

—Short Communication—

## The Effect of Dibutyryl Cyclic Adenosine 3', 5' -Monophosphate on Induction of Malonate Kinase and Isocitrate Lyase in *Acinetobacter calcoaceticus*

Kim, Seong Jun, Young Yil Bahk, and Yu Sam Kim\*

Department of Biochemistry, College of Science, Yonsei University, Seoul, 120, Korea

### *Acinetobacter calcoaceticus*에서 Malonate Kinase와 Isocitrate Lyase 유도에 대한 Dibutyryl Cyclic Adenosine 3', 5' -Monophosphate의 영향

김성준 · 박영일 · 김유삼

연세대학교 이과대학 생화학과

**Abstract:** Malonate kinase and isocitrate lyase were induced in *Acinetobacter calcoaceticus* grown on malonate as a sole carbon source but repressed by succinate. The induction of those two enzymes was stimulated by dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, indicating that the expression of their genes for those enzymes is dependent on cyclic adenosine 3',5' -monophosphate.

**Key Words:** Malonate kinase, Isocitrate lyase, cAMP

Cyclic AMP is known to play an essential role in the initiation of transcription of those genes subject to catabolite repression in many microorganisms (Pastan *et al.* 1970). During catabolite repression of inducible enzyme by glucose, the sugar or its metabolic products is known to cause a lowering of the level of cyclic AMP in a bacterium. Furthermore, it has been demonstrated that the repression of inducible enzyme biosynthesis by glucose in microorganisms can be overcome by adding cyclic AMP in culture medium (Pastan *et al.* 1968). In addition to catabolite repression by glucose, it is of interest to note that in *Pseudomonas aeruginosa* weak repression of the aliphatic amidase by lactate is partially

relieved by cyclic AMP (Clarke *et al.* 1975) and that in *Nocardia salmonicolor* cyclic AMP affects repression of isocitrate lyase induced by fumarate (Higginse *et al.* 1973, Higginse *et al.* 1975). Malonate kinase and isocitrate lyase are induced in *Acinetobacter calcoaceticus* grown on malonate as a sole carbon source (Kim, S.J. & Y.S. Kim, Bahk, Y.Y. & Y.S. Kim, unpublished results). Since the bacteria do not use glucose as a carbon source, glucose effect can not be monitored. However, the biosynthesis of two enzyme is repressed in *A. calcoaceticus* grown on succinate as a sole carbon source. Therefore it is of interest to test whether induction of malonate kinase and isocitrate lyase by malonate in *A. calcoaceticus* is also under same

\*Author to whom correspondence should be addressed.

\*\*This work was supported by a research grant from Korea Science and Engineering Foundation.

type of control involving cyclic AMP as some catabolic enzymes in *E. coli*. In this communication, we present that malonate kinase and isocitrate lyase in *A. calcoaceticus* are dependent on dibutyryl cyclic AMP, which is known to function as cyclic AMP.

## MATERIALS AND METHODS

**Microorganism and Growth-** *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Kim* was maintained on a slant containing malonate as a sole carbon source (Kim, *et al.* 1985). The bacterium was aerobically grown on succinate medium containing 0.6% succinate, 0.3%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  and 0.001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  with shaking at  $30^\circ\text{C}$  for 2.5 hr. The cells were harvested at middle-log phase of cell culture and were washed three times by malonate medium which is the medium described above except the substitution of succinate by malonate.

**Induction of Malonate kinase and Isocitrate lyase-** One gram of the cells described above was resuspended with 100ml of malonate medium in a 500ml triply baffled flask and culture at  $30^\circ\text{C}$  with shaking vigorously. Test culture was supplemented with dibutyryl cyclic AMP to the final concentration of 3mM. 10ml of the control and

the test culture respectively were drawn out for enzyme assay every time.

**Preparation of Cell Extract-** The cells harvested and washed were resuspended in 5ml of 5mM potassium phosphate buffer, pH 7.1, containing 1mM 2-mercaptoethanol and 20mM malonate, and were crushed with sonication in an ice bath with LAB-LINE sonicator. Then the cell extract was centrifugated at  $20,000 \times g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant was used for enzyme assay.

**Enzyme Assay-** Malonate kinase activity was assayed by measuring the formation of malonyl-phosphate through the formation of malonohydroxamate by the modified method of Lipman *et al.* (Lipman *et al.* 1945). The reaction mixture containing (in  $\mu\text{mole}$ ) Tris- HCl, pH 7.4, 100;  $\text{MgCl}_2$ , 10; and the enzyme was preincubated at  $30^\circ\text{C}$  for 15min. Then the reaction started by addition of ATP (10  $\mu\text{mole}$ ) and  $\text{NH}_2\text{OH}$  (200  $\mu\text{mole}$ ) in the final volume of 1ml. The reaction mixture was incubated at  $30^\circ\text{C}$  for 15 min and the reaction was terminated by addition of 1.4ml of 10%  $\text{FeCl}_3$  and 5% trichloroacetic acid in 0.7 N HCl,  $\text{Fe}^{3+}$  formed the malonohydroxamate- $\text{Fe}^{3+}$  complex with red-brown color. Isocitrate lyase was assayed by the method described previously (Jang *et al.* 1982). The amount of protein was determined by the method of Lowry *et al.* with bovine serum albumin

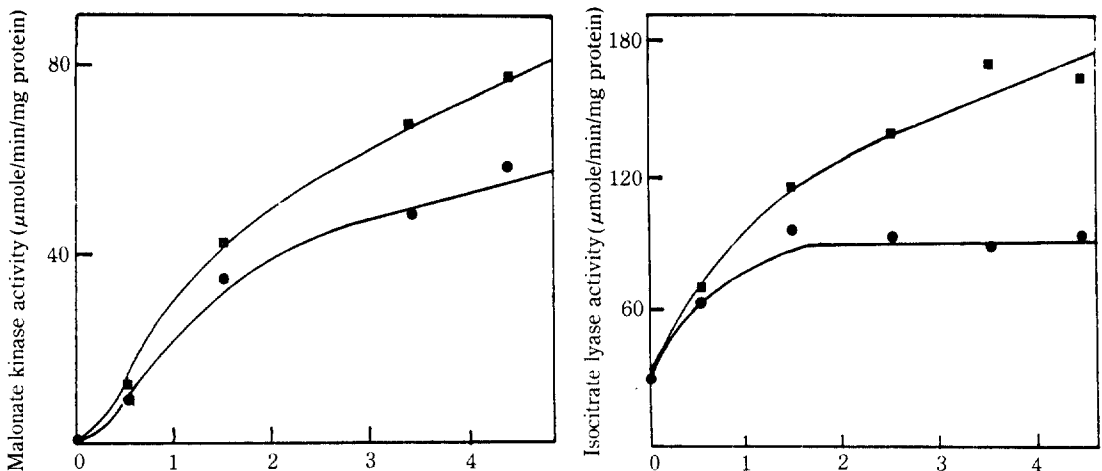


Fig. 1. Effect of dibutyryl cyclic AMP on the induction of malonate kinase (A) and isocitrate lyase (B) in *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Kim*.

●: malonate medium, ■: malonate medium + 3mM dibutyryl cyclic AMP

as standard.

## RESULT AND DISCUSSION

Malonate kinase and isocitrate lyase were induced in *A. calcoaceticus* when that microorganism was transferred from succinate medium to malonate medium. The induction was also stimulated by adding dibutyryl cyclic AMP to the malonate medium as shown on Fig. 1. This result suggests that biosynthesis of these two enzymes may be under the similar type of control as some catabolic enzymes in *E. coli* (Botsford *et al.* 1971). This involves the interaction of the cyclic AMP with an activator protein which then binds to the promoter site of the operon. It is typical examples that repression of  $\beta$ -galactosidase by glucose in *E. coli* can be overcome by adding cyclic AMP as also can be the weak catabolite repression by glucose of tryptophanase (Takahashi, 1975). However, it has been suggested that isocitrate lyase biosynthesis in *E. coli* is regulated only by a repression mechanism involving the intracellular level of phosphoenolpyruvate or other closely related metabolites. Takahashi found that repression of *E. coli* isocitrate lyase by glucose was unaffected

by 3 mM cyclic AMP.

*A. calcoaceticus*, however, do not use glucose as a sole carbon source, diminishing the possibility of phosphoenolpyruvate involvement for isocitrate lyase biosynthesis. In addition to this, cyclic AMP affects the induction of malonate kinase and isocitrate lyase as described above, these results indicate that induction of malonate kinase and isocitrate lyase biosynthesis may be under the similar type of control but not the same by cyclic AMP. At present we do not know the location of genes for these enzymes, the structure of promoter site and, of course, cyclic AMP binding protein in *A. calcoaceticus*. However, we have evidence that the gene for malonate induced malate synthase is located on a plasmid-like DNA in *Pseudomonas fluorescens* (Chae, H.Z., and Y.S. Kim, unpublished data). Considering the proposed metabolic pathway for malonate assimilation in the bacterium; malonate  $\rightarrow$  malonyl CoA  $\rightarrow$  acetyl CoA  $\rightarrow$  glyoxylate cycle, there is possibility that genes for the key enzymes of malonate assimilation are located on the same operon of a plasmid and controlled by the same mechanism including cyclic AMP dependence.

## 적 요

*Acinetobacter calcoaceticus*를 malonate를 탄소원으로 하는 배지에서 배양할 때 malonate kinase와 isocitrate lyase가 유도된다. 그런데 배지속에 dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate를 첨가했을 때 이 효소들의 유도가 촉진되었다. 이러한 사실은 이 효소들의 유도가 cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate에 의해서 조절된다는 사실을 제시하고 있다.

## REFERENCES

1. Anderson, W., B. deCrombrugge, B. Chen, M. Gotteman, P. Nissley, I. Pastan, and R.L. Perlman, 1971, *Lac* DNA, RNA polymerase and cyclic AMP receptor protein, cyclic AMP, *lac* repressor and inducer are the essential elements for controlled *lac* transcription. *Nature, New Biology*, **230**, 139.
2. Botsford, J.L., and R.D. Moss, 1971, Catabolic repression of tryptophanase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **105**, 303.
3. Clarke, P.H., and P.F. Smyth, 1975, Catabolic repression of *Pseudomonas aeruginosa* amidase; the effect of carbon source on amidase synthesis. *J. Gen. Microbiol.*, **90**, 81.
4. Farr, A.L., O.H. Lowry, R.J. Randall, and N.I. Rosebrough, 1951, Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
5. Higginse, I.H., and F.S. Sariaslani, 1973, Control of isocitrate lyase in *Norcardia salmonicolor* (NCIB 9701). *Proc. Soc. Gen. Microbiol.*, **1**, 21.

6. Higginse, I.H., F.S. Sariaslani, and A.W. Westwood, 1975, Control of isocitrate lyase in *Nocardia salmonicolor* (NCIB 9701). *J. Gen. Microbiol.*, **91**, 315.
7. Jang, S.H., and Y.S. Kim, 1982, Isolation of isocitrate lyase from malonate grown *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11250, *Korean Biochem. J.*, **15**, 177.
8. Kim, S.J., and Y.S. Kim, 1985, Isolation of a malonate utilizing *Acinetobacter calcoaceticus* from soil. *Kor. J. Microbiol.*, **23**, 230.
9. Jones, M.E., and F. Lipman, 1955, Aceto-CoA kinase, *Methods in Enzymol.*, **1**, 585.
10. Pastan, I., and R.L. Perlman, 1968, The role of the Lac promoter nucleus in the regulation of  $\beta$ -galactosidase by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **61**, 1336.
11. Pastan, I., B. deCrombrugghe, and R.L. Perlman, 1970, Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science*, **169**, 339.
12. Takahashi, Y., 1975, Effect of glucose and cyclic adenosine monophosphate on the synthesis of succinate dehydrogenase and isocitrate lyase in *Escherichia coli*. *J. Biochem.*, **78**, 1097.

(Received May. 30, 1986)

는 매우 단편적인 것들이 보고되고 있다 (Frehel 등, 1979; Gumpert, 1980; Seo and Kim, 1983). ehel 등, 1979; Gumpert, 1980; Seo 등, 1983). 이러한 미세구조 연구는 전자현미경적 분석을 도입함으로써 어느정도 가능하리라 사료되었기에 본 연구에서는 *Streptomyces lavendulae*의 원형질체 및 원형질체 융합과정에 있어서 원형질막의 변화를 전자현미경을 사용, 추적하여 그 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

*Streptomyces lavendulae* NRRL B-2036을 사용하였으며 Bennet's agar 배지에서 배양하여 4°C에 보관하였다.

### 원형질체 형성

원형질체는 Okanishi 등 (1974)의 방법에 의거하여 만들었으며, 원형질체는 슝으로 여과한 다음 원심분리( $\times 1000g$ , 15분)하여 얻었다.

### 원형질체 융합

정제된 원형질체 덩어리에 polyethylene glycol (PEG; M. W. 6000) 40% 용액을 가한 후 30°C에서 5분동안 반응시킨후 차가운 원형질체 완충액을 가하여 PEG의 작용을 중단시켰다.

### 전자현미경 관찰

정제된 원형질체 및 PEG 처리한 원형질체를

각각 3% (v/v) glutaraldehyde에 전고정 하였으며 전고정이 끝난 시료는 osmotic stabilizer로 여러차례 세척한 후 1% (w/v) osmium tetroxide로 2시간 동안 후고정 하였다. 투과전자현미경(TEM) 관찰을 위하여 후고정한후 각 시료를 2% (w/v) agar에 포매하여 균한 다음 1 mm<sup>3</sup>으로 잘라서 0.5% (w/v) uranyl acetate에서 2시간 세척검 염색하였다. 각 시료의 탈수는 30, 50, 60, 70, 80, 90, 95%의 ethanol로 20분 간격으로 행해졌으며 100% ethanol을 사용하여 2번 탈수하였다. 탈수가 끝난 후 시료는 EPON에 포매하여 24시간 실온에서 방치한후 65°C에서 3일간 중합시켰다. 중합이 끝난후 Sovall MT-2형 ultramicrotome으로 400Å 두께로 자른후 Hitachi H-500형 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였다.

주사전자현미경(SEM) 관찰을 위하여 전고정이 끝난 각 시료를 membrane filter (Millipore, 0.45 $\mu$ m)에 올려서 TEM과 같은 방법으로 후고정 및 탈수하였다. 탈수가 끝난 후 각 시료는 isoamylacetate에 30분 방치한 후 액체 이산화탄소를 이용하여 critical point drier로 건조하였다. 건조후 각 시료는 aluminum stub에 올려져 400Å 두께로 gold coating하여 Hitachi S-450형 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였다.

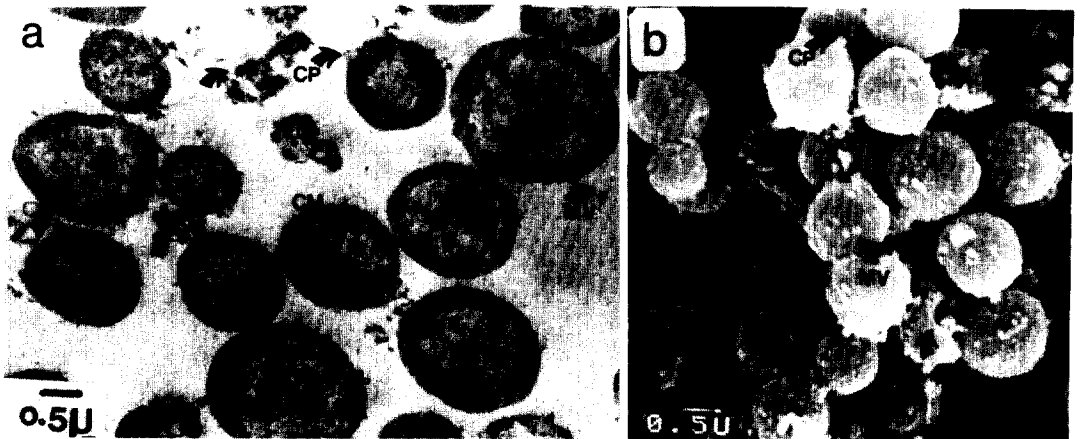


PLATE 1. Transmission and scanning electron microscopic observation of purified protoplasts of *S. lavendulae*.

a) Cytoplasmic membrane(CM), cytoplasm and nuclear region(N) are seen clearly. b) Surface are rough because of many cytoplasmic process.

## 결 과

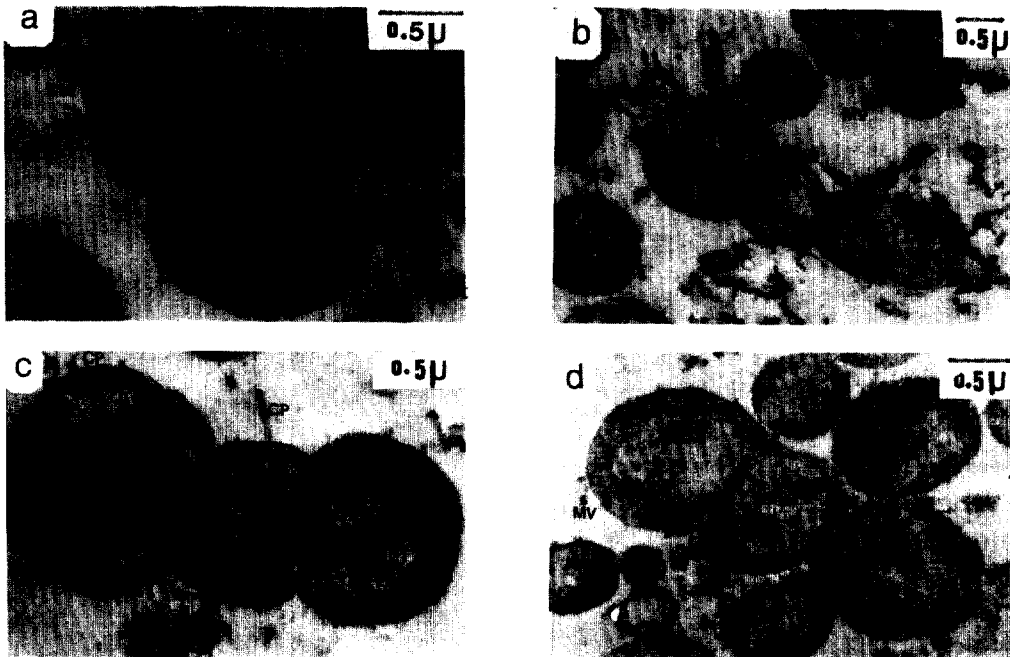
### 생성된 원형질체의 전자현미경적 관찰

*S. lavendulae*의 정상 균사체에 lysozyme 용액을 처리하여 얻어진 원형질체의 초박편을 만든 후 TEM으로 관찰한 바에 의하면 대부분의 원형질체들이 안정한 세포내 구조를 유지하고 있었고 세포막과 세포질, 그리고 분산되어 있거나 혹은 뭉쳐있는 DNA등을 구별할 수 있었다(plate 1-a). 정제된 원형질체의 표면은 세포질의 돌출에 의하여 상당히 거친 형상을 보여주었고 많은 경우에 이러한 세포질 돌출(cytoplasmic process)과 작은 membraneous vesicle이 원형질체 주위와 배지 주변에서 관찰되었다(Plate 1-a, b). TEM 상에서 원형질체가 파열되어 있는 경우와 SEM상에서 원형질체가 함몰되어 있는 경우도 관찰되었다(Plate 1-a, b).

### 원형질체 융합과정의 전자현미경적 관찰

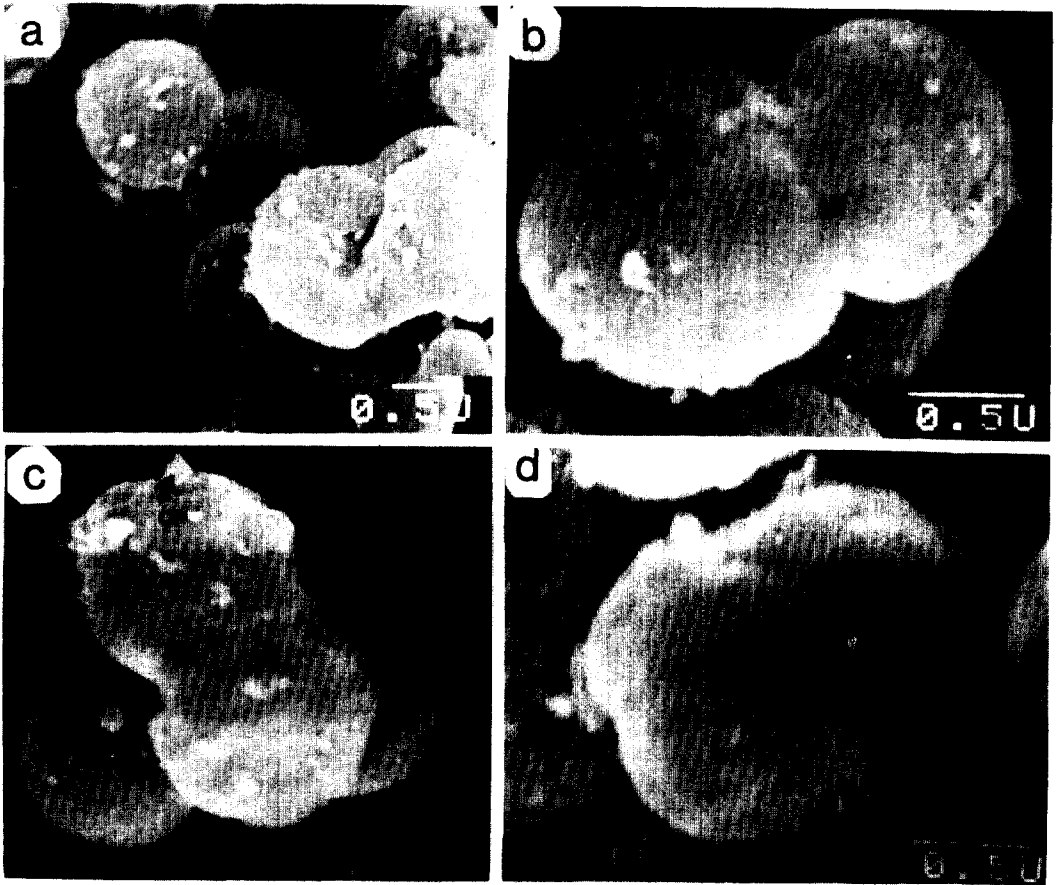
TEM과 SEM을 이용하여 PEG처리한 *S.*

*lavendulae* 원형질체들의 상호작용을 조사하였다. TEM 상에 나타난 원형질체들은 다양한 단계의 융합을 진행하고 있었으며 이때에도 융합체 주위에서 빈 껍데기 원형질체(ghost protoplast), 원형질체 밖으로 빠져나온 DNA, 원형질체출(CP), membraneous vesicle등을 관찰할 수 있었다(Plate-2). 또한 두 원형질체 사이에서 일어나는 집합(Plate 2-a) 이외에도 셋이상의 원형질체들이 한꺼번에 융합에 참여하는 경우도 빈번히 관찰되었다(Plate 2-b, c, d). TEM과 SEM 상에 나타난 원형질체들의 개략적인 융합과정은 다음과같이 관찰되었다. 맨 먼저 커다란 접촉지역(contact zone)이 두 세포막 사이에 형성되는 것이 TEM 상에 나타났으며, SEM 상에서는 이원형(bispherical shape)의 융합체가 명확한 경계선에 의해 구별이 되었다(Plate 2-b, 3-a). 다음에 TEM 상에서 접촉지역이 약간 넓어진 공간으로 변화되는 양상을 보였고 SEM상에서는 원형질체 사이의 외형이 모호하게 되었으며(Plate



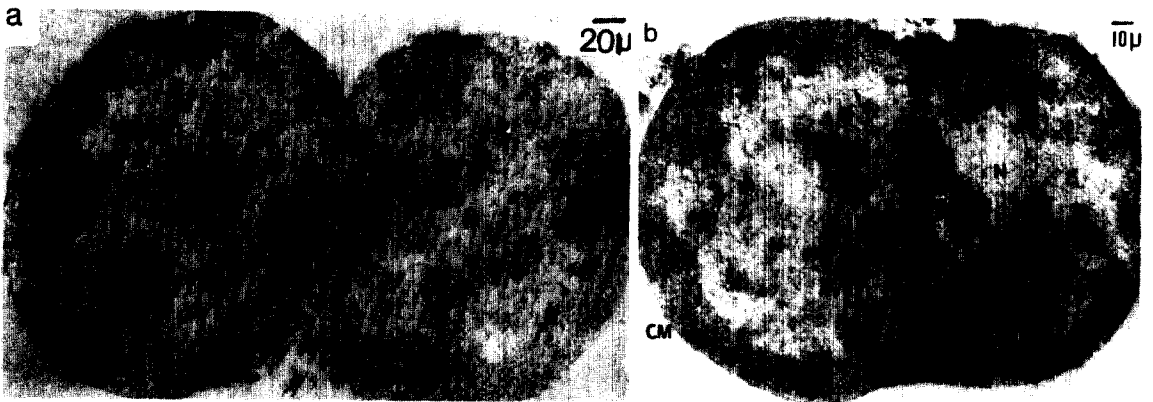
**PLATE 2.** Transmission electron microscopic observation of protoplasts and fusants of *S. lavendulae*. Two or more protoplasts are fusing together (a and b-d respectively).

Abbreviation: MV, membraneous vesicle; G, ghost; T, threads of DNA; CZ, contact zone; SZ, separation zone; FZ, fusion zone; CP, cytoplasmic process.



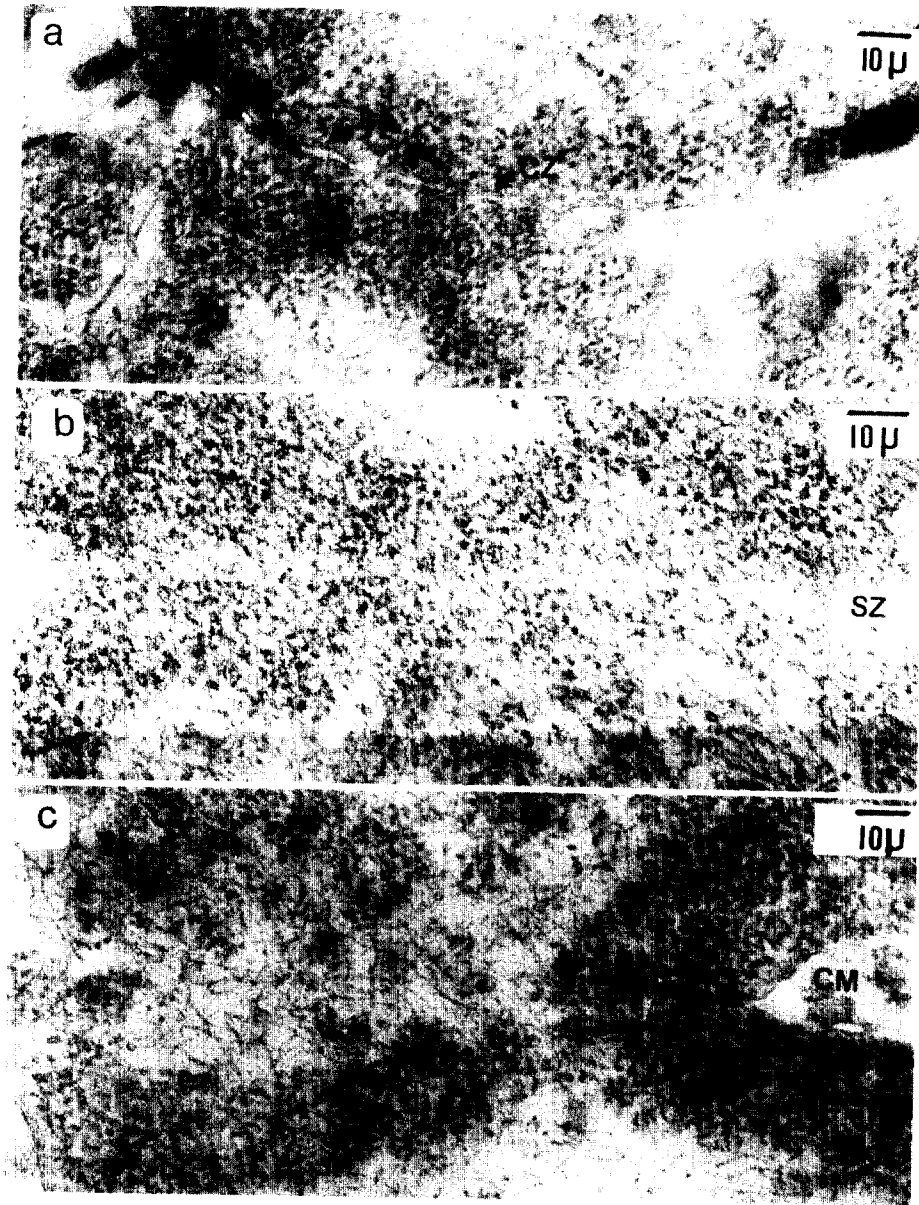
**PLATE 3.** Scanning electron microscopic observation of fusion procedures of *S. lavendulae*. Arrows indicate the regions that fusions are occurring.

a) Contact of protoplasts. b-c) Two protoplasts are still distinguishable. d) Boundary line becomes somewhat obscure.



**PLATE 4.** Gross transmission electron microscopic observation of fusion procedures of *S. lavendulae*.

a) Fusion zone is formed but the cytoplasmic membrane is not broken completely. b) Cytoplasmic membrane is disappeared completely.



**PLATE 5.** Detailed transmission electron microscopic observation of fusing protoplasts

a) Membrane is still separated by electron transparent space. Several cytoplasmic contact and fusion zones are formed via cytoplasmic bridge. b) Typical membrane is dispersed and non-membraneous separation zone is formed. c) There is no membraneous structure between two protoplasts.

2-b, 3-b), 점차로 접촉지역의 세포막이 없어지면서 비막성 분리지역(non-membraneous separation zone)이 생성되어 뚜렷한 장벽이 존재하지 않으면서도 아직 두 원형질체가 분리되어 있는 양상이 TEM 상에서 관찰되었다. 이

경우 SEM 상에서는 두 원형질체의 외형이 구분이 안되는 융합체가 관찰되었다(Plate 2-a, b, 3-c, 4-a). 마지막으로 두 원형질체의 내용물들이 서로 섞이게 되어 분리지역이 사라진 양상을 TEM 상에서 볼 수 있었으며, SEM 에서



는 정상 원형질체보다 상당히 커진 타원형의 융합체를 관찰할 수 있었다(Plate 4-b, 3-d). 이상의 사실들을 좀더 자세하게 이해하고자 하는 목적으로 융합하고 있는 두 원형질체의 접촉 지역을 확대하여 관찰하였다. 이때 세포막들은 아직 electron transparent space 에 의하여 구분이 되었으며 점점 접촉지역의 바깥쪽 세포막들이 부분적으로 소실되면서 공간이 확대된 융합지역(fusion zone)으로 변화되는 것을 관찰할 수 있었다(Plate 5-a). 이 융합지역은 세포막이 완전하게 없어졌음에도 아직 원형질과 DNA가 어떤 장벽에 의하여 구분이 되어 있는 분리지역으로 변화되었으며(Plate 5-b) 점차 원형질과 DNA가 섞이게 되어 두 원형질체의 원형질과 DNA 사이에 아무런 장벽도 존재하지 않게된 완전한 융합체가 관찰되었다(Plate 5-c).

## 고 찰

*S. lavendulae* 원형질체의 초박편 관찰에서는 대부분의 원형질체들이 안정한 형태를 유지하고 있었다. 간혹 발견되는 파열된 원형질체(Plate 1-a) 및 함몰된 원형질체(Plate 1-b) 등의 불완전한 원형질체는 시료조작시의 잘못이나 원형질체 자체의 불안정성에 기인하는 때문이라 사료된다.

TEM 상에서 관찰된 원형질체들의 융합과정은 Gumpert(1980)가 *S. hygroscopicus* 에서 관찰한 사실들과 유사하였으며, SEM 상에서

나타나는 융합과정도 TEM 상에 나타난 결과들과 비교하였을 때 비슷한 과정이라 추측되는 양상들을 관찰할 수 있었다. 융합의 초기에 형성되는 접촉지역은 전형적인 이중막구조의 세포막들이 접촉되어 네겹의 막구조를 이루게 되며(Plate 5-a) 접촉지역에서 융합지역으로 변화되는 과정에서는 Gumpert(1980)가 발견한 fusion bridges 형성과정을 거칠 것으로 사료된다. 이 융합지역은 Robinson등(1979)과 Cullis and Hope(1978)들이 제안한 융합막(fusion membrane)에 의하여 유지되었고(Plate 5-a), 점차적으로 융합지역을 유지하던 융합막들이 없어지면서 분리지역으로 변화되었는데(Plate 5-b), 뚜렷한 장애물이 없어도 두 원형질이 분리되어 있는 이유는 지질성분이 중간에 밀집되어 있기 때문이라 사료된다(Gumpert, 1980). 이와같은 관찰을 통하여 우리는 원형질체 융합시 접촉부위에서 일어나는 미세구조적이고 외형적인 변화가 몇단계를 거쳐 수행된다는 것을 추측할 수 있었는데, 이러한 추측은 우리가 지금까지 알고있는 전형적인 세포막구조의 변화와 이원형의 점차적인 소실에 의하여 뒷받침될 수 있으므로 이러한 변화들을 융합과정에서의 각 단계로 해석하는 것이 가능하리라 사료된다. 원형질체 융합이 동시에 일어나지 않으며 각 융합체들의 융합은 같은 속도로 진행되지 않는다는 것은 위의 관찰에서 확인되었고 이러한 결과들은 Frehel 등(1979), Gumpert(1980)와 Kim(1983)들이 보고한 사실들과 잘 일치되었다.

## 적 요

*Streptomyces lavendulae*에서 생성된 원형질체 및 원형질체 융합과정에 대한 미세구조 및 형태학적 관찰을 투과전자현미경과 주사전자현미경을 사용하여 행하였다. 생성된 원형질체들은 고장액에서 대체로 안정하였으나 간혹 변형된 원형질체들이 관찰되었다. 원형질체 융합은 접촉지역, 융합지역, 분리지역 형성과정을 차례로 거치면서 진행되는 것이 관찰되었다. 이러한 사실은 세포막 구조의 변화와 이원형의 점차적인 소실에 의하여 뒷받침이 될 수 있으므로 이러한 변화들을 융합과정에서의 각 단계로 해석하는 것이 가능하리라 사료된다.

## REFERENCES

1. Baltz, R.H., 1978. Genetic recombination

in *Streptomyces fradiae* by protoplast fusion and cell regeneration. *J. Gen. Microbiol.* **107**, 93-102.

2. Cullis, P.R., and M.J. Hope, 1978. Effects of fusogenic agent on membrane structure of erythrocyte ghosts and the mechanism of membrane fusion. *Nature* **271**, 672-674.
3. Frehel, C., Anne-Marie Lheritier, C. Sanchez-Rivas, and F. Schaeffer, 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**, 1346-1353.
4. Gumpert, J., 1980. Electron microscopic analysis of protoplast fusion in *Streptomyces hygroscopicus* and consideration on structural alterations in fusing membranes. *Arch. Microbiol.* **126**, 263-269.
5. Harquis, R.F. and T.R. Comer, 1976. Isolation and properties of bacterial protoplast. In "Microbial and plant protoplast" (Peberdy, J.F., et al., ed.) pp.1-22. Academic Press. London.
6. Hopwood, D.A., H.M. Wright, M.J. Bibb, and S.N. Cohen, 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature* **268**, 171-174.
7. Hopwood, D.A. and H.M. Wright, 1978. Bacterial protoplast fusion: Recombination in fused protoplasts of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Gen. Genet.* **102**, 307-317.
8. Hopwood, D.A. and H.M. Wright, 1979. Factors affecting recombination frequency in protoplast fusion of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 137-143.
9. Kim, K.S., 1983. Application of protoplast fusion technique to the genetic studies of antibiotic producing *Micromonospora* spp. Ph. D. Thesis, KAIST, Korea.
10. Nakano, K.M., H. Ishihara, and H. Ogawara, 1982. Fusion of protoplasts of *Streptomyces lavendulae*. *J. Antibiotics* **35**, 359-363.
11. Ochi, K., 1982. Protoplast fusion permits high-frequency transfer of a *Streptomyces* determinant which mediate actinomycin synthesis. *J. Bacteriol.* **150**, 592-597.
12. Ochi, K., M.J.M. Hitchcock, and E. Katz, 1979. High-frequency fusion of *Streptomyces parvulus* or *Streptomyces antibioticus* protoplast induced by polyethylene glycol. *J. Bacteriol.* **139**, 984-992.
13. Okanish, M., K. Suzuki, and H. Umezawa, 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts; Cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 389-400.
14. Robinson, J.M., D.S. Roos, R.L. Davidson, and M.J. Karnovsky, 1979. Membrane alterations and other morphological features associated with polyethyleneglycol-induced cell fusion. *J. Cell. Sci.* **40**, 63-75.
15. Seo, Y.H., and C.S. Kim, 1983. Ultrastructure of *Micromonospora rosaria* protoplast and their fusion. *Kor. J. Electron Microscopy* **13**, 31-40.
16. Wesseling, A.C., and B.C. Lago, 1981. Strain improvement by genetic recombination of cephamycin producers, *Nocardia lactamadurans* and *Streptomyces griseus*. *Devel. Ind. Microbiol.* **22**, 641-651.

(Received Aug. 16, 1986)