

대장균의 형태형성 변이주의 계면활성제 감수성

전병권 · 박성대 · 임시규 · 박 완*
경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Detergent Sensitivity of *mrdA* and *mrdB* Shape-Forming Mutants of *Escherichia coli*

Jun, Byoung-Kwon, Sung-Dae Park, Si-Kyu Lim and Wan Park*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — *Escherichia coli* *mrdA*s and *mrdB*s mutants forming spherical cells at 42°C, were employed to investigate the possible role of both inner and outer membrane structures in the determination of cell shape of gram-negative cells. Spherical cells, but not rod-shaped wild types, were specifically killed by anionic detergents, such as sarkosyl, sodium dodecylsulfate and sodium deoxycholate. From the spherical intact cells grown overnight at 42°C, much more proteins were released by sarkosyl. However, nonionic detergent like Triton X-100 which showed no inhibition of growth of spherical cells extracted little amounts of proteins from spherical intact cells as well as from rod-shaped cells. Analyses of membrane fractions of spherical cells by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed that there were apparently reduced amounts of major outer membrane proteins and also some changes in the pattern of inner membrane proteins. Based on these results showing the differences in physicochemical properties of the membrane structures of spherical and rod-shaped cells, we suggest that the determination of cell shape in *E. coli* cells might be associated with both outer and inner membrane structures along with peptidoglycan.

대장균의 세포표층은 안쪽으로부터 세포질막(내막), 세포벽 peptidoglycan, 외막의 3층 구조로 되어 있다. 이 중에서 peptidoglycan은 기계적으로 가장 강한 강구조체로, 세포골격 구조계를 갖지 않는 대장균 세포의 신장, 형태형성, 세포분열 등의 세포복제와 밀접한 관계를 갖고 있다고 알려져 있다. 즉 페니실린 유도체들의 각각의 페니실린 결합단백질(Penicillin-binding Protein, PBP)에 대한 친화성 실험(1, 2, 5, 11), PBP의 온도 감수성 변이주의 해석(3, 7, 13) 등을 통하여 PBP는 세포의 신장(3, 4), 세포분열(3, 5, 6), 형태형성(1, 13, 14) 등의 세포주기상 필수적인 단백질로 세포벽 peptidoglycan 합성효소임이 밝혀져(6-8), 세포벽 peptidoglycan의 생합성이 세균세포복제와 밀접한 관련이 있음을 강력하게 시사하고 있다(9-12). 실제

대장균 염색체상 71분 부근의 *mre* 유전자군(15, 16)과 함께 대장균 세포의 간균형태 형성 기능을 갖고 있는 15분 부근의 *mrd* 유전자군(13, 14) 중에서 PBP 2 (*mrdA*)(1)와 RodA(*mrdB*) 단백질은 공동작용으로 세포벽 peptidoglycan 합성반응 즉 transglycosylase에 의한 중합반응과 transpeptidase에 의한 가교반응을 할 수 있음이 알려져 있다(8, 11, 16). 이들 유전자군에 변이가 일어나면 간균형의 대장균세포는 구형으로 바뀌게 되는데, peptidoglycan 생합성 활성의 변화가 어떠한 기작에 의해 형태형성에 영향을 미치는가에 대해서는 전혀 알려져 있지 않으나, 그람 음성세균인 대장균의 형태형성은 세포벽 peptidoglycan 뿐만 아니라 이를 둘러싸고 있는 막구조와의 상호작용에 의해서 이루어질 가능성도 생각해 볼 수 있다. 본 연구에서는 생체막에 작용하는 계면활성제(20, 21)에 대한 *mrdA*, *mrdB* 형태형성 변이주의 거동을 조사하여 형태형성에 있어서 막구조의 관련 가능성(17-19)을

Key words: Shape-forming mutant, *mrdA*, *mrdB*, detergent sensitivity, cell envelope, *E. coli*

*Corresponding author

고찰해 보고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 대장균의 균주는 Table 1과 같다.

배지

세균의 배양에는 L-broth(Lennox broth(24), 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% glucose, pH 7.0)에 lipoic acid를 1당 50 μ g을 첨가해 사용하였으며 배지의 고화에는 agar 2%를 사용했다. 계면활성제 sarkosyl, Na-deoxycholate(Na-Doc), sodium dodecyl sulfate(SDS), TritonX-100, Brij 58, hexadecyltrimethylammonium bromide(HTAB)는 백배 보존용액을 L-broth에 첨가하여 사용했다. 균의 증식 및 용균정도는 660 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

계면활성제 감수성시험

하룻밤 배양한 균액을 백배 희석하여 고체평판 배지상에 희석하고 이와 교차되게 희석의 중앙부위에 10% 계면활성제 용액에 적신 filter paper strip(2 mm \times 80 mm)을 놓고 30 $^{\circ}$ C, 42 $^{\circ}$ C 에서 하룻밤 배양한 뒤 계면활성제에 의해 생육이 저지된 길이를 측정하였다. 또는 단계적으로 희석된 계면활성제를 함유한 5 ml L-broth에 하룻밤 배양된 균체를 1% 접종하고 (배지 1 ml당 10^7 세포수 이하) 30 $^{\circ}$ C, 42 $^{\circ}$ C 에서 18시간 진탕배양한 후, 육안으로 관찰하여 탁도가 인정되지 않는 최소농도의 시험관을 최소생육저지농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)로 나타내었다.

최소사멸농도(Minimal Bactericidal Concentration, MBC)의 측정

MIC 측정을 위한 실험에서 증식이 인정되지 않는 시험관의 배양액을 일정량 취하여 천 배 또는 만 배 희석에 의하여 계면활성제를 제거하면서 한천평판배지에 도말하여 30 $^{\circ}$ C 에서 24시간 배양하여 콜로니의 증식이 관찰되지 않는 최소농도를 MBC로 하였다. 이때 99.9%의 콜로니 형성능의 감소를 실제 콜로니의 증식이 일어나지 않는 것으로 하였다.

계면활성제에 의한 생세포 단백질의 추출

30 $^{\circ}$ C 및 42 $^{\circ}$ C 에서 하룻밤 배양한 균체를 집균하여

Table 1. *Escherichia coli* strains used

Strain	Relevant properties	Reference or Source
AT 1325	lip9 F ⁻ <i>lip-9 thi-1 proA2 his-4 purB15 mtl-1 xyl-5 galK12 lacY1 str-35</i>	CGSC 4286 (14)
TMM 23	As AT1325 lip9 but lip ⁺ <i>mrdAts</i>	(14)
TMM 24	As AT1325 lip9 but lip ⁺ <i>mrdBts</i>	(14)

배양액 1/10 용량의 50 mM Tris-HCl, 10⁻⁴ M MgCl₂, pH 7.6 완충액으로 1회 씻은 후 균체의 농도가 같도록 흡광도로 조정하면서 완충액으로 현탁하였다. 이들 세포현탁액 일정량에 계면활성제의 농도가 1% 되도록 첨가하고 때때로 흔들어 주면서 시간별로 일정량의 현탁액을 취하여 원심침전 후 얻어지는 상청액의 단백질의 농도를 측정하였다. 균체 집균에서 추출에 이르기까지의 전과정은 4 $^{\circ}$ C 이하에서 행하였다.

세포막 분리조제

L-broth에서 흡광도 A₆₆₀=1 정도까지 증식한 균을 원심집균하여 배양액의 1/10 용량의 50 mM Tris-HCl, 10⁻⁴ M MgCl₂, pH 7.6 완충액으로 균체를 씻고, 배양액 1/20 용량의 동일 완충액으로 현탁 후 초음파 파쇄를 한 다음 세포잔사를 제거하고 10만 \times g, 30분간 초원심 분리하여 얻은 침전물을 동일 완충액으로 1회 씻은 후 소량의 완충액에 현탁하여 세포막 부분을 조제했다(8). 위의 모든 과정은 4 $^{\circ}$ C 이하에서 조작하였으며, 조제한 막단백질은 -70 $^{\circ}$ C 에 보존하면서 사용하였다.

계면활성제에 의한 세포막 단백질의 분획

동일한 양의 상기 세포막 조제품을 취하여 sarkosyl을 최종농도가 1%되게 첨가하여 얼음에서 때때로 흔들어 주면서 30분간 방치한 후 10만 \times g에서 30분간 초원심분리하여 sarkosyl 가용성 분획은 내막단백질로, sarkosyl 불용성의 잔사는 동일 용량의 완충액에 현탁하여 외막단백질로 분획하였다(21).

단백질의 정량

생세포로부터 계면활성제에 의해 추출된 단백질과 막단백질 등의 단백질정량은 bovine serum albumin을 표준물질로하여 Lowry 방법(25)에 따랐다.

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Laemmli의 방법(26)에 따라 전기영동을 한 후 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 염색관찰하였다. Acrylamide gel의 농도는 경우에 따라 10~12.5%로 조정했으며, 시료는 SDS와 mercaptoethanol의 존재 하에 100°C에서 2분간 처리하였다.

시약

모든 계면활성제는 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며 그외 시약은 시판 특급 시약을 구입 사용했다.

결 과

형태형성 변이주의 계면활성제에 대한 감수성

생체막에 작용하여 생체막을 가용화, 해체시키는 성질을 갖고 있는 계면활성제에 대한 형태형성 변이주의 감수성을 filter paper strip에 의한 cross-streak법으로 조사한 결과는 Table 2와 같다. Triton X-100과 Brij 58과 같은 중성 계면활성제는 친주나 변이주의 생육에 아무런 영향을 주지 않으나, HTAB와 같은 양이온성 계면활성제는 친주와 변이주의 구분없이 비특이적으로 모든 균주의 생육을 저해하는 것을 볼 수 있다. 한편, sarkosyl, SDS, Na-DOC와 같은 음이온성 계면활성제는 친주에 대해서는 온도에 상관없이 거의 영향이 없으나, 온도감수성인 형태형성 변이주인 TMM 23(*mrdA*ts), TMM 24(*mrdB*ts)에 대해서는 야생형인 간균형태를 나타내는 30°C에서는 별다른 영향이 없으나 변이형인 구형으로 형태가 바뀌는 42°C에서는 이들의 생육을 특이적으로 저해했다.

형태형성 변이주에 대한 sarkosyl의 생육저해양식

mrdA, *mrdB* 형태형성변이주에 대해 특이적인 생육저해 작용을 나타내는 음이온성 계면활성제 중에서 대장균 내막을 선택적으로 가용화시킬 수 있다고 알려져 있는 sarkosyl(21)을 선택하여 이의 최소생육저지농도 및 최소사멸농도를 구하였다. 두 균 모두 MIC와 MBC가 동일한 값을 나타내었는데 TMM 23(*mrdA*ts)은 0.1%, TMM 24(*mrdB*ts)는 0.3%였다(Table 3). 즉 sarkosyl은 정균적이 아닌 살균적인 양식으로 형태형성 변이주의 증식을 저해하는 것으로 생각된다. 또 이들 각 균의 세포를 ml당 10⁸으로 하고 sarkosyl의 농도를 MIC 또는 MIC의 3배로 하여 42°C에서 시간별로 탁도의 변화와 콜로니 형성능을 측정된 결과 탁도의 감소는 미미한데 비하여 콜로니 형성능은 4시간 이후부터 급격히 감소하는 것으로 보아 용균작용에 의한 살균은 아닐 것으로 생각된다(자료 미제시).

형태형성 변이주 생세포에 대한 sarkosyl의 단백질 성분 추출 특성

형태형성 변이주에 대하여 특이적인 생육저해 작용을 나타내는 sarkosyl의 작용양식을 살펴보기 위하

Table 3. MIC and MBC of sarkosyl against *mrdA*ts and *mrdB*ts mutants^a

Strain	Temp.(°C)	MIC(%)	MBC(%)
AT 1325 lip9	30	3<	3<
	42	3<	3<
TMM 23(<i>mrdA</i> ts)	30	3<	3<
	42	0.1	0.1
TMM 24(<i>mrdB</i> ts)	30	3<	3<
	42	0.3	0.3

^aMIC and MBC were determined by three-fold dilution test, see Materials and Methods.

Table 2. Detergent sensitivity of *mrdA*ts and *mrdB*ts mutant strains of *E. coli*^a

Detergent	Anionic				Nonionic				Cationic			
	Sarkosyl		SDS		Na-DOC		Triton X-100		Brij58		HTAB	
Temp.(°C)	30	42	30	42	30	42	30	42	30	42	30	42
AT 1325 lip9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8
TMM 23(<i>mrdA</i> ts)	0	13	0	10	0	12	0	0	0	0	7.5	8.5
TMM 24(<i>mrdB</i> ts)	0	10	0	11	0	12	0	0	0	0	7.5	8

^aDetergent sensitivities were examined by the paper strip method described in Materials and Methods. Values are expressed as length of inhibition zone in mm.

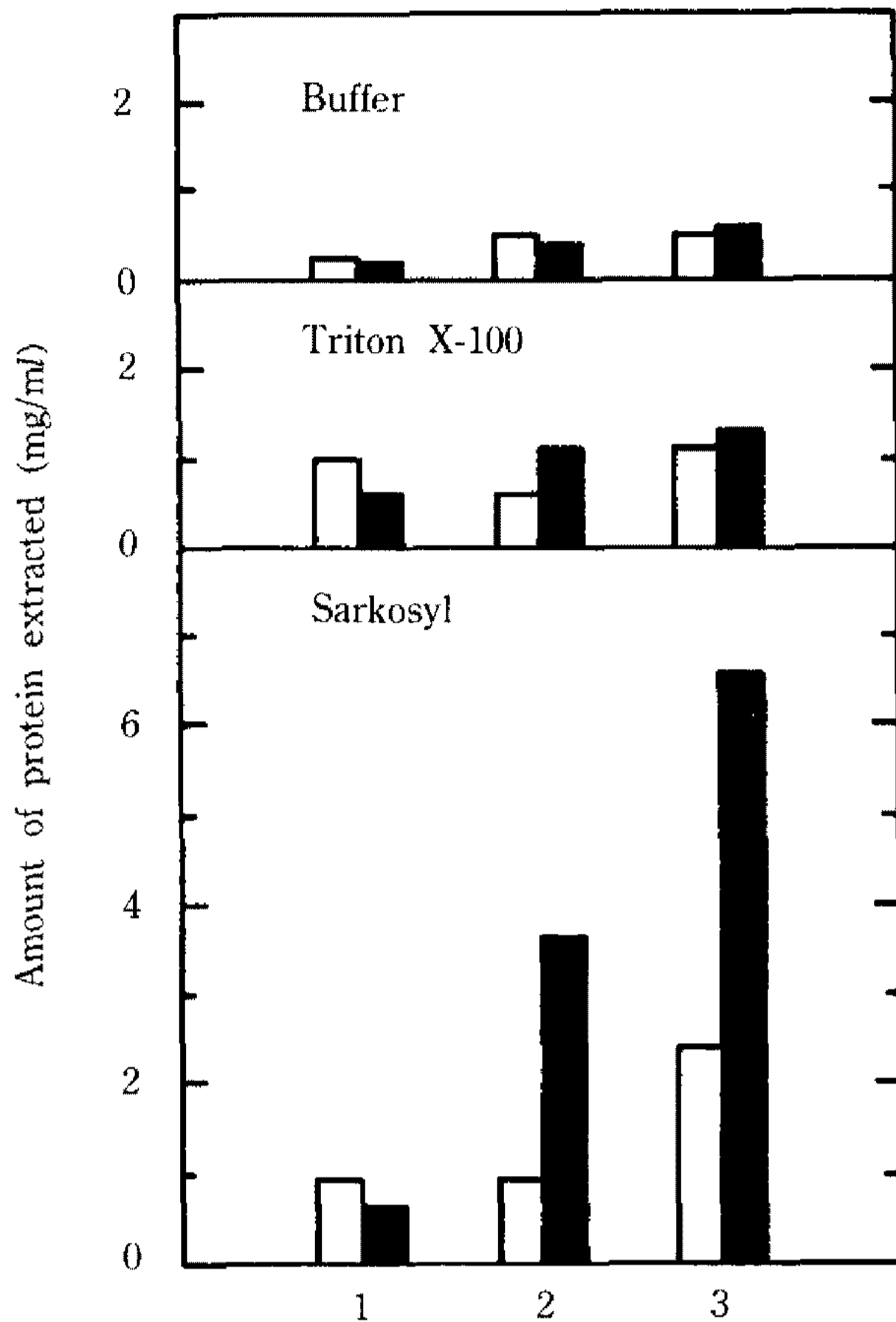


Fig. 1. The amount of proteins extracted in detergent solution from rod-shaped(open bar) and spherical(solid bar) intact cells of *mrdAts*(TMM 23) and *mrdBts*(TMM 24) mutant strains.

Cells were harvested from overnight cultures grown at either 30°C or 42°C, washed and suspended to equal density in 50 mM Tris-HCl, 10⁻⁴ M MgCl₂, pH 7.6. The cell suspensions were treated with 1% detergent at 4°C for 30 min. Lanes: 1, AT1325 lip9(parent); 2, TMM 23(*mrdAts*); 3, TMM 24(*mrdBts*)

여 생세포에 대한 단백질 추출특성을 조사하였다. 30°C 와 42°C 에서 각각 하룻밤 진탕배양한 친주, TMM 23(*mrdAts*) 및 TMM 24(*mrdBts*)의 생세포를 sarkosyl 및 변이주에 대해 생육저해작용을 나타내지 않는 Triton X-100을 각 1% 용액으로 30분 또는 120분간 처리하여 추출된 단백질의 양을 정량하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. TMM 23(*mrdAts*), TMM 24(*mrdBts*) 모두, 30°C 배양에 의해 얻어진 간균형태의 세포에 비해 구균형태의 42°C 의 생세포는 sarkosyl에 의해 훨씬 많은 양의 단백질이 추출되었음을 알 수 있다. 추출되는 단백질의 양은 30분까지는 급격하게 증가되었으나 그 이후 2시간까지는 완만하게 증가되었다(자료 미제시). 또한 TMM 24(*mrdBts*)는 TMM

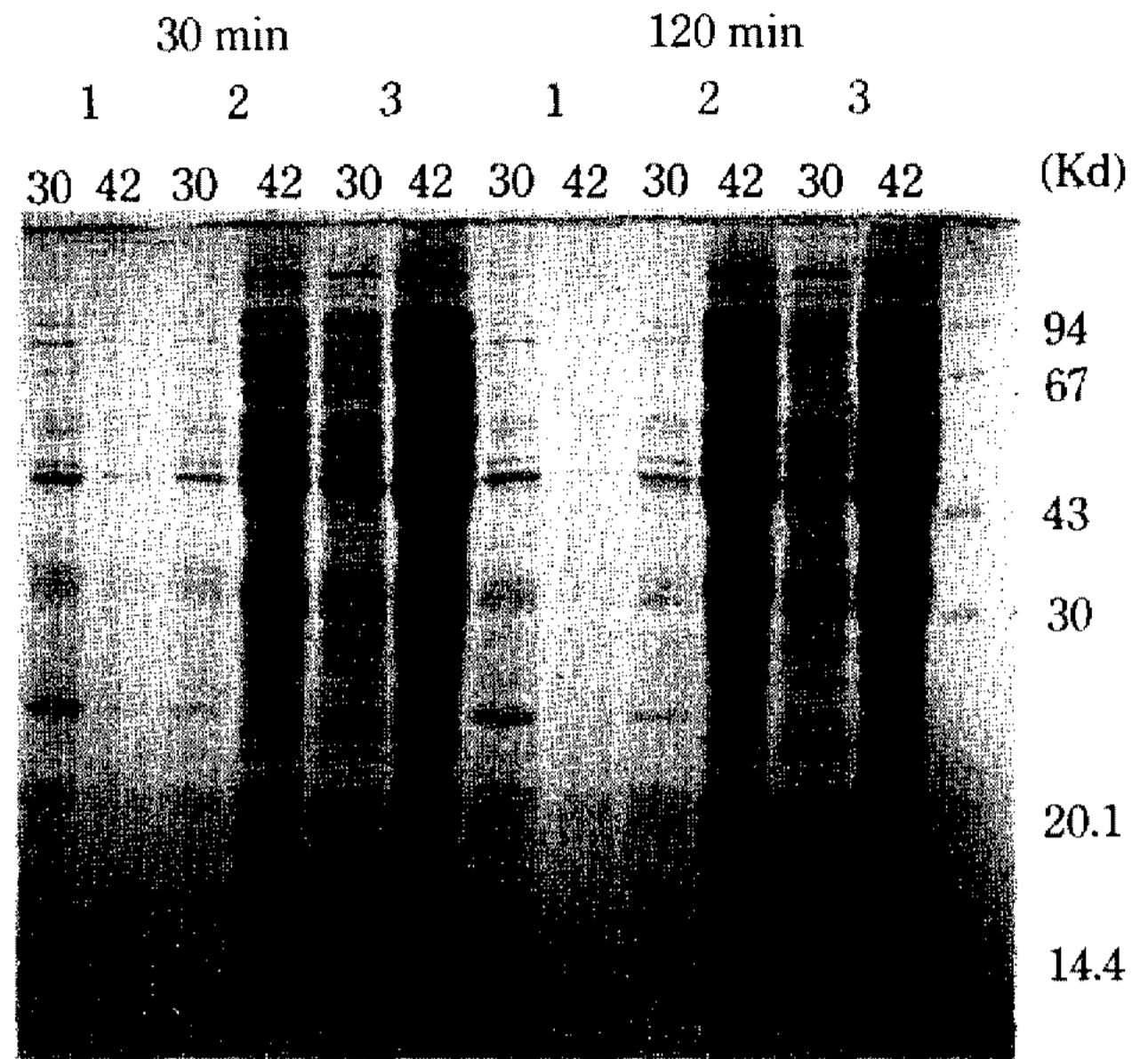


Fig. 2. Protein profiles of sarkosyl-extracts from rod-shaped and spherical intact cells of *mrdAts*(TMM 23) and *mrdBts*(TMM 24) mutants on 12.5% SDS-polyacrylamide gel.

Samples used are the same as in Fig. 1. The molecular weights of marker proteins are indicated. Lanes: 1, AT1325 lip9(parent); 2, TMM 23(*mrdAts*); 3, TMM 24(*mrdBts*)

23(*mrdAts*)에 비해 각 온도에서 유리되는 단백질의 양이 상대적으로 많음을 볼 수 있는데 이는 변이의 차이를 반영하는지는 분명하지 않다. 한편 생육저해 작용을 나타내지 않는 Triton X-100은 계면활성제가 함유되어 있지 않은 대조구와 큰 차이를 볼 수 없었다. 이들 추출된 단백질을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석해본 결과, 배양온도, 추출시간에 따른 특이적인 단백질밴드의 뚜렷한 차이는 발견할 수 없었고 전체적으로 단백질의 양적인 차이만 볼 수 있었다(Fig. 2).

온도감수성 형태형성 변이주의 막 단백질의 양상

형태형성 변이주의 세포 표층의 분자적 특성과 구조적 차이를 밝히기 위한 수단으로 생세포에 대한 계면활성제의 추출 특성을 살펴본데 이어서 내막과 외막 단백질의 구성 양상을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동상에서 살펴보았다. 30°C 와 42°C 에서 각각 배양한 TMM 23(*mrdAts*)과 TMM 24(*mrdBts*)의 균체로부터 조제한 막 부분을 sarkosyl의 가용화에 의해 내막 단백질과 외막 단백질로 분리하여 그 구성양상을 조사해본 결과는 Fig. 3과 같다. 외막의 경우 TMM 23(*mrdAts*), TMM 24(*mrdBts*) 모두 야생형의 간균

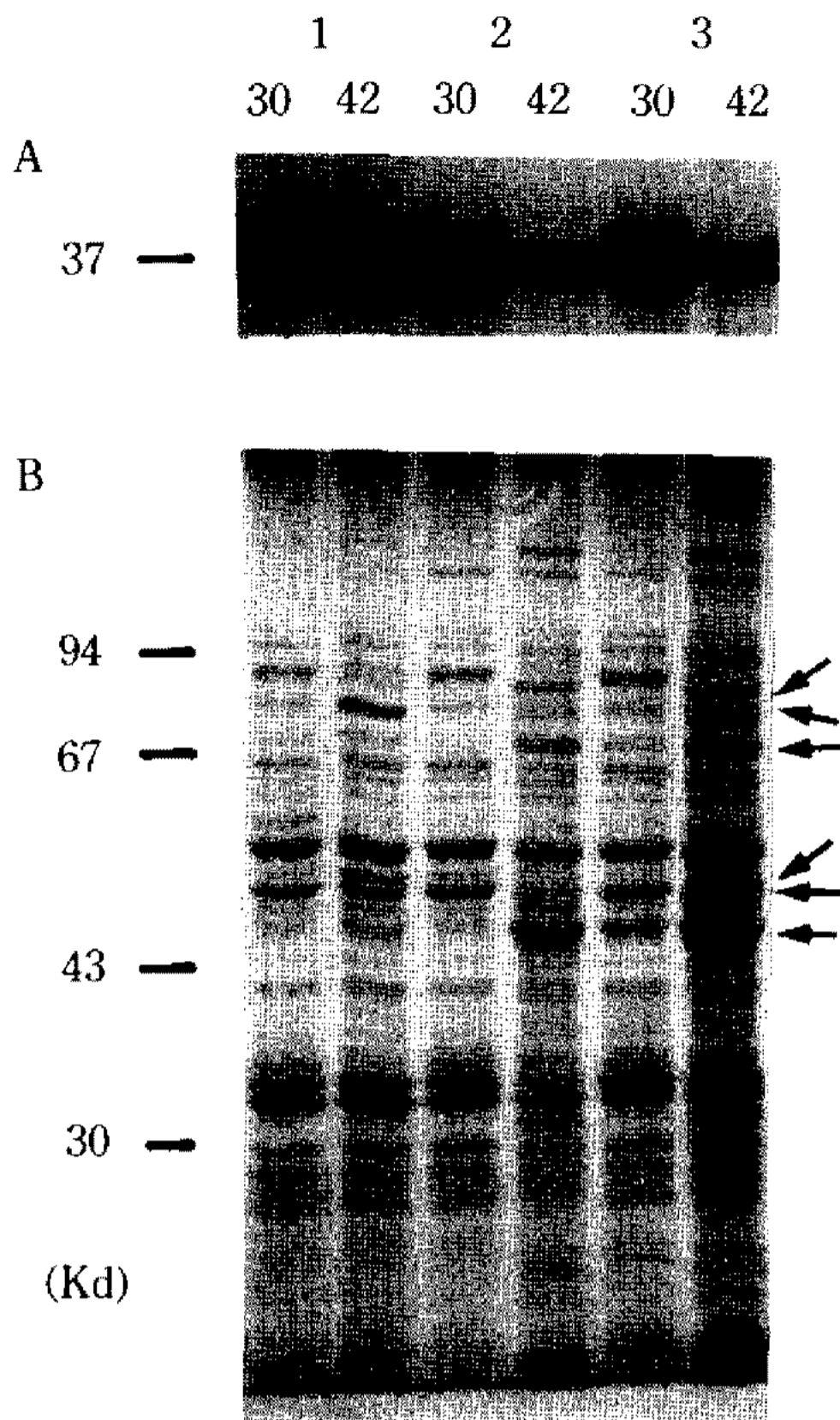


Fig. 3. Protein profiles of outer membrane(A) and inner membrane(B) fraction of rod-shaped and spherical cells of *mrdAts*(TMM 23) and *mrdBts*(TMM 24) mutants on 10% SDS-polyacrylamide gel.

Panel(A) shows the portion of the gel which presented the major outer membrane proteins. Arrows point to the changes in the pattern of inner membrane proteins of spherical cells. The molecular weights of marker proteins are indicated. Lanes: 1, AT1325 lip9(parent); 2, TMM 23(*mrdAts*); 3, TMM 24(*mrdBts*)

형태를 나타내는 30°C에서 배양한 균의 주요 외막 단백질(OmpF, OmpC, OmpA)은 다량 존재하고 있는 반면, 42°C에서 배양한 변이형인 구균형태의 세포 경우는 주요 외막단백질의 뚜렷한 감소를 관찰할 수 있었다. 내막의 경우도 82, 74, 65, 54, 50, 46 Kd 등 여러 막단백질의 조성의 변화를 볼 수 있었다.

고 찰

생체막 구조에 작용해서 생체막을 가용화 해체할 수 있는 성질을 가진 계면활성제들을 peptidoglycan 생합성 관련 유전자 *mrdA*(*pbp2*), *mrdB*(*rodA*)의 온도 감수성 변이를 가진 형태형성 변이주에 작용시켜 보면 정확한 이유는 알 수 없으나 음이온성 계면활성제인 sarkosyl, SDS, Na-DOC에 의해서 간균(Rod⁺)일 때는

생육에 저해를 받지 않으나 변이형인 구균(Rod⁻)으로 형태가 바뀔 때에는 특이적으로 생육에 저해를 받아 사멸하게 됨을 관찰할 수 있었다(Table 2, 3). 생육 저해작용을 나타내지 않는 Triton X-100은 야생형의 간균형은 물론 변이형의 구균형의 생세포로부터 단백질을 거의 유리시키지 않는데 반하여 살균작용을 나타내는 sarkosyl과 같은 음이온성 계면활성제는 구균형의 생세포로부터 많은 양의 단백질을 유리시키고 있다(Fig. 1, 2). 세포표층구조의 상이가 예상되는 그람음성세균의 종류 또는 rough, smooth 균주에 따라서 계면활성제, 완충액, 양이온, EDTA 등에 대한 거동이 달라짐을 생각할 때(22, 20, 27), 이러한 형태 변화에 따른 추출특성의 차이는 간균에서 구균으로 형태가 바뀌어졌을 때 변이주의 막구조에 물리화학적 차이가 있음을 시사하는 것으로 형태형성은 세포 표층구조와 밀접한 관계가 있음을 보여주는 것이라 하겠다. 그래서 sarkosyl 등의 구균형의 세포에 대한 살균작용은 세포의 형태변화에 따른 표층구조의 변화로 sarkosyl 등에 의해 막구조가 교란되어 생육에 필수적인 단백질을 포함한 다량의 단백질이 누출되기 때문으로 생각할 수 있을 것이다. 야생형인 간균형을 나타내는 30°C 및 변이형인 구균형을 나타내는 42°C에서 각각 배양한 대장균의 온도 감수성 형태형성 변이주 TMM 23(*mrdAts*) 및 TMM 24(*mrdBts*) 세포로부터 조제한 세포 표층 즉 막 부분을 각각 내막과 외막으로 분리하고 이들의 단백질의 양상을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 결과 간균형태의 세포와 구균형태의 세포간에는 실제로 막 단백질의 조성에 큰 차이를 보여주고 있다(Fig. 3). 즉 내막의 여러 단백질 등도 변화를 보이고 있으며, 특히 간균형태의 세포에 다량 존재하는 OmpA, OmpC, OmpF로 추정되는 주요 외막 단백질 등이 구균형태의 세포에는 소량밖에 보이지 않는 특징을 나타내고 있다. *mrdA*, *mrdB* 유전자의 변이로 인한 peptidoglycan 생합성 활성의 변화(8, 14)가 어떻게 막단백질의 조성을 변화시키는지 알 수 없으나 Bayer's junction(23)에서의 내막과 외막의 상호작용, peptidoglycan과 외막 단백질의 상호작용 등을 통해 세포표층을 조립하는 것을 고려하면 peptidoglycan 생합성의 변화로 일어날 수 있는 표층구조 형성의 부조는 그 한 이유로 생각할 수 있을 것이다. 본 실험에서 관찰된 외막 단백질 조성의 변화가 형태형성 기구와 직접 관련이 있다는 다른 실험적 증거는 현재까지 가지고 있지 않으나, 주요 외막단백질인 OmpA와 lipoprotein의 이중결손

변이주는 형태변화와 아울러 소수성 항생물질과 계면활성제 등에 감수성을 나타낸다는 보고(19)와 함께 세균세포의 신장, 형태형성, 세포질 분열의 과정이 peptidoglycan 생합성 활성화에만 초점을 맞추어 왔던 지금까지의 연구 흐름에 peptidoglycan 외에 세균세포의 외막 단백질도 형태형성에 관여하는 가능성을 시사하는 새로운 연구방향을 제시하였다고 생각된다.

요 약

대장균의 온도 감수성 형태형성 변이주 TMM 23 (*mrdA*s)와 TMM 24(*mrdB*t)s는 형태 변이가 일어나는 고온조건하에서 특이적으로 sarkosyl, SDS, NaDOC와 같은 음이온성 계면활성제에 의해 생육이 저해되었으며 그 작용 양식은 살균적이었다. 각 균주의 변이형에 대한 sarkosyl의 최소생육저지농도 및 최소사멸농도는 동일하였으며 TMM 23에 대해서는 0.1%, TMM 24의 경우는 0.3%이었다. 생육저해작용이 없는 중성 계면활성제 Triton X-100에 의해서는 형태변화에 관계없이 생세포로부터 단백질이 거의 추출되지 않았으나, sarkosyl에 의해서는 TMM 23 (*mrdA*s), TMM 24(*mrdB*t)s 모두, 변이형인 구균형의 생세포는 야생형인 간균형에 비해 많은 양의 단백질이 추출되었다. 또, SDS-polyacrylamide gel 전기영동에 의한 막단백질의 분석 결과, 간균형 세포의 외막에 다량 존재하는 주요 외막 단백질들이 구균형의 세포에서는 소량 밖에 보이지 않았으며, 내막의 여러 단백질의 조성의 변화도 관찰되었다. 이는 형태형성 변이주의 막구조에 물리 화학적인 성질의 차이가 있음을 나타내는 것으로 대장균 세포의 형태형성 기구는 peptidoglycan 뿐만이 아닌 내, 외막을 포함하는 세포표층의 전 구조체가 관여하고 있을 가능성을 시사하고 있다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부 지원 학술연구 조성비에 의하여 연구된 것입니다.

참고문헌

1. Canepari, P., G. Botta and G. Satta. 1984. Inhibition of lateral elongation by mecillinam stimulates cell division in certain cell division conditional mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **157**: 130-133.
2. Schmidt, L.S., G. Botta and J.T. Park. 1981. Effects of furazlocillin, a β -lactam antibiotic which binds selectively to penicillin-binding protein 3, on *Escherichia coli* mutants deficient in other penicillin-binding proteins. *J. Bacteriol.* **145**: 632-637.
3. Del Portillo, F.G. and M.A. de Pedro. 1990. Differential effect of mutational impairment of penicillin-binding proteins 1A and 1B on *Escherichia coli* strains harboring thermosensitive mutations in the cell division genes *ftsA*, *ftsQ*, *ftsZ*, and *pbpB*. *J. Bacteriol.* **172**: 5863-5870.
4. Kato, J.I., H. Suzuki and Y. Hirota. 1985. Dispensability of either penicillin-binding protein-1a or -1b involved in the essential process for cell elongation in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **200**: 272-277.
5. Botta, G.A. and J.T. Park. 1981. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J. Bacteriol.* **145**: 333-340.
6. Ishino, F. and M. Matsuhashi. 1981. Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: A septum-forming reaction sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **101**: 905-911.
7. Tamaki, S., S. Nakajima and M. Matsuhashi. 1977. Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5472-5476.
8. Ishino, F., W. Park, S. Tomioka, S. Tamaki, I. Takase, K. Kunugita, H. Matsuzawa, S. Asoh, T. Ohta, B.G. Spratt and M. Matsuhashi. 1986. Peptidoglycan synthetic activities in membranes of *Escherichia coli* caused by overproduction of penicillin-binding protein 2 and RodA protein. *J. Biol. Chem.* **261**: 7024-7031.
9. Gally, D., K. Bray and S. Cooper. 1993. Synthesis of peptidoglycan and membrane during the division cycle of rod-shaped, gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **175**: 3121-3130.
10. De Jonge, B.L.M., F.B. Wientjes, I. Jurida, F. Driehuis, J.T.M. Wouters and N. Nanninga. 1989. Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli* composition and mode of insertion. *J. Bacteriol.* **171**: 5783-5794.
11. De la Rosa, E.J., M.A. de Pedro and D. Vazquez. 1985. Penicillin binding proteins: Role in initiation of murein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 5632-5635.
12. Wientjes, F.B. and N. Nanninga. 1989. Rate and topography of peptidoglycan synthesis during cell division in *Escherichia coli*: concept of a leading edge. *J. Bacteriol.* **171**: 3412-3419.
 13. Asoh, S., H. Matsuzawa, M. Matsuhashi and T. Ohta. 1983. Molecular cloning and characterization of the genes (*pbpA* and *rodA*) responsible for the rod shape of *Escherichia coli* K-12: Analysis of gene expression with transposon Tn5 mutagenesis and protein synthesis directed by constructed plasmids. *J. Bacteriol.* **154**: 10-16.
 14. Tamaki, S., H. Matsuzawa and M. Matsuhashi. 1980. Cluster of *mrdA* and *mrdB* genes responsible for the rod shape and mecillinam sensitivity of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **141**: 52-57.
 15. Wachi, M., M. Doi, Y. Okada and M. Matsuhashi. 1989. New *mre* genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the Rod shape of *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.* **171**: 6511-6516.
 16. Wachi, M., M. Doi, S. Tamaki, W. Park, S. Nakajima-Iijima and M. Matsuhashi. 1987. Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 4935-4940.
 17. Barbas, J.A., J. Diaz, A. Rodriguez-tebar and D. Vazquez. 1986. Specific location of penicillin-binding proteins within the cell envelope of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 269-275.
 18. MacAlister, T.J., W.R. Cook, R. Weigand and L.I. Rothfield. 1987. Membrane-murein attachment at the leading edge of the division septum: a second membrane-murein structure associated with morphogenesis of the gram-negative bacterial division septum. *J. Bacteriol.* **169**: 3945-3951.
 19. Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota and U. Henning. 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli* multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **136**: 280-285.
 20. Moriyon, I. and D.T. Berman. 1982. Effects of nonionic, ionic, and dipolar ionic detergents and EDTA on the *Brucella* cell envelope. *J. Bacteriol.* **152**: 822-828.
 21. Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff and C.F. Earhart. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **115**: 717-722.
 22. Stan-Lotter, H. and K.E. Sanderson. 1981. Interaction of cations with membrane fraction of smooth and rough strains of *Salmonella typhimurium* and other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **146**: 542-551.
 23. Bayer, M.E. 1979. The fusion sites between outer membrane and cytoplasmic membrane of bacteria: their role in membrane assembly and virus infection. Pp. 162-202. In M. Inouye (ed), *Bacterial outer membrane*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
 24. Lennox, E.S. 1955. Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P1. *Virology*. **1**: 190-206.
 25. Lowry, O.H., N.J. Rasenberg, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 26. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structured proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
 27. Irvin, R.T., T.J. MacAlister, R. Chan and J.W. Costerton. 1981. Citrate-tris(hydroxymethyl)aminomethane-mediated release of outer membrane sections from the cell envelope of a deep-rough (heptose-deficient lipopolysaccharide) strain of *Escherichia coli* O8. *J. Bacteriol.* **145**: 1386-1396.

(Received September 8, 1993)