Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 26, No. 5, 387–392 (1998)

*Brevibacterium lactofermentum*에서 *meso*-Diaminopimelate-dehydrogenase Gene(*ddh*)의 Site-specific Inactivation

김옥미 · 박선희 · 이갑랑*
영남대학교 식품영양학과

Site-specific Inactivation of *meso*-Diaminopimelate-dehydrogenase Gene(*ddh*) in a Lysine-producing *Brevibacterium lactofermentum*. Kim, Ok-Mi, Sun-Hee Park, and Kap-Rang Lee*. *Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeungsan 712-749, Korea* – *Brevibacterium lactofermentum*, a gram-positive bacteria, has both the diaminopimelate (DAP) pathway and *meso*-DAP-dehydrogenase (DDH) pathway for L-lysine biosynthesis. To investigate importance of DDH pathway and the related *ddh* gene in lysine production, we introduced site-specific mutagenesis technique. A 300 bp DNA fragment central to the *meso*-DAP-dehydrogenase gene (*ddh*) of *B. lactofermentum* was used to inactive chromosomal *ddh* gene via homologous recombination. Southern hybridization analysis confirmed that the chromosomal *ddh* gene was disrupted by the vector sequence. The *B. lactofermentum ddh* mutant obtained have an inactive DDH pathway. The results reveal that inactivation of the *ddh* gene in *B. lactofermentum* leads to dramatic reduction of lysine production as well as decrease of the growth rate, indicating that the DDH pathway is essential for high-level lysine production as well as biosynthesis of *meso*-DAP.

Key words: *Brevibacterium lactofermentum, ddh* gene, site-specific inactivation

원핵생물계에서의 L-lysine 생합성은 3가지 서로 다른 경로를 통하여 일어난다[19]. Fig. 1에서 보는 바와 같이 acetyl화 된 중간 대사물[23] 및 succinyl화 된 중간 대사물[3, 9]을 각각 거쳐 lysine을 생합성하는 2가지 다른 diaminopimelate(DAP) 경로는 중간 물질인 tetrahydrodipicolinate(THDPA)로부터 *meso*-DAP로의 전환에 4단계 효소반응을 요구하지만 *meso*-DAP-dehydrogenase(DDH)경로[25]는 THDPA로부터 한 단계 효소반응을 거쳐 *meso*-DAP를 생산하며 이때 *meso*-DAP-dehydrogenase gene(*ddh*)이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이 중 DDH 경로는 DAP 경로에 비하여 acetyl-coA와 succinyl-coA를 필요로 하지 않으며, 4단계의 효소 반응을 줄여주므로 많은 이점과 중요성을 가질 것으로 추정된다.

일반적으로 대부분의 미생물들은 이러한 생합성 경로들 중 단지 한가지 경로를 통하여 lysine을 생합성하는 것으로 알려져 있다[19]. *Escherichia coli*를 비롯하여 많은 미생물들은 succinyl화 된 중간 대사물을 이용하는 DAP 경로로 lysine을 생합성하며[13], DDH 경로를 통하여 lysine을 생합성하는 대표적인 균주는 *Bacillus sphaericus*이다[25]. 그러나 lysine 생산 균주인 *Corynebacterium glutamicum*에서는 DAP 경로 뿐만 아니라

*Corresponding author
Tel. 82-53-810-2871, Fax. 82-53-811-8111
E-mail: Krlee@ynucc.yeungnam.ac.kr

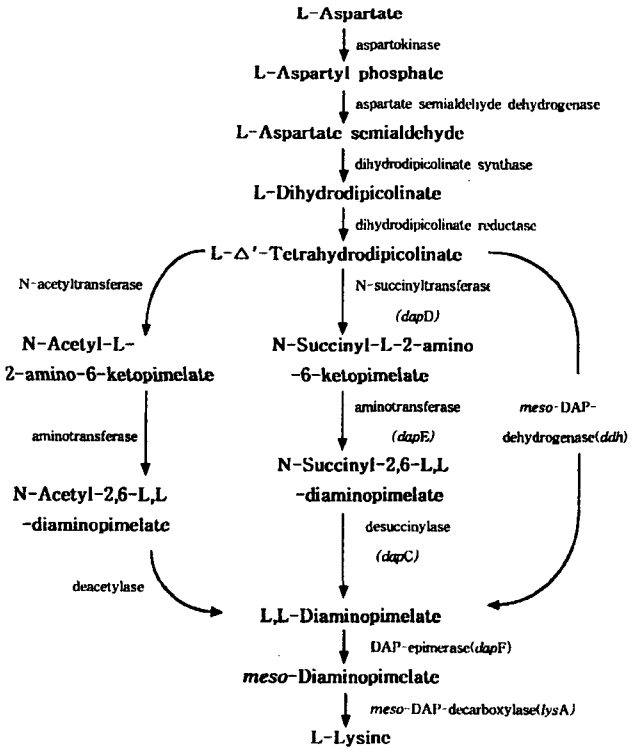

Fig. 1. Biosynthetic pathway of L-lysine in procaryotes.
The acetylated intermediates (left) and succinylated intermediates (center) of the diaminopimelate (DAP) pathway and *meso*-DAP-dehydrogenase (DDH) pathway (right) are utilized for biosynthesis of lysine in procaryotes.

DDH 경로가 함께 작용하여 lysine을 생합성하며[5, 7, 11] 산업적으로 lysine 발효산업에 널리 이용되고 있다[12]. 그러므로 lysine 생산 균주에 부가적으로 존재하는 DDH 경로는 lysine 생산의 높은 수율을 얻는데 기여할 것으로 사료된다.

*C. glutamicum*과 더불어 lysine 발효산업에 유용한 *B. lactofermentum*에서의 lysine 생합성은 DAP 경로를 통하여 일어난다고 알려져 있었으나[1, 24], 본 연구자 등은 DAP 경로 외에도 DDH 경로가 함께 작용한다는 것을 밝혔으며 아울러 *B. lactofermentum*으로부터 DDH 경로에 관여하는 *ddh* gene을 *E. coli dap*D 결손 변이주와의 complementation test를 통해 cloning하였다[15]. 또한 *ddh* gene의 coding region은 320개의 아미노산을 암호화하는 960 bp로 구성되어 있다는 것을 보고한 바 있다[8].

그러므로 본 연구에서는 *B. lactofermentum*의 lysine 생합성에 있어서 DDH 경로 및 *ddh* gene이 지닌 중요성을 조사하기 위하여, *ddh* gene을 disruption하여 DDH 경로를 차단시킴으로써 *B. lactofermentum ddh* mutant의 특성 및 lysine 생산량에 미치는 영향 등을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

B. lactofermentum KCTC1844는 chromosomal DNA donor 균주로 사용하였고, *B. lactofermentum* KCTC1846[17]은 S-2-aminoethyl-L-cysteine(AEC) 내성변이주로 이용하였다. *E. coli* S17-1[19, 20]은 mobilizing donor 균주로 사용하였으며, *E. coli* JM109는 plasmid DNA를 안정하게 보관시키는 균주로 사용하였다.

Plasmid pXX14는 이전의 논문[8, 15]에서 보고한 대로 *ddh* gene을 함유한 재조합 plasmid이며 pEM1은 mating 실험을 위한 재조합 plasmid pED15의 제조에 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주 및 plasmids의 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used

Strain/plasmid	Genotype	Source
B. lactofermentum		
KCTC1844	Wild type Nx^r	KCTC
KCTC1846	AEC^r Nx^r *ser*	KCTC, 17
KM1	KCTC1846 *ddh*::pED15 Nx^r Km^r	This work
E. coli		
S17-1	mobilizing donor strain *hsd*R *rec*A *tra* from RP4 derivative integrated in the chromosome	20
JM109	*rec*A1 *sup*E44 *end*A1 *hsd*R17 *gyr*A96 *rel*A1 *thi*△(*lac-pro*AB)F. [*tra*D36 *pro*A^+ *pro*B^+ *lac*I^q *lac*Z△M15]	Promega
plasmid		
pXX14	Ap^r *ddh*$^+$	8, 15
pEMI	Km^r $oriV_{E.coli}$, pK19::$oriT_{RP4}$	19
pED15	Km^r pEM1::internal *ddh* fragment	This work

Abbreviations : AEC, S-2-aminoethyl-L-cystein ; Nx, nalidixic acid; Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; KCTC, Korean Collection for Type Cultures.

배지 및 배양 조건

실험에 사용한 모든 균주 배양에는 LB(Luria-Bertani) 배지[16]를 사용하였으며, 필요에 따라 ampicillin(Ap), kanamycin(Km), 그리고 nalidixic acid(Nx)를 첨가하여 배양하였다. Lysine 정량을 위한 배지로는 완전 배지로서 CGIII배지를, 최소배지로서 CGX배지를 사용하였다[6]. 본 실험에 사용한 *B. lactofermentum* 및 *E. coli*는 호기적 조건하에서 각각 30℃와 37℃에서 배양하였다.

DNA 조작 및 Southern hybridization

*B. lactofermentum*의 chromosomal DNA는 Ausubel 등[2]의 방법에 따라 분리하였으며 plasmid DNA는 Sambrook 등[16]의 alkaline lysis 방법에 따라 추출되었다. 제한효소 절단 및 ligation 반응은 Sambrook 등[16]의 방법에 준하여 수행하였으며 subcloning을 위한 제한단편은 투석막을 이용하여 agarose gel상에서 분리되었다.

Southern hybridization은 Southern[22]의 방법에 준하여 수행하였으며 probe DNA는 oligolabelling kit(Pharmacia)에 의해 [α-^{32}P]dCTP로 표지하여 사용하였다.

Transconjugation

B. lactofermentum KCTC1846과 *E. coli* S17-1의 mating 실험은 Schafer 등[18]의 방법에 따라 수행하였다. *ddh* gene의 300 bp *Bam*HI-*Hin*dIII 단편만을 함유하고 있는 pED15를 mobilizing 균주인 *E. coli* S17-1로 도입시켜 이를 donor 세포로, *B. lactofermentum* KCTC1846은 recipient 세포로 사용하였다. Donor-recipient 세포의 혼합비율은 1:5로 하였으며 48.5℃에서 열처리 하였다. *B. lactofermentum* transconjugants는 Km(25 μg/ml)과 Nx (30 μg/ml)를 함유한 LB배지에서 selection되었다.

meso-DAP-dehydrogenase(DDH) 활성측정

DDH 활성측정은 Yeh 등[26]이 사용한 방법에 의해 행하였다. 배양된 균체를 0.2 M glycine-KCl-KOH buffer (pH 10.5)에 현탁하여 세포를 파괴한 후 원심분리하여 상층액을 crude extract로 사용하였다. 효소활성은 기질로 10 mM diaminopimelic acid를 사용하였고 조효소로

서 0.1 mM $NADP^+$가 포함된 0.2 M glycine-KCl-KOH buffer에 crude extract를 첨가하여 마지막 부피를 1 ml로 맞춘다음, 37℃에서 30분간 반응시킨 후 340 nm에서 환원된 NADPH의 양을 측정하였다. 1 unit는 1분당 1 μmole NADPH의 형성을 촉매하는 효소 양으로 표시하였으며 비활성은 단백질 mg당 units로 표시하였다. 단백질 정량은 Lowry 등[10]의 방법에 따라 750 nm에서 흡광도로 측정하였으며 bovine serum albumin(0.3 mg/ml)을 standard로 사용하였다.

L-Lysine 정량

Cremer 등[6]의 방법에 따라 항생제가 첨가된 CGIII배지에서 배양시킨 균체를 원심분리하여 모우고 0.9% NaCl로 2회 세척하여 각 sample의 OD_{600} 값을 동일하게 하여 CGX배지로 재접종하여 72시간 배양하였다. Lysine 정량은 배양액을 원심분리하여 얻은 상층액을 0.45 μm membrane filter로 filtration한 후, amino acid analyzer(Biochrome 20, Pharmacia)와 HPLC(Waters)로 분석하였다.

결과 및 고찰

B. lactofermentum ddh gene의 disruption

*B. lactofermentum*에서 DDH 경로에 관여하는 *ddh* gene을 disruption하기 위하여, pXX14로부터 *ddh* gene의 coding region 일부인 300 bp 단편을 *Bam*HI과 *Hin*dIII로 처리하여 분리한 후 같은 효소로 처리한 pEM1 vector에 subcloning하여 재조합 pED15를 제조하였다(Fig. 2). Vector로 사용한 pEMI는 pK19[14]에서 유래된 multiple cloning site와 Tn5의 Km^r gene을 함유하고 있으며 특히 *E. coli*의 복제 origin만 가지고 있기 때문에 *B. lactofermentum*에서는 복제되지 못하고 chromosome 속으로 삽입되는 특성을 지니고 있다. 이렇게 제조된 pED15를 *E. coli* S17-1로 도입시킨 후 *B. lactofermentum* KCTC1846과 mating 실험을 수행하였다. 이 과정에서 pED15는 *E. coli* S17-1로부터 conjugation에 의해 *B. lactofermentum* KCTC1846으로 전이되며 그 후 pED15내의 300 bp *Bam*HI-*Hin*dIII 단편이 *B. lactofermentum*의 chromosomal *ddh* locus에 recombination이 일어나 삽입된다(Fig.3). Transconjugant는 Km (25 μg/ml)와 Nx(30 μg/ml)을 함유한 LB배지에서 seletion되었으며, 선별된 7개의 transconjugants로부터 plasmid DNA의 존재 및 DDH 효소활성이 전혀 관찰되지 않았다(Table 2). 이들 transconjugants중에서 하나를 선택하여 KM1이라 명명하였다.

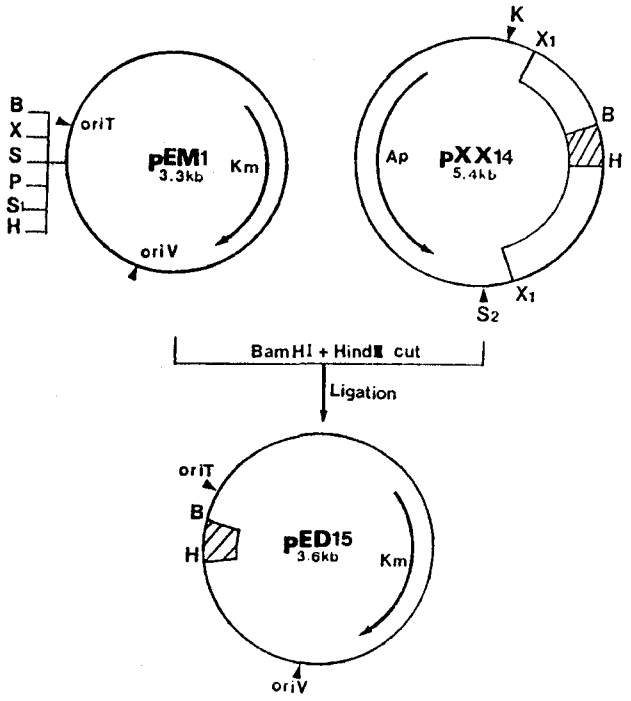

Fig. 2. Construction of the pED15 used for *ddh* gene disruption.

The 300 bp *Bam*HI-*Hin*dIII fragment of pXX14 located within the coding region of the *ddh* gene was inserted in the pEMI vector. B, *Bam*HI; H, *Hin*dIII; K, *Kpn*I; P, *Pst*I; S, *Sal*I; S_1, *Sph*I; S_2, *Sac*I; X, *Xba*I; X_1, *Xho*I.

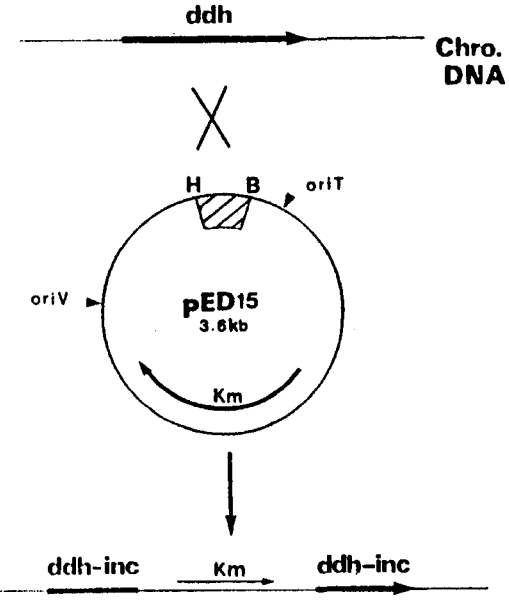

Fig. 3. Schematic illustration of the recombination event leading to site-specific disruption of the *B. lactofermentum ddh* gene.

Single crossover between the 300 bp fragment of *ddh* gene on the nonreplicative plasmid pED15 and chromsomal *ddh* locus disrupted the *ddh* gene by plasmid integration and conferred resistance against kanamycin. Chro. DNA, chromosomal DNA; ddh-inc, ddh-incomplete.

Table 2. DDH activity, growth rate, and amount of lysine secreted by the strains of *B. lactofermentum*

strain	DDH sp. act. (U/mg)	Growth rate (h^{-1})		Lysine (mM)[b]
		CGIII	CGX	
B. lactofermentum 1844	0.09	0.47	0.56	6
B. lactofermentum 1846[a]	0.15	0.48	0.57	20
B. lactofermentum KM1	0.00	0.36	0.29	0.25

[a]Strain 1846 is a mutant with feedback-resistant aspartate kinase.
[b]Lysine was dertermined in supernatants after cells were cultivated on CGX media for 72 hrs.

Southern hybridization

B. lactofermentum KM1의 chromosome에 *ddh* gene이 disruption되었는지 여부를 확인하기 위하여 Southern hybridization을 수행하였다. AEC 내성균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846과 *ddh* 유전자가 disruption된 *B. lactofermentum* KM1의 chromosomal DNA를 분리하여 제한효소 *Xho*I으로 절단시킨 후 α-^{32}P로 label된 pXX14의 2.4 kb *Xho*I 단편을 probe로 하여 hybridization하였다. 그 결과 Fig. 4에서 보는 것처럼 *B. lactofermentum* KCTC 1846에서는 약 2.4 kb위치에서, *B. lactofermentum* KM1에서는 약 6.0 kb위치에 각각 하나의 band가 관찰되었다. 이러한 결과는 *B. lactofermentum* chromosome내의 *ddh* locus에 pED15(3.6 kb)가 삽입되어 *ddh* gene이 disruption됨으로서 6.0 kb의 band가 관찰됨을 보여주는 것이다.

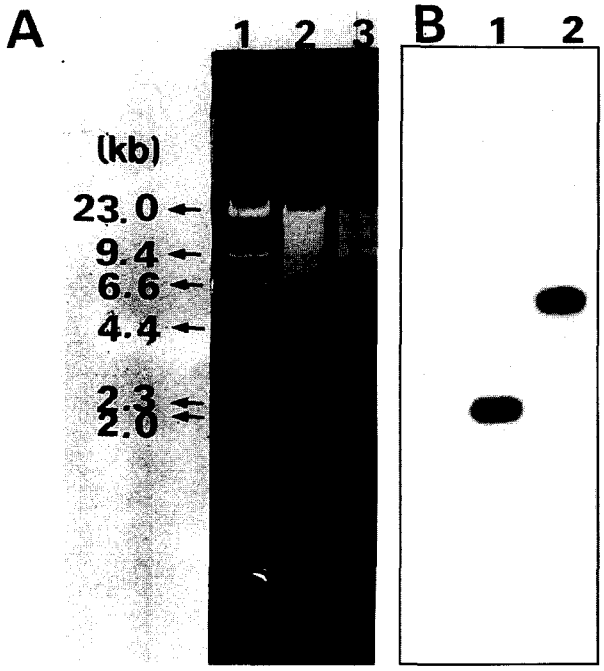

Fig. 4. Southern hybridization analysis of the constructed mutant.
Chromosomal DNAs isolated from *B. lactofermentum* KCTC 1846 and the mutant KM1 were digested with *Xho*I, subjected to agarose gel electrophoresis, transferred to nylon membrane and hybridized with a labeled 2.4 kb *Xho*I fragment of pXX14. A. Agarose gel electrophoresis; lane 1. λDNA digested with *Hind* III, lane 2. *B. lactofermentum* KCTC1846 chromosomal DNA digested with *Xho*I, lane 3. *B. lactofermentum* KM1 chromosomal DNA digested with *Xho*I. B. Autoradiogram.

B. lactofermentum ddh mutant의 특성

ddh gene이 disruption되어 DDH 경로가 차단된 *B. lactofermentum* KM1의 특성을 조사하기 위하여 먼저 wild type인 *B. lactofermentum* KCTC 1844, AEC 내성균주인 KCTC1846, 그리고 KM1을 완전배지인 CGIII와 최소배지인 CGX에서 배양하여 OD_{600}에서 균수를 측정하여 성장을 비교 분석하였다. 그 결과 *B. lactofermentum*의 KCTC1844와 KCTC1846의 성장에 비해 mutant인 KM1은 성장이 저조하였다. 이는 아마도 DDH 경로의 불활성화로 인해 세포벽 합성에 필수적인 *meso*-DAP와 세포의 성장에 필요한 lysine양의 공급이 부족하기 때문에 이러한 결과가 초래되었다고 사료된다(Table. 2). 이 결과를 뒷받침하기 위해 이들의 lysine 생산량을 측정하였을 때에도 현저한 차이를 나타내었다. *B. lactofermentum* KM1에서의 lysine 생산량은 모균주인 *B. lactofermentum* KCTC1846에 비해 80% 이상 감소하였다. 이와 같이 *B. lactofermentum*이 DAP 경로만을 가졌을 때 세포의 성장 및 lysine 생산량에 있어서 극적인 저하를 가져오는 결과는 DDH 경로가 *meso*-DAP 및 lysine 생합성에 있어 필수불가결한 경로라는 것을 확인해 주는 것이다.

그러나 *C. glutamicum*에서 DDH 경로를 gene-directed mutagenesis 방법으로 차단시킨 Schrumpt 등[19]의 보고에 따르면, 변이주들이 여전히 wild type과 비슷한 성장을 유지하는 것으로 보아 *C. glutamicum*에서의 DDH 경로는 세포의 생육을 위한 *meso*-DAP 및 lysine 생합성에 필수적인 경로로 작용하지 않는다고 보고하였다. 그렇지만 DDH 경로의 불활성화로 인한 DAP 경로만의 작용은 대사 중간 물질인 N-succinyl-diaminopimelate의 축적과 동시에 50% 이상 lysine 생산의 감소를 초래하므로 이러한 DDH 경로는 metabolic flux가 증가되면 중간 대사물을 lysine으로 변화시키는데 필요조건으로 작용한다고 보고하였다.

그러므로 *C. glutamicum*과 *B. lactofermentum*과 같은 corynebacteria가 lysine을 많이 생산하는 것은 DDH 경로가 부가적으로 존재하기 때문일 것으로 사료되며, 본 연구자 등은 *B. lactofermentum*에서 *meso*-DAP 및 lysine 생합성을 위하여 필수적으로 작용하는 DDH 경로를 재확인하기 위하여 DAP 경로에 관여하는 *dap*D gene을 cloning하였으며 지금 *dap*D gene을 이용하여 DAP 경로

를 차단시키는 실험을 수행 중에 있다.

요 약

*B. lactofermentum*의 lysine 생합성에 있어서 DDH 경로 및 *ddh* gene이 지닌 중요성을 조사하기 위하여, site-specific mutagenesis technique를 통하여 *B. lactofermentum*의 *ddh* gene을 disruption함으로서 DDH 경로를 차단시켰다. *B. lactofermentum ddh* mutant는 wild type 및 AEC내성 균주보다 성장이 매우 저조하였으며 lysine 생산량에서도 급격한 저하를 가져왔다. 이와 같이 *B. lactofermentum*이 DAP 경로만을 가졌을 때 세포의 성장 및 lysine 생산량에 있어서 극적인 저하를 가져왔기 때문에 *B. lactofermentum*에서의 DDH 경로는 *meso*-DAP 및 lysine 생합성에 있어 필수적인 경로로 작용한다는 것을 확인하였다. 그러므로 *C. glutamicum*과 *B. lactofermentum*과 같은 corynebacteria가 lysine을 많이 생산하는 것은 DDH 경로가 부가적으로 존재하기 때문이며, 이러한 DDH 경로는 metabolic flux가 증가되면 중간 대사물을 lysine으로 변화시키는 중요한 경로로 작용할 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림부에서 지원하는 농림기술관리센타의 농림수산특정연구과제의 연구비지원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Aida, K., I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada. 1986. *Biotechnology of Amino Acid Production*, pp. 152–172. Kodansha Ltd., Japan.
2. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. struh1. 1987. Preparation of genomic DNA from bacteria, 2.4.3-2.4.5. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Inc.
3. Berges, D. A., W. E. Dewolf, G. L. Dunn, D. J. Newman, S. J. Schmidt, J. J. Taggart, and C. Gilvarg. 1996. Studies on the active site of succinyl-CoA : Tetrahydrodipicolinate N-succingl-transferase. *J. Biol. Chem.* **261**: 6160–6167.
4. Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. V. Betlach, H. L. Heynecker, H. W. Boyer, J. H. Crosa, and S. Falkow. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95–113.
5. Cremer, J., C. Treptow, L. Eggeling, and H. Sahm. 1988. Regulation of enzyme of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3221–3229.
6. Cremer, J., L. Eggeling, and H. Sahm. 1991. Control of the lysine biosynthesis sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1746–1752.
7. Ishino, S., K. Yamaguchi, K. Shirahata, and K. Araki. 1984. Involvement of *meso*-α, ε-diaminopimelate D-dehydrogenase in lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 2557–2560.
8. Kim, O. M., H. J. Kim, S. D. Kim, D. C. Park, and K. R. Lee. 1995. Cloning and sequencing of the *ddh* gene involved in the novel pathway of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 250–256.
9. Kindler, S. H. and C. Gilvarg. 1960. N-succinyl-L-α, ε-diaminopimelate acid deacylase. *J. Biol. Chem.* **235**: 3532–3535.
10. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randoll. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–275.
11. Misono, H., M. Ogasawara, and S. Nagasaki. 1986. Characterization of *meso*-diaminopimelate dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum* and its distribution in bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 2729–2734.
12. Nakayama, K. 1985. Lysine, pp. 607–620. *In* M. Moo-Yonug (ed.), *Comprehensive Biotechnology*. Vol. 3. Pergamon press, Oxford.
13. Patte, J. C. 1983. pp. 213–218. *In* K. M. Herrmann and R. L. Somerville (eds.), *Amino acid: Biosynthesis and Genetic Regulation*. Addison-Wesley Publishing Co., Massachusetts.
14. Pridmore, R. D. 1987. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene* **56**: 309–312.
15. Roh, J. H., O. M. Kim, D. C. Park, H. J. Kim, H. K. Yun, S. D. Kim, I. S. Lee, and K. R. Lee. 1994. Cloning and functional expression of the *ddh* gene involved in the novel pathway of lysine biosynthesis from *Brevibacterium lactofermentum*. *Mol. Cells* **4**: 295–299.
16. Sambrook, J., E. T. Fritsh, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
17. Santamaria, R. I., J. A. Gil, and J. H. Martin. 1985. High-frequency transformation of *Brevibacterium lactofermentum* protoplasts by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **162**: 463–467.
18. Schafer, A., J. Kalinowski, R. Simon, A. H. Seep-Feldhaus, and A. Puhler. 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from gram-negative *Escherichia coli* to various gram-positive coryneform bacteria. *J. Bacteriol.* **172**: 1663–1666.
19. Schrumpf, B., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Puhler, L. Eggeling, and H. Sahm. 1991. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **173**: 4510–4516.
20. Schwarzer, A. and A. Puhler. 1991. Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and re-

placement. *Bio/Technology* **9**: 84–87.
21. Simon, R., V. Priefer, and A. Puhler. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**: 784–792.
22. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503–517.
23. Sundharadas, G. and C. Gilvarg. 1967. Biosynthesis of 2, 6-diaminopimelate acid in *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **242**: 3983–3988.
24. Tosaka, O. and K. Takinami. 1978. Pathway and regulation of lysine biosythesis in *Brevibacterium lactofermentum*. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 95–100.
25. White, P. J. 1983. The essential role of diaminopimelate dehydrogenase in the biosynthesis of lysine by *Bacillus sphaericus*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 739–749.
26. Yeh, P., A. M. Sicard, and A. J. Sinskey. 1988. General organization of the genes specifically involved in the diaminopimelate-lysine biosynthetic pathway of *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Gent.* **215**: 105–111.

(Received May 26, 1998)