【解説】

放線菌の線状レプリコンの再編成とゲノム進化

木梨陽康

グラム陽性の土壌細菌である放線菌は、多くの有用な抗生物質を生産し、カビに似た複雑な形態分化を行なう。加えて、原核生物であるにもかかわらず線状レプリコン（染色体・プラスミド）をもつという特徴がある。放線菌の線状レプリコンは両末端が欠失して環状化し、互いに一点交差してキメラレプリコンを形成する。このようなダイナミックな構造変化から生物のゲノム進化の道筋が見えてきた。

放線菌は原核生物であるにもかかわらず、その染色体は線状であり、またしばしば複数の線状プラスミドをもつ。放線菌の線状染色体と線状プラスミドは長さが異なるだけで基本的には同じ構造であり、両末端には末端逆位配列（terminal inverted repeat, TIR）が存在し、5′末端には末端タンパク質（terminal protein, TP）が結合している。放線菌の線状染色体は不安定で両末端が容易に欠失して、環状化、アーム置換、巨大パリンドロームの形成などの構造変化を引き起こす。また、線状プラスミドと相互作用して染色体・プラスミド・ハイブリッド構造を形成する。この解説では、ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* の線状染色体のダイナミックな構造変化、放線菌の代表株 *S. coelicolor* A3(2) の線

状染色体と線状プラスミド SCP1 の相互作用など、筆者らの研究を中心に放線菌の線状レプリコンの様々な再編成の例を紹介する。それらは染色体構造の可塑性と放線菌の適応能力を如実に示すとともに、生物一般のゲノム進化に関しても重要な示唆を与えた。なお、放線菌からの巨大線状プラスミドの単離と、それに続く染色体自身の線状構造の発見などの初期の研究については、すでに他^(1~4)で紹介したのでここでは省略する。

放線菌の線状レプリコンのテロメア構造と末端複製

1. Y字型折り返し構造と末端複製

初めに、放線菌の線状染色体の不安定性の原因とされる最末端（真核生物のものととは構造がまったく異なるがテロメアとも呼ばれる）の構造とその複製機構について述べる。多くの放線菌の線状染色体・プラスミドの最末端の塩基配列はきわめてよく似ていて、図1-Aに示すようなY字型折り返し構造を形成することができる⁽⁵⁾。末端近くにはこの他に数個のステムループ構造が形成可能であり、いずれの場合も先端のループは3つの塩基GNAによって構成され、G-A対（黒丸）というプリン-プリン対をもつ。図1-Aでは3′末端配列を示したが、対応する5′末端のシトシン残基に末端タンパク質（TP）が

図1 ■ 放線菌の線状レプリコンの末端二次構造

いずれも3'末端の塩基配列を示した。(A)はY字型折り返し構造を形成できるが、(B)(C)はできない。(A)(C)ではステムループの先端が3つの塩基によって、(B)では4つの塩基によって構成されている。しかし、いずれのループもG-A対(黒丸)というプリン-プリン対を有する。

共有結合している。アデノウィルスや *Bacillus subtilis* のファージ $\phi 29$ の線状ゲノムの5'末端にもTPが結合し、これをプライマーとして5'末端から鎖置換(strand displacement)様式の複製を行なうことが知られている⁽⁶⁾。放線菌の線状レプリコンも、構造の類似性から同様の様式で複製されると考えられた。

しかし、Cohenらは *S. rochei* の線状プラスミド pSLA2(17 kb)の中央部の *BclI* 断片(7.5 kb)をチオストレプトン耐性遺伝子とつなげて環状にすると、*S. lividans* の中で自己複製することを明らかにした⁽⁷⁾。この *BclI* 断片上に複製開始点があり、そこから両方向への複製が起こったためである。pSLA2自身の両方向複製を解析した結果、リーディング鎖の複製は3'末端まで正確に行なわれるが、ラギング鎖の複製は5'末端まで達せず、約280 bpを残して止まることがわかった。その結果生じた3'突出末端が図1-AのようなY字型折り返し構造を形成し、それをTPその他の末端複製に関与するタンパク質が認識し、TPをプライマーとして残りの複製

を完了させると推定された^(7,8)。実際、折り返し構造の形成に必須な塩基対に変異を導入したところ、変異プラスミドは線状構造を維持できずに環状化した⁽⁹⁾。*S. lividans* や *S. coelicolor* A3(2) の線状染色体のテロメア配列も pSLA2 ときわめてよく似ていて、また中央付近には大腸菌型の複製開始点(*oriC*)が見つかった。増殖中の染色体DNAへの核酸塩基の取り込みが、この点をピークに左右で減少していたことから、*oriC* が実際に機能していることが明らかになった⁽¹⁰⁾。

2. Y字型折り返し構造を形成できないテロメア配列

このように、放線菌の線状レプリコンは中央付近にある *oriC* からの両方向複製と末端タンパク質をプライマーとする末端複製の2つの複製様式をもつ。多くの線状染色体・プラスミドのテロメア共通配列はY字型折り返し構造を形成でき、それに対応してよく似た末端タンパク質遺伝子(terminal protein gene, *tpg*)が同定された^(11,12)。しかし、筆者らは、折り返し構造を形成できないテロメアを、*S. coelicolor* A3(2) の線状プラスミド SCP1 と *S. griseus* 2247 株の線状染色体に発見した。

線状プラスミド SCP1 の4.1 kb *SpeI* 断片が末端を含むことがわかったので、これをforce cloningによってクローン化した。つまり、5'末端にはTPが結合し、これはプロテアーゼ処理によっても完全には取り除けないが、プラスミドに強制的に連結して大腸菌に形質転換した。得られたクローンをを用いてテロメア配列を決定したところ、5'末端にはCではなくGが連なっていて、その数はクローンによって4~6個と異なっていた(図1-B, ここでも3'末端配列を示した)⁽¹³⁾。このような末端不均一はクローン化の際に生じた可能性がある。いずれにしろ、SCP1のテロメア配列は、①Y字型折り返し構造を形成できない、②末端近くのステムループの先端が4つの塩基で構成されている、など共通配列とはまったく異なっていた。なお、その後、筆者らはChaterらに協力してSCP1の全塩基配列を明らかにした⁽¹⁴⁾。

末端コスミド地図を用いた解析によって、*S. griseus* 2247 株のコスミド6E12は線状染色体の右末端から約300 bpまでを含むことがわかった(図2)。6E12を用いて2.7 kb末端 *SalI* 断片を同定し、クローン化して塩基配列を決定したところ、やはりY字型折り返し構造を形成できなかった(図1-C)⁽¹⁵⁾。しかし、末端近くのループは共通配列と同様に3つの塩基で構成されていた。なお、堀之内らは最近、*S. griseus* IFO13350 株のゲノムプロジェクトを完了させ、近くデータが公開される予定である。

図2 ■ *S. griseus* 2247 株の線状染色体の末端コスミド地図と変異株の欠失領域

欠失領域を破線で示した。L:線状, C:環状, Af:AflIII, As:AseI, Sp:SpeI, Ss:SspI

SCP1 と *S. griseus* 染色体の例は、放線菌の線状レプリコンの末端複製に Y 字型折り返し構造が必ずしも必須でないことを示している。SCP1 の全塩基配列が決定されたが、テロメア配列が特異的なため *tpg* 遺伝子を同定することはできなかった。しかし最近、Chen らは SCP1 の末端タンパク質を単離し、そのアミノ酸配列から *orf127* が末端タンパク質遺伝子であることを明らかにし、*tpc* (terminal protein of SCP1) と命名した⁽¹⁶⁾。Tpc タンパク質は Tpg とはまったく相同性がなく、後者に共通する逆転写酵素様ドメインをもたない。*tpc* 遺伝子を破壊すると、変異プラスミドは線状構造を維持できずに環状化した。Tpg と Tpc の末端複製における機能の違いや Y 字型折り返し構造との関係などは今後の研究課題である。

S. griseus の線状染色体のダイナミックな構造変化

1. 線状染色体の末端欠失

S. griseus 2247 株は 7.8 Mb の線状染色体をもつ⁽¹⁷⁾が、それが不安定で自然誘発的あるいは変異処理によって容易に末端欠失をひき起こす。孢子懸濁液に紫外線を照射して得られたコロニーを調べたところ、100 株中 5 株という高い頻度で染色体欠失が起こっていた。末端コスミド地図を用いて欠失の大きさを解析したところ、20~550 kb と様々で、欠失のホットスポットは存在しなかった (図 2)。 *S. griseus* のストレプトマイシン生

産と孢子形成は A-ファクターによって制御されるが、A-ファクターの生産性は不安定で容易に消失する。したがって、その生合成遺伝子 (*afsA*) はプラスミド上にあると考えられた。しかし筆者らは、*afsA* が染色体左末端から 150 kb のコスミド 12H8 上にあり、*afsA*⁻ 株では染色体の両末端が欠失していることを明らかにした⁽¹⁸⁾。このような染色体欠失の原因として Leblond らは、ラギング鎖の複製が完了していない状態の染色体末端がヌクレアーゼによる攻撃を受けやすいことを指摘している⁽¹⁹⁾。

2. 線状染色体の環状化

末端が欠失した *S. griseus* 染色体がどのような構造をしているかを、末端コスミド地図を用いて解析した。欠失株の一つ 404-23 株では、左右の欠失末端がコスミド F2D2, 6E12 上にあり、欠失のサイズはそれぞれ 180 kb, 20 kb であった (図 2)。F2D2, 6E12 がともに新たに生じた 1 つの *SspI* 断片にハイブリダイズしたので、染色体が環状化したことが示唆された⁽¹⁸⁾。これを証明するため、404-23 株から融合部をクローン化し、対応する左右の欠失末端を F2D2, 6E12 から取得した。3 つの断片の塩基配列を比較したところ、予想に反して、左右の欠失末端には相同組換えを起こすような相同配列は存在せず、欠失末端どうしが 1 bp も変わらずに結合していた (図 3-A)⁽²⁰⁾。欠失が染色体の中央部に進むのを、環状化によってくい止めた株が生き残ったものと思われた。

図3 ■ 放線菌の線状染色体の環状化機構と線状染色体の生成機構

(A) *S. griseus* の環状化変異株の融合部と左右の欠失末端の塩基配列の比較, (B) 欠失末端の非相同組換えによる線状染色体の環状化, (C) 環状染色体と線状プラスミドの一点交差による線状染色体の生成. TIR-L,R: terminal inverted repeat, TP: 末端タンパク質, oriC: 複製開始点, UV: 紫外線照射, NTG: ニトロソグアニジン処理

このような環状化機構の一般性を確かめるため, さらに3つの欠失変異株 N2, No. 9, No. 83 を解析した. その結果, 左右の欠失サイズはそれぞれ, 350 kb と 130 kb, 550 kb と 30 kb, 170 kb と 130 kb と様々であり (図2), いずれの場合も新たな融合断片が生じていた. 融合部と左右の欠失末端の塩基配列を比較したところ, 404-23 株のように欠失末端どうしが直接結合している (No. 9 株) か, 1 bp (No. 83 株) または 6 bp (N2 株) のマイクロホモロジーがあるだけで, 相同組換えを起こすような特別な配列はなかった (図3-A)^(20, 21). そこで, 線状染色体の環状化は両欠失末端の非相同組換えによって起こったと結論した (図3-B).

3. 線状染色体のアーム置換

環状化以外の線状染色体の構造変化を探るために, さらに多くの変異株を取得した. そのうち, 染色体の右アームのみが欠失した変異株 MM9 は, 右欠失末端がコスミド 10E12 上にあり, 欠失サイズは 250 kb であった (図2). MM9 株では, 10E12 上の 9.0 kb *Bam*HI 断片に代わって 6.6 kb *Bam*HI 断片が生じていた. この断片をプローブとしてサザン解析したところ, 10E12 に加えて染色体の反対側の左アーム上にあるコスミド F2B4 にもハイブリダイズした. 10E12, F2B4 および 6.6 kb *Bam*HI 断片上の相同領域を絞り込み塩基配列を比較したところ, きわめてよく似たリボタンパク質様 ORF が見つ

かった. つまり, 左右の染色体アーム上にある2つのリボタンパク質様 ORF (ORF-L, R) が相同組換えを起こして, 6.6 kb の融合 *Bam*HI 断片 (ORF-J) を生じていた. このような染色体のアーム置換はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) によっても確認された. したがって, この株では左アームが右アームに乗り移り, 親株では 24 kb であった TIR が 450 kb という巨大な TIR に変化していることがわかった (図4)⁽²²⁾. これは, Leblond らによって報告された *S. ambofaciens* の染色体アーム置換⁽²³⁾に続く第2の例である. このようなアーム置換は染色体の片方のアームが失われたときに, テロメアを回復するために放線菌が用いる戦略であると思われる.

4. 巨大パリンドローム構造の形成

S. griseus 301-22 株では, 左右の欠失末端がコスミド 4D6 および 10E12 上にあり, 2つのコスミドが異なる *Ssp*I 断片にハイブリダイズしたので, 両末端の欠失後も依然として線状構造が維持されていると思われた. しかし, その後の解析によって, この株は特異的な環状染色体をもつことが明らかになった.

染色体の右欠失末端を解析したところ, コスミド 10E12 の 9.0 kb *Bam*HI 断片の代わりに 6.6 kb *Bam*HI 断片が生じていた. これらの断片が MM9 株の場合とまったく同じなので, この株においてもリボタンパク質様 ORF 間の相同組換えによってアーム置換が起こったこ

図4 ■ *S. griseus* 2247 株の線状染色体のダイナミックな構造変化と TIR の機能
線状染色体は racket frame 構造で描いている。

とが示唆された。これは 6.6 kb *Bam*HI 断片の塩基配列決定によって証明された。3つのリポタンパク質様 ORF の塩基配列を比較したところ、同じ ORF 間で相同組換えが起こったにもかかわらず、組換え点は MM9 株の場合とは異なっていた。すなわち、MM9 株においては組換えが2つの ORF の塩基 307 から 578 の間で起こったのに対して、301-22 株では塩基 580 から 648 の間で起きていた。この結果は、*S. griseus* において相同組換えが頻繁に起きていることを示唆した。

染色体の左欠失末端を解析している過程で、初めに左欠失末端と同定されたコスミド 4D6 が、もはや 301-22 DNA にハイブリダイズしなくなった。これは、アーム置換によって生じた2つの‘左アーム’が解析中にも欠失したためであり、欠失の長さが異なる変異株 301-22-L および M を単離した。両株の染色体構造の詳しい解析過程は省略するが、初めに推定したように線状ではなく、アーム置換によって形成された長い TIR に欠失が起こり、TIR の途中で結合して巨大なパンドローム構造が形成されていた(図4)⁽²⁴⁾。坂口は、放線菌の線状レプリコンの両 TIR が末端タンパク質やその他の結合タンパク質の相互作用によって並列にならび、これが柄の部分となって racket frame 構造をとると提唱した⁽²⁵⁾。この仮説は Losick らによる *S. lividans* 染色体の両末端の *in situ* ハイブリダイゼーションによって支持された⁽²⁶⁾。301-22 株染色体では TIR の先端が閉じているので、筆者らはこの構造を‘closed racket frame’と命名した。

図5 ■ *S. griseus* 301-22 株における染色体巨大パンドローム構造の推定される形成機構

301-22-L, M 株染色体の巨大パンドロームの先端部のクローン化を試みたが、成功しなかった。そこで、親株 2247 の対応する領域をクローン化したところ、片側のホモロジーの長さがそれぞれ 14 bp, 24 bp のパンドローム配列が見つかり、これらが closed racket frame の形成に関与したと思われる。すなわち、欠失末端にパンドローム配列があるとステムループが形成され、それが複製によって内側に伸びたところで反対側の TIR と組換え修復を起こして closed racket frame が形成されたものと推定した(図5)⁽²⁴⁾。このような大きなパンドローム配列は大腸菌などでは複製不能であり、放線菌には特別な複製装置が働いていることが示唆される。

5. 染色体逆位

S. griseus 402-2 株染色体を *Ase*I で消化し PFGE で解析したところ、*Ase*I-B, D 断片の代わりに *Ase*I-B', D'

図6 ■線状プラスミド SCP1 の構造

EcoRV サイトと断片名を示した。Tn5714:SCP2 の挿入に関与するトランスポゾン, *mmy* クラスター:メチレノマイシン生合成クラスター

断片が生じ、その他の断片に変化はなかった。*DraI* 消化物についても同様の結果が得られた。これらの結果から、*AseI*-H, K, J, I 断片を挟んで *AseI*-B と *AseI*-D の間で染色体逆位が起こったことが示唆された。402-2 株の *AseI*-B', D' 上の逆位の接合部と親株の *AseI*-B, D 上の対応する領域をクローン化し、制限酵素地図および部分塩基配列を比較した結果、トランスポゾンが逆位に関与したことが示唆された。親株ではこの配列が 1 コピーであるのに対し、402-2 株では 2 コピーあった。したがって、トランスポゾンは染色体上の 2.5 Mb 離れたところに逆向きに転座した後、初めのコピーと相同組換えを起こして逆位が生じたと推定される。

これを証明するため、親株のトランスポゾンの全塩基配列 (6.5 kb) と 402-2 株の 2 コピーのトランスポゾンの両末端の塩基配列を決定した。トランスポゾンには両末端に direct repeat (DR) があり、その塩基配列はコピーごとに異なる。したがって、もし 2 コピーのトランスポゾン間で組換えが起こればキメラ DR が生じるはずである。事実、親株と変異株の 3 つのトランスポゾンの両末端配列を比較したところ、予想通り後者にはキメラ DR (GTGAC—GGAGA, GGAGA—GTGAC) が生じていた。また、トランスポゾンを切断しない酵素 *ScaI*+*NotI* で消化して、3 つのコピーを PFGE ゲル上で巨視的に確認した。さらに、トランスポゾンの中に、トランスポゼース、リゾルベース/リコンビナーゼ、膜貫通タンパク質、ABC トランスポーターおよび GntR ファミリー転写因子をコードする遺伝子を同定した。こうして、放線菌において初めて発見された染色体逆位の生成機構が明らかになった (投稿準備中)。

S. coelicolor A3(2) の線状染色体と SCP1 の相互作用

1. SCP1 組み込み株の特異的な遺伝子転移

SCP1 の全塩基配列決定 (356,023 bp) によって、この線状プラスミド上の 353 個の遺伝子構成が染色体に似ていて、環境適応や形態形成に寄与していることが示唆された⁽¹⁴⁾。SCP1 は *S. coelicolor* A3(2) の線状染色体と相互作用して、その中央付近に組み込まれる。SCP1 組み

込み株は SCP1 をもたない株と接合させたとき、組み込み領域の両側または片側の染色体 DNA を転移する (bidirectional および unidirectional donor)。このような特異的な DNA 転移の原因を明らかにするために、*S. coelicolor* 2612 株および A634 株の染色体に組み込まれた SCP1 の構造を解析した。

2612 株では、染色体に対して SCP1 が図 6 に示した向きに組み込まれ、左側の末端逆位配列 (TIR-L, 75kb) は完全に保存されていたが、TIR-R は欠失していた。さらに、TIR-R の外側の IS (insertion sequence, 挿入配列) クラスターを含む 33 kb 染色体 DNA も欠失していた^(27, 28)。一方、A634 株では、SCP1 が逆向きに組み込まれ、TIR-L の半分と TIR-R のすべてが欠失していた。組み込まれた SCP1 の両側には、2612 株で欠失していた IS クラスターが重複して存在していた⁽²⁸⁾。両株は同じく bidirectional donor であるにもかかわらず、その構造はこんなに大きく異なっていた。

2. S. coelicolor 2106 株の 2 つのキメラ染色体

S. coelicolor 2106 株は約 1,850 kb の巨大線状プラスミド SCP1'-*cysD* をもつ⁽²⁹⁾。このプラスミドと染色体の制限酵素地図の比較から、この株では 8,668 kb の線状染色体と 356 kb の SCP1 が組換えを起こして、7.2 Mb 染色体と SCP1'-*cysD* を生じたことが示唆された。SCP1'-*cysD* は大きな染色体領域を含み、様々な処理によっても除去できないことから、プラスミドというよりむしろ染色体であると考えられた。2 つの線状 DNA の接合部および両末端の塩基配列を決定し、これらが野生型染色体と SCP1 との一点交差によって生じたキメラ染色体であることを最終的に確認した (図 7)⁽³⁰⁾。染色体と SCP1 の組換え点に相同配列はなく、一点交差の結果、それぞれに 15 bp と 55 bp の欠失が起こっていた。Hiranueli らは、*S. rimosus* の線状染色体と線状プラスミド pPZG 101 が一点交差して、前者の末端近くにあったオキシテトラサイクリン生合成クラスターが後者に転移したことを明らかにした⁽³¹⁾。このような線状染色体と線状プラスミドの組換えは、線状染色体の複数化や二次代謝クラスターの水平伝播など、ゲノム進化を考える上で興味深い

図7 ■ 野生型染色体と SCP1 の一点交差による *S. coelicolor* 2106 株の 2 つのキメラ染色体の生成

(後述)。

いことが示唆される。

3. *S. violaceoruber* JCM4979 株のプラスミドラダー

S. violaceoruber JCM4979 株は大きさが約 35 kb ずつ異なる 390~630 kb の一連の SCP1 関連プラスミドをもつ。プラスミドラダーの各バンドを PFGE ゲルから切り出し、*EcoRV* で切断して再び PFGE で解析したところ、SCP1 の *EcoRV* 消化物とほとんど同じパターンを示したが、*EcoRV*-A' 断片のみが約 35 kb ずつ大きくなっていった (図 6 参照)。SCP2 が *EcoRV*-A' バンドにハイブリダイズしたので、この領域に SCP2 が異なるコピー数組み込まれたことが示唆された⁽²⁹⁾。しかし、各プラスミドの大きさの違いが SCP2 のサイズ (31.3 kb) と完全には一致しなかった。SCP1⁽¹⁴⁾ と SCP2⁽³²⁾ の全塩基配列が決定されたので、プラスミドラダー中の SCP1-SCP2 接合部の塩基配列と比較することによって、一連のプラスミドの構造解析が可能になった。それによると、①トランスポゾン Tn5714 どうしの相同組換えによって完全な SCP2 分子が SCP1 に組み込まれた後、②安定化領域が欠失した SCP2 DNA (28 kb) と隣接した SCP1 領域 (8 kb) からなる 36 kb DNA が増幅単位となり、これが異なるコピー数増幅されてラダーを生じたことが推定される (投稿準備中)。そのため、一連の線状プラスミドは、*EcoRV*-A' 上にある増幅領域以外は *EcoRV*-D 上の複製開始点を含めて SCP1 とまったく同じ構造をしている (図 6 参照)。一連のプラスミドが同一細胞内に本当に共存しているのか、あるいは個々の細胞は 1 種類の異なるサイズのプラスミドを保持しているのか、それを厳密に区別することは難しい。しかし、単離した直後のコロニーから調製した DNA サンプルが同じようにラダーを示したことから、前者の可能性が支持される。このように、きわめてよく似たプラスミドが同一細胞内で共存できることは不思議であり、これらの線状プラスミドには不和合性 (incompatibility) が働いていな

線状染色体の進化と再編成に関するいくつかの仮説

上述のように、*S. griseus* 2247 株の欠失変異株の多くでは線状染色体が環状化していた。融合した欠失末端どうしに相同配列はなく、環状化は非相同組換えによって起こっていた。このように、放線菌の染色体は線状でも環状でも複製維持される。これは放線菌が、大腸菌型の両方向複製装置と線状プラスミド・ウイルス型の末端複製装置の両方を備えているためである。このことから、進化の過程においてまったく逆の出来事が起こった可能性が示唆される。つまり、線状染色体は、大腸菌型の環状染色体と線状プラスミドが一点交差して生まれたと推定される^(4, 33, 34)。一方、*S. coelicolor* 2106 株の 2 つのキメラ染色体の生成機構からは、線状染色体どうしあるいは線状染色体と線状プラスミドが一点交差して、線状染色体の複数化が起こったことが示唆される^(30, 35)。生物はこのように、「環状染色体→線状染色体→線状染色体の複数化」とゲノム構造を変化させることによって、進化に伴って飛躍的に増大したゲノム情報量を収容可能にしてきたのだろう。不和合性が作用する環状レプリコンとは違って、真核生物の複数の線状染色体が同一細胞内に共存できることは、このために好都合であった。同じように、*S. violaceoruber* JCM4979 株の一連の線状プラスミドが共存できることは、ゲノム進化の点からたいへん興味深い。

線状染色体と線状プラスミドの相互作用は、放線菌の二次代謝能の水平伝播に関しても重要な示唆を与えている。*S. rimosus* の線状染色体は pPZG101 と一点交差して、オキシテトラサイクリン生合成クラスターをプラスミド側に転移した。また、*S. rochei* 7434AN4 株の線状プラスミド pSLA2-L (210,614 bp) の全塩基配列決定によって、その上にランカサイジン・ランカマイシン・構

造未知のⅡ型ポリケチド・カロテノイドなど多くの生合成クラスターの存在することがわかった⁽³⁶⁾。これらの結果は、二次代謝能の水平伝播機構に関して次の2つの可能性を示唆している。すなわち、①生合成クラスターを載せた線状プラスミドが他の菌株に移ること、②そこで線状染色体と一点交差して生合成クラスターを染色体末端に転移することである⁽³⁵⁾。 *S. coelicolor* A3(2) と *S. lividans* の2つの線状染色体は、コア領域の6 Mb はよく似ているが両末端の3 Mb は異なる。放線菌の線状染色体の末端領域には、テロメア配列を除くと生命維持に必要な遺伝子がないため、様々な遺伝子と交換可能なのである。

S. griseus の線状染色体が、末端欠失に伴って示したダイナミックな構造変化を図4にまとめた。これらの構造変化から、放線菌の線状染色体の再編成を支配している原理および両末端にあるTIRの機能に関して次のようなことが示唆される^(21, 22, 35, 37)。放線菌の線状染色体は頻繁に末端欠失を起こしているが、欠失が一方のTIRの範囲内にある場合は、もう一方の完全なTIRを用いた組換え修復によって末端が回復する。このような修復はしばしば起きているが、まったく同じテロメア構造が回復されるので、通常はこれに気がつかない。放線菌の線状レプリコンの両末端にあるTIRは、相同組換えのための相同配列を保証していると思われる。TIRを越えて欠失が進んだ場合に、もし両アーム上に相同配列があれば、MM9株のように組換え修復によってアーム置換が起こる。この場合は染色体の一部が失われるが、より大きなTIRが形成されてテロメアが回復する。放線菌染色体は様々な長さのTIRをもつが、このようなTIRの多様性はアーム置換によって生じたものであろう。両末端が欠失した場合はもはやテロメアを回復できないので、404-23, N2, No. 9, No. 83株のように欠失末端どうしが非相同組換えを起こして環状化する。アーム置換によって形成された異常に長いTIRも末端欠失に曝されるが、欠失末端にパリンドローム配列があるとそこにステムループが形成され、これがきっかけとなって組換え修復が起こり、301-22株のようにclosed racket frame構造が形成される。

このように、*S. griseus* の線状染色体は末端欠失が起こったときに、様々な戦略を用いてテロメアの回復をはかり、それが不可能な場合は染色体を環状化させて欠失が必須領域へ拡大するのを防いでいる。これまで長い間、染色体は安定なものと考えられてきたが、ゲノム構造の詳細な解析が可能となって、そうではないことが明らかになった。しかし多くの場合は、大腸菌O157に代

表されるように、外来遺伝子が染色体にモザイク状に挿入されている。放線菌の線状染色体のようなきわめてダイナミックな構造変化は初めての例であり、染色体構造の可塑性と生物の適応能力を改めて私たちに認識させてくれた。

文献

- 1) H. Kinashi: *Actinomycetologica*, **8**, 87 (1994).
- 2) 木梨陽康: バイオサイエンスとバイオインダストリー, **53**, 11 (1995).
- 3) 木梨陽康: 蛋白質 核酸 酵素, **43**, 1453 (1998).
- 4) K. F. Chater & H. Kinashi: "Microbiology Monographs, Vol. 7, Microbial Linear Plasmids", ed. by F. Meinhardt and R. Klassen, Springer Berlin/Heidelberg, 2007, p. 1.
- 5) C. H. Huang, Y. S. Lin, Y. L. Yang, S. W. Huang & C. W. Chen: *Mol. Microbiol.*, **28**, 905 (1998).
- 6) M. Salas: *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 39 (1991).
- 7) P. C. Chang & S. N. Cohen: *Science*, **265**, 952 (1994).
- 8) C. W. Chen: *Trends Genet.*, **12**, 192 (1996).
- 9) Z. Qin & S. N. Cohen: *Mol. Microbiol.*, **28**, 893 (1998).
- 10) M. S. Musiaowski *et al.*: *J. Bacteriol.*, **176**, 5123 (1994).
- 11) K. Bao & S. N. Cohen: *Genes Dev.*, **15**, 1518 (2001).
- 12) C. C. Yang *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **43**, 297 (2002).
- 13) H. Kinashi, M. Shimaji-Murayama & T. Hanafusa: *Plasmid*, **26**, 123 (1991).
- 14) S. D. Bentley *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **51**, 1615 (2004).
- 15) K. Goshi *et al.*: *J. Bacteriol.*, **184**, 3411 (2002).
- 16) C. H. Huang *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **63**, 1710 (2007).
- 17) A. Lezhava *et al.*: *J. Bacteriol.*, **177**, 6492 (1995).
- 18) A. Lezhava *et al.*: *Mol. Gen. Genet.*, **253**, 478 (1997).
- 19) P. Leblond & B. Decaris: *FEMS Microbiol. Lett.*, **123**, 225 (1994).
- 20) D. Kameoka *et al.*: *J. Bacteriol.*, **181**, 5711 (1999).
- 21) S. Inoue, K. Higashiyama, T. Uchida, K. Hiratsu & H. Kinashi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 1101 (2003).
- 22) T. Uchida, M. Miyawaki & H. Kinashi: *J. Bacteriol.*, **185**, 1120 (2003).
- 23) G. Fischer, T. Wenner, B. Decaris & P. Leblond: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14296 (1998).
- 24) T. Uchida, N. Ishihara, H. Zenitani, K. Hiratsu & H. Kinashi: *J. Bacteriol.*, **186**, 3313 (2004).
- 25) K. Sakaguchi: *Microbiol. Rev.*, **54**, 66 (1990).
- 26) M. C. Yang & R. Losick: *J. Bacteriol.*, **183**, 5180 (2001).
- 27) T. Hanafusa & H. Kinashi: *Mol. Gen. Genet.*, **231**, 363 (1992).
- 28) M. Yamasaki, M. Redenbach & H. Kinashi: *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 634 (2001).
- 29) H. Kinashi, M. Murayama, H. Matsushita & O. Nimi: *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 1261 (1993).
- 30) M. Yamasaki & H. Kinashi: *J. Bacteriol.*, **186**, 6553 (2004).
- 31) S. Pandza *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **28**, 1165 (1998).
- 32) I. Haug *et al.*: *Microbiology*, **149**, 505 (2003).
- 33) J. N. Volff & J. Altenbuchner: *FEMS Microbiol. Lett.*, **186**, 143 (2000).
- 34) C. W. Chen, C. H. Huang, H. H. Lee, H. H. Tsai & R. Kirby: *Trends Genet.*, **18**, 522 (2002).
- 35) 木梨陽康: 日本農芸化学会誌, **78**, 1067 (2004).
- 36) S. Mochizuki *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **48**, 1501 (2003).
- 37) Z. Qin & S. N. Cohen: *Mol. Microbiol.*, **45**, 785 (2002).