放線菌の線状プラスミド†

木 梨 陽 康

(三菱化成生命科学研究所)

放線菌は抗生物質生産を初めとして気中菌糸形成、メラニン色素生産、薬剤耐性、アルギニン生成など多くの形質発現が不安定で、これらの性質は生育中に spontaneous にまたは変異剤処理によって高頻度で失われる。このような遺伝的不安定性の原因として初めはプラスミドの関与が推定されたが、その後放線菌染色体 DNA が容易に増幅、欠失などの再編成を起こすことが明らかとなり、プラスミド説は急速に勢いを失った。このようなときに著者らはパルスフィールド電気泳動 (PFGE) を用いて、長い間検出されなかった methylenomycin 生産に関与する *Streptomyces coelicolor* のプラスミド SCP 1 が巨大線状プラスミドであることを明らかにした。著者らの研究結果を中心に放線菌の線状プラスミドについて総説し、巨大線状プラスミドの示すダイナミックな構造変化が放線菌の遺伝的不安定性にかかわる可能性について述べる。

1. 放線菌からの線状プラスミドの発見

早川ら⁽¹⁾は抗生物質生産におけるプラスミドの関与を調べるために多くの抗生物質生産菌を検索し、*S. rochei* 7434-AN4 株から線状プラスミド pSLA 2 (17 kb) を単離した。これは原核生物から初めて単離された線状プラスミドである。広近ら^(2,3)は pSLA 2 の 5' 末端に蛋白が結合していること、両末端に 614 bp の逆位配列 (inverted repeat) があることを明らかにした。これらはファージ ϕ 29 やアデノウイルスなどの線状 DNA ゲノムに共通にみられる性質であり、末端蛋白は DNA の複製開始に関与している。その後 oxytetracycline 生産菌 *S. rimosus*、 β -ラクタム抗生物質生産菌 *S. clavuligerus* からそれぞれ線状プラスミド pSRM (43 kb)⁽⁴⁾、pSCL (12 kb)⁽⁵⁾ が単離された。

2. 巨大線状プラスミドの発見

著者らは *S. lasaliensis* NRRL 3382 R におけるポリエーテル抗生物質 lasalocid の生合成研究の過程で、いくつかの実験結果からプラスミドの関与を推定した⁽⁶⁾。しかし他の例と同様に従来のアガロースゲル電気泳動や超遠心分離ではプラスミドは検出されなかった。そこで巨大線状 DNA の分離のために開発された PFGE^(7,8) を放線菌 DNA に初めて適用したところ、520 kb の巨大線状プラスミド pKSL を検出することができた⁽⁹⁾。従来のアガロースゲル電気泳動では一般に 30 kb 以上の線状 DNA は分離しないため、pKSL のような巨大線状プラスミドは染色体 DNA の線状分解物のバンドと重なってこれまで検出されなかったのである。この pKSL の発見は長い間探し続けられ検出できなかった抗生物質生産に関与するプラスミドは、従来考えられていたような巨大な環状プラスミドではなく巨大な線状プラスミドではないかという考えをもたらし、そこでプラスミド性とされていてこれまでプラスミドが検出されなかった抗生物質生産菌を PFGE で分析したところ、表 1 に示したように *S. lasaliensis* も含めて合計 6 株から巨大線状プラスミド (90~590 kb) を検出することができた⁽¹⁰⁾。

3. 抗生物質生産への関与の証明^(9,11)

表 1 に示したように *S. violaceoruber* JCM 4979 株は 30 kb ずつ長さの異なる 410-590 kb の一連のプラスミドを持つ。この株は Hopwood たちが使っている *S. coelicolor* A3(2)1147 株と同じく Sermoniti の元株 *S. coelicolor* A3(2) に由来し methylenomycin を生産するので、*S. coelicolor* A3(2) JCM 4979 株と呼ぶことができる。*S. coelicolor* A3(2) における methylenomycin 生産にはプラスミド、SCP 1 が関与することが Hopwood たちによる長い間の遺伝的研究により明らかにされ⁽¹²⁾、さらに Chater ら⁽¹³⁾によって methylenomycin 生合成遺伝子 (*mmy*) が耐性遺伝子 (*mmr*) とともに SCP 1 上でクラスターを形成していることが明らか

† Linear Plasmids in *Streptomyces*.
Haruyasu KINASHI (Mitsubishi Kasei Institute of Life Sciences, Machida, Tokyo 194)

表 1 抗生物質生産放線菌の巨大線状プラスミド

菌 株	抗 生 物 質	プ ラ ス ミ ド (kb)
<i>S. lasaliensis</i> NRRL 3382R	lasalocid, echinomycin	520
<i>S. violaceoruber</i> JCM 4979	methylenomycin	410, 440, 470, 500, 530, 560, 590
<i>S. fradiae</i> C373.1	tylosin	420
<i>S. parvulus</i> ATCC 12434	actinomycin	520, 560, 580
<i>S. venezuelae</i> ATCC 10712	chloramphenicol	130
<i>S. rochei</i> 7434-AN4	lankacidin	17 (pSLA2), 90, 180

にされた。このようなデータの蓄積にもかかわらず、SCP 1 自身は検出されなかった。JCM 4979 株以外の *S. coelicolor* A3(2) 株の巨大線状プラスミドの有無を調べるために、Hopwood 教授から種々の株をいただき PFGE で分析した。その結果、表 2 に示したように 1147, M138, M146 株は 350 kb の巨大線状プラスミドを持ち、1984 株は 550 kb のプラスミドを持つことが明らかとなった。JCM 4979 株は前述のように約 30 kb ずつ長さの異なる一連のプラスミドを有する。一方染色体に SCP 1 が組み込まれたとされる NF 株や SCP 1⁻ の M124, M130 株からはプラスミドは検出されなかった。

次にこれらのプラスミドと SCP 1 との関係を明らかにするために *mmr* を含むプラスミド pIJ601⁽¹⁴⁾ を用いて Southern hybridization を行ったところ、このプローブはすべてのプラスミドバンドおよび NF 株の原点 (染色体 DNA を含む) に hybridize したが SCP 1⁻ 株にはしなかった。さらにプラスミドを持つ株および NF 株の全 DNA を抽出し *Pst*I で切断したところ、いずれも 2.6 kb の *mmr* 断片を与えた。

これらの結果および Hopwood たちによる遺伝解析の結果から次のことが明らかとなった。1) 1147, M138,

M146 株の 350 kb の巨大線状プラスミドは SCP 1 自身であり、そのうえに methylenomycin 生合成クラスターが乗っている。2) 1984 株のプラスミドは SCP 1'-*cys*B であり染色体 DNA 断片の挿入により 550 kb と大きくなっている。3) 菌体の由来から 1147 株と同じと考えていた JCM 4979 株は一連のプラスミドを持つ。(これらのプラスミドを pA3(2)s と呼び、その成因については後述する) 4) NF 株はプラスミドを持たず SCP 1 は染色体に組み込まれている。

他の巨大線状プラスミドと抗生物質生産との関連についてふれると、*S. rochei* 7434-AN4 からは表 1 に示したように pSLA2 の他に pSLA2-M (90 kb), pSLA2-L (180 kb) が検出され、変異株の PFGE 分析から pSLA2-L と lankacidin 生産との間に対応がみられた。*S. lasaliensis* は lasalocid の他に echinomycin を生産するが、各種変異株の解析から lasalocid よりむしろ echinomycin 生産と pKSL の間に相関がみられた⁽⁴⁾。Hersherberger ら⁽¹⁵⁾は *S. fradiae* の tylosin 非生産株にも巨大線状プラスミドが検出されたことから、このプラスミドの抗生物質生産への関与を否定している。このように

表 2 *S. coelicolor* A3(2) における SCP 1 のさまざまな存在形態

菌 株	PFGE 分 析	遺伝解析
1147	SCP 1 350 kb	SCP 1 ⁺ SCP 2 ⁺
M138	SCP 1 350 kb	SCP 1 ⁺ SCP 2 ⁻
M146	SCP 1 350 kb	SCP 1 ⁺ SCP 2 ⁻
1984	SCP 1'- <i>cys</i> B 550 kb	SCP 1'- <i>cys</i> B ⁺
JCM 4979	pA3(2)s 410-590 kb	SCP 1 ⁺ SCP 2 ⁺
2612	integrated	NF SCP 2 ⁺
A317	integrated	NF (SCP 2 ⁺)
A332	integrated	NF (SCP 2 ⁺)
M124	—	SCP 1 ⁻ SCP 2 ⁻
M130	—	SCP 1 ⁻ SCP 2 ⁻

SCP*: a variant of SCP 2

図 1 SCP 1 の物理地図

図 2 pA3(2) プラスミドの推定される生成機構

SCP 1 の系以外では巨大線状プラスミドの抗生物質生産への関与はまだ十分には証明されていない。

4. SCP 1 の物理地図

SCP 1 のアガロース中での制限酵素切断による解析の結果、図 1 に示したような物理地図が得られた。この地図はまだ不十分であり現在詳細な解析中ではあるが、SCP 1 が線状であることを PFGE 以外の方法で初めて証明した。さらに両末端に非常に長い (~70 kb) 逆位配列があることを示唆したが、これは hybridization によって証明された。これまで線状 DNA ゲノムに見つけられた逆位配列はいずれも 1 kb 以下である。また SCP 1 の調製の際に pronase 処理を除くとプラスミドバンドが検出されなかったことから、SCP 1 の末端にも蛋白が結合していることが推定された。

5. JCM 4979 株のプラスミド pA 3 (2) s の解析⁽¹¹⁾

前述のように JCM 4979 株は一連のプラスミド pA 3 (2) s を持つが、この株は SCP 1⁺ SCP 2⁺ であり各プラスミドの長さの差が約 30 kb であることから、SCP 2 の SCP 1 への組込みが推定された。SCP 2 は Schrepf らによって放線菌から初めて単離された 31.4 kb の環状プラスミドである。上の推定は SCP 2 をプローブとした Southern hybridization によって支持された。pA 3 (2) s 上の SCP 1 と SCP 2 の間の junction 部分およびそれに対応する SCP 1 および SCP 2 部分の cloning, sequencing による詳細な解析の結果、SCP 1 にはもともと約 3.7 kb の SCP 2 断片が含まれること、pA 3 (2) s の生成に際し 2 つの junctions の一方で欠失が起こることが明らかとなった。この結果から、図 2 に示したような順序で SCP 2 の SCP 1 への組込み、欠失、増幅が起こり、pA 3 (2) s が生成したものと思われる。

放線菌においては SLP 1 に代表されるように、環状プラスミドが染色体 DNA に site-specific に組込まれたり、逆に染色体から切り出されたりすることが知られている⁽¹⁰⁾。上の結果は巨大線状プラスミド上でも同じようなことが起こり、さらに組込まれた環状プラスミドの欠失、増幅も起こることを示している。遺伝子の増幅、欠失が隣合って起こることは放線菌染色体 DNA の再編成の特徴であり⁽¹⁷⁾、同じような機構が巨大線状プラスミド上でも働いているものと思われる。

ま と め

以上 *S. coelicolor* A 3 (2) の SCP 1 を中心に SCP 1 が 350 kb の巨大線状プラスミドであること、SCP 1

はさまざまな存在形態をとること、SCP 2 が SCP 1 に組込まれて pA 3 (2) プラスミドが生ずることを述べた。ここでは紙面の都合でふれなかったが、著者らは SCP 1 の染色体 DNA への組込み機構についても解析中であり、NF 株では組込み時に欠失が起こることを明らかにしつつある。つまり放線菌の遺伝子の不安定性に関係する組込み、欠失、増幅などのさまざまな現象が SCP 1 をめぐって起こっていることが判明した。巨大線状プラスミドはその大きさ故、抗生物質生合成遺伝子の他にもさまざまな遺伝子をコードしている可能性が考えられるが、一方でそのダイナミックな構造変化の機構解析が放線菌の特徴である遺伝的不安定性の原因解明に役立つものと期待される。

- (1) T. Hayakawa, T. Tanaka, K. Sakaguchi, N. Ōtake and H. Yonehara: *J. Antibiot.*, **25**, 255 (1979).
- (2) H. Hirochika and K. Sakaguchi: *Plasmid*, **7**, 59 (1982).
- (3) H. Hirochika, K. Nakamura and K. Sakaguchi: *EMBO J.*, **3**, 761 (1984).
- (4) I. Chardon-Loriaux, M. Charpentier and F. Percheron: *FEMS Microbiol. Lett.*, **35**, 151 (1986).
- (5) C. L. Keen, S. Mendelovitz, G. Cohen, Y. Aharonowitz and K. L. Roy: *Mol. Gen. Genet.*, **212**, 172 (1988).
- (6) H. Kinashi, S. L. Otten, J. S. Duncan and C. R. Hutchinson: *J. Antibiot.*, **41**, 624 (1988).
- (7) C. L. Smith and C. R. Cantor: *Methods Enzymol.*, **155**, 449 (1987).
- (8) G. F. Carle and M. V. Olson: *Methods Enzymol.*, **155**, 468 (1987).
- (9) H. Kinashi, M. Shimaji and A. Sakai: *Nature*, **328**, 454 (1987).
- (10) H. Kinashi and M. Shimaji: *J. Antibiot.*, **40**, 913 (1987).
- (11) H. Kinashi: *Biology of Actinomycetes* 88, ed. by Y. Okami, T. Beppu and H. Ogawara, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1988, p. 117.
- (12) K. F. Chater and D. A. Hopwood: *The Biology of the Actinomycetes*, ed. by M. Goodfellow, M. Mordarski and S. T. Williams, Academic Press, London, 1984, p. 229.
- (13) K. F. Chater and C. J. Bruton: *EMBO J.*, **4**, 1893 (1985).
- (14) A. Aguilar and D. A. Hopwood: *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 1893 (1982).

- (15) C. L. Hershberger : Biology of Actinomycetes' 88, p.133.
 - (16) C. A. Omer and S. N. Cohen : *J. Bacteriol.*, 166, 999 (1986).
 - (17) H. Schrempf, P. Dyson, W. Dittrich, M. Betzler, C. Habiger, B. Mahro, V. Brönneke, A. Kessler and H. Düvel : Biology of Actinomycetes' 88, p.145.
-