

放線菌の線状ゲノムのダイナミックな構造変化の解析

●木梨 陽康

広島大学大学院先端物質科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

放線菌は細菌であるにもかかわらず、その染色体は線状であり、またしばしば線状プラスミドをもつ。両者はともに末端逆位配列 (terminal inverted repeat, TIR) をもち、5'末端には末端蛋白を結合している。線状染色体は不安定で両末端が容易に欠失して環状化し、また線状プラスミドと相互作用して様々な染色体-プラスミド・ハイブリッド構造を形成する。本研究では、このようなダイナミックな構造変化の結果生じた変異ゲノムの構造、特に新たに形成された融合部および末端の構造を解析することによって、放線菌の線状ゲノムの構造変化を支配するメカニズムを探り、複製維持に必須な末端構造を明らかにし、さらには生物一般の環状および線状染色体の起源・進化に関する知見を得ることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

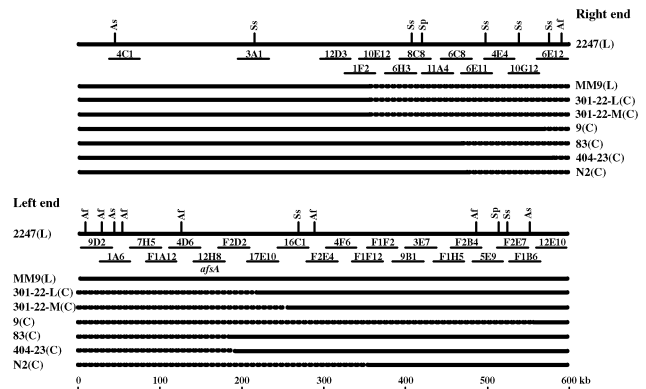
研究期間は4年間にわたるので、以下の研究計画は必ずしも研究開始時のものばかりではなく、その後に導入されたものも含む。

I. *Streptomyces griseus* の線状染色体のダイナミックな構造変化の解析 (論文2, 3, 5, 8)

S. griseus 2247株は7800kbの線状染色体をもつが、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引き起こす。これまでの研究によって、欠失変異株404-23およびN2株では両欠失末端が結合して染色体が環状化していることが明らかになった。環状化の融合部をクローン化・塩基配列決定し、両欠失末端の配列と比較したところ、両欠失末端に相同配列は見られなかった。それゆえ、環状化は欠失末端同士の非相同的組み換えによって起こったと推定された。2247株からはこの他にも様々な欠失変異株が得られたので、それらの染色体構造を詳細に解析することによって、放線菌の線状染色体のダイナミックな構造変化を支配するメカニズムを明らかにし、それがゲノム進化に果たした役割を解明しようとした。

研究対象として用いた変異株の中で、No.9およびNo.83株は404-23, N2株と同じく環状化変異株であった。MM9株は唯一線状染色体をもつ変異株であり、初めは右末端のみが欠失していると思われたが、その後の解析によって染色体の左末端が右末端に乗り移ったアーム置換変異株であることが明らかになった。301-22株は、初めは両末端の欠失後も線状染色体を維持していると思われたが、アーム置換・末端欠失・TIR内での閉環等の複雑な変化を経て、closed racket frame構造を形成したことが分かった。これらの結果を総合して、線状ゲノムに共通して存在する末端逆位配列(TIR)の機能および末端欠失にともなう再編成機構についての仮説を提唱した。一方、402-2株は、染色体のAseI, DraI消化物の解析によって、末端欠失ではなく染色体の中央部に約2Mbにわたる逆位が起きたことが示唆された。逆位の接合部のクローン化・塩基配列決定によって、そのメカニズムの解明を試

みた。



closed racket frame 構造を形成したことが分かった。これらの結果を総合して、線状ゲノムに共通

図1. *S. griseus* の線状染色体の両末端コスミド地図と変異株の欠失領域; (L), linear; (C), circular

II. *Streptomyces coelicolor* A3(2) の線状染色体とSCP1の相互作用の解析 (論文1, 4, 7, 9)

線状プラスミドSCP1は*S. coelicolor* A3(2)の線状染色体と様々な組み換えを起こし、染色体に組み込まれた状態、あるいは逆に染色体断片を組み込んだ状態で存在する。SCP1組み込み株はSCP1をもたない株と接合させたとき、SCP1およびその周りの染色体DNAを転移させる能力をもつ。このとき、組み込み株によって、組み込み領域の両側のDNAを転移させたり、片側のDNAを転移させたりする。このような方向性をもった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。一方、*cysB* donorである*S. coelicolor* 1984株からは600kbの巨大線状プラスミド(SCP1'-*cysB*)が検出されたので、このプラスミドの構造解析も行った。その結果、これは染色体DNA断片を中心にSCP1の左側が左右対称に折り返した構造をもつことが分かった。さらに、*cysD* donorである*S. coelicolor* 2106株からは1850kbの大きさの巨大線状プラスミドが検出されたが、これはSCP1と染色体が一点交差して生まれたキメラ染色体であることが明らかになった。このような結果に基づいて、線状染色体の複数化機構に関する仮説を提唱した。この他に、*S. violaceoruber* JCM4979株に見つかった線状プラスミドドラダーの構造解析を行い、これが30kbの環状プラスミドSCP2のSCP1への組み込みとSCP1断片の増幅によって生成したことを明らかにした。

〈研究期間の成果〉

I. *Streptomyces griseus* の線状染色体のダイナミックな構造変化の解析

(1) *S. griseus* 2247株の線状染色体の末端構造の解析 (論文2)

2247株のコスミドライブラリー中の右末端コスミド

6E12は染色体の右末端から約300bpまでを含むことが、これまでの研究で明らかになった(図1)。このコスミドの末端SalI断片をプローブとして、2247株DNAのSalI消化物にハイブリダイズさせたところ、2.7kbに染色体末端のシグナルが現われた。初めは、この断片を直接クローン化することを試みたが、多くの混在断片のために成功しなかった。そこで、他の大きな断片と離れて11kbの位置に末端断片を与えるAflIIで消化して、この断片を単離した後、さらにSalIで消化して末端SalI断片を得た。これをpUC19のBamHI+SmaI消化物にligateし、大腸菌を用いてクローン化した。得られたトランスフォーマントからサザン解析によって3つの陽性クローンpSGE1, pSGE2, pSGE3を選び出した。これらのプラスミドの塩基配列を決定したところ、pSGE1とpSGE2は染色体末端を正確に含むが、pSGE3では末端から10bpが欠失していることが分かった。染色体末端に見つかったいくつかのパリンドローム配列はループ構造を形成できるが、他のStreptomyces属放線菌の染色体末端とは異なって、Y字型の折り返し構造は形成不能であった(図2)。

放線菌の線状レプリコンは2つの複製様式をもっている。すなわち、中央付近にある複製開始点(oriC)からの両方向複製と末端蛋白をプライマーとする末端からの複製である。Cohenらの研究によって、oriCからの両方向複製においてleading strandの複製は3'末端まで行われるが、lagging strandの複製は5'末端まで完了せず、この複製されない部分を末端複製が補うものと推定された。この際、3'突出末端がY字型の折り返し構造を形成し、これが末端複製に関与する蛋白によって認識されると推定された。しかし、S. griseus 2247株の染色体末端は折り返し構造が形成不能であり、S. coelicolor A3(2)の線状プラスミドSCP1の末端も同様であった。これらの結果から、放線菌の線状レプリコンの末端複製には折り返し構造が必ずしも必須でないことが示唆された。

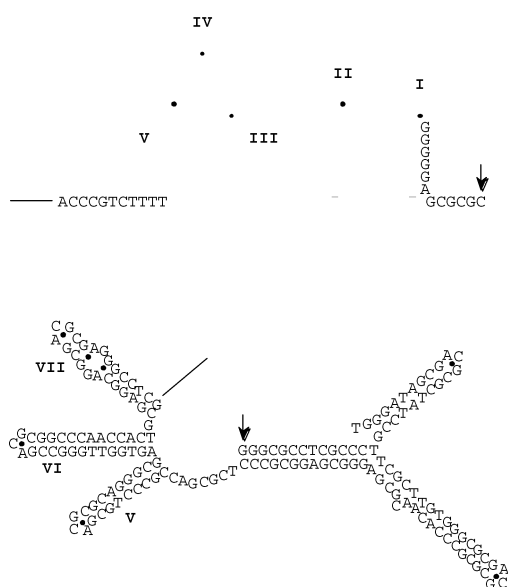


図2. Streptomyces の線状染色体の3'末端の2次構造 (A) S. griseus 2247 株, (B) S. lividans 66 株

(2) 環状化変異株S. griseus No.9, No.83の解析 (論文5)

これまでの研究によって、S. griseus 404-23, N2株では線状染色体の両欠失末端が非相同的組み換えを起こして

環状化したことが明らかになった。このような線状染色体の環状化機構の一般性を確かめるため、更に2つの変異株No.9およびNo.83の染色体構造を解析した。その結果、No.9株では染色体の左右の末端が30kbおよび550kb欠失し、No.83株では130kbおよび170kb欠失して、ともに新たな融合断片が生じていた。融合部を絞り込みクローン化して塩基配列を決定したところ、両株とも両欠失末端の間に相同性は見られなかった。それゆえ、欠失変異株の多くでは欠失末端同士の間で非相同組み換えによる染色体の環状化が起きたことが明らかになった(図3)。

(3) 染色体アーム置換変異株S. griseus MM9株の解析 (論文3)

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の取得を試みた。S. griseus 2247株の孢子懸濁液を99-99.9%致死の条件で紫外線照射して変異株を作製した。生き残ったコロニーからトータルDNAを抽出し、左右の末端逆位配列(TIR)の内側断片をプローブとしてサザン解析したところ、染色体の右アームのみが欠失した変異株MM9が得られた。整列化した末端コスミドライブラリーを用いたサザン解析によって、右欠失末端はコスミド10E12の上であり、欠失サイズは250kbであることが分かった。

MM9株では、コスミド10E12上の9.0kb BamHI断片に代わって、右欠失末端に6.6kb BamHI断片が新たに生じていた。この断片をクローン化し、これをプローブとしてサザン解析したところ、コスミド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及び6.6kb BamHI断片上の3つの相同領域を絞り込み、クローン化して塩基配列を決定したところ、極めて類似したリボ蛋白様ORFが見つかった。つまり、左右の染色体アーム上にある2つのリボ蛋白様ORF(ORF-L, R)が相同組み換えを起こして、6.6kbの融合BamHI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。従って、この株では左アームが右アームに乗り移り、結果的に450kbという巨大なTIRをもつ線状染色体に変化していた(図3)。これは、Leblondらによって報告されたStreptomyces ambofaciensにおける染色体アーム置換に続く第2の例である。このようなアーム置換は染色体の片側の末端(テロメア)が欠失したときに、それを回復するために放線菌が用いる戦略の一つであると思われる。

(4) S. griseus 301-22染色体のclosed racket frame構造の解析 (論文8)

変異株301-22の染色体欠失を、同じように末端コスミドライブラリーを用いて解析したところ、左右の欠失末端がコスミド4D6及び10E12上にあることが分かった。これら2つのコスミドが異なるSspI断片にハイブリダイズしたので、この変異株では両末端の欠失後も、依然として線状構造が維持されていると推定された。しかし、その後の解析によって、301-22株は特異的な環状染色体をもつことが明らかになった。

301-22株染色体の右欠失末端を解析したところ、コスミド10E12の9.0kb BamHI断片の代わりに6.6kb BamHI断片が生じていた。これらの断片が上述したアーム置換変異株MM9の場合と全く同じなので、この変異株においてもリボ蛋白様ORF間の相同組み換えによってアーム置換が起きたことが示唆された。これは6.6kb BamHI断片のクローン化・塩基配列決定によって証明された。3つの

リポ蛋白様ORFの塩基配列を比較したところ、同じORF間で相同組み換えが起きたにもかかわらず、組み換え点はMM9株の場合とは異なっていた。すなわち、MM9株においては組み換えが塩基307から578の間で起きたのに対して、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*において相同組み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調べている過程で、初めの解析で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いことが分かった。これは、左アームの欠失が解析中にも進行したことを示した。そこで、現有の301-22株からプロトプラストを調製し、シングルコロニー単離を行った。その結果、301-22株はアーム置換によって生じた2つの‘左アーム’がさらに欠失した変異株の混合物であることが明らかになった。単離した変異株の中の2株をアームの長さに基づいて301-22-L及び301-22-Mと名づけ、さらに詳しく解析した。

301-22-L及び-Mの染色体構造の詳しい解析過程は省略するが、これらの染色体は初め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がさらに欠失し、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たことが明らかになった(図3)。坂口らは、放線菌の線状レプリコンの両TIRが末端蛋白やその他の結合蛋白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DNA全体はracket frame構造をとると提唱した。この仮説はLosickらによる*Streptomyces lividans*染色体の両末端のin situ hybridizationによって支持された。301-22株染色体ではTIRの先端が閉じているので、私たちはこの構造を‘closed racket frame’と命名した。

301-22-L、-M株染色体のパンドロームの先端のクローン化を試みたが、これまで成功していない。そこで、親株である2247株の対応する領域をクローン化し、塩基配列を決定した。両変異株のパンドローム構造の先端に対応する位置に、片側のホモロジーの長さが14bp及び24bpのパンドローム配列が見つかり、これらがclosed racket frame構造の形成に関与したと思われる。すなわち、アーム置換の結果生じた長いTIRにおいても末端欠失が起こるが、欠失末端にたまたまパンドローム配列があると、そこでヘアピン構造が形成され、これが複製によって伸びたところで反対側のTIRと組み換え修復を起こして、closed racket frame構造が生じたものと推定した。

(5) TIRの機能および染色体の再編成機構に関する仮説の提唱(論文3, 9)

*S. griseus*の線状染色体が示すダイナミックな構造変化に基づいて、TIRの機能と染色体構造の進化に関して次のような仮説を提唱した(図3)。放線菌の線状染色体は常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を用いた組み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、全く同じ末端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、相同組み換えのための相同配列を保証していると考えられる。TIRを越えて欠失が進んだ場合に、もし両アーム上に類似配列があれば、MM9株のように組み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が形成されて末端が回復する。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と思われる。両末端が欠失した場合はもはや末端を回復することはできないので、404-23、

N2, No.9, No.83株のように欠失末端同士が非同相組み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、それが完全に欠失するまでに余分に時間がかかるので、その間に欠失末端に形成されたヘアピン構造がきっかけとなって組み換え修復が起こり、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きたときに、様々な戦略を用いて末端の回復をはかり、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。つまり、染色体構造がどのように変化しようとも、その機能を何とかして維持している。*S. griseus*の線状染色体のこのようなダイナミックな構造変化は、生物の染色体構造の可塑性と適応能力の多様性をあらためて認識させてくれた。

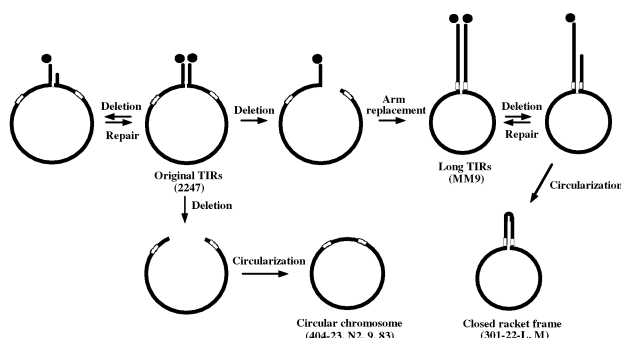


図3. *S. griseus* 2247株の線状染色体のダイナミックな構造変化とTIRの機能

(6) *S. griseus* 402-2株の染色体逆位の解析

S. griseus 402-2株染色体をAseIで消化しPFGEで解析したところ、AseI-B,D断片の代わりにAseI-B', D'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。これらの結果は、AseI-H,K,J,I断片を挟んでAseI-BとAseI-Dの間で約2Mbにわたる染色体逆位が起きたことを示唆した。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・塩基配列の比較を行った。その結果、比較的大きなトランスポゾン様配列(約7kb)が逆位に関与していることが推定された。親株ではこの配列が1コピーあるのに対して、402-2株では2コピーある。それゆえ、402-2株では2コピー目のトランスポゾンが染色体の2Mb離れた個所に逆向きに挿入された後、初めのコピーと相同組み換えを起こして逆位が生じたことと推定された。このような染色体逆位は放線菌では初めて報告された。

II. *Streptomyces coelicolor* A3(2)の線状染色体とSCP1の相互作用の解析

(1) 線状プラスミドSCP1の全塩基配列の決定(論文7)

SCP1はパルスフィールド電気泳動を用いて私たちが初めて検出し解析してきた巨大線状プラスミドである。英国John Innes CentreのChater教授らと共同して、このプラスミドの全塩基配列(356,023bp)を決定した。SCP1上の353個の遺伝子構成はむしろ染色体に似ており、ホストである*S. coelicolor* A3(2)の環境適応や形態形成に寄与しているように思われた。またこの成果は、以下に述べるSCP1と染色体とのinteractionの解析にたいへん有用である。

(2) *S. coelicolor* A3(2)のSCP1組み込み株2612およびA634の解析 (論文1)

SCP1は*S. coelicolor* A3(2)染色体に組み込まれ、組み込み株2612およびA634はSCP1-株と接合させると、SCP1を中心にその両側の染色体DNAを転移する(bidirectional 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、染色体に組み込まれたSCP1の構造解析を行った。2612株では、染色体に対してSCP1が右向きに組み込まれ、左側の末端逆位配列(TIR-L)は保存されていたが、TIR-Rは欠失していた。更に、ISクラスターを含む33kb染色体DNAが欠失していた。一方、A634株では、SCP1が左向きに組み込まれ、TIR-Lの半分とTIR-Rが欠失していた。SCP1の両側には、2612株では欠失していたISクラスターが重複して存在していた。両株は同じくbidirectional donorであるにもかかわらず、その構造はこのように大きく異なっていた。それ故、ISクラスターが関与するSCP1の組み込みモデルを提唱することはできなかったが、特異的なDNA転移の原因を明らかにするには至らなかった。

(3) *S. coelicolor* 2106株のキメラ染色体の構造解析 (論文9)

2106株は1850kbの巨大線状プラスミドSCP1'-cysDをもつ。このプラスミドおよび染色体の制限酵素切断地図の比較から、この株では8700kbの線状染色体と360kbのSCP1が組み換えを起こしてSCP1'-cysDと新たな染色体が生じたことが示唆された。SCP1'-cysDが様々なcuring処理によっても除去できなかったことから、これは生存に必須な染色体であると考えられた。つまり、この株は2つのキメラ染色体(7200, 1850kb)をもつ。両者の接合部及び後者(SCP1'-cysD)の両末端の塩基配列を決定し、これらが線状プラスミドSCP1と染色体の一点交差によって生じたことを最終的に確認した(図4)。これは線状染色体の複数化のモデルと捉えることができ、ゲノム進化を考える上で極めて興味深い。これまでに解析された放線菌の線状ゲノムは全てTIRをもつものに対して、2つのキメラ染色体は全く配列の異なるSCP1と染色体のテロメアを両末端にそれぞれもっている。従って、先にTIRは組み換え修復のための相同配列を提供していると述べたが、この機能は分子内だけではなく分子間においても働いている可能性がある。

(4) *Streptomyces coelicolor* 1984株の線状プラスミドSCP1'-cysBの構造解析

1984株は約600kbの線状プラスミドSCP1'-cysBをもつ。このプラスミドの物理地図を作製し、*S. coelicolor* A3(2)染色体およびSCP1の整列コスミドライブラリーを用いたhybridizationによって、各領域の由来を調べた。その結果、SCP1と染色体の接合部は一つしか検出されず、SCP1'-cysBはSCP1の左側260kbと染色体断片40kbが、後者を中心にして左右対称に2倍化した巨大パリンドロームプラスミドであることが分かった。接合部をクローン化・塩基配列決定することによって、染色体DNAは中央付近のコスミドD72, D84, D66領域を含むことが明らかになった。

(5) *Streptomyces violaceoruber* SANK9550株の環状プラスミドpSV1の構造解析 (論文4)

SANK9550株は環状プラスミドpSV1をもち、その上には線状プラスミドSCP1と同じく、メチレノマイシン生合成遺伝子群(mmy)がコードされている。SCP1は*S. coelicolor* A3(2)の染色体に組み込まれるので、mmyクラ

スターは染色体、線状プラスミド、環状プラスミドの3つの異なるゲノム上に存在することになる。このような多様な存在形態をとる原因を探るため、プラスミドpSV1の構造解析を行った。コスミドライブラリーを整列化し、EcoRIの切断地図を作製した結果、pSV1が162.5kbの巨大環状プラスミドであることが最終的に証明された。pSV1とSCP1とはmmy領域とその周辺のみが似ていたので、pSV1がSCP1に変換したり、あるいはその逆が起こった可能性は否定された。約20kbのmmy遺伝子群の周りにmini-circleおよびtransposase遺伝子が見つかったので、これらがmmy遺伝子群の水平伝播に関与した可能性が示唆された。

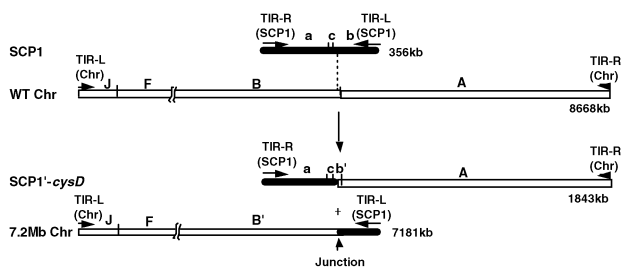


図4. *S.coelicolor* 2106株のキメラ染色体の生成機構

(6) *S. violaceoruber* JCM4979株のプラスミドラダーの解析

JCM4979株は390-610kbにわたるサイズ差35kbの一連のSCP1関連プラスミド(プラスミドラダー)をもつ。各プラスミドバンドをPFGEゲルから切り出し、EcoRVで消化して解析したところ、EcoRV-A断片のみが35kbずつ異なっていて、他の断片は同じであった。30kbの線状プラスミドSCP2がEcoRV-A断片にハイブリダイズしたので、この領域にSCP2が組み込まれたことが示唆された。組み込みの接合部のクローン化を含む詳細な解析の結果、一連のプラスミドは、SCP2からstability regionを除いた25kb断片とSCP1の10kb断片が増幅ユニットとなって、異なるコピー数だけ増幅して生じたことが示唆された。これも放線菌ゲノムのダイナミックな構造変化のもう一つの例である。これら一連の線状プラスミドはSCP1と同じ複製開始点(oriC)をもつので、このように極めて類似したプラスミドがなぜ同一細胞内で共存できるのか興味深い。

<国内外での成果の位置づけ>

私たちがパルスフィールド電気泳動を用いて線状プラスミドSCP1を初めて単離し、その物理的実体を明らかにしたことが契機となって、*Streptomyces*の染色体自身も線状構造であることが明らかになった。こうして、「原核生物は環状染色体をもつ」という遺伝学の常識は否定されたが、このことに私たちの研究は大いに貢献した。その後、放線菌の線状ゲノムの再編成がいくつかのグループによって報告されたが、私たちのように徹底的に解析しているグループは他にない。放線菌の線状ゲノム研究の第一人者として、これまで多くの国際学会に招待され、またMol. Microbiol., J. Bacteriol.等の一流誌に投稿された論文のreviewを依頼されている。

私たちが提唱した線状ゲノムのTIRの機能や再編成機構に関する仮説、あるいは線状ゲノムの複数化に関する仮説についての反響はまだ大きいとは言えないが、それらは線状ゲノムのダイナミックな構造変化やゲノム進化

を正確に説明しており、将来必ず広く認められると確信している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

4年間の研究期間に多くの問題を解決し、その成果を報文としてまとめてきたが、また解決できていない最大の課題は、*S. coelicolor* 301-22株染色体や線状プラスミドSCP1'-cysBで見つかった巨大パリンドローム構造の先端部分のクローン化およびその塩基配列の決定である。大腸菌中ではこのような構造は複製不能であり、逆にそれを利用して、インサートが入らなければベクター自身は複製できないsuicide vectorが作られている。それゆえ、塩基配列決定には特別な方法が必要である。

また、SCP1の発見に続いてもっとも早くから始めた「SCP1組み込み株が示す特異的なDNA転移の原因の解明」は依然として解決されていない。染色体のoriCにSCP1のoriCが加わることが関係していると思われるが、もっと多くの変異株に組み込まれたSCP1の構造を比較解析する必要がある。

〈今後の課題〉

この4年間に多くの問題を解決することができたが、また同時に新たな疑問も生まれてきた。私たちだけでこれらの問題すべてを解決することはとうてい困難であるが、他の人たちの参入を期待して以下に今後の課題を述べる。

(1) *S. coelicolor* A3(2)のSCP1組み込み株が示す特異的なDNA転移の原因の解明

(2) 巨大パリンドローム構造の先端部の塩基配列決定およびその複製機構の解明

S. griseus 301-22株染色体や線状プラスミドSCP1' cysBに加えて、*S. rochei*の変異株KE32の線状プラスミドpSLA2-L1にも巨大パリンドローム構造が見つかった。いずれの場合も、パリンドロームの先端部の塩基配列は不明であり、この部分を何とかクローン化するか、直接シーケンシングする必要がある。大腸菌では複製不能なこのような構造が放線菌から多く見つかったことは、放線菌では大腸菌とは異なった複製装置が働いていることを示唆し、新たな研究課題を提供した。

(3) 線状ゲノムの末端複製機構の解析

*S. griseus*染色体およびSCP1の末端はともにY字型折り返し構造を取ることができない。SCP1の全塩基配列が明らかになったが、その末端塩基配列は他の線状レプリコンとは全く異なるので、塩基配列の相同性からは末端蛋白遺伝子を同定することはできない。台湾のChenから、SCP1の末端蛋白を単離したという話を聞いたが、まだ報文としては出ていない。Cohenらが提唱した末端折り返し構造の末端複製における機能については、さらなる研究が必要である。

(4) SCP1プラスミドドラダーのcompatibility

S. violaceoruber JCM4979株がもつSCP1プラスミドドラダーの構造をほぼ明らかにしたが、このように極めて似た一連のプラスミドがなぜ同一細胞内で共存できるのかという疑問が生じた。私自身この方面の知識不足ではっきりとは言えないが、真核生物が複数の線状染色体をもつことを考えあわせると、線状レプリコンに

はincompatibilityは存在しないように思われてきた。生物の進化の過程で、遺伝情報量を増やさなければならぬという絶対的なプレッシャーの下に複数の線状染色体が生まれてきたのであろう。

(5) 放線菌の線状ゲノムの様々な構造変化に関する私たちの成果および他のグループの成果をまとめて総説を書き、私たちの研究を世界にアピールする。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0111081221

M. Yamasaki, M. Redenbach and H. Kinashi, Integrated structures of the linear plasmid SCP1 in two bidirectional donor strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.*, 264, 634-642 (2001).

2. 0209121025

K. Goshi, T. Uchida, A. Lezhava, M. Yamasaki, K. Hiratsu, H. Shinkawa and H. Kinashi, Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.*, 184, 3411-3415 (2002).

3. 301201236

Uchida, T., Miyawaki M. and Kinashi, H., Chromosomal arm replacement in *Streptomyces griseus*, *J. Bacteriol.*, 185, 1120-1124 (2003).

4.37011859

M. Yamasaki, Y. Ikuto, A. Ohira, K. Chater and H. Kinashi, Limited regions of homology between linear and circular plasmids encoding methylenomycin biosynthesis in two independently isolated streptomycetes, *Microbiology*, 149, 1351-1356 (2003).

5. 307011907

S. Inoue, K. Higashiyama, T. Uchida, K. Hiratsu and H. Kinashi, Chromosomal circularization in *Streptomyces griseus* by nonhomologous recombination of deletion ends, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67, 1101-1108 (2003).

6. 307011916

S. Mochizuki, K. Hiratsu, M. Suwa, T. Ishii, F. Sugino, K. Yamada and H. Kinashi, The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism, *Mol. Microbiol.*, 48, 1501-1510 (2003).

7.403261237

S. D. Bentley, S. Brown, L. D. Murphy, D. E. Harris, M. A. Quail, J. Parkhill, B. G. Barrell, J. R. McCormick, R. I. Santamaria, R. Losick, M. Yamasaki, H. Kinashi, C. W. Chen, G. Chandra, D. Jakimowicz, H. M. Kieser, T. Kieser and K. F. Chater, SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.*, 51, 1615-1628 (2004).

8. 0410080952

T. Uchida, N. Ishihara, H. Zenitani, K. Hiratsu and H. Kinashi, Circularized chromosome with a large palindromic structure in *Streptomyces griseus* mutants, *J. Bacteriol.*, 186, 3313-3320 (2004)

9. 0410080952

M. Yamasaki and H. Kinashi, Two chimeric chromosomes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) generated by single crossover of the wild-type chromosome and linear plasmid SCP1. *J. Bacteriol.*, 186, 6553-6559 (2004)