



## 异源基因在链霉菌系统中的克隆和表达

董可宁 还连栋

(中国科学院微生物研究所, 北京)

链霉菌作为遗传学和分子生物学分析系统已引起人们的兴趣,这不仅因为链霉菌是抗生素的主要产生菌,它还产生许多胞外酶以及酶的抑制物等<sup>[1]</sup>。此外链霉菌尚有许多引人注意的特征,如细胞分化,基因组的高GC含量等。

近年来 DNA 体外重组、基因克隆、基因融合、位点专一突变及 DNA 碱基序列分析等分子生物学技术已广泛应用于链霉菌的遗传学研究。链霉菌的质粒载体、噬菌体载体及链霉菌受体系统都有很大的发展,适合于链霉菌研究的原生质体转化及转染技术已基本成熟,链霉菌基因克隆已经有不少成功的例子,这些都为深入研究异源基因在链霉菌系统中的表达创造了有利的条件<sup>[2,3]</sup>。本文着重讨论异源基因在链霉菌系统中的表达。

### (一) 链霉菌是很有希望的有待进一步开发的基因表达系统

自从遗传工程技术问世以来,克隆外源基因尤其是真核生物基因,大多使用大肠杆菌系统,然而大肠杆菌系统的不足之处是蛋白质产物不易分泌、人们转而利用枯草芽孢杆菌及酵母作为宿主系统<sup>[4,5]</sup>。但是芽孢杆菌具有很强的胞外蛋白酶,因而分泌异源基因蛋白产物的尝试不易成功<sup>[6]</sup>,因此人们逐渐注意开发和利用链霉菌作为表达和分泌异源基因的宿主系统。

近几年来有关链霉菌转录、翻译的起始和终止信号、蛋白质分泌信号等分子生物学研究有很大进展,这些研究结果初步揭示了链霉菌是表达异源基因的很有潜力的受体系统。

链霉菌启动子区域的核苷酸序列分析表明链霉菌至少有三种类型的启动子序列,利用启动子

探测质粒<sup>[7-9]</sup>已经证实其中一类 SEP 启动子 (*Streptomyces* -*E. coli*-type promoters)在链霉菌和大肠杆菌中都有功能。SEP启动子的-10和-35区域以及它们之间的间隔均类似大肠杆菌的启动子保守序列,但是另一类链霉菌启动子在大肠杆菌中不能表达。这类启动子没有典型的原核生物启动子保守序列而且GC含量较高<sup>[10]</sup>。

随机克隆的链霉菌 DNA 片段极少能在大肠杆菌中启动 LacZ 基因的转录,而且转录水平也很低。反之,大肠杆菌的UV 5 和 recA启动子,粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的 trp 启动子及地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) penP 启动子都能启动链霉菌启动子探测质粒 pSLP114 及 pSLP 124 中氯霉素乙酰转移酶基因的表达,说明链霉菌多种 RNA 多聚酶中有的 RNA 多聚酶能识别上述细菌的启动子<sup>[7]</sup>。

除了大肠杆菌的启动子外,还有一些基因如 pBR 322 的 tet 基因<sup>[2]</sup>, Tn5 的卡那霉素抗性基因 (Kan)<sup>[11]</sup>, *E. coli* 质粒 pACYC177 的 Kan 基因和 pACYC184 的 CAT 基因都能在链霉菌中表达<sup>[12]</sup>。

虽然链霉菌 DNA 的 GC 含量高达 73% 以上,它在三联体遗传密码的第三位和第一位较多使用 GC 碱基<sup>[10,13,14]</sup>,但这不是异源基因在链霉菌中表达的绝对障碍。

链霉菌 RNA 多聚酶的研究结果和链霉菌启动子的研究相印证,天蓝色链霉菌 [*S. coelicolor* A3(2)] 及抗生链霉菌 (*S. antibioticus*) 的 RNA 多聚酶具有  $\beta\beta'\alpha 2$  亚单位结构<sup>[15]</sup>,和其他原核生物一样。链霉菌有多种 RNA 多聚酶,至少有三种

本文于1989年6月13日收到。

已得到证实<sup>[16-17]</sup>。*S. coelicolor*中的一种RNA多聚酶含有35kDa的 $\sigma$ 因子能识别典型的原核生物启动子保守序列,而另一种具有49kDa的 $\sigma$ 因子的RNA多聚酶能识别枯草芽孢杆菌的发育调节基因的启动子。

转录信号及基因克隆等的研究表明链霉菌基因较少能在大肠杆菌和枯草芽孢杆菌系统中表达。反之,大肠杆菌及枯草芽孢杆菌的基因则较多能在链霉菌系统中表达。

以上这些对链霉菌启动子、RNA多聚酶等的分子生物学研究说明链霉菌可能是表达外源基因的

的较为宽容的受体系统<sup>[7]</sup>。

## (二) 异源基因及功能序列在链霉菌系统中克隆和表达

到目前为止牛生长激素基因<sup>[18]</sup>,人类白细胞介素2 (Interleukin-2)<sup>[19]</sup>以及人类干扰素IFN- $\alpha$ 2<sup>[20]</sup>、IFN- $\alpha$ 1<sup>[21]</sup>、人类肿瘤坏死因子基因<sup>[22]</sup>,都已经利用基因重组技术引入链霉菌并得到表达(见表1)。此外,异源的原核生物结构基因(见表2)、启动子(见表3)、终止子以及分泌信号序列等(见表4)引入链霉菌中也得到表达。

表 1 真核基因在链霉菌中的克隆和表达

基 因	受 体	载 体	文 献
牛生长激素基因 (bGH)	<i>S. lividans</i> 66	pIJ702	[18]
人干扰素 $\alpha$ 1基因	<i>S. lividans</i>	pIJ487	[21]
人干扰素 $\alpha$ 2基因	<i>S. lividans</i> 1326	pIJ702	[20]
人乙肝表面抗原 (HBsAg) 基因	<i>S. lividans</i> 1326	pIJ702	[29]
人白细胞介素2 (IL-2) 基因	<i>S. lividans</i>	pIJ702	[19]
人肿瘤坏死因子 (TNF)	<i>S. lividans</i> TK24	pIJ702	[22]

表 2 原核基因在链霉菌中的克隆和表达

基 因	受 体	载 体	文 献
沙门氏菌质粒编码的 $\beta$ -内酰胺酶基因	<i>S. lividans</i>		[33]
<i>E. coli</i> LacZ基因	<i>S. lividans</i> <i>S. coelicolor</i>	$\phi$ C31 噬菌体	[34]
<i>E. coli</i> 染色体上的ampC $\beta$ -内酰胺酶	<i>S. lividans</i>	pJAS01	[8]
<i>E. coli</i> 潮霉素抗性基因	<i>S. ambofaciens</i>	穿梭质粒 pKC293 pKC305	[35]
来自Tn5的新霉素抗性基因 (Nm <sup>R</sup> )	<i>S. lividans</i>		[36]
<i>Thermomonospora fusca</i> 的纤维素酶基因	<i>S. lividans</i>	穿梭质粒	[37]
<i>E. coli</i> 氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因	<i>S. lividans</i>	pSLP124 pSLP114 (启动子探测质粒)	[7]
<i>E. coli</i> 质粒pACYC177的卡那霉素 (Kan) 抗性基因	<i>S. lividans</i>	杂种质粒 (pACYC + pSLP111)	[12]
<i>E. coli</i> 质粒pACYC184的氯霉素抗性 (CAT) 基因	<i>S. lividans</i>	杂种质粒 (pACYC + pSLP111)	[12]
<i>E. coli</i> 的葡萄糖异构酶基因	<i>S. lividans</i>	穿梭质粒 (pIJ486 + pGEM3)	
<i>E. coli</i> 的 $\beta$ -半乳糖苷酶基因			[38]
pBR 322的四环素抗性基因	<i>S. albus</i> G <i>S. albus</i> P	$\phi$ C31	[39]

1. 在变铅青链霉菌(*S. lividans*)中合成牛生长激素: 牛生长激素(bGH)是在牛脑垂体合成的217个氨基酸的蛋白质。经加工去除前导序列, 成熟的激素含191或190个氨基酸。氨基端是丙氨酸或苯丙氨酸。从 bGH 基因的 mRNA 反转录的 cDNA 已经分离<sup>[23,24]</sup>, Gray 先将 cDNA 克隆到大肠杆菌中, 然后再克隆到链霉菌质粒 pIJ-702, 并将 bGH 基因置于弗氏链霉菌 (*S. fradiae*)

aph 基因调节区的控制下<sup>[18]</sup>。按细胞总蛋白的百分含量计算, *S. lividans* 中合成的 bGH 约为 *E. coli* 的三倍。培养二天的菌丝体可检测到 bGH, 然后逐渐增加, 培养 28 天, 培养液中仍存在 bGH。用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 bGH 蛋白并用放射免疫的方法检测, *S. lividans* 合成的 bGH 和天然 bGH 分子量完全一致。

表 3 异源启动子在链霉菌中的表达

启动子	表达宿主	载体	文献
<i>E. coli</i> 染色体 ampC $\beta$ -内酰胺酶基因启动子	<i>S. lividans</i>	pJAS01 (pSLP101的衍生质粒)	[8]
<i>E. coli</i> Lac UV5和recA启动子	<i>S. lividans</i> M252	pSLP124 pSLP114	[7]
粘质沙雷氏菌 ( <i>Serratia marcescens</i> ) 的 trp 启动子	<i>S. lividans</i> M252	同上	[7]
地衣芽孢杆菌 ( <i>B. licheniformis</i> ) penP 启动子	<i>S. lividans</i> M252	"	[7]
金黄色葡萄球菌噬菌体 42D 链激酶基因 (Sak) 的启动子	<i>S. lividans</i>	pIJ487	[21]
<i>E. coli</i> 启动子	<i>S. lividans</i> 1326	pIJ702	[19]
牛分枝杆菌 ( <i>Mycobacterium bovis</i> BCG) 的启动子	<i>S. lividans</i>	pIJ424	[26]
<i>B. subtilis</i> 的 veg 启动子			[16]
<i>E. coli</i> tac (trp和lac杂合) 启动子	<i>S. lividans</i>	pARC1 (启动子探测质粒)	[39]
葡萄球菌 ( <i>Staphylococcal</i> ) 质粒 pE194 的红霉素抗性基因 (ermC) 启动子	"	"	[39]
<i>B. subtilis</i> veg 启动子	生二素链霉菌 ( <i>S. ambofaciens</i> )	pOW521 pFJ265	[40]
pBR322 tet 基因启动子	白色链霉菌 ( <i>S. albus</i> )	$\phi$ C31	[38]

2. 在 *S. lividans* 中表达和分泌干扰素  $\alpha 1$ : Noack 将 *E. coli* 质粒 pBB202 (人干扰素  $\alpha 1$  基因的表达载体) 中的 1.1 kb EcoR I 片段 (含干扰素  $\alpha 1$  基因) 移入链霉菌启动子探测质粒 pIJ 487。将干扰素  $\alpha 1$  基因和链激酶基因 (Sak) 的表达和分泌序列融合。这些序列能在链霉菌中表现其功能, 产生干扰素  $\alpha 1$  并分泌到体外<sup>[21]</sup>。Sak 基因是从金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 噬菌体 42D 中克隆得到的<sup>[25]</sup>。

带有重组质粒的 *S. lividans* 培养 10h 即可测

到 IFN- $\alpha 1$ 。IFN- $\alpha 1$  的产生经过对数生长期, 一直持续到静止期过后 2 天, 平均产量为  $2 \times 10^3$  IU/ml, 90% 的 IFN- $\alpha 1$  分泌到培养液中。IFN- $\alpha 1$  在培养液中的稳定性可达 60 多小时。这是真核基因产物在链霉菌中能分泌到胞外的第一个成功的例子。经改进恒化器的培养条件, IFN- $\alpha 1$  的产量提高了 30—100 倍。

3. 干扰素  $\alpha 2$  基因在 *S. lividans* 中的表达: Pulido<sup>[20]</sup> 将编码人干扰素  $\alpha 2$  (hIFN- $\alpha 2$ ) 的 DNA 片段和大肠杆菌膜蛋白基因 (lpp) 的 ATG 起

表 4 其他异源的功能序列在链霉菌中的表达

功 能 序 列	表 达 宿 主	载 体	文 献
<i>E. coli</i> 噬菌体 fd 的转录终止信号		pIJ 424	[41]
		pIJ 486	
		pIJ 487	
		pIJ 688	
金黄色葡萄球菌链激酶基因的分泌序列	<i>S. lividans</i>	pIJ 487	[21]
<i>E. coli</i> 膜蛋白基因 (lpp) 的 ATG 起始密码及 RBS 序列	<i>S. lividans</i>	pIJ 702	[20]
<i>E. coli</i> RBS	<i>S. lividans</i> 1326	pIJ 702	[19]
<i>E. coli</i> 染色体上的 ampC $\beta$ -内酰胺酶基因的转录终止信号	<i>S. lividans</i>	pJAS01	[8]
<i>E. coli</i> 氯霉素抗性基因的 ATG 翻译起始密码	<i>S. lividans</i>		[8]
<i>E. coli</i> 氯霉素抗性基因 (CAT) 的 RBS	<i>S. lividans</i>	pSLP124 pSLP114	[7]

表 5 不同重组质粒中 TNF 的表达

重组质粒	启动子	S/D 和信号肽	TNF 水平 (u/ml)
pSYC1412	aph	$\alpha$ -amylase	$1.3 \times 10^4$
pSYC1414	ermF	$\alpha$ -amylase	$4.0 \times 10^4$
pSYC1493	ermE	melC 1	$2.7 \times 10^5$
pSYC1504	ermEpla	melC 1	$5.5 \times 10^5$

始密码、核糖体结合位点(RBS)以及 *S. fradiae* 的氨基糖苷磷酸转移酶基因 (aph) 的启动子连接后克隆到 pIJ702, 得到重组质粒 pNIS19 及 pNIS91 均有 IFN- $\alpha$ 2 活性 ( $1 \times 10^6$  IU/L 培养液), 但均在胞内, 培养液中没有检测到 IFN- $\alpha$ 2 活性。hIFN- $\alpha$ 2 在 *S. lividans* 中不降解, 说明 *S. lividans* 没有降解 hIFN- $\alpha$ 2 的蛋白酶存在。

4. 人类肿瘤坏死因子的克隆和表达: Chang, S. N. 等 [22] 以 pIJ702 为载体, *S. lividans* TK24 为受体, 用淤泥链霉菌的信号肽序列、链霉菌 melC1 基因的信号肽以及 *S. fradiae* aph 启动子、红霉素链霉菌 (*S. erythraeus*) 的 ermE 启动子来表达和分泌人类肿瘤坏死因子 (简称 TNF)。实验结果说明 ermE 启动子较 aph 启动子有效, 而 ermEpla (在野生型的 ermE 启动子邻近 -35 区域的下游去除 TGG 三联密码子而得到的) 则更为有效。melC1 基因的信号肽序列则较  $\alpha$ -淀粉酶基因的信号肽序列能更有效地分泌 TNF。这说明 *S. lividans* TK24 的信号肽酶可以识别这些外源信号肽, 分泌 TNF 于胞外, 在 *S. lividans* TK24 (pSYC1504) 中分泌的 TNF 水平达 20mg/L (表 5)。改进培养条件后这一水平还将进一步提高。

5. 克隆和表达人类白细胞介素 2 基因: 人类白细胞介素 2 (简称 IL-2) 是 15000Mr 糖蛋白, 由 T 淋巴细胞释放, 可以促使 T 细胞和 B 细胞增生。Muñoz [19] 将 1.5kb 的 HgiA I 片段 (含 IL-2 编码序列) 克隆到 pIJ702 上, 利用典型的 *E. coli*

启动子和核糖体结合位点 (RBS) 合成 IL-2。去掉大肠杆菌的 RBS 序列, IL-2 就不能合成。

6. 克隆和表达牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) BCG DNA: 近年来分枝杆菌基因在大肠杆菌中的克隆和表达已有不少工作。麻疯分枝杆菌 (*M. leprae*) DNA 已克隆到大肠杆菌中, 但是分枝杆菌的启动子在大肠杆菌中只能有十分微弱的表达。大多数的分枝杆菌基因不能在大肠杆菌中转录, 分枝杆菌本身的克隆系统还未建立。链霉菌和分枝杆菌同属革兰氏阳性的放线菌, 因而选用链霉菌作为基因克隆和表达的宿主。为了探索这个可能性, Kieser 等 [26] 试用非致病性的牛分枝杆菌 (*M. bovis*) BCG 菌株的 DNA 在 *S. lividans* 中进行克隆研究。他们发现大多数的 *M. bovis* BCG 的启动子能在 *S. lividans* 中表达, 这样就更有利于进一步克隆专一性的免疫抗原基因等。

7. 异源抗性基因在链霉菌中的克隆和表达: 克隆异源的抗生素抗性基因可以用于改造链霉菌载体, 增加载体的遗传标记便于检测。例如从 Tn5 克隆新霉素抗性基因 (Neo), 从大肠杆菌

克隆的氯霉素乙酰转移酶基因 (CAT) 已用于构建链霉菌质粒(表 2)。在质粒 pIJ486、pIJ487 中含有新霉素抗性结构基因 (Neo)。质粒载体 pSLP181, pSLP114, pSLP124 中含 CAT 基因。从不向来源的微生物克隆和分离同一种抗生素的抗性基因, 比较 DNA 序列的同源性, 可以有助于揭示抗性基因的来源及演化。

8. 异源的转录起始、终止信号及分泌信号在链霉菌系统中的表达: Jaurin 和 Cohen (1984)<sup>[8]</sup> 将大肠杆菌的 ampC  $\beta$ -内酰胺酶基因及其转录起始、终止信号克隆到 *S. lividans* 后得到了表达, 这说明 *S. lividans* 的 RNA 多聚酶能识别这些转录信号。决定启动子强度的三个主要因素在 *S. lividans* 中也引起相应的启动子强度的增加。*S. lividans* 对启动子 -10 及 -35 区域之间的距离更为敏感。在 ampC  $\beta$ -内酰胺酶基因启动子的 -10 及 -35 区域之间插入一个 GC 碱基对, 在大肠杆菌中比野生型 ampC 启动子强度增加 17 倍, 而在链霉菌中则增加 30 倍。

在分泌信号方面, 前述干扰素  $\alpha 1$  的例子说明金黄色葡萄球菌噬菌体 42D 的链激酶基因 (Sak) 的分泌信号序列可以在 *S. lividans* 中用于分泌干扰素  $\alpha 1$ 。

在干扰素  $\alpha 2$  基因克隆的例子中, 干扰素  $\alpha 2$  基因和大肠杆菌膜蛋白基因 (lpp) 的 ATG 起始密码子、核糖体结合位点 (RBS) 及弗氏链霉菌的氨基糖苷磷酸转移酶基因 (aph) 的启动子 aphP 连接后插入 pIJ702, 能在 *S. lividans* 中表达干扰素  $\alpha 2$  基因, 说明大肠杆菌 lpp 基因的 RBS 及 ATG 起始密码能在 *S. lividans* 中表现其功能。

### (三) 利用链霉菌表达异源基因的可利条件

利用链霉菌进行工业规模的生产已有 30 年以上的历史。在工业规模的培养及发酵技术方面已经积累了相当丰富的经验, 因而可用现有的技术及设备在链霉菌生产异源基因产物。链霉菌产生胞外酶, 因而它的分泌系统可利用于分泌异源基因所编码的蛋白。此外链霉菌中只发现疮痂病链霉菌 (*S. scabies*) 及索马里链霉菌 (*S. somaliensis*) 等极少数致病菌, 用链霉菌进行基因克隆比较安全, 这些是将链霉菌发展成为异源基因表达系统的有利条件。

### (四) 问题及展望

综上所述我们可以看到异源基因在链霉菌系统中的克隆和表达的研究近几年已有不少进展。在应用研究方面也有成功的例子, 出现很有希望的苗头。从现有的资料可看到要使链霉菌发展成为完善的受体系统, 尤其是利用这一系统进一步发展应用研究还存在以下亟待深入研究的问题。

1. 基因表达及基因产物的分泌: 链霉菌转录和翻译的调控信号的研究近几年有了一定的进展, 还有待于进一步阐明, 尤其要加强对受到调节(如诱导、阻遏)的某些转录和翻译的调控信号的研究。

从异源基因克隆和表达的现有资料来看, 所克隆的真核基因虽能表达, 但是在多数的例子中基因产物还是滞留在细胞内, 这说明在链霉菌系统中基因产物分泌的研究还需深入, 尤其要注意发展优良的表达-分泌载体。

2. 重组质粒的不稳定性: 链霉菌基因组的不稳定性问题已有不少报道<sup>[27, 28]</sup>。链霉菌中克隆的异源基因也有不稳定性现象, 这是异源基因表达的重要问题之一。Lee<sup>[29]</sup> 将大肠杆菌的 pUC12 质粒的衍生质粒(含乙肝表面抗原基因 HBsAg) 与 pIJ702 经 Sst I 切点连接后构成重组质粒 pWL1(9.75kb), 它在大肠杆菌中稳定, 在 *S. lividans* 1326 中则显示结构的不稳定性, pUC12 序列或 HBsAg 基因以及一部分 pIJ702 序列从重组质粒中完全丢失。进一步的研究查明 pIJ702 中的黑色素基因 (mel) 与 pUC12 序列相互作用引起重组质粒中一部分序列的缺失。单独将 HBsAg 基因插入 pIJ702 构成的重组质粒则是稳定的。

质粒缺失现象不只是链霉菌所独有。在枯草芽孢杆菌中异源 DNA 插入载体质粒后也经常观察到不稳定性<sup>[30]</sup> 并认为是分子内的 DNA 重排引起的, 不依赖于宿主重组系统<sup>[31, 32]</sup>。现在我们对链霉菌重组质粒不稳定性的分子基础了解甚少。

以上分析说明链霉菌受体的发展和完善, 异源基因在链霉菌系统中的高效表达及有效分泌极大地依赖上述基础问题的阐明和解决。随着这些基础研究的进展, 链霉菌作为异源基因受体的应用研究将会有更大的发展, 也将更趋完善。

## 参 考 文 献

- [1] Martin, J. F. et al.; *Biotechnology*, 2:63—72, 1984.
- [2] Chater, K. F. et al.; In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*, ed. Hofschneider, P. H. and Goebel, W. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, Vol.96, pp.69—95, 1982.
- [3] Hopwood, D. A. and Chater, K. F.; In: *Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms*, ed. Ball, C. CRC Pr. Florida pp.7—41, 1984.
- [4] Hitzeman, R. A. et al; *Nature*, 293:217—222, 1981.
- [5] Debabov, V. G.; In: *The Molecular Biology of the Bacilli*, ed. Dubnau, D.; Academic Press, New York, pp.331—370, 1982.
- [6] Mezes, P. S. F. and Lampen, T. O.; In: *The Molecular Biology of Bacilli*, ed. Dubnau, D., Academic Press, New York, pp.151—183, 1985.
- [7] Bibb, M. J. and Cohen, S. N.; *Mol. Gen. Genet.*, 187:265—277, 1982.
- [8] Jaurin, B. et al.; *Gene*, 28:83—91, 1984.
- [9] Jaurin, B. and Cohen, S. N.; *Gene*, 39:191—201, 1985.
- [10] Bibb, M. J. et al; *Mol. Gen. Genet.*, 199:23—26, 1985.
- [11] Gil, T. A. and Hopwood, D. A.; *Gene*, 25:119—132, 1983.
- [12] Schottel, J. L. et al.; *J. Bacteriol.*, 146:360—368, 1981.
- [13] Thompson, C. T. et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5190—5194, 1983.
- [14] Beruan, V. et al.; *Gene*, 37:101—110, 1985.
- [15] Jones, G. H.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 198:195, 1979.
- [16] Westphaling, J. et al.; *Nature*, 313:22—27, 1985.
- [17] Buttner, M. J. et al.; *Cell*, 52:599—607, 1988.
- [18] Gray, G. et al.; *Gene*, 32:21—30, 1984.
- [19] Muñoz, A. et al.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133:511—519, 1985.
- [20] Pulido, D. et al.; *Gene*, 45:167—174, 1986.
- [21] Noack, D. et al.; *Gene*, 68:53—62, 1988.
- [22] Chang, S. Y. and Chang, S.; In: *Biology of Actinomycetes '88*, ed. Okami, Y., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp.103—107, 1988.
- [23] Miller, W. L. et al.; *J. Biol. Chem.*, 155:7521—7524, 1980.
- [24] Seeburg, P. H. et al.; *DNA*, 2:37—45, 1983.
- [25] Behnke, D. and Gerlach, D.; *Mol. Gen. Genet.*, 210:528—534, 1987.
- [26] Kieser, T. et al.; *J. Bacteriology*, 168:72—80, 1986.
- [27] Hasegawa, M. et al.; *Mol. Gen. Genet.*, 200:375—384, 1985.
- [28] Altenbuchner, J. and Cullum, J.; *Mol. Gen. Genet.*, 195:134—138, 1984.
- [29] Lee, Y—H, W. et al.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 140:372—378, 1986.
- [30] Hahn, J. and Dubnau, D.; *J. Bacteriol.*: 162:1014—1023, 1985.
- [31] Uhlen, J. et al.; *Plasmid*, 5:161—169, 1981.
- [32] Primrose, S. B. and Ehrlich, S. D.; *Plasmid*, 6:193—210, 1981.
- [33] Ali, M. A. and Dale, J. W.; *FEMS Microbiol. Lett.*, 33:277—280, 1986.
- [34] King, A. A. and Chater, K. F.; *J. Gen. Microbiol.*, 132:1739—1752, 1986.
- [35] Kuhstoss, S. and Nagaroja, R.; *Gene*, 26:295—299, 1983.
- [36] Bibb, M. J. et al.; In: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Academic Press, London, pp.53—82, 1983.
- [37] Ghangas, G. S. and Wilson, D. B.; *Applied and Environmental Microbiology*, 53:1470—1475, 1987.
- [38] Chater, K. F. et al.; *Gene*, 19:21—22, 1982.
- [39] Horinouchi, S. and Beppu, T.; *J. Bacteriol.*, 162:406—412, 1985.
- [40] Fayerman, J. T. et al.; In: *Microbiology*, ed. Hegemon, G. and Hersherberger, C. L., American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp.414—420, 1985.
- [41] Ward, J. M. et al.; *Mol. Gen. Genet.*, 203:468—478, 1986.