

专论与综述

链霉菌分化的分子遗传学研究的新进展

谭华荣

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

许多科学家对链霉菌 (*Streptomyces*) 很感兴趣, 不仅是由于链霉菌产生大量的次生代谢产物, 如一些重要的医用和农用抗生素; 而且是由于该菌具有复杂的形态分化。产生不同抗生素的各种链霉菌的形态分化是非常类似的: 生命周期始于孢子萌芽, 形成基质菌丝, 继而发育成气生菌丝及孢子分隔等。在链霉菌 MA406-A-1 中气生菌丝的形成与 GTP 和 ppGpp 的存在相关^[1,2]。在灰色链霉菌中不仅气生菌丝和孢子的形成依赖于 A 因子^[3], 而且链霉素的生物合成和抗性均与此因子的存在密切相关。在天蓝色链霉菌 A3 (2) 中同样有类似的 A 因子存在, 但它与该菌株的孢子形成及产生四种抗生素却无直接关系。国际上有关链霉菌分化的分子遗传学研究, 以英国 John Innes 研究所 Hopwood 和 Chater 主持的天蓝色链霉菌 A3 (2) 的研究首开先河。在国内, 70 年代初薛禹谷等得到了灰色链霉菌的一些光秃型突变株, 并证明了孢子的形成和链霉素的生物合成都与光秃型突变株的基因有关; 但有关链霉菌分化基因的分子遗传学研究在国内至今仍属空白。笔者近年来在研究链霉菌分化的分子生物学基础上, 综述链霉菌分化研究的新进展, 可望为国内同仁进行该项研究起到抛砖引玉的作用。

(一) 链霉菌分化研究的意义

现代生物学要解决的重要问题之一是分化。所谓分化是生物细胞的形态和功能不断趋向于不同的一系列变化, 是基因在转录水平上受到限制的结果。原核生物中有关分化的研究是一个具有挑战性的前沿课题。在原核生物分

化的分子遗传学研究中, 枯草杆菌作为一个模式已经进行了系统的研究。但该菌的分化过程比链霉菌简单, 不像链霉菌有基质菌丝、气生菌丝、菌丝螺旋和孢子分隔等过程 (图 1)。真核生物分化也有研究报道, 如构巢曲霉和酵母等。真核生物的基因结构比原核生物要复杂得多, 要弄清分化中基因调控的关系是很困难的。因此, 选用链霉菌为分化研究的材料比枯草杆菌和真菌有其一定的可取性。

链霉菌分化的分子遗传学研究是一个新兴课题, 只有近十年的历史, 属于前沿性、开拓性的研究领域。链霉菌所特有的复杂的分化发育过程为在时空上去研究基因的表达调控提供了条件。研究链霉菌的分化, 有很多重要的理论问题急待解决: 链霉菌的天然栖身地是土壤, 它们是怎样利用有机物进行生命的分化进程的? 是什么代谢信号激活和导致了链霉菌分化的遗传学发生? 形态分化与生理分化之间的关系是什么? 分化基因间的相互作用关系怎样? 如能解决上述诸多问题, 并提出链霉菌分化的基因调控模型, 对于人为地控制分化过程, 弄清分化与抗生素生物合成的关系以及对于发育生物学的研究等都具有重大的意义。

(二) 天蓝色链霉菌的形态分化基因

天蓝色链霉菌 A3 (2) 有两组形态突变株, 即光秃型和白色突变株^[4,5]。相应的光秃基因和白基因 (*bld* 和 *whi*) 参与了分化发育调控。光秃型突变株不象野生型那样能形成气生菌丝和

感谢英国 John Innes 研究所 Keith Chater 教授对本文给予的帮助和讨论。承薛禹谷教授和梁可宁教授审阅本文, 谨此致谢。

孢子。白色突变株在延长培养时间的情况下保持白色而不能形成灰色的孢子。这两组突变株的基因在营养生长期都无缺陷。光秃型突变有

九个基因 (*bldA-bldI*)，这些基因与气生菌丝的正常生长和孢子形成密切相关。其中光秃型基因 A (*bldA*) 是链霉菌形态分化基因中最

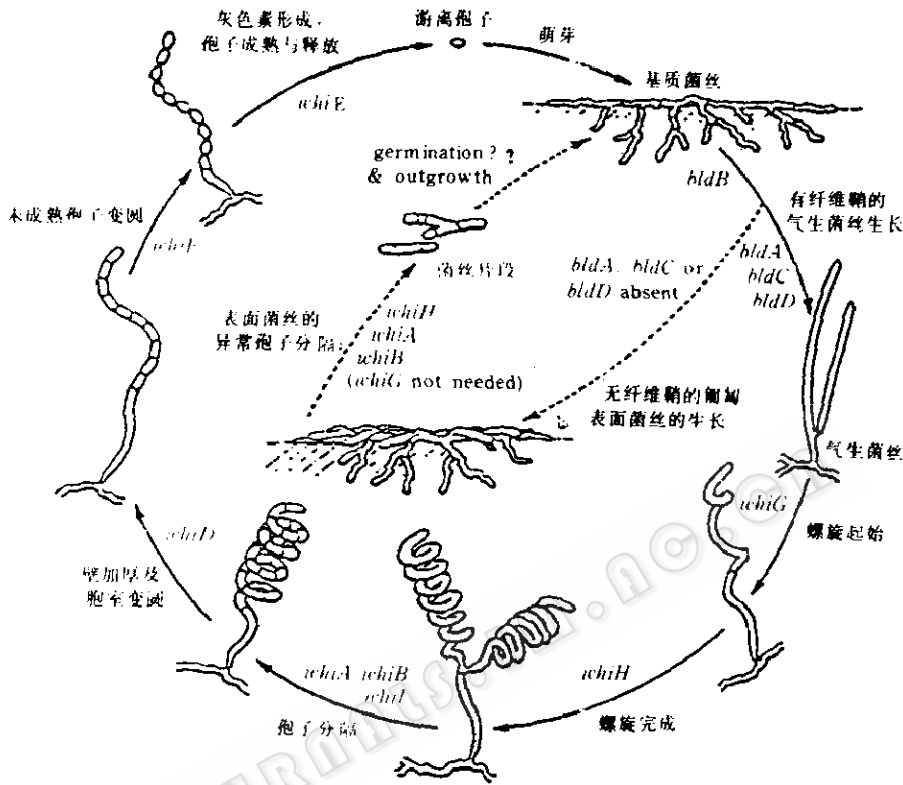


图1 天蓝色链霉菌的发育分化

先被克隆的一个基因^[6,7]。亚克隆分析表明，一个 850bp 的 DNA 片段可以完全互补已经测定的所有 *bldA* 突变基因，使光秃型 A 突变株恢复野生型的表型。序列分析揭示出该基因的编码物是一个亮氨酸 tRNA^[8]。这个 tRNA 能够翻译亮氨酸的密码子 UUA。该密码子在 G+C 含量很高的链霉菌的基因中是很稀有的。同时，该密码子在链霉菌的营养生长到发育分化的转变中也很重要。早期的一些研究结果揭示了光秃型 A 基因的产物主要积累在菌株生长的后期。因此可以认为，TTA 密码子在营养生长期表达的基因中可能是不存在的，但它可能存在于与次生代谢相关的一些调控和抗性基因中。近来一些研究结果表明，含有 TTA 密码子的五个链霉菌基因 (*carB*, *lacZ*, *ampC*, *hyg* 和 *aad*) 的表达依赖于光秃型 A 基因。这提供了一

个重要的遗传学证据，说明光秃型 A 基因的产物亮氨酸 tRNA 在蛋白质的合成中是具有活性的。大多数已知含有 TTA 密码子的基因是与抗生素生物合成基因簇相联系的一些调控蛋白或抗性蛋白。

光秃型 B 基因 (*bldB*) 阻断在形态发育的早期阶段，与气生菌丝和孢子的形成有关。该基因通过互补克隆后，对 *bldB* 基因区域的序列分析表明，该基因产物是一个 89 个氨基酸的多肽，该多肽对于光秃型 B 菌株的形态分化是必需的^[9]。一些研究表明，有些光秃型 B 突变基因不能被克隆到的 *bldB* 互补，从而表明至少有一个以上的相关基因 (*bldI*) 紧位于 *bldB*。

1972 年，Hopwood 教授和 Chater 教授把 50 多个白色突变株分类成六个表型组作图在天蓝色链霉菌基因组遗传图谱上的八个不同的

位置。1975年, Chater 通过分析双突变株的表型研究了这些白基因间的等位关系。近年来开展了白基因的分子生物学研究。到目前为止, 白基因中已有三个 (*whiG*, *whiB*, *whiE*) 被克隆。S1 mapping 或转录研究表明, 已克隆的 *whiB* 是一个单基因^[10], 编码一种高负电荷的只有 87 个氨基酸的蛋白质。此蛋白类似于某些转录因子, 在 N-端有一个两性分子特性的 α -螺旋区, 在 C-端有一个标准 α -螺旋区。序列分析揭示, 已克隆的 *whiE* 含有七个编码区 (ORFs), 其基因产物与聚酮物的生物合成有关^[11]。这些基因产物可能负责天蓝色链霉菌从白色气生菌丝到灰色成熟孢子的转变调控。*whiG* 是目前白基因中研究得最深入的一个基因。Méndez 和 Chater^[12] 用链霉菌噬菌体为载体通过互补克隆得到了 *whiG*。研究结果表明, 增加 *whiG* 的剂量, 孢子的产生也相应增加; *whiG* 的产物是与孢子形成有关的 sigma 因子, 称之为 sigma *whiG* (σ^{whiG})。在蛋白数据库比较中, 这种蛋白与枯草杆菌的 sigma D (σ^D 或 σ^{28}) 有较高的同源性, 大约 42% 的氨基酸序列完全相同^[13]。*whiG* 在形态测定中对所有其它测定的白基因在分化过程中是具有上位效应的, 这意味着其它白基因的转录可能直接或间接地依赖于 σ^{whiG} 。

(三) sigma 因子参与的分化调控

大多数真细菌都有多种 RNA 聚合酶, 其全酶 ($\alpha_2\beta'\sigma$) 可分成两个组份, 即核心酶 ($\alpha_2\beta' = E$) 和 σ 因子 (σ 多肽)。只有当 σ 因子与核心酶结合成全酶 ($E\sigma$), 才能与启动子的特异区域结合起始转录。因此每一种类型的 σ 因子指导 $E\sigma$ 去识别不同类型的启动子。这种特异性是由于 σ 因子和启动子信号识别区的核苷酸序列之间的相互作用。只有全酶才能准确无误地在启动子序列内起始转录。转录开始后 σ 因子立即释放, 留下核心酶负责转录的推进。也就是说, 核心酶有能力在 DNA 模板上合成 RNA, 但不能在适当的位点起始转录。转录的终止是通过推进的 RNA 聚合酶与 RNA 的终止结构间相互作用引起的。有时转录终止需要

特异的终止因子。大多数细胞的转录需要一个初级 σ 因子^[14,15]。枯草杆菌的初级 σ 因子叫 σ^{41} 或 σ^{A16} , 而大肠杆菌的初级 σ 因子为 σ^{70} ^[17]。初级 σ 因子对于细胞的生长、发育有重要作用。在许多或所有的真细菌的种群中都有次级 σ 因子的存在, 它们主要控制启动子序列的一些基因调控位点的转录。目前对枯草杆菌、大肠杆菌和沙门氏菌的次级 σ 因子的研究已有较为详细的报导^[18,19]。

近年来的研究表明天蓝色链霉菌中至少有七个不同的 σ 因子。这些 σ 因子在分化控制和转录中扮演着次级 σ 因子的角色。链霉菌中的第一个 RNA 聚合酶是 1985 年 Westpheling 首先发现的^[20]。Westpheling 等人使用枯草杆菌的两个鉴别的启动子 (*veg* 和 *ctc* 基因的启动子) 为体外转录研究的模板时, 鉴定了天蓝色链霉菌中两个 RNA 聚合酶全酶的 σ 因子—— $E\sigma^{35}$ 和 $E\sigma^{49}$ 。 $E\sigma^{35}$ 识别 *veg* 的启动子, 此启动子与真细菌的主要启动子的保守序列相一致; 而 $E\sigma^{49}$ 识别 *ctc* (氯四环素基因) 的启动子, 它与枯草杆菌的 $E\sigma^{27}$ 所识别的同一类型的转录信号相似^[20]。Buttner 等人 1988 年在天蓝色链霉菌中发现了直接指导琼脂酶结构基因 (*dagA*) 转录的三种不同的 RNA 聚合酶^[31]。*dagA* 有四个启动子。其中之一与营养期启动子的保守序列类似, 而另外三种则不同, 彼此之间的序列也不相同。 $E\sigma^{43}$ 指导 *dagAP3* 的转录, $E\sigma^{28}$ 识别 *dagAP4*。目前尚不了解 *dagAP4* 被何种 RNA 聚合酶全酶识别。天蓝色链霉菌 A3 (2) 有四个相同于 Tanaka 等 (1988 年) 克隆的大肠杆菌的 *rpoD* 基因。这四个基因被分别命名为 *hrdA*, *B*, *C* 和 *D*^[32]。这四个 *hrd* 基因被 Buttner 等人 (1990 年) 克隆并分析了其核苷酸序列, 也分析了它们潜存的编码区。它们分别编码一个非常类似于大肠杆菌、枯草杆菌和黄色粘球菌的初级 σ 因子^[33,34]。

由 *whiG* 编码的 σ 因子命名为 σ^{whiG} ^[13], 它是与分化发育调控有关的 σ 因子。 σ^{whiG} 的氨基酸序列与其它 sigma 因子在 -10 和 -35 区的比较表明, σ^{whiG} 与枯草杆菌的 σ^D 和沙门氏菌的

-10 recognition

σ^{32}	F	A	V	H	W	I	K	A	E	I	H	E	Y	V	L	R	N	W	R	I	V	K	V	A
σ^{70}	Y	A	T	W	W	I	R	Q	A	I	T	R	S	I	A	D	Q	A	R	T	I	R	I	P
σ^A	Y	A	T	W	W	I	R	Q	A	I	T	R	A	I	A	D	Q	A	R	T	I	R	I	P
σ^B	F	A	I	P	T	I	I	G	E	I	K	R	F	L	R	D	K	T	W	S	V	H	V	P
σ^F	Y	A	V	P	M	I	I	G	E	I	Q	R	F	I	R	D	D	G	-	T	V	K	V	S
σ^G	F	A	V	P	M	I	I	G	E	I	R	R	Y	L	R	D	N	N	-	P	I	R	V	S
σ^E	Y	A	S	R	C	I	E	N	E	I	L	M	Y	L	R	R	N	N	K	-	I	R	S	E
σ^K	Y	A	A	R	C	I	E	N	E	I	L	M	H	L	R	A	L	K	K	-	T	K	K	D
σ^H	F	A	E	L	C	I	T	R	Q	I	I	T	A	I	K	T	A	T	R	Q	K	H	I	P
σ^D	Y	A	S	F	R	I	R	G	A	I	I	D	G	L	R	K	E	D	W	L	P	R	T	S
σ^{whiG}	Y	A	I	T	R	I	R	G	A	M	I	D	E	L	R	A	L	D	W	I	P	R	T	S
σ^{flaA}	Y	A	V	Q	R	I	R	G	A	M	L	D	E	L	R	S	R	D	W	V	P	R	S	V

-35 recognition

σ^{32}	G	V	S	A	E	R	V	R	Q	L	E	K	N
σ^{70}	D	V	T	R	E	R	I	R	Q	I	E	A	K
σ^A	G	V	T	R	E	R	I	R	Q	I	E	A	K
σ^B	G	I	S	Q	M	H	V	S	R	L	Q	R	K
σ^F	G	I	S	Q	V	Q	V	S	R	L	E	K	K
σ^G	G	I	S	Q	A	Q	V	S	R	L	E	K	K
σ^E	G	I	S	Q	S	Y	I	S	R	L	E	K	R
σ^K	G	I	S	R	S	Y	V	S	R	I	E	K	R
σ^H	N	R	H	V	K	S	I	D	N	A	L	Q	R
σ^D	N	L	S	T	S	R	I	S	Q	I	H	S	K
σ^{whiG}	G	V	T	E	S	R	V	S	Q	I	H	T	K
σ^{flaA}	E	V	G	E	S	R	V	S	Q	L	H	S	Q

图2 σ^{whiG} 和其他 σ 因子在-10、-35区的氨基酸序列比较 (Keith Chater等1989年修正, 尚未全部发表。此图经Chater教授允许使用)

σ^{flaA} 在-10和-35区非常类似(图2)。 σ^D 是调控游动性、趋化性、特别是自溶性的一些基因, 而它对于枯草杆菌的孢子形成是无关系的, 因为该基因的破坏不影响孢子的形成^[34]。 σ^{whiG} 、 σ^D 和 σ^{flaA} 可能具有识别同族启动子的特性, 譬如能识别被 $E\sigma^D$ 识别的枯草杆菌的启动子 P_{28-1} 。笔者近年来的研究表明, 当把 P_{28-1} 插入到链霉菌的高拷贝载体pIJ2745并转化天蓝色链霉菌

J1501时, 该菌株的灰色孢子形成大大减少, 并出现了白色菌落的表型^[35]。此结果可解释为高拷贝的依赖于枯草杆菌 $E\sigma^D$ 的 P_{28-1} 的存在竞争性地结合了 $E\sigma^{whiG}$, 于是降低了天然的依赖于 σ^{whiG} 的基因的转录, 限制了孢子的形成。类似的现象已在枯草杆菌中观察到, 在一个高拷贝质粒上的枯草杆菌的 $spoVG$ 基因的启动子, 拷贝数的增加抑制了枯草杆菌的孢子形成。这可能

是由于 *spoOH* 的基因产物—— σ^H 指导了 *spoVG* 的转录引起的。

(四) 孢子形成基因间的相互作用

已克隆的两个依赖于 *whiG* 的启动子 P_{TH4} 和 P_{TH270} ^[36] 部分依赖于 *whiH*, 但不依赖于已知的其它白基因 (*whiA*, *B* 和 *I*)。高拷贝的启动子 P_{TH4} 和 P_{TH270} 减少了天蓝色链霉菌的孢子形成, 可以认为 σ^{whiG} 在天蓝色链霉菌的发育中扮演着关键的角色。Gary Brown 进行的 *whiG* 启动子 (P_{whiG}) 的 S1 mapping 或转录研究表明, 该启动子的活性是天蓝色链霉菌在固体培养基上气生菌丝形成时^[37]。当把 *whiG* 的启动子插入到启动子探针载体 pIJ4083, 然后把该质粒转化到不同的白色突变株中, 载体 pIJ4083 中的儿茶酚加氧酶基因在 *whiG* 和 *whiI* 突变株中得到了强表达, 而在 *whiA*, *whiB* 和 *whiH* 突变株中没有表达, 表明 P_{whiG} 的表达与 *whiA*, *whiB* 和 *whiH* 有关^[37]。

用启动子探针质粒 pIJ4083 进行的研究表明, *whiE* 基因簇有两个启动子的活性区域。这两个启动子分别能在 *whiG* 和 *whiI* 突变株中

表达。但不能在 *whiA*, *whiB* 和 *whiH* 突变株中表达^[38]。*whiE* 的这两个启动子与上述白基因的依赖关系相同于 *whiG* 的启动子 P_{whiG} 。体内转录研究表明, *whiE* 的启动子 (P_{whiE}) 在 -10 和 -35 区与 P_{whiG} 非常类似 (图 3)。启动子 P_{TH4} 和 P_{TH270} 在 -10 区与 P_{whiG} 和 P_{whiE} 均无相似性, 但有趣的是启动子 P_{TH270} 和 P_{whiG} 在 -35 区的邻接处有 6 个完全相同的碱基序列 (见有底线的碱基序列), 它们的生物学意义尚不明确。

与天蓝色链霉菌孢子形成相关的另一个基因是 *whiB*。转录研究表明, 该基因的表达是在气生菌丝形成阶段^[38]。 P_{whiG} 在 *WhiA*, *B*, *G*, *H* 和 *I* 突变株中都能表达。*whiB* 基因不能在营养生长期转录, 不是由于依赖于孢子形成的基因, 而可能是由于在营养生长期存在的阻遏子关闭了 *whiB*, 也有可能是由于气生菌丝的细胞生理学的变化, 而不是特异的孢子形成的基因激活了 *whiB* 基因的启动子。启动子 P_{TH4} 和 P_{whiB} 在 -35 区相似, 而且 *whiB* 的启动子与链霉菌的主要启动子在 -35 和 -10 区也相似 (图 3)。

	-35	-10
P_{whiE}	ctgggt <u>CGCGGT</u> ccccgcgggca.cggc <u>CCACGATC</u> gtgcttacg	**
P_{whiG}	ttcgca <u>CACCGC</u> gacagtcacgacg <u>CTACGCTC</u> acgatgacc	**
P_{TH270}	tcgggc <u>TACGcg</u> acggggggcgggcg. <u>CCCGATGA</u> cggcaccgggt	**
P_{TH4}	tgctgg <u>TGGAct</u> ggctggcgctgctg <u>GCCGAAct</u> gctgctgcg	*
P_{whiB}	ctcggc <u>TTGACT</u> cgcccggagcagcacact <u>TGTAAT</u> ttcactcg	*
Spc	----- <u>TTGaca</u> ----- <u>tAGgAT</u> -----	

Spc Streptomyces (E. coli-like) promoter consensus.

* Tanscriptional start point

图 3 天蓝色链霉菌的几个启动子在 -10、-35 区的序列比较

上述研究结果表明, σ^{whiG} 在 *whiB* 和 *whiE* 基因转录中没有直接的或间接的指导作用。启动子 P_{whiG} 和 P_{whiE} 依赖于 *whiA*, *whiB* 和 *whiH*

基因, 而启动子 P_{TH4} 和 P_{TH270} 不依赖于 *whiA* 和 *whiB* 基因。可以假设: 在早期阶段可能有一个低水平的 *whiG* 的表达。这对于从气生菌丝到

孢子形成的转变是至关重要的。两个依赖于 *whiG* 的启动子 (P_{TH4} 和 P_{TH270}) 的活性或许也包括在其它组份之中, 因为 P_{TH4} 和 P_{TH270} 在 *whiH* 突变株中有很弱的表达。早期的一些研究表明, 在形态测定中 *whiG* 相对于其它所有的白基因是处于上位的, 而 P_{whiB} 和 P_{whiE} 启动子又不依赖于 σ^{whiG} 。这些结果表明, 可能有多个转录的串联基因平行出现在孢子形成之中。

虽然有些结果提出了枯草杆菌和链霉菌的孢子形成显著不同, 但它们揭示出一个与丝状真菌 (如构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)) 的分生孢子形成的平行关系。在构巢曲霉的研究中, *brlA* 基因在气生菌丝的延长到孢囊萌芽及气生孢子链的出现起着发育开关的作用^[35], 但不包括分生孢子的形成。此结果与链霉菌的 *whiG* 相比较有相同的保守性^[13]。因此对链霉菌和构巢曲霉发育生物学的比较研究是很有意义的。这两个在进化上不相关的世代的生态学和形态学的汇集可以揭示生理学上一些重要的类似性。

转录研究表明, 依赖于 *whiG* 的两个启动子—— P_{TH4} 和 P_{TH270} 在气生菌丝存在的时候显示出强的活性^[36], 于是可联想到 σ^{whiG} RNA 聚合酶在气生菌丝阶段也是最丰富的。当把这两个启动子转化到光秃型突变株 (*bldA*、*D*、*H*、*F* 和 *G*) 中, 在 *bldH* 和 *bldD* 突变株中没有测定到载体 pIJ4083 的儿茶酚加氧酶报告基因的表达, 但在 *bldA*、*G* 和 *F* 突变株中有很强的表达。这似乎表明, P_{TH4} 和 P_{TH270} 不依赖于 *bldA*、*G* 和 *F*。上述结果难以理解, 因为 *bldA*、*D* 和 *G* 突变株生长在含有葡萄糖的基本培养基上无气生菌丝的形成 (以甘露醇为碳源的基本培养基上能形成疏水的气生菌丝)。也就是说, σ^{whiG} RNA 聚合酶产生甚微或不产生。 P_{whiG} 不依赖于所有的光秃型基因 (*bldA*、*D*、*G*、*H* 和 *F*)^[37]。象 P_{whiG} 那样, P_{TH4} 和 P_{TH270} 不依赖于 *bldA*、*G* 和 *F*。这些结果也表明, *bldA*、*G* 和 *F* 的调控不包括在依赖于 *whiG* 的孢子形成的过程中。上述研究仍可解释为一个以上的基因转录组联包括在气生菌丝的发育中。也有可能是光秃型突变

株在生理学上而不是在形态学上产生了表面菌丝。此表面菌丝相同于气生菌丝。

以上的进展可以充分说明, 为什么链霉菌分化的分子遗传学研究愈来愈受到重视。随着对链霉菌分化的分子生物学研究的不断深入、更多的分化基因的克隆、序列分析及体内外转录的研究, 弄清分化基因与抗生素生物合成基因之间的关系, 并提出基因调控的模型将指日可待。

参 考 文 献

- Ochi K; *J. Gen. Microbiol.*, **132**: 299-305, 1986.
- Ochi K; *J. Gen. Microbiol.*, **133**: 2787-2795, 1987.
- Khokhlov A S et al.; *Z. Allg. Microbiol.*, **13**: 647-655, 1973.
- Hopwood D A et al.; *J. Gen. Microbiol.*, **61**: 397-408, 1970.
- Chater K F; *J. Gen. Microbiol.*, **72**: 9-29, 1972.
- Merrick M J; *J. Gen. Microbiol.*, **96**: 299-315, 1976.
- Piret J M and Chater K F; *J. Bacteriol.*, **163**: 965-972, 1985.
- Leskiw B K et al.; *Mol. Microbiol.*, **12**: 2861-2867, 1991.
- Zhang L H et al.; Abstract In: International Symposium on Biology of Actinomycetes, USA, 1991.
- Davis, N K and Chater, K F; *Mol. Gen. Genet.*, **232**: 351-358, 1992.
- Davis N K and Chater K F; *Mol. Microbiol.*, **4**: 1675-1691, 1990.
- Mendez C and Chater K F; *J. Bacteriol.*, **163**: 5715-5720, 1987.
- Chater K F et al.; *Cell.*, **59**: 133-143, 1989.
- Harris J D et al.; *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **75**: 6177-6181, 1978.
- Osawa T and Yura T; *Mol. Gen. Genet.*, **184**: 166-173, 1981.
- Graves M C and Rabinowitz, J C; *J. Bio. Chem.*, **261**: 11409-11415, 1986.
- Hawley D K and McClure W R; *Nucl. Acids Res.*, **11**: 2237-2255, 1983.
- Grossman A D et al.; *Cell.*, **38**: 383-390, 1984.
- Hunt T P and Magasanik B; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 8453-8457, 1985.
- Cowing D W et al.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 2679-2683, 1985.
- Karm-azyn-Campelli C et al.; *Gene & Dev.*, **3**: 150-

- 157, 1989.
22. Losick R et al. : *Ann. Rev. Genet.* , **20**: 625-669, 1986.
23. Stragier P et al. : *Science* , **243**: 507-512, 1989.
24. Gilman M and Chamberlin M J: *Cell* , **35**: 285-293, 1983.
25. Gilman M et al. : *Gene* , **32**: 11-20, 1984.
26. Helmann J D and Chamberlin M J: *Annu. Rev. Biochem.* , **57**: 839-872, 1988.
27. Ohnish K et al. : *Mol. Gen. Genet.* , **221**: 139-147, 1990.
28. Kutsukake K et al. : *J. Bacteriol.* , **172**: 741-747, 1990.
29. Arnosti D N and Chamberlin M J: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **86**: 830-834, 1989.
30. Westpheling J et al. : *J. Gen. Microbiol.* , **60**: 43-50, 1985.
31. Buttner M J et al. : *Mol. Gen. Genet.* , **209**: 101-109, 1987.
32. Buttner M J et al. : *J. Bacteriol.* , **172**: 3367-3378, 1990.
33. Tanaka K S et al. : *Science* , **242**: 1040-1042, 1988.
34. Helmann J D et al. : *J. Bacteriol.* , **170**: 1568-1574, 1988.
35. Tan H: Ph. D. Thesis, University of East Anglia, England, 1991.
36. Tan H and Chater K F: *J. Bacteriol.* , **175**: 933-940, 1993.
37. Gary B: 私人交流。
38. Soliveri J: 私人交流。
39. Clutterbuck A J: *Genetics* , **63**: 317-327, 1969.

(1993-02-27 收稿)