

アントラサイクリン抗生物質生産菌 *Streptomyces violaceus* A262 及び *Streptomyces* sp. D788 より生合成ブロック 変異株の単離と異種間プロトプラスト融合の試み

勝田 佳朋・細藤 慎司
大藪 剛・吉本 明弘

広島大学生物生産学部, 東広島市 739

1995年4月30日 受付

要 旨 ロドマイシン群抗生物質生産菌 *Streptomyces violaceus* 及びダウノマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. D788 の変異処理により, 新規生合成中間体を蓄積する生合成ブロック変異株12種を単離した。生成物の薄層クロマトグラフィーの結果から, 7株は生合成初期段階がブロックされ前駆体アグリコン類を蓄積する変異株, 5株はグリコシル化以降の段階でブロックされグリコシド中間体を蓄積する変異株であった。また, 両菌種間で生合成ブロック変異の組換えをおこなう目的でプロトプラスト融合による異種間遺伝子組換えを試みたが起こらなかった。

キーワード: アントラサイクリン, ロドマイシン, ダウノマイシン, 抗腫瘍性抗生物質, 生合成ブロック変異株, プロトプラスト融合

緒 言

アントラサイクリン系抗生物質は強力で広域の抗腫瘍性スペクトラムを有し, 現在では臨床薬として使用されているものの中でも最も有用されている制癌剤の一つである。本系統には, ダウノマイシン (Daunomycin) 群, アクラシノマイシン (Aclacinomycin) 群やロドマイシン (Rhodomycin) 群抗生物質等が多数単離されている。自然界より新規なアントラサイクリン系抗生物質生産菌を単離することには限界がある。従って, 既知の生産菌の生合成ブロック変異株から新規中間体を単離することはより多くの当該抗生物質を取得する常套手段である。S. *violaceus* A262 は我々により見出されたロドマイシン群抗生物質生産菌で, 既に親株及び数種のブロック変異株が生産する多数の新規生産物を単離している (JOHDO *et al.*, 1991A, 1991B, 1991C)。本研究では, S. *violaceus* A262 の既取ブロック変異株をさらに変異させることにより, 新規のロドマイシンアナログ生産菌株の単離を試みた。

一方, ダウノマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. D788 からは特異中間体 D788-1 (10-carboxy-13-deoxocarminomycin) を蓄積する生合成ブロック変異株 RPM-5 が単離されている (YOSHIMOTO *et al.*, 1993)。このものは次いで脱炭酸反応を受けて 13-Deoxocarminomycin に変換され, 最終的にダウノマイシンに変換される。RPM-5 菌株は, この脱炭酸反応に関与する遺伝子に損傷のある変異株である。ロドマイシン類はダウノマイシン類生合成経路 (YOSHIMOTO *et al.*, 1995) に類似した経路を経て合成されることが予想されるが, 本研究に供する S. *violaceus* A262 SC-7 菌株の最終生産物 (1-deoxyobelmycin) の構造から類推して Fig.1 に示した経路が考えられる。すなわち, イペルマイシン (Epelmycin) 以降少なくとも三つの中間体 A, B, C を経る経路が妥当である。しかしながら, これらのブロック変異株は未だ単離されていない。10位カルボキシ中間体 A を蓄積する変異株の取得に関しては, RPM-5 菌株の脱炭酸酵素損傷遺伝子を組替換えにより導入して作成する方法が考えられる。10位カルボキシ中間体 D788-1 はアンモニア性アセトン中で照射することにより, 10位脱炭酸と水酸化が同時に起こり強力な抗腫瘍性活性を有するオキシノマイシン (Oxaunomycin) を生成することが明らかにされており (YOSHIMOTO *et al.*, 1991A), 推定される10位カルボキシロドマイシン中間体からは同様の処理においてベタクラマイシン (betaclamycins) (YOSHIMOTO *et al.*, 1986) の調製が可能である。本物質は優れた抗腫瘍性活性を有するが, 前駆体アグリコンの微生物変換に

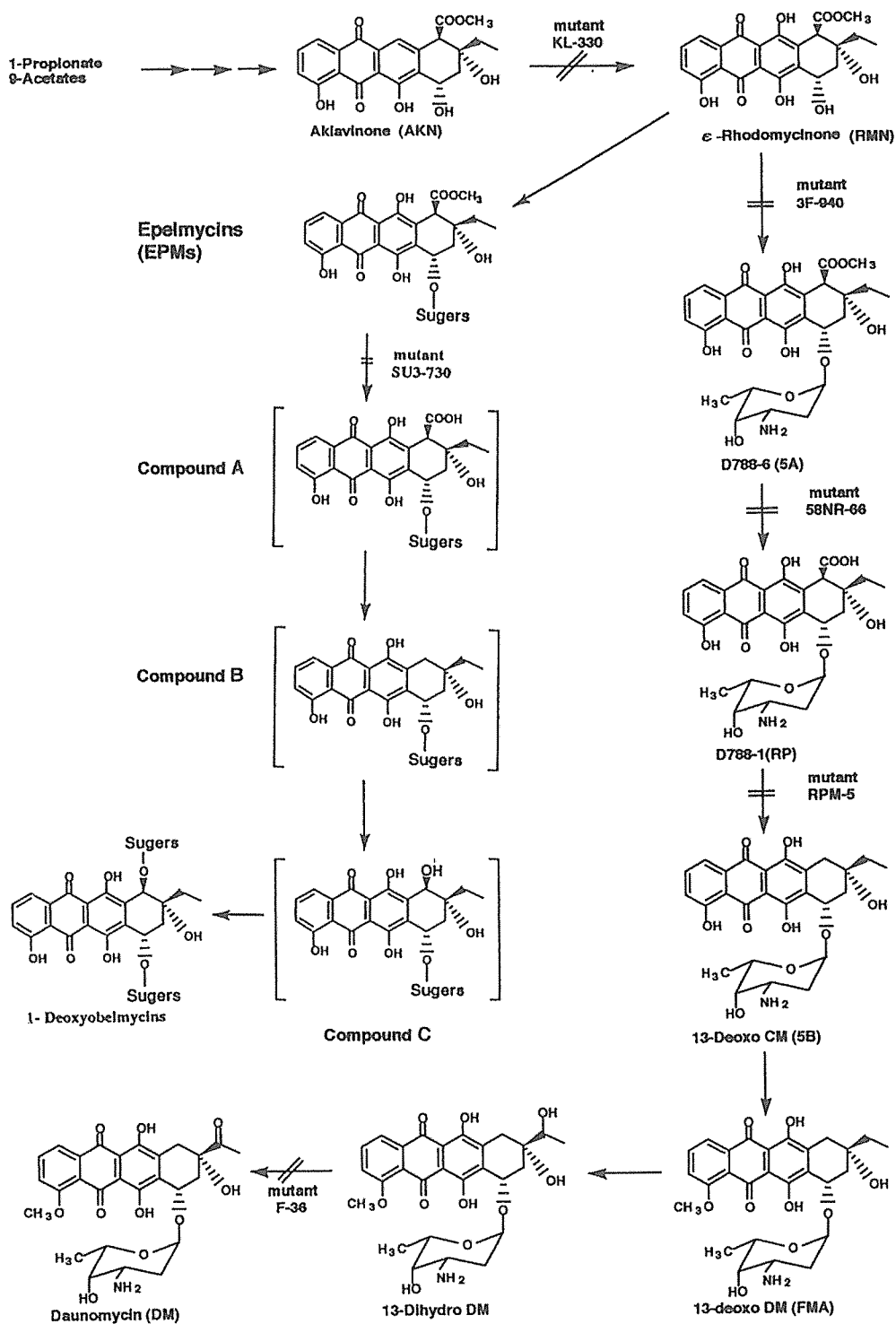


Fig. 1. proposed biosynthetic pathways of anthracycline antibiotics in 1-deoxybelmycin-producing *Streptomyces violaceus* A262 and daunomycin-producing *Streptomyces* sp. D788.

よってのみ得られ大量調製が困難な化合物である。当該菌種間で遺伝子組換えの可能性を見るため、アミノ酸要求株あるいは核酸塩基要求株を用いて、プロトプラスト融合による組換え体（プロトコフ）の出現を調べた。

実験方法

1. 菌株

ロドマイシン (RM と略称) 生産性 *Streptomyces violaceus* A262 から単離したブロック変異株 SEI-625 及び SC-7 (JOHDO *et al.*, 1991A) を、ダウノマイシン (DM と略称) 生産性 *Streptomyces* sp. D788 から単離したブロック変異株 RPM-5 (YOSHIMOTO *et al.*, 1993) を使用した。これらの菌株は YGS 寒天(斜面)に接種し、30°C でおよそ 1 週間培養し、胞子を十分に着生させた後保存し、実験に使用した。また、取得した生合成ブロック変異株及び栄養要求性変異株も YGS 寒天に継代し保存した。パイオアッセイには *Bacillus subtilis* M45T (*rec, arg*) (SADAIE, Y and KADA, T., 1976) を使用し、継代にはブイオン斜面を用いた。

2. 培地

Table 1 に本研究で使用した培地をまとめた。斜面及び平板培地には YGS 培地を使用した。ブロック変異株の検索用培地には生産培地 I ~ III を用いた。栄養要求性変異株の単離には最小培地と 0.3% 酵母エキスを補添した完全培地を用いた。パイオアッセイ用には酵母エキスを補添したブイオン培地を用いた。

3. 変異処理

菌株 SEI-625, SC-7 及び RPM-5 の斜面培養 (30°C, 10 日) の各 1 本に、無菌生理食塩水 4 ml 加え、白金鈎で胞子細胞をかき取り懸濁させて滅菌遠心管に移した。ついで超音波装置 U-200P (トミー精工社製) で 20 秒間処理をおこない胞子塊を均一に分散させた後、小ガラス管に詰めた無菌脱脂綿層 (径 12 mm × 長さ 20 mm) を通過ろ過した。ろ液をシャーレに移し、これに無菌生理食塩水を添加し全量約 10 ml とした。UV 殺菌灯 (15 W) の点灯下 25 cm 位にシャーレを置き回転搅拌しながら 40 秒照射した。一方、*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) 処理は YGS 斜面培養より、滅菌 0.1 M トリス緩衝液 (pH 8.0) 10 ml に懸濁し、上記同様に超音波処理をおこなった後綿ろ過をおこない、これに NTG を最終濃度が 1 mg/ml になる様に添加し、室温暗所で 1 時間振盪した。遠心処理で胞子を集積し、無菌生理食塩水 5 ml に

Table 1. List of media

YGS agar:		Bioassay medium:	
Yeast extract	0.3 %	Polypepton	0.5 %
Soluble starch	0.5 %	Meat extract	0.3 %
Glucose	0.5 %	Yeast extract	0.3 %
Agar	1.5 %	Agar	1.0 %
pH	7.2	pH	7.6
Minimal agar:		Production medium:	
Glucose	0.5 %	Yeast extract	0.2 %
Sucrose	0.5 %	Soluble starch	1.5 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 %	Soybean meal	3.0 %
K ₂ HPO ₄	0.1 %	NaCl	0.1 %
MgSO ₄ /7H ₂ O	0.05 %	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 %
FeSO ₄ /7H ₂ O	0.001 %	CaCO ₃	0.2 %
Agar	1.5 %	CuSO ₄ ·4H ₂ O	0.0003%
pH	7.0	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0003%
Complete agar:		CoSO ₄ ·4H ₂ O	0.0003%
Minimal agar was supplemented with 0.3% yeast extract		FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0003%
		MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0003%
		pH	7.5

* Deionized water was used.

懸濁した。この様にして変異処理した菌液を無菌生理食塩水で連続的に10倍希釈し、その希釈液の 0.1 ml を YGS 寒天平板にプレートした。培養は30°Cで6日間おこない、生成したコロニーを、YGS 平板に1枚当たりおよそ30個当て接種して培養し、栄養要求性試験及び抗生物質生産試験に供した。

4. ブロック変異株の検索

一次検索法として、以下の2方法を用いた。検索法1では、抗生物質生産培地 I 4 ml を添加、滅菌した試験管に変異処理コロニーを一白菌耳接種し、30°Cで5日間往復振盪培養した。これに 1 M リン酸緩衝液 (pH 8.0) 0.2 ml 及びトルエン 0.2 ml を加え、激しく攪拌抽出した。遠心処理 (3000 rpm, 10分) をおこない、トルエン層を分離させた後、その 20 μ l をシリカゲル薄層プレートの下端より 15 mm 位にスポットし、展開溶媒クロロホルム-メタノール-濃アンモニア水 (120 : 10 : 0.2) で展開した。二次検索では、種母培地 4 ml を含む試験管に、寒天斜面より1白金耳接種し、30°Cで2日間培養した菌液全量を、抗生物質生産培地 II の 15 ml を含む 100 ml 容三角フラスコに加え37°Cで5日間ロータリー振盪培養をおこなった。培養液 2 ml を採り、これにアセトン 2 ml を加え攪拌し、さらにクロロホルム 3 ml を加えて攪拌抽出した。遠心後下層のクロロホルム層を分取して減圧濃縮乾固した。残渣をクロロホルム-メタノール (20 : 1) 混液の 0.1 ml に溶かし、適量をシリカゲル薄層プレートにスポットして溶媒クロロホルム-メタノール-濃アンモニア水 (80 : 10 : 0.2) で展開した。親株の培養抽出物を対照として異なるクロマトグラムを示す菌株を検索した。

5. 栄養要求性変異株の検索

YGS 平板に接種し、30°Cで7日間生育させた変異処理コロニーを最小寒天平板上にビロード布を用いてレプリカをおこなった。30°Cで7日間培養して生育の有無を検索した。非生育株については、YGS 平板でストリーク法によりコロニー再単離をおこなった後、最小培地+酵母エキス (0.1%) 及び最小培地+カザミノ酸 (0.1%) の各平板上に接種し、30°Cで培養して生育の有無を調べた。次いで前者で生育した菌株に関しては核酸塩基類の要求性を、後者で成育した菌株についてはアミノ酸の要求性を決定した。すなわち、YGS 培地で液体培養し0.9%食塩水で洗浄した菌体を接種した最小寒天平板上に、1 mg/ml のアミノ酸溶液あるいは核酸塩基溶液に浸したペーパーディスクを置き、30°Cで7日間培養し増殖の有無を判定した。

6. プロトプラスト作成

基本的には岡西らの方法 (OKANISHI *et al.*, 1977) にしたがって調製した。SS 培地の 15 ml を分注殺菌した 100 ml 容三角フラスコに1白金耳接種し37°Cで3日間回転振盪培養し、-85°Cで凍結保存して種母とした。ガラスビーズ (径1.98~2.82mm) の 4 g を投入した SS 培地 (15 ml /100 ml 容三角フラスコ) に凍結種母液 1 ml を加え、37°Cで24時間回転振盪培養した。これをさらに下記するプロトプラスト作成培地の 5 ml を分注し、コイル (外径 8 mm×60 mm) を挿入した滅菌試験管に 0.4 ml 接種し、30°Cで往復培養した。プロトプラスト作成培地及び培養時間は使用する菌によって異なり、*S. violaceus* 由来菌株ではグリシン0.5%及びスクロース10%を補添した SS 培地で72時間培養し、*Streptomyces* sp. D788 由来菌株ではスクロース10%を補添した SS 培地で24時間培養した。菌株につき試験管培養の2本分を遠心管に集め、7,000回転で5分間遠心して集菌し、P3 緩衝液の 10 ml で2回洗浄した。リゾチーム 4 mg/ml を含む同緩衝液に懸濁し、時々ビベッティングしながら30°Cで2時間インキュベートして溶菌させた。乾熱滅菌した脱脂綿詰めガラス管 (綿層 : 径 12 mm×長さ 20 mm) を通して細胞破損残渣を除いたのち、遠心してプロトプラスト細胞を集め、2 ml の P3 緩衝液に懸濁した。プロトプラスト細胞は顕鏡及び13%スクロース無添加完全培地 (OKANISHI *et al.*, 1977) 上でのコロニー非形成により確認し、プロトプラスト数は13%スクロース添加完全培地上で形成されたコロニー数で測定した。本操作により通常 $10^7 \sim 10^8$ /ml のプロトプラスト懸濁液が得られた。

7. プロトプラスト融合

60%ポリエチレングリコール (PEG) 1000 を添加した P3 緩衝液の 0.8 ml に掛け合わせに供するプロトプラスト懸濁液の 0.1 ml を加え、緩やかに攪拌、混合して、30°Cで3分間インキュベートした。この 0.1 ml を P3 緩衝液 0.9 ml に添加して混合希釈し、以下同様に連続的に10倍希釈したのち、それぞれの希釈液の 0.1 ml を13%スクロース添加完全培地及び同最小培地 (OKANISHI *et al.*, 1997) にプレートした。30°Cで12日間培養して、最小培地での成育コロニーを測定し、プロトプラスト融合の有無を観察した。

8. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

生合成ブロック変異株の生産物及び構成アグリコンはシリカゲル薄層プレート 60F₂₅₄ (メルク) を用いて調べた。生成物の溶媒抽出物をスポットし、溶媒系としてクロロホルム-メタノール-濃アンモニア水 (80 : 10 : 0.1) で展開した。風乾したのち生成スポット上に 0.3 N 塩酸を適下して90°Cで10分間加熱して加水分解をおこないアグリコン標準品をスポットしてクロロホルム-メタノール (30 : 1) で二次元に展開して構成アグリコンを調べた。

9. バイオオートグラフィー

バイオアッセイ用培地を融解して55°Cに保温し、これに *B. subtilis* M45T の孢子液を 10⁵/ml になるように接種し、シャーレ (径90mm) 当たり 20 ml を分注固化した。平板上に薄紙で敷き TLC 片を押し付け、5°Cで2時間放置した後剥離し、30°Cで一晩培養して増殖阻止帯の有無を調べた。

10. 試薬

標準品に供したアントラサイクリンアグリコン類、 β -ロドマイシン (β -RMN と略称)、 ϵ -ロドマイシン (ϵ -RMN と略称) 及びアクラピノン (AKN と略称) はオベルマイシン (Obelmycin) (OBM と略称) (JOHDO *et al.*, 1991C), イベルマイシン (EPM と略称) (JOHDO *et al.*, 1991B) 及びアクラシノマイシン (ACM と略称) (OKI *et al.*, 1975) の酸化水分解より調製した。NTG はシグマ社より、リゾチームは生化学工業社より購入した。

実験結果

アントラサイクリン生合成変異株の単離

S. violaceus A262 の RM 生合成変異株については、グリコシド化欠損変異株 (ϵ -RMN 蓄積変異株)、16位脱メチルエステル化欠損株 (EPMs 蓄積株) (JOHDO *et al.*, 1991B) 及び構成糖関連欠損株 (SAITO *et al.*, 1994) 等の数種の変異株が単離されている。一方同系の異種抗生物質 DM 生産菌 *Streptomyces* sp. D788 からは多数のユニークな生合成ブロック変異株を単離している (YOSHIMOTO *et al.*, 1992)。ダウノマイシン (DM と略称) 生合成に関しては、変異株の単離及び前駆体変換法により、その生合成経路がほぼ明らかにされた (YOSHIMOTO *et al.*, 1995)。両者の間には類似した生合成段階が存在するものと思われる、DM 生合成経路と RM 生産物の構造から類推して Fig. 1 に記載した RM 生合成経路が推定される。この中で推定される生合成中間体は、そのものの構造の特徴から優れた抗腫瘍性活性が期待されるばかりではなく、半合成用の原料としても有望である。図中の EPMs を蓄積する変異株 SU2-730 は既に取得しているが、中間体 A~C をそれぞれ蓄積する変異株は取得されていない。本研究の目的は推定中間体 C を蓄積する変異株の単離もしくは中間体 A を蓄積する変異株の単離を目指している。中間体 A タイプの化合物、例えばベタクラマイシン (BCM と略称) (YOSHIMOTO, *et al.*, 1984) には優れた抗腫瘍性活性が証明されており次世代のアントラサイクリンとして開発が期待されているが、今のところ直接に生産する菌株がなく β -RMN を ACM 非生産菌株で微生物変換する方法により取得されており、極めて生産効率が悪い。*S. violaceus* A262 SEI-625 (A262s 1~3 蓄積) 及び11位酸化欠損株 SC-7 (11-deoxyobelmycin 蓄積) を UV あるいは NTG で変異処理した後 (殺菌率は、それぞれ95%以上及び85%以上であった)、YGS 平板上で生育したコロニーのおよそ3000株につき試験管培養し生産物を TLC で検し、両親株と異なる抗生物質を生産する変異株を調べた結果、Table 2 に示す12種の生合成変異株を単離した。このうち7株は未知アグリコン蓄積性変異株で、5株が未知グリコシド抗生物質を生成する変異株であった。加水分解処理をおこない構成アグリコンを調べた結果、菌株 KU4-229 のアグリコンは ϵ -RMN で EPMs アナログの生成菌株と判定した。菌株 KU4-1 生産物のアグリコン (黄色) は2種 (未知) あり、新規グリコシド中間体であった。また、菌株 KU4-502 及び KU5-1001 も黄色グリコシド中間体を生産し、そのアグリコン類は AKN ほかに未知の構成アグリコン数種が検出された。少なくとも4種のアグリコン類が両菌株で共通することから、同質の変異株である可能性が高い。アグリコン構造と色の関係より本物質は11位の水酸基が欠失した化合物と考えられる。菌株 KU4-505 は、黄色と橙色化合物を生産し、構成アグリコンとして AKN 及び ϵ -RMN を有することから 1-deoxy EPMs 及び EPMs を混合蓄積する変異株であると推測された。なお、これら5菌株の生産するグリコシド中間体には抗菌性が確認された。

Table 2. Isolation of biosynthetically blocked mutants and nutrient-requiring mutants from *Streptomyces violaceus* A262 and *Streptomyces* sp. D788 and their characterization.^{a)}

Mutant	Parent	Mutagen	Product (TLC:Rf value) ^{b)}	Aglycone	AMA ^{c)}	Remarks
<i>S. violaceus</i>						
SEI-625	-	-	A262s 1~3(0.55, 0.47, 0.40)	β -RMN	+	known (orange)
SC-7	-	-	1-deoxy OBMs (5 spots: 0.58, 0.44, 0.38, 0.28, 0.22)	"	+	known (orange)
SSUR-641	SC-7	UV	aglycones (5 spots: 0.55, 0.48, 0.41, 0.21, 0.14)	unidentified	-	new (violet)
KU4-1	"	"	glycosides (2 spots: origin, 0.08)	"	+	new (yellow)
KU4-229	"	"	glycosides (5 spots: 0.53, 0.34, 0.27, 0.22, 0.18)	ϵ -RMN	+	new EPMS (orange)
KU4-486	"	"	aglycones (4 spots: 0.61, 0.56, 0.32, 0.19)	unidentified	-	new (violet)
KU4-501	"	"	aglycones (2 spots: 0.63, 0.39) (violet)	"	-	new (violet)
KU4-502	"	"	glycosides (7 spots: 0.78, 0.57, 0.52, 0.33, 0.26, 0.20, 0.16)	"	-	new (yellow)
KU4-503	"	"	aglycones (3 spots: 0.61, 0.35, 0.21)	"	-	new (violet)
KU4-504	"	"	aglycones (2 spots: 0.63, 0.39,)	"	-	new (violet)
KU4-505	"	"	glycosides (6 spots: 0.79, 0.72, 0.68, 0.54, 0.42, 0.25)	AKN, ϵ -RMN, β -RMN	+	new (red and yellow)
KU5-1001	"	"	glycosides (6 spots: 0.59, 0.53, 0.35, 0.30, 0.21, 0.15)	unidentified	+	similar to KU4-502
KU4-502-5	"	"	none			
KU5-1002	"	"	"			
KU5-1004	"	"	"			
<i>Streptomyces</i> sp. D788.						
RPM-5	-	-	D788-1 (0.32)	RPN	+	known (red)
TPU-7	RPM-5	UV	aglycones (5 spots: 0.72, 0.57, 0.53, 0.50, 0.28)	unidentified	-	new (red)
TPU-563	"	"	ϵ -RMN (0.80)	-		
TPU-509	"	"	none	-		

a) Abbreviation: IsoRMN, isorhodomyconine; RMN, rhodomyconine; RPN, 10-Carboxy-13-deoxycarminomycinone; EPMS, epelmycins; OBMs, obelmycins.

b) Solvent: CHCl₃-MeOH-aq.NH₃ (80: 10: 0.2)

c) AMA: antimicrobial activity against *B. subtilis* M45T (+, positive; -, negative)

一方、アグリコン蓄積株 SSUR-641, KU4-486, KU4-501, KU4-503 及び KU4-504 は未知アグリコン類を蓄積し、RM 生合成における ϵ -RMN 形成初期段階でブロックされた変異株と考えられる。なお、アントラサイクリン色素を全く生成しない非生産菌株 3 株を同時に単離した。混合培養による相補試験をおこなっていないので、これらが同一段階に欠損のある変異株か、あるいは別種のプロック変異株かは判定していない。また、D788-1 (RP と略称) 生産菌 *Streptomyces* sp. D788 RPM-5 菌株からはグリコシド化欠損株 TPU-563, 生合成初期段階がブロックされた未知アグリコン類蓄積菌株 TPU-509 及び非生産性プロック変異株 TPU-509 を単離した。

栄養要求性変異株の単離

Streptomyces sp. D788 RPM-5 と *S. violaceus* SEI-625 の異種間プロトプラスト融合の有無を調べるため、両菌株から栄養要求性変異株の単離をおこない、Table 3 に併記した 8 菌株を取得した。アデニン要求性 2 株、キサンチン要求性 1 株、ヒスチジン要求性 1 株及メチオニン要求性 1 株で、このうち SSUR-431 はアデニン栄養要求性の賦与に伴い抗生物質非生産性に変化した。いずれも YGS 寒天培養より取得した胞子細胞をプレートし、レプリカにより復帰変異を調べた結果 10⁻⁷ 以下で安定であった。

プロトプラスト融合

両菌株からプロトプラスト細胞の形成は通常の培養細胞がリゾチームに非感受性であるため困難であった。従って、種母作成の段階にガラスビーズを添加し、非ベレット状の増殖細胞とし、これをコイルを投入した試験管に接種培養する物理学的処理を併用する方法を考案することにより、リゾチーム感受性の増殖細胞を調製することができた。本調製法により 10 ml 培養液よりおよそ 10⁷個/ml 以上のプロトプラスト細

胞懸濁液 1~2 ml を得ることができた。

プロトプラスト融合による栄養要求性マーカーの組換えの有無について検討した結果を Table 4 に示した。 *S. violaceus* SSRU-647 *his* と SSUR-99 *ade* 及び *Streptomyces* sp. D788 TPU-1520 *met* と TPU-581 *xan* の同種間のプロトプラスト融合では、それぞれ 1.4×10^{-3} 及び 2.3×10^{-3} 頻度で組み換えが起こることが確認された。しかし、 *S. violaceus* と *Streptomyces* sp. D788 の異種間ではプロトプラスト融合による組換えは認められなかった。

考 察

RM 生産菌 *S. violaceus* SC-7 (11-deoxyOBMs 蓄積) より10種の生合成ブロック変異株を単離することができた。うち5株はアグリコン蓄積株で、生成物は TLC 分析で既知アグリコン類に一致するものがなくすべて未知アグリコンであった。これらは、今後 RM 生合成経路の初期段階を明かす上で重要な化合物である。RM 生合成に関しては遺伝学的アプローチを試みており、当該生合成遺伝子のクローニングの相補性試験に必須の菌株である。一方、親株とは異なるグリコシド抗生物質を蓄積する変異株を5株単離した。KU4-1 菌株は未知化合物を、KU4-229 菌株は新規 EPM アナログを、KU4-505 菌株は 1 deoxy EPMs 及び EPMs を、KU4-502 及び KU5-1001 はおそらく 11-deoxy OBMs を蓄積する変異株であることが推定された。10-deoxy 及び 11-deoxy RM アナログの蓄積は未だ報告がなく、特に後者の化合物は抗腫瘍性活性の観点から興味もたれる化合物である。しかしながら、およそ3千株の変異処理菌株を検索したが、Fig. 1 に示した仮想中間体 A~C を蓄積する変異株は単離できなかった。一方、 *Streptomyces* sp. D788 RPM-5 株 (RP 蓄積) からはグリコシド化欠損変異株 TPU-563 (ϵ -RMN 蓄積) 及び未知アグリコン蓄積

Table 3. Isolation of nutrient-requiring mutants from *Streptomyces violaceus* A262, SEI-625 and *Streptomyces* sp. D788

Nutrient-requiring mutant	parent	Mutagen	Nutritional requirement	Antibiotic production	Spore-forming ability	Reverse mutation frequency
<i>S. violaceus</i> A262						
SSRU-99	SEI-625	UV	adenine	A262s 1~3	+	$>10^{-7}$
SSRU-431	"	"	"	none	+	"
SSRU-647	"	"	histidine	"	"	"
SSUR-775	"	"	adenine	A262s 1~3	-	"
SSUR-988	"	"	"	+	"	"
SSUR-1034	"	"	unidentified	"	+	"
<i>Streptomyces</i> sp. D788						
TPN 581	"	RPM-5	methionine	D788-1	+	$>10^{-8}$
TPU-1520	"	"	xanthine	"	+	"

Table 4. Interspecific recombination between *Streptomyces violaceus* and *Streptomyces* sp. D788 by protoplast fusion

Protoplast fusion*	Colony counts/ml		Prototrophic recombination frequency
	complete agar	Minimal agar	
<i>S. violaceus</i> SSRU-647 <i>his</i> × <i>S. violaceus</i> SSRU-99 <i>ade</i>	1.3×10^6	1.8×10^3	1.4×10^{-3}
<i>Str.</i> sp. D788 TPU-1520 <i>met</i> × <i>Str.</i> sp. D788 TPU-581 <i>xan</i>	1.0×10^6	2.3×10^3	2.3×10^{-3}
<i>S. violaceus</i> SSRU-647 <i>his</i> × <i>Strep.</i> sp. D788 TPU-1520 <i>met</i>	1.9×10^6	0	-
<i>S. violaceus</i> SSRU-647 <i>his</i> × <i>Strep.</i> sp. D788 TPU-581 <i>xan</i>	1.5×10^6	0	-

*Protoplast cell number before protoplast fusion was as follows.

SSRU-647, 4.9×10^7 /ml ; SSRU-99, 1.6×10^7 /ml ; TPU-1520, 4.3×10^7 /ml ; TPU-581, 7.5×10^6 /ml

株 TPU-7 を単離した。また、両種菌株より 4 株の抗生物質非生産性変異株を単離した。これらは抗生物質生産に対する調節遺伝子の損傷株と考えられ、今後当該遺伝子のクローニングに有用な変異株である。

菌株 RPM-5 は DM 生合成上の 10 位の脱炭酸化段階の欠損変異株で、この欠損遺伝子をプロトプラスト融合による組換えにより *S. violaceus* A262 SEI-625 に導入し、中間体 A の蓄積菌の造成为考えられた。プロトプラスト融合による組換え技術を用いて新規アナログ生産菌株を育成する方法に関しては、ACM 生合成ブロック変異株間の組換えにより 2-hydroxy ACM 生産菌の取得に成功している (YOSHIMOTO *et al.*, 1991B)。プロトプラスト化は SEI-625 株で困難であったが、コイル及びガラスビーズの装着・投入培養により 10^7 /ml 以上のプロトプラスト懸濁液を調製することができた。単一栄養要求性変異株を用いて同種間でプロトプラスト融合をおこなった結果、 $10^2 \sim 10^3$ /ml オーダーの組換え体 (プロトローフ) がいずれの菌種でも認められた。しかしながら、*S. violaceus* 及び *Streptomyces* sp. D788 系の異種間では組換え体は検出されなかった。従って、10 位脱炭酸欠損変異のプロトプラスト融合による組換え導入は不可であることが分かった。

引用文献

- JOHDO, O., ISHIKURA, T., YOSHIMOTO, A. and TAKEUCHI, T., 1991A, Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. I. Isolation of antibiotic blocked mutants from *Streptomyces violaceus* A262. *J. Antibiot.*, 44:1110-1120.
- JOHDO, O., ISHIKURA, T., YOSHIMOTO, A. and TAKEUCHI, T., 1991B, Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. II. New anthracycline epelmocins produced by a blocked mutant strain SU2-730. *J. Antibiot.*, 44:1121-1129.
- JOHDO, O., ISHIKURA, T., YOSHIMOTO, A. and TAKEUCHI, T., 1991C, Anthracycline metabolites from *Streptomyces violaceus* A262. III. New anthracycline obepelmocins produced by a variant strain SE2-2385. *J. Antibiot.*, 44:1130-1140.
- OKANISHI, M., SUZUKI, K. and UMEZAWA, H., 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplast: Cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, 80: 389-400.
- OKI, T., KITAMURA, I., MATSUZAWA, Y., SHIBAMOTO, N., OGASAWARA, T., YOSHIMOTO, A., INUI, T., NAGANAWA, H., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H., 1979. Antitumor anthracycline antibiotics, aclacinomycin A and analogues. II. Structural determination. *J. Antibiot.*, 32:801-819.
- SADAIE, Y. and KADA, T., 1976, Recombination-deficient mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 125: 489-500.
- SAITO, S., KATSUTA, Y., JOHDO, O. and YOSHIMOTO, A., 1995. New rhodomycin analogs, SS-288A and SS-288B, produced by a *Streptomyces violaceus* A262 mutant. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59: 135-137.
- YOSHIMOTO, A., FUJII, S., JOHDO, O., KUBO, K., NISHIDA, H., OKAMOTO, R., and TAKEUCHI, T., 1993. Anthracycline metabolites from baumycin-producing *Streptomyces* sp. D788. II. New anthracycline metabolite produced by a blocked mutant strain RPM-5. *J. Antibiot.*, 46:56-64.
- YOSHIMOTO, A., NAKAMURA, T., KUBO, K., JOHDO, O. and TONE, H., 1995, Daunomycin biosynthesis by microbial conversion of precursor metabolites using biosynthetically blocked mutants. *J. Ferment. Bioeng.*, 79: 229-235.
- YOSHIMOTO, A., JOHDO, O., TONE, H., OKAMOTO, R. and TAKEUCHI, T., 1991. Photochemical production of anthracycline antibiotic oxanomycin from precursor metabolite D788-1. *Jpn. J. Antibiot.*, 44: 264-268.
- YOSHIMOTO, A., MATSUZAWA, Y., ISHIKURA, T., SAWA, T., TAKEUCHI, T. and UMEZAWA, H., 1984. New anthracycline derivatives of betaclamycin A. *J. Antibiot.*, 37: 920-922.
- YOSHIMOTO, A., JOHDO, O., ISHIKURA, T. and TAKEUCHI, T., 1991B. Anthracycline antibiotics 2-hydroxyaclacinomycins. I. 2-Hydroxyaclacinomycin-producing recombinant obtained from aclacinomycin-blocked mutants of *Streptomyces galilaeus* by a technique of protoplast fusion. *Jpn. J. Antibiot.*, 44: 269-276.

Isolation of Biosynthetically Blocked Mutants from Anthracycline-Producing *Streptomyces Violaceus* A262 and *Streptomyces* sp. D788 and an Attempt on the Interspecific Recombination between Them by Protoplast fusion

Yoshiaki KTSUTA, Shinji SAITO,
Takeshi OYABU and Akihiro YOSHIMOTO

*Faculty of Biological Science, Hiroshima University,
Higashi-Hiroshima 739, Japan*

Twelve mutants which produced novel biosynthetic anthracycline metabolites were obtained from two anthracycline producers, rhodomycin-producing *Streptomyces violaceus* A262 and daunomycin-producing *Streptomyces* sp. D788. by mutagenic treatment. The seven mutants were precursor aglycone-accumulating ones and the five mutants were glycosidic intermediate-accumulating ones. Five anthracycline-nonproducing mutants were also isolated.

Interspecific recombination between these two *Streptomyces* strains is other important means for obtaining a desirable biosynthetic mutant if it is possible. However, it was found that no recombination occurred between them.

Key Words: anthracycline, rhodomycin, daunomycin, antitumor antibiotic, biosynthetic mutant, protoplast fusion