KSBB Journal 2010. 25: 167~172

식물독소를 생산하는 *Streptomyces scabiei* ATCC 49173의 형질전환법 구축

장보연 · 하헌수 · 최선욱*

경남대학교 식품생명학과

Construction of Transformation Method for *Streptomyces scabiei* ATCC 49173 Producing Phytotoxin

Bo-Youn Jang, Heon-Su Ha, and Sun-Uk Choi*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

Abstract *Streptomyces scabiei* producing phytotoxin called thaxtomin, which cause scab disease on economically important crops such as potato. For molecular genetics study of *S. scabiei* an effective transformation method was established based on conjugal transfer from *Escherichia coli* ET12567 (pUZ8002) using a *phi*C31-derived integration vector, pSET152, containing *oriT* and *attP* fragments. The high frequency was obtained on MS medium containing 50 mM $MgCl_2$. In addition, the sequence and location of the chromosomal integration *attB* site of *S. scabiei* was identified for the first time in the strains producing thaxtomin by the southern blot analysis of exconjugants and the sequencing of plasmid containing DNA flanking the insertion sites from exconjugant chromosome. Similar to the case of *Streptomyces* species, a single *phi*C31 *attB* site of *S. scabiei* is present within an ORF encoding a pirin-homolog.

Keywords: *Streptomyces scabiei* ATCC 49173, transformation, *attB* site, phytotoxin

서 론

토양 원핵 미생물인 방선균은 포자를 형성하는 그램 양성의 박테리아로서 현재 인류의 질병치료에 사용되고 있는 항생물질의 70%를 생산하는 유용한 미생물이다. 그러나 식물에 피해를 주는 경우도 있는데 감자 더덩이병의 원인물질인 thaxtomin을 생산하는 방선균들 (*Streptomyces scabiei, Streptomyces scabies, Streptomyces. acidiscabies, Streptomyces. turgidiscabies*)이다 [1,2]. Thaxtomin은 phytotoxin의 일종으로 감자생산에 심각한 피해를 주는 물질이며 현재까지 밝혀진 10종의 thaxtomin 중 thaxtomin A가 주요한 병원성 요인물질로 밝혀져 있다 [1,2]. 이러한 질병을 구제하기 위해 여러 연구들이 시도되고 있으나 thaxtomin생합성 제어에 필수적인 분자생물학적인 연구가 방선균의 외부 유전자에 대한 강력한 제한계, 효율적인 형질전환 시스템의 부재, 재조합체의 불안전성 등으로 인해 많은 어려움을 가지고 있다 [3,4].

지금까지 방선균의 형질전환에는 주로 protoplast법과 electroporation법 등이 사용되었다. 그러나 이들 방법들은 형질전환율이 높지 않거나 적용되는 방선균이 제한적이라는 단점이 있다. 최근에 이러한 문제를 극복하기 위하여 *Escherichia coli*를 공여체로 사용하여 단일가닥 DNA를 세포내로 도입하는 접합전달법 (conjugal transfer)이 도입되었다 [5,6,7]. 접합전달법은 *E. coli* 내에서 재조합 플라스미드의 구축 및 조작이 가능하며 구축되어진 플라스미드를 방선균으로 직접 전달할 수 있어 유전자 클로닝, 유전자 파괴, 변이유전자 회복 등에 폭 넓게 사용되고 있다. *E. coli*를 이용한 접합전달이 Mazodier 등 [8]에 의해 처음으로

***Corresponding author**
Tel: +82-55-249-2258, Fax: +82-55-249-2995
e-mail: suchoi@kyungnam.ac.kr

보고되어진 이후, 방선균에 존재하는 메틸화된 DNA의 제한계를 극복하기 위해 DNA의 공여균주 (donor)로 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002 [9,10,11]을 사용함으로써 보다 다양한 속 (genus)의 방선균에 적용할 수 있게 되었다 [12,13]. 또한 현재 사용되고 있는 접합전달을 위한 벡터들 가운데 방선균의 염색체에 존재하는 *attB* site로 integration 되는 *phi*C31유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*int*) 기능을 가진 벡터들이 가장 유용한 것으로 알려져 있다 [5,11]. 이러한 벡터들은 접합전달을 통해 *E. coli*로부터 방선균으로 전달되고 전달된 벡터의 *attP* site는 integrase에 의해 방선균 염색체의 *attB* site로 삽입되게 된다. 그러나 감자 등의 농작물에 심각한 피해를 주는 thaxtomin생산 방선균에 대한 형질전환방법은 아직 연구된 바 없다.

그러므로 본 연구에서는 thaxtomin을 생산하는 대표적인 방선균인 *S. scabiei*의 분자생물학적인 연구를 위해 처음으로 접합전달법을 이용한 고효율 형질전환법을 구축하였으며 *attP* site 삽입 위치인 *S. scabiei*의 *attB* site에 대한 특성을 분석하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

Thaxtomin A를 생산하는 *S. scabiei* ATCC 49173를 본 연구의 전반에 걸쳐 사용하였으며 본 균주의 포자는 접합전달의 수용체로서 사용하였다. *E. coli* XL-10Gold는 클로닝을 위한 숙주로 사용하였으며 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 접합전달의 DNA 공여균주로 사용하였다. *phi*C31 유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*int*) 기능을 가진 pSET152 (5.7 kb) [9]는 접합전달의 부위-특이적 재조합 (site-specific recombination) 벡터로 사용하였다.

배지 및 배양조건

*S. scabiei*의 포자생산용 배지는 ISP2배지 (yeast extract 4 g/L, malt extract 10 g/L, glucose 4 g/L, agar 20 g/L, pH 7.0~7.4)를 사용하였으며 접합전달을 위한 배지로는 AS-1 (yeast extract 1 g/L, L-alanine 0.2 g/L, L-arginine 0.2 g/L, L-asparagin 0.5 g/L, soluble starch 5 g/L, NaCl 2.5 g/L, Na_2SO_4 10 g/L, agar 20 g/L, pH 7.5), ISP4 (soluble starch 10 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, NaCl 1 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, $CaCO_3$ 2 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g/L, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.001 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 g/L, agar 15 g/L, pH 7.0~7.4), MS 배지 (mannitol 20 g/L, soya flour 20 g/L, agar 20 g/L)를 사용하였다. 또 *E. coli*의 일반배양 및 형질전환을 위해 Luria Bertani (LB)배지를 이용하여 37℃에서 180 rpm으로 진탕배양 하였다.

DNA 조작 및 분리

대장균에서의 DNA 조작은 Sambrook 등 [14]의 방법을 사용하였고 *S. scabiei*에서의 DNA 조작은 Kieser 등 [15]의 방법을 이용하였으며 *S. scabiei* 접합전달체의 total DNA는 Rao 등 [16]의 방법으로 회수하였다. Southern blot hybridization을 위해 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Tokyo, Japan)와 pSET152의 0.5 kb apramycin-resistant 유전자 단편을 probe로 사용하였다. DNA 염기서열 결정은 pSET152의 *attP* site 양쪽으로 각각 100 bp 떨어진 부분의 염기서열을 이용하여 ATTPR primer (5'-CTGGGTGGGTTACAC GACGCCCCT-3')와 ATTPL primer (5'-CGTTGGCGCTA CGCTGTGTCGCTG-3')를 제작하여 진행하였다.

접합전달방법

*E. coli*에서 *S. scabiei*으로 plasmid의 접합전달은 Kieser 등 [15]이 확립한 방법을 변형하여 수행하였다. pSET152를 포함하는 공여균주 *E. coli* ET12567/pUZ8002은 apramycin (50 μg/mL; 이하 Apr), chloramphenicol (25 μg/mL; 이하 Cm), kanamycin (50 μg/mL; 이하 Km)이 첨가된 LB 배지에 접종한 후, OD 600 nm에서 흡광도가 0.4가 될 때까지 배양하였다. *S. scabiei*의 생육에 저해가 되는 첨가된 항생제를 제거하기 위해 동량의 LB 배지로 두 번 세척한 후 0.1배의 LB 배지로 재현탁하여 *S. scabiei*와의 접합전달을 위한 공여균주로 사용하였다. 열처리하지 않은 1×10^5의 *S. scabiei* 포자를 2 × YT 배지 0.5 mL로 현탁한 후 준비된 공여균주 현탁액 0.5 mL (2.5×10^7)와 잘 혼합한 다음, 원심분리하여 상징액을 제거한 뒤 얻어진 pellet을 10 mM의 $MgCl_2$를 포함한 4종류 (AS-1, ISP2, ISP4, MS)의 고체배지에 도말하고 28℃에서 16~20시간 동안 정치배양하였다. 형질전환체의 선별을 위해 1.5 mL의 살균수에 0.5 mg의 nalidixic acid (이하 Nal)와 1 mg의 Apr을 첨가하여 배지위에 중첩시킨 후, 28℃에서 6일간 더 배양하였다. 선발된 접합전달체를 Nal (25 μg/mL) 및 Apr (25 μg/mL)이 함유된 선택 배지에 계대배양하여 얻어진 균주들의 염색체 DNA를 추출하고 PCR에 의해 형질전환 유무를 확인하였다.

염기서열의 accession number

본 논문에 보고된 *S. scabiei* ATCC 49173의 *attB* site 염기서열은 GeneBank에 accession number AB530329로 등록되었다.

결과 및 고찰

접합전달을 위한 최적배지

접합전달법을 사용하는 경우에는 사용되는 고체배지의

영향이 대단히 큰 것으로 밝혀졌다 [17]. 그러므로 지금까지의 연구에서 사용된 접합전달용 배지 4종 (AS-1, ISP2, ISP4, MS)에 대하여 *S. scabiei*의 최적배지에 대해 조사하였다. 본 연구에 사용된 MS와 AS-1배지는 방선균의 접합전달에 가장 많이 사용되는 배지이며 [5,7,15], ISP2배지는 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 [6]에, ISP4는 희소방선균 *Kitasatospora setae* [17]의 접합전달에 최적배지이다. 4종의 배지를 각각 *S. scabiei*의 접합전달실험에 적용해 본 결과 AS-1, ISP4, MS의 경우에는 접합전달체가 형성되어 본 실험에 사용가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 ISP2의 경우에는 *S. scabiei*의 포자형성용 배지임에도 불구하고 접합전달체를 전혀 형성하지 못해 *S. scabiei*의 접합전달에는 부적합한 것으로 판명되었다 (Table 1). 형질전환체가 형성된 3종의 배지 중에서는 MS가 가장 높은 접합전달효율을 보였는데 가장 낮은 AS-1에 비해 12배 높은 효율을 보였기 때문에 MS배지를 *S. scabiei*의 접합전달을 위한 최적배지로 선정하고 이후 실험에 계속 사용하였다.

Table 1. Effects of medium on transconjugation efficiency

Medium[a]	Transconjugation frequency[b]
MS	1.1×10^{-2}
ISP4	1.8×10^{-3}
AS-1	9.5×10^{-4}
ISP2	–

[a] Each medium contain 10 mM $MgCl_2$.
[b] Values represent average frequencies from three independent experiments.
- indicates no exconjugant.

포자의 열처리 효과

방선균 포자에 일정 시간동안 열처리를 하였을 경우 접합전달효율이 상승하는 결과들이 보고되었다 [8,15,18].

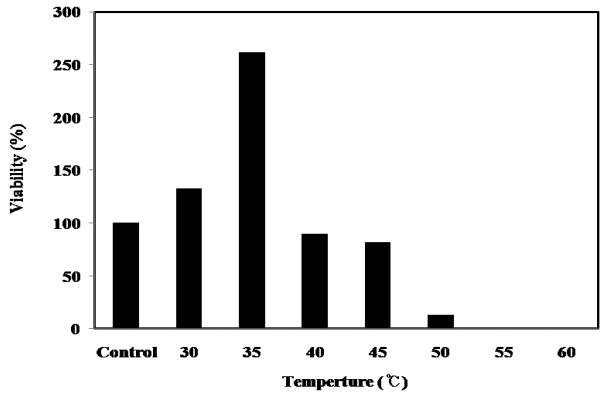

Fig. 1. Effects of temperature on the viability of *S. scabiei* spores. Spores (10^2/mL) in 2×YT medium were incubated for 10 min at the temperature indicated. The data are the average of three independent experiments, and expressed as a percent of the colony count obtained in the absence of heat treatment (control).

이는 열처리가 포자의 발아를 유도하여 접합전달의 효율이 향상되거나 [10] 방선균에 존재하는 제한계를 일시적으로 약화시킴으로써 효율이 증가되는 것으로 알려져 있다 [18,19]. 따라서 *S. scabiei* 포자의 최적 열처리 온도를 결정하기 위하여 30℃에서 60℃까지 5℃간격으로 각각 10분간 열처리하고 처리하지 않은 대조군과 비교하여 열에 대한 포자의 생존율을 조사하였다. 그 결과 35℃까지의 열처리는 대조군에 비해 포자의 생존율을 오히려 2.6배나 증가시키는 경향을 보였다 (Fig. 1). 이러한 결과의 원인으로는 포자에 대한 열처리가 포자의 발아를 촉진시킨 것으로 추정되어 진다. 또 45℃까지는 포자의 생존율이 81% 이상 유지되었지만 50℃이상에서는 생존율이 13% 이하로 감소하였다.

따라서 열처리 범위를 45℃ 이내로 제한하여 포자의 열처리와 접합전달효율과의 관계를 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 포자에 대해 각각 30℃, 35℃, 40℃, 45℃에서 10분간 열처리한 뒤, 대조군과 접합전달 효율을 비교하였을 때 열처리의 온도가 높을수록 접합전달효율이 증가하는 것을 관찰할 수 있었는데 대조군에 비해 45℃의 열처리는 접합전달효율을 18배나 증가시키는 결과를 나타냈다. 따라서 *S. scabiei*의 접합전달에는 45℃의 열처리가 대단히 효과적이라는 사실을 확인할 수 있었다.

Table 2. Effects of heat treatment of spores on transconjugation efficiency

Temperature of heat treatment[a]	Transconjugation frequency[b]
No heat treatment	4.0×10^{-4}
30℃	2.6×10^{-3}
35℃	4.3×10^{-3}
40℃	5.2×10^{-3}
45℃	7.2×10^{-3}

[a] The heat treatment of spores was performed for 10 min.
[b] Values represent average frequencies from three independent experiments.

DNA 공여체수와 수용체수의 관계

방선균의 접합전달에서 plasmid DNA의 공여체로 사용되는 *E. coli*수와 수용체인 포자수의 비율은 접합전달효율에 대단히 중요한 영향을 미친다 [17]. 따라서 *S. scabiei*의 접합

Table 3. Effects of the number of *E. coli* donor cells on transconjugation efficiency

Number of recipient spores	Transconjugation frequency[a]			
	Number of *E. coli* ET12567/pUZ8002 (pSET152)			
	2.5×10^6	2.5×10^7	5×10^7	2.5×10^8
1×10^4	–	–	1.0×10^{-4}	2.0×10^{-4}
1×10^5	–	2.0×10^{-4}	2.0×10^{-4}	2.6×10^{-4}
5×10^5	1.2×10^{-5}	6.6×10^{-5}	5.7×10^{-5}	3.3×10^{-4}

[a] Values represent average frequencies from three independent experiments.
- indicates no exconjugant.

전달에 필요한 최적의 공여체수를 조사하기 위해 Table 3에서 보는 바와 같이 공여체인 *E. coli*수를 2.5×10^6에서 2.5×10^8까지 나누어 적용하였으며 수용체인 포자의 수도 1×10^4에서 5×10^5까지 사용하여 실험하였다. 그 결과 공여체의 수와 수용체의 수가 모두 증가할수록 접합전달의 효율이 증가하는 경향을 보였다. 또 사용되는 포자의 수가 1×10^4에서 1×10^5이하일 때는 DNA 공여체수가 5×10^7이상이 되어야 접합전달이 가능하다는 사실도 확인할 수 있었다.

배지에 첨가되는 $MgCl_2$의 최적농도

배지에 $MgCl_2$의 첨가유무는 접합전달효율에 큰 영향을 미치게 되며 지금까지의 연구에서는 10 mM의 $MgCl_2$가 배지에 첨가되어 왔다 [15]. 그러나 최근 연구에 따르면 방선균에 따라 첨가되는 최적 농도가 달라질 수 있다는 것이 밝혀졌다 [17]. 그러므로 *S. scabiei*에 대한 $MgCl_2$의 최적 첨가농도를 확인하기 위해 최적배지로 선정된 MS배지에 0~60 mM까지 다양한 농도의 $MgCl_2$를 첨가하여 접합전달을 진행하였다. 그 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 $MgCl_2$를 첨가하지 않은 경우에 비해 첨가농도가 증가할수록 접합전달 효율이 높아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 50 mM의 $MgCl_2$를 첨가했을 때 가장 높은 접합전달효율을 보였는데 이것은 지금까지 보고된 연구결과와는 다른 경향이며 $MgCl_2$를 첨가하지 않은 대조군에 비해 18배, 10 mM을 첨가한 경우보다도 2.8배 높은 결과이다. 그러므로 *S. scabiei*의 접합전달을 위해 MS배지에 첨가할 $MgCl_2$의 최적농도는 50 mM이라는 것이 확인되었다.

Table 4. Effects of $MgCl_2$ concentration in MS medium on the transconjugation efficiency

Concentration of $MgCl_2$ added in MS medium (mM)	Transconjugation frequency[a]
0	1.0×10^{-4}
10	6.2×10^{-4}
20	7.2×10^{-4}
30	8.4×10^{-4}
40	1.2×10^{-3}
50	1.8×10^{-3}
60	1.6×10^{-3}

[a] Values represent average frequencies from three independent experiments.

attB site의 특징

접합전달에서 *phi*C31 유래의 *attP* site를 포함하는 pSET152 벡터는 integrase에 의해 방선균의 염색체에 존재하는 *attB* site로 삽입되게 된다. *S. scabiei*의 염색체에 존재하는 *attB* site의 위치와 수, 그리고 그 염기서열을 확인하기 위해 본 연구를 통해 얻어진 4개의 접합전달체로부터 염색체 DNA를 각각 추출한 뒤 pSET152내에는 인식서열이 없는 제한효소, *Nru*I으로 절단하고 pSET152의 Apr 내성유전자를 probe로 사용하여 Southern blot hybridization을 수행하였다. 그 결과 4개의 접합전달체로부터 약 6.9 kb의 위치에 동일한 단일 밴드를 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 이것은 *S. scabiei*의 염색체내에 *attB* site가 한곳만 존재한다는 것을 시사하는 것이다.

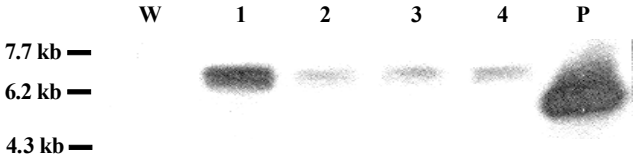

Fig. 2. Southern blot analysis of *Nru*I-digested genomic DNA of exconjugants. Lane W; wild-type *S. scabiei*, lane 1-4; apramycin-resistant exconjugants of *S. scabiei*, lane P; plasmid pSET152. Genomic DNA from the wild-type strain and exconjugants was digested with *Nru*I. pSET152 was digested with *Bam*HI (lane P).

또 *attB* site의 염색체내의 위치와 염기서열을 확인하기 위해 pSET152가 삽입되어진 4개의 접합전달체로부터 염색체 DNA를 각각 추출하여 *Nru*I으로 처리한 뒤 아가로스 전기영동을 통해 6.9 kb 부근의 DNA단편을 회수하였다.

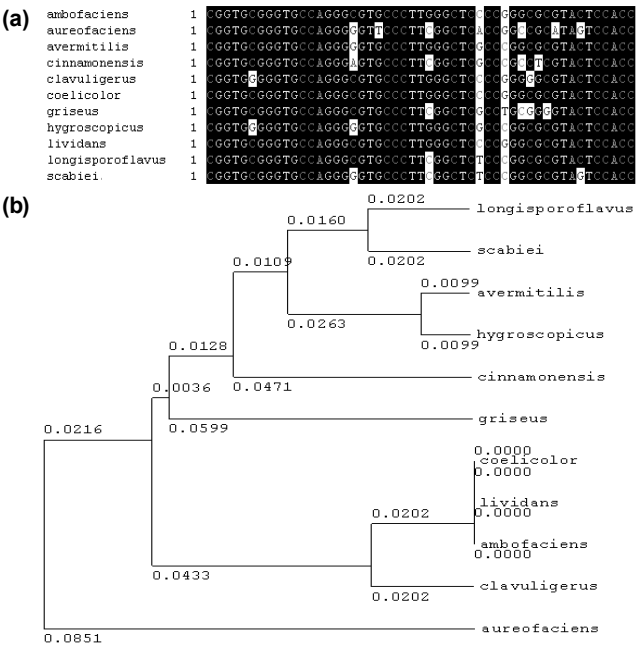

Fig. 3. Alignment of the *attB* site sequences (A) and phylogenetic tree (B) among *S. scabiei* and other actinomycetes: ambofaciens, *S. ambofaciens*; aureofaciens, *S. aureofaciens*; avermitilis, *S. avermitilis* MA-4680; cinnamonensis, *S. cinnamonensis*; clavuligerus, *S. clavuligerus*; coelicolor, *S. coelicolor* A3(2) strain M145; griseus, *S. griseus* ATCC 12475; hygroscopicus, *S. hygroscopicus* NRRL5491; lividans, *S. lividans* 66 TK64; longisporoflavus, *S. longisporoflavus* 83E6; scabiei, *S. scabiei* ATCC 49173 (this work). The alignment and the phylogenetic tree were created by GENETYX software (GENETYX Co., Tokyo, Japan).

얻어진 DNA는 self-ligation을 거쳐 *E. coli* XL10-Gold로 형질전환되었고, Apr (50 μg/mL)가 첨가된 배지를 사용하여 형질전환체를 선별하여 *attB* site가 포함된 염색체단편을 클로닝하였다. 얻어진 염색체단편의 염기서열은 ATTPR과 ATTPL primer를 이용하여 분석하였으며 그 결과 4개의 접합전달체로부터 얻어진 *attB* site는 모두 동일한 염기서열을 보였고 accession number AB530329로 GeneBank에 등록되었다. 또 이미 밝혀진 다른 방선균유래 *attB* site의 염기서열에 대해 86.3%~96.1%의 상동성을 나타냈다 (Fig. 3(a)). 계통학적인 분석에서는 *S. longisporoflavus*의 *attB* site와 가장 가까웠으며 *S. aureofaciens*와 가장 멀었다 (Fig. 3(b)). *attB* site의 염색체내 위치는 *S. scabiei* 염색체의 pirin 상동체를 코드하는 ORF내에 위치해 있었다.

게다가 접합전달의 부위-특이적 재조합을 위해 사용되는 *S. scabiei* 염색체의 *attB* site에 pSET152벡터의 삽입이 *S. scabiei*의 표현형에 어떤 변화를 유도하는지 확인하기 위해 접합전달체와 야생주에 대하여 thaxtomin생산량과 형태분화를 비교 관찰해 보았으나 어떤 변화도 관찰할 수 없었다 (자료 미제시). 그러므로 본 연구에서 사용된 접합전달법은 *S. scabiei*의 분자생물학적인 연구를 위해 매우 안정적이고 효율적인 형질전환방법이라는 것이 확인되었으며 앞으로 *S. scabiei*의 연구에 많은 도움이 될 것으로 기대된다.

요 약

농작물에 심각한 피해를 주는 phytotoxin을 생산하는 *S. scabiei* ATCC 49173의 분자 유전학적인 연구를 위해 대장균으로부터 *S. scabiei*로 plasmid DNA를 도입하는 접합전달법을 이용한 형질전환법을 확립하였다. 본 연구를 통해 확인된 *S. scabiei*의 접합전달용 최적배지는 50 mM의 $MgCl_2$를 첨가한 MS배지이며 접합전달에 사용되는 DNA 수용체인 포자는 45℃의 열처리와 5×10^7이상의 plasmid DNA 공여체가 필요하다는 것을 확인하였다. 또 얻어진 접합전달체에 대하여 Southern blot hybridization과 벡터가 삽입된 염색체부분의 염기서열분석을 통해 *attB* site의 특성을 분석한 결과 *S. scabiei* 염색체의 pirin 상동체를 코드하는 ORF내에 단일위치로 존재하고 있으며 이미 밝혀진 다른 방선균유래 *attB* site의 염기서열에 대해 86.3%~96.1%의 상동성을 보였다.

감 사

이 논문은 2009학년도 경남대학교 학술연구장려금 지원에 의한 것임.

접수 : 2009년 10월 30일, 게재승인 : 2010년 2월 25일

REFERENCES

1. King, R. R., C. H. Lawrence, and L. A. Calhoun (1992) Chemistry of phytotoxins associated with *Streptomyces scabies*, the causal organism of potato common scab. *J. Agric. Food Chem.* 40: 834-837.
2. King, R. R., C. H. Lawrence, and M. C. Clark (1991) Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolates from scab infected tubers. *J. Am. Potato Assoc.* 68: 675-680.
3. Baltz, R. H. (1998) Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* 6: 76-82.
4. MacNeil, D. J. (1988) Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* 170: 5607-5612.
5. Flett, F., V. Mersinias, and C. P. Smith (1997) High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 155: 223-229.
6. Kitani, S., M. J. Bibb, T. Nihira, and Y. Yamada (2000) Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 535-538.
7. Paranthaman, S. and K. Dharmalingam (2003) Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: Chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chi*C gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 84-91.
8. Mazodier, P., R. Petter, and C. Thompson (1989) Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces species*. *J. Bacteriol.* 171: 3583-3585.
9. Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, and B. E. Schoner (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.
10. Motamedi, H., A. Shafiee, and S. J. Cai (1995) Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. *Gene* 160: 25-31.
11. Smokvina, T., P. Mazodier, F. Boccard, C. J. Thompson, and M. Guerineau (1990) Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94: 53-59.
12. Matsushima, P., M. C. Broughton, J. R. Turner, and R. H. Baltz (1994) Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene* 146: 39-45.
13. Stegmann, E., S. Pelzer, K. Wilken, and W. Wohlleben (2001) Development of three different gene cloning systems for genetic investigation of the new species *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17, the ethylenediaminedisuccinic acid producer. *J. Biotechnol.* 92: 195-204.
14. Sambrook, J. and D. W. Russell (2001) *Molecular*

Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
15. Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood (2000) *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, U.K.
16. Rao, R. N., M. A. Richardson, and S. Kuhstoss (1987) Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* 153: 166-198.
17. Choi, S. U., C. K. Lee, Y. I. Hwang, H. Kinoshita, and T. Nihira (2004) Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B_1 producer. *Arch. Microbiol.* 181: 294-298.
18. Engel, P. (1987) Plasmid transformation of *Streptomyces tendae* after heat attenuation of restriction. *Appl Environ Microbiol.* 53: 1-3.
19. Bailey, C. R. and D. J. Winstanley (1986) Inhibition of restriction in *Streptomyces clavuligerus* by heat treatment. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2945-2947.