

DNA Topoisomerase I Inhibitor를 생성하는 방선균 분리균주의 수리동정

이동선 · 하상철¹ · 신우창 · 김태호 · 김홍중¹ · 박용하¹ · 김종국 · 홍순덕*
경북대학교 미생물학과, ¹한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

Numerical Identification of an Actinomycetes Strain Producing an Antitumor Antibiotic with Inhibitory Activity against DNA Topoisomerase I

Dong-Sun Lee, Sang-Chul Ha¹, Woo-Chang Shin, Tae-Ho Kim, Hong-Joong Kim¹,
Yong-Ha Park¹, Jong-Guk Kim and Soon-Duck Hong*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

¹Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong,
Taejon 305-600, Korea

Abstract — DNA topoisomerase I have been shown to be important therapeutic target in cancer chemotherapy. Chemotaxonomy and numerical identification were carried out for an isolate strain No.7489 producing an antibiotic that inhibits DNA topoisomerase I activity. The genus of strain No.7489 was determined as *Streptomyces* sp. from culture, morphological and chemotaxonomic data. Thirty-nine taxonomic unit characters were tested and the data were analyzed numerically using the TAXON program. The isolate was best matched to *Streptomyces melanosporofaciens* in the major cluster 32 of *Streptomyces*. Therefore, it was concluded that the isolate was identified to be a member of *Streptomyces melanosporofaciens*.

DNA Topoisomerase는 DNA 복제, 전사, recombination, chromosome separation 등과 같은 세포내 DNA 대사에서 필수적인 과정에 요구되는 효소로서 생물체에 있어서 두가지 형태인 DNA Topoisomerase I(Topo I)과 DNA Topoisomerase II(Topo II)가 존재한다(1, 2). Topo I은 두가닥 DNA중 한가닥에 nick을 야기시키는 단량체이며, Topo II는 DNA 두가닥에 nick을 야기시키는 이량체로서 두가지 형태의 효소촉매작용은 DNA와 결합, DNA 가닥 절단, DNA 가닥 통과, DNA 재결합의 4단계로 구성되어 있어서 DNA의 topology 변환을 유도한다(1-3). 현재 DNA topoisomerase는 암치료제 개발에서 중요한 target 으로 사용되고 있으며, 임상에서 사용되는 강력한 항암제인 adriamycin, ellipticin, etoposide, tenposide 등과 같은 DNA topoisomerase의 저해를 일으켜 항암효과를

나타내고 있으므로 최근 들어 DNA topoisomerase를 저해하는 물질의 탐색이 진행되고 있다(4, 5). 지금까지 개발된 항암제의 대부분은 Topo II의 저해제이며, Topo I을 저해하여 항암효과를 보이는 식물유래의 camptothecine(CAM)과 그 유도체가 보고되고 있으나 독성이 강하여 실제 임상에서 많은 부작용을 나타낸다(6-8). 따라서 우리는 Topo I의 활성을 저해함으로써 암의 증식을 억제하는 항암제를 생성하는 토양 방선균을 탐색하여 분리균주의 배양학적, 화학적, 및 Williams의 방법(9, 10)에 따라 실험한 결과들을 Ward에 의해 개발된 TAXON program을 이용하여 그 균주를 수리동정하였다.

재료 및 방법

방선균의 분리 및 배양조건

대구 근교에서 채취한 토양에서 방선균 분리를 위하여 Starch-nitrate agar 배지와 Humic acid-Vitamin (HV) agar 배지(11)를 사용하였으며 선별균주의 배양

Key words: DNA topoisomerase I inhibitor, chemotaxonomy and numerical identification, *streptomyces melanosporofaciens*

*Corresponding author

은 Modified Bennett's agar(MBA) 배지(12)와 Starch-nitrate agar 배지 등을 사용하였다.

화학적 동정(Chemotaxonomic identification)을 위한 특성 분석

Nutrient broth에서 증식된 균체를 동결건조시킨 후 DAP(diaminopimelic acid)와 지방산, menaquinone(MK), G+C 몰 함량을 분석하였다(13-16).

균의 수리동정을 위한 특성과 동정스코어(Identification score)

선별균주인 *Streptomyces*의 수리동정에 사용하는 단위형질(unit character)을 Williams 등(9, 10)의 방법에 따라 시험하였다(Table 1). TAXON program을 이용하여 시험항목의 결과로부터 분리주의 동정스코

어를 결정하였으며 그 각각은 다음과 같다.

Willcox probability(17) 분류군(Taxon J)에 대한 분리주(U)의 유사정도(likelihood)는 모든 분류군에 대한 분리주의 유사정도의 합으로 나눈 값을 말한다(9). 스코어 값이 1.0에 가까울수록 그 matrix 내 group과 잘 맞는다는 것을 의미한다.

분류학적 거리(Taxonomic distance) 분리주와 비교되는 group의 중심(centroid)으로부터 분리주의 거리를 나타낸다. 낮은 값일수록 그 group과 높은 상관관계를 나타내며 이 값은 다음의 식으로 계산할 수 있다.

$$\left[\sum (U_i - P_{ij})^2 / m \right]^{1/2}$$

이때 m은 형질의 수이고, U_i 는 형질 i에서 나온 U의 점수(positive일 때 1이거나 negative일 때 0)이

Table 1. Taxonomic unit characters used to the identification of an isolate from the probability matrix of the *Streptomyces* major clusters.*

1. Morphology and pigmentation	
Spore surface	smooth (SMO), rugose (RUG)
Spore chain morphology	rectiflexible (RFS), spiral (SP)
Color of spore mass	red (RED), gray (GRY), green (GRN)
Mycelial pigment	red/orange (ROP), yellow/brown (YBP)
Diffusible pigment	production (PIG),
Melanin production on	PYI medium (MPI), Tyrosine medium (MTY)
2. Antimicrobial activity	
Bacillus subtilis (SUB)	Aspergillus niger (NIG)
3. Biochemical tests	
H ₂ S production (H ₂ S)	Pectin hydrolysis (PEC)
Nitrate reduction (NO ₃)	
4. Degradative tests	
Xanthine (XAN)	Allantoin (ALL)
Arbutin (ARB)	
5. Antibiotic resistance	
Neomycin (NEO)	Rifampicin (RIF)
6. Growth tests	
45°C (45C)	7% NaCl (7NA)
Sodium azide (01Z)	phenol (PHN)
7. Compounds as sole source of nitrogen (1%, w/v)	
L-hydroxyproline (HYD)	L-histidine (HIS)
DL-α-amino-n-butyric acid (BUT)	
8. Organic compounds as sole source of carbon (1%, w/v)	
Cellobiose (CEL)	meso-Inositol (INO)
D-Mannitol (MAN)	L-Rhamnose (RHA)
Raffinose (RAF)	D-Fructose (FRU)
Adonitol (ADO)	Inulin (INU)
D-Xylose (XYL)	

*Characters parenthesis is the code name for computer.

며, P_{ij} 는 Taxon J의 형질 i에 대한 positive의 비율을 의미한다.

95% 분류군 반경(95% Taxon radius) 이는 분류군 J의 95%의 구성군이 포함되는 분류군의 반경을 나타낸다.

% Probability of Strain Further Away cluster 전체균주에 대해 동정된 미지의 시험균주 밖에 존재하는 균주가 확률적으로 몇 %에 해당하는가를 나타낸다.

DNA Topoisomerase I Inhibitor 생성균주의 탐색

DNA topoisomerase 활성은 supercoiled pBR322 DNA가 relaxed form으로의 전환되는 것을 관찰함으로써 결정하였다. 반응혼합액에는 40 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol(DTT), 0.5 mM EDTA, bovine serum albumin(50 µg/ml), pBR 322 DNA(0.2 µg), sample 액 2 µl, topoisomerase 1~5 units을 포함한다. 사용한 DNA topoisomerase은 Promega Co.에서 시판하는 효소와 Calf thymus에서 정제한 효소를 사용하였다. 반응 혼합액을 37°C 에서 1시간 동안 반응시킨 후 loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40% glycerol and 2.5% SDS) 4 µl를 첨가한 후 agarose gel 전기영동하여 DNA topology를 관찰하였다.

결과 및 고찰

형태적 특성과 화학적 분류학적 특성

토양시료로부터 DNA topoisomerase I의 활성을 저해하는 항생물질을 생성하는 방선균을 분리하여 이 균주를 방선균 분리주 No.7489로 표시하였다. 분리주 No.7489을 Bergey's Manual of Bacteriology(18)와 Actinomycetes Taxonomy(19)의 방법에 따라 International Streptomyces Project(ISP) 배지(20-23), Czapeck 배지(11) 등에서 배양하면서 7, 14, 21일 후에 생육, 기균사 색깔, 배면색깔, 수용성 색소 생성 등의 배양학적 특성을 관찰하였으며, 그 결과는 Table 2와 같다. Inorganic salts-starch agar(ISP medium 4) 배지를 제외하고는 전반적으로 생육이 양호하였으며, 기균사의 색깔은 대개 gray 계통이며 수용성 색소는 생성하지 않았다. Inorganic salts-starch agar(ISP medium 4) 배지에서 21일간 배양한 분리주 No.7489의 포자를 전자현미경으로 관찰한 결과, 기균사에서 포자사슬의 형태는 spiral 형이었으며, 포자의 표면은 rugose type이었다(Fig. 1).

분리주 No.7489의 세포벽의 peptidoglycan 층에 존재하는 diaminopimelic acid(DAP) 이성질체는 LL-type이었으며(Fig. 2), 아미노산은 glycine, glutamic acid, alanine이 검출되는 chemotype I에 해당되었다. Chromosomal DNA의 평균 G+C 함량은 68.289% (data not shown)로 나타났으며, 지방산 분석에서는 Fig. 3와 같이 주로 iso-branched fatty acid C₁₆, C₁₅와 anteiso-branched fatty acid C₁₅, C₁₇로 구성되는 2C type이었으며(24, 25), 호흡연쇄의 전자전달에 관

Table 2. Cultural characteristics of the isolated strain No.7489

Medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Diffusile pigment
Yeast extract-malt extract (ISP No.2)	Good	Abundant; Gray	Yellow	Yellow
Oatmeal agar (ISP No.3)	Good	Abundant; White	Yellow	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	Poor	Abundant; Gray	White	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	Good	Abundant; White	Yellow	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No.6)	Good	Poor; White	White	None
Tyrosine agar (ISP No.7)	Good	Abundant; White	Yellow	None
Arginine-glycerin agar	Poor	Poor; White	White	None
Starch agar	Good	Abundant; Gray	Yellow	None
Emersion agar	Good	Abundant; White	Yellow	Yellow
Peptone-beef extract agar Moderate	Moderate	Poor; White	White	None
Dulaney's medium agar	Good	Abundant; White	Sepia	None
Glucose-asparagine agar	Good	Abundant; White	Yellow	None
Glucose-peptone agar	Good	Abundant; White	Yellow	None
Czapek's sucrose agar Moderate	Moderate	Abundant; White	White	None
Bennett medium (modified)	Good	Abundant; Gray	Yellow	None

The strain was cultured in various kinds of media at 28°C for 14 days.



Fig. 1. Scanning electron micrograph of spore chains ($\times 15,000$) of the isolated strain No. 7489 cultured for 2 weeks on inorganic salts-starch agar (ISP No. 4) at 30°C.

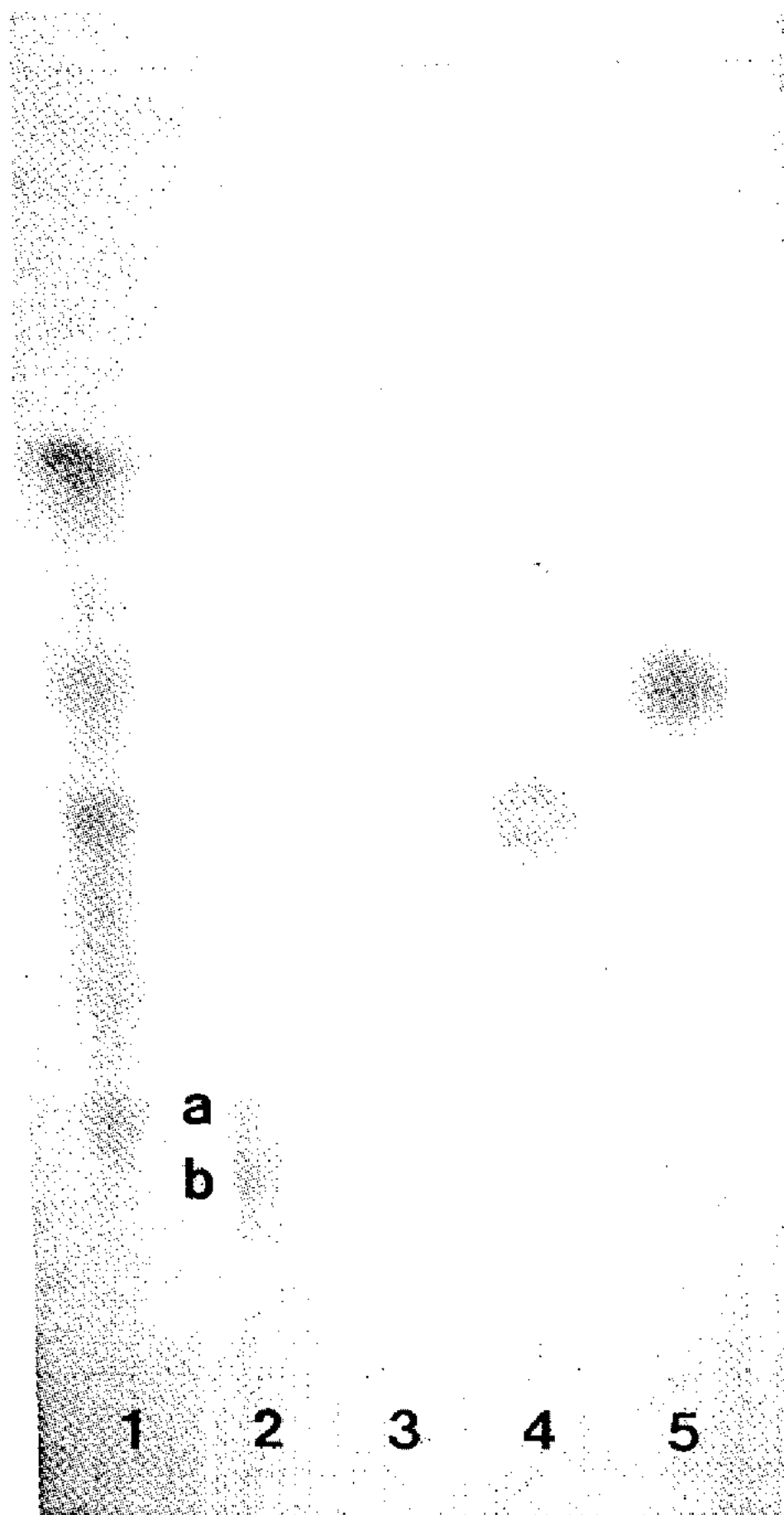
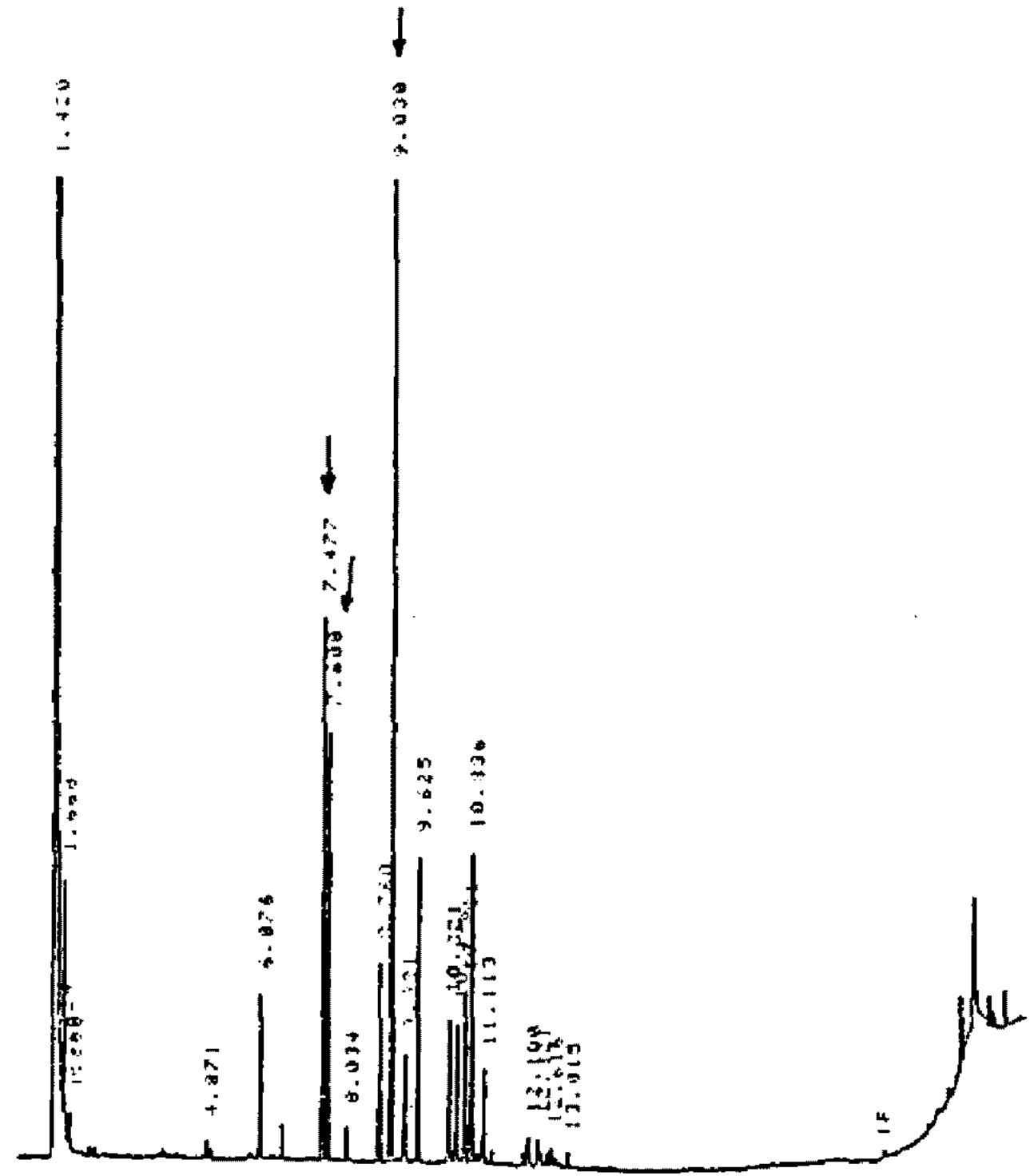


Fig. 2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids of the isolated strain No. 7489. Identification of the DAP isomers is achieved single-dimensional TLC in a solvent system containing methanol-water-6N HCl-pyridine (80:20:4:10, v/v).

1. Cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers (a; LL-DAP, b; meso-DAP), 3. Glycine, 4. Glutamic acid, 5. Alanine



RT	Area	Area%	Response	ECL	Name	%	Comment 1	Comment 2
1.420	525004144	0.028	...	7.064	SOLVENT PEAK
1.871	494	0.001	...	7.487
9.074	4920	0.026	...	7.369
9.076	548	0.027	...	7.880
7.477	4840	0.026	0.994	11.618	14:0 190	3.76	ECL deviation -0.000	Reference -0.004
7.039	1080	0.038	0.990	14.000	14:0	9.83	ECL deviation -0.000	Reference -0.003
9.625	18944	0.058	0.961	14.821	15:0 190	12.72	ECL deviation 0.008	Reference -0.002
10.336	13424	0.058	0.958	14.711	15:0 ANT190	10.29	ECL deviation 0.008	Reference -0.002
11.113	1240	0.044	0.958	15.000	15:0	8.92	ECL deviation 0.008	Reference -0.002
12.109	4704	0.041	0.949	15.437	16:1 190	4.98	ECL deviation -0.004	...
12.618	14920	0.059	0.956	15.626	16:0 190	30.67	ECL deviation 0.000	Reference -0.001
13.013	4240	0.046	0.952	15.815	16:1 190	9.89	ECL deviation -0.002	...
13.418	10504	0.041	0.929	15.999	16:0	7.63	ECL deviation -0.001	Reference -0.004
13.823	9336	0.044	0.925	16.615	16:0 01 HE140	3.85	ECL deviation -0.001	...
14.228	1408	0.043	0.921	16.521	17:1 ANT190 C	3.89	ECL deviation -0.004	...
14.633	6112	0.043	0.920	16.638	17:0 190	4.39	ECL deviation 0.001	Reference 0.001
15.038	11336	0.043	0.919	16.722	17:0 ANT190	8.14	ECL deviation 0.009	Reference -0.004
15.443	4768	0.043	0.917	16.808	17:0 CYCLO	3.87	ECL deviation -0.008	Reference -0.001
15.848	1520	0.041	0.913	17.467	18:1 190	1.89	ECL deviation 0.007	...
16.253	1064	0.047	0.912	17.594	UNCOMMON 17:0 01	0.76	ECL deviation -0.001	...

Fig. 3. Gas chromatogram of cellular fatty acids of the isolated strain No. 7489 Column; 25 \times 0.2 mm methyl phenyl silicone fused silica capillary column (Hewlett-Packard Co.), detector; flame ionization detector, injector temperature; 250°C, detector temperature; 250°C, column temperature; 180°C, carrier gas; N₂ (30 ml/min.)

계하는 quinone type의 분석에서는 Fig. 4와 같이 isoprenoid chain이 9개로 연결된 menaquinone MK-9 (H₆, H₈, H₄, H₂)를(26, 27) 나타내는 전형적인 *Streptomyces* 속으로 분류할 수 있었다. 이상과 같은 배양 특성, 형태적 특성과 화학적 분석결과 No.7489은 *Streptomyces* 속으로 분류할 수 있다.

TAXON program을 이용한 수리동정(Numerical identification)

분리균 *Streptomyces* sp. 7489의 종 수준의 동정을 위하여, 분리균의 단위특성(unit character)들을 TA-

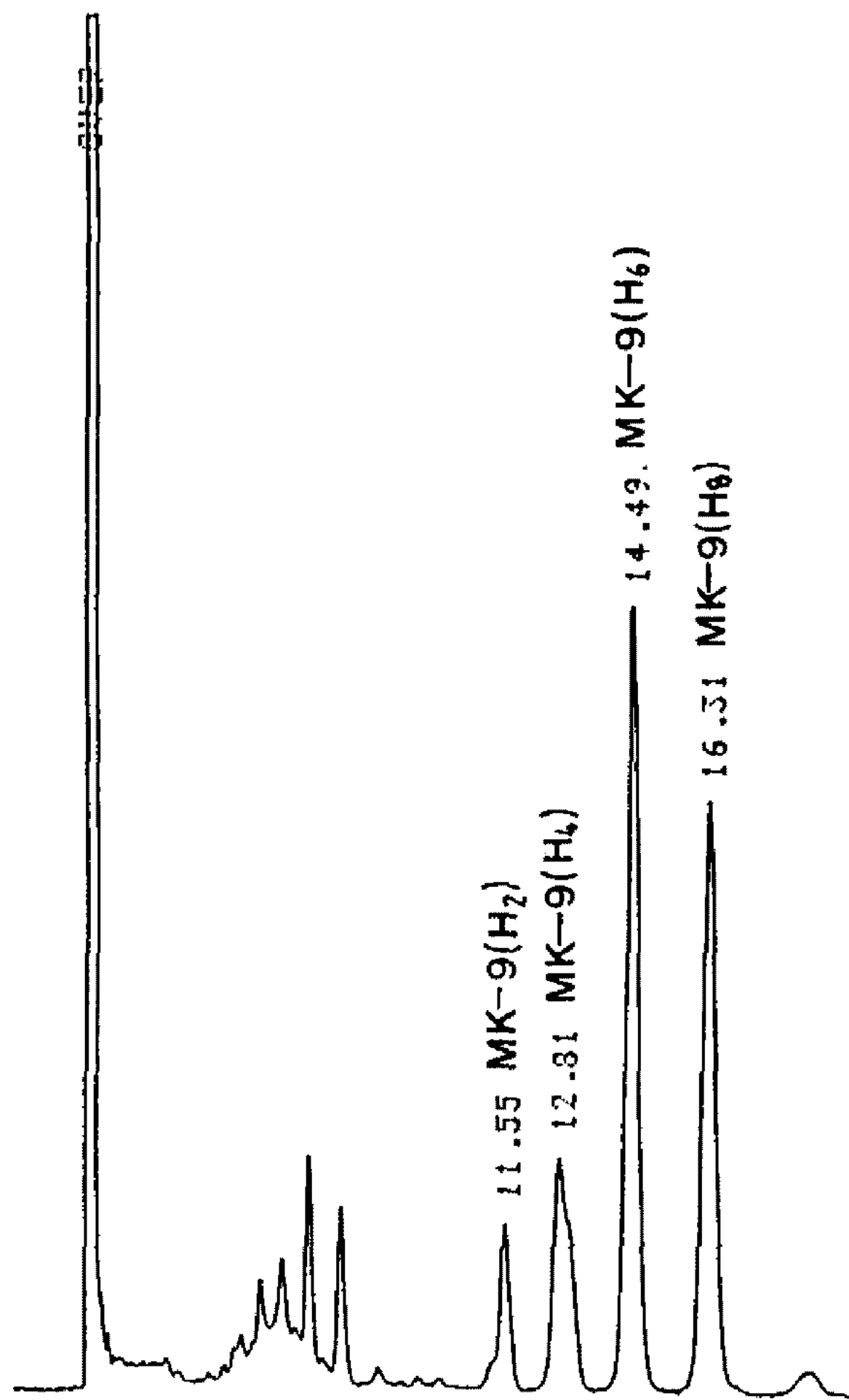


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of me-naquinones (MK) prepared from the isolated strain No. 7489.

Column; 150×4.6 mm RP-C¹⁸ (YHC-Pack ODS-AM), mobile phase; methanol:isopropanol (2:1), detector; UV 270 nm, flow rate; 1 ml/min.

XON program을 이용하여 수리동정하였다(Table 1).

TAXON program을 이용하여 분류군을 정확히 동정하기 위해서는 Willcox probability가 높고(>0.85), Taxon distance가 95% Taxon radius내에 들며 짧을수록 그리고 % probability of strain further away 값이 클수록 이상적이라 할 수 있다(9, 10).

TAXON program을 이용하여 *Streptomyces* 주군집 (major cluster)을 대상으로 분리주 *Streptomyces* sp. 7489을 수리동정한 결과 Table 3와 같이 주군집 32 (Centrotpe member ; *Streptomyces violaceoniger*)에 대해 0.999999의 Willcox probability를 나타내었으며 이는 주군집 19(Centrotpe member ; *Streptomyces diastaticus*)보다 훨씬 높았으며, 그리고 Taxon distance도 낮으며, 95% Taxon radius보다 낮으며, % probability of strain further away 값은 높았으므로 분리군주 *Streptomyces* sp. 7489은 주군집 32에 속하는 것으로 나타났다.

본 분리군주의 단위형질 특성은 6개의 군주로 구성된 집단인 주군집 32의 Hypothetical Medium Organism(HMO), Centrotpe인 *Streptomyces hygrosopicus* N736, 본 분리군주와 가장 근접한 군주(best match strain) *Streptomyces melanosporofaciens*와 outer-most strain인 *Streptomyces hygrosopicus* ISP 5578의 TAXON 단위특성과 Willcox probability를 비교분석한 결과는 Table 4와 같다. 본 분리군주 *Streptomyces* sp. 7489는 주군집 32에서 Taxon distance (0.3128)가 95% Taxon radius(0.3481)보다 작고 outer-most member strain인 *Streptomyces hygrosopi-*

Table 3. Identification of the isolate *Streptomyces* sp. 7489 to the major clusters of *Streptomyces* by using TAXON program

Taxon major cluster (Centrotpe member)	Tax distance	95% Taxon radius	% Prob of strain futher away	Willcox probability
32 (<i>Streptomyces violaceoniger</i>)	0.3128	0.3481	27.7990	0.999999
19 (<i>Streptomyces diastaticus</i>)	0.4817	0.4262	0.1337	0.000000
21 (<i>Streptomyces griseoruber</i>)	0.4847	0.3125	0.0000	0.000000

Table 4. Identification of the isolate *Streptomyces* sp. 7489 to the major clusters of *Streptomyces* by using TAXON program

Member of cluster 32	Tax distance	95% Taxon radius	% Prob of strain futher away	Willcox probability
HMO (Hypothetical median organism)	0.2170	0.3481	98.8704	0.999999
Centrotpe (<i>S. hygrosopicus</i> N736)	0.2696	0.3481	75.8898	0.999999
Best match strain (<i>S. melanosporofaciens</i>)	0.2851	0.3481	59.5409	0.999999
Outer-most member (<i>S. hygrosopicus</i> ISP5578)	0.3136	0.3481	26.9837	0.999999
Isolate (<i>Streptomyces</i> sp. 7489)	0.3128	0.3481	27.7990	0.999999

Table 5. Comparison of taxonomic unit characters between member organisms in cluster 32 of *Streptomyces* and the Willcox probability calculated by TAXON program

Taxonomic unit characters	% value in cluster 32	HMO in cluster 32	Centrotype in cluster 32	Best match strain	Isolate	Outer-most member
RFS	1	—	—	—	—	—
RAS	1	—	—	—	—	—
SPI	99	+	+	+	+	+
BIV	1	—	—	—	—	—
SMO	1	—	—	—	—	—
RUG	99	+	+	+	+	+
RED	1	—	—	—	—	—
GRY	99	+	+	+	+	+
GRN	1	—	—	—	—	—
ROP	1	—	—	—	—	—
YBP	1	—	—	—	—	—
MPI	1	—	—	—	—	—
FRG	1	—	—	—	—	—
BUT	99	+	+	+	+	+
HIS	99	+	+	+	+	+
HYD	83	+	+	—	+	+
PEC	50	+	—	—	—	+
NO3	83	+	—	+	+	+
H2S	99	+	+	+	+	+
SUB	67	+	+	+	+	+
NIG	33	—	—	+	+	—
XAN	1	—	—	—	—	—
ALL	50	+	—	—	+	+
ARB	99	+	+	+	+	+
NEO	1	—	—	—	—	—
RIF	83	+	+	+	+	+
45C	50	+	—	—	—	+
7NA	1	—	—	—	—	—
01Z	50	+	—	—	—	+
PHN	1	—	—	—	—	—
XYL	67	+	+	+	+	—
INO	67	+	+	+	—	—
MAN	99	+	+	+	+	+
FRU	83	+	+	+	+	+
RHA	83	+	+	+	+	—
RAF	83	+	+	+	+	—
INU	33	—	—	—	—	—
ADO	67	+	—	—	—	+
CEL	99	+	+	+	+	+
MATCHED		32	34	35	39	30
MISMATCHED		7	5	4	0	9
S _{SM} VALUE (%)		82	87	90	100	77
STRAIN		Hypothetical median Org.	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	No. 7489	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
Willcox probability		0.999999	0.999999	0.999999	0.999999	0.999999

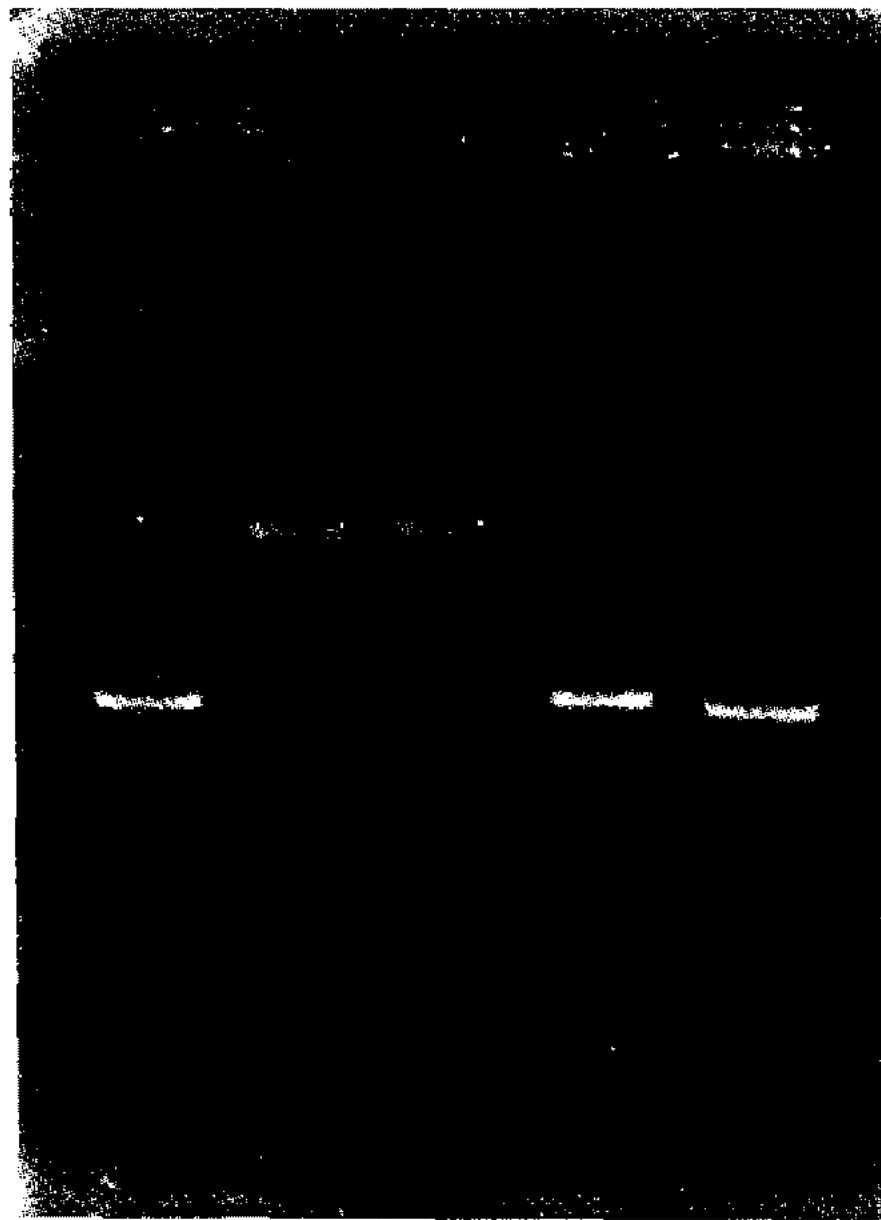


Fig. 5. Inhibitory activity against DNA topoisomerase I. The reaction mixture contained 40 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 50 µg/ml of BSA, 0.2 µg of pBR322 DNA, 2 µl of sample solution and 1 unit of topo I in a total volume of 20 µl. The mixture was incubated at 37°C for 1 hour.

Lane 1: pBR322 DNA, Lane 2: pBR322 DNA+topo. I, Lane 3: pBR322 DNA+topo. I+camptothecine (200 ng), Lane 4: pBR322 DNA+topo. I+Sample (100 ng) that purified from the isolated strain No. 7489, Lane 5: pBR322 DNA+sample (100 ng)

cus ISP 5578의 Taxon distance(0.3136)보다 약간 작지만 군집의 중심에 있다는 확률(% probability of strain further away)이 centrotyp(75.8898)이나 best match strain(59.5409)보다 낮은 27.7990의 수치를 나타내는 것으로 보아 분리균주는 주군집 32의 중심에서는 다소 떨어진 영역내부에 위치하는 것으로 판단된다.

분리주 *Streptomyces* sp. 7489와 best match strain인 *S. melanosporofaciens*는 주군집을 동정하는데 필요한 39개의 단위형질중 포자형태, 색소생성능, 탄소원 및 질소원 이용성 등 35개의 단위형질에서 동일한 결과를 나타내었으며 그 SSM(Simple matching coefficient, 비교되는 두 균주에서, 둘 다 positive이거나 negative의 data를 갖는 동일한 단위형질들의 수에 대한 비교에 사용한 모든 단위형질들의 수의 %로 표현)값은 가장 높은 90.00이었다(Fig. 5).

이상의 수리동정 결과 분리균 *Streptomyces* sp. 7489를 주군집 32의 *Streptomyces melanosporofaciens*로 동정하였다.

DNA Topoisomerase I Inhibitor 생성균주의 탐색

DNA topoisomerase I은 supercoiled DNA의 두가닥 중 한가닥에 nick을 야기시켜 relaxed form으로 전환시키는 효소이며(lane 2), Fig. 5에서와 같이 분리균주에서 생성되는 항생물질의 DNA topoisomerase I에 대한 저해능(lane 4)은 식물에서 분리한 camptothecine(lane 3)보다 우수하며, plasmid DNA의 topology 변환에는 아무런 영향을 주지 않았으며(lane 5), 항생물질의 농도를 1 µg까지 증가시켜 DNA와 반응하여도 DNA에 아무런 영향이 없었다(data not shown). 따라서 *Streptomyces melanosporofaciens*로부터 생성되는 항생물질의 생물활성과 구조결정에 관한 내용은 추후에 보고하기로 한다.

요 약

DNA topoisomerase I은 DNA topology 변환을 촉매하는 효소로서 최근에는 항암제 탐색계에서 사용되고 있으며, 본 효소활성에 저해능이 있는 항생물질을 생산하는 방선균을 토양으로부터 분리하여 형태학적, 화학적 분석 및 수리동정을 실시한 결과 *Streptomyces* sp.로 속을 결정하였으며, 39개의 분류단위형질을 TAXON program에 적용하여 종의 수리동정을 실시한 결과 분리균 7489는 *Streptomyces*의 제 32 주군집에 속하는 *Streptomyces melanosporofaciens*와 가장 높은 유사성을 나타냈다. 따라서 분리주는 *Streptomyces melanosporofaciens*의 한 균주로 동정하였다.

감사의 글

Calf thymus에서 분리한 DNA topoisomerase I를 제공하여 주신 한국해양연구소의 이홍금 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Wang, J.C. 1985. DNA Topoisomerase. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 665-695.
2. Peter D'Arpa and Levoy F. Liu. 1989. Topoisomerase-targeting antumor drugs. *Biochimica et Biophysica Acta.* **989**: 163-177. *Microbiology, New York.* **23**: 1-8.
3. Liu, L.F.: DNA Topoisomerase poisons as antitumor drug. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 351-375.
4. D'Arpa, P. and L.F. Liu. 1989. Topoisomerase-ta-

- rgeting antitumor drugs. *Biochemica et Biophysica Acta*. **989**: 163-177.
5. Schneider, E., Y.H. Hsling and L.F. Liu. 1990. DNA Topoisomerase as anticancer drug targets. *Adv. Pharmacol.* **21**: 149-183.
 6. Dalica, K. and R.J. Franco. 1988. Inhibitors of DNA Topoisomerase. *Biochemistry*. **27**: 2253-2258.
 7. Giovanella, B.C., J.S. Stehlin, M.E. Wall, M.C. Wani, A.W. Nicholas, L.F. Liu, R. Silber and M. Potmesil. 1989. DNA Topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science* **246**: 1046-1048.
 8. Hertzberg, R.P., M.J. Caranfa, K.G. Holden, D.R. Jakas, G. Gallagher, M.R. Mattern, S.M. Mong, J.O. Bartus, R.K. Johnson and W.D. Kingsbury. 1989. Modification of the hydroxyl lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J. Med. Chem.* **32**: 715-720.
 9. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, P.H.A. Sneath and M. Sackin. 1983 A. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
 10. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, J.C. Vickers, P.H.A. Sneath, M. Sackin and A.M. Mortimer. 1983 B. Application of new theoretical concepts to the identification of *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
 11. Difco manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology, 10th ed. Difco Lab. Detroit. U.S.A.
 12. Waksman, S.A. 1961. The actinomycetes. The Williams and Willkins Co., Baltimore. Vol. 2.
 13. Yamada, K. and K. Komagata. 1970. Taxonomic studies on Coryneform Bacteria II. Principal Amino Acids in the Cell Wall and Their Taxonomic Significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
 14. Komagata, K. and K.I. Suzuki. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics, Pp. 161-207. In Colwell, R.R. and Grigorova, R., eds. Method in Microbiology Vol. 19. Academic Press.
 15. Tamaoka, J., Y. Katayama, H. Kuraish. 1983. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* **54**: 31-36.
 16. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase HPLC. *FEMS Microbiol. Letters*. **25**: 125-128.
 17. Willcox, W.B., S.P. Lapage, S. Bascomb and M.A. Curtis. 1973. Identification of bacteria by computer: theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* **77**: 317-330.
 18. Peter, H.A.S., S.M. Nicholas, M.E. Sharp and J.G. Holt. 1986. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. **11**: 1104-1139. Williams and Willkin Co. Baltimore.
 19. Dietz, A. and D.W. Thayer. 1980. "Actinomycetes taxonomy" SIM special publication No. 6. Society for Industrial Microbiology.
 20. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* II. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 172-174.
 21. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* III. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 150-152.
 22. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* IV. species descriptions from second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
 23. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* V. additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
 24. Saddler, G.S., A.G. O'Donnell, M. Goodfellow and D.E. Minnikin. 1987. SIMCA pattern recognition in the analysis of *Streptomyces* fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1137-1147.
 25. Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. Chemical method in bacterial systematics. Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 20. Academic Press, London.
 26. Kroppenstedt, R.M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of Actinomycetes and related organisms, Pp. 173-199. In Goodfellow and Minnikin (eds.), Chemical Methods in Bacterial Systematics, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 20. Academic Press, London.
 27. Alderson, G., M. Goodfellow and D.E. Minnikin. 1985. Menaquinone composition in the classification of *Streptomyces* and other *Sporoactinomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1671-1679.

(Received 23 January 1995)