

V 薬剤耐性変異の導入による翻訳装置および転写酵素の改変と微生物機能の高度利用化

1. はじめに

微生物は多彩な機能を有しており、その能力を余すことなく引き出してやるのが、微生物機能の高度利用化において重要である。我々は、リボゾームタンパク質の S12 変異により放線菌の抗生物質生産能が著しく活性化されることを、約 15 年前に見いだした (図 1)¹⁾。リボゾームは、細胞内において mRNA からタンパク質を合成する翻訳過程に関与する細胞内小器官であるが、我々は以上の発見を機に、「リボゾームを操作することにより、微生物の有用機能を活性化できる可能性がある」という着想を得、それをもとに研究を進めてきた。その中では、リボゾームを作用部位とする抗生物質 (タンパク質合成阻害剤) を利用した簡易なりボゾーム改良法 (薬剤耐性選抜法) を確立した。その結果、リボゾームを改変して微生物機能を活性化することを基礎とした「リボゾーム工学」を確立できた²⁾。さらに、遺伝情報の転写を司る酵素、RNA ポリメラーゼを改変することによっても微生物機能の活性化が可能であることを見いだした。そして、「リボゾーム工学」と同様、RNA ポリメラーゼを作用部位とした抗生物質を用い、当該抗生物質に対する耐性菌の選抜による改変技術 (転写工学) を開発することに成功した^{3,4)}。本技法によって得られた改変型 (変異型) リボゾームまたは RNA ポリメ

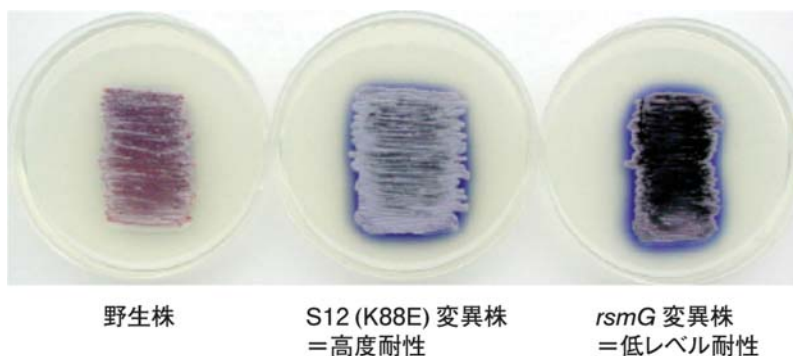


図 1 ストレプトマイシン耐性変異の導入による抗生物質生産の活性化
放線菌 *Streptomyces coelicolor* にストレプトマイシン耐性変異 (S12 変異あるいは *rsmG* 変異) を導入することにより青色抗生物質 (アクチノロージン) の過剰生産が誘発される。

ラーゼがどのようなメカニズムによって微生物機能を活性化させるのかについても解析し、そのメカニズムの解明に成功した^{5,6)}。本稿では、薬剤耐性選抜法の概要(図2)及び微生物機能の活性化メカニズムについて紹介するとともに、最近、明らかにした「低レベルストレプトマイシン耐性菌の耐性機構」について概説する。なお、本手法は放線菌を中心に開発を進め、本稿でも放線菌を中心に詳細を記載するが、我々が調べた範囲のバクテリアすべてについて適用可能であることが確認されている。

2. 薬剤耐性選抜法によるリボソームの改変

一般的に用いられている抗菌剤の中には、タンパク質合成阻害剤、すなわちリボソーム攻撃性の薬剤が多数存在する。こうした抗菌剤に対して耐性を示す変異株を単離した場合、高い確率で、リボソーム構成成分(タンパク質あるいはRNA)の変異を見いだすことが出来る。即ち、薬剤耐性株を選択する事により改変型のリボソームを持つ株を効率的にスクリーニング出来るのである。我々は、放線菌の二次代謝に着目して、リボソームの改変に適した薬剤の選択を行った。具体的には、放線菌 *Streptomyces lividans* および *Streptomyces coelicolor* A3(2)における青色二次代謝産物である「アクチノロージン」の生産をモデルとし、その活性化(生産性の増大)に適したリボソーム変異導入法の確立を行った。本物質の生産は目視で簡単に判別できるため、効率的なスクリーニング成功の鍵となった。種々の抗生物質を検討した結果、二次代謝の顕著な活性化に有効な変異を付与する薬剤の一つとして、抗結核薬として有名なストレプトマイシンが見いだされた⁷⁾。本稿の冒頭で述べた本手法開発の契機となった最初の発見も、偶然使用していた株がストレプトマイシン耐性変異株であったことによった。対象とする菌から高度ストレプトマイシン耐性変異株(最小発育阻止濃度の10倍以上の薬剤濃度で生育可能)を取得すると、その大半はリボソームタンパク質 S12 に様々な変異が生じていることが確認され、中でも、88番目のリジンがグルタミン酸に変化した K88E 変異がアクチノロージン生産の活性化に特に有効であることが明らかとなった^{1,8)}。一方、興味深いことに、高濃度ではなく低濃度のストレプトマイシンで高頻度に得られる低レベルストレプトマイシン耐性変異株(最小発育阻止濃度の3倍程度の薬剤濃度で生育可能)においても顕著なアクチノロージン生産が検出された。低レベルストレプトマイシン耐性を付与する遺伝子変異はこれまでに明らかにされておらず、その同定は難渋を極めたが、最近になって、*rsmG* 変異がその実体であることを確定した。これについては後述する。

二次代謝の活性化には、ストレプトマイシン以外に、同じくリボソームを標的とする薬剤であるゲンタミシン、ジェネティシン、パロモマイシン、リンコマイシン、フシジン酸あるいはチオストレプトンが有効である(図3)。したがって、リボソームの改変(耐性変異の導入)による微生物機能の活性化は、ストレプト

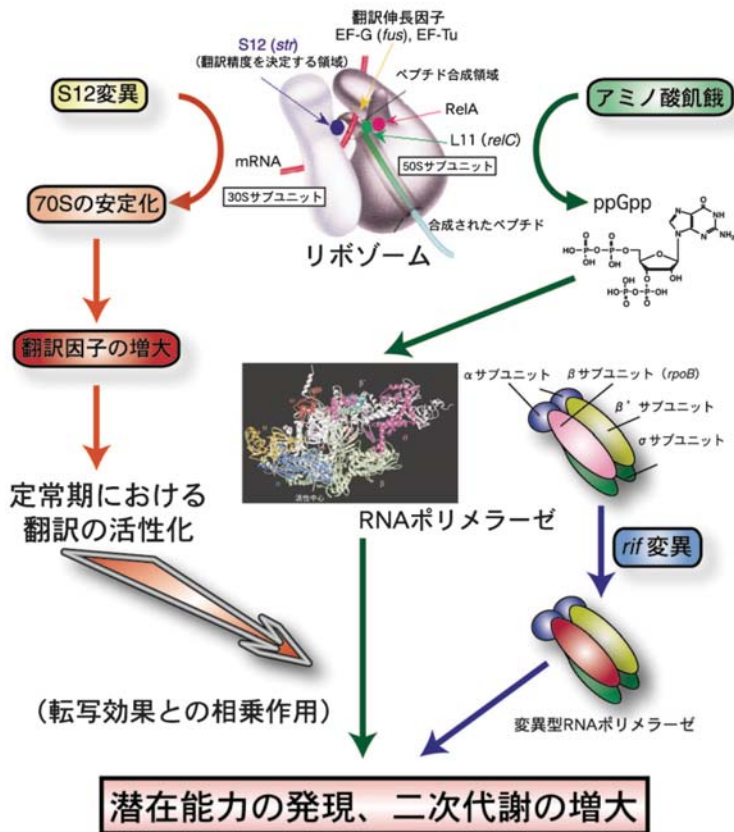


図 2 リボゾーム工学および転写工学の概要



図 3 各種薬剤耐性変異による抗生物質生産の活性化
フジジン酸耐性変異 (*fus*)、チオストレプトン耐性変異 (*tsp*) およびゲンタミシン耐性変異 (*gen*) の導入によりアクチノロージン生産が著しく活性化される。

マイシン耐性に特有なものではなく、これらの薬剤に共通に見られる現象である。これらの耐性変異の内、パロモマイシン耐性変異が S12 変異（ストレプトマイシン耐性とは異なるアミノ酸残基の変化）であることは判明しているが⁹⁾、その他は不明であり、その実体解明は今後の課題である。

3. 薬剤耐性選抜法による RNA ポリメラーゼの改変

転写酵素である RNA ポリメラーゼの改変も微生物機能の活性化に有効であることを、転写阻害剤であるリファンピシンの用いて明らかにした^{3,4)}。バクテリアの RNA ポリメラーゼは α , β , β' および σ の各サブユニットからなる多量体酵素であるが、得られたリファンピシン耐性変異株においては、 β サブユニットをコードする遺伝子 *rpoB* 上に種々の変異が見つかり、中でも 2 種類の変異、H437 Y 及び R440C がアクトキノロージン生産を著しく活性化することを明らかにした。さらに、*rpoB* 変異はリボゾーム変異と相乗作用を示すことが確認され（図 2）、このことから、種々の抗生物質耐性変異を逐次的に付与していくことによって、微生物機能を飛躍的に活性化できることが明らかとなった。

4. 微生物機能活性化のメカニズム

リボゾーム変異や RNA ポリメラーゼ変異がどのように微生物機能の活性化に繋がっているのかについて、これまでに分かっていることを簡単に記しておくこととする。① 微生物機能活性化に有効な S12 変異およびその他のリボゾーム変異を有する株では、生育後期においてもタンパク質合成活性が低下しない（図 4）、という特異な性質が明らかにされている（野生株では同時期にはタンパク質合成活性は急激に低下する）。抗生物質あるいは酵素などの生産は培養後期に見られることが多く、この時期にタンパク質合成能が保持されていることが、微生物機能活性化の主要因であることは間違いない（図 5）^{5,6)}。② 低レベルストレプトマイシン耐性変異（*rsmG* 変異）を有する放線菌変異株においては、S-アデノシルメチオニン（SAM）合成酵素遺伝子の発現が著しく上昇しており、それに伴って細胞内の SAM レベルが有意に高くなっている¹⁰⁾。SAM は抗生物質生産を誘導するシグナル物質であると考えられており、その細胞内レベルの上昇により抗生物質の過剰生産が起こる。③ 微生物機能の活性化能を有する変異型 RNA ポリメラーゼは、遺伝子の発現パターンを劇的に変化させることが観察されている（未発表）。したがって、目的遺伝子（例えば二次代謝遺伝子）を効率的に転写する変異型 RNA ポリメラーゼをスクリーニングしていることになる。微生物機能の活性化については以上のような知見が得られているが、リボゾーム変異及び RNA ポリメラーゼ変異による微生物機能活性化には数多くの因子が複雑に関係すると予想されることから、活性化の全容解明は今後の課題である。

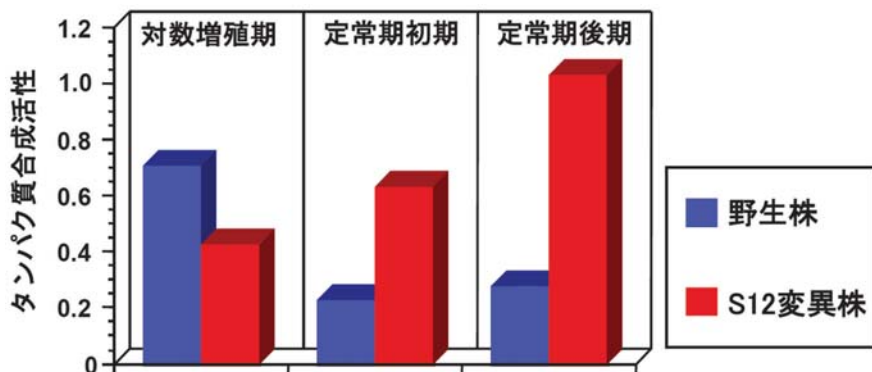


図 4 野生株および S12 株におけるタンパク質合成活性の経時変化
S12 変異株では定常期においても高いタンパク質合成活性が保持されている。

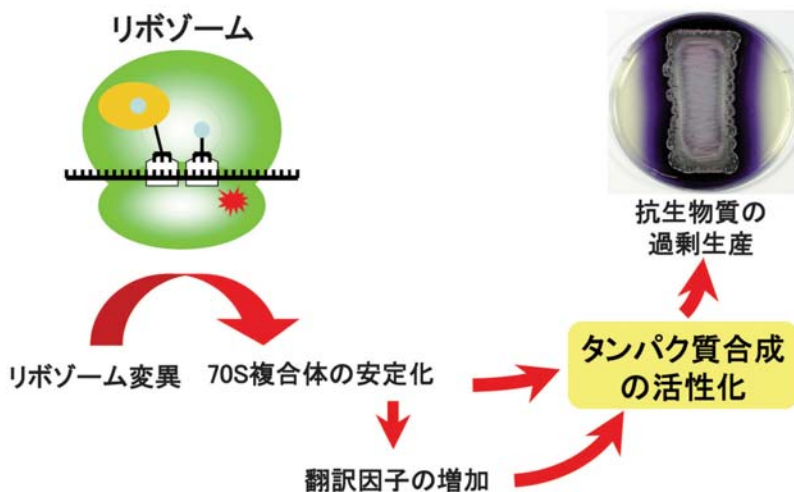


図 5 リボゾーム変異による抗生物質生産活性化のメカニズム

5. 薬剤耐性選抜法の活用例

5.1 新規生理活性物質探索への利用

近年、微生物由来の新規生理活性物質の発見は減少してきており、一部では「微生物の限界」といったことがささやかれているのも事実である。しかしながら、ここ 10 年間の間に蓄積されてきたゲノム情報から判断すると、新規有用物質

の探索という分野における微生物の高いポテンシャルは明らかである。

抗生物質を始めとし、多くの有用物質の生産を担う放線菌が工業上最も重要な微生物の一つであることは疑いの余地もない。2002～2003年に2種類の放線菌 (*S. coelicolor* A (3) 2 及び *Streptomyces avermitilis*) の全ゲノム配列が相次いで報告された^{11,12})。放線菌のゲノムサイズは8 Mb 超とバクテリアとしては異常に大きく、そこから読みとれる情報は本菌群の多彩な潜在能力を示すものであり、未知の物質生産の可能性を十分感じさせるものである。例えば、これらの菌には二次代謝産物(抗生物質)の生合成に関与していると考えられる遺伝子クラスターが *S. coelicolor* では22、*S. avermitilis* では30 クラスターと、予想以上に多く存在することが明らかとなっている。これらの二次代謝遺伝子クラスターの中には通常の培養条件下では発現していないものも少なからずあり、それらの効率的な発現により、新規有用化合物の発見も十分期待できると思われる。したがって、これら通常の条件では発現していない「潜在遺伝子」を活性化するのにわれわれが開発した薬剤耐性選抜法が有効であると予想された。

5.1.1 抗生物質の探索

保坂らは、土壌から分離された *Streptomyces* 属細菌の中から通常の培養条件下では抗菌物質を生産しない菌株を選択した¹³)。これらの放線菌から薬剤耐性選抜法により多数の変異株を取得したところ、新たに抗菌物質生産能を獲得した株が高頻度で出現することを見いだした。また、この潜在的な抗菌物質生産能の活性化には、RNA ポリメラーゼの改変およびリボソーム改変のいずれもが有効であることも明らかにした。さらには、これらの活性化株の一つからは、新規イオノフォア系抗生物質の単離及び構造決定に成功し、「ピペリダマイシン」と命名した(図6)。本物質は4分子のオルニチンを含む環状ペプチドであり、これまでに例のないユニークな骨格を有していた¹³)。以上の成果は、RNA ポリメラーゼの改変およびリボソーム改変を用いた本技術が、新たな抗生物質の発見に有用であることを証明し、画期的な成果として社会的に認められるに至っている。

5.1.2 新規なスクリーニング系の開発

上記の例は、実際の物質生産を指標にするスクリーニング系で薬剤耐性選抜法を活用したものであるが、この方法では簡便でハイスループットなアッセイ系が必要となり、適用範囲が限定されるという問題がある。そこで、遺伝子レベルで目的の微生物機能を検出し、さらにはそれらの発現の有無を迅速に判定できる技術の開発を試みた(未発表)。これらの技術を開発するにあたって我々がターゲットとしたのは、エリスロマイシンなどの抗生物質を始めとする有用物質の宝庫であるポリケタイド化合物である。ポリケタイドの生合成においては、ポリケタイド生合成酵素(PKS)が鍵酵素であるため、PKS 遺伝子をPCR法により検出す

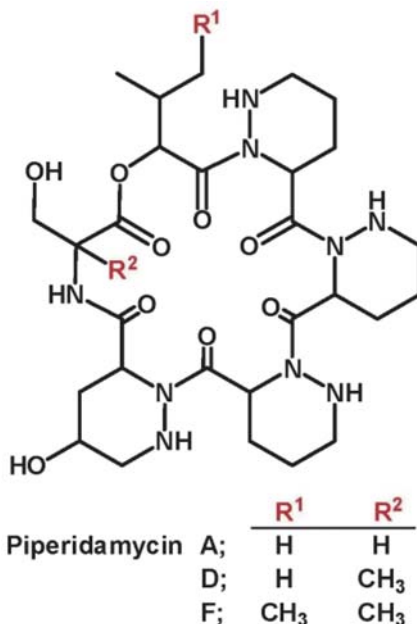


図 6 ピペリダマイシンの構造

ることとした。プライマーの配列を工夫することにより PKS 遺伝子の存在を高感度に検出できると共に、その増幅パターンから新規物質の生産を予測できるシステムの構築に成功した。さらには、RT-PCR 法（逆転写 PCR 法）を応用することにより、目的とする PKS 遺伝子の発現を高感度に検出できる技術確立した（図 7）。構築したシステムの有効性を検討するため、土壌より分離した放線菌を対象としたスクリーニングを行った。最初に PKS 遺伝子を有する菌株をスクリーニング、次にその増幅パターンから新規化合物生産の可能性の高い菌株を選抜した。これらの株から薬剤耐性選抜法により変異株を取得し、PKS 遺伝子発現の有無および強度を RT-PCR 法により判定した。PKS 遺伝子発現活性化の一例を図 8 に示した。この株では、リボゾームの改変（ストレプトマイシン耐性変異の導入）により、PKS 遺伝子の発現が顕著に活性化された。現在までに、新規ポリケチド化合物の生産が期待される株を多数取得しており、幾つかの化合物については単離・構造決定が進行中である。

5.2 微生物育種への利用

薬剤耐性選抜法の利用としては微生物育種への応用が最も直接的であり、野生

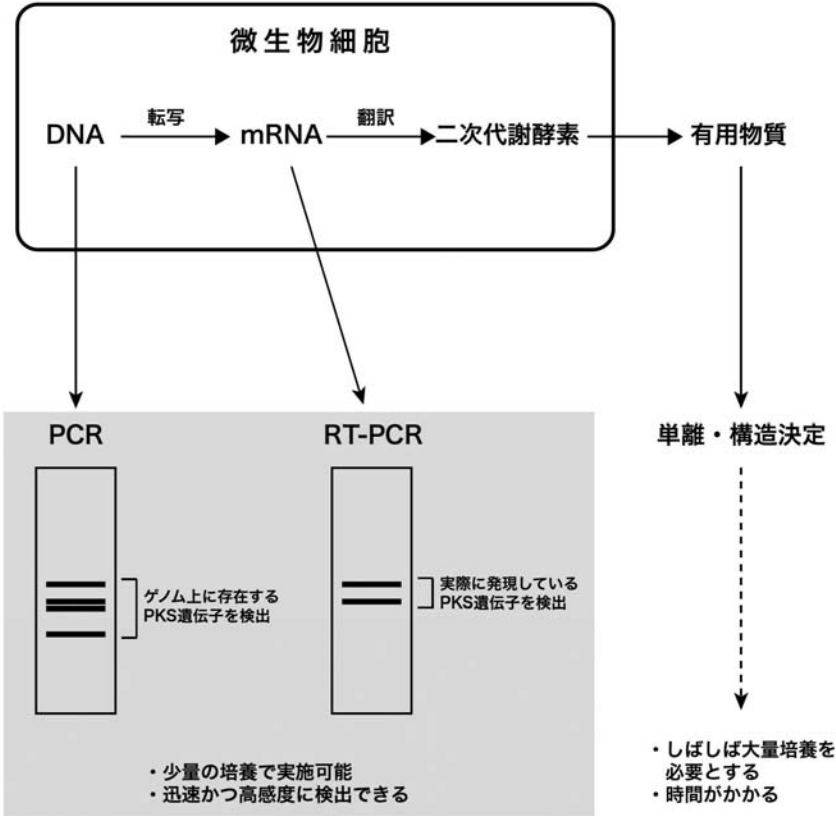


図 7 RT-PCR 法による新規物質スクリーニング系

株を対象とした初期育種から、高度に育種された工業株にまで広く適用可能である。初期育種の場合には、目的とする生理活性物質を薬理試験に供する、あるいは目的酵素の有用性をパイロット反応で検証するといった際に、それらを必要な量だけ供給するために行われる。したがって、いかに短期間で達成できるかが重要なファクターとなってくる。一方、工業株の育種においては、目的とする物質の生産量が重要なのは当然として、生育などが極端に低下しないことなど様々なファクターを加味しなければならず、何年にもわたる長丁場になることもまれではない。一方、本手法による育種の基本ストラテジーは以下の通りであり、手法が簡便で直接的であるため、迅速な育種が可能である。① 対象とする菌株から各種薬剤（リボソーム攻撃性の薬剤およびリファンピシン）に対する耐性株を取得する。② 適当なスクリーニングにより目的とする性質を有する変異株を選別す

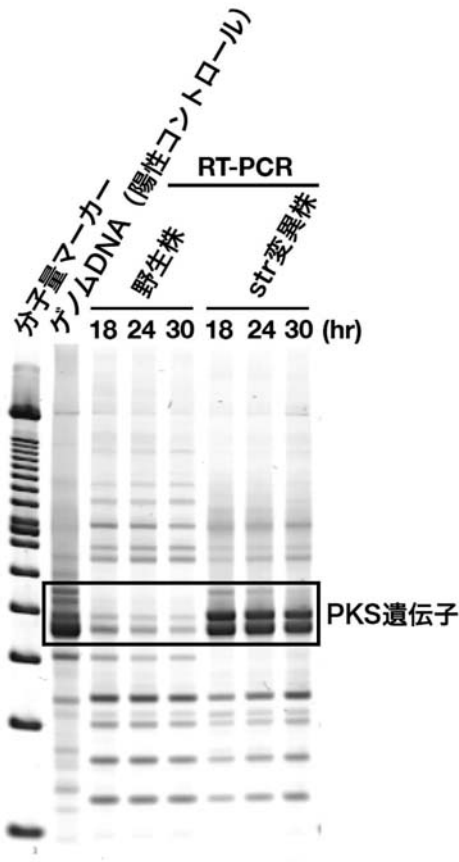


図 8 PKS 遺伝子の検出およびストレプトマイシン耐性 (*str*) 変異の導入による遺伝子発現の活性化

る。③ 必要に応じて異なる種類の薬剤耐性変異を逐次的に付与、目標とするレベルの育種を達成する。このステップにより効率的な微生物育種が可能となる。

王らは、8種類の薬剤耐性変異の逐次的導入（ストレプトマイシン耐性変異→ゲンタミシン耐性変異→リファンピシン耐性変異→パロモマイシン耐性変異→ジェネティシン耐性変異→フシジン酸耐性変異→チオストレプトン耐性変異→リンコマイシン耐性変異）により、*S. coelicolor* のアクチノロージン生産を 170 倍 (9 mg/l→1.6 g/l) に増強することに成功した¹⁴⁾。ここで使用された薬剤は、転写阻害剤であるリファンピシンを除いて全てリボソーム攻撃性の薬剤であり、この

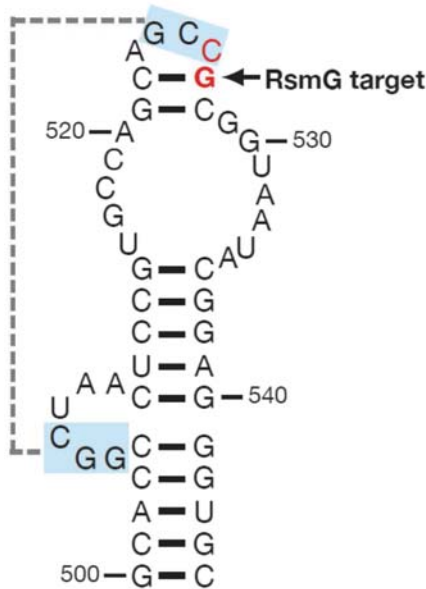


図 9 16S rRNA において高度に保存された 530 ループの構造および RsmG タンパク質の標的部

赤色で示した塩基はストレプトマイシンと直接結合することが示されている。破線で結んだ部分は塩基対を形成する。

育種に要した期間はわずか 8 ヶ月であった。最終的に得られた株は多少生育が低下していたものの孢子形成能も保持しており、実用に充分耐えられるものであることが確認できた。

一方、田中らは、低レベルストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* 変異) および高度ストレプトマイシン耐性変異 (S12 変異) の導入によるアクチノマイシン生産菌の育種について報告した¹⁵⁾。彼らは、放線菌 *Streptomyces antibioticus* にこれら 2 種類の変異を逐次的に付与することにより、野生株にくらべて 10 倍以上のアクチノマイシン生産を達成している。

上記の例は、野生株を対象にした初期育種の好例であるが、本手法を実用菌株に応用した例として、動物用抗生物質「サリノマイシン」の工業生産株 (*Streptomyces albus*) の育種について以下に述べる。為広らは、現在使用されている工業株に対して、ストレプトマイシン耐性およびゲンタミシン耐性変異、さらにはリファンピシン耐性変異を逐次的に導入することにより、そのサリノマイシン生産性を倍増 (10 g/L から 20 g/L に増加) することに成功した¹⁶⁾。野生株においてそ

の物質生産力を2倍に増強することはたやすいが、高度に育種された工業株での2倍アップは大変に困難であり、それを達成した意義は極めて大きい上、育種操作に要した期間はわずか3ヶ月であった。

本手法は抗生物質だけではなく、酵素生産にも適用可能であり、これまでに、枯草菌のアミラーゼおよびプロテアーゼの生産性向上にも有効であることが確認された¹⁷⁾。さらに、最近、食総研の越智・舟根らのグループは、抗う蝕活性を有するオリゴ糖であるサイクロデキストランの生産性向上を目的とし、本オリゴ糖合成酵素生産菌（工業株を使用）のさらなる育種を試みており、非常に良好な結果を得ている（未発表）。

6. 未知の薬剤耐性変異の実体解明とその意義

これまでに述べたように、薬剤耐性選抜法に使用するリボゾーム攻撃性の薬剤の種類は多岐にわたっている。また、得られる耐性菌も、高度耐性から低レベル耐性まで様々である。高度薬剤耐性に関する変異の多くは、これまでの研究により明らかにされている。一方、低レベルの薬剤耐性変異の実体については不明のケースも多い。我々は、これらの変異の多くはこれまでに知られていない新規なものであると予想しており、その実体（変異遺伝子）解明は、実用面のみならず学問的にも非常に重要であると考えている。しかしながら、これらの低レベル耐性変異は、選択培地上での判別が難しく、このことが古典的な遺伝解析（既知の遺伝マーカーとの連鎖解析）による変異同定を困難にしている主因である。近年、ゲノム解析技術の進歩は目を見張るばかりであり、「100ドルでヒトゲノムを解析」等の謳い文句も近々達成されるであろう。これらの技術革新は、微生物のゲノム解析においても非常に有効なツールを提供しており、既に全ゲノム情報が明らかにされている株であれば、そこから得られた変異株の変異点（遺伝子）を同定することは比較的安価（～50万円）かつ短期間（～1ヶ月）で出来るようになってきている。我々は、これまでに、未知の変異を有する薬剤耐性株の解析を試み、いくつかのケースでは変異遺伝子を決定することが出来た。「残念ながら現時点において完璧な方法は存在せず、全ゲノム情報を用いた解析によっても変異が見つからないリスクはかなり（～50%）ある」以下において、低レベルストレプトマイシン耐性変異の解析について述べる。

6.1 低レベルストレプトマイシン耐性変異の実体解明

薬剤耐性選抜法において、ストレプトマイシンは代表的な使用薬剤であるが、微生物機能の活性化に有効な高度ストレプトマイシン耐性（S12変異）の出現頻度は非常に低く、 $10^{-10} \sim 10^{-11}$ である（栄養要求変異などの出現頻度は $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 程度である）。一方、低レベルストレプトマイシン耐性は、 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ の高い頻度で得られ、この変異も放線菌の抗生物質生産の活性化に有効なことは早くか

ら知られていた (図 1)⁸⁾。放線菌 *S. coelicolor* を用いたその後の解析により、本変異株の性質について以下のことが明らかにされた¹⁰⁾。① SAM 合成酵素遺伝子 (*metK* 遺伝子) の発現が野生株に比較して著しく上昇している。② それに伴い細胞内の SAM 濃度も上昇しており、このことが抗生物質過剰生産の主な要因である。本変異株は、このように非常に興味深い形質を示すが、古典的な遺伝学ではその変異の同定には至らなかった。そこで我々は、新しい変異探索の方法である CGS (Comparative Genome Sequencing) の利用を試みた。詳細については割愛するが、本解析手法は DNA マイクロアレイの変法である¹⁸⁾。この方法により、*S. coelicolor* から得られた低レベルストレプトマイシン耐性変異株を解析したところ、後に *rsmG* と命名される遺伝子に変異が検出された¹⁹⁾。我々が分離・保存していた、低レベルストレプトマイシン耐性変異/抗生物質過剰生産の形質を示す *S. coelicolor* の変異株 (7 株) について調べたところ、全ての株で *rsmG* 変異が確認され、本遺伝子の機能欠損により、上記の形質を獲得することが予想された。このことは、実際に *rsmG* 欠失株を作製することにより直接証明した¹⁹⁾。

次に、*rsmG* 遺伝子の機能について解明を試みた²⁰⁾。本遺伝子によってコードされるタンパク質は、そのアミノ酸配列から、一種のメチル化酵素であると考えられた。上述の様に、本遺伝子の欠損はリボソーム攻撃性の薬剤であるストレプトマイシンに対する耐性を付与することから、RsmG タンパク質の基質は何かのリボソーム構成因子であると予想された。

精製 RsmG タンパク質およびリボソームを用いた生化学的解析の結果、本メチル化酵素の基質は、リボソームの 30S サブユニットの構成因子である 16S rRNA であることを見いだした。最終的に、本酵素が 16S rRNA の 627 番目のグアノシン (G627) を 7-メチルグアノシンへと変換する酵素であることを解明した (図 9)^{20,21)}。これらの結果から、本遺伝子を 16S rRNA 修飾酵素の命名則にしたがって *rsmG* (rRNA small subunit methyltransferase G) と命名した。G627 は全てのバクテリアの 16S rRNA において保存されており、ストレプトマイシンと直接結合するヌクレオチドの一つであることが明らかにされている²²⁾。*rsmG* 変異によりそのメチル化が消失することにより、ストレプトマイシンに対するリボソームの親和性が低下、結果として本薬剤に対する耐性が付与されるものと考えられる。なお、*rsmG* 変異による *metK* 遺伝子の発現上昇のメカニズムについては現在解析中である。

6.2 *rsmG* 変異解明の社会的意義

ストレプトマイシンは、古くは結核治療の臨床現場で繁用された。その結果、多くの結核菌が本薬剤に対する耐性を獲得し、現在では第一選択肢の治療薬では無くなった。しかしながら、依然として重要な薬剤の一つであることは間違いない。ストレプトマイシンは 1944 年に発見されているが²³⁾、その 2 年後には耐性菌

の報告がなされている²⁴。また、ストレプトマイシン耐性変異には高度耐性および低レベル耐性の2種類が存在することが知られていた。高度耐性がS12変異の結果であることは1960年代には明らかにされている²⁵。さらに、結核菌では、16S rRNA遺伝子(*rrs*)の変異によっても高度ストレプトマイシン耐性を獲得することが、1990年代に解明されている²⁶。一方、低レベル耐性の実体に関しては60年間不明のままであった。実際に臨床から分離されたストレプトマイシン耐性結核菌を解析しても、S12変異あるいは*rrs*変異を持たない株が数多く(～50%)見つかっている²⁷。我々は、これら変異未知の臨床分離結核菌には*rsmG*変異株が少なからず含まれているのではないかと予想し、薬剤耐性結核菌のエキスパートである北海道大学の鈴木定彦教授と共同研究を開始した。その結果、予想通り多くの臨床分離耐性株において*rsmG*変異を見いだすことに成功した²⁰。結果として、60年来のミステリーに終止符を打つことになり、薬剤耐性結核菌の診断および治療にも貢献するという、社会的に非常にインパクトのある成果となった。

以上のように、未知の薬剤耐性変異の同定は、微生物機能活性化のメカニズム解明の点から重要であるのみならず、時として予想外の波及効果をもたらすこともあり、着実に進展させる必要がある。

7. おわりに

薬剤耐性選抜法は、タンパク質合成装置であるリボゾームあるいは遺伝子の転写を司る酵素であるRNAポリメラーゼを変異によって望ましい形質に改変し、それを微生物機能の活性化に利用する技術である。有効な変異が得られる可能性の高い薬剤については本稿で述べたとおりである。本手法の特徴は、なんといってもその簡便さにある。即ち、対象とするバクテリアから薬剤耐性株を分離し、目的とする性質を示す株をスクリーニングすればよいのである。

もう一つの特徴は、本手法の実施にはゲノム情報などは必要なく、土壌から分離した菌株にも直ちに適用可能な点である。現在、ゲノム情報を活用した微生物育種が盛んに行われているが、その中では遺伝子組み換え技術が用いられることも多い。カルタヘナ法などの法規制を考えると、それらの育種株をオープンな環境で利用することには高いハードルが存在する。本手法は、組換え生物を作製するわけではないのでこの点では非常に有利であると言える。今後、本手法がゲノム育種を補完する重要な育種法として、更に発展・利用されることを願う。

(食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能解析ユニット 岡本 晋)

引用文献

- 1) Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S., and Ochi, K. (1996) Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal pro-

- tein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **178** : 7276–7284.
- 2) Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T., Hosaka, T., Xu, J., and Kurosawa, K. (2004) Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv Appl Microbiol* **56** : 155–184.
 - 3) Hu, H., and Ochi, K. (2001) Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol* **67** : 1885–1892.
 - 4) Hu, H., Zhang, Q., and Ochi, K. (2002) Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding RNA polymerase β -subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **184** : 3984–3991.
 - 5) Okamoto-Hosoya, Y., Hosaka, T., and Ochi, K. (2003) An aberrant protein synthesis activity linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* **149** : 3299–3309.
 - 6) Hosaka, T., Xu, J., and Ochi, K. (2006) Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant. *Mol Microbiol* **61** : 883–897.
 - 7) Hosoya, Y., Okamoto, S., Muramatsu, H., and Ochi, K. (1998) Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **42** : 2041–2047.
 - 8) Hesketh, A., and Ochi, K. (1997) A novel method for improving *Streptomyces coelicolor* A3 (2) for production of actinorhodin by introduction of *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations conferring resistance to streptomycin. *J Antibiot* **50** : 532–535.
 - 9) Okamoto-Hosoya, Y., Sato, T., and Ochi, K. (2000) Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Antibiot* **53** : 1424–1427.
 - 10) Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y., and Ochi, K. (2003) Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **185** : 601–609.
 - 11) Bentley, S.D. *et al.* (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417** : 141–147.
 - 12) Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sasaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003) Complete genome sequence

- and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21** : 526–531.
- 13) Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A., and Ochi, K. (2009) Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol* **27** : 462–464.
 - 14) Wang, G., Hosaka, T., and Ochi, K. (2008) Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl Environ Microbiol* **74** : 2834–2840.
 - 15) Tanaka, Y., Komatsu, M., Okamoto, S., Tokuyama, S., Kaji, A., Ikeda, H., and Ochi, K. (2009) Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl Environ Microbiol* **75** : 4919–4922.
 - 16) Tamehiro, N., Hosaka, T., Xu, J., Hu, H., Otake, N., and Ochi, K. (2003) Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. *Appl Environ Microbiol* **69** : 6412–6417.
 - 17) Kurosawa, K., Hosaka, T., Tamehiro, N., Inaoka, T., and Ochi, K. (2006) Improvement of α -amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. *Appl Environ Microbiol* **72** : 71–77.
 - 18) Albert, T.J., Dailidienė, D., Dailidė, G., Norton, J.E., Kalia, A., Richmond, T.A., Molla, M., Singh, J., Green, R.D., and Berg, D.E. (2005) Mutation discovery in bacterial genomes : metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Nat Methods* **2** : 951–953.
 - 19) Nishimura, K., Hosaka, T., Tokuyama, S., Okamoto, S., and Ochi, K. (2007) Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J Bacteriol* **189** : 3876–3883.
 - 20) Okamoto, S., Tamaru, A., Nakajima, C., Nishimura, K., Tanaka, Y., Tokuyama, S., Suzuki, Y., and Ochi, K. (2007) Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol Microbiol* **63** : 1096–1106.
 - 21) Nishimura, K., Johansen, S.K., Inaoka, T., Hosaka, T., Tokuyama, S., Tahara, Y., Okamoto, S., Kawamura, F., Douthwaite, S., and Ochi, K. (2007) Identification of the RsmG methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis* *rsmG* mutants. *J Bacteriol* **189** : 6068–6073.

- 22) Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000) Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interaction with antibiotics. *Nature* **407** : 340-348.
- 23) Schatz, A., and Waksman, S.A. (1944) Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Bio Med* **57** : 244-248.
- 24) Klein, M., and Kimmelman, L.J. (1946) The role of spontaneous variants in the acquisition of streptomycin resistance by the shigellae. *J Bacteriol* **52** : 471-479.
- 25) Ozaki, M., Mizushima, S., and Nomura, M. (1969) Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *E. coli*. *Nature* **222** : 333-339.
- 26) Finken, M., Kirschner, P., Meier, A., Wrede, E., and Böttger, E.C. (1993) Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : alterations of the ribosomal protein S12 and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* **9** : 1239-1246.
- 27) Gillespie, S.H. (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* : clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* **46** : 267-274.