

Ⅲ 枯草菌の物質生産能を向上させる手法

1. はじめに

枯草菌 (*Bacillus subtilis*) は自然界に普遍的に存在するグラム陽性の土壌細菌である。その特徴は、内生孢子を形成することによって様々なストレスに対して強い抵抗性を獲得し、極めて厳しい環境下でも生き延びることができることにある。また、外部 DNA を取り込む自然形質転換能を有し、古くから分子遺伝学研究が盛んに行なわれてきた。1997年には全ゲノム配列が決定され、その後のポストゲノム解析でもグラム陽性細菌のモデル生物として微生物研究の牽引役となってきた。これらモデル生物としての学術的重要性に加え、枯草菌の産業微生物としての重要性も忘れてはならない。一般的に枯草菌は人間に対する病原性が無く、“安全な”菌として認知されており、産業への活用が容易な菌でもある。日本人には馴染みの深い納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) も分類上、枯草菌に分類されている。また、枯草菌は菌体外に種々の分解酵素や抗菌物質を生産することでも知られ、近縁菌がプロテアーゼやアミラーゼなどの有用酵素の生産菌として利用されているほか、枯草菌孢子を有効成分とする微生物農薬としても活用されている。このように枯草菌は基礎及び応用の両面において魅力的な研究材料であると言える。本稿では、枯草菌の抗生物質生産研究から得られた知見とともに、枯草菌の物質生産能力を向上させる手法について紹介する。

2. 枯草菌の抗生物質生産について

枯草菌は様々な抗生物質を生産することが知られている。これまでに様々な株から抗生物質が単離、構造決定されており、報告された抗生物質は既に 20 種類以上に上る¹⁾。しかしながら、筆者が枯草菌の抗生物質生産の制御機構について研究を始めた頃、枯草菌のポストゲノム解析が着々と進行していたにもかかわらず、枯草菌の抗生物質生産に関する研究はほとんど行なわれていなかった。学会などでは「なぜ枯草菌で抗生物質の研究をするのか」とよく質問されたものである。抗生物質といえば、天然抗菌薬の約 7 割を生産する放線菌に焦点を当てがちであるが、抗生物質の用途は人用医薬品に限ったものではない。前述のように、枯草菌孢子自体は既に微生物農薬として利用されていたが、その効果は病原菌を直接攻撃するものではなく、植物表面上で枯草菌が優先的に増殖することによって病原菌の定着を阻止するというものであった。そこで筆者は抗生物質高生産株を利用すれば更なる防除効果が期待できると考え、枯草菌が生産するジペプチド抗生物質バシリシン (図 1) の研究を開始したのである。バシリシン (図 1) は枯草菌ゲノム解析に用いられた実験標準株 168 が生産する主要な抗生物質であるが、ゲノム配列決定後もバシリシンの生合成遺伝子は同定されていなかった。そ

ここで、筆者は遺伝学的解析により生合成遺伝子を同定し、その転写制御機構を解析してきた^{2),3)}。近年になって、このバシリシンが梨やリンゴなどのバラ科植物に発生する火傷病の原因菌 *Erwinia amylovora* の生育を阻害することが報告され⁴⁾、枯草菌が生産する抗生物質にも徐々に関心が高まりつつある。火傷病は国内では報告例はないものの、一度発生すると防除が困難であり深刻な被害をもたらす伝染病害である。抗生物質ストレプトマイシンは火傷病防除に効果的な薬剤であるが耐性菌の出現が問題となっており、他の防除剤の開発が強く望まれている。火傷病防除におけるバシリシンの有効性は未だ不明であるが、様々な薬剤に抵抗性を有する孢子は他の薬剤との混合・併用も可能であり、バシリシン高生産株を利用した新たな薬剤の開発に繋がる可能性もある。また、火傷病防除剤の目的以外にも、バシリシンの生合成に関与するアミノ酸リガーゼ (図1) がジペプチド合成に活用されている^{5),6)}。このように、枯草菌由来の抗生物質だけでなく、それらの生合成に関与する酵素なども注目されるようになってきている。

3. リファンピシン耐性変異による物質生産能の向上

リファンピシンは細菌のRNAポリメラーゼに作用して転写開始反応を阻害する抗生物質であるが、低い頻度 (約 10^{-8} 程度) でリファンピシン耐性変異株が出現する。リファンピシン耐性変異のほとんどは、RNAポリメラーゼの β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子内の限られた領域内に見出される^{7),8)}。これらリファンピシン耐性変異によりRNAポリメラーゼの機能変化が生じ、有用遺伝子の発現を変化させることができる。このリファンピシン耐性を指標としたRNAポリメラーゼの機能改変は様々な微生物の物質生産能を向上させることが確認されている (表1)。この手法の特徴は、リファンピシン耐性変異という限られた変異で効果的に物質生産能を向上させることができる点にある。但し、リファンピシン耐性変異の効果は生物種や目的遺伝子によっても異なるため注意が必要である。

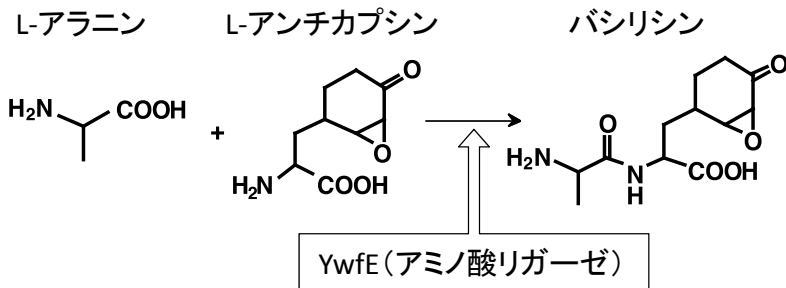


図1 バシリシン生合成の最終段階

3.1 枯草菌の潜在的二次代謝経路ネオトレハロサジアミン合成の活性化

枯草菌の実験標準株である 168 株において、 β サブユニットの 487 番目のセリンがロイシンに置換されたリファンピシン耐性変異株はアミノ糖抗生物質ネオトレハロサジアミン (3,3'-ジアミノ- α, β -トレハロース) を過剰に生産する (図 2)⁹⁾。この抗生物質は *Bacillus pumilus*¹⁷⁾ や *Bacillus circulans*¹⁸⁾ が生産することが

表 1 リファンピシン耐性変異により物質生産が向上した例

生物種	活性化された物質生産能	<i>rpoB</i> 変異	参考文献
<i>B. subtilis</i>	ネオトレハロサジアミン	S487L	9
<i>B. subtilis (natto)</i>	ネオトレハロサジアミン プロテアーゼ セルラーゼ	S487L	10
<i>B. licheniformis</i>	α -アミラーゼ	Q469R A478D A478V H482R R485H S487L	11
<i>B. clausii</i>	プロテアーゼ	A478V	11
<i>S. coelicolor</i>	アクチノロージン	H437Y	12
<i>S. lividans</i>	アクチノロージン	S433L S433P	13
<i>S. erythrae</i>	エリスロマイシン	S444F	14
<i>S. incarnatus</i>	シネフンジン	D447G	15
<i>S. mauvecolor</i>	ピペリダマイシン	H437L	16

下線は本稿に記載の抗生物質

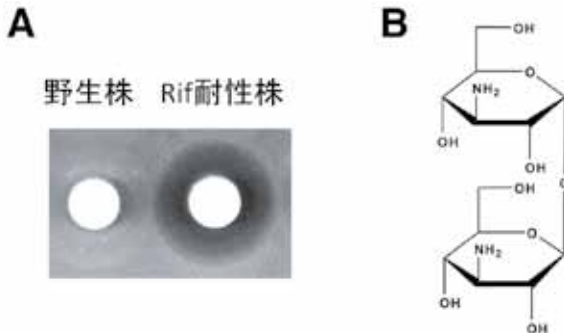


図 2 ネオトレハロサジアミン

A. 枯草菌 168 株 (野生株) 及びリファンピシン耐性変異株 (Rif 耐性株) の培養上清における抗黄色ブドウ球菌活性を示す。B. ネオトレハロサジアミンの構造

報告されていたが、枯草菌 168 株は通常培養条件下では、この抗生物質を生産することはない。即ち、リファンピシン耐性変異によって生じた RNA ポリメラーゼの機能変化が潜在的な抗生物質生産経路であるネオトレハロサジアミン合成経路を活性化したのである。このリファンピシン耐性変異によるネオトレハロサジアミン合成の活性化については納豆菌においても確認されている¹⁰⁾。

3.2 ネオトレハロサジアミン合成経路の活性化メカニズム

ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子 (*ntdABC*) の発現は、最終産物であるネオトレハロサジアミン自身が転写アクチベーター NtdR に作用して生合成遺伝子の発現を誘導するオートインダクション機構によって正に制御されている⁹⁾ (図3)。また、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子下流に存在するグルコーストランスポーター *GlcP* がグルコースの取り込みに連動してネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の発現を抑制していることが判明している¹⁹⁾。この *GlcP* をコードする遺伝子の発現はネオトレハロサジアミン生合成遺伝子プロモーターに依存しており、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子下流の転写終結シグナルをリードスルーすることによって発現している (図3)。これらの転写制御機構を踏まえ、リファンピシン耐性変異によるネオトレハロサジアミン生合成経路の活性化メカニズムとして、①リファンピシン耐性変異が RNA ポリメラーゼのプロ

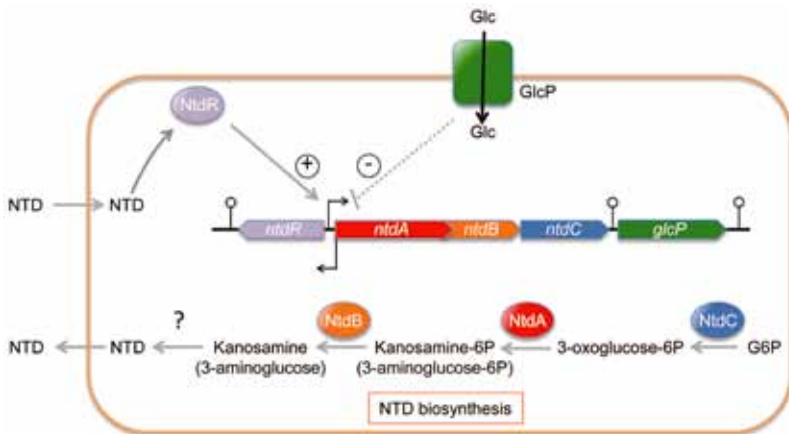


図3 ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の転写制御機構

NtdA, NtdB, NtdC はネオトレハロサジアミン生合成に関わる各酵素, NtdR はネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の転写因子, *GlcP* はグルコーストランスポーター, NTD はネオトレハロサジアミン, *Glc* はグルコース, ステム・ループ構造は転写終結シグナルを表している。+ 及び - はネオトレハロサジアミン生合成遺伝子プロモーターにおける転写効果を示している。点線はメカニズムが判明していない制御機構を表す。

モーター認識能を増大させ、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子プロモーターを含む複数のプロモーター活性を増大させていること⁹⁾、②ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子下流の転写終結シグナルでの転写終結効率を向上させることにより、ネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の負の転写制御に関与するGlcPの発現を低下させていること¹⁹⁾、③ネオトレハロサジアミンによるオートインダクション機構によりネオトレハロサジアミンの過剰生産を引き起こすこと⁹⁾、などが挙げられる。

4. ストレプトマイシン耐性変異による物質生産能の向上

ストレプトマイシンは細菌のリボソームに作用して翻訳を阻害する抗生物質である。ストレプトマイシン耐性変異は、この抗生物質の発見とほぼ同時期に見出されており、耐性レベルの違いにより高レベル耐性（最小発育阻止濃度の10倍以上）及び低レベル耐性（最小発育阻止濃度の数倍程度）の2種類が存在することが知られていた。1969年には高レベルストレプトマイシン耐性変異はリボソームタンパク質S12の突然変異により起こることが明らかにされたが²⁰⁾、低レベルストレプトマイシン耐性変異は、近年まで同定されていなかった。越智らは、高レベルストレプトマイシン耐性変異であるリボソームタンパク質S12の変異が放線菌の抗生物質生産を活性化することを発見し、新たな微生物育種法として「リボソーム工学」を提唱した²¹⁾。これを機に、様々なリボソーム変異と抗生物質生産との相関性について検討され、未同定であった低レベルストレプトマイシン耐性変異もリボソームを構成する16S rRNAのメチル化酵素RsmG（rRNA small subunit methyltransferase G）の変異であることが判明した^{22), 23)}。この変異では、16S rRNAのストレプトマイシン結合部位でのメチル化が消失することによりストレプトマイシンとの親和性が低下するものと考えられている。S12及びRsmG変異は、いずれも放線菌の抗生物質生産の活性化に有効であることが明らかにされている^{21), 24)}。

4.1 枯草菌のバシリシン生産における効果

ストレプトマイシン耐性変異による枯草菌の物質生産における効果については、リボソームタンパク質S12変異の一部で僅かに認められたものの²⁵⁾、芳しい成果は得られていなかった。実際、枯草菌の抗生物質生産能が向上した低レベルストレプトマイシン耐性変異株には、いずれの変異も生じていなかったのである。そこで、枯草菌において抗生物質生産能が向上した低レベルストレプトマイシン耐性変異株を用いてDNAマイクロアレイを利用したCGS（Comparative Genome Sequencing）法により変異を同定することとなった。予期していなかったことに、新たに同定された変異はS-アデノシルホモシステイン（SAH）／メチルチオアデノシン（MTA）ヌクレオシダーゼをコードする*mtmA* 遺伝子

における 11 bp の欠失変異であることが判明した²⁶⁾。この酵素は S-アデノシルメチオニン (SAM) のリサイクル経路の酵素の一つであり (図 4), 同定した *mthA* 変異株では細胞内 SAM レベルが上昇し, バシリシン生合成遺伝子及びネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の発現が増大していた。SAM 合成酵素遺伝子 *metK* を枯草菌内で過剰発現させても同様な効果が認められることから, 細胞内の SAM がこれら抗生物質生産の活性化に寄与していると思われる。放線菌においては SAM 合成酵素遺伝子 *metK* の過剰発現だけでなく, 培地への SAM 添加によっても抗生物質生産を誘導することが報告されている²⁷⁾。しかしながら, 枯草菌においては SAM 添加による抗生物質生産の活性化は観察できなかった。これは SAM の取り込み能の差によるのかもしれない。なお, 同定した *mthA* 変異は枯草菌 *rsmG* 変異よりも低いストレプトマイシン耐性を付与するが, ストレプトマイシン耐性に至るメカニズムは不明である。

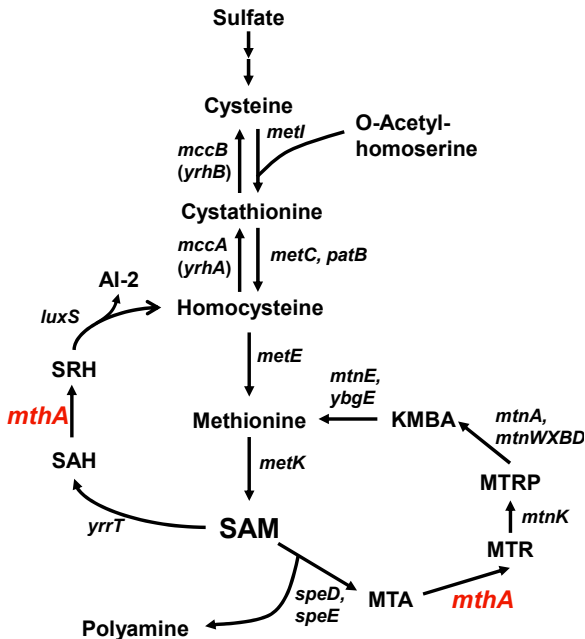


図 4 枯草菌の SAM リサイクリング経路

イタリック文字は各反応に関わる酵素をコードする遺伝子名を示している。SAM: S-アデノシルメチオニン, SAH: S-アデノシルホモシステイン, SRH: リボシルホモシステイン, MTA: メチルチオアデノシン, MTR: メチルチオリボース, MTRP: メチルチオリボース 1-リン酸, KMBA: α -ケト- γ -メチル-チオブチル酸, AI-2 はオートインデューサー 2 を示す。

5. 希土類元素スカンジウムの効果

希土類元素はスカンジウム及びイットリウムの2元素とランタンからルテチウムまでの15元素を合わせた17元素の総称である。これら元素は優れた物理化学的特性を持ち、微量で物質の性質を大きく変えることができることから、「産業のビタミン」と称される。地球上での希土類元素の存在量は決して少ないわけではなく、環境中で生物がこれら元素の影響を受けていても些かも不思議ではない。しかしながら、生物における希土類元素の効果については研究が進んでおらず、未だ不明な部分が多いのが実情である。河合らは希土類元素が微生物に与える影響について調査し、スカンジウムが放線菌の抗生物質生産能を向上させることを報告している²⁸⁾。ここでは枯草菌における希土類元素の効果について紹介する。

5.1 スカンジウムの添加効果

希土類元素は弱い抗菌活性を有している。特にスカンジウムは、枯草菌に対して希土類元素の中では最も強い抗菌活性を示し、50 $\mu\text{g/mL}$ (193 μM) 以上の濃度では生育が阻害される。しかしながら、培地に非致死濃度のスカンジウムを添加することによりアミラーゼやプロテアーゼ、抗生物質の生産能が向上することがわかった(図5)²⁹⁾。スカンジウムの添加効果は終濃度10~20 $\mu\text{g/mL}$ (38.5~77 μM) で最大であり、それ以上の濃度では生育阻害効果が大きく、これらの生産量は低下する。放線菌では他の希土類元素の添加でも抗生物質生産を活性

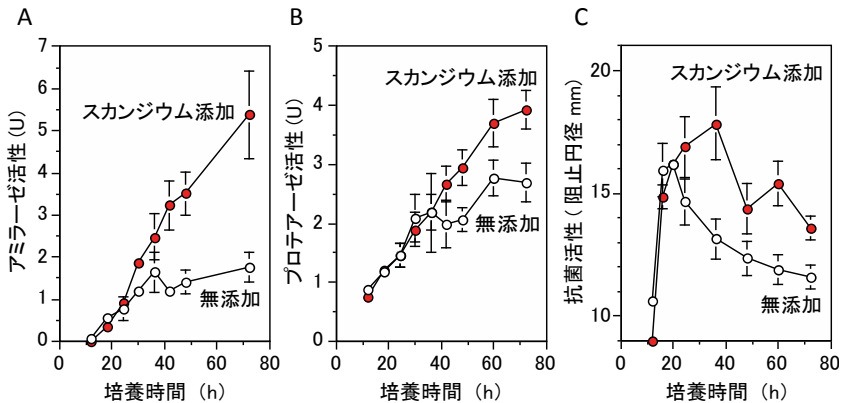


図5 枯草菌の物質生産におけるスカンジウムの添加効果

スカンジウムを10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した培地と無添加の培地で枯草菌を培養し、培養上清におけるアミラーゼ活性(A)及びプロテアーゼ活性(B)、抗菌活性(C)を比較した。赤丸がスカンジウム添加、白丸が無添加時の活性を示す。

化することが報告されているが³⁰⁾、枯草菌においては他の希土類元素に顕著な効果は認められない(図6)。通常、アミラーゼ遺伝子やバシリシン遺伝子の発現量は定常期初期に誘導され、定常期後期(培養開始24時間以降)には低下するが、スカンジウム存在下では、これら遺伝子の発現がより持続しており、物質生産の向上に繋がっていると考えられる。スカンジウムは他の希土類元素よりも、むしろ第1遷移金属元素とよく似た性質を示すことが知られており、枯草菌における効果はスカンジウム特有の現象であるかもしれない。

スカンジウムは高価であるため、研究室で使用される微生物用培地に添加することはほとんどない。近年、スカンジウムは照明や機能性素材などの分野で用途が拡大し、生産量も増えたことから価格は以前よりも下落している。また最近になって、スカンジウムを回収する技術も開発されており、価格がさらに下落することも予想される。今後、スカンジウムを多く含む土壌などから分離した微生物を研究室で培養する際には、スカンジウムの効果を検討する必要があるだろう。

5.2 スカンジウム耐性変異の同定

前述したように、スカンジウムは希土類元素の中では最も強い抗菌活性を有しており、その耐性変異株を取得することが可能である。筆者は、枯草菌のスカンジウム耐性変異株を取得し、CGS法により変異を同定することに成功した³¹⁾。この耐性変異はウンデカプレニル2リン酸(UPP)合成酵素に1アミノ酸置換

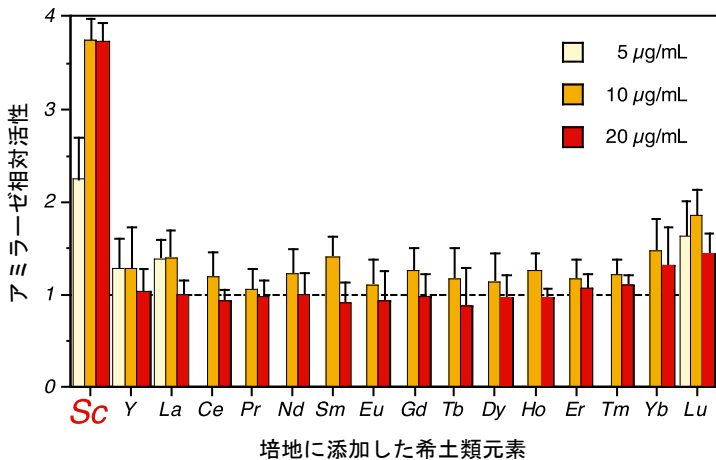


図6 枯草菌のアミラーゼ生産における希土類元素の添加効果

希土類元素を各濃度で添加した培地で枯草菌を48時間培養し、培養上清におけるアミラーゼ活性を比較した。無添加の時のアミラーゼ活性を1として各希土類元素の効果をアミラーゼ相対活性で示している。5 µg/mLの実験はScおよびY, La, Luのみ行なった。

をもたらす変異であった。UPPの脱リン酸化反応で生じるウンデカプレニルリン酸は細胞壁合成の際にグリコシル基を輸送する担体として働く必須分子である³²⁾。細胞壁合成阻害剤であるバシトラシンはUPPに結合して、その脱リン酸化反応を阻害する抗生物質であるが^{33),34)}、この変異株はバシトラシンに対しても耐性を示す³¹⁾。また、UPP合成酵素をコードする*uppS*遺伝子を強力なプロモーターにより過剰に発現させると、スカンジウムやバシトラシンに対して感受性を示すことから、UPPの蓄積がスカンジウム及びバシトラシンに対する感受性を決定する因子となっていると推察される。高橋らは細菌細胞表面のリン酸基に希土類元素が吸着することを報告している³⁵⁾。UPPは細胞膜に局在しており、3価陽イオンであるスカンジウムが細胞表面にあるUPPのリン酸基と結合し、細胞壁合成を阻害している可能性がある。また、スカンジウムが細胞内に取り込まれているかどうかは未だ不明であり、今後の研究で明らかにする必要がある。もし、細胞内に取り込まれているのであれば、スカンジウムがDNAなどに直接作用する可能性もある。

5.3 スカンジウム耐性変異によるアミラーゼ生産の向上

前述したスカンジウム耐性変異株 (*uppS86*) はアミラーゼの生産量が約2倍に増大していた (図7)。一方、プロテアーゼや抗生物質の生産には影響は見られなかった。この変異株でのアミラーゼ遺伝子の発現量は野生株と同程度であ

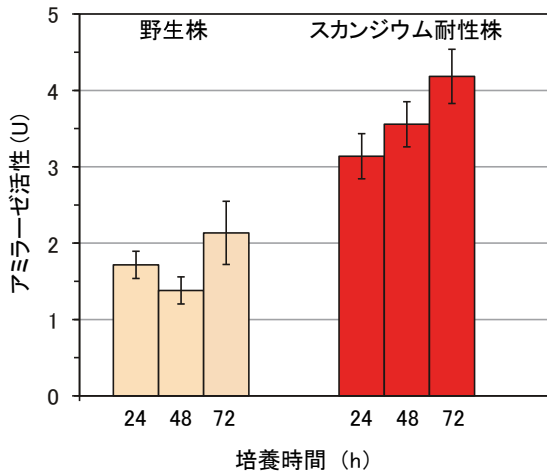


図7 枯草菌のアミラーゼ生産におけるスカンジウム耐性変異の効果

枯草菌野生株とスカンジウム耐性変異株 (*uppS86* 株) を培養し、各培養時間における培養上清中のアミラーゼ活性を測定した。

り、この変異が転写後段階でアミラーゼ生産を向上させていると考えられる。アミラーゼの分泌には細胞表面の電荷が影響するという報告もあり、細胞表面のUPP量が増加したことによってアミラーゼ分泌に影響を及ぼしているのかもしれない。このようにスカンジウム耐性変異によるアミラーゼ生産の向上メカニズムは、スカンジウム添加による効果とは明らかに異なっている。この変異の効果については更なる解析が必要である。

6. おわりに

本稿では、枯草菌において物質生産を向上させる手法を紹介した。これら手法の特徴は、薬剤の耐性変異に基づいていることにある。従来用いられてきた変異剤などによる突然変異誘発法とは異なり、薬剤耐性変異による活性化法では生物間で保存されている必須分子の変異を利用するため、様々な生物種に適用できるという大きな利点がある。リファンピシン耐性変異やストレプトマイシン耐性変異は既に様々な微生物において、その有用性が確認されている^{21), 24)}。また、本稿では紹介しなかったが、これら薬剤の他にゲンタミシンやジェネティシン、パロモマイシン、リンコマイシン、フシジン酸、チオストレプトンなども放線菌の抗生物質生産を活性化することが示されている。さらに、これら薬剤耐性変異による活性化法のもう一つの利点は、通常の培養条件では発現しない“休眠”状態の遺伝子をも活性化しうることである^{9), 16)}。本来、生産菌の生育には必要でない二次代謝産物の場合、培養条件によっては二次代謝産物を生産しないということも珍しいことではない。このような休眠状態の遺伝子を活性化する手法は新規化合物の探索において強力なツールとなるであろう。実際、保坂らはこの手法により、放線菌から新規抗生物質ピペリダマイシンの発見に至っている¹⁶⁾。

一方、スカンジウムについては、様々な生物種に対して未知の効果を発揮する可能性があるものの、現時点ではスカンジウム添加による発酵生産にはコスト面での問題がある。しかしながら、生物におけるスカンジウムの研究は始まったばかりである。今後、スカンジウムによる物質生産向上メカニズムが明らかになれば、同等もしくはそれ以上の効果を発揮する代替物質や変異等による別法の開発も不可能ではない。本研究を契機に、生物における希土類元素の影響に関する研究が活発化することを望む。

(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 稲岡 隆史)

引用文献

- 1) Stein, T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* **56**: 845-857.
- 2) Inaoka, T., Takahashi, K., Kameyama, M.-O., Yoshida, M., and Ochi, K. (2003)

- Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP cooperatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **278**: 2169-2176.
- 3) Inaoka, T., Wang, G., and Ochi, K. (2009) ScoC regulates bacilysin production at the transcription level in *Bacillus subtilis*. *J Bacterio* **191**: 7367-7371.
 - 4) Chen, X. H., Scholz, R., Borriss, M., Junge, H., Mögel, G., Kunz, S., and Borriss, R. (2009) Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *J Biotechnol* **140**: 38-44.
 - 5) Tabata, K., Ikeda, H., and Hashimoto, S. (2005) *ywfE* in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid ligase. *J Bacteriol* **187**: 5195-5202.
 - 6) Tsuda, T., Asami, M., Koguchi, Y., and Kojima, S. (2014) Single mutation alters the substrate specificity of L-amino acid ligase. *Biochem* **53**: 2650-2660.
 - 7) Garcia, L., Alonso-Sanz, M., Rebollo, M. J., Tercero, J. C., and Chaves, F. (2001) Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Spain and their rapid detection by PCR-enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **39**: 1813-1818.
 - 8) Nicholson, W. L., and Maughan, H. (2002) The Spectrum of spontaneous rifampin resistance mutations in the *rpoB* gene of *Bacillus subtilis* 168 spores differs from that of vegetative cells and resembles that of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* **184**: 4936-4940.
 - 9) Inaoka, T., Takahashi, K., Yada, H., Yoshida, M., and Ochi, K. (2004) RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3, 3' -neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **279**: 3885-3892.
 - 10) Kubo, Y., Inaoka, T., Hachiya, T., Miyake, M., Hase, S., Nakagawa, R., Hasegawa, H., Funane, K., Sakakibara, Y., and Kimura, K. (2013) Development of a rifampicin-resistant *Bacillus subtilis* strain for natto-fermentation showing enhanced exoenzyme production. *J Biosci Bioeng* **115**: 654-657.
 - 11) Andersen, J. T., and Jørgensen, S. T. (2003) Yield improvements of *Bacillus* strains by introduction of point mutations in the *rpoB* gene. *12th International Conference on Bacilli Abstract book*. P101.
 - 12) 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.
 - 13) Hu, H., Zhang, Q., and Ochi, K. (2002) Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase

- β -subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **184**: 3984-3991.
- 14) Carata, E., Peano, C., Tredici, S. M., Ferrari, F., Tala, A., Corti, G., Bicciato, S., De Bellis, G., and Alifano, P. (2009) Phenotypes and gene expression profiles of *Saccharopolyspora erythraea* rifampicin-resistant (*rif*) mutants affected in erythromycin production. *Microb Cell Fact* **8**: 18-32.
 - 15) Fukuda, K., Tamura, T., Ito, H., Yamamoto, S., Ochi, K., and Inagaki, K. (2010) Production improvement of antifungal, antitrypanosomal nucleoside sinefungin by *rpoB* mutation and optimization of resting cell system of *Streptomyces incarnates* NRRL 8089. *J Biosci Bioeng* **109**: 459-465.
 - 16) 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.
 - 17) Tsuno, T., Ikeda, C., Numata, K., Tomita, K., Konishi, M., and Kawaguchi, H. (1986) 3,3'-Neotrehalosdiamine (BMY-28251), a new aminosugar antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **39**: 1001-1003.
 - 18) Numata, K., Satoh, F., Hatori, M., Miyaki, T., and Kawaguchi, H. (1986) Isolation of 3,3'-neotrehalosdiamine (BMY-28251) from a butirosin-producing organism. *J Antibiot (Tokyo)* **39**: 1346-1348.
 - 19) Inaoka, T., and Ochi, K. (2007) Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of neotrehalosdiamine, a novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 65-75.
 - 20) Ozaki, M., Mizushima, S., and Nomura, M. (1969) Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in *Escherichia coli*. *Nature* **222**: 333-339.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) 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.
 - 24) Ochi, K., and Hosaka, T., (2013) New strategies for drug discovery: activation

- of silent or weakly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 87-98.
- 25) 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*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 71-77.
 - 26) Tojo, S., Kim, J. Y., Tanaka, Y., Inaoka, T., Hiraga, Y., and Ochi, K. (2014) The *mthA* mutation conferring low-level resistance to streptomycin enhances antibiotic production in *Bacillus subtilis* by increasing the S-adenosylmethionine pool size. *J Bacteriol* **196**: 1514-1524.
 - 27) 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.
 - 28) Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S., and Ochi, K. (2007) The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Lett* **274**: 311-315.
 - 29) Inaoka, T., and Ochi, K. (2011) Scandium stimulates the production of amylase and bacilysin in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **77**: 8181-8183.
 - 30) Ochi, K., Tanaka, Y., and Tojo, S. (2014) Activating the expression of bacterial cryptic genes by *rpoB* mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *J Ind Microbiol Biotechnol* **41**: 403-414.
 - 31) Inaoka, T., and Ochi, K. (2012) Undecaprenyl pyrophosphate involvement in susceptibility of *Bacillus subtilis* to rare earth elements. *J Bacteriol* **194**: 5632-5637.
 - 32) Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D., and Mengin-Lecreulx, D. (2008) The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 208-233.
 - 33) Stone, K. J., and Strominger, J. L. (1971) Mechanism of action of bacitracin: complexation with metal ion and C55-isoprenyl pyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**: 3223-3227.
 - 34) Storm, D. R., and Strominger, J. L. (1973) Complex formation between bacitracin peptides and isoprenyl pyrophosphates. The specificity of lipid-peptide interactions. *J Biol Chem* **248**: 3940-3945.
 - 35) Takahashi, Y., Yamamoto, M., Yamamoto, Y., and Tanaka, K. (2010) EXAFS study on the cause of enrichment of heavy REEs on bacterial cell surfaces. *Geochim Cosmochim Acta* **74**: 5443-5462.