

放線菌の転写及び翻訳系の改変による潜在能力の開発と 抗生物質の探索

保坂 毅*・今井 優**・藤原 達也***

*信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点

**信州大学大学院総合工学系研究科生物・食料科学専攻

***信州大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

〒399-4598 長野県上伊那郡南箕輪村8304 信州大学農学部共用実験棟D206

要約 ゲノム生物学の飛躍的な進歩に伴い、様々な微生物の全ゲノム配列が次々と解読されている。その解析結果から、微生物、とりわけ代表的な抗生物質生産菌である放線菌においては、有用な二次代謝産物の生産に繋がる遺伝子の多くが潜在的に存在していることが判ってきた。従って、放線菌における潜在的な二次代謝産物の生産能力を引き出すための手法を確立することは、放線菌利用の高度化に向けて極めて重要な課題となっている。我々はこれまでの研究で、薬剤耐性変異（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など）を利用して放線菌細胞内のRNAポリメラーゼ（転写）やリボソーム（翻訳）を改変することで、放線菌の潜在的な二次代謝産物の生産能力を効率よく活性化できることを証明してきた。実際にこの原理を通常の培養では抗生物質をほとんど生産しない *Streptomyces* 属の放線菌に活用して、新しい抗生物質ペリダマイシンを発見することにも成功した。本総説では、我々が開発した放線菌の潜在能力活性化技術の原理とその利用の高度化に向けた新たな取り組みについて紹介する。

キーワード：放線菌，二次代謝産物，薬剤耐性変異，RNAポリメラーゼ，リボソーム

1. はじめに

20世紀初頭のペニシリンの発見にはじまり、我々人類は微生物が生み出す様々な有用二次代謝産物の恩恵を受けてきた。代表的な抗生物質生産菌である放線菌からは、1942年のストレプトスリシンと翌年の抗結核薬ストレプトマイシンの発見を皮切りに、実に多くの有用化合物が今日までに発見されている。しかしながら、微生物由来の二次代謝産物に関しては発見し尽くされた感があり、それらの中から医薬品の開発に繋がるような化合物を見つけ出すことは、極めて困難になってきている。一方、近年のゲノム生物学の発展は目覚ましいものがあり、多種多様な微生物の全ゲノム配列が次々と解読されている。抗生物質に代表される有用な二次代謝産物の宝庫である放線菌においては、*Streptomyces coelicolor*（青色色素抗生物質アクチノロージン生産菌，放線菌の基礎研究で最も頻用されているモデル放線菌）や *Streptomyces avermitilis*（エバームクチン生産菌），*Streptomyces griseus*（ストレプトマイシン生産菌）

などの代表菌株の全ゲノム配列が決定された¹⁻³⁾。興味深いことに、これら菌株のゲノム配列の全体像を眺めてみることで、放線菌には通常の培養では検出に到らない極低発現な二次代謝産物生合成遺伝子が数多く存在することが判ってきた。このような潜在的な二次代謝産物生合成遺伝子（潜在能力）は、当然ながら利用されることなく見落とされてきた部分であるが、抗生物質などの有用な二次代謝産物の生産に関与している可能性がある。従って、現在、国内外の多くの研究者が放線菌における潜在能力の有用性に着目し、その活性化と利用に向けた技術開発に取り組んでいる。潜在能力の活性化例としてこれまでに、OSMAC (one strain - many compounds) アプローチや遺伝子発現を劇的に変化させる化合物（S-アデノシルメチオニンや希土類元素を含む化合物）の培地への添加、さらには異種細菌を利用した複合培養など、培養そのものを工夫する手法、また、遺伝子工学技術を活用して遺伝子発現を直接的に操作する手法などが報告されている⁴⁻¹⁰⁾。本総説では、筆者らが開発した薬剤耐性を付与する自然突然変異を利用した放線菌の潜在能力

受理日 2011年12月21日

採択日 2012年1月26日

活性化技術の基本原則と応用例を紹介し、本技術の今後課題と展望について述べる。

2. 薬剤耐性変異による放線菌の潜在能力活性化と新抗生物質の発見

越智らは、放線菌にリファンピシン (RNA ポリメラーゼを標的とする薬剤) やストレプトマイシン (リボソームを標的とする薬剤) に対する耐性を付与すると、抗生物質の生産量が劇的に増大する現象を見出した^{11,12)}。さらに、このような現象が認められるリファンピシン耐性変異株は RNA ポリメラーゼ β サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子に、ストレプトマイシン耐性変異株はリボソームタンパク質 S12 をコードする *rpsL* 遺伝子などに、それぞれ特定の変異を有していることを明らかにした¹³⁻¹⁵⁾。筆者らはこれらの事実をもとに、特定の *rpoB* 変異や *rpsL* 変異が定常期の放線菌細胞内における RNA ポリメラーゼ (転写) あるいはリボソーム (翻訳) の機能を変化させ、結果的に抗生物質生産が活性化されることを突き止めた^{16,17)}。転写や翻訳系の改変による抗生物質生産活性化の詳細なメカニズムについては、未解明の部分が多いが、現在までに次のようなことが判っている。

放線菌は、細胞内のアミノ酸が枯渇すると、微生物アラーム ppGpp (グアノシン 5'-二リン酸 3'-二リン酸) を合成する。ppGpp が RNA ポリメラーゼの活性中心近傍に結合し、ppGpp-RNA ポリメラーゼ複合体が形成されると、放線菌の細胞内では緊縮調節と呼ばれる複雑な制御が起こる¹⁸⁾。この調節によって、リボソームタンパク質やリボソーム RNA、転移 RNA などのタンパク質合成に関与する遺伝子の転写が阻害され、一方で、アミノ酸の生合成または輸送に関わるタンパク質や抗生物質などの二次代謝産物の生合成に必要な酵素タンパク質の発現が促進される。すなわち、ppGpp は、放線菌の抗生物質生産の引き金物質となっている。興味深いことに、Xu らは、特定の *rpoB* 変異株が ppGpp 非依存的に抗生物質を高生産することを明らかにした¹⁹⁾。この発見は、特定の *rpoB* 変異を有する変異型 RNA ポリメラーゼが ppGpp 結合状態を模倣するという提唱に繋がった。筆者らの最近の研究結果によって、抗生物質高生産 *rpoB* 変異株の定常期における RNA ポリメラーゼは、特定遺伝子のプロモーターへの結合力が野生型 RNA ポリメラーゼよりも強いことも判ってきた¹⁷⁾。厳密な証明には程遠いが、変異型 RNA ポリメラーゼが抗生物質

生合成遺伝子の発現制御に関わるプロモーターへの高い親和力を獲得したことで、同遺伝子の転写が促進し、結果的に抗生物質生産の活性化が起きている可能性が考えられる。放線菌には多種多様なシグマ因子が存在することから、野生型と *rpoB* 変異型の RNA ポリメラーゼホロ酵素では、機能しているシグマ因子が異なるため、プロモーターへの親和力が変化したとも推察できるが、実際どのような仕組みで抗生物質生産が活性化されるのか、詳細については、現在も解析中である。

一方、特定の *rpsL* 変異を有する変異型リボソームは、定常期においても高い翻訳活性を維持するという特異な能力を持つことで特徴づけられている^{13,16)}。抗生物質生合成遺伝子の多くは、対数増殖期よりもむしろ定常期において活発に転写されている。この時期に高い翻訳活性を有する *rpsL* 変異株は、抗生物質の生合成に関与する酵素群を効率的に生産できるため、結果的に抗生物質生産の活性化が起こると考えられる。しかしながら、*rpsL* 変異株が定常期に高い翻訳能力を発揮する仕組みは、謎のままである。

rpoB 変異と *rpsL* 変異による抗生物質生産活性化のメカニズムの解明は、現在もなお大きな課題となっているが、薬剤耐性変異の特質が引き起こす RNA ポリメラーゼ (転写) やリボソーム (翻訳) の機能変化が、放線菌の潜在能力を活性化させる要因であることが判ってきた。ごく最近筆者らは、この原理を活用することで、通常の培養では抗生物質を生産しないと判定された放線菌 *Streptomyces* sp. 631689 の潜在能力を活性化して、実際に新しい抗生物質 (ピペリダマイシンと命名) を発見することにも成功している (Figure 1)¹⁷⁾。

以上の事実から、“放線菌の潜在能力を目覚めさせれば新しい二次代謝産物を発見できる”という放線菌利用の高度化に向けた新たな方向性がはっきりと見えてきた。

3. 放線菌の潜在能力を強力に引き出す薬剤耐性変異

前述したように、薬剤 (RNA ポリメラーゼやリボソームを標的とする抗生物質) 耐性変異を利用して放線菌細胞内の転写や翻訳の機能を改変することで、放線菌の潜在的な抗生物質生産力を効率的に活性化できることが判ってきた。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がその代表格であるが、これまでに、ゲンタマイシン、パロモマイ

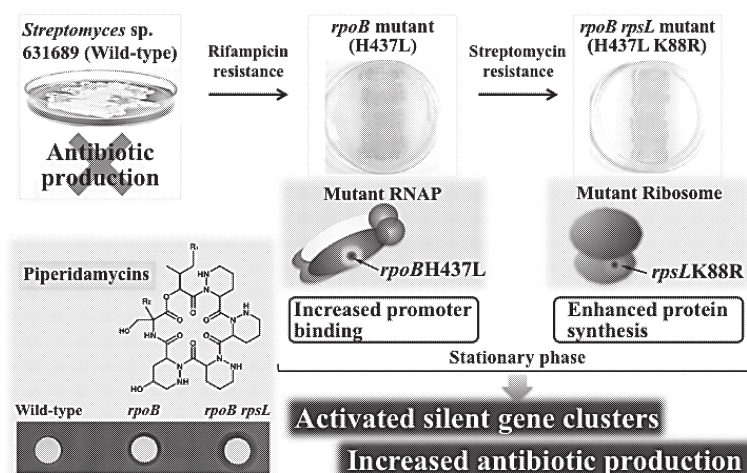


Fig. 1. Antibiotic discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase and ribosome. The H437L mutation in *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase β -subunit) alter the affinity of the resulting mutant RNAP for promoters and the K88R mutation in *rpsL* gene (encoding ribosomal protein S12) enhances protein synthesis during stationary growth phase. This led to the expression of an actinomycete silent gene cluster and production of antibiotic piperidamycin.

Table 1. Screening for antibiotic-overproducing erythromycin-resistant (Ery^r) mutants in various strains of *Streptomyces*

Strains	MIC ^a ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentration of erythromycin used for screening ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Frequency (%) of Ery ^r mutants producing increased antibiotic ^b
<i>S. coelicolor</i> 1147	30	170, 420	22 [57/259]
<i>S. lividans</i> 1326	60	170, 420	20 [61/300]
<i>S. griseus</i> IFO13189	300	600	14 [17/124]
<i>S. parvulus</i> ATCC12434	60	300, 500, 600	24 [40/166]

^aDetermined after incubation on agar medium at 30°C for 3 days.

^bNumbers in parentheses mean number of mutants producing increased antibiotic (actinorhodin in *S. coelicolor* and *S. lividans*, actinomycin in *S. parvulus*, streptomycin in *S. griseus*, respectively) per number of mutants tested.

シン, G418 (ジェネティシン), フシジン酸, チオストレプトン及びリンコマイシン耐性変異にも同様の効果があることが判っている。Wangらは、実際にこれらの変異を逐次的に利用して、モデル放線菌 *S. coelicolor* の青色抗生物質アクチノロージンの生産性を180倍まで上昇させることにも成功している²⁰⁾。また、ごく最近筆者らは、エリスロマイシン耐性変異にも強力な抗生物質生産活性化作用があることを新たに見出した²¹⁾。これまでに、*S. coelicolor* や *S. lividans* のアクチノロージン生産や *S. griseus* のストレプトマイシン生産、*S. parvulus* のアクチノマイシン生産においてその効果を実証している (Table 1)。興味深いことに、エリスロマイシン耐性変異には *S. lividans* の潜在的な抗菌物

質生産力をも顕在化させる効果があることも明らかになった。Figure 2 A に示したように、*S. lividans* から分離したエリスロマイシン耐性変異株は、野生株では生産が認められない抗菌物質を著量に生産する。この抗菌物質は、カルシウム非存在下においても顕著な抗菌活性を示すので、*S. lividans* が生産する抗菌物質として報告のある CDA (calcium-dependent antibiotics) とは異なることが明らかになった。抗菌物質の正体は不明であるが、抗菌物質生産が認められた時期の培養抽出液の HPLC プロファイルが野生株と変異株では大きく異なることも判明した (Figure 2 B)。*S. lividans* は *S. coelicolor* と並んで放線菌の基礎研究の場で頻用されている菌株である。*S. lividans* のようによく

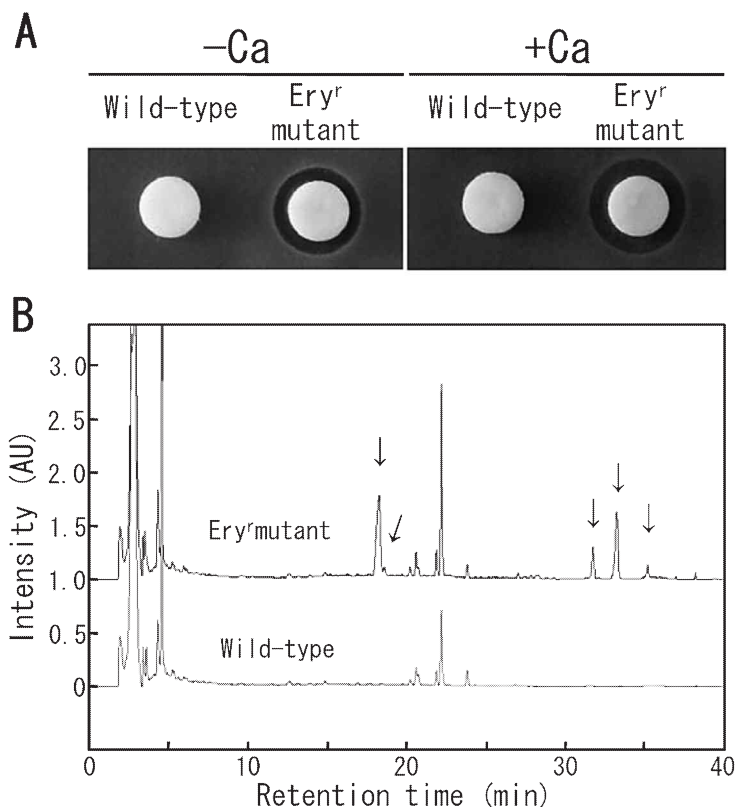


Fig. 2. Development of the potential to produce antibacterial compounds in *S. lividans* through the acquisition of erythromycin resistance. (A) Detection of antibacterial compounds produced by the wild-type and erythromycin-resistant (Ery^r) mutant strains of *S. lividans*. (B) HPLC profiles of culture extracts. The arrows indicate the peaks that were scarcely detected in the sample prepared from the wild-type strain.

特徴付けられている放線菌からも、上で述べたような新事実を導けたことは、画期的な研究成果といえる。しかしながら、その一方で、潜在能力活性化作用を示すエリスロマイシン耐性変異は同定されておらず、活性化の基本原則ですら説明できないのが現状である。エリスロマイシンの標的がリボソームであることを考えると、ストレプトマイシン耐性変異 (*rpsL* 変異) と同じような原理で活性化が起きているのかもしれない。現在、次世代シーケンス解析技術を活用して放線菌の潜在的な抗生物質生産力を引き出すエリスロマイシン耐性変異を特定し、同変異による活性化メカニズムの解明とその利用に向けた論理的基盤の構築にも取り組み始めている。

4. 今後の課題と展望

筆者らは“薬剤耐性変異を利用することで微生物の潜在能力を最大限に引き出せる”という斬新かつ独創的な研究概念を確立しつつある。この概念は、放線菌の抗生物質生産力の活性化のみならず、枯草

菌 (*Bacillus subtilis*) の酵素 (プロテアーゼや α -アミラーゼ) 生産能や *Pseudomonas* 属細菌の有害化学物質分解能の増強、さらには大腸菌 (*Escherichia coli*) の無細胞タンパク質合成系の効率化などにも活用できることを既の実証しており、その応用範囲は急速に拡大している²²⁻²⁵。しかしながら、発酵食品の製造現場で活躍しているカビや酵母への本概念の応用は、それらの微生物が真核生物であるが故に敬遠されてきた傾向にあり、未だ本格的な研究実施には至っていない。この未知の領域に足を踏み入れるためには、原核微生物 (放線菌など) と真核微生物 (カビや酵母) では RNA ポリメラーゼやリボソームの構成が大きく異なるため、変異株の取得の際にどのような薬剤 (RNA ポリメラーゼやリボソームを標的とする抗生物質) が使用できるかを明らかにする必要がある。この課題を克服して、真核微生物を対象とした潜在能力活性化技術を確立できれば、医薬食品分野における微生物利用の促進に向けた新しい道が拓かれていく。

今日までに発見された微生物の数は、地球上に存

在する全微生物の1%にも満たないといわれている。その1%であっても、不用と判定され活躍の場がないまま終わってしまう微生物菌株が大半である。しかしそこには、医薬品の開発に直結するような化合物の生産に関わる潜在能力が計り知れないほど隠されている。従って、我々がこれまで見落としてきた微生物の潜在能力を利用して、新しい二次代謝産物を発掘する試みは、微生物資源を有効活用していく上で極めて重要な研究アプローチといえる。筆者らが開発した微生物の潜在能力活性化技術を様々な微生物に応用していくことで、ストレプトマイシンなどの発見で賑わった1940年～1950年代のような“微生物由来の有用物質探索研究の黄金時代”を再び築き上げることも決して夢ではないと信じている。

5. 謝 辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（若手B：No. 21780068）及び文部科学省テニユア・トラック普及・定着事業の一環として行った。また、本研究を遂行するにあたり有益な御助言と御指導を賜りました（独）農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所（現・広島工業大学情報学部）の越智幸三博士に深く感謝申し上げます。

参考文献

- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* **417**, 141-147 (2002).
- Ikedo, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**, 526-531 (2003).
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**, 4050-4060 (2008).
- Bode, H.B., Bethe, B., Hofs, R. & Zeeck, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* **3**, 619-627 (2002).
- Okamoto, S., Lezhava, A., Hosaka, T., Okamoto-Hosoya, Y. & Ochi, K. Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* **185**, 601-609 (2003).
- Tanaka, Y., Hosaka, T. & Ochi, K. Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Antibiot.* **63**, 477-481 (2010).
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 400-406 (2011).
- Bode, H.B. & Muller, R. The impact of bacterial genomics on natural product research. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **44**, 6828-6846 (2005).
- Baltz, R.H. Strain improvement in actinomycetes in the postgenomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 657-666 (2011).
- Chiang, Y.M., Chang, S.L., Oakley, B.R. & Wang, C.C. Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 137-143 (2011).
- Shima, J., Hesketh, A., Okamoto, S., Kawamoto, S. & Ochi, K. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* **178**, 7276-7284 (1996).
- Hu, H., Zhang, Q. & Ochi, K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase beta subunit) of *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **184**, 3984-3991 (2002).
- Okamoto-Hosoya, Y., Hosaka, T. & Ochi, K. An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **149**, 3299-3309 (2003).
- Ochi, K., Okamoto, S., Tozawa, Y., Inaoka, T.,

- Hosaka, T., Xu, J. & Kurosawa, K. Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**, 155-184 (2004).
- 15) Nishimura, K., Hosaka, T., Tokuyama, S., Okamoto, S. & Ochi, K. 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 (2007).
- 16) Hosaka, T., Xu, J. & Ochi, K. 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 (2006).
- 17) Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A. & Ochi, K. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat. Biotechnol.* **27**, 462-464 (2009).
- 18) Cashel, M., Gentry, D.R., Hernandez, V. J., & Vinella, D. in *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. (ed. F.C. Neidhardt, et al.) 1458-1496 (ASM Press, Washington, DC; 1996).
- 19) Xu, J., Tozawa, Y., Lai, C., Hayashi, H. & Ochi, K. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Mol. Genet. Genomics* **268**, 179-189 (2002).
- 20) Wang, G., Hosaka, T. & Ochi, K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2834-2840 (2008).
- 21) Imai, Y., Fujiwara, T., Ochi, K. & Hosaka, T. Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance. *J. Antibiot* (in press).
- 22) Kurosawa, K., Hosaka, T., Tamehiro, N., Inaoka, T. & Ochi, K. Improvement of alpha-amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 71-77 (2006).
- 23) Hosokawa, K., Park, N.H., Inaoka, T., Itoh, Y. & Ochi, K. Streptomycin-resistant (*rpsL*) or rifampicin-resistant (*rpoB*) mutation in *Pseudomonas putida* KH146-2 confers enhanced tolerance to organic chemicals. *Environ. Microbiol.* **4**, 703-712 (2002).
- 24) Chumpolkulwong, N., Hori-Takemoto, C., Hosaka, T., Inaoka, T., Kigawa, T., Shirouzu, M., Ochi, K. & Yokoyama, S. Effects of *Escherichia coli* ribosomal protein S12 mutations on cell-free protein synthesis. *Eur. J. Biochem.* **271**, 1127-1134 (2004).
- 25) Hosaka, T., Tamehiro, N., Chumpolkulwong, N., Hori-Takemoto, C., Shirouzu, M., Yokoyama, S. & Ochi, K. The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* **271**, 317-324 (2004).

Development of the Potential of Actinomycetes to Produce Secondary Metabolites and Discovery of New Antibiotics by Modulating the RNA Polymerase and/or Ribosome

Takeshi HOSAKA*, Yu IMAI** and Tatsuya FUJIWARA***

*International Young Researchers Empowerment Center, Shinshu University

**Interdisciplinary Graduate School of Science and Technology, Shinshu University

***Graduate School of Agriculture, Shinshu University

Summary

Recent genome sequencing projects have revealed that many biosynthetic gene clusters, producing unknown secondary metabolites, exist in actinomycetes genomes. The exploitation of the genomic potential of actinomycetes may lead to the isolation of new biologically active compounds, exemplified by antibiotics. Therefore, it is extremely important for advanced utilization of actinomycetes to investigate their unexploited abilities to produce secondary metabolites and to clarify their activation mechanism. We

demonstrated a pragmatic method for efficiently activating unexpressed or poorly expressed actinomycetes genes to synthesize secondary metabolites through a mutation that confers resistance to drugs (such as rifampicin and streptomycin, etc.) targeting the RNA polymerase and/or ribosomes; these drug-resistance mutations dramatically alter gene expression in actinomycetes by modulating the transcriptional and translational apparatus or both (i. e., RNA polymerase and ribosome). Interestingly, our method allows the discovery of piperidamycin, a novel antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 631689, which rarely produces antibiotics in any type of culture media. In this review, we first give a detailed description of the basic principle of the abovementioned methods and then introduce some of our recent efforts in taking complete advantage of the potential of microorganisms to produce secondary metabolites.

Key word : actinomycetes, secondary metabolites, drug-resistance mutation, RNA polymerase, ribosome