

信州大学審査学位論文

放線菌における薬剤耐性変異の特性解析と
二次代謝活性化への応用

令和4年3月

星野 颯

目次

第 1 章 序論	3
1. 放線菌の生物学的特徴	3
2. 抗生物質の開発と利用	4
3. 薬剤耐性菌の出現と蔓延	5
4. 薬剤耐性菌問題への取り組み	6
5. 抗生物質探索源としての放線菌の可能性	8
6. 本研究の目的	11
第 2 章 エリスロマイシン耐性を付与する 23S rRNA 変異	12
1. 緒言	12
2. 実験材料および実験方法	15
2-1 使用菌株	15
2-2 培地	16
2-3 放線菌の培養	20
2-4 孢子懸濁液の調製	20
2-5 最小生育阻止濃度の 定	20
2-6 乾燥菌体重量および生育の測定	20
2-7 抗生物質生産の評価	21
2-8 変異遺伝子の特定	22
2-9 変異発生率の評価	27
2-10 mRNA 遺伝子発現解析	27
2-11 タンパク質発現解析	29
3. 結果	31
3-1 <i>S. coelicolor</i> A3(2)におけるエリスロマイシン耐性と抗生物質 高生産に寄与する変異の解析	31
3-2 <i>S. lividans</i> 66 におけるエリスロマイシン耐性と抗生物質高生 産に寄与する変異の解析	37
3-3 23S rRNA 変異が <i>S. coelicolor</i> A3(2)と <i>S. lividans</i> 66 の遺 伝学的特性に与える影響の解析	41

3-4	<i>S. lividans</i> 66 由来 23S rRNA 変異株の遺伝学的解析	60
4.	考察	61
第3章	オフロキサシン耐性変異	67
1.	緒言	67
2.	実験材料および実験方法	69
2-1	使用菌株	69
2-2	培地	69
2-3	放線菌の培養	69
2-4	孢子懸濁液の調製	69
2-5	最小生育阻止濃度の 定	69
2-6	オフロキサシン耐性変異株の取得	70
2-7	乾燥菌体重量および生育の測定	70
2-8	抗生物質生産の評価	70
2-9	代謝分析	71
2-10	抗菌物質の単離、精製、および構 定	72
2-11	mRNA 遺伝子発現解析	73
2-12	変異遺伝子の特定	75
3.	結果	76
3-1	オフロキサシン耐性変異株の取得	76
3-2	遺伝学的作用による二次代謝 性化の解析	81
3-3	生 学的作用による二次代謝 性化の 導の解析	93
3-4	オフロキサシン耐性と二次代謝 性化に關 る変異の解析	97
4.	考察	102
		107
謝		111
考文献		112
関 文献		126

第 1 章 序論

1. 放線菌の生物学的特徴

放線菌はおよそ 27 億年前に、現在のシアロバクテリア門やデイトコッカス-サーマス門などの共通祖先から生じたグラ陽性細菌群である¹。放線菌は、主に土壌に生息するが、その分布は、淡水、海水、大気中にも及ぶ。Actinobacteria 門 (放線菌門) は 130 の属から構成され、その中でも *Streptomyces* 属放線菌は、一見して原核生物とは思えない複雑な形態分化と多様な二次代謝を示すことから、放線菌を代表する属として盛んに研究されている^{2,3}。

一般に放線菌は、自然界の限られた栄養条件下では、ほとんどの時間を休眠孢子の状態ですごす。一定の生育条件が満たされると、孢子の発芽が起こる。発芽では、孢子が膨張し、発芽管が伸長して菌糸となる。菌糸は先端成長と分岐を繰り返すことで、栄養菌糸 (基底菌糸) を形成する。次いで、栄養の枯渇などの環境ストレスに応答し、気中菌糸を大気に向け伸長させる。気中菌糸は染色体の分離と凝集、隔壁の形成、孢子壁の形成を経て、成熟した孢子になる。このようにして形成された孢子は、適切な生育環境が整ったとき、再び発芽する。以上が放線菌の生活環である^{3,4} (Fig. 1-1)。このように、真核生物であるカビのような複雑な形態分化を示す放線菌は、原核生物の形態分化に関する研究の対象としても注目されている。

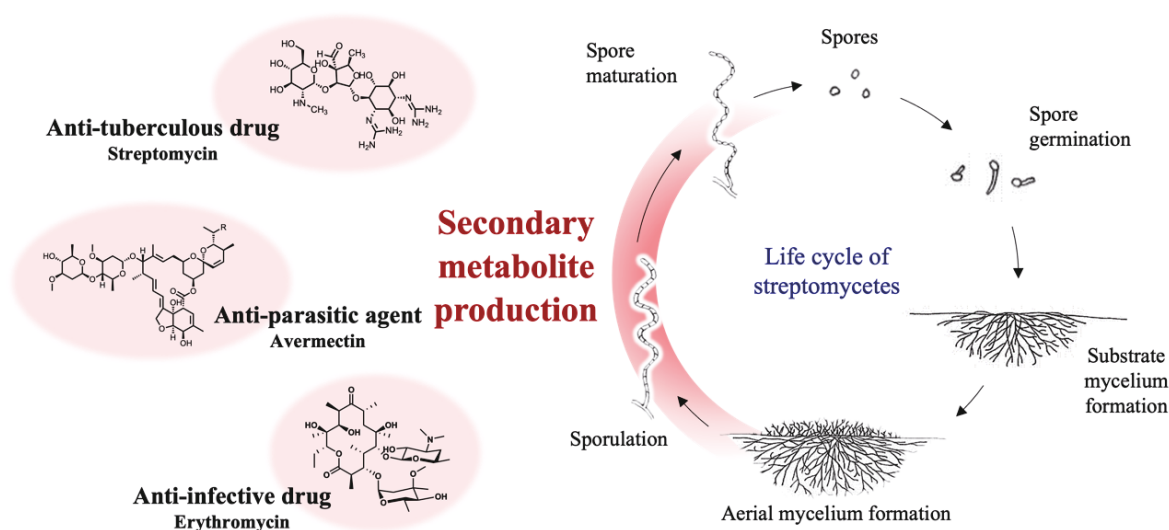


Fig. 1-1. The life cycle and secondary metabolism of typical actinomycetes

上述の複雑な形態分化には多数の遺伝子が関与するが、それら遺伝子も含め、巨大なゲノムを有することも放線菌の大きな特徴である。微生物研究におけるモデル生物として広く用いられる大腸菌 (*Eschericia coli* K-12) や枯草菌 (*Bacillus subtilis* 168) のゲノムサイズはそれぞれ、4.7 Mb および 4.2 Mb である^{5,6}。これに対して、放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)、抗寄生虫薬エーメクチン生産菌 *Streptomyces avermitilis* MA-4680、および抗結核薬ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* IFO 13350 のゲノムサイズはそれぞれ 8.7 Mb、9.0 Mb、および 8.5Mb と、極めて大きなゲノムを有する⁷⁻⁹。

この巨大なゲノムの中には、形態分化関連遺伝子はもちろん、二次代謝関連遺伝子が豊富に含まれている。これら二次代謝関連遺伝子の働きにより生み出される多様な生体活性化合物は、医薬産業、農業、水産、および畜産業の発展に多大な貢献を果たしている。

2. 抗生物質の開発と利用

抗生物質とは、「微生物によって産生され、他の微生物の生育を阻害する物質 (Any small molecule made by a microbe that antagonizes the growth of other microbes)」として、Waksman により定義された化学物質の総称である¹⁰。その発見は、1928 年に A. Fleming が、青カビ *Penicillium rugens* より、ペニシリンを発見したことが最初である^{11,12}。

1944 年に放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝産物から発見されたストレプトマイシン (アミノグリコシド系抗生物質) は、当時世界的に流行していた結核の治療薬として用いられると、それまで死の病と恐れられていた結核をほぼ完治可能な病気にした (Fig. 1-1)¹³。このストレプトマイシンの開発を契機に、1950-70 年代の「抗生物質発見の黄金期」と呼ばれる時代に次々と新たな抗生物質が発見された^{14,15}。そこから今までに、クロラムフェニコール系、テトラサイクリン系、マクロライド系、グリコペプチド系、アンサマイシン系、ストレプトグラミン系、およびダプトマイシン系抗生物質といった、現も感染症の治療で利用される多くの抗生物質が放線菌から見つけてきた^{15,16}。

その一方で、この黄金時代に現 使用される抗生物質の基本骨格のほとんどが発見されてしまうと、現 まで く新たな骨格を有する新しい抗生物質はほとんど見 かっていない抗生物質の“発見の と呼ばれる時代が続いているのも事実である。

3. 薬剤耐性菌の出現と蔓延

抗生物質の開発と利用は、 間社会における薬剤耐性菌の出現と蔓延を促すことにもなってしまった。たとえば、1953年に上市されたエリスロマイシンは、1968年には耐性を示す *Streptococcus* 属細菌が見 かり、1972年に上市された ンコマイシンは、1988年に耐性を示す *Enterococcus* 属細菌が発見された Fig1-2) ^{17,18}。このように、抗生物質の開発および利用とそれに対する耐性菌の出現は、まさに いた ごっこを繰り広げてきた ¹⁸。

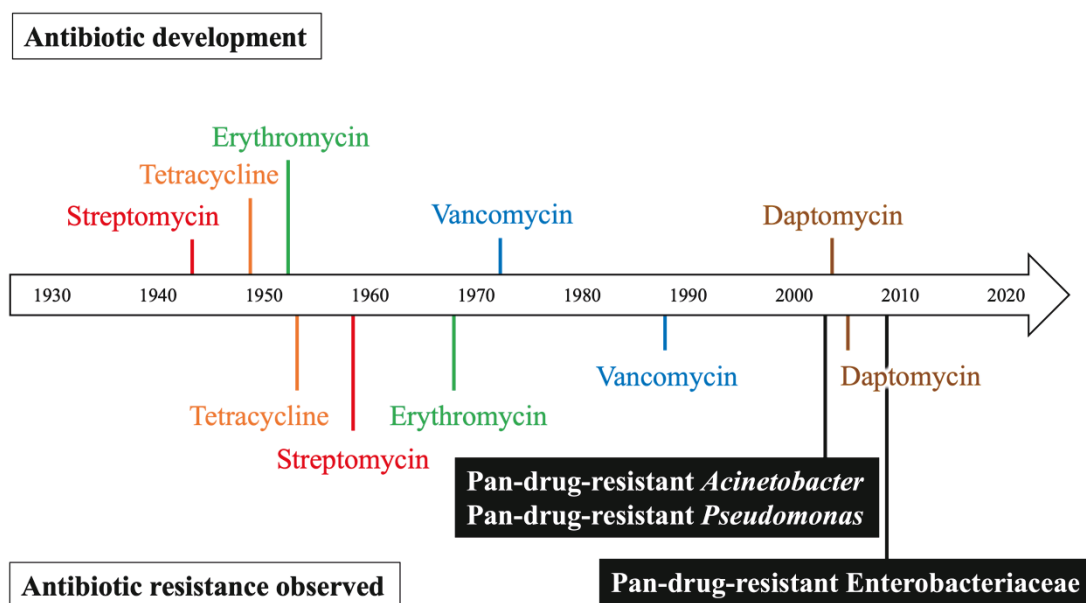


Fig. 1-2. Antibiotic development and its resistance observation
 The upper half shows the year of the antibiotic development. The lower half shows the year of emergence of the drug-resistant microorganisms.

抗生物質の利用 囲は、トにおける 染症治療のみならず、様々な分野に たる。例えば、医療分野では、外科的手術前後における 染症予防薬や臓器移植手術後に起こる免疫拒 の抑制剤などでも利用

される。農業分野では、作物 感染症の予防に利用されている。畜産業や水産業では、生育促進剤として、 育動物に抗生物質を混ぜたエサが与えられている。このような広 大な抗生物質利用 (乱用) は、様々な環境中における抗生物質の蓄積を引き起こし、あらゆる抗生物質が効かない多剤耐性菌 (Pan-drug-resistant bacteria) の出現にも ながった。

現 在、薬剤耐性菌 感染症の拡大が世界的に懸念されている。2013 年に発表されたアメリカの CDC (Centers for Disease Control and Prevention) の報告書によると、アメリカ国内では、年間 200 万 人が、1 もしくは複数の治療用抗生物質に耐性をも 細菌に重篤な 感染をし、2.3 万 人が命を落としている^{18,19}。さらに、2014 年のイギリス政府の報告では、世界の薬剤耐性菌の 感染症による死亡者数は、2013 年において 70 万 人であったが、薬剤耐性菌の 感染症への措置を今後行 ない場合、2050 年には、年間 1000 万 になると推定されている (Fig. 1-3)²⁰。

4. 薬剤耐性菌問題への取り組み

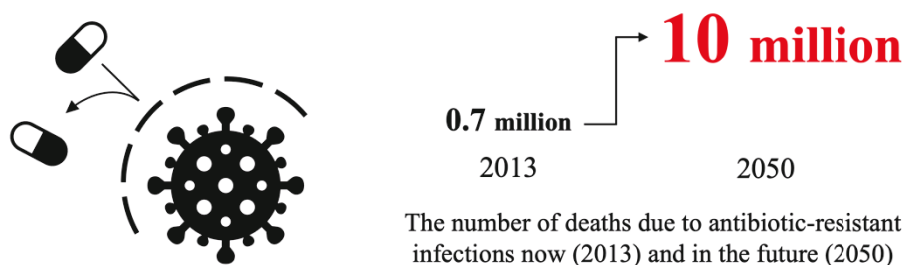
薬剤耐性菌への警戒の世界的高まりから、2015 年 5 月に WHO (世界保健機関) にて、薬剤耐性 (Antimicrobial resistance:AMR) に関するグローバル・アクション・プランが採択され、加盟国は 2 年以内に薬剤耐性に関する国家行動計画を策定することを求められた²¹。

これを受け、本邦の厚生労働省では、国際的に脅威となる 感染症対策関係閣僚会議にて、薬剤耐性に関する検討調整会議を設置し、関係省庁とともに、「薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン 2016-2020」を定めた²²。このプランでは、薬剤耐性菌に関する教育から、抗微生物剤の適正使用、薬剤耐性菌の 感染動態の把握、薬剤耐性問題の解 決に向けた研究の推進、および国際的な薬剤耐性問題への協力に至るまで、集中的に取り組む対策の指標に ついてまとめられている。2020 年の報告では、このアクションプランは、一部の指標は改善傾向にあるが、改善の乏しい指標や新たに生じた課題がいまだに多くあり、国際的な動きと強調し 継続的に取り組んでいくことの必要性を指摘している。2021 年現 在においては、2019 年からの新型コロナウイルス 感染症の拡大を受け、

薬剤耐性を含む国内の様々な感染症対策は、見直しの状況下であり、次期の AMR 対策にかかる計画は確定していない²³。

薬剤耐性問題の解決に向けて、微生物学研究では、既に出現してしまった多剤耐性菌を食い止めるための①新たな抗生物質や代替医薬品の開発は急務である一方で、この開発を的確かつ総合的に進めるためにも、②抗生物質の本質や③抗生物質耐性メカニズムを深く理解することが重要である。②および③は、より耐性菌を生みにくい抗生物質利用や、抗生物質治療に替る新たな感染症治療技術の開発につながる重要な知見を供給することが期待される。しかしながら、得られた知見を基に、真の抗生物質の適正使用や新たな治療法の開発を達成するには、膨大な労力と時間が必要となることが予想される。薬剤耐性菌による感染症の問題の根本的解決策を見出すまで、それら感染症の拡大を食い止めることも目的とし、①の新たな抗生物質を見つけることやその探索手法の確立は急務である (Fig. 1-3)。

The spread of antibiotic resistance



Challenges and solutions to antibiotic resistance

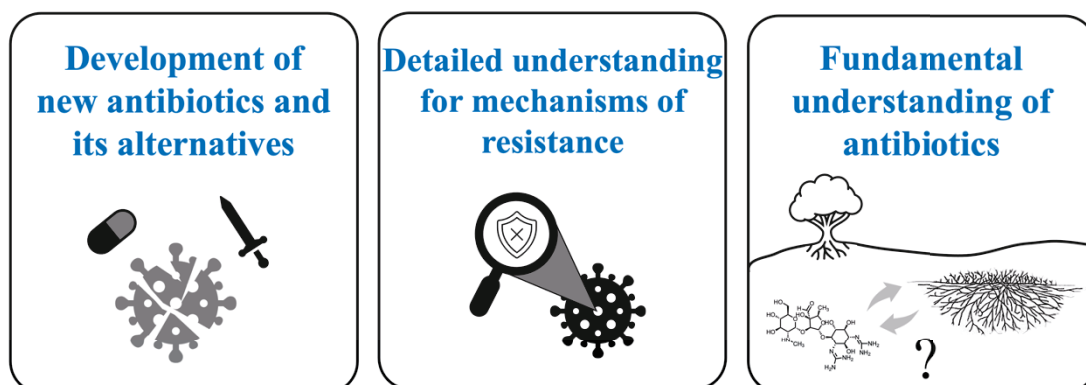


Fig. 1-3. The spread of antibiotic resistance and its challenges and solutions

5. 抗生物質探索源としての放線菌の可能性

現見 かけている抗生物質のおよそ3分の2が放線菌由来のものであり、そのほとんどが、*Streptomyces* 属放線菌により生産された二次代謝産物である³。これらの中には、抗結核薬ストレプトマイシン、抗寄生虫薬エーメクチン、および様々な感染症治療に用いられるエリスロマイシンなど多様な有用生 性物質が含まれている (Fig. 1-1)。ごく最近では、70年前に *Streptomyces hygroscopicus* から発見されたハイグロマイシン A が、ライ 病病原菌 *Borrelia* 属細菌に特異的な抗菌 性を示すことが明らかにされ、放線菌が抗生物質の探索源として再び注目されてきている²⁴。

上述の実績からも、*Streptomyces* 属放線菌は、二次代謝産物の生産能力が優れていることがうかがえるが、その能力は遺伝子レベルでも証明されている。20世紀後半に、ゲ 解析技術が飛躍的に発展したことを受け、2000年代初めに、放線菌のゲ 解読が次々と達成された。2002年の *S. coelicolor* A3(2) を皮切りに、2003年に *S. avermitilis* MA-4680、2008年に *S. griseus* IFO 13350 と、次々に放線菌のゲ 配列が公開された。これらの解析では、二次代謝産物生合成遺伝子の予測も行 れ、放線菌ゲ には30前後の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存 することも明らかにされた⁷⁻⁹。加えて、これら遺伝子の多くは、研究室レベルの培養では極低発現の状態にある“潜 遺伝子”として存 しており、二次代謝産物の生産には結び いていないことも判ってきた (Fig. 1-4)。結果として、放線菌のゲ 解析は、潜 遺伝子の 性化が新たな有用二次代謝産物の発見にも ながりえるというアイデアを生み出し、その 性化研究が盛んに行 れるようになった²⁵⁻²⁸。

Novel bioactive compounds

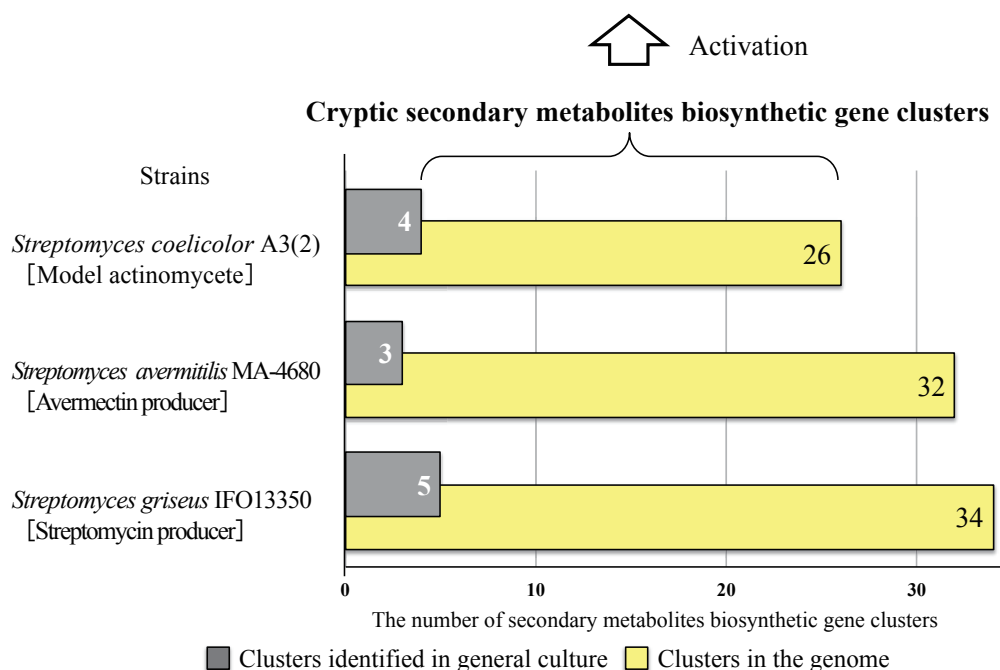


Fig. 1-4. Genetic potential for secondary metabolism in actinomycetes

これまでに様々な潜在遺伝子活性化手法が考案された。培養条件を改変する手法としては、培地成分、pH、温度など培養体を工夫する OSMAC (one strain many compounds) アプローチや、一次代謝を阻害する ARCs (Antibiotic remodeling compounds) や二次代謝産物生合成遺伝子の発現を亢進する γ -ブチロラクトン、S-アデシルメチオニン、希土類元素、および最小生育阻止濃度以下の抗生物質などの特定の化合物を添加するアプローチが考案された²⁹⁻³⁶。また、カビと放線菌や、ミコール酸含有細菌と放線菌などの複合培養に代表される異種微生物同士の緊密な相互作用を利用し、放線菌の二次代謝を活性化させる手法も考案された^{37,38}。生産菌そのものを改良する手法としては、放線菌の二次代謝におけるポジティブレギュレーターの強制発現もしくはネガティブレギュレーター破壊といった特定遺伝子の操作や、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターそのものの高性能発現宿主への導入などにより、潜在的二次代謝を発掘する“ゲマイニング”と呼ばれるアプローチも開

発された³⁹。これらに加えて、薬剤耐性選抜法も簡便かつ効果的に遺伝子を理性化できる手法として認知されている。

薬剤耐性選抜法は、対象となる菌株から薬剤耐性変異株を取得し、その中から目的の表現型を有する菌株を選抜する手法である。様々な微生物の潜在能力の理性化に用いられてきた中で、放線菌における薬剤耐性選抜法の最初の報告として、1976年のVezinaによるものであった。Vezinaは放線菌 *Streptomyces kitasatoensis* より、ロイシンアナログ耐性変異株を取得することにより、ロイシン生合成のフィードバック制御の破壊株を取得し、同菌株のキタマイシン生産量が増加することを明らかにした^{40,41} (Fig. 1-5)。この薬剤耐性選抜法の技術を開き、さらに劇的な理性化効果を示す手法として、RNAポリメラーゼやリボソームの機能改変に着目した“リボソーム工学”が知られている^{25,26,42,43}。

リボソーム工学は、リボソームやRNAポリメラーゼを標的とする抗生物質への耐性変異株を選抜することにより、二次代謝産物の生産が向上した菌株を効率的に取得する手法である⁴⁴⁻⁴⁹ (Fig. 1-5)。その原動力は、リボソームやRNAポリメラーゼにおける特定の変異により、翻訳機構や転写機構を改変することで、二次代謝を理性化させるというものである。理性化した菌株は、リボソームやRNAポリメラーゼ攻撃性抗生物質に耐性を示す変異株の中から高頻度で出現するため、容易に取得できる。この簡便さもリボソーム工学の大きな強みである。保坂らは、放線菌が特定のストレプトマイシン耐性変異(リボソームタンパク質 S12 をコードする *rpsL* 遺伝子の変異や 16S rRNA メチル化酵素をコードする *rsmG* 遺伝子の変異)を取得することで、抗生物質の生産量が劇的に増加することを見出した⁴⁴⁻⁴⁷。また、特定のリファンピシン耐性変異(RNAポリメラーゼサブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子の変異)を取得することにより、抗生物質の生産量が劇的に増加することも見出した^{48,49}。これらを踏まえ、保坂らは *Streptomyces mauvecolor* 631689 にリファンピシン耐性やストレプトマイシン耐性、およびゲンタミシン耐性変異を付与することにより、新規抗生物質ピペリダマイシンを発見した⁵⁰。上述のストレプトマイシンやリファンピシンを代表としてこれまでに、ゲンタミシン、パロモマイシン、フシジン酸、

チオストレプトン、G418、およびリンコマイシンなど様々な抗生物質を用いたリボゾーム工学の有効性が示された⁵¹⁻⁵⁷。

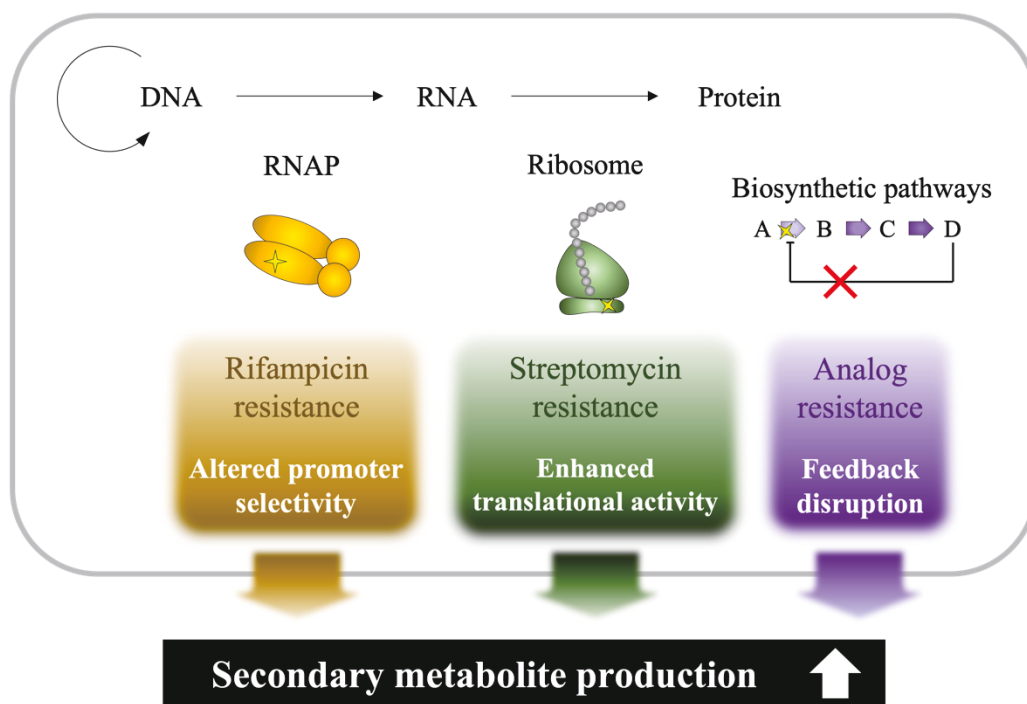


Fig. 1-5. Screening of drug-resistant mutants

6. 本研究の目的

本論文では、放線菌の二次代謝能を引き出す新たなアプローチの考案とその有効性の検証を目的に、DNA複製・翻訳を標的とする抗生物質への耐性変異の特性解析を行なった。

第 2 章 エリスロマイシン耐性を付与する 23S rRNA 変異

1. 緒言

放線菌がリボソームを標的とする抗生物質への耐性変異を得ると、抗生物質を高生産することがある^{44,46}。ストレプトマイシン耐性変異は、放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2) をはじめ、様々な放線菌に対して、二次代謝活性化効果を示すことから、リボソーム工学の代表格として知られている⁴⁷。この活性化には、ストレプトマイシン耐性を付与するリボソームタンパク質 S12 変異が主に関与する。S12 変異は、定常期における 70S リボソームの定化や誤因子の増大を引き起こし、タンパク質合成を活性化することにより、抗生物質高生産潜在的二次代謝産物生産を導く^{58,59}。ストレプトマイシン耐性に関して、これまで、ゲンタマイシン、パロモマイシン いずれもリボソーム 30S サブユニットを標的とするアミノグリコシド系抗生物質)といった抗生物質によるリボソーム工学の有効性も、明らかにされてきた^{51,53}。

今井らは、それまで未検討であったリボソーム 50S サブユニットを標的とするマクロライド系抗生物質エリスロマイシンを用いたリボソーム工学の開発に取り組んだ (Fig. 2-1)。その結果、*S. coelicolor* A3(2) では色素抗生物質の生産量が劇的に増加した菌株が高度で出現すること、*S. coelicolor* A3(2) の近縁種である *Streptomyces lividans* 66 では親株では生産が認められない抗菌物質を生産する菌株を取得できることが示されている⁶⁰ (Fig. 2-2)。このようなことから、エリスロマイシンを用いたリボソーム工学は、これまでのリボソーム工学とは性質の異なる強力な二次代謝活性化作用を有することが明らかになっている。これまでに、*S. coelicolor* A3(2) の抗生物質高生産エリスロマイシン耐性変異株 SCE234 が 23S rRNA 遺伝子における点変異 (*rrnA*-23S rRNA-A2302T) と *nsdA* 遺伝子における点変異 (negatively affecting *Streptomyces* differentiation、*nsdA* T680G) を有することを明らかとされている。加えて、*S. lividans* 66 における抗生物質高生産エリスロマイシン耐性変異株 SLE259 も、23S rRNA 遺伝子における点変異 (*rrnC*-23S rRNA-A2281G) を有することが判っている。以上のことから、23S rRNA

変異が、エリスロマイシン耐性だけではなく、抗生物質高生産化をもたらすことが示唆されている⁶¹。

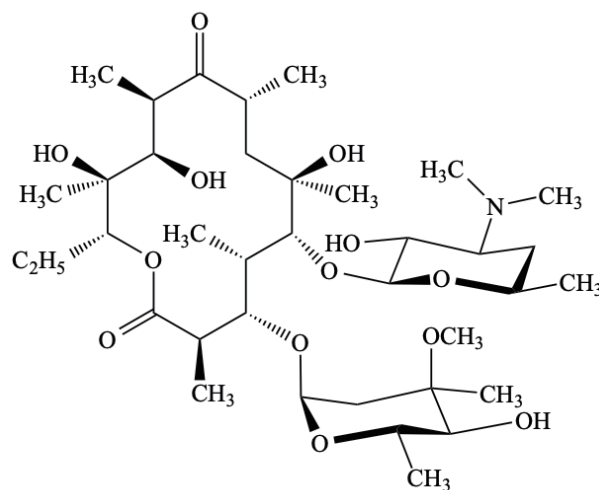


Fig. 2-1. The chemical structure of erythromycin

Streptomyces coelicolor A3(2)

Streptomyces lividans 66

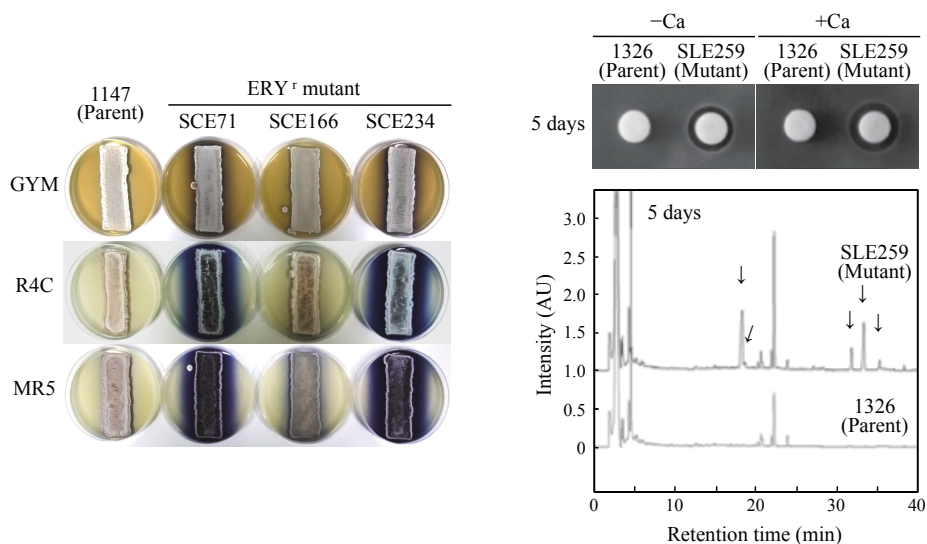


Fig. 2-2. Activation of antibiotic production in *Streptomyces* spp. through the acquisition of erythromycin resistance

以上の知見を元に、本章では、*Streptomyces* 属放線菌における 23S rRNA 変異による二次代謝活性化メカニズムの解明に取り組んだ。その結果、23S rRNA 変異には遺伝的不安定化作用があり、これに付随して発生した付加変異と 23S rRNA 変異の共存が抗生物質の高生産化につながることを判ってきた。本章では、それら実験結果とそれに基づく考察を報告する。

2. 実験材料および実験方法

2-1 使用菌株

本研究では、Table 2-1 に示す放線菌を使用した。*Streptomyces coelicolor* A3(2) 1147 株および *Streptomyces lividans* 66 1326 株は、独立行政法 農業・食品産業技術 合研究機構 食品 合研究所 食品 イオテクノロジー研究領域生物機能解析ユニットより分譲された。

Table 2-1. *Streptomyces* strains used in this study

Strain	Relevant characteristics	Source and/or References
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		
1147	Prototrophic wild-type (SCP1 ⁺ , SCP2 ⁺)	2
SCE234	<i>nsdA</i> T680G (L227R) <i>rrnA</i> -23S rRNA-A2302T	Spontaneous mutant ← 1147 ⁶⁰
SUIC-14	<i>nsdA</i> T680G (L227R)	Gene replacement strain ← 1147 ⁶¹
SUIC-15	<i>rrnA</i> -23S rRNA-A2302T	Gene replacement strain ← 1147 ⁶¹
SUIC-16	<i>rrnA</i> -23S rRNA-A2302T	Gene replacement strain ← 1147 ⁶¹
<i>Streptomyces lividans</i> 66		
1326	Prototrophic wild-type (SLP2 ⁺ , SLP3 ⁺)	2
SLE259	<i>rrnC</i> -23S rRNA-A2281G	Spontaneous mutant ← 1326 ⁶⁰
SUIC-17	<i>rrnC</i> -23S rRNA-A2281G	Gene replacement strain ← 1326 ⁶¹
SUIC-18	<i>rpoB</i> C1309G (H437D)	Spontaneous mutant ← 1326 In this study
SUIC-19	<i>rpoB</i> C1309G (H437D) <i>rrnC</i> -23S rRNA-A2281G	Spontaneous mutant ← SUIC-17 In this study

2-2 培地

放線菌の培養には、GYM、R3、R4、Modified R5 (MR5)、YEME、および SFM 培地を使用した。培地組成は Table 2-2~7 に示した。寒天培地を作製する際には寒天 (ナカライテスク株式会社) を 2 % (w/v) となるように加えた。調製した培地は加圧蒸気滅菌 (121°C、15 分間) した。ただし SFM 培地では、115°C、15 分間の加圧蒸気滅菌を 2 回行なった。

Table 2-2. GYM medium

Glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	4 g
Dried Yeast Extract (Nacalai Tesque, Inc.)	4 g
Extract Malt (Nacalai Tesque, Inc.)	10 g
NaCl (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	2 g
NZ amine, Type A (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	1 g
OB salt *	600 µL
pH 7.2-7.3	
Add 1,000 ml reverse osmosis (RO) water.	

* OB salt

MgSO ₄ ·7H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	50 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	1.6 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	2.5 g
MnSO ₄ ·5H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	1.2 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	6.6 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Fill up to 1,000 ml with RO water.	

Table 2-3. R3 medium

Glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	10 g
Yeast Extract (Nacalai Tesque, Inc.)	5 g
TES (Nacalai Tesque, Inc.)	5.6 g
L-proline (Sigma-Aldrich, Inc.)	3 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	4 g
K ₂ SO ₄ (Nacalai Tesque, Inc.)	200 mg
KH ₂ PO ₄ (Nacalai Tesque, Inc.)	50 mg
Casamino acid (Bacto)	100 mg
Trace elements	2 ml
pH 7.2-7.3	
Add 1,000 ml RO water.	

* Trace elements

ZnCl ₂ (Nacalai Tesque, Inc.)	40 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10 mg
Fill up to 1,000 ml with RO water.	

Table 2-4. R4 medium

Glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	10 g
Yeast Extract (Bacto)	1 g
TES (Nacalai Tesque, Inc.)	5.6 g
Trace elements [※]	2 ml
L-proline (Sigma-Aldrich, Inc.)	3 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	4 g
K ₂ SO ₄ (Nacalai Tesque, Inc.)	200 mg
Casamino acid (Bacto)	100 mg
pH 7.2-7.3	
Add 1,000 ml RO water.	

Table 2-5. Modified R5 (MR5) medium

Glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	10 g
Yeast Extract (Nacalai Tesque, Inc.)	5 g
TES (Nacalai Tesque, Inc.)	5.73 g
Trace elements [※]	2 ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O (Nacalai Tesque, Inc.)	10.12 g
K ₂ SO ₄ (Nacalai Tesque, Inc.)	250 mg
Casamino acid (Bacto)	100 mg
pH 7.2-7.3	
Add 1,000 ml RO water.	

Table 2-6. YEME medium

Glucose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	10 g
Sucrose (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.)	340 g
Yeast Extract (Bacto)	3 g
Extract Malt (Nacalai Tesque, Inc.)	3 g
Bacto peptone (Bacto)	5 g

pH 7.2-7.3

Add 1,000 ml reverse osmosis (RO) water.

After autoclaving, 2ml of 2.5M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (Nacalai Tesque, Inc.) was added.

Table 2-7. SFM medium

Mannitol ((Nacalai Tesque, Inc.)	20 g
Soya flour (Alishan LLC)	20 g

Add 1,000 ml tap water.

2-3 放線菌の培養

寒天培養の際には、放線菌の胞子を GYM、R3、R4、MR5、または SFM 寒天培地〔25 ml 培地 / 9cm シャーレ アズワン株式会社〕に接種し、30°C で 3~14 日間培養した。液体培養の際には、菌体の凝集を防ぐため、フラスコあたり 3 個のステンレス製コイル 培地 20 ml / 100 ml 容三角フラスコで培養する際は直径 5 mm、長さ 2 cm のもの) 培地 100 ml / 500 ml 容三角フラスコでは直径 10 mm、長さ 4.5 cm のもの) を入れ、30°C、200 rpm で 7 日間培養した。

2-4 胞子懸濁液の調製

2-3. に従い、*S. coelicolor* A3(2)もしくは *S. lividans* 66 を GYM 寒天培地に接種し、30°C で 7~10 日間培養した。培養プレート 1-5 枚分の胞子および気菌糸を金耳で掻き取り、ガラスビーズ No.2、Φ1.5-2.5mm) 入り試験管内の菌 RO 水 3~5 ml に懸濁した。これをボルテックスミキサーにより十分に攪拌した後、10 分間室温静置した。懸濁物より上清を回収し、量の 40% (v/v) グリセロールと混合し、これを胞子懸濁液とした。胞子懸濁液は、-20°C または -80°C で保存した。

2-5 最小生育阻止濃度の決定

エリスロマイシン (ナカライテスク株式会社)、ストレプトマイシン (ナカライテスク株式会社)、チオストレプトン (シグマアルドリッチ)、リファンピシン (富士フロン和光純薬株式会社)、およびオフロキサシン (富士フロン和光純薬株式会社) のいずれかを含む GYM 寒天培地を 4 割し、放線菌の胞子を 1 区画あたり 1×10^5 CFU (colony forming unit) に接種し、30°C で 3-7 日間培養した後、顕著な生育阻害が見られた薬剤濃度を最小生育阻止濃度 (MIC) とした。

2-6 乾燥菌体重量および生育の測定

S. coelicolor A3(2)もしくは *S. lividans* 66 の胞子 (2×10^6 CFU) をそれぞれ R4、もしくは YEME 液体培地〔20 ml 培地 100 ml 容三角フラス

コ)]に接種し、2-3 のと同様に培養した。菌体はろ紙 No. 2、東洋濾紙株式会社)を用いて、培養液を吸引ろ過することで集菌した。その際、ろ紙への培地成分の残留を防ぐため、RO 水で数回洗浄した。恒量を計量するため、ろ紙を 55°Cで一晩乾燥した。集菌後のろ紙の恒量より、ろ紙のみの恒量を差し引いた値を乾燥菌体重量とした。

YEME 液体培地 100 ml 培地 / 500 ml 容三角フラスコ)を用いた培養では、放線菌の孢子 (1×10^7 CFU) 接種し、培養液の A_{450} 値を測定し、生育の評価を行った。

2-7 抗生物質生産の評価

青色色素抗生物質アクチ ロージン

寒天培養では、*S. coelicolor* A3(2)もしくは *S. lividans* 66 の孢子 (5×10^5 CFU) をそれぞれ GYM、R4、もしくは MR5 寒天培地に接種し、30°C で 5~7 間培養した。アクチ ロージンの生産は青色色素の生産量を視覚的に判定した。懸濁液を作製していない菌株に いては、GYM 寒天培地で培養した菌体を爪楊枝で掻き取り、本培養用の寒天培地に移植し、培養を行った。

液体培養におけるアクチ ロージン生産量は以下のように測定した。*S. coelicolor* A3(2) と *S. lividans* 66 の孢子 (2×10^6 CFU) を R4、または YEME 液体培地 [20 ml 培地 100 ml 容三角フラスコ)]に接種し、30 °C、200 rpm、7 間培養した。250 μ l もしくは 500 μ l の培養液を量りとり、 量の 2M KOH を加え、ボルテックスミキサーを用いて十分に混合し、遠心分離 (6,000 \times g、10 分間) した。遠心分離後の上清を回収し、 A_{640} 値を測定した。吸光度の測定は SMART SPEC PLUS (BIO-RAD) を用いた。

赤色色素抗生物質ウンデシルプロジ オシン

寒天培養におけるウンデシルプロジ オシン生産は、アクチ ロージン生産評価の場合と同様の培養を行い、評価する際には、寒天培地の裏側から観察し、菌体の赤色の色調を視覚的に評価した。

液体培養では、放線菌をアクチロージン生産評価の際と同様の培養をした後、500 μ l の培養液を量りとり、遠心分離 (13,000 \times g、10 分間) 後、上清を完全除去した。得られた菌体に 500 μ l のメタールナカライテクス株式会社) を添加し、ボルテックスミキサーで攪拌 (室温、1 時間) することでウンデシルプロジオンシンを抽出した。500 μ l の 1M HCl を抽出液に添加し、十分に混合した後、遠心分離 (13,000 \times g、10 分間) 後の上清を回収し、A₅₃₀ 値を測定した。

2-8 変異遺伝子の特定

染色体 DNA の調製

ゲノム解析用の染色体 DNA の調製は以下の通りに行った。*S. coelicolor* A3(2) もしくは *S. lividans* 66 の孢子 (1 \times 10⁷ CFU) を YEME 液体培地 [100 ml 培地 500 ml 容三角フラスコ] に接種し、A₄₅₀ 値が 0.4 から 0.8 に達するまで培養した。培養液を 50 ml チューブに移し、遠心分離 (2,500 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) した。上清除去後、10 ml の STE Buffer [10mM Tris-HCl pH 8.0)、10 mM EDTA pH 8.0)、150 mM NaCl] で菌体を 2 回洗浄し、遠心分離 (2,500 \times g、4 $^{\circ}$ C、5 分間) 後、上清を除去した。終濃度 1 mg/ml となるようリゾチー (From chicken egg white、シグマアルドリッチ) を添加した 5 ml の STE Buffer に懸濁し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。30 μ l の 20mg/ml Proteinase K 溶液 (タカラ イオ株式会社) を加えて反転混合し、550 μ l の 10% (w/v) SDS 溶液 (終濃度 1%) を添加し、反転混合した後、55 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。量のフェール/クロロホルム /イソアミルアルコール (PCI) = 25 : 24 : 1 (ニッポンジーン株式会社) を加え、30 分間穏やかに混合し、遠心分離 (890 \times g、4 $^{\circ}$ C、10 分間) 後、上清を新しい 50 ml チューブに移した。PCI 処を 2 回行い、得られた上清に 2 μ l の 10mg/ml RNaseA (タカラ イオ株式会社) を添加し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間静置した。PCI 処をさらに 3 回行い、得られた上清に対して 1/10 量の 3M の酢酸ナトリウム (pH 5.2) を添加し反転混合した後、量の 99.5%エタール (富士フロン和光純薬株式会社) を加えた。沈殿をガラス棒で巻き取り、70%エタールで洗浄後、風

乾した。得られた DNA を適量の TE Buffer [10 mM Tris-(Hydroxymethyl) Aminomethane-HCl pH 8.0)、1 mM EDTA pH 8.0)] に溶解後、230 nm、260 nm、280nm の吸光度を測定し、DNA 濃度が 1 mg/ml 以上および A₂₆₀/A₂₃₀ が 1.8 以上であることを確認した。

次世代シーケンサーによる ゲノム解析

S. coelicolor A3(2) および *S. lividans* 66 の ゲノム解析は、対象菌株の染色体 DNA を用い、ユーロフロン・ジェミクス株式会社、または大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センターに委託し、Table 2-8 に示す条件で解析を行い、各菌株の変異候補を抽出した。変異候補は個別に DNA シーケンシングを行い、親株の配列と比較することにより変異の有無を確認した。

Table 2-8. The performance specification of Next-generation sequencing

	Sequencer	Method	Read length	Called Bases
<i>S. coelicolor</i> A3(2)				
1147	Hiseq2500	Paired-end	125bp/read	3.6 Gb
SUIC-15	Hiseq2500	Paired-end	125bp/read	4.7 Gb
SUIC-16	Hiseq2500	Paired-end	125bp/read	3.3 Gb
<i>S. lividans</i> 66				
1326	MiSeq	Paired-end	125bp/read	3.5 Gb
SLE259	MiSeq	Paired-end	125bp/read	3.2 Gb
SUIC-17	MiSeq	Paired-end	125bp/read	3.9 Gb

遺伝子特異的プライマーの作成

Strepdb (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/cgi-bin/dc3.pl?accession=AL645882&start=4291472&end=4302043&iorm=map&width=900>)、または GenBank より目的の塩基配列を抽出し、その配列情報を基に Primer BLAST を用いて、プライマーを設計した。設計したプライマーはユーロフロン・ジェミクス株式会社、北海道システムサイエンス株式会社、もしくは株式会社マクロジェン・ジャパンに外部委託し、合成した。

特定の DNA 配列における変異の特定

PCR

PCR には、DNA ポリメラーゼとして、Tks Gflex™ DNA Polymerase (タカラ イオ株式会社) を使用した。Table 2-9 の組成で反応液を調製し、付属の操作マニュアルに従い PCR を行った。使用したプライマーは、Table 2-10 に記載した。目的の増幅断片が得られない場合やマイナーバンドがある場合には、アニーリングや伸長反応の温度および時間を適宜調節した。サーマルサイクラーには、Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) および GeneQ (Bioer Technology Co., Ltd) を使用した。

コロニーPCR の際には、対象菌株の胞子を、GYM 寒天培地に接種し、30°C、1 晩培養した。爪楊枝で菌体を突くように掻き取り、PCR 反応液に懸濁した。ただし、反応液 (Table 2-9) は、菌 MilliQ 水を 8.8 µl とした。

Table 2-9. Reaction mixture for PCR

2× Gflex PCR Buffer (Mg ²⁺ , dNTP plus)	10 µl
Forward primer (10 pmol/µl)	0.4 µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0.4 µl
Tks Gflex DNA Polymerase (1.25 units/µl)	0.4 µl
Template DNA (genomic DNA) (0.1 or 1 ng/µl)	1 µl
Sterilized MilliQ water	7.8 µl
Total volume	20 µl

アガロースゲル電気泳動

アガロースゲルはアガロース S (ニッポンジーン株式会社) を終濃度 1.0 % (w/v) となるように TAE buffer (pH 8.3) (ニッポンジーン株式会社) に溶解し、10 mg/mL 臭化エチジウム溶液 (ナカライテスク株式会社) をアガロースゲル 40 ml あたり 5 µl 添加して作製した。電気泳動装置は、Mupid-2plus (ADVANCE) を用いた。分子サイズマーカーは、WATSON

1kb ラダーマーカー (WATSON) もしくは FastGene™ 1kb DNA Ladder PLUS (本ジェネテクス株式会社) を用いた。

PCR 産物の精製

増幅した DNA 断片の精製には、FastGene™ ゲル/PCR 抽出キット (本ジェネテクス株式会社) を使い、付属のマニュアルに従って、精製した。

DNA シーケンシング

精製が完了した増幅 DNA 断片は、ユーロフンジェミクス株式会社に委託して、DNA シーケンシングを行った。

Table 2-10. Primers used in this study

Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')
DNA sequence	
<i>rrn</i> -23S rRNA-F	CTGAAACCGTGTGCCTACAAG
<i>rrn</i> -23S rRNA-S1	GCAAAATGCCCCCGTAACTTC
<i>rrnA</i> -23S rRNA-R	CGAGTCCACGGTGAAAACAC
<i>rrnB</i> -23S rRNA-R	GTACCGCAAGTCATTCTCGC
<i>rrnC</i> -23S rRNA-R	GAGGATGTTTCGGGATGGTGAG
<i>rrnD</i> -23S rRNA-R	GCCTACCTGGA ACTCAAAGC
<i>rrnE</i> -23S rRNA-R	CATTGCTGCAGTACCCATACG
<i>rrnF</i> -23S rRNA-R	GAACACCGTCGTTGTCGAAG
SCO0829-F	CAGACCGAGCAGGCACTC
SCO0829-R	TGCGTGGGGTTCAGCAG
SCO1695-F	ACCGCCTCGTCTGGAAGTA
SCO1695-R	ACACAGCTGCACCATTCCC
SCO1710-F	TGAAGATGAGCCTGGTTCGTG
SCO1710-R	TTGAACCAGTACAGCCTGGG
SCO3231-F	CTACAACATCCCACCACCC
SCO3231-R	TCACTGGCGATGTGGTGC
SCO3491-F	CGACCGAGAACCCTTTTC
SCO3491-R	CGAACAGGAGATAGAGGAGCG
SCO3849-F	GTTACCAGCAAGTACCGCA
SCO3849-R	CTTCTCGGCCTGTTTGTCGG
SCO4316-F	GAAAAACGGTTGGCCCGTG
SCO4316-R	CGGTGATGTCGAGGGACTC
SCO5002-F	CAAGCCGTCCAAGACGTACC
SCO5002-R	CAAGAGTGAAGAAGAGGCG
SCO5282-F	TGCGGTTTCATCACGGTCTTC
SCO5282-R	GACGATGTTCTCCAGCACCG
SCO6274-F	CTGTCCGATGCCGAAGGG
SCO6274-R	GCCAGCCAGTCCTGTACG
SCO6700-F	CACTTCTCGGTGTTTCGGCTC
SCO6700-R	GGTGTCCGTCCTCGTCATGG
SCO6683-F	GATCTGCTCCTGCGCGAC
SCO6683-R	CCTCCAGGGCTTCCAGCA
SCO6897-F	ACCATCCTCATCCTTCTGCTG
SCO6897-R	TGGAAGTCTCGGTGATGG
SCO7752-F	ACGAACACCTACCGCATCG
SCO7752-R	TTTCGGGTGTTTCGTCCGTG
<i>rpoB</i> -F	GGCCCTCGGCTGGACCCCG
<i>rpoB</i> -R	CGATCAGACCGATGTTTCGGG
<i>rpoB</i> -S1	GACGACATCGACCACTTC
RT-PCR	
<i>actII-orf4</i> -F	TGATCGACGAGGACGAACTCG
<i>actII-orf4</i> -R	ATTTCGCGTCGATACGGAGCTG
<i>hrdB</i> -F	CGTGTCGGCCAGCACATCC
<i>hrdB</i> -R	CTGCTGGTCACCGGCTTCG

2-9 変異発生率の評価

S. coelicolor A3(2) の孢子 1×10^6 CFU) を GYM 寒天培地に接種し、30℃で 7 日間培養した。培養プレートより、孢子懸濁液を調製し、1 ml 薬剤 (リファンピシン 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 入り GYM 寒天培地に接種し、30℃、7 日間培養した。出現してきた耐性コロニーを同濃度の薬剤入り GYM 寒天培地に移植し、30℃、7 日間培養後、親株に比べ生育が顕著に良好な菌株を薬剤耐性変異株とした。変異発生率は、得られた耐性株数を接種孢子数で除することで算出した。

S. lividans 66 の孢子 1×10^6 CFU) を GYM 寒天培地に接種し、30℃で 7 日間培養した。培養プレートより、孢子懸濁液を調製し、凍結保存した後、孢子懸濁液の孢子濃度を調べた。薬剤 (リファンピシン 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ストレプトマイシン 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、チオストレプトン 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、もしくはオフロキサシン 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 入り GYM 寒天培地 1 プレートあたり、 1×10^8 CFU 相当の孢子懸濁液を接種し、30℃、7 日間培養を行い、薬剤耐性株を出現させた。出現してきた耐性コロニーを同濃度の薬剤入り GYM 寒天培地に移植し、30℃、7 日間培養後、親株に比べ、顕著に生育が良好な菌株を薬剤耐性変異株とした。変異発生率は、得られた耐性変異株数を接種孢子数で除することで算出した。なお、本評価において、リファンピシン (RNA ポリメラーゼを標的とする抗生物質) 耐性変異に限定した変異発生率の評価になることを避けるため、チオストレプトン [リボソーム 50S サブユニットを標的とする抗生物質 エリスロマイシンとは標的とする部位が異なる]、ストレプトマイシン [リボソーム 30S サブユニットを標的とする抗生物質]、およびオフロキサシン [DNA トポイソメラーゼ IV および DNA ジャイレースを標的とする抗生物質] という作用標的が異なる抗生物質を用いて、リファンピシンと同様の検討を行った。

2-10 mRNA 遺伝子発現解析

RNA の調製

S. coelicolor A3(2) もしくは *S. lividans* 66 をセロハンフィルムを敷いた MR5 寒天培地で培養後、2ml マイクロチューブに菌体 (およそ 65mg) を

かき取り、液体窒素で速やかに凍結し、使用時まで -80°C で保存した。

RNA の調製は、Sepasol[®]-RNA I Super G (ナカライテスク株式会社)、および High Pure RNA Isolation Kit (ロシュ・ダイアグステックス株式会社)を用いて以下の通りに行った。菌体を終濃度 10 mg/ml となるようにリゾチー (シグマアルドリッチ) を添加した $200\ \mu\text{l}$ の Lysis Buffer [$50\text{ mM Tris-HCl (pH 8.0)}$ 、 50 mM EDTA 、 $20\% (w/v)$ スクロース] に懸濁し、激しく攪拌後、 30°C で 10 分間静置した。 1 ml の Sepasol[®]-RNA I Super G を添加し、 30 秒反転混合後、 50°C で 10 分間静置した。 $200\ \mu\text{l}$ のクロロホルム (富士フロン和光純薬株式会社) を添加後、激しく攪拌し、室温で 3 分間静置した。遠心分離 ($12,000\times g$ 、 4°C 、 15 分間) 後、水層の $650\ \mu\text{l}$ を新しい 1.5 ml チューブに移し、等量の 2-プロパノール (富士フロン和光純薬株式会社) を添加した。激しく混合後、室温で 10 分間静置し、遠心分離 ($12,000\times g$ 、 4°C 、 15 分間) 後の上清を除去した。 1 ml の 75% エタノールを添加後、激しく攪拌し、遠心分離 ($12,000\times g$ 、 4°C 、 15 分間) 後、上清を完全に除去し、 5 分間風乾した。 $42\ \mu\text{l}$ の DEPC 処理水 (ナカライテスク株式会社) で沈殿を溶解し、 $1\ \mu\text{l}$ の RNase Inhibitor $20\text{ U}/\mu\text{l}$ 、アプライドバイオサイエンス株式会社)、 $5\ \mu\text{l}$ $10\times$ DNase I Buffer (タカラバイオ株式会社)、および $2\ \mu\text{l}$ の Recombinant DNase I $5\text{ U}/\mu\text{l}$ 、タカラバイオ株式会社) を添加し、 37°C で 30 分間静置後、 $150\ \mu\text{l}$ の DEPC 処理水を加えて量を $200\ \mu\text{l}$ とした。得られた RNA 溶液の精製は、High Pure RNA Isolation Kit を用いて、添付マニュアルの protocols に従って行った。精製後、 230 nm 、 260 nm 、および 280 nm の吸光度を測定し、 A_{260}/A_{280} および A_{260}/A_{230} の値が 1.8 以上であることを確認した。

半定量 RT-PCR

RNA から cDNA への逆転写反応は、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ・ダイアグステックス株式会社) を用いて行った。 $1\ \mu\text{g}$ の RNA、および $1\ \mu\text{l}$ のランダムヘキサマープライマー ($600\text{ pmol}/\mu\text{l}$) を使用し、付属の操作マニュアルに従い逆転写反応 55°C 、

30分、量 10 μ l) を行い、逆転 反応物を得た。

PCR には、DNA ポリメラーゼとして、Tks Gflex™ DNA Polymerase (タカラ イオ株式会社) を使用した。使用したプライマーは、Table 2-10 に記載した。プライマーの合成は、2-9 遺伝子特異的プライマーの作成と同様に行った。Table 2-9 と同様の組成で反応液を調製し、Tks Gflex™ DNA Polymerase の付属のマニュアルに従い、PCR を行った。ただし、Table 2-9 の反応液のうち、Template DNA (genomic DNA) の代わりに、逆転 反応物 1 μ l を加え、PCR を行った。目的の増幅断片が得られない場合やマイナー ンドがある場合には、アニーリングや伸長反応の温度および時間を適宜調節した。サーマルサイクラーには、Applied Biosystems Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) および GeneQ (Bioer Technology Co., Ltd) を使用した。

2-11 タンパク質発現解析

タンパク質抽出液の調製

2-3 に従い、*S. lividans* 66 をセロハンフル を敷いた MR5 寒天培地で培養後、2 ml マイクロチューブに菌体 (およそ 65mg) をかき取り、液体窒素で速やかに凍結し、使用時まで -80°C で保存した。菌体を融解後、1 mM の PMSF (富士フル 和光純薬株式会社) を含む TMA-I Buffer [10 mM Tris-HCl(pH 7.7)、30 mM CH₃COONH₄、5 mM Mg(CH₃COO)₂、1 mM DTT、20% (v/v) グリセロール] で洗浄し、2.4 g のジルコニアボール (直径 0.6 mm、Nikkato、Co.、Ltd.) と 1mM の PMSF を含む TMA-I Buffer を 500 μ l 加えた。ビーズクラッシャー μ t-12 (株式会社 TAITEC) を用いて菌体の破碎 (3,200 rpm、30sec) と冷却 (4°C、3 分間) を 6 回繰り返した後、遠心分離 (14,800 rpm、4°C、20 分間) し、上清を新しい 1.5 ml チューブに移した。得られた上清をセルロースチューブ (透過分子量 14,000 MWCO、孔径 50 Å、エーデ ア株式会社) に移し、細胞抽出物の 60 倍量以上の TMA-I Buffer 中で透析 (3 時間、2 回) した。透析後のサンプルを遠心分離 (14,800 rpm、4°C、10 分間) し、得られた上清を タンパク質抽出物とした。試料のタンパク質濃度は、BIO-RAD

protein assay (イオ・ラッド株式会社)を用い、Bradford法で測定した。

ウエスタンブロッティング

得られたタンパク質抽出物(タンパク質 5-10 µg 相当)を当量のEzApply(アトー株式会社)と混合した。沸騰水中で5分間静置した後、これを15%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動に供した。分子マーカ―には、CLEARLY Stained Protein Ladder(タカラ イオ株式会社)を使用し、電気泳動は、Running Buffer [1.44% Glycin、0.3% Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane、0.1% SDS] とスラブ電気泳動装置 MODEL BE-211、株式会社 イオクラフト)を用いて、20-30 mA の定電流で行った。

泳動後のゲルは 20% (v/v) エタールに 5 分間浸し、iBlot®2 Gel Transfer Device(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)および iBlot®2 PVDF Mini Stacks(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)を用いてポリアクリルアミドゲルに含まれるタンパク質を PVDF 膜へ転写した。転写後の膜を、10 ml の Blocking One(ナカライテスク株式会社)で振とう処理(4°C、3 時間)した後、0.1% の Tween 20 [polyoxyethylene(20)Sorbitan Monolaurate、ナカライテスク株式会社] を含む TBS-T Buffer (EzTBS、アトー株式会社)で洗浄した。イエンハンサーA(富士フイル和光純薬株式会社)で希釈(1:500)した一次抗体 [211-MGRRAEALESYRNL-224 (ActII-ORF4)、数字は *S. coelicolor* A3(2)におけるアミノ酸残基の位置を示す] に膜を浸し、一次抗体反応を行った(4°C、一晚)。一次抗体反応後、TBS-T Buffer で PVDF 膜を洗浄し、イエンハンサーB(富士フイル和光純薬株式会社)で希釈(1:20000)した抗ウサシ抗体に PVDF 膜を浸し、二次抗体反応(室温、1 時間)を行った。TBS-T Buffer で PVDF 膜を洗浄し、ECL Prime(GEヘルスケア イオサイエンス)を用いて化学発光による目的タンパク質の検出を行った。化学発光は ImageQuant LAS 500(GEヘルスケア イオサイエンス)で検出した。

3. 結果

3-1 *S. coelicolor* A3(2)におけるエリスロマイシン耐性と抗生物質高生産に寄与する変異の解析

rrnA-23S rRNA-A2302T 変異と *nsdA* T680G 変異の単独での性質を調べるため、*S. coelicolor* A3(2)の親株にそれぞれの変異を遺伝子置換により導入した菌株を用いて、特性解析を行った。*rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異置換株を生成したところ、抗生物質非生産性の菌株と高生産性の菌株が同程度の割合で取得された。そのため、非生産株の代表として SUIC-15 (*rrnA*+1) と高生産株の代表として SUIC-16 (*rrnA*+6) を以降の解析に供した。

エリスロマイシン耐性

S. coelicolor A3(2) の親株 1147、自然突然変異株 SCE234、*nsdA* 変異置換株 SUIC-14、*rrnA* 変異置換株 SUIC-15 および SUIC-16 に対するエリスロマイシンの MIC を Table 2-11 および Fig. 2-3 のように決定した。エリスロマイシンの MIC については、SUIC-14 は親株程度であったが、*rrnA*-23S rRNA 変異株 (SCE234、SUIC-15、SUIC-16) は親株の 16 倍であった。

Table 2-11. Resistance levels of various mutants of *S. coelicolor* A3(2)

Strain (Relevant genotype)	Mutation on the		Resistance level ($\mu\text{g/ml}$) to Ery ^a
	<i>nsdA</i>	23S rRNA	
1147 (Parent)	ND	ND	25
SCE234 (<i>rrnA nsdA</i>)	T680G	<i>rrnA</i> -A2302T	400
SUIC-14 (<i>nsdA</i>)	T680G	ND	25
SUIC-15 (<i>rrnA</i> +1)	ND	<i>rrnA</i> -A2302T	400
SUIC-16 (<i>rrnA</i> +6)	ND	<i>rrnA</i> -A2302T	400

^a Determined after incubation on agar medium at 30°C for 7 days.

Abbreviations: Ery, erythromycin ; ND, Not determined.

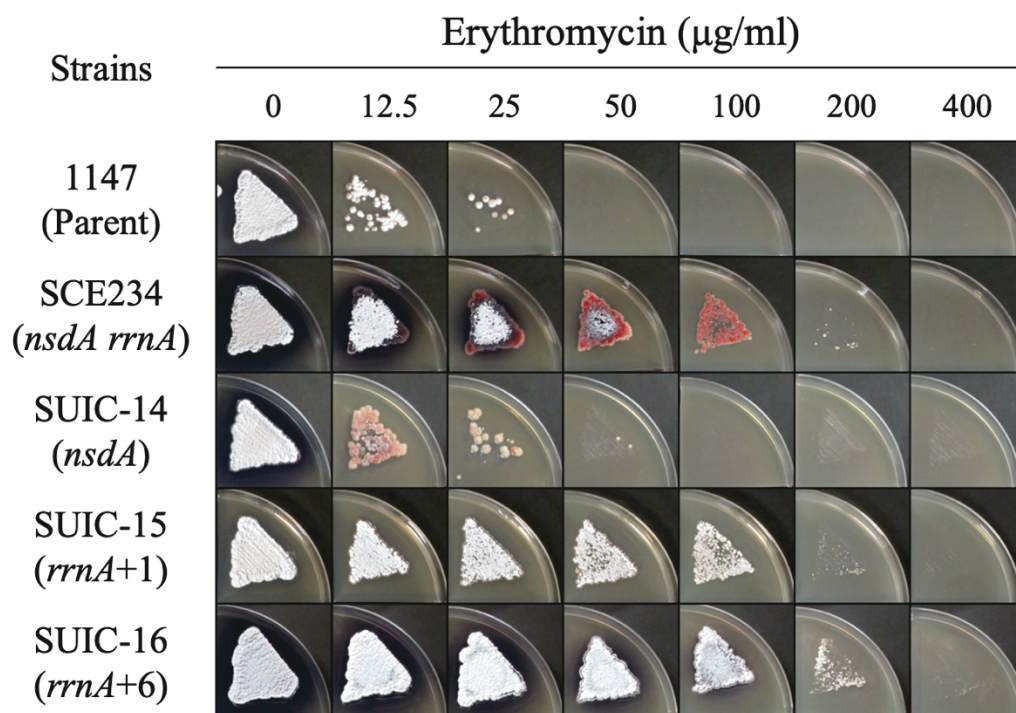


Fig. 2-3. Erythromycin resistance in *S. coelicolor* A3(2) strains
 Strains were inoculated onto GYM agar medium and incubated at 30°C for 7 days.

抗生物質生産

エリスロマイシン耐性の評価と同様の菌株を対象として、抗生物質生産性を寒天培養と液体培養にて評価した。

寒天培養の結果、GYM、MR5、および R4 寒天培地のい れにおいても、SCE234 と SUIC-16 が青色抗生物質アクチノロージンを高生産することが判明した (Fig. 2-4)。SUIC-14 は微弱なアクチノロージン高生産化を示した。SUIC-15 では高生産化が認められなかった。

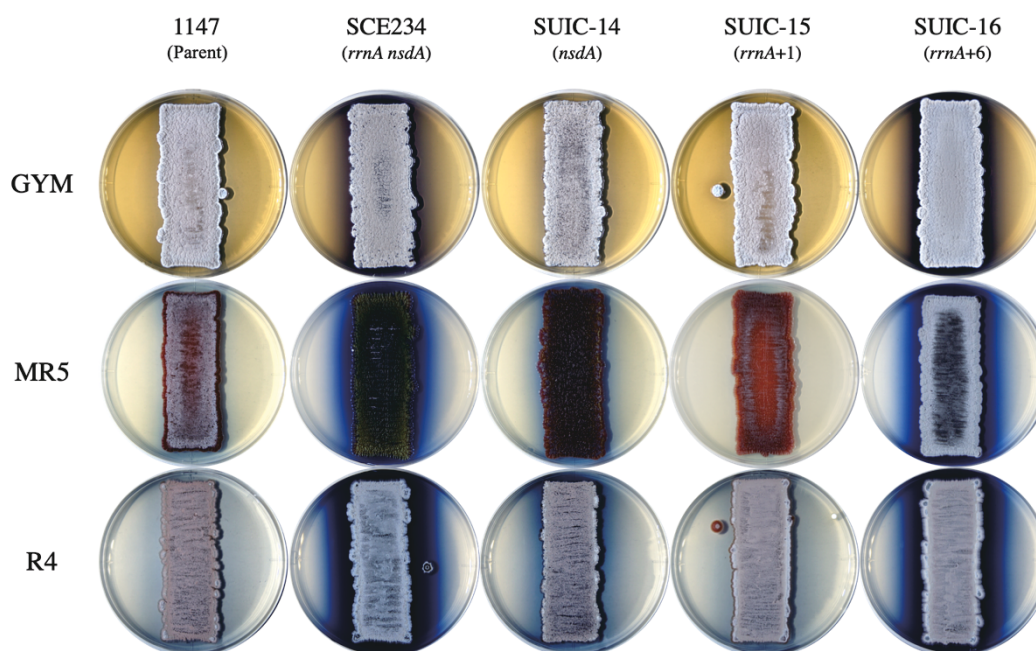


Fig. 2-4. Actinorhodin production by *S. coelicolor* A3(2)

Strains were inoculated onto GYM, MR5, or R4 agar medium and incubated at 30°C for 7 days.

液体培養の結果、SCE234 において、アクチロージンと赤色抗生物質ウンデシルプロジオシンの劇的な高生産（それぞれ親株の 23 倍および 59 倍の生産量）が認められた（Fig. 2-5）。SUIC-14 は、アクチロージンは親株の 1.6 倍、ウンデシルプロジオシンは親株の 2.3 倍の高生産化を示した。SUIC-16 では、親株に比べて、2.1 倍のアクチロージン生産増加および 7.8 倍のウンデシルプロジオシン生産増加が確認された。SUIC-15 では、色素抗生物質の高生産化は認められなかった。

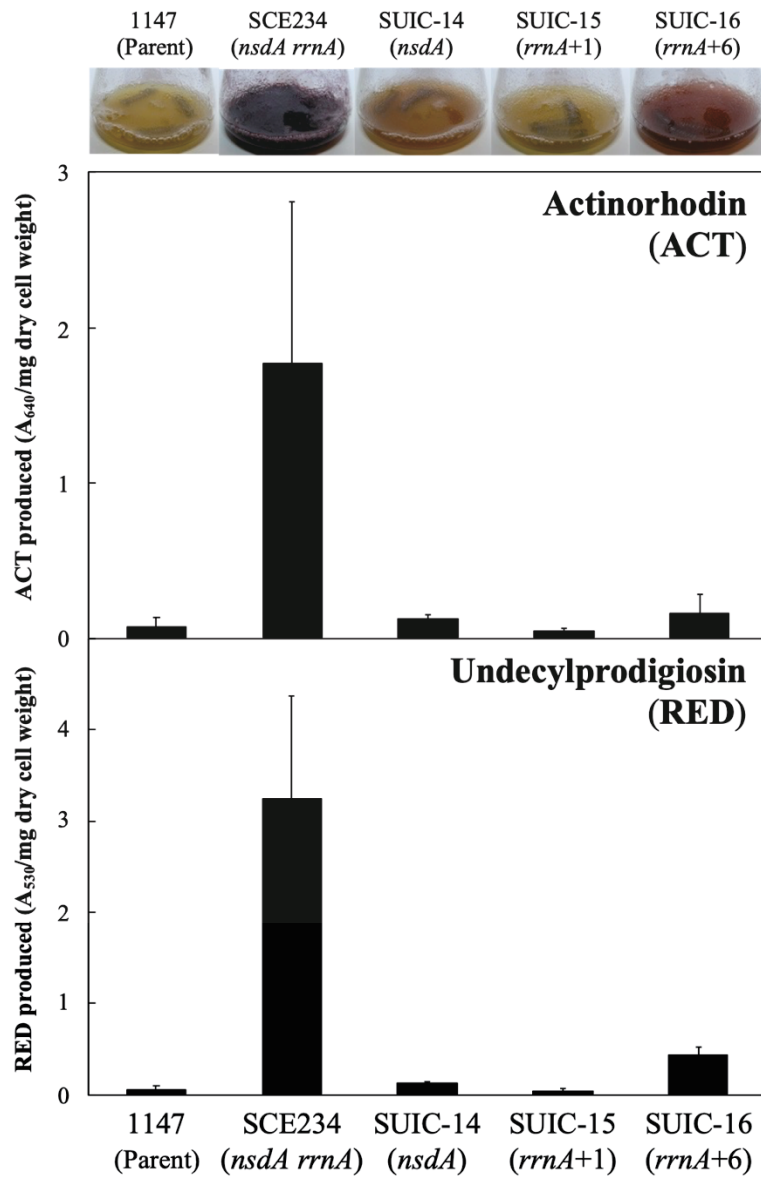


Fig. 2-5. Effects of the *rrnA*-23S rRNA-A2302T mutation and the *nsdA* T680G mutation on antibiotic production
 Strains were inoculated into YEME liquid medium and incubated at 30°C for 7 days with shaking at 200 rpm.

ゲ 解析

抗生物質生産性に関して相反する性質を示した *rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異導入株 SUIC-15 および SUIC-16 の ゲ 解析により、同定された変異を Table 2-12 に示した。なお、遺伝子置換により導入したものの、ゲ 解析により変異候補として抽出されなかった *rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異も Table 2-12 に加えた。

SUIC-15 は、*sco6274* 黄色色素 coelimycin P1 合成 素遺伝子)と *rrnA*-23S rRNA に点変異を有していた。一方、SUIC-16 は、*sco1695* 機能未知タンパク質遺伝子)、*sco3231* カルシウ 依存性抗生物質合成 素遺伝子)、*sco5282* 二成分制御系のセンサーキナーゼ遺伝子)、*sco6274* 黄色色素 coelimycin P1 合成 素遺伝子)、*sco6683* ABC トランスポーター遺伝子)、*sco6700* プロトカテク酸-3,4-ジオキシゲナーゼ遺伝子)と *rrnA*-23S rRNA 遺伝子に点変異を有していた。両菌株において、*rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異と *sco6274* T8921A 変異の保有が認められた。

Table 2-12. Summary of mutations in 23S rRNA mutants of *S. coelicolor* A3(2)

Strain	Gene	Gene Classification	Product	Position	Reference	Alteration	Mutation
SUIC-15	<i>SCO6274</i>	Secondary metabolism	Type I polyketide synthase	6909223	T	A	Transversion
	<i>rrnA</i>	Translation	23S rRNA (ribosome)	4534755	A	T	Transversion
SUIC-16	<i>SCO1695</i>	Others	Hypothetical protein	1817235	T	C	
	<i>SCO3231</i>	Secondary metabolism	CDA peptide synthase II	3569065	G	A	Transition
	<i>SCO5282</i>	Others	Two-component system sensor kinase	5754763-5754764	GC	AA	Transition & Transversion
	<i>SCO6274</i>	Secondary metabolism	Type I polyketide synthase	6909223	T	A	Transversion
	<i>SCO6683</i>	Transporter	ABC transporter	7423299	C	A	Transversion
	<i>SCO6700</i>	Others	Protocatechuate 3,4-dioxygenase beta subunit	7452468	G	C	Transversion
	<i>rrnA</i>	Transcription	23S rRNA (ribosome)	4534755	A	T	Transversion

3-2 *S. lividans* 66 におけるエリスロマイシン耐性と抗生物質高生産に寄与する変異の解析

rrnC-23S rRNA-A2281G 変異の性質を調べるため、*S. lividans* 66 の親株に同変異を遺伝子置換により導入したところ、抗生物質非生産性の菌株が取得された。そのため、非生産株の代表として SUIC-17 (*rrnC*) を代表株として、以降の解析に供試した。

エリスロマイシン耐性

S. lividans 66 の親株 1326、自然突然変異株 SLE259 および *rrnC*-23S rRNA 変異置換株 SUIC-17 のエリスロマイシンへの MIC を Table 2-13 および Fig. 2-6 のように 定した。エリスロマイシンの MIC は、*rrnC*-23S rRNA 変異株 (SLE259、SUIC-17) は親株の 16 倍以上であった。

Table 2-13. Resistance levels of various mutants of *S. lividans* 66

Strain (Relevant genotype)	Mutation on the		Resistance level ($\mu\text{g/ml}$) to Ery ^a
	<i>nsdA</i>	23S rRNA	
1326 (Parent)	ND	ND	25
SLE259 (<i>rrnC</i>)	ND	<i>rrnC</i> -A2281G	>400
SUIC-17 (<i>rrnC</i>)	ND	<i>rrnC</i> -A2281G	>400

^a Determined after incubation on agar medium at 30°C for 7 days.

Abbreviations: Ery, erythromycin ; ND, Not determined.

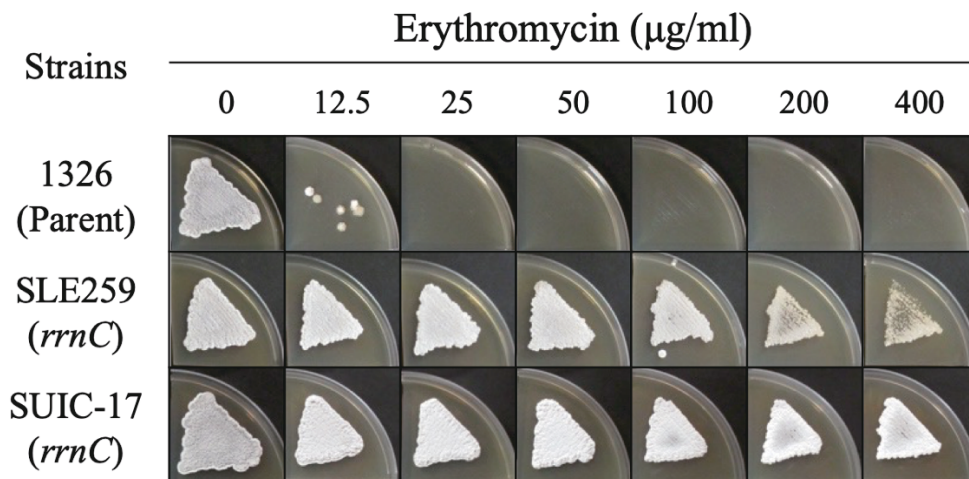


Fig. 2-6. Erythromycin resistance in *S. lividans* 66 strains
 Strains were inoculated onto GYM agar medium and incubated at 30°C for 7 days.

抗生物質生産

エリスロマイシン耐性の評価と同様の菌株の抗生物質生産性を寒天培養および液体培養にて評価した。

寒天培養の結果、R4 寒天培地で培養したときのみ、SLE259 でアクチロージンの高生産が認められた。GYM および MR5 寒天培養では、これらの菌株でも抗生物質高生産は認められなかった (Fig. 2-7)。

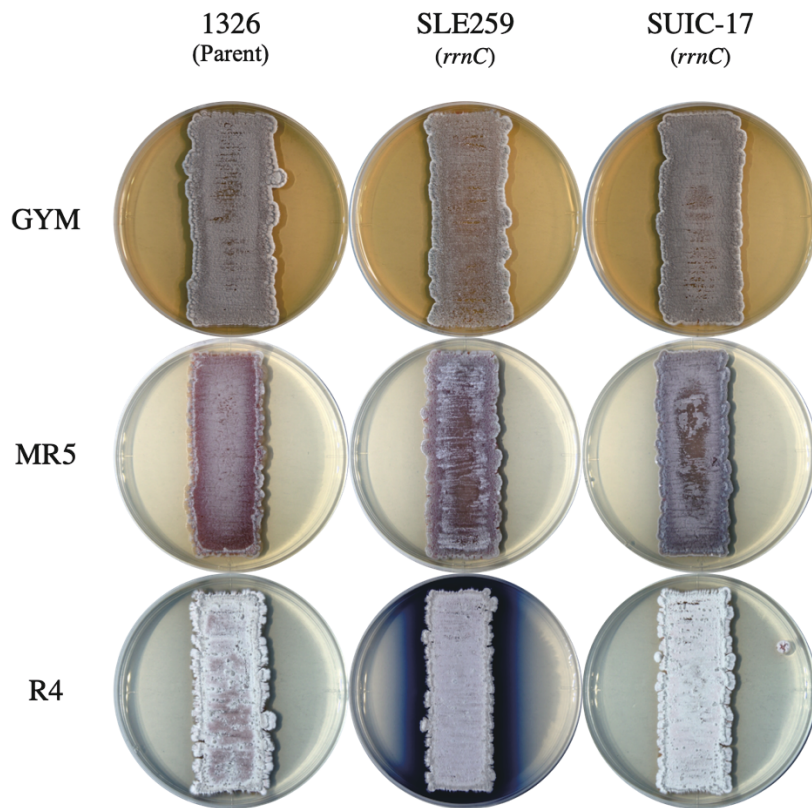


Fig. 2-7. Actinorhodin production by *S.lividans* 66
Strains were inoculated onto GYM, MR5, or R4 agar medium incubated at 30°C for 7 days.

液体培養の結果、SLE259 において、アクチノロージンとウンデシルプロジオシンの高生産（それぞれ親株に比べて 16.6 倍および 2.5 倍の生産）が認められた（Fig. 2-8）。SUIC-17 では抗生物質生産が、親株に比べて、大幅に低下することが判明した。

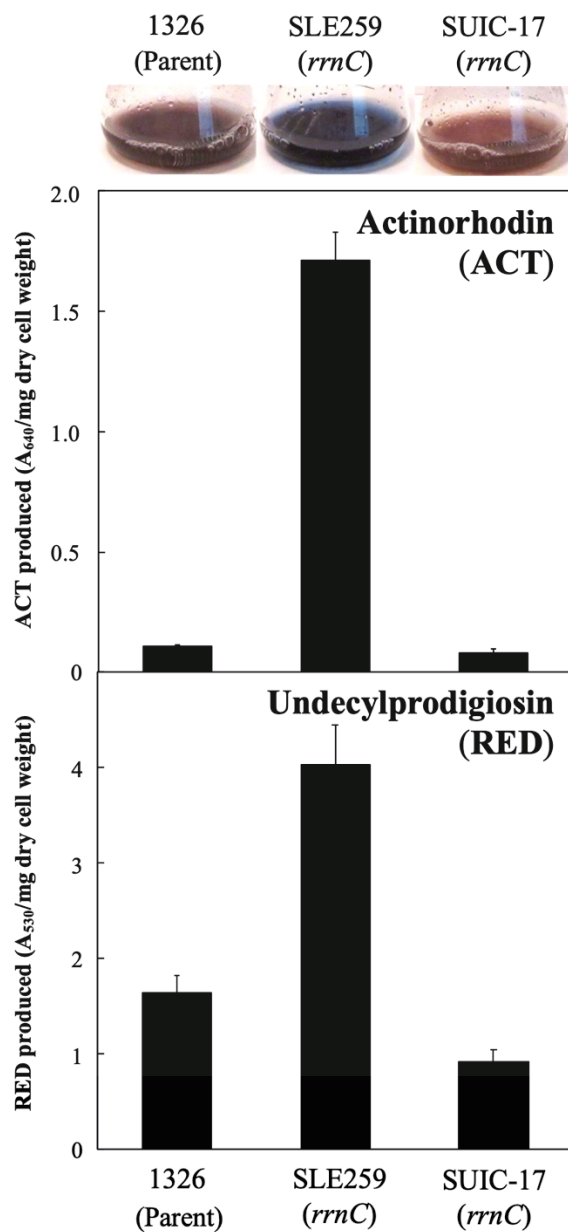


Fig. 2-8. Effects of the *rrnC*-23S rRNA-A2281G mutation on antibiotic production
 Strains were inoculated into R4 liquid medium and incubated at 30°C for 7 days with shaking at 200 rpm.

3-3 23S rRNA 変異が *S. coelicolor* A3(2) と *S. lividans* 66 の遺伝学的特性に与える影響の解析

結果 3-1 における解析により明らかとなった 23S rRNA 変異を有する *Streptomyces* 属放線菌 (SCE234、SUIC-15、SUIC-16) は複数の変異を持つ。事実から、「23S rRNA 変異に変異発生を高める性質があるのでは」という仮説が立てられた。そこで薬剤耐性変異株の出現度を指標とした遺伝的不定性の評価を行った。加えて、*S. lividans* 66 より取得したリファンピシン耐性変異株については、遺伝学および生化学的特性解析を行なった。

S. coelicolor A3(2)

変異発生率の評価

S. coelicolor A3(2) の親株 1147、自然突然変異株 SCE234、*nsdA* 変異置換株 SUIC-14、*rrnA* 変異置換株 SUIC-15 および SUIC-16 を対象として、リファンピシン耐性変異株の出現度を基に変異発生率を評価 (実験回数: 10 回) した。なお、本解析では、変異発生率を中央値を指標に評価し、遺伝的不定性は 10 回の実験のばらつきを基に評価した。

中央値 (Fig. 2-9 の上部に表記) を元に評価すると、抗生物質非生産性株 SUIC-15 は、親株に比べて変異発生率が高く、遺伝的にも不定であることが判明した (Fig. 2-9)。抗生物質高生産株 SCE234 や SUIC-16 では、変異発生率は親株程度であり、データのばらつきも小さく、遺伝的安定化も認められた。SUIC-14 の変異発生率は親株より低く、遺伝的に安定であった。

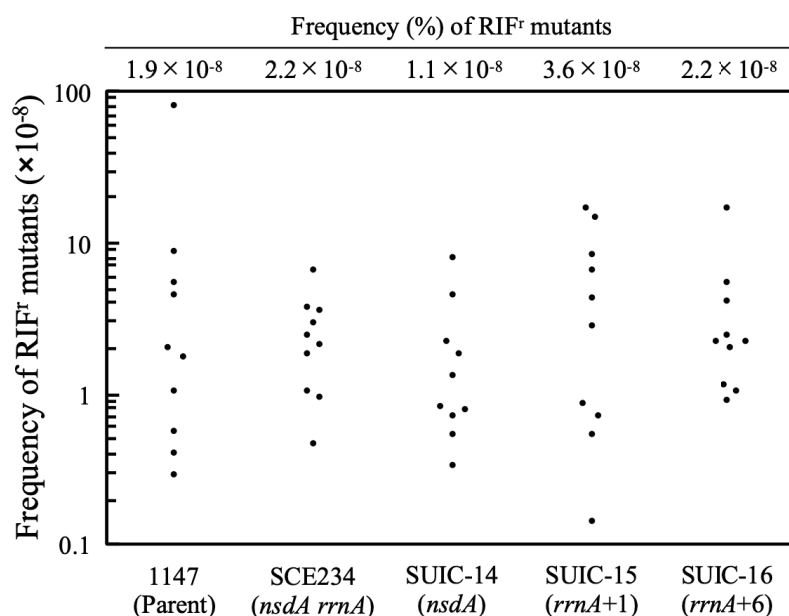


Fig. 2-9. Graphical representation of frequencies of RIF^r mutants generated in *S. coelicolor* A3(2) strains. Spores and hyphal fragments of *S. coelicolor* A3(2) strains were spread onto GYM agar medium containing 200 µg/ml rifampicin, which corresponds to an amount exceeding the MIC by 8-fold. After 7 days of incubation at 30°C, colonies that formed on the agar medium were transferred onto GYM agar medium containing rifampicin at a concentration of 8× MIC. Colonies that grew well on the rifampicin-containing agar plate were counted, and the number was used to calculate the frequency of RIF^r mutants, i.e., the number of spontaneous RIF^r mutants divided by the total number of CFU in the spores or hyphal fragments used. All of the trials in the experiment were independent (n=10). Each plot represents the frequencies of RIF^r mutants generated in each experiment. The values on the graph indicate the median value for frequencies of RIF^r mutants.

***S. lividans* 66**

変異発生率の評価

1326 および SUIC-17 の変異発生率を評価した (実験回数: 3~5 回)。接種胞子数を固定することにより、リファンピシン耐性変異株の出現数で変異発生率を評価できる実験を行なったところ、SUIC-17 で変異発生率の上昇が確認できた (Fig. 2-10)。SUIC-17 における薬剤耐性変異株の出現率の上昇が、リファンピシン特異的な現象であると考えられたため、同様の検討をチオストレプトン、ストレプトマイシン、およびオフロキサシンを用いて行った。その結果、これらの薬剤においても、SUIC-17 において、変異発生率の上昇が認められた (Fig. 2-11)。

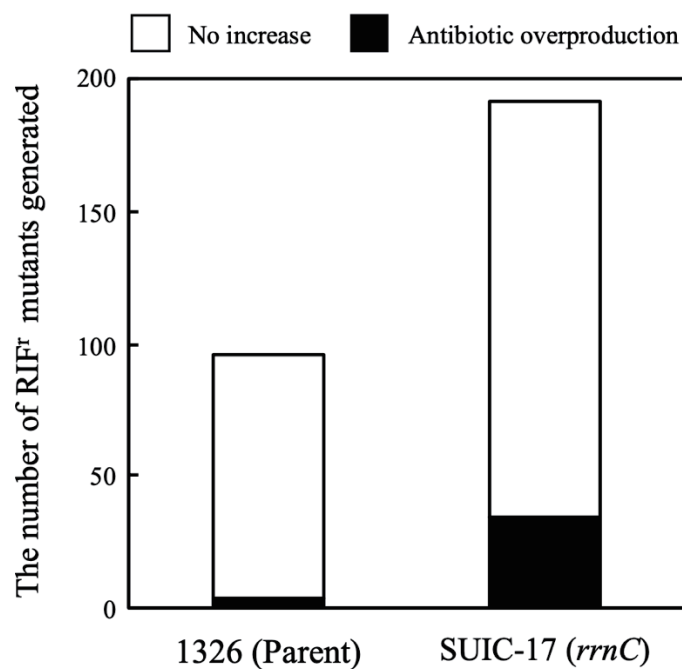


Fig. 2-10. The number of RIF^r mutants generated in *S. lividans* 66 strains
 Spores and hyphal fragments (5×10^8 CFU each) of strains 1326 (Parent) and SUIC-17 (*rrnC*) were spread on to GYM agar medium containing 200 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin, which corresponds to an amount exceeding the MIC by 4-fold. After 7 days of incubation at 30 °C, colonies that formed on the agar medium were transferred onto GYM agar medium containing rifampicin at a concentration of $4 \times \text{MIC}$. Colonies that grew well on the rifampicin-containing agar plate were counted. The value denotes the total number of RIF^r mutants obtained from five independent experiments. Graph bars show the numbers of RIF^r mutants corresponding to the blue-pigmented antibiotic actinorhodin (ACT)-non-overproducing strains (open bars) and ACT-overproducing strains (closed bars).

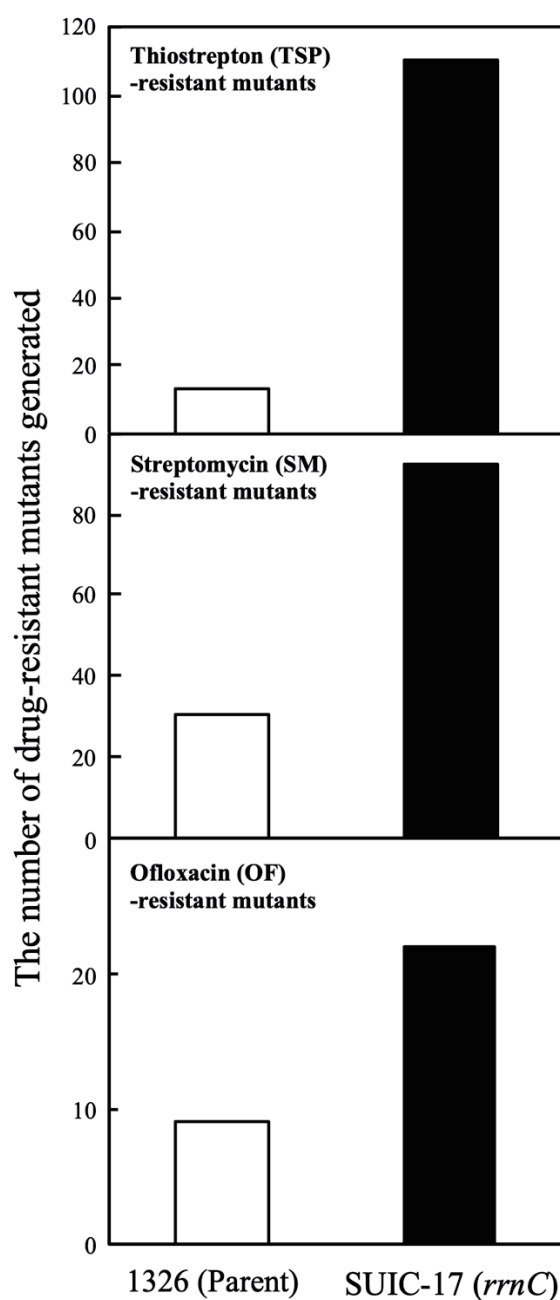


Fig. 2-11. Graphical representation of frequencies of drug-resistant mutants generated in *S. lividans* 66 strains

The number of antibiotic-resistant mutants generated in *S. lividans* 66 strains. Spores and hyphal fragments (5×10^8 CFU each) of strains 1326 (Parent) and SUIC-17 (*rrnC*) were spread on to GYM agar medium containing 10 $\mu\text{g/ml}$ thiostrepton (TSP), 20 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin (SM), and 25 $\mu\text{g/ml}$ ofloxacin (OF), which corresponds to an amount exceeding the MIC by 5-fold, 10-fold, and 5-fold, respectively. After 7 days of incubation at 30°C, colonies that formed on the agar medium were transferred onto GYM agar medium containing the antibiotics at a concentration of 5–10 \times MIC. Colonies that grew well on the antibiotic-containing agar plate were counted. The value denotes the total number of antibiotic-resistant mutants obtained from three independent experiments. Graph bars show the numbers of drug-resistant mutants obtained from strains 1326 (Parent) (open bars) and from strains SUIC-17 (*rrnC*) (closed bars).

変異株の抗生物質生産

S. lividans 66より取得したリファンピシン耐性変異株（親株由来 96株、SUIC-17由来 192株）をGYMおよびMR5寒天培地にて30°Cで7日間培養し、アクチロージン生産を評価した結果をFig. 2-10とTable 2-14および2-15に示した。親株由来のリファンピシン耐性変異株では、4%の菌株（4株/96株）、SUIC-17由来のリファンピシン耐性変異株では、18%の菌株（34株/192株）でアクチロージンの高生産が認められた（Fig. 2-10）。なお、Table 2-14および2-15におけるアクチロージン生産 ++ と評価したものを、抗生物質高生産株とし、Fig. 2-10を作成した。

変異の特定

抗生物質生産と同様の菌株の獲得変異を、*rpoB* 遺伝子（RNAポリメラーゼサブユニット遺伝子）*rif I* 領域のシーケンス解析により特定し、出現した変異とその数をFig. 2-12に示した。親株由来のリファンピシン耐性変異株からは24種類、SUIC-17由来のリファンピシン耐性変異株からは29種類の*rpoB*変異が出現し、それら変異の出現パターンは大きく異なっていた。菌株と変異の対応は、Table 2-14および2-15に示した。

rpoB Q424R変異など親株由来のリファンピシン耐性変異株のみで出現した変異が存する一方で、*rpoB* F416S変異のようにSUIC-17のみからしか出現しない変異も存在した。*rpoB* H437D変異は、親株に比べ、SUIC-17において顕著に高頻度で出現した。全体を通じて、親株とSUIC-17から得られるリファンピシン耐性変異株の*rpoB*変異のパターンは大きく異なることが判った。

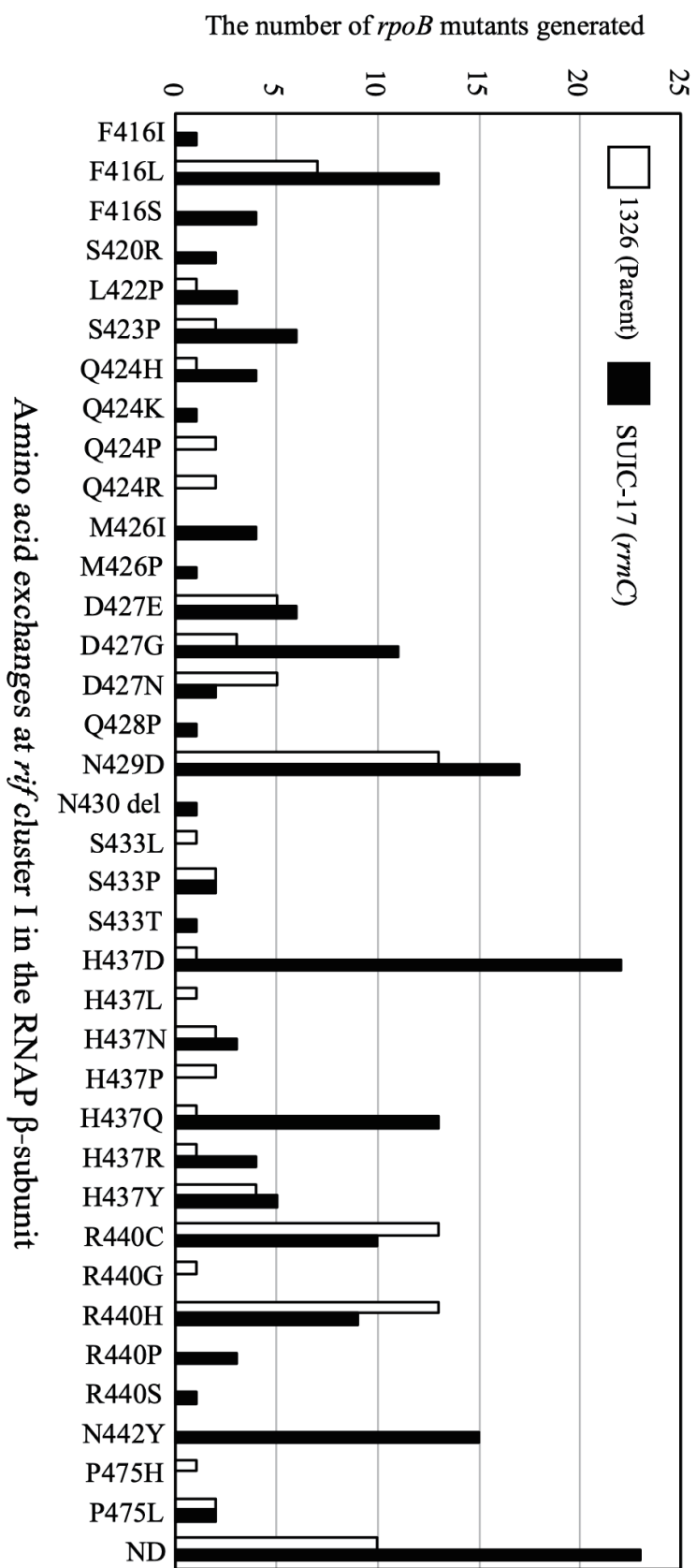


Fig. 2-12. The class and number of *rpoB* mutants generated in *S. lividans* 66 strains
 Spontaneous RIF^r mutants obtained from strains 1326 (Parent) and SUIC-17 (*rrmC*) as described in this figure, were subjected to mutation analysis of the *rpoB* gene. The value denotes the total number of *rpoB* mutants obtained. Graph bars show the numbers of *rpoB* mutants obtained from strains 1326 (Parent) (open bars) and from strains SUIC-17 (*rrmC*) (closed bars)
 Abbreviations: ND, Not determined.

23S rRNA 変異と *rpoB* 変異の組み合わせによる二次代謝活性化

得変異とアクチノロージン生産の結果を照らし合せたところ、親株由来の *rpoB* H437D 変異株 SUIC-18 ではアクチノロージンの生産が認められないものの、SUIC-17 由来の *rpoB* H437D 変異株 SUIC-19 ではアクチノロージンの高生産が認められた (Fig. 2-13A)。このようなアクチノロージンの高生産は、SUIC-17 由来の *rpoB* H437D 変異株 22 株中 20 株で認められた (Fig. 2-14、*rrnC-rpoB*-1~22)。

23S rRNA 変異と *rpoB* H437D 変異の組み合わせによるアクチノロージン高生産の仕組みを調べるため、(1326 親株)、SUIC-17 (*rrnC*)、SUIC-18 (*rpoB*)、SUIC-19 (*rrnC rpoB*) において、アクチノロージン合成のポジティブレギュレーターである *actII-orf4* の遺伝子発現を、半定量 RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により調べた。その結果、RT-PCR およびウエスタンブロットともに、SUIC-19 でのみ *actII-orf4* の顕著な発現増加が確認された (Fig. 2-13B、C)。

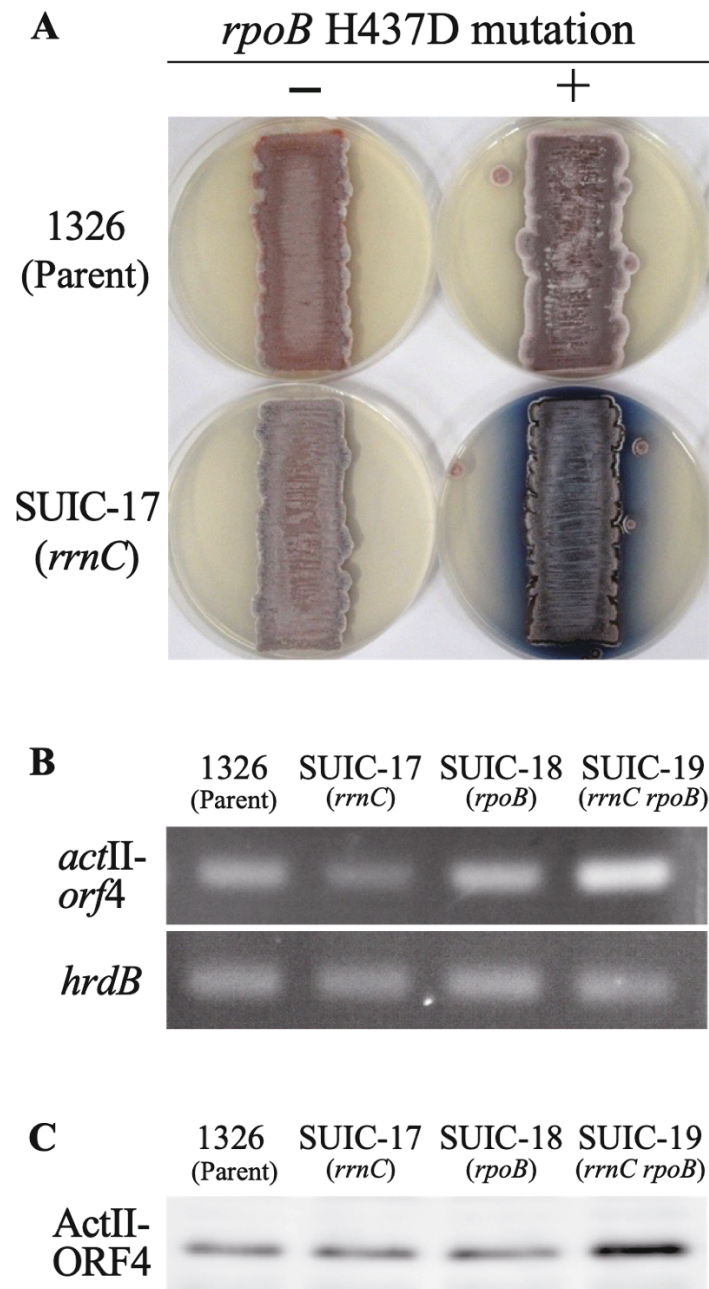


Fig. 2-13. Effects of the *rpoB* H437D mutation on actinorhodin production by *S. lividans* strains 1326 (Parent) and SUIC-17 (*rrnC*)

The *rpoB* H437D mutant strains were inoculated onto MR5 agar medium and incubated at 30 °C for 7 days. (A) Colony morphology and actinorhodin production. (B) Transcriptional analysis of the genes encoding the ActII-ORF4 by semi-quantitative RT-PCR. RNA was extracted from cells grown for 60 h on MR5 agar plate. Expression of the gene encoding sigma factor HrdB was taken as an internal control. (C) Expression analysis of the ActII-ORF4 protein by western blotting. Total cell proteins were prepared from cells grown for 96 h on MR5 agar plate.

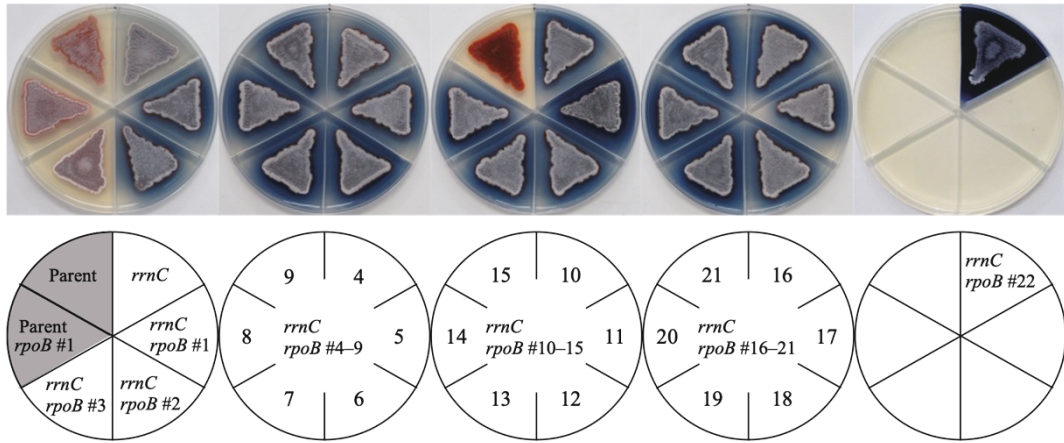


Fig. 2-14. Effects of *rrnC*-23S rRNA-A2281G mutation on antibiotic production in *rpoB* H437D mutant strain. Strains were inoculated onto MR5 agar medium incubated at 30°C for 7 days.

S. lividans 66 より取得したリファンピシン耐性変異株 (親株由来 96 株、SUIC-17 由来 192 株) の *rpoB* 変異およびアクチノロジン生産に いて Table 2-14 および 2-15 にまとめた。

Table 2-14A. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 1326

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (1326 : ±)	
			GYM	MR5
301	T1297C	S433P	±	+
302	C1309G	H437D	±	±
303	C1318T	R440C	±	±
304	N.D.	N.D.	±	++
305	G1319A	R440H	±	±
306	C1318T	R440C	±	±
307	C1318T	R440C	++	++
308	C1318T	R440C	±	±
310	G1279A	D427N	±	±
311	C1318T	R440C	±	±
312	T1246C	F416L	±	±
313	C1298T	S433L	++	±
314	C1281G	D427E	±	±
315	A1271G	Q424R	±	±
316	T1246C	F416L	±	±
317	C1281G	D427E	±	±
318	C1281G	D427E	+	±
319	G1279A	D427N	+	±
320	N.D.	N.D.	±	±
321	C1309T	H437Y	±	±
322	T1246C	F416L	±	±
323	A1310G	H437R	±	±
324	N.D.	N.D.	±	±
325	G1279A	D427N	±	±
326	C1318T	R440C	±	+
327	C1311A	H437Q	±	+
328	C1318T	R440C	±	+
329	C1318T	R440C	±	±
330	C1318T	R440C	±	+

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-14B. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 1326

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (1326 : ±)	
			GYM	MR5
331	N.D.	N.D.	±	±
332	C1309T	H437Y	±	±
333	A1310T	H437L	±	±
334	A1280G	D427G	±	±
335	C1318T	R440C	±	±
336	G1319A	R440H	±	+
337	G1319A	R440H	±	+
338	G1319A	R440H	±	+
339	G1319A	R440H	±	+
340	G1319A	R440H	±	+
341	G1319A	R440H	±	+
342	T1246C	F416L	±	±
343	G1319A	R440H	±	+
344	C1318G	R440G	±	±
345	C1318T	R440C	±	±
346	C1318T	R440C	±	±
347	G1319A	R440H	±	+
348	G1319A	R440H	±	+
349	G1319A	R440H	±	+
350	G1319A	R440H	±	+
351	A1280G	D427G	±	±
352	C1281G	D427E	±	±
353	G1319A	R440H	±	+
354	N.D.	N.D.	±	±
355	T1267C	S423P	±	+
356	G1272C	Q424H	±	±
357	C1309T	H437Y	±	+
358	C1318T	R440C	±	±
359	G1279A	D427N	±	±
360	T1267C	S423P	±	+
361	A1285G	N429D	±	±
362	A1280G	D427G	±	±
363	A1271C	Q424P	±	±
364	A1271C	Q424P	±	±
365	N.D.	N.D.	±	+
366	T1246C	F416L	±	±
367	G1279A	D427N	±	±
368	C1424T	P475L	±	±
369	C1309A	H437N	±	±
370	A1285G	N429D	±	±

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-14C. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 1326

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (1326 : ±)		
			GYM	MR5	
371	A1285G	N429D	±	±	
372	A1271G	Q424R	±	±	
373	A1285G	N429D	±	±	
374	N.D.	N.D.	±	+	
375	A1285G	N429D	±	±	
376	A1285G	N429D	±	±	
377	C1424A	P475H	±	±	
378	C1281G	D427E	±	±	
379	A1310C	H437P	±	++	
380	T1246C	F416L	±	+	
381	A1285G	N429D	±	±	
382	A1285G	N429D	±	±	
383	A1310C	H437P	±	++	
384	C1424T	P475L	±	±	
385	A1285G	N429D	±	±	
386	N.D.	N.D.	±	±	
387	T1246C	F416L	±	+	
388	A1285G	N429D	±	±	
389	N.D.	N.D.	±	+	
390	N.D.	N.D.	±	±	
391	A1285G	N429D	±	±	
392	C1309A	H437N	±	±	
393	T1265C	L422P	±	+	
394	T1297C	S433P	±	±	
395	A1285G	N429D	±	±	
396	A1285G	N429D	±	±	
397	C1309T	H437Y	±	+	
Total					
			++	2	4
			+	2	27
			±	92	65
			-	0	0

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-15A. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 SUIC-17

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (SUIC-17 : ±)	
			GYM	MR5
501	A1285G	N429D	±	±
502	T1246C	F416L	±	±
503	A1310G	H437R	±	±
504	C1318A	R440S	±	±
505	C1318T	R440C	±	±
506	C1424T	P475L	±	±
507	N.D.	N.D.	±	++
508	N.D.	N.D.	±	++
509	T1246C	F416L	±	±
510	N.D.	N.D.	±	++
511	C1318T	R440C	±	±
512	A1280G	D427G	±	±
513	N.D.	N.D.	±	++
514	G1319A	R440H	±	±
515	N.D.	N.D.	±	++
516	C1311G	H437Q	±	±
517	C1311G	H437Q	±	±
518	C1281G	D427E	±	±
519	G1279A	D427N	±	±
520	N.D.	N.D.	±	±
521	C1311G	H437Q	±	±
522	C1318T	R440C	±	±
523	N.D.	N.D.	±	++
524	AT1276-7CC	M426P	±	±
525	T1246C	F416L	±	±
526	C1260A	S420R	±	±
527	C1318T	R440C	±	±
528	C1309G	H437D	±	++
529	A1280G	D427G	±	±
530	A1280G	D427G	±	±

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-15B. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 SUIC-17

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (SUIC-17 : ±)	
			GYM	MR5
531	G1319A	R440H	±	++
532	G1319A	R440H	±	±
533	C1309G	H437D	±	++
534	C1309G	H437D	±	++
535	G1319A	R440H	±	+
536	C1309G	H437D	±	++
537	C1309G	H437D	±	++
538	C1309G	H437D	±	++
539	C1311G	H437Q	±	±
540	C1311G	H437Q	±	±
541	A1285G	N429D	±	±
542	A1285G	N429D	±	±
543	C1309A	H437N	±	±
544	C1311G	H437Q	±	±
545	C1309G	H437D	±	++
546	C1309G	H437D	±	++
547	T1246C	F416L	±	±
548	C1309G	H437D	±	++
549	T1247C	F416S	±	±
550	C1311G	H437Q	±	±
551	C1281G	D427E	±	±
552	C1309G	H437D	±	+
553	C1311G	H437Q	±	±
554	G1319A	R440H	+	++
555	C1311G	H437Q	±	±
556	C1309G	H437D	±	++
557	C1311G	H437Q	±	±
558	T1247C	F416S	±	±
559	C1311G	H437Q	±	±
560	A1310G	H437R	±	±
561	C1311G	H437Q	±	±
562	G1319A	R440H	±	+
563	C1281G	D427E	±	±
564	A1285G	N429D	±	±
565	A1285G	N429D	±	±
566	A1285G	N429D	±	±
567	A1285G	N429D	±	±
568	T1265C	L422P	±	±
569	A1280G	D427G	+	±
570	C1309T	H437Y	+	±

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-15C. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 SUIC-17

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (SUIC-17 : ±)	
			GYM	MR5
571	T1246C	F416L	±	±
572	A1285G	N429D	±	±
573	G1319C	R440P	±	±
574	G1319C	R440P	±	±
575	T1246A	F416I	±	±
576	A1285G	N429D	±	±
577	G1272C	Q424H	±	±
578	N.D.	N.D.	±	±
579	A1285G	N429D	±	±
580	N.D.	N.D.	±	±
581	C1318T	R440C	±	±
582	T1246C	F416L	±	±
583	C1309T	H437Y	±	±
584	T1247C	F416S	±	±
585	C1309A	H437N	±	±
586	C1281A	D427E	±	±
587	A1280G	D427G	±	±
588	G1319C	R440P	±	±
589	N.D.	N.D.	±	++
590	T1297A	S433T	±	±
591	C1309T	H437Y	±	±
592	C1309T	H437Y	±	±
593	T1297C	S433P	+	++
594	N.D.	N.D.	±	±
595	T1247C	F416S	±	±
596	A1285G	N429D	±	±
597	C1309G	H437D	+	++
599	C1260A	S420R	±	-
600	T1267C	S423P	±	+
601	C1424T	P475L	±	-
602	G1272C	Q424H	±	±
603	N.D.	N.D.	±	+
604	A1283C	Q428P	±	±
605	A1424T	N442Y	±	±
606	C1309A	H437N	±	±
607	N.D.	N.D.	±	-
608	C1309G	H437D	±	-
609	C1309G	H437D	±	++
610	A1280G	D427G	±	+

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-15D. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 SUIC-17

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (SUIC-17 : ±)	
			GYM	MR5
611	A1310G	H437R	+	+
612	A1280G	D427G	±	+
613	A1424T	N442Y	±	±
614	N.D.	N.D.	±	+
615	C1309G	H437D	±	+
616	T1265C	L422P	±	++
617	N.D.	N.D.	±	-
618	T1265C	L422P	±	++
619	A1324T	N442Y	±	±
620	C1318T	R440C	±	±
621	G1319A	R440H	±	+
622	A1324T	N442Y	±	±
623	T1267C	S423P	±	±
624	A1324T	N442Y	±	±
625	G1278T	M426I	±	-
626	A1324T	N442Y	±	±
627	G1319A	R440H	±	+
628	A1324T	N442Y	±	±
629	G1319A	R440H	±	+
630	C1309G	H437D	±	+
631	C1309G	H437D	±	+
632	A1324T	N442Y	±	±
633	N.D.	N.D.	±	+
634	C1318T	R440C	±	-
635	A1280G	D427G	±	±
636	C1281G	D427E	±	+
637	G1278T	M426I	±	-
638	A1324T	N442Y	±	±
639	A1280G	D427G	±	±
640	T1246C	F416L	±	++
641	A1324T	N442Y	±	±
642	C1281G	D427E	±	-
643	A1324T	N442Y	±	±
644	A1324T	N442Y	±	±
645	N.D.	N.D.	±	±
646	C1309T	H437Y	±	+
647	T1246C	F416L	±	++
648	T1246C	F416L	±	++
649	T1297C	S433P	±	++
650	C1318T	R440C	±	±

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-15E. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 SUIC-17

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (SUIC-17 : ±)	
			GYM	MR5
651	N.D.	N.D.	±	-
652	T1267C	S423P	±	+
653	C1309G	H437D	±	+
654	T1246C	F416L	±	-
655	AAC1288-1290 del	N430 del	±	-
656	T1246C	F416L	±	++
657	A1280G	D427G	±	±
658	A1324T	N442Y	±	-
659	G1278T	M426I	±	-
660	N.D.	N.D.	±	+
661	C1318T	R440C	±	±
662	G1278T	M426I	±	-
663	C1318T	R440C	+	±
664	C1309G	H437D	±	+
665	A1324T	N442Y	±	-
666	C1309G	H437D	±	+
667	C1309G	H437D	+	+
668	A1324T	N442Y	±	±
669	A1285G	N429D	±	-
670	N.D.	N.D.	±	+
671	N.D.	N.D.	±	+
672	T1246C	F416L	±	++
673	C1311G	H437Q	±	-
674	N.D.	N.D.	±	++
675	A1285G	N429D	±	-
676	A1310G	H437R	±	+
677	N.D.	N.D.	±	+
678	T1246C	F416L	+	++
679	N.D.	N.D.	±	-
680	T1267C	S423P	±	++
681	A1285G	N429D	±	-
682	T1267C	S423P	±	++
683	A1285G	N429D	±	-
684	A1280G	D427G	+	+
685	A1285G	N429D	±	-
686	A1285G	N429D	±	±
687	N.D.	N.D.	±	+
688	G1279A	D427N	±	-
689	T1267C	S423P	±	+
690	C1309G	H437D	±	+

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

Table 2-15F. Characteristics of rifampicin-resistant mutants isolated from *S. lividans* 66 SUIC-17

Strains	Position of mutation in <i>rpoB</i>	Amino acid exchange	ACT production ^a (SUIC-17 : ±)	
			GYM	MR5
691	C1270A	Q424K	±	-
692	G1272C	Q424H	±	+
693	G1272C	Q424H	±	+
Total		++	0	34
		+	10	34
		±	182	99
		-	0	25

Abbreviations: ACT, Actinorhodin ; N.D., Not determined.

^a Determined after 7 days of cultivation on MR5 agar medium.

-, no production; ±, little; +, moderate; ++, abundant.

3-4 *S. lividans* 66 由来 23S rRNA 変異株の遺伝学的解析

S. lividans 66 の 23S rRNA 変異株 SLE259 および SUIC-17 のゲノム解析により、同定された変異を Table 2-16 に示した。なお、遺伝子置換により導入したものの、ゲノム解析により変異候補として抽出されなかった *rrnC*-23S rRNA-A2281G 変異も Table 2-16 に加えた。

SLE259 は、23S rRNA 変異の他に、非コード領域の欠失変異を有していた。その一方で、SUIC-17 は 23S rRNA 変異に加えて、*SLI_2837* (推定 DNA 結合タンパク質)、*SLI_6774* (機能未知タンパク質)、*SLI_7183* (イシトール輸送系 ATP 結合タンパク質)、および非コード領域における挿入変異を有していた。

Table 2-16. Summary of mutations in 23S rRNA mutants of *S. lividans* 66

Strain	Gene	Gene Classification	Product	Position	Reference	Alteration	Mutation
SLE259	-	Others	-	863175-863180	AGCACC	-	Deletion
	<i>rrnC</i>	Translation	23S rRNA (ribosome)		A	G	Transition
SUIC-17	-	Others	-	64757-64758	-	G	Insertion
	<i>SLI_2837</i>	Replication or Transcription	Putative DNA-binding protein	2913212	G	A	Transition
	<i>SLI_6774</i>	Others	Hypothetical protein	7116439	G	C	Transversion
	<i>SLI_7183</i>	Transport	Inositol transport system ATP-binding protein	7573983	C	A	Transversion
	<i>rrnC</i>	Transcription	23S rRNA (ribosome)		A	G	Transition

4. 考察

先行研究により、*Streptomyces* 属放線菌において、23S rRNA 変異が、強力な二次代謝活性化効果を有することが示唆された^{60,61}。この知見を元に、本章では、抗生物質高生産エリスロマイシン耐性変異株より見かけた 23S rRNA 変異の特性解析を行い、同変異の抗生物質高生産化への関与を明らかにすることを目指した。

S. coelicolor A3(2) における 23S rRNA 変異と *nsdA* 変異の特性

nsdA 変異置換株 SUIC-14 が、SCE234 のようなエリスロマイシン耐性を示さなかったことから、*nsdA* 変異はエリスロマイシン耐性変異ではないことが判った。抗生物質生産性に関して、SUIC-14 は親株の 1.6 倍のアクチノロージン高生産を示したものの、SCE234 レベルの生産には至らなかったことから、単独の *nsdA* 変異には、低レベルの抗生物質高生産化作用はあるものの、劇的な抗生物質高生産化を起こすほどのものではないことが明らかとなった。*nsdA* 遺伝子は、放線菌に広く存在し、孢子形成や抗生物質生産を負に制御する因子として知られており、同遺伝子を *Streptomyces* 属放線菌で破壊すると、抗生物質の高生産化が起こることが報告されている⁶²⁻⁶⁴。これら報告と SUIC-14 が親株の数倍程度の抗生物質高生産化を示したことを考慮すると、*nsdA* 変異は、NsdA タンパク質の機能を低下させる変異であることが推察された。

自然突然変異株 SCE234 と *rrnA*-23S rRNA 変異導入株 SUIC-15 および SUIC-16 がエリスロマイシン耐性を示したことから、*rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異は、エリスロマイシン耐性変異であることが明らかとなった。この結果は、大腸菌 *Escherichia coli* の 23S rRNA 遺伝子の 2058 番目の塩基 [*S. coelicolor* A3(2) の *rrnA*-23S rRNA の 2302 番目の塩基 A) に対応する塩基] における点変異が、エリスロマイシン耐性を付与するという報告に一致するものである⁶⁵。

ゲノム解析の結果から、抗生物質非高生産株 SUIC-15 は *rrnA*-23S rRNA 変異と 1 の点変異、抗生物質高生産株 SUIC-16 は *rrnA*-23S rRNA 変異と 6 の点変異を有することが判明した。これらに加え、抗生

物質高生産株 SCE234 は、*rrnA*-23S rRNA 変異と *nsdA* 変異を有していた。この *rrnA*-23S rRNA 変異株において、複数の変異を有すること、加えてそれら変異の数や種類が異なることを見出した。以上より、*rrnA*-23S rRNA 変異は他の変異と共存したときに、その組合せ次第で抗生物質非生産性か高生産性かが決まることが示唆された。

***S. lividans* 66 における 23S rRNA 変異の特性**

rrnC-23S rRNA 変異置換株 SUIC-17 の特性解析から、*rrnC*-23S rRNA 変異は、*S. coelicolor* A3(2) の *rrnA*-23S rRNA 変異と同様に、エリスロマイシン耐性変異であることが判明した。*rrnC*-23S rRNA 変異株の形成においては、*S. coelicolor* A3(2) の *rrnA*-23S rRNA 変異株の形成時のように抗生物質生産の表現型が様々になることはなく、一貫して抗生物質非高生産株が出現した^{61,66}。この結果は、*S. lividans* 66 において、*rrnC*-23S rRNA 変異は、単独で抗生物質高生産化をもたらすものではないことを示唆した。以上のことから、SLE259 で認められた抗生物質の高生産は、*rrnC*-23S rRNA 変異と何らかの変異が共存することにより、起きていることが考えられた。

23S rRNA 変異が *S. coelicolor* A3(2) と *S. lividans* 66 の遺伝的特性に与える影響

この *rrnA*-23S rRNA 変異株 (SCE234、SUIC-15、および SUIC-16) が、*rrnA*-23S rRNA 変異以外の他の変異（以降では付加変異と示す）を 1 つ以上有していたことから、23S rRNA 変異が付加変異を発生させやすくするという仮説を立てた。この仮説を検証する第一段階として、薬剤耐性変異株の出現頻度や出現数を指標とし、遺伝的特性に対する 23S rRNA 変異の影響を検証した。

S. coelicolor A3(2) におけるリファンピシン耐性変異株の出現頻度は、 $1.1 \times 10^{-8} \sim 3.6 \times 10^{-8}$ の頻度であった。菌株間での有意差は認められなかったものの、10 回の実験の中央値を元に評価すると、SUIC-15(*rrnA*+1) におけるリファンピシン耐性変異株の出現頻度は、他の菌

株に比べて高くなり、*nsdA* 変異を導入した SUIC-14 は低くなる傾向が見られた。このことを踏まえると、SCE234 (*rrnA nsdA*) の 度 が SUIC-15 に比べて低くなるのは、*nsdA* 変異の存 によるものであることが考えられた。加えて、SUIC-16 も SUIC-15 に比べて変異株の出現 度が低く、SUIC-16 が有する *sco6274* 以外の付加の変異 (SUIC-15 も *sco6274* の変異を有するため) は、リファンピシン耐性変異株の出現に対して *nsdA* 変異と同様の効果を持つ ことが推察された。気がかりなこととして、SCE234、SUIC-14、SUIC-16 におけるリファンピシン耐性変異株の出現 度は親株と SUIC-15 に比べて、データのばら きが小さく、このことはそれら 3 菌株が親株や SUIC-15 に比べてより遺伝的に 定であることを示唆するものかもしれない。以上のことより、*nsdA* 変異と SUIC-16 が有する変異の一部は、*S. coelicolor* A3(2) において遺伝的に 定化作用を有する可能性が示唆された。これらのことを SCE234 に当てはめると、*S. coelicolor* A3(2)の親株がエリスロマイシン耐性を付与する *rrnA-23S* rRNA 変異を得し、これにより遺伝的に不 定化したことで、*nsdA* 変異が発生し、遺伝的不 定化が解消され、抗生物質の高生産化も起こすようになったことが考えられた。

S. lividans 66 を用いた検討では、上述の仮説 “23S rRNA 変異には遺伝的不 定化作用がある” をサポートしうる実験結果が得られた。*rrnC-23S* rRNA-A2281G 変異を保有する SUIC-17 からは、親株に比べて、より多くのリファンピシン耐性変異株が取得された。作用標的が異なる様々な抗生物質を用いた際にも、*rrnC-23S* rRNA 変異株 (SUIC-17) で薬剤耐性変異株の出現 度が高くなることから、23S rRNA 変異による遺伝的不 定化は、ゲ 体の遺伝子で広く起こる現象であることが強く示唆された。

これまで、23S rRNA 変異に遺伝的不 定化作用があるという報告はない。この現象は 訳装置リボソ における点変異が変異の発生に影響すると捉えると、分子生物学的にも興味深い知見と言える。遺伝的不 定性の高まりは、一般に複製エラーの増加と DNA 修復機能の低下により変異が発生しやすくなることから、大きな原因として知られている^{67,68}。

rrnA-23S rRNA-A2302T および *rrnC*-23S rRNA-A2281G 変異は、リボソームにおいて新生ペプチドが通る NPET (ペプチド排出トンネル) の起点に位置する変異である。そのため、変異型リボソーム (変異した 23S rRNA を含むリボソーム) では、NPET の形状や化学的性質が変化することが考えられ、これにより翻訳されるタンパク質のパターンが変化することも想定される。この変化は、DNA 複製や DNA 修復に関するタンパク質の翻訳動態にも影響する可能性があり、この複製・修復酵素の変化が、複製エラーの増加や DNA 修復機能の低下をもたらし、変異を発生しやすくする可能性がある。こうした可能性を踏まえると、変異型リボソームの翻訳機能解析や、23S rRNA 変異株におけるプロテオーム解析は、今後の重要な課題と言える。

得られたリファンピシン耐性変異株の二次代謝を評価したところ、SUIC-17 は、親株と比べて、アクチノロージン高生産株の出現度が 4.5 倍高かった。このことから、23S rRNA 変異には付加の変異と共存することで、抗生物質高生産化を起こしやすくする作用があることが示唆された。さらに、SUIC-17 の *rpoB* 変異のリエーションは、親株と大きく異なることも判明し、この点からも 23S rRNA 変異が変異の発生に影響を与えていることがうかがえた。

各菌株の *rpoB* 変異とアクチノロージン生産性を照らし合わせていったところ、*rpoB* H437D 変異 (C1309G 変異) が興味深い結果を示した。野生株から出現した 1 株はアクチノロージン高生産を示さないものの、SUIC-17 より取得した 22 株のうち 20 株がアクチノロージン高生産化を示した。また、*rpoB* H437D 変異は、これまで *S. coelicolor* A3(2) や *S. lividans* 66 では報告されていない新規変異であるにもかかわらず、SUIC-17 から 22 株も出現したことは興味を持たれた^{48,49,69,70}。この現象に対する考察としては、*rpoB* H437D 変異は、23S rRNA 変異が存するときに出現しやすくなる変異の典型的なものであることが考えられる。これを引き起こすメカニズムの一つには、*S. lividans* 66 において単独の *rpoB* H437D 変異は致死変異であるため、過去の研究では出現しなかったものの、23S rRNA 変異により致死作用が打消されて変異株として出現

できるようになったということも考えられる。いれにせよ、23S rRNA 変異が共存することで、野生株では出現しにくい変異が発生し、抗生物質高生産化までもが起こることは極めて興味深い現象である。*S. coelicolor* A3(2)と *S. lividans* 66 以外の放線菌において、RpoB タンパク質の 437 番目の スチジンのアミノ酸置換は、抗生物質高生産を導く場合があることがよく知られている^{48,49,69,70}。このことから、*S. lividans* 66 の *rpoB* H437D 変異にも、単独では抗生物質高生産に至らないものの、微弱な高生産化作用はあるものと予想でき、*rpoB* H437D 変異は 23S rRNA 変異と共存することにより、*actII-orf4* の顕著な発現増加を通じ、抗生物質高生産化に至ったと推測された。

***Streptomyces lividans* 66 由来 23S rRNA 変異株の遺伝学的解析**

これまでの 23S rRNA 変異の特性解析の結果を踏まえると、SLE259 では、*rrnC*-23S rRNA 変異と何らかの付加変異が共存することで、抗生物質高生産が起きていることが示唆された。そこで、*S. lividans* 66 より取得した 23S rRNA 変異株のゲノム解析を行ったところ、SLE259 は 1 、SUIC-17 は 4 の付加変異を有することが判明した。

SLE259 に存在した非コード領域変異は、*S. lividans* 66 の抗生物質生産にポジティブな影響を与える変異かもしれない。一方で、本ゲノム解析で行なったショットガンシーケンスは、マルチコピー遺伝子 (rRNA 遺伝子など) における変異やゲノムの再編 (染色体上における遺伝子の移動や線状染色体 DNA の環状化など) の検出は難しい。SLE259 では、本研究では浮かび上がらなかった遺伝的変化が抗生物質高生産化に寄与する可能性も考えられた。

SLE259 および SUIC-17 とともに複数の変異を有しており、このことから *rrnC*-23S rRNA 変異には、遺伝的不安定化作用があることが示唆された。一方で、SUIC-17 では、*S. coelicolor* A3(2)の結果に比べて、より大きな遺伝的不安定性が認められた。これは、SUIC-17 の推定 DNA 結合タンパク質変異などの付加変異が 23S rRNA 変異と組み合わせることさらなる遺伝的不安定性をもたらすことも考えられた。

まとめ

以上の結果は、エリスロマイシン耐性を付与する 23S rRNA 変異は、自然突然変異の発生に影響を与え、様々な付加変異の発生をもたらす可能性を新たに見出した。23S rRNA 変異はそれら付加変異との組み合わせ次第で、抗生物質高生産化を引き起こすことも判った⁶⁶。

第 3 章 オフロキサシン耐性変異

1. 緒言

薬剤耐性選抜法は、対象となる菌株を薬剤含有培地で培養し、得られた耐性変異株の中から目的の表現型を有する菌株を選抜する手法である。この簡便さから、放線菌のみならず様々な微生物の潜在的能力の活性化に用されてきた。放線菌における薬剤耐性選抜法の最初の報告として、1976年に Vezina は、放線菌 *Streptomyces kitasatoensis* より、ロイシンアナログ耐性変異株を取得することにより、ロイシン生合成のフードック制御の破壊株を取得し、同菌株のキタサマイシン生産量が増加することを明らかにした^{40,41}。これまでに述べてきたリボゾーム工学も、薬剤耐性選抜法を用いた技術である。

放線菌から翻訳を標的としたストレプトマイシン耐性変異株を取得すると、リボゾームタンパク質 S12 変異株が得られる。この変異は、放線菌の生育後期における翻訳性の増強やトランスクリプトームの大規模な変化をもたらすことにより二次代謝活性化をもたらす^{26,71}。また、放線菌から転写を標的としたリファンピシンへの耐性変異株を取得することで、RNA ポリメラーゼサブユニット変異株を取得することができる。この変異は、RNA ポリメラーゼのプロモーター選択性が変化することにより、二次代謝関連遺伝子の発現増加をもたらすことが知られている⁵⁰。

ここまでをまとめると、放線菌からアナログ、転写阻害剤、翻訳阻害剤への耐性を示す変異株を取得すると、同菌の二次代謝が活性化することがある (Fig. 3-1)。その一方で、DNA 複製を阻害する抗生物質を利用した薬剤耐性選抜法は、放線菌において開発されていない。加えて、第 2 章では、23S rRNA 変異が変異の発生に影響を及ぼし、付加の変異を生むことが最終的な二次代謝に好影響を及ぼすこともわかってきた⁶⁶。このことは、23S rRNA 変異により DNA 複製が攪乱・改変されたと捉えることもできる。

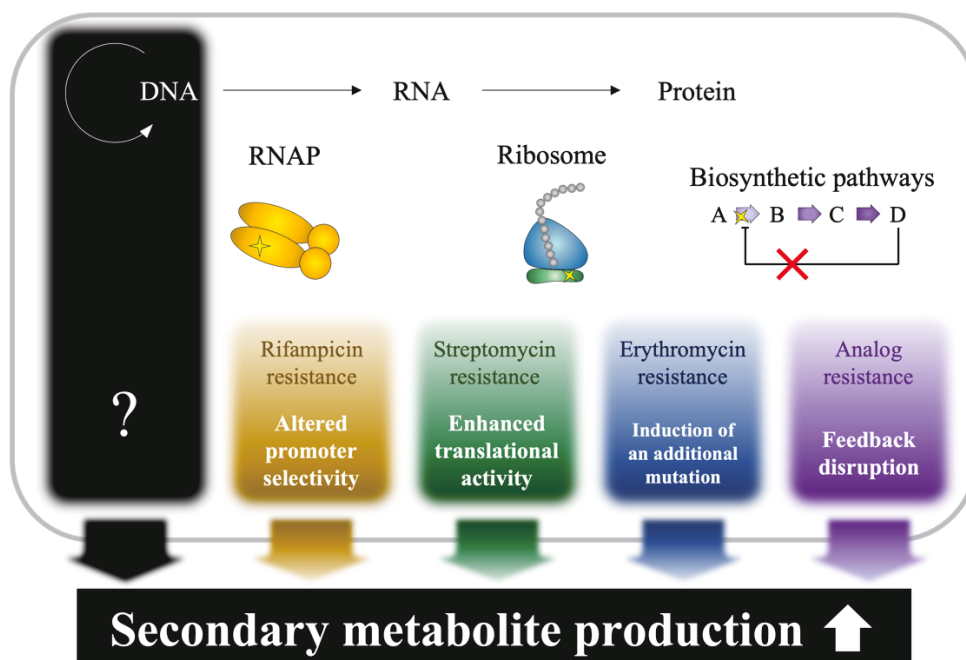


Fig. 3-1. Screening of drug-resistant mutants for increased secondary metabolite production

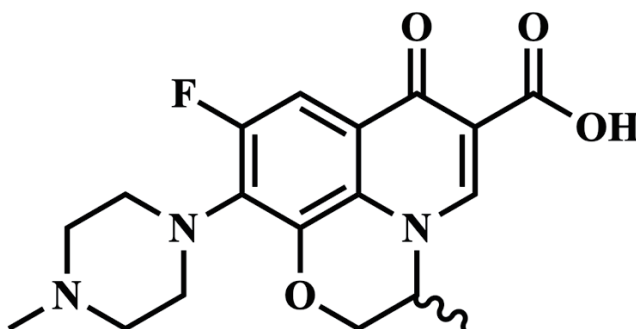


Fig. 3-2. The chemical structure of ofloxacin

そこで、本章では、DNA 複製を標的とする抗生物質に耐性を示す変異株を取得することにより、放線菌の潜在的二次代謝が活性化できるか検証した。代表的複製阻害剤であるフルオロキノロン系抗生物質のオフロキサシン (Fig. 3-2) に耐性を示す変異株の諸性質を解析したところ、オフロキサシンの遺伝学的作用と生化学的作用は、放線菌の二次代謝活性化に有効であり、これまでの薬剤耐性選抜法では認められない特徴を有することも明らかとなった。

2. 実験材料および実験方法

2-1 使用菌株

本研究では、Table 3-1 に示す放線菌を使用した。*Streptomyces coelicolor* A3(2) 1147 株および *Streptomyces lividans* 66 1326 株は、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品イオテクノロジー研究領域生物機能解析ユニットより分譲された。

Table 3-1. *Streptomyces* strains used in this study

Strain	Relevant characteristics	Source and/or References
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) 1147	Prototrophic wild-type (SCP1 ⁺ , SCP2 ⁺)	²
<i>Streptomyces lividans</i> 1326	Prototrophic wild-type (SLP2 ⁺ , SLP3 ⁺)	²
<i>Streptomyces vietnamensis</i> NBRC 104153	Prototrophic wild-type	NBRC strain ^a
<i>Streptomyces griseus</i> IFO 13350	Prototrophic wild-type	NBRC strain ^a
<i>Streptomyces</i> sp. Y-4	Prototrophic wild-type	LC650963 ^b

^a Obtained from the NBRC culture collection (NITE Biological Resource Center Japan).

^b Partial 16S rDNA sequence data are available in the DDBJ Sequenced Read Archive under accession numbers indicated.

2-2 培地

培地は、第 2 章 2-2 に従った。

2-3 放線菌の培養

放線菌の培養は、第 2 章 2-3 に従った。

2-4 孢子懸濁液の調製

孢子懸濁液の調製は、第 2 章 2-4 に従った。

2-5 最小生育阻止濃度の 定

最小生育阻止濃度の 定は、第 2 章 2-5 に従った。

2-6 オフロキサシン耐性変異株の取得

第 2 章 2-4 に従って調製した孢子懸濁液を MIC の 5 倍濃度のオフロキサシンを含む GYM 寒天培地に接種し、7-14 培養した。出現した耐性コロニーにから、一過的耐性株やオフロキサシン依存性株を除くため、継代培養を以下の通りに行った。耐性コロニーを MIC の 2 倍濃度のオフロキサシンを含む GYM 寒天培地に継代し、3-5 培養した。これにより耐性が認められた菌株は、オフロキサシンを含まない GYM 寒天培地で 3-5 培養した。これら菌株をさらに MIC の 2 倍濃度のオフロキサシンを含む GYM 寒天培地に継代し、3-5 培養することで、生育が認められたものをオフロキサシン耐性変異株として取得した。

2-7 乾燥菌体重量および生育の測定

乾燥菌体重量の測定は、第 2 章 2-6 に従った。ただし、ろ紙の乾燥は、105°C、2 時間の乾燥後、デシケーターで 1 時間の放冷を行なった。

2-8 抗生物質生産の評価

アクチ ロージンおよびウンデシルプロジ オシンの評価は、第 2 章 2-7 に従った。加えて、*S. vietnamensis* の主要な二次代謝産物である 色抗生物質グラナチシンは、 色色素の生産を視覚的に判定した。

抗菌試験

検定菌懸濁液の調製

Staphylococcus aureus 209P⁷² および *Echelicia coli* W3110⁷³ を LB 寒天培地〔ナカライテスク株式会社、20ml 培地 / 9cm シャーレ アズワン株式会社〕に接種し、37°C で 1 培養した。プレート 1 枚分の細胞を金耳で掻き取り、20% (v/v) グリセロール溶液に懸濁して、-80°C または、-20°C で保存した。

検定プレートの作製

1/2 Mueller Hinton 寒天培地 19g/L、121°C、15 min 加圧蒸気 (菌)

に検定菌懸濁液を 1×10^7 CFU/ml となるように接種し、穏やかに混合した。これを 2 角シャーレ (栄研化学株式会社) に 20ml 流し込み、抗菌物質検定用プレートとした。

アガーピース法による抗菌物質生産の評価

放線菌の寒天培養物を、ストロー (φ 8 mm) でくり抜き、アガーピースを作製し、検定プレート上に配置した。37°C で 1 インキュベートし、抗菌物質生産性を評価した。

2-9 代謝分析

寒天培養物からの抽出

第 2 章 2-3 に従って培養した放線菌の寒天プレート (培地 25 ml) に倍量 (50 ml) のメタールを加え、3 時間穏やかに振とう抽出した。振とう抽出液は、量のメタールで洗い混みながらろ過することにより菌体および培地切片を除去した。得られた抽出液は、遠心エポレーターを用いて、量を圧乾固した。これにより、乾固しない場合は、凍結乾燥法により、抽出液を完全に乾固させた。乾固したサンプルは、50%メタールもしくは純水 (0.1% 酸を含む) に溶解した。溶解液をシリンジフィルター (0.2 μm、Sartorius-Stedim Biotech、RC4) でろ過したものを分析試料とし、培地 250 μl 相当量を HPLC 分析に供した。HPLC 分析は高速液体クロマトグラフ Prominence system、株式会社 (製作所) を使用し、Table 3-2 および 3-3 に示す条件で行なった。

Table 3-2. HPLC condition for analysis of the culture extracts of *S. coelicolor* A3(2)

Column	TCI Stella PFP (4.6 x 250 mm; Tokyo Chemical Industry Co. Ltd.)
Solvent	A: 0.1% formic acid/20% Acetonitrile B: 0.1% formic acid/100% Acetonitrile
Elution	0-10 min 20% B 10-20 min 100% B
Column temperature	35°C
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	Maxplot (190-800 nm)

Table 3-3. HPLC condition for analysis of the culture extracts of *S. lividans* 66 and *S. griseus*

Column	CAPCELL PAK C18 MG II (4.6 × 250 mm; Shiseido)
Solvent	A: 0.01% formic acid/20% Acetonitrile B: 0.01% formic acid/100% Acetonitrile
Elution	0-5 min 20% B 5-20 min Linear gradient from 20 to 100% B 20-30 min 100% B
Column temperature	35°C
Flow rate	1.0 ml/min
Detection	Maxplot (190-800 nm)

2-10 抗菌物質の単離、精製、および構 定

第 2 章 2-3 に従ってセロハンを敷いた R3 寒天培地 3 枚で放線菌を培養した (培地 75 ml)。培養後、セロハン上の菌体を除去し、第 3 章 2-9 と同様の方法でメタール抽出し、HPLC に分析試料を供し、目的の抗菌物質を分取した。分取した抗菌物質溶液は凍結乾燥により乾固した。ただし、培地 1 ml 相当量を 1 度の HPLC 分取に供し、HPLC 分析カラムは、TCI Stella PFP (10.0 × 150 mm、東京化成工業株式会社) を用い、流速は 4.0 ml/min とした。

抗菌物質の構 定は、静岡大学学術農学領域 応用微生物学研究室 小 真也准教授と国立研究開発法人 農業・食品産業技術 合

研究機構 高度分析研究センター 生 性物質分析ユニット中川博
博士に依頼した。精製した乾燥サンプル 5.0 mg を 500 μ l の重 DMSO
に溶解した。Bruker Avance800 spectrometer を用いて、1 次元および 2
次元 NMR スペクトルを取得した⁷⁴。

2-11 mRNA 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析は、第 2 章 2-10 に従った。プライマーは、Table 3-4 に
示したものを使用した。

Table 3-4A. Primers used in this study.

Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')
DNA sequence	
<i>sco0799_F</i>	GCCGGGTGCTCCTGC
<i>sco0799_R</i>	CTCCGTGAGCTGTGCGAC
<i>sco3207_F</i>	CCCTCACAGACACCACAGAC
<i>sco3207_R</i>	ATCATCAGATCGCCGACGC
<i>sco3558_F</i>	ATCGGTGGATTCTCCGTGC
<i>sco3558_R</i>	GAATGCGGCGGTACGAATG
<i>sco6262_F</i>	GTCGGCGTACGACCTGTTC
<i>sco6262_R</i>	GTGTCCATCTCGGCCTCG
<i>sco3207_F</i>	GTAGCCGGCGGAGGTG
<i>sco3207_R</i>	AGATGAGAAAAGGGGCGAGTG
<i>sco6262_F</i>	GGCTCTACGTCCAGTTCGAG
<i>sco6262_R</i>	CTCGCGTGCCTCCCG
<i>sco6262_S1</i>	AGAGGACTTCGGGGGAG
<i>sco6262_S2</i>	GCGCGACCGGCTCACCG
<i>sco6262_S3</i>	GGCCGCGCTGTACGAGG
<i>sco0829_F</i>	CTCGACTTCAAGACGGTCTCC
<i>sco0829_R</i>	CTCAGGTGCGGCTCCATC
<i>sco3173_F</i>	CTTCGAGGGCGAGGTCAC
<i>sco3173_R</i>	GACCGTACTCGTGGTGGTC
<i>sco3774_F</i>	ATGTCCGTGACGACAACAC
<i>sco3774_R</i>	GTGCCGATCACCGCATCC
<i>SCP1.275_F</i>	ATCACGTAAAGGGCCTCTGG
<i>SCP1.275_R</i>	ACTGCAAAAAGTTCGGCATCC
<i>sco3549_F</i>	ATCGGGTTCGGTATTCTTGG
<i>sco3549_R</i>	CCGAGGTGTGAATGGGGAAC
<i>sco3932_F</i>	CTGTGACCGTCTCCTCATCG
<i>sco3932_R</i>	CGTCGCCTCGGTTCCCTTG
<i>sco5494_F</i>	CATCAACGGCCTCTCCATCC
<i>sco5494_R</i>	TCAACCGCTATTCTCAGCC
<i>sco3831_F</i>	CTCAAGGGCGACGACGTG
<i>sco3831_R</i>	TCGGGGTTCCTGGTTCATCC
<i>sco4587_F</i>	GAGTCGAGACATCGTTCCCC
<i>sco4587_R</i>	TGGACAGCGTGTACCAGTAG
<i>sco5550_F</i>	GATGAGCAGGACGGTCACG
<i>sco5550_R</i>	GCCCAGCAGTTCGAGGAG
<i>sco7626_F</i>	TTGTCCAGTTTCGGGGATGC
<i>sco7626_R</i>	GCACGGTACGTCCAGCTC
<i>sco7284_F</i>	GACGTCTCCTGAGCCCTGTC
<i>sco7284_R</i>	GGGTCGTGCGGGTCATCC
<i>svtn15985_F</i>	GCACGACTCCTGAATCTGCTC
<i>svtn15985_R</i>	TGAAGTCGACGTCCATGAGGG
<i>svtn27335_F</i>	CATGACCTCCATCATCCGCC
<i>svtn27335_R</i>	ATCCACACACAGCCGAAGTC

Table 3-4B. Primers used in this study

Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')
RT-PCR	
<i>mmfR</i> _F	ATGACGAGCGCCCAACAAC
<i>mmfR</i> _R	CCTTGCTGGGGAAGTGGAAG
<i>mmyB</i> _F	CAAAGATTCGACGGTGTGCA
<i>mmyB</i> _R	GATGACTGCGACTTCCTCAC
<i>mmyR</i> _F	CTGAAGAGTTCGCCCTGCA
<i>mmyR</i> _R	TGTCGTGCTTCATTTGACGG
<i>crtI</i> _F	CTCCGTCCGCCGTGATCCTG
<i>crtI</i> _R	GCGCGAGGACGTAGTGGAGG
<i>sco3206</i> _F	GTCTCAAACAGCCGTCAAGG
<i>sco3206</i> _R	CAGACCGAGGACGAAGGTG
<i>hrdB</i> -F	CGTGTCCGCCAGCACATCC
<i>hrdB</i> -R	CTGCTGGTCACCGGCTTCG

2-12 変異遺伝子の特定

変異遺伝子の特定は、第 2 章 2-8 に従った。プライマーは、Table 3-4 に示したものを使用した。ゲノム解析は、対象菌株の染色体 DNA を用い、大阪大学微生物病研究所遺伝情報実験センター (*S. coelicolor* A3(2)の解析) およびユーロフロン株式会社 (*S. vietnamensis* の解析) に委託し、Table 3-5 に示す条件で解析を行った。

Table 3-5. The performance specification of Next-generation sequencing

Strains	Sequencer	Method	Read length	Called Bases
<i>S. coelicolor</i> A3(2)				
1147	NovaSeq6000	Paired-end	101 bp/read	8.9 Gb
SCO1	NovaSeq6000	Paired-end	101 bp/read	8.7 Gb
SCO3	NovaSeq6000	Paired-end	101 bp/read	6.7 Gb
SCO5	NovaSeq6000	Paired-end	101 bp/read	7.7 Gb
SCO8	NovaSeq6000	Paired-end	101 bp/read	6.4 Gb
<i>S. vietnamensis</i>				
NBRC104153	HiSeqX	Paired-end	151 bp/read	5.3 Gb
SVO3	HiSeqX	Paired-end	151 bp/read	5.1 Gb

3. 結果

3-1 オフロキサシン耐性変異株の取得

S. coelicolor A3(2)、*S. lividans* 66、*S. vietnamensis* NBRC 104153、*Streptomyces griseus* IFO 13350、および *Streptomyces* sp. Y-4 の親株へのオフロキサシンの MIC はそれぞれ、5、5、5、3、10 $\mu\text{g/ml}$ であつた

Table 3-6)。最小生育阻止濃度の 5 倍濃度のオフロキサシンを含む GYM 寒天培地に、 4.8×10^8 - 4.8×10^{10} CFU の孢子懸濁液を接種し、7-14 培養したところ、*S. coelicolor* A3(2)、*S. lividans* 66、*S. vietnamensis* NBRC 104153、*S. griseus* IFO 13350、および *Streptomyces* sp. Y-4 よりそれぞれ、444、125、189、186、331 株のオフロキサシン耐性変異株を得られた (Table 3-7)。取得した変異株のオフロキサシン耐性は、親株の 2-64 倍と様々であつた (Table 3-6、Fig. 3-3)。*S. coelicolor* A3(2)のオフロキサシン耐性変異株は、オフロキサシンと同じフルオロキノロン系の代表的抗生物質であるシプロフロキサシンへの差耐性も認められた (Fig. 3-4)。その一方で、*S. coelicolor* A3(2)のオフロキサシン耐性変異株は、同じ II 型トポイソメラーゼを標的とするアミクマリン系抗生物質ボビオシンへの耐性は認められなかつた (Fig. 3-5)

Table 3-6. Representative *Streptomyces* strains used in this study

Strain	MIC of OF ^a ($\mu\text{g/ml}$)	Comments	Reference or source
<i>S. coelicolor</i> A3(2)			
1147 (Parent)	5	Prototrophic strain	²
SCO1	40	ACT overproduction	in this study
SCO2	80	RED overproduction	in this study
SCO3	80	Methylenomycin A overproduction	in this study
SCO4	40	Putative carotenoid overproduction	in this study
SCO5	160	ACT overproduction in the presence of OF	in this study
SCO6	160	ACT overproduction in the presence of OF	in this study
SCO7	40	ACT overproduction in the presence of OF	in this study
SCO8	320	High-level OF resistance	in this study
<i>S. lividans</i> 66			
1326 (Parent)	5	Prototrophic strain	²
SLO1	20	ACT overproduction	in this study
SLO2	40	Change in spore color	in this study
SLO3	40	Spore deficiency	in this study
SLO4	40	ACT overproduction in the presence of OF	in this study
SLO5	40	ACT overproduction in the presence of OF	in this study
SLO6	80	ACT overproduction in the presence of OF	in this study
<i>S. vietnamensis</i>			
NBRC 104153 (Parent)	5	Prototrophic strain	NBRC strain ^b
SVO1	40	GRA overproduction	in this study
SVO2	40	Spore deficiency & Altered pigmentation	in this study
SVO3	160	GRA overproduction in the presence of OF	in this study
<i>S. griseus</i>			
IFO 13350 (Parent)	3	Prototrophic strain	NBRC strain ^b
SGO1	12	Antibacterial overproduction	in this study
SGO2	24	Antibacterial overproduction	in this study
SGO3	24	Pigment overproduction	in this study
<i>Streptomyces</i> sp. Y-4			
Y-4 (Parent)	10	Prototrophic strain	LC650963 ^c
SO1	160	Antibacterial overproduction	in this study
SO2	80	Spore deficiency	in this study
SO3	80	Pigment deficiency	in this study

ACT: actinorhodin; GRA: granaticin; OF: ofloxacin; RED: undecylprodigiocin.

^a Determined after incubation on GYM agar medium at 30 ° C for 3 days.

^b Obtained from the NBRC culture collection (NITE Biological Resource Center Japan).

^c Partial 16S rDNA sequence data are available in the DDBJ Sequenced Read Archive under accession numbers indicated.

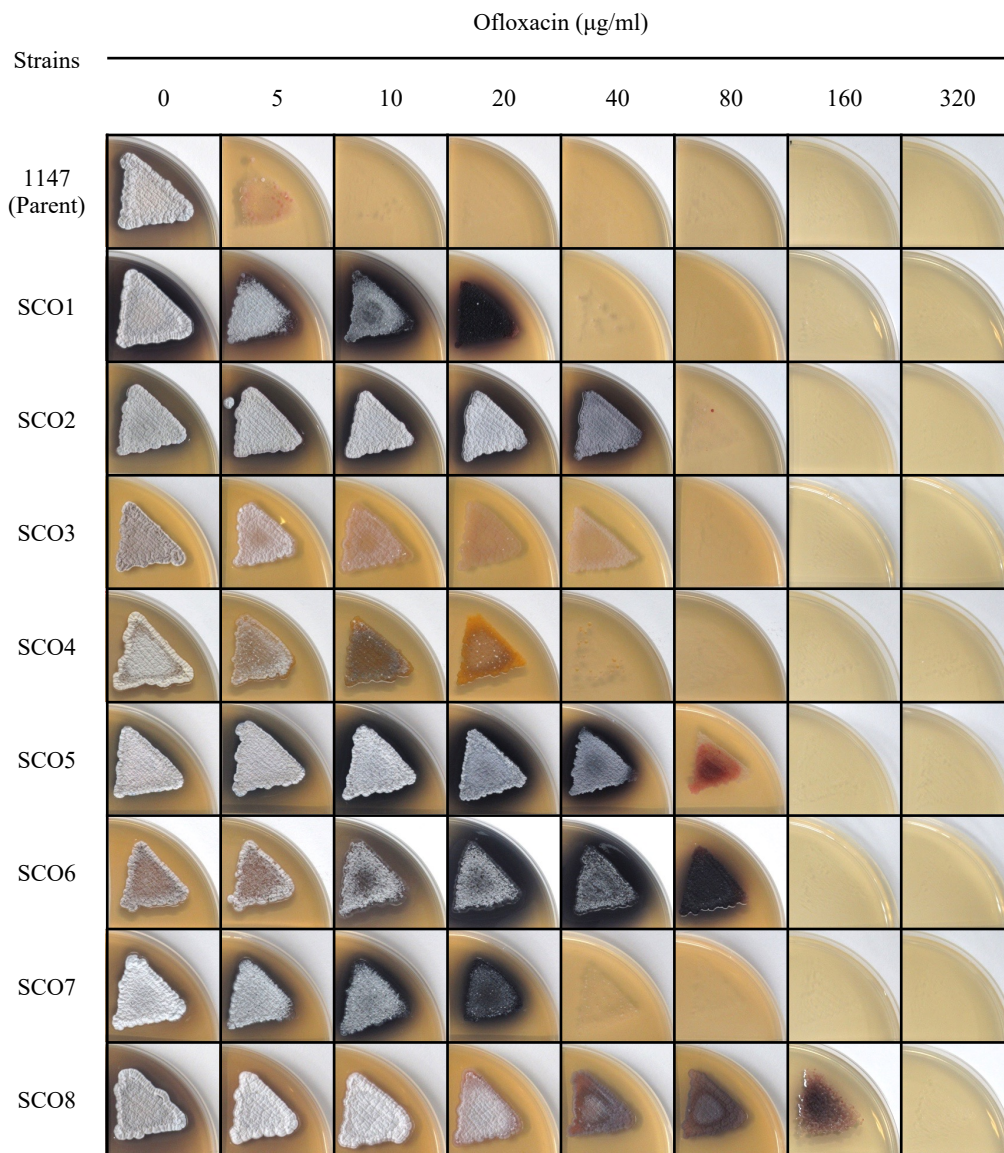


Fig. 3-3. OF resistance in OF-resistant mutants of *S. coelicolor* A3(2). Strains (1×10^5 CFU spores and hyphal fragments) were inoculated onto GYM agar medium containing OF and incubated at 30°C for 7 days.

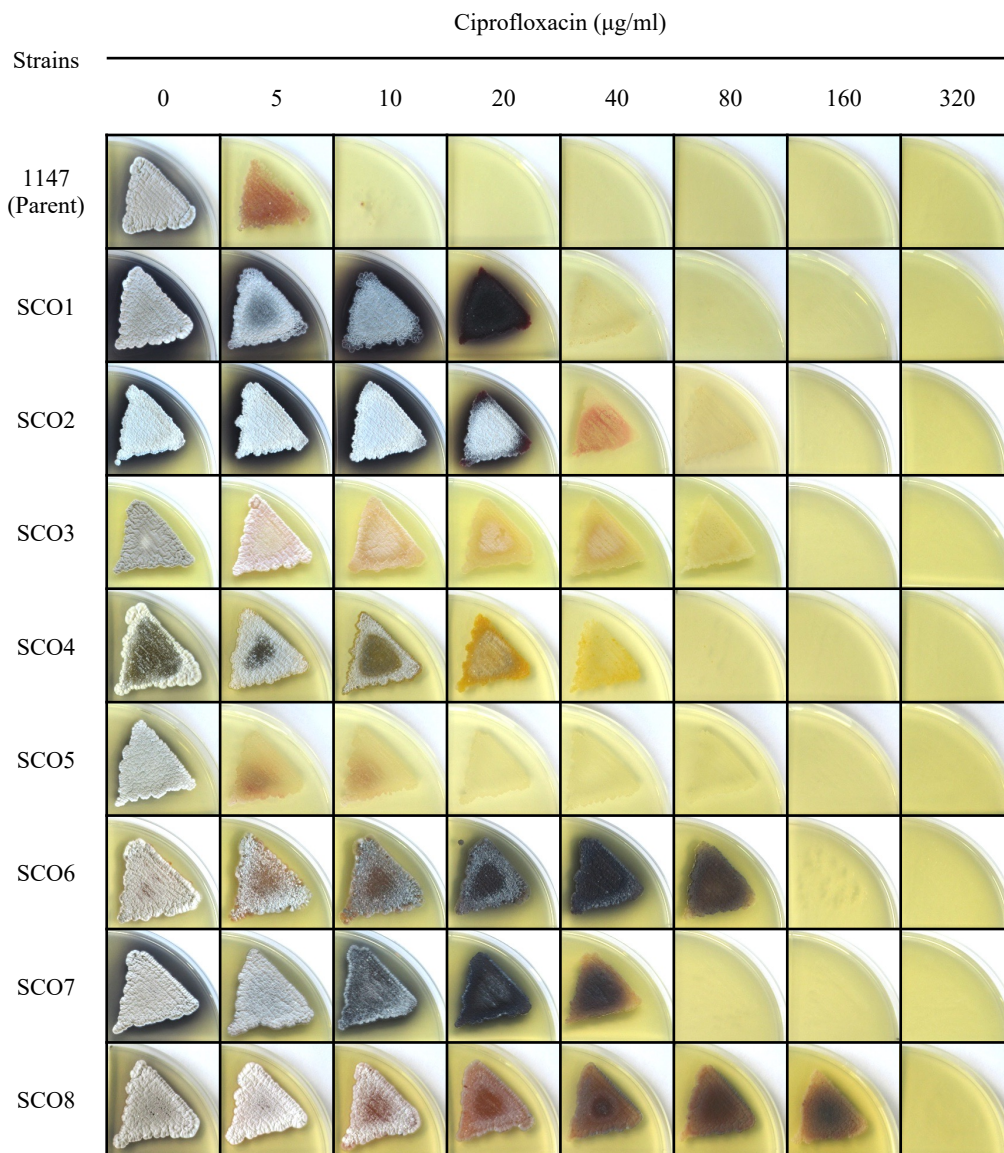


Fig. 3-4. Ciprofloxacin resistance in OF-resistant mutants of *S. coelicolor* A3(2). Strains (1×10^5 CFU spores and hyphal fragments) were inoculated onto GYM agar medium containing ciprofloxacin and incubated at 30°C for 7 days.

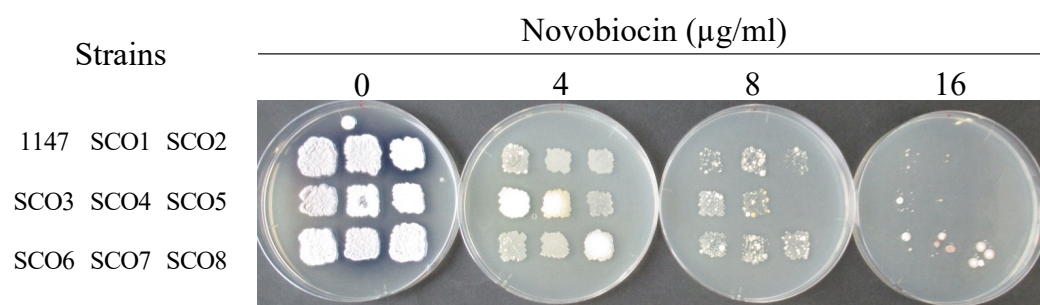


Fig. 3-5. Novobiocin resistance in OF-resistant mutants of *S. coelicolor* A3(2). Strains were inoculated onto GYM agar medium containing novobiocin and incubated at 30°C for 7 days.

3-2 遺伝学的作用による二次代謝 性化の解析

オフロキサシン耐性の 得が放線菌の二次代謝 性化を引き起こすか検証するため、オフロキサシン耐性変異株の二次代謝産物の生産を調べた。

S. coelicolor A3(2)

MR5 寒天培地における 7 日間培養によりアクチ ロージンの生産性を評価したところ、8.6%のオフロキサシン耐性変異株が、親株に比べてアクチ ロージンを高生産することが判った (Table 3-7)。取得したオフロキサシン耐性変異株の表現型は、色素生産や孢子形成などの表現型が多様であった。このことを踏まえ、*S. coelicolor* A3(2) が生合成遺伝子を有する他の二次代謝産物の生産も評価した。その結果、様々な二次代謝の 性化株の出現が認められ、その代表的な菌株を Fig. 3-6 に示した。SCO1 ではアクチ ロージンの高生産が認められ、その生産量は親株に比べて 10.5 倍有意に増加していた (Fig. 3-6A&B 上)。SCO2 ではウンデシルプロジ オシンの高生産が認められ、その生産量は親株から 2.4 倍有意に増加していた (Fig. 3-6B 下)。 *S. aureus* に対する抗菌 性試験を行ったところ、SCO3 は、他の変異株では認められない抗菌物質の生産増加が認められた (Fig. 3-6C)。この抗菌物質の同定に向けて、SCO3 の培養プレートのメタ ール抽出液から、HPLC による単離を行い、当該抗菌物質 5.0 mg を得た (Fig. 3-7)。この抗菌物質の NMR 解析を行ったところ、メチレ マイシン A と同定された (Table 3-8、Fig. 3-7~12)。この結果に一致して、SCO3 ではメチレ マイシン生合成における正の制御遺伝子である *mmyB* の mRNA レベルでの高発現化、および負の制御遺伝子である *mmfR* と *mmyR* の低発現化が確認された (Fig. 3-13)。SCO4 株では細胞内に黄色色素が蓄積していた (Fig. 3-5C)。 *S. coelicolor* A3(2)は、黄色色素のカロテ イドの生合成遺伝子クラスターを有することが知られている⁷⁵。そこで、カロテ イド生合成遺伝子である *crtI* の mRNA 発現を調べたところ、SCO4 は親株に比べて、*crtI* が高発現していることが判明し、カロテ イドの高生産が示唆された (Fig. 3-13)。

Table 3-7. Frequency of antibiotic-overproducing OF-resistant mutants in various strains of *Streptomyces*

Strain	Spore inoculated (CFU)	Frequency	
		OF ^r mutants	Antibiotic-overproducing OF ^r mutant (%)
<i>S. coelicolor</i> A3(2) 1147	4.8×10 ⁸	9.3×10 ⁻⁷	8.6 [38/444] ^a
<i>S. lividans</i> 66 1326	1.0×10 ¹⁰	1.3×10 ⁻⁸	13.6 [17/125]
<i>S. vietnamensis</i> NBRC 104153	3.6×10 ⁹	5.3×10 ⁻⁸	1.6 [3/189]
<i>S. griseus</i> IFO 13350	4.8×10 ¹⁰	3.9×10 ⁻⁹	8.6 [16/186]
<i>Streptomyces</i> sp. Y-4	8.0×10 ⁹	4.1×10 ⁻⁸	80.4 [266/331]

MIC: minimum inhibitory concentration; **OF:** ofloxacin.

^a The number of antibiotic-overproducing OF^r mutants / OF^r mutants tested

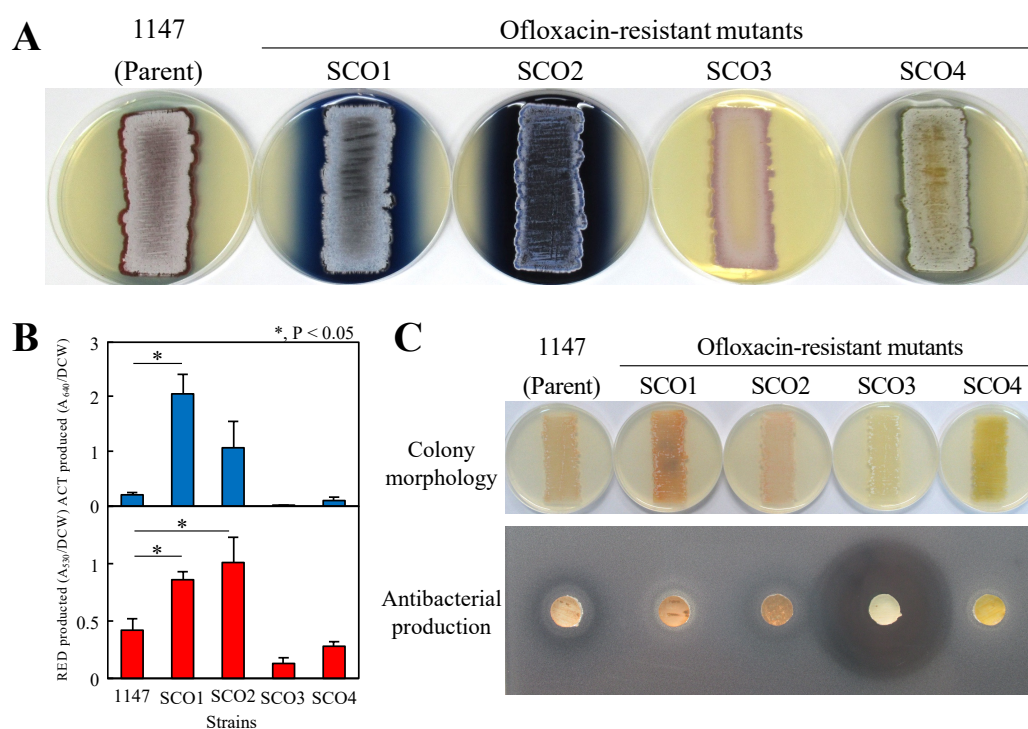


Fig. 3-6. Activation of secondary metabolism in ofloxacin-resistant (OF^r) mutants isolated from *S. coelicolor* A3(2). (A) Colony morphology and antibiotic production. Strains were grown on MR5 agar plates at 30°C for 7 days. (B) Pigmented antibiotics production. Strains were grown in GYM liquid medium at 30°C with shaking at 200 rpm for 7 days. (C) Antibacterial production in the early growth phase. Strains were grown on R3 agar plates at 30°C for 3 days (upper panel). Bioassay to test the antibacterial production of OF^r mutants against *Staphylococcus aureus* 209P (lower panel). Agar plugs were transferred to an assay plate containing *S. aureus* cells. The assay plates were incubated at 37°C for an additional 12 h.

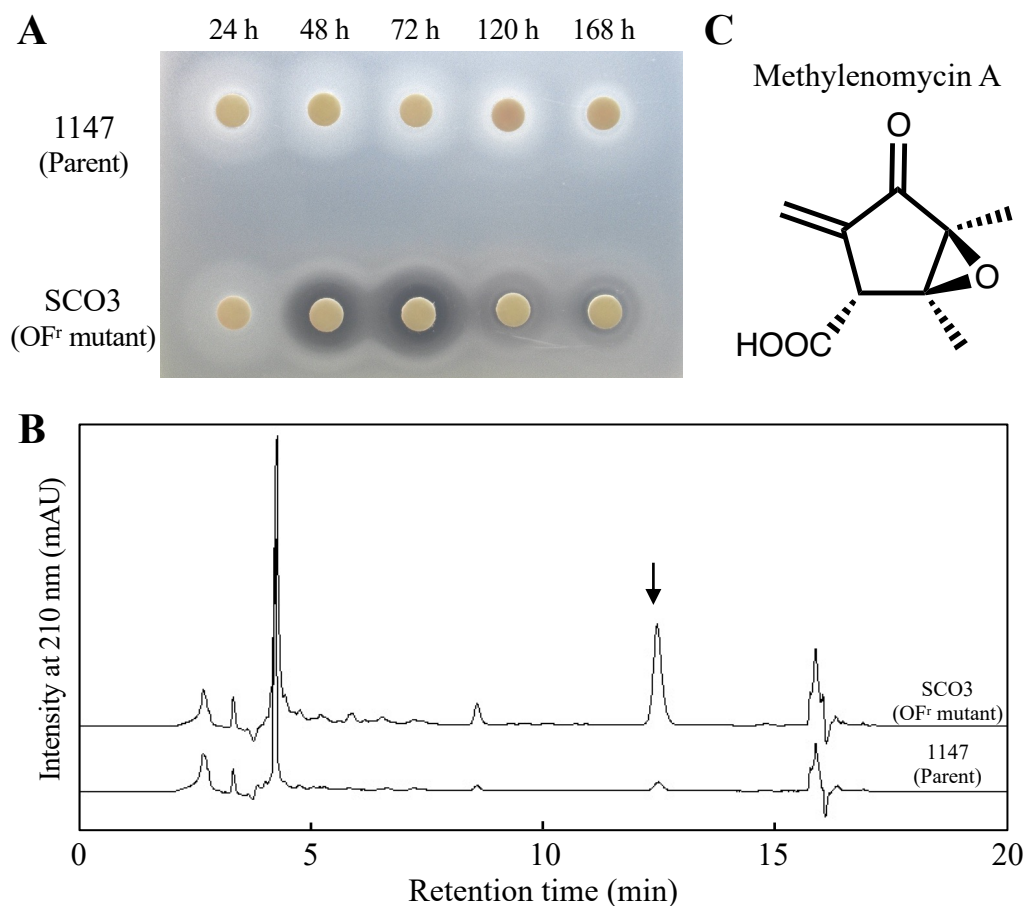
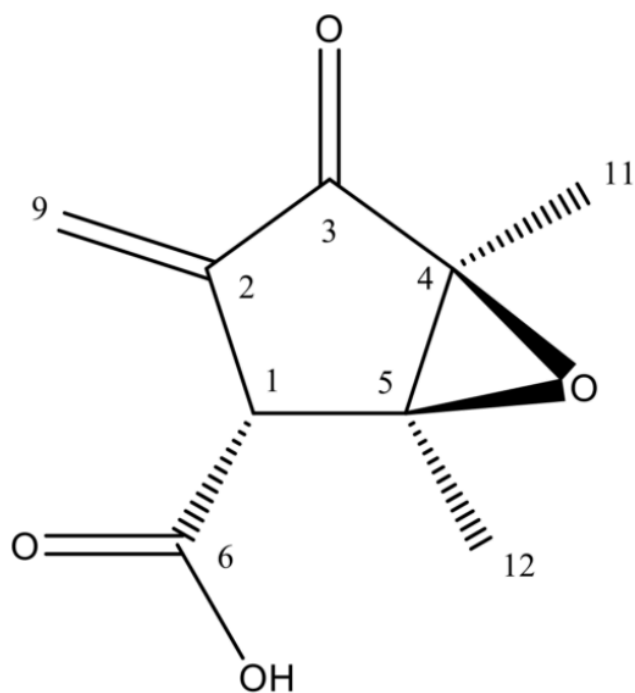


Fig. 3-7. Methylenomycin A production by the OF^r mutant SCO3 in *S. coelicolor* A3(2). (A) Bioassay of the culture extract prepared from the parental and SCO3 strains. Strains were grown on R3 agar plates at 30°C for the indicated times. The dried crude extracts from 25 ml of agar medium were dissolved in 2.5 ml of ultrapure water and a portion (500 μL) of the extract was used for the antibacterial assay activity against *S. aureus*. (B) HPLC analysis of the culture extract prepared from parental and SCO3 strains. Strains were grown on R3 agar plates at 30°C for 60 h. The arrow indicates the peak of methylenomycin A. (C) Chemical structure of methylenomycin A.

Table 3-8. Chemical shift values of methylenomycin A in DMSO-*d*₆

POS	δH ($J = \text{Hz}$)	δC
1	3.80 (br)	51.4
2		141.2
3		197.1
4		64.2
5		66.6
6		171.2
9	5.65 (d, 1.7), 6.05 (d, 1.7)	121.8
11	1.39 (s)	13.1
12	1.51 (s)	7.8



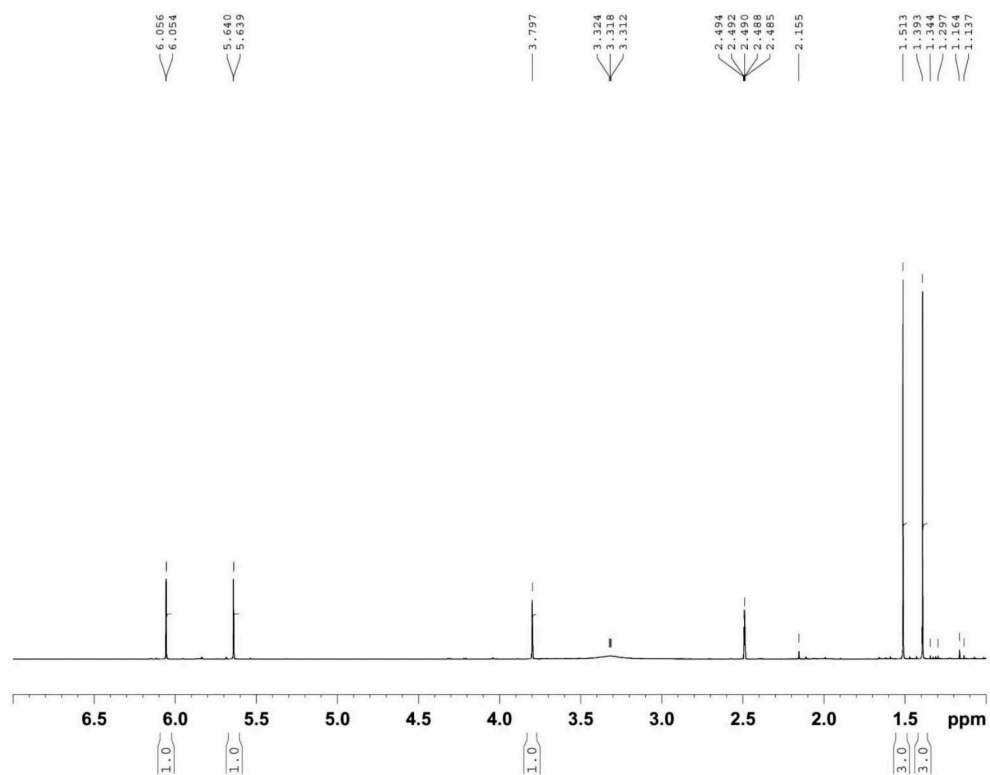


Fig. 3-8. ^1H NMR spectrum of methylenomycin A

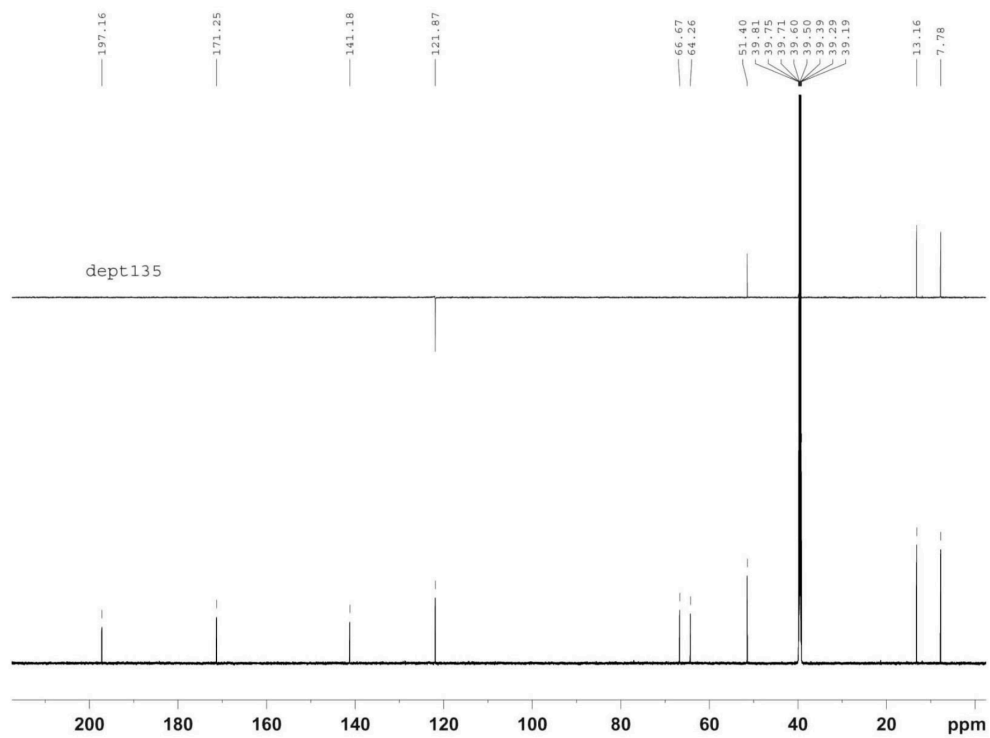


Fig. 3-9. ^{13}C NMR and DEPT135 spectra of methylenomycin A

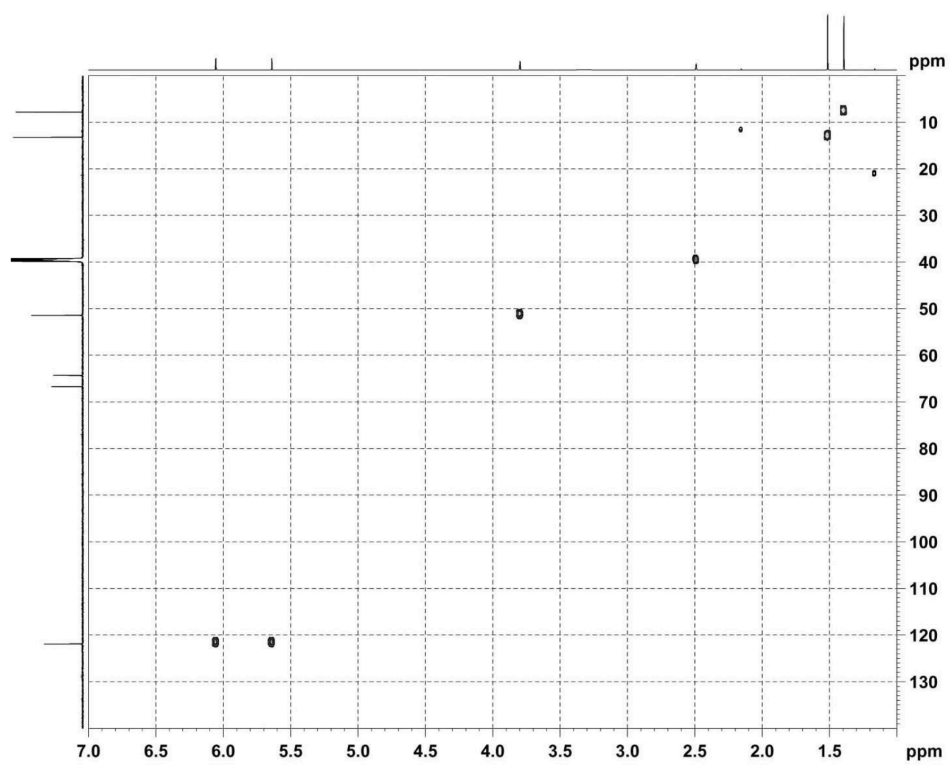


Fig. 3-10. HSQC spectrum of methylenomycin A

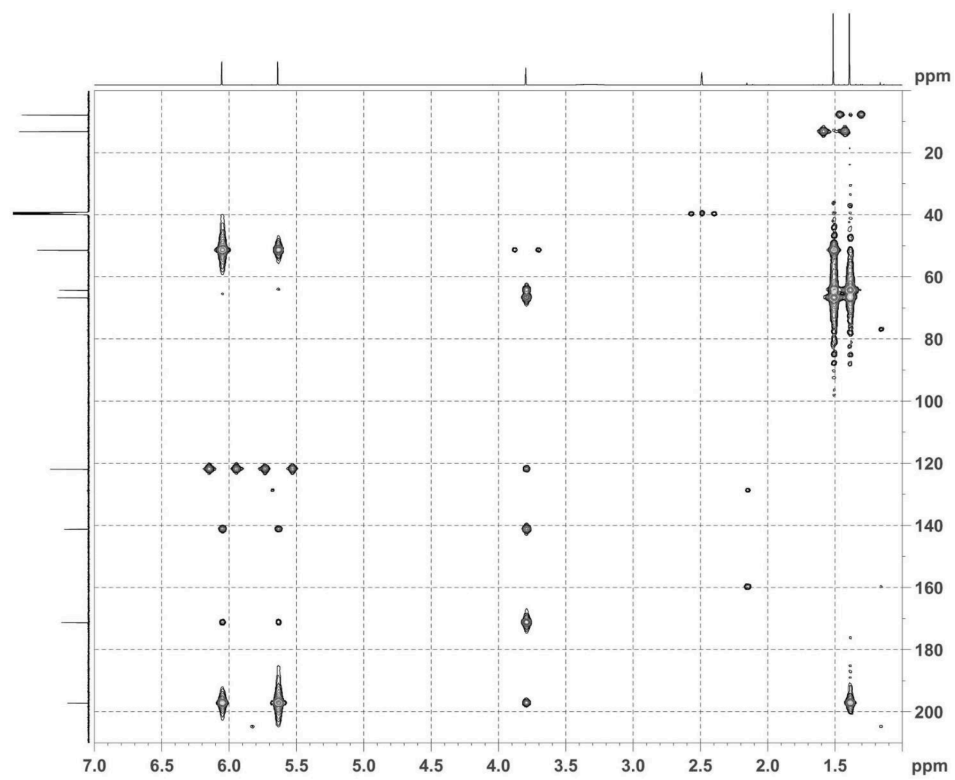


Fig. 3-11. HMBC spectrum of methylenomycin A

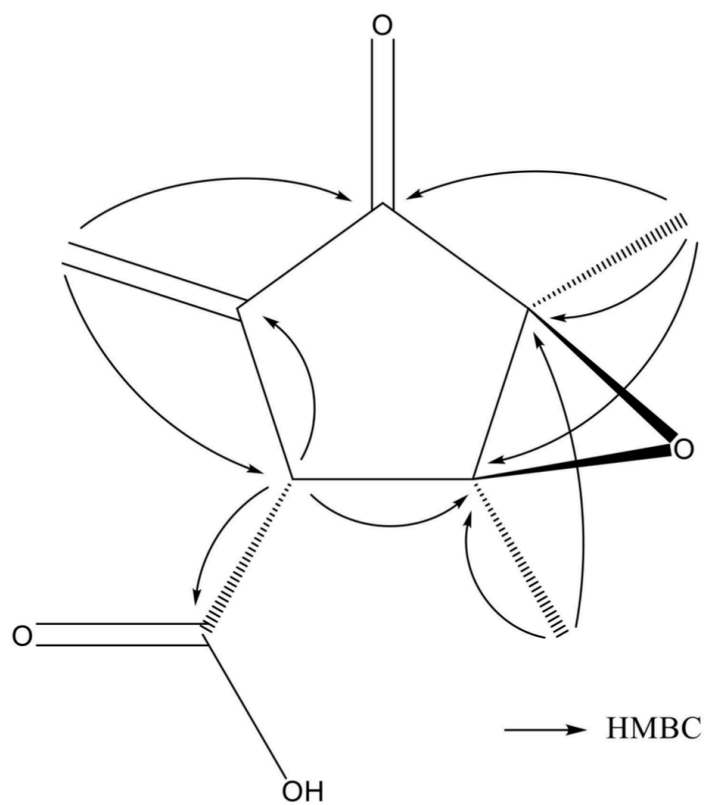


Fig. 3-12. Key HMBC correlations for structure identification of methylenomycin A

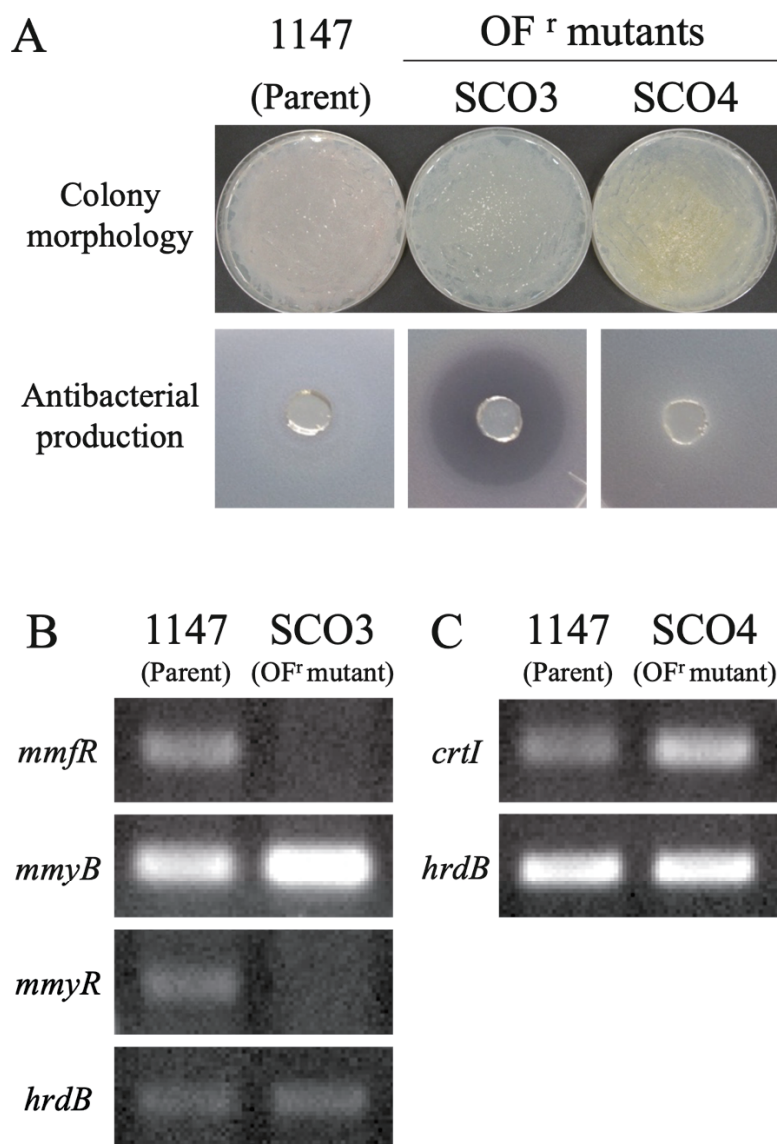


Fig. 3-13. Characterization of OF-resistant mutants that overproduced secondary metabolites in *S. coelicolor* A3(2). (A) Colony morphology and methylenomycin A/carotenoid (yellow pigment) production. Strains were grown on R3 agar plates incubated at 30 °C for 36 h. Agar plugs were transferred to the assay plate prepared with two-fold-diluted Mueller–Hinton agar containing *S. aureus* 209P cells. The assay plates were incubated at 37 °C for an additional 12 h. (B-C) Semi-quantitative RT-PCR expression profiling of the genes involved in the biosynthesis of methylenomycin A (B) and carotenoid (C). RNA was extracted from cells grown for 36 h on R3 agar plates. Total RNA preparation and RT-PCR were performed as described in the Materials and Methods section. Expression of the gene encoding principal sigma factors (σ^{HrdB}) was used as an internal control.

***S. lividans* 66**

R4 寒天培地における 7 日間培養によりアクチノロージンの生産性を評価したところ、13.6%のオフロキサシン耐性変異株が、親株に比べてアクチノロージンを高生産した (Table 3-7)。特にアクチノロージンの生産が顕著に高かった SLO1 の抗生物質生産量を定量した。その結果、SLO1 は、アクチノロージンとウンデシルプロジオリシンをそれぞれ、6.5 倍および 1.7 倍、親株に比べて高生産することが判明した (Fig 3-14A)。*S. lividans* 66 においても、様々な表現型の菌株が取得されたため、特徴的な菌株の代謝物を分析した。その結果、胞子の色調が変化した SLO2 および胞子形成が欠失した SLO3 では、親株では認められない物質が複数検出された (Fig 3-15A)。

***S. vietnamensis* NBRC 104153**

GYM 寒天培地における 7 日間培養により赤色抗生物質グラナチシンの生産性を評価したところ、1.6%のオフロキサシン耐性変異株が、SVO1 のように、親株に比べてグラナチシンを高生産した (Table 3-14B)。加えて、SVO2 のように、赤色色素を生産する菌株も出現した (Fig 3-14B)。

***S. griseus* IFO 13350**

MR5 寒天培地における 7 日間培養により抗菌物質生産を評価 (検定菌: *S. aureus* および *E. coli*) したところ、8.6%のオフロキサシン耐性変異株が、抗菌物質を高生産した (Table 3-7)。それら抗菌物質生産株の中には、SGO1 のように *S. aureus* と *E. coli* の双方に抗菌性を示すものと SGO2 のように *S. aureus* にのみ抗菌性を示すものが存在した (Fig 3-14C)。加えて、表現型が大きく変化した SGO1-3 では、代謝物プロファイルの大きな変化も認められた (Fig 3-15B)。

***Streptomyces* sp. Y-4**

MR5 寒天培地における 7 日間培養により抗菌物質生産を評価 (検定菌: *S. aureus*) したところ、80.4%のオフロキサシン耐性変異株が、SO1 の

ように、抗菌物質を高生産した Table 3-7)。その他にも、胞子や気菌糸の形成が大きく変化した菌株が出現した Fig 3-14D)。

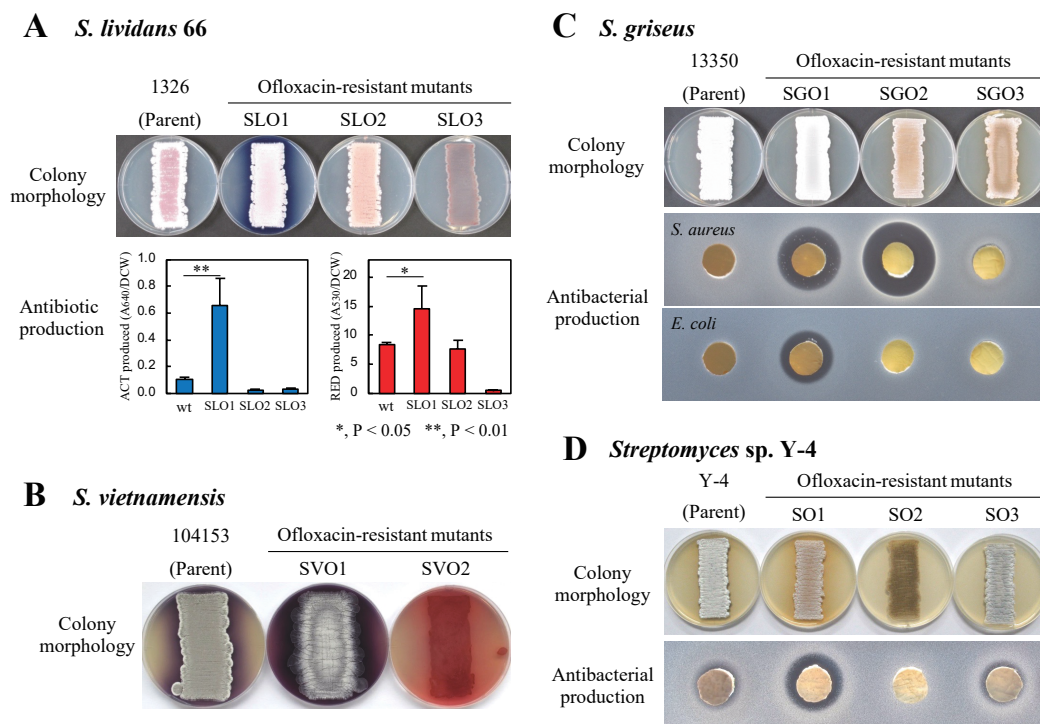
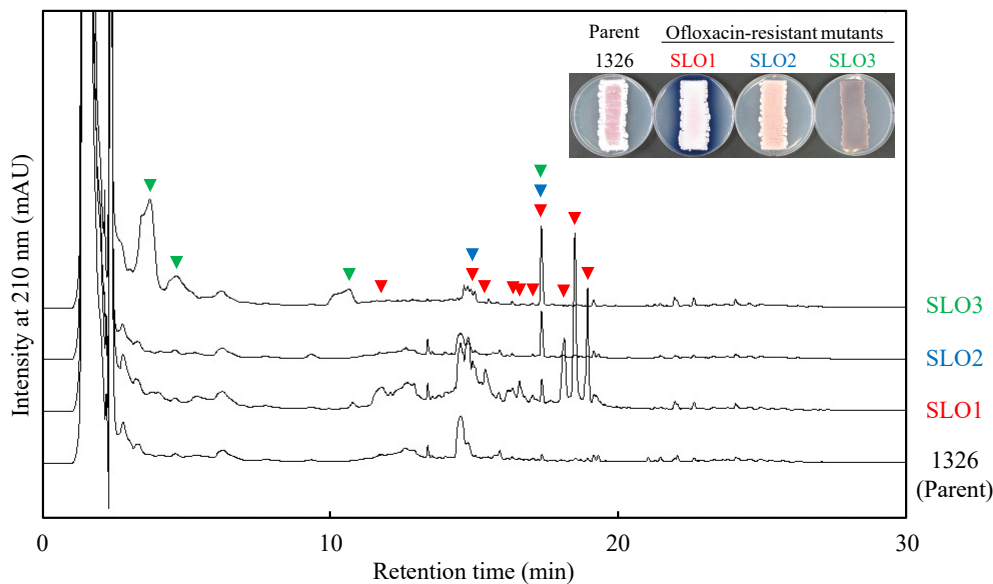


Fig. 3-14. Activation of secondary metabolism in OF^r mutants isolated from *Streptomyces* strains. (A) Colony morphology and antibiotic production in *Streptomyces lividans* 66. Strains were grown on R4 agar medium at 30°C for 7 days (upper panel). Strains were grown in R4 liquid medium at 30°C with shaking at 200 rpm for 7 days (lower panel). (B) Colony morphology and antibiotic production in *Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153. Strains were grown on GYM agar medium at 30°C for 7 days. (C) Colony morphology and antibiotic production in *Streptomyces griseus* IFO 13350. Strains were grown on MR5 agar medium at 30°C for 7 days (upper panel). Bioassay to test the antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* (lower panel). (D) Colony morphology and antibiotic production in *Streptomyces* sp. Y-4. Strains were grown on MR5 agar medium at 30°C for 7 days (upper panel). Bioassay to test the antibacterial activity against *S. aureus* (lower panel).

A *S. lividans*



B *S. griseus*

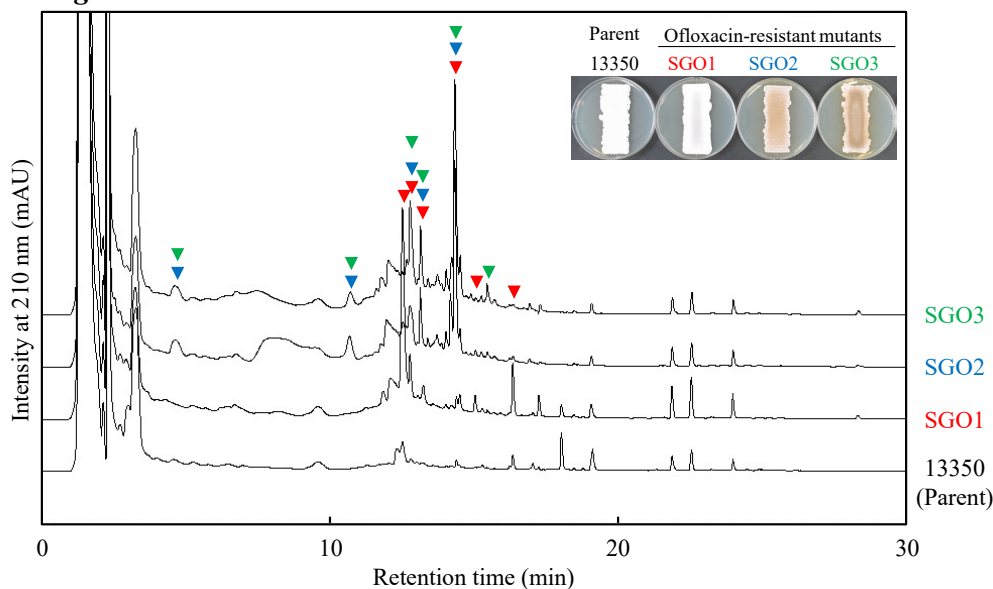


Fig. 3-15. HPLC analysis of the culture extract prepared from the OF-resistant mutants isolated from *Streptomyces* strains. Strains were grown at 30°C for 7 days. Samples were prepared and analyzed as described in the Materials and Methods section. The eluate absorbance was monitored at 210 nm. The colored arrows indicate clearly detectable peaks in the samples prepared from a culture plate of the corresponding OF-resistant mutant. (A) *S. lividans* 66 strains were grown on R4 agar medium. (B) *S. griseus* strains were grown on MR5 agar medium.

3-3 生 学的作用による二次代謝 性化の 導の解析

S. coelicolor A3(2)におけるオフロキサシンの MIC の 定において、一部のオフロキサシン耐性株がオフロキサシン存 下でアクチ ロージンを高生産することが判明した (Fig 3-2 & 3-16A)。特に、SCO5、6、7は、通常はアクチ ロージンをほとんど生産しないものの、オフロキサシン存 下では、顕著なアクチ ロージンの高生産を示すことが判明した (Fig 3-17)。このような現象は、*S. lividans* 66 のアクチ ロージン生産や、*S. vietnamensis* のグラナチシン生産においても認められた (Fig 3-16B、C、& 3-17)。そこでオフロキサシンによるアクチ ロージン生産 性化の 導がオフロキサシン耐性変異株 体で起こるか否か検証した。

SCO5、6、7が共通して、アクチ ロージンの生産が 性化 (Fig 3-17A)したオフロキサシン 20 µg/mlを至適 性化濃度とし、オフロキサシン 0および 20 µg/mlを含む GYM 寒天培地で、*S. coelicolor* A3(2)より取得したオフロキサシン耐性変異株を培養した。その結果、オフロキサシン非存 下ではアクチ ロージン高生産を示さない 407株のオフロキサシン耐性変異株のうち、87株がオフロキサシン存 下でアクチ ロージン生産の向上を示した (Fig 3-18A)。加えて、オフロキサシン非存 下でアクチ ロージンを高生産する菌株 37株のうち、20株はオフロキサシン存 下でさらにアクチ ロージンの生産が 性化することが判った。以上の結果より、オフロキサシン耐性株の取得とオフロキサシン存 下での培養を 用することにより、27.9%のオフロキサシン耐性変異株の抗生物質生産を 性化できることが明らかとなった (Fig 3-18A)。

同様の検証を *S. lividans* 66で行ったところ、オフロキサシン非存 下ではアクチ ロージン高生産を示さないオフロキサシン耐性株 115株のうち、65株がオフロキサシン存 下でアクチ ロージン生産の向上を示した (Fig 3-18B)。加えて、オフロキサシン非存 下でアクチ ロージンを高生産する菌株 10株のうち、7株はオフロキサシン存 下でさらにアクチ ロージンの生産が 性化することが判った。以上の結果より、オフロキサシン耐性株の取得とオフロキサシン存 下での培養を 用することにより、60.0%のオフロキサシン耐性変異株の抗生物質生産を 性化できること

が明らかとなった (Fig 3-17B)。

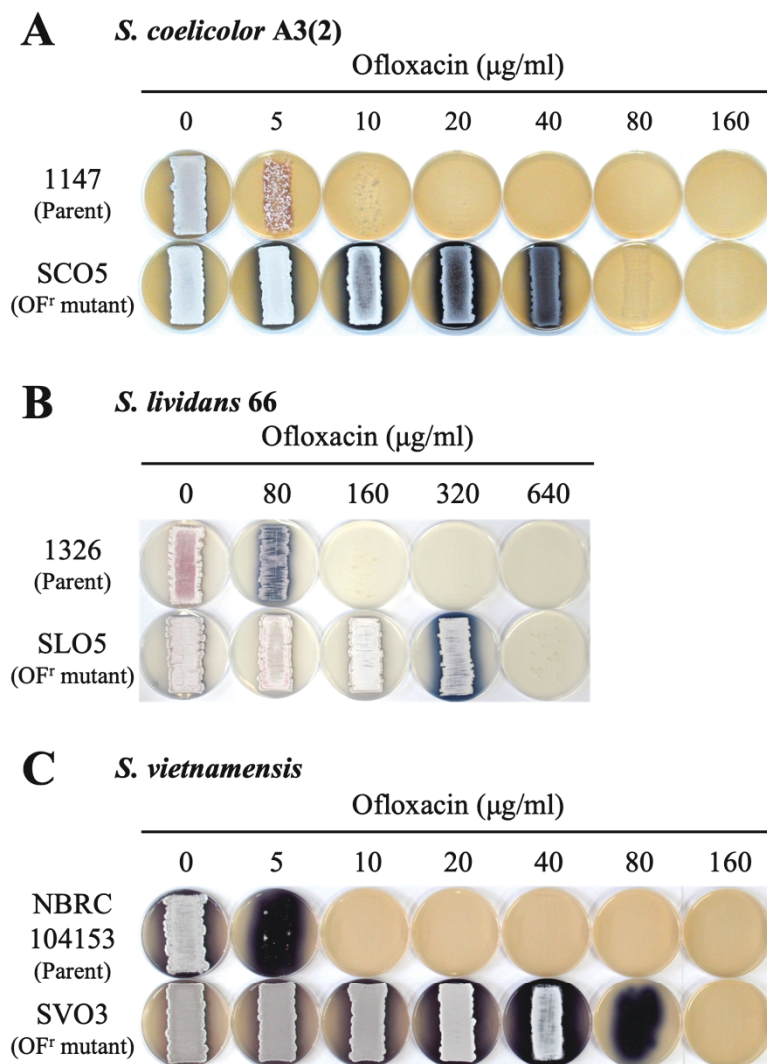


Fig. 3-16. Effects of ofloxacin on the growth and pigmented antibiotic production of OF^r mutants isolated from *Streptomyces* strains. (A) *S. coelicolor* A3(2) strains were grown on GYM agar plates at 30°C for 7 days. (B) *S. lividans* 66 strains were grown on R4 agar plates at 30°C for 7 days. (C) *S. vietnamensis* strains were grown on GYM agar plates at 30°C for 7 days.

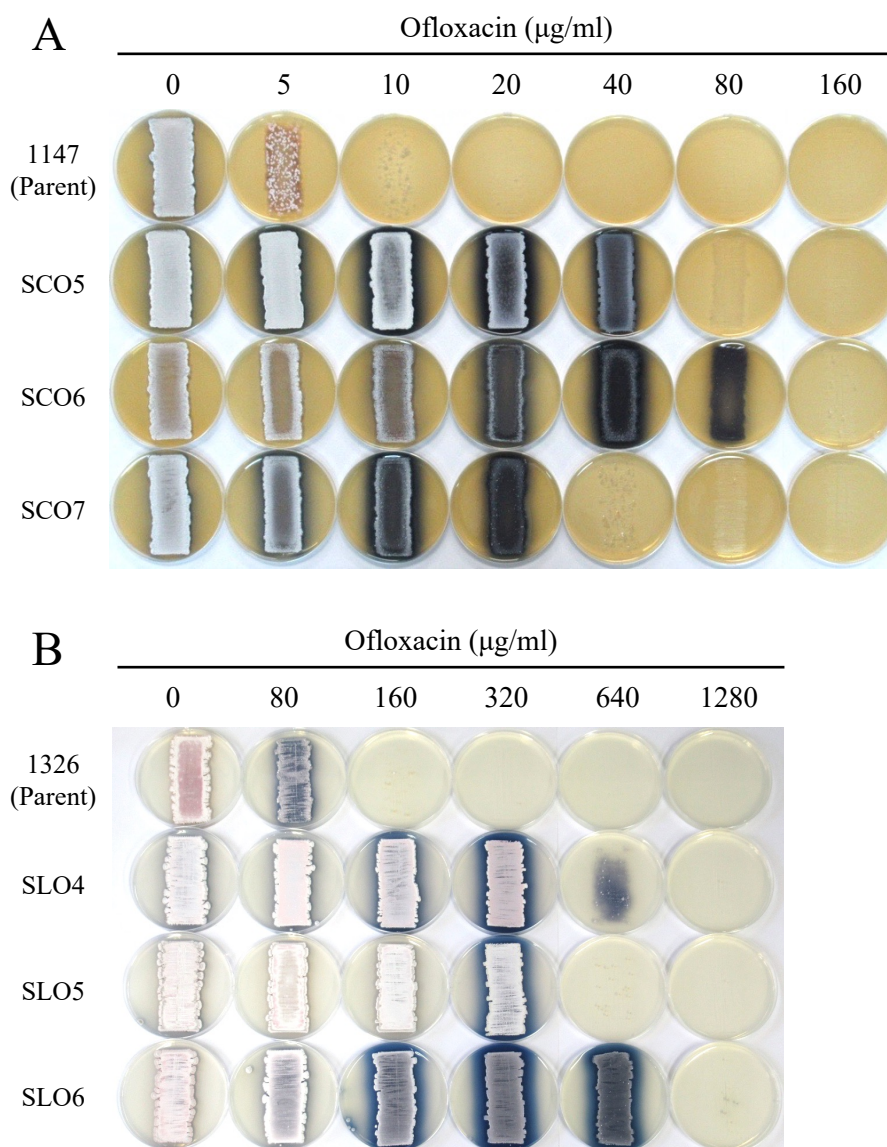


Fig. 3-17. Effects of OF on the growth and actinorhodin production of various OF-resistant mutants isolated from *Streptomyces* spp. (A) *S. coelicolor* A3(2) strains were grown at 30°C for 7 days on GYM agar medium. (B) *S. lividans* 66 strains were grown at 30°C for 7 days on R4 agar medium.

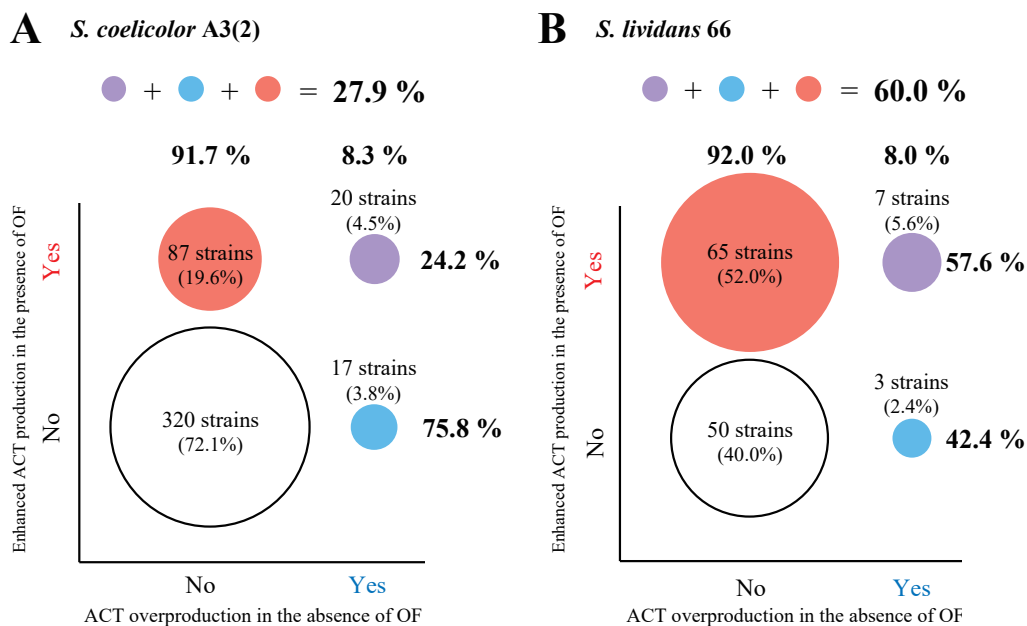


Fig. 3-18. Frequency of OF^r mutants with actinorhodin overproduction in the presence or absence of ofloxacin in *Streptomyces* strains. The size of each circle indicates the size of the mutant population. White circles indicate strains that exhibited non-production under any conditions. Red circles indicate strains that exhibited non-production in the absence of ofloxacin and overproduction in the presence of ofloxacin. Blue circles indicate strains that exhibited overproduction in the absence of ofloxacin. Purple circles indicate strains that exhibited overproduction in the absence of ofloxacin and a high level of overproduction in the presence of ofloxacin. (A) *S. coelicolor* A3(2) strains were grown on GYM agar plates containing ofloxacin (20 µg/ml, 4 × MIC) at 30°C for 14 days. (B) *S. lividans* 66 strains were grown on R4 agar plates containing ofloxacin (320 µg/ml, 4 × MIC) at 30°C for 7 days.

3-4 オフロキサシン耐性と二次代謝 性化に関する変異の解析

オフロキサシン耐性と二次代謝 性化の仕組みの解明に向け、*S. coelicolor* A3(2)のオフロキサシン耐性変異株の変異を解析した。様々な表現型を示すオフロキサシン耐性変異株4株(アクチノロージン高生産株 SCO1、メチレマイシン A 高生産株 SCO3、オフロキサシン 導型アクチノロージン高生産株 SCO5、高レベルオフロキサシン耐性株 SCO8)のゲノム解析により、同定された変異を Table 3-9 に示した。

解析に供試した菌株でのオフロキサシン耐性変異株が、*sco3207* TetR ファミリー転写因子遺伝子)のフレームシフト変異(Cys139Gly もしくは Glu50Ser)を有していた。加えて、それらの菌株でオフロキサシンの MIC が高い SCO5 および SCO8 では、DEAD/DEAH box ヘリカーゼ遺伝子における点変異もしくはフレームシフト変異の獲得が認められた。

ゲノム解析に供していないオフロキサシン耐性株において、これら遺伝子を個別にシーケンス解析したところ、菌株で TetR ファミリー転写因子遺伝子のフレームシフト変異が検出された。さらに、SCO4、6 株では、DEAD/DEAH box ヘリカーゼ遺伝子におけるフレームシフト変異が検出された。

また、フルオロキノロン耐性変異が様々な細菌で数多く報告されている II 型トポイソメラーゼ遺伝子 (*gyrA/B* および *parC/E*) 変異は、ゲノム解析に供した菌株からは検出されなかった⁷⁶。

以上の変異に加え、SCO1 では、*sco0799* (推定タンパク質遺伝子)、*sco3831* (分岐鎖 α ケト酸脱水素 素 α サブユニット遺伝子)、*sco7626* (モオキシゲナーゼ遺伝子)、および 3 の非コード領域変異を有していた。SCO3 は、*sco0799* (推定タンパク質遺伝子)、および 1 の非コード領域変異を有していた。SCO5 は、*sco0799* (推定タンパク質遺伝子)、*sco3549* (アンチアンチシグマ因子 BldG 遺伝子)、*sco3932* (GntR ファミリー転写因子遺伝子)、*sco5494* (NAD 依存型 DNA リガーゼ遺伝子)、および 1 の非コード領域変異を有していた。さらに、SCO5 は染色体左端におよそ 300kb (323 遺伝子)、染色体右端におよそ 700kb (713 遺伝子)の大規模欠失を有していた。SCO8 は、*sco3173* (MerR ファミリー

一転 因子遺伝子)、*sco3774* (ラクタマーゼ遺伝子)、および 2 の非コード領域変異を有していた。

sco3207 の下流に隣接する推定排出ポンプ遺伝子 (*sco3206*) の発現量を半定量 RT-PCR 法により調べた。その結果、解析した *tetR* 変異株で、親株に比べて、排出ポンプ遺伝子の発現が高まっていた (Fig 3-19)。

Table 3-9. Summary of mutations in the OF-resistant mutants of *S. coelicolor* A3(2)

Strain	Gene	Gene Classification	Product	Position	Reference	Alteration	Mutation	Amino acid change
NGS-analyzed strains								
SCO1	SCO0799	Others	Hypothetical protein	846374	G	A	Transition	Leu146Leu
	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop
	-	Junk DNA	-	3934810	C	G	Transversion	-
	SCO3831	Amino acid metabolism	E1- α branched-chain α keto acid dehydrogenase (BkdA2)	4213660	C	-	Deletion	Gly260Ala FS: AA268Stop
	-	Junk DNA	-	5010121	A	G	Transition	-
	-	Junk DNA	-	6050394	C	T	Transition	-
SCO7626	Antimicrobial resistance	Monooxygenase		8452572	A	C	Transversion	Phe378Cys
SCO3	SCO0799	Others	Hypothetical protein	846374	G	A	Transition	Leu146Leu
	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop
	-	Junk DNA	-	3934810	C	G	Transversion	-
SCO7284	Replication	Ribonuclease H (RnhA)		8090287	A	G	Transition	Asp118Gly
SCO5	SCO0799	Others	Hypothetical protein	846374	G	A	Transition	Leu146Leu
	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop
	SCO3549	Transcription	Anti-sigma antagonist(BldG) factor	3924583	A	C	Transversion	Ser4Ala
	-	Junk DNA	-	3934810	C	G	Transversion	-
	SCO3932	Transcription	GntR-family transcriptional regulator	4327698	C	T	Transition	Val220Ile
	SCO5494	Replication	NAD-dependent DNA ligase (LigA)	5980776	G	C	Transversion	Arg664Arg
	SCO6262	Replication	DEAD/DEAH box helicase	6887071	A	C	Transversion	Stop978Cys: AA1072Stop
	323 genes	-	-	1-336428	-	-	Deletion ^a	-
	713 genes	-	-	7927186-8667507	-	-	Deletion ^a	-
	SCO8	-	Junk DNA	-	877601	C	G	Transversion
SCO3173	SCO3173	Transcription	MerR-family transcriptional regulator	3478432	C	T	Transition	Ser203Ser
	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515889	C	-	Deletion	Glu50Ser FS: AA186Stop
	SCO3774	Antimicrobial resistance	β -lactamase	4149243	G	T	Transversion	Met186Ile
	SCO6262	Replication	DEAD/DEAH box helicase	6885124-6885125	-	C	Insertion	Pro331Ala FS: AA1775Stop
	-	Junk DNA	-	277357 (SCP1) ^b	A	G	Transition	-
Strains not subjected to NGS analysis								
SCO2	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop
SCO4	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop
	SCO6262	Replication	DEAD/DEAH box helicase	6885998	C	-	Deletion	Trp622Gly FS: AA633Stop
SCO6	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop
	SCO6262	Replication	DEAD/DEAH box helicase	6885946	T	-	Deletion	Leu604Pro FS: AA633Stop
SCO7	SCO3207	Transcription	TetR-family transcriptional regulator	3515615-3515622	ATGGGGCA	-	Deletion	Cys139Gly FS: AA264Stop

FS: frameshift.

^a Large deletion on the chromosome.

^b The mutation in linear plasmid SCP1.

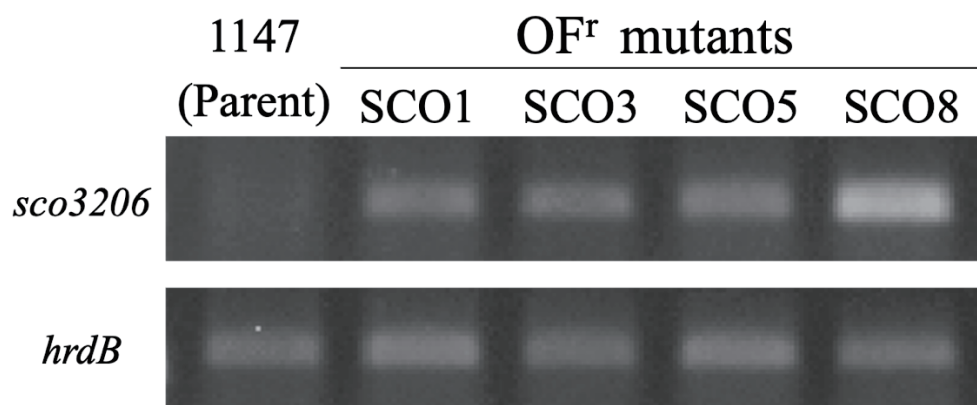


Fig. 3-19. Semi-quantitative RT-PCR expression profiling of *sco3206* encoding putative transmembrane efflux protein. RNA was extracted from cells grown for 24 h on GYM agar plates. Total RNA preparation and RT-PCR were performed as described in the Materials and Methods section. Expression of the gene encoding principal sigma factors (σ^{HrdB}) was used as an internal control.

S. coelicolor A3(2)で検出された変異が、他の放線菌において共通するか調べるため、*S. vietnamensis* のオフロキサシン耐性変異株のうち高レベル耐性を示した SVO3 のゲノム解析を行ったが、*S. coelicolor* A3(2) の TetR ファミリー転写因子遺伝子や DEAD/DEAH box ヘリカーゼ遺伝子のホモログ遺伝子に変異は認められなかった (Table 3-10)。

さらに、*S. lividans* 66 のオフロキサシン耐性変異株においても、TetR ファミリー転写因子遺伝子のホモログ遺伝子のシーケンス解析を行なったが、いかなる変異も認められなかった。

Table 3-10. Summary of mutations in the OF-resistant mutants of *S. vietnamensis*

Strain	Gene	Gene classification	Product	Position	Reference	Alteration	Mutation	Amino acid change
SVO3	SVTN_15985	Transcription	Transcriptional regulator	3621312	T	C	Transition	Val111Ala
	SVTN_27335	Amino acid Metabolism	Phenylacetaldehyde dehydrogenase	6057705	C	T	Transition	Ala303Ala

4. 考察

本研究では、リボソーム工学に代表される薬剤耐性選抜法の新たなアプローチとして、DNA複製を標的とする抗生物質を用いた薬剤耐性選抜法を考案し、有効性を検証した。その結果、オフロキサシンの遺伝学的・生化学的作用は、放線菌の潜在的二次代謝を多様かつ劇的に活性化させることが明らかとなった。

5種の *Streptomyces* 属放線菌よりオフロキサシン耐性株を取得し、二次代謝産物の生産を調べたところ、全ての放線菌から抗菌物質高生産株の出現が認められた。*S. coelicolor* A3(2)では、色素抗生物質アクチノロージンやウンデシルプロジオリシンに加え、これまでに薬剤耐性選抜法による高生産化の前例がないメチレマイシンA、およびカロテノイドといった、様々な二次代謝産物の高生産株が出現した。これら二次代謝産物の生合成遺伝子は染色体DNA上の異なる領域に存在し、メチレマイシンAに関しては、巨大線状プラスミドSCP1上に生合成遺伝子がコードされている^{77,78}。以上の事実を踏まえると、オフロキサシン耐性変異株の取得は、放線菌のゲノム上に存在する様々な二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの活性化に有効であることが明らかとなった。今後このような現象が、本研究で扱っていない希釈放線菌やその他の細菌でも起こるか否か検証することは重要な課題といえる。

取得したオフロキサシン耐性変異株は、同じフルオロキノロン系抗生物質であるシプロフロキサシンへの耐性も示したことから、他のフルオロキノロン系抗生物質を用いても、オフロキサシンの作用と同様に、放線菌の二次代謝活性化を実現できるものと推察された。その一方で、本研究で取得したオフロキサシン耐性変異株は、アミクマリン系抗生物質ボビオシンへの差耐性は示さなかった。ボビオシンは、DNAジャイレースBサブユニットのATP結合部位に結合し、DNA複製を阻害する抗生物質であり、フルオロキノロン系抗生物質とは、DNAジャイレースにおける結合部位が異なる⁷⁹。これらことは、放線菌におけるオフロキサシン耐性変異とボビオシン耐性変異は異なることを示唆しており、ボビオシン耐性変異株のスクリーニングは、本研究で得られたオフロキサシン耐性変異株とは

異なるタイプの菌株が取得されることを暗示している。DNA 複製をターゲットとする抗生物質は、フルオロキロン系抗生物質以外にも、ブレオマイシン、ナイボマイシン、ゲポチダシン、ゾリフロダシンなどが知られており、これら抗生物質への耐性変異株の取得とその特性評価は、放線菌の二次代謝活性化における DNA 複製阻害剤の応用という新たなアプローチの確立につながる可能性があり、極めて興味深い⁸⁰⁻⁸³。

オフロキサシン耐性と二次代謝活性化の仕組みの解明に向けた第一段階として、*S. coelicolor* A3(2)に由来するオフロキサシン耐性変異株のゲノム解析を行った。その結果、解析した菌株でのオフロキサシン耐性株が TetR ファミリー転写因子遺伝子 (*sco3207*) にフレームシフト変異を有することが明らかとなった。一般に TetR ファミリー転写因子遺伝子は、タンパク質に翻訳されると、自身を含むオペロンの上流 DNA 領域に結合し、オペロンの転写を抑制するリプレッサーとして知られている。このタンパク質に抗生物質などのリガンドが結合すると、タンパク質の立体構造が変化し、DNA から垂離することで、オペロン内の遺伝子の転写誘導が起こる。同オペロン内に薬剤耐性遺伝子が含まれる場合、細胞は一時的薬剤耐性状態になる。このように、TetR ファミリー転写因子遺伝子はリガンドの濃度に応じて転写調節を行う制御因子である⁸⁴。オフロキサシン耐性変異株で確認されたいくつかの変異も、フレームシフト変異によるアミノ酸配列の大規模変化が起きており、TetR ファミリー転写因子の機能欠失が示唆された。TetR ファミリー転写因子遺伝子がオフロキサシン耐性変異に関与するとの報告は、*S. coelicolor* A3(2)においてなかった。その一方で、Guerinらは、*Listeria* 属細菌の TetR ファミリー転写因子遺伝子 *fepR* が、その下流に隣接するフルオロキロン排出ポンプ遺伝子 *fepA* のリプレッサーであることが明らかになり、*fepR* の遺伝子破壊が *fepA* の恒常的高発現をもたらす、フルオロキロン系抗生物質への耐性レベルの上昇につながることを明らかにしている⁸⁵。この知見を踏まえ、*S. coelicolor* A3(2)の TetR ファミリー転写因子遺伝子 (*sco3207*) と同じ転写単位に存在する推定排出タンパク質遺伝子 (*sco3206*) の発現量を調べたところ、菌株での *tetR* 変異株で、親株に比べて、排出タンパク質遺伝子の発現が高まって

いた。以上の事実を踏まえると、放線菌における TetR ファミリー転 因子のフレー シフト変異は、その機能欠損を介して、排出ポンプなどの制御下遺伝子の恒常的発現を導くことにより、オフロキサシン耐性をもたらすことが示唆された。

一方で、TetR ファミリー転 因子には、抗生物質、脂質、アミノ酸、シグナル分子など、様々な天然物をリガンドとするものが知られている⁸⁴。しかしながら、完全合成物であるフルオロキロン系抗生物質が TetR ファミリー転 因子のリガンドとなる報告はない。このことと TFR 変異株が ポビオシンといった他の抗生物質に 差耐性を示さなかったことを踏まえると、*sco3206* タンパク質 (TetR ファミリー転 因子) は、完全合成物であるオフロキサシンをリガンドとし、耐性を発 することも考察された。このような完全合成化合物を特異的に認識し、発 される TetR 薬剤耐性システムはこれまでに知られておらず、この仮説の検証は興味深い。

TetR ファミリー転 因子遺伝子の変異に加え、オフロキサシンへの耐性レベルが高い SCO5、6、8 株などは、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子 (*sco6262*) における変異も共通して有していた。これら変異は異なるパターンのフレー シフト変異や、終始コドンの変異によるタンパク質の延長に なる変異などであり、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼの機能が損な れているものと推察された。この DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子 (*sco6262*) に関する研究報告は、*S. coelicolor* A3(2)では存 在しなかった。一般に DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼは、RNA ヘリカーゼとして、リボソームの生合成、RNA ターンオーバー、 訳の開始に関与し、細菌の環境変化への適応やストレス応答において重要な役割を果たすことが知られている⁸⁶。しかしながら、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼがオフロキサシン耐性に関与するとの報告はなかった。したがって、放線菌の DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼは、他の細菌のものとは異なり、オフロキサシンのターゲットとなりえ、オフロキサシンに阻害されることで放線菌の細胞死に なるような重要な役割を果たしていることが推察される。そのため、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼの欠失がオフロキサシン耐性に なることも推察された。

様々な細菌において、フルオロキロン系抗生物質の標的タンパク質をコードする II 型トポイソメラーゼ遺伝子 (*gyrA/B*, *parC/E*) の点変異により、オフロキサシンの表現型が出現することが知られている⁷⁶。しかしながら、本研究で取得した放線菌のオフロキサシン耐性変異株において、II 型トポイソメラーゼ変異は確認されなかった。これは、放線菌では、TetR ファミリー転写因子遺伝子や DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子の変異(機能欠損)により、オフロキサシンに十分対応することができ、II 型トポイソメラーゼを変異させる必要がないことを示すのかもしれない。加えて、放線菌では、II 型トポイソメラーゼというよりはむしろ、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼがオフロキサシンのメインターゲットであり、このヘリカーゼの機能阻害が細胞の生存に大きな影響を及ぼす可能性もある。いにせよ *S. coelicolor* A3(2) のオフロキサシン耐性変異株の獲得変異を踏まえると、TetR ファミリー転写因子遺伝子や DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子の変異は、放線菌におけるこれまでに知られていないオフロキサシン耐性機構であることが示唆された。

二次代謝活性化においても、TetR ファミリー転写因子遺伝子や DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子の変異の関与が示唆された。放線菌は多数の TetR ファミリー転写因子遺伝子を有することが知られているが、その中には、抗生物質生合成に関する遺伝子のリプレッサーとして働くものも存在している⁸⁴。そのため TetR ファミリー転写因子遺伝子の変異が、放線菌の二次代謝活性化に関する可能性が考えられた。一方で、

村らは、*Burkholderia* 属細菌が、DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼを欠失することにより、二次代謝産物である Haereoplatin A を高生産するようになることを報告している⁸⁷。そのメカニズムについては未だ明らかにされていないものの、*S. coelicolor* A3(2) の DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子の機能欠損に二次代謝活性化効果があることが推察された。

オフロキサシン耐性変異株では様々な二次代謝産物の高生産化が認められた。この多様な二次代謝の活性化を、TetR ファミリー転写因子遺伝子と DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子の変異のみで説明するのは難しい。オフロキサシン耐性変異株では、TetR ファミリー転写因子遺伝

子と DEAD/DEAH ボックスヘリカーゼ遺伝子以外にも、様々な変異やゲノムの欠失が個々の変異株で検出された。それぞれの機能は十分に解明されていないものの、これら固有の変異が様々な二次代謝産物の高生産化に寄与することが推察された。

オフロキサシン耐性変異株をさらにオフロキサシン存在下で培養したところ、二次代謝産物の生産量が著しく増加した。このような現象は、これまでの薬剤耐性選抜法で得られた菌株では認められないものであり、潜在的二次代謝を効率的に引き出すという視点で興味深い。Minalと Salika は、亜阻止濃度のシプロフロキサシンが *S. coelicolor* A3(2) M145 のアクチノロージン生産を効率化するを明らかにした^{88,89}。本研究で見出したオフロキサシン耐性株におけるオフロキサシンによる抗生物質高生産化は、親株におけるそれに比べて、より顕著であり、親株では認められないレベルの高生産が起きていた。このことは、オフロキサシンの遺伝学的作用と生理学的作用を組み合わせることにより、放線菌の潜在的二次代謝を効率的かつ劇的に効率化できることを示唆した。この点は非常に興味深く、今後オフロキサシン耐性変異を得ることにより、なぜよりオフロキサシンの二次代謝効率化の導効果が増強されたか検証する必要がある。加えて、上述の現象の解明は、応用視点のみならず、医学的見地からも興味深い。このメカニズムの解明は、抗生物質存在下における抗生物質耐性菌の毒性や病原性の増加の解明につながるかもしれない。

オフロキサシンのような DNA 複製を標的とする抗生物質の遺伝学的・生理学的作用は、放線菌における二次代謝産物高生産株の効率的分離と二次代謝産物生産能の効果的効率化への新たな見込みを示した。放線菌ごとにオフロキサシン耐性変異は異なる可能性があり、この解明は今後の重要な課題である。そこから生まれた知見は、細菌における薬剤耐性や放線菌における二次代謝のメカニズムの解明に有益であろう。放線菌は、抗生物質生産菌のみではなく、抗生物質耐性メカニズムの解明に向けても魅力的生物であると言える。

1944年に放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝産物から抗結核薬ストレプトマイシンが発見されて以来、放線菌は抗生物質の供給源として、感染症治療に多大な貢献を果たしてきた。その一方で、抗生物質の開発と利用は薬剤耐性菌を生み出す原動力にもなってしまった。近年ではあらゆる抗生物質が効かない多剤耐性菌も出現し、それらの感染が拡大し続けている。薬剤耐性菌問題への世界規模での様々な対策が求められる中、新たな抗生物質の開発は喫緊の課題である。

過去十数年のゲノムプロジェクトの成果から、放線菌の二次代謝に関する遺伝子の多くが潜在的に存在していることが分かっている。このような潜在的二次代謝を活性化することにより、様々な抗生物質が発見されてきている。転写・翻訳を標的とする抗生物質に対して耐性を示す自然突然変異体を放線菌から分離すると、二次代謝産物の高生産株が得られることがある。放線菌の潜在的二次代謝を活性化する方法として、そのような薬剤耐性選抜法が有効であることが知られている。

本論文では、放線菌の二次代謝能を引き出す新たなアプローチの考案とその有効性の検証を目的に、DNA複製・翻訳を標的とする抗生物質への耐性変異の特性解析を行なった。

エリスロマイシン耐性を付与する 23S リボソーム RNA(rRNA)変異⁶⁶

放線菌がエリスロマイシン耐性変異を得ると、二次代謝が発達になり、抗生物質を高生産することがある。先行研究において、*Streptomyces* 属放線菌の抗生物質高生産エリスロマイシン耐性変異株が 23S rRNA 遺伝子に変異を持つこと、加えて、その変異が抗生物質高生産化の原因であることが示唆されている。本研究で著者は、放線菌における 23S rRNA 変異を起点とした二次代謝活性化の推定メカニズムを明らかにした。

放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) とその類縁種 *Streptomyces lividans* 66 から自然突然変異体として取得した抗生物質高生産エリスロマイシン耐性変異株はそれぞれ、*rrnA*-23S rRNA-A2302T 変異と *rrnC*-23S rRNA-A2281G 変異を有する。このことを踏まえ、両菌株において、各変異を導入した形質転換体エリスロマイシン耐性変異株の性質を、親株や自然突然変異体の性質と比較することで、23S rRNA 変異の特性を解析した。その結果、23S rRNA 変異には遺伝的不安定化作用があり、それにより同変異を有する菌株では、付加変異の発生が高まることを見出した。興味深いことに、23S rRNA 変異のみでは抗生物質高生産化は起こらないものの、23S rRNA 変異と付加変異が組み合わさると、抗生物質高生産化が起こることが判った。この抗生物質高生産は、変異の組み合わせに依存した二次代謝制御遺伝子の発現増加によるものであることも明らかにした。以上の事実から、23S rRNA 変異の遺伝的不安定化作用により付加変異が発生し、それら変異の組み合わせ次第で、二次代謝活性化が起こるものと結論づけた (Fig. 4-1)。

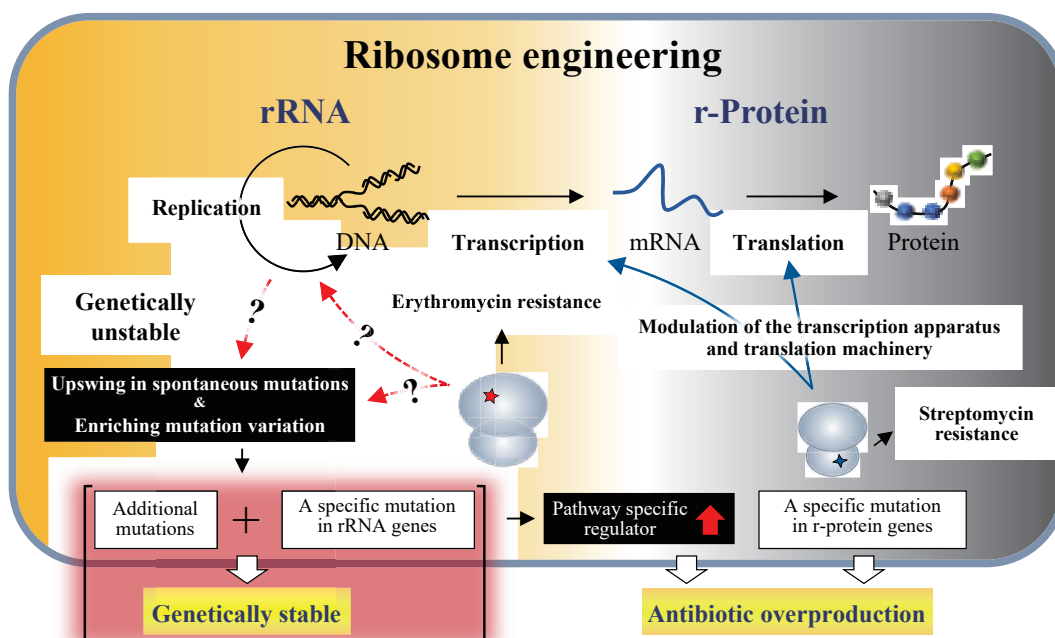


Fig. 4-1. Schematic diagram showing the fundamental mechanisms of the novel ribosome engineering approach by using erythromycin resistance

オフロキサシン耐性変異⁹⁰

オフロキサシンは、細菌のII型トポイソメラーゼを標的とし、DNA複製を阻害するフルオロキノロン系抗生物質である。本研究で著者は、この複製を標的とする抗生物質に対する耐性変異株の解析から、オフロキサシンの遺伝学・生化学的作用により放線菌の潜在的二次代謝を活性化できることを見出した。

S. coelicolor A3(2)を含む5種の放線菌より、オフロキサシン耐性変異株を取得し、二次代謝産物の生産を調べた。その結果、全ての放線菌から抗菌物質高生産株が得られた。*S. coelicolor* A3(2)では、色素抗生物質アクチノロージンやウンデシルプロジオリシン、メチレマイシンA、もしくはカロテノイドの高生産株が出現した。このような様々な二次代謝の活性化は、*S. coelicolor* A3(2)以外の4種の放線菌のオフロキサシン耐性変異株においても認められた。興味深いことに、オフロキサシン存在下で二次代謝が活性化するオフロキサシン耐性変異株も存在した。オフロキサシンによるそのような二次代謝活性化の誘導は、*S. coelicolor* A3(2)、*S. lividans* 66、および *Streptomyces vietnamensis* NBRC 104153 で確認された。以上の結果は、オフロキサシン耐性変異株の取得(遺伝学的作用)とオフロキサシン存在下での培養(生化学的作用)を用いることにより、放線菌における潜在的二次代謝の多様な活性化が可能であることを示唆した (Fig. 4-2)。

オフロキサシン耐性と二次代謝活性化の仕組みの解明に向け、*S. coelicolor* A3(2)のオフロキサシン耐性変異株の変異を解析した。その結果、解析した全ての変異株がTetRファミリー転写因子遺伝子のフレームシフト変異を有すること、加えて、それらのうちオフロキサシンに対して高レベル耐性を示す変異株はRNAヘリカーゼ遺伝子にも変異を持つことが判明した。これらTetRとヘリカーゼ遺伝子の先行知見から、両遺伝子変異はオフロキサシン耐性および二次代謝活性化への関与が示唆された。

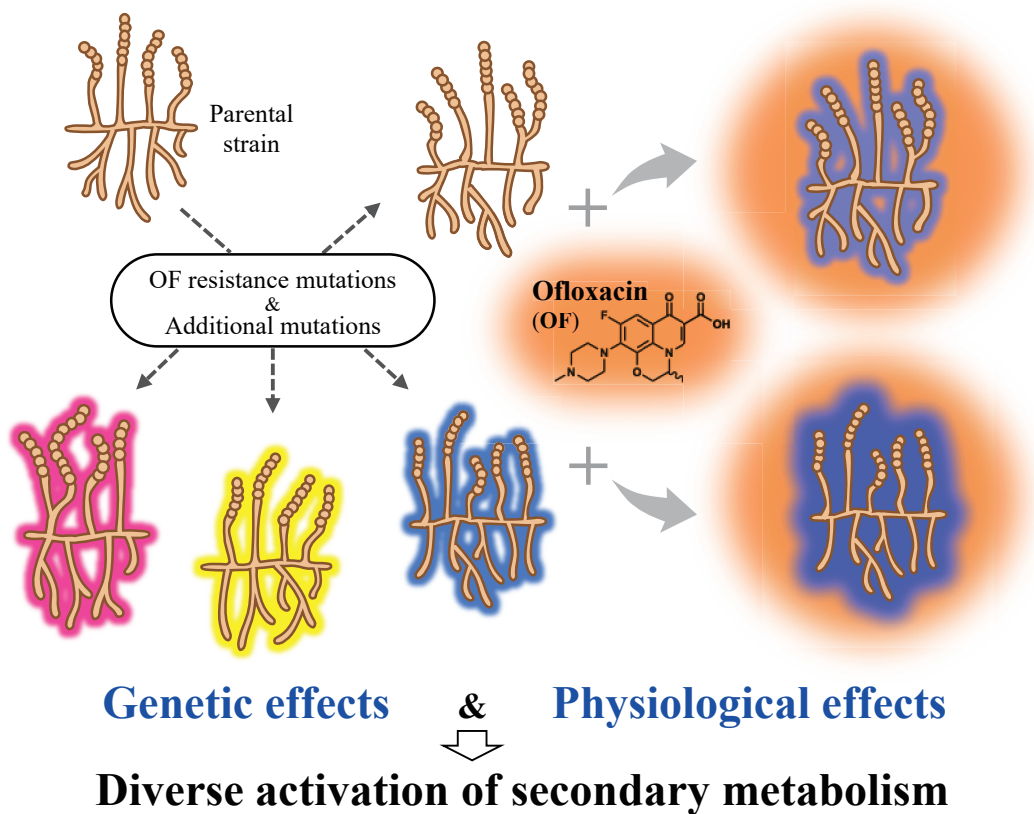


Fig. 4-2. Schematic of diverse activation of secondary metabolism via genetic and physiological effects of ofloxacin

本論文では、DNA 複製・ 訳を標的とする抗生物質への耐性変異が、放線菌の潜在的二次代謝活性化における新たなアプローチとして有効であることを明らかにした。このような薬剤耐性選抜法は、基本的な培養設備の下で、菌株と抗生物質さえあれば実行可能であり、特殊な遺伝子組換え技術や高価な装置を必要としないという強みを持つ。新たな抗生物質の開発が早急に求められていること、微生物資源が世界中のあらゆる場所に存在していることを鑑みると、世界中の研究機関で同時に抗生物質探索研究を展開していく必要があるだろう。そうした状況下で、薬剤耐性選抜法のような簡便かつ効果的な抗生物質探索技術の発展と利用を通じ、薬剤耐性菌にも有効な新たな抗生物質が発見されることに期待したい。加えて、その研究過程で浮かび上がる抗生物質耐性機構や抗生物質そのものへの疑問を紐解くことにより、薬剤耐性菌問題の解決の一助となることを願う。

謝

本研究の遂行にあたり、終始懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました信
大学 先鋭領域融合研究群 イオメデ カル研究所 生体分子イ ベ
ーション部門 准教授 保坂毅先生に深く 謝申し上げます。保坂先生
には、これまでの6年半の間、本研究を実施する機会や研究指導のみなら
、その成果を発表する機会もいただきました。また研究の枠を え、
生 面においても様々なご高配を賜りました。重ねて御礼申し上げます。

本論文の作成および審査におきまして、多角的で適切な御指導を賜り
ました、信 大学大学院 合医 工学研究科 下里剛士教授、片岡
正和准教授、伊原正喜准教授、静岡大学 学術院農学領域 小 真
也准教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に多大なるご支援を賜りました小 真也先生、国立研
究開発法 農業・食品産業技術 合研究機構 高度分析研究センタ
ー 生 性物質分析ユニット 中川博 博士に深く 謝致します。

信 大学大学院 合医 工学研究科 千菊夫教授には、研究室合
同のゼミにおきまして、貴重な御助言をいただきました。ここに深く御礼申
申し上げます。

23S rRNA 変異のテーマにおける先行研究者として、様々なご助言をい
ただきました ースイスン大学 Antimicrobial Discovery Center 博
士研究員 今井優 博士に厚く御礼申し上げます。

また 頃の実験や研究室生 において、多くのご協力を頂きました応
用分子微生物学研究室の皆様へ深く 謝致します。

最後に、これまでの学生生 を支え、い も応援してくれた家族に心か
らの 謝を申し上げます。

星野 颯

考文献

1. Lewin GR, Carlos C, Chevrette MG, Horn HA, McDonald BR, Stankey RJ, Fox BG, Currie CR. Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annu. Rev. Microbiol.* **70**, 235–254 (2016).
2. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces genetics*. vol. 291 (John Innes Foundation Norwich, 2000).
3. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 1–43 (2016).
4. Flärdh K, Buttner MJ. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 36–49 (2009).
5. Blattner FR, Plunkett G III, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–1462 (1997).
6. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini AM, Alloni G, Azevedo V, Bertero MG, Bessières P, Bolotin A, Borchert S, Borriss R, Boursier L, Brans A, Braun M, Brignell SC, Bron S, Brouillet S, Bruschi CV, Caldwell B, Capuano V, Carter NM, Choi SK, Cordani JJ, Connerton IF, Cummings NJ, Daniel RA, Denziot F, Devine KM, Düsterhöft A, Ehrlich SD, Emmerson PT, Entian KD, Errington J, Fabret C, Ferrari E, Foulger D, Fritz C, Fujita M, Fujita Y, Fuma

- S, Galizzi A, Galleron N, Ghim SY, Glaser P, Goffeau A, Golightly EJ, Grandi G, Guiseppi G, Guy BJ, Haga K, Haiech J, Harwood CR, Hènaut A, Hilbert H, Holsappel S, Hosono S, Hullo MF, Itaya M, Jones L, Joris B, Karamata D, Kasahara Y, Klaerr-Blanchard M, Klein C, Kobayashi Y, Koetter P, Koningstein G, Krogh S, Kumano M, Kurita K, Lapidus A, Lardinois S, Lauber J, Lazarevic V, Lee SM, Levine A, Liu H, Masuda S, Mauël C, Médigue C, Medina N, Mellado RP, Mizuno M, Moestl D, Nakai S, Noback M, Noone D, O'Reilly M, Ogawa K, Ogiwara A, Oudega B, Park SH, Parro V, Pohl TM, Portelle D, Porwollik S, Prescott AM, Presecan E, *et al.* The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–256 (1997).
7. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga A-M, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, 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 BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147 (2002).

8. Ikeda 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).
9. 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).
10. Clardy J, Fischbach MA, Currie CR. The natural history of antibiotics. *Curr. Biol.* **19**, R437-41 (2009).
11. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**, 226 (1929).
12. Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* **2**, 87–95 (2011).
13. Woodruff HB, Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2–8 (2014).
14. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**, 134 (2010).
15. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**, 71–

- 109 (2011).
16. Lewis K. The science of antibiotic discovery. *Cell* **181**, 29–45 (2020).
 17. Clatworthy AE, Pierson E, Hung DT. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 541–548 (2007).
 18. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* **40**, 277–283 (2015).
 19. CDC. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2013*. (2013).
 20. O’Neill, J. *Review on antimicrobial resistance*. (2014).
 21. World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. (2015).
 22. 国際的に脅威となる 感染症対策関係閣僚会議(厚生労働省). *薬剤耐性 (AMR)対策アクションプラン*. (2016).
 23. AMR アライアンス・ジャパン. *AMR アライアンス・ジャパン提言 感染症法の改正に向けて*. (2021).
 24. Leimer N, Wu X, Imai Y, Morrissette M, Pitt N, Favre-Godal Q, Iinishi A, Jain S, Caboni M, Leus IV, Bonifay V, Niles S, Bargabos R, Ghiglieri M, Corsetti R, Krumpoch M, Fox G, Son S, Klepacki D, Polikanov YS, Freliche CA, McCarthy JE, Edmondson DG, Norris SJ, D’Onofrio A, Hu LT, Zgurskaya HI, Lewis K. A selective antibiotic for Lyme disease. *Cell* (2021)
 25. Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or

- weakly expressed microbial gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 87–98 (2013).
26. Ochi K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *J. Antibiot.* **70**, 25–40 (2017).
 27. Myronovskiy M, Luzhetskyy A. Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts. *Nat. Prod. Rep.* **36**, 1281–1294 (2019).
 28. Scherlach K, Hertweck C. Mining and unearthing hidden biosynthetic potential. *Nat. Commun.* **12**, 3864 (2021).
 29. Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* **3**, 619–627 (2002).
 30. Craney A, Ozimok C, Pimentel-Elardo SM, Capretta A, Nodwell JR. Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism. *Chem. Biol.* **19**, 1020–1027 (2012).
 31. Takano E. Gamma-butyrolactones: *Streptomyces* signalling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 287–294 (2006).
 32. 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).
33. 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).
 34. Imai Y, Sato S, Tanaka Y, Ochi K, Hosaka T. Lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 3869–3879 (2015).
 35. Ishizuka M, Imai Y, Mukai K, Shimono K, Hamauzu R, Ochi K, Hosaka T. A possible mechanism for lincomycin induction of secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie Van Leeuwenhoek* **111**, 705–716 (2018).
 36. Mukai K, Kobayashi M, Hoshino K, Maruyama T, Hayashi D, Hamauzu R, Hosaka T. Lincomycin-induced secondary metabolism in *Streptomyces lividans* 66 with a mutation in the gene encoding the RNA polymerase beta subunit. *Curr. Microbiol.* **77**, 2933–2939 (2020).
 37. Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann H-W, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuemann J, Martin K, Hertweck C, Brakhage AA. Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14558–14563 (2009).
 38. Hoshino S, Onaka H, Abe I. Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with

- mycolic acid-containing bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 363–374 (2019).
39. Gomez-Escribano JP, Bibb MJ. Heterologous expression of natural product biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor*: from genome mining to manipulation of biosynthetic pathways. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 425–431 (2014).
40. Vezina C. Mutation to change the spectra of metabolites. *Microbiology* 528–530 (1976).
41. Vezina C, Bolduc C, Kudelski A, Audet P. Biosynthesis of kitasamycin(leucomycin) by leucine analog resistant mutants of *Streptomyces kitasatoensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **15**, 738–746 (1979).
42. 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).
43. Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 1373–1386 (2007).
44. 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).

45. Hesketh A, Ochi K. 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. *The journal of antibiotics* **50**, 532–535 (1997).
46. 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).
47. Tanaka Y, Komatsu M, Okamoto S, Tokuyama S, Kaji A, Ikeda H, Ochi K. Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4919–4922 (2009).
48. 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).
49. Hu H, Zhang Q, Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* **184**, 3984–3991 (2002).
50. 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).
51. Hu H-F, Zhang Q, Zhu B-Q. Enhanced antibiotic production by inducing low level of resistance to gentamicin. *Chin. J. Nat. Med.* **6**, 146–152 (2008).
52. Okamoto-Hosoya Y, Sato T, Ochi K. Resistance to paromomycin is conferred by *rpsL* mutations, accompanied by an enhanced antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Antibiot.* **53**, 1424–1427 (2000).
53. Wang G, Inaoka T, Okamoto S, Ochi K. A novel insertion mutation in *Streptomyces coelicolor* ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1019–1026 (2009).
54. 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).
55. 藤原達也. ゲンタミシン耐性変異による *Streptomyces* 属放線菌の抗生物質生産力増強メカニズムの解明. (2011).
56. 渡邊健. 放線菌の ppGpp 標的分子改変による抗生物質高生産化機構の解析. (2013).
57. Wang G, Izawa M, Yang X, Xu D, Tanaka Y, Ochi K. Identification of a novel lincomycin resistance mutation associated with activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antimicrob. Agents Chemother.*

- 61, (2017).
58. O 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).
59. 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).
60. 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.* **65**, 323–326 (2012).
61. 今井優. 訳阻害剤の生 学・遺伝学的作用による *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝 性化とその機構の分子生物学的解析. (2015).
62. Li W, Ying X, Guo Y, Yu Z, Zhou X, Deng Z, Kieser H, Chater KF, Tao M. Identification of a gene negatively affecting antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **188**, 8368–8375 (2006).
63. Yu Z, Wang Q, Mei-Feng DZ-XT.. Activation of silent antibiotic synthesis in *Streptomyces lividans* by disruption of a negative regulator *nsdA*, a gene conserved in *Streptomyces*. *Chin. J. Biotechnol.* **22**, 751–762 (2006).

64. Zhang G, Yu D, Sang B, Feng J, Han L, Zhang X. Genome-wide analysis reveals the secondary metabolome in *Streptomyces kanasensis* ZX01. *Genes* **8**, 346 (2017).
65. Douthwaite S. Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. *J. Bacteriol.* **174**, 1333–1338 (1992).
66. Hoshino K, Imai Y, Mukai K, Hamauzu R, Ochi K, Hosaka T. A putative mechanism underlying secondary metabolite overproduction by *Streptomyces* strains with a 23S rRNA mutation conferring erythromycin resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 2193–2203 (2020).
67. Fijalkowska IJ, Schaaper RM. Mutants in the Exo I motif of *Escherichia coli* *dnaQ*: defective proofreading and inviability due to error catastrophe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2856–2861 (1996).
68. Longerich S, Galloway AM, Harris RS, Wong C, Rosenberg SM. Adaptive mutation sequences reproduced by mismatch repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 12017–12020 (1995).
69. Hu H, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1885–1892 (2001).
70. Lai C, Xu J, Tozawa Y, Okamoto-Hosoya Y, Yao X, Ochi K. Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic

- production in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* **148**, 3365–3373 (2002).
71. Lopatniuk M, Myronovskyi M, Nottebrock A, Busche T, Kalinowski J, Ostash B, Fedorenko V, Luzhetskyy A. Effect of “ribosome engineering” on the transcription level and production of *S. albus* indigenous secondary metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 7097–7110 (2019).
 72. Klimek JW, Cavallito CJ, Hays BJ. Induced resistance of *Staphylococcus aureus* to various antibiotics. *J. Bacteriol.* **55**, 139–145 (1948).
 73. Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H, Horiuchi T. Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0007 (2006).
 74. Kodani S, Hemmi H, Miyake Y, Kaweewan I, Nakagawa H. Heterologous production of a new lasso peptide brevunsin in *Sphingomonas subterranea*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 983–992 (2018).
 75. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J. Bacteriol.* **187**, 1825–1832 (2005).
 76. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**,

a025320 (2016).

77. Kirby R, Hopwood DA. Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCPI plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* **98**, 239–252 (1977).
78. Zhou S, Bhukya H, Malet N, Harrison PJ, Rea D, Belousoff MJ, Venugopal H, Sydor PK, Styles KM, Song L, Cryle MJ, Alkhalaf LM, Fulop V, Challis GL, Corre C. Molecular basis for control of antibiotic production by a bacterial hormone. *Nature* **590**, 463–467 (2021).
79. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr. Opin. Microbiol.* **51**, 72–80 (2019).
80. Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T. Studies on bleomycin. *Cancer* **20**, 891–895 (1967).
81. Strelitz F, Flon H, Asheshov IN. Nybomycin, a new antibiotic with antiphage and antibacterial properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **41**, 620–624 (1955).
82. Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Hackel M, Miller LA, Scangarella-Oman NE, Jakielaszek C, Sahn DF. In vitro activity of gepotidacin, a novel triazaacenaphthylene bacterial topoisomerase inhibitor, against a broad spectrum of bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, 1918–1923 (2016).
83. Bradford PA, Miller AA, O'Donnell J, Mueller JP. Zoliflodacin: an oral

- spiropyrimidinetrione antibiotic for the treatment of *Neisseria gonorrhoeae*, Including Multi-drug-resistant Isolates. *ACS Infect Dis* **6**, 1332–1345 (2020).
84. Cuthbertson L, Nodwell JR. The TetR family of regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**, 440–475 (2013).
85. Guérin F, Galimand M, Tuambilangana F, Courvalin P, Cattoir V. Overexpression of the novel MATE fluoroquinolone efflux pump FepA in *Listeria monocytogenes* is driven by inactivation of its local repressor FepR. *PLoS One* **9**, e106340 (2014).
86. Redder P, Hausmann S, Khemici V, Yasrebi H, Linder P. Bacterial versatility requires DEAD-box RNA helicases. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 392–412 (2015).
87. Yoshimura A, Covington BC, Gallant É, Zhang C, Li A, Seyedsayamdost MR. Unlocking cryptic metabolites with mass spectrometry-guided transposon mutant selection. *ACS Chem. Biol.* **15**, 2766–2774 (2020).
88. Patkari M, Mehra S. Transcriptomic study of ciprofloxacin resistance in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Biosyst.* **9**, 3101–3116 (2013).
89. Patkari M, Kumbhar C, Nag A, Mehra S. Distinct transcriptomic response of *S. coelicolor* to ciprofloxacin in a nutrient-rich environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 10623–10643 (2018).
90. Hoshino K, Hamauzu R, Nakagawa H, Kodani S, Hosaka T. Unique physiological and genetic features of ofloxacin-resistant *Streptomyces* mutants.

Appl. Environ. Microbiol. aem0232721 (2021).

関 文 献

- Hoshino K, Imai Y, Mukai K, Hamauzu R, Ochi K, Hosaka T. A putative mechanism underlying secondary metabolite overproduction by *Streptomyces* strains with a 23S rRNA mutation conferring erythromycin resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 2193–2203 (2020).
- Hoshino K, Hamauzu R, Nakagawa H, Kodani S, Hosaka T. Unique physiological and genetic features of ofloxacin-resistant *Streptomyces* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 88, aem0232721 (2021).