

様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21年 6月 9日現在

研究種目：基盤研究 (B)
研究期間：2005～2008
課題番号：17380058
研究課題名 (和文) RNAポリメラーゼ改変による微生物潜在機能の発現と転写機構の総括的
解明
研究課題名 (英文) Activation of dormant ability by modulating RNA polymerase and
global clarification of transcription mechanism
研究代表者 越智 幸三
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
食品バイオテクノロジー研究領域 生物機能解析ユニット ユニット長
研究者番号：70353985

研究成果の概要：微生物における潜在機能を活性化するための技術開発と理論構築を目的として研究を展開し、結果として RNA ポリメラーゼの改変とリボゾームの改変が有効であることを見出した。特に RNA ポリメラーゼの改変は「休眠遺伝子」の活性化においても有効で、本技術は新物質の探索にひとつの有効な手法となるものと思われる。休眠遺伝子の発現原理についても明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	3,500,000	1,000,000	4,500,000
2006年度	3,500,000	1,000,000	4,500,000
2007年度	3,500,000	1,000,000	4,500,000
2008年度	3,500,000	1,000,000	4,500,000
年度			
総計	14,000,000	4,000,000	18,000,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：応用微生物, 発酵, 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) グラム陽性細菌である放線菌、枯草菌は、抗生物質をはじめ多くの生理活性物質を生産するため、工業微生物としてゆるぎない地位を保っている。一方、好熱菌 *Thermus thermophilus* は蛋白質の安定性ゆえに構造生物学に貴重な題材である。我々は、放線菌の二次代謝が RNA ポリメラーゼに作用する微生物アラームであるグアノ

シン-4-リン酸(ppGpp)によってポジティブに制御されていることを実証し、ごく最近ではリファンピシン耐性を付与することによって特定の RNA ポリメラーゼ変異(rpoB 変異)が放線菌の潜在遺伝子を活性化させ、結果として抗生物質を生産せしめる事実を発見した。引き続き、放線菌における ppGpp の単元的制御と異なり、枯草菌の二次代謝は ppGpp と GTP による二元制御のもとに

あること、および **rpoB** 変異の導入によって枯草菌が生産する抗生物質ネオトレハロサジアミン(NTD)は自身の生合成遺伝子を活性化(オートインダクション)しているという、二次代謝研究における全く斬新な知見を得ている。さらに、RNA ポリメラーゼの改変は物質生産のみならず幅広く微生物機能を発現させることも明らかにした。このように、RNA ポリメラーゼの改変による微生物の潜在能力の発現は、未知なる転写機構の解明にとどまらず、微生物利用にとって新たな概念と技術を与えるものである。本研究では、主として放線菌、枯草菌を活用して、いかなるメカニズムにより潜在遺伝子が活性化されるかを、ppGpp の機能と絡めて分子レベルで解明することを大きな目標とする。

RNA ポリメラーゼに特定の変異を起こせば、眠っている遺伝子が活性されるのではないかという発想は我々の独創であり、緊縮制御物質 ppGpp の放線菌二次代謝における重要性も、長年にわたる我々の先駆的研究で明らかになったものである。本研究は、今まで独立に研究されてきた RNA ポリメラーゼと ppGpp による緊縮制御を、潜在機能発現という応用微生物学的側面に焦点を当てつつ、統括的に理解しようという点が特色である。また研究遂行に当たって、放線菌、枯草菌、*Thermus* それぞれの利点を活用するという手法も本研究の大きな特色である。また NTD、ppGpp など自前で作出できるのは大きな強みとなっている。本研究は、転写機構・緊縮制御という基礎微生物学に貢献するのみならず、潜在機能発現技術の構築という観点から、ここで得られる知見は微生物の分子育種という実用面にも直結したものである。

緊縮制御研究の歴史は長いが、微生物アラーム ppGpp の二次代謝誘発における我々の先駆的な研究を契機として、世界中の

いくつかの研究室で同様の研究が開始されている。しかしながら、我々がこれまでに蓄積してきた種々の遺伝子・変異株を用いた遺伝生理学的技法により次々に明らかにしてきた成果は、二次代謝という面でみれば明らかに他を圧倒しているのが実情であり、かつ充実したものであるといえる。RNA ポリメラーゼの研究は、石浜ら横山らを中心とした日本人研究者の寄与が大きいのも特徴である。現在、RNA ポリメラーゼのX線解析による三次元構造が横山らによって明らかにされており、本研究はまさに時宜を得たものといえる。

(2) 本課題を推進するにあたって、放線菌(ppGpp 結合ミミック説)、枯草菌(NTD による二次代謝オートアクティベーション)、*Thermus*(ppGpp の細胞内における実在)のように、それぞれの微生物について当研究室独自の切り口を既に用意していることは、本提案課題の最大の強みといえる。元来リファンピシンに耐性な *Thermus* は別として、それぞれの菌で多種多様な **rpoB** 変異株を既に作出しており、解析に必要な各種抗体も一部作成済みである。また、本研究課題をリボゾーム機能、すなわち翻訳レベルでの潜在機能発現という側面から解明していくことは、微生物の機能発現をより高次のレベルで理解するために極めて有効と思われる。この点において、過去5年間の「リボゾーム工学プロジェクト」で蓄積された知見と技術・研究素材は大いに活用できる。

2. 研究の目的

我々は放線菌を中心として微生物の潜在機能活性化における複雑な調節ネットワークを提唱してきた。これはリボゾームに着目して、その翻訳機能を調節または改造することにより潜在機能を活性化できることを示したものである。一方、原核生物のリボゾームの特徴として微生物アラーム

ppGpp の合成能力があり、この ppGpp は RNA ポリメラーゼに作用するため、翻訳器官であるリボゾームは遺伝子の転写をも制御している。従って、バクテリアのリボゾームは転写・翻訳の両面において重要な役割を演じている。これら転写・翻訳の両者が潜在機能発現にあたって相乗的に機能することはリボゾーム工学プロジェクトにおいて既の実証しており、リボゾーム蛋白質に生じた各種変異と潜在機能発現力、蛋白質合成能力、翻訳因子蓄積能力について詳細な解析を行ってきた。その結果、我々はリボゾームを合目的に改変するという、従来のリボゾーム研究にみられなかった新しい研究概念の構築に成功している。一方、リボゾームの ppGpp 生合成機構および ppGpp の潜在機能発現における重要性は、我々の研究を中心に多くの研究室で確立されてきたが、そのメカニズムの詳細、すなわち ① ppGpp は RNA ポリメラーゼに作用することにより、なぜ潜在遺伝子を活性化できるのか？ ②なぜ特定の RNA ポリメラーゼ変異は(ppGpp 不在下でも)潜在機能を発揮させるのか？ という重要な点は不明のままに残されている。本研究の最大の目標は、このブラックボックスを解明して微生物の転写・翻訳の共役システムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 本研究では各種微生物から様々な薬剤耐性変異株を取得するのが重要な部分となるが、低レベル耐性は最小阻止濃度 (MIC) の2倍で、高レベル耐性は 10 ~ 30 倍で変異株を選択した。リボゾーム蛋白質 S12 の変異はストレプトマイシンまたは、パロモマイシンを、RNA ポリメラーゼの変異はリファンピシンを用いた。潜在機能の発現を物質生産の観点からみる時、生産物に色がついていれば判定が容易であることから、

青色抗生物質アクチノロージンと赤色抗生物質プロディジオシンを産生する *Streptomyces coelicolor* を汎用した。また、適宜、土壌から分離した微生物を用いた。

(2) 野生型および変異型の蛋白質合成活性は、主として試験管内 (in vitro) 合成活性を測定することにより判定した。抗生物質生産力は、被験菌を用いたバイオアッセイ、もしくは HPLC による化学分析により行った。野生型および変異型の RNA ポリメラーゼの二次代謝遺伝子のプロモーター領域への親和力は、ピアコア 3000 を用いて行った。20 ~ 30 base のプロモーターヌクレオチドをチップに固定し、そこに野生型または変異型の RNA ポリメラーゼ含有液を流し、両者の相互作用をみることによって親和力を判定した。未知の変異の固定は、最近開発された新技術である比較ゲノムシーケンシング法により行った。

4. 研究の成果

(1) リボゾーム蛋白質 S12 の特定部位の変異が潜在機能を著しく高めることは既に報告してきたが、今回の結果として、そのメカニズムを分子レベルで明らかにすることに成功した。すなわち、潜在機能の発現は、S12 変異による生育後期における高い蛋白質合成活性の保持と翻訳因子のひとつリボゾームリサイクリングファクター (RRF) の発現上昇の 2 点にあることを突きとめた。更に、蛋白質合成活性の保持は、S12 変異により 70S リボゾーム粒子が強固になるためであることも明らかにした。因みに、RRF の発現上昇は転写レベルによるものであることを RT-PCR とウエスタン解析により明らかにしたが、何故リボゾーム上の S12 変異が RRF コード遺伝子の発現を転写レベルで制御するのか、ミステリーと言わざるを得ない。翻って、このことはリボゾームの未知機能を究明してゆく上で、

格好の切り口となり得るかもしれない。

(2) S12 変異はストレプトマイシンに対して高いレベルの耐性を付与するが、このストレプトマイシン耐性には低レベルのものがあることが 60 年も前から知られていた。この低レベルストレプトマイシン耐性変異は S12 変異に劣らず強力な潜在機能活性化力があることを明らかにした。そこで 60 年来のミステリーとされてきた低レベルストレプトマイシン耐性変異がいずれの遺伝子に生じたものであるかを、最新の変異探索技術である比較ゲノムシーケンシング法により挑戦した。幸運にも変異遺伝子の同定に成功し、それが、リボゾーム 530 ループの一塩基をメチル化するメチル転移酵素をコードする *rsmG* 遺伝子であることを突きとめた。更に、*rsmG* 変異によりリボゾームに異常が起きると S-アデノシルメチオニン合成をコードする *metK* 遺伝子が強発現し、その結果生じる S-アデノシルメチオニンの細胞内での著しい上昇が潜在機能発現の直接の起因となっていることを明らかにした。因みに *metK* の発現は転写レベルで増大しており、これまたミステリーのひとつである。

この *rsmG* 変異が潜在遺伝子の活性化に極めて有効であることは上述したが、もうひとつの不思議な事象を引き起こす事実を見出した。それは *rsmG* 変異は $10^4 \sim 10^6$ という異常に高い頻度で発生し（通常の変異は $10^8 \sim 10^9$ ）、ひとたび *rsmG* 変異を獲得すると野生型に比べて 100 ~ 10,000 倍の高い頻度で高レベル耐性 (*rpsL* 変異の獲得)に移行するという事実である。このことは、奇妙な現象というにとどまらず、ストレプトマイシンが現在でも結核治療に使われていることを考えると、医学上重大である。そこで、結核患者から分離された臨床結核菌を数多く調べてみると、予想通りかなりの高い比率で *rpsL-rsmG* の二重変異株が見

つかった。従って、*rsmG* 変異自体は低レベル耐性のため重大ではないものの、現在問題となっている高レベル耐性のまん延にある程度の原因を形成している可能性がある。すなわち、*rsmG* 遺伝子は、応用微生物学と病原微生物学の両面から注目されるべきものである。因みに、*rsmG* と同じくリボゾーム RNA の特定部位 (A 1518 と A 1519) のメチル化酵素をコードする *ksgA* 遺伝子に変異が生じるとカスガマイシンに弱耐性となり、これも高い頻度で高レベルカスガマイシン耐性に移行することを見出した。このことから推して、リボゾーム RNA のメチル化の不能化がこの奇妙な現象の原因であるようだが、詳細なメカニズムは全く不明であり、逆にこの解明は基本生命メカニズムの解明に格好の切り口となる可能性を含んでいる。尚、*rsmG* 変異はリボゾーム RNA メチル化という、一見必須の機能を保有するが、*rsmG* 変異自体は菌の生育、野生株との競合生育において全く不利益を生じさせない。いずれにしても、*rsmG* はミステリーの集合体の観を呈している。

(3) リボゾーム攻撃性の抗生物質に対する耐性は、その多くが潜在能力を発揮させる。ストレプトマイシン以外に、ジェンタミシン、パロモイシン、ジェネティシン、フシジン酸、チオストレプトン、およびリンコマイシンなどがそれである。そこで、これらの抗生物質に耐性を逐次的に付与してゆき、結果として 8 重変異株を取得した。予期したように、この 8 重変異株は野生型の 180 倍の抗生物質 (アクチノロージン) を生産し、そのレベルは工業生産レベルに比肩しうるものであった。この 8 重変異株は、予想されるように生育後期での蛋白質合成活性がほとんど低下することがなく、しかも生育初期から高い ppGpp レベルを保持しているという極だった特徴があった。この高レベル ppGpp が生産力アップに大き

く貢献していることは *relA* 変異を導入することによって確認した。さらに、この特異な能力はチオストレプトン耐性変異によって付与されたことも突き止めたが、変異遺伝子の同定には未だ到っていない。尚、*rsmG* と *rpsL* の二重変異も、多彩な放線菌の抗生物質生産力を著しく上昇させる。

(4) リボゾーム S 1 2 変異は生育後期の蛋白質合成活性を高めるので、いくつかの酵素活性にも有効であろうと考えた。そこで、枯草菌が生産する産業酵素、 α -アミラーゼにこれを適用してみた。結果として、*rpsL* K88E 変異の導入により α -アミラーゼの生産力が1.4倍に上昇することを見出した。同じくある種の *Bacillus* 属による環状イソマルトオリゴ糖合成酵素に適用したところ、*rsmG*、*rpsL*、*rpoB* (リファンピシン耐性) の三重変異により、実にその生産力は 1,000 倍を超えるものとなった。リボゾーム工学の適用が極めて好結果を生んだ例である。生産力の著しい転写レベルでの発現自体はわずか数倍にしか上昇していないので、生産力アップの詳細は今後に残された課題と言えよう。

(5) 先にも触れたが、微生物のアラーモン ppGpp は微生物における潜在能力発揮のカギを握る物質のひとつである。我々は先に、ppGpp がRNAポリメラーゼの活性中心のすぐ近くに結合することを好熱菌 *Thermus thermototicus* 由来のRNAポリメラーゼを用いて実証したが、今回、*Thermus* 自体がアミノ酸欠乏に応答して細胞内に ppGpp を蓄積することを確認した。しかし、その蓄積レベルは予想以上に小さく、RNA合成の抑制は、むしろ ppGpp によるIMPデヒドロゲナーゼ活性の強力な抑制に大きく依存しているものと結論した。RNA合成の抑制は、いわゆる「緊縮抑制」の指標とされるものであるが、今後、ppGpp のRNAポリメラーゼへの結合がこの事象にどの程度貢献しているのか見定

めてゆく必要がある。更に、放線菌においては、特定の蛋白質 (EshA) が細胞内の ppGpp のレベルを微調整しており、この EshA 蛋白質の機能なくしては、抗生物質生産の引き金が引かれないことも明らかにした。因みに、植物体にも ppGpp が存在するというのは我々の発見によるものであるが、今回植物体内のバクテリア型RNAポリメラーゼ (葉緑体に存在) と ppGpp が結合能を有していることも明らかにした。

(6) バクテリアには、ただ一種類のRNAポリメラーゼが存在するのみと、長い間信じられてきた。最近我々は、放線菌の中の一類 (希少放線菌と呼ばれる) には、しばしば複数種のRNAポリメラーゼを保有するものがあることを突き止めた。しかも、いわゆる変異型と思われるタイプは *rpoB* 遺伝子の複数部位で変異を生じており、更に重要なのはこの変異型RNAポリメラーゼはその菌の抗生物質生産能力を決定付けている事実である。従来のリファンピシン耐性など薬剤耐性を選抜する技法では、複数部位に変異を生じたものを得ることは確率的にみてほとんど不可能であり、逆に考えるとこれら天然に存在する変異型RNAポリメラーゼは“自然界の贈り物”とも言える。今後は、これら天然の変異型RNAポリメラーゼをいかに物質生産など応用微生物に利用するかが重要となる。また、学術的には変異型RNAポリメラーゼはいかなる環境下で菌にメリットを与えているかは、環境応答の観点から興味深い。

(7) 潜在機能の活性化技術は新物質のスクリーニングに直結している。また、最近のゲノムプロジェクトの成果から、放線菌には多くの二次代謝遺伝子が、「休眠遺伝子」として存在することが判ってきている。そこで、土壌から分離した 1068 株の放線菌から、通常の培養条件では抗生物質を生産しない株として 343 株を選び出し、こ

これらの菌にリファンピシン耐性、ストレプトマイシン耐性、ジェンタミン耐性のいずれかを付与し、新たに抗生物質生産能を獲得したか否かを判定した。その結果、20 % (66/343) の菌株で抗生物質生産力が出現したことを確認した。「休眠遺伝子」が目覚めたと考えられるが、そのうちのひと株 631689 を対象として、産生された抗生物質が新規か否かを判定するため、単離構造決定を行ったところ、期待通り奇抜な化学構造を持った抗生物質（ピペリダマイシンと命名）であることが判った。また、目覚めのメカニズムは、リファンピシン耐性変異の場合は変異型 RNA ポリメラーゼが二次代謝遺伝子のプロモーターへの親和力を増大させたこと、ストレプトマイシン耐性の場合は変異型リボゾームが生育後期においても高い蛋白質合成活性を獲得したことによることを明らかにした。この技術は遺伝子情報の全くない菌にも即適用できるという利点をもっているため、今後新薬の開発に利用できるものと思われる。

(8) 枯草菌は研究し尽くされた観があるが、この場合でさえも休眠遺伝子を目覚めさせて抗生物質を作らせることができる。ネオトレハロサジアミンがそれで、新規物質ではなかったが、特定の RNA ポリメラーゼ変異によって強力に発現してくる。ネオトレハロサジアミンはいくつかの最近の生育を阻止するいわゆる抗生物質であるが、面白いことに、その生合成遺伝子はネオトレハロサジアミンによって活性化され（オートアクティベーション）、しかもいくつかの遺伝子発現はこの抗生物質によって制御されていることを見出した。従来、抗生物質はその生産菌自身にはなんの生理的意義も有しないと考えられてきたが、枯草菌のネオトレハロサジアミンはこの点を究明していく上で、ひとつの切り口となり得るだろう。

(9) 研究の過程において、以下に示す極めて興味ある現象を見出した。

希土類元素は、ランタンからルテチウムの15元素にスカンジウムとイトリウムを加えた17元素の総称であるが、これまで生物との接点は全くと言ってよい程知られてこなかった。我々は希土類元素とりわけスカンジウムが、微量で培地中に添加することにより、微生物の潜在能力を著しく活性化する事実を見出しつつある。放線菌 *S. coelicolor* の場合であれば、培地中に20 ~ 30 μ M で添加することにより、抗生物質生産能は20倍以上に増大する。植物の場合も微量の添加でその生育が著しく促進される。希土類は、微量ではあるが地球上の全ての土壤に存在し、生物はこれら微量元素を環境応答システムに利用している可能性も考えられる。すなわち、希土類元素と生物との接点の究明は、基礎、応用いずれにおいても重要な問題を提起するものと言えよう。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計21件)

- ① Hosaka, T., M. Ohnishi-Kameyama, H. Muramatsu, K. Murakami, Y. Tsurumi, S. Kodani, M. Yoshida, A. Fujie, and K. Ochi. Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nature Biotechnology* 27:462-464 (2009)、査読有
- ② Kim, J. Y. T. Inaoka, K. Hirooka, H. Matsuoka, M. Murata, R. Ohki, Y. Adachi, Y. Fujita, and K. Ochi. Identification and Characterization of

- a Novel Multidrug Resistance Operon *mdtRP* (*yusOP*) of *Bacillus subtilis*. 191:3273-3281 (2009)、査読有
- ③ **Sato, M., K. Takahashi, Y. Ochiai, T. Hosaka, K. Ochi, and K. Nabeta.** Bacterial alarmone, guanosine 5' -diphosphate 3' -diphosphate (ppGpp), binds the β' subunit of plastid-encoded plastid RNA polymerase in chloroplasts. *ChemBioChem*. 10:1227-1233 (2009)、査読有
- ④ **Okamoto, S., T. Taguchi, K. Ochi, and K. Ichinose.** Biosynthesis of actinorhodin and related antibiotics: Discovery of alternative routes for quinine formation encoded in the *Streptomyces coelicolor* gene cluster. *Chem. Biol.* 16: 226-236 (2009)、査読有
- ⑤ **Wang, G., T. Inaoka, S. Okamoto, and K. Ochi.** A novel insertion mutation in *Streptomyces coelicolor* ribosomal S12 protein results in paromomycin resistance and antibiotic overproduction. *Antimicrob. Agents Chemother* 53:1019-1026. (2009)、査読有
- ⑥ **Tala, A., G. Wang, M. Zemanova, S. Okamoto, K. Ochi, and P. Alifano.** Activation of dormant genes by *Nonomuraea* ATCC 39727 "mutant type" RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 191: 805-814 (2009)、査読有
- ⑦ **Ochi, K., J-Y. Kim., Y. Tanaka, G. Wang, K. Masuda, H. Nanamiya, S. Okamoto, S. Tokuyasu, Y. Adachi, and F. Kawamura.** Inactivation of KsgA, 16S rRNA methyltransferase, causes vigorous emergence of mutants with high-level kasugamycin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:193-201 (2009)、査読有
- ⑧ **Wang, G., T. Hosaka, and K. Ochi.** Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug-resistance mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2834-2840 (2008)、査読有
- ⑨ **Taguchi, T., S. Okamoto., T. Itoh., Y. Ebizuka., K. Ochi, and K. Ichinose.** Actinoperlyone, a novel perylenequinone-type shunt product, from a deletion mutant of the actVA-OFr5 gene for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Tetrahedron Letters.* 49:1208-1211 (2008)、査読有
- ⑩ **Nishimura, K., S. K. Johansen., T. Inaoka., T. Hosaka., S. Tokuyuyama., T. Tahara., S. Okamoto., F. Kawamura., S. Douthwaite., and K. Ochi.** Identification of the RsmG methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis* *rsmG* mutants. *J. Bacteriol.* 189:6068-6073 (2007)、査読有
- ⑪ **Kawai, K., G. Wang., S. Okamoto., and K. Ochi.** The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol.*

- l. Lett.*, **274**:311-315 (2007)、査読有
- ⑫ **Taguchi, T., S. Okamoto., A. Lezhava., A. Li., K. Ochi., Y. Ebizaka., and K. Ichinose.** Possible involvement of ActVI-ORFA in transcriptional regulation of *actVI* tailoring-step genes for actinorhodin biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **269**:234-239、査読有
- ⑬ **Okamoto, S., A. Tamaru., C. Nakajima., K. Nishimura., Y. Tanaka., S. Tokuyama., Y. Suzuki., and K. Ochi.** Loss of a conserved 7-methylguanine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Mol. Microbiol.* **63**:1096-1106 (2007)、査読有
- ⑭ **Asai, K., T. Inaoka., H. Nanamiya., Y. Sadaie., K. Ochi., and F. Kawamura.** Isolation and characterization of soprulation-initiation mutation in *Bacillus subtilis prfB* gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**:397-406 (2007)、査読有
- ⑮ **Nishimura, K., T. Hosaka., S. Tokuyama., S. Okamoto., and K. Ochi.** Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction. *J. Bacteriol.* **189**:3876-3883 (2007)、査読有
- ⑯ **Inaoka, T., and K. Ochi.** Glucose uptake pathway-specific regulation of synthesis of neotrehalosdiamine, an novel autoinducer produced in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**:65-75 (2007)、査読有
- ⑰ **Natori, Y., H. Nanamiya., G. Akanuma., S. Kosono., T. Kudo., K. Ochi., and F. Kawamura.** A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **63**:294-307 (2007)、査読有
- ⑱ **Hosaka, T., J. Xu., and K. Ochi.** 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)、査読有
- ⑲ **Kasai, K., T. Nishizawa., K. Takahashi., T. Hosaka., H. Aoki., and K. Ochi.** Physiological analysis of the stringent response elicited in an extreme thermophilic bacterium, *Thermoplasma thermophilus*. *J. Bacteriol.* **188**:7111-7122 (2006)、査読有
- ⑳ **Saito, N., J. Xu., T. Hosaka., S. Okamoto., H. Aoki., M. J. Bibb., and K. Ochi.** EshA accentuates ppGpp accumulation and is conditionally required for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **188**:4952-4961 (2006)、査読有
- ㉑ **Kurosawa, K., T. Hosaka, N. Tamehiro,**

T. Inaoka, and K. Ochi. Improvement of α -amylase production by modulating the ribosomal component S12 protein in *Bacillus subtilis* 168. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 71-77 (2006)、査読有

[学会発表] (計3件)

① Actinorhodin 生合成におけるActVA-5, ActVA-6 の機能解析

田口 貴章、岡本 晋、越智 幸三、市瀬 浩志 (武蔵野大・薬研、食総研) 日本放線菌学会 2008年7月10日、11日・フルーツパーク富士屋ホテル (山梨県山梨市)

② ストレプトマイシン弱耐性変異 *rsmG* 導入による *Streptomyces* 属の二次代謝能の変化

田中 幸徳、岡本 晋、小松 譲、徳山 真治、池田 治生、越智 幸三 (食総研、静岡大・農、北里大・北里生命研) 日本放線菌学会 2008年7月10日、11日・フルーツパーク富士屋ホテル (山梨県山梨市)

③ *Streptomyces coelicolor* 変異株における染色体環状化の解析

西川 友也、荒川 賢治、王国君、越智 幸三、木梨 陽康 (広大院・先端研・分子生命、食総研) 日本放線菌学会 2008年7月10日、11日・フルーツパーク富士屋ホテル (山梨県山梨市)

他32件

[図書] (計5件)

① Regulation of secondary metabolism in *Bacillus subtilis*, In Global Regulatory Networks in *Bacillus subtilis* (2007), Transworld Research Network, Kerala, India

② 越智幸三、稲岡隆史: 微生物の二次代謝に生理的意義はあるのか? 抗生物質生

産の新たな意味を探る、化学と生物、45 : 526-528 (2007)

③ Ochi, K. : From microbial differentiation to ribosome engineering. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71:1373-1386 (2007)

④ 越智幸三: 微生物の「休眠遺伝子」を活性化し抗生物質などを作り出す技術を開発、ブレインテクノニュース、15-20 (2007)

⑤ 保坂毅、王国君、岡本晋、越智幸三: リボゾーム工学による微生物からの有用物質発見、月刊バイオインダストリー2007年10月号: 59-66

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 幸三

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バイオテクノロジー研究領域生物機能解析ユニットユニット長

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者