

Ribosomal RNAの人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン

宮崎健太郎

はじめにーリボソームの構造と機能ー

リボソームは、すべての細胞に存在するタンパク質合成装置であり、DNAからmRNAに写し取られた遺伝情報をポリペプチド（タンパク質）に翻訳する役割を担っている。リボソームは、生物種によらず大小二つのサブユニットから構成されるが、細菌由来のリボソームでは、大（50S）サブユニットは23S rRNA, 5S rRNA, 36のタンパク質から構成され、小（30S）サブユニットは16S rRNAと21のタンパク質から構成されている。図1に大腸菌リボソームの立体構造¹⁾を示すが、きわめて複雑な構造をとっていることが見てとれる。これに加え、rRNAの転写後修飾（塩基修飾やプロセッシング）や各成分の秩序だったアセンブリーなど、リボソームが出来上がるまでの過程もきわめて複雑である。このため、リボソームの各成分は、複雑で緻密な相互作用、成熟過程に支障をきたさないよう、協調的に進化してきたと考えられている²⁾。

微生物分類指標としての16S rRNA

生化学者は、リボソームをタンパク質合成装置として捉えるだろうが、微生物学者の多くは、そこに含まれる16S rRNAのこしか念頭がないのではなかろうか。

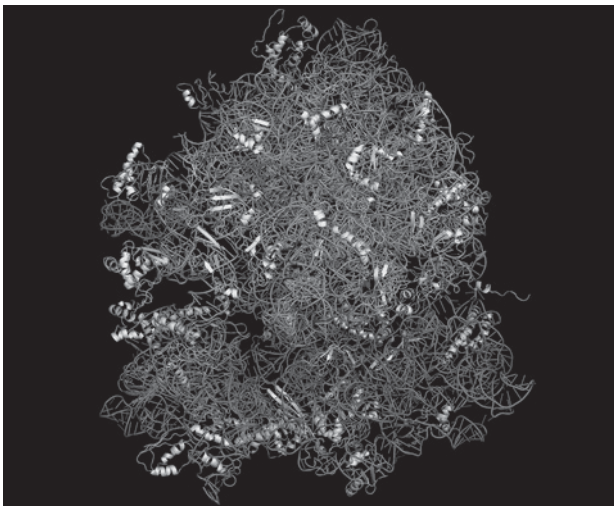


図1. 大腸菌リボソームの立体構造

1980年代後半、Woeseが微生物系統分類のために16S rRNA遺伝子配列を用いることを提唱して以来³⁾、微生物に携わる研究者で16S rRNAを知らぬ者はいない。

16S rRNA遺伝子配列が、微生物系統分類の指標として使われてきたのには、合理的な理由がある。すべての微生物に存在すること、適度な情報量（約1500塩基）であること、種を超えた配列相同性（保存領域）が見られること、種ごとに異なる配列（非保存領域）を含むことが、高解像度に種を分類するための重要なポイントとなる。そしてこの分類が意味をなすための基盤となっているのが、「16S rRNA遺伝子は種に固有で水平伝播しない」という前提である^{2,3)}。しかしこの「前提」は、先に述べたリボソームの機能的な重要性、構造的な複雑性を拠り所にしており、その実態は「直感」に近い。

16S rRNA遺伝子に基づく系統分類は、すでに古典とも言える手法として確立されているが、研究の進展とともに、その基盤を揺るがす事例が報告されている。我々の「直感」に反し、16S rRNA遺伝子の水平伝播を示唆する例が散見されるのである。ある種の微生物では、複数の16S rRNA遺伝子がモザイク様に組み合わせられたかのような配列の16S rRNAを保持している例や、一つの染色体上に相同性の低い16S rRNA遺伝子を併せ持つ微生物^{註1)}も見つかっているのである⁴⁻⁸⁾。

さらに、実験的な立場から16S rRNAが水平伝播可能であることを示唆する報告もある。Asaiらは、染色体上のrRNAオペロンを完全欠失した大腸菌変異株(Δ7株)を構築し、大腸菌とは同目別属のサルモネラやプロテウスといった細菌由来の16S rRNAが、遺伝子欠損を相補できることを示した⁹⁾。

これらの研究は、自然界における16S rRNAの水平伝播の痕跡を見いだしたままで、その遺伝的メカニズムを説明するものではない。しかしリボソームの構造的・機能的な可塑性を示唆するには十分な証拠であり、「リボソームは保守的である」「16S rRNAは水平伝播しない」

注1) 通常、微生物ゲノムには複数のrRNAオペロンがコードされている。たとえば大腸菌には7コピーのrRNAオペロンが存在する。

といった従来の考え方に一石を投じるものである。

リボソームの水平伝播実験

16S rRNA 遺伝子は水平伝播するのか？ —我々は、この問題を「リボソーム成分の種間和合性」の問題として捉え、実験的にその可能性を検証することとした。換言すると、16S rRNAの受け皿としてのリボソームは、水平伝播を受け付けるほどに可塑的なのか？という問題に答えようというものである。さらに、リボソームが異種16S rRNAを受け入れるとしたら、どの程度の種のものまで(どの程度の配列相同性まで)可能なのか？リボソームの構造的な複雑性とはどのように折り合いをつけるか？といった点に興味を持ち研究を開始した。実験手法としては、大腸菌リボソームを材料に、16S rRNAのみを異種生物のものと置き換え、細胞内で活性リボソームを再構成させるというものである。

16S rRNA 遺伝子のクローニング 16S rRNA 遺伝子は、先に述べた「種を超えた保存性」のお陰で、遺伝子の両末端付近にユニバーサルプライマーを設計することができる。これを用いてゲノムDNAを鋳型にPCR増幅すれば、全長に近い配列を容易にクローニングできる。さらに我々は、個別の菌株のゲノムではなく、環境ゲノム(メタゲノム)を鋳型に用いることで、実験に供する16S rRNAの多様化、実験のハイスループット化を図った。

環境ゲノムは、環境試料に含まれる微生物ゲノムの集合体である。環境中には膨大な種類、数の微生物が棲息している。しかし、その大半は「難培養性」である。そのため培養をしてしまうと本来の多様性が損なわれてしまうが、培養の工程を踏まずに、環境試料から直接ゲノムを抽出すれば、本来の多様性を維持したまま利用できる。我々は、土壌・海水・堆肥・温泉などさまざまな環境試料からの環境ゲノムを調製し、それを鋳型に16S rRNA 遺伝子をPCR増幅し、大腸菌16S rRNAとの入れ替え実験に用いた。

機能スクリーニング系 外来の16S rRNAが大腸菌内で機能するか否かを判別するために、Asaiらが構築したΔ7株をさらに改良したKT101株^{10,11)}を宿主として利用した。KT101株はΔ7株同様、染色体上のrRNAオペロンをすべて欠失し、その生育を大腸菌rrnBオペロンの発現ベクターpRB101(アンピシリン耐性, pSC101 ori)により補っている。さらにpRB101はカウンターセクションマーカー*sacB*も含んでいるため、ショ糖存在下で脱落させることができる。一方、外来16S rRNA 遺伝子は、pRB101とは異なる薬剤耐性を示すベクターpRB103(ゼオシン耐性, pSC101 ori)にクローニングしておく。KT101をpRB103で形質転換し、さらにショ糖によるカウンターセクションと抗生物質による選択を組み合わせることで、異種16S rRNAの機能スクリーニングができる。異種16S rRNAが大腸菌内で

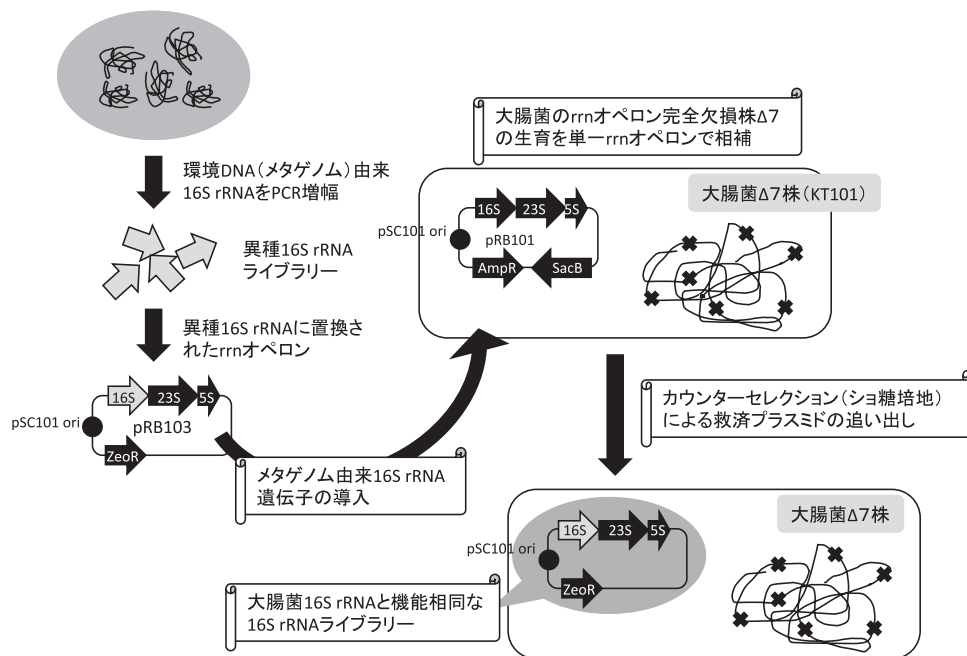


図2. 外来(異種)16S rRNA 遺伝子の機能スクリーニング

他の成分と協調して機能する場合のみ、相補株を得られるという仕組みである(図2)。

大腸菌内で活性な16S rRNAの選抜 この実験系を用いて環境ゲノムより得た16S rRNAをスクリーニングした結果、33種の相補株が得られた^{12,13}。得られたクローンからpRB103を抽出し、16S rRNA遺伝子領域を解析したところ、大半が大腸菌の属するγ-プロテオバクテリア綱に帰属された。しかし、サルモネラやプロテウスなどといった、大腸菌と近縁な腸内細菌類ばかりでなく、シュドモナスの近縁種なども数多く含まれていた。さらに驚くべきことに、γ-プロテオバクテリアを超え、β-プロテオバクテリア綱に帰属される16S rRNAも含まれていた(図3)。大腸菌の16S rRNA遺伝子と比較し、80%程度の配列相同性しかもたないものでも、大腸菌のリボソーム成分とうまく組み合わせたり、機能相補したのである。こうして、我々の想像(これまた我々の先入観にすぎないが)をはるかに超えたレベルでリボソーム成分の生物種間での和合性が成り立つことが証明された¹⁰。

リボソーム可塑性の分子基盤

では、大腸菌の生育を相補した外来16S rRNAの間に何か共通の特徴はあったのであろうか？我々は、取得し

た16S rRNAと大腸菌16S rRNAとの間で異なる箇所をRNAの二次構造上にマッピングした。その結果、大腸菌の生育を相補した異種16S rRNAは、配列が変わっても二次構造を壊さないというルールを堅持していることを見いだした。図4は、一例としてヘリックス21と呼ばれる二次構造領域を示すが、たとえば、大腸菌ではU589-G650となっている塩基対が、A01(配列全体ではγ-プロテオバクテリアの*Thioalkalivibrio sulfidophilus*と91%の相同性、大腸菌とは84%の相同性)ではC-G塩基対に、A02(配列全体ではγ-プロテオバクテリアの*Thalassomonas viridans*と94%の相同性、大腸菌とは88%の相同性)ではU-A塩基対になっている。

さらに一部の16S rRNAについては、ヘリックス構造すら大きく異なる例も見いだされている。図5に示す通り、ヘリックスの伸長、短縮が起きているのである(B01は配列全体ではγ-プロテオバクテリアの*Porticoccus litoralis*と92%の相同性、大腸菌とは86%の相同性。H01は配列全体ではγ-プロテオバクテリアの*Thiohalobacter thiocyanaticus*と93%の相同性、大腸菌とは84%の相同性)。こうした部位は溶媒に露出しており、リボソーマルタンパク質なども相互作用していない(図6)。

二次構造リッチな16S rRNAにおいては、点突然変異は構造を破壊しかねない。これに対し、他の生物由来といえども、二次構造は保持しているという場合であれば、部品の差し替えのような感覚で、交換可能というのである。遺伝学的には一見ドラスチックな水平伝播であるが、点突然変異よりも寧ろ許容されやすいというのは、リボソームあるいは16S rRNAの進化を考える上で非常に重要かつ示唆的な知見である。

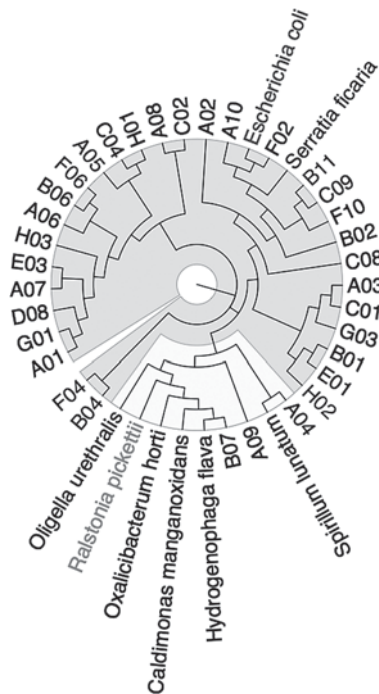


図3. 大腸菌16S rRNAの遺伝子欠損を相補する外来16S rRNAの起源。濃い網掛けはγ-プロテオバクテリア由来、薄い網掛けはβ-プロテオバクテリア由来。

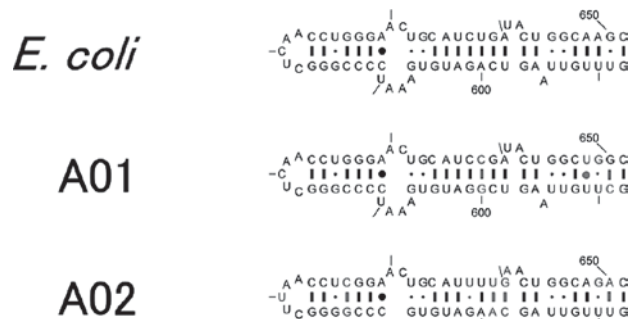


図4. 大腸菌内で機能する異種(A01およびA02)16S rRNAのヘリックス21領域の二次構造

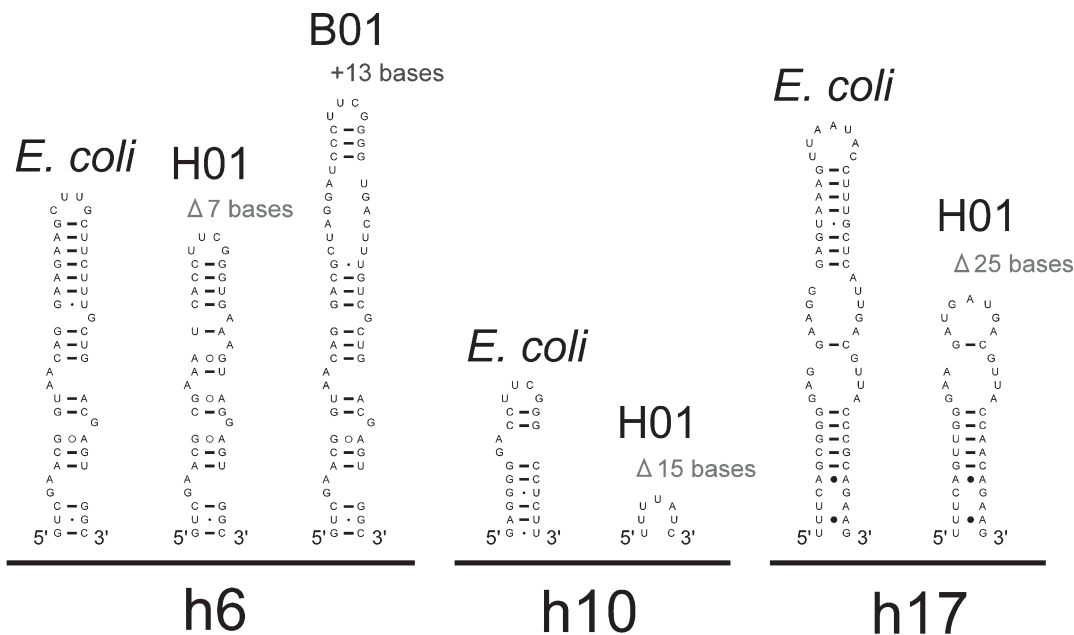


図5. ヘリックス構造に変化が見られた16S rRNAのヘリックス6, 10, 17領域

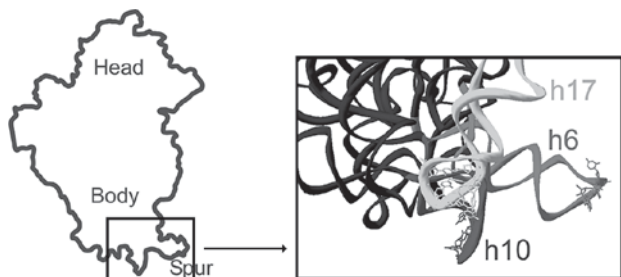


図6. ヘリックス構造に変化が見られた16S rRNAのヘリックス領域の立体構造上の位置

細胞工学としてのリボソーム改変

以上の研究から、リボソームは人工的に改変可能であること、その手法の一つとして16S rRNAの置換変異が有効であることが示された。得られた変異株は、「生きる」という条件を満たしたものの集まりである。が、翻訳系に変化が起きた以上、細胞内のタンパク質発現全般に大きな変動が及ぶことは必然である(図7)。では、システムの変更を余儀なくされた彼らの「生き様」はどのように変わるのか?我々はこのことに興味を持ち、大腸菌変異株の表現型観察を行った。

まず変異株間で増殖速度を比較すると、野生株(大腸菌自身の16S rRNAで機能相補したもの)と遜色ないものから、倍加時間が3倍程度長くなるものが生じた。また、定常期のOD値(菌体密度)にも差が生じることが

リボソーム 30Sサブユニットの骨格
16S rRNAの改変

▼
変異の影響がリボソーム全体に波及

▼
細胞内翻訳システムの攪乱

▼
多様かつ予測不能な表現型の創出

- ✓高発現
- ✓高速増殖
- ✓温度耐性
- ✓溶媒耐性
- ✓耐塩性...

図7. リボソーム改変に基づく細胞機能工学のコンセプト

観察された。寒天培地で生育させると、倍加時間を反映して大小のコロニーが出現するが、同時に、野生株のようにきれいな円形ではなく楕円形に近いもの、フチがギザギザなものなどが観察された(佃&宮崎, 未発表)。このように変異株ごとに表現型にはさまざまな違いが観察され、その「生き様」は千差万別であることが示唆された。

多様性が生まれれば、それを改良に活かそうという発想が生まれる。進化工学の考え方である。我々も手始めに、異宿主発現について実験を行った。たとえばレポーターとして緑色蛍光タンパク質(GFP)を変異株に導入

すると、多くの場合、野生株が変異株に比べて高い蛍光強度を示したが、大腸菌とは系統的に離れた微生物の遺伝子を模して合成したGFP（アミノ酸配列は共通であるが、同義置換を導入している）などでは、野生株では低い蛍光、逆に変異株において高い蛍光が見られることも観察された。

細胞工学としての研究は端緒についたばかりであるが、新たな微生物育種技術として発展させたいと思っている。

本稿で紹介した研究の一部は、科学研究費補助金の支援を受けたものである。また本研究は、産総研 元ポストドク研究員北原圭博士、安武義晃主任研究員、東大院 新領域創成科学研究科 大学院生の佃美雪さん、佐藤允治さんらとともに行った。本研究で用いた大腸菌 *rrn* オペロン欠損株およびプラスミドセットは、東京大学大学院 工学系研究科 化学生命工学専攻 鈴木勉教授に供与していただいた。この場を借りて感謝する。

文 献

- 1) Korostelev, A. *et al.*: *Cell*, **26**, 1065 (2006).
- 2) Jain, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3801 (1999).
- 3) Woese, C. R.: *Microbiol. Rev.*, **51**, 221 (1987).
- 4) Acinas, S. G. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **186**, 2629 (2004).
- 5) Wang, Y. and Zhang, Z.: *Microbiology*, **146**, 2845 (2000).
- 6) Schouls, L. M. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **185**, 7241 (2003).
- 7) Miller, S. R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 850 (2005).
- 8) Eardly, B. D. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1328 (2005).
- 9) Asai, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1971 (1999).
- 10) Sato, N. S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15386 (2006).
- 11) Kitahara, K. and Suzuki, T.: *Mol. Cell*, **34**, 760 (2009).
- 12) Kitahara, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19220 (2012).
- 13) Kitahara, K. and Miyazaki, K.: *Nat. Commun.*, **2**, 549 (2011).