

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19346

研究課題名(和文) G+C含量の異なる16S rRNA遺伝子をもつ好塩性アーキアの温度適応メカニズム

研究課題名(英文) Expression of different GC content 16S rRNA genes in Haloarcula at different temperatures

研究代表者

木村 浩之(Kimura, Hiroyuki)

静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授

研究者番号：30377717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円

研究成果の概要(和文)：砂漠の塩湖に生息する好塩性アーキアは、ゲノム上にグアニンとシトシンの割合(GC含量)が異なる16S rRNA遺伝子を有する。また、原核生物の16S rRNA遺伝子のGC含量と生育温度は高い相関を示す。そこで、好塩性アーキアは低温時には低GC含量16S rRNAを発現させ、高温時には高GC含量16S rRNAを発現させるという仮説を検証した。好塩性アーキア6菌株を20 から55 まで培養し、各16S rRNA遺伝子の発現量を測定した。その結果、20-40 においては低GC含量16S rRNA遺伝子が多く発現し、50-55 では高GC含量16S rRNA遺伝子の有意に高い発現が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、培養温度によって好塩性アーキアがGC含量の異なる16S rRNAを含むリボソームを使い分けるといった新たな温度適応メカニズムに関する知見を得た。今後、高GC含量の16S rRNA遺伝子を含む新たなリボソームRNAオペロンやその転写制御遺伝子群をゲノムに組み込むことによって、原核生物の生育温度を5 プラスする新たなバイオ手法に繋がる可能性がある。製薬、醸造、食品、水処理、環境浄化といった様々な産業分野で利活用されている有用微生物菌株の生育温度を5 程度上昇させることができれば、バイオリクターの冷却コストを大幅に削減することが可能となり、温暖化防止に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Halophilic archaea harbour three copies of 16S rRNA genes (rrsA and rrsBC) in their genomes. While rrsB and rrsC show almost identical sequences, rrsA shows 1-3% guanine-plus-cytosine content (PGC) difference compared to rrsBC. Based on the strong correlation between the PGC of 16S rRNA genes and the growth temperatures of the prokaryotes, we hypothesized that high-PGC rrsA and low-PGC rrsBC are expressed at high and low temperatures, respectively. The secondary structure prediction of the 16 rRNA via computer simulation showed that the structural stability of 16S rRNAs transcribed from rrsA was higher than that of 16S rRNAs transcribed from rrsBC. We measured expression levels of rrsA and rrsBC under various temperature conditions by reverse-transcriptase quantitative PCR. The expression ratio of high-PGC rrsA to low-PGC rrsBC increased with cultivation temperatures. Our results suggest that 16S rRNAs transcribed from high-PGC rrsA function under high temperature conditions.

研究分野：分子生物学

キーワード：温度適応 生育温度 好塩性アーキア リボソームRNA GC含量 トランスクリプトーム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボソーム RNA 遺伝子 (特に 16S rRNA 遺伝子) は、原核生物の系統分類を行う際に最も広く用いられる遺伝子である。これまでの研究において、低温環境から中温環境に生息する原核生物 (好冷菌および中温菌) は 48-58% のグアニンとシトシンの割合 (GC 含量) の 16S rRNA 遺伝子を有するのに対し、高温環境に生息する原核生物 (好熱菌および超好熱菌) は 55-70% の高い GC 含量の 16S rRNA 遺伝子を持つことが報告されている。そして、原核生物の 16S rRNA 遺伝子の GC 含量とその生育温度は高い相関を示すことが見出されてきた (引用文献-1)。近年の微生物ゲノム解読により、ゲノム上に塩基配列の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子を有する原核生物が報告されているが、中でも砂漠の塩湖や塩田から単離されてきた好塩性アーキアは、ゲノム上に塩基配列の異なる 3 種類の 16S rRNA 遺伝子 (*rrsABC*) を持つことが知られている (引用文献-2)。

我々は、DNA データベースに登録されている好塩性アーキアのゲノム情報および 16S rRNA 遺伝子を網羅的に探索した。そして、好塩性アーキアはゲノム上に 3 つのリボソーム RNA オペロンを有すること、各オペロンに含まれる 5S rRNA 遺伝子および 23S rRNA 遺伝子の塩基配列に違いは見られないこと、16S rRNA 遺伝子の塩基配列は 5% 以上も異なり、且つ、その GC 含量は 2% 以上の差が見られることを明らかにした。さらに、砂漠の塩湖や塩田は昼夜で 20°C 以上の温度変動が見られることや、原核生物の 16S rRNA 遺伝子の GC 含量とその生育温度は高い相関を示すことから、好塩性アーキアは低温時と高温時に GC 含量の異なる 16S rRNA を含む複数種のリボソームを使い分けるといふ仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

本研究においては、砂漠の塩湖や塩田から単離されてきた好塩性アーキアは、昼間の高温時には耐熱性を有する高い GC 含量の 16S rRNA (*rrsA*) を含むリボソームを機能させ、夜から早朝にかけての低温時には転写効率のよい低い GC 含量の 16S rRNA (*rrsBC*) を含むリボソームを機能させるという仮説を立て、それを検証する。さらに、温度変動の激しい極限環境に生息する好塩性アーキアが有する温度適応メカニズムを明らかにするとともに、原核生物の生育温度を 5°C 上昇させるバイオ技術を開発するための基盤データを獲得する。

3. 研究の方法

(1) モデル生物として異なる GC 含量の 16S rRNA 遺伝子を有する好塩性アーキア 6 菌株 (*Halorcula*) を選定し、理化学研究所微生物材料開発室 (JCM) からこれらの菌株を購入した。次に、各菌株からゲノム DNA を抽出し、クローニング・シーケンス法を用いて各 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定するとともに、各 16S rRNA 遺伝子の GC 含量を算出した。そして、各 16S rRNA の二次構造をモデル化し、GC 含量の異なる 16S rRNA の二次構造の熱安定性を算出した。

(2) 理化学研究所 JCM から購入した好塩性アーキア 6 菌株を培養した。増殖した各菌株の細胞からゲノム DNA を抽出した。次に、クローニング・シーケンス法により 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定したのち、それぞれの 16S rRNA 遺伝子を特異的に PCR 増幅・定量するためのプライマーをデザインした。さらに、好塩性アーキア 6 菌株を 20°C から 55°C までのそれぞれの菌株の生育温度にて培養し、各培養温度における各 16S rRNA の発現量を測定した。

(3) 好塩性アーキア菌株を用いてリボソーム RNA オペロンの欠損株を作製した。ゲノム解読済みの好塩性アーキア菌株を選定して、その野生株から高い GC 含量の 16S rRNA 遺伝子を含むリボソーム RNA オペロンを欠損させた菌株と低い GC 含量の 16S rRNA 遺伝子を含むリボソーム RNA オペロンを欠損させた菌株を作製した。各欠損株の作製には、リボソーム RNA オペロンの前後約 1,000 bp の塩基配列と薬剤耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを作成し、これらのプラスミドを菌株に取り込ませた。その後、各リボソーム RNA オペロンを薬剤耐性遺伝子に置換した。次に、遺伝子欠損株を 20°C から 55°C までの生育温度にて培養し、各温度における欠損株の増殖速度および世代時間を算出するとともに、野生株の増殖速度と比較した。

(4) ゲノム解読済みの好塩性アーキア菌株を最低生育温度に近い低温 (25°C) と最高生育温度に近い高温 (45°C) にて培養した。次に、遠心分離によって微生物細胞を集積したのち、これらの微生物細胞から全 RNA を抽出した。そして、全 RNA から cDNA を合成した後、次世代シーケンサーを用いて網羅的に cDNA の塩基配列を決定した。その後、アノテーションにより遺伝子を同定した。そして、培養温度によって GC 含量の異なるリボソーム RNA 遺伝子の発現量が有意に異なるかどうか検証した。さらに、各温度条件下で発現したリボソーム RNA オペロンの転写制御に関わる遺伝子群や温度センサーの機能を担うタンパク質をコードした遺伝子を定量した。

4. 研究成果

(1) モデル生物として異なる GC 含量の 16S rRNA 遺伝子を有する好塩性アーキア 6 菌株を選定し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した。そして、各 16S rRNA の二次構造をモデル化し、GC 含量の異なる 16S rRNA の二次構造の熱安定性を算出した。その結果、塩基配列が異なり、GC 含量に違いの見られる部分は 16S rRNA の二次構造のヘアピン構造の中に集中していることが明らかとなった (図 1)。また、高い GC 含量の 16S rRNA (*rrsA*) の二次構造は、低い GC 含量の 16S rRNA (*rrsBC*) の二次構造より高い熱安定性を示した (引用文献-2)。

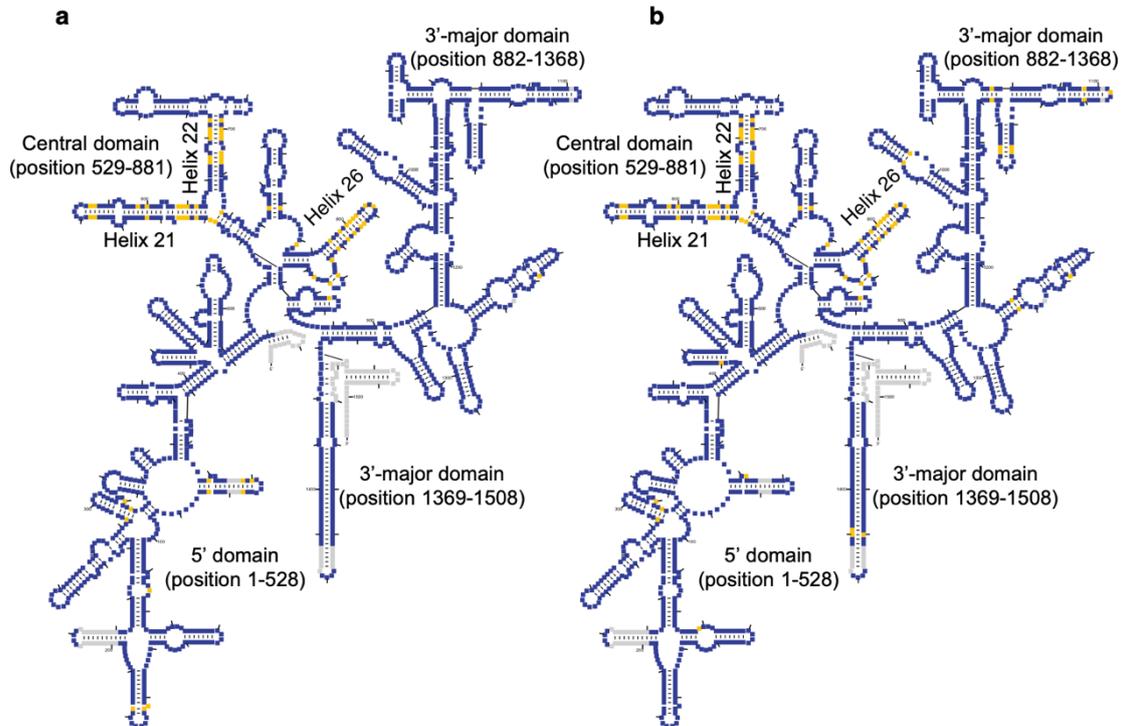


図 1. 16S rRNA 遺伝子の塩基配列をもとにモデル化した 16S rRNA の二次構造。黄色で示された箇所は、*rrsA* と *rrsBC* の塩基配列の異なる部分を示す。

(2) ゲノム上に GC 含量の異なる 16S rRNA 遺伝子を有する好塩性アーキア 6 菌株を用いて、最低生育温度から最高生育温度まで幅広い温度での菌株の培養を行った。そして、GC 含量の異なる 16S rRNA 遺伝子の発現量を測定し、培養温度条件と 16S rRNA 遺伝子の GC 含量の関係を明らかにした。その結果、最低生育温度から至適生育温度までの低い温度条件下においては低い GC 含量の 16S rRNA 遺伝子が多く発現し、最高生育温度付近の高い温度条件下では、高い GC 含量の 16S rRNA 遺伝子が有意に多く発現することを見出した (図 2)。そして、好塩性アーキアは高温時には耐熱性を有する高い GC 含量の 16S rRNA を含むリボソームを機能させ、低温時には転写効率のよい低い GC 含量の 16S rRNA を含むリボソームを機能させるという仮説を支持する結果が得られた (引用文献-2)。

(3) 好塩性アーキア菌株を用いてリボソーム RNA オペロンの欠損株を作製し、遺伝子欠損株を 20°C から 55°C までの生育温度にて培養した。その後、各温度条件下における増殖速度および世代時間を算出するとともに、野生株と欠損株の増殖特性を比較した。その結果、高い GC 含量を有する 16S rRNA 遺伝子のみを持つ遺伝子欠損株は、低い GC 含量を有する 16S rRNA 遺伝子のみを持つ遺伝子欠損株よりも、高温環境で有意に速い増殖を示した。一方、高い GC 含量を有する 16S rRNA 遺伝子と低い GC 含量を有する 16S rRNA 遺伝子の両方を持つ野生株は、20°C から 55°C までの全ての温度条件下において有意に高い増殖速度を示した。本研究結果は、好塩性アーキアは、耐熱性を有する高い G+C 含量の 16S rRNA を含むリボソームを持つことは、高温時の増殖において機能するという仮説を支持するものであった。

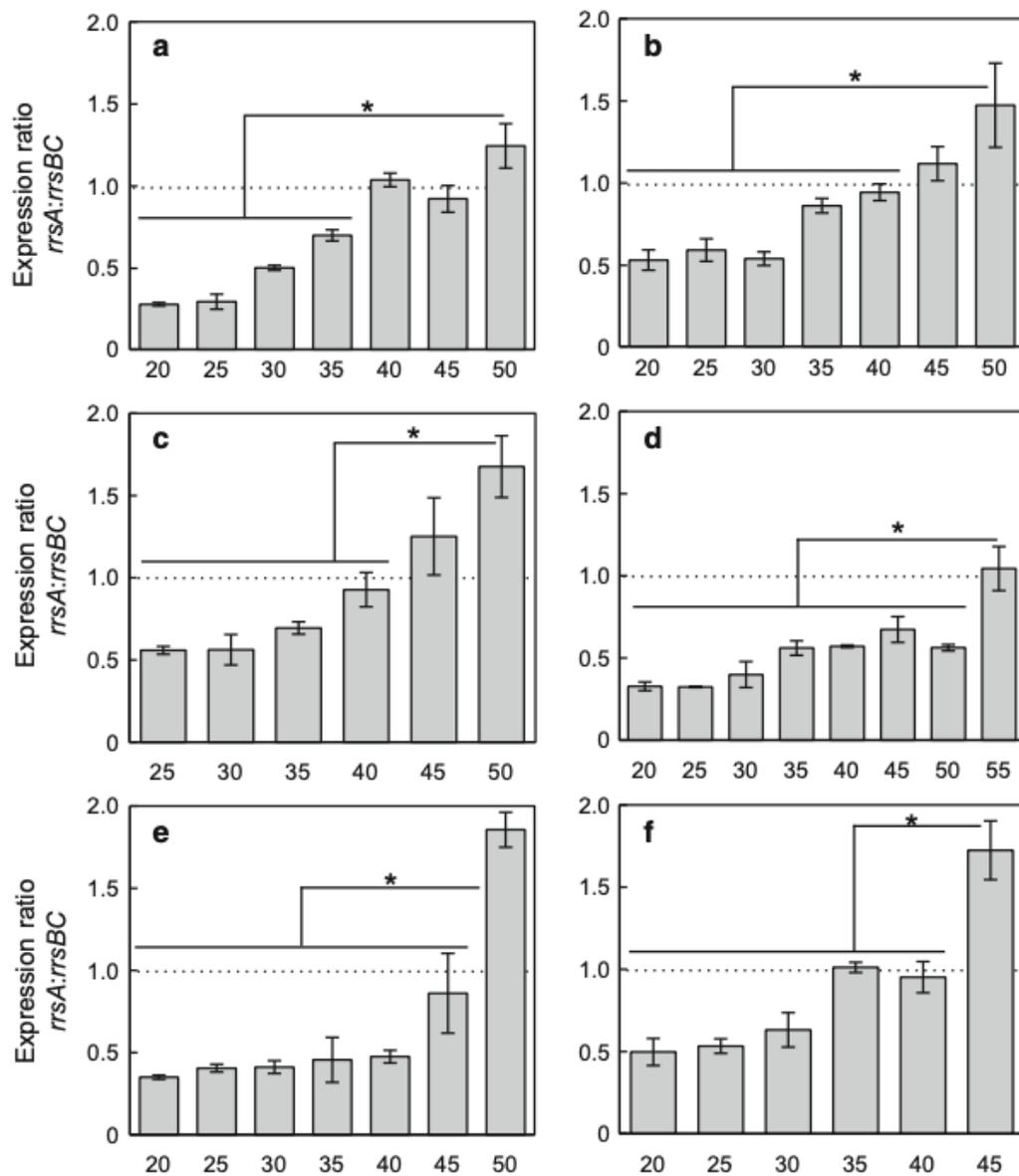


図 2. 各培養温度における、*rrsA*に対する *rrsBC*の発現量の割合

(4) ゲノム解読済みの好塩性アーキア菌株を最低生育温度に近い低温と最高生育温度に近い高温にて培養した。その後、抽出した全 RNA から cDNA を作製し、次世代シーケンサーを用いて網羅的に cDNA の塩基配列を決定した。その結果、高温の培養条件下において、高い GC 含量の 16S rRNA 遺伝子の発現量が有意に高いことが明らかとなった。また、高温培養条件下において発現したリボソーム RNA オペロンの転写制御に関わる遺伝子群や温度センサーの機能を担うタンパク質をコードした遺伝子が多く発現していることも示された。

<引用文献>

1. Yu Sato, Kenji Okano, Hiroyuki Kimura, Kohsuke Honda. TEMPURA: Database of growth TEMPERATURES of Usual and RARE prokaryotes. *Microbes and Environments* 35, ME20074, 2020.
2. Yu Sato, Hiroyuki Kimura. Temperature-dependent expression of different guanine-plus-cytosine content 16S rRNA genes in *Haloarcula* strains of the class *Halobacteria*. *Antonie van Leeuwenhoek* 112, 187-201, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yu Sato, Kenji Okano, Hiroyuki Kimura, Kohsuke Honda	4. 巻 35
2. 論文標題 TEMPURA: Database of growth TEMPeratures of Usual and RAre prokaryotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 ME20074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME20074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Yu, Kimura Hiroyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Temperature-dependent expression of different guanine-plus-cytosine content 16S rRNA genes in Haloarcula strains of the class Halobacteria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antonie van Leeuwenhoek	6. 最初と最後の頁 187-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10482-018-1144-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Makoto Matsushita, Kenta Magara, Yu Sato, Naoya Shinzato, Hiroyuki Kimura	4. 巻 33
2. 論文標題 Geochemical and microbiological evidence for microbial methane production in deep aquifers of the Cretaceous accretionary prism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 205-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME17199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yu Sato, Taketomo Fujiwara, Hiroyuki Kimura	4. 巻 8
2. 論文標題 Expression and function of different guanine-plus-cytosine content 16S rRNA genes in Haloarcula hispanica at different temperatures	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2017.00482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 悠、木村浩之、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 原核生物の生育温度データベースの構築と利用 ~生育温度に影響を及ぼす因子の特定を目指して~
3. 学会等名 第20回極限環境生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 悠、木村浩之、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 原核生物の生育温度データベースの構築と利用 ~生育温度決定因子の特定を目指して~
3. 学会等名 Biothermology Workshop 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三宅敬太、伏見圭司、Ni-Ni-Win、木村浩之、杉島正一、池内昌彦、成川 礼
2. 発表標題 ユニークなシアノバクテリアがもつ2つの色素合成酵素PcyAの光受容と光合成に対応する機能分化
3. 学会等名 第20回日本光生物学協会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keita Miyake, Keiji Fushimi, Ni-Ni-Win, Hiroyuki Kimura, Masakazu Sugishima, Masahiko Ikeuchi, Rei Narikawa
2. 発表標題 Dihydrobiliverdin as a chromophore for cyanobacteriochromes from chlorophyll d-bearing cyanobacterium <i>Acaryochloris marina</i>
3. 学会等名 17th International Conference on the Tetrapyrrole Photoreceptors of Photosynthetic Organisms (ICTPPO) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 悠、木村浩之
2. 発表標題 16S rRNA遺伝子のGC含量に着目した原核生物の温度適応メカニズム
3. 学会等名 日本進化学会第19回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 悠、木村浩之
2. 発表標題 Relationship between guanine-plus-cytosine content of 16S rRNA genes and growth temperature of the prokaryotic hosts
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 悠、藤原健智、木村浩之
2. 発表標題 砂漠の塩湖に生息するアーキアの高温適応～リボソームRNAのG+C含量に着目して～
3. 学会等名 第2回Biothermology Workshop
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 悠、藤原健智、木村浩之
2. 発表標題 16S rRNA遺伝子のG+C含量に着目したアーキアの温度適応メカニズム
3. 学会等名 第12回日本ゲノム微生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

木村研究室
<http://kimura-lab.sci.shizuoka.ac.jp/top.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of Hawaii, Manoa			