

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580091

研究課題名(和文) 真正細菌の16S rRNAに生じる7-メチルグアノシン修飾の生理的意義の解明

研究課題名(英文) Analysis of biological functions of the 7-methylguanosine modification in 16S rRNA

研究代表者

岡本 晋 (OKSAMOTO SUSUMU)

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・ユニット長

研究者番号：80353986

研究成果の概要(和文)：全ての真正細菌において見られる16S rRNAの7-メチルグアノシン修飾についてその生理的意義の解明を試みた。大腸菌においては実験室レベルの培養条件下ではその欠損の影響はほとんど認められなかった。一方、放線菌では高温条件下における生育の阻害が見られた。また、ストレプトマイセス属放線菌では本修飾の欠損により二次代謝が広く活性化されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bacterial rRNA have many methylated nucleotides. Among them, a 7-methylguanosine (m⁷G) modification in 16S rRNA is highly conserved among eubacteria. Here, we conducted genetic analyses of this conserved rRNA modification. Apparently, in *Escherichia coli*, the m⁷G modification is not essential for its growth under laboratory culture conditions. On the other hand, in *Streptomyces coelicolor* A3(2), this modification is critical for its viability under high temperature culture conditions. Furthermore, we found that the loss of the m⁷G modification in 16S rRNA often activates secondary metabolisms in the genus *Streptomyces*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：微生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：RNA修飾、大腸菌、放線菌、二次代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) リボゾーム攻撃性の抗生物質であるストレプトマイシンは、1943年の発見以来、抗結核薬として長年使用されてきた。しかしながら、耐性菌の蔓延により、近年はその有効性の低下が問題となっていた。

(2) ストレプトマイシン耐性には高レベル

耐性および低レベル耐性の二種類が存在することが発見当初から知られていた。高レベル耐性は、リボゾーム蛋白質 S12 あるいは16S リボゾーム RNA (rRNA) の変異によって付与されることが明らかにされていた。一方、低レベル耐性の原因(変異)については60年来不明のままであり、臨床から分離されるストレプトマイシン耐性結核菌において

も、多くのケース（～50%）で変異遺伝子が同定されずにいた。

（3）研究代表者らは、応用微生物学的興味から、抗生物質を過剰生産する低レベルストレプトマイシン耐性放線菌変異株について解析を行ってきた。その途上において、以下に示す成果を挙げていた。

①低レベルストレプトマイシン耐性の原因となる変異を機能未知の遺伝子 *rsmG* に見いだすことに成功した。

②本遺伝子が 16S rRNA の 7-メチルグアノシン (m⁷G) 修飾を司るメチル化酵素をコードすること、さらには、*rsmG* 変異に起因する m⁷G 修飾の消失により低レベルストレプトマイシン耐性が付与される事も明らかにした。

③臨床分離ストレプトマイシン耐性結核菌において多数の *rsmG* 変異を見だし、60 年来のミステリーであった低レベルストレプトマイシン耐性の謎を解明することに成功した。

（4）rRNA 中には多数の修飾残基が存在する。例えば、大腸菌 16S rRNA では 10ヶ所のメチル化が知られている。しかしながら、個々の修飾の生理的意義については理解が進んでいなかった。

2. 研究の目的

（1）本研究においては、研究代表者らがバクテリアにおいて新たに見いだした 16S rRNA メチル化酵素「RsmG」によって触媒される m⁷G 修飾について、その生理的意義を明らかにする。

（2）本研究では、大腸菌 (*E. coli* K12 株) および放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) をモデルとして解析を行う。

①大腸菌を用いる解析では、m⁷G 修飾の欠失による細胞生理の変化について明らかにする。また、*rsmG* 遺伝子の機能が必須となるような条件があるかどうかを生理学的・遺伝学的に調べる。

②放線菌を用いる系では、*rsmG* 変異から抗生物質高生産に至る経路の概要解明を目指す。

3. 研究の方法

（1）大腸菌を用いる解析では、m⁷G 修飾の欠失による細胞生理の変化について DNA マイクロアレイ解析により明らかにすることを目指した。また、*rsmG* 遺伝子と遺伝学的に相互作用する因子について同定を試み、以下の方法により研究を実施した。

①様々な条件下における大腸菌 *rsmG* 変異株の生育について検討

②DNA マイクロアレイによる発現解析

③合成致死変異 (synthetic lethal mutation) の探索

④その他の RNA 修飾酵素遺伝子との遺伝学的相互作用の検討

（2）放線菌を用いる系では、変異株のスクリーニングおよびその解析により *rsmG* 変異から抗生物質高生産に至る経路に關与する基本因子の解明を目指し、以下の方法により研究を実施した。

①様々な条件下における放線菌 *rsmG* 変異株の生育について検討

②放線菌 *rsmG* 変異によって過剰発現が誘導される S-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子 (*metK*) 発現制御機構解明のためのレポーターシステム構築

③様々な放線菌の二次代謝におよぼす *rsmG* 変異の影響について検討

4. 研究成果

（1）*rsmG* 遺伝子を欠損した大腸菌変異株 ($\Delta rsmG$ 変異株) の各種培養条件下における生育を野生株と比較した。しかしながら、試した全ての条件下で生育の差は認められなかった。さらに厳密を期するために、いくつかの条件においては、野生株と $\Delta rsmG$ 変異株を同じフラスコに同時接種する実験、いわゆる競合実験を行ったが、両株における生育の差を見いだすことはできなかった。したがって、大腸菌においては人為的な培養条件下における本修飾の生理的意義は未だ不明である。一方、放線菌の $\Delta rsmG$ 変異株では高温培養 (42°C) において明らかな生育の低下が観察された。

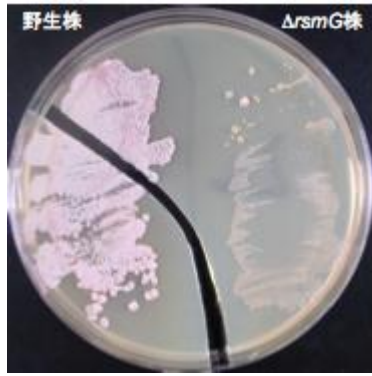


図1 高温培養における放線菌 *rsmG* 変異株の生育低下

(2) 大腸菌の遺伝子発現に及ぼす $\Delta rsmG$ 変異の影響を調べるために、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析を行った。具体的には、標準的な培地であるLBを使用し、対数増殖期および定常期の細胞からRNAを調製して遺伝子発現プロファイルを解析した。

結果的には、対数増殖期、定常期のいずれにおいても、遺伝子発現プロファイルは遺伝子野生株のそれと有意な差は認められなかった。(1)の結果も考慮すると、大腸菌では実験室レベルの環境下ではm7G修飾はそれほど重要な機能を担っていないものと考えられる。

(3) 細胞には *rsmG* 遺伝子の機能が失われた場合のバックアップ機構が備わっている可能性は十分に考えられる。そこで、*rsmG*変異と組み合わせられた場合に致死性を示す変異、いわゆる「合成致死変異」を大腸菌において探索した。具体的には、染色体上の *rsmG* 遺伝子を欠失させた株にインタクトな同遺伝子を持つプラスミドを持たせて遺伝子機能を相補させておき、そこにトラスポゾンによりランダムな変異を導入した。得られたトラスポゾンライブラリーの中から、プラスミドを失う事が出来ない株をスクリーニング(プラスミド上にコードされている β -ガラクトシダーゼ活性を指標)した。実験系自体が上手く働くことを確認するために、合成致死変異の存在が確認されている既知の変異($\Delta gidA$)を陽性コントロールとして用いた。

30万株以上のトラスポゾンライブラリーを調べたが目的とする変異は見いだされなかった。一方、*gidA* 遺伝子を用いた対照実験においては期待通りに合成致死変異が取得

されており、実験系自体は目的通りに機能していることが確認されている。

以上の結果から、*rsmG* 遺伝子に関しては合成致死の性質を示す変異は無いものと結論した。

(4) 上記実験において合成致死の性質を示す変異が見いだされなかったことから、*rsmG* と遺伝学的に相互作用する遺伝子を、翻訳関連因子を中心に探索した。具体的には、大腸菌 *rsmG* 破壊株に調べようとする遺伝子変異(欠失変異)を導入し、生育、薬剤に対する感受性等を調べた。

その結果、幾つかの tRNA 修飾酵素遺伝子(*gidA*, *miaA* 等) 変異との組合せにおいて、*rsmG* 変異株の表現型である抗生物質ストレプトマイシンに対する耐性が低下することが示され、これらの因子との相互作用が確認された。このうち *gidA* 遺伝子は *rsmG* 遺伝子とオペロンをなしているが、その機能面においても両者がリンクしていることが裏付けられた。

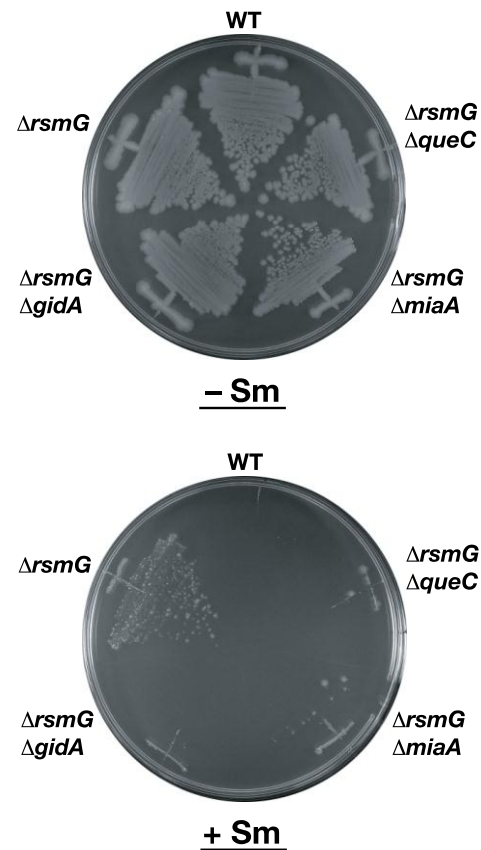


図2 *rsmG* 遺伝子と遺伝学的に相互作用する因子

(5) 放線菌 *S. coelicolor* においては、*rsmG* 変異により S-アデノシルメチオニン合成酵

素遺伝子 (*metK*) の過剰発現が起こることが明らかにされている。さらには、この事に起因する細胞内 S-アデノシルメチオン濃度の上昇が抗生物質過剰生産誘発の主因であることも確かめられている。そこで、*metK* 遺伝子の発現制御機構、さらには *rsmG* 変異による発現誘導機構を解明するための礎となる遺伝学的システム、具体的には *metK* プロモーターの支配下に配置したレポーター遺伝子を染色体上に組み込んだ菌株の構築を試みた。具体的には、カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ遺伝子 (*xyIE*) および赤色色素合成活性化遺伝子 (*redD*) の活用を検討した。これらのうち、*xyIE* をレポーターとして使用した場合には *rsmG* 変異株における *metK* プロモーターの活性化が検出可能であった。

ここで構築した実験系を用いて、*metK* 遺伝子の発現制御に関わる遺伝子 (変異あるいは多コピーで影響を与える遺伝子) を探索したが、目的遺伝子の同定には至らなかった。

(6) モデル放線菌である *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株において、*rsmG* 変異は二次代謝 (抗生物質生産) を活性化する。そこで、他の放線菌における *rsmG* 変異の効果を検証した。

試した多くのストレプトマイセス属放線菌では *rsmG* 変異による二次代謝の活性化が認められた。例外的な菌株の一つとして *Streptomyces avermitilis* が挙げられる。本菌のゲノム情報は全て明らかにされており、数多くの二次代謝遺伝子クラスター (少なくとも 30 クラスター) の存在が報告されている。本菌から *rsmG* 変異株を分離して二次代謝化合物の生産性について調べたが、*rsmG* 変異による顕著な活性化認められなかった。さらに、ストレプトマイセス属以外の放線菌においても *rsmG* 変異の効果が無いことを明らかにした。今後、この差違を決定する要因について検討する必要がある。



図3 *rsmG*変異およびS12変異の導入による本線菌 *Streptomyces antibioticus* のアクチノマイシン生産の活性化

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1件)

- ① 田中幸徳、小松 護、岡本 晋、徳山真治、梶 昭、池田治夫、越智幸三、**Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes**、Applied and environmental microbiology、査読有、Vol. 75、No. 14、2009、p.4919-4922

[学会発表] (計4件)

- ① 岡本 晋、Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2)、第4回 日本-フィンランド バイオテクノロジー シンポジウム、2008年10月2日、ガトーキングダムサッポロ (札幌市)
- ② 岡本 晋、*rsmG* mutations-novel links between streptomycin resistance and antibiotic overproduction-、UK-Japan Workshop 2008 Genomics of antibiotic producing actinomycetes、2008年10月31日、日本大学ホール (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晋 (OKSAMOTO SUSUMU)

食品総合研究所・食品バイオテクノロジー
研究領域・ユニット長

研究者番号：80353986

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：