

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657016

研究課題名（和文）好塩性アーキアが G+C 含量の異なるリボソーム RNA を使い分ける可能性の追究

研究課題名（英文）Diversity and transcription of 16S rRNA genes on the genome of halophilic archaea

研究代表者

木村 浩之（KIMURA HIROYUKI）

静岡大学・理学部・講師

研究者番号：30377717

研究成果の概要（和文）：好塩性アーキアは、ゲノム上にグアニン+シトシンの割合（G+C 含量）の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子を有する。一般的に、好熱菌や超好熱菌は高い G+C 含量の 16S rRNA を持つ。一方、中温菌は低い G+C 含量の 16S rRNA を有する。本研究課題では、好塩性アーキア菌株を 20℃から 60℃まで様々な温度条件下において培養し、好塩性アーキアの増殖速度と G+C 含量の異なる 16S rRNA 遺伝子の発現パターンを測定した。その結果、25-35℃では低い G+C 含量の 16S rRNA が多く発現し、40-50℃の高温では高い G+C 含量の 16S rRNA が多く発現する傾向が示された。

研究成果の概要（英文）：Halophilic archaea have a few types of 16S rRNA gene on their genome. The prokaryotes, which live in high temperature, commonly have high G+C content of 16S rRNA genes, whereas the prokaryotes, which live in normal or low temperature, have low G+C content of 16S rRNA genes. In this study, we determined the growth temperatures and transcription amount of 16S rRNA genes of the halophilic archaeal strains in several temperature conditions. The low G+C content of 16S rRNAs showed significant upregulation in 25-30℃. On the other hand, high G+C content of 16S rRNAs were expressed at significantly higher levels in high temperature condition, 40-50℃.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生態・環境

キーワード：微生物、生態、極限環境、好塩菌、アーキア、16S rRNA、G+C 含量、微生物分子温度計

## 1. 研究開始当初の背景

リボゾームは、細胞内にてタンパク質を合成する翻訳の場であり、大小2つのサブユニットが存在する。原核生物の小サブユニット・リボソームは、16S rRNA と 21 種類のタ

ンパク質から構成されている。全ての原核生物が有する 16S rRNA は、塩基配列の保存性が高く、進化系統の離れた生物種の比較も可能であることから、微生物の系統解析や系統樹の作成に用いられてきた。

一方において、微生物分類群の中にはゲノ

ム上に塩基配列の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子を有するものがあり、種同定に用いる際に混乱を生じさせている。原核生物のドメインであるアーキアにおいては、16S rRNA 遺伝子中の多様性としては 0.1%の分岐が見られるメタン生成アーキアもあれば、好塩性アーキアのように 0.1~6.8%の分岐を示すものも存在する。例えば、*Thermomonospora chromogena* および *Thermobispora bispora* といった好熱性アーキアがゲノム上に複数種の 16S rRNA 遺伝子を有することが知られている。さらに、好塩性アーキアである *Haloarcula* においても、ゲノム上に塩基配列の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*) が存在することが報告されている。

一方において、16S rRNA は細胞内にて二次構造を構成する。よって、翻訳を行うためにはこの二次構造を維持することが重要である。さらに、16S rRNA の二次構造が微生物の生育温度を決定する上で重要であると言われている。16S rRNA の塩基配列におけるグアニンとシトシンの割合 (G+C 含量) が高ければ高いほど熱耐性を有するリボソームであるといえ、実際に高温環境に生息する好熱菌や超好熱菌は高い G+C 含量 (56-69%) の 16S rRNA を有している。一方、中温菌や好冷菌は DNA 複製の際にエネルギー消費の少ない比較的低い G+C 含量 (52-58%) の 16S rRNA 遺伝子を有する。原核生物における 16S rRNA 遺伝子の G+C 含量はその生育温度とよい相関を示すことが報告されており、この特性に着目して微生物の生育温度を推定するための手法として、微生物分子温度計が考案された (Kimura *et al.*, 2013)。この手法を用いると、16S rRNA 遺伝子の G+C 含量から微生物の最低生育温度、至適生育温度、最高生育温度を推定することができる。これまで、微生物の生育温度は培養法により決定されてきたが、環境中には培養できない微生物群集が数多く存在する。微生物分子温度計は培養法に依存せず、16S rRNA 遺伝子の塩基配列より微生物の生育温度を算出する手法であるため、環境微生物の新たな知見を得る上で重要な手法と言える。

好塩性アーキアは、ゲノム上に高い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*) と低い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子 (*rrnBC*) を有することが報告されている。よって、環境の温度変化によって、高い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子と低い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子を使い分けている可能性が示唆される。さらに、好塩性アーキアの生息場所について考えてみると、主に砂漠の塩湖のような昼夜で温度差の激しいことが想像できる。一般的に砂漠のような極限環境は、昼間は 50°C 以上の気温に達し、逆に夜間には氷点下まで冷え込むと言われ

ている。このような温度差の激しい極限環境に生息する好塩性アーキアの生理生態学的メカニズムを解明することは、極限環境微生物を理解する上で非常に重要である。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、好塩性アーキアに分類される *Haloarcula* 属の菌株を幅広い温度で培養し、各温度条件下における増殖速度を正確に測定した。さらに、ゲノム上に存在する複数種の 16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*) の塩基配列を決定し、その G+C 含量を算出した。そして、微生物分子温度計を用いて各 16S rRNA 遺伝子の G+C 含量から最低生育温度、至適生育温度、最高生育温度を算出した。加えて、25-35°C の中温環境と 40-50°C の比較的高温の環境において、好塩性アーキア *Haloarcula* 属 5 菌株を培養し、塩基配列の異なる 16S rRNA 遺伝子の発現パターンを解析した。そして、環境温度によって *Haloarcula* は高い G+C 含量の 16S rRNA と低い G+C 含量の 16S rRNA を使い分ける、という仮説を検証した。

## 3. 研究の方法

### (1) *Haloarcula* 菌株

好塩性アーキアに属する *Haloarcula* 属の 5 菌株 *Haloarcula hispanica* JCM8911、*H. japonica* JCM7785、*H. marismortui* JCM8966、*H. argentinensis* JCM9737、*H. amylolytica* JCM13557 を Japan Collection of Microorganisms (JCM) より購入した。さらに、比較実験として *Escherichia coli* (大腸菌) を用いた。大腸菌は、Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit (Invitrogen) に含まれる One Shot TOP10 *E. coli* Cells (Invitrogen) を使用した。

### (2) 各温度条件下における増殖速度の測定

*Haloarcula* 属 5 菌株の培養には、Medium 169 (Casamino acid, 7.5 g; Yeast extract, 10.0 g; Trisodium citrate · 2H<sub>2</sub>O, 3.0 g; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 20.0 g; KCl, 2.0 g; NaCl, 250.0 g; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.05 g; MnSO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 0.2 mg; 蒸留水, 1L) を使用した。JCM より購入した好塩性アーキア 5 菌株を 37°C、180 rpm で 5 日間前培養した。その後、20°C から 60°C まで 5°C 間隔の温度条件にて液体培養を行った。培養中は、6 時間おきに吸光度測定 (660 nm) を行い、増殖したアーキアの細胞数を測定した。細胞数の算出には、0. D. = 1.0 あたり 8.0 × 10<sup>8</sup> cells/ml という細胞濃度変換係数を使用した。さらに、下記の式を用いて、各温度条件下での増殖速度定数を算出した。

増殖速度定数 (h<sup>-1</sup>) =

$$2.303 \cdot (\log_{10} X_2 - \log_{10} X_1) / (T_2 - T_1)$$

$T_2 - T_1$  は培養時間を、 $X_1$  は培養開始時の細胞濃度を、 $X_2$  は培養終了時の細胞濃度を表す。

### (3) 16S rRNA 遺伝子の解析

*Haloarcula* 属 5 菌株を 40°C で培養し、対数増殖期になった際に微生物細胞を回収した。その後、培養液を 6,800×g で 3 分間遠心分離し、菌体ペレットを採取した。菌体ペレットに PBS 溶液を加えよく攪拌し、60 μl の Lysozyme を加えた。15 分ごとに攪拌しながら 1 時間保温した。さらに、30 μl のプロテナーゼ K と 15 ml の SBS 溶液を加え、15 分ごとに攪拌しながら 37°C で 2 時間インキュベートした。次に、中性フェノール溶液を加えて攪拌し、12,000×g で 1 分間遠心分離した。その後、水層上澄み液を回収したのち、500 μl の PCI を各エッペンに加えた。よく攪拌してから 12,000×g で 1 分間遠心分離した。新しいエッペンに水層の上澄みを移し、500 μl の CIA を各エッペンに加えた。よく攪拌してから 12,000×g で 1 分間の遠心分離を行い、水層上澄み液を回収した。CIA を用いた処理は、計 2 回行った。その後、エタノール沈殿によりゲノム DNA を精製した。抽出したゲノム DNA は、アガロースゲル電気泳動により DNA サイズを確認した。さらに、可視光吸光度計を用いて、DNA 濃度を測定した。

次に、16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR を行った。PCR プライマーにはアーキアの 16S rRNA 遺伝子に特異的な 109aF (5' -AMD GCT CAG TAA CAC GT-3' ) および 915aR (5' -GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3' ) を使用した。PCR 後にアガロースゲル電気泳動を行い、PCR 産物のサイズを確認した。その後、核酸精製用スピニングカラム (MicroSpin Columns, GE Healthcare) を用いて PCR 産物の精製を行い、反応液中の PCR プライマーおよびプライマーダイマーを除去した。

次に、Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いて、PCR 産物をベクターに組み込んだ。さらに、ヒートショック法を用いてベクターを *E. coli* (大腸菌) に挿入した。その後、抗生物質 (ampicillin) を含む LB 寒天培地上に大腸菌を散布し、14 時間インキュベートした。大腸菌コロニーを回収し、クローン・ライブラリーを作成した。

次に、各大腸菌クローンを LB 液体培地にて培養し、プラスミド抽出を行った。抽出したプラスミドは、M13F プライマーを用いてシーケンスを行い、16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*) の塩基配列を決定した。BLAST プログラムを用いて、相同性検索を行い *Haloarcula* 属の 16S rRNA 遺伝子であることを確認した。さらに、各 16S rRNA 遺伝子の G+C 含量を算出した。

### (4) 最低生育温度、至適生育温度、最高生

### 育温度の推定

16S rRNA 遺伝子の G+C 含量から微生物の生育温度を推定する微生物分子温度計を用いて、*Haloarcula* 属 5 菌株の最低生育温度、至適生育温度、最高生育温度を算出した。各生育温度の算出には下記の計算式を用いた (Kimura *et al.*, 2013)。

$$\text{最低生育温度} = 4.38 \cdot P_{G+C} - 225.3$$

$$\text{至適生育温度} = 4.98 \cdot P_{G+C} - 241.6$$

$$\text{最高生育温度} = 4.89 \cdot P_{G+C} - 228.2$$

### (5) 16S rRNA の発現量解析

20°C から 55°C まで 5°C 間隔の温度条件下にて培養した *Haloarcula* 属 5 菌株を採取し、6,800×g で 3 分間遠心分離した。ペレット状になった菌体に RNA later (Ambion) を加え、-85°C のデープフリーザーにて冷凍保存した。Total RNA 抽出キット (mirVana miRNA Isolation kit, Ambion) を用いて、微生物菌体より total RNA を抽出した。バイオアナライザ 2100 (Agilent) を用いて、total RNA の濃度およびサイズを測定した。次に、SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen) および SuperScript Double Stranded cDNA Synthesis kit (Invitrogen) を用いて、total RNA より cDNA を合成した。

Total RNA より合成した cDNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした定量 PCR を行い、塩基配列の異なる 3 種類の 16S rRNA (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*) の発現量を測定した。定量 PCR では、*rrnA* に特異的なプライマー *rrnA*-1F (5' -CGT CCA GCG GAA ACT GTC CGG-3' ) および *rrnA*-1R (5' -CCG TCG GGT CCG TCT TCC TGA -3' )、*rrnC* および *rrnC* に特異的なプライマー *rrnBC*-1F (5' -GGC GTC CGG TGG AAA CTA CAC AG -3' ) および *rrnBC*-1R (5' -CAC TGT CGG GTC CGG TCT CTC AAC -3' ) をそれぞれ使用した。また、定量 PCR の標準試料として 16S rRNA 遺伝子解析で得られた *rrnA*, *rrnB*, *rrnC* を含むプラスミドをそれぞれ使用した。

## 4. 研究成果

### (1) 好塩性アーキアの生育温度

好塩性アーキア *Haloarcula* 属 5 菌株および *E. coli* (大腸菌) を 20°C から 60°C まで 5°C 間隔の温度条件下にて培養し、それぞれの増殖速度を算出した。その結果、*Haloarcula* 属 5 菌株については、25-35°C 付近および 40-50°C 付近にて増殖速度のピークがそれぞれ確認され、各温度での増殖速度定数のピークとなる至適生育温度が 2 つないし 3 つ存在することが示された。特に、*H. hispanica* では 35°C と 45°C にて (図 1 A)、*H. japonica* では 30°C と 40°C にて (図 1 B)、*H.*

*argentinensis* では 25°C、35°C、45°C にて (図 1 C)、*H. amylolytica* では 35°C と 50°C にて (図 1 D)、増殖速度定数のピークが見られた。一方、大腸菌では、40°C 付近で 1 つの増殖速度定数のピーク (至適生育温度) が示された。

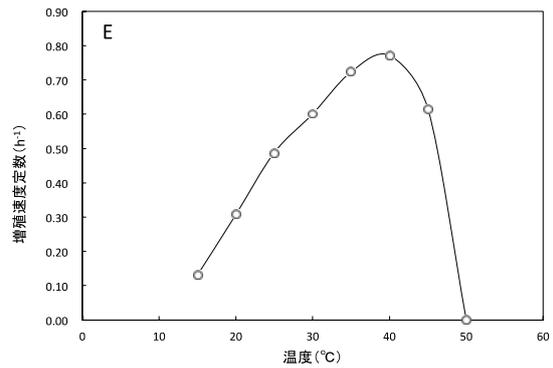
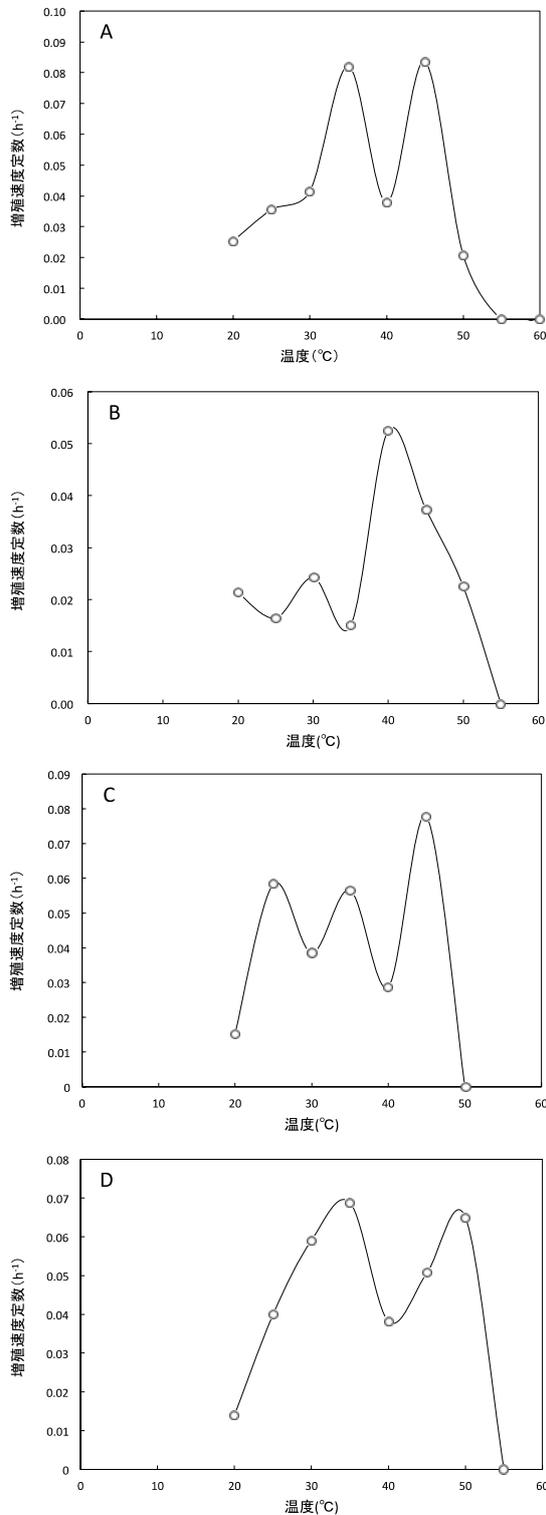


図 1. 好塩性アーキア・*Haloarcula* 属および大腸菌の各温度条件下での増殖速度定数 (h<sup>-1</sup>)。 (A) *H. hispanica*、 (B) *H. japonica*、 (C) *H. argentinensis*、 (D) *H. amylolytica*、 (E) *Escherichia coli*。

## (2) 16S rRNA 遺伝子の解析

*Haloarcula* 属 5 菌株に由来する DNA 抽出液から 109aF/915aR プライマーを用いた PCR により、約 800 bp の PCR 産物が得られた。さらに、プラスミドに特異的な M13F プライマーおよび M13R プライマーを用いたシーケンスにより、16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*) の塩基配列を決定した。

これらの塩基配列は、遺伝子相同性検索プログラム (Blast) を用いて、相同性検索が行われた。その結果、いずれの 16S rRNA 遺伝子も DNA データベースにある既存の塩基配列とほぼ一致する結果となった。

## (3) 最低、至適、最高生育温度の推定

*Haloarcula* 属 5 菌株の 16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*, *rrnB*, *rrnC*) の塩基配列より G+C 含量を算出し、G+C 含量をもとに最低生育温度、至適生育温度、最高生育温度を算出する計算式を用いて、好塩性アーキアの 3 種類の生育温度を推定した。

その結果、*rrnA* の 16S rRNA 遺伝子はいずれも高い G+C 含量を示した (57.2–58.9%)。一方、*rrnB* および *rrnC* の 16S rRNA 遺伝子は、いずれも低い G+C 含量を示した (56.4–56.7%)。*rrnA* と *rrnBC* の G+C 含量をもとに算出された至適生育温度は、*H. hispanica* ではそれぞれ 51.6°C と 40.0°C、*H. japonica* では 50.2°C と 40.0°C、*H. marismortui* では 50.6°C と 39.4°C、*H. amylolytica* では 49.0°C と 39.8°C、*H. argentinensis* では 43.5°C と 39.5°C と推定された (表 1)。*rrnA* と *rrnBC* の G+C 含量から算出されたこれらの至適生育温度は、10°C 以上の差があることが示された。この値は、培養法により明らかにした至適生育温度 (2 ないし 3 個のピークを示した) と概ね一致する結果となった。

表 1. 16S rRNA 遺伝子の G+C 含量をもとにした生育温度の推定

Strain	16S rRNA		生育温度		
	遺伝子	G+C含量 (%)	最低 (°C)	至適 (°C)	最高 (°C)
<i>H. hispanica</i>	<i>rrnA</i>	58.9	32.6	51.6	59.7
	<i>rrnB</i>	56.6	22.4	40.0	48.3
<i>H. japonica</i>	<i>rrnA</i>	58.6	31.3	50.2	58.3
	<i>rrnBC</i>	56.5	22.3	40.0	48.3
<i>H. marismortui</i>	<i>rrnA</i>	58.7	31.7	50.6	58.7
	<i>rrnB</i>	56.7	23.2	40.9	49.2
	<i>rrnC</i>	56.4	21.8	39.4	47.7
<i>H. amylolytica</i>	<i>rrnA</i>	58.4	30.3	49.0	57.2
	<i>rrnBC</i>	56.5	22.2	39.8	48.1
<i>H. argentinensis</i>	<i>rrnA</i>	57.2	25.4	43.5	51.7
	<i>rrnB</i>	56.5	22.0	39.5	47.8

#### (4) 16S rRNA の発現量解析

20°Cから60°Cまで5°C間隔の温度条件下で培養した *Haloarcula* 属 5 菌株から total RNA を抽出した。その後、バイオアナライザ 2100 にて RNA 電気泳動を行った結果、十分な量の total RNA が抽出されていることを確認した。その後、total RNA から cDNA を合成した。さらに、cDNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子 *rrnA* および *rrnBC* をターゲットとした定量 PCR を行った。その結果、高い G+C 含量を示す *rrnA* は、40–50°C の比較的高温での培養において有意に高く発現していることが示唆された。一方、低い G+C 含量の *rrnBC* は、25–35°C の中温での培養において有意に高く発現していることが示された。このことにより、好塩性アーキア *Haloarcula* 属は、ゲノム上の G+C 含量の異なる複数種の 16S rRNA 遺伝子を環境温度にあわせて使い分けていることが示された。

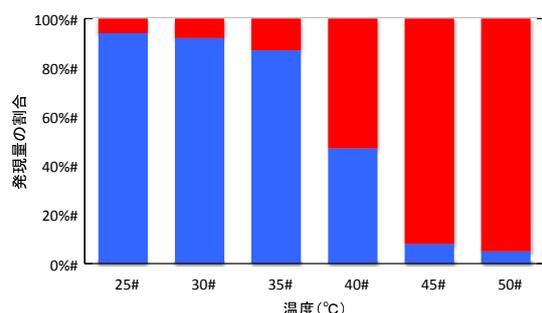


図 2. 各培養温度での 16S rRNA の発現量。(赤) 高い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子 (*rrnA*) の発現量、(青) 低い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子の発現量 (*rrnBC*)。

#### (5) まとめ

好塩性アーキアに分類される *Haloarcula* 属は、ゲノム上に 2–3 個の G+C 含量の異なる 16S rRNA 遺伝子を有する。本研究では、

*Haloarcula* 属 5 菌株の 16S rRNA 遺伝子のシーケンスを決定した。その結果、16S rRNA 遺伝子の塩基配列は G+C 含量に差が見られ、高い G+C 含量のもので 57.2–58.9%、低い G+C 含量のもので 56.4–56.6% であった。また、16S rRNA 遺伝子の G+C 含量をもとに菌株の至適生育温度を算出した結果、高い G+C 含量の 16S rRNA 遺伝子をもとに 43.5–51.6°C、低い G+C 含量の 16S rRNA をもとに 39.5–40.9°C の至適生育温度が算出された。さらに、20–60°C まで 5°C 間隔で微生物菌体を培養し、各温度条件下での増殖速度定数を測定した。その結果、増殖速度は 2 つなし 3 つのピークが示された。さらに、定量 RT-PCR 解析より、25–35°C 付近での中温培養では低い G+C 含量の 16S rRNA (*rrnB* および *rrnC*) が多く発現し、40–50°C 付近の比較的高温での培養では高い G+C 含量の 16S rRNA (*rrnA*) が多く発現する傾向が示された。以上の結果より、好塩性アーキアは環境温度によって複数種の 16S rRNA を使い分けている可能性が示唆された。

本研究結果は、第 14 回静岡ライフサイエンスシンポジウムにて発表され、優秀ポスター賞を受賞した。さらに、国際学術雑誌に投稿すべく準備を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

- (1) Hiroyuki Kimura, Kousuke Mori, Toshiro Yamanaka, Jun-Ichiro Ishibashi, Growth temperatures of archaeal communities can be estimated from the guanine-plus-cytosine contents of 16S rRNA gene fragments, *Environmental Microbiology Reports*, 査読有、Vol. 5、Issue 3、2013、pp. 468–474、DOI:10.1111/1758-2229.12035
- (2) Shohei Hattori, Hiroaki Nashimoto, Hiroyuki Kimura, Keisuke Koba, Keita Yamada, Mikio Shimizu, Hiroshi Watanabe, Muneoki Yoh, Naohiro Yoshida, Hydrogen and carbon isotope fractionation by thermophilic hydrogenotrophic methanogens from a deep aquifer under coculture with fermenters, *Geochemical Journal*, 査読有、Vol. 46, No. 3、2012、pp. 193–200、<http://www.terrapub.co.jp/journals/GJ/abstract/4603/46030193.html>
- (3) Koji Mori, Takao Iino, Jun-Ichiro Ishibashi, Hiroyuki Kimura, Ken-Ichiro Suzuki, *Meiothermus hypogaeus* sp. nov., a novel moderately thermophilic bacterium isolated from a Japanese hot spring, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 査読有、Vol. 62, No. 1、

- 2012、pp.112-117、  
DOI: 10.1099/ijs.0.028654-0
- (4) 木村浩之、微生物分子温度計による地下圏の温度プロファイリング、月刊地球、査読無、34巻、2012、pp.201-206
- (5) Hiroyuki Kimura, Robert Young, Asuncion Martinez, Edward F. DeLong, Light-induced transcriptional responses associated with proteorhodopsin-enhanced growth in a marine flavobacterium, The ISME Journal、査読有、Vol.5、No.10、2011、pp.1641-1651、  
DOI:10.1038/ismej.2011.36

〔学会発表〕(計5件)

- (1) 佐藤 悠、木村浩之、好塩性古細菌 *Haloarcula* の多様な 16S rRNA 遺伝子と生育温度、第14回静岡ライフサイエンスシンポジウム、2013年03月16日、静岡大学大会館(静岡市)
- (2) 木村浩之、プロテオロドプシンを有する海洋細菌の光エネルギー利用と代謝メカニズム、日本地球惑星科学連合2012年大会、2012年05月20日、幕張メッセ国際会議場(千葉市)
- (3) 木村浩之、次世代シーケンサーによる small RNA の解析と水圏複合微生物系への展開、日本農芸化学会2012年度京都大会、2012年3月25日、京都女子大学(京都市)
- (4) 木村浩之、Young C、Martinez A、DeLong EF、プロテオロドプシンを有する海洋細菌の網羅的遺伝子応答解析、第27回日本微生物生態学会、2011年10月8日、京都大学農学部(京都市)
- (5) 木村浩之、道林克禎、微生物分子温度計：地下圏の温度プロファイリング、日本鉱物科学会2011年年会、2011年9月9日、茨城大学理学部(茨城県水戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~shkimur/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 浩之 (KIMURA HIROYUKI)  
静岡大学・理学部・講師  
研究者番号：30377717

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし