

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651231

研究課題名(和文) rRNAの置換変異によるリボソーム可塑性の研究

研究課題名(英文) Study on the mutational robustness of the ribosome through interspecies exchange of rRNA genes

研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki, Kentaro)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：60344123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームは3つのrRNAと55の蛋白質から構成される精密な超分子複合体で、構成成分の変異や不和合は細胞死を招く。そのため、リボソームの各成分、とくに中心骨格を形成するrRNAは超保守的であり、16S rRNAは生物種固有の分子として、微生物の進化系統解析にも用いられてきた。これに対し我々は、大腸菌rrnオペロンの完全欠損株(7株)を用い、異種生物由来16S rRNA、23S rRNAによる生育相補試験を行った結果、大腸菌遺伝子との配列相同性が80%程度しか有さないものでも機能相補することを見出した。このことは従来考えられていたリボソームの保守性という既成概念を覆すものである。

研究成果の概要(英文)：Because of structural and mechanistic complexity of the ribosome, it is generally believed that rRNAs coevolve with their partner ribosomal proteins. Thus, horizontal transfer should seldom occur for 16S (or 23S) rRNA genes to maintain the structural integrity of the ribosome. Despite this general thought, however, in this study, we have shown that growth of *Escherichia coli* prrn-Delta7, a null mutant of rrn operons, was successfully complemented with exogenous 16S (or 23S) rRNA genes from diverse lineages of bacteria that showed only ~80% identities with those of *E. coli*. Thus ribosome is unexpectedly robust enough to accommodate large mutations or horizontal gene transfer.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：リボソーム rRNA 16S rRNA 23S rRNA 変異耐性

1. 研究開始当初の背景

リボソームは大小二つのサブユニットからなる超分子複合体であり、中心骨格は rRNA が形成している。我々は、リボソームの機能及び構造的な可塑性について研究すべく、30S サブユニットの骨格を形成する 16S rRNA の遺伝子変異を行った。より具体的には、大腸菌染色体上の 7 つ全ての 16S rRNA 遺伝子を欠いた完全欠損株 ($\Delta 7$ 株、rrnB オペロン発現プラスミドで生育を相補) を宿主に、各種微生物ゲノムから 16S rRNA 遺伝子を単離し、異種生物由来 16S rRNA による $\Delta 7$ 株の生育相補性試験を行った。その結果、微生物系統分類上の綱 (Class) を超え、大腸菌の 16S rRNA とは 80% 程度の相同性しかもたない 16S rRNA が生育を相補できることを発見し、リボソームの意外な可塑性を浮き彫りにした。

2. 研究の目的

本研究では、リボソームの機能及び構造的な可塑性を明らかにすることを目的に、その構造的な中核である 16S rRNA 及び 23S rRNA の置換変異実験を行う。生育相補性によりリボソームの機能を評価し、変異点の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

大腸菌 16S rRNA 遺伝子の完全欠損株の生育を相補しうる 16S rRNA 遺伝子を、環境 DNA (メタゲノム) をソースとして徹底探索する。次に生育を相補する 16S rRNA 遺伝子を DNA シャッフリングにより掛け合わせ、非天然型の 16S rRNA を創出する。さらに、それらを用いた生育相補性のスクリーニングを行う。同様の手法を 50S サブユニットの骨格を形成する 23S rRNA にも展開する。課題別にまとめると以下ようになる。各課題で得られた 16S rRNA, 23S rRNA の変異部位・パターンを既知の変異情報などと比較するとともに、進化系統的な特徴などと合わせて体系化する。

4. 研究成果

土壌や温泉など、各種環境試料より定法に従い環境ゲノムを調製し、16S rRNA を PCR 増幅した。得られた断片を In-Fusion クローニング法により 16S rRNA の発現ベクターに組み込み、 $\Delta 7$ 株を形質転換した。ショ糖によるカウンターセレクトの有無により機能相補率を判定した結果、数千規模の相補株を取得した。とくに、生育の遅い変異株 (小さなコロニーを形成する変異株) に着目してスクリーニングしたところ、大腸菌 16S rRNA 遺伝子との配列相同性が 80% 前後のものを数多く分離することに成功した。これは、リボソームの可塑性に対する既存概念を覆す結果である。なお、16S rRNA の機能スクリーニングを行う上で、遺伝子操作上の問題となっていたベクターの改良 (薬剤耐性遺伝子の交換) やも行い、スクリーニング規模の拡大が容易にできるようになった。

上記方法により得られた変異株の 16S rRNA について、さらに配列、二次構造、立体構造の点で詳細に解析した。その結果、基本的には塩基置換は二次構造内に発生し、置換を相補するように追号する塩基も変化していることがわかった。つまり、二次構造を維持するという制約の中で配列が変化していることが判明した。ただし例外として、リボソームタンパク質と接触しない溶媒露出部位においては、配列上の挿入、欠失を伴う大きな配列変化とともに、二次構造においても変化していることがわかった。

天然の 16S rRNA に多くの機能相補性なものを見出したが、これらの幾つかを DNA シャッフリングの手法を用いてランダムに組み替えることも行った。この結果、多くのシャッフリング産物で機能相補しうるものが見出された。

23S rRNA については 16S rRNA と異なり、遺伝子両端の配列が全細菌を通じて必ずしも保存されていない。そこで系統群ごとに既知 23S rRNA をデータベースより網羅的に取得し、同一のプライマーセットで増幅しうるものを分類し、群特異的な遺伝子増幅と機能相補実験を行った。スクリーニング手法は、16S rRNA の置換変異実験に倣い行った。その結果、16S rRNA と同様に、大腸菌とは系統的に近いものから遠いものまで、幅広い系統群から機能相補性の遺伝子が獲得された。最も系統的に遠いものについては 82% 程度の相同性しか示さないものも含まれた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Nakashima N, Miyazaki K (2014) Bacterial cellular engineering by genome editing and gene silencing. *Int J Mol Sci* 15, 2773-2793 (査読有)
2. Kitahara K, Miyazaki K (2013) Revisiting bacterial phylogeny: Natural and experimental evidence for horizontal gene transfer of 16S rRNA. *Mob Genet Elements* 3, e24210 (査読有)
3. Uchiyama T, Miyazaki K (2013) Metagenomic screening for aromatic compound-responsive transcriptional regulators. *PLOS ONE*, 8, e75795 (査読有)
4. Uchiyama T, Miyazaki K, Yaoi K (2013) Characterization of a novel β -glucosidase from a compost microbial metagenome with strong transglycosylation activity. *J Biol Chem*, 288, 18325-18334 (査読有)
5. Verma D, Kawarabayasi Y, Miyazaki K, Satyanarayana T (2013) Cloning, expression and characteristics of a novel alkalistable and thermostable xylanase encoding gene (mxy1)

retrieved from compost-soil metagenome, PLOS ONE, 8, e52459 (査読有)

6. Tsukuda M, Miyazaki K (2013) Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in *Escherichia coli*. J Biosci Bioeng, 116, 540-545 (査読有)
7. Tsukuda M, Miyazaki K (2013) DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. J Biosci Bioeng, 116, 644-646 (査読有)
8. Engel K, Ashby D, Brady SF, Cowan DA, Doemer J, Edwards EA, Fiebig K, Martens EC, McCormac D, Mead DA, Miyazaki K, Moreno-Hagelsieb G, O' Gara F, Reid A, Rose DR, Simonet P, Sjöling S, Smalla K, Streit WR, Tedman-Jones J, Valla S, Wellington EMH, Wu C-C, Liles MR, Neufeld JD, Sessitsch A, Charles TC (2013) Meeting Report: 1st International Functional Metagenomics Workshop May 7-8, 2012, St. Jacobs, Ontario, Canada. Stand Genomic Sci, 8, 106-111 (査読無)
9. Kitahara K, Yasutake Y, Miyazaki K (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 109, 19220-19225 (査読有)
10. 佃 美雪, 佐藤 允治, 宮崎 健太郎 (2014) 16S rRNAの「水平伝播」—異種16S rRNAによる遺伝的相補一, 化学と生物, 52-2, 70-72 (査読無)
11. 宮崎 健太郎 (2012) リボソームに翻訳以外の機能を発見, 産総研TODAY, 12, 20-20 (査読無)

[学会発表] (計 19 件)

1. 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 日本農芸化学会大会 2014, 神奈川県, 2014/03/29
2. 末永 光, 水田 志織, 宮崎 健太郎, 矢追 克郎, メタゲノム手法は培養法を凌駕するのか: 遺伝子資源取得に際しての手法間の比較, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 神奈川県, 2014/03/28
3. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎, 腸内細菌目の 16S rRNA の網状進化, 第 8 回 日本ゲノム微生物学会年会, 東京都, 2014/03/07
4. 宮崎 健太郎, Functional metagenomics and *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, Kasetsart university Seminar, Bangkok, Thailand, 2014/02/21
5. 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme

discovery, AMBC2014, Bangkok, Thailand, 2014/02/20

6. 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 産業微生物の力を深化させる日本の技~育種の最前線~ 我が国独自の起点・技術から, 東京都, 2013/12/17
7. 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎, アンチセンス RNA を用いた新規カウンターセクション技術の開発, 細胞を創る研究会 6.0, 山形県, 2013/11/14
8. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, 細胞を創る研究会 6.0, 山形県, 2013/11/14
9. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, CBI 学会 2013 年大会, 東京都, 2013/10/28
10. 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, Enzyme Engineering XXII Conference, 富山県, 2013/09/24
11. 宮崎 健太郎, リボソーム工学に基づく大腸菌の宿主機能改変, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島県, 2013/09/19
12. 宮崎 健太郎, *Escherichia coli* host engineering for efficient enzyme discovery, 2013 SIMB Annual Meeting, San Diego, USA, 2013/08/12
13. 北原 圭, 宮崎 健太郎, 大腸菌への遺伝子水平伝播実験により示された 16S rRNA の種間和合性, 第 10 回 21 世紀大腸菌研究会, 静岡県, 2013/06/20
14. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎, 系統ネットワーク法で見る腸内細菌目 16S rRNA の網状進化, 第 2 回リボソームミーティング, 東京都, 2013/03/26
15. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 16S rRNA 置換変異による大腸菌宿主改良, 第 2 回リボソームミーティング, 東京都, 2013/03/26
16. 佃 美雪, 宮崎 健太郎, 16S rRNA の置換変異による大腸菌宿主デザイン, 「細胞を創る」研究会 5.0, 神奈川県, 2012/11/21
17. 宮崎 健太郎, メタゲノムからの有用遺伝子探索, 次世代シーケンス東京セミナー・メタゲノムセミナー, 東京都, 2012/10/25
18. 北原 圭, 宮崎 健太郎, 16S リボソーム RNA のヘリックス 41 はリボヌクレアーゼ I の特異的インヒビターである, 第 9 回 21 世紀大腸菌研究会, 滋賀県, 2012/06/21
19. 宮崎 健太郎, Functional screening strategy, International Functional Metagenomics Workshop, Waterloo, Canada, 2012/05/07

[図書] (計 5 件)

1. Suenaga H, Miyazaki K (2014) Encyclopedia of Metagenomics, extradiol dioxygenases retrieved from the metagenome, Springer
2. 宮崎 健太郎 (2013) 進化分子工学の最前線, 生物種を超えた 16S rRNA 遺伝子の機能相補性の解明, pp. 223-229, NTS
3. 宮崎 健太郎 (2012) 生体の科学, リボソームに翻訳以外の機能があるーリボスクレアーゼ作用阻害, pp. 356-357, 医学書院
4. 宮崎 健太郎 (2012) 生命システム工学, 遺伝子資源の多様化, pp. 18-27, 化学同人
5. 宮崎 健太郎 (2012) 生命システム工学, 進化分子工学の事始, pp. 3-17, 化学同人

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称: 新規なカウンターセレクション法
発明者: 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2013-226229
出願年月日: H25/10/31
国内外の別: 国内

名称: 翻訳特性の改変された大腸菌
発明者: 宮崎 健太郎, 佃 美雪
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2012-102128
出願年月日: H24/04/27
国内外の別: 国内

名称: 翻訳特性の改変された大腸菌
発明者: 宮崎 健太郎, 佃 美雪
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 61/611827
出願年月日: H24/03/16
国内外の別: 国外 (米国)

○取得状況 (計 1 件)

名称: 酵素遺伝子スクリーニング法
発明者: 内山拓, 宮崎 健太郎
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特 5397666
取得年月日: 2013/11/01
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

1. <https://staff.aist.go.jp/miyazaki-kentaro/group/index.html>
2. <https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-s>

ynthe/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki Kentaro)
産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長
研究者番号: 60344123