

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830132

研究課題名(和文) 16S rRNA遺伝子の異種間水平伝播の可能性を探究する

研究課題名(英文) Investigating horizontal transferability of 16S ribosomal RNA gene

研究代表者

北原 圭 (Kitahara, Kei)

大阪大学・情報科学研究科・研究員

研究者番号：30567855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：原核生物では遺伝子の水平伝播が一般的であるため、その分子分類は16S rRNA遺伝子の塩基配列の相同性を基準に行われることが多い。この手法の理論的大前提には「16S rRNA遺伝子は異種間水平伝播が困難である」という仮定(complexity仮説)が存在する。本研究は分子進化におけるcomplexity仮説という、一見確立されたモデルを批判的に検証することを目的としている。そのために大腸菌をモデルとして、メタゲノム由来16S rRNA遺伝子を実験的に水平伝播させる実験を実施した。

研究成果の概要(英文)：In general, many prokaryotic genes are amenable to be transferred between different species. Hence, phylogeny of prokaryotic species has been reduced by comparing each species' 16S rRNA sequence. The rationale for this is based on an assumption that the 16S rRNA gene is least unlikely to be transferred between species. This assumption called "complexity hypothesis" was experimentally tested in this study, by introducing 16S rRNA genes from metagenome into Escherichia coli.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：16S rRNA メタゲノム 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

原核生物では遺伝子の水平伝播が一般的であるため、その分子分類は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性を基準に行われることが多い。この手法の理論的大前提には「16S rRNA 遺伝子は異種間水平伝播が困難である」という仮定が存在する。J. Lake は有名な「complexity 仮説」において、rRNA は多くのリボソーム蛋白質や tRNA、種々の翻訳因子などと複雑に相互作用しているため、異種生物由来の rRNA 遺伝子が水平伝播したとしても複合体として機能せず、進化的にも排除されるというモデルを提唱している (Jain et al. PNAS 1999)。

しかし、研究代表者らは大腸菌 rRNA 遺伝子の蛋白質結合部位の塩基配列を完全にランダム化したところ、細菌・古細菌・真核生物全ての型の塩基配列が大腸菌内で機能配列として選択されることを示すことができた。 (Kitahara et al. Nucleic Acids Res 2007)。さらに研究代表者らは、大腸菌内でラルストニア菌の 16S rRNA 遺伝子(大腸菌のものとの相同性 80.2%・図 1)を発現させ、機能可能なことを証明した (Kitahara et al. Nature Commun, 2011)。

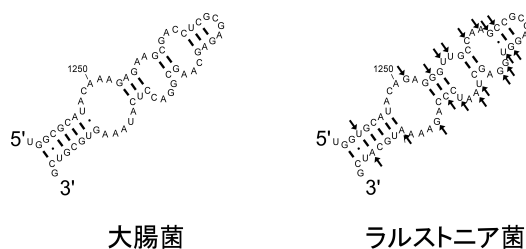


図 1. 大腸菌で機能可能な異種由来 16S rRNA の例. ラルストニア菌 16S rRNA(1240-1297 位)の二次構造(右)を大腸菌の対応部位の二次構造(左)と比較し、異なる塩基を矢印で示した。

これらの結果は、リボソーム内部での分子間相互作用(complexity)の存在は 16S

rRNA 遺伝子の水平伝播を阻害する要因にはならないことを強く示唆している。そこで本研究では、遺伝的バックグラウンドが明らかな大腸菌を recipient とし、環境試料より抽出した環境 DNA (メタゲノム) 由来の多様な 16S rRNA 遺伝子を水平伝播させることにより、本遺伝子の水平伝播能を網羅的に明らかにする実験を計画した。

2. 研究の目的

本研究の予備実験の結果(a)-(b)からは、complexity 仮説と矛盾する結果が得られていた。

(a) 相同性が 80% 台の 16S rRNA 遺伝子でも大腸菌に正常に (増殖速度を全くあるいはほとんど悪化させずに) 伝播可能であることを示した。

(b) 上記遺伝子配列では少なくとも 100 塩基以上の蛋白質結合部位が大腸菌のものと比較して異なっていることが判明した。complexity 仮説と明らかに矛盾!

これらの結果を前提として、complexity 仮説を批判的に再検証するための研究(c)-(e)を行う。

(c) 水平伝播モデル実験: 大腸菌で機能できるメタゲノム由来 16S rRNA 遺伝子の分子系統樹を作成し、門・綱・目いずれの分類群レベルの相同性があれば水平伝播可能か明らかにする。

(d) RNA 構造の解析: 得られた 16S rRNA の二次構造マップを比較することにより、RNA のドメイン構造やヘリックス長多形などの構造的特徴に共通点が出てくるかどうか解析する。また、それらの要素が本遺伝子の水平伝播の阻害要因になるかどうか検討する。

(e) 形質変化の解析: 水平伝播による gain of function がどの程度の頻度で起こるのか定量的に明らかにする(薬剤耐性を指標とする)。

3. 研究の方法

本研究は分子進化における complexity 仮説という、一見確立されたモデルを批判的に検証することを目的としている。そのために大腸菌をモデルとして、メタゲノム由来 16S rRNA 遺伝子を実験的に水平伝播させる実験を計画した。本研究では、rRNA 遺伝子の改変用に研究代表者らが6年間かけて改良を重ねてきた大腸菌株 KT101 (Kitahara et al. Mol Cell 2009) を用いた。ゲノム上の rRNA オペロンを全て欠失させた本株によるセレクションは実験系が極めてシンプルであるためアーティファクトがほとんど無く、信頼性が極めて高いのが特徴である。

4. 研究成果

(c) 水平伝播モデル実験: 環境試料から直接抽出したメタゲノムサンプルを鋳型とし、PCR で増幅した 16S rRNA 遺伝子を in-fusion ligation 法で発現ベクター上の相同領域と置換した(図2)。

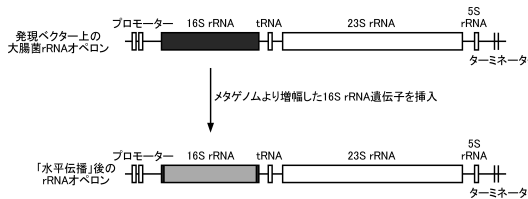


図2. メタゲノム由来 16S rRNA 遺伝子の発現コンストラクト. 大腸菌 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長(99.5%)を他細菌由来のものに置換し、KT101 株で機能できるかどうか確認する。

この過程は、異種由来 16S rRNA 遺伝子が大腸菌に偶然取り込まれ、相同組み換えを起こ

した状態をプラスミド上で模倣している。異種 16S rRNA 遺伝子のみで生育可能な KT101 株を選択(Kitahara et al. Nature Commun, 2011)し、プラスミド上の 16S rRNA 遺伝子をシーケンスし大腸菌に水平伝播可能な 16S rRNA 遺伝子のリストを作成した。得られた遺伝子配列は 16S rRNA 遺伝子の配列解析用のユニバーサルプライマー 4 種類を用いて全長配列を決定した。配列のアッセンブル後、マルチプルアライメントを行うとともに分子系統樹を作成した。

(d) RNA 構造の解析: 得られた RNA の二次構造を mFOLD 等の解析ソフトを用いて予測した後、大腸菌 16S rRNA の二次構造マップに手動にて superimpose する作業を行った。蛋白質結合塩基一覧は、リボソームの結晶構造(Wimberly et al. Nature 2005)を元に分子間コンタクトマップを作成したものと本研究で得られた配列を照らし合わせるにより変異し得る蛋白質結合塩基のリストを作成した。

(e) 形質変化の解析: まず、KT101 株の増殖曲線を測定することで、水平伝播後のフェノタイプの変化を調べた。研究代表者らは可視光プレートリーダーを用いて大腸菌の倍加時間を秒単位の正確性で測定するプロトコルを開発しており(Kitahara et al. Nucleic Acids Res 2007)、異種由来 16S rRNA 遺伝子の中立性を正確に評価した。続いて、薬剤耐性の「gain of function」が起こるかどうか調べるために、16S rRNA を標的とする抗生物質への感受性の変化を測定した。

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)

[学会発表](計 2件)

北原圭、佐藤さとみネウザ、鈴木勉「バクテリアリボソームRNAの最小機能構造の探求」第10回21世紀大腸菌研究会(2015年3月6-8日、神戸大学神大会館)口頭発表

北原圭、安武義晃、宮崎健太郎「メタゲノム水平伝播実験により示された16S rRNAの種間互換性」第10回21世紀大腸菌研究会(2013年5月20-21日、ラフォーレ修善寺)ポスター発表

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北原 圭 (Kei Kitahara)

研究者番号：30567855