

平成 29 年 5 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292048

研究課題名(和文)大腸菌リボソームの可塑性と表現型進化の機構解明

研究課題名(英文)Functional plasticity in *E. coli* ribosome

研究代表者

宮崎 健太郎 (Miyazaki, Kentaro)

国立研究開発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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌 *rrn* オペロン完全欠損株 7 を宿主とした異種 16S rRNA の機能相補株として、大腸菌とは門レベルで異なる Acidobacteria、Firmicutes、Bacteroidetes 門に帰属される 16S rRNA を見出した。大腸菌とは進化系統的に非常に乖離した 16S rRNA が機能的であることは、16S rRNA 遺伝子の進化中立性をさらに補強する成果である。また、系統の異なる生物種間で組換わったと思われるキメラも見出された。以上の結果は、16S rRNA が系統を超えて遺伝子組み換えにより進化することを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：Using *E. coli* null mutant of *run* operons, we have succeeded in obtaining functional 16S rRNA genes from various bacteria, including those from Acidobacteria, Firmicutes, and Bacteroidetes phylum, that are distantly related to *E. coli*. The unexpected functional plasticity in the *E. coli* ribosome suggest that the 16S rRNA genes have evolved by accumulating lineage-specific functionally nearly neutral evolution.

研究分野：応用微生物学

キーワード：リボソーム 16S rRNA 中立進化 キメラ遺伝子 機能相補

## 1. 研究開始当初の背景

原核細胞内では転写と翻訳は同時に進行する。DNAの遺伝情報がmRNAに転写されるや否や、その終結を待つ間もなくリボソームが結合し、翻訳が開始される。このように転写と翻訳が共役しているため、リボソームは翻訳を司るばかりでなく転写調節にも関わり、転写の変動は細胞内の代謝システム全般へと及び (Qu et al., Nature, 2011)。リボソームは翻訳装置であるとともに、細胞システムの総司令塔的な役割も担っていると言える。進化の過程で、生物は自らの設計図 (ゲノム) を効率的に運用すべく、最適なりボソームを育ててきたと考えられる。

リボソームは3つのRNAと57の蛋白質から構成され、極めて精巧で複雑な立体構造をとる。さらに、rRNAの転写後修飾 (塩基修飾やプロセッシング) や各成分の協働的なフォールディング等、その成熟過程も極めて複雑である (Kitahara & Suzuki, Mol Cell, 2009)。それ故、リボソームは進化的に極めて保守的で、各成分が協調進化してきたと考えられてきた。実際、リボソーム30Sサブユニットに含まれる16S rRNAは垂直伝播によってのみ伝わるとされ、微生物系統分類の指標として広く使われてきた (Woese, Microbiol Rev, 1987)。16S rRNAが異種間で水平伝播しないことは、リボソームの構造・機能・進化に鑑み自明とされてきた (Jain et al., PNAS, 1999)。

これに対し我々は、大腸菌rrnオペロン欠損株を用いた遺伝学的な機能相補実験により、大腸菌16S rRNAの遺伝子欠損を異種生物のもので相補するという、従来の常識を覆す発見をした。これにより、リボソームの構造的・機能的・進化的な可塑性を明らかにするとともに、16S rRNA遺伝子の水平伝播の可能性、16S rRNA遺伝子配列に基づく進化系統解析の脆弱性を指摘した (Kitahara & Miyazaki, Nature Commun, 2011; Kitahara et al., PNAS, 2012; Kitahara & Miyazaki, Mob Genet Elements, 2013)。さらに我々は、16S rRNAを置換された変異株において劇的な表現型の変化が現れること (増殖速度の向上や高温適応等) を見出した。

## 2. 研究の目的

現存する生物種がどのような選択圧のもと今日まで進化してきたのかを明らかにすることは、分子進化学の中心課題であるが、その実験的な再現・検証は極めて難しい。進化の原動力である塩基配列の変化は確率的な発散過程であり、遺伝型の固定や種の誕生は、選択圧や棲み分け、偶然の結果によると考えられている。しかし、これらは進化論に基づく推定でしかなく、その瞬間を直接観察する試みはなされていない。つまり、進化を通じて蓄積してき

た遺伝的变化が生物にどのような影響を与えたか、逆に生物はどのように遺伝的变化を選択してきたか等、遺伝子型-表現型の相関が、精密かつ具体的に対応付けられて論じられることはなかった。

本研究では、16S rRNAの置換変異により観察された細胞表現型の劇的な変化という我々独自の知見に基づき、翻訳系の改変が駆動する生物の適応進化過程を実験室内で再現し、その機構解明を行う。

## 3. 研究の方法

本研究は、様々な16S rRNA遺伝子の創成、大腸菌欠損株への組み込み、表現型評価、実験室進化、オミックス解析から構成される。具体的には、16S rRNA遺伝子の創成は、(1) バイオインフォマティクスに基づく祖先型16S rRNAの推定、(2) DNAシャッフリングによるミッシングリンク型16S rRNAの復元、(3) 環境ゲノムの利用により行う。次に、我々が開発した16S rRNA遺伝子置換変異法により大腸菌16S rRNAを各16S rRNAと交換し、変異株の表現型 (増殖速度や温度適応) を評価する。次に、実験室進化により16S rRNAの遺伝子変異を促し、適応株を選抜する。進化前後の16S rRNA配列、蛋白質合成活性、表現型、細胞システム (トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム) を関連付け、翻訳システムの進化がもたらす生物の適応進化の分子機構を解明する。

## 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、7株を形質転換した。引き続き、生育相補性に基づく選択を行い、数千クローン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) に着目して遺伝子解析を行なったところ、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。なお、16S rRNAの機能スクリーニングを行う上で問題となっていた点 (ベクター上の不要領域の除去、薬剤耐性遺伝子の交換、16S rRNA遺伝子増幅用のPCRプライマーの再設計) も解決し (Miyazaki et al., 2017)、スクリーニング規模の拡大やアーティファクトの低減につながった。

大腸菌rrnオペロン完全欠損株7を宿主とした異種16S rRNAの機能相補株として、大腸菌とは門レベルで異なるAcidobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes門に帰属される16S rRNAを見出した。大腸菌とは進化系統的に非常に乖離した16S rRNAが機能的であることは、16S rRNA遺伝子の進化中立性をさら

に補強する成果である。

Acidobacteria 門 16S rRNA の中でも最も生育不良になった NS5 株について、継代培養による生育復帰株の獲得を試みた。NS5 株を 3 系統 (A, B, C) に分け、対数増殖期に菌体を植え継ぐ方法で、37℃、栄養培地にて継代培養を行った。増殖の回復の見られた 2 週間後に各系統から一部を分取し、3 株ずつを寒天培地上で単離した。これらの株よりゲノム DNA を調製し、全ゲノム解析を行った (新学術領域「ゲノム支援」の支援)。

その結果、各系統のいずれの 3 株も独立した変異株であり、A 系統及び B 系統の各 3 株において、同一のリボソームタンパク質をコードする遺伝子内にアミノ酸置換を伴う塩基変異を見出した。A 系統、B 系統では別々のアミノ酸置換であり、これらの変異が適応進化をもたらしたことが強く示唆された。大腸菌リボソームの立体構造上の位置を確認したところ、16S rRNA と変異アミノ酸部位との距離が 3 オングストローム以内であった。C 系統においては、A, B 系統とは別のリボソームタンパク質中に塩基置換を見出した。これらは 3 株間で共有されていた。以上の結果は、16S rRNA とリボソームタンパク質が確かに共進化していることを示唆する。

一方、Acidobacteria 門由来のもう一株 NS11 については大腸菌 16S rRNA 遺伝子との間でドメインキメラを作成し、生育速度を比較した。その結果、3' マイナードメインを置換したものについて大幅な生育回復が見られた。さらに部位特異的な塩基置換により生育に関わる部位を絞り込んだところ、わずか 1 塩基対を大腸菌型に変えることでほぼ生育が復帰することが確認された。300 塩基以上の異なる 16S rRNA でもわずか数塩基の置換で機能回復が見られることは、二つの 16S rRNA を隔てる塩基の大半が機能的に中立であることを示している。このことは、バクテリアリボソームの原型 (祖先) が誕生し、その後、種分化が起きる際に、16S rRNA はリボソームタンパク質の枠組みの中で、機能的に中立でかつ種 (系統) に固有な変異を可変領域に書き込んできたことを示唆している。これにより、リボソームタンパク質との相互作用は種を超え維持され、「水平伝播」という遺伝的な大きな変化に対しても機能が損なわれなかったものと推察された。

上記、NS5, NS11 を題材とした実験からは、16S rRNA 遺伝子の進化中立性とリボソームタンパク質との共進化の両面が見られ一見相反する結果ではあるが、16S rRNA 遺伝子の機能互換性の範囲が大腸菌とは比較的類縁の Acidobacteria 門に留まらず、Firmicutes, Bacteroidetes 門のものも含まれることから、基本的には中立進化、一部の領域では共進化も見られると考えるのが妥当なのではないかと考えている。

温度適応は、生物進化において最もよく研究のなされている題材であるが、我々の

研究でも 16S rRNA 遺伝子「のみ」に摂動を加えることにより誘発される表現型進化の一例として高温適応実験を行なった。まず、環境ゲノム由来の 16S rRNA を含む 7 変異株ライブラリーを 45℃ の高温下で数日間継代培養し、シングルコロニーを単離した。その結果、45℃ において、大腸菌 16S rRNA を含む 7 株よりも顕著に増殖能に優れた変異株が得られた (45BH, 45HK)。宿主リフレッシュ、ベクターリフレッシュを行い、高温適応が 16S rRNA に由来することを確認した。つぎに、異種 16S rRNA の高温適応に關与する領域を調べるために 45HK と大腸菌 16S rRNA 遺伝子との間でドメインキメラを構築し、高温下での集積培養を行なった結果、45HK の 3' メジャードメインが大きく寄与することが判明した。そこで、大腸菌 16S rRNA 遺伝子の 3' メジャードメイン部分のみをさらに多様な配列から選択すべく、環境ゲノムより再度相同ドメインを PCR 増幅し、キメラ遺伝子ライブラリーを構築し、集積培養を行った。単離したコロニーのいくつかを 45℃ での生育能 (倍加時間) に基づき評価した結果、45HK や大腸菌と 45HK 間でのキメラよりも増殖能に優れた変異株を取得した。本研究では高温での集積培養に数日間を要したが、結果としては 16S rRNA 遺伝子の一部を別種のものに置換することにより「一瞬」で高温適応する変異株を取得したことになる。従来の数百～数万世代継代培養による逐次ゲノム変異の集積と比較し、ゲノムの大部分を変えずに、それを運用するリボソームの機能を変えることで適応進化が加速されたと考えられる。今後、変異リボソームを含む変異株の高温での生育環境下でのおミックス解析などを行い、適応進化をミクロな視点で明らかにしたい。また、表現型進化の評価項目を増やし、リボソーム改変を起点とした表現型の加速進化に関して知見を蓄積するとともに、新たな微生物育種技術として確立したい。

## 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 6 件)

1. Miyazaki K, Sato M, Tsukuda M (2017) PCR primer design for 16S rRNAs for experimental horizontal gene transfer test in *Escherichia coli*, *Front Bioeng Biotechnol* 5:14 pp.doi: 10.3389/fbioe. (査読有)
2. Tsukuda M, Nakashima N, Miyazaki K (2015) Counterselection method based on conditional silencing of antitoxin genes in *Escherichia coli*, *J Biosci Bioeng*, 120:591-595. doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.03.008. (査読有)

3. Miyazaki K (2015) Molecular engineering of a PheS counterselection marker for improved operating efficiency in *Escherichia coli*, *Biotechniques*, 58(2):86-88. doi: 10.2144/000114257. (査読有)
  4. 佃美雪, 宮崎 健太郎 (2015) 「16S リボソーム RNA の水平伝播実験から見えるリボソームの可塑性」*生化学* 87; 475-477. doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870475
  5. 宮崎 健太郎 (2014) リボソーム改変による大腸菌宿主デザイン, *環境バイオテクノロジー学会誌*, 14:3-8 (査読無)
  6. 宮崎 健太郎 (2014) Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン, *生物工学会誌*, 92, 607-611 (査読無)
- 〔学会発表〕(計 24 件)
1. 野沢 汎, 宮崎 健太郎 (2017) 16S rRNA 遺伝子の進化中立性的実験的証明, *日本ゲノム微生物学会第 11 回年会*, 神奈川県藤沢市, 2017/03/03
  2. 星野 里樹, 宮崎 健太郎 (2017) 大腸菌 16S rRNA のドメインレベルでの遺伝子水平伝播, *日本ゲノム微生物学会第 11 回年会*, 神奈川県藤沢市, 2017/03/03
  3. Miyazaki K (2017) Translating uncultured microbial resources to bioindustrial application, *AgBI02017*, Thailand, 2017/02/28
  4. Nozawa H, Miyazaki K (2017) An extreme functional plasticity of the bacterial ribosome as revealed by the interspecies exchange of 16S rRNAs between distantly related phyla, *Biosystems Design 3.0*, Singapore, 2017/02/16
  5. Hoshino R, Miyazaki K (2017) Domain-based chimeragenesis in *E. coli* 16S rRNA, *Biosystems Design 3.0*, Singapore, 2017/02/16
  6. 泊口 菜月, 玉腰雅忠, 玉木 秀幸, 宮崎 健太郎 (2016) *Thermus thermophilus* における 16S rRNA 遺伝子の水平伝播, 極限環境生物学会 2016 年度 (第 17 回) 年会, 神奈川県横浜市, 2016/11/25
  7. 宮崎 健太郎, 泊口菜月, 玉木秀幸, 玉腰雅忠 (2016) *Thermus thermophilus* における 16S rRNA 遺伝子の水平伝播, 「細胞を創る」研究会 9.0, 東京都新宿区, 2016/11/21
  8. 宮崎 健太郎 (2016) リニア機動分子リボソームの進化工学, *日本化学会 第 96 春季年会*, 京都府京田辺市, 2016/03/27
  9. Tsukuda M, Miyazaki K (2016) RINSPEX technique for *Escherichia coli* strain engineering, *Biosystems Design 2.0*, Singapore, 2016/03/21
  10. 宮崎 健太郎 (2015) 大腸菌リボソームの変異耐性, 第 17 回 日本進化学会年会, 東京都文京区, 2015/08/21
  11. 宮崎 健太郎 (2015) リボソーム改変によるバクテリア細胞工学, 第 17 回 日本進化学会年会, 東京都文京区, 2015/08/20
  12. 宮崎 健太郎 (2015) 大腸菌リボソームの変異耐性, 第 17 回 日本 RNA 学会年会, 北海道札幌市, 2015/07/15
  13. 宮崎 健太郎 (2015) メタゲノムを活用した酵素スクリーニング, 第 15 回 日本蛋白質科学会年会, 徳島県徳島市, 2015/06/26
  14. Miyazaki K (2015) Functional metagenomic for enzyme discovery, 9th AIST-TISTR-NSTDA ワークショップ, 東京都, 2015/04/28
  15. 佃 美雪, 宮崎 健太郎 (2015) 大腸菌における 16S rRNA の置換変異によるリボソームの寛容性の検証, 第 3 回リボソームミーティング, 宮崎県宮崎市, 2015/03/17
  16. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎 (2015) バクテリア 16S rRNA 遺伝子の進化, 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 兵庫県神戸市, 2015/03/06
  17. 佃 美雪, 宮崎 健太郎 (2015) リボソーム改変による大腸菌の高温適応進化, 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 兵庫県神戸市, 2015/03/06
  18. 宮崎 健太郎 (2015) リボソーム改変によるバクテリア細胞工学, 第 10 回理研「バイオものづくり」シンポジウム, 埼玉県和光市, 2015/03/06
  19. Miyazaki K (2015) Metagenomic screening for 16S rRNA-based antibiotic resistance genes, 1st International Caparica Conference in Antibiotic Resistance, Caparica, Portugal, 2015/01/27
  20. 宮崎 健太郎 (2014) PheS 変異体を利用した新規大腸菌カウンターセクションマーカーの開発, 第 66 回日本生物工学会大会 (2014), 北海道札幌市, 2014/09/12
  21. 佃 美雪, 中島 信孝, 宮崎 健太郎 (2014) Toxin-Antitoxin system を利用した大腸菌カウンターセクション技術の開発, 第 66 回日本生物工学会大会 (2014), 北海道札幌市, 2014/09/11
  22. 佐藤 允治, 宮崎 健太郎 (2014) 水平伝播によるバクテリア 16S rRNA 遺伝子の進化の検証, *日本進化学会 第 16 回大会*, 大阪府高槻市, 2014/08/22
  23. 宮崎 健太郎 (2014) リボソーム工学によるバクテリア細胞機能の多様化, 細

胞を創る研究会 7.0, 東京都,  
2014/11/13

24. 宮崎 健太郎 (2014), 多様性の利用と創出に基づく有用酵素の開発 ~メタゲノミクスと進化工学~, フロンティア化学教育研究センター講演会, 北海道札幌市, 2014/07/17

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

1. 名称:非天然型16SリボソーマルRNA遺伝子及びその作成方法  
発明者:宮崎健太郎,星野里樹,佃美雪  
権利者:産業技術総合研究所  
種類:特許  
番号:特願 2017-025461  
出願年月日:2017/02/14  
国内外の別: 国内
2. 名称:新規なカウンターセクションマーカー  
発明者:宮崎健太郎  
権利者:産業技術総合研究所  
種類:特許  
番号:特願 2014-155954  
出願年月日:2014/07/31  
国内外の別: 国内

取得状況(計2件)

1. 名称:改変された致死遺伝子及び該遺伝子を含むベクター  
発明者:宮崎健太郎  
権利者:産業技術総合研究所  
種類:特許  
番号:特 5794558  
取得年月日:2015/08/21  
国内外の別: 国内
2. 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:産業技術総合研究所  
種類:特許  
番号:特 5984084  
取得年月日:2016/08/12  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://staff.aist.go.jp/miyazaki-kentaro/group/>

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

(2)研究分担者 ( )

研究者番号:

(3)連携研究者 ( )

研究者番号: