

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H05538・20K20453

研究課題名（和文）リボソーム改変による加速的生物進化工学の開発

研究課題名（英文）Accelerated adaptive bacterial evolution by ribosome engineering

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・生命工学領域・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） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：生物の加速的な環境適応技術を開発する目的で、「ゲノムの活用方法」に着目した。具体的には、好熱菌 *Thermus thermophilus* のリボソーム（特に16S rRNA）を改変することにより、野生株の生育できない低温での生育を可能とする変異株を得た。16S rRNAは保守性が高く、種のアイデンティティともされる分子であるが、人工的な手法により改変することで従来のゲノム点変異蓄積型の進化とは全く異なる機構による進化が実現したと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
従来型のゲノムへの変異の蓄積による段階的な進化ではなく、遺伝子の発現プロファイルを変えるという新たな進化様式による生物の適応進化を示すことに成功した。本方法は、リボソームの進化的保守性という既成概念と異なる事実の発見に基づいている。

研究成果の概要（英文）：With the goal of developing technologies for accelerated environmental adaptation of organisms, we focused on "how to utilize genomes". Specifically, by modifying the ribosome (especially 16S rRNA) of the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*, they obtained a mutant strain that can grow at low temperatures where wild strains cannot. 16S rRNA is a highly conservative molecule and is considered the identity of a species. However, the artificial modification of 16S rRNA is thought to have achieved evolution by a mechanism completely different from the conventional evolution based on the accumulation of genomic point mutations.

研究分野：生物工学

キーワード：リボソーム 温度適応

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2018年のノーベル化学賞が酵素やペプチド・抗体の進化工学に授与された通り、ペプチドやタンパク質分子レベルの進化工学は成熟の域に達した。一方、生物個体に目を向けると、今尚「古典的育種」が主流である。生物学者が最も飼育してきた大腸菌や酵母でさえ、未だにそれを自由に改造できるレベルにはない。これまで酵素進化工学に従事してきた私は、機能創出という点で圧倒的に優れた「進化」を、タンパク質から生物個体へと拡張するために、生物進化の力学を洞察した。そして、生物の爆発的な多様化は制御系の進化がもたらしたという史実にヒントを得て、制御系の人工改変がキーテクノロジーになると考えた。ゲノム中の大半を占める「働く遺伝子」ではなく、それらの発現を制御するシステムを変えることで、生物の表現型は変化するのではないかと考え、特にリボソームに着目した。

タンパク質をコードする遺伝子には、コドンの揺らぎを利用して多くの制御情報が書き込まれている。リボソームは、単にアミノ酸を連結するだけでなく、量やタイミングなどの制御情報を読み取りつつタンパク質を合成する。リボソームが変われば、発現する成分自体は変わらずとも、量やタイミングが変わり、結果的に表現型が変わるのではないかと考えた。

では超保守的な分子の代表格であるリボソームをどう改変するか？ この難問に対しては、大腸菌 rRNA 欠損株を用いた生育相補実験が突破口となった。この一見奇抜な実験の結果は、16S rRNA の生物種間互換性という定説を覆す発見につながり、同時にリボソームの大規模改変技術となった。さらに 16S rRNA 置換株の表現型を解析すべく、大腸菌変異株にレポーター遺伝子を導入したところ、野生株よりも高発現する変異株も見出された(国内特許 5984084「翻訳特性の改変された大腸菌」)。

2. 研究の目的

本研究では、リボソームの人工改変を進化の力学とした生物進化工学を開発し、その有効性を好熱菌の低温適応をひとつのモデルとして実証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 系統的変異株ライブラリーの構築

異種 16S rRNA 遺伝子で生育する *T. thermophilus* 変異株ライブラリーを構築する。16S rRNA 遺伝子の供給源としては進化系統的な観点から広範な細菌由来のゲノムを利用する。ゲノムを鋳型に 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、*T. thermophilus* ゲノム (2 コピー存在する 16S rRNA のうち *rrsB* を欠失した自作の欠損株 DB1 株を利用) 上の *rrsA* 遺伝子と置換する。この操作は、*T. thermophilus* 特有の高い自然形質転換能・相同組換え能に基づく(図 1)。生育相補性に基づくスクリーニングを行い、16S rRNA 遺伝子置換変異ライブラリーとする。

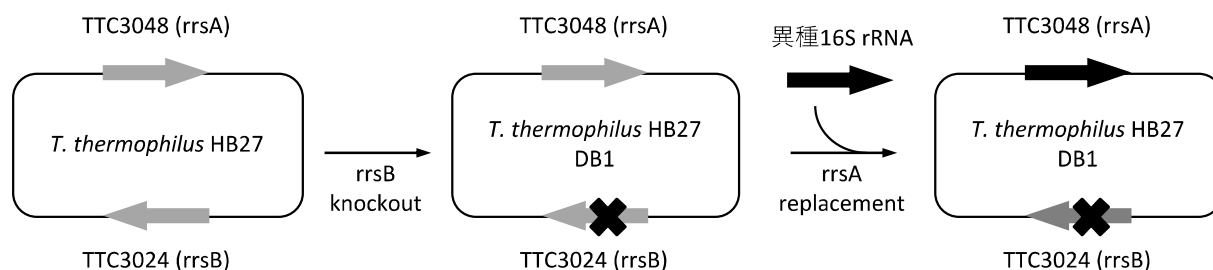


図 1 : *Thermus thermophilus* 16S rRNA 遺伝子欠損株の構築と異種 16S rRNA 遺伝子の導入

(2) 低温適応変異株の単離：ゲノムポテンシャルの解明

(1)で得たライブラリーを 50 で集積培養する。「対数増殖期までの増殖 希釈」のサイクルを繰り返し、高速増殖株を単離する。定期的サンプリングにより集積度を確認しながら、培養を継続する。

4. 研究成果

16S rRNA 遺伝子置換による高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の低温適応

16S rRNA 遺伝子を置換した変異ライブラリーを野生株の生育下限温度 50 で集積培養した。16S rRNA 遺伝子の供与体としては、*T. thermophilus* と同属異種、同一門ではあるが、綱の異なるもの(*Deinococcus*, *Meiothermus*) 門レベルで異なるもの(*Rubrobacter*, *Rhodothermus*, *Aquifex*, *Thermotoga*)などを用いた。なお、*Rubrobacter* (Tomariguchi & Miyazaki, 2019), *Rhodothermus* (Tomariguchi & Miyazaki, 2020) については有馬温泉を分離源として自ら単離した株であり、同じ環境からは *Thermus thermophilus* (Miyazaki & Tomariguchi, 2019; Miyazaki, Tomariguchi, & Ueno, 2021) も多数分離されている。これらの単離株については、全ゲノム解析などを行なった。

宿主 *T. thermophilus* の形質転換は、元来的特徴である高い形質転換能に基づいているが、同時に *T. thermophilus* ゲノムと供与体間で相同組換えが起きることも特徴的である。特に 16S rRNA は配列間での相同性も高いため、遺伝子内部での組換え、すなわちキメラが生じる。今回のライブラリーでは全長以外に、さまざまなキメラも含まれており、それらを丸ごと集積培養した。1週間程度の集積培養後、寒天培地上でコロニーを単離した。

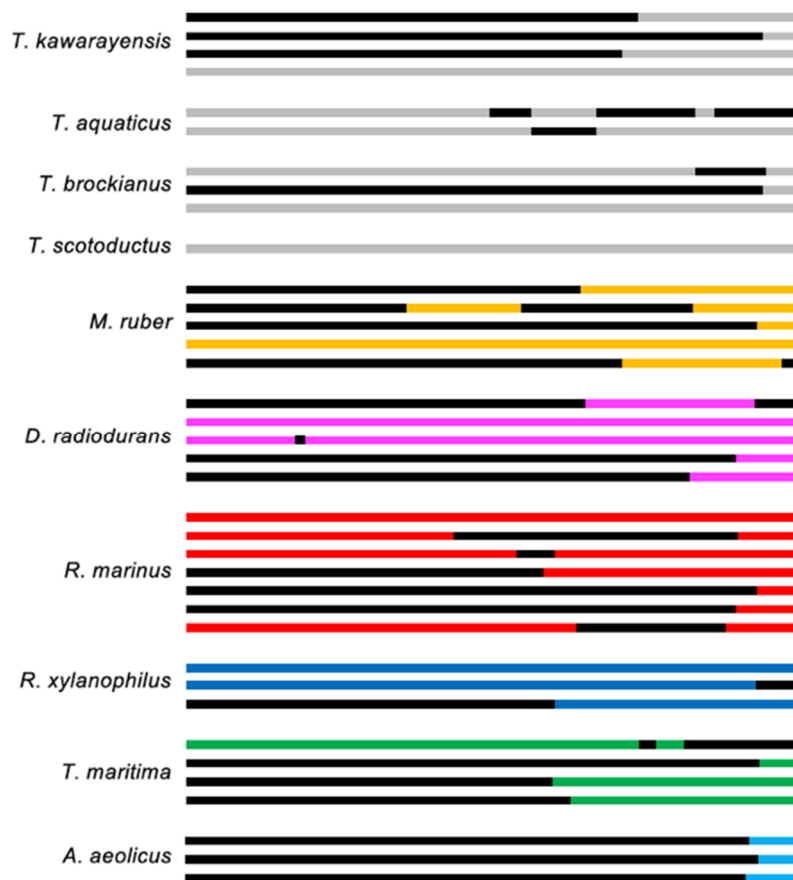


図2：異種 16S rRNA 遺伝子による形質転換で得られた全長・キメラ 16S rRNA 遺伝子置換体

さまざまな供与体による形質転換の結果、図2に示す通り、遺伝子全長あるいは遺伝子内部の様々な領域で組換ったキメラ遺伝子が得られた。従来の 16S rRNA の進化的保守性(種固有性)とは反対で、門レベルで異なる種間でも様々な組換えが起きることを示す実験的な証拠である。一方、*Thermotoga maritima*、*Aquifex aeolicus* については、キメラ遺伝子は得られなかったものの、全長が置き換わった変異体は実験を

尽くしても(各 200 コロニーほどのスクリーニング)全長置換体は得られなかった。このことは、16S rRNA 遺伝子は単一系統ではなく、*T. maritima*、*A. aeolicus* など、*T. thermophilus* よりも進化系統的に生命の起源に近い(系統樹の根に近い)生物については、リボソーム自体が異なる scaffold を持つのではないかと推察された。またこれらの例外を除き、種間和合性を示したものについては、リボソームの進化過程で、リボソーム機能に必要な部位については変異を受けず、それ以外の部位で種特異的な変異が蓄積したと推察された。16S rRNA の種固有性と交雑性が両立することの根拠となる Random Patch Model をリボソーム進化の新たなモデルとして提唱した(Miyazaki & Tomariguchi, 2019)。

形質転換により宿主 供与体間で様々な組換え 16S rRNA 遺伝子が発生するが、図 3 には 50 での集積培養後に単離された変異株の増殖曲線を示す。高温では *T. thermophilus* 16S rRNA を保持した株が優勢だが、低温では増殖速度が逆転する現象が見られ、高度好熱菌が低温適応したことが示された。またこのような形質を示した変異株の 16S rRNA 遺伝子の一つには *M. ruber* と *T. thermophilus* とのキメラ遺伝子も見出されたが、このキメラ配列をクエリーに NCBI データベースを検索したところ、ほぼ同一の配列が存在した。今回のキメラの発生は実験室で人工的に生み出されたが、自然界でも実際に 16S rRNA 遺伝子の組換え進化が起きている可能性も示唆された。

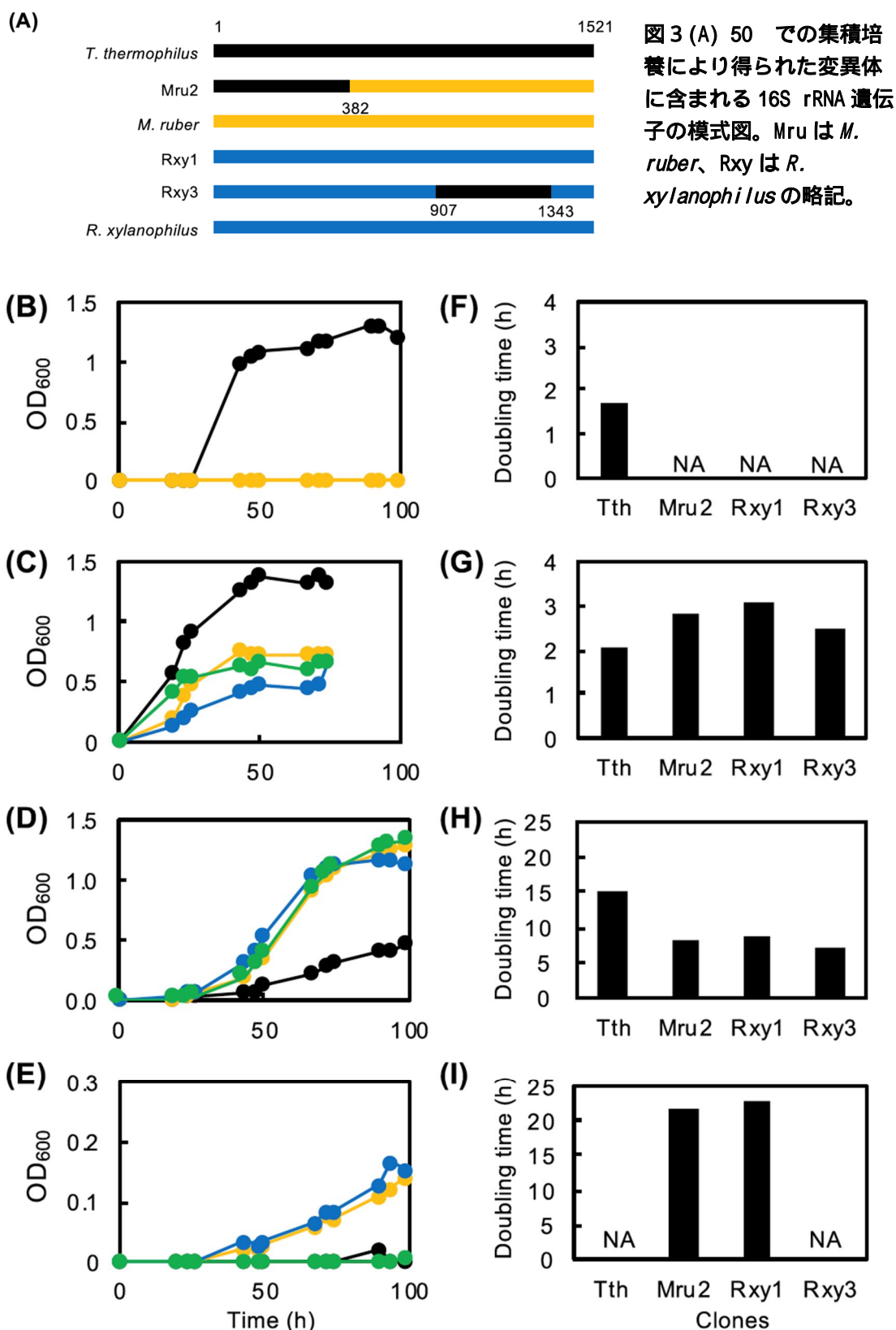


図3 (B)-(I) 変異体の増殖曲線(B-E)と倍化時間(F-I)。 (B)75、(C)70、(D)50、(E)45。高温では *T. thermophilus* 16S rRNA を保持した株が優勢だが、低温では増殖速度が逆転する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 17件）

1. 著者名 Miyazaki Kentaro	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Thermus Strains Isolated from Senami Hot Spring in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00354-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00354-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Hosoya Kae	4. 巻 11
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Four Parageobacillus Strains Isolated from Soil in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00204-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.00204-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Tokito Natsuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Resequencing of Thermus thermophilus Strain TMY by Hybrid Assembly of Long- and Short-Read Sequencing Technologies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00979-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00979-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Tomariguchi Natsuki, Ueno Yuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Four Halophilic Thermus thermophilus Strains Isolated from Arima Hot Spring in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00874-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00874-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Moriya Toshiyuki, Tokito Natsuko, Oshima Tairo, Yura Kei, Bessho Yoshitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Thermus thermophilus Strains HB5002 and HB5008, Isolated from Mine Hot Spring in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00272-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00272-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 宮崎健太郎	4. 巻 5
2. 論文標題 リボソーム改変による好熱菌の低温適応進化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 905-910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Moriya Toshiyuki, Nemoto Naoki, Oshima Tairo, Yura Kei, Bessho Yoshitaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Thermus thermophilus Strain HB5018, Isolated from Mine Hot Spring in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00039-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00039-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Hase Erina, Tokito Natsuko	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Geobacillus sp. Strain E55-1, Isolated from Mine Geyser in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00339-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00339-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Hase Erina, Maruya Tomomasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Pseudomonas otitidis Strain MrB4, Isolated from Lake Biwa in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00148-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00148-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Wiseschart Apirak, Pootanakit Kusol, Kitahara Kei	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Vibrio rotiferianus Strain AM7	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01591-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01591-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 宮崎健太郎	4. 巻 53
2. 論文標題 リボソーム改変による好熱菌の低温適応進化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 49-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Hase Erina, Maruya Tomomasa	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Bacillus cereus Strain PL1, Isolated from Soil in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00195-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00195-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Izumi Kouki	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Alteromonas sp. Strain I4, Isolated from the Japan Sea	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01277-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01277-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yu Hiroki, Taniguchi Makoto, Uesaka Kazuma, Wiseschart Apirak, Pootanakit Kusol, Nishitani Yudai, Murakami Yota, Ishimori Koichiro, Miyazaki Kentaro, Kitahara Kei	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Staphylococcus arlettae Strain P2, Isolated from a Laboratory Environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00696-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00696-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyazaki Kentaro	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequencing of Thermus thermophilus Strain HC11, Isolated from Mine Geyser in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00873-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00873-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomariguchi Natsuki, Miyazaki Kentaro	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Rubrobacter xylanophilus Strain AA3-22, Isolated from Arima Onsen in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00818-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00818-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Tomariguchi Natsuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Occurrence of randomly recombined functional 16S rRNA genes in <i>Thermus thermophilus</i> suggests genetic interoperability and promiscuity of bacterial 16S rRNAs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-47807-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyazaki Kentaro, Tomariguchi Natsuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of <i>Thermus thermophilus</i> Strains AA2-20 and AA2-29, Isolated from Arima Onsen in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00820-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00820-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tomariguchi Natsuki, Miyazaki Kentaro	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of <i>Rhodothermus marinus</i> Strains AA2-13 and AA3-38, Isolated from Arima Onsen Hot Spring in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01475-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01475-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎 健太郎
2. 発表標題 Genetic Interoperability and Promiscuity of Bacterial 16S rRNA: Proposal for a Random Patch Model
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎健太郎
2. 発表標題 Genetic Interoperability and Promiscuity of Bacterial 16S rRNA: Proposal for a Random Patch Model
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎 健太郎、泊口 菜月
2. 発表標題 16S rRNAは遺伝子組み換えにより進化する
3. 学会等名 極限環境生物学会 第21回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 泉 洗輝、佐藤 勝也、大野 豊、宮崎 健太郎、鳴海 一成
2. 発表標題 Rubrobacter sp. AA3-22株の放射線と紫外線に対する耐性
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎 健太郎
2. 発表標題 Directed evolution: irrational approach to molecular engineering
3. 学会等名 日本育種学会 第61回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 健太郎
2. 発表標題 多様性工学 ~進化を利用したセンサー分子探索と高機能化~
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎 健太郎
2. 発表標題 16SrRNAは遺伝子組み換えにより進化する -リボソーム進化のRandom Patch Modelの提唱-
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関