

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14771

研究課題名（和文）リボソームRNAを利用した原核生物の増殖アクセラレータの開発

研究課題名（英文）Development of prokaryotic growth accelerator using ribosomal RNA

研究代表者

佐藤 悠 (Sato, Yu)

山口大学・大学研究推進機構・助教（テニュアトラック）

研究者番号：90852187

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：原核生物において、タンパク質合成の翻訳機能に関わるリボソームRNA(rRNA)遺伝子数と増殖速度との間には正の相関関係がみられる。本研究課題では、人為的に細胞内のrRNA遺伝子数を調整することにより、任意の細菌の増殖速度を操作できるかどうかを検証した。プラスミド上のみrRNA遺伝子をもつ大腸菌を用いて遺伝子改変実験を行った結果、ある一定のrRNA遺伝子数まで増加させることで増殖速度が向上することを見出した。また、rRNA遺伝子数を過剰に増やすと細胞サイズやタンパク質生産量にも影響することが示され、rRNA遺伝子改変にもとづく新たな細胞改変技術の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ産業は目覚ましい発展を続けており、経済協力開発機構によると2030年のバイオ市場は約200兆円の巨大市場に成長すると予想されている。これまでに環境中から約2万種もの原核生物が単離され、その性質に応じて幅広い分野に利用されてきた。しかしながら、産業利用に十分な菌体密度を得るまでに数日から数週間と増殖が遅い微生物も少なくなく、限られた原核生物しか産業利用できていない。本研究で得られた「rRNA遺伝子の改変により任意の微生物の増殖速度を加速可能である」という知見は、既存の微生物利用を最大化するとともに、有用微生物の探索の加速化にも貢献しうる。

研究成果の概要（英文）：In prokaryotes, there is a positive correlation between the number of ribosomal RNA (rRNA) genes involved in the translational process of protein synthesis and growth rate. In this research project, we tested whether the growth rate of a given bacterium can be manipulated by artificially adjusting the number of rRNA genes in the cell. As a result of genetic modification experiments using *E. coli*, which has rRNA genes only on a plasmid, we found that increasing the number of rRNA genes up to a certain level improves the growth rate. The results also showed that an excessive increase in the number of rRNA genes affects cell size and protein production, and the development of a new cell modification technology based on rRNA gene modification is expected.

研究分野：応用微生物学

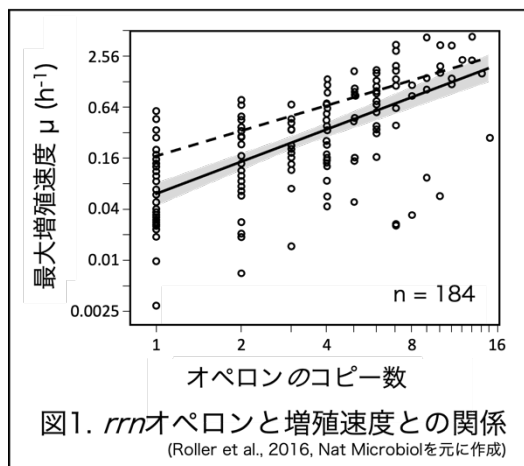
キーワード：リボソームRNA 増殖速度 バクテリア プラスミド 微生物操作技術

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

バイオ産業は目覚ましい発展を続けており、経済協力開発機構によると 2030 年のバイオ市場は約 200 兆円の巨大市場に成長すると予想されている。これまでに環境中から約 2 万種もの原核生物が単離され、その性質に応じて幅広い分野に利用されてきた。しかしながら、産業利用に十分な菌体密度を得るまでに数日から数週間と増殖が遅い微生物も少なくない。そのため、限られた原核生物しか産業利用できていない。そのため、新規産業の創出に向けた、既存微生物の利用最大化ならびに有用微生物の探索の加速化には、その増殖を加速させる技術(アクセラレータ)の開発が必要不可欠である。

天然環境中の原核生物でみられる現象として、ゲノム上のリボソーム RNA 遺伝子群(*rrn* オペロン)のコピー数が多い種ほど最大増殖速度が速い傾向にある(図 1)。これは原核生物の環境適応戦略の違いによると考えられており¹、栄養状態の変動が激しい環境下では「細胞内のリボソーム量を調節可能な *rrn* オペロンの多い種」が、飢餓環境下では「翻訳にかかるエネルギー消費を抑えられる *rrn* オペロンの少ない種」が生存・優占に有利であるとされる。実際に、有機物濃度を上昇させると菌叢中で *rrn* オペロンのコピー数が多い細菌の割合が増加する等²、菌叢レベルで rRNA 量と増殖速度に相関があることが示唆されている。しかしながら、1 菌株レベルでの相関を検証した研究は皆無であり、*rrn* オペロンの発現量の人為的改変により微生物の増殖速度を制御できるかは定かではない。



2. 研究の目的

こうした背景のもと、本申請課題では、「細胞内 rRNA 発現量の人為的改変により微生物の増殖速度が改変可能なこと」を検証する。本申請課題の遂行により得られる「1 菌株レベルでの細胞内 *rrn* オペロン数と増殖速度の相関」に関する知見は、有用微生物の増殖アクセラレータへの応用を考える上で重要である。

3. 研究の方法

本申請課題では、特殊な細菌や変異株を用いて *rrn* オペロンのコピー数の違いのみが増殖に及ぼす影響の評価を試みた。一般的な細菌は複数コピーの *rrn* オペロンを有するが、オペロン間で”ゲノム上の位置”や”塩基配列”にバラつきがあるため、コピー数以外の因子による影響を排除できない。前者に関しては、増殖の速い細菌では複数の複製フォークが同時に形成されるため、複製開始点付近の rRNA 遺伝子は他の領域のものよりも 4~5 倍多く利用されてしまう。また、後者に関しては *rrn* オペロン間で塩基配列が異なる例も多くみられ、ある細菌種では環境ストレスに応じた塩基配列の異なる rRNA 遺伝子の使い分けも報告されている³。そこで本研究では、プラスミド上にも *rrn* オペロンを有する細菌をもとに、*rrn* オペロン数のみが異なる変異株ライブラリーを構築・利用することで上述の問題を解決する方策をとった。

はじめに、各細菌より抽出した *rrn* オペロンを含むプラスミドをもとに、その細菌が感受性を示す薬剤への耐性遺伝子を導入したプラスミドを構築した。また、ランダムプライマーを用いてプラスミド上の推定複製開始領域に無作為な変異を導入したプラスミドを構築した。構築したプラスミドを用いて各種細菌の形質転換を行い、抗生物質入りの寒天培地上でセレクションを行った。増殖した(=変異導入プラスミドを保持した)クローンを用いて異なるコピー数の *rrn* オペロンをもつ変異株ライブラリーを構築した。

培養試験により、各クローンの増殖のモニタリングを行うと同時に、対数増殖期・静止期それぞれの培養サンプルを保存した。培養には、リボソーム合成に必要なエネルギー源の欠乏が律速とならないように、炭素源および窒素源に富んだ培地を利用した。定量 PCR により、対数増殖期や静止期の細胞内の *rrn* オペロンのコピー数と rRNA 量を測定した。コピー数に関しては、サンプル中のコピー数を生菌数で割ることにより、細胞内のプラスミドのコピー数 (= *rrn* オペロンのコピー数) を算出した。加えて、ブラッドフォード法による全タンパク量の測定を行い、1 細胞あたりのタンパク量を算出した。測定したパラメータをもとに、*rrn* オペロンのコピー数の違いが宿主細胞に及ぼす影響の包括的評価、及び、富栄養な実験室条件下における細胞内 *rrn* オペロンの最適な数の算出を試みた。

4. 研究成果

1) プラスミド上にのみ *rrn* オペロンを有する細菌の形質転換

はじめに、プラスミド上にのみ *rrn* オペロンを有する細菌の形質転換技術の開発を試みた。候補として *Aureimonas* sp. JCM 18007 株ならびに *Oecophyllibacter saccharovorans* NBRC 113643 を菌株保有機関の情報に基づき培養試験を行い、保有するプラスミドを抽出した。また、カナマイシン耐性に関わる遺伝子をマーカーとしてプラスミド上に導入し、ヒートショック法やエレクトロポレーション法を用いて形質転換を試みた。変異株をいくつか構築できたため、ランダムプライマーを用いて推定複製開始点に変異を導入した。繰り返し実験を試みたが、安定して培養可能な変異株を取得できなかったため、以下の大腸菌株を用いる方針に変更した。

2) コピー数の異なる *rrn* オペロンを有する大腸菌変異株の構築

本研究では、プラスミド上にのみ *rrn* オペロンを有する大腸菌を用いて rRNA 遺伝子数と増殖速度との関係を調べた。本株は、ゲノム上の 7 コピーの *rrn* オペロンを欠損させた大腸菌 $\Delta 7$ 株に、*rrn* オペロンを補完するプラスミド pMY201 (*amp^r*, *sacB*, *rrnB*, p15A-ori) を形質転換した株である⁴。また、培地への抗生物質をはじめとする添加剤を変更することで、pMY201 を pMY205 (*tmp^r*, *pheS*, *rrnB*, p15A-ori) に変更可能なシステムとなっている。ギブソンアセンブリーにより pMY205 上の複製開始点である p15A 由来の ori (18-22 コピー) を pMW119 由来の ori (1-5 コピー) や pUC19 由来の ori (500-700 コピー) に置換したプラスミドを構築した。構築したプラスミドを $\Delta 7$ -pMY201 株に形質転換し、抗生物質をアンピシリンからトリメトプリムに変更することで pMY201 を pMY205 に置き換えた。また、比較対象として 7 コピーの *rrn* オペロンをもつ野生株に、*rrn* オペロンを削除した pMY205 (空ベクター) を形質転換した変異株も作製した。

3) *rrn* オペロン数の変化に伴う増殖速度への影響評価

構築した各種変異株の増殖速度を比較した。培養条件を検討するために、大腸菌 $\Delta 7$ -pMY205 株を用いて有機物濃度や種類の異なる 3 種類の培地 [LB 培地、M9 培地、R2A 培地] にて培養した。

その結果、有機物の種類や濃度に応じた増殖速度への影響は比較的小さかったため、以降の実験はLB培地を用いて行なった。37℃にて各種変異株の振とう培養を行なった結果、コピー数の増減に伴い増殖速度が変化した(図2)。pMW119-ori、野生株、p15A-oriとコピー数が高くなる順に増殖速度が向上したのに対し、p15A-oriとpUC19-oriの結果はほとんど変化しなかった。これまでに発見されている細菌において最大の *rrn* オペロン数は21コピーであり、本研究の結果と合わせると2桁以上のコピー数の増加により増殖速度を向上させることは難しいと考えられる。本研究結果より増殖速度に影響を及ぼす *rrn* オペロン数の範囲が絞られただけでなく、「1菌株レベルでの細胞内 *rrn* オペロン数と増殖速度の相関」という有用微生物の増殖アクセラレータへの応用を考える上で重要な知見が得られた。

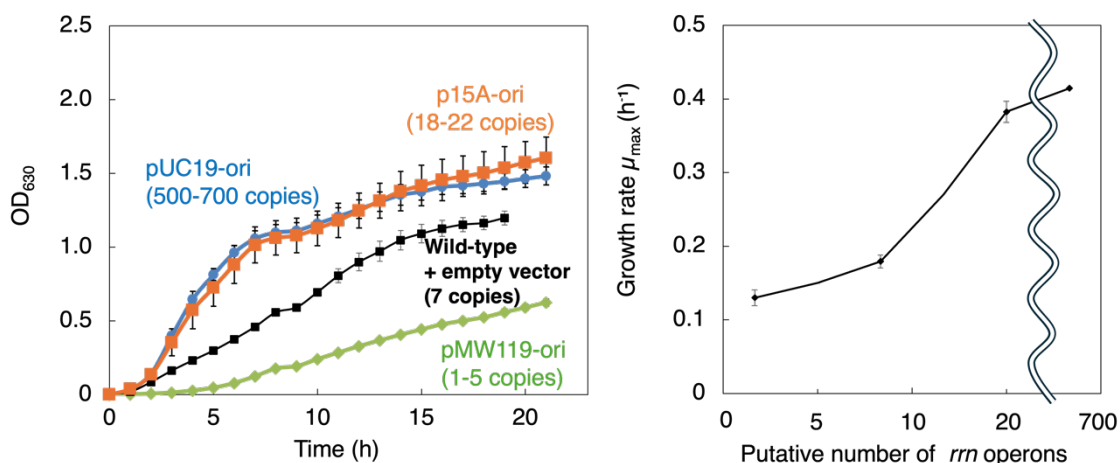


図2 各種変異株の培養結果

(左) 増殖曲線 (右) 増殖速度と *rrn* オペロン数との関係

4) 過剰な *rrn* オペロン数をもつ変異株の解析

増殖速度以外の生理特性として、細胞の形態およびサイズ、タンパク質生産量を測定した。その結果、ほとんどの変異株において違いは見られなかった。一方、他の株と比較して pUC19 の複製開始点を有する変異株のみ細胞サイズが約 3 割減少しており、1細胞あたりのタンパク質生産量が約 4 倍に向上していた。本検証システムに基づく影響も否定できていないが、本現象によりタンパク質合成の翻訳機構という生育に必須な機能を担うリボソームの改変により、増殖速度以外にも影響を及ぼす可能性が示された。

[参考文献]

1. Klappenbach JA, Dunbar JM, Schmidt TM. (2000) rRNA Operon Copy Number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. Appl Environ Microbiol 66: <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000>
2. Wu, L., Yang, Y., Chen, S. et al. (2017) Microbial functional trait of rRNA operon copy numbers increases with organic levels in anaerobic digesters. ISME J 11, 2874–2878. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.135>
3. Song, W., Joo, M., Yeom, JH. et al. Divergent rRNAs as regulators of gene expression at the ribosome level. Nat Microbiol 4, 515–526 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0341-1>
4. Kitahara, K., Miyazaki, K. (2018). Constructing Mutant Ribosomes Containing Mutant Ribosomal RNAs. In: Masuda, S., Izawa, S. (eds) Applied RNA Bioscience. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8372-3_2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okano Kenji, Sato Yu, Hama Shnji, Tanaka Tsutomu, Noda Hideo, Kondo Akihiko, Honda Kohsuke	4. 巻 17
2. 論文標題 L-Lactate oxidase mediated removal of L lactic acid derived from fermentation medium for the production of optically pure D lactic acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/biot.202100331	査読の有無 有
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 佐藤 悠、岡野 憲司、木村 浩之、本田 孝祐	4. 巻 21
2. 論文標題 原核生物における多様な温度適応機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 環境バイオテクノロジー学会誌	6. 最初と最後の頁 17~28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.50963/jenvbio.21.1_17	査読の有無 有
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 Iso Shinsei, Sato Yu, Kimura Hiroyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Impacts of Groundwater Pumping on Subterranean Microbial Communities in a Deep Aquifer Associated with an Accretionary Prism	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 679~679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms12040679	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 Sato Yu, Okano Kenji, Honda Kohsuke	4. 巻 28
2. 論文標題 Effects of small heat shock proteins from thermotolerant bacteria on the stress resistance of Escherichia coli to temperature, pH, and hyperosmolarity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Extremophiles	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00792-023-01326-y	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 Hizume Tatsuya, Sato Yu, Iwaki Hiroaki, Honda Kohsuke, Okano Kenji	4. 巻 14
2. 論文標題 Subtractive modification of bacterial consortium using antisense peptide nucleic acids	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2023.1321428	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 Okano Kenji, Sato Yu, Hizume Tatsuya, Honda Kohsuke	4. 巻 132
2. 論文標題 Genome editing by miniature CRISPR/Cas12f1 enzyme in Escherichia coli	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 120 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.04.009	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 佐藤悠
2. 発表標題 Toward a full picture of microbial dark matter in the terrestrial subsurface
3. 学会等名 中高温微生物研究センター環境微生物部門セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 悠、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 好熱菌由来のヒートショックタンパク質による大腸菌のストレス耐性強化
3. 学会等名 第74回日本生物工学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 悠
2. 発表標題 温度適応に必要なものは何か？－例外的な微生物を例に－
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部支部創立20周年記念第36回若手研究者シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 悠、中島 悠、大久保智司、岡野憲司、木村浩之、延優、玉木秀幸、本田孝祐
2. 発表標題 地下圏に潜む微生物ダークマターの全貌解明を目指して
3. 学会等名 第17回日本ゲノム微生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 悠、中島 悠、大久保 智司、岡野 憲司、木村 浩之、本田 孝祐
2. 発表標題 深部流体に含まれる微生物の多様性と代謝特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第35回札幌大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato Yu, Okano Kenji, Tanaka Tsutomu, Kondo Akihiko, Honda Kohsuke
2. 発表標題 Production of optically pure D-lactic acid from renewable resources
3. 学会等名 Young Asian Biochemical Engineers ' Community (YABEC) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato Yu, Okano Kenji, Honda Kohsuke
2. 発表標題 Metabolic engineering of <i>Lactobacillus plantarum</i> for D-lactic acid production from lignocellulosic materials
3. 学会等名 Universitas Brawijaya-Osaka University Joint Symposium - Development of Green Technology for a Sustainable Society - (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 悠、Maruf Ilma Fauziah、佐々木 由佳、Krebs Anastasia、NieBer Jochen、谷口 博範、岡野 憲司、木谷 茂、Restiawaty Elvi、Akmaloka、本田 孝祐
2. 発表標題 好熱好酸性アーキア <i>Thermoplasma acidophilum</i> 由来の2種類のセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼの異種発現及び機能解析
3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 悠、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 耐熱菌由来ヒートショックタンパク質が大腸菌のマルチストレス耐性に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度東京大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 悠、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 耐熱菌由来の熱ショックタンパク質による大腸菌のストレス耐性強化
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第67回講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐藤 悠、岡野憲司、本田孝祐
2. 発表標題 高温で増殖可能なバクテリア由来のヒートショックタンパク質による大腸菌のストレス耐性強化
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023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
---------	---------