

## 16S ribosomal RNA 遺伝子置換に基づく大腸菌リボソームの進化分子工学

佃 美雪

### 【研究の背景と目的】

あらゆる生物に共通するタンパク質合成装置、リボソームは、機能や構造、生合成過程が非常に複雑である。それゆえ、リボソームの各構成成分をコードする遺伝子は各生物において協同的に進化してきたと考えられ、生物種間で遺伝的な移動（水平伝播）は起こり得ないと考えられてきた<sup>1</sup>。特に、バクテリアリボソームの構成成分である 16S rRNA 遺伝子は、バクテリアの分子系統分類の指標として使われてきた歴史を持ち<sup>2</sup>、生物種固有の分子であると広く認識されている。

一方、大腸菌において、実験的な 16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子の水平伝播が報告された<sup>3,4</sup>。これまでに、大腸菌と同じプロテオバクテリア門ガンマプロテオバクテリア綱からベータプロテオバクテリア綱まで、多種多様なバクテリア 16S rRNA 遺伝子が、大腸菌 16S rRNA 遺伝子の欠損を相補可能であることが示されている<sup>3,4</sup>。このことから、リボソームが従来考えられてきた以上に機能的に柔軟性に富む分子であることが判明した。

16S rRNA は、30S サブユニットの中心骨格を担う分子であり、21 個のリボソーマルタンパク質がそれを取り囲んでいる。そのため、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換の影響は、リボソーム全体に波及し、リボソーム機能に大きな変化を与えると予想される。一般的には、16S rRNA の変化は機能低下を招くと予想されるが、改変の方法次第では改良が可能かもしれない。

そこで、本博士論文において、大腸菌リボソームを材料に、16S rRNA はどこまで改変可能か？という基礎的な問いにはじまり、「リボソーム工学」の基盤構築を目的に研究を行った。リボソームの機能変化は、大腸菌内遺伝子の翻訳プロファイル（プロテオーム）を変動させ、それがトランスクリプトーム、メタボローム、そして、フェノームを変化させると予想される。この観点から、リボソーム工学のさらなる発展型として、大腸菌宿主創成技術としての応用も視野に入れ、研究を行った。

より具体的には、16S rRNA 遺伝子置換技術のハイスループット化に向けた種々の改良と機能相補性 16S rRNA 遺伝子のハイスループットスクリーニングにより、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の改変限界を決定した。さらに、様々なバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子による置換株のフェノタイプマイクロアレイ解析を通し、16S rRNA 遺伝子の置換技術がリボソームの改良、ひいては大腸菌の宿主改良に有用な技術であるか検証した。

### 【大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換実験<sup>3,4)</sup>】

この実験では、大腸菌が持つ 7 つの rRNA オペロンをすべて欠損させ、代わりに 1 つの rRNA オペロン (*rrnB*) がコードされたレスキュープラスミドの発現により生育が維持されている株 ( $\Delta 7$  株) と、異種 16S rRNA 遺伝子と大腸菌 23S・5S rRNA によるキメラ rRNA オペロンがコードされた異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミドを用いる。つまり、16S rRNA 遺伝子の置換は、「 $\Delta 7$  株でのレスキュープラスミドと異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミドの置換」による<sup>3,4)</sup>。

16S rRNA 遺伝子の両末端は全バクテリア間で保存性が高く、ユニバーサルプライマーで多種多様なバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅・抽出できる。その断片をクローニングした異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミド (pSC101 ori, ゼオシン耐性) で  $\Delta 7$  株を形質転換し、ゼオシンを含む LB 寒天プレート培地で選択することで、 $\Delta 7$  株にレスキュープラスミド (pSC101 ori, アンピシリン耐性, *sacB*) と、異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミドが共発現する株を獲得する。レスキュープラスミドには、自殺遺伝子の *sacB* 遺伝子 (スクロース毒性) がコードされているため、選択されたコロニーを、スクロースを含む LB 寒天プレート培地で選択 (カウンターセクション) することで、レスキュープラスミドを含む細胞を死滅させ、異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミドのみが発現する細胞を獲得する。

### 【16S rRNA 遺伝子の置換技術の改良とライブラリー構築】

上記の 16S rRNA 遺伝子の置換技術において、律速となっていたカウンターセクション操作のハイスループット化を行った (図 1)。具体的には、カウンターセクションを行う際の単離コロニーのスロットテストという作業工程を、コロニーライブラリー混合液の塗布によるスクリーニングに変更した。特に、選択薬剤を DNA の断片化を招くゼオシン<sup>5)</sup>からトリメトプリムに変更したことが効果的であった。さらに、ライブラリー規模の拡大のために、16S rRNA 遺伝子を PCR クローニングする際のユニバーサルプライマーの再設計や、16S rRNA のソースとして、多様な環境から抽出したメタゲノムの利用などの工夫も取り入れた。そして、16S rRNA 遺伝子のソースとして土壌や海水、動物の腸内などの環境由来のメタゲノムを利用し、様々な異種 16S rRNA 遺伝子が置換された 4,000 スケールの大腸菌変異株ライブラリーを構築した。

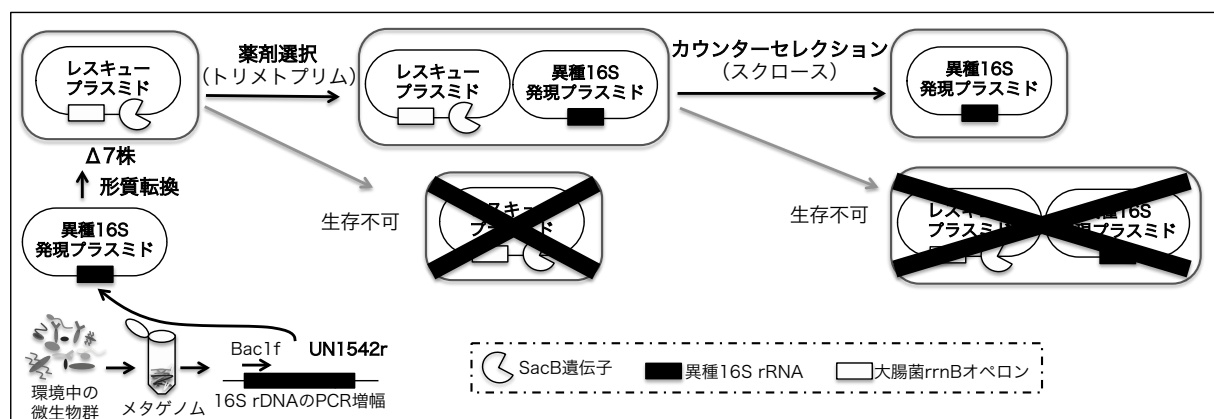


図1 大腸菌における16S rRNA遺伝子の置換技術

## 【16S rRNA 遺伝子の改変限界】

大腸菌と遠縁なバクテリア 16S rRNA 遺伝子が機能する株ほど、増殖が不良となる傾向があるため<sup>4</sup>、通常より培養時間を延長し（17→48 h）、小さなコロニーを選択した。各クローンの 16S rRNA 遺伝子の配列解析から、大腸菌とは門レベルで異なるアシドバクテリア門の *Holophaga* sp. WY42 株の 16S rRNA 遺伝子に 84.5%の相同性を持つ 16S rRNA (16S<sup>NS11</sup>) の存在が確認された。16S<sup>NS11</sup> の大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Eco</sup>) との配列相同性は 78.4%であった。これまでの研究における大腸菌 16S rRNA の改変限界は 81%であったため、本研究により、さらに 16S rRNA 遺伝子の改変限界が詳細に解明されたとと言える。

## 【改変限界 16S rRNA 遺伝子の機能復帰】

16S<sup>NS11</sup> が機能する大腸菌変異株 NS11 株の生育を、16S<sup>Eco</sup> が機能する Eco 株と比較した。LB 培地の場合、NS11 株の増殖速度（増殖倍化時間）は、Eco 株の  $40.2 \pm 1.2$  min に対し、 $72.6 \pm 1.9$  min と明らかに遅かった（図 2）。また、ラグについてもより長く（NS11 株:  $503 \pm 7.5$  min、Eco 株:  $307 \pm 13$  min）、最大増殖濁度も低かった（NS11 株:  $1.39 \pm 0.07$ 、Eco 株:  $1.59 \pm 0.05$ ）（図 2）。

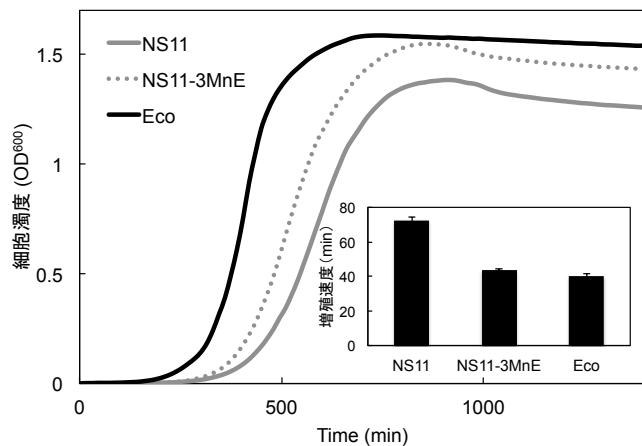


図2 増殖曲線と増殖速度 (LB培地 [Tmp, Km], 37°C)

次に、NS11 株について、16S<sup>NS11</sup> を 16S<sup>Eco</sup> の配列に戻していくことで生育の復帰を試みた。16S rRNA は、5' (5)、Central (Cnt)、3' major (3Mj)、3' minor (3Mn) の 4 つのドメインに大別される。そこで、16S<sup>NS11</sup> の各ドメインを 16S<sup>Eco</sup> に置換したキメラクローン (16S<sup>NS11-5E</sup>、16S<sup>NS11-CntE</sup>、16S<sup>NS11-3MjE</sup>、16S<sup>NS11-3MnE</sup>) を構築し、大腸菌  $\Delta 7$  株での機能相補実験を行った。その結果、16S<sup>NS11-5E</sup> 以外のクローンの大腸菌  $\Delta 7$  株での機能相補性が確認された (NS11-CntE 株、NS11-3MjE 株、NS11-3MnE 株)。これら株の生育観察の結果、NS11-3MjE 株、NS11-3MnE 株は、NS11 株に比べ、増殖速度、ラグ、最大細胞濁度の点で生育が復帰していた（図 2）。特に、NS11-3MnE 株の生育は良好で（図 2）、3' minor ドメインが大腸菌の生育に最も大きな負の影響を与えていたことが明らかとなった。

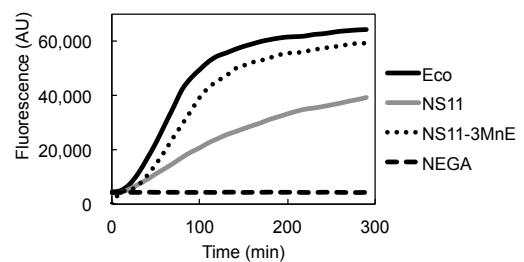


図3 70Sリボソームの翻訳活性

また、大腸菌無細胞翻訳系 PUREfrex システムにより、NS11-3MnE 株とその親クローン (NS11 株、Eco 株) の 70S リボソーム (70S<sup>NS11-3MnE</sup>、70S<sup>NS11</sup>、70S<sup>Eco</sup>) の翻訳活性を比較した。鋳型として、蛍光強度を指標に翻訳効率を評価可能な *gfp* 遺伝子を用い、Mx3000p<sup>TM</sup> qPCR system にてリアルタイムに蛍光強度をモニタリングした。その結果、70S<sup>NS11</sup> の無細胞翻訳系での翻訳活性は、70S<sup>Eco</sup> の場合と比較して約 2/3 であった。一方、70S<sup>NS11-3MnE</sup> では、70S<sup>NS11</sup> の場合と比較し 2.5 倍翻訳活性が向上し、70S<sup>Eco</sup> の翻訳活性に

近づいたことが認められた。

3' minor ドメインは、h44 と h45 の 2 つのヘリックスのみを有す約 150 塩基の最も短いドメインである。しかし、リボソームの生合成<sup>6</sup>や 50S サブユニットとのサブユニット間相互作用<sup>7</sup>に重要な領域であることが知られている。そこで、NS11-3MnE 株とその親クローン (NS11 株、Eco 株) のサブユニット会合様式を、ショ糖密度勾配超遠心法によって観察した。その結果、NS11 株は、Eco 株に比べ 50S サブユニットのピークが高く、30S サブユニット、70S リボソーム、ポリソームの量が少なかった (図 4)。一方、生育の回復が認められた NS11-3MnE 株では、Eco 株と類似したパターンを示した (図 4)。このことから、NS11 株で認められる 30S サブユニットの生合成効率およびサブユニットの会合効率の不良が、NS11-3MnE 株では改善したことが判明した。また、ポリソームの量についても改善したことが分かった。

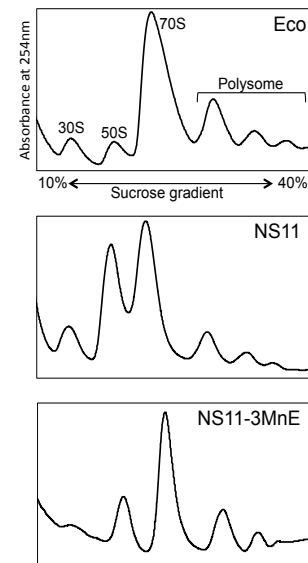


図4 リボソームパターン

#### 【16S rRNA 遺伝子置換変異株のフェノタイプマイクロアレイ解析】

様々な分類群のバクテリア 16S rRNA 遺伝子による約 30 の 16S rRNA 遺伝子置換大腸菌変異株と Eco 株に対し、種々の糖やアミノ酸などの資化性やストレス応答などに関する 95 の試験項目を実施し、フェノタイプマイクロアレイ解析 (OMNIBLOG, GENIII プレート, Biolog) を行った。その結果、機能する 16S rRNA 遺伝子によって、約 2/3 の試験項目で有意な違いが見られた。D-マルトースや L-ラムノースなどの糖、L-アスパラギン酸などのアミノ酸の資化性、pH や浸透圧に対するストレス応答に関わる試験項目において、Eco 株の結果に対し、程度の違いや陽性・陰性の違いも認められた変異株もあった。このことは、16S rRNA 遺伝子の置換により大腸菌リボソーム機能に変化が起こり、それが細胞システムに変動を与えた結果であると解釈できる。

以上より、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換技術は、門レベルで異なるバクテリア由来 16S rRNA 遺伝子である 16S<sup>NS11</sup> (1, 542 塩基中 334 塩基の変異に換算) の置換が確認されたことから明らかな通り、大腸菌 16S rRNA 遺伝子を大規模に改変できる技術だと言える。加えて、16S<sup>NS11</sup> の機能改良から、生育不良を導く変異部位は局所的で、16S rRNA 遺伝子は考えられてきた以上に改変に適した分子であることが示唆された。また、フェノタイプマイクロアレイ解析から、本技術で創成された宿主において細胞システムの変動が認められ、求められる宿主機能によっては、本技術が大腸菌宿主創成の有効な技術になりうると考えられる。

#### 【引用文献】

1. Jain, R. *et al.*, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.
2. Woese, C.R. (1986) *Microbiol. rev.* **51**, 221-271.
3. Asai, T. *et al.*, (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1971-1976.
4. Kitahara, K. *et al.*, (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19220-19225.
5. Tsukuda, M. and Miyazaki, K. (2013) *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 540-545.
6. Xu, Z. and Culver, G.M. (2010) *RNA* **16**, 1990-2001.
7. Yusupov, M.M., *et al.*, (2001) *Science* **292**, 883-896.