

博士論文

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

# 目次

序章	-----1
1. リボソーム	
2. リボソームの変異感受性と 16S rRNA 遺伝子の生物種固有性	
3. 16S rRNA 遺伝子のゲノム内多型とリボソームの柔軟性	
4. 16S rRNA 遺伝子の置換によるリボソームの機能解析	
5. 16S rRNA 遺伝子置換技術の大腸菌リボソーム工学・宿主創成への応用	
6. 本論文の構成と概要	
第1章 16S rRNA 遺伝子置換実験のハイスループット化:RINSPEX 法の開発	-----9
1. はじめに	
2. 16S rRNA 遺伝子置換実験に最適な 16S rRNA 遺伝子増幅 PCR プライマーの設計	
3. 16S rRNA 遺伝子置換変異株の選択薬剤の変更	
4. カウンターセレクション操作の改良	
5. アンチトキシン遺伝子のサイレンシングによるカウンターセレクション法の開発	
6. おわりに	
第2章 機能性異種 16S rRNA 遺伝子の進化系統的限界の探索	-----39
1. はじめに	
2. 材料と方法	
3. 結果と考察	
4. おわりに	
第3章 ドメインキメラ解析による 16S <sup>NS11</sup> の機能解析	-----53
1. はじめに	
2. 材料と方法	
3. 結果と考察	
4. おわりに	

第4章 16S rRNA 遺伝子置換型大腸菌の表現型変化-----	63
1. はじめに	
2. 材料と方法	
3. 結果と考察	
4. おわりに	
終章-----	89
1. 本研究の成果	
2. 今後の展望	
実験手法の詳細-----	93
1. 試薬	
2. 機器	
3. 方法	
業績-----	99
謝辞-----	101

# 序章

## 1. リボソーム

### 1-1. リボソームの構造

リボソームは、すべての生物に共通する「翻訳装置」であり、3つのRNAと50余りのタンパク質が複雑に組み合わさった巨大分子である（図1）。バクテリアのリボソームは70Sの沈降係数を持ち、大小二つのサブユニット（30Sおよび50Sサブユニット）から構成され、大腸菌のリボソームの総分子量は2.7 MDaにのぼる。両サブユニットとも、その構造的・機能的中心はRNAが担う。30Sサブユニットでは、16S ribosomal RNA (rRNA)がそれにあたり、21個のリボソーマルタンパク質がその周りを取り囲んでいる<sup>1-2</sup>。50Sサブユニットでは、23S rRNAが中心骨格となり、その周りに5S rRNAと33個のリボソーマルタンパク質が配置されている<sup>3-4</sup>。

このように巨大かつ複雑なリボソームの分子構造解明に向けて、世界中のグループが激しくしのぎを削ったが、2000年にはYonathら<sup>1</sup>、Ramakrishnanら<sup>2</sup>により *Thermus thermophilus* の30Sサブユニットの構造が解明され、同年Steitzらにより *Haloarcula marismortui* の50Sサブユニット構造<sup>3</sup>が解明された。2001年にはYonathらにより *Deinococcus radiodurans* の50Sサブユニットの構造<sup>4</sup>が解明され、同年Nollerら<sup>6</sup>により *Thermus thermophilus* の70Sリボソームの構造が解明された。さらに2005年にはCateらにより大腸菌70Sリボソーム<sup>5</sup>の構造が解明され、2006年にはRamakrishnanら<sup>7</sup>により *Thermus thermophilus* の70Sリボソームの高解像度構造が解明された。

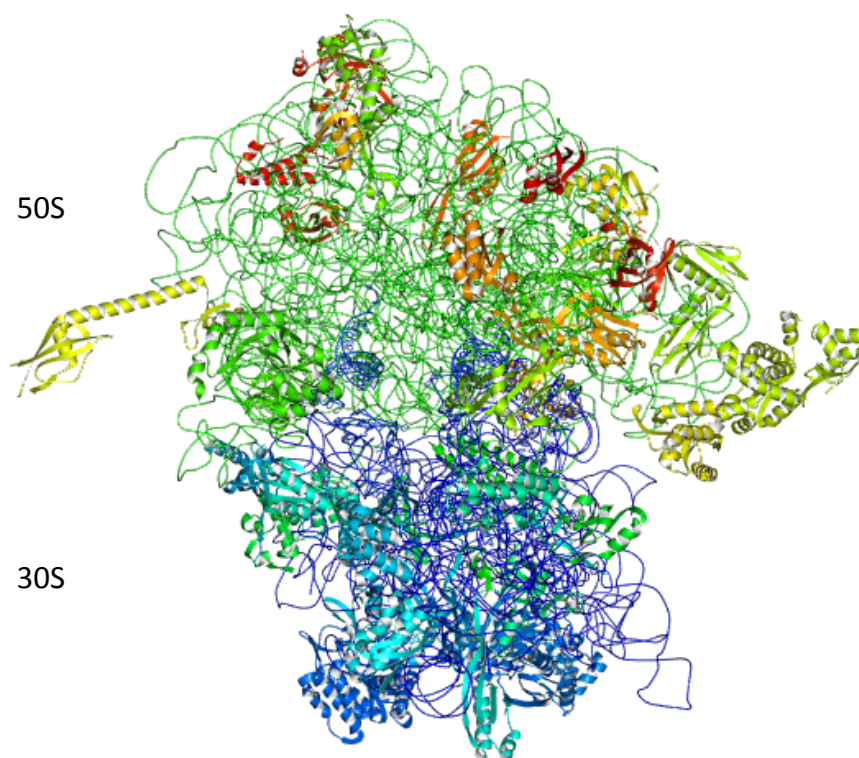


図1 *Thermus thermophilus* の70S リボソームの立体構造 (PDB: 4V42<sup>6</sup>)  
図は MolMil 分子ビューワ (PDBj) により作成した。



## 1-2. リボソームの翻訳機構

リボソームによる翻訳過程は、messenger RNA (mRNA) にコードされた遺伝暗号を解読し、タンパク質へと変換する一連の反応である。翻訳過程は、開始・伸長・終結の三段階に大別され、反応の過程で30Sサブユニットと50Sサブユニットとが会合と解離を繰り返す。

開始段階では、遊離状態にある30Sサブユニットが翻訳開始因子の助けを借りmRNAに結合する。この結合は、16S rRNAの3'末端にあるアンチ-シャイン-ダルガーノ配列 (ASD配列) と mRNAの開始コドン上流に位置するリボソーム結合部位 (シャイン-ダルガーノ配列 [SD配列]) の相補性に基づく。その後、開始tRNA (fMet-tRNA)、50Sサブユニットが複合体に結合し、翻訳開始因子の脱離などを経て70S開始複合体が完成する。伸長段階では、まず、2番目のコドンに対応するアミノアシルtRNAがA部位に結合し、次にP部位に結合した開始tRNA上のアミノ酸 (メチオニン) を次のtRNAに引き渡し (ペプチド転移反応)、ペプチド結合が形成される。リボソームはmRNA上を3'末端側に1コドンずつ移動し、次の伸長サイクルに入る。トランスロケーションと呼ばれるこのリボソームのmRNA上の移動は、30Sサブユニットが50Sサブユニットに対してつめ車 (ラチェット) に似た運動<sup>8</sup>による (<https://www.youtube.com/watch?v=JsP7Nr-7zKo>)。70Sリボソームは、このラチェット様運動を繰り返し、ポリペプチド鎖を伸長させるが、リボソームのA部位に終止コドンに対応するtRNAが対合すると、翻訳も終結段階を迎える。ポリペプチド鎖はリボソームから遊離し、70Sリボソームはサブユニットに解離、再び開始段階に戻る。

## 1-3. リボソームの生合成

リボソームの生合成は、rRNA とリボソーマルタンパク質の他に、RNase や RNA ヘリカーゼ、GTPase など種々の因子が関わる複雑な過程である。rRNA は、まず前駆体として合成されたのち、RNase による切断や塩基修飾などのプロセッシングを受ける。rRNA の高次構造の形成は、修飾塩基などを指標に進行し、その過程でリボソーマルタンパク質が段階的に組み込まれていく<sup>9</sup>。

## 2. リボソームの変異感受性と 16S rRNA 遺伝子の生物種固有性

上述の通り、リボソームは、分子構造、反応機構、生合成過程のいずれも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、各生物において協調的な進化を辿り、生物種間で移動 (水平伝播) することはないと考えられてきた<sup>10</sup>。このような特性から、16S rRNA 遺伝子は生物種固有であると広く認識されており、バクテリアの進化系統分類の指標として使われてきた<sup>11</sup>。

16S rRNA 遺伝子は生物種間で水平伝播しない (であろう) と同時に、点変異に対しても感受性が高い。Laios らは、大腸菌の 16S rRNA 遺伝子に対しランダム変異を導入したところ、同時に変異導入できる塩基数は、1,542 塩基中せいぜい 15 個程度であることを報告している<sup>12</sup>。また、Yassin らは、16S RNA 遺伝子へのランダム変異の多くが、リボソームの翻訳活性に有害であることを報告している<sup>13</sup>。

## 3. 16S rRNA 遺伝子のゲノム内多型とリボソームの柔軟性

大腸菌 (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655) のゲノムには、7つの rRNA オペロン (*rrn* オペロン: *rrnA*, *rrnB*, *rrnC*, *rrnD*, *rrnE*, *rrnG*, *rrnH* オペロン) がコードされている。これらのオペロンに含まれる 16S

rRNA 遺伝子 (*rrsA*, *rrsB*, *rrsC*, *rrsD*, *rrsE*, *rrsG*, *rrsH*) に着目すると、*rrsB* と *rrsE* が完全に同一配列である他は、互いに 1 塩基から最大 19 塩基の違いが見られる (図 2)。このゲノム内の 16S rRNA 遺伝子の多型は、大腸菌特有の現象ではなく、ゲノム内に複数の rRNA オペロンを持つ多くの生物種で普遍的に見られる。

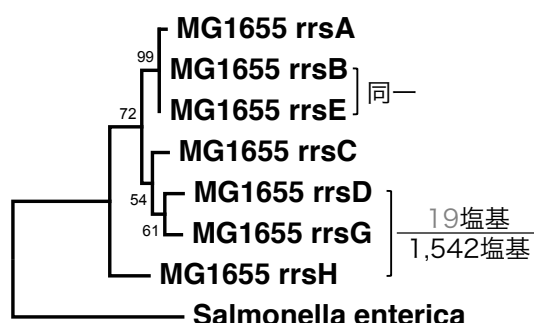


図 2 大腸菌 16S rRNA 遺伝子の進化系統樹

大腸菌 (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655) ゲノムにコードされている 7 つの 16S rRNA 遺伝子および外群である *Salmonella enterica* の 16S rRNA 遺伝子を SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) により整列し、Neighbor-joining 法<sup>14</sup> により系統樹を作成した。Bootstrap は 1,000 回施行した。

さらに、種間 (*Escherichia* と *Salmonella*<sup>15</sup>, *Actinomycetes*<sup>16</sup>) または種内 (*Rizobium*<sup>17</sup>, *Vibrio cholerae*<sup>18</sup>, *Bradyrhizobium*<sup>19</sup>, *Thermomonospora*<sup>20</sup>, *Streptococcus anginosus*<sup>21</sup>) において、16S rRNA 遺伝子 (全長あるいは部分的) の水平伝播が報告されている。これらのことは、リボソーム、および微生物 (細胞) が、16S rRNA 遺伝子の「ゆらぎ」に対してある程度寛容であることを意味している。

#### 4. 16S rRNA 遺伝子の置換によるリボソームの機能解析

16S rRNA 遺伝子がある程度の配列変化を許容するのであれば、それはどの程度か? どの部位がどのように変わりうるのか? —これらの問いに答えるべく、当研究室では 16S rRNA 遺伝子の全体を異種のものとして置換するという方法により、それを探った<sup>22-23</sup>。大腸菌と近縁な微生物の 16S rRNA 遺伝子であれば、大腸菌の遺伝子欠損を相補できるのではないかと考えたのである。本手法では、染色体上に含まれる 7 つの rRNA オペロンをすべて欠損している大腸菌 Δ7 株 (KT101 株) (Δ*rrnG* Δ*rrnA* Δ*rrnD* Δ*rrnE* Δ*rrnH* Δ*rrnB* Δ*rrnC*, *rna::Km<sup>R</sup>*, pTRNA67, pRB101)<sup>24-25</sup> を用いる。KT101 株は、rRNA の欠損を補うための *rrnB* オペロンがコードされたレスキュープラスミド pRB101 (アンピシリン耐性 [Ampicilin<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup>], pSC101 ori, *sacB*) に加え、rRNA オペロンを染色体上から欠失する際に rRNA 遺伝子とともに欠損された tRNA 遺伝子を補うための pTRNA67 (スペクチノマイシン耐性 [Spectinomycin<sup>R</sup>, Spc<sup>R</sup>], p15A ori) により生育が相補されている。また、本宿主株は、RNase I の遺伝子欠損株 (*rna* 遺伝子がカナマイシン耐性遺伝子で置換されている) であり、変異リボソーム、16S rRNA の安定性を維持するよう工夫が凝らされている。

具体的な実験手順を図 3 に示す<sup>22-23</sup>。まず、様々な環境由来のメタゲノムを鋳型に 16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーを用い、多種多様なバクテリア 16S rRNA 遺伝子ライブラリーを PCR 増幅する。得られた異種 16S rRNA 遺伝子を、異種 16S rRNA を発現させるプラスミド pRB103 (ゼオシン耐性 [Zeocin<sup>R</sup>, Zeo<sup>R</sup>], pSC101 ori) にコードされた *rrnB* オペロンの 16S rRNA 遺伝子と交換し、異種 16S rRNA 遺伝子と大腸菌 23S rRNA (*rrlB*) 遺伝子、大腸菌 5S rRNA (*rrfB*) 遺伝子により構成されるキメラ rRNA オペロンを

構築する。次に、pRB103 を KT101 株に導入し、さらにスクロースカウンターセクションによりレスキュープラスミド pRB101 を脱落した宿主を選択する。異種 16S rRNA が大腸菌リボソームのその他成分と和合し、機能的であれば Δ7 株の生育が相補され、形質転換体（KT103 株）が得られるという仕組みである。

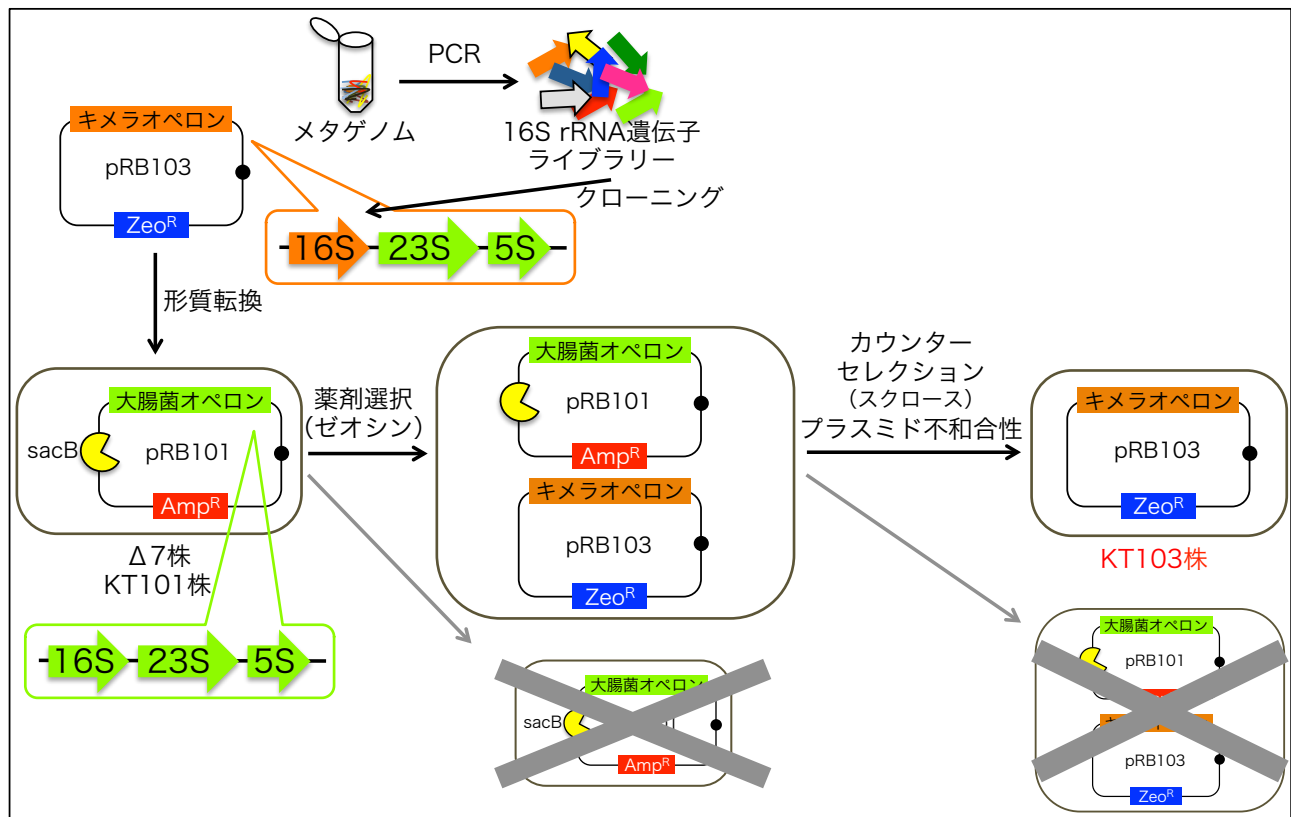


図3 大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換法の手順

置換に用いる 16S rRNA 遺伝子の給源には、分離菌株ゲノムやメタゲノムを用いる。16S rRNA 遺伝子の両末端は、全バクテリア間で保存性が高いため、ユニバーサルプライマー (Bac8f と UN1541r) を用いることで、多種多様なバクテリア 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅できる。増幅断片を、pRB103 にコードされた *rrnB* オペロン (16S rDNA、23S rDNA、5S rDNA の順に並ぶ) の 16S rDNA 部位にクローニングする。異種 16S rDNA を含む pRB103 により KT101 を形質転換し、ゼオシン (Zeo) を含む LB 寒天プレート培地で選択し、KT101 内株に pRB101 と pRB103 が共存する株を獲得する。次に、スクロースを含む LB 寒天プレート培地で、pRB101 を脱落し、pRB103 により生育を相補される株を選択する。

上記手順に従い、大腸菌 Δ7 株の機能相補実験をおこなった結果、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に由来する 16S rRNA 遺伝子の他、別綱のベータプロテオバクテリア綱に由来する 16S rRNA 遺伝子が生育を相補しうることが確認された<sup>23</sup>。大腸菌 16S rRNA (*rrsB*) と進化系統上、最も遠縁の 16S rRNA 遺伝子はベータプロテオバクテリア綱由来のものであり、配列相同性としては 81%であった<sup>23</sup>。

リボソームあるいは 16S rRNA は、その複雑性と変異に対する感受性の高さから、水平伝播しない遺伝子の代表格として捉えられてきた。これに対し、水平伝播を模した「16S rRNA 遺伝子の置換実験」により我々が得た結果 — 綱を超えた種間和合性 — は、16S rRNA 遺伝子あるいはリボソーム全体が、水平伝播を許容するほどに機能的・構造的な柔軟性に富むことを示唆している<sup>23</sup>。

## 5. 16S rRNA 遺伝子置換技術の大腸菌リボソーム工学・宿主創成への応用

「16S rRNA を大規模に改変可能である」という発見は、リボソームの機能解析手段として新たな局面を拓いた。それとともに、私は、この方法を駆使することで、これまで機能解析が中心に行われてきたリボソーム研究に風穴を開け、「機能改良」にまで踏み込めるのではないかと考えた。かつて、自然界で進化してきた酵素やタンパク質は、その生物の生育条件で「最大」の機能を発揮すると思われていた。しかし、実際には必ずしもそうではなく、多くの酵素やタンパク質の機能に十分に改良の余地があることが明らかとなった。今では工業用酵素などの開発において、「進化分子工学」などの手法により機能改良することが当たり前になっている。これと同様、リボソームにおいても、それが究極的に進化したものではなく、改良の余地があるのではないかと考えたわけである。本研究では、かつて試みられることのなかった「リボソームの進化分子工学」の可能性を探索すべく、16S rRNA 遺伝子の置換技術を中心にリボソーム進化工学に必要な要素技術を開発し、リボソームの解析から改変・改良へと発展させることを目指した。

本研究で材料として扱うリボソームの起源生物は大腸菌である。大腸菌は、学術的な目的（遺伝子工学）から工業利用（物質生産）まで最も頻用される宿主微生物である。そのため、クローニング・発現ベクターの開発から多様な宿主開発まで、数多くの開発・改良がなされてきた。特にタンパク質の大量発現を目的とした解決策については、これまでに数々の方法が提案されてきた。

タンパク質は、転写・翻訳・タンパク質フォールディングを経て発現（生産）されるが、転写段階では、T7 や taq などの強力プロモーターが開発され、多くの発現ベクターに組み込まれている。翻訳段階では、大腸菌レアコドンに対する tRNA の発現プラスミドの開発や、宿主の遺伝子特性（コドン使用や mRNA の高次構造など）に合わせ遺伝子配列を合成する方法が確立されている。フォールディング段階では、分子シャペロンの添加や低温培養によるフォールディング効率化、可溶化タグの導入等の方法が提示されている。このように多大な研究がなされてきたが、それでもなお多くの試行錯誤を要することも少なくない。

発現特性の改良という点では一見同種の問題ではあるが、特定の遺伝子を大量発現させるのではなく、幅広い生物種の遺伝子を網羅的に発現するといった要請もある。例えば、環境メタゲノムのショットガンライブラリーを構築し、活性に基づくスクリーニングをおこなう場合などがこれにあたる。給源となるメタゲノムには、大腸菌と近縁な微生物のみならず、遠縁のものも含まれる。これまで、宿主微生物と進化系統的に近縁であればその遺伝子も比較的スムーズに発現するが、遠縁であれば転写・翻訳装置とのミスマッチから発現不良となることも知られている<sup>26-28</sup>。こうした新たなニーズに応えるためにも、新たな観点から発現問題に取り組むことは有意義なのではないかと考えられる。

このような大腸菌における異種遺伝子発現問題の背景を受け、大腸菌 16S rRNA 遺伝子の置換技術は、翻訳装置リボソームに従来にない手法でメスを入れ、新たな宿主機能を引き出せるのではないかと考えた。特に、16S rRNA 遺伝子は環境中に無尽蔵に存在していることから、リボソーム機能・宿主機能の変化度もそれに応じた多様性を示すことも期待される。さらに、16S rRNA 遺伝子の置換による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、そしてフェノタイプを変化させると予想される。それゆえ、リボソームの特性を改変することが、大腸菌の細胞システムを変動し、システム全体として新たな機能を創出することもありうるのではないかと考えた。リボソーム工学の宿主創成技術としての応用である。

## 6. 本論文の構成と概要

本博士論文は本章（序章）に始まり、第1章から第4章、そして終章で構成されている。

「第1章」では、大腸菌における 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実験改良に関して記載した。メタゲノムを鋳型に 16S rRNA 遺伝子を増幅する際のプライマー配列の再検討、カウンターセレクションの実験操作の最適化、異種 16S rRNA 発現プラスミドの選択薬剤の変更をおこなった。これらの改良を加えた 16S rRNA 置換実験法を「RINSPEX (Ribosomal RNA Interspecies Exchange)」と名付け、第2章以下の研究に用いた。なお、カウンターセレクション操作の安定性（偽陽性、偽陰性の出現）が機能スクリーニングの際に大きな問題となることも予想されたため、新規なカウンターセレクション手法についても開発した。最終的に RINSPEX 法には組み込まれることはなかったが、合わせて記載してある。

「第2章」では、RINSPEX 法により、大規模な 16S rRNA 遺伝子の置換変異株ライブラリーを構築した。特に、「大腸菌リボソーム成分の種間和合性の範囲を特定する」という興味から、大腸菌と進化系統的に乖離した（配列相同性の低い）微生物由来の 16S rRNA を探索することを第一義的におこなった。「大腸菌 16S rRNA の配列自由度 ―どこをどの程度、どのように変えられるのか？」を知ることは、今後リボソーム工学を進める際の重要な指針ともなる。

「第3章」では、第2章で得た KT105 変異株のうち、大腸菌とは最も遠縁な微生物（アシドバクテリア）由来の 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>NS11</sup>) の機能解析を、キメラ解析の手法によりおこなった。その結果、16S<sup>NS11</sup> によって生育を相補された KT105 株 NS11 株の生育不良に関わる重要部位が 16S<sup>NS11</sup> 遺伝子全体に散在するのではなく、3' minor ドメインに集中していることを突き止めた。また生化学実験により、16S<sup>NS11</sup> の 3' minor ドメインがもたらす機能低下の要因は、30S サブユニットのアッセンブリー効率の低下と 30S-50S サブユニット間相互作用の低下に起因すると結論された。さらに 3' minor ドメイン内の点変異解析の結果、わずか一組の塩基対変異（2 塩基の変異）で、リボソーム機能（宿主株の増殖）がドメイン全体の置換に匹敵することを見出した。本章では、RINSPEX 法でおこなった遺伝子全長を置換する手法に加え、ドメインベースでの置換も 16S rRNA の改変手法として利用可能であることを確認し、進化工学を進めていく上での有効な変異手法として付け加えることとした。

「第4章」では、16S rRNA 遺伝子が置換された大腸菌変異株の表現型変化を、フェノタイプマイクロアレイ解析により検証した。本章では、16S rRNA 遺伝子置換によりもたらされる宿主大腸菌の表現型変化の範囲を詳細に知ること、今後、宿主工学として発展させることの可否・是非と方向性を検討した。そのため、第2章で得られた変異株を材料に、多数の検査項目に対する変異株の挙動を調べた。

「終章」では第1章から第4章までの結果を総括し、今後の展望を述べている。

### 《引用文献》

1. Schluedermeier, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. (2000) Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell* **102**, 615-623.
2. Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Jr, W.M.C., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000) Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**, 327-339.

3. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**, 905-920.
4. Harms, J., Schlutzenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679-688.
5. Scuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M. and Cate, J.H. (2005) Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* **310**, 827-834.
6. Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896.
7. Selmer, M., Dunham, C.M., Murphy, F.V. 4<sup>th</sup>, Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A.C., Weir, J.R. and Ramakrishnan, V. (2006) Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science* **313**, 1935-1942.
8. Frank, J. and Agrawal, R.K. (2000) A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**, 318-322.
9. Shajani, Z., Sykes, M.T. and Williamson, J.R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 501-526.
10. Jain, R., Rivera, M.C. and Lake, J.A. (1999) Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.
11. Woese, C.R. (1986) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
12. Laios, E., Waddington, M.S., Saraiya, A.A., Baker, A.K., O'Connor, E., Pamarathy, D. and Cunningham, R.P. (2004) Combinatorial genetic technology for the development of new anti-infectives. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **128**, 1351-1359.
13. Yassin, A., Fredrick, K. and Mankin, A.S. (2005) Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16620-16625.
14. Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
15. Cilia, V., Lafay, B. and Christen, R. (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 451-461.
16. Wang, Y. and Zhang, Z. (2000) Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiol.* **146**, 2845-2854.
17. Eardly, B.D., Nour, S.M., van Berkum, P. and Selander, R.K. (2005) Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: Mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1328-1335.

18. Lan, R. and Reeves, P.R. (1998) Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiol.* **144**, 1213-1221.
19. Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. and Kataoka, M. (1999) Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.* **181**, 78-82.
20. Yap, W.H., Zhang, Z. and Wang, Y. (1999) Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J. Bacteriol.* **181**, 5201-5209.
21. Schouls, L.M., Schot, C.S. and Jacobs, J.A. (2003) Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J. Bacteriol.* **185**, 7241-7246.
22. Kitahara, K. and Miyazaki, K. (2011) Specific inhibition of bacterial RNase T2 by helix 41 of 16S ribosomal RNA. *Nat. Commun.* **2**, 549.
23. Kitahara, K., Yasutake, Y. and Miyazaki, K. (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19220-19225.
24. Asai, T., Zaporozets, D., Squires, C., Squires, C.L. (1999) An *Escherichia coli* strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1971-1976.
25. Kitahara, K. and Suzuki, T. (2009) The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **34**, 760-766.
26. Hosokawa-Okamoto, R. and Miyazaki, K. (2011) *Escherichia coli* host engineering for efficient metagenomic enzyme discovery. *Metagenomics: Current Innovations and Future Trends* (ed. D. Marco), Horizon Scientific Press, pp. 241-252.
27. Uchiyama, T. and Miyazaki, K. (2009) Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 616-622.
28. Engel, K., Ashby, D., Brady, S.F., Cowan, D.A., Doemer, J., Edwards, E.A., Fiebig, K., Martens, E.C., McCormac, D., Mead, D.A., Miyazaki, K., Moreno-Hagelsieb, G., O'Gara, F., Reid, A., Rose, D.R., Simonet, P., Sjøling, S., Smalla, K., Streit, W.R., Tedman-Jones, J., Valla, S., Wellington, E.M., Wu, C.C., Liles, M.R., Neufeld, J.D., Sessitsch, A. and Charles, T.C. (2013) Meeting report: 1st international functional metagenomics workshop May 7-8, 2012, St. Jacobs, Ontario, Canada. *Stand. Genomic Sci.* **8**, 106-111.

# 第1章 16S rRNA 遺伝子置換実験のハイスループット化： RINSPEX 法の開発

本章では、16S rRNA 遺伝子置換技術のハイスループット化をおこなった。具体的には、異種 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅する際のプライマーの改良、異種 16S rRNA 遺伝子の発現プラスミド pRB103 の薬剤耐性マーカーの変更、スループットの限界を規定していたカウンターセクション操作の改善や新規カウンターセクションシステムの開発をおこなった。

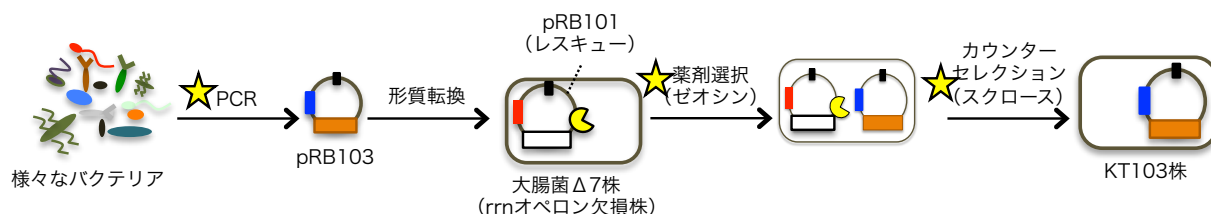
プライマー改良では、天然の 16S rRNA 遺伝子とプライマー配列のミスマッチが引き起こす宿主の低温感受性の問題を回避する新規なプライマーを設計した。

pRB103 の薬剤耐性マーカーについては、これまで選択薬剤として利用してきたゼオシンを高濃度または長時間利用することにより細胞内ゲノム DNA の断片化を引き起こす現象を見出したことをきっかけに、選択薬剤をトリメトプリムに変更した。これに伴い、pRB103 の薬剤耐性マーカーを変更した。

以上、これらの改良点を盛り込んだ大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換技術を、“RINSPEX (Ribosomal RNA InterSpecies EXchange) 法”と命名した。

**キーワード**：16S rRNA 遺伝子ユニバーサルプライマー、ゼオシン、カウンターセクション、RINSPEX 法、トキシソ-アンチトキシソシステム、発現アンチセンス法

## 【16S rRNA 遺伝子の置換技術のハイスループット化】



### ★16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーの設計

Bac8f による塩基置換に伴う 16S rRNA ヘリックス h2 の構造変化  
→ 増殖特性の変化（低温感受性）  
→ Bac1f および UN1542r の設計

### ★選択薬剤の変更

ゼオシンの DNA 断片化現象の確認 → トリメトプリム

### ★カウンターセクション操作の改善

1 検体ずつのスポットテスト → 全クローン同時に試験  
アンチトキシソのサイレンシングによるカウンターセクションシステムの開発

**“RINSPEX 法”**  
(Ribosomal RNA InterSpecies EXchange)



## 1. はじめに

当研究室で開発された 16S rRNA 遺伝子置換技術では、16S rRNA 遺伝子の給源にメタゲノムを利用することに特徴がある。1 グラムの土にも数百万種の微生物が含まれている事実に鑑みると、16S rRNA 遺伝子は事実上、無尽蔵な生物資源と言える。この資源を最大限に生かすことで「16S rRNA 遺伝子置換に基づくリボソーム機能改変」の特徴が最大化される。しかし、これまでの実験系では、機能選択の工程に律速段階があり（スクロースカウンターセクションが 1 クローンずつ手作業で行われていた）、ハイスループットなスクリーニングがなされていなかった。そこで従来の実験工程を抜本的に見直し、本技術が最大限に生きる実験系の完成を目指した。

## 2. 16S rRNA 遺伝子置換実験に最適な 16S rRNA 遺伝子増幅 PCR プライマーの設計

### 2-1. はじめに

16S rRNA 遺伝子は、全バクテリア間で高度に保存されている。特に、16S rRNA 遺伝子の両末端配列は高度に保存され、進化系統解析で多用されるユニバーサルプライマー Bac8f (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) と UN1541r (AAGGAGGTGATCCARCC)<sup>1</sup> を使えば幅広い系統群からほぼ全長の 16S rRNA 遺伝子を増幅可能である。当研究室で開発された 16S rRNA の置換実験も、当初は Bac8f/UN1541r プライマーを使って行われていた。しかし、全バクテリアの 16S rRNA 遺伝子の両末端配列が完全に一致しているわけではない。16S rRNA 遺伝子によっては、ユニバーサルプライマーの配列と異なる部位があり、PCR により塩基置換が起こる可能性がある。私は、16S rRNA 遺伝子置換実験において、Bac8f の配列と天然の 16S rRNA 遺伝子配列にミスマッチがある場合、PCR により塩基置換が起こり、それが宿主に対して低温感受性という表現型を与える場合があることを見出した。このことは、16S rRNA の機能評価をおこなう上で大きな問題となる。そこで、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子置換実験に適した PCR プライマーを新たにデザインすることとした。

### 2-2. 材料と方法

#### 2-2-1. 16S rRNA 遺伝子の獲得、pRB103 へのクローニング、Δ7 株への導入と機能相補実験

16S rRNA 遺伝子の給源として、研究室所蔵の分離菌株（大腸菌が属するガンマプロテオバクテリア綱から同門のベータプロテオバクテリア綱、アルファプロテオバクテリア綱、そして、門レベルで異なるファーミキューティス門、デインコッカス-サーマス門、ユリアーキオータ門に属する進化系統的に多様な分離菌株 14 種：表 1）由来のゲノムを用いた。遺伝子のクローニングから機能スクリーニングまでの工程は、すでに研究室で確立されていた方法<sup>2-3</sup>に従った。

より具体的には、まず、分離菌株ゲノムを鋳型に Bac8f と UN1541r を用いて PCR をおこない、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅した。DNA ポリメラーゼには KOD-FX-Neo を用いた。一方、異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミド pRB103 (pSC101 ori、Zeo<sup>R</sup>) については、Bac8f と UN1541r に相補的なプライマー Bac8r (CTGAGCCATGATCAAACCTCTTCAATTTAAAAGTTTGA) と UN1541f (GGTTGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAAGCG) を用いてインバース PCR により増幅し、16S rRNA 遺伝子領域が欠失した直鎖状プラスミドを得た。PCR 用の DNA ポリメラーゼには KOD-Plus-Neo を用いた。こうして得られた 16S rRNA 遺伝子、

ベクター断片を In-Fusion HD Cloning Kit により連結し、組換えプラスミドを得た。次に、それぞれの 16S rRNA 遺伝子がコードされた pRB103 により大腸菌 Δ7 株 (KT101 株) を形質転換し、カウンターセクション操作を経て KT103 変異株を得た。

## 2-2-2. 分離菌株由来の KT103 株の温度感受性の観察

37°Cでの生育相補実験により生育の確認された KT103 変異株について、各コロニーを爪楊枝でつつき、6 枚の寒天プレート培地 (LB Lennox、1.5% Agar、100 μg/ml Zeo、25 μg/ml Km [今後、断りがない場合、この濃度で使用]) にストリークした。各プレートを 15°C、20°C、28°C、37°C、42°C、50°Cの恒温器で 24 時間から最長 1 週間培養し、コロニー形成能から温度感受性を評価した。

## 2-2-3. 16S rRNA 遺伝子置換実験に適したプライマーの設計

NCBI データベース (August, 2014) に登録された 23 の分類群のバクテリアのゲノム DNA (2,476 種) から、16S rRNA 遺伝子 (9,624 種) の 5'末端と 3'末端配列を抽出し、MEGA 6.0<sup>5</sup>を用いて整列し、サイトごとの塩基頻度を算出した。

## 2-3. 結果と考察

### 2-3-1. Bac1f/UN1541r プライマーを用いた 16S rRNA 遺伝子置換と宿主変異株の生育温度域

表 1 に示す系統的に多様な微生物ゲノムを鋳型に Bac8f および UN1541r を用いて 16S rRNA 遺伝子を増幅したところ、いずれにおいても問題なく PCR 増幅が可能であった。これらのプライマーは元来、環境中の微生物の菌叢解析に広く用いられており、本実験においても、系統的に多様なバクテリアから効率的に PCR 増幅が可能であることが確認された。

略称	株名	系統分類	PCR増幅	機能相補試験	相同性 to 16S <sub>Eco</sub>
Eco	<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria	○	○	100%
Sfi	<i>Serratia ficaria</i>		○	○	95%
Slu	<i>Spirillum lunatum</i>		○	×	85%
Oho	<i>Oxalibacterium flavum</i>		○	○	82%
Cma	<i>Caldimonas manganoxidans</i>		○	○	81%
Hfl	<i>Hydrogenophaga flava</i>		○	○	81%
Our	<i>Oligella urethralis</i>		○	×	81%
Asp	<i>Achromobacter spanius</i>		○	×	81%
Sto	<i>Sulfolobus tokodaii</i>		○	×	81%
Bsa	<i>Burkholderia sacchari</i>		○	○	79%
Cle	<i>Caulomobacter ledyia</i>		○	×	78%
Oih	<i>Oceanobacillus iheyensis THE831</i>		○	×	77%
Gvu	<i>Geobacillus vulcani</i>		○	×	76%
Tth	<i>Thermus thermophiles</i>	Deinococcus-Thermus	○	×	75%
Pho	<i>Pyrococcus horikoshii OT3</i>	Euryarchaeota	○	×	75%

表 1 分離株ゲノムを用いた機能相補試験：16S rRNA 遺伝子の給源と機能相補結果

置換実験に用いた分離菌株の系統分類をまとめた。また、「PCR 増幅」の欄には、各分離菌株ゲノムを鋳型に Bac8f と UN1541r にて PCR した際、増幅が確認された場合を○、確認されなかった場合を×で示した。「機能相補試験」の欄には、各々の分離菌株由来の 16S rRNA 遺伝子の、大腸菌 Δ7 株における機能相補が確認された場合を○、確認されなかった場合を×で示した。また、分離菌株由来の 16S rRNA 遺伝子 (プライマーのアニール部位を除く) の大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sub>Eco</sub>) との配列相同性も示した。

次に、増幅された 16S rRNA 遺伝子断片を pRB103 に組み込み、機能相補実験に供したところ、大腸菌と同じガンマプロテオバクテリア綱に属する 1 種 (Sfi)、および、同門別綱であるベータプロテオバクテリア綱に属する 4 種 (Oho、Cma、Hfl、Bsa) の 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Sfi</sup>、16S<sup>Oho</sup>、16S<sup>Cma</sup>、16S<sup>Hfl</sup>、16S<sup>Bsa</sup>) の機能相補が確認された (表 1)。ただし、機能相補が確認された分類群 (ガンマプロテオバクテリア綱とベータプロテオバクテリア綱) においても全ての 16S rRNA 遺伝子が機能相補するわけではなく、Slu、Our、Asp、Sto、Cle の 16S rRNA 遺伝子によっては機能相補されなかった (表 1)。

次に、5 種の KT103 変異株および大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Eco</sup>) により生育相補された Eco 株について温度感受性試験をおこなった。15°C から 50°C の範囲で、寒天プレート上での生育を検証した結果、28°C より高温域 (28°C、37°C、42°C) ではいずれの株においても生育が認められ、50°C ではいずれの株においても生育は認められなかった (表 2)。一方、28°C より低い温度 (15、20°C) では、いくつかの株において低温感受性が見られた。ベータプロテオバクテリア綱由来の 16S rRNA 遺伝子により生育相補された KT103/Hfl 株は、15°C および 20°C で増殖が確認されず、同じく KT103/Bsa 株は、15°C で増殖が確認されなかった (表 2)。

KT103株	15°C	20°C	28°C	37°C	42°C	50°C
Eco	○	○	○	○	○	×
Sfi	○	○	○	○	○	×
Cma	○	○	○	○	○	×
Hfl	×	×	○	○	○	×
Oho	○	○	○	○	○	×
Bsa	×	○	○	○	○	×

表2 KT103株のLB寒天プレート培地上での温度感受性  
1週間以内に増殖が確認された場合は○、確認されなかった場合は×

16S<sup>Eco</sup> の変化による低温感受性は、1993 年に Dammel らによって始めて報告された<sup>4</sup>。

16S<sup>Eco</sup> への C23U 変異が、5'末端の Pseudoknot 構造を変化させ、それに伴い大腸菌が低温感受性になることが明らかにされている<sup>4</sup>。この Pseudoknot 構造の 5'側の領域は、Bac8f プライマーのアニール領域に重なっている。

Bac8f を用いた PCR 増幅前後の 16S rRNA 遺伝子の 5'末端配列を比較したところ、低温感受性を示す株では、16S rRNA (16S<sup>Hfl</sup> と 16S<sup>Bsa</sup>) 内に PCR 増幅の際に生じた 19 番目の塩基に置換が確認された。すなわち本来 19C である塩基が 19A と置換されていた。これが Pseudoknot 構造に変化を引き起こし (図 1)、KT103/Hfl 株と KT103/Bsa 株が低温感受性になったと考えられる。

## 2-3-2. 16S rRNA 遺伝子の両末端配列の保存性と新規 16S rRNA 遺伝子増幅用プライマーの設計

Bac8f プライマーに起因する低温感受性の問題を解決するため、新規なプライマーを設計することとした。進化系統的に多様な微生物群より、可能な限り網羅的に 16S rRNA 遺伝子を獲得できるよう、バクテリア全般の 16S rRNA 遺伝子配列を NCBI より抽出・整列し、5'、3'両末端配列の保存性を調べた (図 2)。

まず 5'末端側に着目すると、全バクテリアを通し、19 番目の塩基を除き、8 番から 27 番目の塩基までが高度に保存されていた (図 2A)。Eden らによって作成された Bac8f<sup>1</sup> は、この高度に保存された領域をカバーするので、確かに様々な系統群のバクテリア 16S rRNA に対してハイブリダイズしうることが確認された。しかし、19 番目の塩基は、全バクテリア 16S rRNA 遺伝子中、大腸菌と同じアデニン (A) であるものが約 20%で、残りのほとんどがシトシン (C) であった (図 2A)。また、8 番目の塩基より上流は多様度が高い (保存性が低い) ことがわかった。上記の解析結果を踏まえ、5'末端側については、保存性が低い 19 番目の塩基にかからない領域でプライマーを設計することとした。同時に、1 番から 7 番目の塩基は 16S rRNA の成熟



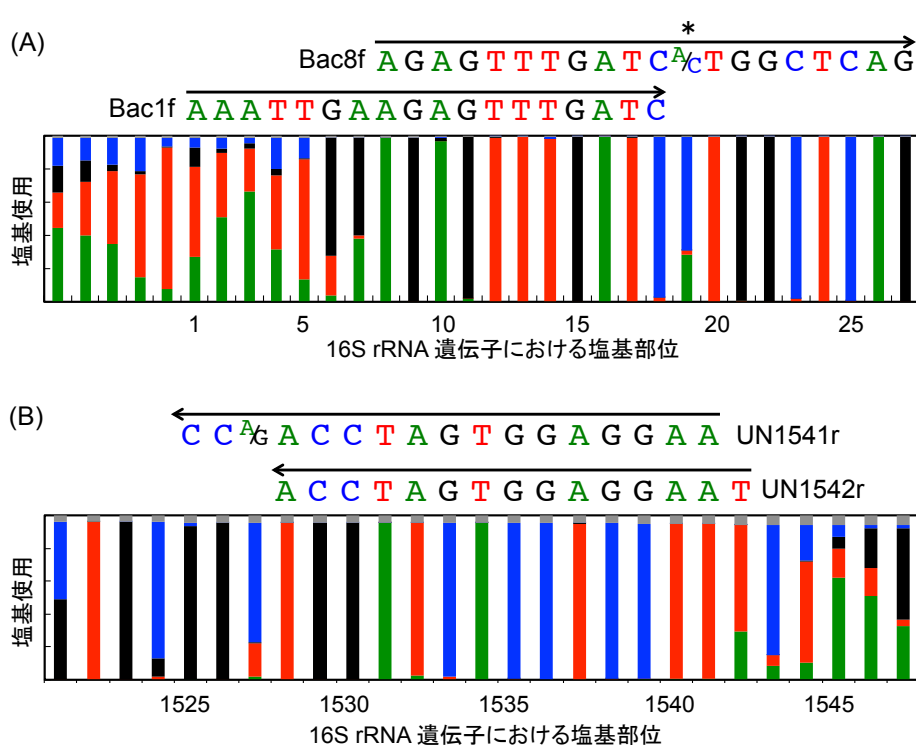


図2 16S rRNA 遺伝子末端配列の保存性とプライマーアニーリング部位

(A) 5'末端側 (B) 3'末端側  
NCBI データベース (August, 2014) に登録された 23 の分類群のバクテリアのゲノム DNA (2,476 種) から、16S rRNA 遺伝子 (9,624 種) の 5'末端と 3'末端配列を抽出し、MEGA 6.05 を用いて整列し、各サイトの塩基使用を算出した。

### 3. 16S rRNA 遺伝子置換変異株の選択薬剤の変更

#### 3-1. はじめに

Zeo はブレオマイシンファミリーに属する抗生物質であり、遺伝子工学の選択薬剤として原核生物細胞（大腸菌など）から真核生物細胞（酵母やヒト）まで利用可能である。Zeo は、Cu や Fe などの DNA の塩基対間にインターカレートする金属イオンと複合体を形成し、1 本鎖または 2 本鎖の DNA の切断を触媒する<sup>7-8</sup>。Zeo に対する耐性遺伝子 (Zeo<sup>R</sup>) は、ブレオマイシン生産性放線菌の生合成遺伝子クラスター内に見出され、Zeo による薬剤選択をおこなう際の選択マーカーとして用いられている。このように、Zeo ならびにその耐性遺伝子の組合せは、遺伝子工学の分野で広く浸透し、それを搭載したベクター類も整備されている。その一方、価格が高値（200 µg/ml で使用した場合、培地 1 L あたり 11,200 円）で、光によって分解しやすい、塩濃度の高い培地では力価が低下し使用できないというマイナス点もある。

私は、16S rRNA 遺伝子の置換実験において、pRB103 選択薬剤として Zeo を用いてきたが、特に、スクロースを含む条件（カウンターセクション）で、高いバックグラウンドの上昇（目的外クローンの生育）を経験していた。上述の Zeo の特性から、バックグラウンドの上昇は Zeo の力価低下によるものと予測し、プレートの乾燥による塩濃度の上昇を防いだり、培地中の Zeo 濃度を高めたり（100 µg/ml → 200 µg/ml）することによりバックグラウンドの問題を解決した。通常の株のメンテナンス時も Zeo によりプラスミドを選択する際には、高濃度 Zeo を用いた。しかし、上述の通り Zeo は高価であり、スクリーニングの規模や培養スケールが大きくなればなるほどコスト的な問題が無視できなくなる。これに加え、高濃度の Zeo を含む培地で培養した菌体からプラスミドを回収すると、他の選択薬剤を用いた場合と比べて核酸収量（見かけのプラスミド濃度）が高くなること、また、得られたプラスミドを用いて形質転換をおこなうと、予想される効率よりも低くなるという現象に遭遇した。そこで、Zeo を使用する際に生じたこれらの問題を、プラスミドの「量」と「質」に着眼し説明することを試みた。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 実験のストラテジー

Invitrogen から販売されているプラスミド pCR-Blunt には、Zeo<sup>R</sup> とカナマイシン耐性遺伝子 (Kanamycin<sup>R</sup> [Km<sup>R</sup>]) がコードされている (図 3)。そこで、このプラスミドを含む大腸菌を、Zeo とカナマイシン (Km) それぞれの抗生物質を含む培地で培養し、各菌株からプラスミドを抽出し、大腸菌の形質転換効率およびアガロース電気泳動により、「量」と「質」の問題を検討した。

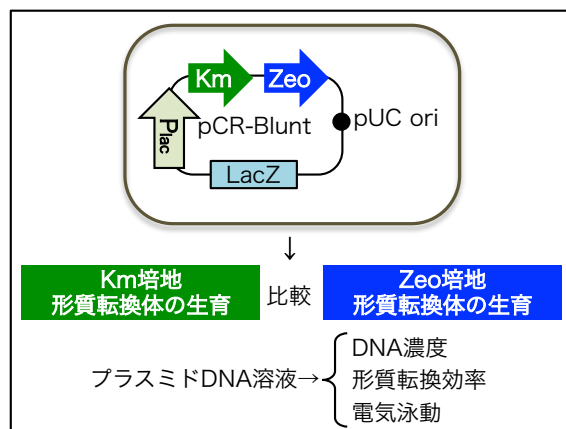


図3 Zeoシンの特徴を検証するためのストラテジー

### 3-2-2. Zeo または Km を含む培地で生育した株由来のプラスミド DNA 溶液の核酸濃度

pCR-Blunt を大腸菌 DH5  $\alpha$  (F<sup>-</sup>,  $\Phi$  80d*lacZ*  $\Delta$  M15,  $\Delta$  (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r<sub>K</sub><sup>-</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$  -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*) 株に導入し、25  $\mu$ g/ml の Km を含む LB 寒天プレート培地で形質転換体を選択した。プレートからシングルコロニーを拾い、2 ml の LB 培地 (25  $\mu$ g/ml Km) で前培養し (37°C、17 h、200 rpm)、その後、Km または Zeo を 25  $\mu$ g/ml、または 50  $\mu$ g/ml、または 100  $\mu$ g/ml を含む培地 4 ml の LB 培地に植菌した。12 時間および 24 時間培養 (37°C、200 rpm)、等量の菌液からプラスミド DNA を抽出した。抽出したプラスミド DNA 溶液中の核酸の量を、極微量分光光度計 NanoDrop Lite によって測定した。

### 3-2-3. 獲得したプラスミドによる形質転換効率

各条件 (培養時間 [12, 24 h]、抗生物質 [Km, Zeo]、濃度 [25, 50, 100  $\mu$ g/ml]) で抽出したプラスミド DNA 溶液の質を評価するため、各プラスミド溶液中の核酸 100  $\mu$ g を使用して、大腸菌 DH5  $\alpha$  株の形質転換効率を比較した (4 回の繰り返し実験)。形質転換体は Km を含む寒天プレート培地で選択し、出現したコロニーを aCoLyte 自動コロニーカウンターで計数した。

### 3-2-4. 獲得したプラスミドの電気泳動

プラスミド DNA 溶液中のプラスミド DNA およびその他の核酸の存在を確認するため、プラスミド DNA 溶液中の核酸 1  $\mu$ g および EcoRI 処理 (10U、37°C、1 時間) をした核酸 1  $\mu$ g を 0.9% [w/v] アガロースゲルで電気泳動した。

## 3-3. 結果

### 3-3-1. Zeo または Km を含む培地で生育した株由来のプラスミド DNA 溶液の DNA 濃度

12 時間培養後の収量は、抗生物質の種類および濃度の違いに関係なく大きな違いは見られなかった (図 4)。一方、24 時間培養後では、Km で培養した場合、12 時間時の収量の 1/3~1/2 になっていたのに対し、Zeo で培養した場合は Zeo の培地中の濃度が高くなるほどプラスミド DNA 溶液中の核酸の収量が高くなっていた (図 4)。

### 3-3-2. 獲得したプラスミド溶液による形質転換効率

Km 培地由来のプラスミド DNA の場合、培養時間 (12, 24 h) および濃度 (25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) によらず、形質転換効率に大きな違いは見られなかった (図 5)。一方、Zeo 培地由来に関しては、12 時間培養後に抽出したプラスミド DNA よりも、24 時間培養後に抽出したもののほうが、形質転換効率が低いことが認められた (図 5)。特に、Zeo の培地中の濃度が 25  $\mu\text{g/ml}$  よりも高い培地 (50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) から抽出したプラスミド DNA では、形質転換効率の低下が顕著で、Zeo の培地中の濃度が 50  $\mu\text{g/ml}$  の場合に着目すると、培養時間の違いで約 2.5 倍、形質転換効率に開きがあった (図 5)。

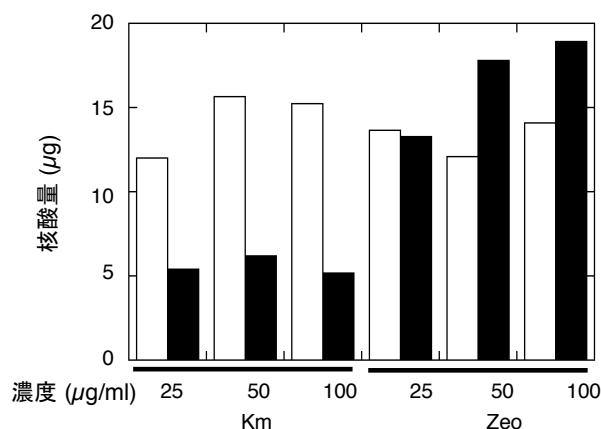


図4 プラスミドDNA溶液の核酸濃度  
 12時間培養後  
 24時間培養後

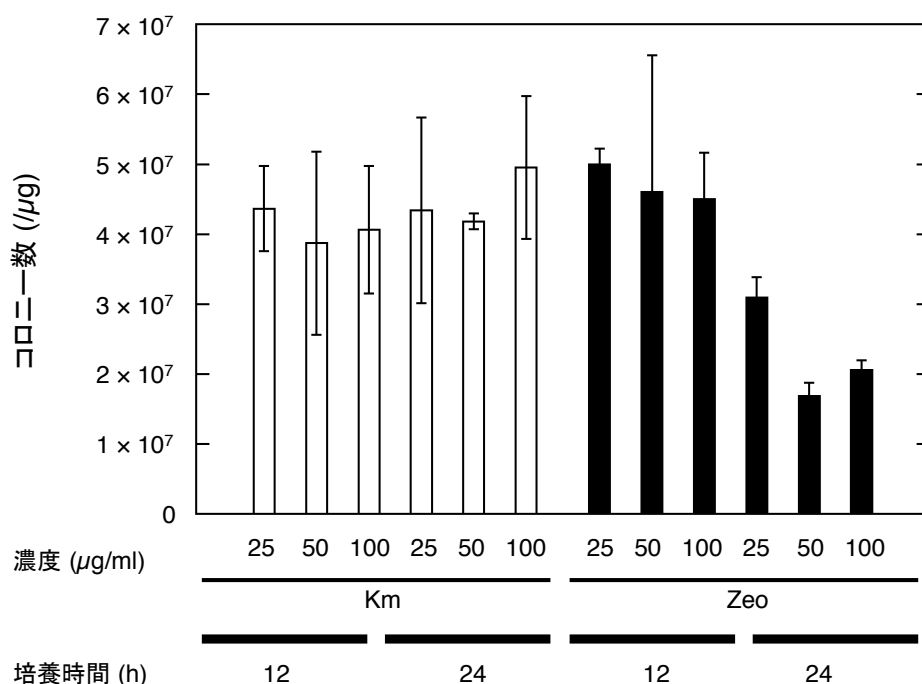


図5 プラスミド DNA 溶液による大腸菌 DH5 $\alpha$  株の形質転換効率  
 各条件 (培養時間 [12, 24 h]、抗生物質 [Km, Zeo]、濃度 [25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ ]) で抽出したプラスミド DNA (核酸 100  $\mu\text{g}$ ) を使用して、大腸菌 DH5 $\alpha$  株の形質転換効率を比較した。(N=2)

### 3-3-3. 獲得したプラスミド溶液の電気泳動

Km を含む培地で培養した場合は、いかなる条件 (制限酵素処理の有無、培養時間、濃度) でもバンドがシャープで、目的プラスミド以外のバンドは検出限界以下だった (図 6)。一方、Zeo を含む培地で培養した場合は、24 時間培養時、抗生物質の濃度が高くなるほどバンドが薄く、また、バックグラウンドが高いことが確認された (図 6)。このことは、プラスミド溶液中にプラスミド DNA 以外の核酸が混入していることを意味している。



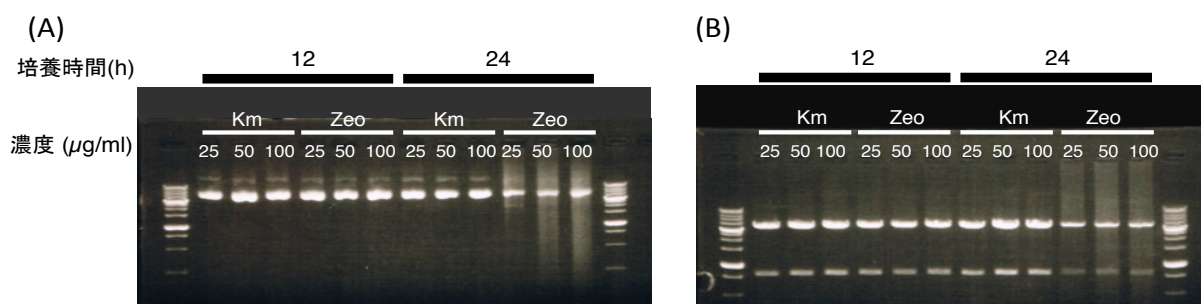


図 6 プラスミド DNA 溶液のアガロース電気泳動

(A) 制限酵素未処理 (B) 制限酵素処理

各条件（培養時間 [12, 24 h]、抗生物質 [Km, Zeo]、濃度 [25, 50, 100 µg/ml]）で抽出したプラスミド DNA 溶液中の核酸 1 µg および EcoRI 処理（10U、37°C、1 時間）をした核酸 1 µg を 0.9% [w/v] アガロースゲルで電気泳動した。

### 3-4. 考察

本実験は、16S rRNA 遺伝子の置換技術をおこなう際、高濃度 Zeo を用いた際に見出された「見た目の核酸収量の増加」に端を発している。本実験では、16S rRNA 遺伝子の置換技術で用いるプラスミド（pRB103）とは別のプラスミド（pCR Blunt）を利用し、Zeo 添加培地で培養した際に得られる菌体から抽出したプラスミド DNA の「見た目の核酸収量増加」の再現性の検証から始めた。

pCR-Blunt（Zeo<sup>R</sup>、Km<sup>R</sup>）を保持した大腸菌 DH5α 株を Zeo または Km を含む培地で培養し、市販プラスミド抽出キットによりプラスミドを抽出し、添加した抗生物質の種類と核酸収量との関係を比較した。その結果、Km 存在下で培養した場合、24 時間培養後に抽出したプラスミド溶液の核酸収量は、12 時間培養後と比較し 1/3～1/2 に減少した（図 4）。これは、プラスミド DNA 抽出に用いた菌体量が過剰となり、溶菌が不十分であったことが一因と考えられた。一方、Zeo 存在下で培養した場合は、培養時間が長いほど、また、Zeo の培地中の濃度が高いほど、核酸収量が高くなった（図 4）。このことは、KT103 株を高濃度 Zeo で培養した菌体から pRB103 を抽出した際に見られた現象と一致した。核酸収量が増加した理由は、Zeo によるプラスミドコピー数の増加、ゲノム DNA などのプラスミド以外の核酸の混入が原因であると予想された。

高濃度 Zeo 培地で培養した菌体から得たプラスミドを用いて大腸菌を形質転換すると、その効率は低下し（図 5）、アガロースゲル電気泳動解析からは、プラスミドのバンドが薄く、スメアーバンドが高くなり（図 6）、見た目の核酸収量が増加した要因は、プラスミドのコピー数の増加というよりは、細胞内でゲノム DNA が断片化を受け、それがプラスミド精製時に混入したことが原因であることが示唆された。

Zeo は、DNA を切断する活性を有する抗生物質である。ゼオシン耐性タンパク質（Zeo<sup>R</sup>）は、Zeo に化学量論的に結合し無毒化するが、この作用機序は、酵素により無毒化される β ラクタム系やクロラムフェニコール、カナマイシンなどの抗生物質とは異なり、Zeo が Zeo<sup>R</sup> に対し大過剰となると遊離 Zeo が細胞内に残存することとなる。Zeo を高濃度で使用した場合に見られた DNA の損傷は、これが直接的な原因であると考えられた。また、培養時間が長いほど DNA の断片化が促進されることも確認した。Zeo による DNA の断片化現象は、断片化されたゲノム DNA の混入により見かけのプラスミド DNA 収量が増大するだけでなく、プラスミド DNA 自身も損傷を受ける可能性があり、下流の遺伝子工学実験の効率・精確性の低下や表現型に影響を及ぼすことが危惧される。

16S rRNA 遺伝子の置換実験においても、pRB103 の選択に Zeo を用いることにより、今後種々の問題に遭遇しかねないと考え、代わりになる抗生物質を探った。市販抗生物質（ブラストサイジン S、リファンピ



シン、トリメトプリム) や研究室で保有する耐性遺伝子などの組合せを種々検討した結果、16S rRNA 遺伝子置換技術における選択薬剤をトリメトプリム (Trimethoprim [Tmp]) に、耐性マーカをジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) 遺伝子 (Tmp<sup>R</sup>) に変更することとした (表 3)。

なお、本節の内容は、2013 年に J. Biosci. Bioeng. にて発表した<sup>9</sup>。

薬剤	作用機序	価格 (培地 1 L あたり)	問題点
ゼオシン (Zeo)	DNA 切断	11,200 円 (200 µg/ml 使用時)	光感受性 高塩濃度の培地で力価低下
トリメトプリム (Tmp)	葉酸活性化阻害	18 円 (10 µg/ml 使用時)	

表 3 ゼオシンとトリメトプリムの比較

## 4. カウンターセレクション操作の改良

### 4-1. 問題

16S rRNA 遺伝子の置換実験において、スループット拡大を阻むもっとも大きな問題が、カウンターセレクション工程にあった。これまでは、異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミド pRB103 (または pRB105) で KT101 株を形質転換し、Zeo (または Tmp) 選択後のコロニー 1 つ 1 つを LB 培地に懸濁し、段階希釈した後にスポットテストにてスクロース培地での生育の可否を確認していた (図 8)。この方法では、1 日に 200 クローン程度の処理が限界であった。

### 4-2. 解決策

そこで、薬剤選択後のコロニーを寒天培地からかき取り、LB 培地にまとめて懸濁し、スクロース培地に塗布することを試みた (図 8)。その結果、pRB103-Zeo の系ではスクロース培地上でのコロニーがムコイド状になり (この原因は現時点では不明である)、コロニーの選別が困難であった。一方、pRB105-Tmp の系ではそうした現象は見られず、カウンターセレクションの作業効率が劇的に改善した。

薬剤耐性の変更は、前節で述べた Zeo による DNA 切断の問題を解消しただけでなく、カウンターセレクションの操作性向上にも繋がった。この改良でライブラリースケールが大幅に拡大できるとともに、ライブラリーごとの「生育相補率」を正確に算出することもでき、スケールアップしてスクリーニングする前段階として、ライブラリーの性能評価、ヒット率の見積もりを簡易に行えるという利点も生まれた。

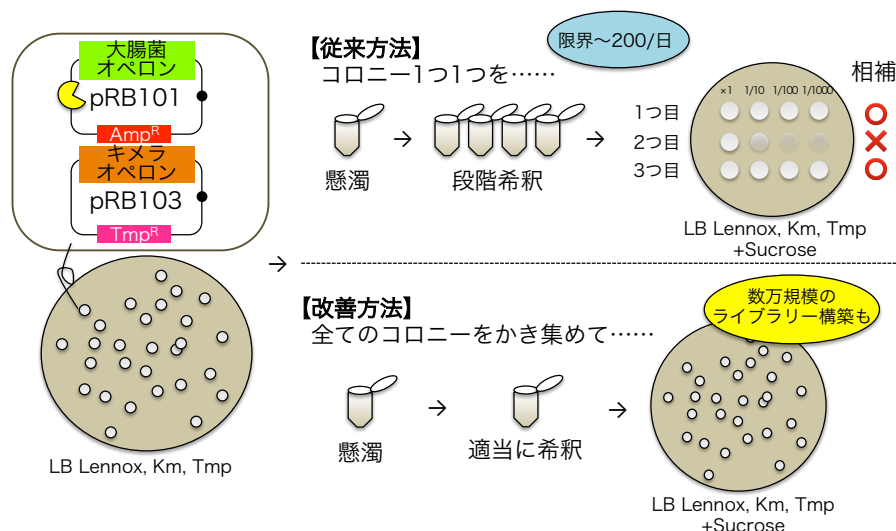


図 8 カウンターセレクション工程の模式図

従来 (図の上段) の方法では pRB101/pRB103 共存状態から pRB101 を脱落させる際に、コロニーを手作業でショ糖寒天培地にスポットテストし、カウンターセレクションをおこなっていた。改良法では、プレートからかき取ったコロニーを適宜希釈したのちにまとめてショ糖寒天培地に展開する。

## 5. アンチトキシン遺伝子のサイレンシングによるカウンターセクション法の開発

### 5-1. はじめに

#### 5-1-1. 大腸菌における選択マーカーとカウンターセクションマーカー

大腸菌は、宿主ベクター系が整備されており、遺伝子工学で最も頻用されている微生物宿主である。大腸菌の形質転換法は、その手順や効率などの点で異なるいくつかの手法があり（コンピテントセル法やエレクトロポレーション法、接合伝達法など）、用途によって使い分けることができる。形質転換体の選択は、栄養要求性や抗生物質耐性に基づく場合が多い。特に後者は現在最も広く用いられる方法であり、抗生物質の種類も、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、ゼオシン、トリメトプリム、スペクチノマイシン、ストレプトマイシン、リファンピシンなど、作用点や作用機序の異なるものが豊富に存在する。

一方、形質転換体から特定の遺伝子断片やそれを含むベクターを除去する為の手法は、カウンターセクション（あるいはネガティブセクション）法として知られる。カウンターセクションマーカーとしては、チミジンキナーゼ（thymidine kinase）<sup>10</sup>や PheS（small subunit of phenylalanyl-tRNA synthase）<sup>11-12</sup>、CcdB<sup>13</sup>、TolC<sup>14</sup>、そして SacB<sup>15-16</sup>などが知られているが、ポジティブセクションマーカーに比べ、その種類は依然少ない。今後発展するであろう合成生物学において、複数のベクターを自在に出し入れするというニーズは拡大すると想像され、カウンターセクションマーカーの拡充は重要な技術要素の一つと言える。

#### 5-1-2. SacB—ショ糖によるカウンターセクションの問題点

大腸菌で最も頻用されるカウンターセクションマーカーは、枯草菌由来の SacB である。sacB 遺伝子の産物であるレバンシュクラゼ（Levansucrase）は、スクロースと反応することでペリプラズム層に多糖であるレバンを蓄積し、細胞を死滅させる。細胞から除去する予定のプラスミドに sacB 遺伝子をコードしておき、スクロース存在下で培養することで、プラスミドを脱落した宿主を効率的に選択できる。

しかし、このシステムにはいくつかの問題点がある。第一に、レバンシュクラゼ自体に細胞毒性があり、非選択時（スクロース非存在下）であっても、SacB の発現量次第では細胞の不安定化の要因になり得る。第二に、sacB 遺伝子の突然変異により機能が喪失し、擬陽性が生じる場合も少なくない<sup>16</sup>。第三に、選択時に 5-15% [w/v] 程度のスクロースを必要とし、細胞の表現型になんらかの影響を及ぼす可能性が危惧される。

このような現状を踏まえ、新しい原理に基づくカウンターセクションシステムの開発を試みた。特に、トキシン-アンチトキシン（TA）システムに着目し、アンチトキシン遺伝子をサイレンシングさせる方法により、トキシンの効果を顕在化させる方法での細胞死誘導を考案し、実験的に検証した。

### 5-2. 実験のストラテジー

#### 5-2-1. トキシン-アンチトキシン（TA）システム

PEC (Profiling of E. coli Chromosome) database によると、大腸菌 MG1655 株のゲノム (GeneBank: U00096.2 に存在する生育必須遺伝子は、302 ある<sup>17-18</sup>。その中には、トキシン-アンチトキシン (Toxin-Antitoxin [TA] system) システムのアンチトキシン遺伝子も含まれる。

TA システムは、バクテリアゲノムに普遍的に存在し、通常の生育条件では、構造的に安定なトキシンの毒

性は、構造的に不安定だが過剰発現されているアンチトキシンによって中和されている<sup>19</sup>。TA システムは、トキシンの毒性の中和方法によって、下記の 5 つに大別される（表 4）。

大腸菌 MG1655 株では、最低でも 36 個の TA システムが存在すると推定されている<sup>23</sup>。5 種の TA システムのうち、大腸菌では Type II が最も多い。Type II TA システムでは、トキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子がオペロン構造を取っている。一般的に、より高発現するアンチトキシン遺伝子がトキシン遺伝子の上流に位置するが、その逆も度々見られる。また、両遺伝子間の配列は多様で、発現バランスを保つ工夫が垣間見られる（表 5）。例えば、アンチトキシン遺伝子がトキシン遺伝子の下流にある MqsR/MqsA（トキシン/アンチトキシン）では、両遺伝子間のスペーサー配列は一塩基のみである。この場合、トキシン遺伝子を翻訳したリボソームが、mRNA から解離する事なく、すぐさまアンチトキシン遺伝子の翻訳を開始する（re-initiation）と予想され、アンチトキシン遺伝子が下流に位置していても、発現量が保たれる仕組みとなっている。HicA/HicB も、アンチトキシン遺伝子がトキシン遺伝子の下流に配置されているシステムの一つである。両遺伝子間には 45 塩基のスペーサー配列がある。このシステムでは、トキシン遺伝子の開始コドンに大腸菌リボソームの認識能が低い GUG が用いられており、一方、アンチトキシン遺伝子の開始コドンは大腸菌リボソームの認識能が最も高い AUG が用いられている。よって、開始コドンの使い分けにより、両遺伝子の発現量が調整されており、トキシンの毒性が平常時マスクされていると予想される。これらの他の TA システムにおいても、独自の巧みな戦略でトキシンとアンチトキシンの発現量バランスを維持している。

Type	作用機序
Type I <sup>20</sup>	タンパク質の状態で毒性を示すトキシン（RNase や DNase など）の mRNA に、その mRNA のアンチセンス配列を有するアンチトキシンの RNA が作用することにより、トキシンタンパク質の翻訳が阻害される。
Type II <sup>20</sup>	タンパク質の状態で毒性を示すトキシンタンパク質に、アンチトキシンタンパク質が結合することで、その毒性を中和する。
Type III <sup>20</sup>	タンパク質の状態で毒性を示すトキシンタンパク質に、アンチトキシンの mRNA が結合することで、その毒性を中和する。
Type IV <sup>21</sup>	アンチトキシンタンパク質が、タンパク質の状態で毒性を示すトキシンタンパク質のターゲット分子への結合を妨害することで、その毒性を中和する。
Type V <sup>22</sup>	アンチトキシンタンパク質が RNase 活性を持ち、トキシンの mRNA を切断することで、その毒性を中和する。GhoT-GhoS TA システムの一種類のみが報告されている。

表 4 トキシンーアンチトキシンシステムの種類

## 5-2-2. TA システムを利用した細胞致死誘導

TA システムの巧みな発現量バランスの調節は、細胞の生育維持に直結する。このことに着目し、トキシンとアンチトキシンの発現量バランスを破綻させること — 「トキシンの過剰発現」または「アンチトキシンの発現抑制」— により、大腸菌の細胞死を誘導できるのではないかと考えた。

「トキシンの過剰発現」に基づくカウンターセレクションは、すでに多くのシステムで採用されている。たとえば Invitrogen 社の pCR Blunt ベクターなどには ccdB 遺伝子がコードされており、ccdB 遺伝子のコー

ド領域内に外来遺伝子を挿入するようにクローニングサイトが設けられている。実験の不具合で外来遺伝子を導入できなかった場合、空ベクターを含む宿主が死滅するようになっている。このようにトキシンの細胞死誘導をうまく使うことにより効率的なカウンターセクションが可能な一方、トキシン遺伝子の発現のわずかな漏れにより遺伝子のクローニングが困難な場合もある。

TA system※ <sup>1</sup>	Gene arrangement in chromosome	Essentiality of antitoxin※ <sup>2</sup>	References
MazF/MazE	Antitoxin (A) /Toxin (T), 1 b overlap	No	35
ChpB/ChpS	A/T, 7 b overlap	No	36
HicA/HicB	T/A, 45 b gap	Yes	37
YhaV/PrfF	A/T, 1 b overlap	Yes	38
MqsR/MqsA	T/A, 1 b gap	No	29, 31
RnlA/RnlB	T/A, 8 b overlap, Start codon for antitoxin, TTG	Yes	39
RelE/RelB	A/T, 35 b gap	Yes	40, 41
YoeB/YefM	A/T, 10 b overlap, Start codon for toxin, GTG	No	42
YafO/YafN	A/T, 2 b gap	Yes	43
YafQ/DinJ	A/T, 2 b gap	Yes	44
HigB/HigA	T/A, 2 b overlap	Yes	45
RatA/RatB	T/A, 11 b overlap, Start codon for antitoxin, GTG	Yes	46
CbtA/CbeA	A/T, 88 b gap	Yes	21, 47
YkfI/YafW	A/T, 20 b gap	Yes	48
YpfF/YfjZ	A/T, 20 b gap	Yes	30
GnsA/YmcE	A/T, 11 b overlap, Start codon for antitoxin, GTG	Yes	49
HipA/HipB	T/A, 1 b overlap	Yes	50
YjhX/YjhQ	T/A, 11 b gap	Yes	
YdaS/YdaT	T/A, 22 b gap	Yes	45

※1: トキシン (T) /アンチトキシン (A)の順番で記載。

※2: アンチトキシンの生育必須遺伝子であるかどうかの判定は、遺伝子欠損株<sup>51</sup>での生育試験による。

表 5 大腸菌ゲノムに存在する Type II TA システム

一方、「アンチトキシンの発現抑制」を利用したカウンターセクションの報告はない。しかし、アンチトキシンはトキシンに比べ遺伝子操作が容易であり、トキシンそのものを扱う場合に比べ実験的な障壁は低い。アンチトキシンは、細胞内でトキシンよりも大過剰存在しているため、アンチトキシンの発現が少々漏れたとしても、細胞の表現型に大きな影響をもたらす可能性が低く、わずかな漏れが表現型の不安定化を招くトキシンに比べ、多くの利点があると予想される。上述の通り、大腸菌ゲノム中には多数の TA システムが存在しており、ターゲットとなるトキシンも数多い。そこで、まず、これらに対応するアンチトキシンを網羅的にサイレンシングし、効果的に細胞死を誘導するターゲットを探索した。それに基づき、アンチトキシンの遺伝子サイレンシングに基づく新規なカウンターセクションシステムの開発を試みた。

### 5-2-3. アンチトキシンの発現抑制：アンチセンス RNA を利用した遺伝子サイレンシング

遺伝子の発現抑制を目的に利用されるアンチセンス核酸は、標的遺伝子の mRNA に相補的な配列を持つよ

うに設計される。細胞質内にアンチセンス核酸が存在すると、標的遺伝子の mRNA にハイブリダイズして翻訳を妨げ、標的遺伝子産物の生産を抑制する。アンチセンス核酸の細胞内への導入には、外部から導入する場合と細胞内で発現させる方法がある ([https://staff.aist.go.jp/n-nakashima/research\\_introduction2](https://staff.aist.go.jp/n-nakashima/research_introduction2))。後者「発現アンチセンス法」は、アンチセンス RNA (antisense-RNA [asRNA]) を細胞内で発現し、作用させる方法である。

私は、発現アンチセンス法を、アンチトキシンの発現抑制に適用することを考えた。つまり、将来除去する予定のプラスミド DNA にアンチトキシン遺伝子の mRNA を標的とした asRNA 遺伝子 (アンチセンス DNA : antisense-DNA [asDNA]) 発現系をコードしておけば、asRNA を誘導発現させることでこのプラスミドを死滅させることができると考えた (図 9)。

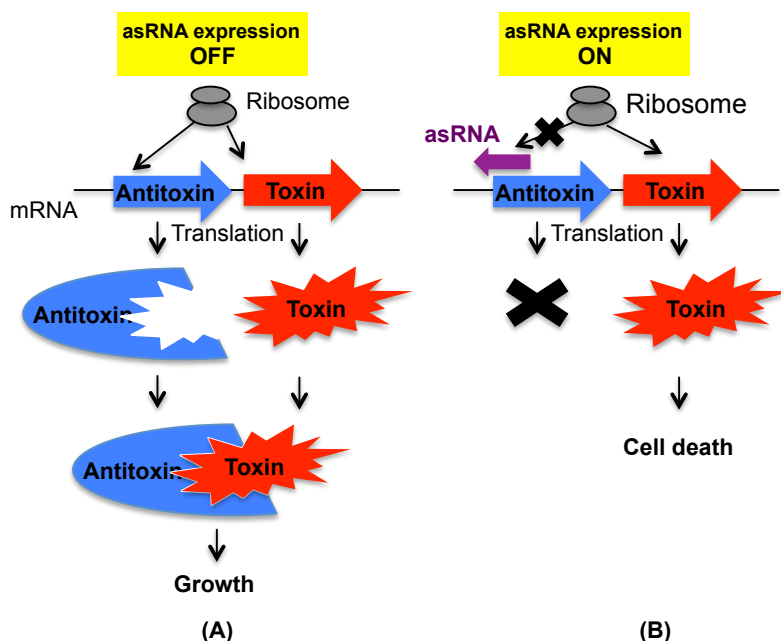


図 9 asRNA を利用したカウンターセクション

通常、トキシタンパク質の毒性は、それより大過剰に発現しているアンチトキシタンパク質と結合することにより不活化されている (A)。アンチトキシン mRNA のリボソーム結合部位に相補的な asRNA が発現されると、細胞内のアンチトキシン mRNA に結合し、リボソームの接近を妨いだり mRNA の分解を促したりして、アンチトキシタンパク質の発現量が抑制される。すると、アンチトキシタンパク質がフリーな状態となり毒性を発揮し、そのトキシンの毒性の強さによっては細胞が死滅する (B)。すなわち、アンチトキシン mRNA をターゲットとした asRNA の発現調整による細胞死誘導を利用することで、カウンターセクションが成り立つと考えられる。

このアイデアに基づいた新規なカウンターセクションシステムの開発スキームを図 10 に示す。まず、大腸菌ゲノムにコードされた Type II に属するアンチトキシンの mRNA 全てに対して asRNA を設計した。次に、それらの asRNA 遺伝子を発現ベクターに組み込み、発現誘導することで、高い致死効果を示す asRNA を選択した。次に、致死効果が認められた asRNA を用い、実際に、細胞から除外したいプラスミドが 1 種類、および 2 種類 (複製開始点が和合性および不和合性の場合) の系で、カウンターセクション効率を検証した。最後に、大腸菌のゲノム変異株のスクリーニング実験に応用し、実用性を評価した。

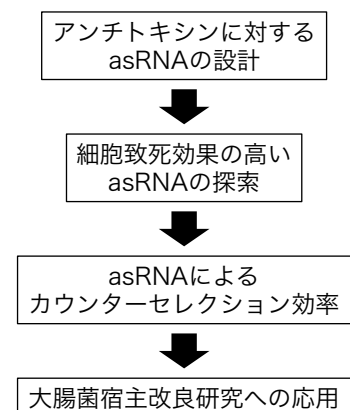


図10 研究のストラテジー

### 5-3. asRNA の設計と細胞致死効果の高い asRNA のスクリーニング

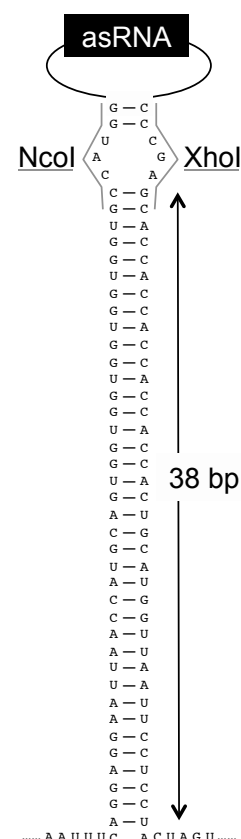
#### 5-3-1. 方法

##### asRNA の設計

asRNA は、Nakashima らの指針に従い<sup>24</sup>、① ターゲットとなる mRNA のリボソーム結合領域 (RBS) と

開始コドンマスクし、② asRNA 単独で高次構造を取らないように注意し設計した。大腸菌 MG1655 ゲノムにコードされている 19 種の Type II の antitoxin mRNA をターゲットとした asRNA のターゲット配列は、表 6 の通りである。asRNA の二次構造予測は、CentroidFold web server (<http://www.ncrna.org/centroidfold>)<sup>25</sup> 上で行なった。

表 6 asRNA のターゲット配列



## 細胞致死効果の高い asRNA のスクリーニング

形質転換体は、対応するアンチトキシンの名を JM109 の右肩に示し表記した。それらの形質転換体を 600  $\mu$ l LB/Amp (100  $\mu$ g/ml [今後、断りがない場合、この濃度で使用]) 培地 (96 deep well plate)、37°Cで一晩培養し、前培養菌液 1  $\mu$ l を本培養培地 1,000  $\mu$ l LB/Amp/1 mM IPTG (asRNA 発現) or 0.9 % グルコース (Glc) (asRNA 発現抑制) に植菌し、37°Cで培養した (図 12)。16 時間培養後に、細胞濁度 (OD<sup>600</sup>) を測定し、[LB/Amp/Glc で増殖させた時の細胞濁度]に対する[LB/Amp/IPTG で増殖させた時の細胞濁度]を算出することで asRNA の発現による大腸菌の生存率を評価した。

Target antitoxin	Name	Sequence (5' to 3') <sup>※1</sup>	Target antitoxin	Name	Sequence (5' to 3') <sup>※1</sup>
MazE	MazE-F	TTTCTCGAGGATTGATATATACTGTATCTACATATGATAGC	HigA	HigA-F	TTTCTCGAGGAATACGATTTCTTTACCGCTGTTC
	MazE-R	AAACCATGGATCCGACCCGCCGGTGAATTC		HigA-R	AAACCATGGGCCAGAAAAGGTGCCACAGCAG
ChpS	ChpS-F	TTTCTCGAGTTATACTTTGATAACTTAAGGAGGTGC	RatB	RatB-F	TTTCTCGAGGCTAATATGGTCCAGGCTTTAC
	ChpS-R	AAACCATGGGTTCTTTCATTACGATAATTGGGAATG		RatB-R	AAACCATGGGGTAGCGCATAAGCCACCTC
HicB	HicB-F	TTTCTCGAGGAGTTAATCGCCAATTAAAGGTTAAT	CbeA	CbeA-F	TTTCTCGAGGAATTATCGCCACTACCGGAC
	HicB-R	AAACCATGGCCTTCGGGCGCGGTGTAAGAG		CbeA-R	AAACCATGGGCGGTGCTGATTGTCTCGCGGA
PrfF	PrfF-F	TTTCTCGAGGTTCAAGCTTATAATTGAGCAGAAAAC	YafW	YafW-F	TTTCTCGAGGCCCTATACCTGCCTGATGAGC
	PrfF-R	AAACCATGGCCTTTGATTCACTGAGTGTGATACAG		YafW-R	AAACCATGGGCGCAGTGTAACTCTCCCGCT
MqsA	MqsA-F	TTTCTCGAGATTACGGTAATTCATGACGTACTGATCG	YfjZ	YfjZ-F	TTTCTCGAGGACCGTATGCTGACTGATGAG
	MqsA-R	AAACCATGGAATATCTTAATGCCAGAAACATTCTCTCC		YfjZ-R	AAACCATGGCGCGCGTGATATCTCGCTGCA
RnlB	RnlB-F	TTTCTCGAGGGGTAAGCCACTAGAGCGTGG	YmcE	YmcE-F	TTTCTCGAGGACGATGATCACCTTTGATAACG
	RnlB-R	AAACCATGGCGCAGCGCTTTTAGAGCCCT		YmcE-R	AAACCATGGGCTCCACGAGGGAGCGTGATATT
RelB	RelB-F	TTTCTCGAGTTGTAATGACATTTGTAATTACAAGAGG	HipB	HipB-F	TTTCTCGAGTCCCCTTAAGCGGATAAACTTG
	RelB-R	AAACCATGGGCGCTTTAAGTTCATCGTCAATAC		HipB-R	AAACCATGGACAGTTTCATTGCATTGCGCAAT
YefM	YefM-F	TTTCTCGAGTTATACTTTGATAACTTAAGGAGGTGC	YjhQ	YjhQ-F	TTTCTCGAGGTTCCGCGTCAGCTCGATAAT
	YefM-R	AAACCATGGGTTCTTTCATTACGATAATTGGGAATG		YjhQ-R	AAACCATGGTCCCGGATATCACTGGCATCAC
YafN	YafN-F	TTTCTCGAGGATGTATACTATTATGTATATTCTGGTG	YdaT	YdaT-F	TTTCTCGAGCAAATCCTCATTTGATCATACCTG
	YafN-R	AAACCATGGCGTAACCTAGTGATATTGACCGAT		YdaT-R	AAACCATGGTTTCGGGTGCTAGGGCAACAAC
DinJ	DinJ-F	TTTCTCGAGCTCATTTGAGCTACAATTCAAGC			
	DinJ-R	AAACCATGGGCGCGAACAACGCGTTAGC			

表 7 asDNA の抽出に使用したプライマー

※1; Forward プライマーには XhoI、Reverse プライマーには NcoI の認識部位を含む。

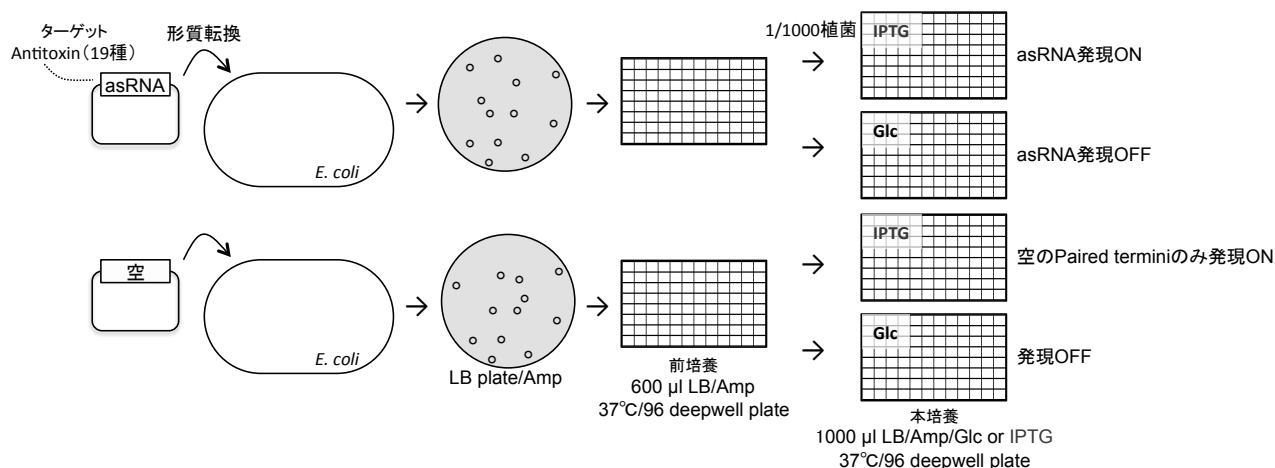


図 12 生育抑制を指標としたカウンターセクションマーカー遺伝子の候補 asRNA の選定方法

asRNA がクローニングされたプラスミド (計 19 種) と pHN1009<sup>empty</sup> による形質転換体を、1 mM IPTG または 0.9 % Glc を含む培地で 16 時間培養後の細胞濁度を比較する。

## 液体培地での asRNA<sup>mqsA</sup> および asRNA<sup>rnlB</sup> による致死効果

JM109<sup>mqsA</sup> と JM109<sup>rnlB</sup> について、LB/Amp/IPTG 0-1 mM 培地における増殖を比較した。コロニーを 600  $\mu$ l LB/Amp 培地 (96 deep well plate)、37°Cで前培養し、前培養菌液 0.7  $\mu$ l を本培養培地 200  $\mu$ l LB/Amp/0, 0.1, 0.5, 1 mM IPTG に植菌し、37°Cで培養しながら 15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した (N=4) (図 13)。

## 寒天プレート培地での $asRNA^{mqsA}$ および $asRNA^{rnlB}$ による致死効果

JM109<sup>mqsA</sup>、JM109<sup>rnlB</sup>、および JM109<sup>empty</sup> について、そのコロニーを 600  $\mu$ l LB/Amp 培地 (96 deep well plate)、37°C で前培養し、その前培養菌液を適当に希釈して LB/Amp/IPTG 0, 0.1, 0.5, 1 mM、0.9% Glc 寒天プレート培地にまき、37°C で一晚培養した。その後、LB 寒天プレート培地に生じたコロニーを計数し、寒天プレートに植菌した菌液の希釈率を考慮した上で、CFU を比較した。 $asRNA$  の発現量に伴う大腸菌の生存率を、 $asRNA$  の発現を抑制した状態である 0.9% Glc を含む寒天プレート培地の CFU を基準に評価した。

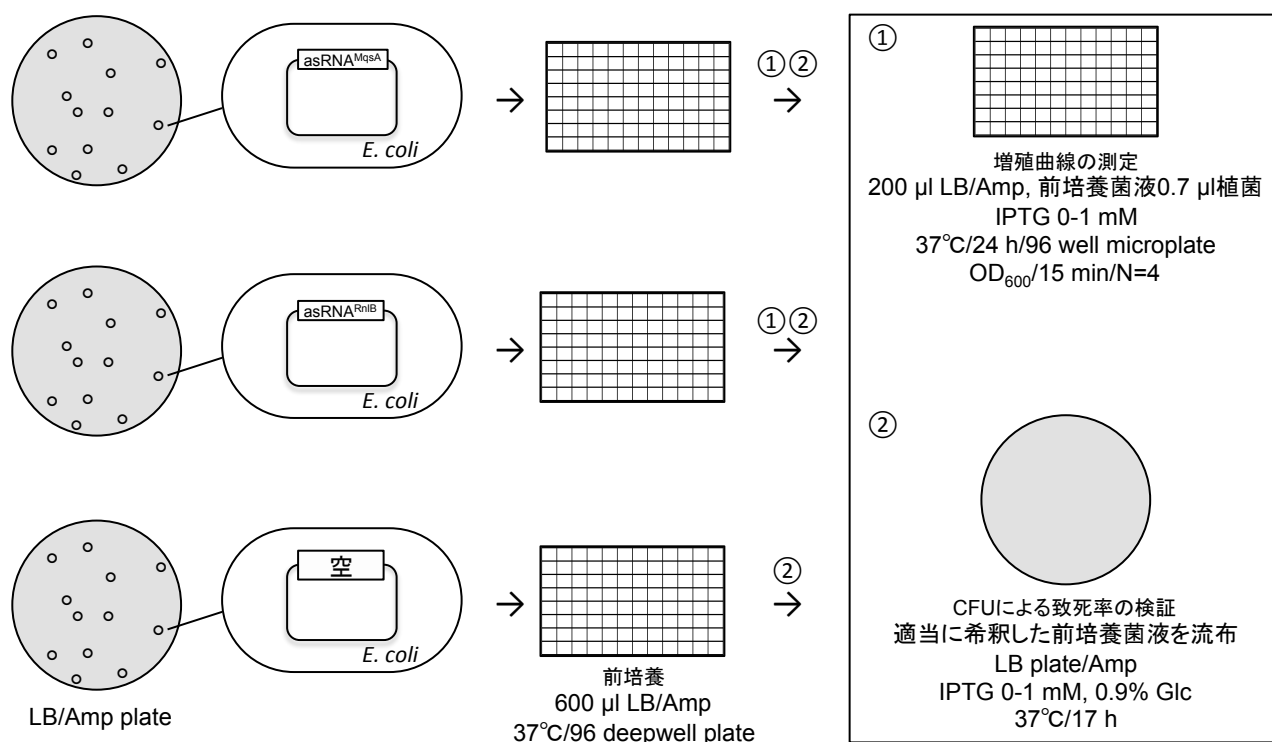


図 13  $asRNA$  の発現量依存的な致死効果の検証方法

JM109<sup>mqsA</sup> と JM109<sup>rnlB</sup> の  $asRNA$  発現による致死性について、0-1 mM IPTG を含む培地における増殖を、液体培地条件では増殖曲線から、固体培養条件では出現したコロニー数を指標に評価した。

## 5-3-2. 結果

### 細胞致死効果の高い $asRNA$ のスクリーニング

$asRNA$  の発現によるアンチトキシンのサイレンシングに伴う致死効果は、 $asRNA$  の配列設計、対応するトキシンの毒性、TA システムのオペロン構造など、複数の因子が複雑に絡み合った結果として現れる。

JM109<sup>empty</sup> ( $asRNA$  を含まない空ベクター pHN1009 のみを含む株) では、IPTG 存在下で培養した際の生育開始 16 時間後の細胞濁度は、Glc 存在下に比べ 10% 程度の減少が認められた (図 14)。これは  $asRNA$  発現ベクターに含まれる Paired-termini に、若干ながら生育阻害効果があることを示唆している。一方、 $asRNA$  の発現の ON/OFF で大きな差がみられたのは JM109<sup>mqsA</sup> と JM109<sup>rnlB</sup> であり、 $asRNA$  の発現により、それぞれ 85%、88% の致死効果が観察された (図 14)。この結果から、19 種の  $asRNA$  のうち、 $asRNA^{mqsA}$  と  $asRNA^{rnlB}$  の発現が高い細胞致死効果を示すことがわかった。



## asRNA<sup>mqsA</sup> および asRNA<sup>rnlB</sup> による細胞致死効果の検証

高い致死効果が確認された asRNA<sup>mqsA</sup> と asRNA<sup>rnlB</sup> について、IPTG の添加量依存的な致死効果や、液体培地および固体培地による培養条件の違いによる致死効果の変化を検証した。

**液体培養条件** asRNA<sup>mqsA</sup> では、0.1 mM の IPTG による asRNA の発現でも、測定時間内（16 h）に生育が確認されることはなかった（図 15A）。一方、asRNA<sup>rnlB</sup> では、0.1~0.5 mM の IPTG 濃度において、測定終了時の細胞濁度は、IPTG を入れていない場合と比べ 75% および 50% であり、asRNA<sup>mqsA</sup> よりも asRNA の発現による致死効果は低かった（図 15B）。しかし、1 mM の IPTG 濃度では高い致死効果が認められた（図 15B）。

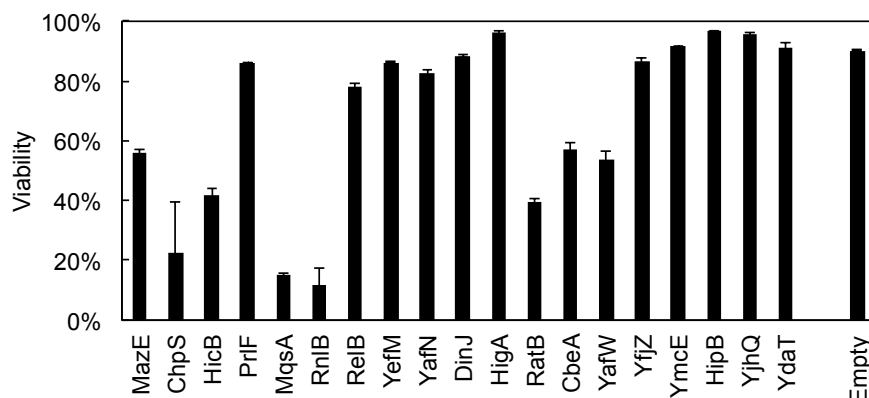


図 14 アンチトキシン発現抑制時の大腸菌の生存率

各種 asDNA がコードされた pHN1009<sup>asRNA</sup> を含む大腸菌 JM109 を、asRNA の発現を ON にする培地（1 mM IPTG）、および OFF にする培地（0.9 % Glc）で 16 時間培養し、細胞濁度を測定した。Viability は、細胞濁度の比（[ON]/[OFF]）によって算出した。

**固体培養条件** asRNA<sup>mqsA</sup> と asRNA<sup>rnlB</sup> に共通して、低濃度の IPTG（0.1 mM）による asRNA の発現でも、高い致死効果が認められた（図 15C）。0.5 mM 以上の IPTG 濃度では、寒天プレート培地の植菌に使用した菌液の原液（希釈なし）を寒天プレート培地に植菌してもコロニーは確認されず、生存率は 10<sup>-8</sup> 以下（検出限界以下）であった。液体培地よりも寒天プレート培地での選択の場合の方が、asRNA の発現による生育抑制が高かったが、その理由はわからない。一方、空ベクターの場合、培地に加えられた IPTG の濃度に関わらず、その細胞の生育が抑制されることはなく、Paired-termini のみによるオフターゲット効果に起因した生育不良はないことを確認した。これは、予備的におこなった「細胞致死効果の高い asRNA のスクリーニング（図 14）」の結果とは若干食い違うが、大きな問題ではないため、これ以上追求しなかった。

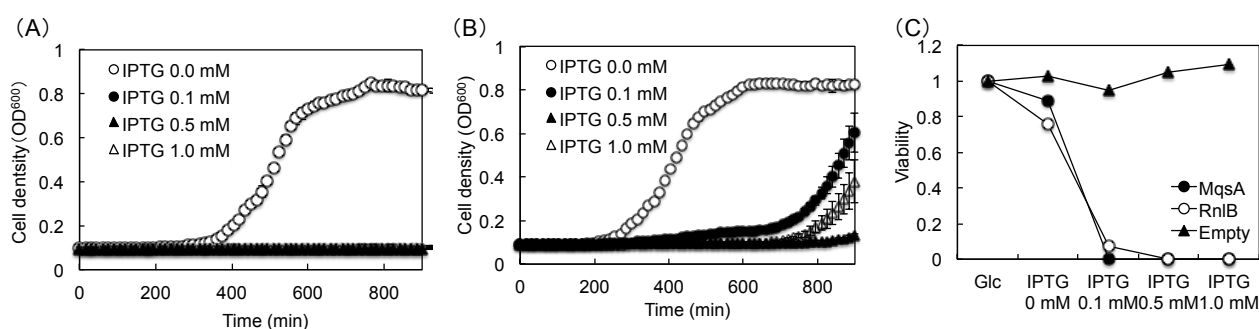


図 15 asRNA の発現量に伴う致死効果

(A) 液体培養環境での JM109<sup>mqsA</sup> の IPTG 量依存的増殖曲線。(B) 液体培養環境での JM109<sup>rnlB</sup> の IPTG 量依存的増殖曲線。(C) 固体培養環境での JM109<sup>mqsA</sup>、JM109<sup>rnlB</sup>、JM109<sup>empty</sup> の IPTG 量依存的生存率。

**宿主株の違いによる致死効率の違い** 以上の実験では、宿主として大腸菌 JM109 株 (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(*r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *e14<sup>-</sup>* (*mcrA<sup>-</sup>*), *supE44*, *relA1*,  $\Delta$  (*lac-proAB*)/F' [*traD36*, *proAB<sup>+</sup>*, *lacI<sup>q</sup>*, *lacZ*  $\Delta$  M15])

を使用した。JM109 株は、クローニング実験を始め様々な用途で頻用されているが、その他、NEB-Turbo 株 ( $F'$ ,  $proA^+B^+$ ,  $lacI^q$ ,  $\Delta lacZM15$  /  $fhuA2$ ,  $\Delta(lac-proAB)$ ,  $glnV$ ,  $galK16$ ,  $galE15$ ,  $R(zgb-210::Tn10)Tet^S$ ,  $endA1$ ,  $thi-1$ ,  $\Delta(hsdS-mcrB)5$ )、MG1655 株 ( $F^-$ ,  $\lambda$ ,  $rph-1$ )、DH5 $\alpha$  株 ( $F^-$ ,  $\Phi 80d/lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta(lacZYA-argF)U169$ ,  $deoR$ ,  $recA1$ ,  $endA1$ ,  $hsdR17(r_K^-, m_K^+)$ ,  $phoA$ ,  $supE44$ ,  $\lambda^-$ ,  $thi-1$ ,  $gyrA96$ ,  $relA1$ )、BL21(DE3)株 ( $F^-$ ,  $ompT$ ,  $hsdS_B$  ( $r_B^- m_B^-$ ),  $gal$ ,  $dcm$ ) も同様に頻用されている。そこで、これらの株についても、アンチトキシン遺伝子のサイレンシングによる致死効果が認められるか、 $asRNA^{mqsA}$  を用い固体培養条件にて検証した。

その結果、NEB-Turbo 株、DH5 $\alpha$  株、BL21(DE3)株において、低濃度の IPTG (0.1 mM) による  $asRNA$  の発現により確かな致死効果が認められた (図 16)。しかし、MG1655 株では 0.1 mM の IPTG 濃度では十分な致死効果が認められず、0.5 mM 以上の IPTG 濃度で他の株と同様の致死効果を示した (図 16)。MG1655 株が他の株よりも、 $asRNA$  の発現による生育抑制効果が低い原因は不明である。このように、株によって若干効果に差が見られたが、遺伝子工学で頻用される様々な大腸菌株において、アンチトキシン MqsA のサイレンシングが生育抑制に効果的であることが判明した。

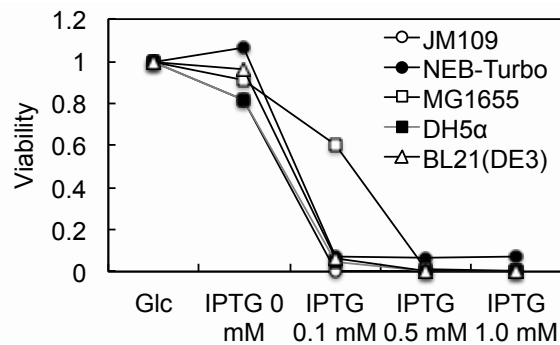


図16  $asRNA^{mqsA}$ の発現量に伴う生存率  
 $asRNA^{mqsA}$ が発現する各株におけるIPTG量依存的な細胞濁度を示した。

### 5-3-3. 考察

アンチトキシン遺伝子の発現アンチセンス法によるサイレンシングにより、高い致死効果が認められた  $asRNA$  は、MqsR/MqsA システムのアンチトキシン MqsA と、RnlA/RnlB システムのアンチトキシン RnlB をターゲットとするものであった (図 14)。これらの  $asRNA$  がターゲットとするアンチトキシン遺伝子、 $mqsA$  遺伝子および  $rnlB$  遺伝子は、TA システムのオペロンにおいて、トキシン遺伝子の下流に位置している点で共通である (表 1)。このような遺伝子の並びのため、下流に位置するアンチトキシン遺伝子の発現抑制が、上流トキシン遺伝子の発現量に影響することがなく、高い致死率を示す理由の一つであると考えられた。この 2 つのシステムを利用した  $asRNA$  のうち、特に、 $asRNA$  の発現を調節する IPTG の量依存的な致死効果の結果から、 $asRNA^{MqsA}$  は極めて高い致死効果が認められた (図 15)。

MqsA/MqsR TA システムは Motility Quorum Sensing regulator から名付けられ<sup>27</sup>、バイオフィーム形成<sup>27</sup>や細胞間コミュニケーション (quorum sensing)<sup>28</sup>、走性<sup>29</sup>に関与する。平常時、細胞質内に存在するトキシンタンパク質である MqsR は、過剰に存在するアンチトキシンタンパク質の MqsA と複合体を形成して、毒性が不活化されている (図 17)。

MqsR の細胞毒性は、細胞質内の mRNA の 5' -GCU- 3'部位を切断する RNase 機能による<sup>22</sup>。この認識部位は、大腸菌の mRNA の大半が有しているが、14 種の mRNA はその認識部位を持たない<sup>22</sup>。その中の CstA, CspD, RpoS, Dps, HokD はストレス応答に関与するタンパク質であり<sup>29</sup>、PheL, TnaC, TrpL, YciG, YgaQ, RalR はバイオフィーム形成に関わる<sup>30</sup>。また、Type V の TA システムである GhoT/GhoS システムのトキシン GhoT の mRNA も、5' -GCU- 3'の MqsR の切断認識部位を持っていない<sup>22</sup>。一方、GhoT のアンチトキシ

ン GhoS の mRNA は、この認識部位を有しており切断される<sup>22</sup>。よって、MqsR の活性化は、他の TA システムに含まれるトキシンも活性化する効果がある。GhoT/GhoS システムにおけるトキシン GhoT は、膜毒性（溶菌活性）を有しており<sup>17, 22, 31</sup>、アンチトキシン ghoS 遺伝子の欠損株は致死となる<sup>20</sup>（図 17）。平常時、GhoT の毒性は、CRISPR-associated-2 (CAS2) 配列特異的 Enodoribonuclease 活性を持つアンチトキシン GhoS が ghoT の mRNA の 5'-UNNU(A/C)N(A/G)(A/U)A(A/U)-3'配列を切断することで中和している<sup>22</sup>。また、GhoS の mRNA は、5' -GCU- 3'部位を有するため、MqsR によっても切断される。

一方、アンチトキシン MqsA は、少なくとも 40 種のバクテリア分類群で保存されている global regulator でもある<sup>29, 32</sup>。MqsA は、その C-terminal ドメインの helix-turn-helix 構造を介し、自身 (mqsAR) のプロモーターだけでなく、mcbR や spy、rpoS などのプロモーターに結合して、転写の抑制に関わる<sup>29, 33</sup>。

以上、MqsA のサイレンシングに伴う MqsR の細胞毒性の活性化は、①大腸菌細胞質内の大半の mRNA の切断、②ストレス応答やバイオフィーム形成に関わる遺伝子の発現量の相対的な向上、③Type V の GhoT-GhoS システムのトキシンの活性化、④MqsA-MqsR システム、および、ストレス応答に関わる遺伝子の転写量の向上を誘導することで、強力に細胞システムをストレス応答・バイオフィーム形成の準備に切り替え、細胞死を誘導していると考えられる（図 17）。そのため、MqsA のサイレンシングに伴う生育抑制効果が高いと予想される。また、図 14 において、JM109<sup>empty</sup> において 10%程度の致死効果が認められたことは、発現された Pared-termini のオフターゲット効果の可能性が考えられた。

次節では、発現により高い致死効果が認められた asRNA<sup>mqsA</sup> と asRNA<sup>mib</sup> をマーカーとしたカウンターセレクション効果を実践的な利用を想定して検討した。

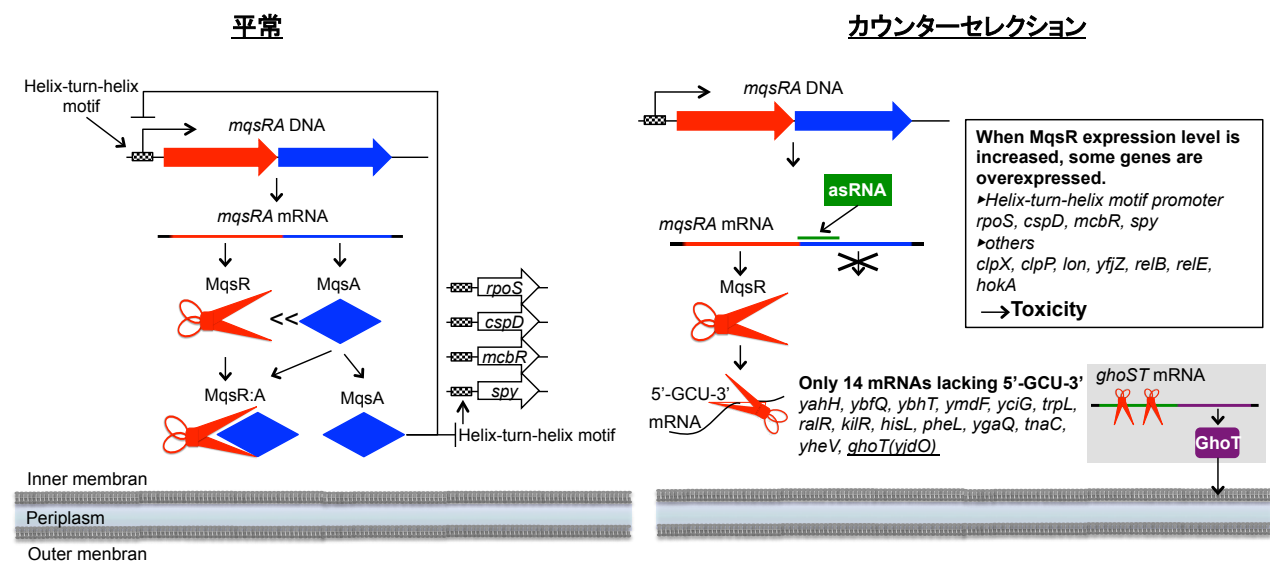


図 17 MqsA/MqsR システムのメカニズム

平常時、細胞内に多量に存在するアンチトキシン MqsA が比較적으로少数存在するトキシン MqsR に結合し無毒化している。また、MqsA は自身のオペロンの他、ストレス応答に関与するいくつかの遺伝子の転写因子として機能する。一方、asRNA により MqsA の発現量が低下すると、MqsR が遊離し毒性を発揮する。MqsR は mRNA の GCU 部位を認識し細胞内の大半の mRNA を切断するが、バイオフィーム形成に関与する遺伝子やトキシン GhoT の mRNA は、例外的にその認識部位を含まない。また、MqsA の発現量の低下により、ストレス応答に関与する遺伝子の転写量が向上する。よって、MqsA の発現量低下は様々な要因が複合的に組み合わせられて効率的な細胞死を招いたと想定される。

#### 5-4. アンチトキシンのサイレンシングによるカウンターセレクション

複数種類のプラスミド DNA を持つ株からカウンターセレクションマーカを含むプラスミド DNA を選択的に除去する場面を想定し、asRNA<sup>mqsA</sup> と asRNA<sup>rnlB</sup> を用いたカウンターセレクション効率を検証した。複数種のプラスミド DNA を同一宿主内に共存させる際、複製開始点の相性が共存の安定性に関わる。asRNA 発現プラスミド pHN1009 は ColE1 ori を持つため<sup>26</sup>、ColE1 ori を持つ pHSG398 (Chloramphenicol<sup>R</sup> [Cm<sup>R</sup>]) とは薬剤耐性などで積極的に選択しなければ、両方のプラスミドが安定的に共存できない（不和合性）。一方、p15A ori を持つ pSTV28 (Cm<sup>R</sup>) は pHN1009 とは複製機構が異なるため、両プラスミドは同一宿主内で安定維持させることが可能である。この「宿主内でのプラスミドの共存の安定性の違い」と「カウンターセレクションの効率」の関係を検証した。

##### 5-4-1. 方法

各種 pHN1009 (pHN1009<sup>mqsA</sup>, rnlB or empty) と pHSG39 (Cm<sup>R</sup>) と pSTV28 (Cm<sup>R</sup>) を用い、表 7 の組合せで大腸菌 JM109 株を形質転換し、Amp、Cm (34 µg/ml [今後、断りがない場合、この濃度で使用]) の両方の薬剤を含む LB 寒天プレート培地で選択し、2 種のプラスミドが共存する形質転換体を得た (図 18)。シングルコロニーを適量の LB 培地に懸濁し、段階希釈し、種々の薬剤を含む LB 寒天プレート培地 (Amp/Cm、Cm、Cm/IPTG 0.1 mM、Cm/IPTG 0.5 mM、Cm/IPTG 1 mM) に適量塗布し、37°C で一晩培養した。カウンターセレクション効率は、(LB/Amp 寒天プレート培地の CFU) / (LB/Cm 寒天プレート培地の CFU) により求めた。

		pHSG398	pSTV28
pHN1009	asRNA <sup>mqsA</sup>	<b>M1</b>	<b>M2</b>
	asRNA <sup>rnlB</sup>	<b>R1</b>	<b>R2</b>
	Empty	<b>E1</b>	<b>E2</b>

表 7 2種類のプラスミド DNA の組み合わせ

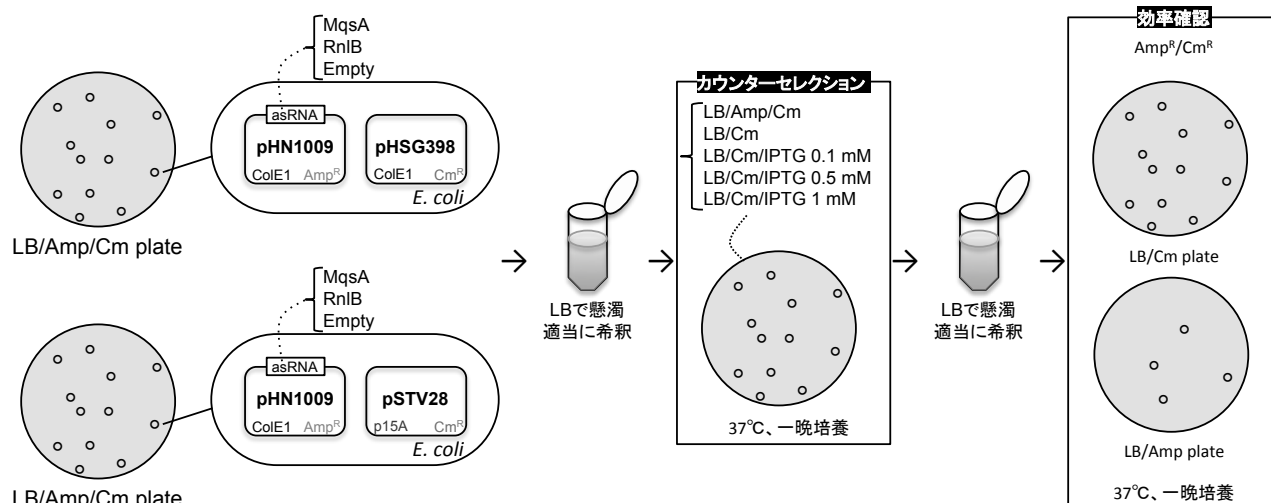


図 18 2種のプラスミド DNA の共存状態におけるカウンターセレクション効率の検証方法

2 種のプラスミドが共存する形質転換体を LB 培地に懸濁し段階希釈した。その菌液を種々の薬剤を含む LB 寒天プレート培地 (Amp/Cm、Cm、Cm/IPTG 0.1 mM、Cm/IPTG 0.5 mM、Cm/IPTG 1 mM) に適量塗布し、37°C で一晩培養した。カウンターセレクション効率は、(LB/Amp 寒天プレート培地の CFU) / (LB/Cm 寒天プレート培地の CFU) により求めた。

##### 5-4-2. 結果

##### 同一複製開始点を持つプラスミドの共存状態 (M1・R1・E1) でのカウンターセレクション

2 種のプラスミドの選択薬剤 (Amp および Cm) を培地に添加した場合、それらの組合せ (M1、R1、E1 [表

7])に関係なく、2種類のプラスミドは細胞内に維持されたままであった。ただし、M1の組合せでは、pHSG398の存在率がpHN1009<sup>rnIB</sup>とpHN1009<sup>empty</sup>の場合に比べて低かった(図19A)。一方、Ampを使用しない培地条件では(IPTGを添加しない場合も含め)、M1、R1、E1の結果は、一見、完全に一致してした(図19A)。また、IPTGを添加せず、Cmのみで選択した場合においても、非選択細胞の存在率が全体の1%未満と低いことから(図19A, B)、複製開始点が同一なプラスミドDNAの共存状態から、任意のプラスミドDNAを除去する場合は、プラスミドDNAの不和合性(目的プラスミドDNAの選択マーカーに応じた抗生物質の利用)だけでも十分な場合が多いことが分かった。ただし、実験の性質によっては、ほんの少しの偽陽性の出現が問題になる場合がある。そこで、図19Aの結果をより詳しく見てみると、IPTGによりasRNAの発現を促進しない場合、非選択細胞が全体の約0.4%(M1)および約0.8%(R1)含まれる一方、低濃度のIPTG(0.1 mM)の添加により非選択細胞の出現率は検出限界以下となることが分かった。また、E1において、IPTGの添加量に関わらず非選択細胞が0.05~0.1%含まれることから、asRNAの発現が選択すべき細胞の集積を効率化しうることが明らかとなった。

#### 複製開始点の異なるプラスミドの共存状態におけるカウンターセレクション

2種のプラスミドの選択薬剤(AmpおよびCm)を培地中に添加した場合、すべての組合せ(M2、R2、E2)において、2種のプラスミドは細胞内に安定して維持された(図19C)。複製開始点が同一である場合とは異なり、M2の組合せでは、pHN1009の脱落は認められなかった(図19C)。またAmpが存在しない条件では、E2の組合せでは、抗生物質やIPTGの添加に関係なく、どの条件の培地でも空ベクターの存在率の低下は確認されなかった(図19C)。一方、M2とR2の組合せでは、IPTGの添加によりpHN1009の存在率の低下が確認された(図19C)。

#### 5-4-3. 考察

同一の複製開始点を持つプラスミドの共存状態でのカウンターセレクション効率については、アンチトキシンに対するasRNAが発現されていないJM109<sup>empty</sup>においても、高い選択率であったことがわかった(図19A)。pHN1009<sup>empty</sup>が残留するクローンの存在率は、IPTGの濃度に影響することなく約1/1,000であった(図19B)。一方、JM109<sup>MqsA</sup>およびJM109<sup>rnIB</sup>においては、IPTGによりasRNAを発現することで、pHN1009が残留するクローンの存在率が検出限界(1/10,000)以下であることが認められた。このことは、同一の複製開始点を持つプラスミドの共存状態におけるpHN1009の除去において、確かに、アンチトキシン遺伝子のサイレンシングが目的クローンの選択効率の向上を高めることを意味している。また、pHN1009の選択薬剤であるAmp存在下でさえ、JM109<sup>MqsA</sup>においてはpHN1009<sup>mqsA</sup>を含むクローンの減少が認められる(図19A)。このことは、asRNA<sup>mqsA</sup>のわずかな発現の漏れが及ぼした結果であるのではないかと予想している。

異なる複製開始点を持つプラスミドの共存状態でのカウンターセレクション効率については、アンチトキシン遺伝子のサイレンシングによる選択率の向上を確認した(図19C, D)。JM109<sup>mqsA</sup>は、IPTGによりasRNAの発現を促進しなくとも、目的クローンの選択が確認されたが(図19C, D)、それは、MqsRの毒性が極めて高いためであると考えられる。

以上、asRNA<sup>mqsA</sup>とasRNA<sup>rnIB</sup>を用いることにより、「アンチトキシン遺伝子のサイレンシングに伴う生育

阻害」を利用したカウンターセレクションの確立という本研究の狙いは達成されたと言える。以下の節では、「大腸菌変異株のスクリーニング」の場面での実用性試験をおこなった。

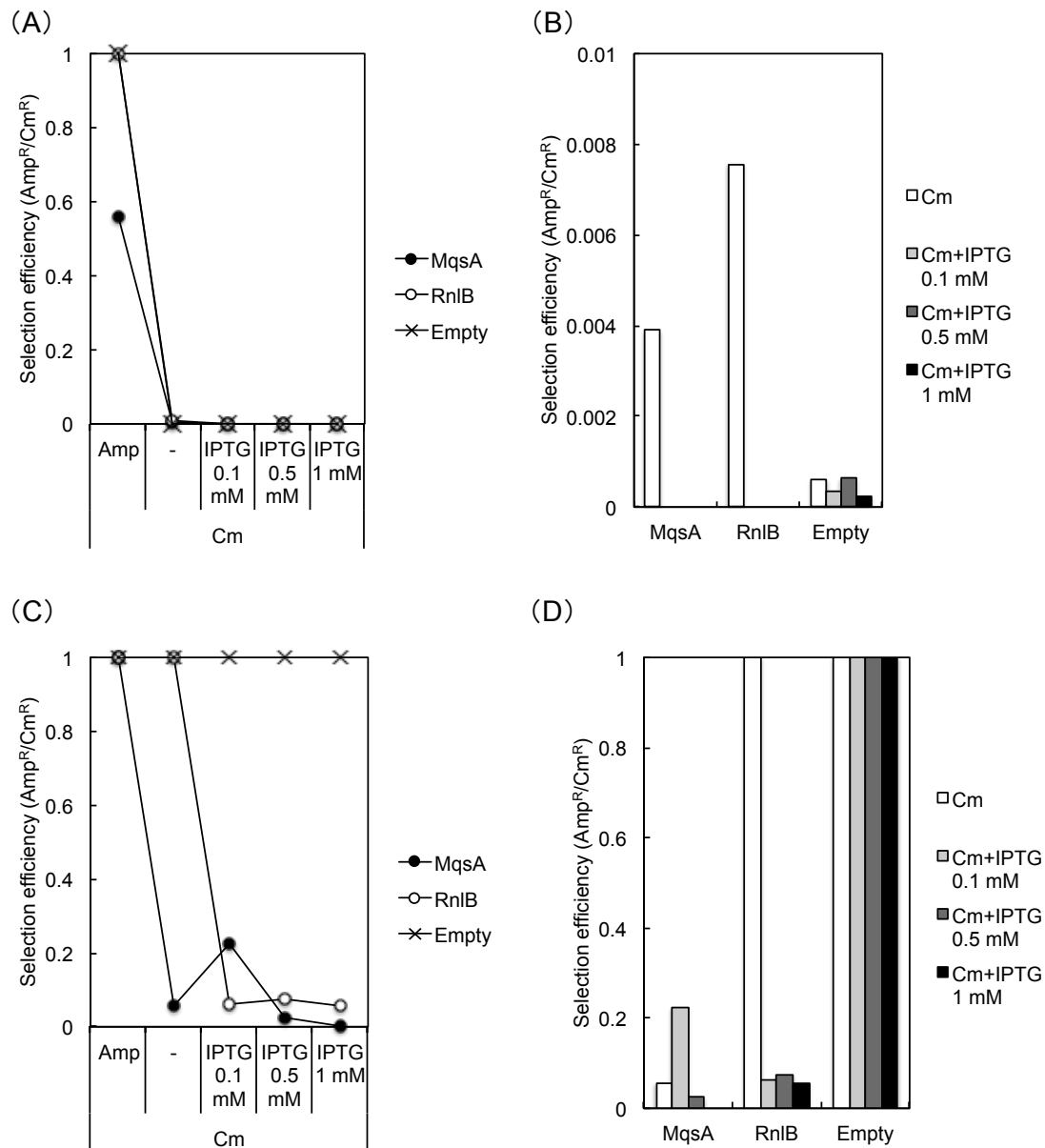


図 19 2 種のプラスミドの共存状態におけるカウンターセレクション効率

(A) 同一の複製開始点を持つプラスミドの共存状態における選択効率。(B) (A) の IPTG 0 から 1 mM の値の棒グラフ表示。(C) 異なる複製開始点を持つプラスミドの共存状態における選択効率。(D) (C) の IPTG 0 から 1 mM の値の棒グラフ表示。

2 種のプラスミドが発現する大腸菌 JM109 株を、各種培地条件 (Amp/Cm、Cm、Cm/IPTG 0.1 mM、Cm/IPTG 0.5 mM、Cm/IPTG 1 mM) で培養し、生育が確認されたクローンを計数した。カウンターセレクション効率は、(LB/Amp 寒天プレート培地に生じたコロニーの数) / (LB/Cm 寒天プレート培地に生じたコロニーの数) により算出した。

## 5-5. 大腸菌宿主改良研究への応用

大腸菌は、様々な異種遺伝子の発現実績を持つが、遺伝子の種類によっては目的の発現量を得られない場合も少なくない。そこで、異種遺伝子発現効率の向上した大腸菌宿主が求められている。ここでは、遺伝子の発現効率を、蛍光強度を指標に簡易に評価可能な *gfp* 遺伝子を用い、ゲノム内の変異により発現効率の向上した大腸菌宿主のスクリーニングに取り組んだ。このように、ゲノム変異などの手法により獲得した宿主

変異株について、確かにその効果がベクター由来でなく宿主由来であることを確認するには、一旦ベクターを除去する必要がある、その際に、gfp 遺伝子の発現プラスミドのカウンターセレクションが必要となる。

### 5-5-1. 方法

#### 大腸菌 JM109 変異株ライブラリーの作成

LB 培地での継代培養により、自然変異導入による JM109 株の変異ライブラリーを構築した。JM109 株のグリセロールストックから LB 培地 2 ml に植菌し、37°Cで一晩培養した。引き続き一晩培養液を、50 ml の LB 培地 (500 ml バッフル付きフラスコ) に 1/1,000 希釈して植え、37°Cで培養した。24 時間ごとに 1/1,000 希釈した菌液を 50 ml の LB 培地に継代し、これを 5 日間繰り返した。5 日後の菌液を適量 LB プレートに塗布し、37°Cで一晩培養した。コロニーの大きさや形状に違いが見られることから変異の導入を確認し、継代培養終了後の菌液からコンピテントセルを作成した。

#### pHN1009<sup>mqsA</sup> の gfp 遺伝子の挿入

本試験に用いた gfp 遺伝子は、アミノ酸配列は相同で、大腸菌および酵母の遺伝子特性にそれぞれ合わせて全合成した 2 種類の遺伝子 (gfp<sup>Eco</sup>、gfp<sup>Sce</sup>) を用いた<sup>34</sup>。これにより、各塩基配列に応じて異なる発現特性を持つ大腸菌宿主変異株の獲得を目指した。pHN1009<sup>mqsA</sup> の beta-lactamase 遺伝子の下流に、gfp<sup>Eco</sup> および gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子をクローニングし、gfp 遺伝子が恒常的に発現するプラスミド (pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Eco]</sup> および pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Sce]</sup>) を構築した。

#### 各 GFP 遺伝子による高発現性宿主のスクリーニング

JM109 変異株ライブラリーのコンピテントセルを、pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Eco]</sup> および pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Sce]</sup> で各々形質転換した。LB/Amp プレート培地上に出現したコロニーライブラリー (>2,000) から、無作為に 388 個のクローンを選択し、1 ml の LB/Amp 培地 (96-well plate) で 24 時間培養した (37°C)。その後、菌液 170  $\mu$ l を 96-well microplate に移し、蛍光強度を SpectraMax Gemini microplate reader にて測定した (ex 488 nm/ em 530 nm)。

#### E1~E4 および S1~S4 における pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Eco]</sup> または pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Sce]</sup> の除去

E1~E4 および S1~S4 から pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Eco]</sup> または pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Sce]</sup> を除去するため、asRNA<sup>mqsA</sup> の発現によるカウンターセレクションをおこなった。具体的には、まず、E1~E4 および S1~S4 を、2 ml の 1 mM IPTG を含む LB 培地で一晩培養した (37°C)。そして、プラスミドが除去された細胞を、1 mM IPTG を含む LB 寒天プレート培地で選択した。カウンターセレクション効果は、カウンターセレクション後の細胞のアンピシリン耐性の欠落と蛍光強度の消失により確認した。

#### カウンターセレクション前後の宿主の表現型維持の評価

プラスミドが除去されたクローンに関し、コンピテントセルを作成した。そして、pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Eco]</sup> および pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>[Sce]</sup> を導入し、形質転換体の GFP の蛍光強度を観察することで、獲得した E1~E4 およ

び S1～S4 の発現効率の向上と、2 種の gfp 遺伝子によってスクリーニングされた宿主の発現の遺伝子特性を検証した。

## 5-5-2. 結果

### gfp<sup>Eco</sup> 遺伝子および gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子の高発現宿主のスクリーニング

JM109 変異株ライブラリーから、gfp<sup>Eco</sup> 遺伝子および gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子を高発現する宿主のスクリーニングをおこなったところ、各々、388 クローン中 15 個程度が同定された。そのうち、発現効率が高いものから順に 4 つずつクローンを選択した（高発現性宿主探索に GFP<sup>Eco</sup> を用いて得た変異株：E1～E4、GFP<sup>Sce</sup>：S1～S4）。

### 選択宿主のカウンターセレクションによる GFP 発現プラスミドの除去

gfp<sup>Eco</sup> 遺伝子および gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子がコードされたプラスミド（pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>Eco</sup> および pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>Sce</sup>）には、asDNA<sup>mqsA</sup> がコードされている。そのため、培地中に IPTG を添加し asRNA を発現させ、これらのプラスミドを細胞から除去した。除去後の細胞は、GFP の蛍光が認められず、アンピシリン耐性が欠落したことを確認した。

### 選択宿主の gfp<sup>Eco</sup> 遺伝子および gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子に対する発現効率向上の確認

gfp<sup>Eco</sup> 遺伝子によってスクリーニングされた宿主（E1～E4）について、プラスミドのリフレッシュをしてクローンを再評価したところ、GFP<sup>Eco</sup> の発現効率の向上が確認された（図 20A）。gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子によってスクリーニングされた宿主（S1～S4）に関しては、gfp<sup>Eco</sup> 遺伝子の発現効率が S2 と S4 で E1～E4 と遜色ない発現効率を示すことが認められた（図 20A）。しかし、S1 については、GFP<sup>Eco</sup> の発現が野生型 JM109 株（WT）よりも発現効率が低下した（図 20A）。

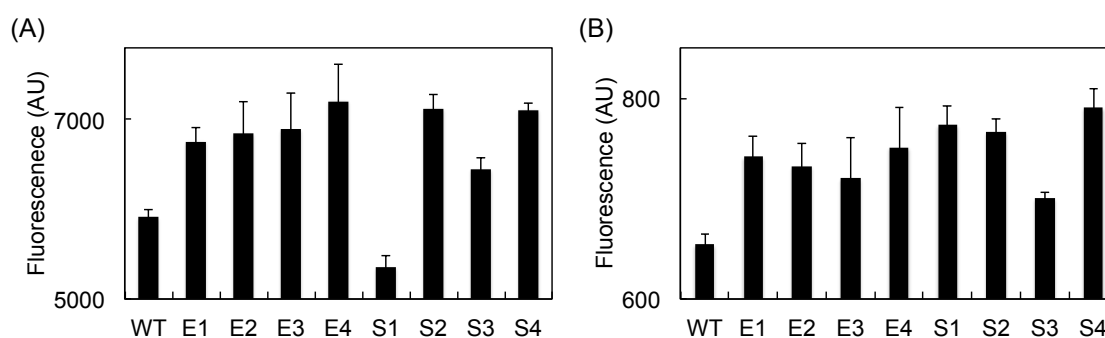


図 20 JM109 変異株における GFP の発現効率

(A) pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>Eco</sup> による GFP の発現。(B) pHN1009<sup>mqsA</sup>/GFP<sup>Sce</sup> による GFP の発現。

一方、gfp<sup>Sce</sup> 遺伝子による発現では、S1～S4 が WT よりも明らかに発現効率が向上したことが確認された（図 20B）。E1～E4 についても、S1、S2、S4 には劣るが GFP<sup>Sce</sup> の発現効率が WT よりも高いことが認められた（図 20B）。

上記の結果から、アンチトキシン遺伝子のサイレンシングによるカウンターセレクションシステムは、大腸菌宿主改良研究に応用可能であることが確認された。

なお、本節の内容は、2015 年に J. Biosci. Bioeng. にて発表済みである<sup>52</sup>。



## 6. おわりに

本章では、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換実験のハイスループット化を試みた。16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーの設計では、低温感受性に関わるヘリックス h2 の領域の Pseudoknot 構造を保存するために、h2 内に含まれるもののバクテリアごとに塩基の違いが見られる 19 塩基目を含めないようにした。さらに、16S rRNA の成熟に関わる 5'末端領域を 16S<sup>Eco</sup> の配列に一致させたプライマーBac1f が誕生した。また、3'末端側においても、保存性が高い領域にアニールするプライマーUN1542r を設計した。これらのユニバーサルプライマーの誕生により、ヘリックス h2 の Pseudoknot 構造の変化に起因する低温感受性を有す 16S rRNA 遺伝子置換株や、16S rRNA の成熟不良の問題が回避された。

選択薬剤の変更では、これまで使用してきた Zeo の注意すべき点を明らかにし、Tnp に変更することで解決した。コスト的にも 1/300 程度に大幅に改善できた。

カウンターセクション工程は、16S rRNA 遺伝子の置換実験のスループットを制限するもっとも大きなボトルネックであったが、寒天プレートからかき取ったコロニーを懸濁し、適宜希釈後にスクロースプレートに塗布するという簡単な操作で本問題を解決できた。この操作性の向上とスループットの拡大は、選択薬剤をゼオシンから Tnp に変更することで成し得た。また、大腸菌 Type II TA システムに含まれるアンチトキシン遺伝子を発現アンチセンス法によりサイレンシングするという原理に基づく新規なカウンターセクションシステムを開発した。ここで開発されたカウンターセクションシステムを 16S rRNA 遺伝子置換実験に適用することも検討したが、別途進めていた選択薬剤の最適化（Zeo から Tnp）により、当初抱えていた SacB 変異による系の不安定性の問題も同時に回避されたため、引き続き SacB を使用した。

以上、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子置換技術のスループット性を向上させる、各操作段階での最適化に成功した。そこで、これらの改良点を盛り込んだ大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換技術を、“RINSPEX (Ribosomal RNA INterSPecies EXchange) 法”と命名した。また、新規位に開発したカウンターセクションシステムについては、16S rRNA 遺伝子置換技術に採用はしないが、遺伝子工学的なツールとして、今後利用が広がることが期待される。

### 《引用文献》

1. Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R.P. and Pace, N.R. (1991) Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 324-325.
2. Kitahara, K. and Miyazaki, K. (2011) Specific inhibition of bacterial RNase T2 by helix 41 of 16S ribosomal RNA. *Nat. Commun.* **2**, 549.
3. Kitahara, K., Yasutake, Y. and Miyazaki, K. (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19220-19225.
4. Dammel, C.S. and Noller, H.F. (1993) A cold-sensitive mutation in 16S rRNA provides evidence for helical switching in ribosome assembly. *Genes Dev.* **7**, 660-670.

5. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 2725-2729.
6. Gutgsell, N.S. and Jain, C. (2012) Gateway role for rRNA precursors in ribosome assembly. *J. Bacteriol.* **194**, 6875-6882.
7. Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. (1966) New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot.* **19**, 200-209.
8. Stubbe, J. and Kozarich, J.W. (1987) Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem. Rev.* **87**, 1107-1136.
9. Tsukuda, M. and Miyazaki, K. (2013) DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 644-646.
10. Tashiro, Y., Fukutomi, H., Terakubo, K., Saito, K. and Umeno, D. (2011) A nucleoside kinase as a dual selector for genetic switches and circuits. *Nucleic Acids Res.* **39**, e12.
11. Kast, P. and Hennecke, H. (1991) Amino acid substrate specificity of *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase altered by distinct mutations. *J. Mol. Biol.* **222**, 99-124.
12. Miyazaki, K. (2015) Molecular engineering of a PheS counterselection marker for improved operating efficiency in *Escherichia coli*. *Biotechniques* **58**, 86-88.
13. Bernard, P. (1995) New ccdB positive-selection cloning vectors with kanamycin or chloramphenicol selectable markers. *Gene* **162**, 159-160.
14. DeVito, J.A. (2008) Recombineering with tolC as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **36**, e4.
15. Steinmetz, M., Le, Coq, D., Djemia, H. B. and Gay, P. (1983) Genetic analysis of sacB, the structural gene of a secreted enzyme, levansucrase of *Bacillus subtilis* Marburg. *Mol. Gene Genet.* **191**, 138-144
16. Mizoguchi, H., Tanaka-Masuda, K. and Mori, H. (2007) A simple method for multiple modification of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2905-2911.
17. Hashimoto, M., Ichimura, T., Mizoguchi, H., Tanaka, K., Fujimitsu, K., Keyamura, K., Ote, T., Yamakawa, T., Yamazaki, Y., Mori, H., Katayama, T. and Kato, J. (2005) Cell size and nucleoid organization of engineered *Escherichia coli* cells with a reduced genome. *Mol. Microbiol.* **55**, 137-149.
18. Kato, J. and Hashimoto, M. (2007) Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 132.
19. Engelberg-Kulka, H. and Glaser, G. (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 43-70.
20. Hayes, F. and van Melderren, L. (2011) Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**, 386-408.

21. Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.P. and Inouye, M. (2012) YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **84**, 979-989.
22. Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., Benedik, M.J., Page, R. and Wood, T.K. (2012) A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 855-861.
23. Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2011) Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nat. Rev Microbiol.* **9**, 779-790.
24. Nakashima, N., Hoh, S., Good, L. and Tamura, T. (2012) Multiple-gene silencing using antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Methods. Mol. Biol.* **815**, 307-319.
25. Sato, K., Hamada, M., Asai, K. and Mituyama, T. (2009) CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction, *Nucleic Acids Res.* **37**, W277-280.
26. Nakashima, N., Tamura, T. and Good, L (2006) Paired termini stabilize antisense RNAs and enhance conditional gene silencing in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **34**, e138.
27. Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W. and Wood, T.K. (2004) Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 515-524.
28. Gonzalez, Barrios, A.F., Zuo, R., Hashimoto, Y., Yang, L., Bientey, W.E. and Wood, T.K. (2006) Autoinducer 2 controls biofilm formation in *Escherichia coli* through a novel motility quorum-sensing regulator (MqsR, B3022). *J. Bacteriol.* **188**, 305-316.
29. Kim, T., Wang, X., Zhang, X.S., Grigoriu, S., Page, R., Peti, W. and Wood, T.K. (2010) *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. *Environ. Microbiol.* **12**, 1105-1121.
30. Domka, J., Lee, J., Bansal, T. and Wood, T.K. (2007) Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.* **9**, 332-346.
31. Cheng, H.Y., Valerie, W.C., Sabina, S., Islam, M., McAnulty, J.M., Benedik, J.M. and Wood, T.K. (2014) Toxin GhoT of the GhoT/GhoS toxin/antitoxin system damages the cell membrane to reduce adenosine triphosphate and to reduce growth under stress. *Environ. Microbiol.* **16**, 1741-1754.
32. Yamaguchi, Y., Larm, J.H. and Inouye, M. (2009) MqsR, a crucial regulator for quorum sensing and biofilm formation, is a GCU-specific mRNA interferase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **284**, 28746-28753.
33. Brown, B.L., Grigoriu, S., Kim, Y., Arruda, J.M., Davenport, A., Wood, T.K., Peti, W. and Page, R. (2009) Three dimensional structure of the MqsR:MqsA complex: a novel TA pair comprised of a toxin homologous to RelE and an antitoxin with unique properties. *PLoS Pathog.* **5**, e1000706.
34. Tsukuda, M. and Miyazaki, K. (2013) Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 540-545.

35. Zhang, Y., Zhang, J., Hoeflich, K.P., Ikura, M., Qing, G. and Inouye, M. (2003) MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **12**, 913-923.
36. Zhang, Y., Zhu, L., Zhang, J. and Inouye, M. (2005) Characterization of ChpBK, an mRNA interferase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **280**, 26080-26088.
37. Jongensen, M.G., Pandey, D.P., Jaskoiska, M. and Gerdes, K. (2009) HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* **191**, 1191-1199.
38. Schmidt, O., Schuenemann, V.J., Hand, N.J., Silhavy, T.J., Martin, J., Lupas, A.N. and Djuranovic, S. (2007) prlF and yhaV encode a new toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **372**, 894-905.
39. Koga, M., Otsuka, Y., Lemire, S. and Yonesaki, T. (2011) *Escherichia coli* rnlA and rnlB compose a novel toxin-antitoxin system, *Genetics* **187**, 123-130.
40. Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K. and Ehrenberg, M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site, *Cell* **10**, 131-140.
41. Takagi, H., Kakuta, Y., Okada, T., Yao, M., Tanaka, I. and Kimura, M. (2005) Crystal structure of archaeal toxin-antitoxin RelE-RelB complex with implications for toxin activity and antitoxin effects, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 327-331.
42. Christensen, S.K., Maenhaut-Michel, G., Mine, N., Gottesman, S., Gerdes, K. and Van Melderren, L. (2004) Overproduction of the Lon protease triggers inhibition of translation in *Escherichia coli*: involvement of the yefM-yoeB toxin-antitoxin system, *Mol. Microbiol.* **51**, 1705-1717.
43. Zhang, Y., Yamaguchi, Y. and Inouye, M. (2009) Characterization of YafO, an *Escherichia coli* toxin, *J. Biol. Chem.* **284**, 25522-25531.
44. Prysak, M.H., Mozdierz, C.J., Cook, A.M., Zhu, L., Zhang, Y., Inouye, M. and Woychik, N.A. (2009) Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. *Mol. Microbiol.* **71**, 1071-1087.
45. Christensen-Dalsgaard, M., Jorgensen, M. G. and Gerdes, K. (2010) Three new RelE- homologous mRNA interferases of *Escherichia coli* differentially induced by environmental stresses. *Mol. Microbiol.* **75**, 333-348.
46. Zhang, Y. and Inouye, M. (2011) RatA (YfjG), an *Escherichia coli* toxin, inhibits 70S ribosome association to block translation initiation. *Mol. Microbiol.* **79**, 1418-1429.
47. Tan, Q., Awano, N. and Inouye, M. (2011) YeeV is an *Escherichia coli* toxin that inhibits cell division by targeting the cytoskeleton proteins, FtsZ and MreB. *Mol. Microbiol.* **79**, 109-118.
48. Burke, C., Liu, M., Britton, W., Triccas, J.A., Thomas, T., Smith, A.L., Allen, S., Salomon, R. and Harry, E. (2013) Harnessing single cell sorting to identify cell division genes and regulators in bacteria. *PLoS One.* **8**, e60964.

49. Sugai, R., Shimizu, H., Nishiyama, K. and Tokuda, H. (2001) Overexpression of *yccL* (*gnsA*) and *ydfY* (*gnsB*) increases levels of unsaturated fatty acids and suppresses both the temperature-sensitive *fabA6* mutation and cold-sensitive *secG* null mutation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**, 5523-5528.
50. Korch, S.B., Henderson, T.A. and Hill, T.M. (2003) Characterization of the *hipA7* allele of *Escherichia coli* and evidence that high persistence is governed by (p) ppGpp synthesis. *Mol. Microbiol.* **50**, 1199-1213.
51. Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* **2**, 2006.0008.
52. Tsukuda, M. Nakashima, N. and Miyazaki, K. (2015) Counterselection method based on conditional silencing of antitoxin genes in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **120**, 591-595.

## 第2章 機能性異種 16S rRNA 遺伝子の進化系統的限界 の探索

本章では、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子の置換法 “RINSPEX 法”（第1章）により得られる異種 16S rRNA の進化系統的な「限界」を追求した。つまり、大腸菌  $\Delta 7$  株を生育相補しうる 16S rRNA 遺伝子のうち、大腸菌 16S rRNA 遺伝子との配列相同性が最も低いものを探索した。

まず、多種多様な 16S rRNA 遺伝子が機能する 4,000 クローン規模の KT105 株ライブラリーを構築した。次に、増殖が不良なクローン 48 個を選択した。その結果、無作為に選択した場合と比較し、大腸菌と進化系統的に遠縁のバクテリア 16S rRNA が高頻度で含まれることが確認された。シーケンス解析の結果、大腸菌とは門レベルで異なるアシドバクテリア門由来の 16S rRNA 2 種（16S<sup>NS5</sup>、16S<sup>NS11</sup>）を獲得した。特に 16S<sup>NS11</sup> は大腸菌 16S rRNA 遺伝子との配列相同性が非常に低く（78.4%）、334 の塩基置換があった。これまでに確認された「限界」は、大腸菌と同門別綱であるベータプロテオバクテリア綱に帰属される 16S rRNA 遺伝子であり、その配列相同性は 81%であった。よって、本章における研究で、進化系統的な「限界」を更新することに成功した。大腸菌リボソームが 334 もの塩基変化を受容可能であることが示され、16S rRNA 遺伝子が大規模に改変可能であることが改めて証明された。

**キーワード**：16S rRNA 遺伝子の改変限界、アシドバクテリア門



## 1. はじめに

第1章で述べた通り、16S rRNA は二次構造に富むため、点変異に対する感受性が高い。その一方、二次構造を維持した形で配列を改変することに対しての許容度は非常に高いことがわかった。では、それがどの程度なのか？ 本章では、RINSPEX 法により大規模なライブラリーを構築し、生育の遅いクローンを選択的に解析することで、その「限界」を探った。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミド pRB105 ライブラリーの構築

土壌や海水、動物の腸内など。様々な環境サンプルから、Extrap Soil DNA kit Plus ver.2 を用い、メタゲノムを獲得した (図 1)。それらのメタゲノムを鋳型に、第1章で開発した Bac1f と UN1542r プライマーを用い、異種 16S rRNA 遺伝子断片を PCR 増幅した (図 1)。PCR 用の DNA ポリメラーゼは、不純物の存在下でも高い増幅効率を示す KOD-Fx-Neo を用いた。一方、異種 16S rRNA 遺伝子発現ベクターである pRB105 については、Bac1f と UN1542r とは逆向きのプライマー、Bac1r (GATCAAACCTCTTCAATTTAAAGTTTGACGCTCAAAG) と UN1542f (TGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAAGCGT) を用いて増幅した。得られた PCR 断片は、16S rRNA 遺伝子領域が欠失した直鎖状の pRB105 となる (図 1)。PCR 用の DNA ポリメラーゼは KOD-Plus-Neo を用いた。こうして増幅されたベクターおよびインサート断片を In-Fusion HD Cloning Kit により連結し、pRB105 プラスミドライブラリーを作成した (図 1)。次に、pRB105 ライブラリーにより大腸菌 JM109 株を形質転換し、約 40,000 クローン規模の形質転換体を獲得した。すべてのコロニーを寒天培地より回収し、LB 培地に懸濁し、HiYield™ Plasmid Mini Kit を用いて pRB105 ライブラリーを抽出した。

### 2-2. pRB105 ライブラリーの 16S rRNA 遺伝子の多様度解析

pRB105 ライブラリーにより JM109 株を形質転換し、約 40,000 の形質転換体から 48 個のクローンを無作為に選択し、各クローンから pRB105 を抽出した。pRB105 にコードされた 16S rRNA 遺伝子の全長配列を解析するため、まず、pRB105 特異的で、16S rRNA 遺伝子の上流にアニールするプライマー-Tmp-F (ATGGCGAATGAAGGAAAAAATGAGGTC)、および 16S rRNA 遺伝子の下流にアニールする+126R (GTGATATTTTCGTGTAGGGT) により 16S rRNA 遺伝子を含む領域を PCR により増幅した。PCR 用の DNA ポリメラーゼは EmeraldAmp PCR Master Mix を用いた。次に、これを鋳型に、16S rRNA 遺伝子より上流にアニールする-47F (AATACCAAGTCTCAAGAGTG)、16S rRNA 遺伝子内の全バクテリア間で高度に保存されている領域にアニールする 907R (CCGYCAATTCMTTTRAGTTT)、そして+126R を用いてシーケンス解析した (ABI BigDye Terminator v3.1、3130 自動シーケンサー)。3 種のプライマーによって得られた配列をアッセンブリーし、16S rRNA 遺伝子全長を明らかにした。ユニバーサルプライマー領域を除く領域 (19~1,527 領域) をクエリーとして NCBI nucleotide database “16S rRNA sequences (Bacteria and Archaea)” に対して BLAST 解析<sup>4</sup>をおこない、系統の帰属をおこなった。解析条件は Highly similar sequences (megablast) を適用した。

### 2-3. pRB105 ライブラリーのスクリーニングと相補株の単離、配列解析

pRB105 ライブラリーで、KT101 株を形質転換し、LB/Tmp (10 µg/ml [今後、断りがない場合、この濃度で使用]) 寒天培地で pRB101 と pRB105 が共存する形質転換体を選択した (図 1)。獲得された形質転換体を寒天プレートからかき集め、LB 培地に懸濁し、適当に希釈し、スクロースを含む寒天プレート培地 (LB Lennox, Km, Tmp、5% スクロース) に撒き、37°C で 2 日間培養した (図 1)。得られたライブラリーから無作為に 48 個のクローンを選択し、16S rRNA 遺伝子の配列解析を 2-2 記載の方法に準じておこなった。また、同じライブラリーから、増殖が不良なクローン (コロニーサイズが小さい) 48 個を選択し、16S rRNA 遺伝子の配列解析を 2-2 記載の方法に準じておこなった。

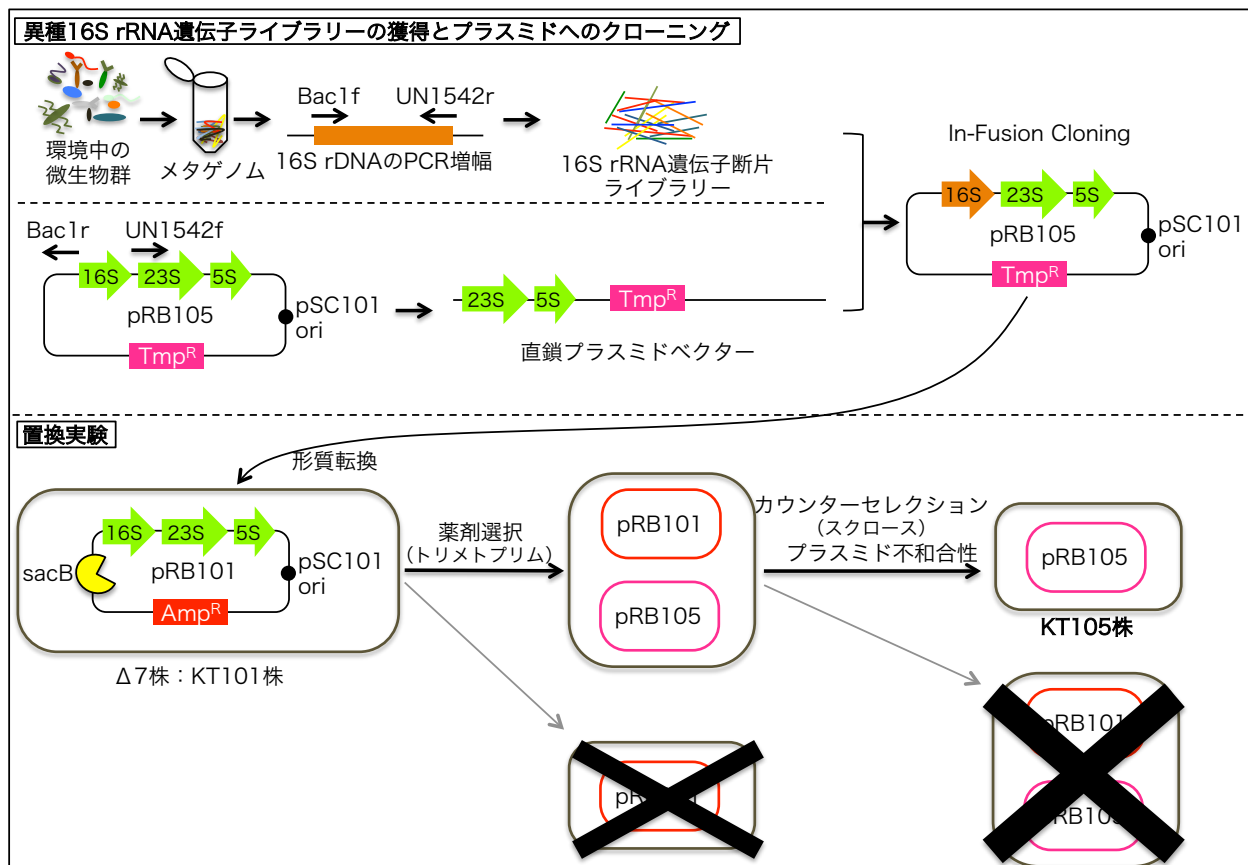


図1 RINSPEX 法の流れ

メタゲノムを鋳型に Bac1f と UN1542r で、多種多様なバクテリア 16S rRNA 遺伝子を PCR により抽出する。また、異種 16S rRNA 遺伝子発現プラスミドである pRB105 を鋳型に、Bac1f と UN1542r と相補的なプライマーである Bac1r と UN1542f を用い PCR 増幅する。そして、16S rRNA 遺伝子断片と直鎖 pRB105 を In-Fusion Cloning に用い、異種 16S rRNA 遺伝子がコードされた pRB105 ライブラリーを構築する。得られたプラスミドライブラリーにより KT101 株を形質転換し、Tmp を含む LB 寒天プレート培地で選択することで、Δ7 株に pRB101 と pRB105 が共存する株を獲得する。次にスクロースを含む LB 寒天プレート培地で pRB101 を脱落し、pRB105 により生育を相補される株を選択する。

### 2-4. 増殖良好株のスクリーニングと配列解析

2-3 で得られたライブラリーを 8 ml の LB 培地に懸濁し、その一部を大腸菌の生育至適温度である 37°C よりも 6°C 高い 43°C に予め保温していた 50 ml LB 培地 (500 ml バッフル付き三角フラスコ) に植菌し、12 時間おきに継代培養を繰り返した。3 日間培養後の菌液を適当に希釈し、寒天プレート培地に撒きクローンを純化し、16 個のコロニーを選択した。その機能性 16S rRNA 遺伝子の配列解析は、“pRB105 ライブラリーの 16S rRNA 遺伝子の多様度解析”と同様の方法でおこなった。



## 2-5. pRB101 除去の確認

カウンターセクションによる pRB101 の除去を確認する対象のクローン、および、Eco 株、そして、大腸菌 Δ7 株 (KT101 株) からゲノム DNA (およびプラスミド DNA) を抽出し、pRB101、16S<sup>Eco</sup>、それぞれの異種 16S rRNA 遺伝子に対し、特異的に PCR 増幅するプライマーセット (表 2) で PCR をおこなった。PCR 用の DNA ポリメラーゼは、EmeraldAmp PCR Master Mix を使い、25 サイクル施行した。その後、PCR 反応液は 0.9 % [w/v] アガロースゲルで電気泳動され、バンドの有無を観察した。

PCR標的遺伝子		Name	Sequence (5' to 3') <sup>※1</sup>
pRB101	sacB遺伝子	SacB-F	ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGC
		SacB-R	TTATTTGTAACTGTTAATTGTCCTTGTTTC
16S <sup>Eco</sup>	16S <sup>Eco</sup> の625～989塩基領域	Eco-625F	TGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAG
		Eco-989R	CTGAAAGTTCCTGGATGTCAAGA
16S <sup>NS5</sup>	16S <sup>NS5</sup> の454～1542塩基領域	NS5-454F	GCGACTCGGCCTAATACGCCGG
		UN1542r	TAAGGAGGTGATCCA
16S <sup>NS11</sup>	16S <sup>NS11</sup> の454～1542塩基領域	NS11-454F	GGCCTCTGGCCACACCAGAGGA
		UN1542r	TAAGGAGGTGATCCA

表 2 pRB101 除去の確認に用いたプライマー

## 2-6. 進化系統解析

28 種の機能性 16S rRNA 遺伝子配列 (19～1,527 領域) は、対応する近縁種の 16S rRNA 遺伝子配列や、16S<sup>Eco</sup> (rrsB) 配列、外群の *Haloarcula argentinensis* DSM 12282 strain (DF645681) の 16S rRNA 遺伝子配列と一緒に、SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) で整列した。整列配列セットを用い、MEGA 6.0<sup>5</sup> で、Neighbor-joining 法<sup>6</sup> による系統樹を作成した。Bootstrap は 1,000 回施行した。

## 2-7. 生育評価

まず、生育評価対象の KT105 株の宿主リフレッシュをおこなった。各株から pRB105 を抽出し、16S<sup>Eco</sup> がコードされたプラスミド pRB105<sup>Eco</sup> と共に、同じロットの KT101 株に導入し、pRB105 ライブラリーによる大腸菌 Δ7 株における機能相補実験<sup>7</sup>記載の方法に従い、KT105 株を改めて選択した。

### 2-7-1. 固体培地条件

LB 寒天プレート培地 (Tnp, Km, 5% sucrose) 上のコロニーを 2 ml の LB 培地 (Tnp, Km) で培養した (37°C、24 h)。その後、M9-グルコース (Glc) 最少培地で 2 度洗浄し、OD<sub>600</sub> を 1 に揃えた菌液を、LB 寒天プレート培地 (Tnp, Km) にスポットし、37°C で培養した。

### 2-7-2. 液体培地条件

LB 寒天プレート培地 (Tnp, Km, 5% sucrose) 上のコロニーを 4 つずつ、それぞれ 600 μl の LB 培地 (Tnp, Km) で培養した (96 deepwell plate, 37°C、24 h)。その後、M9-Glc 最少培地で 2 度洗浄し、OD<sub>600</sub> を 1 に揃えた菌液 0.7 μl を、37°C に温められた 200 μl の LB 培地 (Tnp, Km) および M9-Glc 最少培地 (Tnp, Km) に植菌し、VersaMax plate reader を使い、37°C で振盪しながら、15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。

各株の増殖倍化時間 (DT) は、増殖曲線からそれぞれ算出された、独立クローン 4 つの平均値である。また、ラグは、培養開始時から対数増殖期に入るまでの時間とした。

Clone	Accession No.	identity to rrsB	Closest 16S rRNA (Accession number)	Identity	Classification
Eco	CP009685	100.0%	<i>Escherichia coli</i> _str._K-12 substr._MG1655(CP009685)	100.0%	Gammaproteobacteria
BH1	LC093139	97.6%	<i>Edwardsiella tarda</i> (CP011359)	99.6%	Gammaproteobacteria
BH2	LC093140	95.0%	<i>Edwardsiella tarda</i> (CP011359)	99.7%	Gammaproteobacteria
BH6	LC093141	95.5%	<i>Edwardsiella tarda</i> (CP011359)	99.5%	Gammaproteobacteria
HK1	LC093142	81.5%	<i>Burkholderia sordidicola</i> (DQ256491)	99.7%	Betaproteobacteria
HK2	LC093143	82.7%	<i>Xanthomonadaceae bacterium</i> _Ellin7015(AY673181)	96.2%	Gammaproteobacteria
HK3	LC093144	81.3%	<i>Burkholderia sordidicola</i> (LC008478)	99.1%	Betaproteobacteria
HK5	LC093146	80.4%	<i>Methylobium</i> _sp._DR10(FJ464985)	97.8%	Betaproteobacteria
HK7	LC093147	80.8%	<i>Burkholderia sordidicola</i> (LC008478)	98.9%	Betaproteobacteria
HK9	LC093148	80.8%	<i>Methylobium</i> _sp._W125(AB162105)	97.8%	Betaproteobacteria
HK10	LC093149	80.9%	<i>Burkholderia sordidicola</i> (KJ606830)	99.9%	Betaproteobacteria
HK11	LC093150	81.7%	<i>Burkholderia sordidicola</i> (DQ256491)	99.7%	Betaproteobacteria
HK16	LC093151	81.8%	<i>Janthinobacterium lividum</i> (DQ473538)	97.9%	Betaproteobacteria
HK19	LC093153	81.3%	<i>Massilia</i> _sp._Asd_M1A2(FM955855)	99.3%	Betaproteobacteria
HK20	LC093154	80.6%	<i>Leptothrix</i> _sp._PN15D(AB480711)	99.1%	Betaproteobacteria
HK21	LC093155	80.8%	<i>Burkholderia cepacia</i> (AY741358)	100.0%	Betaproteobacteria
NS3	LC093156	83.4%	<i>Rudaea</i> _sp._B0.10-151(JX458397)	95.6%	Gammaproteobacteria
NS4	LC093157	81.0%	<i>Burkholderia</i> _sp._RPE64(AP013059)	91.0%	Betaproteobacteria
NS5	LC093165	79.3%	<i>Holophaga</i> _sp._WY42(KC921174)	85.2%	Acidobacteria
			<i>Acidobacteria bacterium</i> _WY67(KC921177)	83.2%	Acidobacteria
NS6	LC093158	80.2%	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> (JX049412)	97.9%	Betaproteobacteria
NS7	LC093159	80.3%	<i>Ramlibacter</i> _sp._7B-217(KF441662)	97.4%	Betaproteobacteria
NS10	LC093160	80.6%	<i>Burkholderia</i> _sp._RPE64(AP013059)	91.3%	Betaproteobacteria
NS11	LC093166	78.4%	<i>Holophaga</i> _sp._WY42(KC921174)	84.5%	Acidobacteria
			<i>Acidobacteria bacterium</i> _IGE-010(GU187031)	83.5%	Acidobacteria
NS14	LC093161	81.1%	<i>Burkholderia</i> _sp._RPE64(AP013059)	91.2%	Betaproteobacteria
NS16	LC093162	82.7%	<i>Janthinobacterium</i> _sp._A1-13(AB252072)	98.6%	Betaproteobacteria
NS19	LC093163	80.6%	<i>Leptothrix</i> _sp._PN15D(AB480711)	99.2%	Betaproteobacteria
NS20	LC093164	80.8%	<i>Burkholderia</i> _sp._RPE64(AP013059)	91.2%	Betaproteobacteria
45-BH	LC093167	95.1%	<i>Edwardsiella tarda</i> (CP011359)	99.6%	Gammaproteobacteria
45-HK	LC093168	85.4%	<i>Cellvibrio gandavensis</i> (NR_025419)	97.6%	Gammaproteobacteria

表 3 機能性 16S rRNA 遺伝子配列情報

28 種の KT105 株 (BH1 株～45HK 株) の機能性 16S rRNA 遺伝子の DDBJ 登録番号 (Accession No)、大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Eco</sup>) との配列相同性、Blast 解析結果を記した。

## 2-8. 16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup> の 16S rRNA 二次構造上の変異部位マッピング

16S<sup>Eco</sup>、16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup> の配列を SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) で整列した情報を用いた。

## 2-9. 異種 16S rRNA と 16S<sup>Eco</sup> の相違度のウィンドウ解析

解析に用いた 16S rRNA 遺伝子の配列は、NCBI nucleotide database “16S rRNA sequences (Bacteria and Archaea)” から、プロテオバクテリア門の各綱 (アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、イプシロンプロテオバクテリア綱)、そして、アシドバクテリア門において最大 30 の 16S rRNA 遺伝子配列を無作為に獲得した。

対象となる 16S rRNA 遺伝子配列 (19～1,527 領域) を SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) で整列し、MEGA 6.0<sup>5</sup> で、16S<sup>Eco</sup> の配列に対応する部位 (16S<sup>Eco</sup> 基準とした場合の挿入は解析対象外。欠失部位は解析対象。) を抽出した。5'末端から 40 塩基目まで、そして、1 塩基ずつ 3'末端側に移動させながら 3'末端に到達するまで、40 塩基分の相違度を算出した。

また、大腸菌リボソームの 30S サブユニットにおける、16S<sup>Eco</sup> とリボソームタンパク質の距離 (PDB code: 3R80<sup>7</sup>) を指標に、16S<sup>Eco</sup> のリボソームタンパク質との相互作用に関するウィンドウ解析をおこなった。

## 2-10. ヘリックス情報の抽出と二次構造予測

16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>Eco</sup> を SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) で整列し、16S<sup>Eco</sup> の配列を基準に、45 個すべてのヘリックス領域の配列を抽出した。16S<sup>Eco</sup> のヘリックスの長さを基準に、15 塩基未満のヘリックスは解析対象から除外した。16S<sup>NS11</sup> の各ヘリックス領域の配列は、16S<sup>Eco</sup> を基準として長さの違いを求めた。また、16S<sup>Eco</sup> の各ヘリックスとの相同性は、ギャップも相違部位として見なし、求めた。16S<sup>NS11</sup> の二次構造は、CENTROIDFOLD<sup>9</sup> による二次構造予測を参考にした。

## 2-11. データベースへの配列登録

本研究において新たに大腸菌 Δ7 株への機能相補が確認された 16S rRNA 遺伝子配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) database (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) に登録した (LC093139 ~ LC093151, LC093153 ~ LC093168) (表 3)。

## 3. 結果と考察

### 3-1. RINSPEX 法による KT105 変異株ライブラリーの構築と機能スクリーニング

RINSPEX 法により大規模な KT105 変異株ライブラリーを構築した。16S rRNA 遺伝子の給源としてメタゲノムを利用し、微生物多様性の確保を図ったが、その多様性を実験的に確認した。このため、まず機能相補実験をおこなう前に、pRB105 ライブラリーにコードされた 16S rRNA 遺伝子の配列を解析した。その結果、約半数が、バクテロイデテスに帰属されるバクテリア由来であり、その他、含有率の高い分類群順に、ガンマプロテオバクテリア、ファーミキューティス、フソバクテリア、アルファプロテオバクテリア、アシドバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子が確認された (図 2、pRB105 lib)。解析した 48 個の配列はどれも独立であり、構築された pRB105 ライブラリー内の 16S rRNA 遺伝子は多様であることを確認した。

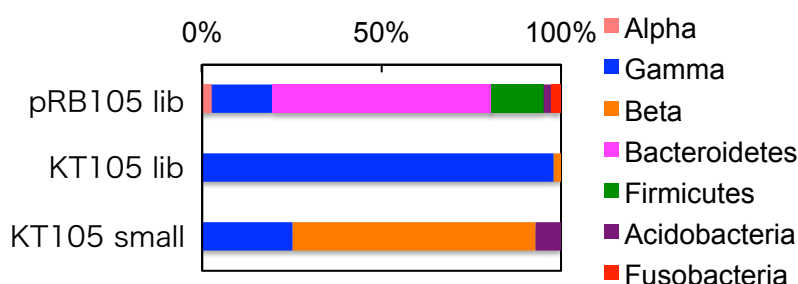


図 2 ライブラリー、選択クローンに含まれる 16S rRNA 遺伝子の進化系統分類

メタゲノム由来の 16S rRNA 遺伝子ライブラリーの機能選択前の pRB105 ライブラリー "pRB105 lib" 機能選択後、ランダムに選択した KT105 株ライブラリー "KT105 lib" 機能選択後、生育不良な株を選択した "KT105 small" の 16S rRNA 遺伝子の進化系統分類に基づく存在率。

次に、この KT101 株ライブラリーをショ糖寒天培地に播種しカウンターセクションをおこない、約 4,000 の機能相補株 (KT105 株) を獲得した。この中から、まず 48 個のコロニーをランダムに選択し、16S rRNA 遺伝子配列を解析した結果、いずれのクローンも独立した配列を持ち、その大半がガンマプロテオバクテリア綱に帰属され、少数がベータプロテオバクテリア綱に帰属されるものであった (図 2、KT105 lib)。この結果は、RINSPEX 法として確立する以前に研究室内で得た結果<sup>2</sup>とほぼ一致した。

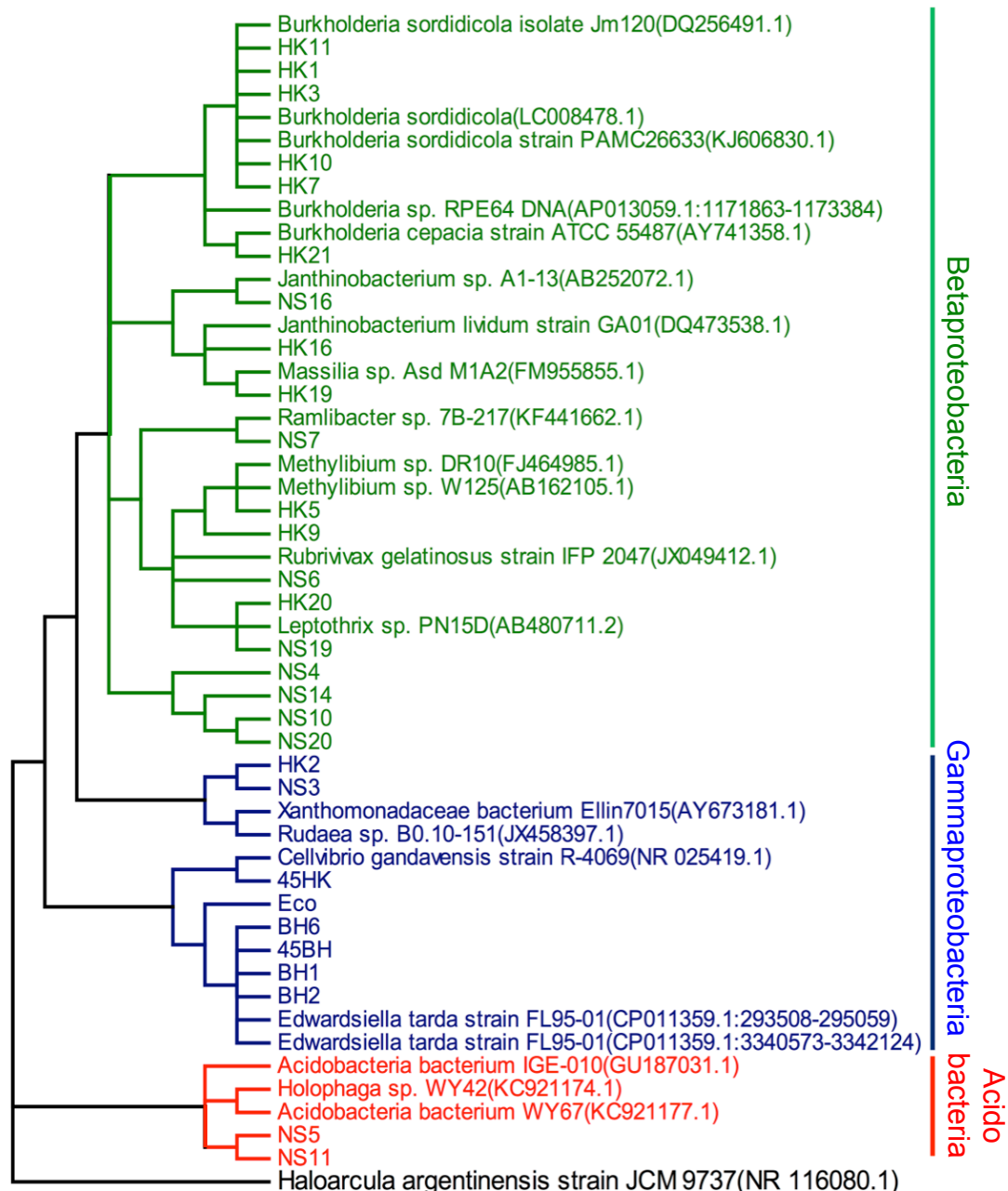


図3 機能相補性 16S rRNA 遺伝子の Neighbor-joining 法<sup>6</sup>による進化系統樹

機能性 16S rRNA 遺伝子 (19~1,527 領域)、その近縁種の 16S rRNA 遺伝子、16S<sup>Eco</sup>、そして *Haloarcula argentinensis* DSM 122 82 strain (DF645681) (外群) の 16S rRNA 遺伝子と共に、Neighbor-joining 法<sup>6</sup>により系統樹を作成した。Bootstrap は 1,000 回施行し、Bootstrap value が 95%以上のブランチのみを示している。

KT105 株で機能する 16S rRNA 遺伝子は、大腸菌と進化系統的に遠縁であるほど増殖不良を招く傾向があることが報告されている<sup>2</sup>。そこで、同じ KT105 変異株ライブラリーから、コロニーサイズが小さなクローン 48 個を選択した。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、一部に重複が見られ、独立配列としては 28 種類を確認した。この 28 配列の内訳は、7 種が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、19 種が同門別綱のベータプロテオバクテリア綱、そして 2 種 (16S<sup>NS5</sup>、16S<sup>NS11</sup>) が、大腸菌とは門レベルで異なるアシドバクテリア門に帰属された (図 2、KT105 small、図 3、表 3)。

アシドバクテリア門由来 16S rRNA 遺伝子が機能する NS5 株および NS11 株について、遺伝的なアクセシビリティ (レスキュープラスミド pRB101 が残存していないか、pRB101 にコードされていた大腸菌 16S rRNA

遺伝子が KT105 株のゲノムに組み込まれていないかなど) が起きていないか、PCR ジェノタイピングにより確かめた。コントロールとしては、KT101 株、および大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Eco</sup>) が機能する KT105 株 (Eco 株) を用い、NS5 株と NS11 株とともに検証した。

pRB101 にコードされた sacB 遺伝子特異的なプライマー (SacB-F と SacB-R) を用いたタイピングでは、KT101 株でのみ遺伝子断片の増幅が確認された (図 4)。つまり、KT105 株である NS5 株、NS11 株、Eco 株には pRB101 が残存していないことが確認された。次に、16S<sup>Eco</sup> の特異的プライマーである Eco-625F と Eco-989R を用いた場合は、KT101 株と Eco 株においてのみ遺伝子増幅が確認され、NS5 株および NS11 株においては、一切増幅が確認されなかった (図 4)。また、16S<sup>NS5</sup>、16S<sup>NS11</sup> の特異的増幅プライマーによっては、NS5 株および NS11 株においてのみ、それぞれ増幅が確認された (図 4)。これらのことから、NS5 株および NS11 株では、大腸菌由来の 16S rRNA は完全に除外されており、機能する 16S rRNA 遺伝子は、それぞれ 16S<sup>NS5</sup> と 16S<sup>NS11</sup> のみであることが確認された。

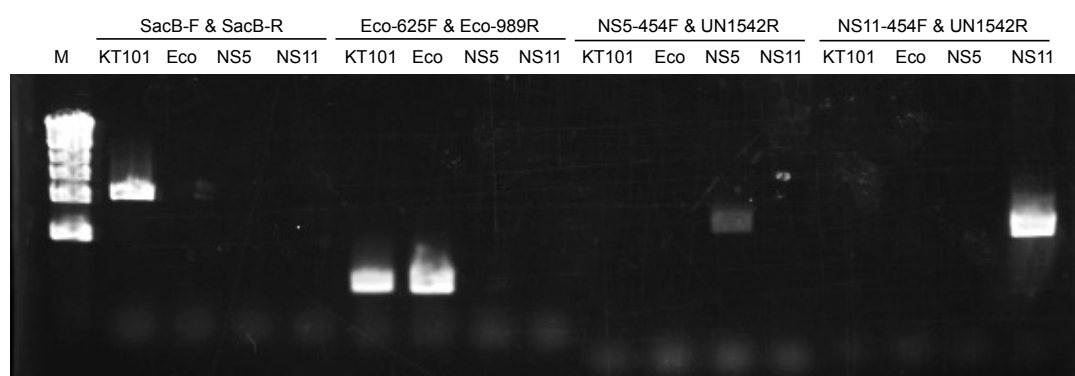


図 4 NS5 株と NS11 株における pRB101 脱落の確認

RINSPEX 法に用いる大腸菌 Δ7 株である KT101 株 (pRB101[大腸菌 rRNA オペロン、sacB 遺伝子を含む])、大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Eco</sup>) が機能する KT105 株 (Eco 株)、アシドバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子である 16S<sup>NS5</sup> および 16S<sup>NS11</sup> が機能する KT105 株である NS5 株および NS11 株から抽出したゲノム DNA を鋳型に、sacB 遺伝子、16S<sup>Eco</sup>、16S<sup>NS5</sup>、16S<sup>NS11</sup> に特異的なプライマーセットを用い、ジェノタイピング PCR をおこなった。

集積培養により獲得した、増殖が良好なクローン 2 種 (45BH および 45HK) については、いずれもガンマプロテオバクテリア綱に帰属される 16S rRNA 遺伝子を有していた (図 3、表 3)。しかし、45BH 株の 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>45BH</sup>) は大腸菌との配列相同性が 95.1% と高いのに対し、45HK 株の 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>45HK</sup>) は 85.4% と相同性が低かった (表 3)。当研究室では、配列相同性と増殖速度にはある程度の相関が見られる<sup>2</sup> ことを報告してきたが、それは必ずしも厳密ではなく、比較的低い相同性を示す 16S rRNA でも十分に高いリボソーム機能を発揮しうることが示唆された。

以上、本実験により、大腸菌と門レベルで異なるアシドバクテリア門由来の 16S rRNA 遺伝子でさえ、大腸菌 16S rRNA 遺伝子と置換可能であることが確認された。第 1 章に記載したとおり、RINSPEX 法を開発する前の方法では、1 日あたりカウンターセクションをおこなうクローン数がせいぜい約 200 であり、機能相補株も、1 日あたりせいぜい 10 個程度しか得られなかった。一方、本章では RINSPEX 法を用い、4,000 クローン規模の生育相補株 (KT105 株) を得ることができた。RINSPEX 法の開発によりハイスループットなスクリーニングができたことで、大腸菌 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>Eco</sup>) との配列相同性 78.4%、大腸菌とは門レベルで異なるアシドバクテリア門由来の機能性 16S rRNA が獲得できたと考えている。

### 3-2. NS11 株の生育評価

RINSPEX 法により得られたクローンのうち、大腸菌 16S rRNA 遺伝子と最も遠縁な関係にあった NS11 株に注目し、16S rRNA 遺伝子置換が生育に及ぼす影響を調べた。

#### 3-2-1. 固体培養条件

Eco 株は、培養 15 時間で生育が確認された (図 5)。一方、NS11 株においては、15 時間培養後、スポット跡が極うっすらと白く濁っていたが、はっきりと生育を確認することはできなかった (図 5)。培養開始後 20 時間では、NS11 株でも生育が認められた (図 5)。RINSPEX 法の開発以前は、カウンターセクション後、通常 17 時間後にコロニーの確認をおこなっていたが、それでは NS11 株を獲得できなかった可能性が高い。些細なことではあるが、生育相補限界の 16S rRNA 遺伝子を追求する過程での工夫 (培養時間の延長 [17 h→48 h]) が効果的であった。

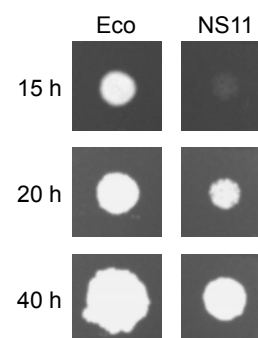


図5 寒天プレート培地上のコロニー

#### 3-2-2. 液体培養条件

LB 培地の場合、NS11 株の増殖倍化時間は  $72.6 \pm 1.9$  min であり、Eco 株の  $40.2 \pm 1.2$  min に比べ、明らかに遅かった (図 6A)。この生育能の低下は、増殖倍化時間のみならず、ラグの延長 (NS11 株:  $503 \pm 7.5$  min、Eco 株:  $307 \pm 13$  min) や最大細胞濁度の低下 (NS11 株:  $1.39 \pm 0.07$ 、Eco 株:  $1.59 \pm 0.05$ ) (図 6A) にも現れた。

M9-Glc 最少培地の場合、NS11 株の DT は  $319 \pm 50$  min、Eco 株では  $126 \pm 9.9$  min であった (図 6B)。LB 培地に比べ、さらにその増殖倍化時間の差が開きが生じた。また、ラグ (NS11 株:  $908 \pm 88$  min、Eco 株:  $461 \pm 27$  min)、および最大細胞濁度 (NS11 株:  $0.57 \pm 0.02$ 、Eco 株:  $0.26 \pm 0.06$ ) においても、両株間での顕著な生育の違いが見られた (図 6B)。

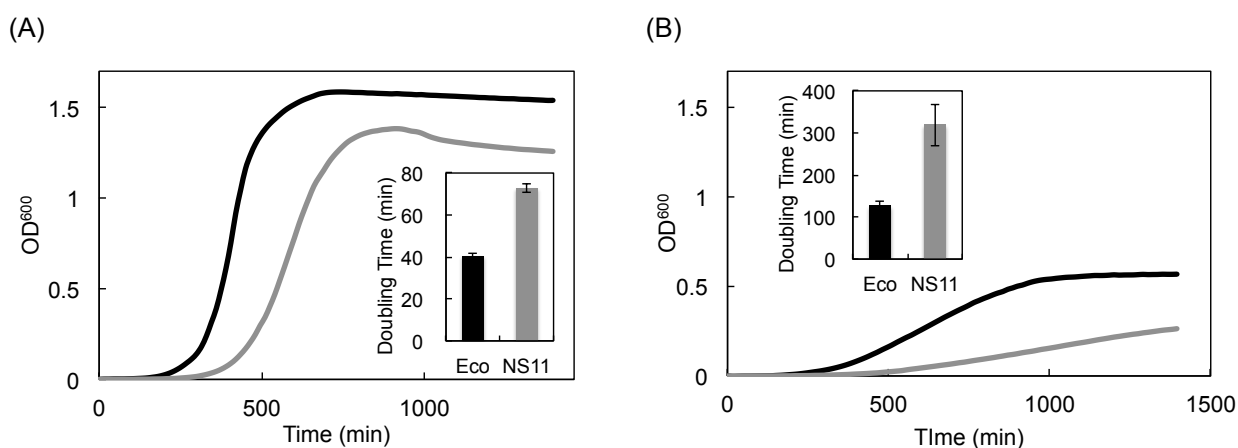


図 6 液体培地での増殖曲線と増殖倍化時間

(A) LB 培地 (B) M9-Glc 最少培地。

LB 寒天プレート培地 (Tmp, Km, 5% sucrose) 上のコロニーを 4 つずつ、それぞれ 600  $\mu$ l の LB 培地 (Tmp, Km) で培養した (96 deepwell plate, 37°C, 24 h)。その後、M9-Glc 最少培地で 2 度洗浄し、OD<sub>600</sub> を 1 に揃えた菌液 0.7  $\mu$ l を、37°C に温められた 200  $\mu$ l の LB 培地 (Tmp, Km) および M9-Glc 最少培地 (Tmp, Km) に植菌し、VersaMax plate reader を用い、37°C で振盪しながら、15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。各株の増殖倍化時間 (DT) は、増殖曲線からそれぞれ算出された、独立クローン 4 つの平均値である。また、ラグは、培養開始時から対数増殖期に入るまでの時間とした。

増殖倍化時間は、リボソームの翻訳活性をよく反映していると考えられている。NS11 株における増殖倍化時間の大幅な延長は、16S rRNA 遺伝子の置換による翻訳活性の低下を強く示唆した。

### 3-3. 16S<sup>NS11</sup> 配列の特徴

16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup> の 16S<sup>Eco</sup> に対する変異部位（本博士論文では、異種バクテリアとの相違部位を 16S<sup>Eco</sup> の変異部位とみなし、そのように表記する）を 16S<sup>Eco</sup> の二次構造マップに記した（図 7）。16S<sup>Eco</sup> の全長は 1,542 塩基である一方、16S<sup>NS11</sup> は 1,537 塩基、同じくアシドバクテリア由来の 16S<sup>NS5</sup> も 1,527 塩基と短かった。16S<sup>NS11</sup> には 16S<sup>Eco</sup> に対して 334 の変異部位が認められた。

16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>Eco</sup> の相違度に関するウィンドウ解析からは、変異が多く集積する部分（可変領域）とそうでない部分（保存領域）があることが分かった（図 8）。16S<sup>NS5</sup> についても同様に解析したところ、その結果は 16S<sup>NS11</sup> の場合と高く一致した（図 8）。可変領域は 9 箇所あり、その領域は、全バクテリア 16S rRNA 遺伝子において多様度が高い領域（Hypervariable region<sup>8</sup>）である V1 から V9 領域に一致した（図 8）。これらの領域は、以下のヘリックスを含んでいる（V1: ヘリックス h6, V2: h9, V3: h17, V4: h21, V5: h26, V6: h33, V7: h39, V8: h41, V9: h44）<sup>8</sup>。可変領域によっても相違度は異なるが、V4（ヘリックス h21）を除く他の領域では、半数以上の塩基が変化していた（図 8）。また、16S<sup>NS11</sup> の 16S<sup>Eco</sup> の相違度と 16S<sup>Eco</sup> とリボソームタンパク質との距離（3.4 Å 以内）との関係が相反していた（図 8）。これは、16S<sup>Eco</sup> とリボソームタンパク質との距離が近い（相互作用している）部位ほど塩基変異が少なく、遠いほど多いという結果である。

プロテオバクテリア門の各綱（アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、イプシロンプロテオバクテリア綱）、そして、アシドバクテリア門に帰属されるバクテリア 16S rRNA における 16S<sup>Eco</sup> との相違度に関するウィンドウ解析から、ガンマプロテオバクテリア綱の相違度は、16S rRNA 遺伝子全領域に渡って低く、他の分類群よりも 16S<sup>Eco</sup> に類似していた（図 9）。一方、V2、V3、V6、V7 領域において、アシドバクテリア門では、その他の分類群よりも 16S<sup>Eco</sup> との相違度が高かった（図 9）。しかし、16S<sup>NS11</sup> はアシドバクテリア門であるにもかかわらず、この領域の相違度は、他のアシドバクテリアの結果とは異なり低い相違度（すなわち高い類似度）を示した。16S<sup>NS5</sup> についても 16S<sup>NS11</sup> の結果と類似しており（図 8）、16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>NS5</sup> は、アシドバクテリア門に帰属されるが、部分的に 16S<sup>Eco</sup> に相同性が高い配列を有していると言える。

さらに詳細に見ると、16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup> は、プロテオバクテリア門のアルファプロテオバクテリア綱やデルタプロテオバクテリア綱よりも 16S<sup>Eco</sup> との相違度が高いことが確認された（図 9）。これまで、アルファプロテオバクテリア綱やデルタプロテオバクテリア綱の分類群の 16S rRNA 遺伝子の機能相補は確認されておらず（本研究で利用した pRB105 ライブラリーにアルファプロテオバクテリア綱の 16S rRNA 遺伝子がアシドバクテリア門やベータプロテオバクテリア綱の 16S rRNA 遺伝子よりも多く含まれているにもかかわらず）（図 2）、アルファプロテオバクテリア綱の 16S rRNA 遺伝子は機能相補できない可能性が高い。



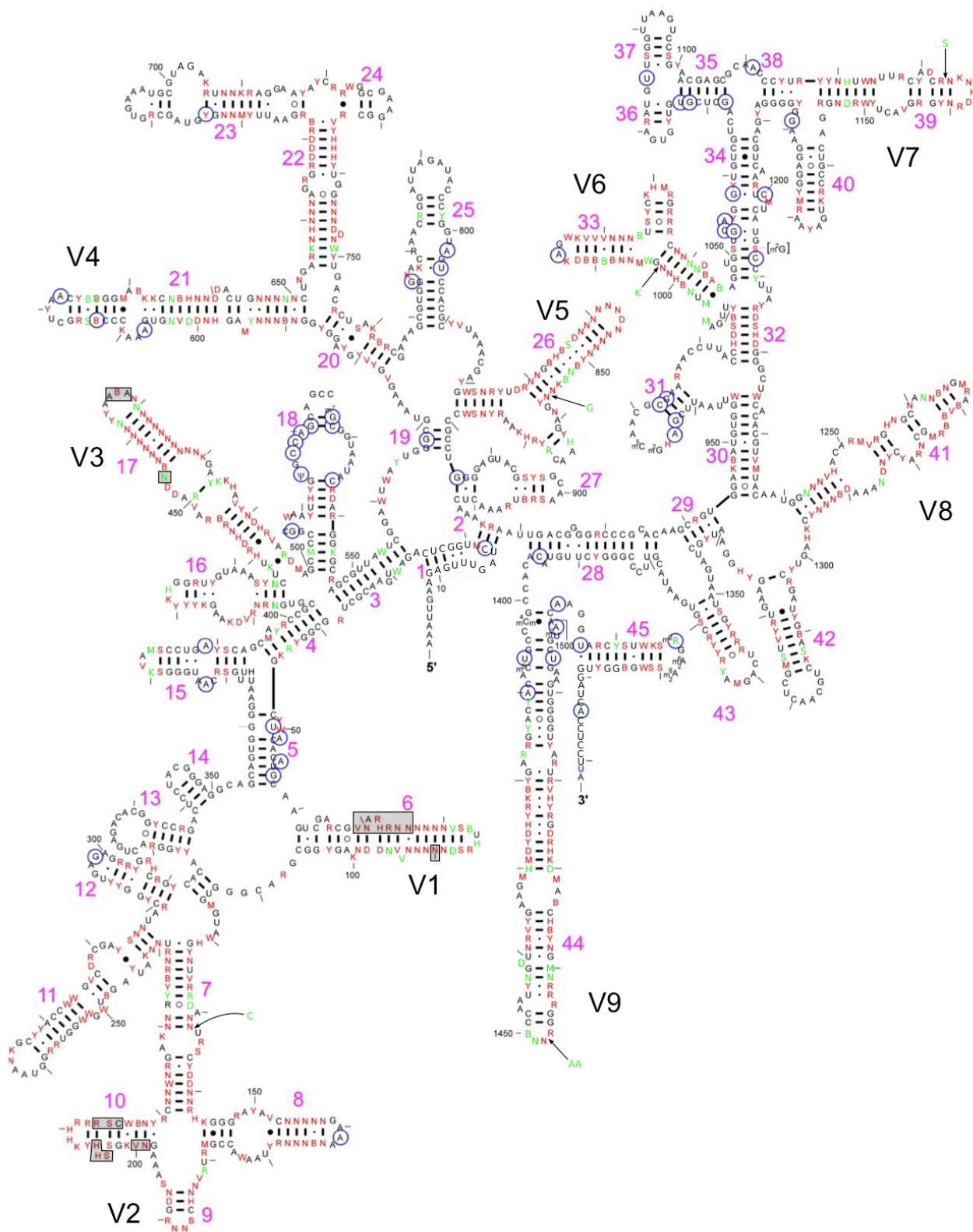


図7 16S<sup>Eco</sup>の二次構造マップと可変部位

SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>)によって整理した獲得された28種のKT105株で機能する16S rRNA遺伝子と16S<sup>Eco</sup>の配列(19~1,527領域)の情報を用い可変部位を抽出し、Kitahara et al., 2012<sup>2</sup>のFig 2である大腸菌16S rRNAの二次構造マップに追加した。Kitaharaらによって明らかとされた可変部位を赤色で、本研究により新たに明らかにされた可変部位を緑色で表示した。青丸は、Yassin<sup>10</sup>らによって変異導入することによりリボソーム機能が低下すると報告されている部位を示した。縮退塩基は、IUPAC表記に則り、以下の通りに表記した。W: A or T, R: A or G, M: A or C, K: T or G, Y: T or C, S: G or C, H: A, C or T, N: G, C or T, V: A, G or C, D: A, G or T, and N: A, G, C or T。9箇所のHypervariable region<sup>8</sup>については、V1からV9で示した。



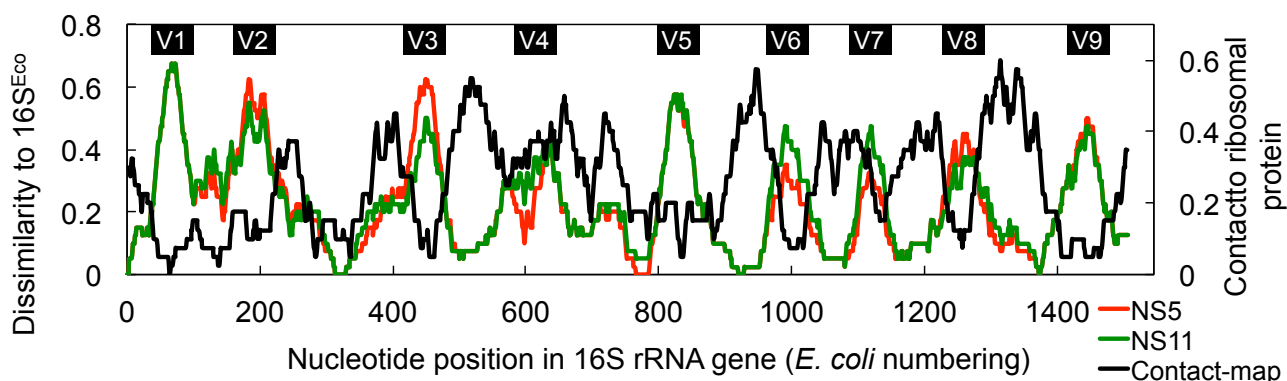


図 8 16S<sup>NS5</sup> と 16S<sup>NS11</sup> の 16S<sup>Eco</sup> との相違度に関するウィンドウ解析

SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>)によって整列した 16S<sup>Eco</sup>、16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup> の配列 (19~1,527 領域) の情報を基に、5'末端から 40 塩基の 16S<sup>Eco</sup> における変異率を算出し、1 塩基ずつ 3'末端側に移動させながら、同様に 40 塩基分の変異率を算出することを 3'末端に到達するまで繰り返すというウィンドウ解析をおこなった。また、大腸菌リボソームの 30S サブユニットにおける、16S<sup>Eco</sup> とリボソームタンパク質の距離 (PDB code: 3R80<sup>7</sup>) を指標に、16S<sup>Eco</sup> のリボソームタンパク質との相互作用に関するウィンドウ解析をおこない、結果を相違度のウィンドウ解析と共に示した。

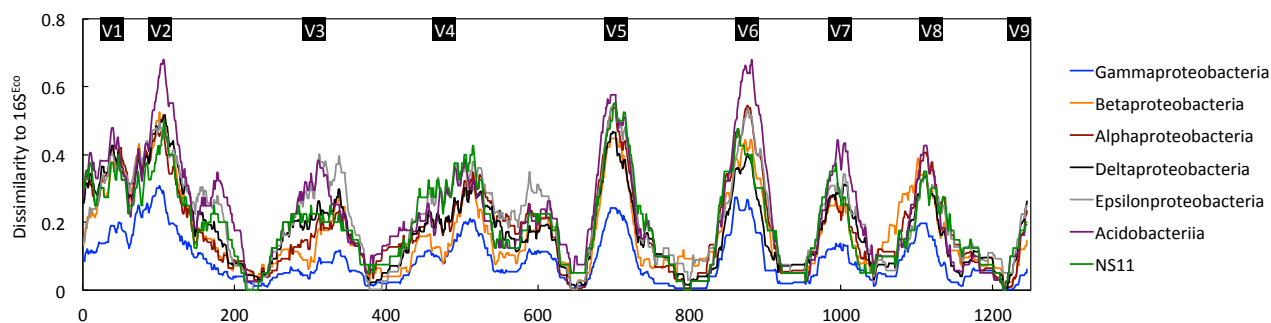


図 9 各分類群の 16S<sup>Eco</sup> との相違度に関するウィンドウ解析

プロテオバクテリア門の各綱 (アルファ、ベータ、ガンマ、デルタ、イプシロン)、そして、アシドバクテリア門のバクテリア 16S rRNA 遺伝子配列は、16S<sup>Eco</sup>、16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup> の配列と共に SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) によって整列した。この情報を基に、ウィンドウ解析をおこない (ウィンドウサイズ: 40 塩基、ステップサイズ: 1)、分類群ごとに平均値を算出した。

各ヘリックスの長さは、全 45 ヘリックスのうち 27 個について 16S<sup>Eco</sup> と同一であった (図 10)。また、長さが異なるヘリックスにおいても、ヘリックス h6 を除いたすべてが 2 塩基未満の長さ多型であり、16S rRNA 全域でヘリックスの長さの変化はあまりないことが分かった。16S<sup>NS11</sup> は、全長が 16S<sup>Eco</sup> に比べて 5 塩基短い、塩基の欠失はヘリックス h6 に集中しており、16S<sup>Eco</sup> の h6 に比べ 9 塩基短くなっていた。一方、相同性解析から、16S<sup>Eco</sup> のヘリックスと完全に一致するのは h13、h28、h30 の 3 つのみで、その他のヘリックスは程度の差はあるが配列が多様であった (図 10)。このことから、16S<sup>NS11</sup> では、ヘリックスの長さは維持しつつ、配列が多様化している傾向があることが確認された。

16S<sup>NS11</sup> には多くの変異が見られたが、その大半は 16S rRNA の二次構造を大きく変化させることはなかった。つまり、塩基結合をする塩基のペアごとに変化する場合が多かった。例えば、V4 領域のヘリックス h21 は、16S<sup>NS11</sup> では前半部分 (ヘリックスの付け根部分) に変異部位が集中しているが、塩基結合をするペアごとに変化している場合がほとんどで、二次構造は高く保存されていた (図 11)。

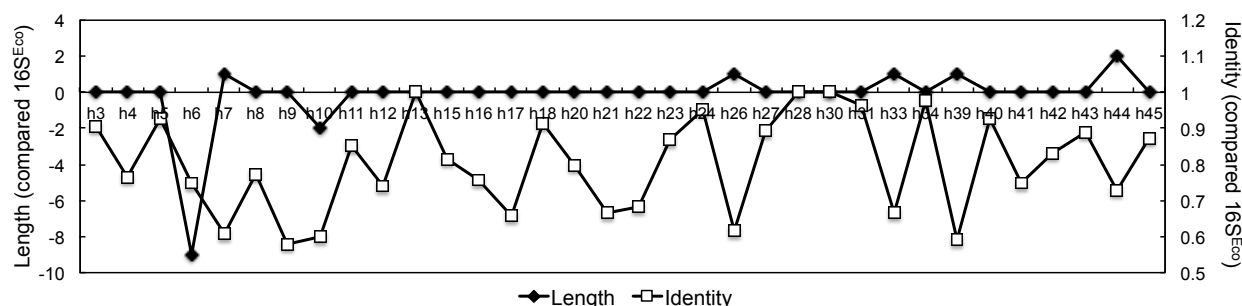


図 10 16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>Eco</sup> の各ヘリックス長さの違いと相同性

16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>Eco</sup> を SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) で整列し、16S<sup>Eco</sup> の配列を基準に、45 個すべてのヘリックス領域の配列をそれぞれ抽出した。16S<sup>Eco</sup> のヘリックスの長さを基準に、15 塩基未満のヘリックスは解析対象から除外した。16S<sup>NS11</sup> の各ヘリックス領域の配列は、16S<sup>Eco</sup> を基準として長さの違いを求めた。また、16S<sup>Eco</sup> の各ヘリックスとの相同性は、ギャップも相違部位として見なし、求めた。16S<sup>NS11</sup> の二次構造は、CENTROIDFOLD<sup>9</sup> による二次構造予測を参考にした。

	h21	h6	h10
Eco	<pre> A A C C U G G G A A C U G C A U C U G A C U G G C A A G C C . U C G G G C C C C U A A A G U G U A G A C U G A U U G U U G U A A A 588 </pre>	<pre> 61 GA G U C A C G U C A G G A A G A A G C U C G G U G C A G U C U U C U U C G U AG </pre>	<pre> G G G C C U C U U C . . . . . U C C A G G G G A G AG 198 </pre>
NS5	<pre> A A C C U G G G A A C U G C C C U C C A C U G U U U G A C C . U C G G G C C C C U A A A G U G A A G G U G A C A G G C U G U A A A 588 </pre>	<pre> 61 GA G U C G C G G G G G U A G C C G G C G A G C U G C C A U A A AG </pre>	<pre> A A U C C C C . . . . . G C G G G G 198 </pre>
NS11	<pre> A A C C U G G G A A U G G C A U U G G A C U G G C G G G C U . U C G G G C C C C U G A A A G U G U A G G C C U G U C G C U U G G A A A 588 </pre>		<pre> A G G G C U U C C C . . . . . G C U C G G G G 198 </pre>

図 11 二次構造の変化

それぞれの 16S rRNA のヘリックス構造を、CENTROIDFOLD<sup>9</sup> の二次構造予測を参考に図式化した。ヘリックス h21 および h6 について、青丸は塩基置換により翻訳活性が低くなると報告されている部位であり<sup>10</sup>、赤文字は、それぞれの 16S rRNA 遺伝子において変異が認められた部位を示す。ヘリックス h10 については、3 つの 16S rRNA 遺伝子配列のアライメントの信頼度が低いため、変異部位を確定することができなかったため、変異部位の色分けはしていない。

しかし、例外的に、二次構造の変化も見られる部位もあった。特に、16S<sup>Eco</sup> とヘリックスの長さが異なる V1 領域のヘリックス h6 に顕著であった。ヘリックスの長さは 16S<sup>Eco</sup> に比べ 9 塩基短く (図 10)、バルジの大きさや数も 16S<sup>Eco</sup> と異なっていた (図 11)。また、16S<sup>NS5</sup> においても同様に各ヘリックスの長さ、相同性、二次構造を比較すると、ヘリックス h10 において 16S<sup>Eco</sup> よりも 8 塩基短く、二次構造も大きく異なることが分かった (図 11)。

## 4. おわりに

本章では、RINSPEX 法により構築した大規模な KT105 変異株ライブラリーのスクリーニングにより大腸菌の遺伝子欠損を相補しうる 16S rRNA 遺伝子の進化系統的な限界を追求した。培養時間を従来条件よりも延長し、さらに増殖不良のクローンを選択するために小さめのコロニーを選抜するという工夫をした。その結果、従来の限界を超えた、門レベルで異なるアシドバクテリア門由来の機能相補性 16S rRNA 遺伝子の獲得に成功した。16S<sup>Eco</sup> と最も低い相同性を示した 16S<sup>NS11</sup> の配列解析により、①大腸菌 16S rRNA 遺伝子 1, 542 塩基中、334 塩基が改変可能であること、②保存領域の存在が認められる一方で、可変領域においては

半数以上の部位が可変であること、③領域によっては二次構造の変化も許容されることなどが明らかとなった。

16S rRNA 遺伝子の改変に、タンパク質の進化工学において頻用される「部位特異的変異」や「ランダム変異」は不向きである。これに対し、「16S rRNA 遺伝子置換」は、高次構造をある程度保ったまま塩基置換が可能な点で好適である。この方法では、「塩基対を組む」という制約のもと塩基変異を許容するが、全体の配列の2割以上を一度に改変することができた。

以上、本章では、RINSPEX 法の 16S rRNA 遺伝子の改変手法としての有用性を示すことができた。

#### 《引用文献》

1. Kitahara, K. and Miyazaki, K. (2011) Specific inhibition of bacterial RNase T2 by helix 41 of 16S ribosomal RNA. *Nat. Commun.* **2**, 549.
2. Kitahara, K., Yasutake, Y., Miyazaki, K. (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19220-19225.
3. Laios, E., Waddington, M.S., Saraiya, A.A., Baker, A.K., O'Connor, E., Pamarathy, D., Cunningham, R.P. (2004) Combinatorial genetic technology for the development of new anti-infectives. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **128**, 1351-1359.
4. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
5. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 2725-2729.
6. Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
7. Dunkle, J.A., Wang, L., Feldman, M.B., Pulk, A., Chen, V.B., Kapral, G.J., Noeske, J., Richardson, J.S., Blanchard, S.C., Cate, J.H. (2011) Structures of the bacterial ribosome in classical and hybrid states of tRNA binding. *Science* **332**, 981-984.
8. Neefs, J.M., Van, de, Peer, T., Hendrinks, L., De, Wachter, R. (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2237-2317.
9. Sato, K., Hamada, M., Asai, K., Mituyama, T. (2009) CENTROIDFOLD: a web server for RNA secondary structure prediction, *Nucleic Acids Res.* **37**, W277-280.
10. Yassin, A., Fredrick, K., Mankin, A.S. (2005) Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16620-16625.

### 第3章 ドメインキメラ解析による 16S<sup>NS11</sup> の機能解析

本章では、第2章で獲得した大腸菌 Δ7 株相補性 16S rRNA 遺伝子の進化系統的な限界である 16S<sup>NS11</sup> の機能解析実験を「ドメインキメラ解析」によりおこなった。ここで言うドメインキメラ解析とは、16S<sup>NS11</sup> を4つのドメイン（5'、Central、3' major、3' minor）に分割し、それぞれのドメインを 16S<sup>Eco</sup> 配列で置換し、各キメラ 16S rRNA 遺伝子に現れる機能の変化を、生育相補試験や生化学手法により明らかにする解析のことである。16S<sup>NS11</sup> は 16S<sup>Eco</sup> と比較し 334 の変異箇所を含み、これが 9 箇所の Hypervariable region を中心に 16S rRNA 遺伝子全域に散在しているため、機能的に重要な塩基を割り出すことは難しく、まずドメインという大きな領域単位で特定することを試みた。

その結果、16S<sup>NS11</sup> の 3' minor ドメインを 16S<sup>Eco</sup> 配列に置換した 16S<sup>3MnE</sup> が、宿主の生育を最も大きく回復させることが分かった（増殖倍化時間：Eco 株 40.2 min、NS11 株 72.6 min、NS11-3MnE 株 43.6 min）。これらの変異体について、増殖速度とリボソーム機能を関連づけるために、リボソームの生化学解析（シヨ糖密度勾配遠心によるサブユニット解析、無細胞翻訳系 PURE システムを用いた活性評価）をおこない、増殖とリボソーム活性が密接に関わっていること、16S<sup>NS11</sup> がもたらす増殖能（あるいは翻訳活性）の低下は 3' minor ドメインに起因するサブユニット会合効率の低下が主因であることが判明した。

引き続き、3' minor ドメイン内の「点変異解析」をおこなった結果、50S サブユニットとの相互作用に関わるとされる 1416-1484 塩基対の 16S<sup>Eco</sup> 型への置換（二塩基同時置換）が、ドメイン全体の置換に匹敵する効果を示すことが判明した（倍化時間 42.7 min）。334 中の 2 塩基変異のみで NS11 株の生育が Eco 株並みに復帰したことは、16S<sup>NS11</sup> に見出された 300 余りの変異は、リボソーム機能に大きな影響を及ぼさない（中立的）変異であることを意味する。このことは、リボソーム成分が高い種間和合性を持つ（第2章）とともに、高い進化能を有していることを意味している。

工学的な観点でも有益な知見を得た。すなわち、16S rRNA の全長を置換するばかりでなく、その一部の配列（ドメイン）のみを置換しても多くの場合機能を維持することが示され、16S rRNA の変異手法として有効に使える見通しが立った。また、16S rRNA 遺伝子の大部分の領域が、機能に大きな（悪）影響を及ぼさないことが示された。これらの知見は、RINSPEX 法の実験手法の拡充と運用ノウハウにつながるものである。

**キーワード**：16S rRNA 遺伝子のドメインキメラ解析、3' minor ドメイン、シヨ糖密度勾配遠心、大腸菌無細胞翻訳系

## 1. はじめに

第2章で獲得された置換限界株である NS11 株は、大腸菌とは門レベルで異なるアシドバクテリア門に帰属されるバクテリア 16S rRNA 遺伝子が機能している。NS11 株の増殖倍化時間は  $72.6 \pm 1.9$  min で、Eco 株では  $40.2 \pm 1.2$  min あることから、明らかに生育が不良であった。また、NS11 16S rRNA 遺伝子 ( $16S^{NS11}$ ) と大腸菌 16S rRNA 遺伝子 ( $16S^{Eco}$ ) を比較すると、334 の相違部位 (変異部位) が認められた (第2章)。 $16S^{NS11}$  の変異のうち、どの変異が生育不良に関わっているのか? —この問いに答えるためにドメインキメラ解析をおこなった。

16S rRNA は、5' (5)、Central (Cnt)、3' major (3Mj)、そして、3' minor (3Mn) ドメインの4つのドメインから構成されている。第2章で獲得した  $16S^{NS11}$  と  $16S^{Eco}$  を両親とするドメインキメラ ( $16S^{NS11}$  の各ドメインを  $16S^{Eco}$  配列に置換) を作成するために、各ドメインを増幅するための PCR プライマーを設計し、キメラ体を作成、各キメラの生育相補性試験、並びに  $16S^{NS11}$  の生育不良の原因の特定までをおこなった。

さらに、増殖復帰の見られた 3' minor ドメイン置換体と Eco、NS11 株についてリボソームの生化学解析 (シヨ糖密度勾配遠心、PURE システムを用いた in vitro 活性評価) をおこない、増殖と翻訳活性の関連を調べた。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 16S rRNA 遺伝子の各ドメイン領域のプライマーの設計

NCBI データベース (August, 2014) に登録された 23 の分類群のバクテリアのゲノム DNA (2,476 種) から、16S rRNA 遺伝子 (9,624 種) を抽出し、SINA alignment service (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) で整列した。ドメイン間の配列を抽出し、配列の保存性が高い領域で、 $16S^{Eco}$  に完全に一致し、15 塩基以上の長さのプライマーを設計した。「15 塩基以上」という制約は、ドメインの連結を In-Fusion 法によりおこなうことを想定しているためである。

### 2-2. ドメインキメラ体の構築

$16S^{Eco}$  および  $16S^{NS11}$  は、表 1 のプライマーセットで PCR 増幅・抽出し (DNA ポリメラーゼは KOD-Plus-Neo)、In-Fusion HD Cloning Kit により連結した。それらのキメラ 16S rRNA 遺伝子は、 $16S^{NS11-5E}$ 、 $16S^{NS11-CntE}$ 、 $16S^{NS11-3MjE}$ 、 $16S^{NS11-3MnE}$  と表記する。対応するプラスミドは、 $pRB105^{NS11-5E}$ 、 $pRB105^{NS11-CntE}$ 、 $pRB105^{NS11-3MjE}$ 、 $pRB105^{NS11-3MnE}$  と表記する。各プラスミドを KT101 株の機能相補試験 (第2章) に供試し、変異 KT105 株名は、NS11-5E、NS11-CntE、NS11-3MjE、NS11-3MnE と表記する。

### 2-3. 生育試験

LB 寒天プレート培地 (Tmp, Km, 5% sucrose) 上のコロニーを4つずつ、それぞれ 600  $\mu$ l の LB 培地 (Tmp, Km) で培養した (96 deepwell plate, 37°C, 24 h)。その後、M9-Glc 最少培地で2度洗浄し、OD<sub>600</sub> を1に揃えた菌液 0.7  $\mu$ l を、37°Cに温められた 200  $\mu$ l の LB 培地 (Tmp, Km) に植菌し、VersaMax plate reader を用い、37°Cで振盪培養しながら、15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。各株の増殖倍化時間 (DT) は、独立クローン4つのそれぞれの増殖曲線から算出された値の平均値である。

## 2-4. ショ糖密度勾配超遠心法によるリボソーム構成プロファイルの観察

LB 寒天プレート培地 (Tmp、Km) 上の NS11-3MnE 株、NS11 株、Eco 株の 3 株のコロニーを、50 ml LB 培地 (Tmp、Km、500 ml バッフル付きフラスコ) で培養し (37°C)、OD<sub>600</sub> が 0.4~0.6 に到達した時点で Cm (100 µg/ml) を加え、5 分間振盪を続けた。その後、フラスコごと氷水に沈め、10 分間冷却した。そして、遠心 (5,000 g, 10 min, 4°C) により集菌した。次に、ペレットを、氷水中で冷やされた 2 ml の RBS バッファー (20 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 30 mM NH<sub>4</sub>Cl, 6 mM 2-mercaptethanol) で懸濁し、500 µl ずつ 2 ml のチューブに分注し、再度遠心 (36,220 g, 10 min, 4°C) した。ペレットと等量のガラスビース、RBS バッファー 500 µl を加え、ビーズクラッシャーで 1 分間細胞破碎 (最大速度、室温) — サンプルチューブの冷却 (氷水で 2 分間) の工程を 3 回繰り返した。その後、遠心 (36,220 g, 10min, 4°C) することにより、細胞抽出液を獲得した。

NanoDrop を用い細胞抽出液の A<sub>260</sub> を測定し、5 A<sub>260</sub> 分をショ糖密度勾配超遠心に使用した。5 A<sub>260</sub> 分の細胞抽出液を 10-40% (w/v) ショ糖密度勾配溶液 (RBS バッファー) に乗せ、超遠心分離をおこなった (SW-40 Ti Rotor, 35,000 rpm [245,853 g], 3 h, 4° C)。

その後、A<sub>254</sub> を随時観察しながら、フラクショネーターによりチューブトップからボトムまでを分画した。

## 2-5. 大腸菌無細胞翻訳系 PUREfrex システムによる 70S リボソームの翻訳活性評価

LB 寒天プレート培地 (Tmp、Km) 上の NS11-3MnE 株、NS11 株、Eco 株の 3 株のコロニーを、10 ml LB 培地 (Tmp、Km、試験管) で前培養し (37°C、一晚培養)、そのうちの 6 ml を 600 ml の LB 培地 (Tmp、Km、3L フラスコ) に植菌し、OD<sub>600</sub> が 0.5~0.6 に到達するまで培養した (37°C)。その後、2-4 記載の方法に準じて細胞抽出液を取得し、超遠心分離をおこなった。次に、遠心後のサンプルを、A<sub>254</sub> を観察しながら、フラクショネーターによりチューブトップからボトムまでを分画した。

70S リボソームに相当する画分を集め、溶液 (400 A<sub>260</sub> 分) を 30% (w/v) スクロース溶液 (RBS バッファー)<sup>1</sup> のクッションに乗せ、超遠心分離をおこなった (SW-40 Ti Rotor, 40,000 rpm [280,976 g], 12 h, 4° C)。ペレットは、リボソームバッファー (20 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 6 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 7 mM 2-mepcaptoethanol)<sup>1</sup> に溶解させた。

各株由来の 70S リボソーム (70S<sup>Eco</sup>, 70S<sup>NS11</sup>, 70S<sup>NS11-3MnE</sup>) の翻訳活性は、無細胞翻訳系 PUREfrex システムを用いて評価した<sup>2</sup>。翻訳の鑄型としては、蛍光強度を指標に翻訳効率を評価することができる gfp 遺伝子、特に、フォールディング効率が高い superfolderGFP 遺伝子 (コドン使用頻度を大腸菌に合わせて全合成したもの)<sup>3</sup>を使用した。gfp 遺伝子は、pET-20b(+)ベクターの T7 プロモーター下流にクローニングした。得られたプラスミドを鑄型に T7-promoter(TAATACGACTCACTATAGGG)と T7-terminator(GCTAGTTATTGC TCAGCGG) プライマーを用いて PCR 増幅をおこない、ゲル抽出により生成した DNA 断片を鑄型 DNA として利用した。PUREfrex のキットプロトコールの 1/5 量スケール (10 µl) で調製した反応液に、20 ng の鑄型 DNA と 0.2 µmol の 70S リボソームを加え反応を開始した。反応溶液を Stratagene Mx3000p™ qPCR system にて 37°C で保温し、10 分おきに 5 時間、GFP の蛍光強度 (ex: 488 nm, em: 530 nm) を測定した。リボソームの代わりに等量のリボソームバッファーを反応液に添加したものをネガティブコントロール (NEGA) とした。翻訳活性は、リアルタイムの蛍光強度の測定値によるプロットの傾きを指標に評価した。

## 2-6. 16S<sup>NS11</sup>における生育不良に寄与する部位の特定：3' minor ドメインの点変異解析

pRB105<sup>NS11</sup> を鋳型に、NS11-A1416Gf (GCCCCGTCACATCACGGAAGTCGGTTGCACTAGA) -NS11-A1416Gr (TCTAGTGCAACCGACTTCCGTGATGTGACGGGC)、NS11-G1417Ar (CTCGTGATGTGACGGGCGGTGTG) -NS11-1418f (AGTCGGTTGCACTAGAAGTCGGTGGGC)、NS11-T1484Cf (CTAAAGTGGATCGGTA ACTGGGGTGAAGTCGTAAC) -NS11-T1484Cr (GTTACGACTTCACCCCAGTTACCGATCACAC)、NS11-A1516Gr (GCCACAGGTTCCCCTACAGCTACCTTGTT) -UN1542f (TGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAAGCGT) の組合せで PCR をおこなった。1416 部位の置換変異の場合、PCR 後、DpnI 処理し、その反応溶液を直接大腸菌 JM109 株の形質転換に用いた。それ以外の場合は、PCR 後、DpnI 処理し、T4 DNA Ligase により連結（自己環状化）してから、JM109 株の形質転換に用いた。各々の形質転換体から、プラスミドを抽出し、16S rRNA 遺伝子全長のシーケンス解析（BigDye Terminator v3.1）によって目的配列を確認した。各変異を組合せたクローンの構築は、いずれかの変異導入 16S rRNA 遺伝子を鋳型に、変異を上記の方法と同様に加算させた。各プラスミドにより KT101 株の機能相補試験をおこなった。

1416、1417、1484、1516 番目の塩基が 1 塩基変異した 16S rRNA 遺伝子をそれぞれ 16S<sup>NS11-A1416G</sup>、16S<sup>NS11-A1417G</sup>、16S<sup>NS11-U1484C</sup>、16S<sup>NS11-A1516G</sup> と表記し、1416 と 1484 の変異が組み合わさったものを 16S<sup>NS11-1416-1484</sup>、4 つすべての変異を持つものを 16S<sup>NS11-All</sup> と表記した。対応する KT105 株を、それぞれ NS11-A1416G、NS11-A1417G、NS11-U1484C、NS11-A1516G、NS11-1416-1484、NS11-All 株と表記した。

## 2-7. 点変異変異体の生育評価

LB 寒天プレート培地 (Tnp, Km, 5% sucrose) 上のコロニーを 4 つずつ、それぞれ 600  $\mu$ l の LB 培地 (Tnp, Km) で培養した (96 deepwell plate, 37°C, 24 h)。その後、M9-Glc 最少培地で 2 度洗浄し、OD<sub>600</sub> を 1 に揃えた菌液 0.7  $\mu$ l を、37°C に温められた 200  $\mu$ l の LB 培地 (Tnp, Km) に植菌し、VersaMax plate reader を用い、37°C で振盪しながら、15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。各株の増殖倍化時間 (DT) は、独立クローン 4 つのそれぞれの増殖曲線から算出された値の平均値である。

## 3. 結果と考察

### 3-1. ドメインキメラ作成のプライマー設計とキメラ体の作成、生育評価

16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>Eco</sup> 間のキメラ解析をおこなうにあたり、16S rRNA の機能単位であるドメインに着目した。その際、今回、注目している 16S<sup>NS11</sup> と 16S<sup>Eco</sup> 間だけでなく、今後広く用いることができるよう、まずバクテリア 16S rRNA 遺伝子を整列し、多様な系統からドメインが増幅できるプライマーを設計した (表 1)。その結果、ドメインの境界はバクテリア種間を通して配列がよく保存されていることが確認された。そのため設計したプライマーの配列は完全に 16S<sup>Eco</sup> に一致するようにした。

設計したプライマーを用い、16S<sup>NS11</sup> の各ドメインを 16S<sup>Eco</sup> の相同領域で置換された 4 種のキメラ 16S rRNA 遺伝子、16S<sup>NS11-5E</sup>、16S<sup>NS11-CntE</sup>、16S<sup>NS11-3MjE</sup>、16S<sup>NS11-3MnE</sup> を構築した。それらがコードされた pRB105 により KT101 株で機能相補実験をおこなったところ、16S<sup>NS11-CntE</sup>、16S<sup>NS11-3MjE</sup>、16S<sup>NS11-3MnE</sup> の機能相補が確認され、NS11-CntE 株、NS11-3MjE 株、および NS11-3MnE 株を獲得した。ここで、16S<sup>NS11-5E</sup> は、大腸菌  $\Delta$ 7

株の生育を相補できなかった。16S<sup>NS11-5E</sup> が機能不全となったのは、16S<sup>NS11</sup> の 5'ドメインを大腸菌型にすることで、第 1 章で観察された Pseudoknot 構造の乱れが生じるためであると予想された。

	16S <sup>Eco</sup>		16S <sup>NS11</sup>	
	Name	Sequence (5' to 3') <sup>※1</sup>	Name	Sequence (5' to 3') <sup>※1</sup>
5'ドメイン	Bac1F	AAATTGAAGAGTTTGATC	Bac1r	GATCAAACCTCTCAATTTAAAGTTTGACGCTCAAAG
	5D-	CGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCT	CntD+	AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
Centralドメイン	CntD+	AGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG	5D-	CGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCT
	CntD-	CCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTC	3MjD+	GAATTGACGGGGGGCCG CACAAGCGGTGG
3' majorドメイン	3MjD+	GAATTGACGGGGGGCCG CACAAGCGGTGG	CntD-	CCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTC
	3MjD-	CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG	3MnD+	CTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAG
3' minorドメイン	3MnD+	CTTGACACACCGCCGTCACACCATGGGAG	3MjD-	CTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
	UN1542r	TAAGGAGGTGATCCA	UN1542f	TGGATCACCTCCTTACCTTAAAGAAGCGT

表 1 ドメインキメラ体の構築に用いるプライマー

①進化系統的に多様な微生物群より可能な限り網羅的に PCR 増幅ができ、②ドメインの PCR 増副産物同士を In-Fusion HD Cloning Kit により連結可能なように、ドメインの PCR 増副産物の末端が隣り合うドメインの PCR 増副産物と 15 塩基以上相同になるように、ドメイン間にアニールするプライマーの設計をおこなった。

### 3-2. ドメインキメラ体の増殖特性解析

生育を相補した 16S<sup>NS11-CntE</sup>、16S<sup>NS11-3MjE</sup>、16S<sup>NS11-3MnE</sup> 各変異体を液体培地での増殖曲線から評価した (図 1)。NS11-3MjE 株、NS11-3MnE 株の生育は、増殖倍化時間、ラグ、最大細胞濁度の点で NS11 株に比べ良好であることが確認された。NS11-CntE 株では、NS11 株よりもさらに生育が不良となった (図 1)。この原因は、16S rRNA 内のドメイン間相互作用が原因であると予想した。

増殖倍化時間は NS11 株の  $72.6 \pm 1.9$  min に対し、NS11-3MjE 株では  $57.5 \pm 3.7$  min、NS11-3MnE 株では  $43.6 \pm 0.7$  min であった (図 1)。Eco 株の増殖倍化時間は  $40.2 \pm 1.2$  min であり、NS11-3MnE 株は、増殖倍化時間においては、Eco 株と遜色ないほど生育が良好になっていたことが分かった (図 1)。ただし対数増殖期に入るまでのラグ時間については、NS11-3MnE 株では、NS11 株 ( $503 \pm 7.5$  min) に比べ短縮した ( $453.8 \pm 24$  min) もの、Eco 株 ( $307 \pm 13$  min) には及ばなかった (図 1)。また、NS11-3MnE 株の最大細胞濁度は、 $1.47 \pm 0.03$  であり、NS11 株 ( $1.39 \pm 0.07$ ) に比べ増加したが、Eco 株 ( $1.59 \pm 0.05$ ) のレベルには届いていない (図 1)。加えて、NS11-3MnE 株が最大細胞濁度に到達して以降、時間とともに徐々に細胞濁度が低下することが観察された (図 1)。

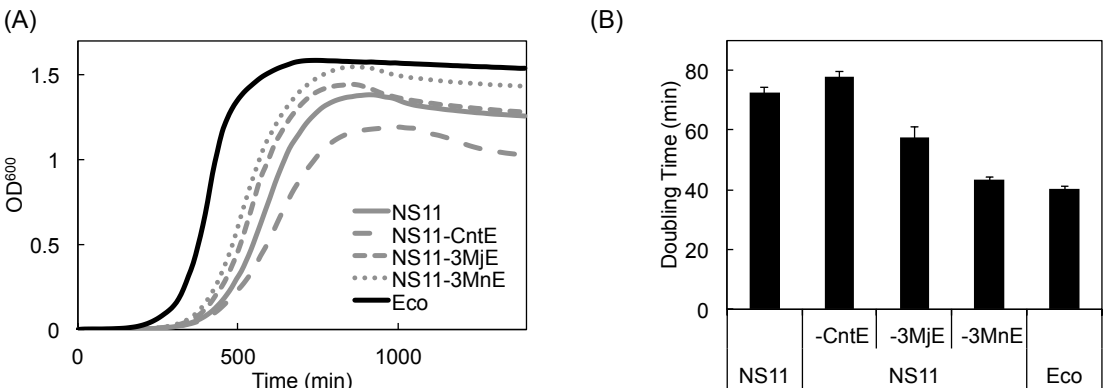


図 1 ドメインキメラクロンの生育評価

(A) 増殖曲線 (B) 増殖倍化時間

各 KT105 株の前培養菌液は、M9-Glc 最少培地で 2 度洗浄し、OD<sub>600</sub> を 1 に揃え、菌液 0.7  $\mu$ l を 37°C に温められた 200  $\mu$ l の LB 培地 (Tnp, Km) に植菌し、37°C で 15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。(A) の増殖曲線は、4 つの独立クローンそれぞれの増殖曲線の平均のプロットである。各株内でのプロットはよく重なっていたため (CV<10%)、誤差棒は省いている。(B) の増殖倍化時間 (DT) は、4 つの独立クローンそれぞれの増殖曲線からそれぞれ算出された値の平均値である。

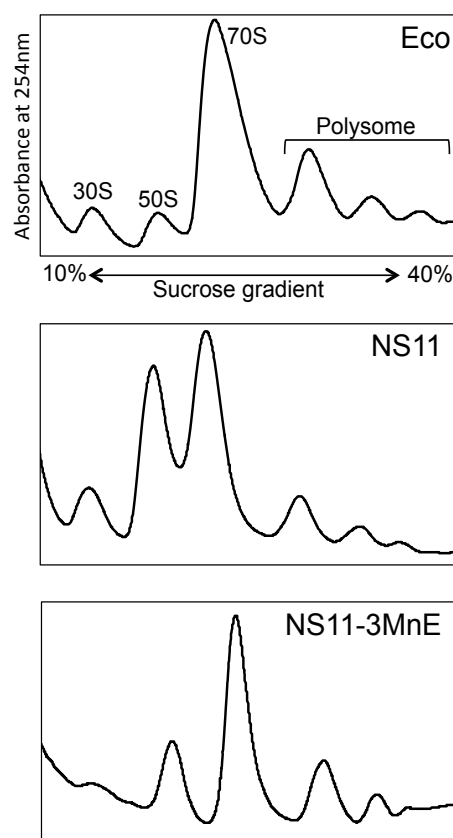


### 3-3. ショ糖密度勾配遠心法によるドメインキメラ体のリボソーム構成プロファイル解析

3' minor ドメインは、約 150 塩基からなり、ヘリックス h44 と h45 の 2 つのヘリックスを有す。4 つのドメインのうち、3' minor ドメインはサイズの最も小さいが、30S サブユニットの生合成<sup>4</sup>や 50S サブユニットとの相互作用<sup>5</sup>に関わる重要な領域を含むことが知られている。そこで、NS11-3MnE 株、NS11 株、Eco 株のリボソーム構成プロファイルをショ糖密度勾配遠心法により解析し、30S サブユニットの生合成効率やサブユニット間相互作用の違いを検証した。

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 2)。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 2)。

これらのことから、16S<sup>NS11</sup> の 3' minor ドメインを 16S<sup>Eco</sup> 型に戻すことで、30S サブユニットの生合成効率や 50S サブユニットとの相互作用が向上することが明らかとなった。つまり、16S<sup>NS11</sup> の 3' minor ドメインは、生合成効率の低下やサブユニット間相互作用の低下を招くことが分かった。

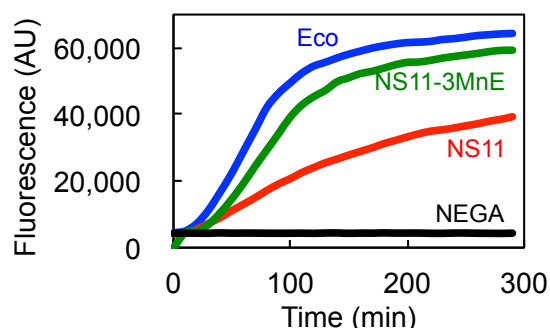


**図 2 リボソーム構成プロファイル**  
細胞抽出液を 10-40% (w/v) ショ糖密度勾配遠心により分離し、A260 をモニターしながらフラクショネーターでトップからボトムの溶液を分画した。

### 3-4. 無細胞翻訳系 PURE システムを用いたドメインキメラ体のリボソーム翻訳活性解析

次に、各株より調製した 70S リボソームの活性評価を、大腸菌無細胞翻訳系 PURE システムを用いておこなった (図 3)。70S<sup>NS11</sup> の翻訳活性は、70S<sup>Eco</sup> の場合と比較して約 1/3 程度であることが判明した。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> のレベルに近づいた。これらのことから、16S<sup>NS11</sup> の 3' minor ドメインを 16S<sup>Eco</sup> 型にすることで、リボソームの翻訳活性が大きく回復することが明らかとなった。

3-3 で示した通り、NS11 株では 30S と 50S の会合効率が低い。そのため、無細胞翻訳系においても、NS11 株由来のリボソームは、翻訳を終えた mRNA からリボソームが遊離してサブユニットが解離した後、新たな翻訳サイクルに入る際の再会合効率も低くなると考えられる。NS11 に見られた翻訳活性の低さは、70S リボソーム自身の翻訳活性が低い可能性と、サブユニット会合不良に起因するターンオーバー効率の低下のいずれかであると考えられる。



**図3 70Sリボソームの翻訳活性**  
各株の70Sリボソームの翻訳活性は、無細胞翻訳系PUREfrexシステム<sup>22</sup>を用いた。superfolderGFP遺伝子<sup>23</sup>を鋳型に用い、Stratagene Mx3000p™ qPCR systemにて37℃で5時間反応させ、10分おきにGFPの蛍光強度 (ex: 488 nm, em: 530 nm) を測定した。

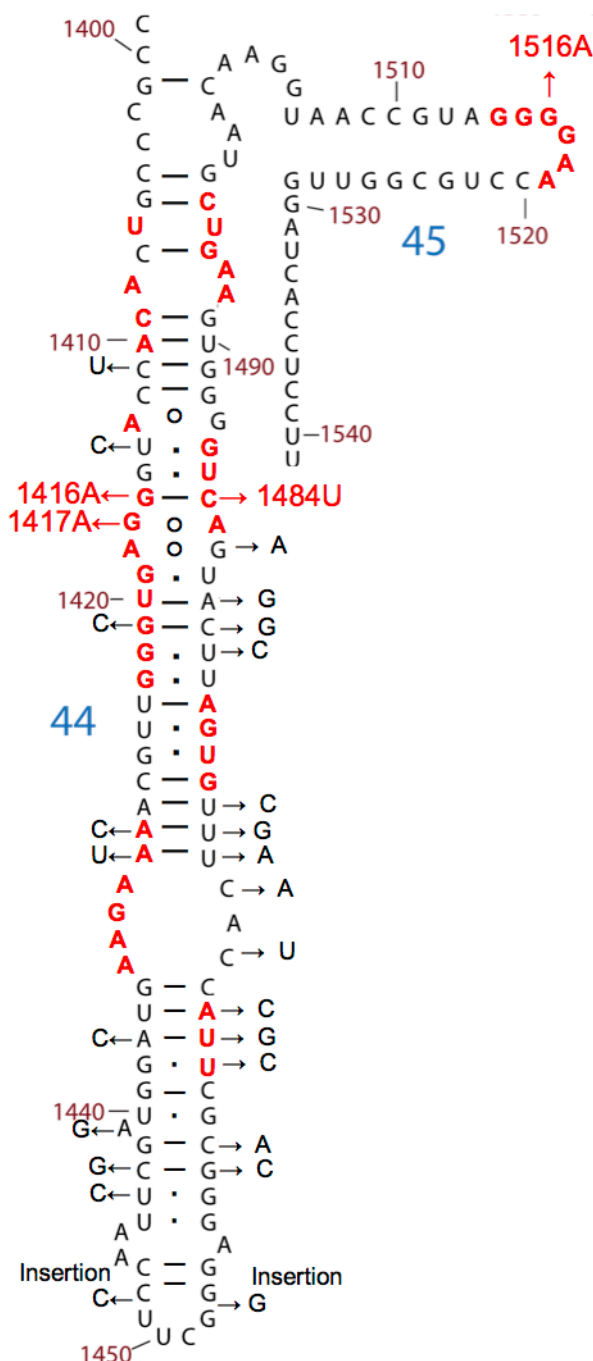
### 3-5. 3' minor ドメインの点変異解析

16S<sup>NS11</sup> の 3' minor ドメインには、29 箇所の変異が存在する (図 4)。3' minor ドメインに存在する、30S サブユニットの生合成<sup>4</sup>や 50S サブユニットとのサブユニット間相互作用<sup>5</sup>に重要であると報告されている部位で、かつ、16S<sup>NS11</sup>において 16S<sup>Eco</sup>と相違する部位 (1416、1417、1484、1516 番目の塩基) を、16S<sup>Eco</sup>型の塩基に置換し、16S<sup>NS11</sup>のいずれかの 1 塩基部位が 16S<sup>Eco</sup>に置換された 16S rRNA 遺伝子 16S<sup>NS11-A1416G</sup>、16S<sup>NS11-A1417G</sup>、16S<sup>NS11-U1484C</sup>、16S<sup>NS11-A1516G</sup>を構築し、生育不良に寄与する 16S<sup>NS11</sup>内の部位を特定することを試みた。

各変異 16S rRNA 遺伝子の大腸菌 Δ7 株の機能相補実験から、16S<sup>NS11-A1416G</sup>が、Δ7 株の生育を相補できないことが確認された。1416 番目の塩基は、30S サブユニット生合成に重要な部位として報告されており<sup>4</sup>、同じく生合成に重要である 1484 番目の塩基<sup>4</sup>と塩基対を形成する (図 4)。16S<sup>Eco</sup>では、1416 番目の塩基と 1484 番目の塩基は G-C 塩基対、16S<sup>NS11</sup>では A-U 塩基対を形成し、どちらもワトソン-クリック結合である (図 4)。一方、NS11において 1416 番目の塩基を大腸菌型に置換した 16S<sup>NS11-A1416G</sup>では、非ワトソン-クリック型の G・U 塩基対となり、これがリボソーム機能を失活させると考えられた。一方、1416 番目の塩基に対合する 1484 番目の塩基の置換変異体 16S<sup>NS11-U1484C</sup>は、Δ7 株を機能相補しうるばかりでなく、増殖倍化時間の短縮も確認された (図 5)。

**図 4 16S<sup>Eco</sup> の 3' minor ドメインの二次構造と 16S<sup>NS11</sup> の変異部位**

サブユニット間相互作用に重要であるとされる部位を赤字で示し、16S<sup>NS11</sup>に見出された 29 個の変異については矢印で示してある。



NS11-U1484C 株と同様、16S<sup>NS11</sup>の 1 塩基置換変異体 NS11-A1417G 株および NS11-A1516G 株においても、生育の回復が確認された (図 5)。1417 番目の塩基は、1483 番目の塩基と塩基対を形成するが、16S<sup>Eco</sup>では G-A であり、16S<sup>NS11</sup>では A-A である。この non-canonical な非ワトソン-クリック型塩基対の変化が局所的な構造を最適化し、50S サブユニットとの相互作用を向上させたと考えられる。

16S<sup>Eco</sup>において、G1516 はヘリックス h45 のループに位置し、メチル化転移酵素である RsmJ によってメチル化修飾の対象となる塩基である<sup>6</sup>。このような修飾塩基は、大腸菌 16S rRNA には 11 箇所、23S rRNA には 25 箇所存在する<sup>7</sup>。rRNA の in vitro メチル化修飾反応の再構成実験から、メチル化転移酵素の基質は様々であり、例えば、G967 のメチル化転移酵素である RsmB は、リボソーマルタンパク質 S7 と S19 が結合する前の 16S rRNA を基質にし、C966 のメチル化転移酵素である RsmD は、両リボソーマルタンパク質が結合した後の 16S rRNA を基質とする<sup>8</sup>。このように、16S rRNA の修飾は、30S サブユニットの生合成過程において、リボソーマルタンパク質の組み込みのチェック機構の役割を担っていると言える。それゆえ、16S rRNA 遺伝子の修飾塩基が保存されていることが、リボソームの生合成・機能発現に重要であると考えられてきた。実際、Yassin ら<sup>9</sup>は、大腸菌 16S rRNA 遺伝子の 1516 番目の塩基の置換が翻訳活性を低下させることを報告している。

一方、Basturea らは、大腸菌において RsmJ (G1516 のメチル化転移酵素) のノックアウト株は、通常の培養条件 (37°C、栄養培地) では顕著な表現型を示さないと報告している<sup>6</sup>。このように、G1516 のメチル化がリボソーム機能に与える影響について、二つのグループの見解は一致していないが、本研究において得られた結果、すなわち修飾対象塩基である 1516 番目の塩基が置換された 16S<sup>NS11</sup>が大腸菌 Δ7 株の生育を機能相補したことは Basturea らの結果を一部支持している。一方、16S<sup>NS11</sup>の 1516 番目の塩基を大腸菌型に置換することで生育が回復したことは、Yassin ら<sup>9</sup>の結果を一部支持している (図 5)。

16S<sup>NS11</sup>において、唯一、30S サブユニットの生合成およびサブユニット間相互作用に重要な部位が塩基対単位で置換されている 1416-1484 塩基対を 16S<sup>Eco</sup>型に置換したところ、NS11-1416-1484 株の増殖倍化時間は、NS11-3MnE 株よりもやや短く、Eco 株と遜色ない生育速度に回復した (図 5)。

一方、1416、1417、1484、1516 番目の塩基すべてを 16S<sup>Eco</sup>型にした変異体では、NS11 株より増殖倍化時間が短縮したことは確認できたが、NS11-1416-1484 株の増殖倍化時間を下回することはなかった (図 5、All)。個々の塩基置換では生育の回復が認められた塩基の統合が、生育回復に加算的に影響しなかった理由としては、これらの塩基間でなんらかの相互作用が働いているためであると考えられる。

以上、16S<sup>NS11</sup>の 3' minor ドメイン内の重要残基の点変異解析により、1416-1484 塩基対の大腸菌型への置換により生育が大幅に回復することが判明した。1416-1484 塩基対パターンと増殖倍化時間の関係は、G・U (致死 [NS11-A1416G 株]) → A-U (72.6 min [NS11 株]) → A・C (42.7 min [NS11-U1484C]) となる。各部位を占める塩基の種類とともに、塩基対の結合強度 (AC<GU<AU) の違いが大きく生育に影響することがわかった。

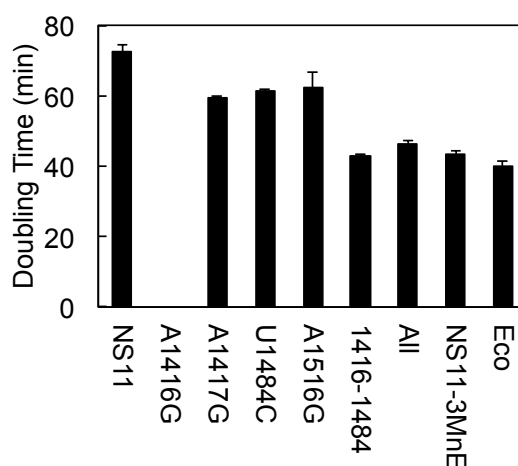


図5

#### 16S<sup>NS11</sup>の16S<sup>Eco</sup>置換変異体の生育評価

各KT105株の前培養菌液は、M9-グルコース最少培地で2度洗浄し、OD<sub>600</sub>を1に揃えた後、菌液 0.7 μlを、37°Cに温められた200 μlのLB培地 (Tmp, Km)に植菌し、37°Cで15分ごとにOD<sub>600</sub>を測定した。各株の増殖倍化時間(DT)は、増殖曲線からそれぞれ算出された、独立クローン4つの平均値である。

## 4. おわりに

上記の研究を通じ、16S<sup>NS11</sup>においては3' minor ドメインの数塩基が50S サブユニットとの相互作用低下を招き、これがリボソーム機能低下の主要因であるという結論が得られた。16S<sup>Eco</sup>とは334塩基もの違いを有する16S<sup>NS11</sup>が、わずか2塩基置換により16S<sup>Eco</sup>に匹敵する増殖特性を獲得するという事実（増殖開始までのラグや最終濁度に違いはあったものの）は、裏を返せば、残りの300余りの塩基は、実はそれほど機能に影響しない「中立」であることを示唆している。塩基置換の大半が機能低下を招くと考えられていた過去の知見<sup>9-10</sup>と比べ、「二次構造を維持する」という原則の範囲内で相当程度、配列自由度があるということになる。今後、リボソームを徹底的に改変していく上で、重要な指針となる。今回、16S<sup>NS11</sup>について詳細な解析をおこなったが、クローンごとに配列の相違部位は様々である。第2章で得た「進化系統的な限界」で得た知見と、今回見出された「機能維持の分子基盤に関する知見」を組合せると、配列自由度はさらに拡張するかもしれない。

本章では、16S<sup>NS11</sup>における機能上重要な残基を特定する手段として、「ドメインキメラ解析」を利用し、その手法が16S rRNAの機能解析・改変に有効であることも示された。16S<sup>NS11</sup>と16S<sup>Eco</sup>の間では5'ドメインを置換した際に失活したものの、Central、3' major、3' minor ドメイン置換体については機能不良に陥ることはなかった。このことは、16S rRNAにおいて、ドメインという構造単位が比較的自由に組合せ可能であることを示唆する。第2章までは、RINSPEX法による改変を16S rRNAの全長配列の置換を主体に進めてきたが、本章で得られた知見により、ドメイン単位で置換することも有効であることが示された。本章では野生型（大腸菌）16S rRNA遺伝子とのバッククロス実験としておこなったが、異なるバクテリア由来の16S rRNA遺伝子同士のキメラ化にも利用可能である。ドメインキメラ解析を目的に本章で設計したドメインごとの増幅プライマーは、進化系統上、多様な分類群から16S rRNA遺伝子を捕捉することができ、それらの連結もIn-Fusion法などで簡便におこなうことができる。今後、RINSPEX法をさらに発展させ、またリボソーム機能を改変・改良する上で、新たな変異手法として加えていきたい。

次章では、リボソームの機能を一遺伝子の翻訳活性として見るではなく、宿主に戻した際の細胞全体の表現型という観点で研究を進めた。少数のレポーター遺伝子の活性のみでは見えなかった表現型の変化も検出されるものと期待される。

### 《引用文献》

1. Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B.W. and Ueda, T. (2007) Efficient protein selection based on ribosome display system with purified components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 270-276.
2. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components, *Nat. Biotechnol.* **19**, 751-755.
3. Tsukuda, M. and Miyazaki, K. (2013) Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **116**, 540-545.
4. Xu, Z. and Culver, G.M. (2010) Differential assembly of 16S rRNA domains during 30S subunit formation. *RNA* **16**, 1990-2001.

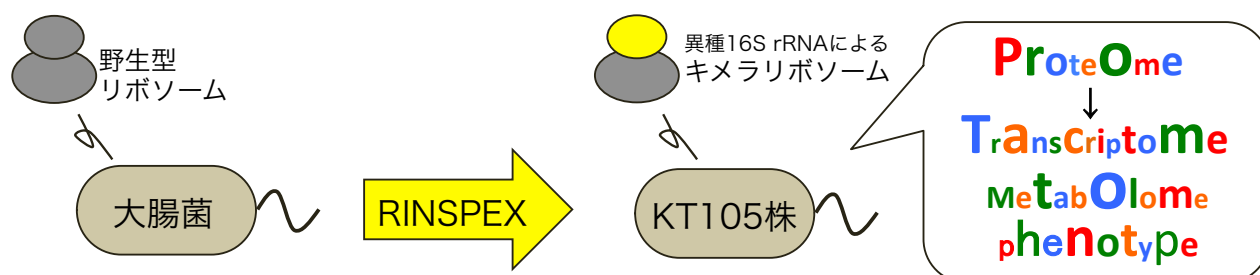
5. Yusupov, M.M., Yusupov, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. and Noller, H.F. (2001) Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**, 883-896.
6. Basturea, G.N., Dague, D.R., Deutscher, MP. and Rudd, K.E. (2012) YhiQ is RsmJ, the methyltransferase responsible for methylation of G1516 in 16S rRNA of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **415**, 16-21.
7. Sergiev, P.V. Osterman, I.A., Prokhorova, I.V., Nesterchuk, M.V., Sergeeva, O.V., Folovina, Ala. Demina, I.A., Galiamina, M.A., Serebriakova, M.V. and Dontsova, O.A. (2011) Systems biology approach to the functional role of enzyme modification of bacterial ribosome. *Bioorg. Khim.* **37**, 81-90.
8. Weitzmann, C. Tumminia, S. J., Boublik, M. and Ofengand, J. (1991) A paradigm for local conformational control of function in the ribosome: binding of ribosomal protein S19 to *Escherichia coli* 16S rRNA in the presence of S7 is required for methylation of m<sup>2</sup>G966 and blocks methylation of m<sup>5</sup>C967 by their respective methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **19**, 70819-7095.
9. Yassin, A., Fredrick, K. and Mankin, A.S. (2005) Deleterious mutations in small subunit ribosomal RNA identify functional sites and potential targets for antibiotics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16620-16625.
10. Laios, E., Waddington, M.S., Saraiya, A.A., Baker, A.K., O'Connor, E., Pamarathy, D. and Cunningham, RP. (2004) Combinatorial genetic technology for the development of new anti-infectives. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **128**, 1351-1359.

## 第4章 16S rRNA 遺伝子置換の大腸菌表現型への影響

16S rRNA 遺伝子置換は、リボソームの機能を変化させる。そして、リボソームの機能変化は、細胞内のプロテオームを変動し、それがメタボローム、トランスクリプトーム、さらには表現型変化へとつながると考えられる。本章では、RINSPEX 法によって創成された 29 種の大腸菌変異株（Eco 株を含む）についてフェノタイプマイクロアレイによる表現型解析をおこない、16S rRNA 遺伝子の置換が最終的に大腸菌の表現型にどのように影響するかを検証した。データの解析には、トランスクリプトーム解析やメタボローム解析等によく使われるクラスタリング分析を用いた。

その結果、大半の変異株では、Eco 株に比べストレス応答の低下、糖やアミノ酸代謝活性の低下が見られた。しかし、株によっては、抗生物質 Nalidixic Acid や Aztreonam に耐性が向上するなど、元株より優れた形質をもつものが生まれうることが確認された。

**キーワード**：フェノタイプマイクロアレイ解析、GENIII MicroPlate™、OmniLog、  
階層的クラスタリング分析、主成分分析



28種の変異株 + Eco株

↓

### 【表現型評価】

- 増殖
- フェノタイプマイクロアレイ解析

↓

### 【データ解析】

- 階層的クラスタリング分析
- Eco株の表現型との比較分析
- 主成分分析

↓

16S rRNA遺伝子の置換による  
大腸菌の表現型の変化を解明

### 【結果のまとめ】

- 機能的16S rRNAの進化系統的分類と表現型に強い相関は見られない。
- 変異株の大半がEco株よりも、糖やアミノ酸などの代謝活性が低下。

(例外)

- 変異株の大半がNalidixic Acid耐性を獲得。
- いくつかの変異株にて、D-MaltoseやPectinの代謝活性が向上。
- いくつかの変異株にて、Aztreonam（抗生物質）耐性を獲得。



## 1. はじめに

### 1-1. リボソーム改変による細胞システムの変動と微生物育種

リボソームの機能改変は、大腸菌ゲノムにコードされている約 4,000 の遺伝子の翻訳プロファイル（プロテオーム）を変化させ、それがさらにトランスクリプトーム、メタボロームなど、細胞システム全体の変動を誘導し、最終的には表現型にまで影響を及ぼすと考えられる（図 1）。リボソームの機能次第では、細胞のもつ機能をさらに高めたり、あるいは休眠遺伝子を活性化させたり<sup>1</sup> するなどして、通常現れていない機能が発揮されることも期待される。第 3 章までは、16S rRNA 遺伝子の種類によって、置換された大腸菌の「生き死に」に焦点を当ててきたが、本章では、変異株に観察される「表現型の変化」に着目する。さらにそれが「微生物育種技術」として適用可能であるかどうかについて検討した。特に、どのような表現型に変わらうのか、機能向上が起こりうるのかという二点に着目し、第 2 章で獲得した 28 の変異株および Eco 株を材料に、フェノタイプマイクロアレイ（PM）による網羅的な表現型解析をおこなった。

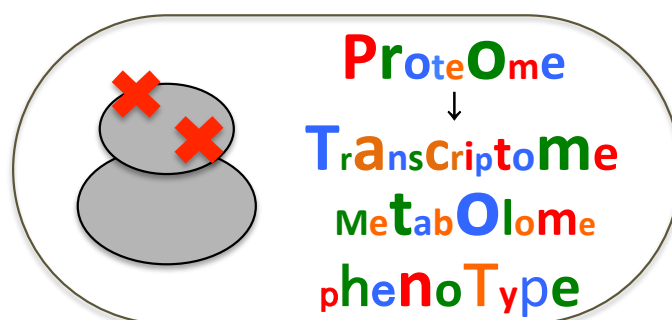


図 1 リボソーム改変に伴う細胞システムの変動

16S rRNA 遺伝子改変は、リボソームの機能を変化させ、大腸菌内遺伝子の翻訳プロファイル（プロテオーム）を変化させ、それがさらにトランスクリプトーム、メタボロームなど、細胞システム全体の変動を誘導し、最終的にはフェノタイプにまで影響を及ぼすと考えられる。

### 1-2. フェノタイプマイクロアレイ解析

PM 解析はフェノーム解析手段のひとつであり、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析、メタボローム解析に並ぶ、生命現象の包括的な解析・解明の一手法である。本章では、PM 解析に Biolog 社の GEN III MicroPlate™ を用いた。GEN III MicroPlate™ は 96 well microplate に、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、および 94 の生化学的項目に関する試薬（糖やアミノ酸、NaCl、抗生物質など）が充填されている（表 1）。専用の溶液（IF-A）に懸濁した菌液を各ウェルに分注し、対象の菌株の培養最適温度で保温する。そして、各ウェルにおける細胞の呼吸活性を、テトラゾリウム色素の酸化還元反応による呈色により評価する。OmniLog システムを用いることで、最大 50 枚のプレートのアッセイ（反応と検出）が可能である。試験結果は、呈色の度合いを「定性的」に評価することが一般的であるが、本章では各試験項目に対する呈色程度を「定量的」に評価し、高い解像度で変異株の表現型を評価した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 検体

第 2 章で獲得した 28 の変異株および Eco 株に対し、GEN III MicroPlate™ による PM 解析をおこなった。

A1	NEGA	B1	D-Raffinose	C1	a-D-Glucose	D1	D-Sorbitol
A2	Dextrin	B2	a-D-Lactose	C2	D-Mannose	D2	D-Mannitol
A3	D-Maltose	B3	D-Melibiose	C3	D-Fructose	D3	D-Arabitol
A4	D-Trehalose	B4	b-Methyl-D-Glucoside	C4	D-Galactose	D4	myo-Inositol
A5	D-Cellobiose	B5	D-Salicin	C5	3-Methyl Glucose	D5	Glycerol
A6	Gentiobiose	B6	N-Acetyl-D-Glucosamine	C6	D-Fucose	D6	D-Glucose-6-PO4
A7	Sucrose	B7	N-Acetyl- b-D-Mannosamine	C7	L-Fucose	D7	D-Fructose-6-PO4
A8	D-Turanose	B8	N-Acetyl-D-Galactosamine	C8	L-Rhamnose	D8	D-Aspartic Acid
A9	Stachyose	B9	N-Acetyl Neuraminic Acid	C9	Inosine	D9	D-Serine
A10	POSI	B10	1% NaCl	C10	1% Sodium Lactate	D10	Troleandomycin
A11	pH 6	B11	4% NaCl	C11	Fusidic Acid	D11	Rifamycin SV
A12	pH 5	B12	8% NaCl	C12	D-Serine	D12	Minocycline

E1	Gelatin	F1	Pectin	G1	p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	H1	Tween 40
E2	Glycyl-L-Proline	F2	D-Galacturonic Acid	G2	Methyl Pyruvate	H2	g-Amino-Butyric Acid
E3	L-Alanine	F3	L-Galactonic Acid Lactone	G3	D-Lactic Acid Methyl Ester	H3	a-Hydroxy- Butyric Acid
E4	L-Arginine	F4	D-Gluconic Acid	G4	L-Lactic Acid	H4	β-Hydroxy-D,L-Butyric Acid
E5	L-Aspartic Acid	F5	D-Glucuronic Acid	G5	Citric Acid	H5	a-Keto-Butyric Acid
E6	L-Glutamic Acid	F6	Glucuronamide	G6	a-Keto-Glutaric Acid	H6	Acetoacetic Acid
E7	L-Histidine	F7	Mucic Acid	G7	D-Malic Acid	H7	Propionic Acid
E8	L-Pyroglutamic Acid	F8	Quinic Acid	G8	L-Malic Acid	H8	Acetic Acid
E9	L-Serine	F9	D-Saccharic Acid	G9	Bromo-Succinic Acid	H9	Formic Acid
E10	Lincomycin	F10	Vancomycin	G10	Nalidixic Acid	H10	Aztreonam
E11	Guanidine HCl	F11	Tetrazolium Violet	G11	Lithium Chloride	H11	Sodium Butyrate
E12	Niaproof 4	F12	Tetrazolium Blue	G12	Potassium Tellurite	H12	Sodium Bromate

表 1 GEN III MicroPlate™ の各ウェルの試験項目

## 2-2. PM 解析

### 2-2-1. データ取得

**スケジュール** 試験対象の 29 種の KT105 株に対し、繰り返し実験回数 3 回（N=3）で PM 解析をおこなった。測定は、OmniLog の解析プレート数の限度と作業効率の点から、5 回（5 日）に分けておこなった。

(1) Eco 株（Eco-Test1、Eco-Test2、Eco-Test3、以下同様に N=3 を個別に管理。）

NS5 株 NS11 株 45HK 株 45BH 株 BH1 株 BH2 株 BH6 株

(2) NS3 株 NS4 株 NS6 株 NS7 株 HK20 株 HK21 株

(3) HK1 株 HK2 株 HK3 株 HK5 株 HK7 株 HK9 株

(4) HK10 株 HK11 株 HK16 株 HK19 株 NS10 株

(5) NS14 株 NS16 株 NS19 株 NS20 株



**試験対象の KT105 株の準備** PM 解析の測定開始日にフレッシュなコロニーを獲得できるよう、試験対象の株に対応する pRB105 による KT101 株の形質転換（測定開始時間の 72 時間前）、カウンターセクション（48 時間前）、KT105 株のストリーク（24 時間前）を計画的におこなった。また、実験誤差を出来る限り小さく抑えるため、培地組成（同時に同じコニカルビーカー由来の寒天プレート培地の使用）や培養条件（温度 [37°C]、培養時間）を統一した。

**OmniLog による測定** PM 測定予定の株の培養終了時の 1 時間前に、GEN III MicroPlate™ と菌懸濁液の IF-A を冷蔵庫から取り出し常温に慣らした。24 時間培養後、LB 寒天プレート培地上のコロニーをスワブでつつき IF-A に懸濁し、専用の濁度計にて濁度指数 98 に調整した。その後、GEN III MicroPlate™ に 100  $\mu$ l ずつ分注した。そして、試験プレートを 37°C に保温された OmniLog にセットし、テトラゾリウム色素による呈色反応（画像の一例を図 2 に示す）を、24 時間、15 分おきに測定し、定量化した。

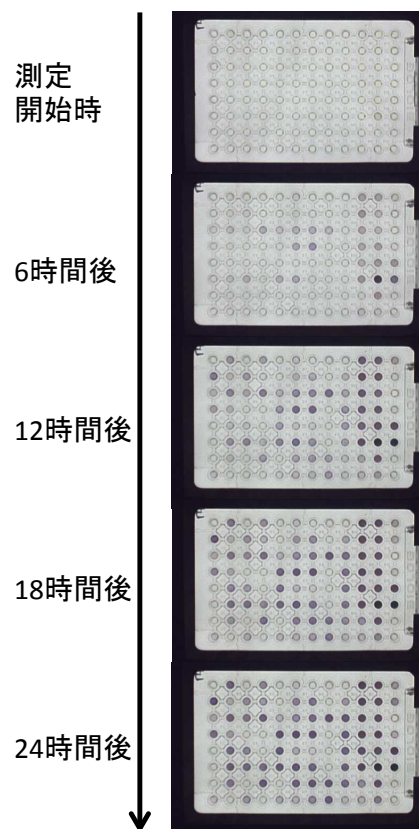


図2

**測定中のGENIII MicroPlate™の継時変化**  
寒天プレート培地上のEco株コロニーをIF-Aに懸濁し、濁度指数98に調整後、各wellに100  $\mu$ lずつ分注した。そのマイクロプレートは、37°Cに保温されたOmniLogにセットし、24時間15分おきにプレートの写真を撮影した。

## 2-2-2. データ処理

**カイネティクスグラフ** PM 解析のデータは、試験プレートごとに、ウェル番号 A01 から H12 までの 96 の試験項目（横方向）に対する、15 分ごとの呈色強度が縦方向に並んだ CSV 形式で取得できる（図 3A）。カイネティクスグラフの作成は、オープンソースの統計解析ソフトウェアである R の grofit パッケージ<sup>2</sup>を利用した（図 3B）。なお、それぞれのカイネティクスグラフの傾き（mu 値）、最大値（A 値）、面積（integral 値）も grofit パッケージ<sup>2</sup>によって与えられる（図 3E）。

**繰り返し実験の再現性評価** 繰り返し実験 3 回の再現性を評価するため、まず、カイネティクスグラフに用いたデータの相関係数（1 回目と 2 回目、2 回目と 3 回目、3 回目と 1 回目の総当たり）と回帰直線の傾きを算出した（エクセル：CORREL 関数、SLOPE 関数）（図 3C）。次に、算出されたカイネティクスグラフの相関係数と回帰直線の傾きの、全株、全試験における観測頻度に関するヒストグラムを作成した（図 3D）。各株の各試験における mu 値、A 値、integral 値について、繰り返し実験 3 回分の平均値と標準偏差を求め、誤差率（標準偏差／平均値）を算出した（図 3F）。さらに、それぞれの誤差率を統合し（図 3G）、誤差率の観測頻度をヒストグラムとして表した（図 3H）。試験項目間の誤差率は、試験項目別に各株の誤差率を平均化することで算出した（図 3I）。KT105 株間の誤差率は、株別に各試験項目の誤差率を平均化することで算出した（図 3J）。

**階層的クラスタリング分析** PM 解析結果の全容を俯瞰するため、繰り返し実験間で最も誤差率が低い A 値を用い、ユークリッド距離 (Euclid distance) による階層的クラスタリング分析をおこなった。R、gplots パッケージ<sup>3</sup>の heatmap.2 によりヒートマップおよびデンドログラムとして描写した (図 4)。数値が小さいほど濃い青色、大きいほど赤色、中間は白色で示した。

クラスター内外の各株の 96 の試験項目結果 (A 値) に関する相関図行列および相関係数は、R の pairs 関数を用いて導いた (図 5)。相関係数は、0.95 以上の場合、赤文字で記載した (図 5)。

**その他のデータ解析** ヒストグラムの作成には、R、psych パッケージ<sup>5</sup>の multi.hist 関数を用いた。主成分分析には、R、prcomp パッケージ<sup>6-8</sup>を利用した。

## 2-3. 生育速度の測定

LB 寒天プレート培地 (Tmp, Km, 5% sucrose) 上のコロニーを 4 つずつ、それぞれ 600  $\mu$ l の LB 培地 (Tmp, Km) で培養した (96 deepwell plate, 37°C、24 h)。その前培養 0.7  $\mu$ l を、37°C に温められた 200  $\mu$ l の LB 培地 (Tmp, Km) に植菌し、VersaMax plate reader を用い、37°C で振盪しながら、15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定した。各株の増殖倍化時間 (DT) は、独立クローン 4 つのそれぞれの増殖曲線から算出された値の平均値である。

## 3. 結果と考察

### 3-1. 取得データの信頼度の確認

Biolog 社の GEN III MicroPlate™ を用い、28 種の異種 16S rRNA 遺伝子による置換変異株と Eco 株の PM 解析をおこなった。これらの菌体の希釈液を種々の試薬の充填された 96 ウェルに分注し、その条件下での大腸菌の呼吸活性をテトラゾリウム色素の呈色を指標にリアルタイムに計測した。獲得されたデータ (図 3A) は、R の grofit パッケージ<sup>2</sup>によって、株別、試験項目別にカイネティクスグラフを作成した (図 3B)。一株につき同一の測定を 3 回繰り返したが、得られたデータセットは独立に扱った。

各株 3 回の繰り返し実験におけるカイネティクスグラフ間の相関係数は、全株、全試験を通し 0.9 から 1 の間、回帰直線の傾きは  $1 \pm 0.2$  に集中していることから (図 3D)、いずれの株、いずれの試験項目においても、高い再現性が認められた。また、全株の全試験のカイネティクスグラフにおける、傾き (mu 値)、最大値 (A 値)、面積 (integral 値) それぞれの繰り返し実験での誤差率 (図 3E) の比較から、最も誤差率が低い (最も再現性が高い) 数値は、A 値であることがわかった (図 3H)。また、96 の試験項目別、29 の株別に誤差率を見ても、大半の場合において A 値の誤差率が最も低いことが認められた (図 3I, J)。

そこで、今後の解析では、最大値 (A 値) を試験結果として利用することとした。

例) BH1-Tset1

【OmniLogから得られる生データ】

(A)

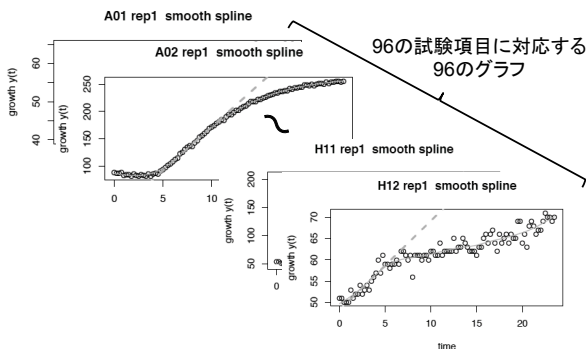
96の試験項目													
Time (min)	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07						
0	41	88	29	41	29	32	34						
15	40	87	28	39	30	31	34						
30	40	87	30	40	29	31	34						
45	40	86	31	39	30	31	33						
60	42	83	29	38	30	30	31						
75	42	84	31	36	28	30	33						
90	42	84	33	39	31	33	36						
105	40	81	32	37	33	33	36						
120	45	85	34	40	34	34	35						
135	43	83	35	38	32	35	37						
150	46	82	31	39	33	34	36						
165	47	84	39	41	36	35	39						

2805	66	261	109	190	62	62	65	71					
2820	65	257	105	188	60	79	66	71	116	188	233	79	
2835	66	258	107	188	60	78	65	71	114	186	232	77	
2850	64	257	107	189	60	78	65	71	114	186	234	76	

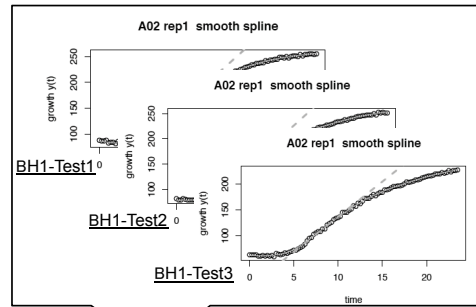
【カイネティクスグラフ化 (grofit)】

(B)



【繰り返し実験(N=3)における成長曲線の総当たり相関係数】

(C)



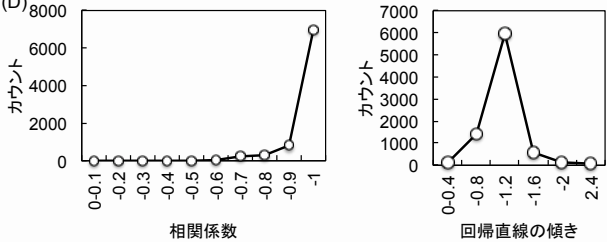
96の試験項目													
BH1	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07						
Test1:Test2	0.93	1	0.99	1	0.96	0.96	0.97						
Test2:Test3	0.96	1	0.96	1	0.98	0.96	0.99						
Test3:Test1	0.95	0.99	0.96	1	0.97	0.97	0.97						

H09	H10	H11	H12					
Test1:Test2	0.98	0.9	0.99	0.95				
Test2:Test3	0.98	0.99	0.99	0.98				
Test3:Test1	0.99	0.94	0.99	0.97				

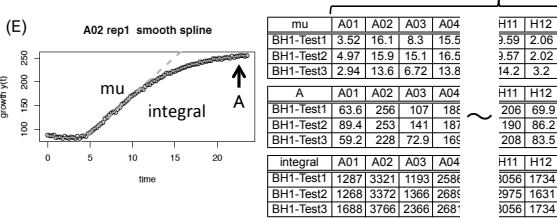
【カイネティクスグラフ間の相関係数および回帰直線の傾きの観測頻度におけるヒストグラム】

(D)



【傾き (mu値)、最大値 (A値)、面積 (integral値) の抽出】

(E)



【mu値、A値、integral値の平均値・標準偏差・誤差率の算出】

(F)

96の試験項目													
mu	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07						
平均	3.81	15.2	10	15.2	4.56	11.2	3.61						
標準偏差	0.85	1.12	3.62	1.12	0.43	1.29	0.2						
誤差率	0.22	0.07	0.36	0.07	0.1	0.12	0.06						

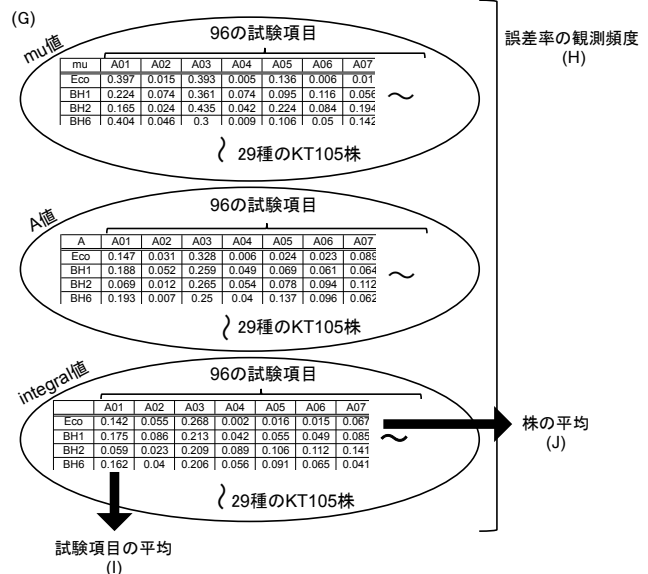
A	A01	A02	A03	A04						H09	H10	H11	H12
平均	70.7	246	107	181	63.1	83.6	61.3						
標準偏差	13.3	12.8	27.6	8.86	4.36	5.1	3.93						
誤差率	0.19	0.05	0.26	0.05	0.07	0.06	0.06						

integral	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07						
平均	1414	3486	1642	2652	1171	1532	1034						
標準偏差	194	199	517	47	18.8	21.2	90.4						
誤差率	0.14	0.06	0.31	0.02	0.02	0.01	0.09						

【29種のKT105株の誤差率】

(G)

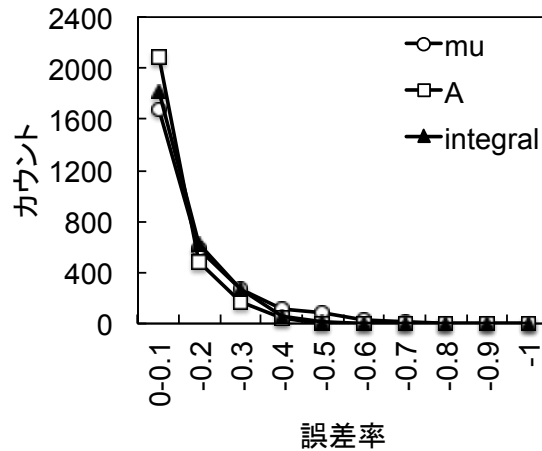


試験項目の平均 (I)

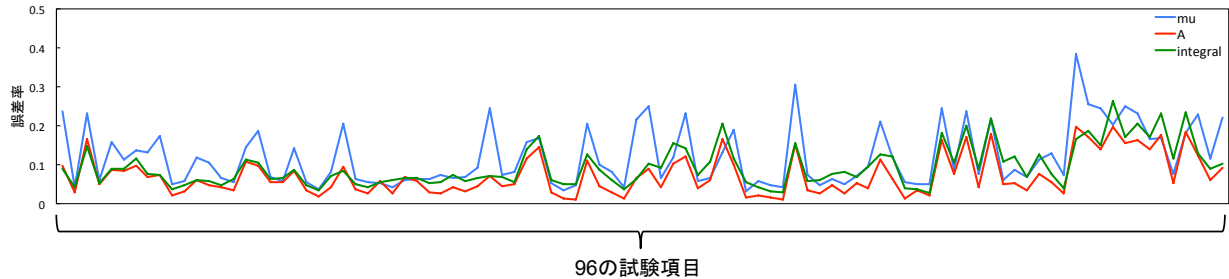
株の平均 (J)

【繰り返し実験の誤差率の観測頻度に関するヒストグラム】

(H)



(I) 【試験項目別の誤差率の平均】



(J) 【KT105株別の誤差率の平均】

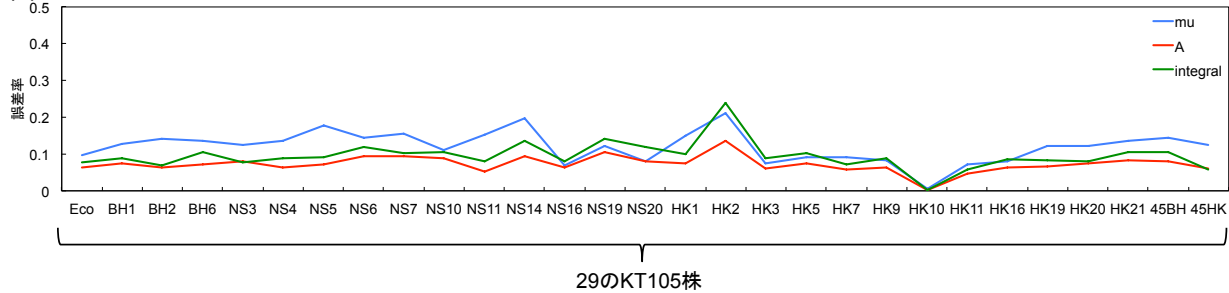


図3 PM解析の再現性の検証

(A) 生データの一部 (例として BH1 株-Test1)。 (B) grofit によるカイネティクスグラフ化の一部 (例として BH1 株-Test1)。 (C) 繰り返し実験におけるカイネティクスグラフの総当たり相関係数 (例として BH1 株-Test1)。 (D) 各株におけるカイネティクスグラフの相関係数および回帰直線の傾き (N=3) の観測頻度のヒストグラム。 (E) カイネティクスグラフからの mu 値、A 値、integral 値の抽出 (例として BH1 株-Test1)。 (F) mu 値、A 値、integral 値の平均値・標準偏差・誤差率の算出 (例として BH1 株-Test1)。 (G) 29 種の KT105 株における誤差率。 (H) 全株・全試験における、誤差率 (N=3) の観測頻度のヒストグラム。 (I) 試験項目別の誤差率。 (J) KT105 株別の誤差率。 PM 解析により得られたデータ (A) は、grofit によりカイネティクスグラフを作成し (B)、繰り返し実験 1 回目と 2 回目、2 回目と 3 回目、3 回目と 1 回目のカイネティクスグラフの相関係数と回帰直線の傾きを検証した (C,D,E)。また、カイネティクスグラフから抽出された傾き (mu 値)、最大値 (A 値)、面積 (integral 値) (EF) の再現性を、誤差率を指標に比較した (GHIF)。

### 3-2. PM 解析結果によるクラスタリングと生育速度および進化分子系統関係の関連

再現性が最も高い A 値を利用し、29 種の株における 96 の試験結果の階層的クラスタリング分析をおこなう。結果をヒートマップと株・試験双方に対するデンドログラムとして示した (図 4)。その結果、29 種の KT105 株はクラスター A~E の 5 つに、96 の試験は、1~6 群にクラスタリングされた (図 4)。

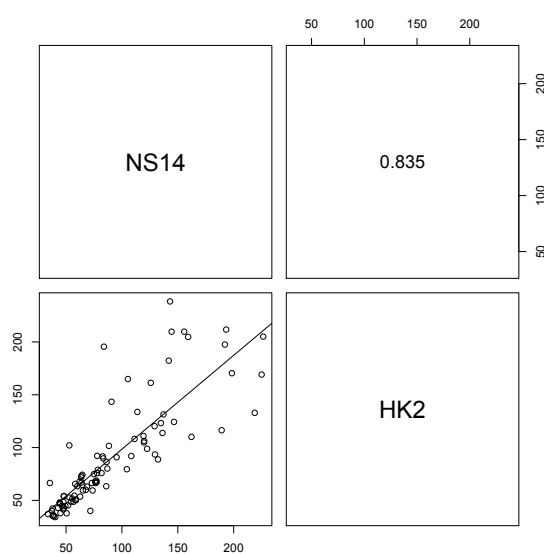


同一クラスターに属する株の 96 の試験結果 (A 値) を、総当たりで相関解析したところ、2 つの株のみで構成されるクラスター A の NS14 株と HK2 株、そしてクラスター B の NS5 株とその他の株について、それ以外の組合せと比較して低い相関係数を示した (図 5)。クラスター A の NS14 株と HK2 株の相関係数は 0.835 であった。ただし、NS14 株と HK2 株では、A 値が低い (活性がない、あるいは低い) 試験項目の結果 (相関図の左下隅周辺) では比較的相関が高いことが認められ、相関係数の低下は A 値が 100 以上の試験項目の結果に起因することが確認された (図 5A)。一方、クラスター B における NS5 株とその他の株との相関では、A 値が 100 以下 (相関図の左下隅周辺) および 200~220 以上 (相関図の右上隅周辺) の試験項目においては相関が認められた (図 5B)。

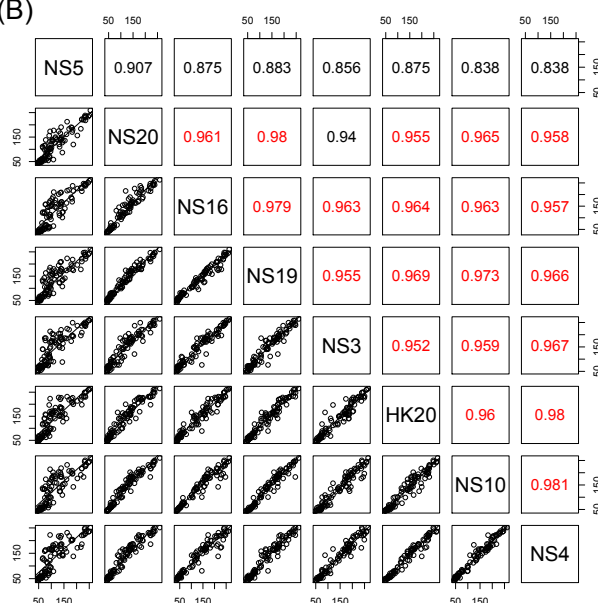
クラスター間の PM 解析結果の相関についても検証した。各クラスターの代表株 (図 5A-5E における最上位に位置する株) 同士の PM 解析結果の相関解析では、クラスターを共有する株同士の相関が比較的低かったクラスター A の NS14 株についても、クラスター B の NS5 株についても、クラスター内の株との相関係数より高いことはなかった (図 5)。つまり、クラスターによって、クラスターを共有する株の PM 試験結果の相関の程度にバラツキが見られるが、異なるクラスターに帰属される株との相関よりは、最低でも 0.015 以上高いことが分かり、29 種の株の中では試験結果が類似した株とクラスターを構成していると確認することができた。

Eco 株はクラスター C に含まれる (図 4、図 5C) が、このクラスターには、その他に BH1 株、BH2 株、BH6 株、45BH 株、45HK 株が含まれる (図 4、図 5C)。クラスター C はその他のクラスターに比べ、クラスター内の株間の試験結果が互いによく相関し (相関係数 0.97 以上、図 5)、また 16S rRNA 遺伝子の進化系統関係および生育速度の点でも、他のクラスターと比較して、より類似していることがわかった (図 6)。クラスター C の相関図行列から、相関係数の最高は Eco 株と BH2 株の間の 0.994 であり、最低でも BH6 株と BH1 株の間の 0.97 であった (図 5C)。以上、16S rRNA 遺伝子が大腸菌に近縁であるならば、KT105 株の PM 解析の結果も類似することがわかった。

(A)



(B)





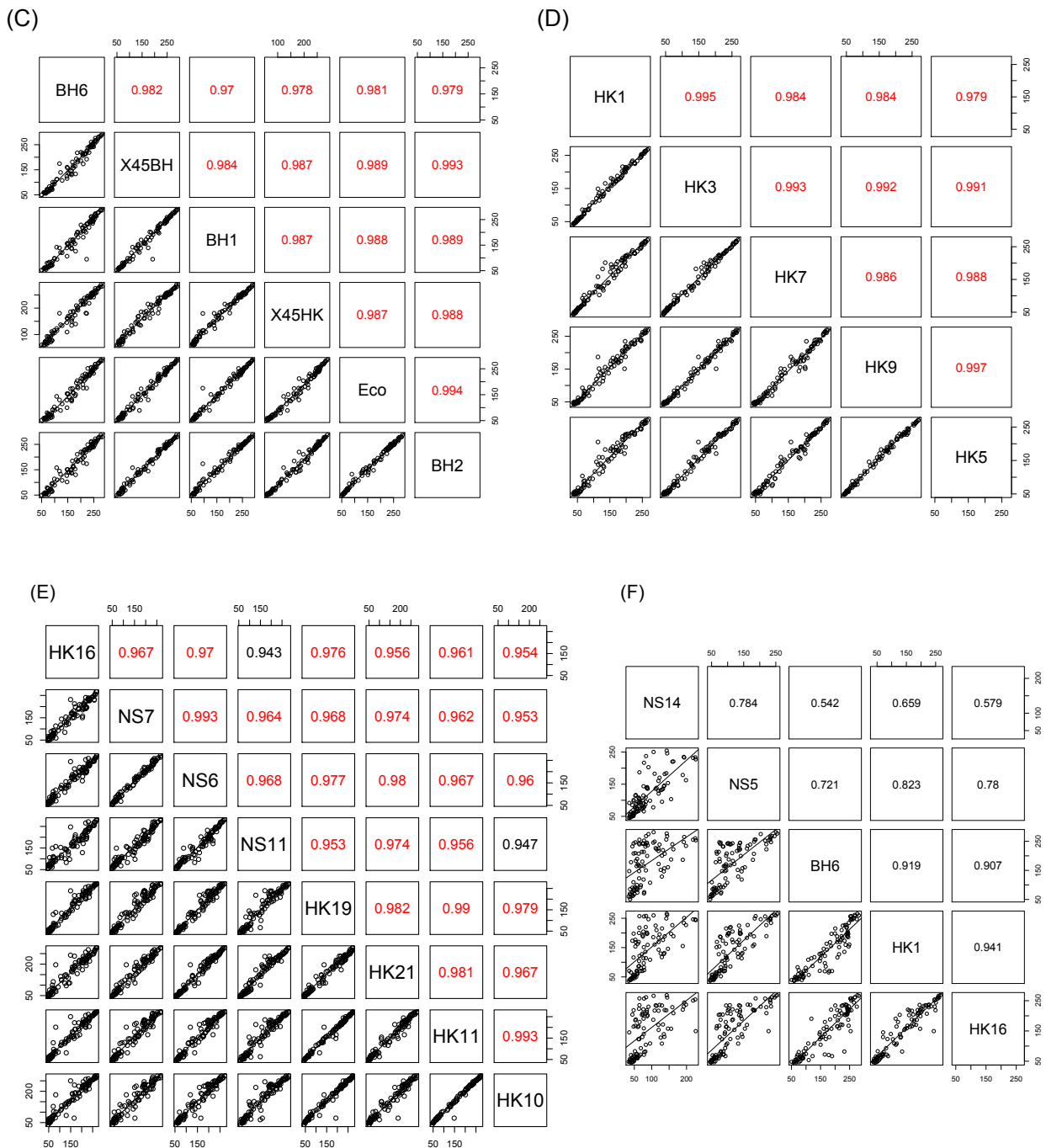


図5 PM 解析結果 (A 値) による相関図行列

(A) クラスターA。(B) クラスターB。(C) クラスターC。(D) クラスターD。(E) クラスターE。(F) クラスターA～E の代表株を使用。クラスターを共にする、あるいは異なるクラスターの KT105 株の PM 解析結果 (96 の試験結果 [A 値]) を、総当たりで相関解析した。相関図行列および相関係数は、R の pairs 関数を用いて導いた。相関係数は、0.95 以上の場合を赤字で記載した。

一方、クラスターC 以外については、クラスターを共にする 16S rRNA 遺伝子同士が、必ずしも進化系統的に近縁であるとは限らなかった (図 6)。クラスターA については、HK2 株の 16S rRNA 遺伝子は大腸菌と同じガンマプロテオバクテリア綱に由来し、NS14 株の機能性 16S rRNA 遺伝子は別綱のベータプロテオバクテリア綱に由来する。クラスターB については、8 つの 16S rRNA 遺伝子の由来は、ガンマプロテオバクテリア綱、ベータプロテオバクテリア綱、アシドバクテリア門と、多様な系統群にまたがっていた。クラス

ターDについては、5つの16S rRNA遺伝子すべてがベータプロテオバクテリア綱に由来するが、進化系統的には2つのグループに分かれた(図6)。クラスターEの8つの16S rRNA遺伝子では、クラスターB同様、進化系統樹上の位置はバラついていた(図6)。

KT105株の生育速度とPM解析結果の関係については、前述のとおり、Eco株を含むクラスターCでは、帰属される株の生育速度が比較的速いものが集合している(図6)。しかし、それよりも生育速度が類似した株の集合体であるクラスターが、クラスターDである。クラスターCでは、第2章で競合実験の末に獲得され、Eco株の生育速度(40.2 min)よりも生育速度が速い45BH株(35.0 min)と45HK株(38.6 min)のほか、比較的生育速度が速いBH2株(61.1 min)およびBH6株(66.7 min)を含む(図6)。しかし、16S rRNA遺伝子の配列相同性では、BH2株およびBH6株の遺伝子間で99%を超えるが、生育速度が84.7 minと低いBH6株も含まれる(図6)。一方、クラスターDでは、5つの株の生育速度は、49.0 min(HK7株)から61.6 min(HK11株)の間に収まり、生育速度がクラスターCよりも類似した(図6)。クラスターC、D以外では、生育速度の類似性は認められなかった(図6)。

クラスターA~Eの各試験項目群に対するA値の平均値を図7に示した。ここから、階層的クラスタリング分析により見出された96の試験項目の1から6群に属する試験項目における、各クラスターに帰属されるKT105株の呼吸活性の傾向を比較すると、強度の程度の差があるが、クラスターAとB、そしてクラスターC、D、Eはグラフ形状が類似していた(図7)。具体的なその両者の違いは、試験項目3群と6群に顕著であり、クラスターAとBに関して、その群の活性が低くなっていることが認められた(図7)。



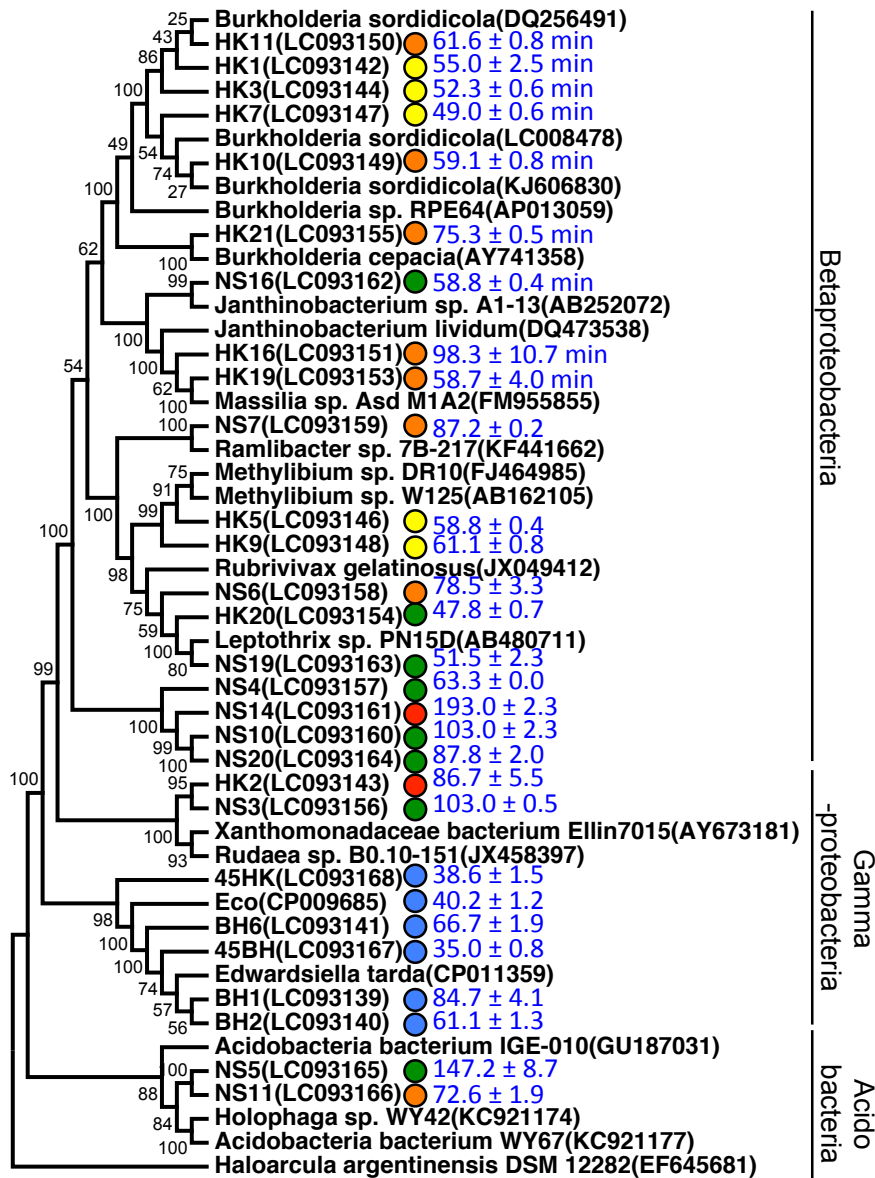


図6 KT105株の機能性16S rRNA遺伝子による進化的関係とPM解析結果および生育速度の関係

第2章図3の系統樹に、各株のPM解析結果に関するR、gplotsパッケージ<sup>3</sup>による階層的クラスタリング分析によって帰属されたクラスター（赤：クラスターA、緑：クラスターB、青：クラスターC、黄：クラスターD、橙：クラスターE）を示した。また、各株の名称の右に表記した数値は、生育速度を示す。LB培地で前培養した菌液 0.7 μl を、37°Cに温められた 200 μl の LB 培地 (T<sub>mp</sub>, Km) に植菌し、VersaMax plate reader を用い、37°Cで振盪しながら、15 分ごとに OD<sub>600</sub> を測定し、増殖曲線から算出した (N=4)。

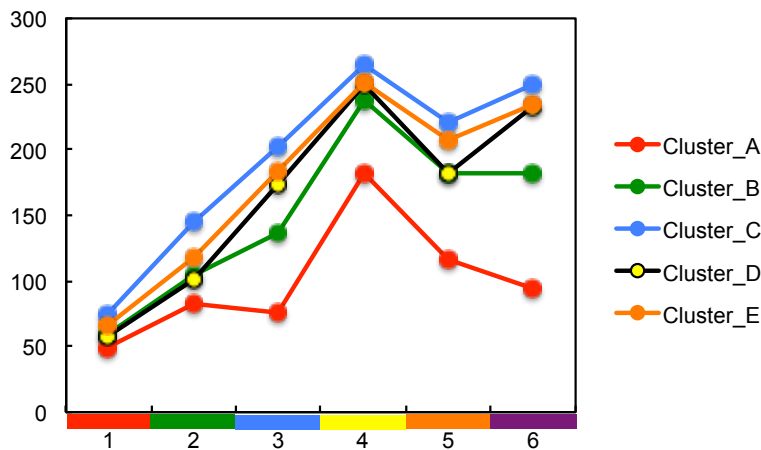


図7 試験項目群別の各クラスターのPM解析

試験項目群別の各クラスターのPM解析結果の平均値を算出しグラフ化した。横軸の数字は、各株のPM解析結果に関するR、gplotsパッケージ<sup>3</sup>による階層的クラスタリング分析による試験項目群 1~6 に対応している。縦軸は、PM解析のA値である。

### 3-3. Eco 株との比較分析

#### 3-3-1. クラスター別の 96 の試験結果

29 種の KT105 株の 96 の試験項目の測定結果（A 値）を図 8 に示した。1 列目には、96 の試験項目に対応する GEN III MicroPlate™ のウェル番号を、1 行目には 29 種の KT105 株を 3-2 で導いたクラスターごとに配置している。1 列目の 96 種の試験項目は、Eco 株の A 値を基準に、大きい値から小さい値の試験項目順に整列している。A 値が大きい程赤色に、小さいほど青色に、そして中間では白色に表示している。

図 8 から、クラスター C に含まれる KT105 株はいずれも、他のクラスターより、A 値が高い試験が多く見られる傾向が認められた。また、クラスター C に帰属される KT105 株は、96 の試験項目全般 Eco 株の結果とよく類似し、図 8 の上の列から下の列に向かうにつれ、いずれの株でも値が小さくなっている（赤→白→青）が、その他のクラスターでは、試験項目によっては値が極端に低くなっていたり、赤と青の行が入り混じっていたりした（図 8）。Eco 株（およびクラスター C に帰属される KT105 株）に比べ、試験項目によっては活性が明らかに低下、または失活しているものがあることを意味している。

#### 3-3-2. A 値の変化が大きい試験項目（20 種）における A 値の観測頻度

Eco 株の A 値との差が 150 以上の試験項目 20 種を抽出した。それらの試験項目に対し、各株の A 値の分布をヒストグラムとして示した（図 9）。その結果、Eco 株の A 値は、20 種の試験項目の大半において、最も高い部分にあり、その他の株の A 値の分布は試験項目によって様々であった（図 9）。例えば、D10（Troleandomycin）のように、ほとんどの株が Eco 株と同様の高い A 値を示し、少数の株のみが低い値を示したり、F09（D-Saccharic Acid）のように、Eco 株の A 値に近づくほどに株数が増える場合であったり、E03（L-Alanine）のように二山型に分布する場合であったり、G09（Bromo-Succinic Acid）や C09（Inosine）のように、正規分布型に分布する場合であったり、様々であった（図 9）。

#### 3-3-3. Eco 株よりも高い A 値を示す株の抽出

96 の試験項目の大半において、16S rRNA 遺伝子置換株は Eco 株よりも低い A 値を示したが、試験項目と株の組合せによっては、Eco 株よりも高い A 値を示す株も見出された。Eco 株よりも 50 以上高い A 値を示した試験項目は、A03（D-Maltose）、H10（Aztreonam）、G10（Nalidixic Acid）、F01（Pectin）の 4 つであった。これらの 4 つの試験項目について、各株における A 値の分布を、ヒストグラムで示した（図 10）。A03 と F01 については、約半数の株が Eco 株よりも高い A 値を示し（図 10）、H10 と G10 においては、半数以上の株が、Eco 株よりも A 値が高かった（図 10）。4 つの試験項目の Eco 株の A 値は、G10 を除き、低活性であった（図 10）ことを考えると、G10 以外の 3 つの試験項目に関しては、Eco 株に備わっていない新たな機能（表現型）を獲得したと言える。

以上、Eco 株との A 値の比較分析により、階層的クラスタリング分析では見えづらかった Eco 株の A 値に対し変化が大きい試験項目を抽出できた。GEN III MicroPlate™ の試験では、大半が Eco 株よりも代謝活性、あるいはストレス応答が低下したことが認められた。一方、少数ではあるが、Eco 株よりもそれらが向上した場合も認められた。16S rRNA 遺伝子の置換が、大腸菌のリボソームの機能改変を通じ、細胞の潜在的な機能をさらに高めたり、本来持たない機能を付与したりするといった効果を実際に観察できたと言える。

大 小

クラスター	A										B										C										D										E									
KT105	NS14	HK2	NS5	NS20	NS16	NS19	NS3	HK20	NS10	NS4	BH6	45BH	BH1	45HK	Eco	BH2	HK1	HK3	HK7	HK9	HK5	HK16	NS7	NS6	NS11	HK19	HK21	HK11	HK10																					
E12	143	238	254	260	263	260	265	265	260	252	277	287	288	284	大	287	268	267	271	268	270	268	266	271	261	272	278	273	274																					
A10	105	165	250	239	259	245	259	261	245	237	281	290	287	282		279	260	262	267	269	270	268	267	264	277	270	277	269	265																					
A11	91	143	203	157	226	196	237	214	177	172	275	283	285	281		276	247	253	257	254	260	230	239	258	271	259	269	261	260																					
F10	84	195	238	234	244	232	246	250	233	237	268	280	278	277		274	276	258	251							271	265	269	263	262																				
D11	144	210	246	234	251	239	258	280	242	234	268	281	278	275		271	277	267									270	267	269	273																				
B10	193	212	233	231	245	238	250	234	229	226	265	272	277	272		269											270	267	269	273																				
C10	142	182	184	180	237	218	249	227	196	203	258	268	270	267		268											270	267	269	273																				
D10	65	74	187	120	215	174	194	200	142	138	256	276	273	274		268											270	267	269	273																				
E10	78	92	217	184	229	178	197	220	191	174	252	263	267	264		265											270	267	269	273																				
D06	225	169	234	238	242	247	239	248	250	250	280	283	284	259		260											270	267	269	273																				
E07	219	133	232	233	240	239	241	249	245	248	255	265	262	255	256											270	267	269	273																					
E11	159	205	220	223	227	222	236	231	217	220	240	249	259	257	258											270	267	269	273																					
C11	83	92	110	177	210	180	201	169	169	179	240	260	262	254	255											270	267	269	273																					
G11	192	198	235	218	237	221	235	230	226	229	247	255	256	250	253	250										270	267	269	273																					
F05	111	108	136	166	208	207	204	221	201	212	227	239	235	246	247	249	225	229								270	267	269	273																					
B11	226	205	228	221	247	242	244	231	183	221	253	255	254	259	250	248	244	243								270	267	269	273																					
G04	86	86	139	141	157	169	181	155	183	169	245	253	256	260	247	254	196	202	204	216	218	191	194	232	234	237	239	243	250	230																				
C08	48	54	101	108	154	124	175	164	144	166	243	244	248	253	245	247	198	214	222	217	223	218	196	215	230	231	224	229	220																					
D05	86	63	138	145	167	181	192	185	194	186	244	248	252	257	243	249	201	213	222	219	227	212	211	217	222	227	230	227	230																					
B01	53	53	74	97	124	105	186	140	133	158	247	249	242	250	243	243	154	181	196	175	185	167	213	213	162	216	238	222	230																					
F06	123	99	170	184	220	180	221	219	207	218	239	245	241	242	240	239	195	202	202	151	171	236	229	230	247	227	214	244	249																					
E05	64	72	104	138	159	159	172	159	162	162	243	246	249	256	239	249	200	209	222	220	228	223	196	204	202	238	220	232	233																					
H08	75	75	77	117	157	127	176	158	145	163	242	247	250	256	239	249	188	201	210	205	213	224	185	206	210	221	222	214	220																					
G08	76	68	115	145	164	171	170	172	185	171	243	245	249	255	239	249	205	211	225	213	230	222	196	197	195	238	225	234	234																					
G07	74	59	99	121	150	152	169	161	171	164	242	250	250	253	239	251	192	198	210	202	212	202	191	197	199	232	220	224	229																					
E02	104	80	78	138	158	163	186	155	173	162	245	241	235	250	238	242	186	185	209	184	197	187	188	185	182	217	213	221	224																					
F07	65	65	107	138	189	158	186	164	202	182	240	241	243	246	235	238	218	235	234	231	233	235	226	225	235	247	241	247	249																					
A02	108	92	183	171	169	179	197	206	196	204	249	242	246	242	232	239	160	169	162	173	179	218	220	219	226	203	220	203	209																					
F02	120	105	129	174	202	195	204	228	203	217	217	214	216	222	230	230	169	174	197	176	181	217	225	212	221	219	227	213	213																					
G06	88	102	136	140	162	172	186	182	184	178	236	240	237	240	229	239	159	178	188	184	191	202	197	202	206	217	207	213	216																					
F09	44	47	85	82	131	95	131	115	123	112	232	241	241	242	229	237	173	188	204	189	203	234	158	178	189	223	208	219	225																					
D01	119	111	160	161	164	174	185	141	173	155	225	224	234	241	229	232	183	181	180	174	177	170	163	166	202	188	193	192	190																					
E09	198	170	162	213	217	223	225	232	232	231	234	243	243	243	225	234	227	225	229	228	228	237	234	236	241	241	237	241	242																					
C04	137	131	182	188	182	192	194	210	209	201	207	217	219	229	224	213	188	189	192	193	191	219	199	201	209	201	207	201	203																					
B12	82	76	87	93	145	134	76	89	100	81	232	219	219	218	222	228	136	165	201	156	183	82	113	118	157	138	197	201	183																					
F03	114	134	139	191	209	209	220	227	219	219	223	225	233	237	229	230	210	217	220	217	223	233	227	230	238	229	233	230	229																					
C09	77	67	66	111	121	133	141	115	137	128	214	213	225	238	219	229	151	160	173	165	179	159	150	170	177	180	176	178	196																					
D02	132	89	135	141	150	158	189	189	125	163	220	214	201	181	212	220	176	176	176	169	178	171	198	193	211	193	207	191	193																					
G09	63	54	67	108	124	127	140	119	133	131	207	212	217	225	211	220	169	173	182	174	189	166	152	165	159	193	189	140	71																					
E03	72	40	72	115	119	143	111	141	134	123	214	212	206	214	202	202	127	141	152	144	159	203	150	159	129	218	173	213	218																					
F04	189	116	179	190	188	199	174	222	202	200	186	218	197	197	204	211	155	158	156	156	156	220	197	199	192	210	193	213	218																					
C02	87	80	141	150	169	180	181	185	183	186	200	186	200	213	202	190	198	199	190	187	190	199	205	208	192	196	214	204	205																					
C07	54	49	116	150	176	163	177	186	178	187	183	194	191	209	206	190	169	170	164	179	174	188	191	196	188	181	183	188	198																					
B07	48	54	97	91	113	114	150	140	128	138	208	206	205	215	206	196	116	135	127	151	160	165	164	177	170	179	185	158	158																					
H11	156	210	103	132	181	171	204	172	179	172	188	181	202	203	206	182	197	209	205	236	228	157	173																											

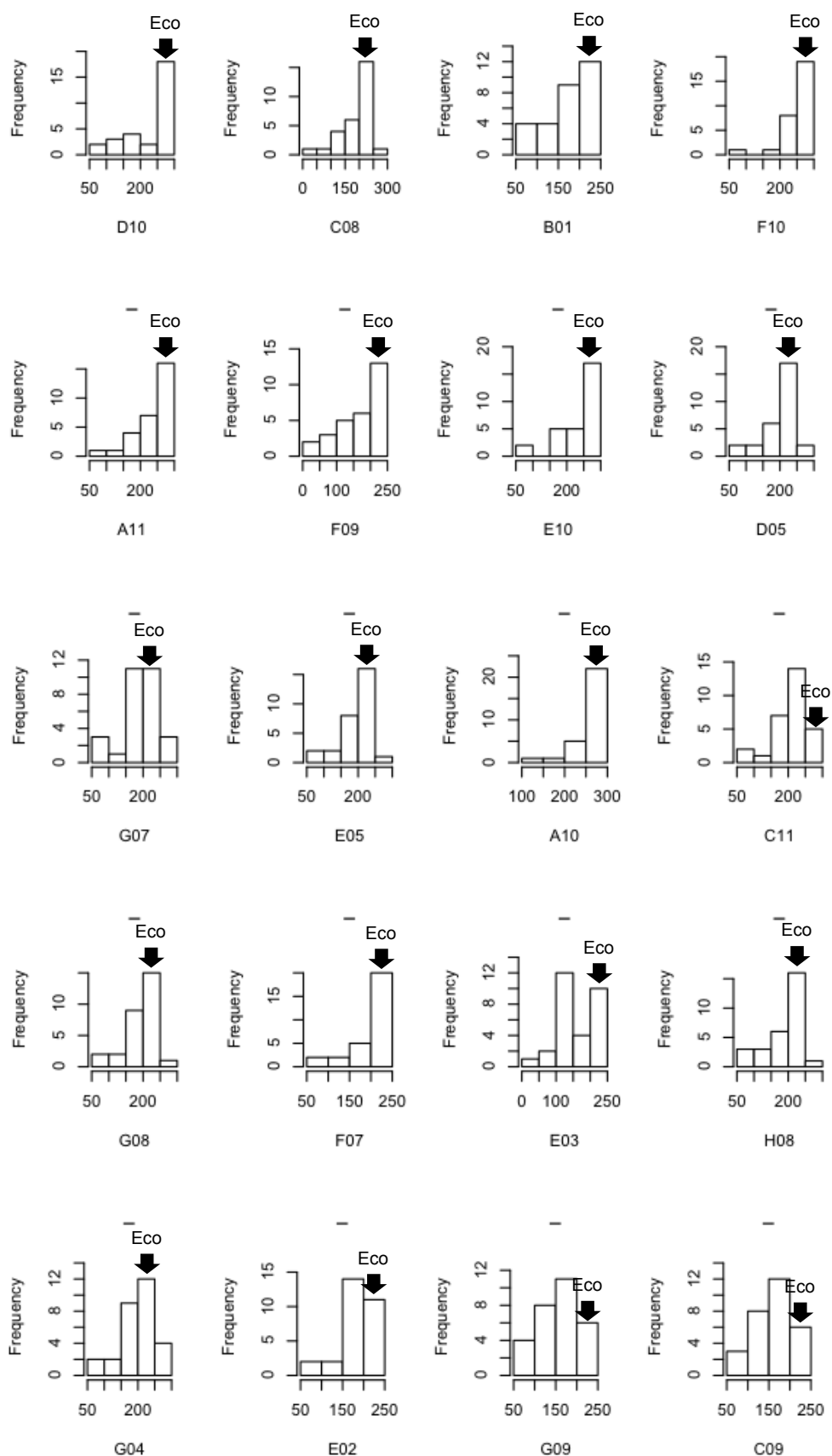


図9 Eco株とのA値の差が150以上の試験項目の29種のKT105株のA値の分布

Eco株のA値との差が大きい(150以上)試験項目20種 D10 (Troleandomycin)、C08 (L-Rhamnose)、B01 (D-Raffinose)、F10 (Vancomycin)、A11 (pH6)、F09 (Gluconic Acid)、E10 (Lincomycin)、D05 (Glycerol)、G07 (D-Malic Acid)、E05 (L-Aspartic Acid)、A10 (POS1)、C11 (Fusidic Acid)、G08 (L-Malic Acid)、F07 (Mucic Acid)、E03 (L-Alanine)、H08 (Acetic Acid)「G04 (L-Lactic Acid)、E02 (Glycyl-L-Proline)、G09 (Bromo-Succinic Acid)、C09 (Inosine) に関し、各株のA値の分布をR、psychパッケージ<sup>5</sup>のmulti.hist関数にてヒストグラムとして示した。横軸はA値を示し、1目盛りは50である。

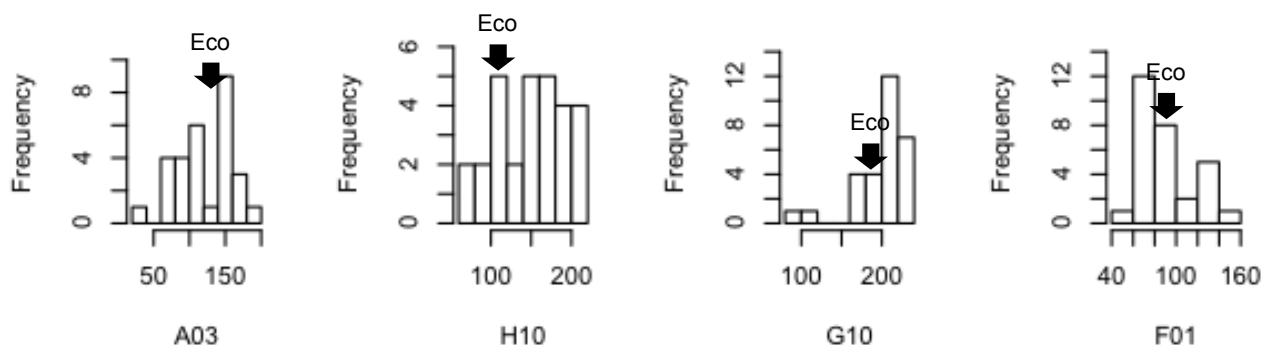


図 10 Eco 株よりも A 値が 50 以上高い株が存在する試験項目の各 KT105 株の A 値の分布

A 値が Eco 株よりも 50 以上高い場合が記録された 4 つの試験項目 A03 (D-Maltose)、H10 (Aztreonam)、G10 (Nalidixic Acid)、F01 (Pectin) について、各株における A 値の分布を、R、psych パッケージ<sup>5</sup>の multi.hist 関数にてヒストグラムとして示した。横軸は A 値を示し、1 目盛りは 50 である。

### 3-4. 主成分分析

ここでは、16S rRNA 遺伝子の置換により、大腸菌の表現型がどのように発散するのか、どのような試験項目に対しどのような変化を起こしているのかを具体的に検証するため、表現型の変化が特異的な 3-3 で抽出した試験項目を、試験の性質（ストレス応答試験・糖代謝試験・アミノ酸代謝試験）別に主成分分析をおこなった。

#### 3-4-1. ストレス応答

主成分分析の対象の試験項目は、29 種の KT105 株の G10 (Nalidixic Acid)、H10 (Aztreonam)、E10 (Lincomycin)、D10 (Troleandomycin)、F10 (Vancomycin)、A11 (pH6) における PM 結果 (A 値)、および「増殖倍化時間」、「16S<sup>Eco</sup> との配列相同性」とした。主成分分析の結果、主成分は第 1 主成分 (PC1) から第 8 主成分 (PC8) まで出現した。8 つの主成分に対する累積寄与率は PC3 で 1 を切り、PC2 までで約 8 割に達している。つまり、PC1 と PC2 で全体の情報量の約 8 割を説明できることを意味する (図 11B)。

そこで、PC1 と PC2 の情報を用いた分析結果を図 11A に示した。PC1 および PC2 の軸の意味は、図 11A における赤矢印と図 11CD の因子負荷量から読み取れる。赤矢印の方向は、対応する試験項目が寄与する方向であり、その矢印の長さは寄与度の大小を示している。図 11CD は、1 および -1 に近いものほど、その方向に大きく寄与していることを示しており、図 11A の赤矢印の意味を異なる手法で表現したものである。図 11A の重心を中心に、PC1 軸および PC2 軸に垂直に分断し、29 種の株それぞれのストレス応答の特徴づけをした。

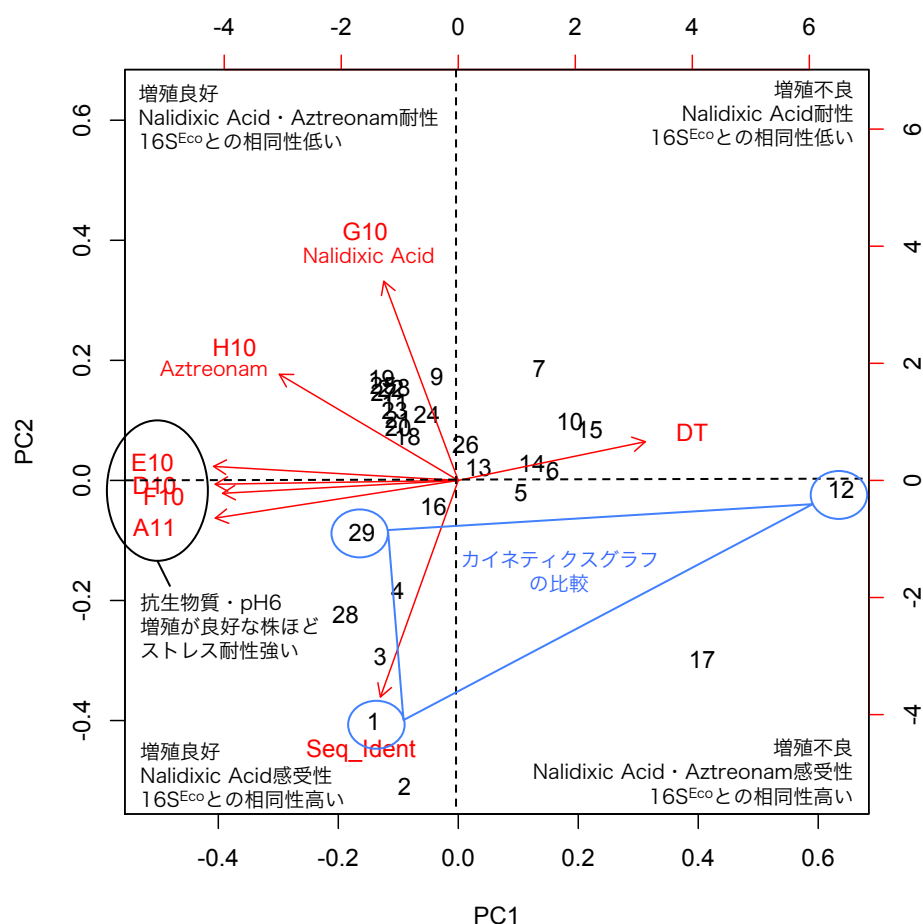
**PC1 軸 (横軸)** まず、PC1 軸について考えていく。右方向に伸びている矢印は「DT (Doubling Time)」で、それに真反対方向に伸びる矢印は、E10 (Lincomycin)、D10 (Troleandomycin)、F10 (Vancomycin)、A11 (pH6) である (図 11A)。このことから、重心より右側は、増殖倍化時間が大きく (増殖不良)、前述の 3 種の抗生物質と pH6 に関する試験において A 値が低い (= 抗生物質と pH6 への感受性が高い) と言える。重心より左側は、その逆の特徴となる。それゆえ、図 11A の右端に位置する NS14 株 (12) は、増殖倍化時

間が大きく（増殖不良）、前述の3種の抗生物質に感受性が高く、pH6に対するストレス応答が他の29種の株よりも低いと言える。一方、左側に位置する45HK株（29）においては、NS14株とは逆の特徴を持つと言える。

**PC2 軸（縦軸）** 下向きに伸びている矢印は「Seq Ident (16S<sup>Eco</sup>との配列相同性)」に関するもので、上方向に伸びているものはG10 (Nalidixic Acid) である（図11A）。このことから、重心より上側は、16S<sup>Eco</sup>との配列相同性が低いもの、かつ、Nalidixic Acid 耐性が強いものであり、重心より下側は、その逆の特徴を持つものであると言える。それゆえ、重心より上に位置するNS7株（9）は、Nalidixic Acid 耐性が強く、16S<sup>Eco</sup>との配列相同性が低く、重心より下に位置するBH1株（2）は、逆に、Nalidixic Acid に感受性が高く、16S<sup>Eco</sup>との配列相同性が高い。

**軸に斜めに関わる試験** H10 (Aztreonam) の矢印は、上斜め左に向いている（図11A）。つまり、重心より左上に位置すれば、Aztreonam 耐性が強く、逆に右下であれば、耐性が弱いということが言える。そのため、Aztreonam の矢印が示す方向の反対側に位置するHK2株（17）は、Aztreonam に感受性が高いと言える。

(A)



Clone No	KT105株
1	Eco
2	BH1
3	BH2
4	BH6
5	NS3
6	NS4
7	NS5
8	NS6
9	NS7
10	NS10
11	NS11
12	NS14
13	NS16
14	NS19
15	NS20
16	HK1
17	HK2
18	HK3
19	HK5
20	HK7
21	HK9
22	HK10
23	HK11
24	HK16
25	HK19
26	HK20
27	HK21
28	45BH
29	45HK

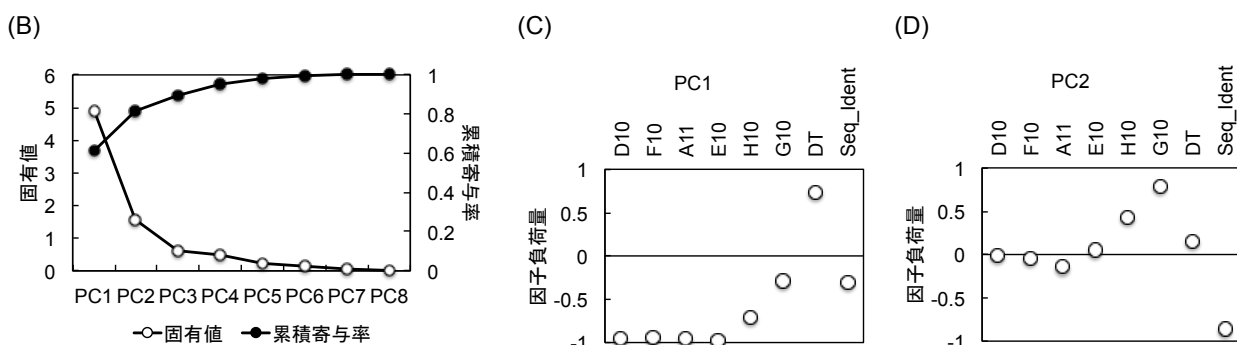


図 11 ストレス応答に関する主成分分析

29 種の KT105 株 (表) の G10 (Nalidixic Acid)、H10 (Aztreonam)、E10 (Lincomycin)、D10 (Troleandomycin)、F10 (Vancomycin)、A11 (pH6) における PM 解析結果 (A 値)、および「増殖倍化時間」、「16S<sup>Eco</sup> との配列相同性」を利用し、主成分分析をおこなった。第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) の結果を (A) に示した。1 から 29 までの数字は、29 種の株 (表) を示している。また、8 つの主成分の固有値と累積寄与率を (B) に示した。そして、PC1 の因子負荷量を (C) に PC2 の因子負荷量を (D) に示した。

**Eco 株との比較** Eco 株 (1) は、左下に位置する (図 11A)。増殖が良好で、かつ Nalidixic Acid に感受性が高いという特徴が認められた。

Eco 株と同じ左下の区画に位置する株は、階層的クラスタリング分析 (4-2) により Eco 株と同じクラスター C に帰属される、BH1 株、BH2 株、BH6 株、45BH 株、45HK 株が含まれていることが確認された。その他、HK1 株も認められた。その他の株の多くが左上の区画に位置し、次に右上の区画が多く、右下の区画は少数であった。

このことから、16S rRNA 遺伝子の置換は、「ストレス応答」に関し、多くの場合が Nalidixic Acid に耐性を持つ ([上] に共通) になることが判明した。また、BH6 株と HK2 株については、GENIII MicroPlate<sup>TM</sup> の全試験をまとめて評価した場合は類似しないことも多かったが、「ストレス応答」に関しては、Eco 株らと類似する表現型を示すことが分かった。また、図 11A 上の株間の距離はいずれの場合も近接している訳ではなく、その特徴の程度の差が認められた。

**Nalidixic Acid 耐性の獲得** 変異株の半数以上が、Eco 株よりも Nalidixic Acid 耐性が高いことが判明した (図 10)。Nalidixic Acid はキノロン系の抗生物質であり、2 本鎖 DNA が DNA ジャイレースによって切断された切断面に結合し、DNA 鎖の再結合を阻害することにより、DNA 複製を阻害する<sup>9-11</sup>。Nalidixic Acid は耐性菌の出現率が高いことでも知られ、ゲノムの変異率の推定に Nalidixic Acid 耐性の獲得率を指標とすることもある<sup>12</sup>。

Nalidixic Acid 耐性の獲得機構は、直接のターゲットとなる DNA ジャイレースの変異のみならず膜透過性の変化 (Nalidixic Acid の取り込みの低下や排出系の亢進) もある<sup>13-15</sup>。16S rRNA 遺伝子の置換が、Nalidixic Acid の耐性に直接影響したとは考え難く、リボソームの機能改変によって細胞システムが変動し、膜透過性が変化したのではないかと予想される。

**類似する表現型を持つ集団** 図 11A において、左上の区画に位置する株は、互いの距離が近接していた。29 種の KT105 株中 13 の株が左上の区画に含まれる。これらのことから、16S rRNA 遺伝子の置換によって獲得された KT105 株の 2/5 程度が「ストレス応答」に関し、同様の表現型を獲得したことが分かった。

**特異な表現型を持つ株** HK2 株 (17) は、図 11A において、他のどの株とも距離が離れており (右下に位置)、“ストレス応答”に関し特徴的な表現型を示すことが示唆された。前述の通り、特に他の株に比べ Aztreonam に感受性が高いことが言える。

**カイネティクスグラフの比較による詳細解析** 主成分分析では、解析・解釈の簡素化のため、各株における繰り返し実験の平均値を用いた。しかし、前述のように、A 値にはある程度の誤差が認められるため、特定の株の表現型の詳細な議論をする場では、繰り返し実験におけるデータのぶれを今一度確認することが重要であるとする。そこで、ストレス応答に関して、Eco 株 (1) と特徴が異なる株、45HK 株 (29) と NS14 株 (12) において (図 11A、青線)、カイネティクスデータを、誤差棒付きのグラフで比較した。

繰り返し実験のデータに基づく誤差棒付きのカイネティクスグラフ E10 において、45HK 株の曲線は、Eco 株の曲線と重なり、誤差も小さいことが確認された (図 12)。D10、F10、A11 についても、誤差は小さく、A 値がほぼ一致し、図 23A の結果を支持する結果であった。ただし、曲線の傾き ( $\mu$  値に関連) に注目すると、45HK 株の場合は Eco 株に比べ、緩やかであることが確認され、 $\mu$  値を利用した主成分分析では結果が多少変動することが予想された (図 12)。

一方、G10 および H10 においては、45HK 株が Eco 株よりも A 値が高かった (図 12)。カイネティクスグラフから、それらの試験項目に関し、45HK 株も Eco 株も誤差が比較的大きかったが、それでも 45HK 株の A 値が Eco 株よりも高いことを確認することができた (図 12)。NS14 株については、G10 以外の A 値が Eco 株に比べ大きく低いことが、カイネティクスグラフからも確認することができた (図 12)。これらのカイネティクスグラフによる比較結果は、すべて主成分分析の結果 (図 11A) を支持するものであることが確認できた。

### 3-4-2. 糖代謝

“ストレス応答”と同様に、解析をおこなった。主成分は 5 つであり、PC2 の固有値は 1 に近く、その累積寄与率は 8 割程度であることを確認した (図 13B)。よって、PC1 と PC2 による主成分分析の結果を図 13A に示した。

**PC1 軸 (横軸)** 左方向に伸びている矢印は B01 (D-Raffinose) および C08 (L-Rhamnose) である (図 13A)。このことから、重心より左側は、D-Raffinose と L-Rhamnose の代謝活性が高く、右側はそれらの代謝活性が低いと言える。

**PC2 軸 (縦軸)** 下向きに伸びている矢印は A03 (D-Maltose) である (図 13A)。このことから、重心より上側は、D-Maltose 代謝活性が低く、下側はそれが高いと言える。



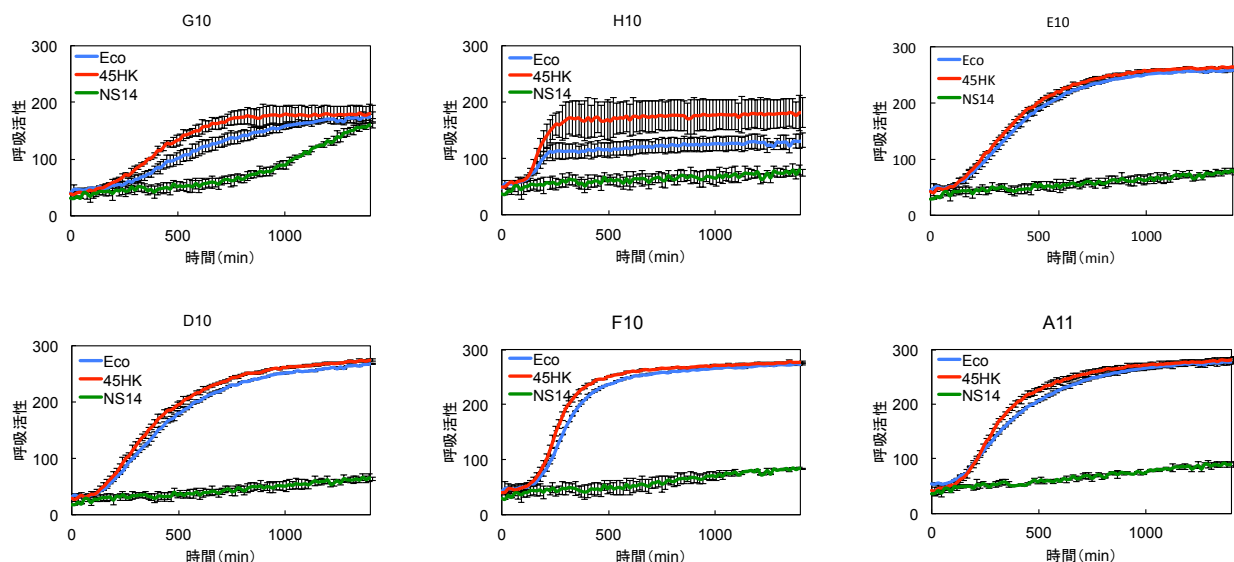


図 12 カイネティクスグラフの比較

45HK 株、NS14 株および Eco 株の G10 (Nalidixic Acid)、H10 (Aztreonam)、E10 (Lincomycin)、D10 (Troleandomycin)、F10 (Vancomycin)、A11 (pH6) における PM 解析での呈色強度のリアルタイム測定結果を示した。誤差棒は、繰り返し実験 3 回分である。

**軸に斜めに関わる試験** 「Seq\_Ident (16S<sup>Eco</sup> との配列相同性)」の矢印は左斜め上の方向を指している (図 13A)。それゆえ、左上の区画は、16S<sup>Eco</sup> との配列相同性が高く、逆に右下の区画は、16S<sup>Eco</sup> との配列相同性が低いことを意味している。「DT (増殖倍化時間)」の矢印は、右斜め上の方向を指している (図 13A)。それゆえ、右上の区画は、増殖倍化時間が大きく (増殖不良)、逆に左下の区画は、増殖倍化時間が小さい (増殖良好) ことを意味している。

**Eco 株との比較** Eco 株 (1) は、左上に位置する (図 13A)。つまり、Eco 株は 29 種の KT105 株の中で、当然 16S<sup>Eco</sup> との配列相同性が高く (100%)、D-Rafinose および L-Rhamnose の代謝活性が高く、D-Maltose の代謝活性が低いという特徴が認められた。

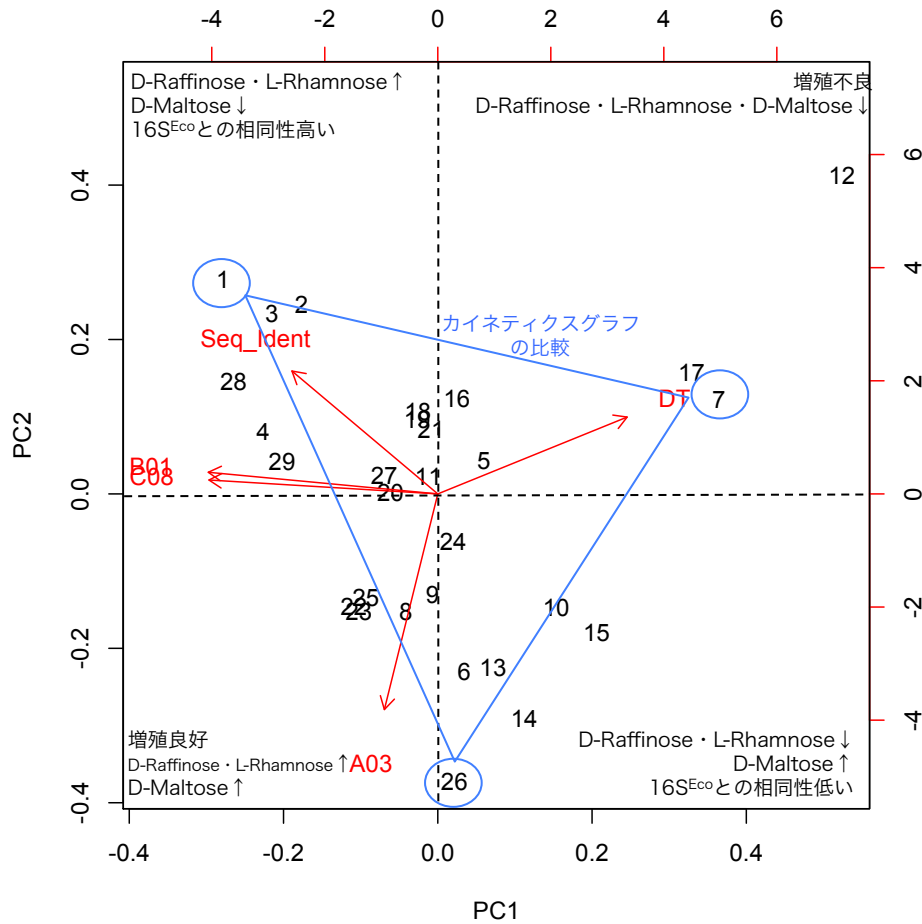
Eco 株と同じ左下の区画に位置する株は、階層的クラスタリング分析で Eco 株と同じクラスター C に帰属される BH1 株、BH2 株、BH6 株、45BH 株、45HK 株が含まれていることが確認された。”ストレス応答”に比べ”糖代謝”は、主成分分析の結果が一局に集中しておらず、各株がバラけていた。

このことから、16S rRNA 遺伝子の置換は、”糖代謝”に関する表現型を多様に変化させることが示唆された。

**カイネティクスグラフの比較による詳細解析** “糖代謝”の表現型が特異的な NS5 株 (7) および HK20 (26) について、”糖代謝”に重要な試験におけるカイネティクスグラフを Eco 株 (1) のものと比較した。これによって、図 13A 上では不明瞭であった、表現型の差の程度を詳細に検証可能となる。

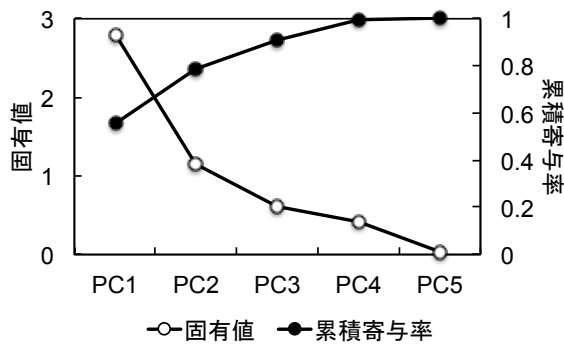
3 つの株のカイネティクスグラフの重ね合わせの結果、B01 と C08 においては、A 値だけでなく、傾き (mu 値) および面積 (integral 値) においても明らかに、Eco 株、HK20 株、NS5 株の順に値が低いことが確認された (図 14)。これは図 13A の主成分分析の結果と一致する。また、繰り返し実験による誤差も小さく、再現性が高いことも確認できた (図 14)。

(A)

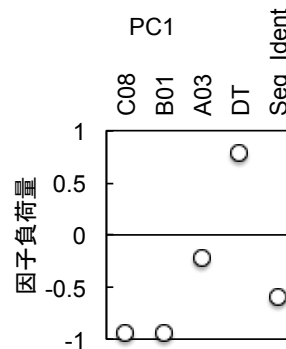


Clone No	KT105株
1	Eco
2	BH1
3	BH2
4	BH6
5	NS3
6	NS4
7	NS5
8	NS6
9	NS7
10	NS10
11	NS11
12	NS14
13	NS16
14	NS19
15	NS20
16	HK1
17	HK2
18	HK3
19	HK5
20	HK7
21	HK9
22	HK10
23	HK11
24	HK16
25	HK19
26	HK20
27	HK21
28	45BH
29	45HK

(B)



(C)



(D)

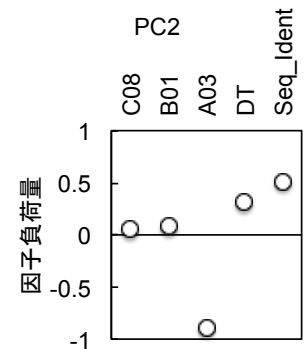


図 13 糖代謝に関する主成分分析

29種のKT105株(表)のA03(D-Maltose)、B01(D-Raffinose)、C08(L-Rhamnose)におけるPM解析結果(A値)、および「増殖倍化時間」、「16S<sup>Eco</sup>との配列相同性」を利用し、主成分分析をおこなった。第1主成分(PC1)と第2主成分(PC2)の結果を(A)に示した。1から29までの数字は、29種の株(右表)を示している。また、5つの主成分の固有値と累積寄与率を(B)に示した。そして、PC1の因子負荷量を(C)にPC2の因子負荷量を(D)に示した。

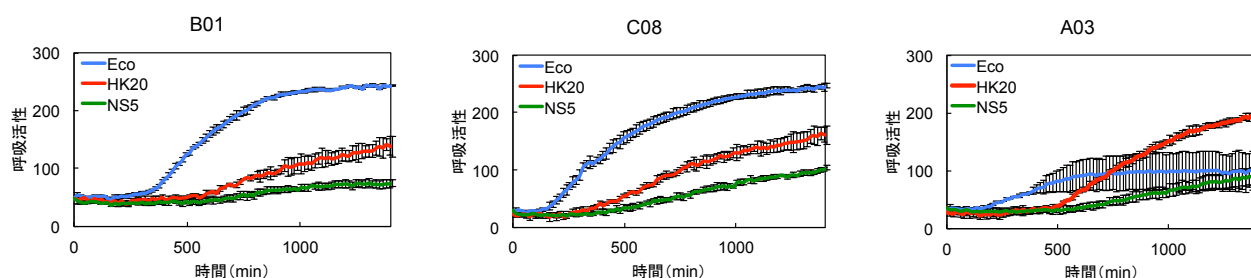


図 14 カイネティクスグラフの比較

HK20 株、NS5 株および Eco 株の A03 (D-Maltose)、B01 (D-Raffinose)、C08 (L-Rhamnose) における PM 解析での呈色強度のリアルタイム測定結果を示した。誤差棒は、繰り返し実験 3 回分である。

A03 においては、Eco 株の誤差がやや目立った (図 14)。しかし、その誤差を考慮しても、HK20 株は Eco 株よりも明らかに活性が高いことが確認された。また、A03 において A 値だけで判断すれば、Eco 株は NS5 株と同等である (図 14)。しかし、Eco 株の立ち上がりの長さ (ラグ:  $\lambda$ ) は、NS5 株だけでなく HK20 株と比較しても短かった (図 14)。PM 解析のデータだけでは、この結果を解釈すること難しく、今後、A03 の D-Maltose を混合した培地による増殖比較など、様々な視点から検証していく必要がある。

### 3-4-3. アミノ酸代謝

“ストレス応答”や“糖代謝”と同様に、解析をおこなった。主成分は 6 つであり、PC2 の固有値は 1 を切り、その累積寄与率は 8 割を超えることを確認した (図 15B)。よって、PC1 と PC2 による主成分分析の結果を図 15A に示した。

**PC1 軸(横軸)** 左方向に伸びている矢印は E05(L-Aspartic Acid)、E03(L-Alanine)、E02(Glycyl-L-Proline) であり、逆(右)方向に伸びている矢印は「DT (増殖倍化時間)」である (図 15A)。このことから、重心より左側は、L-Aspartic Acid、L-Alanine、Glycyl-L-Proline の代謝活性が高く、増殖倍化時間が小さい (増殖良好) であり、右側はそれらの逆の特徴があると言える。

**PC2 軸(縦軸)** 縦方向に寄与する矢印はないため、斜めを向いている矢印から意味を捉える必要がある。

**軸に斜めに関わる試験** E06 (L-Glutamic Acid) の矢印は左斜め上の方を指している (図 15A)。それゆえ、左上の区画は、L-Glutamic Acid の代謝活性が高く、逆に右下の区画は、それが低いことを意味している。「Seq\_Ident (16S<sup>Eco</sup> との配列相同性)」の矢印は、左斜め下の方を指している (図 15A)。それゆえ、左下の区画は、16S<sup>Eco</sup> との配列相同性が高く、逆に右上の区画は、16S<sup>Eco</sup> との配列相同性が低いことを意味している。

**アミノ酸の代謝活性と増殖倍化時間の関係** 検証に用いた 4 種のアミノ酸の代謝活性低いほど、増殖倍化時間が大きい (増殖不良) であることが認められた (図 15A)。

**Eco 株の位置** Eco 株 (1) は、左下に位置する (図 15A)。つまり、Eco 株は 29 種の KT105 株の中で、当然 16S<sup>Eco</sup> との配列相同性が高く (100%)、比較的 L-Aspartic Acid、L-Alanine、Glycyl-L-Proline の代謝活性が高こと認められた。Eco 株と同じ左下の区画に位置する株は、いくつか確認されたが、いずれも Eco 株との距離は離れていた (図 15A)。このことから、置換に用いた 16S rRNA 遺伝子の種類が、大腸菌に近縁なものであっても、“アミノ酸代謝”における表現型には変化が生じることが分かった。

**類似する表現型を持つ集団** 図 15A において、多くの KT105 株が重心の少し上に集中しており、かつ、E06 (L-Glutamic Acid) の矢印に平行に広がっていた。つまり、16S rRNA 遺伝子の置換によって生じた変異株の大半において、L-Glutamic Acid の代謝活性に違いが生じた。また、L-Aspartic Acid、L-Alanine、Glycyl-L-Proline においても、大半の変異株間で違いが認められた。

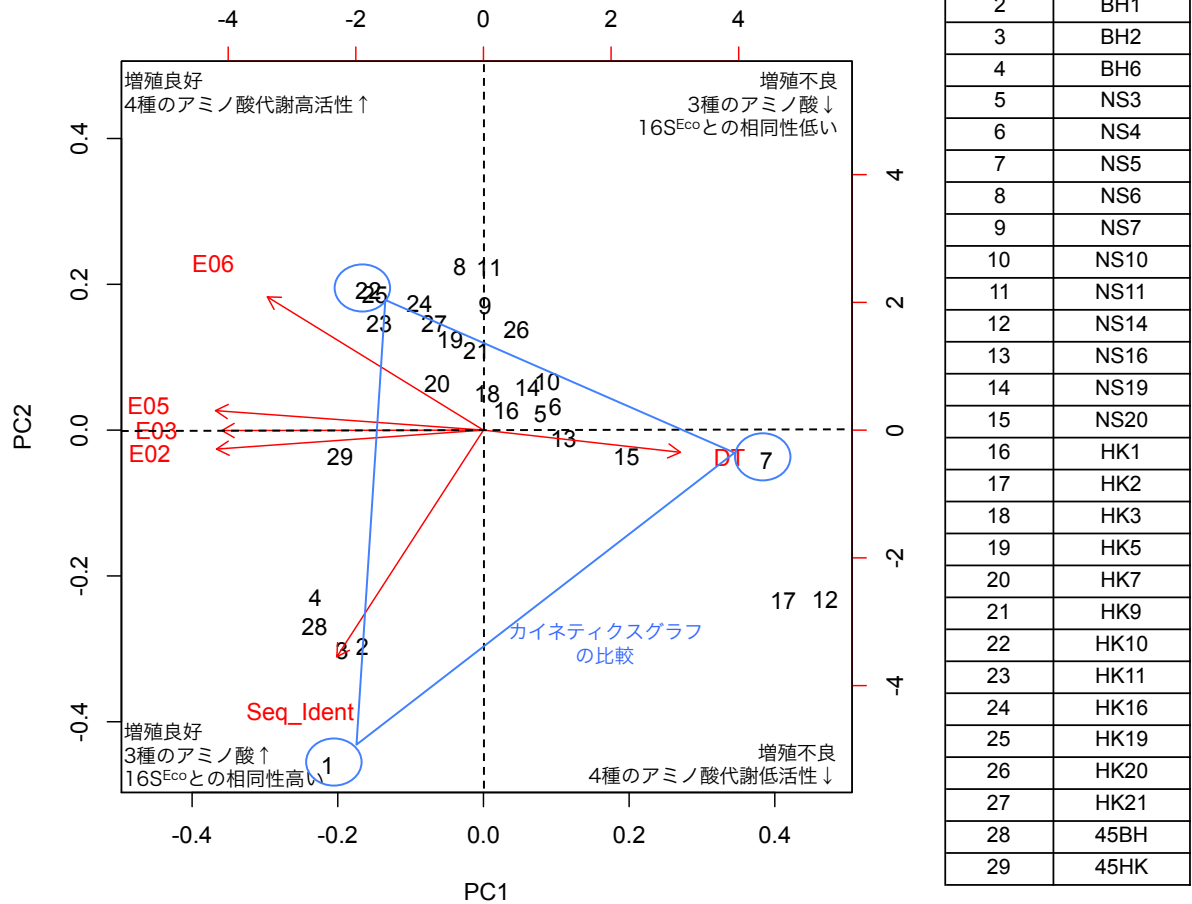
**特異な表現型を持つ株** HK2 株 (17) および NS14 株 (12) は、図 27A において互いに近接しており、他の株との距離は遠かった (図 15A)。それゆえ、“アミノ酸代謝”においては、これらの 2 つの株は特徴的な表現型を示すことが分かった。軸の意味から、これらは、増殖不良であり、分析に用いた 4 種すべてのアミノ酸の代謝活性が低いことが分かった。

**カイネティクスグラフの比較による詳細解析** “アミノ酸代謝”の表現型が特異的な NS5 株 (7) および HK10 (22) について、“アミノ酸代謝”に重要な試験におけるカイネティクスグラフを Eco 株 (1) のものと比較した。その結果、E06 については、29 種の KT105 株の中で最も A 値が高かった HK10 株でさえ、200 に届いていない (図 16)。つまり、この試験は他の試験に比べ、A 値の違いが結果に影響しやすい。それゆえ、横軸 (PC1) の座標がほぼ一致する Eco 株 (1) と HK10 株 (22) において、縦軸 (PC2) は遠く離れているが、その差は他のものと比較的变化が小さかった。NS5 株については、Eco 株 (1) と HK10 株 (22) に対し、どのアミノ酸に対しても代謝活性が低かったことが確認された。

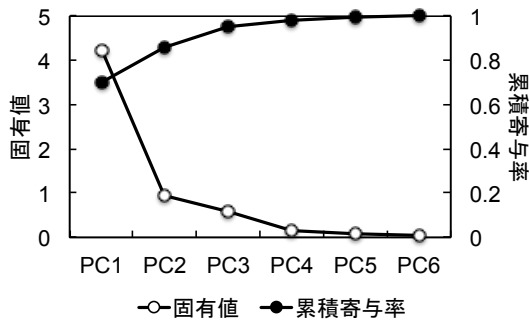
E06 については、前述の通り、図 15A で読み取れるほどの差が見られなかった。その他のアミノ酸に関しては、特に Eco 株に誤差がやや目立ったが、図 15A を支持する内容であった。

以上、GENIII MicroPlate™ の 96 の試験項目において、Eco 株の結果と大きく異なる結果が観察された試験項目を抽出し、“ストレス応答 (検証対象の試験項目数：6)”、“糖代謝 (検証対象の試験項目数：3)”、“アミノ酸代謝 (検証対象の試験項目数：4)”別に主成分分析をおこなった。“ストレス応答”については、変異株の半数以上が、Eco 株よりも Nalidixic Acid 耐性が高いことが判明した (図 10)。《糖代謝》については、いくつかの変異株において、特に、D-Maltose の代謝活性が Eco 株よりも向上したことが確認された (図 10)。このことは、16S rRNA 遺伝子の置換によって、本来 Eco 株が持っている機能をさらに高めた例であると言える。《アミノ酸代謝》については、検証に用いた 4 種のアミノ酸の代謝活性低いほど、増殖倍化時間が大きい (増殖不良) であることが認められた (図 15A)。以上、主成分分析では、29 種の KT105 株のいくつかの試験項目に関する結果の関連性を確認することができた。それにより、16S rRNA 遺伝子の置換がもたらす大腸菌の表現型の変化を簡潔に評価することができた。

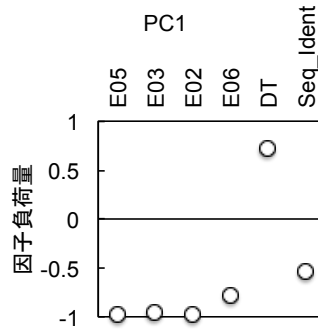
(A)



(B)



(C)



(D)

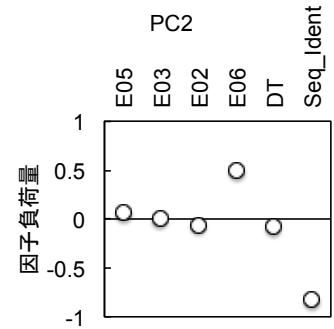


図 15 アミノ酸代謝に関する主成分分析

29 種の KT105 株 (表) の E05 (L-Aspartic Acid)、E03 (L-Alanine)、E02 (Glycyl-L-Proline)、E06 (L-Glutamic Acid) における PM 解析結果 (A 値)、および「増殖倍化時間」、「16S<sup>Eco</sup>との配列相同性」を利用し、主成分分析をおこなった。第 1 主成分 (PC1) と第 2 主成分 (PC2) の結果を (A) に示した。1 から 29 までの数字は、29 種の株 (表) を示している。また、5 つの主成分の固有値と累積寄与率を (B) に示した。そして、PC1 の因子負荷量を (C) に PC2 の因子負荷量を (D) に示した。

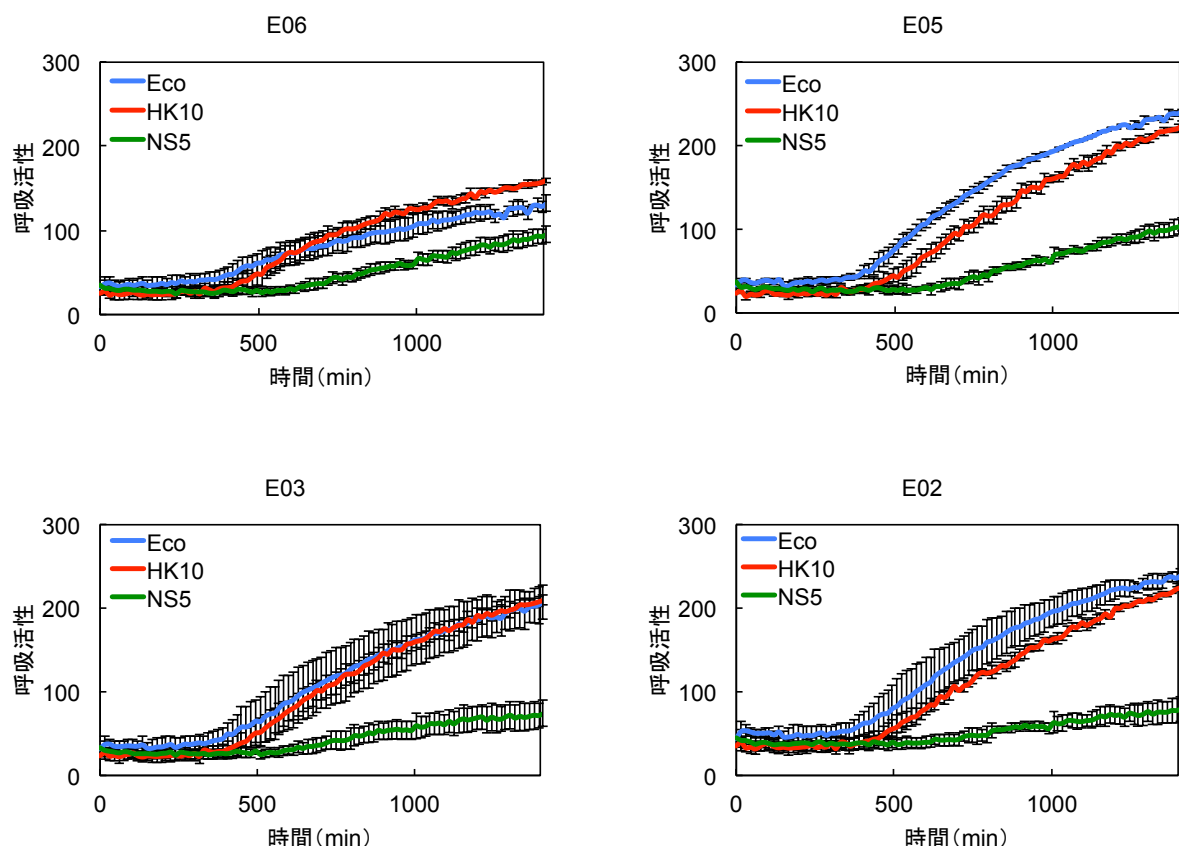


図 16 カイネティクスグラフの比較

HK20 株、NS5 株および Eco 株の E05 (L-Aspartic Acid)、E03 (L-Alanine)、E02 (Glycyl-L-Proline)、E06 (L-Glutamic Acid) における PM 解析での呈色強度のリアルタイム測定結果を示した。誤差棒は、繰り返し実験 3 回分である。

#### 4. おわりに

RINSPEX 法によって創成された大腸菌変異株の表現型を、PM 解析により評価した。階層的クラスタリング分析結果と機能性 16S rRNA 遺伝子の進化系統関係の関連性の検証から、大腸菌の近縁種由来の 16S rRNA 遺伝子が機能している KT105 株では、Eco 株と PM 解析結果が類似していることが確認された。一方、その他の KT105 株では、PM 解析結果と 16S rRNA 遺伝子の進化系統関係に関連は認められなかった。また、PM 解析結果と増殖倍化時間の関連に関する検証では、クラスターによっては増殖倍化時間が類似する場合も認められた。

Eco 株の結果の比較分析では、96 の試験項目中の Eco 株と結果が大きく異なる試験項目（特に、最大値[A 値]が 150 以上 Eco 株と異なる試験項目）が、20 項目あることが確認された。また、Eco 株よりも A 値が向上する株・試験項目の組合せもあり、A 値において 50 以上 Eco 株よりも高い試験項目を 4 項目抽出した。そのうちの 2 つは抗生物質 Nalidixic Acid と Aztreonam であった。この 2 つの抗生物質は、リボソームがターゲットであるわけではない。それゆえ、16S rRNA 遺伝子置換によるリボソームの機能改変が、細胞システムを変動させたことが起因していると考えられる。

すなわち、本章では、16S rRNA 遺伝子置換が、確かに大腸菌の表現型を変化させ、これまで大腸菌が有していなかった機能を獲得する、または隠れていた機能を顕在化させることができることが示された。

## 《引用文献》

1. 越智幸三, 田中幸徳, 笠原堅. 「リポゾーム工学」とその活用—新たな育種技術の構築に向けて—. (2014) 生物工学会誌. **92**, 612-616.
2. Kahm, M., Hasenbrink, G., Lichtenberg-Frate, H., Ludwig, J., Kschischo, M. (2010) grofit: Fitting Biological Growth Curves with R. *J. Stat. Softw.* **33**, 1-21.
3. Gregory, R., Bolker, W., Bonebakker, L., Gentleman, R., Huber, W., Liaw, A., Lumley, T., Maechler, M., Magnusson, A., Moeller, S., Schwartz, M., Venables, B. (2015). gplots: Various R Programming Tools for Plotting. Data. R package version 2.17.0. <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>
4. Adler, D., Murdoch, D., and others (2014). rgl: 3D visualization device system (OpenGL). R package version 0.95.1201. <http://CRAN.R-project.org/package=rgl>
5. Revelle, W. (2015) psych: Procedures for Personality and Psychological Research, Northwestern University, Evanston, Illinois, USA, <http://CRAN.R-project.org/package=psych> Version = 1.5.8.
6. Becker, R.A., Chambers, J.M., Wilks, A.R. (1988) The New S Language. Wadsworth & Brooks/Cole.
7. Mardia, K.V., Kent, J.T., Bibby, J.M. (1979) Multivariate Analysis, London: Academic Press.
8. Venables, W.N. and Ripley, B.D. (2002) Modern Applied Statistics with S, Springer-Verlag.
9. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., Itoh, T., Tomizawa, J.I. (1977) Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4772-4776.
10. Sugino, A., Peebles, C.L., Kreuzer, K.N., Cozzarelli, N.R. (1977) Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nalA gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4767-4771.
11. Shen, L.L., Mitscher, L.A., Sharma, P.N., O'Donnell, T.J., Chu, D.W., Cooper, C.S., Rosen, T., Pernet, A. G. (1989) Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug—DNA binding model. *Biochemistry* **28**, 3886-3894.
12. Nakashima, N. and Tamura, T. (2009) Conditional gene silencing of multiple genes with antisense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **37**, e103.
13. Hirai, K., Aoyama, H., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S., Mitsuhashi, S. (1986) Isolation and characterization of norfloxacin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 248-253.
14. Hirai, K., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S., Mitsuhashi, S. (1987) Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 582-586.
15. Fukuda, H., Hosaka, M., Hirai, K., Iyobe, S. (1990) New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1757-1761.

# 終章

## 1. 本研究の成果

16S rRNA 遺伝子は「水平伝播しない遺伝子<sup>1)</sup>」の代表としてみなされ、「バクテリア進化系統分類の分子マーカー<sup>2)</sup>」として使用されてきた。一方、大腸菌を含む大半の生物種において、「類似するが完全に同一ではない」複数の 16S rRNA 遺伝子を有すること、さらには、いくつかの種間で 16S rRNA 遺伝子の全長あるいは部分的な水平伝播が報告されてきた<sup>3-9)</sup>。これら相反する知見に対し、私の研究室では、「リボソームは考えられてきた以上に柔軟なのではないか？」と考え、「16S rRNA 遺伝子の水平伝播」を模した実験を企画し、その結果、メタゲノム由来の大腸菌と同じプロテオバクテリア門のガンマプロテオバクテリア綱およびベータプロテオバクテリア綱の 16S rRNA 遺伝子が、大腸菌の 16S rRNA 遺伝子と置換可能であることを示した<sup>10)</sup>。

このような背景のもと、まず私は大腸菌の遺伝子欠損を相補する 16S rRNA の「限界」に興味を持ち、研究に取り組み始めた。しかし、実際に実験に取り掛かると、技術的な壁に当たった。その第一が、第 1 章に詳述した「スループットの壁」である。限界に挑戦するからには、ある程度の「数」をこなさなければならないはずだからである。そこで、本博士論文、第 1 章では、16S rRNA 遺伝子置換技術のスループットを向上させることを目的とした。具体的には、(1) 異種 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅により獲得する際のプライマーの改良、(2) 異種 16S rRNA 遺伝子の発現プラスミド pRB103 の薬剤耐性マーカーの変更、(3) スループットの限界を規定していたカウンターセクション工程の改善や、(4) 新規カウンターセクションシステムの開発をおこない、(1)から(3)でおこなった改良をすべて反映させ、大腸菌における 16S rRNA 遺伝子置換技術 “RINSPEX (Ribosomal RNA INterSPecies EXchange) 法” を確立した。

第 2 章では、RINSPEX 法に基づき、メタゲノムライブラリー由来の多種多様な 16S rRNA 遺伝子をスクリーニングし、4,000 クローン規模の大腸菌変異株ライブラリーを構築した。従来法ではカウンターセクションに供するクローン数がせいぜい 1 日 200 程度で、獲得される機能相補株もせいぜい 10 種類程度であったことを考えると大幅な飛躍であった。そして、機能性 16S rRNA 遺伝子の配列解析および変異株の生育観察から、RINSPEX 法による 16S rRNA の改変範囲を検証した。その結果、大腸菌とは門レベルで異なるアシドバクテリア門由来の 16S rRNA 遺伝子 (16S<sup>NS11</sup> および 16S<sup>NS5</sup>) でさえ置換可能であることが判明した。16S<sup>NS11</sup> は、大腸菌 16S rRNA 遺伝子 16S<sup>Eco</sup> に 78.4% の配列相同性を示し、334 箇所の相違部位 (変異部位) を有する。変異の大半は Hypervariable region<sup>11)</sup> に存在し、変異による 16S rRNA 内の大きな高次構造変化はないことも確認された。このように、RINSPEX 法により得られた機能性 16S rRNA 遺伝子の配列解析の結果から、配列自由度 —どの部位をどのように変えることができるか— について、多くの知見が得られた。

第 3 章では、16S<sup>NS11</sup> による置換変異株 NS11 株を対象にして、16S rRNA 遺伝子のキメラ解析 (16S<sup>NS11</sup> の各ドメインを 16S<sup>Eco</sup> 配列で置換)、それに引き続きキメラ解析で絞り込まれた 3' minor ドメインに関して



点変異解析をおこなった。ドメインキメラ解析と生化学解析（ショ糖密度勾配遠心、無細胞翻訳系による翻訳活性解析）を組合せることで、3' minor ドメインが 16S<sup>NS11</sup> によりもたらされるリボソーム機能低下の主要原因を担っていることを明らかにした。3' minor ドメインの点変異解析により、ヘリックス h44 内のわずか一つの塩基対（1416-1484）を大腸菌型に戻すことで大幅に回復し（倍化時間 42.7 min）、Eco 株（倍化時間 40.2 min）に匹敵するほどとなったことが明らかとなった。裏を返せば、16S<sup>NS11</sup> に存在する 300 余りの変異の大半は、リボソーム機能に大きな影響を及ぼさない（中立的）変異であることを意味した。第 2 章で得られた知見（リボソームが数百塩基も異なる 16S rRNA を受容可能であること）とともに、高い進化能を有していることを意味しているという、リボソームの進化を考える上で重要な知見を得た。

第 4 章では、RINSPEX 法によって創成された置換変異株 28 種と Eco 株に対し、リボソーム改変によりもたらされる細胞システムの変動、それにより現れる表現型の変化をフェノタイプマイクロアレイ解析により網羅的に解析した。16S rRNA 遺伝子の改変はリボソーム機能を変化させるはずである——単に「強い」「弱い」だけでなく、翻訳される鋳型の特異性なども含めて。このため、リボソームの機能変化は、細胞内のあらゆる遺伝子の翻訳変動を引き起こし、トランスクリプトーム、メタボロームなどの細胞内システムをがらりと変化させる可能性がある。私は、16S rRNA 遺伝子の改変により、この可能性を検証し、微生物育種の新しいアプローチとして確立できないかと考えた。細胞システムを変えることにより細胞の機能・性質を変化させる研究は、Stephanopolous らによる酵母 RNA ポリメラーゼを改変対象とした gTME<sup>12</sup> や、Ochi らによる休眠遺伝子の活性化による新規抗生物質の高生産<sup>13</sup> などでよく知られている。これらの研究は転写制御システムを改変した研究であったが、本研究は翻訳系を改変している点で異なる。アプローチの違いによる優劣を議論する段階にはないが、私の研究でもリボソーム中の 16S rRNA を変えることで多様な表現型が生まれることは確認された。その大半は（大半の変異株、大半の表現型検査項目）、Eco 株よりも代謝活性（糖やアミノ酸などに対する）が低下していたが、Azotreonam や Nalidixic Acid といった抗生物質に対しては、半数以上の変異株において耐性が向上していた。いずれにせよ、16S rRNA 遺伝子の置換が大腸菌の表現型を変化させることを証明したばかりでなく、形質の改良につながる可能性を示すことができた。「リボソーム改変に基づく大腸菌の育種」の可能性は十分に見込めると言える。

## 2. 今後の展望

細胞システムの変動を利用した宿主改良は、主に転写レベル（転写因子や RNA ポリメラーゼサブユニットの改変）により行われてきたが<sup>12-13</sup>、本研究で新たに「翻訳システム改変」という方法論を提起する。本研究によって、大腸菌 16S rRNA 遺伝子置換技術の大腸菌宿主創成への応用の下準備が整った。今後は、真に産業上有用な大腸菌宿主の創成を目指し、工学的な観点で発展させる必要がある。

第一に、置換に用いる 16S rRNA 遺伝子ライブラリーをメタゲノムソースの拡大することなどが考えられるが、単に多様化するのか、あるいはある系統群に絞った Focused Library を利用するのか？ こうした技術課題に対し、「ライブラリーの構築」と「機能評価」を繰り返しながら解答を見出し、方法論自体を進化させていく計画である。より具体的な要素技術としては、Focused Library の作成方法（プライマー設計、選択

培地での可培養細菌の集積等)、ドメインごとのライブラリー構築と機能スクリーニングなどが挙げられる。

より基礎的な研究についても新たな研究課題が多く見つかった。本論で見出された特徴的な変異株について、「なぜそのような振る舞いをするのか？」について明確な結論は得られていない。16S rRNA 遺伝子やリボソームの機能と表現型を関連づけることで、メカニズム解明を進めることも可能かもしれない。例えば、変異株の多くで確認された Nalidixic Acid 耐性獲得の原因の解明などは、細胞内のトランスクリプトーム解析などにより解決するかもしれない。膜脂質分析 (FAME) 等の生化学手段などによっても分子機構の解明を行える可能性がある。

本論の第 4 章で得られた膨大なデータには、まだ私たちが知らない細胞内システムが多く包含されているはずである。16S rRNA 遺伝子の改変を起点に誘起される細胞内システムの変動の分子機構を解明することにより、より合理的な表現型デザインも可能になるかもしれない。

#### 《引用文献》

1. Jain, R., Rivera, M.C. and Lake, J.A. (1999) Horizontal gene transfer among genomes: The complexity hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3801-3806.
2. Woese, C.R. (1986) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271.
3. Cilia, V., Lafay, B. and Christen, R. (1996) Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 451-461.
4. Eardly, B.D., Nour, S.M., van Berkum, P. and Selander, R.K. (2005) Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: Mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1328-1335.
5. Lan, R. and Reeves, P.R. (1998) Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiol.* **144**, 1213-1221.
6. Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T. and Kataoka, M. (1999) Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. *J. Bacteriol.* **181**, 78-82.
7. Yap, W.H., Zhang, Z. and Wang, Y. (1999) Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon. *J. Bacteriol.* **181**, 5201-5209.
8. Wang, Y. and Zhang, Z. (2000) Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiol.* **146**, 2845-2854.
9. Schouls, L.M., Schot, C.S. and Jacobs, J.A. (2003) Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. *J. Bacteriol.* **185**, 7241-7246

10. Kitahara, K., Yasutake, Y. and Miyazaki, K. (2012) Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 19220-19225.
11. Neefs, J.M., Van, de, Peer, T., Hendricks, L. and De, Wachter, R. (1990) Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **18**, 2237-2317.
12. Alper, H. and Stephanopoulos, G. (2007) Global transcription machinery engineering: a new approach for improving cellular phenotype. *Metab. Eng.* **3**, 258-257.
13. Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A. and Ochi, K. (2009) Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat. Biotechnol.* **27**, 462-464.

# 実験方法の詳細

本研究を進める上で、使用した試薬、機器、方法について以下にまとめた。

## 1. 試薬

### 1-1. PCR 試薬

EmeraldAmp PCR Master Mix	タカラバイオ
KOD-Plus-Neo	東洋紡
KOD-FX-Neo	東洋紡

### 1-2. クローニング用試薬

In-Fusion HD Cloning Kit	タカラバイオ
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
T4 Polynucleotide Kinase	New England BioLabs
Antarctic Phosphatase	New England BioLabs
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
リゾチーム	和光純薬
メルカプトエタノール	和光純薬
各種制限酵素（HF 版があれば HF）	New England BioLabs
Agarose S	和光純薬
Formaldehyde-Free RNA Gel Kit	AMRESCO
50xTAE	ニッポンジーン
臭化エチジウム	和光純薬
1 kb DNA Ladder	タカラバイオ
ミドリグリーン DNA 染色蛍光試薬	日本ジェネティクス
Z-Competent E. coli Transformation Kit	ZYMO RESEARCH

### 1-3. 核酸抽出キット

FastGene Gel/PCR Extraction	日本ジェネティクス
HiYield™ Plasmid Mini Kit	SciTrove
Extrap Siol DNA kit Plus ver.2	J-Bio21
NucleoSpin RNA	MACHERY NAGEL

### 1-4. 培地

Difco™ SOB Medium	BD
-------------------	----

LB Broth Lennox	Novagen
2xYT Both	Novagen
Agar	CALBIOCHEM
M9 Minimal Medium Salts	MP
D(+)-グルコース	和光純薬
Nuclease-Free Water	Thermo Fisher

#### 1-5. 抗生物質

トリメトプリム	和光純薬
カナマイシン	和光純薬
アンピシリン	和光純薬
クロラムフェニコール	和光純薬
ゼオシン	Invitrogen

#### 1-6. コンピテントセル

HIT-JM109	RBC Bioscience
HIT-DH5 $\alpha$	RBC Bioscience
NEB-Turbo	New England BioLabs

#### 1-7. 測定試薬

PUREfrex (1.0)	ジーンフロンティア
GEN III MicroPlate	Biolog
IF-A	Biolog

#### 1-8. プラスティックウェア等

8 連 PCR チューブ QPCR-8S	BMBio
96 well cell culture cluster, Flat bottom, 3595	Costar
通気性タイプ細胞培養用 BF-400	BMBio
粘着タイプアルミシール (PCR・保存用) BMPCR-AS-200	BMBio

## 2. 機器

#### 2-1. 培養関連

Bioshaker M・BR-024	TAITEC
恒温器	yamato
Bioshaker BR-40LF	TAITEC
Bioshaker BR-43FL	TAITEC

## 2-2. クローニング用機器

チューブレミキサー TWIN3-28N	SCINICS
Eppendorf Thermomixer Comfort	Fisher Scientific
ビーズクラッシャー $\mu$ T-12	TAITEC
Veriti サーマルサイクラー	Applied Biosystems
GeneAmp PCR システム 9700	Applied Biosystems
GeneAtlas サーマルサイクラー	ASTEC
小型恒温水槽 NTT-2000	EYELA
遠心エバポレーター CVE-2200	EYELA
eLINE 電動ピペット	Biohit
Mupid-exU	ADVANCE
AE-6932GXES プリントグラフ	ATTO
白黒プリンター UP-X898MD	SONY

## 2-3. 遠心機

Centrifuge 5810R	Eppendorf
Centrifuge 5430R	Eppendorf
Optima™ L-70K Ultracentrifuge	Beckman

## 2-4. 測定

WPA biowave CO8000 Cell density meter	Biochrom
VersaMax microplate reader	Molecular Devices
SpectraMax Gemini microplate reader	Molecular Devices
Sunrise microplate reader	TECAN
Bio-Mini UV monitor AC-5200L	ATTO
Piston Gradient Fractionator	Biocomp
Grandient master 108	Biocomp
Mx3000p qPCR System	Agilent Technologies
OmniLog phenotype microarray system	Biolog
aCOLyte Colony Counter	SYNBIONISIS
極微量分光光度計 NanoDrop Lite	Thermo SCIENTIFIC

### 3. 方法

#### 3.1. メタゲノムの調製

北海道の土壌や海水、動物の腸内環境サンプル各々4 g 程度から、Extrap Soil DNA kit Plus ver. 2 を用い、微生物ゲノムを抽出した。

#### 3-2. PCR

PCR 試薬は用途によって使い分けた。ジェノタイピングやシーケンス反応の鋳型 DNA の増幅には EmeraldAmp を利用した。遺伝子クローニング実験での利用は KOD-Plus-Neo を利用した。環境サンプル由来の不純物を多く含むメタゲノムなどの DNA を鋳型する場合や、KOD-Plus-Neo で増幅効率が低い場合には、KOD-Fx-Neo を利用した。

PCR における反応液の組成や反応サイクルの条件は、各 PCR 試薬の推奨プロトコール通りにおこなった。

#### 3-3. In-Fusion クローニング

主に、16S rRNA 遺伝子断片の pRB105 へのクローニングに利用した。PCR 増幅によるベクター断片は十分に DpnI により PCR の鋳型 DNA (プラスミド) を切断し除去しておく。反応組成については、酵素量を推奨プロトコールの 1/4 量に、反応時間については 4 倍に変更しておこなった。反応後は、反応液を直接、大腸菌の形質転換に利用した。

#### 3-4. 制限酵素と DNA リガーゼによるクローニング

利用する酵素の種類や組合せによって、推奨されているプロトコールを確認し、それに従いおこなった。

第 5 章において、NcoI と XhoI を種々の asRNA 遺伝子断片の発現プラスミドの作成に利用した。asRNA 発現プラスミド、pHN1009 にはあらかじめ asRNA の挿入部位に NcoI と XhoI の認識配列が存在する。asRNA 断片については、その両末端に対応する認識配列が付加されるように、大腸菌ゲノムから PCR によって獲得する際に用いるプライマーに認識配列を付加しておく (第 5 章表 3)。そして、プラスミドベクターおよび asRNA 増幅産物を各々制限酵素処理、ついでリガーゼ処理により、目的の産物を獲得した。反応産物は、直接大腸菌 JM109 株の形質転換に利用した。

#### 3-5. DNA の脱リン酸化酵素、リン酸化酵素、DNA リガーゼによるクローニング

PCR 増幅産物の直鎖プラスミドの環状化については、断片のリン酸化を 37°C で 30 分程度おこなった後、その反応液に直接リガーゼを混合し、室温で 15 分以上反応させた。反応産物は、直接大腸菌 JM109 株の形質転換に利用した。

複数の DNA 断片同士のクローニングの場合、必要に応じて脱リン酸化(37°C で 1 時間以上)、リン酸化(37°C で 30 分程度)をおこない、必要に応じて FastGene Gel/PCR Extraction により溶液をクリーンアップしてから、大腸菌 JM109 株の形質転換に利用した。

### 3-6. 寒天プレート培地上のコロニーの大きさのバラツキ解析

aCOLyte で寒天プレート培地上のコロニーの撮影・画像保存

↓

PC に画像取り込み

↓

無料画像解析ソフトウェア ImageJ (ImageJ 1.49v)

↓

[Image]→[Adjust]→[Threshold]

調整してコロニーを認識させる。

ここでコロニーでない文字やプレートの一部が  
認識されてしまっても問題ない。

↓

[Analyze]→[Analyze particle]

Size: 3 以上

プレート上のチリなど、ノイズを認識しなくなる。

Circularity: 0.9-01.00

文字などのコロニー以外の部分を認識しなくなる。

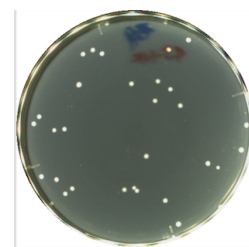
Show: Outlines

結果として出された各 particle の番号を図で確認できる。

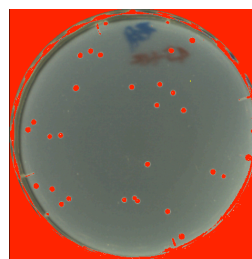
↓

結果

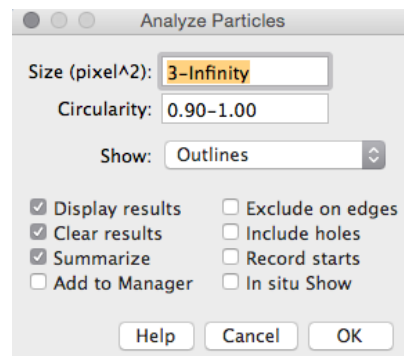
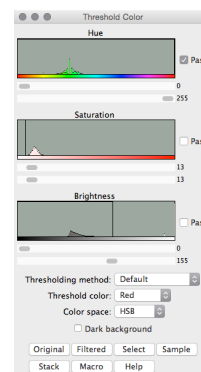
認識した particle が図（認識 particle に番号）と表で表される。



aCOLyteで撮影・保存プレート

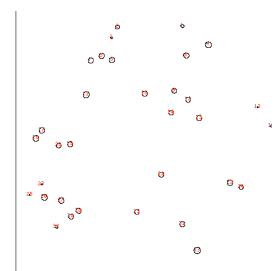


Thresholdによりコロニーを認識



コロニーの大きさは、ヒストグラムや散布図で確認するのが良い。

Results				
	Area	Mean	Min	Max
1	26	167.731	143	205
2	43	180.047	138	228
3	8	150.625	141	161
4	96	209.719	141	239
5	75	207.813	145	239
6	73	181.384	111	223
7	75	210.507	135	239
8	76	208.539	147	239
9	61	199.393	148	238
10	69	200.522	146	239
11	97	210.639	139	239







## 業績

《学術雑誌等（紀要・論文集等も含む）に発表した論文、著書》

- Miyuki Tsukuda & Kentaro Miyazaki, 「DNA fragmentation caused by an overdose of Zeocin」, Journal of Bioscience and Bioengineering, 116, 540-545, 2013 年
- Miyuki Tsukuda & Kentaro Miyazaki, 「Directed evolution study unveiling key sequence factors that affect translation efficiency in *Escherichia coli*」, Journal of Bioscience and Bioengineering, 116, 644-646, 2013 年
- Miyuki Tsukuda, Nobutaka Nakashima & Kentaro Miyazaki, 「Counterselection method based on conditional silencing of antitoxin genes in *Escherichia coli*」, Journal of Bioscience and Bioengineering, 120, 591-595, 2015 年

《学術雑誌等又は商業誌における解説、総説》

- 宮崎健太郎、佃美雪、佐藤允治, 「16S rRNA 遺伝子の水平伝播」, 化学と生物, 52 巻, 70-72, 2014 年
- 佃美雪、宮崎健太郎, 「16S リボソーム RNA の水平伝播実験からみえてくるリボソームの可塑性」, 生化学, 87 巻, 475-477, 2015 年

《国際会議における発表（ポスター発表 査読なし）》

- ○Miyuki Tsukuda, Kei Kitahara, Kentaro Miyazaki, 「Diversification of cellular phenotype through ribosome engineering in *Escherichia coli*」, ERATO International Symposium on Synthesizing Life and Biological Systems, P-91, 大阪府, 10 月, 2011 年
- ○Miyuki Tsukuda, Kentaro Miyazaki, 「RINSPEX technique for *Escherichia coli* strains engineering」, Biosystems Design 2.0, Singapore, 3 月, 2016 年

《国内学会・シンポジウム等における発表》

（口頭発表 査読なし）

- ○佃美雪、宮崎健太郎, 「進化工学的手法による異種蛋白質発現における発現律速因子の同定と発現効率化」, 第 8 回 21 世紀大腸菌研究会, 長野県, 5 月, 2011 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎, 「16S rRNA 置換変異による大腸菌宿主改良」, 第 2 回 Ribosome Meeting, 東京都, 3 月, 2013 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎, 「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, 101-05, 兵庫県, 3 月, 2015 年

(ポスター発表 査読なし)

- ○佃美雪、宮崎健太郎、「進化工学的手法による異種蛋白質発現における発現律速因子の同定と発現効率化」、第 11 回 日本蛋白質科学会、2P-116、大阪府、6 月、2011 年
- ○佃美雪、北原圭、宮崎健太郎、「Diversification of cellular phenotype through ribosome engineering in *Escherichia coli*」、細胞を創る研究会 4.0、P-91、大阪府、10 月、2011 年
- ○佃美雪、北原圭、宮崎健太郎、「Diversification of cellular phenotype through ribosome engineering in *Escherichia coli*」、第 10 回 微生物研究会、P-36、千葉県、11 月、2011 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎、「16S rRNA の置換変異による大腸菌宿主デザイン」、細胞を創る研究会 5.0、P-48、神奈川県、11 月、2012 年
- ○佃美雪、中島信孝、宮崎健太郎、「*E. coli* host engineering for efficient enzyme discovery」、CBI 学会 2013 年大会・生命医薬情報学連合大会、東京、10 月、2013 年
- 佃美雪、中島信孝、○宮崎健太郎、「アンチセンス RNA を用いた新規カウンターセクション技術の開発」、細胞を創る研究会 6.0、山形県、11 月、2013 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎、「Ribosomal RNA の人工水平伝播による大腸菌宿主デザイン」、細胞を創る研究会 6.0、山形県、11 月、2013 年
- ○佃美雪、中島信孝、宮崎健太郎、「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 回日本生物工学大会、北海道、9 月、2014 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎、「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、1P-09、兵庫県、3 月、2015 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎、「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、3 月、2015 年
- ○佃美雪、宮崎健太郎、「大腸菌を用いたものづくりの基盤研究」、SAT テクノロジー・ショーケース 2016、茨城県、2 月、2016 年

《特許》

- 13/802256 (米国、2011 年 3 月 13 日出願、公開)、「翻訳特性の改変された大腸菌」、宮崎健太郎、佃美雪
- 特願 2012-102128 (日本、2011 年 4 月 27 日出願、公開)、「翻訳特性の改変された大腸菌」、宮崎健太郎、佃美雪
- 特願 2013-226229 (日本、2013 年 10 月 30 日出願、公開)、「新規なカウンターセクション法」、佃美雪、中島信孝、宮崎健太郎

# 謝辞

研究について何も知らない東邦大学在学時の学部4年生の頃からこれまでの6年間、充実した研究環境を与えてくださった宮崎健太郎先生に感謝致します。6年の間には、2011年3月11日の大震災やそれに伴う研究テーマの変更、そして、二度の研究室の引越し、二度の研究グループの解散と発足を共に経験しました。学術的な部分もさることながら、先生の研究グループ運営の面でのリーダーシップなどについて間近で勉強させて頂きました。

北海道大学大学院理学研究院（元産総研、生物プロセス研究部門、酵素開発研究グループ、特別研究員）の北原圭特任助教に感謝致します。北原さんが確立した「16S rRNA 遺伝子の水平伝播実験」に関する手法と膨大な実験から蓄積したノウハウがあったからこそ、本博士論文が成り立ちました。誠に有難うございました。

東京工業大学大学院生命理工学研究科（元産総研、生物プロセス研究部門、合成生物工学研究グループ、主任研究員）の中島信孝准教授に感謝致します。中島さんが構築した発現アンチセンス法の各種プラスミドDNA および豊富な実験ノウハウを提供頂きました。誠に有難うございました。

北海道大学大学院、農学研究院（元産総研、生物プロセス研究部門、合成生物工学研究グループ）の鎌田頌子さんに感謝致します。発現アンチセンス法に関する実験について、一緒に実験をしてくださいました。誠に有難うございました。

メディカル情報生命専攻の上田卓也教授、伊藤耕一教授、鈴木穰教授、そして、千葉大学工学部共生応用化学科の梅野太輔准教授には、博士論文執筆にあたって有益なコメントを頂きました。大変感謝申し上げます。

上田卓也教授の研究室の布施（村上）朋重さんに感謝致します。大腸菌無細胞翻訳系で使用するリボソームの調製方法について、大変丁寧に教えて頂きました。誠に有難うございました。

株式会社吉田生物研究所の和田明博士に感謝致します。リボソーム研究に関わる実験手法に関し、手取り足取り直接教えて頂きました。先生の実験における職人技と呼ぶに相応しい洗練された実験手技を拝見できたことは私の財産です。また、和田千恵子博士および上田雅美博士に感謝致します。研究に関して、先生方の豊富な知識とノウハウを惜しみなく提供頂き、また、有意義なご討論を頂きました。誠に有難うございました。

札幌市円山動物園 向井猛動物管理センター所長（当時）に感謝いたします。動物園の案内していただくとともに、多種類の動物腸内細菌試料を供与いただきました。

産総研、生物プロセス研究部門、生物資源情報基盤研究グループの玉木秀幸主任研究員および秋庭綾さんに感謝致します。環境微生物の種々の培養法と同定法の手技について、丁寧に教えて頂きました。特に、細胞膜の脂質評価解析手段の FAME や、種々の化合物に対する資化性評価解析手段は、リボソーム改変された大腸菌変異株の評価軸として一部参考にさせて頂き、研究の幅を広げるきっかけとなりました。また、柿澤茂行主任研究員に感謝致します。大変有意義なご意見を頂いたことに加え、学振 PD の申請書作成に関し大変ご丁寧に指導頂きました。また、菅野学主任研究員に感謝致します。qPCR 装置を貸して頂きました。また、宮崎亮博士に感謝致します。R 言語の基礎を教えて頂きました。また、メディカル情報生命専攻の矢野大和特任助教に感謝致します。R 言語 grofit パッケージに関し、プログラミングが不得意で大変ご迷惑をおかけいたしました。問題がなくなるまで丁寧に対応して頂きました。

6 年間の産総研における研究活動において、常に支えてくださった産総研の関係者の皆様に感謝申し上げます。プロの研究者、事務職員、知財担当者の中にお邪魔し、皆様の仕事を拝見しながらこの 6 年間研究に携われたことはかけがえのない財産です。

2014 年度からの 2 年間、日本学術振興会特別研究員奨励費 26-7760 からご支援頂きました。

2015 年度からの 1 年間、産総研イノベーションスクール制度のもと、企業や公設試験研究機関、政府など様々な立場の関係者の方にお話を伺う機会を頂き、企業における研究活動や異分野研究の融合に関するノウハウなどについて幅広い視野を養うことができました。

最後に、「勉強好きだったの？」の一言のみで博士課程に送り出してくれた両親に感謝致します。常に深入りせずに、けれどももしっかり見守ってくれた姿勢に感謝致します。

平成 28 年 3 月  
佃 美雪