

16S rRNA 遺伝子の「水平伝播」 異種 16S rRNA による遺伝的相補

リボソームは、すべての生物に存在するタンパク質合成装置であり、DNA から mRNA に写し取られた遺伝情報をポリペプチドに「翻訳」する役割を担っている。細菌においては、リボソームは大小2つのサブユニット、3つの RNA と 57 のタンパク質から構成されており、その立体構造は極めて複雑である。さらに rRNA の転写後修飾（塩基修飾やプロセッシング）や各成分の協調的なフォールディングなど、その生合成過程も極めて複雑である⁽¹⁾。このため、リボソームは進化的に保守的で、各成分が協調的に進化してきたと考えられてきた。小サブユニットに含まれる 16S rRNA などが微生物系統分類の指標として種の同定に使われてきたのも⁽²⁾、遺伝子が水平伝播しないことを前提としている⁽³⁾。

これに対し、16S rRNA 遺伝子の水平伝播を示唆する報告もある。ある種の微生物では、複数の 16S rRNA 遺伝子のモザイク様の配列をもっていたり、別の微生物では、一つの染色体上に相同性の低い 16S rRNA 遺伝子を共存させたりしている例も見つかっている^(4~8)。さらに Asai らは、染色体上の rRNA オペロンを完全欠失した大腸菌変異株（Δ7 株）を構築し、大腸菌とは同目別属

のサルモネラやプロテウスといった細菌由来の 16S rRNA が、遺伝子欠損を相補できることを示した⁽⁹⁾。これら相反する報告は、リボソームの進化や可塑性を考えるうえで非常に示唆的である。

われわれは、「16S rRNA 遺伝子の水平伝播」の問題を「リボソーム成分の種間適合性」の問題と捉え直し、遺伝学的方法で検証することとした。すなわち、大腸菌リボソームをモデルに、16S rRNA をほかの生物から供給し、残りの成分を大腸菌から供給し、細胞内で再構成させることを試みた。16S rRNA 遺伝子は、ゲノム DNA を鋳型としてユニバーサルプライマーを用いて全長配列を PCR クローニングできる。われわれは、環境ゲノム（メタゲノム）を活用することで給源となる 16S rRNA の多様性の拡大を図った。環境ゲノムは、環境試料に含まれる微生物ゲノムの集合体である。環境中には膨大な種類、数の微生物が棲息しているが、その大半は「難培養性」である。培養をしてしまうと本来の多様性が損なわれてしまうが、その工程を踏まずに環境試料から直接ゲノムを抽出すればそっくりそのまま利用できる。われわれは、土壌・海水・堆肥などさまざまな環境

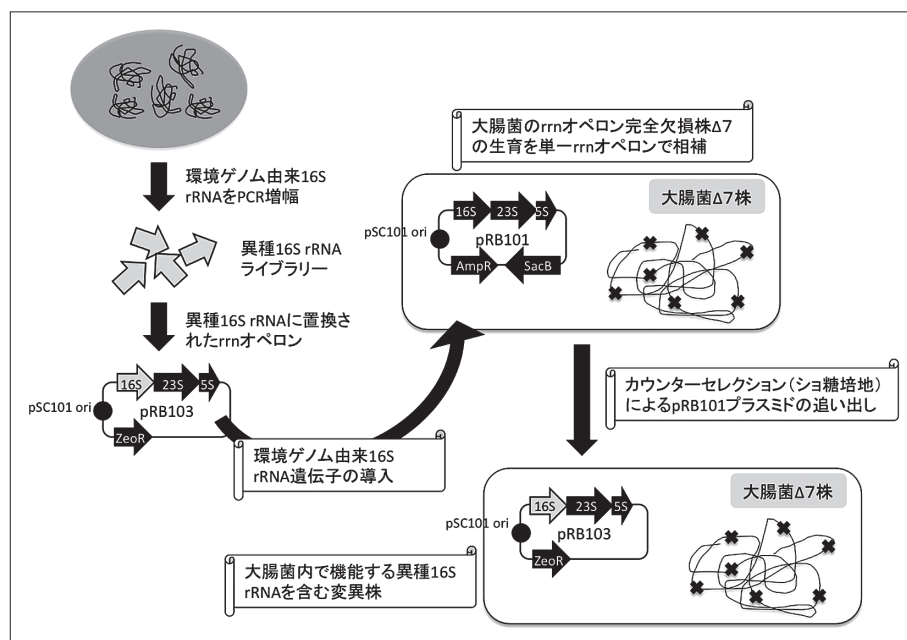


図1 ■ 外来生物種由来の 16S rRNA による水平伝播実験

環境 DNA を鋳型にさまざまな微生物由来の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、pRB103 に含まれる大腸菌由来の 16S rRNA と置き換える。ゲノム中のすべての rrn オペロンを欠失した宿主株 KT101 を pRB103 により形質転換する。KT101 には、一過的に pRB101 と pRB103 が共存した状態になる。この後、ショ糖による pRB101 の追い出し（カウンターセクション）と薬剤による選択（ゼオシン）により、外来 16S rRNA が大腸菌内で機能する場合、生育相補株が得られる。



から得た環境ゲノムを鋳型に16S rRNA遺伝子をPCR増幅し、大腸菌16S rRNAとの入れ替え実験に用いた。宿主に用いたのはAsaiらが構築した $\Delta 7$ 株を改変したKT101株である。KT101株は $\Delta 7$ 株同様、染色体上のrRNAオペロンをすべて欠失し、その生育を大腸菌rrnBオペロンの発現ベクターpRB101（アンピシリン耐性、pSC101 ori）により補っている。さらにpRB101はカウンターセクションマーカーsacBも含んでいるため、ショ糖存在下で脱落させることができる。一方、外来16S rRNA遺伝子をpRB101とは薬剤耐性が異なるベクターpRB103（ゼオシン耐性、pSC101 ori）にクローニングしておく。KT101をpRB103で形質転換しさらにショ糖と抗生物質で選択する。異種16S rRNAが大腸菌内でほかの成分と協調して機能すれば、首尾よく相補株を得られるという仕組みである（図1）。

この実験系を用いて環境ゲノムより得た16S rRNAをスクリーニングした結果、33種の相補株が得られた。さらに16S rRNA遺伝子を解析したところ、その多くが大腸菌の属する γ -プロテオバクテリア綱^{*1}由来のものであった。Asaiらが示したサルモネラやプロテウスなど、大腸菌と近縁な腸内細菌類ばかりでなく、シュードモナスの近縁種なども数多く含まれていた。さらに驚くべきことに、 β -プロテオバクテリア綱由来の16S rRNAも含まれていた。一方、今回得た範囲では、 β -プロテオバクテリアよりも遠縁の α -プロテオバクテリア別の門に属するものなどで相補されることはなかった。ある程度の限界（大腸菌の16S rRNA遺伝子と比較し80%程度の配列相同性）はあるものの、これまでの常識をはるかに超えたレベルでリボソーム成分の異種間適合性が成り立つことが証明された⁽¹⁰⁾。

では、それら大腸菌の生育を相補した16S rRNAに何か共通の特徴はあったのか。そこでわれわれは、今回取得した16S rRNAと大腸菌16S rRNAとの間で異なる箇所をRNAの二次構造上にマッピングした。その結果、大腸菌の生育を相補した異種16S rRNAは、配列は多様であるものの、二次構造を壊さないというルールを堅持していた。点突然変異に対しては容易に機能を失う一方、二次構造を維持する限り意外にも可塑性が高いという結論である。16S rRNAは点変異の蓄積という観点からは進化速度が遅いと判断されるが、反面、点変異より

も一見ドラスチックな水平伝播は許容されやすいというのは非常に興味深い。

以上述べたように、16S rRNAは水平伝播しうる分子である。少なくともリボソームは意外なほど可塑的で、その余地を十分に残している。ただ、人工的に置換可能だからといって、自然界でこの現象が多発しているということにはならない。水平伝播の遺伝学的なメカニズムは全く未解明であり、われわれは、水平伝播を阻む「壁」についても提唱している^{*2, (11)}。いずれにせよ、16S rRNAの水平伝播問題は、一遺伝子の進化にとどまらず細胞システム全体の進化、種分化などにも通じる生物進化の根源的な問題を含んでおり、その可能性の探求の興味は尽きない。

謝辞：本稿で紹介した研究の一部は科学研究費補助金の支援を受けたものである。

- 1) K. Kitahara & T. Suzuki: *Mol. Cell.*, **34**, 760 (2009).
- 2) C. R. Woese: *Microbiol. Rev.*, **51**, 221 (1987).
- 3) R. Jain, M. C. Rivera & J. A. Lake: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3801 (1999).
- 4) Y. Wang & Z. Zhang: *Microbiology*, **146**, 2845 (2000).
- 5) L. M. Schouls, C. S. Schot & J. A. Jacobs: *J. Bacteriol.*, **185**, 7241 (2003).
- 6) S. G. Acinas, L. A. Marcelino, V. Klepac-Ceraj & M. F. Polz: *J. Bacteriol.*, **186**, 2629 (2004).
- 7) B. D. Eardly, S. M. Nour, P. van Berkum & R. K. Selander: *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 1328 (2005).
- 8) S. R. Miller, et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 850 (2005).
- 9) T. Asai, D. Zaporozhets, G. Squires & C. L. Squires: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 1971 (1999).
- 10) K. Kitahara, Y. Yasutake & K. Miyazaki: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19220 (2012).
- 11) K. Kitahara & K. Miyazaki: *Nature Commun.*, **2**, 549 (2011).

(宮崎健太郎, 佃 美雪, 佐藤允治, 産業技術総合研究所生物プロセス研究部門, 東京大学大学院新領域創成科学研究科)

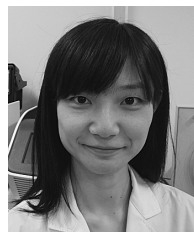
^{*1}綱という分類群は、さらに上位の門という分類群が登場するまでは最上位の分類群であり、極めて多くの種を含む分類群である。

^{*2}16S rRNAのhelix 41 (Antitoxin) がペリプラズム酵素RNaseI (Toxin) の特異的インヒビターとなっている。16S rRNAが異種のものに置き換わると細胞内RNAがRNaseIにより切断されるリスクが高まり、遺伝的に不利なこととなる。

プロフィール



宮崎健太郎 (Kentaro MIYAZAKI)
 <略歴> 1994年東京工業大学総合理工学研究科生命化学専攻修了 (理学博士) / 同年通産省工技院生命工学工業技術研究所入所 / 1997年カリフォルニア工科大学客員研究員 / 2000年新エネルギー産業技術総合開発機構出向 / 2001年産業技術総合研究所主任研究員 / 2004年同研究所生物機能工学研究部門酵素開発研究グループ長 / 2006年東京大学大学院新領域創成科学研究所客員准教授 (2011年客員教授) / 2012年産総研生物プロセス研究部門合成生物学グループ長 <研究テーマと抱負> 有用遺伝子の取得・機能改変, 宿主機能改変を統合した研究を展開したい <趣味> 料理, ガーデニング



佃 美雪 (Miyuki TSUKUDA)
 <略歴> 2011年東邦大学理学部生物分子科学科卒業 / 2013年東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻修士課程修了 / 2013年同博士課程進学 (現在博士過程1年) <研究テーマと抱負> 大腸菌での異種遺伝子発現, 特に翻訳にかかわる研究 <趣味> ソフトテニス, 散歩



佐藤 允治 (Mitsuharu SATO)
 <略歴> 2010年茨城大学生体分子機能工学科卒業 / 2012年同大学大学院物質工学専攻博士前期課程卒業 (修士課程修了) / 同年東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻博士後期課程進学 (現在博士課程2年) <研究テーマと抱負> 微生物のゲノム進化を網状進化の観点からとらえなおし, 進化史を明らかにしたいです <趣味> 釣り, スキー, 読書, 散歩, 廃墟観察