Journal of Environmental Biotechnology
（環境バイオテクノロジー学会誌）
Vol. 14, No. 1, 3–8, 2014

総　　説（特集）

リボソーム改変による大腸菌宿主デザイン

Escherichia coli Host Design through Ribosome Engineering

宮崎健太郎 [1,2*]
KENTARO MIYAZAKI[1,2*]

[1] 独立行政法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門　〒 062–8517　北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 17–2–1
[2] 東京大学大学院新領域創成科学研究科　〒 062–8517　北海道札幌市豊平区月寒東 2 条 17–2–1
* TEL: 011–857–8489 FAX: 011–857–8516
* E-mail: miyazaki-kentaro@aist.go.jp
[1] *Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 2–17–2–1 Tsukisamu-higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062–8517, Japan*
[2] *Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 2–17–2–1 Tsukisamu-higashi, Toyohira-ku, Sapporo 062–8517, Japan*

キーワード：リボソーム，16S rRNA，宿主改変，大腸菌
Key words: *Escherichia coli*, ribosome, 16S rRNA, host engineering

（原稿受付　2014 年 6 月 30 日／原稿受理　2014 年 7 月 2 日）

1. はじめに

生物は地球上のありとあらゆる環境に棲み着いている。時々刻々変化する環境の中，生物は生命の「設計図」であるゲノムにコードされた数千の遺伝子の中から，適当なものを，適当な量，適当な場所で，適当なタイミングで発現させ，生命活動を営んでいる。個々の遺伝子（産物）の性質もさることながら，時空間制御された遺伝子発現システムこそが，生物の個性・振る舞いを決定する。このシステムを駆動するのに中核的な役割を果たすのが，RNA ポリメラーゼやリボソームである。ゲノム情報を読み解き機能分子へと変換するこれらの装置に大きな障害が起きれば，健全な生育が阻害されることは明らかである。テキトーな遺伝子をテキトーな量，テキトーな場所で，テキトーなタイミングで発現すれば，システムは破綻するであろう。一方，僅かな障害であれば，なんとかやりくりして生きていけるかもしれない。ではどの程度の障害（変異）までであれば，「生きる」という要件を満たすことができるのであろうか？　我々は，遺伝子発現を統治する「装置」に着目することで，生命システムのロバストネスを解明できるのではないかと考えた。とくに翻訳過程を司るリボソームを改変対象とした。ゲノムの全体像を変えることなく，リボソームのみを改変することで生物の振る舞いはどのように変わるのかを，大腸菌をモデルに研究することとした。

2. 翻訳装置を改変する

2.1 リボソームの構造と機能

翻訳装置であるリボソームは，遺伝情報を蛋白質へと変換する蛋白質合成反応を担っている。数ある生体反応の中でも特に高い正確性を要求する翻訳過程は，リボソームのもつ複雑な立体構造の上に成り立っている。図 1 は，X 線結晶構造解析に基づく大腸菌リボソームの立体構造である [1]。大小 2 つのサブユニットから成るリボソームは，分子量 250 万の巨大分子である。両サブユニットともに，分子の中心は rRNA が占め，RNA と蛋白質の分子量比は約 2 : 1 である。大サブユニット（50S）は 2 種の RNA（5S rRNA 及び 23S rRNA）と 36 種の蛋白質，小サブユニット（30S）は 1 種の RNA（16S rRNA）と 21 種の蛋白質から成る。単一，あるいは数少ない成分の繰り返しではなく，異なる成分が一つずつ組み合わさっているのが特徴的である。リボソーマル蛋白質の大半は塩基性で，負電荷を帯びた RNA の隙間に入り込むことで電荷を中和し，リボソーム全体を安定化している。このように，成分内，成分間に無数の相互作用用ネットワーク（RNA–RNA，蛋白質 – 蛋白質，RNA– 蛋白質）が張り巡らされ，生体分子の最高傑作ともいうべき，巨大で精密な分子機械が構築されている。

リボソームの機能に目を向けると，翻訳過程は，開始・伸長・終結の 3 段階に分けられる。開始過程を担う小サブユニットには暗号解読（decoding）センターがあり，mRNA のコドンを 5’ 末端側から順番に解読してアミノアシル化された tRNA のアンチコドン部位を対合させる役割を担っている。伸長過程を担う大サブユニットには，ペプチジル転移センターがあり，アミノアシル – tRNA が運んでくるアミノ酸を重合し，ペプチドを伸長する役割を担っている。いずれの場合も，活性中心は RNA，すなわち 16S，23S rRNA に存在しており，リボソーマル蛋白質は，翻訳の開始・終結地点の決定，翻訳

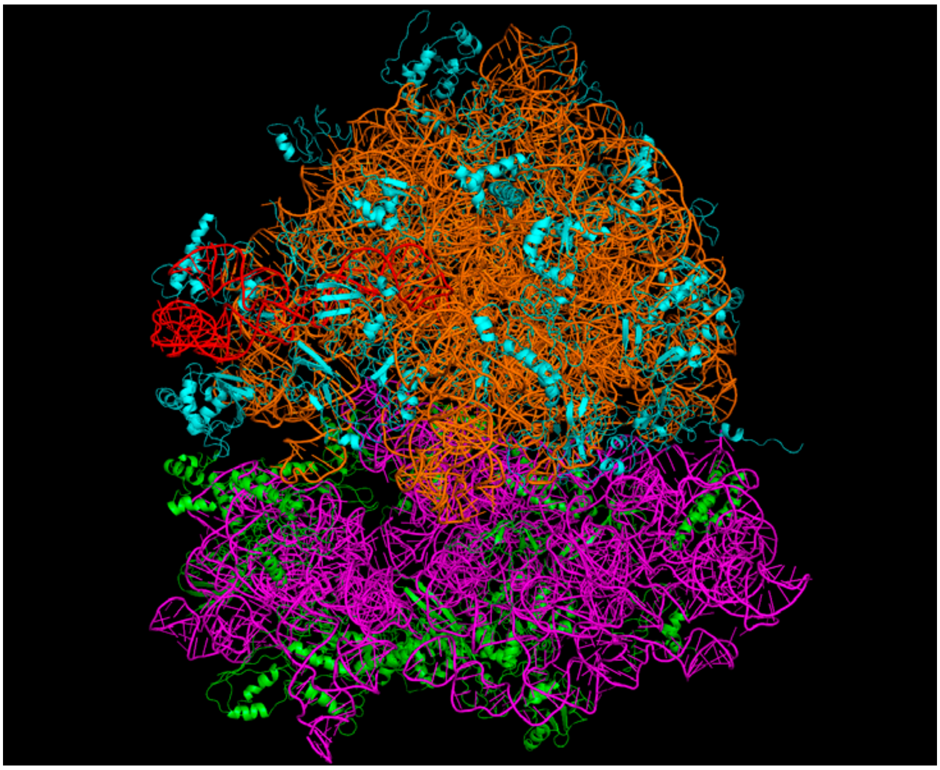

図 1. 大腸菌リボソームの立体構造。色分けは以下のとおり：16S rRNA（マゼンタ色），23S rRNA（オレンジ色），5S rRNA（赤色），30S サブユニット中のリボソーム蛋白質（緑色），50S サブユニット中のリボソーム蛋白質（みず色）。

の制御・維持などに関わっている。

このように構造・機能において極めて複雑で，かつ精度の高い反応を行う必要のある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る[2)]。

2.2 生物の系統分類の指標としての 16S rRNA

前節で述べた通り，リボソームは極めて進化的に保守性が高い。とは言え，時間とともに遺伝子はゆっくりと変化する。進化の過程で様々な遺伝子変異が蓄積されるが，それは種の個性を色濃く反映したものとなる。このような分子は，生物の進化系統分類に役立つ。なかでも 16S rRNA は，あらゆるバクテリアに備わっていることに加え，情報量が適当である（約 1500 塩基）こと，保存領域と非保存領域が適度に存在することから，生物を分類するための「物差し」としての広く受け入れられるようになった[3)]。

生物ごとに固有の 16S rRNA ―これが生物の進化系統分類を行う大前提である。新たなバクテリアを見つけるたびに 16S rRNA 遺伝子配列を決定し，他の生物の 16S rRNA との類縁関係を系統樹の形で表記する。系統樹の作成方法としては，最大節約法，最尤法，近隣接合法など様々あるが，いずれの方法においても（史実を正確に反映するかどうかの議論はあるが），何かしらの系統関係を描き出すことができる。しかし中には「例外」もある。

2.3 自然界で見られる 16S rRNA 遺伝子のゲノム内多様性とリボソームの可塑性

通常，バクテリアゲノム内には rRNA 遺伝子（オペロン）は複数個存在している。生物種により様々であるが，例えば大腸菌では 7 個，枯草菌では 13 個の rRNA オペロンがコードされている。興味深いことに，これらは完全に同じというわけではなく，オペロン間に数塩基の多型が見られることが多い。「例外」とは，ゲノム中に複数存在する 16S rRNA の差が「数塩基」ではなく，あたかも異種生物の 16S rRNA 遺伝子が丸ごと飛び込んできたかのように，相同性の低い 16S rRNA 遺伝子が共存している事例を指す。どちらか一方が偽遺伝子というわけではなく，両方共に機能していることも確かめられている[4)]。遺伝子丸ごとではなく，部分的な断片として飛び込んできているようにみえる事例も見つかっている。相同遺伝子間で組換えが起きたかのような「キメラ型」の 16S rRNA である[5–8)]。系統分類を惑わすこうした事例は多くはなく，「例外」として済ませることもできるが，リボソーム（16S rRNA）の構造的，機能的な可塑性を示唆しているようにも思われる。進化の戦略として複数種類の 16S rRNA を備えておくことの意義などには関心が持たれるが，分子機械としてのリボソームの機能要件―どのような組み合わせ（16S rRNA とその他のリボソーム成分）であれば機能的なハイブリッドリボソームが構成されるのであろうか？―といった問題も興味深い。我々はリボソームの機能的な可塑性を検証するために，自然界で見られる例外的ケースがどれほど一般的なのか？ リボソームの機能要件として，配列相同性がどれほど低くてもそれが満たされるのか？ といった興味から，「16S rRNA 遺伝子の水平伝播実験」を行った。

3. 16S rRNA の「水平伝播」実験

3.1 大腸菌 16S rRNA の欠損株と 16S rRNA の変異解析

先述の通り，バクテリアゲノムには通常，複数の rRNA オペロン（rrn オペロン）が存在しており，大腸菌には 7 コピーが備わっている。このように遺伝子が多重化しているため，野生株を宿主に使うと変異（外来）16S rRNA の正確な機能解析が難しくなる。そこで我々は，Asai らにより構築されたゲノム中の rRNA オペロンを完全に欠失した変異株（Δ7 prrn 株）を用いた[9]。欠損株とは言え，rrn オペロン遺伝子は生育に必須なため，ただ単に欠失させることはできない。Δ7 株は，ゲノム中にコードされた 7 個の rrn オペロンを欠失しつつ，rrn オペロン発現プラスミドを供給することで生育可能となっている。

Asai らは Δ7 prrn 株を宿主に，大腸菌の 16S rRNA 遺伝子を異種のものと入れ替えた。試みたのは大腸菌とは比較的近縁な *Salmonella typhimurium* や *Proteus vulgaris* 由来の 16S rRNA である。16S rRNA 遺伝子の配列相同性はそれぞれ 97%，93%である。その結果，野生株よりも若干生育が遅れるものの，異種 16S rRNA が大腸菌 16S rRNA 遺伝子の欠損を補完できることが判明した。rRNA とリボソーム蛋白質の比率も野生型リボソームと遜色なく，近縁種間でハイブリッドを形成し機能しうることが確かめられた。

さらに鈴木らは遺伝子操作系を改良し，外来 rrn オペロン発現プラスミドと大腸菌 rrn オペロンを含む救済プラスミドを簡便に出し入れできる系を確立した（図 2）[10,11]。宿主としては同じく Δ7 prrn 株を使うが，大腸菌 rrn オペロンを含む救済プラスミド（アンピシリン耐性）にカウンターセレクションマーカー（ショ糖毒性を示す枯草菌 sacB 遺伝子）を導入した。外来 16S rRNA を発現するプラスミド pRB103 は，救済プラスミド pRB101 と同一の複製起点，異なる薬剤耐性マーカー（ゼオシン）を含ませる。pRB103 を Δ7 prrn 株に導入し，ゼオシン含有プレートで選択すると，両方のプラスミドを保持した形質転換体が得られる。一般的には複製起点が同一のプラスミドは不和合性のため，この時点でアンピシリン耐性の救済プラスミドが脱落すると考えられているが，実際に実験してみると，複製起点の不和合性のみではプラスミドが落ち切らないことがよくある。この 2 種プラスミドが共存する状態から，次にショ糖によるカウンターセレクションを行うことで，pRB101 を確実に脱落させる。これにより，外来 16S rRNA の機能評価を行うことができる。すなわち，外来 16S rRNA が他のリボソーム成分と複合体を形成し機能すれば形質転換体が得られ，そうでない場合はコロニー形成に至らないという仕組みである。我々は，この方法を使って，機能相補する 16S rRNA 遺伝子について徹底的に検討した。

3.2 環境 16S rRNA の利用

約 1500 塩基から成る 16S rRNA 遺伝子は，触媒中心のみならず，遺伝子の全領域にわたり種間でよく保存されている。両末端の配列についても同様によく保存され

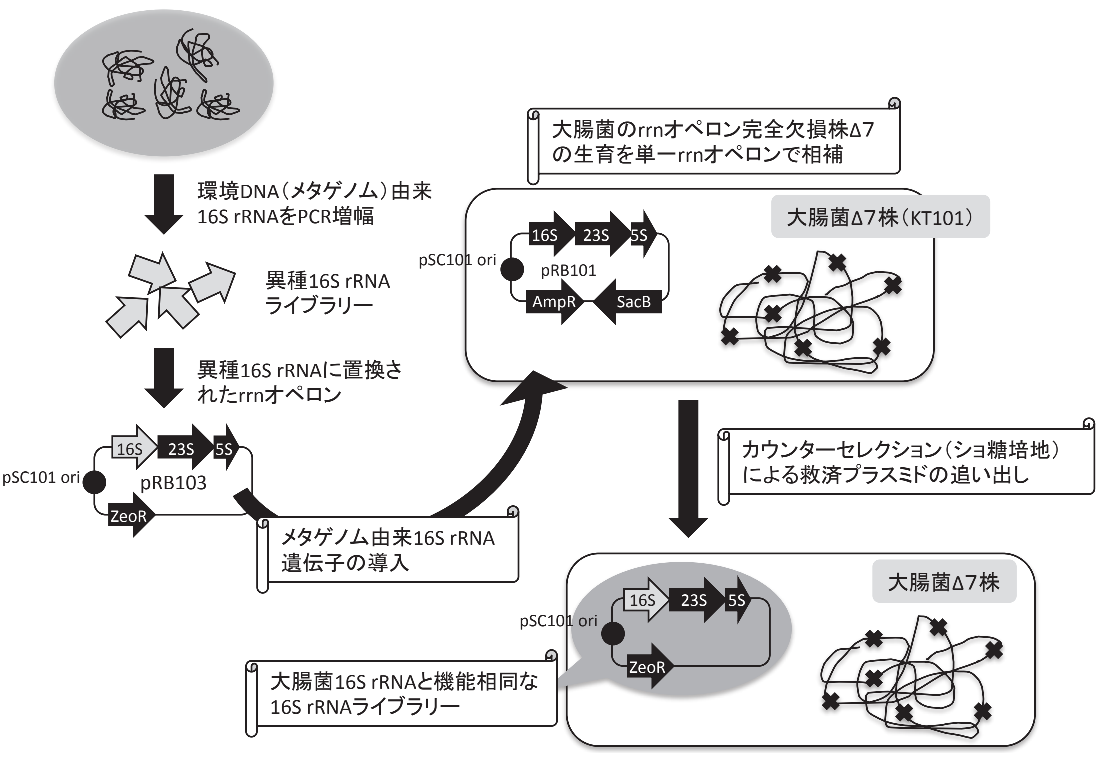

図 2. 外来（異種）16S rRNA 遺伝子の機能スクリーニング．環境 DNA を鋳型に様々な微生物由来の 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し，pRB103 に含まれる大腸菌由来の 16S rRNA と置き換える。ゲノム中に存在する全ての rrn オペロンを欠失した宿主株 KT101 を pRB103 により形質転換する。KT101 には一過的に，pRB101 と pRB103 が共存状態になる。この後，ショ糖による pRB101 の追い出し（カウンターセレクション）と薬剤による選択（ゼオシン）により，外来 16S rRNA が大腸菌内で機能する場合，生育相補株が得られる。

ている。このため，両末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーを用いれば，様々な微生物ゲノムから 16S rRNA 遺伝子を簡単に増幅することが可能である。さらに「環境 DNA」を鋳型に用いれば，16S rRNA 遺伝子を一網打尽にすることができる。様々な試料から精製した環境 DNA を鋳型に全長 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅すると，約 1.5 kb あたりにバンドが検出できる。バンドサイズとしてはほぼ均一であるが，この中には多種多様な微生物由来の 16S rRNA 遺伝子が含まれている。我々はこの手法で得た 16S rRNA 遺伝子を，rRNA の発現ベクターに組み込んで機能評価した。

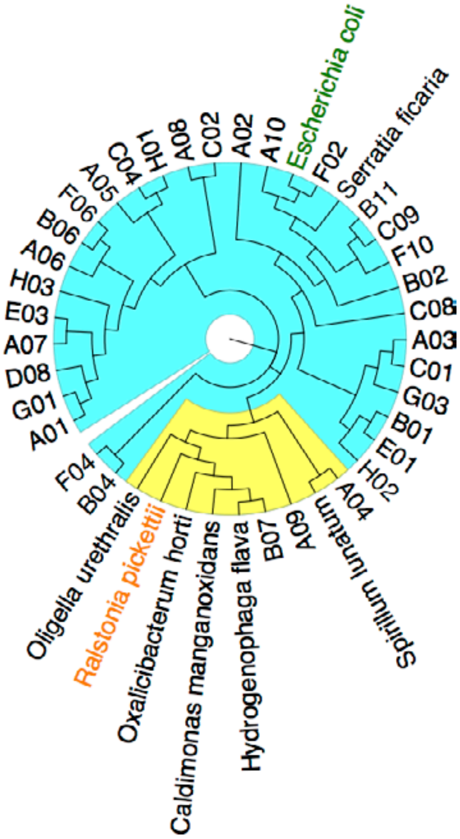

図 3.　大腸菌 16S rRNA の遺伝子欠損を相補する外来 16S rRNA の起源。

3.3　リボソームの意外な可塑性とその分子基盤

スクリーニングの結果，大腸菌の 16S rRNA 遺伝子と綱（クラス）のレベルで異なる微生物（β-プロテオバクテリア）由来の 16S rRNA 遺伝子でも大腸菌の生育を相補することができた（図 3，一部未発表データを含む）[12,13]。配列相同性については，最も相同性の低いものは 80%程度であった。これは遺伝子の全長 1542 塩基に対して 300 塩基程度が異なっていることになる。

このように大きな配列上の違いがあるのみかかわらず，異種生物の 16S rRNA はどのように他のリボソーム成分と協調して機能するのか？　このことを明らかにするために，rRNA に特有な二次構造を主眼に配列の比較を行った。代表的な例として，ヘリックス 21 と呼ばれる領域における配列・二次構造を比較した。その結果，図 4 に示す通り，塩基配列が変化しても二次構造（ヘリックス形成）が保たれれば，多くの場合 16S rRNA の機能も保たれることが判明した。生物種固有と思われていた 16S rRNA であるが，配列そのものではなく二次構造が機能にとって重要であることがわかった。さらに，一部の 16S rRNA については，ヘリックス構造すら大きく異なる例も見出されている。図 5 に示す通り，一部のクローンでは，ヘリックスの伸長，短縮が起きている。立体構造の面からこの領域を見ると，こうした部位は溶媒に露出し，リボソーマル蛋白質などとも相互作用していないことが判明した。

このように，進化的に極めて保守性が高いと考えられてきたリボソームが，「水平伝播」をも許容しうる意外に柔軟な分子であることが示された。

3.4　変異リボソームが駆動する大腸菌変異株―微生物育種への途

生物のシステムを支配するリボソームが変わると，宿主である大腸菌はどのように振る舞うであろうか？　まず変異株間で増殖速度を比較すると，野生株（大腸菌自身の 16S rRNA で機能相補したもの）と遜色ないものから，倍加時間が 3 倍程度延びてしまうものも生じた。また，定常期の OD 値にも差が生じることが観察された。寒天培地で増殖させると，生育速度を反映して大小のコロニーが出現するが，同時に，円形ではなく楕円形に近

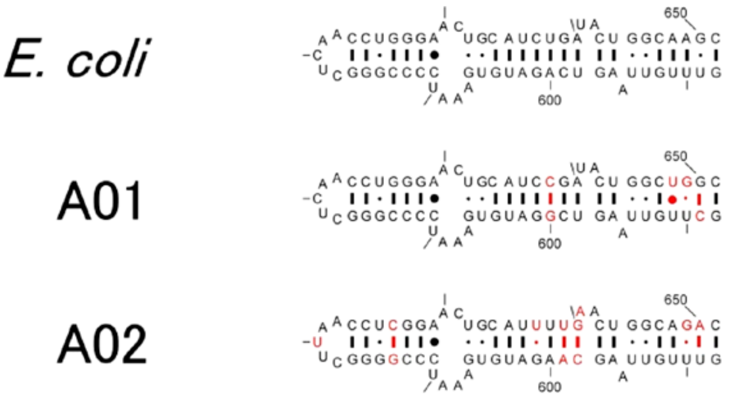

図 4.　大腸菌内で機能する異種（A01 及び A02）16S rRNA のヘリックス 21 領域の二次構造。塩基配列の変化（赤字部分）にもかかわらず，二次構造が維持されていることがわかる。

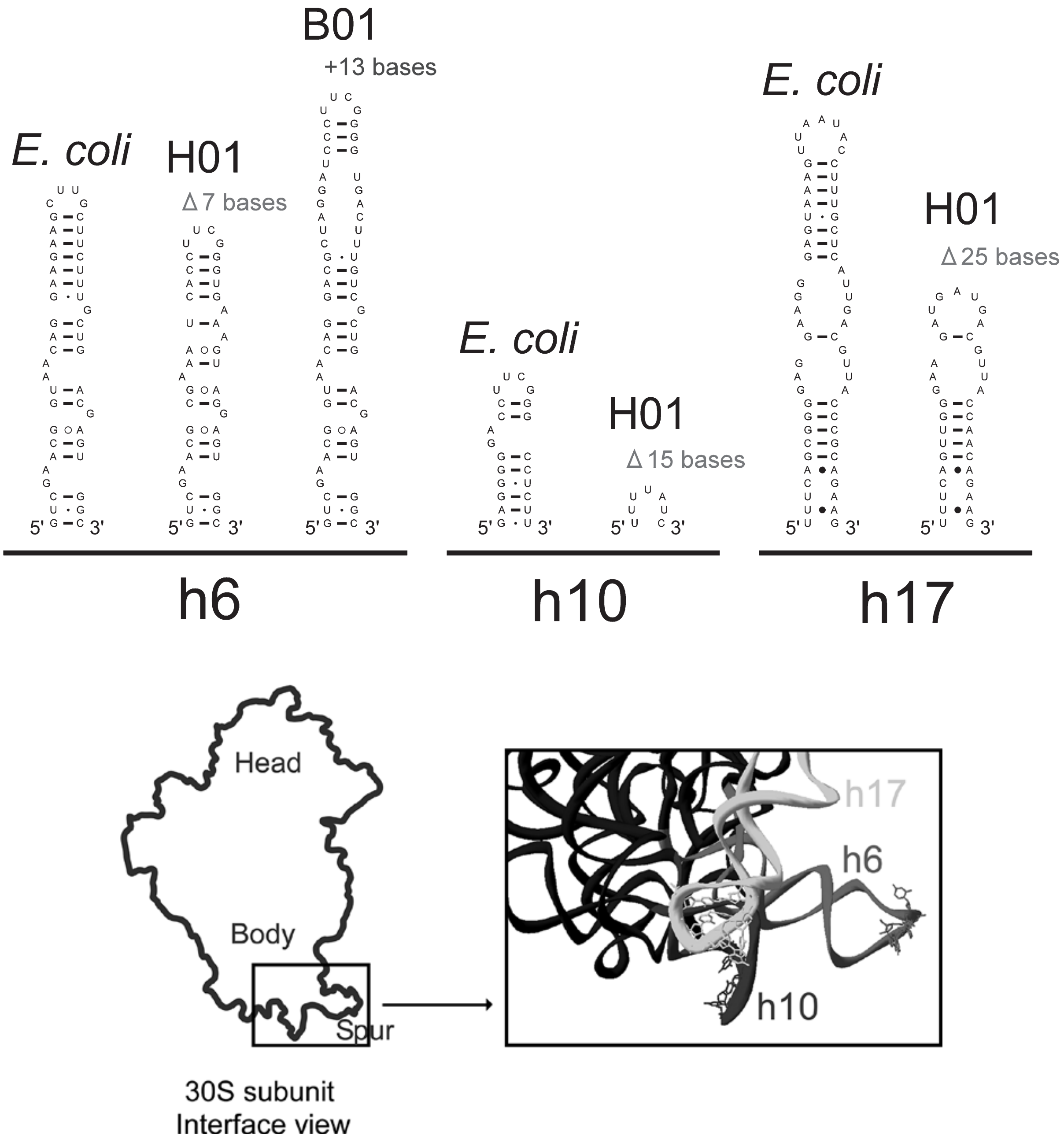

図 5. ヘリックス構造に変化が見られた 16S rRNA のヘリックス 6, 10, 21 領域。ヘリックス構造に変化が見られた 16S rRNA のヘリックス領域の立体構造上の位置。

いもの，フチがギザギザなものなどが観察された。このように変異株ごとに表現型に様々な違いが観察され,「生き様」に違いがあろうことが想像された。

多様性が生まれれば，それを改良に活かそうという発想が生まれる。進化工学の考え方である。我々も手始めに，異宿主発現について実験を行った。例えば緑色蛍光蛋白質（GFP）を変異株に導入すると，多くの場合，野生株において高い発現が見られたが，野生株では発現が不良なものなどでは，逆に生育不良な変異株において高い発現が見られた。研究は端緒についたばかりであるが，この他にも，大腸菌を工業利用する際に有用な形質について「改良」の観点でスクリーニングを進めている。微生物育種の新たな技術として発展させたいと思っている。

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。本稿で紹介した研究は，ポスドク研究員であった北原圭博士，大学院生の佃美雪さんらとともに行った。この場を借りて感謝する。

文　献

1) Korostelev, A., S. Trakhanov, M. Laurberg, and H.F. Noller. 2006. Crystal structure of a 70S ribosome-tRNA complex reveals functional interactions and rearrangements. Cell 26: 1065–1077.
2) Jain, R., M.C. Rivera, and J.A. Lake. 1999. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 96: 3801–3806.
3) Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol. Rev. 51: 221–271.
4) Acinas, S.G., L.A. Marcelino, V. Klepac-Ceraj, and M.F. Polz. 2004. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple rrn operons. J. Bacteriol. 186: 2629–2635.
5) Wang, Y. and Z. Zhang. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. Microbiology 146: 2845–2854.
6) Schouls, L.M., C.S. Schot, and J.A. Jacobs. 2003. Horizontal transfer of segments of the 16S rRNA genes between species of the *Streptococcus anginosus* group. J. Bacteriol. 185: 7241–7246.
7) Miller, S.R., S. Augustine, T.L. Olson, R.E. Blankenship, J. Selker, and A.M. Wood. 2005. Discovery of a free-living chlorophyll d-producing cyanobacterium with a hybrid proteobacterial/cyanobacterial small-subunit rRNA gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 850–855.
8) Eardly, B.D., S.M. Nour, P. van Berkum, and R.K. Selander. 2005. Rhizobial 16S rRNA and dnaK genes: mosaicism and the uncertain phylogenetic placement of *Rhizobium galegae*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1328–1335.
9) Asai, T., D. Zaporojets, C. Squires, and C.L. Squires. 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.
10) Sato, N.S., N. Hirabayashi, I. Agmon, A. Yonath, and T. Suzuki. 2006. Comprehensive genetic selection revealed essential bases in the peptidyl-transferase center. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 15386–15391.
11) Kitahara, K. and T. Suzuki. 2009. The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. Mol. Cell 34: 760–766.
12) Kitahara, K., Y. Yasutake, and K. Miyazaki. 2012. Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 19220–19225.
13) Kitahara, K. and K. Miyazaki. 2011. Specific inhibition of bacterial RNase T2 by helix 41 of 16S ribosomal RNA. Nat. Commun. 2: 549.