

発表番号 27 (0519)

高度好塩古細菌リボソームの多型性とその分子解剖 —好塩微生物に学ぶ蛋白合成装置の進化—

仲宗根 薫 (近畿大学工学部)

高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株は、富山県の塩田から採取された、三角形の特異な形態を有する微生物である。本菌株は、至適塩濃度が 20% の *Haloarcula* 属に分類される古細菌であり約 15 年前に系統分類が行われたが、その分類の基礎となる 16S rDNA のデータベース情報は不完全であり、その情報の再検討の必要性があった。そこで近畿大学の仲宗根は、PCR クローニング法等、定法による 16S rDNA の塩基配列の完全決定、サザン法によるコピー数の推定、さらに *Haloarcula* 属の系統解析及び多型解析を行うことで、上記の分類における再検討の基礎を築くための研究を行った。

上記解析手法による結果から、*H. japonica* の 16S rDNA は、2 種類存在することが確認され、様々な *Haloarcula* 属を含む系統樹を作成したところ、これら情報は2つのクラスターに分かれ、A (HjaA) 及び B (HjaB) と再分類した。これら A-B 間の塩基配列の相同性の差違は 5% と大きな違いを示しており、他の微生物の例(従来は 1% 程度の差違)とは、明らかに異なる傾向を示していた。この観察結果は 2 種の 16S は rRNA は、互いに異なる

リボソーム蛋白、又は新規な蛋白と複合体を形成する可能性を示唆し、*Haloarcula* 属においては、少なくとも複数のリボソームが存在(リボソーム多様性の概念)を示唆すると同時に、「一種の細胞に一種のリボソーム」という概念から対立する考えであることを示している。

本研究では、さらにリボソームの機能研究のスタートの一環として、リボソーム蛋白遺伝子、特に S10 及び Spc オペロンをとりあげ、クローン化を行った。Degenerate PCR 法により、*H. japonica* の目的遺伝子をクローン化、塩基配列を明らかにし、またオペロン構造を解析したところ、本菌株においては、大腸菌の S10 及び Spc オペロンの両方の特徴を有するクラスターが見いだされ、このオペロン編成を古細菌全体で比較した。その結果、このオペロンは古細菌で広く保存されており、かつ *H. japonica* の S10-Spc オペロンの遺伝子編成が *H. marismortui* と同じであることが示唆された。これら研究結果は、将来における好塩酵素(蛋白)の物質生産系を構築する上での基礎を築くものである。さらに全ゲノム解析による、本菌株からの有用酵素の発見、及びゲノム資源の全貌の解明が望まれる。

助成番号 0519

高度好塩古細菌リボソームの多型性とその分子解剖 —好塩微生物に学ぶ蛋白合成装置の進化—

仲宗根 薫 (近畿大学工学部生物化学工学科)

1. 研究目的

高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株は、富山県の塩田から採取された、三角形の特異な形態を有する極限環境微生物である。本菌株は、至適塩濃度が20%の *Haloarcula* 属に分類される古細菌であり約15年前に系統分類が行われた¹⁾が、その分類の基礎となる16S rDNAのデータベース情報は不完全であり、その情報の再検討の必要性があった。また、本菌株の有する極限酵素、有用物質の生産など、好塩微生物の遺伝子及びゲノム資源の探索とその利用は、工学的に非常に重要な研究課題であり、これら有用酵素や有用物質の生産システムの確立には、蛋白合成装置であるリボソームの構造と機能の解析は不可欠であると判断される。Fig. 1に示すように、原核生物リボソームは、3種のrRNA(16S rRNA, 23S rRNA, 5S rRNA)、約55種類のリボソーム蛋白から構成される、核酸-蛋白複合体である。100Sのリボソームは、50S大サブユニット(34リボソーム蛋白 + 23S rRNA)と30S小サブユニット(21リボソーム蛋白 + 16S rRNA, 5S rRNA)に分かれ、古細菌においてもその基本構造は同様なものであると考えられる²⁾。このような背景から本研究では、16S rDNAの塩基配列の完全決定、サザン法によるコピー数の推定、さらに *Haloarcula*

属の系統解析及び多型解析を行い、さらにリボソームの機能研究のスタートの一環として、リボソーム蛋白遺伝子、特にSpcオペロンをとりあげ、クローン化を行い、それらの構造解析を行った。

2. 研究方法

2.1 高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* の培養及び染色体DNA精製

好塩古細菌 *H. japonica* (JCM7785^T)は、好塩古細菌用培地(1% Yeast Extract, 0.75% Casamino acid, 0.2% KCl, 0.3% Trisodium Citrate, 2% MgSO₄, 20% NaCl, trace amount of MnCl₂ & FeSO₄, pH 7.2)を使用し、37°C又は42°Cの条件で培養を行った¹⁾。シングルコロニーアインレーションされたプレートからシングルコロニーを50 ml培地に植菌後、5日間前培養を行った。その後、500 ml培地に1-2%の前培養菌体培養液を加え、培養を開始した。

染色体DNAの精製は、UltraCleanTM Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)を用い、添付実験マニュアルに従い *H. japonica* 染色体DNAの精製を行った。

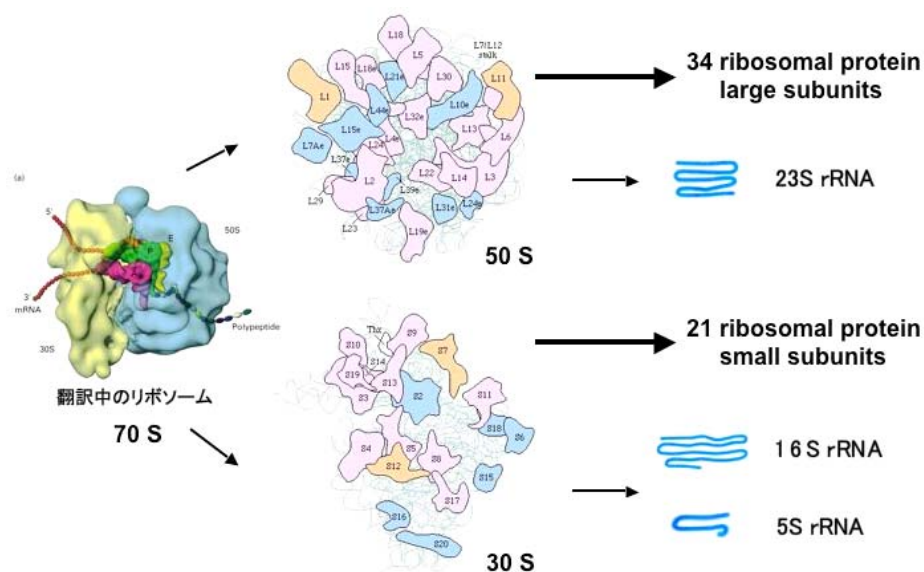


Fig. 1 Molecular anatomy of prokaryotic ribosome

2. 2 *H. japonica* の 16S rDNA 遺伝子の構造解析と系統樹の作成

高度好塩古細菌 *H. japonica* TR-1 の 16S rDNA を決定するために古細菌 16S ユニバーサルプライマーを設計 (Table 1) し、PCR にて 16S rDNA 増幅後、TA クローニングを行い、目的遺伝子産物の塩基配列決定を行った。得られた塩基配列を他の *Haloarcula* 属と比較するため、ClustalW³⁾ 及び TreeView⁴⁾ を用い系統解析及び多型性分析を行った。さらに大腸菌の 16S rRNA の二次構造に基づき、*H. japonica* の 16S rRNA の二次構造モデルを構築し、構造比較を行った。

Table 1 Oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence
ha27F	AGAGTTTGCCTGGCTCAG
ha120F	ATTCCGGTTGCCTGCCGG
ha1535F	TCCGTAGCTTGCTGTGTAAG
ha1934F	CCGGTCCCACAGTAGTAAT
ha11223F	TGCAACGCCGAAAGCGAAG
ha1336R	AGTGTAAGGTTTCGCGCC
ha1787R	TCACTACGGCACATCACGTG
ha1937R	TCATTACTACTGTCGGGAC
ha11452R	AGGAGGTGATCCAGCCGCAG

2. 3 サザン解析による 16S rDNA の染色体上のコピー数の推定

サザン解析は、常法により行ったが検出システムに関しては、DIG システムの発色法が採用された。*H. japonica* 染色体 DNA (2 mg) を、8 種の制限酵素 (*AseI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SpeI* and *XbaI*) で消化し、ナイロンメンブレンにブロットングを行った後、DIG ラベルされた 16S rDNA をプローブとして用い、ハイブリダイゼーションを行った。検出は、アルカリフォスファターゼによる NBT/X-リン酸の発色法を用いたバンドの検出を行った⁵⁾。

2. 4 *H. japonica* のリボソーム蛋白遺伝子群の取得とその構造解析

H. japonica リボソーム蛋白遺伝子群の単離は、本菌株の遺伝子ライブラリーを構築の後、プラークハイブリダイゼーション法により目的遺伝子のスクリーニングを行った。*Sau3AI* により部分消化された *H. japonica* 染色体 DNA を、ファージベクター λ DASHII の *BamHI* サイトに組み込み、その後 *In vitro* packaging によりライブラリーを作成した⁵⁾。

3 結果と考察

3. 1 *H. japonica* 16S rDNA の取得、系統解析、遺伝子のコピー数、二次構造の比較

研究目的の項目で述べたように、高度好塩古細菌 *Haloarcula japonica* TR-1 株は、約 15 年前に系統分類が行われたが、その分類の基礎となる 16S rDNA のデータベース情報は不完全であり、その情報の再検討の必要性があった。このような背景から本研究では、まずはじめに、16S rDNA の塩基配列の完全決定、サザン法によるコピー数の推定、さらに *Haloarcula* 属の系統解析及び多型解析を行った。*Haloarcula* 属の 16S rDNA 塩基配列に基づく系統解析及び多型解析から、本菌株の 16S rDNA は、2 種類存在することが確認された (Fig. 2)。また *H. japonica* においては不完全であった 16S rDNA 配列が完全なものとなり、これら情報は 2 つのクラスターに分かれ、A (HjaA) 及び B (HjaB) への再分類が可能となった。

一般的に、16S rDNA の配列は、コピー数は複数あったとしても、「一種の生物に一種存在」するのであり、その事実が微生物の系統分類の基礎を成り立たせている。しかしながら、この結果は、「1 種の生物に 2 種の 16S rRNA が存在」することを示している。この結果が、好塩古細菌の *Haloarcula* 属微生物にとって、生理学的に何らかの意味を持つと思われるが、詳細は全く不明である。16S rDNA をプローブとするサザン解析 (Fig. 3) により、*H. Japonica* ゲノム上のコピー数は、少なくとも 2 コピーであることが示唆された。近縁種で、既にゲノム解析の終了した *H. Marismortui*⁶⁾ においては 3 コピーであり、本菌株においては、今後ゲノム解析などの情報により、コピー数の確定を行っていく必要があるだろう。またこれら A-B 間の塩基配列の相同性の差は 5% と大きな違い (Fig. 4) を示しており、他の微生物の例 (従来は 1% 程度の差) とは、明らかに異なる傾向を示していた。この観察結果は 2 種の 16S rRNA は、互いに異なるリボソーム蛋白、又は新規な蛋白と複合体を形成する可能性を示唆し、*Haloarcula* 属においては、少なくとも複数のリボソームが存在 (リボソーム多様性の概念) を示唆すると同時に、「一種の細胞に一種のリボソーム」という概念から対立する考えであることを示している。

次にこれら 16S rDNA のどの部分に変化が生じているのかを知るために、*Haloarcula japonica* の *rrnA* と *rrnB* の 16S rDNA 約 1,500 bp の塩基配列を 200 bp ごとにブロッック化したのち、塩基配列の比較を行った。その結果、Fig. 4 に示されるようにある一部分、600~800 bp 付近に集中して塩基配列の違いが観察される事が明らかとなった。

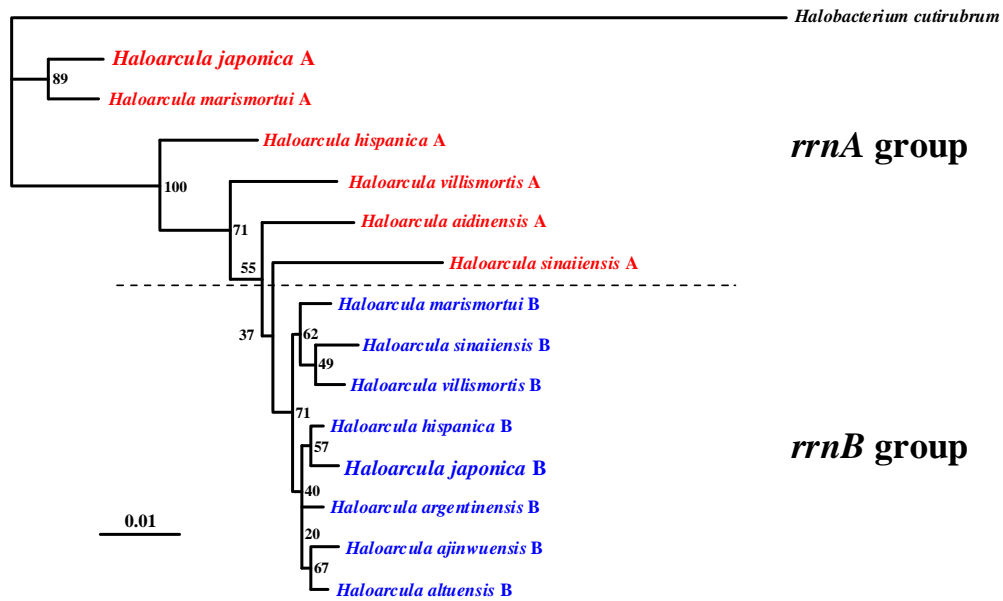


Fig. 2 Phylogenetic tree of Genus *Haloarcula* based on two types of 16S rDNA. Phylogenetic tree of Genus *Haloarcula* was constructed based on two types of 16S rDNA. *H. marismortui* *rrnA* (AF034619), *H. marismortui* *rrnB* (AF034620), *H. hispanica* *rrnA* (AB090167), *H. hispanica* *rrnB* (AB090168), *H. vallismortis* (D50851), *H. aidinensis* (AB000563), *H. sinaiensis* *rrnA* (HAC16SRR07), *H. sinaiensis* *rrnB* (HAC16SRR08), *H. argentinensis* (D50849), *H. ajinwuensis* (AY208973), *H. altuensis* (AY277585)

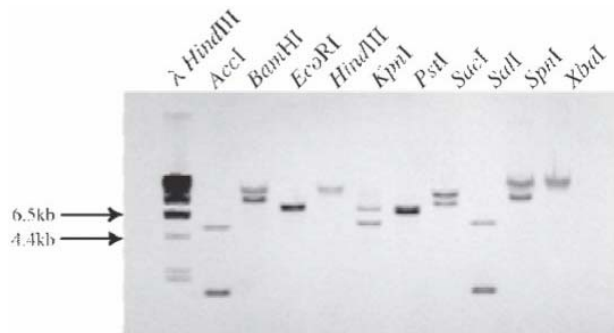


Fig. 3 Southern hybridization of chromosomal DNA from *H. japonica* with 16S rDNA probe. Chromosomal DNA (2.0 ug) from *H. japonica*, was digested with restriction endonuclease, *AscI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SpnI*, and *XbaI*, and separated by agarose gel electrophoresis. A DIG-labeled probe was prepared from *H. japonica* 16S rDNA. λ *HindIII* on the left side indicates the size maker (kb).

Table 2 Similarities of 16S rDNA(*rrnA* and *rrnB*) between *H. japonica* and *H. marismortui*.

	<i>rrnA</i>	<i>rrnB</i>
<i>rrnA</i>	98.7%	94.7%
<i>rrnB</i>	94.5%	99.1%

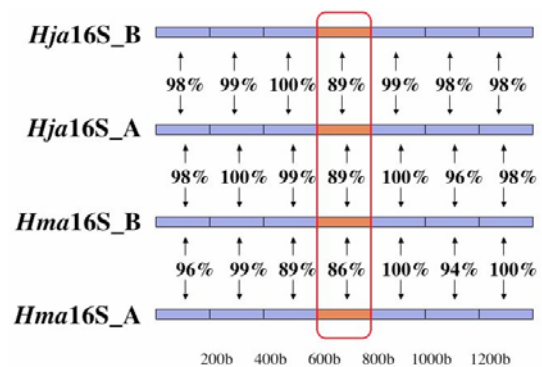


Fig. 4 Distribution of differences between *rrnA* and *rrnB* of 16 rDNA

また16S rDNAの塩基配列に違いが存在することから、二次構造にも差があるのではないかと推測し、この違いが集中して観察できた部分(600-800 bp)を中心にrRNAの二次構造予測を行い、さらに16S rDNAのどの部分に構造変化が生じているのかを解析した。二次構造の予測は、Fig. 5に示す大腸菌の16S rDNAの二次構造をモデルとし、*H. japonica*のrDNAの600-800 bpと相同性のある箇所を中心に抜き出し、二次構造の予測に用いた。

全体的に見ると基本構造はほぼ一致していたが、幾つ

かの箇所で違いが観察され、赤丸で示したようにマイナーな構造上の違いも見いだされた(Fig. 6)。これら結果は、*Haloarcula japonica*が持つこの16S rDNAは、1) 二次構造の類似性の高さから、リボソーム中でリボソームRNAとして機能しうる、2) また、その二次構造中に2カ所の部分的な違いも見出されることから、この部分に何らかの新奇(新規)な蛋白質が結合するのではないかと? 3) 従って、予想される複数のリボソーム間に何らかの使い分けがあるのではないかと?、を示唆しているだろう。

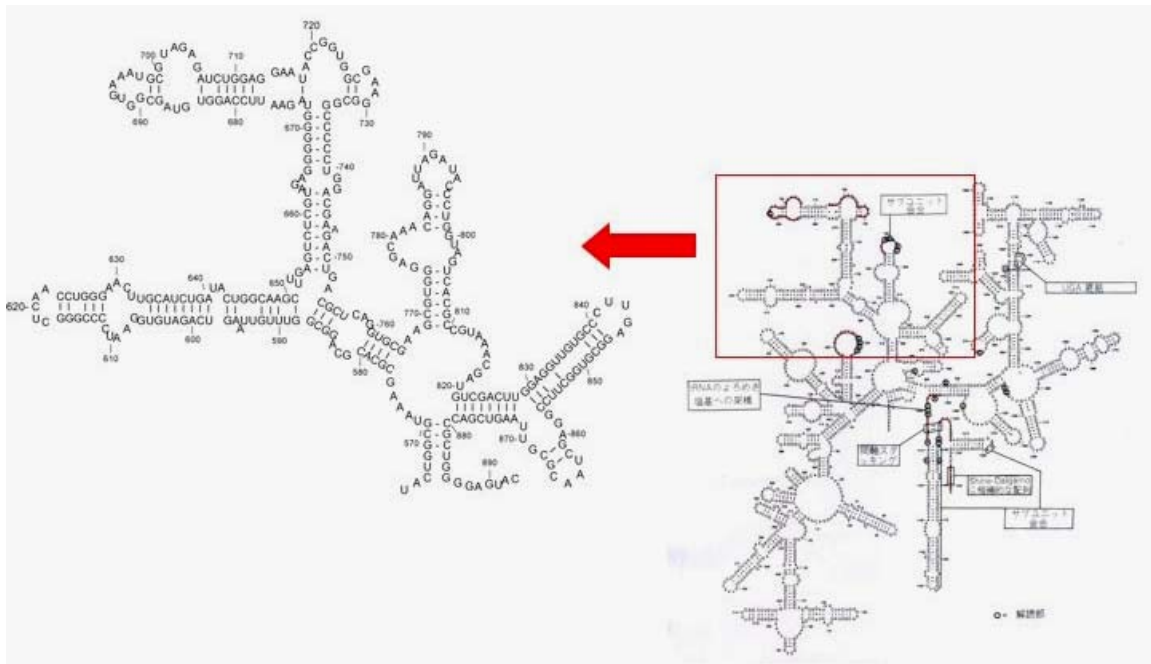


Fig. 5 Secondary structure of 16S rRNA in *Escherichia coli*

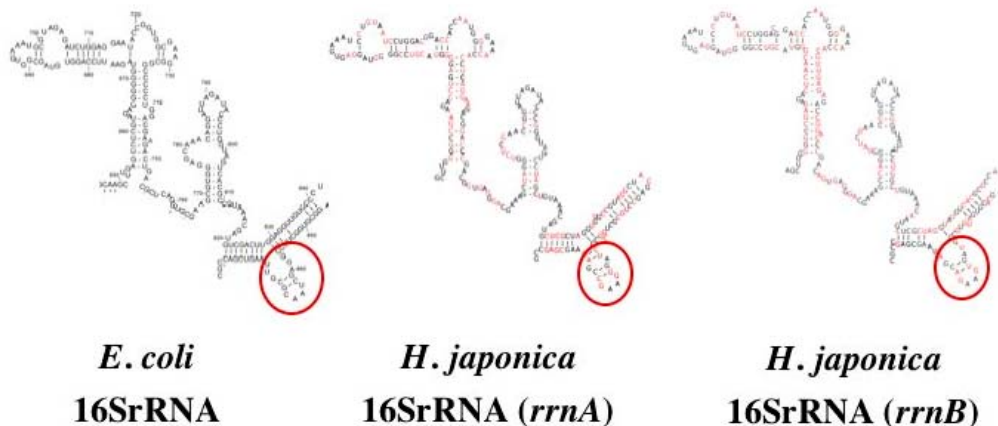


Fig. 6 Comparison of the secondary structure with that of *E. coli*

3. 2 *H. japonica* リボソーム蛋白遺伝子群取得と構造解析

さらにリボソームの機能研究のスタートの一環として、リボソーム蛋白遺伝子、特にS10及びSpcオペロンをとりあげ、クローン化を行い、それらの構造解析を行った。

ここでは、全リボソーム蛋白遺伝子のクローニングを目的とし、まず1)に本菌株の遺伝子ライブラリーの作製、様々なリボソーム蛋白質遺伝子をプローブとした目的遺伝子のスクリーニングを行いました。2)クローン化された遺伝子産物の全塩基配列決定の後、PCRによりそれらオペロン構造の確認を行い、今回はその中でもS10及びSpcオペロンの構造解析に着目しました。構造解析は古細菌間における構造比較を行うことで構造解析とした。

遺伝子ライブラリーからスクリーニングされたクローンの全塩基配列決定をし、その後その連続性をPCRにて確認した結果、これらリボソーム蛋白質の各遺伝子は、連

続していることが明らかとなった。S10 及び Spc オペロンに着目し、それらオペロンの並びをこれまでゲノム解析が終了している全古細菌類のオペロンに着目し、比較した (Fig. 7)。Fig. 7では、赤は好塩菌、緑はメタン菌、オレンジ色は高熱菌、黒は大腸菌の並びを示し、最下に示した4種類の生物以外はほぼオペロンの並びが保存されているということが確認された。

さらに上記結果に基づき、保存度の高いものを抽出し、オペロンの中の遺伝子配列を比較したところ、Fig. 8のピンクで示した高度好塩古細菌においてはすべてのオペロン構造が保存されており、メタン菌と高熱菌では同一のオペロン構造を示しているということが明らかとなった。下の4種においては遺伝子が欠失しているというような構造を示し、さらに大腸菌においては、これらL16が挿入されていたり、S4が欠失していたりと様々な遺伝子の欠失の違いが観察された。

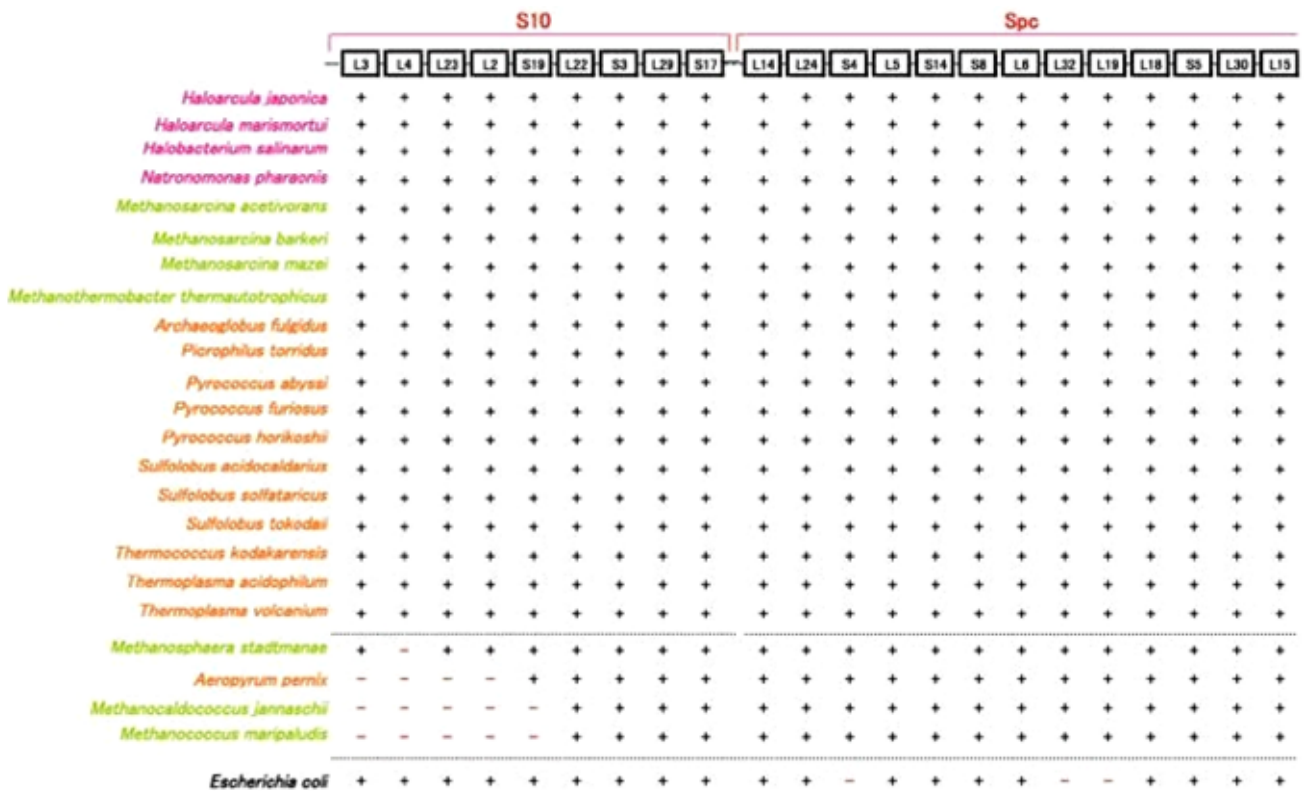


Fig. 7 Comparison of S10 and Spc clusters between several archaea

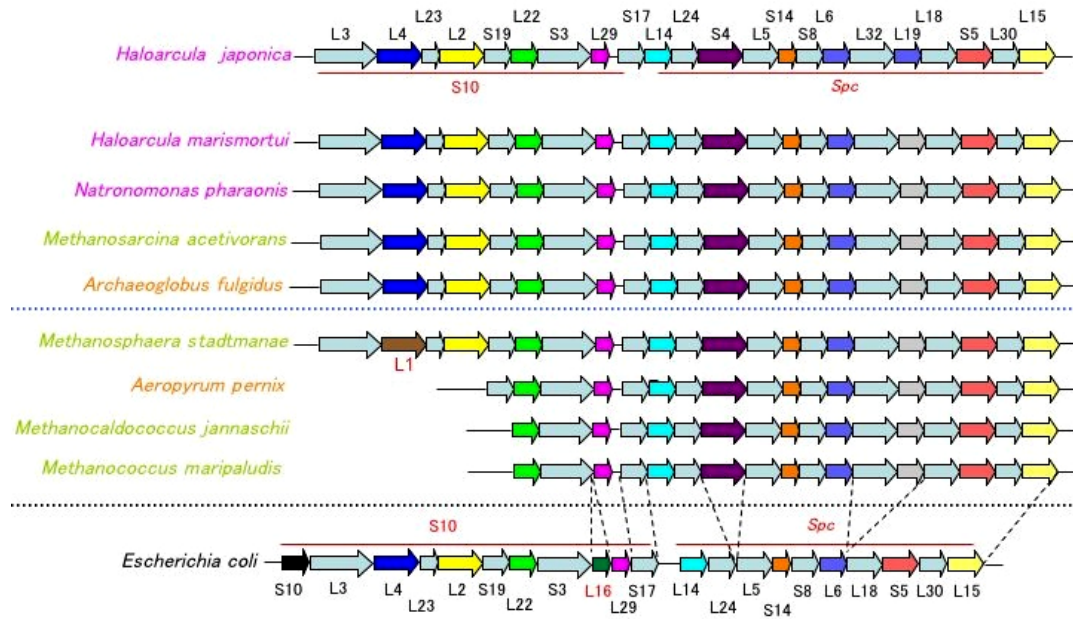


Fig. 8 Comparison of gene organization of S10 and Spc operons between several archaea

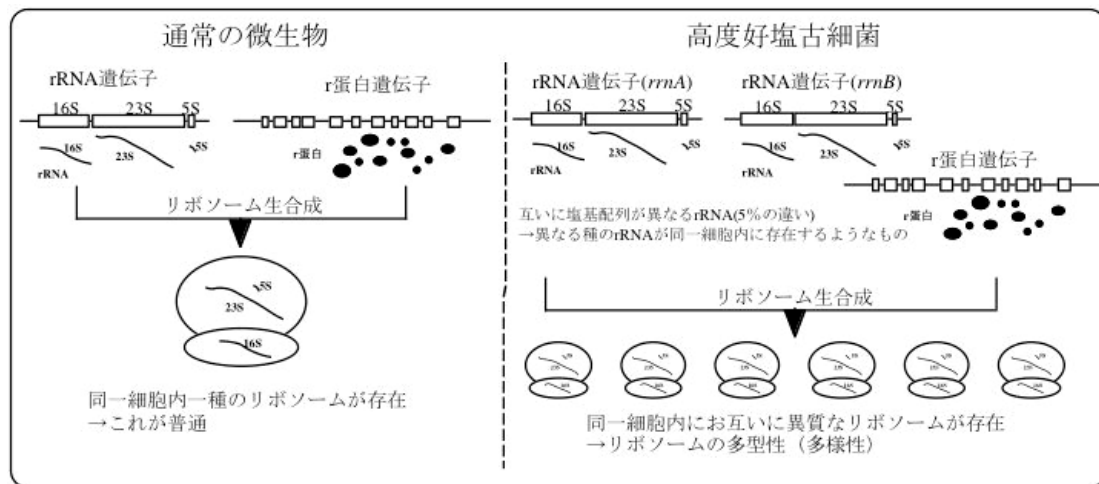


Fig. 9 *Haloarculaz* 属に観察されと思われる特殊な翻訳系の進化的存在意義

以上の結果をまとめると、高度好塩微生物に対する様々な問題的が可能になる。すなわち、1) 本菌株に見いだされた rRNA の多型性の、高塩濃度環境に対する生理学的意義、2) 特殊な翻訳系の進化的存在意義、3) 我々の物質生産システムに対する示唆; *Haloarcula* から学ぶリボソーム工学、である。特に 2) でまとめた観察結果に関しては下記の Fig. 9 にまとめた。

上記結果は、今後の好塩菌リボソームの機能解析へのスタートポイントをなすものであり、今後、リボソーム RNA、リボソームタンパク質相互作用の解析、そしてリボソームチップの作製などを行うことで、好塩菌を宿主とす

る物質生産系への応用が可能となると考えられる。

4 今後の課題

本研究結果は、さらに本菌株への全ゲノム解析研究、さらにポストゲノム解析による、日本独自のゲノム資源の確保が重要であり、本菌株は、経済産業省の重要菌株として認識され、全遺伝子情報を解明すべく、全ゲノム解析が進行中である。

謝辞

本研究にご援助いただきましたソルト・サイエンス研究財団に感謝申し上げます。

文献等

- (1) Takashina, T., Hamamoto, T., Otozai, K., Grant, W.D., and Horikoshi, K. (1990) "*Haloarcula japonica* sp. nov., a new triangular halophilic archaeobacterium." Syst. Appl. Microbiol., 13:177-181
- (2) 古賀洋介、亀倉正博 編 1998: 古細菌の生物学, 東京大学出版会
- (3) Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-80
- (4) URL:
<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- (5) 小笠原尚毅、高見英人、久原哲、服部正平 編 2001: ゲノム解析とアノテーション、学会出版センター
- (6) Baliga NS, Bonneau R, Facciotti MT, Pan M, Glusman G, Deutsch EW, Shannon P, Chiu Y, Weng RS, Gan RR, Hung P, Date SV, Marcotte E, Hood L, Ng WV. (2004) Genome sequence of *Haloarcula marismortui*: a halophilic archaeon from the Dead Sea., Genome Res. 2004 14, 2510.

0519

Polymorphism and molecular anatomy of ribosomes
in extremely halophilic archaeon
- Evolution of ribosomes based on the study of halophilic microorganisms -

Kaoru Nakasone

Department of Biotechnology and Chemistry, School of Engineering, Kinki University

Summary

In virtually all species, the sequences of multicopy of rRNA genes (rDNA) are identical or nearly identical. The molecular mechanism responsible for maintaining the sequence homogeneity has not yet been elaborated, although the necessity for such a mechanism seems obvious. The halophilic archaeon, *Haloarcula marismortui*, contains two different *rrn* operons in its genome. These two operons, designated as *rrnA* and *rrnB*, were previously cloned on separate genomic restriction fragments. The extremely halophilic triangular archaeon, *Haloarcula japonica* strain TR-1 is originally isolated from a Japanese saltern soil. Until now, however sequence determination of 16S rDNA in *H. japonica* is incomplete. In addition, copy number of the gene has not yet been estimated. To construct precise phylogenetic tree suggesting evolutionary position of the species in genus *Haloarcula*, the copy number and heterogeneity of 16S rDNA in *H. japonica* are essential.

In this study, the complete 16S rDNA sequences of the extremely halophilic triangular archaeon, *H. japonica* strain TR-1, were determined and then designated as 16S-A (*rrnA*) and 16S-B (*rrnB*). The substitutions are not uniformly distributed but rather are localized within three domains of 16S rRNA. Comparison of these two the strain TR-1 sequences to the 16S gene sequences from related halophilic genera suggests that (i) in diverging genera, mutational differences in 16S rDNA sequences are not clustered but rather are more generally distributed throughout the length of the 16S sequence and (ii) the 16SB rDNA sequence, particularly within the 508-823 domain, is more different from the out group sequences than is the 16SA rDNA sequence. Several possible explanations for the evolutionary origin and maintenance of this sequence heterogeneity within 16S rRNA of *H. japonica* will be discussed.