

進化系統分類の指標となる 16S rRNA 遺伝子の進化的な中立性を実験的に証明 — 指標としての適性を検討するための重要な事実も同時に発見 —

平成 29 年 8 月 30 日

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

国立大学法人 北海道大学

■ ポイント ■

- ・ 進化系統分類上、大きく離れた 2 種類のバクテリアの 16S rRNA の機能が同等であることを発見
- ・ 原核生物の進化系統分類の指標である 16S rRNA 遺伝子が中立進化していることを世界で初めて証明
- ・ 16S rRNA 遺伝子の進化様式として「ゆりかごモデル(Cradle model)」を提唱

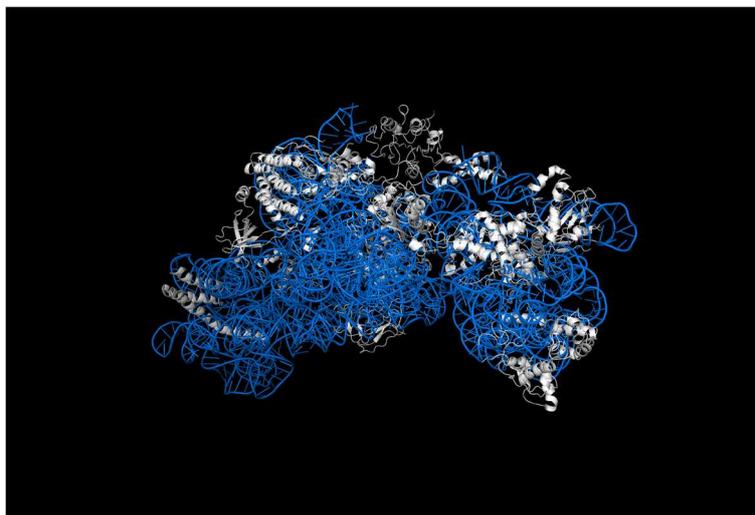
■ 概要 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所【理事長 中鉢 良治】(以下「産総研」という)生物プロセス研究部門【研究部門長 田村 具博】合成生物工学研究グループ 宮崎 健太郎 研究グループ長(東京大学大学院新領域創成科学研究科 客員教授)は、佃 美雪 元産総研技術研修員(兼)元東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程学生(現:花王株式会社安全性科学研究所)、北海道大学【総長 名和 豊春】大学院理学研究院 北原 圭 特任助教らの協力を得て、バクテリア系統分類の最上位である門レベルで相異なる2種のバクテリアの**リボソームに含まれる16SリボソーマルRNA(rRNA)の比較機能解析**を行い、16S rRNA遺伝子間の配列の違いの大半が機能に大きな影響を及ぼさないことを発見し、16S rRNA遺伝子が**中立進化**していることを証明した。

この成果は、この遺伝子が**進化系統解析**に用いられる**分子時計**の基本的要件である「進化的な中立性」を満たしていることを、世界で初めて実験的に示したものである。解析結果から、リボソームの進化においては生物種に特異的な塩基配列の変異の大半は、リボソームの機能には影響を及ぼさないことが示唆された。一方、この事実は、生物種間での16S rRNAの組み換えが比較的自在であるということを示唆しており、分子時計としての16S rRNA遺伝子の適性を検討する上での重要な知見として活用されることが期待される。

この研究の詳細は、2017年8月30日(英国時間)に英国科学雑誌 *Scientific Reports* にオンライン掲載された。

_____ は【用語の説明】参照



リボソームの 30S サブユニットの立体構造 (青: 16S rRNA、白: 21 種類のリボソームタンパク質)
RNA を中心にタンパク質が密に相互作用しながら取り囲む極めて複雑な構造をしている。

■ 開発の社会的背景 ■

微生物の進化系統関係を明らかにすることは、生命の誕生とその後の進化過程を解明する上で重要な手がかりを与える。しかし、微生物は動植物と異なり化石がほとんど存在しないため、化石によって系統進化の歴史を推定することは非常に難しい。そのため、微生物の系統関係はこれまで、分子の系統関係で議論されてきた。生物の系統進化を正確に反映する「分子マーカー(分子時計)」の要件は、(1)どの生物にも必ず存在すること、(2)生物種に固有であること、(3)機能が生物種によらず同等であること、(4)進化速度(遺伝子の変異する速度)が生物種や生育環境によらず一定であることが挙げられる。しかし、これらをすべて満たす分子は皆無に近い。

rRNA はすべての生物に必ず存在する生体高分子であり、中でも、16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子は、分子時計と見なされており、原核生物の進化系統分類の指標として用いられている。これまで、遺伝子が持つ約 1500 塩基から構成される配列の類似度に基づいて微生物の系統分類がなされてきた。しかし、16S rRNA が分子時計としての要件、特に(3)および(4)の要件を満たすかどうかは、これまで実験的に検証されていない。

■ 研究の経緯 ■

リボソームは生体内で遺伝情報をもとにタンパク質を合成する翻訳装置であり、16S rRNA はその小サブユニットの中心骨格を形成する分子である。産総研では、16S rRNA を生物種間で交換する遺伝学的手法を開発してリボソームが翻訳以外の機能(RNA 分解酵素阻害活性)を持つことを発見した(2011年11月23日 産総研プレス発表)。また、大腸菌とは進化系統分類の「綱」のレベルで異なる生物種の 16S rRNA が、大腸菌の 16S rRNA と機能的に同等であることを明らかにし(2012年10月30日 産総研プレス発表)、生物種に固有という 16S rRNA に対する考え方を一変させた。

今回、大腸菌の 16S rRNA と機能的に互換である 16S rRNA の系統範囲を明らかにするため、環境ゲノム(メタゲノム)由来 16S rRNA 遺伝子を用いて大規模な機能スクリーニングを行った。なお、この研究開発は、独立行政法人 日本学術振興会の科学研究費助成事業 基盤研究 (B) 「大腸菌リボソームの可塑性と表現型進化の機構解明」(平成26~28年度)、科学研究費助成事業 挑戦的萌芽研究「rRNA の置換変異によるリボソーム可塑性の研究」(平成24~25年度)、科学研究費助成事業 新学術領域研究「翻訳システム改変による人工細胞創成」(平成24~25年度)による支援を受けて行った。

■ 研究の内容 ■

16S rRNA 遺伝子は細胞の生育に不可欠であり、導入した 16S rRNA が機能しないと細胞は生育しない。今回の研究では、16S rRNA 遺伝子が欠損している大腸菌に、環境ゲノム由来の 16S rRNA 遺伝子を導入したところ、プロテオバクテリア門に分類される大腸菌の 16S rRNA 遺伝子を、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(NS11 と命名)と入れ替えても大腸菌が生育することが確認された。しかし、NS11 を導入した大腸菌 変異株 では、増殖能の低下、すなわち 増殖倍加時間の伸長 が観察された(図 1)。

NS11 と大腸菌 16S rRNA 遺伝子は、配列全体にわたって 334 塩基の違いがあるが、増殖能の低下を招いた領域を大まかに探るために、キメラ解析を行った。16S rRNA は 4 つの ドメイン から構成されるが、NS11 の各ドメインを大腸菌のものと置き換えた結果、一部のドメインを置き換えることで、元の大腸菌の 16S rRNA と同等のレベルまで増殖倍加時間が短縮した。さらに、このドメインにおける塩基配列のうち、NS11 と大腸菌で比較して機能的に重要であると考えられる 4 つの塩基を絞り込み、NS11 におけるそれら(A1416-U1484)を大腸菌のもの(G1416-C1484)と置換して相補試験を行ったところ、元の大腸菌と同様のレベルまで増殖倍加時間が短縮した。

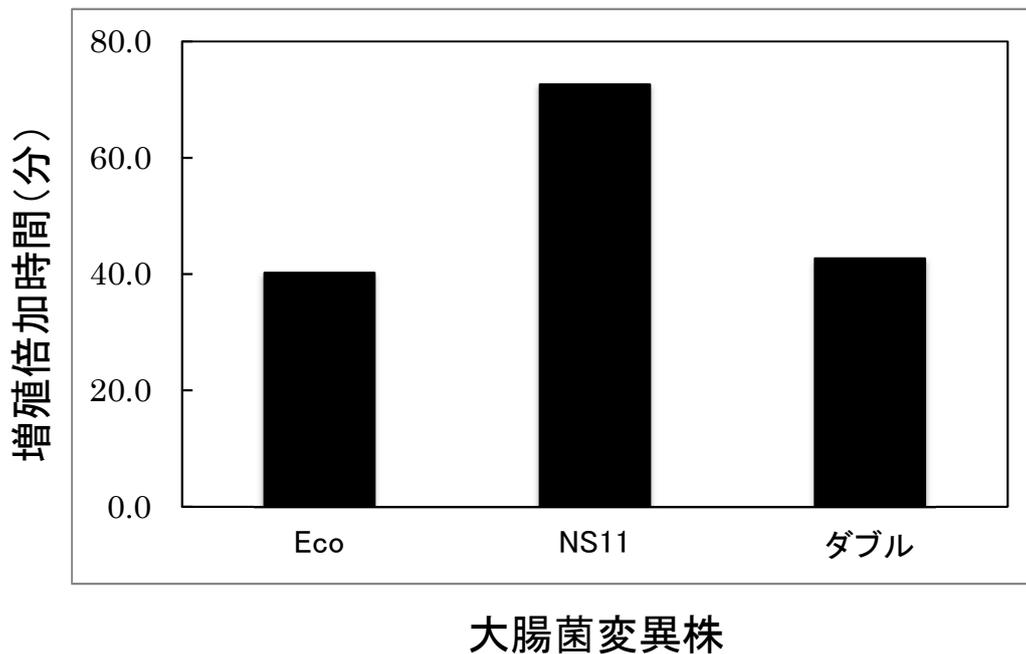


図 1 さまざまな 16S rRNA を含む大腸菌の増殖倍加時間

大腸菌固有の 16S rRNA (図中、Eco と表記) に対して、アシドバクテリア門由来の 16S rRNA (図中、NS11) を含む大腸菌変異株の増殖能は低下する (増殖倍加時間の伸長) が、A1416-U1484 二塩基 (一塩基対) を大腸菌型の G1416-C1484 に置換した変異株 (図中、ダブル) では増殖能は回復する (増殖倍加時間の短縮)。

この結果は、プロテオバクテリア門の大腸菌 16S rRNA 遺伝子とアシドバクテリア門由来の NS11 を分かつ塩基配列の違いの大半 (99.4 %) は、生育に影響を及ぼさないことを意味する。すなわち、両生物は共通の祖先型 16S rRNA を共有し、それぞれが系統に特異的な変異を蓄積してきたが、それらの大半が機能に影響を及ぼさない「中立変異」であり、16S rRNA が分子時計として必要な要件の一つを持っていることが実験的に初めて証明された。

今回の結果をもとに、リボソームの進化モデルとして「ゆりかごモデル (Cradle model)」を提唱している。このモデルでは、機能に必要な rRNA とタンパク質との相互作用は門レベルでの分化以前に共通祖先の段階で形成され、その後の種分化過程でも引き継がれた。生物種に特異的な変異の大半は機能に無関係である (図 2)。このモデルであれば、今回の結果のように、生物種間で 16S rRNA の組み換えが比較的自在に行える (水平伝播が起きやすい) こともよく説明できる。一方で、分子時計として 16S rRNA が持つとされている別の要件「種固有性」に対しては疑問を呈する結果となった。今後、16S rRNA 遺伝子の水平伝播の可能性やその頻度について明らかにする必要がある。

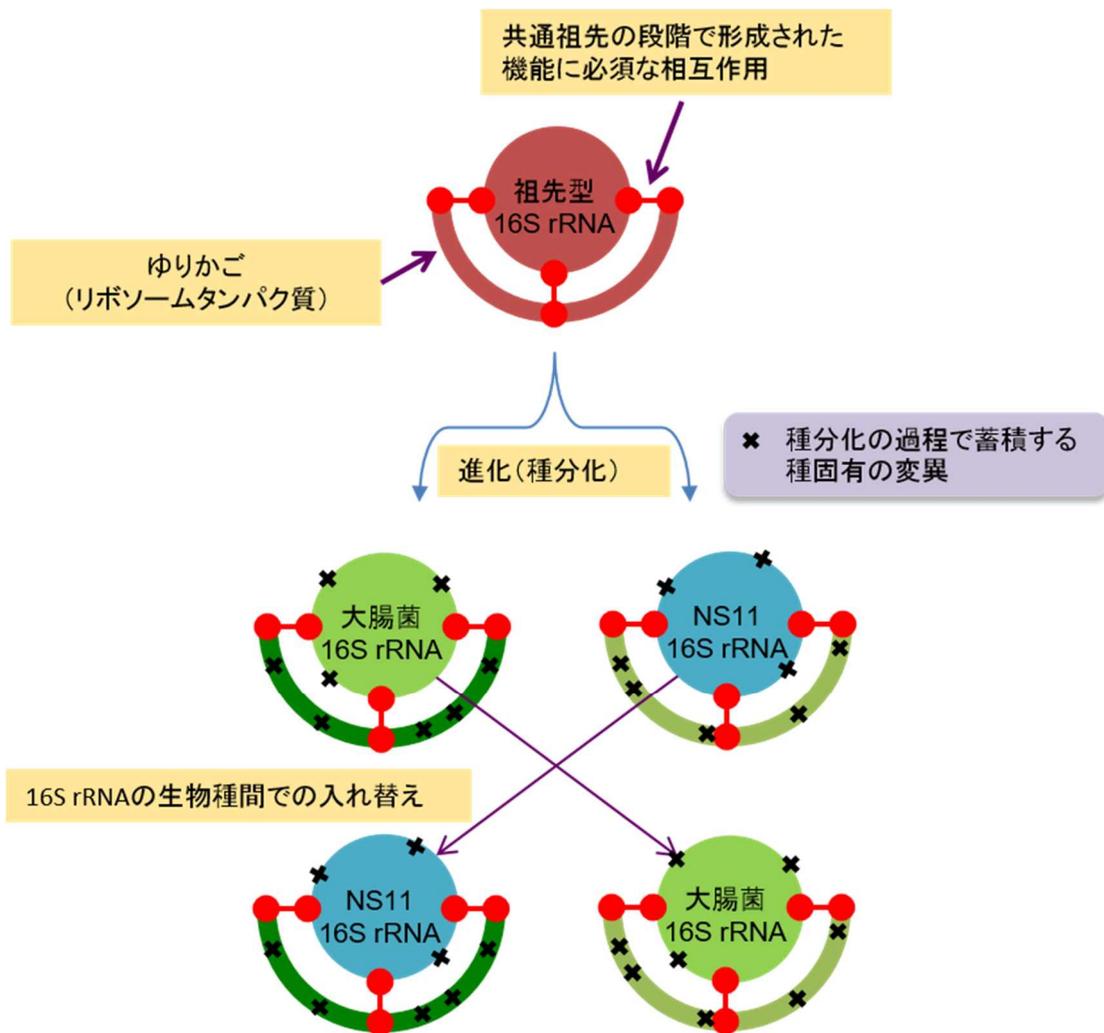


図2 リボソーム進化のゆりかご (Gradle) モデル

祖先型リボソームは進化の過程で生物種に特異的なさまざまな変異を蓄積するが、その変異により機能発現に必要な相互作用（図中の●●）が破壊されることはない。このため、RNAを生物種間で入れ替えても相互作用は維持され、リボソームがもつ翻訳活性機能も維持される。

■ 今後の予定 ■

今後は、アシドバクテリア門以外のバクテリアの各門の個別機能解析などにより、今回の結果で示唆されたりリボソームの基本的な構造の形成段階が、バクテリア種分化におけるどの段階で生じたのかを検証する予定である。

■ 本件問い合わせ先 ■

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

生物プロセス研究部門 合成生物工学研究グループ

研究グループ長 宮崎 健太郎

〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第六

TEL: 029-861-6897 FAX: 029-861-6897

E-mail: miyazaki-kentaro@aist.go.jp

【取材に関する窓口】

国立研究開発法人 産業技術総合研究所 企画本部 報道室

〒305-8560 茨城県つくば市梅園 1-1-1 中央第1

つくば本部・情報技術共同研究棟 8F

TEL:029-862-6216 FAX:029-862-6212 E-mail:press-ml@aist.go.jp

国立大学法人北海道大学総務企画部広報課

〒060-0808 北海道札幌市北区北8条西5丁目

TEL:011-706-2610 FAX:011-706-2092 E-mail:kouhou@jimuhokudai.ac.jp

【用語の説明】

◆門、綱

細菌(バクテリア)の分類階級は上位から、門(phylum)、綱(class)、目(family)、科(order)、属(genus)、種(species)に分けられており、門は最上位の分類群、綱は門に次いで上位の分類階級にあたる。

◆リボソーム

DNAからRNAへと「転写」された遺伝情報をタンパク質へと「翻訳」する機能を担う細胞小器官。大小2つのサブユニット、3つのリボソーマルRNA(rRNA)と57のタンパク質から構成される非常に複雑な超分子複合体である。

◆16S リボソーマルRNA(16S rRNA)

原核生物(バクテリアなど)のリボソームの30Sサブユニット(小サブユニット)に含まれるリボソーマルRNA。約1500塩基からなる。適度な情報量と種に固有な特性から、微生物の進化系統解析に用いられる。

◆中立進化

遺伝子の進化において、機能に有利でも不利でもない変異により塩基配列が変化すること。

◆進化系統解析

生物進化の視点から生物の類縁関係を明らかにする解析。系統とは進化の道筋のことをいい、生物間で異なるさまざまな性質を基に、その道筋をたどり、生物の類縁関係を明らかにする。近年では、系統分類指標となる遺伝子(リボソームをコードする遺伝子など)の配列情報から、生物の類似性、近縁関係を調べる手法が用いられている。細菌の場合、16S rRNA遺伝子情報が主要な指標となっている。

◆分子時計

化石のない生物の系統進化の歴史を推定するには、生物個体ではなく、それに含まれる分子(遺伝子あるいはタンパク質)に着目する。進化に伴い生じる分子(遺伝子あるいはタンパク質の配列)の変化の度合いが一定であれば、あたかも正確に時を刻む「時計」のようにみなすことができることから、こうした分子を分子時計(進化系統解析における分子マーカー)と呼ぶ。

◆翻訳

DNAからRNAへと転写された核酸の遺伝情報を機能分子であるタンパク質へと変換すること。

◆環境ゲノム(メタゲノム)

環境中には多種多様な微生物が生息するが、個々の微生物を分離することなく、環境試料全体から抽出した微生物ゲノムのこと。

◆変異株

元々の生物(野生株という)に対し、異なる遺伝子を含む生物を変異株という。

◆増殖倍加時間

大腸菌は細胞分裂により増殖するが、増殖倍加時間は、一つの個体が二つの細胞に分裂するまでに要する時間をいう。増殖倍加時間が短いほど、生育が良好であるといえる。

◆キメラ解析

遺伝子の一部の領域を他の生物種の遺伝子と組換えて作成されたキメラ分子の機能解析を行う手法。

◆ドメイン

16S rRNAは、4つの構造単位が組み合わさって構成されている。この構造単位をドメインと呼び、それぞれ5'ドメイン、セントラルドメイン、3'メジャードメイン、3'マイナードメインと名付けられている。

◆水平伝播

遺伝子は通常、親から子へと垂直に伝播される。これに対し、生物もしくは生物種の壁を超えて遺伝子の移動が起きる場合があり、これを遺伝子の水平伝播と呼ぶ。