

立教大学学術推進特別重点資金 (立教 S F R)
 大学院生研究
 2007年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院		理学研究科	生命理学専攻
指導教員	所属・職名		氏名	
	理学部・教授		河村 富士夫 印	
自然・人文の別	○自然・人文		個人・共同の別	○個人・共同名
研究課題名	生物進化に伴う rRNA オペロンのコピー数増大とその機能の解明			
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年		氏名	
	理学研究科・生命理学専攻・博士前期課程2年		佐藤 牧子 印	
研究組織	在籍研究科・専攻・学年		氏名	
研究期間	2007 年度			
研究経費	496,064 円			

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

本研究では、枯草菌ゲノムが有する 10 コピーの rRNA オペロン (*rrnO*, *A*, *J*, *W*, *I*, *H*, *G*, *E*, *D*, *B*) 機能がそれぞれに相違があるのか否かを明らかにすることを目的としており、SFR 交付期間中においては申請者が中心となって構築した *rrnO* オペロンのみを有する株 (*rrnO* + 株) を用い、*rrnO* オペロンの機能を明らかにすることである。そのため、*rrnO* + 株から新たにサプレッサー変異株を単離し、その変異部位を同定することで詳細な *rrnO* 機能を明らかにすることを目的とした。また、野生株と同程度の表現型を示す *rrn* オペロンのコピー数を決定することにした。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[リボソーム] [rRNA] [枯草菌]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

＜ S F R の 交 付 期 間 内 実 験 計 画 ＞

当研究室ではこれまでに、*rrnO*、*A*、*J*、*I*、*E*、*D*、*B* オペロンをそれぞれ 1 個のみ有する株はすべて、野生株よりも 70S リボソームの形成量が著しく低下し、それに伴い細胞の増殖速度が低下しており、かつ、自然形質転換能、胞子形成能が野生株に比べ低下していることを明らかにしていた。さらに、こうした機能低下はすべての株において同等ではなく、細胞の増殖速度に関しては *rrnB* オペロンのみを有する変異株が最も遅く、胞子形成能に関しては *rrnD* オペロンのみを有する変異株が最も低い、という表現型を示すことを見出していた。そこで、申請者は、各 *rrn* オペロンには機能の相違があり、枯草菌が有する 10 コピーの *rrn* オペロンの存在意義を明らかにするためには、それぞれの *rrn* オペロンをより詳細に解析することが必要であると考えた。そこで、まず、DNA 複製の起点である *oriC* に最も近い *rrn* オペロンである *rrnO* オペロンの機能は極めて重要であると予測し、*rrnO* 1 個のみを有する株 (*rrnO*+株) に焦点を絞って解析を行うことにした。そのため、本研究では、*rrnO*+株からサプレッサー変異株を単離し、その変異部位を特定することにより、その遺伝子、もしくは遺伝子産物と *rrnO* オペロンとがどのような機能関与をしているのかを解析することで、*rrnO* オペロンのより詳細な機能を明らかにすることを第一の目標とした (下記の研究結果 1)。

一方で、野生株と同様な表現型を示す rRNA オペロンの最少の数を明らかにし、生物進化に伴う rRNA オペロンのコピー数増加の過程を実験室のレベルで検証、実証することを試みた (下記の研究結果 2)。

＜研究結果 1＞

***rrnO* オペロン 1 個のみを有する株から単離したサプレッサー変異株の単離と変異部位の同定**① *rrnO* オペロン 1 個のみを有する株からのサプレッサー変異株の単離

サプレッサー変異株の単離を行なうにあたり、得られるサプレッサー変異株の変異部位が *rrnO* 内、もしくはその近傍に生じているか否かを遺伝学的に検討するため、*rrnO*+(RIK543 株)の *rrnO* プロモーターと 16S rRNA の間にカナマイシン耐性遺伝子を導入した株を構築した (RIK566)。次に、サプレッサー変異株を単離するため、RIK566 株を LB 培地で 24 時間培養した後、LB 寒天培地に塗布した。その結果、増殖速度が回復したサプレッサー変異株を単離することができた。さらに、得られたサプレッサー変異株のコロニーの大きさの違いから、大別して 4 種に分類可能であることが分かった。これらを LB 培地、37℃にて生育曲線を測定した結果、コロニーの形態が最も小さい株は増殖速度の回復度合いが一番小さいことが分かった。次に、4 種のサプレッサー変異株のリボソーム量を検討するため LB 培地、37℃にて対数増殖期 (約 OD₆₀₀=0.2) まで培養した細胞をショ糖密度勾配超遠心法により解析したところ、細胞の増殖速度に呼応してリボソームの形成量が回復していることを明らかにした。

② サプレッサー変異部位の同定

得られた 4 種のサプレッサー変異株の変異部位の同定を行うため、まず、カナマイシン耐性遺伝子を指標とし、変異部位が *rrnO* 内もしくはその近傍に生じているかを検討した。その結果、変異部位はすべて同領域には存在しないことが分かった。また、これらのサプレッサー効果の要因は *rrnO* 以外の *rrn* オペロンのコピー数増加でないことも確認した。さらに、変異が生じていると推測されたリボソームのアッセムブリーや翻訳等に関与する因子、また、RNA ポリメラーゼをコードする遺伝子内に変異部位が生じているか否かに関して DNA シークエンサーを用いて変異部位の特定を試みたが変異部位を発見することができなかった。そのため、SFR 交付期間中においては変異部位の同定を行うことができなかった。しかしながら、この変異部位を同定できれば

研究成果の概要 つづき

その遺伝子、もしくは遺伝子産物と *rrnO* オペロンとがどのような機能関与をしているのかを明らかにすることができ、*rrnO* オペロンのより詳細な機能を解明することが可能であるので本解析を引き続き行う必要がある。

<研究結果 2>**野生株と同様な表現型を示す rRNA オペロン数の決定**

前述したように、これまでの当研究室の解析結果から、リボソーム量は *rrn* オペロンのコピー数に依存しており、正常な増殖速度と細胞分化には複数個以上の *rrn* オペロンが必須であることが分かっている。そこで、*rrn* オペロンを組み合わせた株を構築して、野生株と同様な増殖速度、胞子形成能に必要な最少の *rrn* オペロンのセットを明らかにすることにした。そのために、まず 2 コピーの *rrn* オペロンを有する株 (*rrnO* と *rrnE* オペロンを有する株 (*rrnO*⁺*E*⁺株)) を構築し、その株について解析を行った。

① *rrnO*⁺*E*⁺株の構築

rrnO⁺*E*⁺株を構築するため、形質転換法を用い *rrnE*⁺株を受容菌として *rrnO* オペロンを復帰させることにした。そこで、まず、薬剤耐性マーカーによる選択を可能にするため *rrnO*⁺株の *rrnO* オペロン領域の下流領域にスペクチノマイシン耐性遺伝子を導入した株を構築した。次に、この株から抽出した DNA を *rrnE*⁺株に形質転換し、スペクチノマイシン耐性となった形質転換体を選択した。得られた形質転換体が目的とする *rrnO*⁺*E*⁺株であるか否かを調べるため、DNA を抽出し PCR 法により *rrnO* オペロンが復帰しているか否か、また、他の箇所では *rrnO* オペロンが復帰していないか否かを解析した。その結果、得られた形質転換体は目的とした *rrnO*⁺*E*⁺株であることが分かり、2 コピーの *rrn* オペロン (*rrnO* と *rrnE* オペロン) を有する菌株の構築に成功した。

② *rrnO*⁺*E*⁺株の細胞増殖速度およびリボソーム量の測定

上記で得られた *rrnO*⁺*E*⁺株を LB 寒天プレートに塗布したところ、*rrnO*⁺*E*⁺株は *rrnO*⁺株および、*rrnE*⁺株に比べ増殖速度が速く、コロニーの形態も異なることが分かった。次に、*rrnO*⁺*E*⁺株の生育曲線を調べるため LB 培地 37℃において培養したところ、*rrnO*⁺株に比べ、細胞の増殖速度が著しく回復していることが分かった。しかしながら、その増殖速度は野生株程ではなく、野生株と *rrnO*⁺株および、*rrnE*⁺株の中間の速度であることが分かった。次に、*rrnO*⁺*E*⁺株の細胞内のリボソーム量を測定し、野生株、*rrnO*⁺株、*rrnE*⁺株とのリボソーム量を比較するため、これらの菌株を LB 培地、37℃にて対数増殖期(約 OD₆₀₀=0.2)まで培養し、これらの細胞粗抽出液をショ糖密度勾配超遠心法により解析した。その結果、*rrnO*⁺*E*⁺株のリボソーム量は生育曲線に呼応しており、*rrnO*⁺株や *rrnE*⁺株よりは多いが、野生株よりは少ないという結果を得た。これらの結果から、野生株と同様な表現型を示すのに必要な *rrn* オペロンのコピー数は 2 つ以上必要であることが推測できる。

今後は、*rrnO*⁺*E*⁺株の胞子形成能の測定に加え、*rrn* オペロンのコピー数を 3 コピー、または 4 コピーを有する株を構築し、細胞増殖速度、リボソーム量、胞子形成能を測定する必要がある。さらに、こうした解析を行うことで、未だ明らかにされていない生物進化に伴う *rrn* オペロンのコピー数増大の機構を研究室レベルでの解明が可能になることが期待できる。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

①雑誌論文

‘Multiple rRNA operons are required for efficient sporulation as well as growth in *Bacillus subtilis*’ の表題で投稿準備中 (2008年3月現在)

④学会発表

2007年6月27日 (ポスター発表)

FUNCTIONAL GENOMICS OF GRAM-POSITIVE MICROORGANISMS 4th International Conference on Functional Genomics of Gram-Positive Microorganisms

‘Isolation and characterization of a temperature-sensitive mutant of the *rlpB* gene encoding the L2 ribosomal protein, and its suppressor mutant in *Bacillus subtilis*.’

2007年9月21日 (口頭発表)

日本遺伝学会第79回大会「枯草菌における単一 rRNA オペロン保有変異株とそのサプレッサー変異株の機能解析」

2008年3月28日 (口頭発表)

日本農芸化学会2008年度大会「枯草菌における単一 rRNA オペロン保有変異株の構築と解析」