慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	極限環境に生息する微生物のRNA遺伝子解析
Sub Title	
Author	村上, 慎之介(Murakami, Shinnosuke) 冨田, 勝(Tomita, Masaru)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2009-10
Jtitle	研究会優秀論文
JaLC DOI	
Abstract	古細菌の研究は生物の起源や進化を解明するうえで非常に重要である。tRNA遺伝子は地球上の全生物がもっている重要な遺伝子であるが，古細菌のtRNAの遺伝子構造は複数のイントロンを含むものや，複数に分断されたものなど多様性に富んでいる。しかし解析に必要なゲノム情報は乏しい。そこで沖縄トラフ深海底土と鶴岡市湯野浜温泉源泉水のサンプルから網羅的に系統解析を行ったところ，新タイプのtRNA遺伝子を発見した。
Notes	先端生命科学プロジェクト2009年度春学期
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=0302-0000-0624

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

SFC-SWP 2009-S-003

研究会優秀論文

極

限環境に生息する微生物のRNA遺伝子解析

2009年度　春学期
SPRING

村上慎之介　環境情報学部 3年

先端生命科学プロジェクト

慶應義塾大学湘南藤沢学会

Keio SFC Academic Society

研究会優秀論文推薦のことば

村上君は極限環境とよばれる深海の熱水噴出孔や地下250～1000mにおける温泉の泉源等に生育する細菌群の遺伝子解析を行いました．その結果，これまでほとんど知られていない古細菌の存在を明らかにし，また新しい転移RNA（tRNA)遺伝子のタイプを見出すことになりました．本研究は，1人の学生が実験材料のサンプリング，遺伝子解析実験からコンピュータを用いたデータ解析までを一貫して行っており，生物学的と情報科学の両面性を持ったすばらしい研究です。

慶應義塾大学
環境情報学部教授
冨田　勝

極限環境に生息する微生物のRNA遺伝子解析

環境情報学部　3 年
村上　慎之介
t07795sm@sfc.keio.ac.jp

要旨

地球上には多種多様な生物が生息しており，それらは真核生物，バクテリア，古細菌の 3 つに大別できる．中でも古細菌は深海や温泉の源泉のような高温・高圧・低 pH などの極限環境を好む微生物であり，原始生物の様相を今なお残していると考えられていることから，古細菌の研究を行うことは生物の起源や進化を解明する上で非常に重要である．また，転移 RNA (transfer RNA , tRNA)はゲノムに記録されているタンパク質の設計図からタンパク質を合成する際に必要不可欠な分子であり，地球上の全生物が共通してもっている重要な遺伝子であるが，古細菌 tRNA の遺伝子構造は多様性に富んでいる．すなわち，通常は単一の遺伝子としてゲノムにコードされているが，古細菌では複数のイントロンを含むものや，別々の 2,3 の遺伝子に分断されてコードされるものがある．古細菌で複雑に分断された tRNA 遺伝子が発見されたことで，tRNA 遺伝子の特徴を再解析する必要が出てきたが，現在ゲノム情報が公開されている古細菌はわずかに 60 種程度であり，既存のゲノム情報から古細菌の tRNA 遺伝子について議論するには情報量が圧倒的に不足している状況である．そのためゲノム情報が未知な古細菌が生息していると思われる環境サンプルから，tRNA 遺伝子だけを選択的かつ網羅的に取り出し，その特徴を探ることにした．

我々は環境サンプルとして沖縄トラフ深海底土，及び山形県鶴岡市にある湯野浜温泉の源泉水の 2 つを用いた．まずサンプル中に存在する生物種を 16S rRNA 遺伝子の解析によって調査したところ，沖縄トラフ深海底土には海洋性古細菌のグループに属すると考えられるゲノム未知な古細菌が多種類生息していることが示唆された．一方湯野浜温泉源泉水には南アフリカの金山で発見されたゲノム未知な古細菌と同じ古細菌が生息している可能性が示唆され，地球規模で相同な古細菌が見つかるという興味深い結果を得た．これらのゲノム未知な古細菌が多数生息していることがわかったサンプルから網羅的に tRNA 遺伝子の系統解析を行ったところ，古細菌の遺伝子のように分断されていながらバクテリアの遺伝子に近い tRNA 遺伝子を発見した．また，どの既存の古細菌の tRNA 遺伝子よりもバクテリアの遺伝子と相同性の低い tRNA 遺伝子も発見することができた．

Keywords : tRNA，メタゲノム，古細菌，系統解析

1. 序論

tRNA (transfer RNA) は mRNA (messenger RNA) をタンパク質に翻訳するために必要不可欠な non-coding RNA である．多くの tRNA 遺伝子は 70～80 塩基の tRNA を直接コードしているが，真核生物と古細菌ドメインではスプライシングエンドヌクレアーゼで切り取られるタイプのイントロンが，真正細菌ドメインではグループ I イントロンを介在する tRNA が知られており[1]，特に古細菌ドメインでは複数のイントロンが様々な箇所に介在している tRNA や split tRNA と呼ばれる 2 つ以上の異なる遺伝子に tRNA がコードされているユニークな例が発見されている[1～4]．また tRNA は翻訳装置であるリボソームに取り込まれるためにクローバーリーフ構造という独特な立体構造を形成する必要があると考えられており[5]，既存の tRNA は全てクローバーリーフ構造を形成することが可能である．しかし tRNA に関連する酵素の多くは tRNA の上半分で tRNA を認識しているため[6]，tRNA はクローバーリーフ構造を取らなくても機能する可能性がある[7]．また，*Drosophila* において細胞内で大きな 2 つのヘアピンループ構造とクローバーリーフ構造を行き来する tRNA 分子も発見されており[8]，このような tRNA の構造と機能に関する新しい情報の蓄積により，あらためて tRNA の原型はどのような形をしていたのかということが議論されている．

そこで，我々はこの議論に一石を投じるべく，既知のゲノム情報から tRNA の議論を行うのではなく，環境サンプル中（沖縄トラフ深海底土と湯野浜温泉源泉水）から網羅的に tRNA 遺伝子の配列を得ることで，tRNA の配列，イントロン，クローバーリーフ構造おける特徴を考察し，tRNA の進化的な多様性から原型を類推してみることにした．中でも古細菌は tRNA 遺伝子の様々な位置にイントロンを含む唯一のドメインであるため，tRNA の多様性を議論するには古細菌に着目することが適切であると考えている．また，既知のゲノム情報を利用しない理由はゲノムが解読された古細菌が 2008 年 7 月の時点でわずか 52 種[9]であり，既存の知見から古細菌についての議論を行うには圧倒的に情報量が少ないことも挙げられる．そのため我々は 16S rRNA (ribosomal RNA) 遺伝子による系統解析によって，ゲノムが未知の種を含み多様な古細菌が存在すると考えられるサンプルから tRNA 遺伝子を特異的にシークエンスすることで，イントロン介在型をはじめとする新規 tRNA を多数発見できると考えた．

我々のこれまでのメタゲノム解析により，464 種に及ぶ古細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を用いた系統解析の結果から，沖縄トラフ深海底土と湯野浜温泉源泉水の両サンプルにはタウムアーキオータ門を中心とする多様な古細菌の存在が示唆されている（図 1）．そこでこれらの古細菌由来の tRNA 配列を得るべく，手始めに tRNA の中でも特に古細菌全般に広くまたがって高い相同性を示している $tRNA^{Arg}$(CCT)に対するプライマーを設計し，これらのサンプルから tRNA 遺伝子のシークエンスを試みた．その結果 30 本(21 種)の tRNA 遺伝子と思われる塩基配列を取得できたため，tRNAscan-SE[10]によってこれらの塩基配列がクローバーリーフ構造を形成しうるかを検証すると共に，アンチコドンを予測した．今回はシークエンスされた tRNA の塩基配列とその系統解析の結果について報告する．

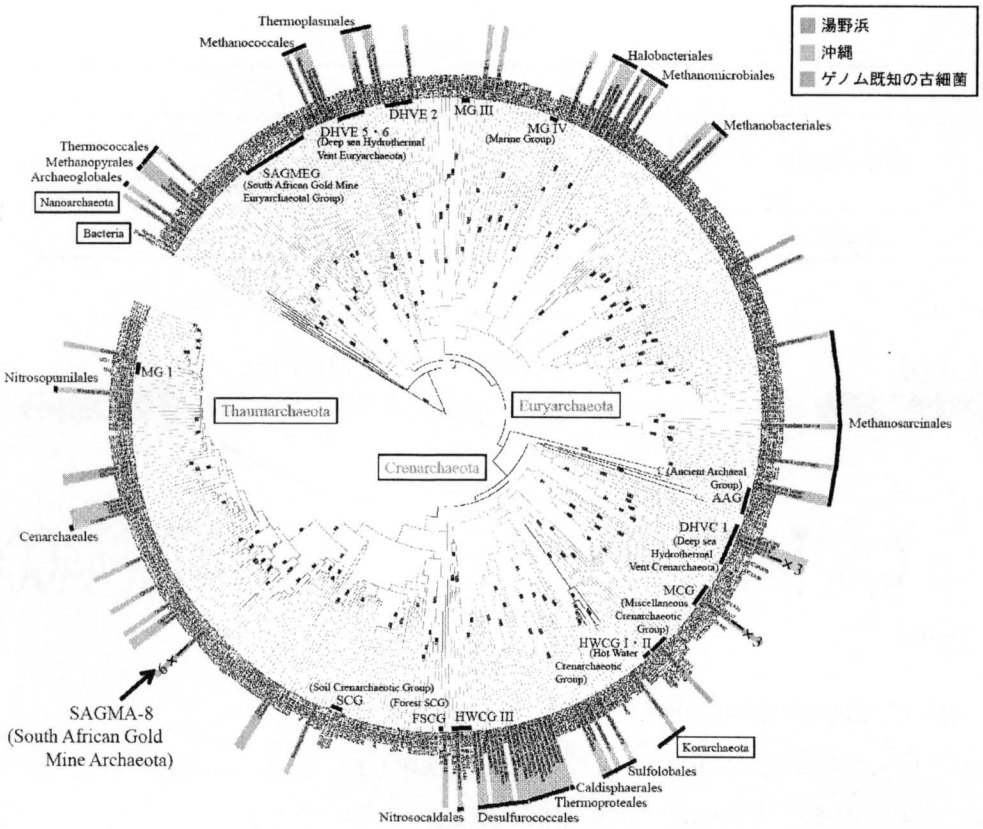


図 1：16S rRNA 遺伝子による系統樹

沖縄トラフ深海底土からシークエンスされた配列を青色，湯野浜温泉源泉水からシークエンスされた配列をピンク色，ゲノムが既知の古細菌の配列を緑色で示す．色が付いていないものは RDB(Ribosomal Data Base)[11]から取得した環境サンプルからシークエンスされた 16S rRNA 遺伝子配列である．ゲノムが既知の古細菌の分布（緑色）は偏っているが，沖縄（青色）と湯野浜（ピンク色）のサンプル中には多様な古細菌の存在が伺える．

2. 対象と方法

本研究には沖縄トラフ深海底土と湯野浜温泉源泉水の 2 種類のサンプルを用いた．沖縄トラフ深海底土は独立行政法人海洋研究開発機構（JAMSTEC）の有人潜水調査船「しんかい 6500」が 2007 年 3 月 16 日に行った 1001 回目の航行で，沖縄トラフ南部に位置する鳩間海丘の深海 1526m にある熱水噴出孔付近から採取したものである．湯野浜温泉源泉水は有限会社湯野浜温泉源泉の協力の下，2009 年 2 月 10 日に採取したものである．湯野浜温泉の源泉は 8 か所から汲み上げており，その深さは 250m～1000m である．本研究で使用したサンプルはそれら 8 か所から汲み上げられた源泉水を混合した貯水タンクから採取したものであるため正確な深さの特定は困難であるが，地中 250m～1000m の間から採取されたものであることがわかっている．また，この源泉水は濾過等の処理はされていない．

まず両サンプルから MOBIO 社製 Power Soil DNA Isolation Kit を用いて DNA を抽出した．続いて我々が独自に設計した古細菌の $tRNA^{Arg}$(CCT)に対するプライマーを用いて PCR を行った．プライマーの設計には図 2 の古細菌 tRNA43 本のアライメントから得られたコンセンサス配列情報を踏まえ，表 1 のように Forward プライマーは 2 種類，Reverse プライマーは 1 種類を設計した．

表 1：$tRNA^{Arg}$ プライマー配列

	プライマー名	配列
Forward	F1 (CCT)	5'-GGGCCCGTRGCCTAG-3'
	F2 (CCT)	5'-GGGCCCGTAGCTCAG-3'
Reverse	R1 (CCT)	5'-GGGATTYGAACCC-3'

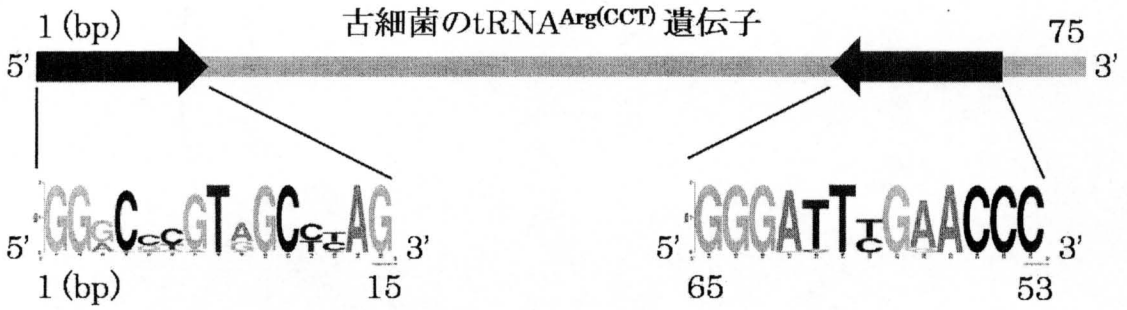


図 2：独自に設計した古細菌 $tRNA^{Arg(CCT)}$ 遺伝子に対するプライマー

Forward プライマーを青い矢印，Reverse プライマーを赤い矢印で示している．Reverse プライマーはアンチセンス鎖の配列を示しているが，5'側を左にしている関係で左右が入れ替わっている．

設計したプライマーを用いた PCR の条件は，アニーリングの温度や時間を変えて試行し，表 2 の条件で行うこととした．ただし， 1 回の PCR で増幅が不十分なものに関してはセカンド PCR を行った．セカンド PCR の条件も 1 回目（表 2）と同様にした．

表 2：PCR 条件

	← 40 cycle →				
94℃	98℃	40℃	60℃	55℃	4℃
1:00	0:10	0:04	0:02	5:00	∞

PCR 産物は PROMEGA 社製 pGEM-T Easy Vector と大腸菌 DH5α 株を用いてサブクローニングした．LB 寒天培地のプレートにはあらかじめ IPTG と X-gal を塗布しており，青白選択にて PCR 産物がクローニングできているコロニーを選別した．白いコロニーを一晩液体培養した後プラスミドを抽出し，ABI3100 にてシークエンスを行った．

以上のような行程でサンプルから得られた tRNA と考えられる配列を用い，既知の tRNA 配列と合わせてアンチコドンごとに系統解析を行った．既知の tRNA 配列は全ゲノムが解読されている古細菌 45 種前後（アンチコドンによって異なる）と，16S rRNA による古細菌の系統解析の際，習慣的にアウトグループとして用いられる 2 種のバクテリア（*Aquifex pyrophilus* と *Thermotoga maritima*）のものを用いた．また，本研究に用いたサンプルには 16S rRNA 遺伝子による系統解析の結果，タウムアーキオータ門の古細菌が多く存在していることが示唆されていたため，tRNA の系統解析にタウムアーキオータ門の古細菌由来の tRNA 配列を可能な限り利用することが望ま

れた．しかし現段階でゲノムが解読されているタウムアーキオータ門はわずかに 3 種のみ（図 1）であり，さらに tRNA 配列が既知の種は 1 種のみであった．そこで本研究会の博士学生であり，古細菌の tRNA 遺伝子予測ソフトウェア「SPLITS」の開発者である菅原潤一氏にご協力頂き，最新の未発表データである *Nitrosopumilus* の tRNA 遺伝子配列を利用させて頂いた．

$tRNA^{Met}$(CAT)に関しては得られた配列が開始メチオニンか通常のメチオニンかを区別するために，開始メチオニン(iMet)と通常のメチオニン(Met)の tRNA を混ぜて解析を行った．

系統解析には ClustalW(1.83)[12]を用いた．その際パラメータは rRNA や tRNA などの RNA 配列のアライメントに最適とされる Gap Open Penalty = 22.5, Gap Extension Penalty = 0.83[13] を用い，Bootstrap100 回試行で系統樹を作成した．系統樹の描画には iTOL (http://itol.embl.de/) [14]を用いた．

3. 結果

まず沖縄トラフ深海底土と湯野浜温泉源泉水から抽出したゲノム DNA の電気泳動図を示す（図 3）．両サンプル共に問題なくゲノム DNA が得られていると考えられる．

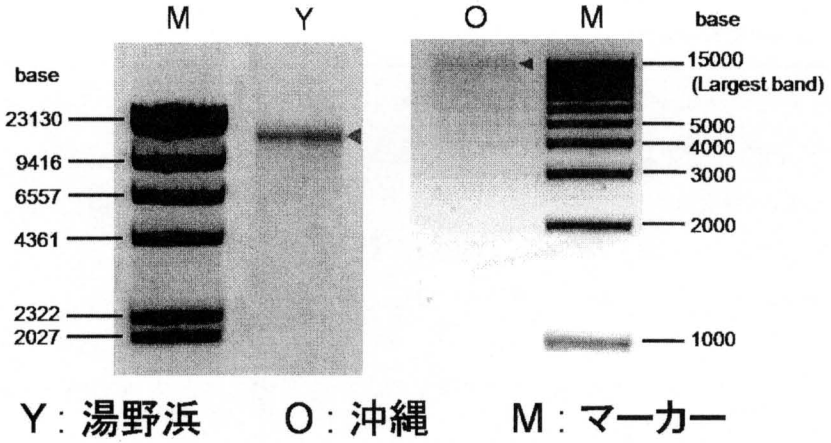
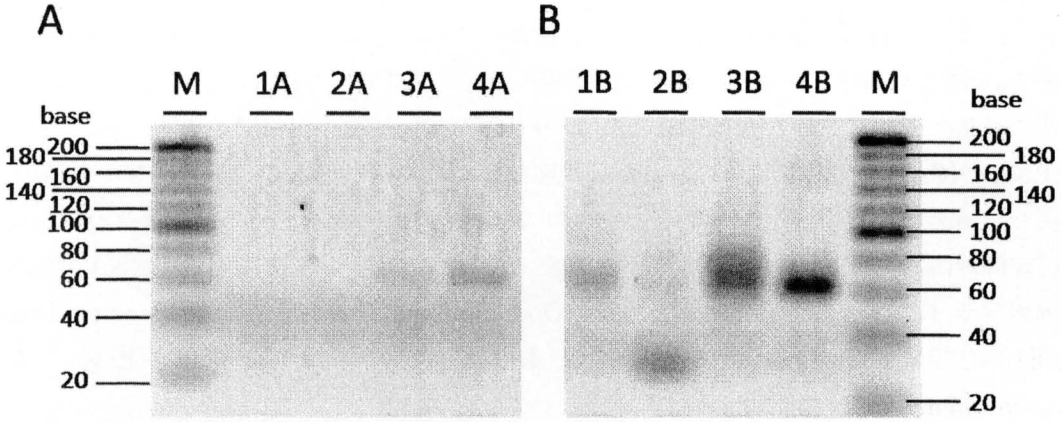


図 3：サンプルから抽出されたゲノム DNA

泳動条件は 1%アガロースゲルで 100V, 沖縄のサンプルは 30 分, 湯野浜のサンプルは 35 分, バンドの検出は EtBr 染色にて行った．

古細菌の $tRNA^{Arg}$(CCT)に共通する配列を基に作成したプライマーを用いて沖縄トラフ深海底土と湯野浜温泉源泉水から抽出した DNA 配列に対して PCR を行った．その結果，深海底土及び温泉水ともに 70bp 付近に増幅が確認された（図 4）．これはイントロンを含まない tRNA の全長配列（約 72nt）と一致する．また F1 に比べ F2 プライマーを用いた方が効率よく DNA が増幅されていることが確認できた．



	プライマー	サンプル	アニーリング	エロンゲーション
1	F1 – R1 (CCT)	沖縄	40℃ 4sec	60 ℃ 2sec
2	F1 – R1 (CCT)	湯野浜	40℃ 4sec	60 ℃ 2sec
3	F2 – R1 (CCT)	沖縄	40℃ 4sec	60 ℃ 2sec
4	F2 – R1 (CCT)	湯野浜	40℃ 4sec	60 ℃ 2sec
M	20bp Ladder			

図 4：tRNA 特異的プライマーを用いた環境 DNA からの PCR 結果

A：表 2 の条件で PCR を行った結果　　B：A のサンプルを表 2 の条件でセカンド PCR を行った結果.

泳動条件は 3% NuSieve アガロースゲルで 100V，45 分，バンドの検出は EtBr 染色にて行った.

沖縄：沖縄トラフ深海底土由来のゲノム DNA を鋳型に使用

湯野浜：湯野浜温泉源泉水のゲノム DNA を鋳型に使用

表 3 にシークエンスによって得られた tRNA の詳細を示す．これらは tRNAscan-SE によっ
予測されたアンチコドンを元に分類している.

表 3：シークエンスによって得られた tRNA

アミノ酸	アンチコドン	種類	本数
Ala	GGC	1	1
	TGC	1	1
Lys	TTT	3	3
	CTT	3	3
Arg	TCT	2	2
	ACG	6	5
	TCG	1	1
His	GTG	12	4
Met	CAT	1	1
合計		21	30

既知の古細菌の tRNA 配列を用いて作成する系統樹と，既知の古細菌の 16S rRNA 遺伝子を用いて作成する系統樹は数本の例外を除いて目のレベルまで類似する[15]．従って tRNA 配列を用いた場合でも 16S rRNA 遺伝子を用いる場合と同様に系統解析を行うことができ，シークエンスされた配列がどのような生物種由来であるかを目のレベルで議論することができる．

系統解析の結果，$tRNA^{Lys}$(TTT)・$tRNA^{Lys}$(CTT)・$tRNA^{Arg}$(TCT)の配列は古細菌由来であることが示唆された（図 5・付録）ため，クラスタリングされた近縁種を表 4 にまとめた．他の配列は系統解析の結果どの既知の古細菌よりもバクテリアに近い位置へクラスタリングされたため，現時点で古細菌由来の配列とはいえない．これについては「4.議論」の項で触れる．

表 4：古細菌の tRNA と思われる配列のクラスタリング結果

アミノ酸	アンチコドン	門	目	由来するサンプル
Lys	TTT	Euryarchaea	Methanococcales	沖縄
	CTT	Euryarchaea	Thermoplasmatales	湯野浜
		Crenarchaea	Thermoproteales	沖縄
Arg	TCT	Crenarchaea	Thermoproteales	沖縄

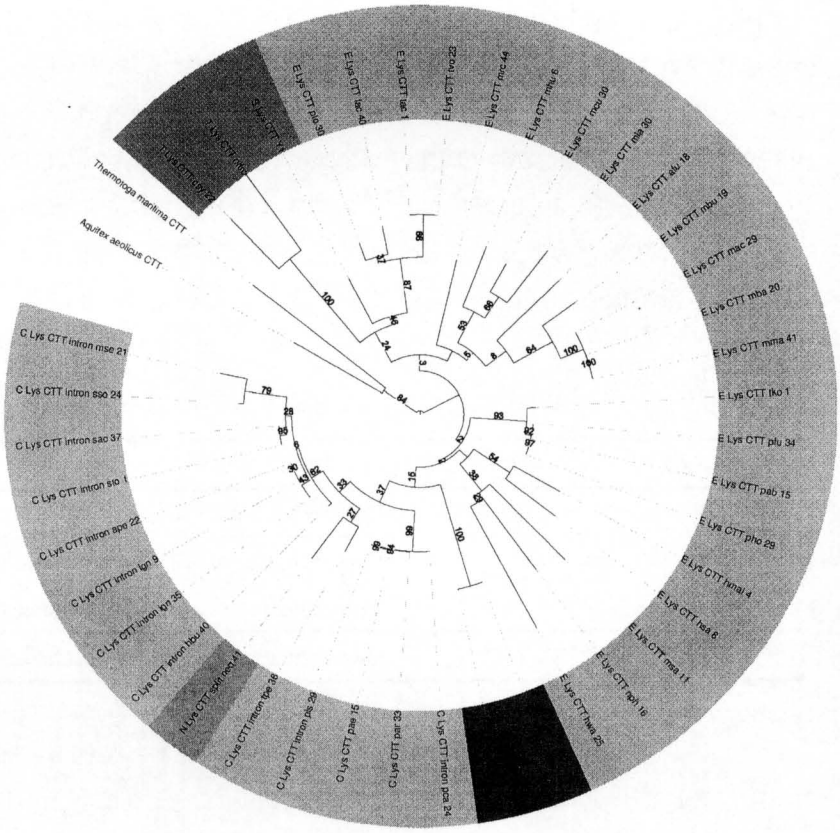
続いてアンチコドンごとの系統解析の結果を系統樹として図 5 に示す．9 種の系統樹があるが，ここでは特に注目して頂きたい 4 種のみを掲載した．残りは巻末の付録を参照して頂きたい．

なお，既知の古細菌の tRNA にアンチコドンが ACG である配列は存在しなかったため，ACG のみはシークエンスされた配列とアウトグループのバクテリア 1 種（もう 1 種は ACG を持たない）のみである．

$tRNA^{Met}$(CAT)は開始メチオニンのグループと通常のメチオニンのグループの大きく 2 つに分かれた．シークエンスされた配列は通常のメチオニンのグループに入っているため，開始メチオニンとして用いられる tRNA ではなく通常のメチオニンを転移する tRNA であると考えられる．

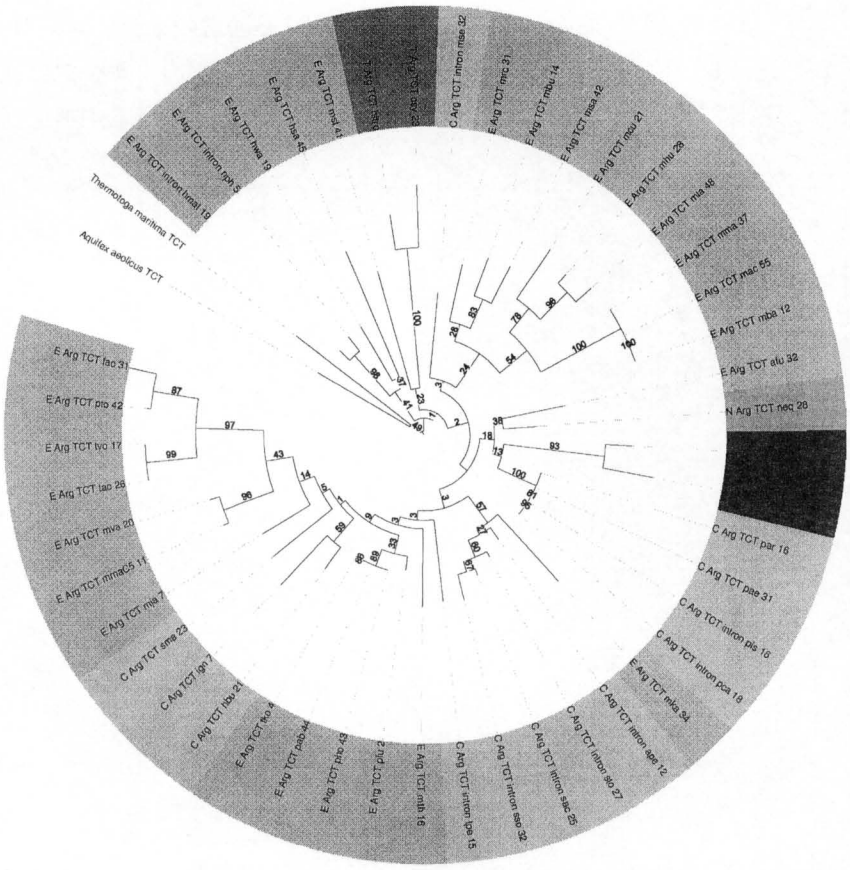
A : tRNA^{Lys}(CTT)

沖縄深海底土由来のtRNAがクレンアーキオータ門サーモプロテウス目にクラスタリングされている．（黄色と緑色の間に位置する青色２つ）



B : tRNA^{Arg}(TCT)

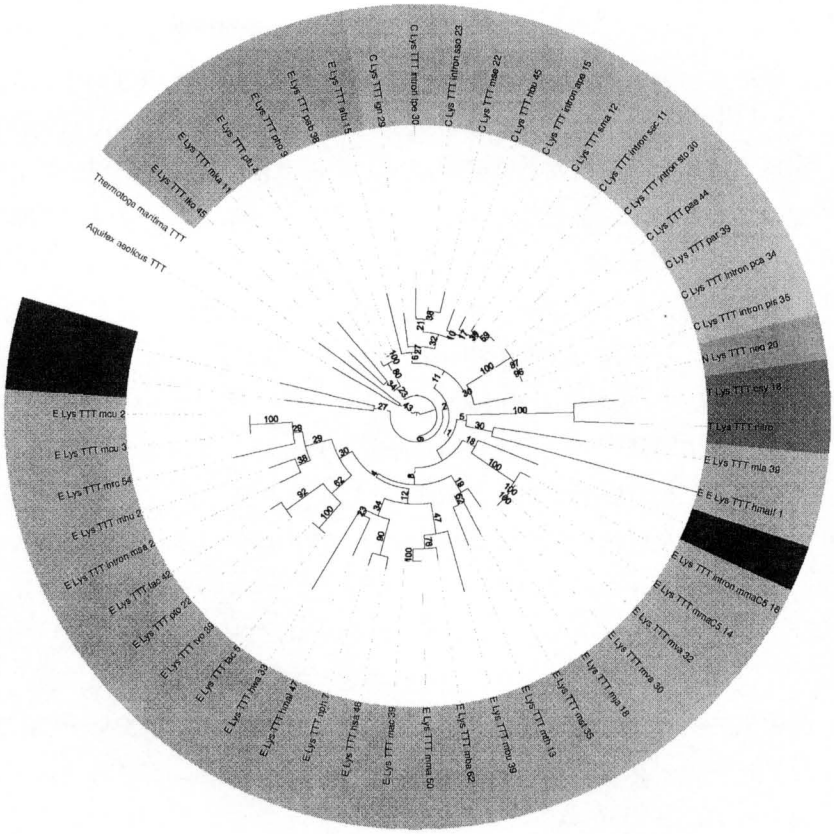
沖縄深海底土由来のtRNAがクレンアーキオータ門サーモプロテウス目にクラスタリングされている．（黄色と灰色の間に位置する青色２つ）



Euryarchaea
Crenarchaea
Thaumarchaea
Nanoarchaea
Okinawa
Yunohama

C：tRNA^{Lys}(TTT)

沖縄深海底土由来のtRNA がユーリアーキオータ門メタノコッカス目にクラスタリングされている．（緑色の中に位置する青色１つ）また，どのグループにも属さない tRNA も得られた．（緑色の端にある青色 2 つ）さらにこのうち 1 つはイントロンを介在している．



D：tRNA^{His}(GTG)

沖縄・湯野浜の両サンプルから配列が得られた．沖縄のうち１つはイントロンを介在している．

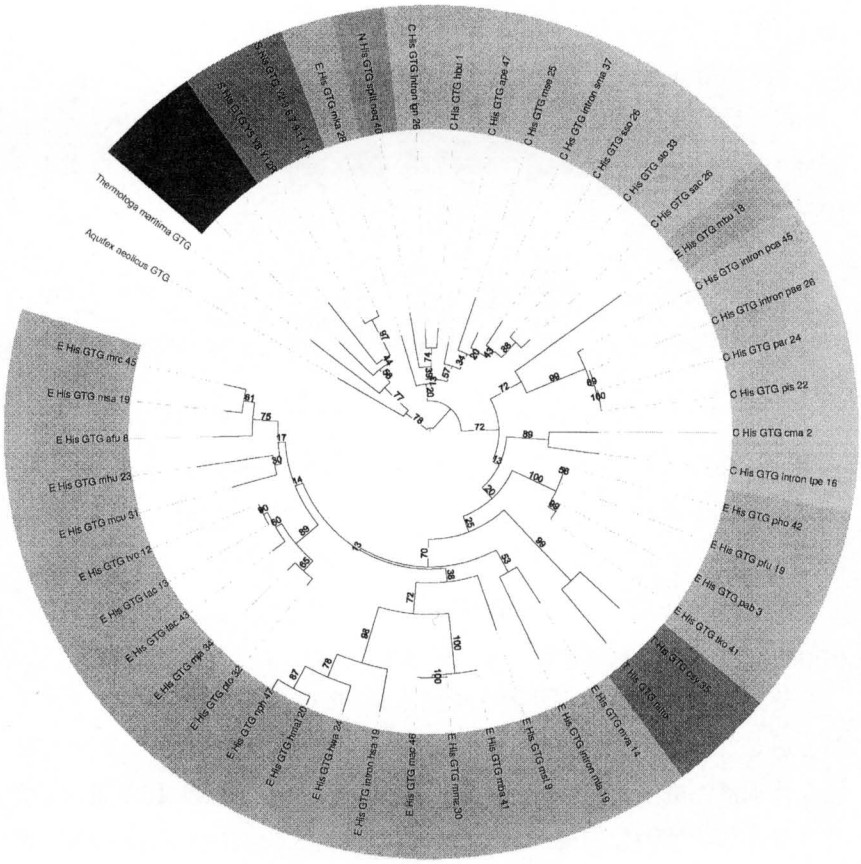


図 5 (A～D)：

アンチコドンごとの古細菌 tRNA 系統樹

シークエンスによって得た配列（青色とピンク色）と既知の古細菌の tRNA 配列（その他の色）を合わせ，アンチコドンごとに系統樹を描いた．アウトグループとして用いた2種のバクテリアには色を付けていないが，他は凡例の通り．

4. 議論

サンプルからシークエンスされた配列は 5 種のアミノ酸に対応する 9 種のアンチコドンを持つグループに分類できたが，これらは古細菌の $tRNA^{Arg}$(CTT)に対して設計した同一のプライマーを用いて増幅された DNA 断片である．この結果は，tRNA は対応するアンチコドンやアミノ酸が異なっていても相同な領域を持っている場合があることを示している. tRNA の 5'側の半分と 3'側の半分は異なる進化的なバックグラウンドを有しているとの指摘もあり[15]，それならばアンチコドンやアミノ酸のみならず生物種を超えて相同な領域が存在することも納得できる.

tRNA のアクセプターステムと呼ばれる部分は通常 7 塩基対になるが, tRNAscan-SE を用いて今回得られた配列の構造予測を行うと，いずれもアクセプターステムが 7 塩基対にならない．これは tRNA の 5'末端に Forward プライマーを設計している影響と，Reverse プライマーは T アーム付近に設計しているため構造予測を行う際に 3'末端の 8 塩基は 5'末端の配列を見ながら相補的に補っている影響であると考えられる. この点に関しては, 今後予定している転写された tRNA 配列にタグを付け逆転写 PCR を行い，プライマー非依存に tRNA 全長をシークエンスする方法で解決できると考えている.

図 5 より，シークエンスされた $tRNA^{Lys}$(CTT)・$tRNA^{Arg}$(TCT)・$tRNA^{Lys}$(TTT)の配列はアウトグループとして用いたバクテリアよりも古細菌の近くにクラスタリングされていることから古細菌由来であると考えられる. 特に沖縄深海底土由来の $tRNA^{Lys}$(CTT)と $tRNA^{Arg}$(TCT)は共にクレンアーキオータ門サーモプロテウス目にクラスタリングされたが，同じ生物種のアンチコドンが異なる tRNA が同一のプライマーで増幅されたことは興味深い．それぞれのアンチコドンでシークエンスされた配列とサーモプロテウス目の配列は図 6 に示すように非常に類似している.

A：CTT

```
                    ****************  *** **** *** ************ **  **** ****** ****** * ******
       Okinawa13_CTT_ GGGCCCGTAGCTCAGTCTGGCAGAGTGGCTGGCTCTTAACCAGTTTGTCGCGGGTTCAAATCCCGC-GGGCCC-
       Okinawa16_CTT_ GGGCCCGTAGCTCAGT-TGGCAGAGTGGCTGGCTCTTAACCAGTTTGTCGCGGGTTCAAATCCCGC-GGGCCC-
 Thermoproteales CTT GGGCCCGTAGCTCAGCCTGGTAGAGCGGCGGGCTCTTAACCGGTAGGTCGTGGGTTCGAATCCCACCGGGCCCG
```

B：TCT

```
                    ****************   *** ***** *  ************  * ** ** ****** ******  *******
       Okinawa11_TCT_ GGGCCCGTAGCTCAG--AGGACAGAGCAGGAGCCTTCTAAGCTCTTGGTCGGGGGTTCAAATCCC-CCGGGCCC----
        Okinawa4_TCT_ GGGCCCGTAGCTCAG--TGGACAGAGCAGGAGCCTTCTAAGCTCTTGGCCGAGGGTTCGAATCCC-TCGGGCCC----
 Thermoproteales TCT GGGCCCGTAGCTCAGCCTGGATAGAGCGGCGGCCTTCTAAGCCGTAGGTCGTGGGTTCAAATCCCATCGGGCCCGCCA
```

図 6：シークエンスされた配列とサームプロテウス目の配列のアライメント

サーモプロテウス目にクラスタリングされたシークエンス配列と，実際のサーモプロテウス目の tRNA の比較. A はアンチコドンが CCT の配列，B はアンチコドンが TCT の配列.

しかし tRNA による系統解析の結果存在が示唆された種（表 4）を 16S rRNA 遺伝子による系統解析（図 1）に照らし合わせてみると一致しないことがわかる.

系統解析の結果は沖縄深海底土由来の tRNA がメタノコッカス目とサーモプロテウス目に近縁だと示しているが，16S rRNA 遺伝子の系統樹ではメタノコッカス目とサーモプロテウス目に近縁な沖縄深海底土由来の配列は存在しない．この結果は 16S rRNA 遺伝子の配列がサーモプロテウス目と類似性の低い種がサーモプラズマ目と類似性の高い tRNA 遺伝子を有しているか，あるいは 16S rRNA 遺伝子のシークエンスでは発見されなかった種が存在しているかのどちらかであ

る．先行研究（図 1）では合計 24 本の 16S rRNA 配列しかシークエンスしていないため，結論を導くのは難しいが，現時点では 16S rRNA 遺伝子に対するメタゲノムと tRNA に対するメタゲノムでは結果の表れ方が異なるということがわかった．これについては「5.展望」で述べるが，次世代シークエンスによって十分な量のシークエンスを得ることで新たな知見が得られるものと考えている．

表 4 に示した配列以外は系統解析の結果，古細菌よりもバクテリアの近くにクラスタリングされた．しかしこの結果はこれらの配列がバクテリア由来であることを示すものではない．先述のように古細菌は 52 種しかゲノムが解読されていないため，サンプル中に既知のどの古細菌よりもバクテリアに近縁な新種が存在している可能性があり，そのような種の tRNA をシークエンスしていたとすると，古細菌由来の配列でもバクテリアの近くにクラスタリングされる可能性もある．

さらに興味深い点は，バクテリアの近くにクラスタリングされた $tRNA^{Ala}$(GGC)・$tRNA^{His}$(GTG)の配列がイントロンを介在していたことである．また $tRNA^{Lys}$(TTT)として得られた配列はメタノコッカス目にクラスタリングされた配列の他に，バクテリアとも古細菌とも異なるグループにクラスタリングされた配列があるが，さらにそのうちの 1 配列もイントロンを有しており，こちらも大変興味深い．これらイントロンを介在する塩基配列を表 5 に示す．

なお，$tRNA^{Arg}$(ACG)は 122bp の配列であったため当初イントロンを持つと考えられたが，考察の結果これは 2 つの tRNA が PCR の過程で合体してしまったものである可能性が高く，イントロンを含むものではなかった．

表 5：イントロンを介在していた配列

[*]はイントロン介在位置．各々2 段目に BHB 形成配列を示す．小文字部がイントロン．

Okinawa1 $tRNA^{Ala}$(GGC)	GGGCCCGTAGCTCAGCTTGGTAGAGCGCCTG[*]TTTTACCTTAATG CAGGAGGTCGTGGGTTCAAATCCCACCGGGCCC
31/32	TTGGTAGAGCGCCTGcttggcaattttatggcatgaatgccaTTTTACCTT
Okinawa5 $tRNA^{His}$(GTG)	GGGCCCGTAGCTCAGGTGGTGGAGCGCCAGGTTGTGGCCCGTAGC TCA[*]CGCGGGTTCAAATCCCGCGGGCCC
48/49	GGGCCCGTAGCTCaggtggtggagcgccaggttgtggcccgtagctcagCCTGGCTA
Okinawa12 $tRNA^{Lys}$(TTT)	GGGCCCGTAGCTCAGCCTGGCAGAGCACTGGACTTTTA[*]ATCCAG GTGTCGAGGGTTCAAATCCCTCGGGCCC
38/39	CACTGGACTTTTAgcgaaggattttcgtgaagatATCCAGGT

バクテリアにおいては 37 塩基目と 38 塩基目の間(37/38)にセルフスプライシングによって切り出されるイントロンを介在している tRNA は報告されているが，その他の位置にイントロンを介在する tRNA は報告がない．しかし，表 5 に示した配列はいずれもイントロン介在位置が 37/38 ではないため興味深い．

また，古細菌の tRNA に介在しているイントロンは BHB(bulge–helix–bulge)モチーフと呼ばれる特殊な 2 次構造を形成することが知られており[16]，我々のグループではこの知見を利用して古細菌のイントロン介在型 tRNA や split tRNA を発見するソフトウェア，SPLITS を開発している[17]．そこで，今回シークエンスによって得られた配列が BHB モチーフを形成するイントロンを介在しているかを検証したところ，図 7 に示すように全て BHB モチーフを形成しうることがわかった．教科書的なきれいな BHB モチーフではないものの，近年サーモプロテウス目(Pyrobaculum)の tRNA エンドヌクレアーゼは BHB モチーフの認識がとても曖昧であり，バルジが 3 塩基でなくてもイントロンを切断できることがわかっている[18]ため，これらの配列も BHB モチーフとして十分機能するものと考えられる．

$tRNA^{Ala}$(GGC)の配列については BHB モチーフを考慮する前に tRNAscan-SE で予測したアンチコドンは GGC であったが，BHB モチーフを考慮したところクローバーリーフ構造は形成するものの，アンチコドンが不明となってしまった．そのため図 7 では何のアンチコドンの tRNA かを明記しないこととした．

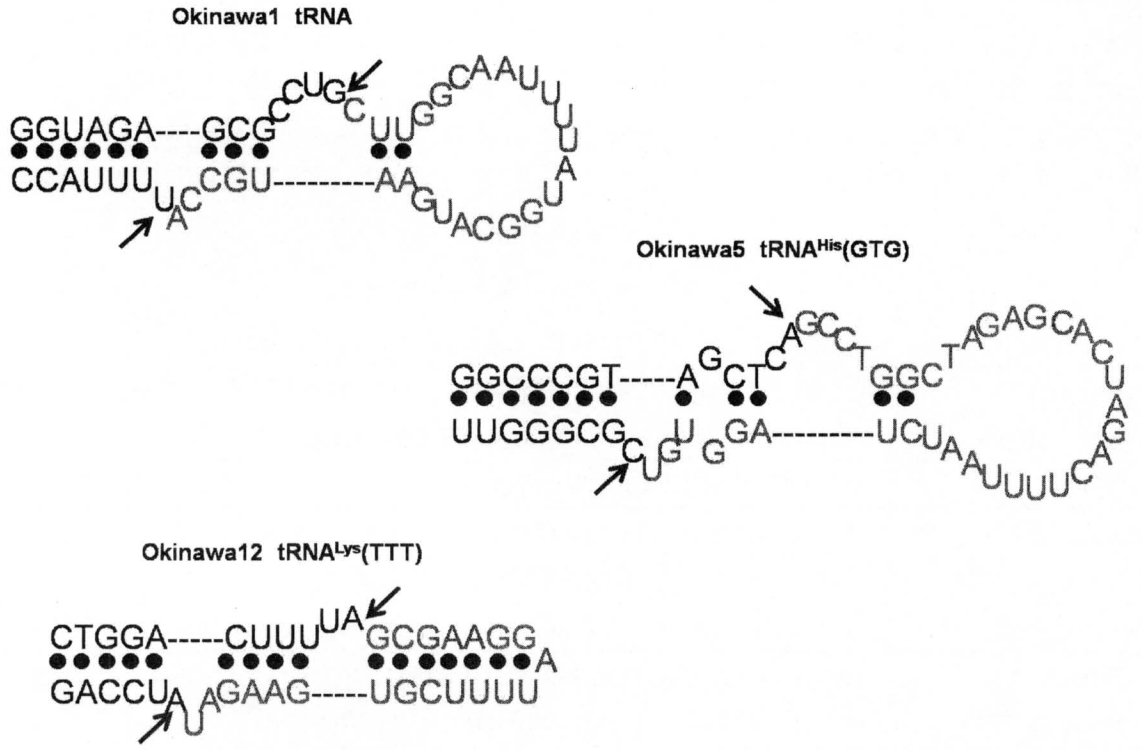


図 7：シークエンスされた tRNA のイントロンの BHB モチーフ模式図

黒字はエキソン，赤字はイントロンを示す．矢印は切断位置を示している．

図 7 に示すように，表 5 の配列のイントロンが BHB モチーフを形成できることから，これらは系統解析の結果バクテリアの近くにクラスタリングされていたが古細菌由来の tRNA だと考えられる．これは極めて興味深く，我々が用いたサンプル中に既知のどの古細菌よりもバクテリアに近い新種古細菌が存在していることを示唆するものである．さらに $tRNA^{Lys}$(TTT)においては，図 5 の系統樹に示すようにバクテリアの近縁でもなく古細菌のグループにも属さない独立した配列が BHB モチーフを形成できるイントロンを有していたことになる．こちらも極めて興味深く，これは逆に既知のどの古細菌よりもバクテリアから遠縁である古細菌の存在を示唆している．

5. 展望

今回の結果から，沖縄深海底土と湯野浜温泉源泉水のどちらからも非常に興味深い tRNA 遺伝子配列を得ることができたと考えている．しかし現状ではシークエンスの量が十分でなく，またプライマーを用いて tRNA 遺伝子の増幅（PCR）を行っていることで様々な不都合が生じているため，今後はそれらを解決すべく次世代シークエンスを行いサンプル中から網羅的に tRNA 配列全長を取得することを目指す．

具体的には湯野浜温泉源泉水を再度サンプリングし，Ambion 社の mirVana miRNA isolation キットを用いて 20～200 bp の small RNA 分画を得る．その後，図 8 のように Takara 社の small RNA cloning kit を用いて cDNA ライブラリーを構築する．cDNA ライブラリーから数本のシークエンスを行い，問題がなければ cDNA ライブラリーを Roche Diagnostics の GS FLX（454）を用いてシークエンスし，1 万リードの塩基配列を得る．得られた配列を解析することで今回の報告以上の興味深い知見が得られるものと期待している．

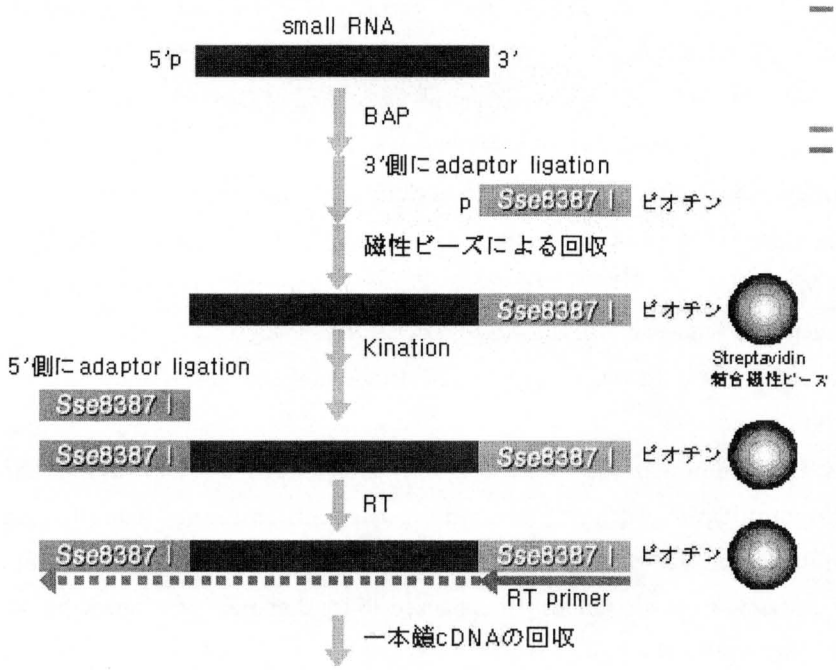


図 8：Takara 社の small RNA cloning kit による cDNA ライブラリー構築の模式図

画像引用：タカラバイオ（http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100005071）

謝辞

本研究にて使用した沖縄トラフ深海底土のサンプルを分与して下さいました JAMSTEC，またその仲介をして下さいました慶應義塾高等学校の杵島正洋教諭，湯野浜温泉源泉水の採取にあたり快くご協力頂きました有限会社湯野浜温泉源泉に，心より御礼申し上げます．

また，本研究を行うに当たり，イントロン配列の BHB モチーフ検証を行って頂きました濱島聖文氏，最新の未発表データである *Nitrosopumilus* の tRNA 遺伝子配列を快くご提供下さった菅原潤一氏には大変お世話になりました．

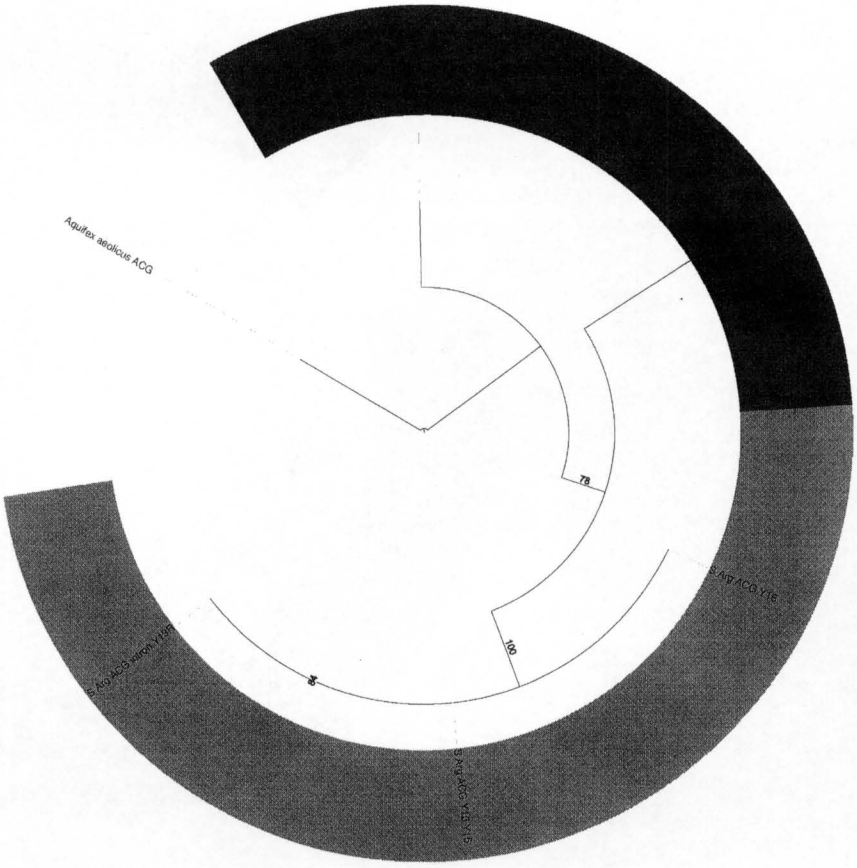
さらにアドバイザーの藤島皓介氏，首長の金井昭夫教授には日ごろから的確なご指導，ご教授を賜りました．そしてこのような研究環境を与えて下さった冨田勝教授には大変感謝しております．この場を借りて皆様に御礼申し上げます．

参考文献

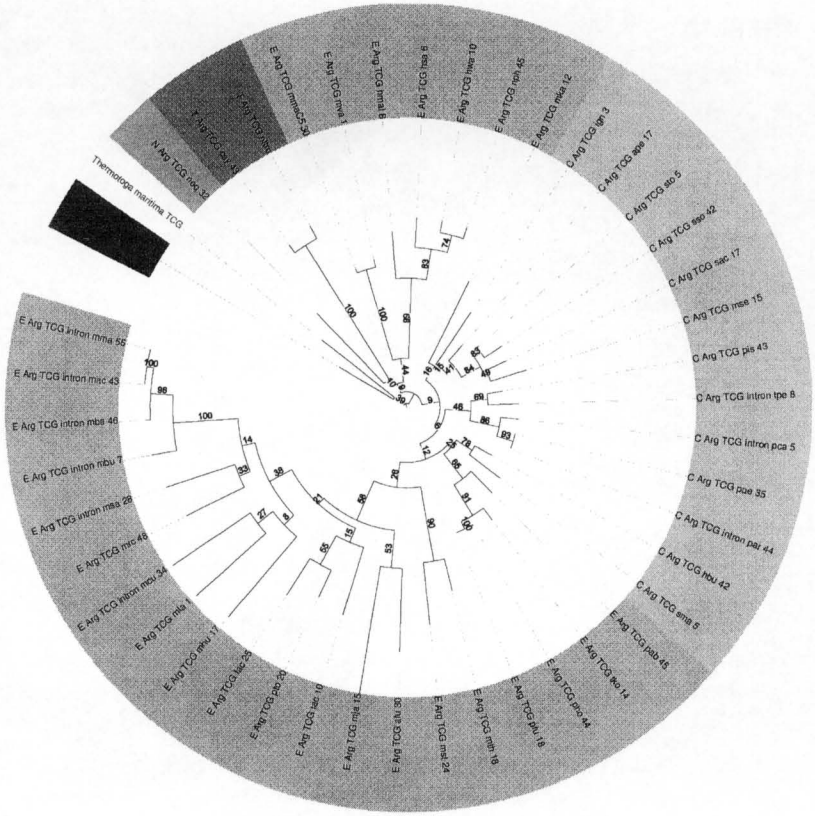
1. Randau, L., Söll, D. (2008) Transfer RNA genes in pieces. *EMBO Rep.*, 9(7), 623-628.
2. Randau, L., Münch, R., e*t al.*, (2005) Nanoarchaeum equitans createsfunctional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. *Nature*, **433**, 537-541.
3. Fujishima, K., Sugahara, J., *et al.*, (2009) Tri-split tRNA: A transfer RNA made from three transcripts provides insight into the evolution of fragmented tRNAs in archaea. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**, 2683-2687.
4. Sugahara, J., Kikuta, K., et al. (2008) Comprehensive analysis of archaeal tRNA genes reveals rapid increase of tRNA introns in the order thermoproteales. Mol.Biol.Evol., 25, 2709-2716.
5. Holley, RW. (1965) Structure of an alanine transfer ribonucleic acid. *JAMA*, **194(8)**, 868-871.
6. Weiner, AM., Maizels, N. (1987) tRNA-like structures tag the 3' ends of genomic RNA molecules for replication: implications for the origin of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 7383-7387.
7. xSchimmel,P., Giege,R., et al. (1993) An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 90, 8763-8768.
8. Hori, Y., Baba, H., *et al.*, (2000) In vitro hyperprocessing of Drosophila tRNAs by the catalytic RNA of RNase P. *Eur J Biochem.*, **267**, 4781-4788.
9. Koonin,E.V. and Wolf,Y.I. (2008) Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.*, 36, 6688-6719.
10. Lowe, T.M., Eddy, S.R. (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 955-964.
11. Olsen, GJ., Overbeek, R., *et al.*, (1992) The Ribosomal Database Project. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 2199-2200
12. Higgins D., Thompson J., *et al.*, (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressivemultiple sequence alignment through sequence weighting,position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
13. Wilm, A., Mainz, I., *et al.*, (2006) An enhanced RNA alignment benchmark for sequence alignment programs. *Algorithms Mol Biol.*, **1**, 19.
14. Letunic, I., Bork, P. (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, **23(1)**, 127-8.
15. Fujishima, K., Sugahara, J., *et al.*, (2008) Sequence evidence in the archaeal genomes that tRNAs emerged through the combination of ancestral genes as 5' and 3' tRNA halves. *PLoS One*, **3(2)**, e1622.
16. Diener JL, Moore PB (1998) Solution structure of a substrate for the archaeal pre-tRNA splicing endonucleases: the bulge–helix–bulge motif. *Mol Cell.*, **1**, 883–894.
17. Sugahara, J., Yachie, N., et al. (2006) SPLITS: a new program for predicting split and intron-containing tRNA genes at the genome level. *In.Silico Biol.*, **6**, 411-418.
18. Yoshinari,S., Shiba,T., et al. (2009) Functional importance of Crenarchaea-specific extra-loop revealed by an X-ray structure of a heterotetrameric crenarchaeal splicing endonuclease. *Nucleic Acids Res.*

付録

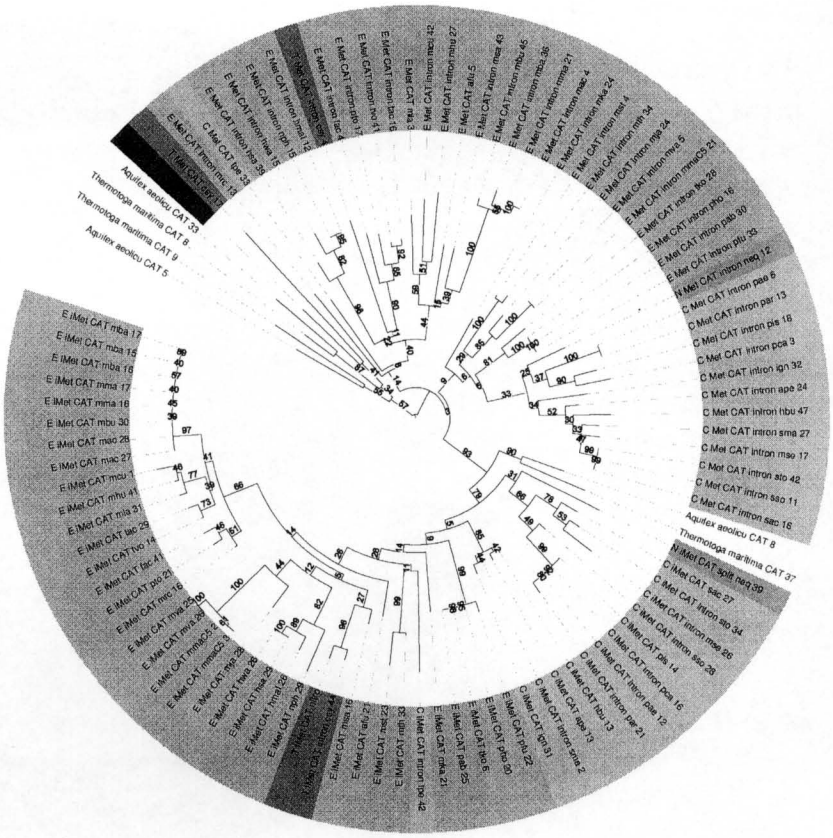
tRNA^{Arg}(ACG)の
系統樹



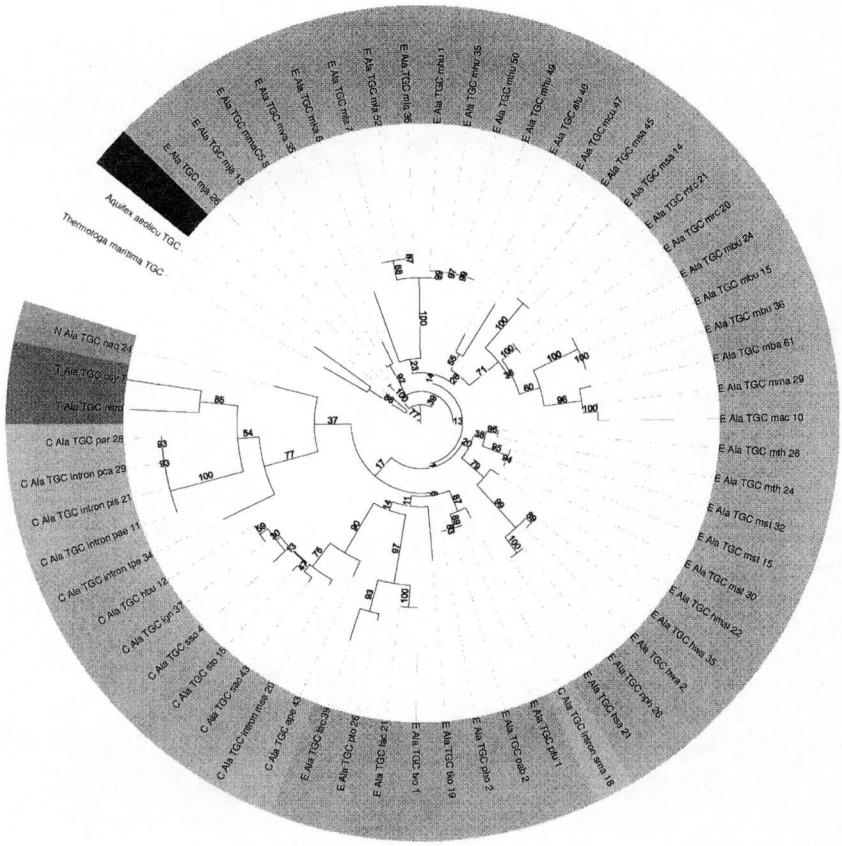
tRNA^{Arg}(TCG)の
系統樹



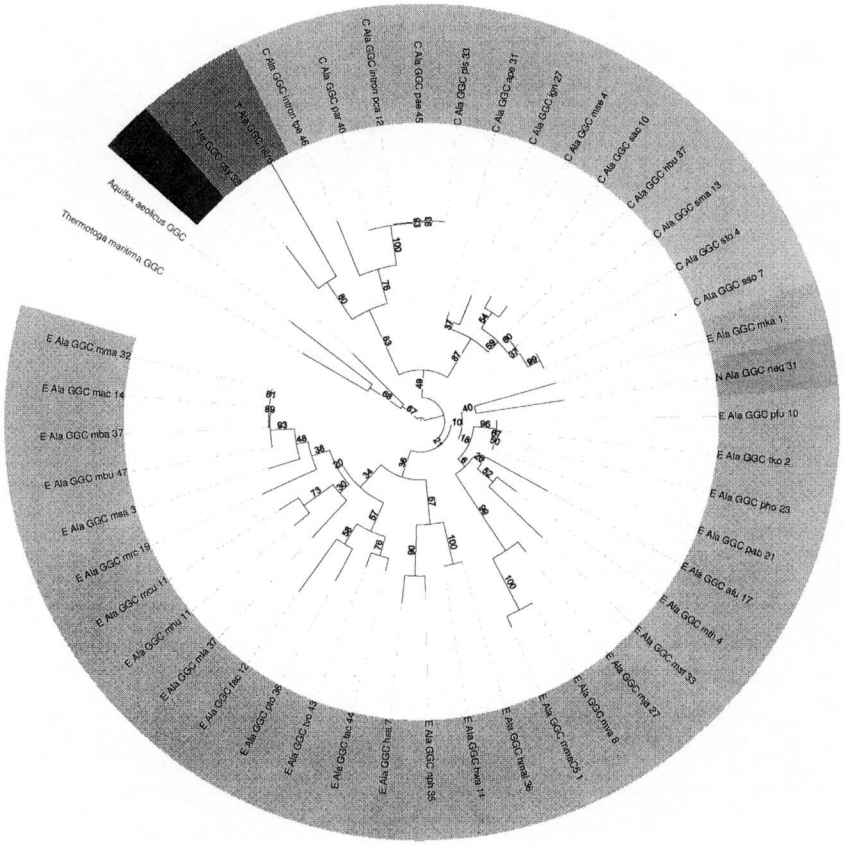
tRNA^{Met}(CAT)の
系統樹



tRNA^{Ala}(TCG)の
系統樹



tRNA^{Ala}(GGC)の
系統樹



極限環境に生息する微生物のRNA遺伝子解析

2009年10月5日　　初版発行

著者　村上慎之介

監修　冨田勝

発行　慶應義塾大学 湘南藤沢学会
〒252-0816　神奈川県藤沢市遠藤5322
TEL:0466-49-3437

Printed in Japan　　印刷・製本　　ワキプリントピア

SFC-SWP 2009-S-003

■本論文は研究会において優秀と認められ、出版されたものです。