

## [総 説]

## 16S リボソーム RNA 保存領域研究の進展

保科定頼

東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座

(平成16年6月22日受付)

16S リボソーム RNA の塩基配列が各菌種によって多様であることを利用して、その相同性の差から分子系統樹の説明がなされるようになった。これを用いて菌種同定技術が進歩してきたのは、臨床微生物学の進展につながっている。これは、標的遺伝子を普遍的に検査できることと、リボソームの有用性から菌が容易に配列の変異を作りやすく安定していることである。

16S rRNA 研究は、1本鎖配列領域が担う蛋白質翻訳機能とその二次構造、立体構造の解析技術の進展にともなう場所の確定が主流となってきた。その研究進展の基礎になったのは、分子系統進化を説明するためのリボソーム RNA 研究である。16S rRNA は構成する蛋白質と一体となってリボソーム 30S スモールサブユニットを構成する。この構造研究から、リボソーム RNA 塩基配列に相補的な 1本鎖 DNA オリゴマーを用いて、蛋白質翻訳調節に関する開始因子に相当する役割を持たせることが可能であった。

**Key words:** 血流感染症, 細菌, 系統分類, リボソーム, 翻訳開始点

蛋白質翻訳はリボソームの仲介によって、メッセンジャー RNA (mRNA) と転移 RNA (tRNA) の相互作用により行われる。tRNA に備わったアンチコドンは相補的に mRNA に結合するがリボソームにも相互的に作用する。リボソームの tRNA 結合部は P site と呼ばれ、高  $Mg^{2+}$  濃度状態では mRNA が存在しなくても、結合が起こるのである。この P site は 16S/18S リボソーム RNA (16S/18S rRNA) の特定の位置の塩基と考えられている (図 1)。

カリフォルニア大学サンタクルーズの Noller HF らのグループが、リボソーム small subunit である 16S rRNA の 966 番、1401 番のグアニンをメチル化することによって P site における mRNA と tRNA の結合を阻害することを明らかにした。また、926 番のグアニンをメチル化すると先程の高  $Mg^{2+}$  濃度状態での P site への tRNA 結合を阻害するようになる<sup>1)</sup>。これら

のリボソーム RNA 上の位置は古くから微生物に広く塩基配列が保存された領域、すなわち archaeobacteria から原核生物に至るまで 16S rRNA に数カ所認められ、約 20 塩基長のオリゴマーとして存在する。これらの保存領域に挟まれた数百塩基長の RNA 配列は、属あるいは種として分類学上規定される特異的な菌の集団におおむね一致して同じ配列がみられる。この RNA 塩基配列は DNA としてコードされている。DNA にコードされた RNA 塩基配列は *rrn* オペロンと呼ばれ、2つのプロモーターの後ろに 16S rRNA, tRNA, 23S rRNA, 5S rRNA, tRNA の順にスパーサー領域を介して連結している (図 2)。

それぞれの tRNA は 2つの同じ tRNA<sup>Glu</sup> の組み合わせか、あるいは tRNA<sup>Ile</sup> と tRNA<sup>Ala</sup> の組み合わせで存在し、この 2種類の *rrn* オペロンが数個染色体上に存在する<sup>2)</sup>。1960年代後半からみられるリボソーム RNA 研究を年代を追って研究の目標ごとにまとめると、上述のリボソーム RNA の保存領域に関しては重要な機能を担う配列が保存されているとの認識が早くからみられ、リボソーム RNA 上の 1本鎖 RNA 構造にその機能が託されていると考え、その検索がアミノアシル tRNA の解析方法に則って行われるようになった。ドイツのマックスプランク研究所の Erdmann

著者連絡先：(〒105-8461) 東京都港区西新橋3-25-8  
東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座  
保科定頼  
TEL 03-3433-1111 内線2291  
FAX 03-5401-0467  
E-mail: hoshina@jikei.ac.jp

VAらのグループ<sup>3)</sup>は、配列が明らかなオリゴヌクレオチドを合成し、リボソームRNAとの相補的結合能をみてリボソームRNAの1本鎖構造上の位置と配列を決定している(1978年)。

リボソームの機能に関する研究はヨーロッパを中心に広がり、イギリス<sup>4)</sup>、フランス<sup>5)</sup>で進んだ。アメリカ<sup>6)</sup>では前述のカリフォルニアのNoller HFらのグル

ープの研究が進んでいる。

こういったリボソームRNAの構造と機能に関する研究の進展とは別に、ほぼ同時期1972年に始まった米国イリノイ大学のWoese CR<sup>7-13)</sup>のグループの原核生物を対象にした系統分類学に16S rRNAの塩基配列の類似性を利用したユニークな研究もみられる。リボソームRNAの塩基配列を利用した細菌の分類に関しては、ベルギーのDe Ley J<sup>14-16)</sup>のグループがあるが、相補的な塩基配列の結合能(アナログ解析)に終始したため、Woese CRらのグループがめざした個々の塩基配列(デジタル解析)による特異性の高い識別能が得られず、頓挫した感がある。

一方、リボソームRNAの塩基配列の多様性を利用した細菌の検出に関しては、ワシントンDCのKohne DEのグループが後に液体ハイブリダイゼーションを利用して菌種を検出、同定する方法を研究開発し、特にハイドロキシアパタイトを用い、相補的に結合した2本鎖ヌクレオチドを分離する方法で簡易な細菌の検出同定キットを商品化するに至っている<sup>17)</sup>。いずれにしても細菌の菌種、同定に関してはKohne DEらのグループが早くから標的を絞っていたようだが、1972年の彼らの論文<sup>18)</sup>ではリボソームRNAの抽出と特質を述べるにとどまり、多様性に着目したのはその後の研究によるところが大きい。

以上のような視点でリボソーム研究の萌芽期を研究テーマごとに総括し、今後のリボソーム研究の進展を窺ってみた。

I. リボソームRNA塩基配列の保存領域に関わる研究

1. リボソームRNAの機能に関わる研究

マックスプランクのErdmann VAら<sup>3)</sup>のグループは、*E. coli*と*B. stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*)の5S rRNA配列の二次構造にみ

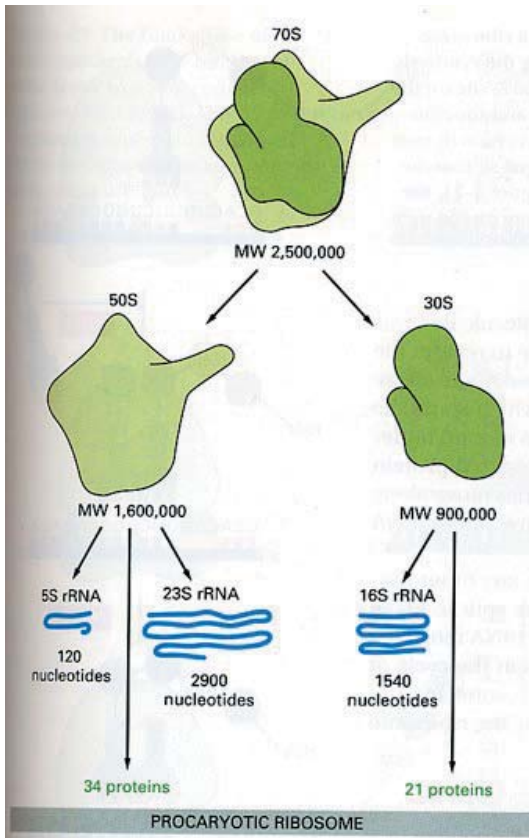


図1 細菌リボソームの構造<sup>49)</sup>

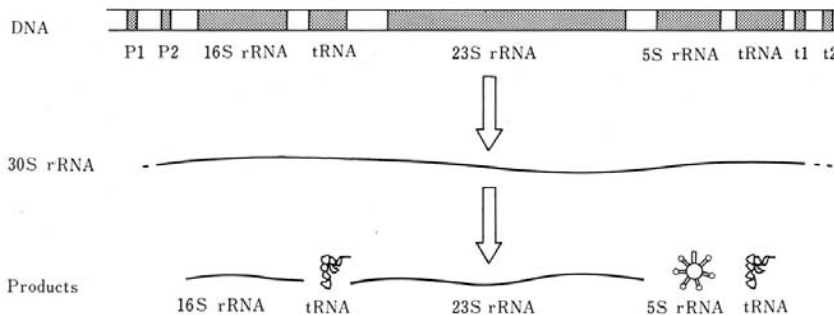


図2 *rrn* オペロンの構造<sup>2)</sup>

られる1本鎖領域と2本鎖領域が存在することを推定し、それを決定することを行った。あらかじめ配列のわかっているオリゴマー（3, 4塩基）を合成し、常温でハイブリダイズさせ、1本鎖状態を保持している位置と配列を特定している。5S rRNAの約120塩基配列の10番, 30番, 60番, 70番, 85番, 95番の塩基位置に1本鎖領域が認められ、二次構造が提案されている。

しかし、5S rRNAは進化の過程で塩基配列の変化が少なく、加えて配列と位置が保存された場合と1本鎖の位置だけが保存された場合の2通りがみられたという。この1本鎖領域は蛋白質との相互作用で構造変化をきたし、Noller HFら（1975年）が提唱した5S rRNAと23S rRNAの結合部にも成り得るとしている。5S rRNAは塩基数が少ないことから、これ以降、進化あるいは機能解析の道具には成り得なかった。1本鎖領域に保存領域あるいは機能を担う領域が含まれることを予想した研究であるが、これ以降の16S rRNAの解析にも影響を与えたものである。その後Brown大学のGerbi SA, Edinburgh大学のCox RAのグループでは、真核細胞同士のリボソームRNAの比較あるいは原核細胞との比較を行って機能部位の探索を行っている。この時点になると制限酵素を使えるようになってきているので、かなり正確に塩基の位置を特定できるようになっているが、塩基配列の決定までは行われていない<sup>4,6)</sup>。

真核生物として*Xenopus laevis*, *Neurospora crassa*, *Drosophila melanogaster*, 原核生物として*Escherichia coli*を用い28S, 23S, 18S（真核生物）、16S（原核生物）を対象にしている。ここでもやはり、リボソームRNAの機能領域を明確にするため進化の過程で保存された領域に着目している。制限酵素で50~300塩基ごとにマッピングを行い、それについて異種同士から抽出したヌクレオチドをプローブにしてDNA-DNAあるいはDNA-RNAハイブリダイゼーションを行って、異種間で共通の塩基配列すなわち保存された領域を特定する作業を行っている。

その結果、(1)各種間に普遍的な保存領域が認められ、(2)その保存領域はリボソームRNAのDNAコード領域内に認められ、スパーサー領域にはほとんど認められない。(3)18S rRNAあるいは16S rRNAの3'末端側の保存領域は生物全般に広く認められ、mRNAの結合域Shine and Dalgarno boxを強く推定している。(4)16S, 18S内には他にもいくつかの保存領域がみつけられている。(5)またtRNAの結合域とrRNAのメチル化についての相関についても予想を立

てている。このように極めて内容の格調が高い仕事が行われている（Gerbi SA）<sup>6)</sup>。

1980年はリボソームRNAでは画期的な年であった。Woese CRらが70年代初頭から続けてきたオリゴマーDNAによる分類、すなわち塩基配列に基づいた研究に続かたちで、16S rRNA, 18S rRNAの完全塩基配列が決定されたのである。*E. coli*（1978）、*Proteus vulgaris*（1981）の16S rRNA, *Zea mays*の葉緑体rRNA（1980）、*Saccharomyces cerevisiae*の18S rRNA（1980）、*Xenopus laevis*の18S rRNA（1981）、ヒトとマウスのミトコンドリア12S rRNA（1980）、*S. cerevisiae*ミトコンドリア15S rRNA（1980）の塩基配列がほぼ同時期に発表された。また、*E. coli*の16S rRNAの二次構造が5カ所から提出され、細菌に普遍的な二次構造として認められたのもこの年である。これによってペプチド結合を触媒するリボソームの機能が保存配列に存在し、二次構造上に推定されることが確実になってきた。二次構造の決定にはコンピュータプログラムによるところが大きい。このように1980年に花開いたリボソームRNAの構造と機能の研究は、冒頭に述べたNoller HFらの成果に繋がっていくことになった。

## 2. リボソームRNAの保存塩基配列を利用した研究（図3）

リボソームRNAの保存塩基配列は前述のように16S rRNA, 18S rRNAの3'末端部にShine and Dalgarno領域があるが、他にもグアニンがメチル化することによって、mRNA, tRNAの結合が阻害される領域として4カ所、その他に4カ所見出されている。1987年の時点でHoshina S<sup>19,20)</sup>らは、こういった機能が明らかになる前に、そのうちの2カ所を任意に用いることで本来無菌の状態を維持している生体部位に起こる細菌感染症を普遍的に検出し、その病原体を識別する方法を提案した。16S rRNAに存在する保存配列は各々約20塩基あり（生体内でもこれをプライマーとする複製酵素の進展反応があるのだろう）、そこでこの共通な塩基配列の中から2つを選んでプライマーとし、いわゆる遺伝子増幅を行えば、原因菌に特異的な配列を検出可能な量だけ得られることになる。血液や髄液のように本来は無菌状態であるべき検査材料の細菌感染を診断するのに有効である。むろん*Helicobacter pylori*（以下*H. pylori*）による胃潰瘍、Salmonella, Shigellaなど検出されることによって原因菌として確定診断がつく病原体は、このようにして増幅されたDNAあるいはRNAの塩基配列を、さまざまな細菌叢DNAの中から調べて検出することで診

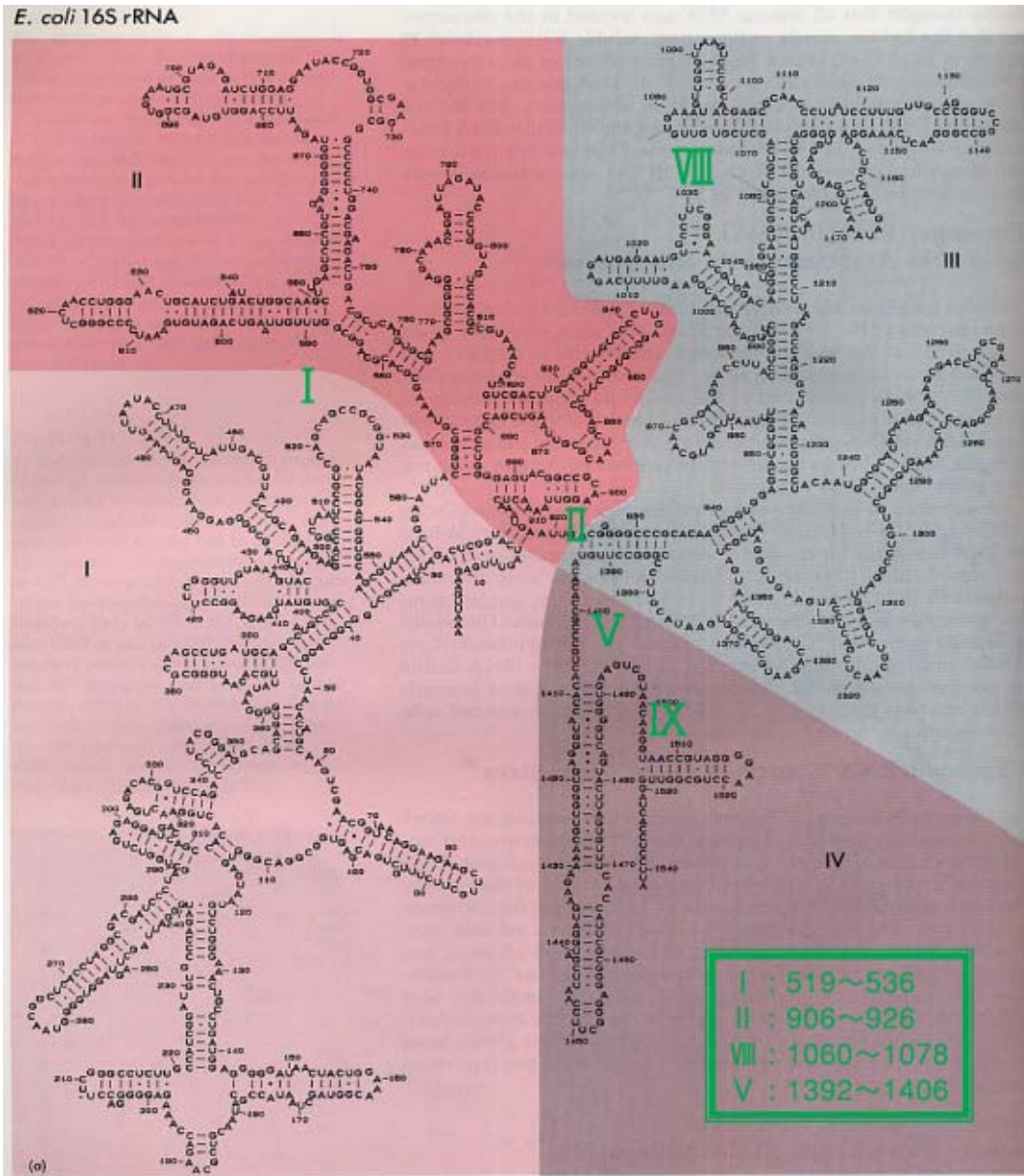


図3 16S rRNAの2次構造

オリゴマー I (530 ループ), II (926 部位), V (1401 部位) の 16S rRNA 2 次構造内の位置を示す。オリゴマー VIII は細菌にのみ共通の配列を示す。IX は V と対合して tRNA のアンチコドンが認識するデコーディング領域とされる<sup>50)</sup>。

断がつく。

また日和見感染症あるいは常在細菌叢にみられる宿主上皮細胞との相互作用といった感染状態を証明するには、欠くことのできない方法論である。例えば *H. pylori* による潰瘍形成には、病原体として病巣周辺から *H. pylori* を培養して証明するといった感染学的

あるいはコッホの原則の立証という立場で寄生体と宿主の関係を明らかにできる。しかし *H. pylori* の宿主細胞に対する発癌性を証明するといった場合には、*H. pylori* を培養したところで明らかにすることは期待できない。宿主細胞に対する *H. pylori* の発癌作用のイニシエーション、プロモーションの機構を解明するのに

は、特定の因子が使われている可能性が高く、培養では得られない情報としての *H. pylori* の存在を証明することが必要である。16S rRNA を検出する必要がある。

このように 16S rRNA の保存塩基配列を用いることによって細菌を証明すること、あるいはそれに引き続いて特定の菌の存在を明らかにすることが可能である。

また、健常ヒト腸内に定着する細菌が宿主に対し生理活性物質を受け渡すといった、相互作用の機構を解明するには生化学的、分子生物学的方法が必要となってきた。従来から細菌をすべて宿主細胞に対する病原体として考える臨床微生物学、感染症学の概念を変える必要があるが、16S rRNA 塩基配列を検出し細菌と宿主上皮細胞との相互作用を証明することで、細菌の持つ役割を新たに認識できると思われる。例えば 16S/18S rRNA では 530 ループ、926 部位、1401 部位の塩基配列、二次構造、立体構造が細菌、真菌、植物、動物の細胞で共通であり保存されていることから、これらの異なる細胞同士が相互作用を起こした場合には、これらオリゴヌクレオチドの細胞への相互取り込みがあり得ると考えられる。細胞の増殖や分化といった細胞周期そのものを制御し合う現象が予想される<sup>21-26)</sup>。

## II. リボソーム RNA 塩基配列の類似性と進化に関わる研究

Woese CR らは、1971 年より Sanger F らの二次元電気泳動による DNA フィンガープリント法 (1965) を利用して 5S rRNA の比較を行い、2 つの異なる菌種に関して類似性を求めて細菌の分類を行うことを試みた。その後、5S rRNA の塩基配列が短く情報量が少ないことから 16S rRNA を用いることになった。1974 年にはグアニンを認識して切断する T<sub>1</sub> Ribonuclease で 16S rRNA を消化し、オリゴマー RNA の断片化を行い、二次元電気泳動で配列を決定する方法をとっている<sup>7)</sup>。対象の 2 つの菌 (A 菌, B 菌) について上記方法でオリゴマー RNA の配列を比較し、相対的類似度 ( $S_{AB}$ ) を計算式  $S_{AB} = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$  から算出している。N<sub>A</sub> は A 菌の通常 6 塩基以上のオリゴマーの個数、N<sub>B</sub> は B 菌の 6 塩基以上のオリゴマーの個数、N<sub>AB</sub> は A, B 両菌で共通する配列を示したオリゴマーの個数である。これによって 1975 年には 16S rRNA の配列にみられる保存性が議論されている<sup>8)</sup>。保存された普遍配列が 9 種報告され、16S rRNA の 3' 末端に近い配列の重要性を指摘している。

しかしながら保存領域に関する報告はこれ以降みら

れず、1977 年には 60 菌種の原核生物の分類に 16S rRNA の類似の塩基配列を上記の方法で算出し (相対類似値)、比較を行っている<sup>9)</sup>。具体的にはメタン産生菌がメタン生産という同一形質を示すことから 1 つのグループにまとめられていたが、16S rRNA の配列からみると 2 つのグループに分かれて進化したものであったことを証明している<sup>10)</sup>。また細胞壁をもたない細菌として *Mycoplasma*, *Thermoplasma* を調べ、*Mycoplasma* は起源が *Bacillus*, *Lactobacillus* 属に由来するもので、*Thermoplasma* は archaeobacteria (古細菌) 由来であるとしている<sup>11)</sup>。1980 年におけるこのような一連の 16S rRNA 塩基配列の類似性を利用した原核生物の系統樹の確立は画期的なことであった。生物界における原核生物、真核生物といった分類に加え、分子進化の考えのもとに古細菌の独立を示したことは 16S rRNA 研究の業績として重要なものである<sup>12,13)</sup>。

ベルギーの De Ley J らのグループは、16S rRNA を <sup>14</sup>C でラベルし抽出精製した全長をプローブとして用い、比較対象とする細菌の DNA とハイブリダイズさせ T<sub>m</sub> 値の測定とプローブの結合量の測定から菌種間の類縁関係を調べている<sup>14)</sup>。特に *Agrobacterium*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Nitrogen-Fixing bacteria* の各属内、属間における菌種の近縁関係を求めている。それによると、従来から行われてきた形質の差違を基本にした分類とほぼ相関する成績が得られ、Woese CR らの 16S rRNA のオリゴマーの比較による方法で得られた成績と同様であった<sup>15,16)</sup>。

すなわち 16S rRNA の配列の類似性を用いて進化の系統樹が作製できたことと、従来の形質をもとに分類していた結果がほぼ一致したのである。このことは驚くべきことである。それでもいくつかの菌種は分類上の位置が異なり 16S rRNA の成績から訂正されていた。残念ながら De Ley J らの方法がハイブリダイゼーションの温度、塩濃度条件によって得られる結果が変わることと、近縁関係が数値化できないことによってその後、進展はみられなかった。

## III. リボソーム RNA 塩基配列の多様性を利用した研究

Kohne DE ら<sup>17)</sup> のグループは、1972 年に *Neurospora crassa* のリボソーム RNA をコードする DNA を分離、精製した。リボソームは蛋白質として回収し、その中の RNA を抽出、精製している。菌体 DNA は抽出後フレンチプレスで物理的に切断し、約 300 塩基にしたものを用いている。DNA-RNA ハイブリダイゼーションをさせ、ハイドロキシアパタイトを用いて回収した

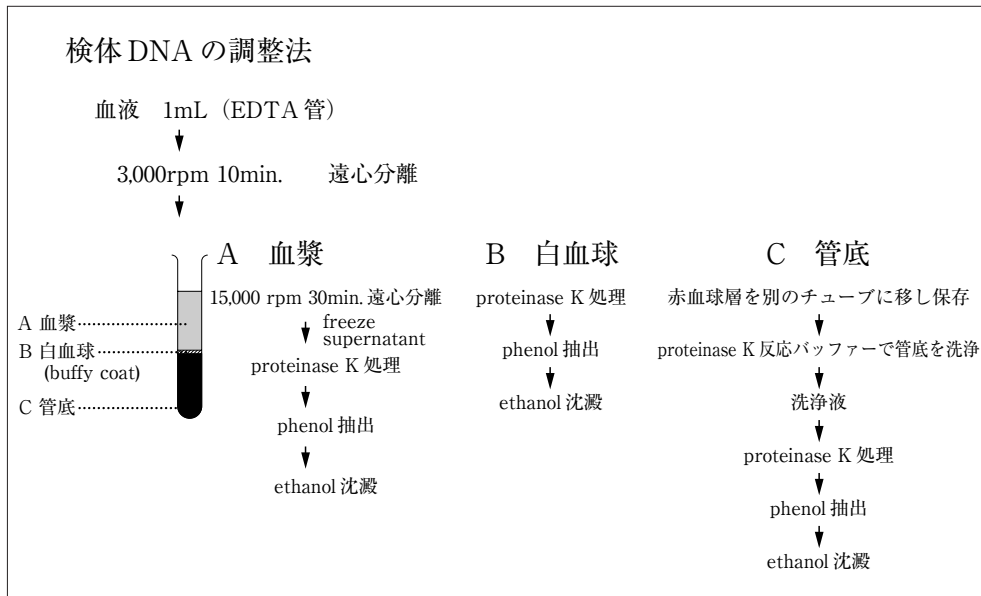


図4 血流感染症血液からの 16S rRNA の検出 (1)

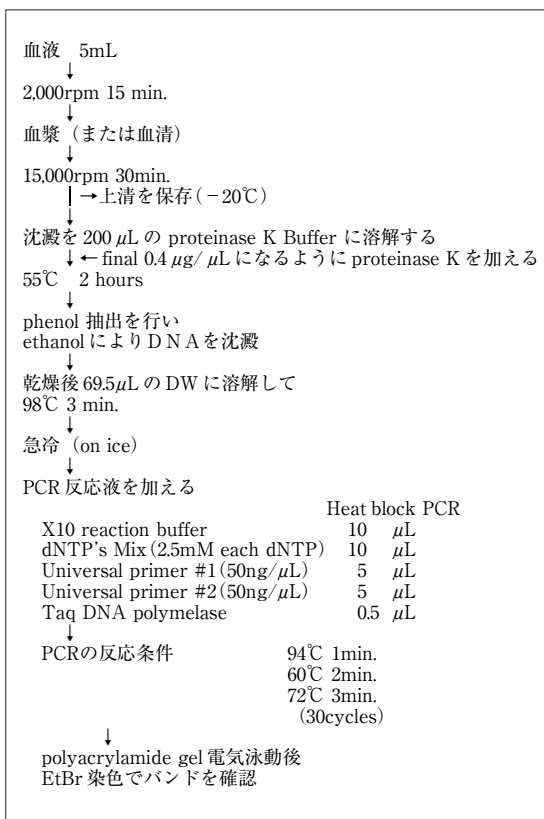


図5 血流感染症血液からの 16S rRNA の検出 (2)

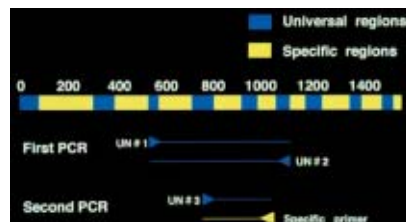


図6 ユニバーサル領域と特異領域の配置

のち、RNaseでRNAを壊し、リボソームRNAをコードしたDNAのみを回収している。それによると *Neurospora crassa* は約100コピーのリボソームシストロンを保持している成績が得られている。考察の中で Avery RJらの *E. coli* 16S rRNA の成績が引用されており、*E. coli* 菌種内のどの株を用いても16S rRNA が共通であることを示し、将来rRNA geneの塩基配列を知る必要があると述べている。このことは彼自身、16S rRNAのコピー数や、同一菌種内では、塩基配列が同一である可能性を予想している。その後この方向で菌を検出、同定してゆく方法が確立されたものと思われる。

Woese CRですら1975年の論文で、16S rRNAの保存塩基配列に着目した研究を進めていることからしても、この1970年代初期のリボソーム研究は塩基配列の保存領域、二次構造における1本鎖領域、リボソームのタンパク合成における機能、役割といった研究の

流れに沿っていたと思われる。その後 Woese CR は 1977 年の論文で、16S rRNA の類似性塩基配列をもとに生物の分類、進化系統樹の研究に進んでいる。Kohne DE からも 1972 年の論文の後に 16S rRNA 多様性塩基配列を用いて菌種特異的検出、同定の方法論を研究、開発することに気がついていったのではないだろうか<sup>17)</sup>。

#### IV. 16S rRNA/DNA の保存領域と多様性領域に着目した検出方法 (図4, 5, 6)

リボソーム RNA の保存塩基配列は、前述のように 16S/18S rRNA の 3' 末端部に Shine and Dalgarno 領域があるが、他にも mRNA, tRNA の結合する領域として 3カ所 (I, II, V), その他に 16S rRNA だけに共通する配列箇所 (VIII) が見出されている。1987 年の時点で Hoshina S<sup>19,20)</sup> らは、こういった機能が明らかになる前に、そのうちの 2カ所を任意に用いることで本来無菌の状態を維持している生体部位に起こる細菌感染症を普遍的に検出し、その病原体を識別する方法を提案した。16S rRNA に存在する保存的配列は各々約 20 塩基あり (生体内でもこれをプライマーとする複製酵素の進展反応があるのだろう)、そこでこの共通な塩基配列の中から 2つを選んでプライマーとし、いわゆる遺伝子増幅を行えば、原因菌に特異的な配列を検出可能な量だけ得られることになる。血液 5mL 中に数個以下といわれる血流感染症の起因菌の 16S Ribosomal DNA を検出する方法を述べる<sup>19,27~30)</sup>。

患者血液は採取し軽く遠心したのち、血球を分離し、血漿と分けて使用する。微量遠心器で 15,000 回転、30 分遠心して集菌したのち proteinase K 処理、フェノール抽出、エタノール沈殿を行い、菌 DNA を回収する。PCR プライマーには保存領域から得た配列を用い、型のごとく PCR 反応を行い、ハイブリダイズ温度 60℃ で 30 サイクルをかける。この操作で原因菌 DNA が検出される。

当検査室の半年間 (98~99) の血液培養で検出された株数 176 株中、*S. aureus* 42 株、*S. epidermidis* 24 株、*P. aeruginosa* 13 株、*E. coli* 10 株であることから、この 4 種に関して細菌の特異的配列をもったプライマーを作成した。

*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* に特異的な 16S rRNA の塩基配列を上記の保存領域 oligo I (519~536) と oligo VIII (1061~1078) に挟まれる領域 (560 塩基) から選び出し、それぞれ pSA, pSE, pPA, pEC とした。片方に保存領域 VIII, 他方に各菌種に特異的なプライマー PSA, pSE などを用い、

DNA 増幅を nested で行い (230 塩基) 同定操作を行った。保存領域プライマー (I, II) だけを用いた菌の検出率は同定成績は得られないが、敗血症の患者血液を対象にすると 23 例中 20 例 (87%) が何らかの細菌感染が陽性であり、対照として血液を同時に採血し増菌培養した従来法では 23 例では 3 例 (13%) であった。培養成績は別としても、原因菌 DNA の検出は臨床症状を反映する成績が得られると思われた<sup>31~37)</sup>。

この方法では迷入菌の防止とともに DNA フリーの検査手順の確立が要求される。即ち DNA 増幅操作で用いられる試薬、器具から DNA を取り除く必要がある。例えばプライマーや試薬類はウルトラフリーの分子ろ過法 (Ultra free C3-LGC, Millipore) で DNA を除いたり、水は DNA フリーのグレードのものを購入するとか、DNA フリーの増幅酵素を用いる。器具にガス滅菌、 $\gamma$  線滅菌を施し、付着した DNA を不活化するとか、ピペットチップにフィルターを装着したものを使う。低レベル DNA を扱うのにクリーンベンチを用意し、検体の前処理、DNA 抽出、PCR 準備を行うなどの注意が必要である。また高レベル DNA 処理では SD ボックスを用意し、DNA 増幅した産物は検

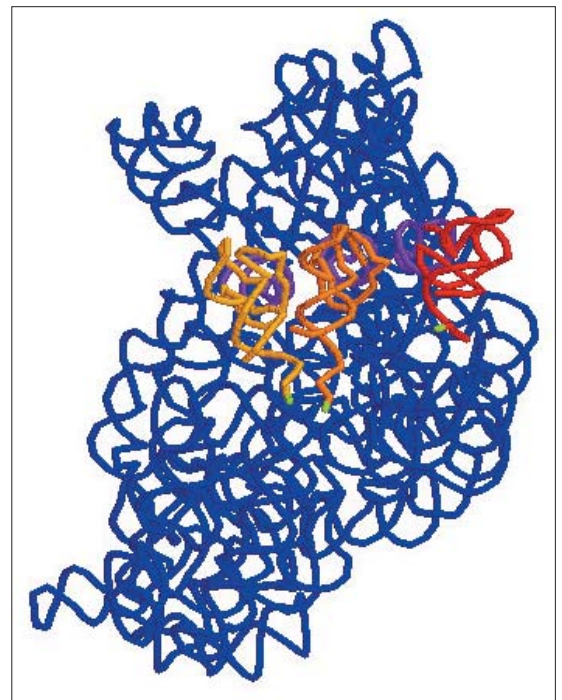


図7 16S rRNA の立体構造と保存領域の位置

オリゴマー I (530 ループ), II (926 部位), V (1401 部位) の 16S rRNA 立体構造における位置を示した。細菌にのみ共通配列のオリゴマー VIII は少し離れた位置にみられる。

出後すみやかに封じ込める必要がある。

保存領域プライマーを用いたDNA増幅産物の塩基配列による同定を行うには、以下のような操作を行う。

16S rDNAを上記のように保存領域プライマーで増幅し、さらに保存領域の片側プライマーだけを用いてサイクルシーケンスを行うと、保存領域で増幅された菌種特異的DNAの塩基配列が得られる。それをDNAデータベースを用いて調べ、ホモロジー検索によって塩基配列による同定操作を行う。最近では感染症原因菌が多様化してきており、培養検査では同定不可能な場合に大変有用な方法である<sup>38-44)</sup>。

#### V. 16S/18S rRNAの保存配列の普遍性 (図7)

繰り返しになるが、リボソームRNAの保存塩基配列は16S rRNA, 18S rRNAの3'末端部にShine and Dalgarno領域があるが、他にもグアニンがメチル化することによって、mRNA, tRNAの結合が認められる領域として発見された3カ所が見出されている。これらはヒト細胞中のリボソーム粒子18S rRNAと細菌細胞中のリボソーム粒子16S rRNAとに共通する配列であって、16S/18S rRNAのI (530ループ), II (926部位), V (1401部位) の配列とよんでいる。16S/18S rRNAに存在する保存的配列は各々約20塩基あり、生体内でもこれをプライマーとする複製酵素の伸展反応があるのだらうと推定される。表1に示すように*E. coli*のリボソームの保存領域のうちI (5'cag cag

ccg cgg taa tac 3') とヒトの18S rRNAとラットの18S rRNAとの一致率は89%であり、*E. coli*のリボソームの保存領域のうちII (ccg tca att cct ttg agt tt) とヒトの18S rRNAとラットの18S rRNAとの一致率が95%であり、*E. coli*リボソームの保存領域のうちV (gca cac acc gcc cgt) とヒトの18S rRNAとの一致率が93%, ラットの18S rRNAとの一致率が87%であるように*E. coli*や高等の哺乳類あるいは真菌, 植物を含めて進化の進み具合に差があるにも関わらず、共通の遺伝子配列を持つことが確認されている。

#### VI. 16S/18S rRNAの塩基配列中の保存領域の機能 (図8, 9)

前述のように16S/18S rRNA塩基配列の中には細菌, 真菌, 植物, 動物など細胞で共通の配列がみられる。特に冒頭でも述べたように530ループ, 926部位, 1401部位は塩基配列の共通する領域で二次構造, 立体構造も共通した性状を示している。これらの領域は16S/18S rRNAのP site (peptidyl transferase center)中に存在していて、mRNAのコドンとtRNAのアンチコドンが認識するデコーディング機能にかかわる部位である (特にV領域)。即ちリボソームのsmall subunit (16S/18S rRNAとリボソーム蛋白質の複合体)にmRNAとtRNAが会合する場所である。18S rRNAでは蛋白質翻訳の開始には、このP site部位にホルミル化されたメチオニン-tRNA (f Met-

表1 16S/18S rRNAの保存領域の普遍性

	5'-3'	Human(Homo sapiens)	Rat(Rattus norvegicus)	E. coli	
		18S rRNA	18S rRNA	16S rRNA	
I	CAGCAGCCGCGTAATAC(18)	Score=32bits Identities=16/18(89%) Identities=16/16(100%) Expect=0.79	Score=32bits Identities=16/18(89%) Identities=16/16(100%) Expect=0.06	Score=36bits Identities=18/18(100%) Expect=0.002	
V	GCACACACCCCGT(15)	Identities=14/15(93%)	Score=26bits Identities=13/15(87%) Identities=13/13(100%) Expect=0.92	Score=26.3bits Identities=13/15(87%) Identities=13/13(100%) Expect=0.4	Human DNA seq. On chromosome 1 Score=30bits Identities=15/15(100%) Expect=3.1
II	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT(20)	Score=32bits Identities=19/20(95%) Expect=2.4	Score=32bits Identities=19/20(95%) Expect=0.090	Score=32bits Identities=19/20(95%) Expect=0.047	
VIII	ACGACACGAGCTGACGAC(18)	×	×	Score=30bits Identities=15/18(83%) Identities=15/15(100%) Expect=0.15	Human DNA seq. On chromosome 1 Score=28bits Identities=14/18(83%) Identities=14/14(100%) Expect=12





図8 16S rRNAの立体構造とtRNAの結合部位

tRNAが16SrRNAに結合する部位P site(peptidyl transferase center)は、530ループ、926部位、1401部位に相当し、70 Å以内に入る<sup>50</sup>。

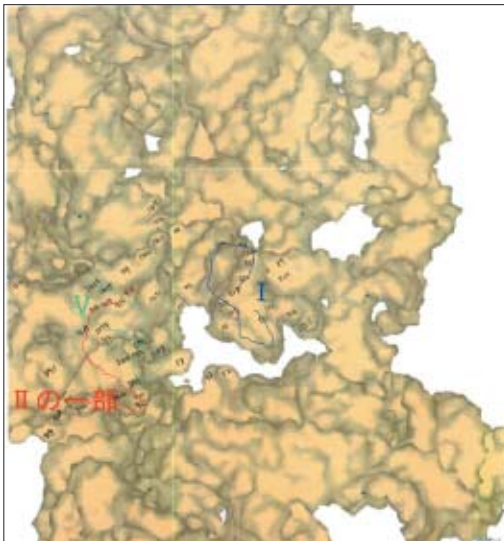


図9 拡大されたリボソーム small subunit と保存領域 (1本鎖部位) の位置

リボソーム small subunit (16S rRNA と蛋白質からなる) の立体構造における530ループ、926部位、1401部位の位置関係を示した。横断する間隙部分をtRNA、mRNAが横切る。926部位、1401部位がp siteに密接に関わるのがわかる。

tRNA<sup>Met</sup>: UAC) と mRNA の転写開始コドン (AUG) が相補的に結合したものと翻訳開始因子 eIF2 が定着するのが第1段階である。つぎにリボソームの large subunit (23S/28S rRNA とリボソーム蛋白質の複合体) がかぶさって、いわゆるリボソーム粒子が形成される。small subunit と large subunit が結合した段階でペプチド鎖伸長反応が始まる。さらにリボソーム: tRNA 複合体の mRNA に対する1コドンの移動 (トランスロケーション) が引き続いて起こる。このリボソームの small subunit 中にある530ループ、926部位、1401部位は立体構造でその位置を決めると70~100 Åの間に入る。リボソーム上での蛋白質翻訳の第1段階では、P site に f Met-tRNA<sup>Met</sup> が結合する反応が起こる時、f Met-tRNA<sup>Met</sup> が A site に誤って結合しないこと、引き続き mRNA の開始コドン AUG が f Met-tRNA のアンチコドンと結合する。この時、f Met-tRNA<sup>Met</sup> と P site の結合の後につぎの tRNA が会合してこないことがみられる。さらに large subunit が最後まで会合してこないことなど一連の阻害反応がみられ、それを担う因子が存在する。それぞれ役割分担して蛋白質翻訳が順調に性格に進むための働きをしている因子を Initiation factor (IF) という。細菌以外では eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4B, eIF5b があり、このうち eIF2 は GTP を脱リン酸する GTPase である。eIF2 は、リボソーム small subunit に最初に結合して f Met-tRNA<sup>Met</sup> が P site に結合するための空間を提供し、eIF3 と eIF5b は large subunit が結合するのを防ぐ「くさび」の役をしていると考えられる。

#### VII. 18S rRNA での人為的蛋白質翻訳開始の可能性

前述のリボソーム RNA に存在する保存的配列を合成した1本鎖DNAオリゴマーを細胞内に取込ませると、増殖性細胞がさらに増殖することが見出された。

16S/18S rRNA の保存領域は蛋白質合成機能を行う場の領域とされ、リボソーム立体構造をみると1本鎖で存在することが明らかになってきた。ラット繊維芽細胞 Rat6 の18S rRNA 塩基配列に相補的なDNA塩基配列を3つ合成した。3つのDNAオリゴマーは、I, II, Vである。

Rat6細胞を上皮細胞増殖因子EGF (epidermal growth factor) (10ng/mL) 加DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) を入れて2週間培養した (serum free medium)。その後以下の条件で培養を3週間続けた。すなわち上記培地で培養を続けた (EGF) case, それに oligo DNA I, II をそれぞれ 10ng/mL を加えたものを (oligoI-II) case とした。こ

これらの条件培地に馴化したRat 6細胞をDMEMのみで培養した (noCS-EGF) case, 10%子牛血清 (CS) をDMEMに添加した (CS) case, EGF (10ng/mL) を添加した (EGF) caseに移し, 培養を1週間から3週間行った。培地交換はその間3~4日ごとに適宜行った。

(EGF) caseで培養したRat 6細胞を (noCS-EGF) caseの培地に置き換えると11個のコロニーを形成した。(CS) caseに置き換えた場合ではコロニー数は61個に増加した。(EGF) caseで培養を行うとコロニー数は170個であった。一方, (oligoI-II) caseで培養を行ったRat 6細胞は (CS) caseに置き換えた場合コロニー数は77個であった。(EGF) caseではコロニー数は832個であった。(EGF) caseで培養を続けた場合に比べ, それにオリゴマーDNAを添加して培養を続けた (oligoI-II) caseのRat 6細胞では, (CS) caseのいわゆる標準培地に移したものではコロニー数はわずかに増加したが, (EGF) caseに移した場合ではコロニー数が強く増加した。また, oligo Iの代わりに oligo Vを加えて同様の実験を試みたところ, 細胞増殖能が認められた。これはEGFによる細胞内信号伝達系が働いた時にみられるシグナル依存性の蛋白質翻訳を活性化した可能性がある。

Rat 6細胞は約2週間 (EGF) caseで正常発育であった。その後Rat 6細胞の発育は正常を維持していた。第26日, (oligoI-II) caseでのRat 6細胞の発育が増殖性に変換し, コロニー形成がみられた。(EGF) caseでのRat 6細胞の発育がやや増殖性に変換し, コロニー形成がみられた。また, oligoII-Vを添加した系でもRat 6細胞の発育が増殖性を示した。oligoI-IIを添加した場合の方が細胞増殖能が最も強力であった。第26日, 96穴プレートにそれらのコロニーを選び, 細胞を $1 \times 10^5$  cell/wellずつ軟寒天培地に植え継いだ。(EGF) caseでは上層を0.3%寒天にEGFのみ添加, (oligoI-II) caseでは上層を0.3%寒天にEGFとoligo DNAのIとIIを添加, 下層はすべて0.5%寒天で何も添加せず。第33日, 96穴プレートにそれらのコロニーを選び, 細胞を $8 \times 10^3$  cell/wellずつ接種。条件培地は (noCS-EGF) case, (CS) case, (EGF) caseの培地に移した。第39日, 増殖性細胞に一般にみられるフォーカス形成とコロニー形成がみられた。第54日, 結果観察した。

実験ではoligo II (926部位) を加えた場合にコロニー数が最も増加したことから, その塩基配列の位置が蛋白質翻訳の主たる場 (peptidyl transferase center) を提供していると考えられる。リボソームRNAの1

本鎖領域で (IIではTが多くみられる) mRNAのポリAテールが結合して, いわゆるサークルを形づかったのかもしれない。その結果, リボソーム粒子の再構成, 再利用が効率良く進み蛋白質翻訳が増強された可能性が考えられる。このP site部位は16S/18S rRNAの1本鎖領域で塩基配列が進化の過程で保存され, fMet-tRNA<sup>Met</sup>が結合する翻訳開始部である。そこで1本鎖のoligomer DNAのI, II, VをDNA合成して細胞に与えると, P siteの530ループ, 926部位, 1401部位に到達しリボソームRNAに結合してf Met-tRNA<sup>Met</sup>が誤ってA siteに結合しない役目と, 2番目のtRNAがP siteに会合してこないように制御し, さらにlarge subunitが18S rRNAを含むsmall subunitに覆い被さるのを遅らせるなど, リボソーム粒子が完成するのを遅らせるを考える。rRNAは本来単独でpeptidyl transferaseとしての酵素活性を有するが, その働きを速めたり, 特異性を上げるものとしてinitiation factor (IF) の役目が考えられている。eIF2は530ループのG530に働くGTPaseとされ, f Met-tRNA<sup>Met</sup>がmRNAの開始コドン (AUG) に結合し, 2番目のtRNAがP siteに直ぐに結合するのを防ぐように制御しているとされている。1本鎖DNAが化学物質として, 翻訳開始時のP siteにおけるtRNAの働きについて触媒のように寄与していると推測される (実際に細胞質中には, これらのoligo DNAが存在してinitiation factorとして働いているのかもしれない)。18S rRNAの保存領域における配列を有する1本鎖DNAオリゴマーを細胞内に取込ませると, 蛋白質翻訳開始を助長したものと思われる。

このことから, 細胞を用いて増殖因子と選んで組み合わせると有用蛋白質を多量に生産できる可能性がみられる。新たに細胞内で蛋白質を多量に生産させることができ, さらには細胞を増殖させたり増殖を制限させるなど医薬品の開発に繋がると考えられる<sup>45-48)</sup>。

## VIII. まとめ

16S rRNAは2次構造をみると2本鎖領域と1本鎖領域が認められていて, 長い間その1本鎖領域が蛋白質翻訳機能に関わるものと考えられてきた。増殖中の細菌はエネルギーの80%, 乾燥重量の50%を蛋白質合成に使っている。1955年にFrancis H. Crickが蛋白質翻訳機構を予言して, リボソームRNAの働きについて解明する研究が始まった。その過程を注意深く眺めると16S rRNAの2次構造の解明, 立体構造のコンピュータグラフィックスによる描画による機能解析に有用な情報を得られることとなった。細菌感染症にお

ける臨床検査医学に有効な手段をもたらしたことに留まらず、16S rRNA 本来の役目を理解して応用する機運が高まってきている。

#### 文 献

- 1) von Ahsen U., Noller H.F. 1995. Identification of bases in 16S rRNA essential for tRNA binding at the 30S ribosomal P site. *Science*. 267 : 234-237.
- 2) Lewin B. 1994. pp 484-490, *Genes V*, Oxford University Press, Oxford.
- 3) Wrede P., Pongs O., Erdmann V.A. 1978. Binding oligonucleotides to *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus* 5S RNA. *J. Mol. Biol.* 120 : 83-96.
- 4) Cox R.A., Thompson R.D. 1980. Distribution of sequences common to the 25-28S-ribonucleic acid genes of *Xenopus laevis* and *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 187 : 75-90.
- 5) Stiegler P., Carbon P., Ebel J.P., et al. 1981. A general secondary-structure model for prokaryotic and eucaryotic RNAs of the small ribosomal subunits. *FEBS* 120 : 487-495.
- 6) Gourse R.L., Gerbi S.A. 1980. Fine structure of ribosomal RNA III location of evolutionarily conserved regions within ribosomal DNA. *J. Mol. Biol.* 140 : 321-339.
- 7) Woese C.R., Sogin M.L., Sutton L.A. 1974. Prokaryote Phylogeny. *J. Mol. Evol* 3 : 293-299.
- 8) Woese C.R., Fox G.E., Zablen L.B., et al. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*. 254 : 83-85.
- 9) Fox G.E., Pechman K.R., Woese C.R. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to prokaryotic systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27 : 44-47.
- 10) Fox G.E., Magrum L.J., Balch W.E., et al. 1977. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 4357-4541.
- 11) Woese C.R., Maniloff J., Zablen L.B. 1980. Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 494-498.
- 12) Fox G.E., Stackebrandt E., Hespell R.B., et al. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Science*. 209 : 457-463.
- 13) Woese C.R. 1981. Archaeobacteria. *Scientific American*. 244 : 94-106.
- 14) De Smedt J., De Ley J. 1977. Intra-and intergeneric similarities of *Agrobacterium* ribosomal ribonucleic acid cistrons. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27 : 222-240.
- 15) Gillis M., De Ley J. 1980. Intra-and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30 : 7-27.
- 16) De Smedt J., Bauwens M., Tytgat R., et al. 1980. Intra-and intergeneric similarities of ribosomal ribonucleic acid cistrons of free-living, nitrogen-fixing Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30 : 106-122.
- 17) Kohne D.E., Steigerwalt A.G., Brenner D.J. 1984. Nucleic acid probe specific for members of the genus *Legionella*. In *Legionella*. Proceedings of the second International Symposium, Thornsberry C., Balows A., Feeley J.C., et al (eds). p107 American Society for Microbiology, Washington DC.
- 18) Chattopadhyay S.K., Kohne D.E., Dutta S.K. 1972. Ribosomal RNA genes of *Neurospora*: Isolation and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 : 3256-3259.
- 19) Hoshina S., Kahn S.M., Jiang W., et al. 1990. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 13 : 473-479.
- 20) 川上正也編. 1992. 共通プライマーを用いた遺伝子増幅法による細菌 16S リボソーム DNA の塩基配列の同定 p99-112 医学の中の遺伝子工学, 国際医学出版.
- 21) M. Chiba, M. Komatsu, T. Ishioka, et al. 1998. Microbiology of the intestinal lymph follicle- a clue to elucidate causative microbial agent(s) in Crohn's disease. *Medical Hypotheses*. 51 : 421-427.
- 22) Mitsuhiro Chiba, Midori Kono, Sadayori Hoshina. 2000. Presence of bacterial 16S ribosomal RNA gene segments in human intestinal follicle of Chrones' disease patient. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 35 (8) : 824-831.
- 23) Chiba M., Kono, M., Hoshina, S, et al. 2000. Presence of bacterial 16S ribosomal RNA gene segments in human intestinal lymph follicles. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 35 (8) : 824-831.
- 24) M.Chiba, S. Hoshina, M.Kono, et al. 2001. *Staphylococcus aureus* in inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 36 : 615-620.
- 25) M.Chiba, T. Nakamura, S. Hoshina. 2001. Optimal cases and sites to search for primary microbial agents in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 120 : 1066-1067.
- 26) 保科定頼. 2002. Viable but non cultivable (VBNC) の微生物学. 耳鼻咽喉科展望 45 : (2) 139-143.
- 27) 保科定頼, 町田勝彦. 1988. 核酸プローブを用いた細菌検査. *臨床病理*. 36 : 545-547.
- 28) Miasami Morotomi, Sadayori Hoshina, Hidetoshi Mutai, et al. 1989. Oligonucleotide probe for Detection and identification of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.*, 27 : 2652-2655.
- 29) 保科定頼, 河野 緑, 北原慎太郎, et al. 1993. 細菌 16S リボソーム RNA 共通配列を用いた遺伝子増幅

- の問題点. 日本臨床検査自動化学会誌. 18 : 731-733.
- 30) Sadayori Hoshina, Midori Kono, Shintaro Kitahara, et al. 1994. Universal primers to detect the general presence of bacteria followed by the Sequencing identification. World Congress of Anatomic and Clinical Pathology. Editor Guillermo G. Santoscoy. Monduzzi Editore S.P.A.- Bologna (Italy), 53-57.
  - 31) Katsutoshi Saruta, Teiichi Matsunaga, Sadayori Hoshina. 1995. Rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* by PCR amplification of ribosomal DNA spacer region. FEMS Microbiology Letters. 132 : 165-170.
  - 32) Katsutoshi Saruta, Sadayori Hoshina, and Katsuhiko Machida. 1995. Genetic identification of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction using single-base-pair mismatch in 16S ribosomal RNA gene. Microbiol. Immunol. 39 : 839-844.
  - 33) Katsutoshi Saruta, Midori Kono, Sadayori Hoshina, Sonomi Kanemoto, et al. 1996. Rapid detection and taxonomic identification of bacteria by two-step polymerase chain reaction. Jikei Medical Journal. 43 : 95-103.
  - 34) 保科定頼, 町田勝彦. 1996. 敗血症のDNA診断. 臨床病理. 44 : 314-321.
  - 35) Katsutoshi Saruta, Midori Kono, Sadayori Hoshina, et al. 1996. Rapid detection and taxonomic identification of bacteria by two-step polymerase chain reaction. Jikei Medical Journal. 43 : 95-103.
  - 36) Katsutoshi Saruta, Teiichi Matsunaga, Midori Kono, et al. 1997. Simultaneous detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by nested PCR amplification from cerebrospinal fluid samples. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 19 : 151-157.
  - 37) 猿田克年. 1997. 微生物検査における遺伝子技術の導入と最近の動向. 東京都医師会雑誌. 49 : 1345-1351.
  - 38) 保科定頼. 1997. DNA/RNAによる病原微生物の検出と定量. 最新医学. 52 : 2070-2078.
  - 39) 保科定頼. 1999. 感染症の遺伝子診断. メビオ (MEDICAL VIEW). 16 : (6)12-17.
  - 40) 高尾 匡, 河野 緑. 保科定頼. 2000. DNA同時検出法による喀痰および咽頭拭い液からの呼吸器感染症主要病原菌の検出. 東京慈恵会医科大学雑誌. 115 (2): 235-243.
  - 41) Eriko Kai, Kazuhiro Ikebukuro, Sadayori Hoshina, et al. 2000. Detection of PCR products of *Escherichia coli* O157:H7 in human stool samples using surface plasmon resonance (SPR). FEMS Immunology and Medical Microbiology. 127:1: 1-6.
  - 42) Miyachi H., Yano, K., Ikebukuro, K., et al. 2000. Application of chimeric RNA-DNA oligonucleotides to the detection of pathogenic microorganisms using surface plasmon resonance. Analytica Chimica Acta 407 : 1-10.
  - 43) Hirotaka Miyachi, Kazuyoshi Yano, Kazunori Ikebukuro. Scheduled publication date: FEB-2000. Application of chimeric RNA-DNA oligonucleotides to the detection of pathogenic microorganisms using surface plasmon resonance. Analytica Chimica Acta. 407(1-2): 1-10.
  - 44) 保科定頼. 2002. 感染症の遺伝子検査—臨床の場で用いる場合の問題点, 今後の展望. 医学のあゆみ. 200 : (11) 874-876.
  - 45) Ling-Ling Hsieh, Sadayori Hoshina, and I. Bernard Weinstein. 1989. Phenotypic effects of overexpression of PKC  $\beta$  1 in rat liver epithelial cells. Journal of Cellular Biochemistry. 41 : 179-188.
  - 46) Sadayori Hoshina, Marius Ueffing, I. Bernard Weinstein. 1990. Growth factor-induced DNA synthesis in cells that overproduce protein kinase C. Journal of Cellular Physiology. 145 : 262-268.
  - 47) Sadayori Hoshina, Masami Morotomi, I. Bernard Weinstein. 1991. Effect of Fecapentanene on protein Kinase C. Biochemical and Biophysical Research Communications. 176 : 505-510.
  - 48) 保科定頼. 1995. リボソームRNA萌芽期の研究に関する考察. 医学と薬学. 33 : 1287-1294.
  - 49) B. Alberts, D. Bray, J. Lewis., et al. 1994. Molecular Biology of the CELL, third ed. Garland publishing, Inc. New York & London.
  - 50) Watson J. 2004. Molecular Biology of the Gene, fifth ed. CSHL Press.

---

## Review for the research on 16S ribosomal RNA of its Single Stranded Regions

Sadayori Hoshina

Department of Laboratory Medicine, The Jikei University, School of Medicine

Evolutionary phylogeny was accomplished by homology search for 16S ribosomal RNA sequences. This method has been used as bacterial identification system in laboratory medicine through hybridization technique and polymerase chain reaction. 16S rRNA is suitable gene target for identification of bacteria by its universal conserved sequence and its stable diversity of essential organelle as protein synthesis.

We could classify the ribosomal research to four areas in its early stage. First, its functional and structural analysis through conserved (single stranded) region of 16S ribosomal RNA sequence. Second, its usefulness of conserved sequences for detecting the bacteria. Third for evolutionary phylogeny study using 16S rRNA sequence homology. And fourth, identify the bacteria using 16S rRNA sequence diversity.

Research for ribosomal function through 16S rRNA single stranded region has been taken place in Europe and United States, especially Noller HF in California Santa Cruz. At the same time, Woese CR of Illinois University started to construct the evolutionary phylogeny using 16S rRNA double stranded region. Kone DE focused on detecting bacteria by this region.

Structural analysis for 16S rRNA was conducted in recently, suggested the model of computer assist structural biology. Function of these single stranded region was cleared for protein synthesis as peptidyl transferase center. These finding suggested the mechanisms of protein translation of rRNA was more applied method to genetic engineering of medicine.