

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850049

研究課題名(和文) DNAメチル化酵素の配列認識変換の機構解明とエピゲノム育種への応用

研究課題名(英文) Mechanisms underlying target specificity changes of DNA methyltransferase, and its application to epigenome breeding

研究代表者

矢野 大和 (Yano, Hirokazu)

東京大学・新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：20646773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：原核生物が保有するDNAメチル化酵素のトランスクリプトーム制御能力を利用して細菌の形質を操作する「エピゲノム育種」の確立を目指し、そのために必要な基盤情報を得た。特に、ピロリ菌の遺伝子ノックアウトを用いた計画においては、特定のII型DNAメチル化系がトランスクリプトーム制御に関わり、酸化ストレス耐性をなどの多面的な形質に影響を与えているという証拠を得た。また特定のDNAメチル化酵素の導入により大腸菌のトランスクリプトームを変化させることができることを発見した。

研究成果の概要(英文)：We obtained basic knowledge that contributes to 'epigenome breeding' wherein we manipulate bacterial phenotypes using transcriptome-modulation capability of DNA methyltransferases. We demonstrated that a Type II DNA methyltransferase in a *H. pylori* strain contributes to adaptive phenotypes through gene regulation. Furthermore we found that it is possible to modulate transcriptome of *E. coli* by introducing sequence-specific DNA methyltransferase genes to *E. coli*.

研究分野：応用微生物学

キーワード：エピゲノム トランスクリプトーム DNAメチル化 ピロリ菌 メチローム 制限修飾系

1. 研究開始当初の背景

増加する微生物ゲノム情報を生物育種へどうつなげるかは現在大きな課題の一つとなっている。ゲノム配列の詳細な比較解析から、ピロリ菌をはじめとする病原細菌が DNA メチル化酵素の配列認識ドメインをコードする DNA 領域を頻繁に置換していることが明らかになってきた。これは「微生物がゲノムのメチル化パターンの切り替えによって、トランスクリプトーム状態を切り替え、環境に適応する」という新しい適応進化のあり方を示唆する。微生物のこの適応進化のメカニズムを理解することができれば、DNA メチル化酵素を利用して生物の形質を改変する「エピゲノム育種」の実現が可能になると期待できる。

2. 研究の目的

エピゲノム育種実現に向けた基盤情報を得るため以下の2点の目的を設定した。

(1) 既存のピロリ菌ゲノムにコードされている配列特異的メチル化酵素は、ゲノムのメチル化によって特定のトランスクリプトーム状態を規定し、適応形質の発現に寄与しているという仮説を検証する。

(2) 外来性の DNA メチル化酵素遺伝子をモデル大腸菌株に導入し、大腸菌のトランスクリプトームの改変によって、形質を変化させることができるかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 先行研究から、すでに活性があることが判明しているピロリ菌内の配列特異的メチル化酵素遺伝子の3つをノックアウトする。得られた変異体のトランスクリプトームの変化をイルミナの HiSeq2500 を用いた RNA-seq 法により評価する。変異体の基本的な形質（増殖速度、低 pH 耐性、酸化ストレス耐性）を実験により評価する。

(2) メチル化標的配列が既知の DNA メチル化酵素遺伝子を大腸菌に導入し、ゲノムメチル化状態を変化させた株を複数作成する。これらの株のトランスクリプトーム、基本的な形質を上記と同様に評価する。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌の DNA メチル化酵素：標準株が持つ異なるタイプ(I型、II型、III型)の DNA メチル化酵素遺伝子または配列特異性決定遺伝子のノックアウト株3株を作成した。これらの株と野生株の対数増殖期トランスクリプトームを決定し、比較した。データ解析には、BWA, samtools, BEDtools, HTseq などの Linux プログラムや、TCC, GSVA, Pathview などの R パッケージを用いた。リードカバレッジデータとモチーフ位置の関係を視覚的に把握するための R のスクリプトを作成した。

どのノックアウト株においてもユニーク

なトランスクリプトームの変動は観察されたが、比較的ピロリ菌集団に保存されている II 型 DNA メチル化酵素遺伝子のノックアウト株において、最も多くの遺伝子の発現変動が観察された (図1)。

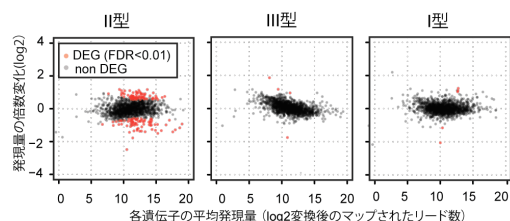


図1. 親株と変異体株の2群間比較での遺伝子発現変動。各ドットは遺伝子を意味する。赤が統計的に有意な発現変動を示した遺伝子。

発現量が変化した遺伝子が関与すると予想された形質である酸耐性、酸化ストレス耐性を実験によって評価したところ、本変異体株において、両耐性の低下が認められた。

ノックアウト株に、メチル化酵素遺伝子を再導入したところ、酸化ストレス耐性の回復が認められた。これらのことから、特定の II 型メチル化酵素がピロリ菌の適応形質発現に寄与していることが強く示唆される。

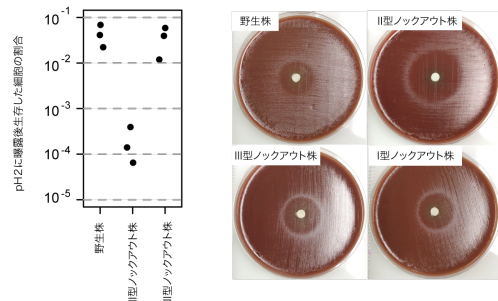


図2. II 型メチル化酵素遺伝子ノックアウト株における酸耐性(左)、活性酸素耐性(右)の低下。右の実験は、希釈したピロリ菌細胞懸濁液を塗抹した血液寒天培地の上に、活性酸素誘導剤を含ませたフィルターを載せ、3日間培養後、フィルターの周りに形成される生育阻止円の大きさを調べたものである。

メチル化が転写に影響を与える機構を調べるため、発現変動が起きた遺伝子周辺でのモチーフの位置を調べたところ、プロモーター領域内にメチル化モチーフが出現する例以外に、転写開始地点よりも下流のオペロン内部にモチーフが出現する例が見つかった (図3)。オペロン内部のメチル化によって遺伝子発現を調節可能であることを示唆する新規的な知見である。

現在 Pacbio シーケンサーを用いて野生株と

作成済みの変異体のメチローム解読を進めている。結果が得られれば、モチーフのメチル化レベルと遺伝子発現の相関を解明できると期待出来る。

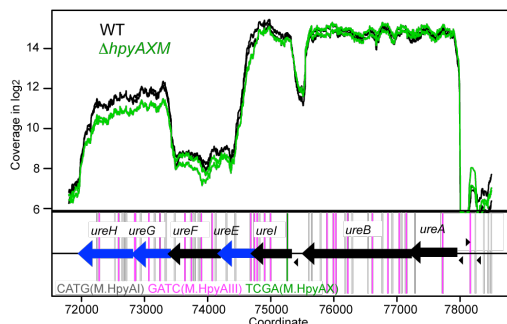


図3. Ure オペロン内部のメチル化がモチーフ下流の遺伝子発現に影響を与える。(上) RNA-seq リードのカバレッジ黒: 野生株, 緑: ノックアウト株; (下) ピロリ菌の遺伝子地図とモチーフの位置: 横線: ORF; 縦線, メチル化標的モチーフ内のメチル化部位。緑の縦線がノックアウトしたメチル化酵素のメチル化標的の部位。水平線よりも上の縦線は top strand, 下の縦線は bottom strand のメチル化部位。

(2) DNA メチル化酵素を用いた大腸菌の形質操作:

腸内細菌の可動遺伝因子由来で、標的配列が既知の II 型メチル化酵素、III 型メチル化酵素 (8 種類) を大腸菌に導入し、ベクターのみを保有する大腸菌と、メチル化酵素を発現する大腸菌のトランスクリプトームを決定した。トランスクリプトームに影響を与えるメチル化酵素、影響を与えないメチル化酵素を見出した。

プレートリーダー内で成長させた大腸菌培養液の OD データと R スクリプトを使用して、適応度や成長パターンをハイスループットに評価できる解析法を確立した。

上記の方法を用いて、メチル化酵素遺伝子の導入に際してトランスクリプトームに影響が出た大腸菌の成長パターンを比較したところ、幾つかの培養条件において、メチル化酵素遺伝子導入株に増殖パターンの変化が確認された (図4)。

大腸菌についてもプロモーター領域でのモチーフメチル化が、遺伝子発現に影響を与える例がいくつか見つかった。今後その機構の詳細を解明していくことで、望むトランスクリプトーム状態をデザインする「エピゲノム工学」の展開が可能になると期待できる。

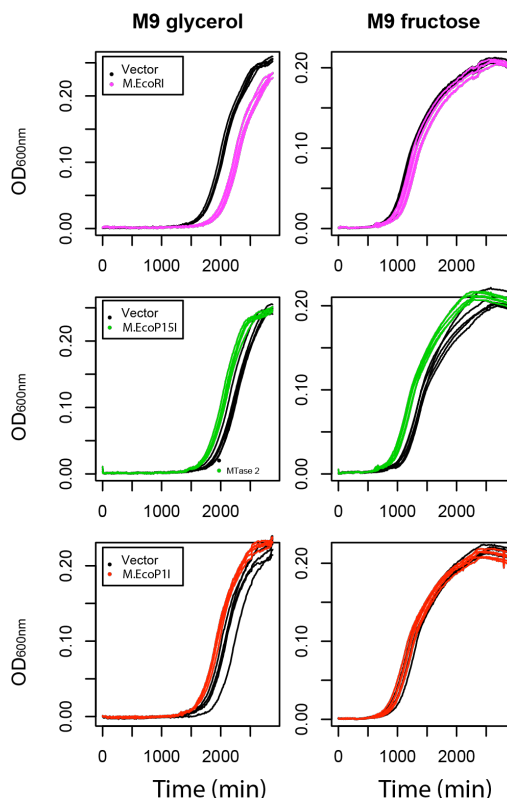


図4. メチル化酵素遺伝子を導入した大腸菌の増殖パターンの変化。コントロール株は黒、メチル化酵素遺伝子導入株はピンク、緑、赤で示す。トランスクリプトーム解析からフルクトース代謝系が活性化していることが判明した EcoP15 メチル化系導入株では、フルクトース最小培地での細胞の増殖に正の影響が観察された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Masaki Fukuyo, Toshiaki Nakano, Yingbiao Zhang, Yoshikazu Furuta, Ken Ishikawa, Miki Watanabe-Matsui, Hirokazu Yano, Takeshi Hamakawa, Hiroshi Ide and Ichizo Kobayashi. Restriction-modification system with methyl-inhibited base excision and abasic-site cleavage activities. *Nucleic Acids Research*. Vol43: 2841-2852. (2015).(査読有)

[学会発表] (計 7 件)

① Hirokazu Yano, Zobaidul M. Alam, Emiko Rimbara, Yoshikazu Furuta, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keigo Shibayama, Ichizo Kobayashi. Network of DNA methyltransferase behind the adaptive phenotype in *Helicobacter pylori*. Gordon Research Seminar, Microbial Population Biology. Andover, NH, USA. July 18-19, 2015 (Poster presentation).

② 矢野大和, Zobaidul M. Alam, 林原絵美子, 古田芳一, 鈴木穰, 菅野純夫, 柴山恵吾, 小林一三. 特定のエピゲノム状態がピロリ菌ストレス耐性を支配する. 第21回ヘリコバクター学会 2015年6月26-27日. 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市中央区). (口頭発表).

③ 矢野大和, Zobaidul M. Alam, 林原絵美子, 古田

芳一、鈴木穰、菅野純夫、柴山恵吾、小林一三。特定のエピゲノム状態がピロリ菌ストレス耐性を支配する。第10回日本ゲノム微生物学会 2015年3月7日、神戸大学六甲第2キャンパス（兵庫県神戸市灘区六甲台町）。（口頭発表）

◎Hirokazu Yano, Katarzyna Wegrzyn, Wesley

Loftie-Eaton, Igor Konieczny, Eva M. Top.

Plasmid-host adaptation through fitness cost amelioration of a plasmid replication protein

3P-0002. (2014年11月27日) 第37回

日本分子生物学会年会、バンフィコ横浜（神奈川県横浜市）。（ポスター発表）

◎矢野大和, Eva M Top. 複製開始タンパク質の

フィットネス・コストの改善を伴うプラスミドの宿主適応。2014年9月28

日（日）第8回日本ゲノム微生物学会 若

手の会ろうきん研修所富士センター（静岡県駿東郡小山町）。（口頭発表）

◎Celeste Brown, Diya Sen, Hirokazu Yano, Matthew

Bauer, Linda Rogers, Geraldine Van der

Auwers, Eva Top: Diverse broad-host-range

plasmids from freshwater carry few accessory

genes. 1P-145 (2014年3月8日) 第9回日

本ゲノム微生物学会年会、東京農業大学（東京都世田谷区桜丘）。（ポスター発表）

◎Yano, H., Rogers, L.M., Molly K., Heuer, H., Smalla,

K., Brown C.J., and Top E.M. Diversification

of host range within the IncP-1 plasmid group.

1P-0135 (2013年12月3日) 第36回日本

分子生物学会年会、神戸国際会議場神戸

国際展示場（兵庫県神戸市中央区）。（ポスター発表）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

Hirokazu Yano

<https://sites.google.com/site/hymyresearch/>

6. 研究組織

研究代表者

矢野 大和 (Hirokazu, Yano)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任助教

研究者番号：20646773