

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370001

研究課題名（和文）多様な利己的 DNase がゲノム切断で作り出す生・死・進化の分岐点

研究課題名（英文）Selfish DNases at a diverging point to survival, death and evolution

研究代表者

小林 一三（KOBAYASHI ICHIZO）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30126057

研究成果の概要（和文）：

「自己」ゲノムを守り「非自己」ゲノムを破壊する DNA 切断分解酵素が、生き物にどう働きかけ進化させてきたかを、実験とゲノム配列比較から解明した。

1. 制限修飾系の制御でのアンチセンス RNA の役割を示した。
2. 制限酵素が DNA 複製フォークを切断することを示した。
3. 制限酵素による染色体攻撃を例に感染への自殺型防御戦略の成功条件を示した。
4. 制限修飾系が新しいしくみで認識配列を切り替えている証拠を得た。

研究成果の概要（英文）：

Our experimental analyses and genome comparisons revealed how DNAases distinguishing self and non-self genome acted on genomes and drove their evolution.

1. We revealed role of antisense RNA in their gene regulation and life cycle.
2. We showed several restriction enzymes cleave a DNA replication fork.
3. With restriction enzyme attacking the chromosome, we demonstrated success of suicidal defense strategy against infection.
4. Genome comparison of *H. pylori* revealed novel mechanisms of genome rearrangements and suggested that restriction modification systems frequently switch their recognition sequence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築、ゲノム再編、ゲノム維持、ゲノム進化

1. 研究開始当初の背景

近縁細菌ゲノム比較は、制限酵素修飾酵素遺伝子が「動く遺伝子」であり、ゲノムの多型形成に関与していることを示唆した。これ

は、実験室内で、制限修飾遺伝子の存在を脅かしたときに、ゲノムに起きる様々な再編と対応しており、「制限修飾遺伝子をライバル遺伝子が排除したときに、制限酵素の染色体

切断によって、細胞死が起きる」という発見 (Naito et al. Science 1995) から、私たちが提案していた「制限修飾遺伝子の利己的遺伝子仮説」と、合致するものだった。

制限修飾遺伝子は、自己の存続を脅かされると、ゲノムを切断し細胞死を起こす。そして、クローン中で無傷な自己とゲノムを持つ細胞・個体を生き残らせる。超保守的な秩序維持戦略といえる。ところが、このゲノム切断自身が、様々な再編ゲノムを創り出し、その中でも制限修飾遺伝子の発現を回復させたゲノムだけを生き残らせる。つまり、制限修飾遺伝子は、ゲノムの秩序維持と再編の両方に関与している、ゲノムの進化を支配するパワーと考えられる。

私たちはこれまでに、制限修飾遺伝子のバイオロジーという新分野を開拓し、自己増殖・発現制御・相互競争などのウイルスを想起させる利己的・寄生的な振る舞いを明らかにしてきた。加えて、細菌宿主側が持つ、単独メチル化酵素によるゲノム防御・相同組換え機構による染色体切断への抵抗を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、II型制限修飾系の生き物としての解析を進めるだけでなく、他の型の制限酵素の宿主攻撃の機構と意義を解明する。これら多様な制限修飾系が、ゲノムをどう造り替えてきたかを、ゲノム比較と実験から明らかにする。

3. 研究の方法

分子生物学的解析に、ゲノム配列のインフォマティクス解析、数理生物学的シミュレーションを統合して、研究を進めた。

4. 研究成果

A. <制限修飾系の活動>

A1. <小さなRNAによる制御>

制限酵素遺伝子内の逆向きのプロモーターからのアンチセンスRNAが、修飾遺伝子プロモーターからの発現へ影響すること、制限修飾系による宿主ゲノム攻撃に影響することを発見した (Mruk, Liu et al. 2011)。

A2. <綱引き型制限酵素による複製フォーク切断>

I型、IV型 (メチル化DNA特異的) 制限酵素が、試験管内で、モデルDNA複製フォークの分岐点を切断することを証明した (Ishikawa et al. 2009; Ishikawa et al. 2011)。DNA損傷あるいはDNAのメチル化への、細胞死型防御という仮説を提唱した (Ishikawa et al. 2010)。

A3. <転移>

制限修飾系遺伝子塊が、ISに挟まれた産物を

作って、ゲノム内で転移することを、実験で示した (Takahashi et al. 2011)。

A4. <実験進化の加速>

制限修飾系の使用によって、細菌の実験進化を加速することに成功した。進化した株では、細胞間コミュニケーションに関する遺伝子などが、変異によって壊れていた (Asakura et al. 2011; 2009)。

B. <相同組換えのしくみ>

RecFOR組換え系が、制限修飾系による染色体切断を修復することを示した (Handa et al. 2009)。RecF経路の初期過程の試験管内での再構成に成功した (Handa et al. 2009)。赤い蛍光を発するRecAタンパク質を使って、核タンパクフィラメントの形成過程を明らかにした (Handa et al. 2009)。RecBCD酵素が、「自己」配列に出会ったとき、どのようにして分子内情報が伝わるかを、変異体の解析によって明らかにした (Handa et al. 2012)。

C. <感染と死>

C1. <利己的遺伝子の存続条件>

ゲノムの一カ所に切断を作って乗り移る利己的遺伝子 (ホーミングエンドヌクレアーゼ) が、集団中で長期的に存続できる条件を、数理生態学的手法で明らかにした (Yahara et al. 2009)。

C2. <なぜ感染で死ぬのか?>

細菌をモデル宿主、ファージをモデル病原体とする大規模感染実験系を作り、数理モデルおよびシミュレーションとリンクさせた。IV型制限修飾系の理解に基づいた系で、「感染に対する自殺型防御」戦略が、空間構造のあるところで成り立つことを、明らかにした (Fukuyo et al. 2012)。

D. <ゲノム比較>

D1. <制限修飾系と再編>

網羅的な原核生物のゲノム配列比較から、制限修飾系遺伝子塊のゲノム再編への関与を明らかにした (Furuta et al. 2010)。動く遺伝子としての性質から、新しい制限酵素 R.PluTI を発見し、生化学的性質を明らかにした (Khan et al. 2010)。

D2. <制限修飾系の配列認識の変換仮説>

ゲノム配列比較から、一つの遺伝子の複数のサイト間をドメイン配列が動く「ドメイン間の配列移動 DoMo」という新しい遺伝子再編機構を発見した (Furuta et al. 2011)。これは、I型制限修飾系の配列特異性サブユニットで起きており、メチル化配列の変換をもたらし、エピゲノムの多様化に寄与すると推測した (Furuta & Kobayashi, 2012)。

III型制限修飾系のゲノム配列比較から、DNA配列認識ドメインが、非オーソログな制限修飾系の遺伝子間を動き回ることを発見した。配列認識ドメインは、種の垣根を超えて細菌界に広がっていた (Furuta &

Kobayashi 2012)。

これから「DNA メチル化の配列特異性の変換に駆動される適応進化」という新しい進化機構モデルを提出した(Furuta & Kobayashi 2012)。

D3. <相同組換え>

ピロリ菌複数株の全ゲノム配列から、相同組換えの痕跡を数え上げ、それらの多い遺伝子少ない遺伝子を明らかにした(Yahara et al. 2012)。コンピューター内での染色体ペインティングという手法で、ピロリ菌の微細な集団構造とそれらの間の遺伝情報の流れを明らかにした(Yahara et al. 2013)。

D4. <ピロリ菌ゲノム比較から>

日本のピロリ菌4株の全ゲノムを解読し、世界各地の株と比較し、その特徴を明らかにした(Kawai et al. 2011)。

ピロリ菌多数全ゲノムの配列比較から、新しいゲノム再編機構である「逆位を伴う重複」を発見した。逆位を、これを含む4つのしくみで説明し、ピロリ菌のシンテニーの進化を再構成した(Furuta, Kawai et al. 2011)。

ピロリ菌の *cagA* がん遺伝子の網羅的比較から、3種の組換えによってそれらの進化を説明することに成功した(Furuta et al. 2012)。

D5. <rRNA とタンパク合成開始機構の進化>

原核生物でのタンパク質合成の開始は、mRNAにあるSD配列とrRNAとの相互作用によるが、この相互作用を失った細菌グループを多数発見した。さらにrRNA遺伝子の再編を発見し、それが保守的な遺伝子であるという固定観念を打ち壊した(Lim et al. 2012)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計36件)

① K Yahara, et al., I Kobayashi. Chromosome painting in silico in a bacterial species reveals fine population structure. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 1454-1464, 2013 (査読有)
DOI: 10.1093/molbev/mst055

② Y Furuta, I Kobayashi. Movement of DNA sequence recognition domains between non-orthologous proteins. **Nucleic Acids Res.**, 40(18) 9218-9232, 2012 (査読有)
doi: 10.1093/nar/gks681

③ N Handa, et al., I Kobayashi (4人目), S C Kowalczykowski. Molecular determinants responsible for recognition of the single-stranded DNA regulatory sequence, χ , by RecBCD enzyme. **Proc. Nat.**

Acad. Sci. USA, 109(23) 8901-8906, 2012 (査読有)

doi: 10.1073/pnas.1206076109

④ K Yahara, et al., I Kobayashi. Genome-wide survey of mutual homologous recombination in a highly sexual bacterial species. **Genome Biol. Evol.** 4(5) 628-640, 2012 (査読有)

doi: 10.1093/gbe/evs043

⑤ K Lim, Y Furuta, I Kobayashi. Large variations in bacterial ribosomal RNA genes. **Mol. Biol. Evol.** 29(10) 2937-2948, 2012 (査読有)

doi: 10.1093/molbev/mss101

⑥ M Fukuyo, A Sasaki, I Kobayashi. Success of a suicidal defense strategy against infection in a structured habitat. **Scientific Reports** 2: 238 (ページなし), 2012 (査読有)

doi:10.1038/srep00238

⑦ Y Furuta, K Yahara, M Hatakeyama, I Kobayashi. Evolution of *cagA* oncogene of *Helicobacter pylori* through recombination. **PLoS ONE** 6(8): e23499 (ページなし), 2011 (査読有)

doi:10.1371/journal.pone.0023499

⑧ Y Asakura, H Kojima, I Kobayashi. Evolutionary Genome Engineering using a Restriction-modification System. **Nucleic Acids Research** 39(20) 9034-9046, 2011 (査読有)

doi: 10.1093/nar/gkr585

⑨ M Kawai, et al., I Kobayashi. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. **BMC Microbiology** 11:104 (ページなし), 2011 (査読有)

doi:10.1186/1471-2180-11-104

⑩ Y Furuta, M Kawai, I Uchiyama, I Kobayashi. Domain movement within a gene: a novel evolutionary mechanism for protein diversification. **PLoS ONE** 6(4): e18819 (ページなし), 2011 (査読有)

doi: 10.1371/journal.pone.0018819

⑪ M Mruk*, Y Liu*, L Ge, I Kobayashi (*: Equal contribution). Antisense RNA associated with biological regulation of a restriction-modification system. **Nucleic Acids Research** 39(13) 5622-5632, 2011 (査読有)

doi: 10.1093/nar/gkr166

⑫ K Ishikawa, et al., I Kobayashi. Cleavage of a model DNA replication fork by a methyl-specific endonuclease. **Nucleic Acids Research** 39(13) 5489-5498, 2011 (査読有)

doi: 10.1093/nar/gkr153

⑬ N Takahashi, et al., I Kobayashi. IS-linked Movement of a Restriction-modification System. **PLoS ONE**, 6: e16554 (ページなし), 2011 (査読有)
doi:10.1371/journal.pone.0016554

⑭ Y Furuta*, M Kawai*, et al., I Kobayashi (*: Equal contribution). Birth and death of genes linked to chromosomal inversion. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 108 no. 4 1501-1506, 2011 (査読有)
doi: 10.1073/pnas.1012579108

⑮ Ken Ishikawa, Eri Fukuda, Ichizo Kobayashi. Conflicts targeting epigenetic systems and their resolution by cell death: new biology of methyl-specific and other restriction systems. **DNA Research**, 17:325-342, 2010 (査読有)
doi: 10.1093/dnares/dsq027

⑯ Uchiyama, I., Higuchi, T., and Kawai, M. (2010). MGD update 2010: toward a comprehensive resource for exploring microbial genome diversity. **Nucleic Acids Res.** 38, D361-D365. (査読有)
doi: 10.1093/nar/gkp948

⑰ F Khan, et al., I Kobayashi. A putative mobile genetic element carrying a novel Type IIF restriction-modification system (PluTI). **Nucleic Acids Res.**, 38: 3019-3030, 2010 (査読有)
doi: 10.1093/nar/gkp1221

⑱ Y Furuta, K Abe, I Kobayashi. Genome comparison and context analysis reveals putative mobile forms of restriction-modification systems and related rearrangements. **Nucleic Acids Res.**, 38: 2428-2443, 2010 (査読有)
doi: 10.1093/nar/gkp1226

⑲ K Yahara, M Fukuyo, A Sasaki and I Kobayashi. Evolutionary maintenance of selfish homing endonuclease genes in the absence of horizontal transfer. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, November 3, 2009 106: 18861-18866 (査読有)
doi:10.1073/pnas.0908404106

⑳ I Kobayashi and N Handa, DNA Double-strand Breaks and their Consequences in Bacteria. In **Encyclopedia of Life Sciences**, A21652, John Wiley & Sons, Chichester, 2009 (査読有)
DOI:10.1002/9780470015902.a0000576.pub2

㉑ N Handa, et al., S C Kowalczykowski. Single-molecule analysis of a red fluorescent RecA protein reveals a defect in nucleoprotein filament nucleation that relates to its reduced biological functions. **Journal of Biological**

Chemistry, 284:18664-18673, 2009 (査読有)
doi:10.1074/jbc.M109.004895

㉒ N Handa, A Ichige, and I Kobayashi. Contribution of RecFOR machinery of homologous recombination to cell survival after loss of a restriction-modification gene complex. **Microbiology**, Jul 2009; 155: 2320 - 2332 (査読有)
doi:10.1099/mic.0.026401-0

㉓ N Handa, K Morimatsu, S T Lovett, and S C Kowalczykowski. Reconstitution of Initial Steps of Double-strand DNA Break Repair by the RecF pathway of *E. coli*. **Genes and Development**, 23:1234-1245, 2009 (査読有)
doi:10.1101/gad.1780709

その他英文論文 5件

日本語論文 7件、日本語翻訳 1件

[学会発表など] (計 11 5件)

< 国際学会口頭発表 (招待講演を含む) >
(計 24 件)

① K Yahara, et al. ○ I Kobayashi. Genome-wide survey of mutual homologous recombination in *H. pylori*. 10th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections, 2012/7/6, Helsingor, Denmark.

② 小林 一三. Evolutionary genome dynamics revealed by microbial genome comparison. 東京農業大学国際シンポジウム “Genome Research: Current Challenges and Future Directions” (招待講演), 2012/1/21, 東京.

③ I Kobayashi. Genome comparison of *Helicobacter pylori* strains from the West and the Far East. XXIVth International Workshop of the European Helicobacter Study Group (招待講演), 2011/9/13, Dublin, Ireland.

④ Y Furuta, K Yahara, M Hatakeyama, ○ I Kobayashi. Evolution of *cagA* Oncogene of *Helicobacter pylori* through Recombination. XXIVth International Workshop of the European Helicobacter Study Group, 2011/9/13, Dublin, Ireland.

⑤ ○ Y Furuta, et al., I Kobayashi. Novel genome rearrangement mechanisms detected by *Helicobacter pylori* genome comparison. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011), 2011/9/9, Sapporo.

⑥ I Kobayashi. Evolutionary genome dynamics revealed by comparison of Japanese and other *Helicobacter pylori* complete genomes. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS2011) (招待講演), 2011/9/6, Sapporo.

⑦ I Kobayashi. Novel evolutionary dynamics revealed through comparison of East Asian and other *H. pylori* complete genomes. the 16th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO 2011), 2011/8/30, Vancouver, Canada.

⑧ I Kobayashi, DNA duplication associated with inversion (DDAI) and domain movement (DoMo): two novel genome rearrangement mechanisms discovered through genome comparison, SMBE2011 (Annual Conference of Society for Molecular Biology and Evolution), July 27, 2011, Kyoto.

⑨ I Kobayashi, Biology of restriction-modification systems. Nucleic Acid Enzymes & Enzymes in Human Disease (招待講演) 2011/6/21, Tianjin, China.

⑩ I Kobayashi, Genome dynamics and evolution. OIST Summer School on Quantitative Evolutionary and Comparative Genomics (招待講演) 2011/5/28, Okinawa.

⑪ O Y Furuta, et al., I Kobayashi: Genome rearrangements revealed through comparison of four complete genomes of Japanese *Helicobacter pylori*, XXIIIrd International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer, W7.2, September 2010, Rotterdam, The Netherlands.

⑫ I Kobayashi. Selfish restriction systems switching on bacterial death program, 6th New England Biolabs Meeting on DNA Restriction and Modification, August 4, 2010, Bremen, Germany.

⑬ M Kawai, et al., O I Kobayashi. East Asian *Helicobacter pylori* Genomes: Co-evolution with their Human Host, Global COE Workshop on Bioinformatics in the Era of "Genome Information Big Bang" (招待講演), November 5th-8th, 2009, Shenzhen, China.

⑭ O I Kobayashi, et al., I Uchiyama. Complete genome sequences of multiple Japanese *Helicobacter pylori* strains: a progress report. CHRO 2009 15th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (招待講演), September 2-5, 2009, Toki Messe, Niigata.

<学会以外の海外招待講演> (計 7 件)

① I Kobayashi. Evolutionary genome dynamics revealed through close genome comparison. Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, 2011/11/21,

Leipzig, Germany.

② I Kobayashi. Selfish restriction systems switching on bacterial death program, August 30, 2010, International Institute of Molecular and Cellular Biology, Warsaw, Poland.

③ M Kawai, et al., O I Kobayashi. *H. pylori* evolution: clues from Japanese isolates' genomes. August 6, 2010, Hannover Medical School, Hannover, Germany.

④ I Kobayashi, Selfish genes vs. genome: Roles of selfish DNase genes programming deaths. 17th Annual Microbial Genomics Conference, Oct 14, 2009, Rocky Gap State Park, MD, USA.

⑤ I Kobayashi, Recent findings with DNases, NEBiolabs, Ipswich, USA, Apr 24, 2009.

⑥ I Kobayashi. Selfish DNases programming bacterial deaths. National Cancer Institute, NIH, Bethesda, USA, Apr 23, 2009.

⑦ I Kobayashi. Selfish genes into a genome society. NIMBioS Workgroup on Intragenomic conflicts, Knoxville, USA, Apr 20-22, 2009.

<国内学会での口頭発表> (計 4 7 件)

<国際学会でのポスター発表> (計 9 件)

<国内学会でのポスター発表> (計 2 5 件)

<その他の発表 (アウトリーチ活動)> (計 3 件)

[図書] (計 4 件)

① 小林一三: 遺伝子にハマって進化する。Carl Zimmer (カール・ジンマー) 著、長谷川真理子監訳: 進化。岩波書店, 111-113 (2012)

② Y Furuta, I Kobayashi. Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements ("Restriction-modification systems as mobile epigenetic elements."), Landes Bioscience, 2012

③ Y Fujitani, J Kawai, I Kobayashi. Random-Walk Mechanism in the Genetic Recombination. In **Advances in Computational Biology** (series: Advances in Experimental Medicine and Biology), Springer, Vol. 680, Part 3, 275-282, 2011.

④ M Watanabe-Matsui, et al., I Kobayashi. Cell-free protein synthesis for structure determination by X-ray crystallography. In **Cell-free Expression Systems** (Series: Methods in Molecular Biology) Editors: Yaeta Endo, Kazuyuki Takai, Takuya Ueda. **Humana Press**, pp.149-160, 2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 一三 (KOBAYASHI ICHIZO)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
教授
研究者番号：30126057

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

半田 直史 (HANDA NAOFUMI)
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：00396855
(H21→H22)

高橋 規子 (TAKAHASHI NORIKO)
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：70466829
(H21→H23)

河合 幹彦 (MIKIHICO KAWAI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・
特任研究員
研究者番号：80451904
(H21)

古田 芳一 (FURUTA YOSHIKAZU)
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：40613667

(4) 研究協力者

内山 郁夫 (UCHIYAMA IKUO)
基礎生物学研究所・ゲノム情報研究室・
助教
研究者番号：90243089

Janusz Bujnicki
IIMCB, Poland
研究者番号：なし

矢原 耕史 (KOJI YAHARA)
学振・特別研究員 (PD)
研究者番号：なし

福世 真樹 (MASAKI FUKUYO)
学振・特別研究員 (PD)
研究者番号：40639085