

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18665

研究課題名(和文) エピゲノム駆動進化に倣う微生物育種

研究課題名(英文) The epigenetics-driven adaptive evolution concept and its application to microbe engineering

研究代表者

矢野 大和 (Yano, Hirokazu)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20646773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：病原細菌(ピロリ菌)が進化させてきたゲノムメチル化系の機能性を証明し、それをツールとして微生物の形質操作に利用する微生物育種法の基盤技術を確立した。NGSを用いたゲノムメチル化の網羅的検出とトランスクリプトームの解析手法を確立した。これまでに構築したメチル化酵素遺伝子ノックアウト株のトランスクリプトームデータを統合することで、複数の配列特異的メチル化系から構成される遺伝子発現ネットワーク(epigenetic network)があることを発見した。エピゲノム育種に利用できる可能性のある新規DNAメチル化系を発見した。

研究成果の概要(英文)：We revealed the functionality of diverse methyltransferase genes in the pathogen (*H. pylori*) genome. We established experimental and analytical protocols for bacterial methylome and transcriptome studies. We discovered an epigenetic network consisting of multiple regulatory networks governed by site-specific DNA methyltransferases. We discovered a novel restriction-modification system potentially useful for epigenome engineering.

研究分野：ゲノム微生物学

キーワード：ゲノム ピロリ菌 メチローム

1. 研究開始当初の背景

細菌ゲノムの情報は、病原性細菌を中心として爆発的に増加している。これまでの比較ゲノム研究は、各細菌種系統群が、進化の過程で、DNA メチル化酵素遺伝子の獲得と喪失に加え、組換えによる DNA メチル化酵素遺伝子の構造変換を繰り返しているという事実を明らかにしてきた。これは細胞内で新しく発現する配列特異的 DNA メチル化酵素が書きかえる DNA の修飾情報によって、細胞が取り得るトランスクリプトーム状態の範囲が変わり、それが適応的な形質の発現に寄与するという「エピゲノム駆動型進化」という概念をもたらした。これは、これまでの「ゲノム内の特定の箇所に突然変異を導入することで細胞の性質を改変する」という従来の育種方法でなく、「ゲノムワイドなメチル化の導入によって細胞の性質を改変する」という新しい微生物育種法のあり方を提案するものであった。

2. 研究の目的

「エピゲノム駆動型進化」という考え方の妥当性の検証と、配列特異的 DNA メチル化酵素を用いた微生物育種実現に向けた技術基盤の整備のため、以下の2点の目的を設定した。

(1) ピロリ菌が保有するメチル化酵素が、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かどうかを検証する。複数のメチル化酵素についてそのメチル化活性、転写制御活性、形質への影響を調べる。

(2) 形質操作のツールとして使用出来る DNA メチル化酵素のレパートリーを増やすため、多数株のゲノム配列が公開されている細菌種のゲノムを比較することで、細菌種の系統分岐の促進に関与した可能性のある DNA メチル化酵素遺伝子をスクリーニングする。またそれを大腸菌に導入し、形質操作を行う。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌の複数の推定メチル化酵素遺伝子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を RNA-seq 法により評価する。変異体の基本的な形質(増殖速度、運動性、様々なストレス耐性)を実験により評価する。

(2) ドラフトゲノム情報が得られている非モデル生物の *Mycobacterium avium* の 36 株の遺伝子レパートリーを比較し、系統特異的な遺伝子セットの中に制限酵素・DNA メチル化酵素遺伝子があるかどうかを調べる。同定された DNA メチル化酵素遺伝子を REBASE データベース内で検索し、メチル化標的配列が同定されていない新規性のあるものかどうかを検証する。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌が保有するメチル化酵素の細胞内メチル化活性、転写制御活性、形質への影響

ピロリ菌 P12 株の7種類の推定メチル化酵素遺伝子をノックアウトした。構築したノックアウト株のうち、標的配列が不明であった III 型 DNA メチル化酵素遺伝子の3つのノックアウト株については、PacBioRSII を用いてメチロームを決定し、ノックアウトしたメチル化酵素遺伝子標的配列の推定を行った。メチル化が起きている配列モチーフの種類を株間で比較した結果、標的配列が不明であった3つの III 型 DNA メチル化酵素遺伝子のうち、一つの遺伝子の産物の標的配列が GACC である事が推定された。残り二つの遺伝子の産物については活性がない事が判明した。

続いて、ノックアウト株のトランスクリプトーム変化と、栄養培地での成長速度の変化を解析した(図1)。その結果、トランスクリプトームと細菌株の成長パターンに大きな変化をもたらすものもあったが(MTase 1,

MTase 2, MTase 5) それらにほとんど影響を与えないものもあった (MTase 4, MTase 5)。

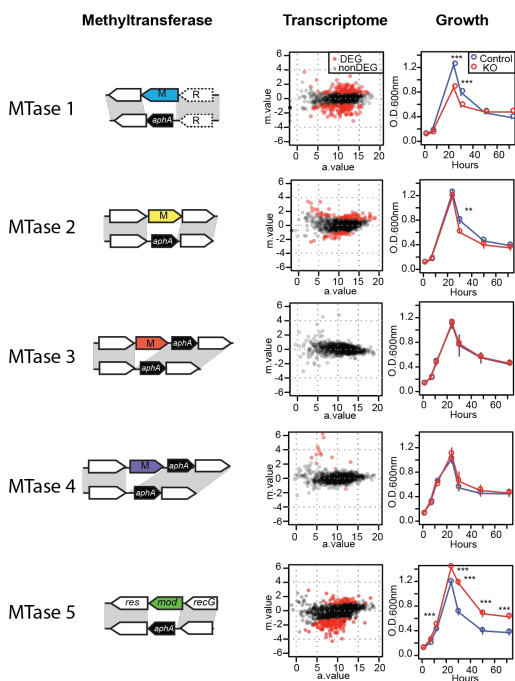


図 1. P12 株の 5 つの活性のあるメチル化酵素遺伝子破壊株のトランスクリプトーム変化と成長パターンの変化。結果の一部は Zhang et al. (2017)にて発表した。

トランスクリプトーム情報から、MTase2 ノックアウト株では、細胞の運動性と酸化ストレス耐性の変化が予測された。そこでそれら 2 つの形質を、寒天培地を用いた実験によって調べたところ、ノックアウト株において運動性の増大と酸化ストレス耐性の低下が認められた。それらの変化が、実際にノックアウトした遺伝子に依存していることを証明するために、ノックアウト株にオリジナルの遺伝子を導入し、同様の実験をしたところ、オリジナルの遺伝子の再導入に伴って、運動性の低下と酸化ストレス耐性の低下が認められた。よって、少なくとも、MTase 2 は、ピロリ菌 P12 株の形質発現に実際に寄与していることを証明できた (図 2)。

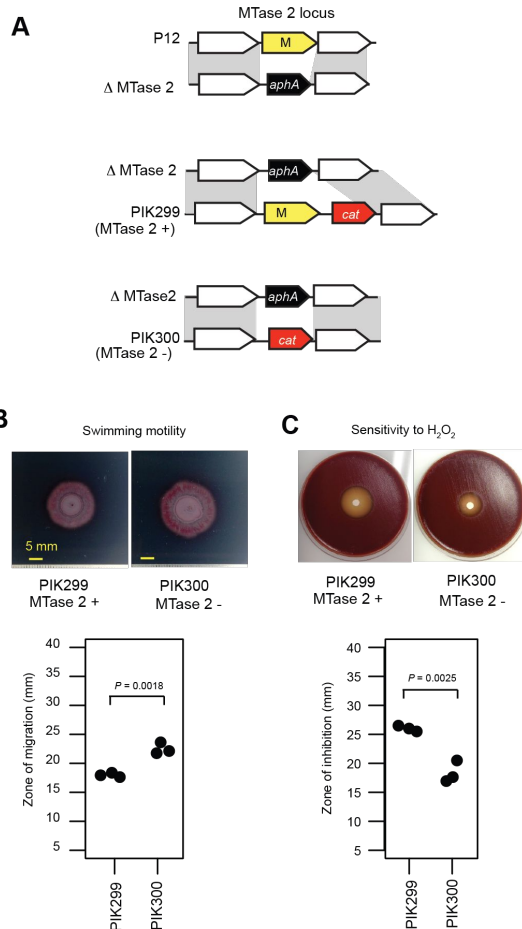


図 2. ノックアウト株へのメチル化酵素遺伝子再導入実験の結果。

これまでに得たトランスクリプトームデータを統合し、各メチル化酵素遺伝子の遺伝子発現への影響を可視化した。すると、メチル化酵素による転写制御ネットワーク同士がオーバーラップしていることが判明した (図 3)。これは、ピロリ菌においては、細胞内のメチル化系同士が、相互作用しながら適応形質を制御する系を (進化の過程で) 確立したことを示唆する。

転写制御領域において、期待されるより多く出現しているメチル化モチーフを持つ遺伝子が、対応するメチル化酵素遺伝子のノックアウトによって、大きく発現変動を起こすこともあったが、ノックアウトしたすべてのメチル化酵素遺伝子の標的モチーフについて、同様の「モチーフ出現率と発現変動の相関」が見られるわけではなかった。そのため、

細菌のメチル化酵素が如何にして細胞の表現型を制御しているのかは、未だに完全に理解できていない。それを理解し、微生物育種につなげるにはさらなる努力が必要であると考えられる。

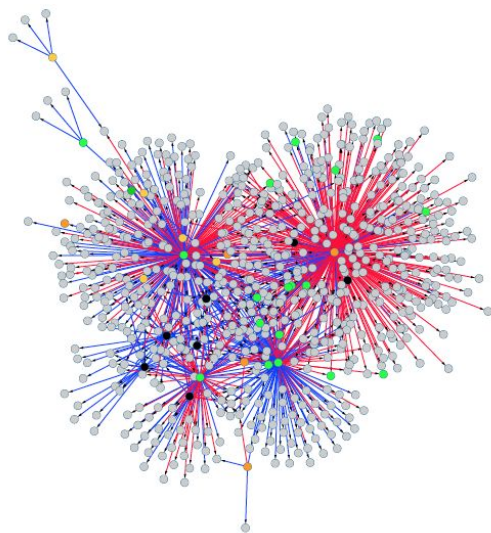


図 3. ピロリ菌内のメチル化による転写制御ネットワークのオーバーラップ。ノードは遺伝子。黒、緑、オレンジ、ピンクのノードはそれぞれ、II 型、I 型、III 型メチル化系を意味する。

(1) 新規 DNA メチル化酵素の探索

比較ゲノム解析がこれまでになされてこなかった細菌種である *Mycobacterium avium* の種内の系統解析と遺伝子レパートリー解析を行い、系統群特異的な遺伝子セットの中にメチル化酵素遺伝子が含まれていることを発見した(一部は、Yano et al 2017 に発表)。REBASE データベース内での BLAST 検索により、系統群特異的なメチル化系の中には、標的配列を予測できない新規の II 型メチル化系があることが判明した。今後、これらメチル化系の標的配列を *M.avium* 分離株のメチローム解読と、新規 II 型メチル化系を発現する大腸菌株のメチローム解読という二つのアプローチにより決定する予定である。また、大腸菌の適応度測定方法は、すでに確立

されており、今後、異種メチル化酵素の発現が細胞に与える影響の基本的なデータが得られるだろう。

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 2 件)

Zhang Y, Matsuzaka T, Yano H, Furuta Y, Nakano T, Ishikawa K, Fukuyo M, Takahashi N, Suzuki Y, Sugano S, Ide H, Kobayashi I. Restriction glycosylases: involvement of endonuclease activities in the restriction process. *Nucleic Acids Res.* 45: 1392-1403 (2017).

Yano H, Iwamoto T, Nishiuchi Y, Nakajima C, Starkova DA, Mokrousov I, Narvskaya O, Yoshida S, Arikawa K, Nakanishi N, Osaki K, Nakagawa I, Ato M, Suzuki Y, and Maruyama F. Population structure and local adaptation of MAC lung disease agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Genome Biol. Evol.* 9: 2403-2417 (2017)

[学会発表](計 9 件)

Hirokazu Yano, Tomotada Iwamoto, Yukiko Nishiuchi, Chie Nakajima, Daria A. Starkova, Igor Mokrousov, Olga Narvskaya, Shiomi Yoshida, Kentaro Arikawa, Noriko Nakanishi, Ken Osaki, Ichiro Nakagawa, Manabu Ato, Yasuhiko Suzuki, and Fumito Maruyama. Population structure and local adaptation of MAC lung disease agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* The 52nd US-Japan Mycobacteria Panel Meeting 2018 in Niigata, Japan, March 15-16, 2018

Hirokazu Yano, Tomotada Iwamoto, Yukiko Nishiuchi, Chie Nakajima, Daria A.

Starkova, Igor Mokrousov, Olga Narvskaya, Shiomi Yoshida, Kentaro Arikawa, Noriko Nakanishi, Ken Osaki, Ichiro Nakagawa, Manabu Ato, Yasuhiko Suzuki, and Fumito Maruyama. Population structure and local adaptation of MAC lung disease agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* 日本進化学会 京都大学吉田キャンパス 2017年8月24-26日

矢野大和、丸山史人、西内由紀子、中川一路、中島千絵、鈴木定彦、岩本朋忠. 種内相互組み換えによって促進される鳥型結核菌の地域適応 日本ゲノム微生物学会 2017年度3月2-4日. 慶応大学湘南藤沢キャンパス

矢野大和、林原恵美子、古田芳一、柴山恵吾、小林一三、III型制限修飾系によるピロリ菌の適応形質とゲノミックアイランドの制御。第22回ヘリコバクター学会学術集会。2016年6月24日。別府国際コンベンションセンター、B-CON PLAZA。

矢野大和、M Zobaidul 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 ピロリ菌の適応形質を支配する DNA メチル化系ネットワークの発見日本農芸化学会 2016年度大会 2016年3月30日札幌コンベンションセンター

Hirokazu Yano, Md Zobaidul Alam, Emirko Rimbara, Yoshikazu Furuta, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keigo Shibayama, Ichizo Kobayahsi. Epigenetic network of gene expression involving DNA methyltransferases 第10回ゲノム微生物学会年会2016年3月3日 東京工業大学大岡山キャンパス

矢野大和 メチローム変換に基づく進化

第55回浜松特別セミナー 2016年2月29日 静岡大学浜松キャンパス

矢野大和、古田芳一、Zobaidu M. Alam、林原絵美子、柴田朋子、西山智明、重信秀治、長谷部光泰、鈴木穰、菅野純夫、柴山恵吾、小林一三. メチローム変換に基づく進化。日本遺伝学会 2015年9月24日、東北大学川内キャンパス

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、ピロリ菌の適応形質を支配する DNA メチル化系ネットワークの発見 日本進化学会第17回大会 2015年8月20日-23日 中央大学後楽園キャンパス

〔図書〕(計 1 件)

矢野大和「ヘリコバクターピロリのトランスクリプトーム解析」 *Helicobacter Research* 20:66-70 (2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/hirokazuyano/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野大和 (Hirokazu Yano)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20646773