

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32658

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14892

研究課題名(和文)細菌メチロームと変異バイアス解析によるゲノムの配列維持機構

研究課題名(英文) Analysis of maintenance mechanism of genome structure by bacterial methylome and IS transposition assay.

研究代表者

吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：50175676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムの構造維持機構として、メチル化とトランスポゾンに着目して挑戦的な研究を行った。バクテリアにおけるエピジェネティクスは、近年ようやく注目され始めたが、増殖制御との関連は全く知られていない。本研究において、枯草菌の孢子形成期には、栄養増殖期と異なるメチル化パターンが確認された。一方、枯草菌の挿入配列(IS)転移機構の解析では、大腸菌における知見とは異なり、RecAに完全に依存することを解明した。その必須機能は相同組換え能ではなく、ATP加水分解能であった。また枯草菌168株ゲノムは、例外的にISが存在しないが、トランスポゼースをターゲットに変異を導入し、転移を抑制する機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In terms of maintenance mechanisms of genome structure, we focused on two phenomena, methylation and IS transposition. Bacterial epigenetics has been noted only recently and correlation with growth regulation is totally unknown. In this study, we demonstrated sporulation specific methylation in *Bacillus subtilis*. While transposition of IS derived from natto strain has been found to be strictly dependent on *recA* gene, its essential function on IS transposition was not homologous recombination but ATP hydrolysis activity. In addition, we explored the possible evolutionary background of the unique feature of 168 genome which harbored no IS element. Successive culture of 168 cells with our newly developed IS transposition assay system revealed that 168 cells allowed IS transposition to some extent, but later inhibitory effect of IS transposition seemed to emerge by inactivating transposase activity. Those transposition-capable cells grew slowly and would be titrate out during evolution.

研究分野：微生物分子遺伝学

キーワード：メチローム シトシンメチル化 挿入配列 トランスポゼース

## 1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーの普及とともにゲノムの解析手法が革新されたが、特に細菌においては進化をめぐる実験が加速的に増加してきた。その中心はさまざまな条件で継代培養し、変異箇所を解読するというものである。一方で、ゲノムの操作が容易なモデル微生物を材料とし、遺伝的背景を考慮しながら変異の要因を追求すると言った手法はほとんどされてきていない。こうした点を受けて、細菌においてはわずかな解析しかされていないメチローム解析と進化の要因として長く語られてきたトランスポゾンの転移に関し、ゲノムの構造維持機構という視点から解析することに着目した。メチローム解析に関しては高等動物のインプリンティング機構などから注目されてきたが、細菌に関してはエピジェネティクスの観点から解析された例はほとんどない。さらに、枯草菌においてはミスマッチ修復機構 (MMR) の親鎖認識因子 *MutH* がなく、枯草菌のメチル化機構に着目するきっかけとなった。また、トランスポゾンは変異株取得の手段として使われてきているが、転移のコントロールと生物学的な意義については大腸菌で解析されているだけである。グラム陽性菌の代表株である枯草菌の 168 株ゲノムにはトランスポゾン (挿入配列: IS) がなく、ゲノムとしては例外的である。この進化的意義については全く解析されていない。

## 2. 研究の目的

上記の背景の下、一般的に大腸菌等でよく知られているゲノムを忠実に複製する機構 (構造維持機構) とは大きく異なる枯草菌のメチローム解析と IS 転移機構について解析することを目的とした。メチローム解析に関しては、新生鎖/親鎖識別機構に対する興味と同時に、孢子形成という細胞分化への影響も解析することにした。この点は、制限酵素を用いた予備的解析により、栄養増殖期と孢子形成期でメチル化パターンが異なるという結果を得たことが大きな引き金になった。一方、我々はさまざまな IS 転移頻度の測定系を構築し、168 株に導入して解析してきたが、近年、非常に高頻度で転移する系を見出したため、転移頻度を再現性良く検証することが出来、さまざまな因子の影響を定量的に調べることが可能になった。したがってこの系を用いることにより、大腸菌とは異なる枯草菌独特の宿主因子の同定に繋げ、最終的に 168 株がなぜ IS を保持しなくなったのか、その要因を探ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

第三世代シーケンサーと言われる PacBio シーケンサーは、その原理上、メチル化塩基の同定ができる。まずこれを用いて、枯草菌ゲノムにおけるメチル化のパターンを同定する。これによって、どのようなメチル化パ

ターンを枯草菌が持っているのか、その概要を把握する。次に、枯草菌ゲノム中で予測されるメチル化酵素を探索し、その破壊株作製と、それによる影響について調べる。最終的に、ゲノムのメチル化パターンに及ぼす遺伝子の同定と増殖相における違いを解析し、孢子形成過程におけるメチル化の意義を考察する。

枯草菌の IS 転移機構解析に関しては、同種の納豆菌由来 IS を導入して転移頻度を測定する系を構築し、大腸菌とは異なって組換え酵素 *RecA* が必須であるという結果を得ている。本研究では、*RecA* のどのような機能が転移に必須であるかを詳細に解析し、枯草菌独自の機構に迫る。また、この転移頻度アッセイ系を用いて、継代培養することにより、実際に 168 株において転移の動態を調べ、進化的にゲノム中に IS を保持しなくなった要因を追跡する。

一方、我々は突然変異が環境変化を引き金として起きているのではないかということを示唆する結果を得た。これは現在では否定されている適応的突然変異であり、これが事実であれば、進化の議論に一石を投じると考え、この点も更に検証する。

## 4. 研究成果

## (1) メチローム解析

枯草菌における DNA メチル化酵素は、遺伝子アノテーションから表 1 にまとめた 3 組が可能性として挙げられる。*YdiO/P* は C メチル化酵素で m4C を生じる。*YeeA* は A メチル化酵素で m6A を生じる。*YeeA* super family を形成し、大腸菌等に保存されている。*MtbP* は C メチル化酵素で SPβ に由来し、ペアとなる制限酵素のない Orphan Methyl Transferase である。

表 1. 枯草菌のメチル化酵素

遺伝子	酵素名	予測配列
<i>ydiO</i>	M1. BsuMI	CTCGAG
<i>ydiP</i>	M2. BsuMI	CTCGAG
<i>yeeA</i>	BsuMORF6760P	GACGAG
<i>mtbP</i>	M. BsuMIIP	GGCC

栄養増殖期および 24 時間孢子形成培地で培養した枯草菌を孢子と母細胞に分画し、それぞれから DNA を抽出して PacBio RSII によるシーケンスを行った。その結果を図 1 および表 2 に示す。

この結果、パターン 1, 3, 7, 9 は孢子形成期特異的なメチル化を表していると考えられる。一方で、遺伝子情報と一致する認識配列はパターン 6 の *YeeA* だけであり、*YdiO/P* に関しては類似はしているものの、遺伝子機能との関連は検証できていない。これらの遺伝子破壊株を作製し、メチル化パターンとの関連性を解析しているが、現在まで確認は得られていない。しかし、枯草菌が増殖相特異的なメチル化機能を持っていることは明らかになった。さらに孢子と母細胞において異なる

メチル化が働いていることも示唆しており、細胞分化との関連も興味深い。

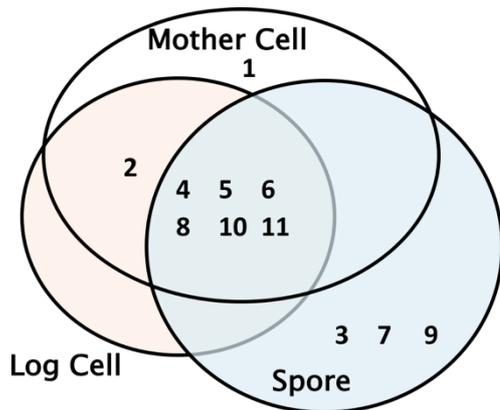


図1. 枯草菌ゲノムのメチローム解析

表2. 図1のメチル化パターン一覧

ID	Sequence	Modification type
1*	CTCGAAA	modified_base
2	CTCGAAB	m4C
3*	CTCGAABNBD	m4C
4	CTCGAGA	m4C
5	CTCGARB	m4C
6	GACGAG	m6A
7*	HBCTCGAAA	modified_base
8	TCTCGAG	m4C
9*	TV	modified_base
10	VTCGAG	m4C
11	VYTCGAG	m4C

グレー網掛けは孢子形成期のパターン

### (2) IS 転移に関する RecA の機能解析

同種の納豆菌ゲノムには多くの IS が存在するが、枯草菌に導入した IS が転移するとクロラムフェニコール耐性になる系、Jumping cat assay システムを構築し、転移頻度 (TPF) を測定したところ、IS256Bsu1 が非常に高頻度で転移することが分かり、この系を用いて制御機構の解析を行った。RecA のさまざまな変異株を用いて、転移頻度を測定したところ、RecA の相同組換え能ではなく、ATP 加水分解活性が必須であることがわかった (図2)。このことを検証するため、NCBI の保存ドメインデータベースから同様に P-loop dNTPase superfamily に属する Mu フェージの muB 遺伝子に着目し、*recA* 破壊株に導入したところ、UV 感受性は相補できなかったのに対し、IS 転移を相補できた。結論として ssDNA 結合活性や相同組換え能は IS 転移に不要であることが分かった。したがって RecA の転移に必要な機能は、トランスポゼースと IS の複合体をターゲット配列にリクルートし、ATP 加水分解と共に DNA から離れた後、IS の両端でニックを入れて転移を促すのではないかと考えている。

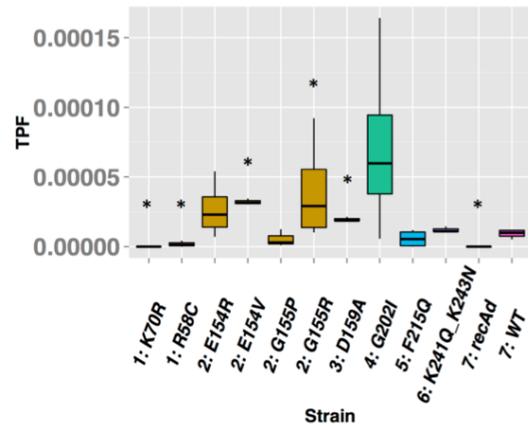


図2. 各 *recA* 変異株の転移頻度. 1~6は各ドメインの機能による分類を示す. 1: ATP 結合と加水分解. 2: ssDNA 結合と co-protease. 3: RecA primary site への ssDNA 結合制御. 4: ssDNA 結合. 5: RecA 重合化. 6: RecA-ssDNA 複合体の dsDNA 結合と相同領域ペアリング.

### (3) 枯草菌 168 株が IS を持たない理由の探索

上記 IS256Bsu1 を用いた Jumping cat assay 系を組み込んだ 168 野生株を継代培養し、経時的に転移頻度を測定したところ、図3のように、転移頻度が一旦上昇し、その後減少した。この現象を詳細に検証した結果、次の2点が明らかになった。1つは、新しい表現型を持つ株が次第に出現するようになり、その株は増殖が若干早くてやがて優占種になること。2つめは、新しい表現型を持つ株はトランスポゼースに変異が入っており、転移能を示さないこと、である。これらの結果から、168 株にとってトランスポゼースの発現は毒性を持ち、Hot spot として変異を導入するため、進化的に IS が淘汰されたのではないかと考えられる。

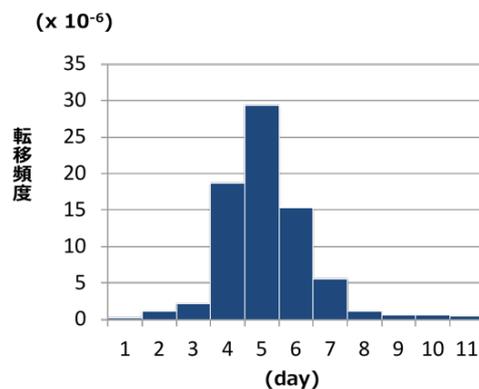


図3. 168 株の継代培養による IS 転移頻度測定

継代 4 日目頃から野生型とは異なるコロニー表現型をもつ株が出現し始め、やがて転移頻度が減少して、全く転移しなくなる。

#### (4) 適応的突然変異の検証

さまざまな変異株に対し、リファンピシン耐性を指標にした突然変異率測定を行ってきたが、その過程で抗生物質に出会うことによって変異が誘起される、すなわち適応的突然変異が起きている可能性を示唆する結果を得た。詳細な解析の結果、この現象は、多くの場合にリファンピシン耐性株が野生株に比べて増殖速度が遅くなるために、見かけ上適応進化に見えていたことが判明した。すなわち、耐性株の増殖速度が遅い場合(図4左)、野生株の生育に押されて耐性株がスポット上にコロニーを形成するが、耐性株でも野生株同様の増殖速度を持つ場合(図4右)には、競争に負けずに扇状コロニーを形成した。このことは抗生物質に触れることによって耐性菌が生じるわけではないことを明らかにした。

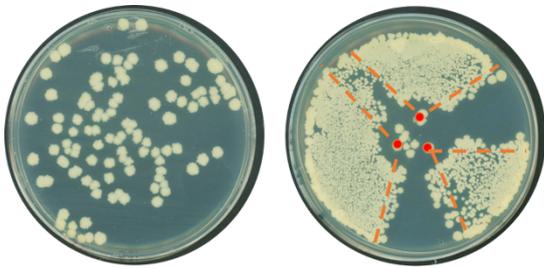


図4. レプリカ法による耐性菌出現様式の検証  
軟寒天培地の中心に野生型を、耐性菌を人為的にその周辺に植菌し、一晚培養した後、リファンピシンプレートにレプリカを取って耐性菌の増殖を観察した

#### (5) MMR 機構における親鎖認識について

この問題に関しては、研究途上において、一部真核生物で知られているメカニズム、すなわち $\beta$ -クランプを介して親鎖を認識しているという方法を枯草菌も持っていることを示唆する報告があったため、その検証作業は不要と考えて中止した。

#### 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1件)

①Akashi M., Harada S., Moki S., Okouji Y., Takahashi K., Kada S., Yamagami K., Sekine Y., Watanabe S., Chibazakura T., Yoshikawa H.,  
Transposition of insertion sequence IS256*BsuI* in *Bacillus subtilis* 168 is strictly dependent on *recA*.  
*Genes Genet Syst.* 査読有、92巻、2017、59–71

DOI: 10.1266/ggs.16-00071.

[学会発表] (計4件)

①徳山麻里、人為的 IS 誘導が枯草菌 168 株に与える影響の解析、日本ゲノム微生物学会、2018

②徳山麻里、枯草菌 168 株が挿入配列を持たない理由の解明、日本農芸化学会、2018

③北村夏美、枯草菌 168 株が挿入配列を持たない理由の解明、日本ゲノム微生物学会、2017

④北村夏美、枯草菌分子シャペロンによる変異緩衝作用の検証、日本農芸化学会、2017

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉川 博文 (YOSHIKAWA, Hirofumi)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：50175676