

令和 4 年 4 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14672

研究課題名(和文) バクテリアのメチロームによる表現型多様化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of phenotype diversification by bacterial methylome

研究代表者

古田 芳一 (Furuta, Yoshikazu)

北海道大学・人獣共通感染症国際共同研究所・講師

研究者番号：40613667

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)：バクテリアにおいて、DNAメチル化はどのようなメカニズムで表現型の変化をもたらすのか。この問いに答えるため、これを用いてメチロームの多様性を持つ大腸菌ライブラリを構築することを旨とし、ワンハイブリッド法を用いて多様なターゲット配列を持つDNAメチル化酵素を開発、ならびに未だ認識配列が明らかとなっていないDNA修飾酵素をデータベースより探索した。前者については、元のDNA修飾酵素と異なるターゲット配列を持つ酵素が選択されたものの、理想的な活性を持つ酵素を得ることは難しかった。一方、後者については、これまでに知られていなかった複雑なターゲット配列を持つDNA修飾酵素を発見できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

データベース中のDNAメチル化酵素の活性を探索することで、今回のような複雑なメチル化ターゲット配列を示すものを得られたことによって、バクテリアのメチル化パターンの多様性が示された。今後はこうした複雑なメチル化を施すDNAメチル化酵素の役割や、環境中のバクテリア中のメチル化パターンの多様性について、解析を行っていく。

研究成果の概要(英文)：To analyze how DNA methylation affect phenotype of bacterial cells, we aimed to develop an E. coli library with diversity in DNA methylation status by developing DNA methyltransferase enzyme with various DNA methylation target sequence utilizing one-hybrid method and also by searching a DNA methyltransferase with unknown target sequence from databases. The former didn't work well as it was difficult to obtain an enzyme with ideal activity with enough specificity and biochemical activity. For the latter, we discovered a novel DNA methyltransferase with complex target sequence.

研究分野：ゲノム細菌学

キーワード：DNA修飾 エピゲノム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バクテリアのエピゲノムにおいては、メチル化酵素の活性によって特定の DNA 配列に施される DNA メチル化が主なプレーヤーであり、真核生物のエピゲノムと同様、遺伝子発現制御や表現型に影響する事例が知られている(1)。我々は、これまでにバクテリアのメチル化酵素をコードする遺伝子がゲノム中でトランスポゾンなどの浮動因子上に多く存在すること、またバクテリアの近縁株間でゲノム中のメチル化酵素をコードする遺伝子の種類や組み合わせが多様であることを見出し、バクテリアの菌種・菌株間でゲノムのメチル化状態(メチローム)が多様であることを見出してきた(2)。また、後に開発された SMRT 法により、バクテリアのメチロームについて 1 塩基レベルの精度で網羅的に検出できるようになったため(3)、菌株間で異なるメチル化酵素をコードする遺伝子を持つピロリ菌株についてメチロームを解析した結果、実際にバクテリアのエピゲノムが菌株間で多様であることを証明した(4)。

こうした菌種・菌株間におけるエピゲノムの多様性はなぜ起こるのか。我々は菌集団中でメチル化酵素をコードする遺伝子が頻りにやり取りされ、異なるメチロームを持つ株が共存すると、トランスクリプトームや表現型が変化した個体と共存することとなり、急激な環境変化にも生存できる個体が存在する可能性が上昇する。メチロームが細菌の適応進化に寄与する、「メチローム駆動適応進化仮説」を提唱した(5)。

バクテリアにおいて、DNA メチル化はどのようなメカニズムで表現型の変化をもたらすのか。メチローム駆動適応進化仮説を実証するにあたり、最も大きな問いであるが、バクテリアのメチロームの多様性は真核生物と比較して非常に大きく、この問いに答えるための網羅的な解析を行うに十分な量と質のデータはまだ得られていないのが現状であった。

2. 研究の目的

バクテリアにおいて、DNA メチル化はどのようなメカニズムで表現型の変化をもたらすのか。この問いに答えるため、多様なメチロームを持つ菌株について、メチロームと表現型の対について解析を行う必要があった。多様なメチロームを持つ菌株を構築するため、我々が過去にピロリ菌にて見出していた、多様なドメイン配列を持つ DNA 修飾酵素系のシステムを応用することを着想した。本研究では、ワンハイブリッド法(6)を用いて多様なターゲット配列を持つ DNA メチル化酵素を開発し、これを用いてメチロームの多様性を持つ大腸菌ライブラリを構築することを目指した。並行して、未だ認識配列が明らかとなっていない DNA 修飾酵素について認識配列を明らかにし、より多様な配列のメチル化を含むライブラリの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) ワンハイブリッド法を用いたドメインスクリーニング

I 型 DNA メチル化酵素系は、DNA メチル化酵素サブユニットをコードする M 遺伝子と、配列認識サブユニットをコードする S 遺伝子で構成され、両遺伝子産物で形成される複合体がターゲット配列への結合活性及びメチル化活性を持つ。特に、配列認識サブユニットが複合体のターゲット配列を決定しており、遺伝子配列中の 2 つの配列認識ドメイン(TRD)がそれぞれ特定の 3 ないし 4 塩基の DNA 配列を認識する(Fig. 1)。

認識配列が既知の配列認識サブユニットのドメイン配列について、点突然変異を導入し、ワンハイブリッド法(6)を用いて、異なる認識配列を持つ配列認識サブユニットの構築を行った。

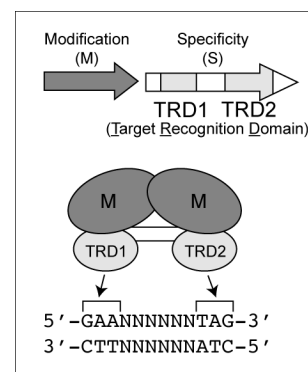


Fig. 1 I 型 DNA メチル化酵素系

(2) メチロームバーコードライブラリの構築

メチル化酵素遺伝子を持つプラスミドに、①で得られた配列認識ドメイン、およびピロリ菌にて検出されている、認識配列既知の配列認識ドメインをランダム組み合わせた配列認識遺伝子を導入し、これを大腸菌に形質転換することで、DNA バーコード付きで多様なメチローム状態を持った大腸菌集団の構築を試みた。

(3) 新規認識配列を持つ DNA 修飾酵素の探索

上記の手法がうまくいかない場合に備え、これまでに認識配列が明らかにされていない細菌由来 DNA メチル化酵素の情報を収集し、認識配列の解析を行った。種々の細菌の DNA メチル化酵素について、その遺伝子配列を合成し、大腸菌にクローニング後、MinION シークエンサーにて解読し、DNA メチル化の有無について解析を行った。

4. 研究成果

(1) ワンハイブリッド法を用いたドメインスクリーニング

3 塩基の塩基配列 CTA を認識する配列認識ドメインについて、この手法を用いることで 1 塩基違いの CAA、CGA、CCA を認識する配列認識ドメインが取得できるか試みた。3 塩基それぞれ

についてメチル化を施せる配列認識ドメインを選択することはできたものの、野生株の認識配列(CTA)へのメチル化活性を保っている場合や、標的とした1塩基違いの認識配列へのメチル化の活性が野生株と比較して弱い場合が多く、新規認識配列を持つ配列認識ドメインとしてライブラリ構築に使用するに十分な特異性を持つものを取得することは困難であると判断した。

(2) メチロームバーコードライブラリの構築

ピロリ菌にて検出されている配列認識ドメインをランダムに組み合わせた配列認識遺伝子を用いて、多様なメチローム状態が期待される大腸菌集団を構築した。この集団よりランダムに菌株を分離し、配列認識ドメインをランダムに組み合わせてもDNA修飾活性が維持されているか、解析を行った。ゲノムDNAを各分離株より抽出し、PacBioシーケンサーを用いてゲノム上のメチル化の有無について解析を行った。その結果、7/11(64%)についてはメチル化活性が検出されたものの、残りについては検出されず、活性を維持できる組み合わせが限られていることを見出した。活性が維持できない組み合わせについては、ピロリ菌内では活性が見出されている組み合わせも検出されており、異なる種を用いたことがタンパク質の活性に影響している可能性が示唆された。

ピロリ菌においては多様な配列認識ドメインの組み合わせが検出されているが、終止コドンの導入等がなされない限りはメチル化の活性が維持されている。ランダムに見える組み合わせがなぜ常に活性を保っているのか、あるいはなぜ活性を維持できる組み合わせのみが選択されているのか、今後の解析の課題としたい。

(3) 新規認識配列を持つDNA修飾酵素の探索

(1)の多様な認識配列の探索が不調であった場合のバックアップとして、これまでに認識配列が解析されていない細菌由来のDNAメチル化酵素について、その認識配列の解析を行った。解析したメチル化酵素の中で、未知の認識配列を持つDNAメチル化酵素が見出された。

そのうち、炭疽菌の保持するDNAメチル化酵素M.BatIについて、詳細に解析を行った(7)。M.BatIをコードする遺伝子は炭疽菌染色体上のプロフェージ内に存在し、炭疽菌内では活性が確認されなかったものの、大腸菌にクローニングし発現を誘導すると、シトシンのメチル化活性が確認された。大腸菌内におけるDNAメチル化のパターンを解析したところ、GCWGCの配列モチーフについてはDNAの両方の鎖をメチル化し、GCSGCの配列モチーフについてはDNAの片方の鎖のみをメチル化することが見出された(Fig. 2)。これまでに報告されているDNAメチル化酵素は、ターゲットとなる配列モチーフの両方の鎖をメチル化するか、片方の鎖のみをメチル化するかのどちらかに分類されており、このような複雑なDNAメチル化パターンを持つDNAメチル化酵素の報告はこれが初めてであった。また、大腸菌にてこのDNAメチル化酵素を発現すると細胞死が誘導されるなど、極めて珍しい活性を持つことがわかった。今後この特殊なDNAメチル化パターンを実現する分子メカニズムや、細胞毒性との関連性など、生化学的な解析を行っていく予定である。

<引用文献>

1. Low DA, Casadesús J. 2008. Clocks and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr Opin Microbiol* 11:106-12.
2. Furuta Y, Kawai M, Uchiyama I, Kobayashi I. 2011. Domain movement within a gene: a novel evolutionary mechanism for protein diversification. *PLoS One* 6:e18819.
3. Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, Korlach J, Turner SW. 2010. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat Methods* 7:461-5.
4. Furuta Y, Namba-Fukuyo H, Shibata TF, Nishiyama T, Shigenobu S, Suzuki Y, Sugano S, Hasebe M, Kobayashi I. 2014. Methyloome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. *PLoS Genet* 10:e1004272.
5. Furuta Y, Kobayashi I. 2012. Mobility of DNA sequence recognition domains in DNA methyltransferases suggests epigenetics-driven adaptive evolution. *Mob Genet Elements* 2:292-296.
6. Meng X, Wolfe SA. 2006. Identifying DNA sequences recognized by a transcription factor using a bacterial one-hybrid system. *Nat Protoc* 1:30-45.
7. Furuta Y, Miura F, Ichise T, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Zorigt T, Tsujinouchi M, Ishizuka M, Ito

T, Higashi H. 2022. A GCDGC-specific DNA (cytosine-5) methyltransferase that methylates the GCWGC sequence on both strands and the GCSGC sequence on one strand. PLoS One 17:e0265225.

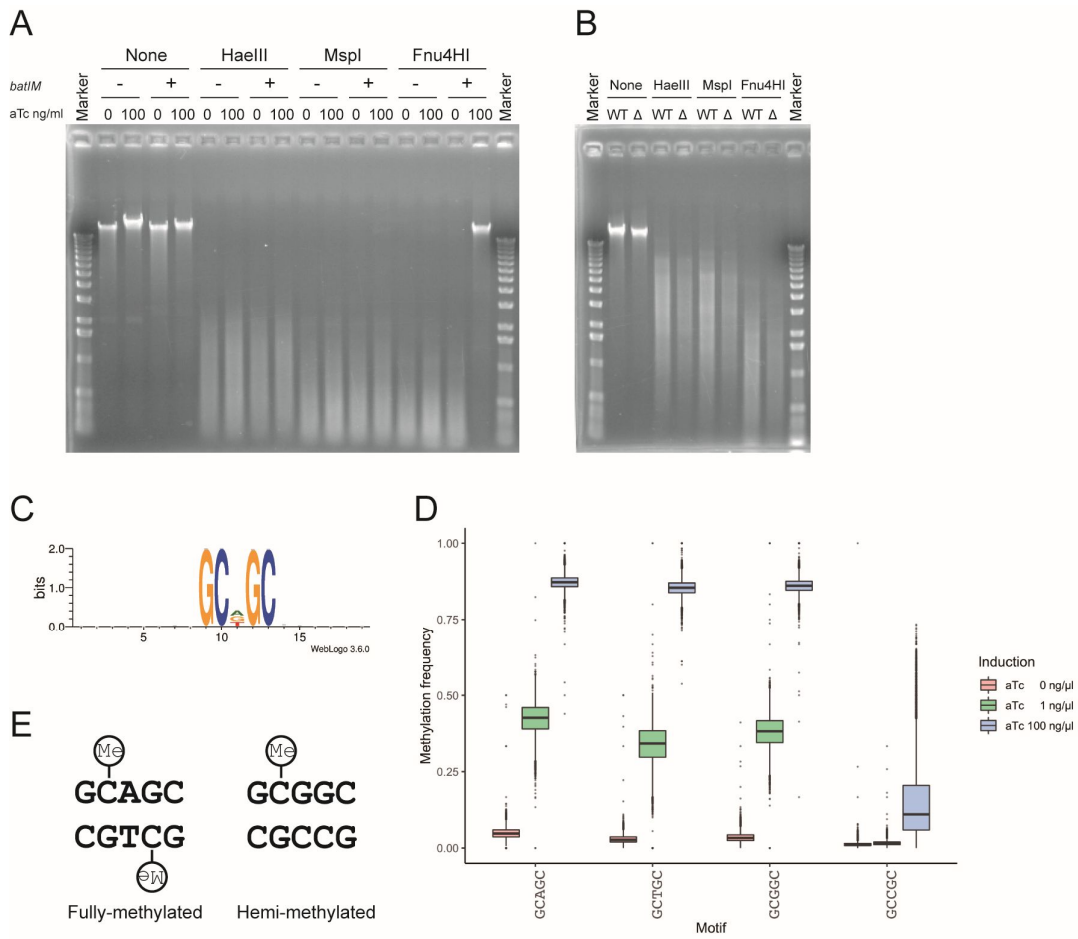


Fig. 2 (A) M. BatI でメチル化された大腸菌ゲノム DNA の制限酵素による切断。(B) 炭疽菌ゲノム DNA の制限酵素による切断。(C) M. BatI でメチル化された箇所に見出された DNA モチーフ。(D) GCNGC に含まれるモチーフのメチル化頻度解析。(E)M. BatI のターゲットとなる DNA モチーフ。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yano Hirokazu, Alam Md. Zobaidul, Rimbara Emiko, Shibata Tomoko F., Fukuyo Masaki, Furuta Yoshikazu, Nishiyama Tomoaki, Shigenobu Shuji, Hasebe Mitsuyasu, Toyoda Atsushi, Suzuki Yutaka, Sugano Sumio, Shibayama Keigo, Kobayashi Ichizo	4. 巻 11
2. 論文標題 Networking and Specificity-Changing DNA Methyltransferases in Helicobacter pylori	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.01628	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furuta Yoshikazu, Miura Fumihito, Ichise Takahiro, Nakayama Shouta M. M., Ikenaka Yoshinori, Zorigt Tuvshinzaya, Tsujinouchi Mai, Ishizuka Mayumi, Ito Takashi, Higashi Hideaki	4. 巻 17
2. 論文標題 A GCDGC-specific DNA (cytosine-5) methyltransferase that methylates the GCWGC sequence on both strands and the GCSGC sequence on one strand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0265225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田芳一、播磨勇人、伊藤絵美子、丸山史人、大西なおみ、大崎研、小川寛人、David Squarre、Bernard M. Hang'ombe、東秀明
2. 発表標題 長鎖型シークエンサーを用いた炭疽菌のゲノム欠失およびDNAメチル化の解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------