

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291080

研究課題名(和文) エピゲノムのデジタル変換による適応進化：オーミクスと実験進化による検証

研究課題名(英文) Adaptive evolution through digital changes in the epigenome

## 研究代表者

小林 一三 (KOBAYASHI, Ichizo)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：30126057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：「適応進化の単位がゲノムよりもエピゲノムである」という「エピゲノム駆動進化仮説」を細菌で検討した。ピロリ菌のDNAメチル化配列特異性を決める遺伝子を複数ノックアウトし、トランスクリプトームを親株と比較した。これから、適応的な形質を実験で検討したところ、影響が認められた。DNAメチル化系の中にネットワークを明らかにした。ピロリ菌の株間比較から、制限修飾系特に標的配列認識ドメインの著しい多様性を明らかにした。それは、ゲノム配列にもとづく集団構造と密接には対応しなかった。アミノ酸配列の変換に選択圧の働いたコドンを含めた全ゲノムで探索したところ、制限修飾系の配列認識サブユニットに存在した。

研究成果の概要(英文)：We examined the possibility that diverse epigenomes as opposed to diverse genomes might serve as units of adaptive evolution. We used *Helicobacter pylori*. We knocked out several genes determining sequence specificity of DNA methylation and analyzed their effects on transcriptome. Based on these, we examined adaptation-related phenotype sets and found unique effects. From 30 *H. pylori* genome comparison, we revealed high diversity in the restriction-modification systems. It did not closely match the population structure based on genome sequences. We looked for codons with diversifying selection, and found some in the specificity subunits of the restriction-modification systems.

研究分野：ゲノム進化

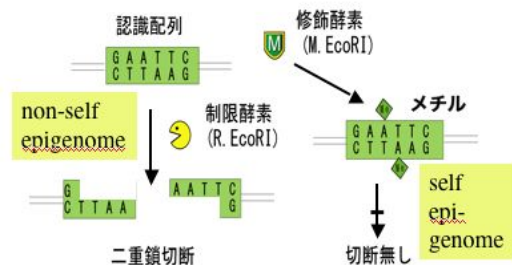
キーワード：適応進化 エピジェネティクス メチローム トランスクリプトーム 集団構造 ピロリ菌 制限修飾系 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

<適応進化のパラダイム> 「適応進化は、多様なゲノム配列からの選択によって進む」という現在支配的な考え方は、neo-Darwinism が微生物と出会った所に成立した。しかし、「自然集団に選択による適応をもたらすほどのゲノム変異があるのか」の直接検証は、今世紀のゲノム解読イノベーションまで待たなければならなかった。

<エピジェネティクスによる適応進化?> この考え方を乗り越えるべく提起されたのが、「適応進化は、多様なエピゲノムからの選択によって進む」という考え方である。

<DNA メチル化> エピジェネティクスのしくみの中で、ゲノム DNA のメチル化は、機構と遺伝子発現への影響が詳細に解明されている。細菌でのメチル化は、多くの場合極めて配列特異性が高い。特定の DNA 配列をメチル化する修飾酵素と、そのようなメチル化を持たない DNA を「非自己」として破壊する制限酵素からなる制限修飾系が、その多くを担う。それは、ゲノムに特定のメチル化状態を強制するものと言える。



代表者のグループは、制限修飾系の宿主細菌ゲノム攻撃の発見(Naito et al. Science 1995)から、制限修飾系が「動く遺伝子」であることを提唱し、それらのバイオロジーという分野を開拓してきた。

<DNA メチル化系の配列認識ドメインの動き> 細菌ゲノムの比較によって、制限修飾系の DNA 配列認識ドメインが「動き」の単位である場合を発見した (Furuta & Kobayashi, 2012; Furuta et al. 2011)。III型では、DNA 配列認識ドメインは非相同な遺伝子間を動き回り、細菌界に広まっていた。I型では、遺伝子内のドメインの配列が同じ遺伝子内の別のドメインに移動する Domain Movement (DoMo)反応を発見した。

<「ゲノム DNA メチル化パターンのデジタル変換による適応進化」仮説> 配列認識タンパク質の変換は、メチル化配列の変換をもたらすことが推測される。この変換は、一つの配列認識遺伝子に 1000 程度の DNA 配列の認識を可能にするだろう。複数の遺伝子座がゲノムにあれば、10 の 12 から 15 乗程度の多様な DNA 配列メチル化パターンが可能になる。DNA メチル化パターンの変換が、グローバルな遺伝子発現の変換をもたらすこと、それが形質の変換をもたらすことは、容易に想像される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この「DNA メチル化配列特異性の変換による、エピゲノムのデジタル変換が、グローバルな遺伝子発現の変換をもたらす、自然選択の素材となるエピゲノムの多様性をもたらす」という仮説を、細菌の場合について、検証することである。そのために、

- A. メチロームとトランスクリプトームの解析を行う。
- B. 適応進化を実験進化技法によって証明する。
- C. これらをゲノム配列比較からの知見と統合して進化過程を再構築し、理論的にも理解する。

## 3. 研究の方法

メチル化の DNA 配列特異性を決めるドメインを変換したときに、メチロームとトランスクリプトームがどう変わるかを測定する。そして発現が変わる遺伝子群のインフォマティクス解析から、適応的な形質を予測し、形質測定実験によって検証する。また、メチル化特異性変換の適応における役割を、変異体間の競争を行わせる実験進化手法で検討する。ゲノム比較による変換過程の追跡と合わせて、メチル化配列変換による適応進化の過程を再構成し、理論的な理解を試みる。

主としてピロリ菌を、副として大腸菌を用いる。

## 4. 研究成果

(1) ピロリ菌 5 株のメチロームを Pacbio シーケンサーで解読した。それらの著しい多様性を明らかにした。メチル化のホットスポットとコールドスポットを明らかにした。メチル化系の配列認識のマイクロ進化を明らかにした。I 型の制限修飾系のドメイン間配列移動による認識配列多様化を実証した。I 型の制限修飾系がオペロン様クラスターの発現を大きく変えること、そこにメチル化配列があることを示した。

(2) 大腸菌で、腸内細菌プラスミド由来の配列特異性の異なる DNA 修飾酵素複数をプラスミドから発現し、トランスクリプトームへの影響を RNA-seq で調べた。それぞれユニークな遺伝子発現変化が観察され、特定の形質群への影響が強く示唆された。

(3) ピロリ菌の DNA メチル化の配列特異性を決める遺伝子を多数ノックアウトし、それらのトランスクリプトームを親株と比較した。遺伝子によってユニークな遺伝子発現変化を示すものがあった。それらをパスウェイ解析し、特定のパスウェイカテゴリーで変化遣

伝子が濃縮されていることを突き止めた。これにもとづいて、運動性、酸化ストレス耐性、酸耐性などの適応的な形質を実験で検討したところ、影響が認められた。一つの形質が、複数のメチル化系によって正負の逆方向に制御されている場合があった。DNA メチル化系の間に、遺伝子発現によるネットワークがあることを明らかにした。

またこれらのノックアウトには、増殖にプラスあるいはマイナスに影響するものがあった。狭義の適応度に明確な違いが見られた。

(4) ピロリ菌多数の株間比較から、制限修飾系とくにその標的配列認識ドメインの著しいバリエーションを明らかにした。その多様性は、ゲノム配列（染色体ペインティング）にもとづく集団構造とも、逆位の解析によるシントニー進化とも密接には対応しなかった。

(5) アミノ酸配列の変換に選択圧の働いたコドンを含めた全ゲノムで探索したところ、I 型の制限修飾系の配列認識サブユニットに存在した。

(6) 家族メンバーから得たピロリ菌のゲノムを解読したところ、制限修飾遺伝子に非同義置換を発見した。親から子への感染時にメチル化の変化が起きたことが推測された。

以上の結果は、エピジェネティクスによって適応進化が駆動されるという仮説を支持する。

## 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 10 件)

(1) Koji Yahara, Yoshikazu Furuta, Shinpei Morimoto, Chie Kikutake, Sho Komukai, Dorota Matelska, Stanisław Dunin-Horkawicz, Janusz M. Bujnicki, Ikuo Uchiyama, Ichizo Kobayashi. Genome-wide survey of codons under diversifying selection in a highly recombining bacterial species, *Helicobacter pylori*. **DNA Research** doi: 10.1093/dnares/dsw003 (2016) 査読あり

(2) Koji Yahara, Xavier Didelot, Keith A. Jolley, Ichizo Kobayashi, Martin C.J. Maiden, Samuel K. Sheppard and Daniel Falush. The Landscape of Realized Homologous Recombination in Pathogenic Bacteria. **Molecular Biology and Evolution**, 33(2):456-471 (2015) 査読あり

(3) Kenji K. Kojima, Ichizo Kobayashi.

Transmission of the PabI family of restriction DNA glycosylase genes: mobility and long-term inheritance. **BMC Genomics** 16(1):817 (2015) 査読あり

(4) Yoshikazu Furuta, Mutsuko Konno, Takako Osaki, Hideo Yonezawa, Taichiro Ishige, Misaki Imai, Yuh Shiwa, Mari Shibata-Hatta, Yu Kanasaki, Hirofumi Yoshikawa, Shigeru Kamiya, Ichizo Kobayashi. Microevolution of Virulence-Related Genes in *Helicobacter pylori* Familial Infection. **PLoS ONE** 10(5):e0127197 (2015) 査読あり

(5) Y. Furuta, H. Namba-Fukuyo, T. F. Shibata, T. Nishiyama, S. Shigenobu, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Hasebe, I. Kobayashi. Methylome diversification through changes in DNA methyltransferase sequence specificity. **PLoS Genetics**, 10(4): e1004272 (2014). 査読あり

(6) I. Mruk, I. Kobayashi. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. **Nucleic Acids Research**, 42 (1): 70-86 (2014). 査読あり

(7) Y. Furuta, I. Kobayashi. Restriction-modification systems as mobile epigenetic elements. In: A. Roberts, Peter Mullany, Eds. **Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements**. Landes Bioscience, pp. 85-103 (2013). 査読あり

(8) 小林一三、進化の単位としてのエピゲノム：配列特異性を変える細菌の DNA メチル化系からの仮説。「種生物学研究」第 39 号「エコロジカル・エピジェネティクス - 生物の柔軟性の分子生態学 -」(責任編集者：荒木希和子・土畑重人) 文一総合出版、刊行中、査読あり

(9) 小林一三、ゲノム育種からエピゲノム育種へ。「化学と生物」日本農芸化学会、刊行中、査読なし

(10) 小林一三：ゲノムからみるピロリ菌。日本臨牀、第 71 巻・第 8 号(平成 25 年 8 月号)：1352-1367(2013) 査読なし

[学会発表](計 23 件以上)

(1) 小林一三、「一分子リアルタイムシーケンサー」によるメチローム解読、S-7、第 89 回日本細菌学会総会、大阪、2016 年 3 月 23 日～25 日、口頭発表

(2) 小林一三、エピジェネティクス駆動進化:細菌での OMICS による検証、**BMB2015**、ワークショップ、神戸ポートアイランド、2015 年 12 月 1 日～4 日、兵庫県神戸市

(3) Ichizo Kobayashi, Genome/ Epigenome Dynamics in Bacterial Evolution. **MCB75: Molecules to organisms**. Dec. 11-14, 2015. Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore, INDIA.

(4) Ichizo Kobayashi, Genome and epigenome evolution of *H. pylori*. **18th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms (CHRO 2015)**, 1st - 5th of November 2015, Rotorua Conference Centre, Rotorua, New Zealand.

(5) 矢野大和、古田芳一、Zobaidul Alam、林原絵美子、柴田朋子、鈴木穰、菅野純夫、重信秀治、長谷部光泰、小林一三、日本遺伝学会第 87 回大会、WS12-3、仙台、2015 年 9 月 24 日～26 日

(6) Hirokazu Yano, Yoshikazu Furuta, Zobaidul M. Alam, Emiko Rimbara, Hiroe Namba-Fukuyo, Tomoko Shibata, Tomoaki Nishiyama, Shuji Shigenobu, Mitsuyasu Hasebe, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Keigo Shibayama, Ichizo Kobayashi, Adaptive evolution and ever metamorphosing DNA methylation systems, **7<sup>th</sup> NEB Meeting on DNA Restriction and Modification**, August 24-29, 2015, University of Gdansk, Gdansk, Poland.

(7) 小林一三、「エピジェネティクスに基づく進化」の細菌での検証、S4、**日本進化学会第 17 回大会**、中央大学後楽園キャンパス、2015 年 8 月 20 日～23 日、東京都文京区

(8) 古田芳一、今野武津子、大崎敬子、米澤英雄、神谷茂、小林一三、ピロリ菌の病原因子はなぜあるのか？ 小児を含む家族間感染株の全ゲノム配列比較から、S-1、**第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会**、神戸ポートピアホテル、神戸、2015 年 6 月 26 日

(9) 矢野大和、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、「ワークショップ WS1-10 ヘリコバクター基礎研究の新たな展開」、**第 21 回日本ヘリコバクター学会学術集会**、神戸ポートピアホテル、神戸、2015 年 6 月 26 日～27 日

(10) 小林一三「エピジェネティクス駆動進

化:細菌種内複数系列での OMICS 比較による実証」インシリコメガバンク研究会セミナー、2015 年 4 月 16 日、東北大学メディカル・メガバンク棟

(11) Ichizo Kobayashi, *H. pylori* evolution, **VI International Symposium of Helicobacter pylori: natural history and implications for human health**, December 3, 2014, San José, Costa Rica

(12) I. Kobayashi, Methylome dynamics in *H. pylori*, **EHSG2014 XXVIth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer**, Sep. 12, 2014, Rome, Italy.

(13) Ichizo Kobayashi, Epigenetics-driven evolution?, S3-3, 16th Annual Meeting of the Society of Evolutionary Studies, Japan, August 22, 2014, TAKATSUKI GENDAI GEKIJO, Osaka

(14) Ichizo Kobayashi, Epigenetics-driven evolution, MS62, Japanese Society for Mathematical Biology/ SMB (Symposium of Mathematical Biology) 2014 Osaka, July 31, 2014, Osaka

(15) Ichizo Kobayashi: Evolution of *H. pylori*, **11th International Workshop on Pathogenesis and Host Response in Helicobacter Infections**, July 2, 2014, Helsingør, Denmark.

(16) Ichizo Kobayashi, Epigenetics in evolution, **Commemorative Symposium for the 29th International Prize for Biology**, Nov. 22, 2013, Fukuoka, Japan

(17) 小林一三、進化する能力を細胞に持たせるには、どうすればいいだろうか?、「細胞を創る」研究会 6.0、鶴岡メタポロームキャンパスレクチャーホール、鶴岡市、2013 年 11 月 15 日

(18) Ichizo Kobayashi, Why restriction enzymes? Restriction-modification, epigenetic powers driving evolution. **Special Cold Spring Harbor Laboratory meeting hosted by CSHL Genentech Center for the History of Molecular Biology and Biotechnology, History of restriction enzymes**, Cold Spring Harbor Laboratory, 2013 October 19-21.

(19) K. Yahara, Y. Furuta, K. Ichizo Kobayashi, Methylome diversification

through changes in the sequence specificity of DNA methyltransferases. **Infectious Disease Genomics & Global Health 2013**, Wellcome Trust Conference Centre, Hinxton, 16–18 October 2013.

(20) 古田芳一、南波宏枝、柴田朋子、西山智明、重信秀治、鈴木 穰、菅野純夫、長谷部光泰、小林一三、一分子リアルタイム (SMRT) シークエンシングによるメチローム解読と「エピジェネティクス駆動進化」仮説、ワークショップ「網羅的ゲノム DNA メチル化解析から現れる新しい生命像」WS9-1、日本遺伝学会第 85 回大会、慶應大学、横浜市、2013 年 9 月 21 日

(21) Oshima, M. Yoshida, T. Azuma, M. Hattori, I. Uchiyama, o.I. Kobayashi, Chromosome painting in silico in a bacterial species reveals fine population structure, Workshop 1. Molecular Genetics & Virulence Factors, **EHSG2013 XXVth International Workshop on Helicobacter and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer**, Sep. 13, 2013, Madrid, Spain.

(22) 矢原耕史、古田芳一、吉田優、東健、小林一三、インシリコ染色体ペインティングでわかるピロリ菌の詳細な集団構造、シンポジウム「ヘリコバクターの Omics」S2-2、**第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会**、2013 年 6 月 28 日、長崎大学、長崎市、口頭発表。

(23) Ichizo Kobayashi, Mobility of restriction-modification systems and their domains, **International Conference on Nucleic Acid Enzymes and Enzymes in Human Diseases (NAEEHD)**, June 17, 2013, The Chinese University of Hong Kong.

(多数につき一般発表を省略)

〔図書〕(計 4 件)

(1) I. Kobayashi. Genome evolution: *Helicobacter pylori* as an extreme model. pp.217-231. In: S. Backert, Y. Yamaoka, Eds. *Helicobacter pylori* Research - From Bench to Bedside, Springer Tokyo, Japan. 2016.

(2) I. Mruk, I. Kobayashi. Epigenetics mediated by restriction-modification systems. In: F. J. de Bruijn, Ed. **Stress and Environmental Control of Gene Expression in Bacteria**, two volume set, 1416 pages, Wiley. (2016)

(3) I. Kobayashi, N. Handa, K. Kusano. DNA Double-strand Breaks and Their Consequences in Bacteria and Their Genomes. **Encyclopedia of Life Sciences (eLS)**, A21652, Wiley (2014).

(4) 小林一三:ゲノム内対立.上田恵介、菊水健史、坂上貴之、辻和希、友永雅己、中島定彦、松島俊也(編) 行動生物学辞典, p.151、**東京化学同人** (2013)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 一三 (KOBAYASHI, Ichizo)  
東京大学新領域創成科学研究科教授  
研究者番号 : 30126057

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

古田 芳一 (FURUTA, Yoshikazu)  
東京大学新領域創成科学研究科特任助教  
研究者番号 : 40613667

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

長谷部 光泰 (HASEBE, Mitsuyasu)

基礎生物学研究所 生物進化研究部門 教授  
研究者番号：40237996

大槻 久 (OHTSUKI, Hisashi)  
総合研究大学院大学先導科学研究科助教  
研究者番号：50517802