



甲基化修饰在细菌表观调控中的功能

童童, 王连荣*

武汉大学药学院, 湖北 武汉 430072

摘要: 为了适应复杂多变的生存环境, 微生物通常需要在保证基因组序列不变的前提下不断调整胞内代谢网络。表观调控可以在不改变 DNA 序列的情况下对基因表达进行调控, 因此成为细菌中重要的调控方式。作为一种 DNA 修饰, DNA 甲基化修饰是生物体中最常见的表观调控工具。在本文中我们全面、深入解析了两种孤儿甲基转移酶: DNA 腺嘌呤甲基转移酶(DNA adenine methyltransferase, Dam)和细胞周期调控甲基转移酶(Cell cycle-regulated methyltransferase, CcrM)在原核生物中的表观调控功能。我们主要探讨了 DNA 甲基化参与的细胞生理过程包括 DNA 复制起始、DNA 错配修复、基因表达调控、致病性和相变异等方面。同时, 我们结合三维基因组研究技术基因组结构捕获(Chromosome conformation capture, 3C)技术和新型 DNA 磷硫酰化修饰讨论了该领域的发展前景。

关键词: 细菌, 表观遗传, DNA 甲基化, 调控基因表达

细菌生存所处的微环境是动态变化的, 表观遗传对基因表达的调控可以帮助细菌更好地适应多变的生存环境。比如对于一些致病菌来说, 应对宿主免疫反应的能力对它们在宿主中的生存和繁殖至关重要, 而表观调控在某种程度上帮助细菌加强了这种能力。表观遗传不同于传统的用基因序列承载和传递遗传信息的方式, 是以不改变基因序列的方式传递遗传信息, 从而调控基因表达。表观遗传的机制包括 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 RNA 沉默^[1]。在真核生物中, 表观遗传的研

究主要集中在胚胎形成、细胞分化以及癌症的发生, 其中癌症的发生与基因的错误表达或沉默有关^[1]。在原核生物中, 表观遗传的研究主要集中在 DNA 甲基化参与的胞内生理过程, 包括 DNA 复制起始、错配修复和调控基因表达等。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶将甲基基团从腺苷甲硫氨酸转移至腺嘌呤或胞嘧啶形成 6-甲基腺嘌呤(6-Methyladenine, 6mA), 4-甲基胞嘧啶(4-Methylcytosine, 4mC)和 5-甲基胞嘧啶(5-Methylcytosine, 5mC) 3 种修饰, 其中 5-甲基胞

基金项目: 国家自然科学基金(31670086)

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-68759931; E-mail: lianrong@whu.edu.cn

收稿日期: 2017-04-04; 修回日期: 2017-05-20; 网络出版日期: 2017-07-10

嘧啶主要存在于真核细胞中, 而 6-甲基腺嘌呤甲基化和 4-甲基胞嘧啶甲基化主要存在于原核生物中。

早期对细菌甲基转移酶的研究集中在它与限制性内切酶的关系和生理意义, 因为它们可以形成一种修饰限制系统(Restriction-modification, R-M), 帮助细菌抵抗噬菌体等外源 DNA 的入侵^[2]。然而, 在某些微生物中, 限制性内切酶并没有伴随甲基转移酶一起出现, 这种甲基转移酶被称作孤儿甲基转移酶(Orphan methyltransferase)。孤儿甲基转移酶包括 DNA 腺嘌呤甲基转移酶(DNA adenine methyltransferase, Dam), 细胞周期调控甲基转移酶(Cell cycle-regulated methyltransferase, CcrM)和 DNA 胞嘧啶甲基转移酶(DNA cytosine methyltransferase, Dcm), 孤儿甲基转移酶可以参与重要的细胞生理过程, 包括 DNA 复制起始、DNA 错配修复和调节基因表达等(图 1), 但是至今为止还没有出现关于 Dcm 参与原核生物表观遗传调控的相关报导。

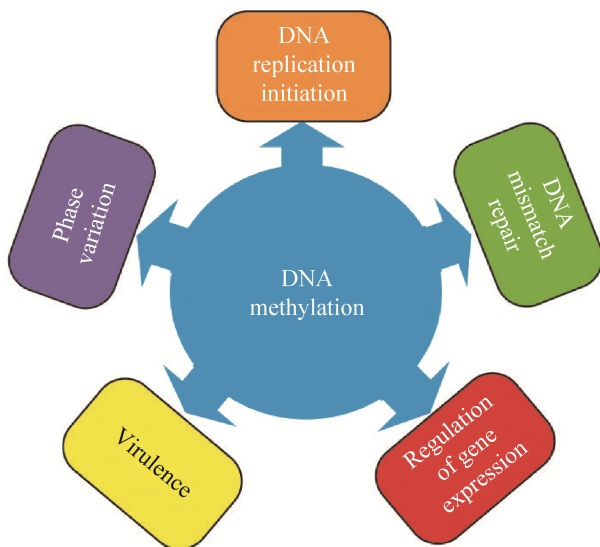


图 1. 细菌中 DNA 甲基化参与调节的主要细胞生理过程
Figure 1. Overview of the cellular physiological processes regulated by DNA methylation in bacteria.

为了满足深入研究甲基化修饰及其表观遗传机制的需要, 甲基化修饰的相关检测技术正在不断地更新和进步。基于第二代测序技术如 Illumina 测序的甲基化修饰检测需要对待测 DNA 进行预处理, 例如胞嘧啶甲基化的检测运用重亚硫酸盐法^[3-4]: DNA 上没有被甲基化修饰的胞嘧啶被重亚硫酸盐处理后变为尿嘧啶, PCR 时尿嘧啶会被读作胸腺嘧啶而被甲基化的位点不变; 腺嘌呤甲基化的检测运用限制性内切酶酶切的方法, 比如 *Dpn II* 切割未甲基化的 GATC 而 *Mbo I* 切割甲基化的 GATC 位点^[5]。但是这些方法由于预处理的误差及相对短的测序读长使得对基因组全局修饰的描绘进展艰难。近年来, 单分子实时(Single molecule real-time, SMRT)测序技术的发展和突破应用突破了这种局限, 使得描绘整个基因组的甲基化图谱成为可能^[6-8]。SMRT 测序技术是基于边合成边测序的方法, 在纳米微孔中以基因组片段为模板进行扩增, 带有不同荧光标签的脱氧核苷酸 dNTP 在被加入新生链时会被激发出荧光, 通过捕获和分析这些荧光的信息可以得出 DNA 的序列^[6-8]。SMRT 测序技术有比第一代和第二代测序技术更长的读长, 有利于后续的组装和获得较为完整的基因组信息。由于第三代测序技术是单分子实时测序, 样品 DNA 不需要进行预处理也不经过扩增直接测序, 使得原始模板 DNA 上的核酸修饰信息也能表征在最终的测序信号中^[6-8]: 通过检测 2 次荧光出现的间隔可以分析出该核苷酸上的修饰类型。SMRT 测序技术经过几年的迅速发展和成熟, 已经帮助科研人员获得了大量的 DNA 序列信息, 特别是为研究 DNA 甲基化修饰的修饰类型、修饰频率、修饰图谱等提供了更加广阔的发展空间(表 1)。

表 1. 细菌中甲基化酶的修饰类型和修饰序列^[9]
Table 1. Types and recognition motifs of DNA methylase in bacteria^[9]

Methylation type	Recognition motifs	Methylase name	Organism name	Biological function
m5C	CggccG	Ama55I	<i>Alicyclobacillus macrosporangiidus</i> CPP55	R-M system
	ggCGcc	BloAI	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697	R-M system
	GatC	CpeAIII	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	R-M system
	GgncC	MjaII	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> DSM 2661	R-M system
	CcwG	SptADcm	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A str. ATCC 9150	R-M system
m6A	gCgcGc	Nme18V	<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C FAM18	R-M system
	gATc	EcoKDam	<i>Escherichia coli</i> str. K-12 substr. MG1655	Epigenetic regulation*
	gAnTc	CcrM	<i>Caulobacter crescentus</i> CB15	Epigenetic regulation*
	TtaA	Asp24188I	<i>Acidobacteriaceae bacterium</i> TAA166	Not found
	cgAannnnnTga	Pmi614I	<i>Patulibacter minatonensis</i> DSM 18081	R-M system
	gaAnnnnnnnTcgc	SptAIII	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Paratyphi A str. ATCC 9150	R-M system
	m4C	tgGCca	Aco12261III	<i>Aminobacterium colombiense</i> DSM 12261
GgncC		CocIII	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271	R-M system
gCcnnnngGc		CagI	<i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	R-M system
caGCtg		Mru1279IV	<i>Meiothermus ruber</i> DSM 1279	Not found
CtaG		Lba2029II	<i>Lachnospiraceae bacterium</i> AC2029	R-M system

*Described in this review.

1 甲基化与 DNA 复制起始

细菌通过基因组 DNA 的复制和细胞分裂保证自身的繁殖和遗传物质的传递, DNA 甲基化在 DNA 的复制起始过程中扮演了重要的角色。在大肠杆菌中, 当 DnaA 蛋白结合在 *oriC* 区域时可以启动基因组复制^[10]。DNA 复制后, 大肠杆菌的基因组从完全甲基化(双链都被甲基化)变为半甲基化(模板链被甲基化而新生链没有被甲基化), 这时大部分半甲基化的 GATC 位点在 2–4 s 后被 Dam 完全甲基化^[11], 但是 *oriC* 区域的 11 个 GATC 位点和 *dnaA* 的启动子区的 8 个 GATC 位点因为复制起始调节蛋白 SeqA 的结合而保持一段时间的半甲基化状态^[12], 此时 DnaA 蛋白对 *oriC* 的结合也会阻止 Dam 对其甲基化, 从而维持 *oriC* 的半甲基

化状态^[13], SeqA 对 *dnaA* 启动子区的结合可以抑制 *dnaA* 表达, 保证了 DNA 不会再次启动复制^[14]。在 DNA 处于半甲基化状态的这段时间内, 细胞内的其他作用机制将使 DndA 失活, 以保证细胞在分裂之前不会再次启动 DNA 复制^[15]。

2 甲基化介导的错配修复

DNA 在复制过程中可能会引入错误的碱基导致错配, DNA 的错配会改变遗传信息进而影响微生物的生长繁殖, 所以细菌需要特定的机制来修复这种错配。在 Dam 甲基化介导的错配修复系统中, MutS 识别错配的碱基, MutL 与 MutS 相互作用并招募可以特异识别 GATC 位点的核酸内切酶 MutH 形成多蛋白复合物^[16]。MutH 于错配位点附

近切割无甲基化修饰的新生链 5'端鸟嘌呤的磷酸二酯键^[17]。然后,核酸外切酶 UvrD 逐个降解该链上的碱基包括错配的碱基,最后由 DNA 聚合酶 III 加上正确的碱基, DNA 连接酶将缺口连合^[18]。因此, Dam 甲基转移酶的甲基化作用对维持细菌 DNA 的完整和正确性非常重要。值得一提的是, Dam 甲基化的修饰基序 GATC 很短并且在基因组上分布广泛,使 Dam 甲基化依赖的配修复系统更灵活高效地行使功能。研究发现,甲基化介导的错配修复系统仅存在于含 Dam 甲基转移酶的大肠杆菌或其他 γ 变形菌,部分菌株的错配修复系统中不含有 MutH^[19],但 MutL 高度保守的核酸内切酶活性可以替代 MutH 的切割作用^[20]。

3 DNA 甲基化参与基因表达调控

3.1 Dam 甲基转移酶调控基因表达

通常情况下,大肠杆菌的基因组处于完全甲基化状态,只有在基因组复制后的一瞬间是半甲基化状态。*dam* 缺失突变株的自然突变率比野生型高,也失去了协调基因组复制起始的能力^[21],这说明甲基化可以参与 DNA 复制和修复^[22]。那么甲基化是否参与基因表达调控呢?

Oshima 等对大肠杆菌的 *dam* 缺失突变株进行了全局基因调控变化的研究,结果表明,与野生型相比,在 *dam* 缺失突变株中,一些与有氧呼吸、氨基酸代谢、核酸代谢、鞭毛合成、趋化性和 SOS 反应相关的基因表达量发生了变化^[23],但大部分基因的变化幅度较小(小于 2 倍)。也就是说,虽然大肠杆菌中有很多基因的启动子区都存在 GATC 位点,只有少部分在 *dam* 缺失突变株中有显著的表达量变化,所以 Dam 并不是一个全局调控因子^[15]。但是, Dam 可以调控大肠杆菌中特定基因的表达,

如 *trpR*^[24]、*Tn10* 转座子^[25]、*dnaA*^[26]等。研究者通过 SMRT 测序对不同生长阶段(稳定期、衰亡期、长期稳定期)的大肠杆菌基因组的 GATC 甲基化位点分布进行了研究,发现 66 个 GATC 位点的甲基化状态变化是和其他的位点明显不同的,其中有 3 个和唾液酸的转运和代谢有关,说明这些基因是受到 *dam* 甲基化调控的^[27]。Dam 甲基转移酶可以改变某些调节蛋白与 DNA 之间的相互作用^[28],比如, Dam 通过改变 GATC 位点(通常是在启动子区的 RNA 聚合酶结合区)的甲基化状态来增强或抑制转录。上文所述的甲基化介导 DNA 复制就是一例。

霍乱弧菌有 2 条染色体,染色体 I (*oriI*)的复制与大肠杆菌一样,需要 DnaA 起始、SeqA 隔离来保证每次分裂只复制 1 次^[29],而染色体 II 的复制与大肠杆菌不同,*oriII* 的复制起始需要 Dam 而不是 SeqA 的参与^[29]。除了 *dam*,在霍乱弧菌基因组还存在其他 3 个甲基转移酶 *vca0447*、*vc1769* 和 *vchM*。*Vca0447* 是一个孤儿腺嘌呤甲基转移酶;*Vc1769* 是参与 R-M 系统的腺嘌呤甲基转移酶,与大肠杆菌的 HsdM 蛋白同源^[30]; *VchM* 是孤儿胞嘧啶甲基转移酶,可以将 5'-RCCGGY-3'序列中第 1 个胞嘧啶甲基化^[31]。全局基因调控分析表明在 *vchM* 突变株中 79 个基因的表达发生了显著性变化,包括氨基酸代谢、能量代谢和铁原子利用相关基因^[30]。

3.2 CcrM 甲基转移酶调控基因表达

CcrM 甲基转移酶初次发现于新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*)中,其基因组 DNA 甲基化位点为 5'-GANTC-3'中第二位腺嘌呤。新月柄杆菌属于革兰氏阴性 α 变形菌,是研究细胞周期的模式菌株^[32]。*ccrM* 的转录受细胞周期调控,它只在

细胞分裂前期也就是基因组复制后积累^[33]。不同于 Dam 甲基化的是, CcrM 甲基转移酶在 DNA 复制后不会立即将半甲基化的 DNA 甲基化, 复制后和甲基化前的这段时间内, DNA 结合蛋白会和 DNA 再结合^[34]。 *ccrM* 调控基因表达的发现源于 *ccrM* 基因本身, *ccrM* 启动子区 GANTC 位点的甲基化会抑制其自身的表达, 突变了该位点后 *ccrM* 的转录就恢复了正常^[35]。对新月柄杆菌基因组进行 SMRT 测序后发现, 该菌基因组上有 4542 个甲基化的 GANTC 位点, 其中 23%是在基因间隔区, 占基因组的 9%, 这些位于基因间隔区的甲基化位点极有可能参与了基因表达的调控^[8]。研究发现, 在柄杆菌整个细胞周期内有 27 个 *ccrM* 位点一直没有被甲基化, 这些位点位于基因间隔区、编码区和一些关键基因的上游^[8]。全基因组生物信息学分析表明, 在受到 *ccrM* 基因调控的细菌中, 位于基因间隔区的 *ccrM* 位点比较多, 而处于基因内部的 *ccrM* 位点相对较少^[36]。而且, 许多基因的转录受到其启动子区的 *ccrM* 甲基化状态的调控。在柄杆菌的 3932 个基因中, 388 个基因的表达在 *ccrM* 的突变株中出现了显著性变化, 而在这 388 个基因中, 80 个基因的启动子区含有 GANTC 位点^[36]。根据以上信息, 可以推测启动子区 *ccrM* 位点的甲基化状态有可能通过参与 DNA 与蛋白质的互作来调控基因的表达。

GcrA 是新月柄杆菌中部分基因的调控因子。研究表明, GcrA 结合序列的 GANTC 位点含量是普通序列含量的 3 倍^[37], GcrA 可以与 161 个启动子结合, 其中 89 个启动子含有至少一个 GANTC 位点^[37]。后来研究这些启动子区含有 GANTC 位点基因的表达量时发现, 缺失 *gcrA* 或突变 GANTC 位点都会使表达量下降。然而, 虽然 GcrA 可以结

合含有 GANTC 的启动子, 但只有特定一部分含有 GANTC 的启动子可以通过与 RNA 聚合酶相互作用被激活^[37]。Haakonsen 等发现, GcrA 几乎可以与所有启动子区结合, 不论这些区域有没有甲基化位点^[38]。一些细胞循环调控基因的启动子在 -35 和 -10 区以外含有 GANTC 甲基化位点, 这样的基因在细胞周期 GcrA 活性最强的时候表达量却非常小^[39]。综上所述, GcrA 是基于甲基化的转录调控因子, 因此也是细菌中为数不多的表观调控因子之一。

4 DNA 甲基化与细菌致病性

DNA 胞嘧啶甲基化在致病菌致病性相关基因表达方面也发挥了调控作用。DNA 甲基化对细菌毒性的影响首先在鼠伤寒沙门氏菌 (*S. enterica* serovar Typhimurium) 中发现, 敲除 *dam* 以后, 该菌对小鼠的侵染效率明显降低。沙门氏菌的 *dam* 缺失突变株表现出多方面的致病性缺陷, 包括膜不稳定性、蛋白外泌、移动性下降和囊泡外排, 而且对深层组织的侵入能力下降^[40]。在变异链球菌 (*Streptococcus mutans*) 的研究中作者发现, *dam* 的突变会影响致龋性相关基因的表达^[41]。沙门氏菌 *dam* 缺失突变株致病性的降低可能是由于致病性相关基因表达调控异常, 使得在感染过程中需要增加表达量的基因没有得到正确的调控而影响致病性, 比如 *spvB*, 一种可以导致巨噬细胞凋亡的细胞毒素^[42]。另外, *dam* 的过量表达也可以对致病菌的致病性造成影响, 在过量表达 Dam 的假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 中, 一些可以抑制吞噬作用和感染因子的蛋白分泌增加, 减弱其致病性^[43]。研究表明, CcrM 的过量表达会抑制布氏杆菌在巨噬细胞中的生长繁殖, 这

可能由于 CcrM 的过量表达影响了一些适应宿主环境必需基因的表达。

5 甲基化与相变异

相变异是一个控制基因表达开启或关闭的开关, 可以改变一个或多个蛋白在不同细胞里的表达量^[44]。细菌中有很多相变异机制, 比如滑链错配^[45]、位点特异性重组^[46]和 DNA 甲基化^[47]。前两者需要改变基因序列, 而 DNA 甲基化不依赖基因序列的改变, 因此是一种表观调控。根据目前的研究基础, 大肠杆菌中 Pap 相变异和 Ag43 相变异的调控机制已经较为清晰。Pap 是肾盂肾炎相关菌毛基因^[48], Dam 甲基转移酶参与了 Pap 的相变异调控机制, 使得大肠杆菌产生不同的群体, 有的有 Pap 菌毛(开启状态)有的没有(关闭状态)。Pap 操纵子的启动子区含有 6 个亮氨酸应答调控蛋白 (Leucine-responsive regulatory protein, Lrp) 结合位点。位点 1-3 位于 *papB* 基因上游, 并且在位点 2 处有 1 个 GATC 位点(GATC-2); 位点 4-6 位于位点 1-3 的上游, 并且在位点 5 处有 1 个 GATC 位点(GATC-1)^[48]。在 *pap* 处于关闭状态时, GATC-2 在 2 条链上都没有被甲基化, 而 GATC-1 在两条链上都有甲基化, 由于 Lrp 趋向于结合没有甲基化的位点, 所以结合在位点 1-3 以维持关闭状态。当基因组启动复制时, Lrp 从位点 1-3 上脱离, 复制完成时, 位点 1-3 变为半甲基化状态, 此时 PapI 蛋白会帮助 Lrp 结合至位点 4-6 使 *pap* 操纵子变为启动状态^[49]。*ag43* 编码外膜蛋白 Ag43, 它所具有的自聚集能力可以加强生物膜的形成, 也可能也会影响噬菌体的吸附^[50]。*ag43* 的表达取决于一段序列上 3 个 Dam 位点的甲基化状态, 这段序列与氧化压力反应蛋白 (Oxidative stress response

protein, OxyR) 结合区重合。OxyR 是 *ag43* 表达的负调控因子, GATC 位点的甲基化使得 OxyR 不能与之结合, 所以 *ag43* 的表达呈开启状态; 在没有甲基化的情况下, OxyR 结合至调控区, 致使 *ag43* 的表达变为关闭状态^[51]。近期研究发现, 在沙门氏菌中, *opvAB* 操纵子产生的 2 个蛋白 OpvA 和 OpvB 可以改变脂多糖上 O 抗原的长度^[52-53]。*opvAB* 操纵子的表达通过相变异机制调控, 需要 Dam 甲基转移酶和 OxyR 参与^[52-53]。相变异是 DNA 甲基化参与调控特定基因表达的有力证据, 其调控机制的揭示为甲基化调控胞内生理过程的研究提供了佐证并指明了方向。

6 总结与展望

DNA 甲基化修饰通过对胞嘧啶或腺嘌呤进行修饰, 不仅构成了细菌限制修饰的免疫系统来帮助细菌调节自身对外来 DNA 的反应, 还可以在不改变基因序列的前提下对一些基因的表达进行表观调控, 增加了细菌的遗传多样性, 是细菌繁衍和进化过程中极为重要的一部分。大肠杆菌 Dam 甲基转移酶在整个细胞周期都表达, 使其 DNA 处于完全甲基化状态, 但在基因组复制时可以在启动子区产生短时的半甲基化状态, DNA 甲基化状态的不同可以改变 DNA 与蛋白的结合能力从而调控基因的表达。DNA 与蛋白的结合会抑制甲基化酶在该位点的甲基化, 比如 OxyR、Lrp, 因而产生稳定的半甲基化和无甲基化位点。新月柄杆菌中的 CcrM 甲基转移酶只在细胞周期内很短一段时间表达, 在基因组复制的过程中启动子区处于半甲基化状态的时间稍长于大肠杆菌。相变异也是表观遗传中重要的调节机制, 细菌通过改变操纵子上游 GATC 位点甲基化状态来调控操纵子

的表达, 相变异可以帮助细菌更好地适应宿主环境和应对免疫反应。DNA 甲基化有助于理解细菌基因组的三维空间结构和空间结构上远距离的基因蛋白相互作用: 基因组结构捕获(Chromosome conformation capture, 3C)^[54]及其衍生技术是基因组三维结构相关研究的重要手段, 在这种技术中, 首先需要将细胞进行预处理使 DNA 的结构固定, 然后提取 DNA, 再依次进行核酸酶处理、连接酶连接、测序等步骤, 最终得到胞内远距离相互作用的 DNA 序列, 对测序结果进行分析后可以描绘出整个基因组的三维结构。基因组三维结构形成的主要原因之一是 DNA 与蛋白之间频繁的相互作用, 由于 DNA 甲基化的状态会影响其与蛋白之间的相互作用, 对基因组三维结构进行分析时如果将 DNA 甲基化对 DNA 蛋白相互作用的影响考虑在内, 将会有助于剖析高分辨率的基因组三维结构。DNA 磷硫酰化修饰是一种新型的 DNA 骨架生理修饰^[55], 像 DNA 甲基化一样, DNA 磷硫酰化修饰也是一种限制-修饰系统^[56]。但是参与 DNA 磷硫酰化修饰的蛋白 DndABCDE 比甲基化的多, 机制更加复杂, 因此研究进展艰难。根据最新的研究, DNA 甲基化和 DNA 磷硫酰化修饰两种修饰系统能够相互兼容, 其修饰基因能够识别同一序列, 形成杂合修饰 d(G_{PS}^{6m}A)结构; 而两者的限制系统同时都会受到两种修饰系统的制约^[57]。由此可知, DNA 甲基化的研究对 DNA 磷硫酰化修饰的进一步探索有不可替代的推动作用。

但是关于细菌的表观遗传, 还有很多难题亟待解决。比如, 虽然基因组上大部分的甲基转移酶识别位点都被甲基化了, 但是仍有一些位点逃过了甲基转移酶的甲基化, 其机制是什么? 有与之相互作用的蛋白和甲基转移酶相互竞争, 还是

可以形成特定的二级结构? 不被甲基化的位点是否还有其他功能? CcrM 甲基转移酶是否有维持基因组结构的功能? 甲基化与致病菌毒性的关系还只停留在表型层面, 其机制尚未研究清楚。4-胞嘧啶甲基化也在细菌中广泛分布, 胞嘧啶甲基化是否具有除限制-修饰系统以外的功能? 由此可见, 对细菌表观遗传的研究仍处于初级阶段, 未来充满了挑战, 但相信所有问题的答案都可以在今后的研究中一一被揭示。

参 考 文 献

- [1] Egger G, Liang GN, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004, 429(6990): 457-463.
- [2] Bickle TA, Krüger DH. Biology of DNA restriction. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1993, 57(2): 434-450.
- [3] Cokus SJ, Feng SH, Zhang XY, Chen ZG, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE. Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 2008, 452(7184): 215-219.
- [4] Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(5): 1827-1831.
- [5] Lacks S, Greenberg B. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology*, 1977, 114(1): 153-168.
- [6] Flusberg BA, Webster DR, Lee JH, Travers KJ, Olivares EC, Clark TA, Korlach J, Turner SW. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature Methods*, 2010, 7(6): 461-465.
- [7] Fang G, Munera D, Friedman DI, Mandlik A, Chao MC, Banerjee O, Feng ZX, Losic B, Mahajan MC, Jabado OJ, Deikus G, Clark TA, Luong K, Murray IA, Davis BM, Keren-Paz A, Chess A, Roberts RJ, Korlach J, Turner SW, Kumar V, Waldor MK, Schadt EE. Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nature*

- Biotechnology*, 2012, 30(12): 1232–1239.
- [8] Kozdon JB, Melfi MD, Luong K, Clark TA, Boitano M, Wang S, Zhou B, Gonzalez D, Collier J, Turner SW, Korlach J, Shapiro L, McAdams HH. Global methylation state at base-pair resolution of the caulobacter genome throughout the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(48): E4658–E4667.
- [9] Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. Rebase—a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D298–D299.
- [10] Boye E, Løbner-Olesen A, Skarstad K. Limiting DNA replication to once and only once. *EMBO Reports*, 2000, 1(6): 479–483.
- [11] Stancheva I, Koller T, Sogo JM. Asymmetry of dam remethylation on the leading and lagging arms of plasmid replicative intermediates. *The EMBO Journal*, 1999, 18(22): 6542–6551.
- [12] Waldminghaus T, Weigel C, Skarstad K. Replication fork movement and methylation govern seqA binding to the *Escherichia coli* chromosome. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(12): 5465–5476.
- [13] Bach T, Morigen, Skarstad K. The initiator protein dnaA contributes to keeping new origins inactivated by promoting the presence of hemimethylated DNA. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 384(5): 1076–1085.
- [14] Campbell JL, Kleckner N. *E. coli oriC* and the *dnaA* gene promoter are sequestered from *dam* methyltransferase following the passage of the chromosomal replication fork. *Cell*, 1990, 62(5): 967–979.
- [15] Marinus MG, Løbner-Olesen A. DNA methylation. *EcoSal Plus*, 2014, 6(1), doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013.
- [16] Au KG, Welsh K, Modrich P. Initiation of methyl-directed mismatch repair. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(17): 12142–12148.
- [17] Welsh KM, Lu AL, Clark S, Modrich P. Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *muth* gene product. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(32): 15624–15629.
- [18] Lahue RS, Au KG, Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science*, 1989, 245(4914): 160–164.
- [19] Lenhart JS, Pillon MC, Guarné A, Biteen JS, Simmons LA. Mismatch repair in gram-positive bacteria. *Research in Microbiology*, 2016, 167(1): 4–12.
- [20] Guarné A, Charbonnier JB. Insights from a decade of biophysical studies on mutL: Roles in strand discrimination and mismatch removal. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2015, 117(2/3): 149–156.
- [21] Boye E, Løbner-Olesen A, Skarstad K. Timing of chromosomal replication in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1988, 951(2/3): 359–364.
- [22] Marinus MG, Morris NR. Biological function for 6-methyladenine residues in the DNA of *Escherichia coli* K12. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 85(2): 309–322.
- [23] Oshima T, Wada C, Kawagoe Y, Ara T, Maeda M, Masuda Y, Hiraga S, Mori H. Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(3): 673–695.
- [24] Peterson KR, Wertman KF, Mount DW, Marinus MG. Viability of *Escherichia coli* K-12 DNA adenine methylase (*dam*) mutants requires increased expression of specific genes in the SOS regulon. *Molecular and General Genetics MGG*, 1985, 201(1): 14–19.
- [25] Roberts D, Hoopes BC, McClure WR, Kleckner N. Is10 transposition is regulated by DNA adenine methylation. *Cell*, 1985, 43(1): 117–130.
- [26] Braun RE, Wright A. DNA methylation differentially enhances the expression of one of the two *E. coli dnaA* promoters *in vivo* and *in vitro*. *Molecular and General Genetics MGG*, 1986, 202(2): 246–250.
- [27] Westphal LL, Sauvey P, Champion MM, Ehrenreich IM, Finkel SE. Genomewide *dam* methylation in *Escherichia coli* during long-term stationary phase. *mSystems*, 2016, 1(6): e00130–16.
- [28] Polaczek P, Kwan K, Campbell JL. GATC motifs may alter the conformation of DNA depending on sequence context and *n*6-adenine methylation status: Possible implications for DNA-protein recognition. *Molecular and General Genetics MGG*, 1998, 258(5): 488–493.
- [29] Demarre G, Chattoraj DK. DNA adenine methylation is required to replicate both *Vibrio cholerae* chromosomes once per cell cycle. *PLoS Genetics*, 2010, 6(5): e1000939.
- [30] Chao MC, Zhu SJ, Kimura S, Davis BM, Schadt EE, Fang G, Waldor MK. A cytosine methyltransferase modulates the cell envelope stress response in the cholera pathogen. *PLoS Genetics*, 2015, 11(11): e1005666.
- [31] Banerjee S, Chowdhury R. An orphan DNA (cytosine-5-)-methyltransferase in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 2006, 152(4): 1055–1062.
- [32] Skerker JM, Laub MT. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(4): 325–337.
- [33] Wright R, Stephens C, Zweiger G, Shapiro L, Alley MR. Caulobacter lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation. *Genes & Development*, 1996, 10(12): 1532–1542.

- [34] Albu RF, Jurkowski TP, Jeltsch A. The *Caulobacter crescentus* DNA-(adenine-N6)-methyltransferase CcrM methylates DNA in a distributive manner. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(4): 1708–1716.
- [35] Stephens CM, Zweiger G, Shapiro L. Coordinate cell cycle control of a caulobacter DNA methyltransferase and the flagellar genetic hierarchy. *Journal of Bacteriology*, 1995, 177(7): 1662–1669.
- [36] Gonzalez D, Kozdon JB, McAdams HH, Shapiro L, Collier J. The functions of DNA methylation by CcrM in *Caulobacter crescentus*: A global approach. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(6): 3720–3735.
- [37] Fioravanti A, Fumeaux C, Mohapatra SS, Bompard C, Brilli M, Frandi A, Castric V, Villeret V, Viollier PH, Biondi EG. DNA binding of the cell cycle transcriptional regulator gcrA depends on n6-adenosine methylation in *Caulobacter crescentus* and other *Alphaproteobacteria*. *PLoS Genetics*, 2013, 9(5): e1003541.
- [38] Haakonsen DL, Yuan AH, Laub MT. The bacterial cell cycle regulator gcrA is a σ^{70} cofactor that drives gene expression from a subset of methylated promoters. *Genes & Development*, 2015, 29(21): 2272–2286.
- [39] Zhou B, Schrader JM, Kalogeraki VS, Abeliuk E, Dinh CB, Pham JQ, Cui ZZ, Dill DL, McAdams HH, Shapiro L. The global regulatory architecture of transcription during the *Caulobacter* cell cycle. *PLoS Genetics*, 2015, 11(1): e1004831.
- [40] Heusipp G, Falker S, Schmidt MA. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *International Journal of Medical Microbiology*, 2007, 297(1): 1–7.
- [41] Banas JA, Biswas S, Zhu M. Effects of DNA methylation on expression of virulence genes in *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(20): 7236–7242.
- [42] Heithoff DM, Sinsheimer RL, Low DA, Mahan MJ. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science*, 1999, 284(5416): 967–970.
- [43] Falker S, Schmidt MA, Heusipp G. DNA methylation in *Yersinia enterocolitica*: role of the DNA adenine methyltransferase in mismatch repair and regulation of virulence factors. *Microbiology*, 2005, 151(7): 2291–2299.
- [44] Weiser JN, Williams A, Moxon ER. Phase-variable lipopolysaccharide structures enhance the invasive capacity of haemophilus influenzae. *Infection and Immunity*, 1990, 58(10): 3455–3457.
- [45] Jonsson AB, Nyberg G, Normark S. Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in *pilC*, a novel gene for pilus assembly. *The EMBO Journal*, 1991, 10(2): 477–488.
- [46] Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1985, 82(17): 5724–5727.
- [47] Nou X, Skinner B, Braaten B, Blyn L, Hirsch D, Low D. Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: Binding of the papI and the lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. *Molecular Microbiology*, 1993, 7(4): 545–553.
- [48] van der Woude M, Braaten B, Low D. Epigenetic phase variation of the pap operon in *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 1996, 4(1): 5–9.
- [49] Hernday AD, Braaten BA, Low DA. The mechanism by which DNA adenine methylase and papi activate the pap epigenetic switch. *Molecular Cell*, 2003, 12(4): 947–957.
- [50] Hallet B. Playing dr jekyll and mr hyde: Combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2001, 4(5): 570–581.
- [51] Haagmans W, van der Woude M. Phase variation of ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Molecular Microbiology*, 2000, 35(4): 877–887.
- [52] Cota I, Bunk B, Spröer C, Overmann J, König C, Casadesus J. Oxyr-dependent formation of DNA methylation patterns in OpvAB^{off} and OpvAB^{on} cell lineages of salmonella enterica. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(8): 3595–3609.
- [53] Cota I, Blanc-Potard AB, Casadesús J. *Stm2209-stm2208* (*OpvAB*): A phase variation locus of *Salmonella enterica* involved in control of o-antigen chain length. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36863.
- [54] Dekker J. Gene regulation in the third dimension. *Science*, 2008, 319(5871): 1793–1794.
- [55] Wang LR, Chen S, Xu TG, Taghizadeh K, Wishnok JS, Zhou XF, You DL, Deng ZX, Dedon PC. Phosphorothioation of DNA in bacteria by *dnd* genes. *Nature Chemical Biology*, 2007, 3(11): 709–710.
- [56] Xu TG, Yao F, Zhou XF, Deng ZX, You DL. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone s-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(20): 7133–7141.
- [57] Chen C, Wang LR, Chen S, Wu XL, Gu MJ, Chen X, Jiang SS, Wang YF, Deng ZX, Dedon PC, Chen S. Convergence of DNA methylation and phosphorothioation epigenetics in bacterial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(17): 4501–4506.

Epigenetic regulation role of DNA methylation in bacteria

Tong Tong, Lianrong Wang*

School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, Hubei Province, China

Abstract: To accommodate the variable environments, bacterial cells often need to take swift changes on metabolism while keep their genomic sequence unchanged. Thus, epigenetic regulation becomes an important way for bacteria because no genomic alteration is required. As one of the DNA modifications, DNA methylation is the most well-known epigenetic tools among all the organisms. Here in this review, we gave a comprehensive introduction of two orphan methyltransferases Dam (DNA adenine methyltransferase) and CcrM (Cell cycle-regulated methyltransferase), as examples of epigenetic regulation in prokaryotes. We majorly talked about their role in bacterial DNA replication initiation, DNA mismatch repair, regulation of gene expression, virulence and phase variation. Moreover, we also discussed the trends in this field based on a newly-generated technology Chromosome Conformation Capture (3C) and a novel DNA phosphorothioate modification.

Keywords: prokaryote, epigenetics, DNA methylation, regulation of gene expression

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31670086)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-68759931; E-mail: lianrong@whu.edu.cn

Received: 4 April 2017; Revised: 20 May 2017; Published online: 10 July 2017

王连荣, 武汉大学药学院, 楚天学者特聘教授, 博士生导师。2003年毕业于山东大学, 2008年获上海交通大学博士学位。2006–2008攻读博士期间于麻省理工学院学术交流, 2008–2010年在麻省理工学院进行博士后研究。2011年回到武汉大学任教。以第一作者或通讯作者在 *Nature Chemical Biology*、*PNAS*、*Nature Communications*、*Medicinal Research Reviews*、*Analytical Chemistry* 等权威学术期刊上发表论文。获评《环球科学》2007年度“全球十大科学新闻”。入选2017年教育部青年长江, 2014年中组部“万人计划”青年拔尖人才, 2012年获首届国家基金委优秀青年基金的资助。获得全国百篇优秀博士论文和上海市优秀博士论文。2011年获教育部新世纪优秀人才。被美国 *Bioanalysis* 作为 Young Investigator 进行了专门报道。担任科技部973课题组长, 主持国家基金委重点国际合作项目、面上项目等。

