

# ヒストン修飾による DNA メチル化プロファイルの形成

池上 浩太

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用動物科学専攻

平成 16 年度 博士課程 進学

指導教員 塩田邦郎

	目次	頁
緒言		2
第一章		
序論		9
材料と方法		10
結果		13
考察		18
図表		21
第二章		
序論		32
材料と方法		34
結果		38
考察		42
図表		45
第三章		
序論		55
材料と方法		57
結果		58
考察		63
図表		64
総括		73
引用文献		78
論文要旨		85
謝辞		90

## 緒言

ほ乳類のゲノム DNA 中のメチル化修飾はシトシン-グアニン塩基が連続した CpG 配列のシトシン塩基の 5 位に起こり、ゲノム中の CpG 配列の大部分はメチル化されている (Razin & Riggs 1980)。ほ乳類のゲノムの大部分は反復配列によって占められており、これらの大部分は、トランスポソンの転移の抑制の為にメチル化されている (Yoder *et al.*, 1997)。そのため、ほ乳類のゲノム DNA 全体の DNA メチル化レベルは反復配列のメチル化状態を反映する。一方、遺伝子領域はゲノムの 30%程度だが、これらもまたメチル化され得る (Bird 2002; Shiota 2004)。遺伝子領域のランドマークとして用いられているゲノムの特徴的な領域として CpG アイランドがある。CpG アイランドは GC 含量と CpG 配列の出現頻度とが高い通常 200~1,400 塩基対の領域であり、マウスゲノムでは遺伝子領域の約半数に存在する (Gardiner-Garden & Frommer 1987; Cross & Bird 1995; Suzuki *et al.*, 2001; Robinson *et al.*, 2004)。これまで CpG アイランドは正常組織、細胞ではメチル化されない領域と考えられてきたが、1990 年代後半以降、組織特異的にメチル化される CpG アイランドが、マウス、ラット、ヒトゲノム中に多数発見されてきた (Ohgane *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 2001; Ohgane *et al.*, 2002; Shiota *et al.*, 2002; Kremenskoy *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005; Khulan *et al.*, 2006; Eckhardt *et al.*, 2006)。これらの組織特異的にメチル化されるゲノム領域は、「組織特異的メチル化可変領域 = Tissue-specific differentially methylated region (T-DMR)」と命名された (Imamura *et al.*, 2001、図 GI-1)。

近年、T-DMR が CpG 配列の多寡によらず遺伝子領域に存在していることが明らかになってきた (Cho *et al.*, 2001; Nishino *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2005; Sakamoto 2006; Eckhardt *et al.*, 2006)。これらの遺伝子の発現は、T-DMR の DNA メチル化状態と密接に関係している。例えば、*Oct-4* 遺伝子の T-DMR は、発現量の高い胚性幹細胞 (ES 細胞) ではメチル化状態が低く、一方、発現のない栄養膜幹細胞 (TS 細胞) では高い (Hattori *et al.*, 2004b)。また胎生期の雄の生殖巣で一過的に発現する *Sry* 遺伝子では、発現時期特異的に T-DMR のメチル化が消失する (Nishino *et al.*, 2004)。多数の遺伝子の T-DMR について、メチル化が発現の抑制を引き起こすことが報告され (Cho *et al.*, 2001; Hattori *et al.*, 2004b; Nishino *et al.*, 2004; Tomikawa *et al.*, 2006)、遺伝子の組織/発生過程特異的な発現を制御していると考えられている。

これまで 200 を超える T-DMR が発見されているが、これらの高メチル化あるいは低メチル化

状態の模様は「DNA メチル化プロファイル」と呼ばれている(Shiota 2004; 図 GI-1)。例えば、Shiota *et al.* (2002) の報告に基づく、マウス ES 細胞は少なくとも 128 個のメチル化 T-DMR と 119 の非メチル化 T-DMR から構成される DNA メチル化プロファイルを持つ。DNA メチル化プロファイルは T-DMR により構成されているので細胞の種類に固有となり、細胞種に特異的な遺伝子発現プロファイルの分子基盤である。胚発生過程を含む細胞の分化過程では新規のメチル化と脱メチル化が特異的な T-DMR において生じ、プロファイルが変化する。一方、通常の細胞分裂過程においては、DNA 複製に際しても個々の T-DMR の高メチル化あるいは非メチル化状態が維持される。DNA メチル化プロファイルの維持と変化には、個々の T-DMR が区別されて制御されている必要がある。

ここまで述べてきたことから、遺伝子領域の DNA メチル化が配列または領域に特異的に起きていると考えられる。しかし、現在までに哺乳類で同定されている DNA メチル化を触媒する酵素、即ち DNA メチル転移酵素(Dnmt1、Dnmt3a および Dnmt3b)は、*in vitro* において標的 DNA の配列特異性を持たない(Bestor 2000)。従って、DNA の *in vivo* での環境が領域特異的な DNA メチル化の制御に関与していると考えられる。DNA は生体内ではヒストン分子に巻き付いてヌクレオソーム構造をとり、これがさらに折り畳まれてクロマチンを形成する(図 GI-2)。凝集状態のクロマチンには高メチル化 DNA が含まれ、一方、非メチル化 DNA は弛緩したクロマチン中に含まれることが知られている(Bird 2002)。クロマチンの構造はヒストンのアミノ末端における修飾状態とも密接に関係している。ヒストン H3 分子のアミノ末端から 9 番目と 27 番目のリジン残基(H3-K9、H3-K27)のメチル化はセントロメア領域や、ユークロマチン領域の転写不活性な領域などのクロマチンが凝集した領域に見られる(Lachner & Jenuwein 2002)。一方、ヒストン H3 や H4 のアセチル化や H3-K4 のメチル化は転写活性な弛緩状態のクロマチン中に見られる。これらのヒストン修飾は、クロマチン再構築因子群を介してクロマチン構造の変化に寄与する(Li 2002)。例えばメチル化 H3-K9 と K27 はそれぞれ heterochromatin protein 1 (HP1) と polycomb (Pc) との結合を介してクロマチン構造の凝集を引き起こす(Fischle *et al.*, 2003)。

G9a は免疫化学的にユークロマチン領域に局在するヒストンメチル転移酵素(HMT)で、H3-K9 と K27 に対し触媒活性を持つ。ほぼ全ての HMT はメチル転移活性ドメインとして SET ドメインを持ち、約 50 個の SET ドメインタンパク質がマウスゲノム中にコードされていると予見されている(Ensembl, <http://www.ensembl.org/>)。この中で、G9a を含めた 5 つの H3-K9 と K27

のヒストンメチル化を触媒する HMT がこれまでに同定されている(表 GI-1)。H3-K9 のメチル化は、Suv39h(Rea *et al.*, 2000)、ESET/SETDB1(Schultz *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002)、GLP/Ehmt1 (Ogawa *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2005)、G9a/Ehmt2(Tachibana *et al.*, 2001)によって触媒される。Ezh2(Cao *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002)、G9a、GLP は H3-K27 に対しメチル基を転移する活性を持つ。GLP は G9a と一次構造が最も類似した HMT であり、ユークロマチン領域に存在することが免疫染色法により明らかにされている(Tachibana *et al.*, 2005)。遺伝子のほぼ全てはユークロマチン領域に存在するので、G9a と GLP は遺伝子領域におけるヒストンメチル化を触媒していると考えられる。しかし G9a と GLP の標的遺伝子領域はほとんど明らかになっていない。

本研究では、ユークロマチン領域に局在するヒストンメチル化酵素である G9a、GLP が DNA メチル化プロファイルの維持・形成に関与するとの仮説を立てた。仮説が正しければ、G9a、GLP の欠損により特異的なゲノム座位において DNA メチル化状態に異常が生じると考えられる。第一章では G9a 欠損 ES 細胞を用いてこの仮説の検証を行なった。第二章では、GLP 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析により、DNA メチル化を指標としたときの ES 細胞での G9a と GLP の標的領域について解析を行った。第三章では、ES 細胞の分化前後において G9a または GLP が DNA メチル化に関与するゲノム座位を明らかにし、分化に伴う DNA メチル化プロファイルの変化に対する G9a と GLP の役割を解析した。

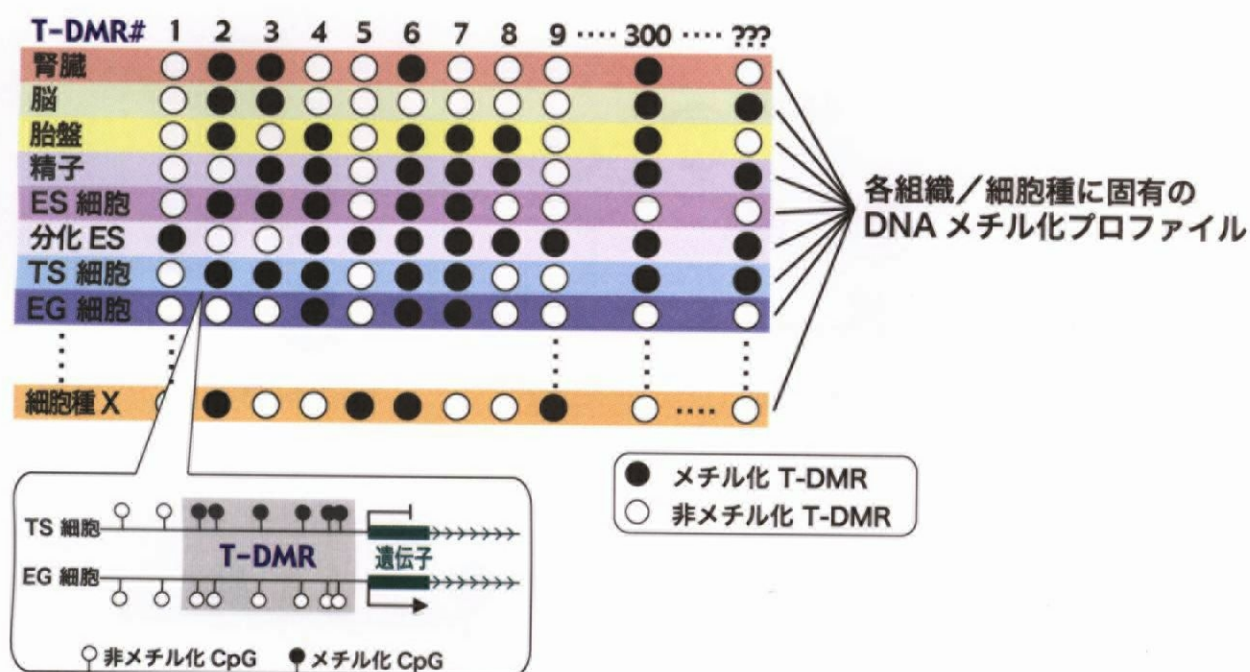


図 GI-1 DNA メチル化プロファイル

DNA メチル化プロファイルは、ゲノムに散在する T-DMR のメチル化状態の模様である。個々の T-DMR の DNA メチル化状態は細胞の種類によって異なるので、DNA メチル化プロファイルも細胞の種類に固有となる。(囲み) T-DMR は主に遺伝子領域に存在し、遺伝子の制御に関与する。

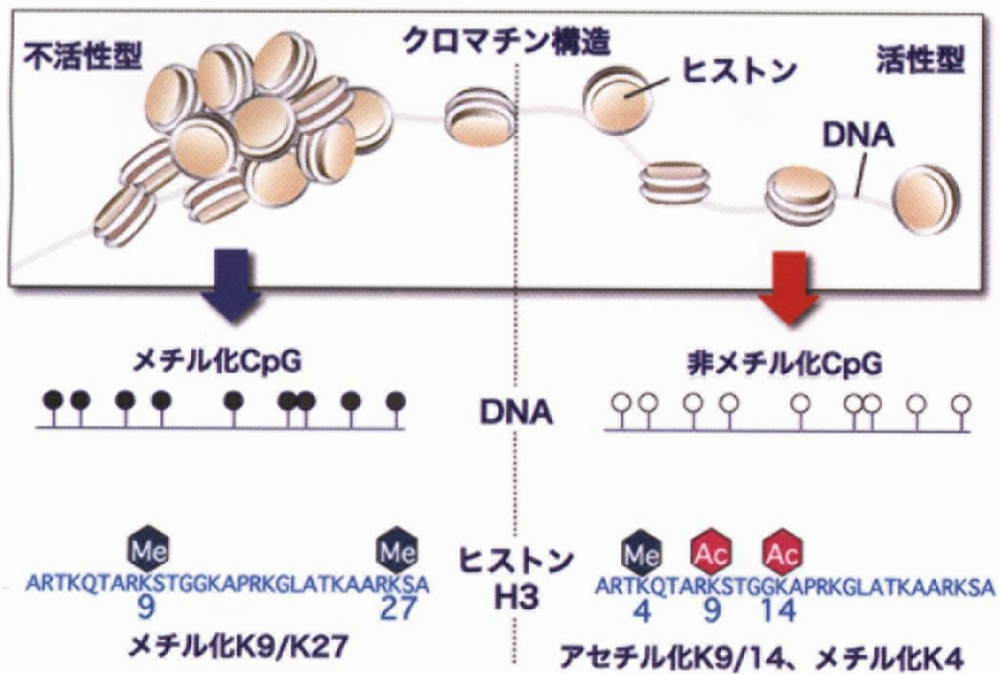


図 GI-2 DNA メチル化とヒストン修飾、クロマチン構造の関係

不活性なゲノム領域は凝縮型のクロマチン構造をとり、DNA メチル化やヒストン H3-K9 および K27 のメチル化が見られる。

表 GI-1 ヒストン H3-K9 または K27 に対するメチル転移酵素

標的アミノ酸	名前	転移メチル 基数	ノックアウトマウス	核内分布
H3-K9	Suv39h1,2 / Suv39H1,2	2、3	一部が E14.5 までに致死	セントロメア近傍
	ESET / SETDB1	2、3	胚性致死	ユークロマチン
	GLP / Ehmt1	1、2	胚性致死	ユークロマチン
	G9a / Ehmt2	1、2	胚性致死	ユークロマチン
H3-K27	Ezh2	2、3	胚性致死	ユークロマチン
	GLP / Ehmt1	1、2	胚性致死	ユークロマチン
	G9a / Ehmt2	1、2	胚性致死	ユークロマチン



## 第一章

### G9a 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析

## 序論

ユークロマチン領域にはゲノム上の遺伝子のほぼ全てが存在し、組織特異的 DNA メチル化可変領域 (T-DMR) を持つ遺伝子が多数存在する。細胞や組織の種類によって特定の T-DMR がメチル化され、固有の DNA メチル化プロファイルが構築されることから、DNA メチル化プロファイルの形成には領域特異的な DNA メチル化制御が関与していると考えられる。しかし、DNA メチル化を触媒する DNA メチル転移酵素 (Dnmt) は *in vitro* で裸の DNA に対しメチル基を転移する標的配列の特異性を持たない。このことから、領域特異的な DNA メチル化に、*in vivo* で DNA と共にクロマチンを構成しているヒストンが関与していると考えられる。

メチル化 DNA が含まれるクロマチン領域のヒストン H3 分子にはリジン 9 と 27 (H3-K9 と K27) のメチル化が見られ、一方、DNA 非メチル化領域にはヒストンのアセチル化が見られる。G9a はヒストン H3-K9 と K27 に対するメチル転移酵素であり (Tachibana *et al.*, 2001)、抗 G9a 抗体を用いた免疫染色によりユークロマチン領域に局在することが示されている (Tachibana *et al.*, 2002)。G9a 欠損 ES 細胞では、ユークロマチン領域全体の H3-K9 メチル化レベルが低下することが免疫染色法によって示されている (Tachibana *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003)。しかし、実際に G9a が機能する標的ゲノム座位はわずかしか知られていない (Tachibana *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2003; Rougeulle *et al.*, 2004; Feldman *et al.*, 2006)。

G9a はリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基に 1 つ (モノメチル) または 2 つ (ジメチル) のメチル基を転移する活性を持つ (Tachibana *et al.*, 2001)。*In vitro* において H3-K9 と K27 の両方にメチル転移活性を示すが、K27 に対する活性の方が低い (Tachibana *et al.*, 2001)。さらに、G9a 欠損細胞において H3-K9 のジメチル化レベルは低下するが、K27 のジメチル化レベルは低下しないことが免疫染色法とウェスタンブロッティング法により示されている (Tachibana *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003)。さらに、Rougeulle *et al.* (2004) は、G9a 欠損下において H3-K9 ジメチル化レベルが低下するが、H3-K27 ジトリメチル化レベルは低下しない座位を報告した。これらのことから、G9a は *in vivo* で H3-K27 のメチル化を触媒しないと考えられてきた。

本章では G9a が DNA メチル化プロファイルの形成に関与するとの仮説を立て、G9a の欠損がゲノムワイドの DNA メチル化状態に影響を与えるか否かを解析する。また、もしそのようなゲノム領域があるならば、G9a が H3-K9 と K27 のどちらを触媒しているかも解析する。

## 材料および方法

### ES 細胞

G9a 欠損 ES 細胞および G9a 欠損 TgES 細胞は、Tachibana *et al.* (2002) によって TT2 ES 細胞株 (野生型 ES 細胞) から樹立された。本研究では樹立から少なくとも 10 世代を超えた細胞株を用いた。これらの細胞株を、15% (v/v) のウシ胎児血清 (FCS) と 1,000 U/ml の白血病抑制因子 (LIF; ESGRO<sup>®</sup>; Chemicon, Temecula, CA) を含む DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 培地中、ゼラチンコートをした培養皿を用いて培養したものを、ES 細胞として本研究で用いた。

### ゲノム DNA の抽出

約  $5 \times 10^7$  個の細胞を 5-10 ml の細胞溶解バッファー (10% SDS、10 mM Tris-HCl、150 mM EDTA、pH 8.0) 中に溶解し、プロテナーゼ K 処理をした。反応液に等量の PCI 溶液 (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1) を加え転倒混和し、3,000 rpm の遠心分離により、粗 DNA 溶液を得た。これを 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液中で 16 時間透析し、その後、氷冷エタノール (99.9%; v/v) を加えて穏和に転倒混和し、DNA を析出させた。これを 100-300  $\mu$ l の TE (10 mM Tris-HCl、0.5% EDTA、pH 8.0) 中に溶解した。

### Restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法

本研究では Not I-Pvu II-Pst I の組み合わせによる RLGS 解析を行なった。それぞれの細胞から抽出したゲノム DNA について、少なくとも、3 回の解析を行なった。方法は Shiota *et al.* (2002) に準じて行なった。まず、約 3  $\mu$ g のゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 (ランドマーク酵素) である Not I で消化し (Nippon gene, Toyama, Japan)、付着末端を [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP と [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP によって放射性ラベルした。次に、Pvu II 制限酵素 (Nippon gene) で消化し、0.9% のアガロースディスクゲル中で約 23 時間、240 V で一次元目の電気泳動を行なった。電気泳動後、ディスクゲル中の DNA を約 1,000 ユニットの Pst I 制限酵素 (Nippon gene) で、約 3 時間消化した。ゲル中の DNA は、5% ポリアクリルアミドゲル中に移行させ、160 V で約 20 時間、二次元目の電気泳動を行なった。ゲルを乾燥させた後、-80℃ で増感板存在下、X 線フィルムと約 2-3 週間密着させ、RLGS 像を得た。

### Virtual-image RLGS (Vi-RLGS) 法とゲノム配列解析

Vi-RLGS 像は、Matsuyama *et al.* (2003) が開発した Vi-RLGS ソフトウェアにより作製した。ゲノム配列は、GenBank の FTP サイト ([ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/M\\_musculus/](ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/M_musculus/)) から入手した MGSCv3\_release3 を用いた。本章で同定した G9a 標的 Not I 部位のゲノム情報は、UCSC ゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/>) と NCBI ゲノムブラウザ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から得た。G9a 標的 Not I 部位の±1キロ塩基対内の CpG アイランドと CpG 高頻度領域の有無は、CpGPlot プログラム (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) によって判断した。ゲノム領域の C+G 含量が 50%以上、含まれる CpG 数の実測頻度と予測頻度の比が 0.6 以上の領域の内、200 塩基対より長い領域を CpG アイランド、200 塩基対以下で 100 塩基以上の領域を CpG 高頻度領域とした。

### DNA メチル化感受性定量的リアルタイム PCR (MS-qPCR) 法

本法は、Hattori *et al.* (2004a) に準じて行なった。まずゲノム DNA を Pst I 制限酵素で消化し、その一部をさらに DNA メチル化感受性制限酵素である Not I によって消化した。それぞれの DNA を精製し、その内、40 ng を鋳型とし、Not I 部位の 5' と 3' 側にそれぞれ作製した対のプライマーを用い、定量的 PCR を行なった。PCR の増幅は、#258 Not I 部位では Tamra で測定し、それ以外は SYBR グリーンで測定した。PCR 反応は、ABI Prism 7000、ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA)、DNA Engine Opticon 2 system (BioRad, Hercules, CA) の機器によって行なった。DNA メチル化レベルは、Not I 消化群中の未消化 DNA 量を Not I 非消化群中の未消化 DNA 量で割った値の百分率として算出し、以下のように計算した。DNA メチル化レベル (%) =  $100 \times (1 + E)(C_{tb} - C_{ta}) \times k^{-1}$ , ここで、E はプライマーの PCR 効率、C<sub>ta</sub> と C<sub>tb</sub> は、それぞれ Not I 消化群と非消化群の DNA を増幅した時の Ct 値、k は、Not I 消化群中の DNA 総量を Not I 非消化群中の DNA 総量で割った、補正值である。DNA の総量は、Not I 部位を含まない領域に対するプライマー (Met、Xist1、5-lipo2) を用いた定量的リアルタイム PCR により求めた。すべての PCR は 3 連で行なった。用いたプライマーは表 1-1 に示した。

### クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

本法は、Hattori *et al.* (2004b) に準じて行なった。回収した ES 細胞および ESd 細胞を 1% (w/v) ホルムアルデヒド、15% (v/v) FCS 含 DMEM 中、20 分間室温でインキュベートしクロマチンの固定を行なった。細胞は細胞溶解液中で、DNA 断片が 200-1,000 塩基対になるように超音波処理した。1 × 10<sup>6</sup> 細胞分のクロマチンを抗ジメチル H3-K9 抗体 (Cat. # 07-212, Lot. # 27563, Upstate, Charlottesville, VA)、または抗ジメチル H3-K27 抗体 (Cat. # 07-452, Lot. # 24461, Upstate)、またはネガティブコントロールとして非免疫ウサギ由来の IgG で免疫沈降した。免疫沈降クロマチンから回収した DNA は領域毎に PCR で増幅し、電気泳動しバンドを得た。バンドの強度は、NIH image 1.61 ソフトウェア (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) で解析し、その相対値を以下の式により求めた。バンドの相対値 = ([IP] - [IgG]) / [Input]、ここで [IP]、[IgG]、[Input] は各 PCR バンドの強さである。PCR に用いたプライマーは表 1-1 に示した。

### バイサルファイトシーケンス法

バイサルファイトシーケンス法は、Hattori *et al.* (2004a) に基づいて行なった。約 2 µg の DNA を 0.3 N NaOH 溶液中で変性させ、これを終濃度 5 M の亜硫酸バイサルファイト (pH 5.0)、同 0.5 mM のヒドロキノン溶液中で一晩、遮光下で反応させた。反応液中の DNA は Wizard DNA Clean-up Kit (Promega, Madison, WI) を用いて精製し、さらに NaOH 処理により反応を完了させた。反応液を酢酸アンモニウムで中性に戻した後、DNA を精製し PCR に用いた。用いたプライマーは表 1-1 に示した。

## 結果

### G9a 欠損 ES 細胞において、多数のゲノム座位が DNA 低メチル化状態となる

RLGS 法では、ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素である Not I で消化し、二次元電気泳動により展開することで、低メチル化状態の Not I 部位に由来する DNA 断片が二次元電気泳動像 (RLGS 像) 上にスポットとして現れる。スポット強度の濃さは対応する Not I 部位の DNA メチル化レベルに対応し、低い DNA メチル化レベルの Not I 部位ほど濃いスポットとして現れる。

RLGS 法を用いて、まず野生型 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した結果、RLGS 像上に約 1,300 の濃いスポットが現れた。このことは、1,300 のスポットに対応する Not I 部位が非メチル化状態であったことを示す。G9a が DNA メチル化に関与しているゲノム座位では、G9a の欠損下で低メチル化状態となると考えられる。G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 解析を行ない低メチル化状態として現れるスポットを探したところ、野生型での 1,300 のスポットに加え、35 のスポットが発見された (図 1-1)。この結果は、35 のスポットに対応する Not I 部位が G9a の欠損により低メチル化状態となったことを示した。

G9a 欠損 ES 細胞で現れた 35 のスポットは近傍のスポットに比べて薄かった (図 1-1B)。さらに、35 のスポット間でもスポットの濃さは異なった。例えば、#291 スポットは #341 スポットに比べて濃かった。これらの結果より、G9a 欠損によっても完全な非メチル化状態とはならず部分的にメチル化されており、さらに低メチル化のレベルはゲノム座位によって異なることが示された。

### Vi-RLGS 法と MS-qPCR 法を用いた G9a 標的座位の同定

Web 上で公開されているマウスのゲノム配列を、コンピュータ上で Not I-Pvu II-Pst I において切断し、さらに画面上で二次元電気泳動を模すことで、Virtual-image RLGS (Vi-RLGS) 像が得られる (Matsuyama *et al.*, 2003; Hattori *et al.*, 2004a)。コンピュータ上での Not I 消化は、DNA メチル化状態に影響されないため、画面の Vi-RLGS 像上には、通常の RLGS で出現可能な約 2,000 の全スポットが仮想スポットとして存在する (図 1-2)。この Vi-RLGS 像と G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 像を比較し、35 のスポットに対応する Vi-RLGS 像の位置から、それぞれ複数個の候補スポットを選択した (図 1-2)。これらから対応する Not I 部位近傍の DNA 配列を取得

し、配列に対応する PCR プライマーを用いた DNA メチル化感受性定量的 PCR 法 (MS-qPCR 法) により、候補 Not I 部位の DNA メチル化状態を解析した。本法では、メチル化感受性制限酵素である Not I によりゲノムを消化し、Not I 部位の上下流の DNA 配列に相補のプライマーで PCR を行なう。従って、Not I 部位がメチル化されていれば消化されないので増幅され、さらに定量的 PCR を用いることで DNA メチル化度合いに応じた増幅が得られる。その結果、野生型 ES 細胞に比べ、G9a 欠損 ES 細胞の方が低いメチル化状態を示す 10 箇所の Not I 部位を、G9a 標的座位として同定することに成功した (表 1-2A)。一方、Vi-RLGS 像から無作為に選んだスポットに対応する Not I 部位の DNA メチル化レベルは、野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞間で差がなかった (表 1-2B)。

G9a 標的座位の DNA メチル化レベルは、標的座位の CpG 配列の多寡に関係なく、野生型 ES 細胞で高く、G9a 欠損 ES 細胞において有意に減少した (図 1-3、表 1-2A)。G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルの平均は、野生型 ES 細胞の DNA メチル化レベルの約半分 (49.6%) であり、G9a 欠損においても部分的にメチル化されていた。これにより RLGS 解析の結果 (図 1-1B) が裏付けられた。G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態は Not I 部位によって異なり、#291Not I 部位では、野生型 ES 細胞の DNA メチル化レベルの 11.8% だったのに対し、#289Not I 部位では 70.5% だった。

G9a 欠損 ES 細胞で見られた DNA の低メチル化が G9a 欠損によるものならば、G9a 欠損 ES 細胞に再び G9a 遺伝子を導入した細胞株 (G9a 欠損 TgES 細胞) では、DNA メチル化レベルが回復しているはずである。MS-qPCR 法を用いた G9a 欠損 TgES 細胞の DNA メチル化解析の結果、#282、#284 および #291 の Not I 部位を除く全てにおいて、DNA メチル化レベルが野生型 ES 細胞のレベルまで復帰した (図 1-3)。#282、#284 および #291 の Not I 部位においては、野生型 ES 細胞のレベルには達さなかったが、欠損 ES 細胞よりも有意に DNA メチル化が高くなった。G9a 欠損 TgES 細胞における 10 箇所の Not I 部位の DNA メチル化レベルは、平均で、野生型 ES 細胞の DNA メチル化レベルの 94.4% に達した。スポット #284 の Not I 部位では 63.1% で DNA メチル化レベルの回復率が低かった。全 10 箇所の Not I 部位の DNA メチル化レベルが G9a 遺伝子の導入で上昇したことにより、これらが、G9a が DNA メチル化に関与している標的座位であると結論づけた。

### G9a の標的 Not I 部位は、ユークロマチン領域に散在する遺伝子領域に位置する

図 1-4 に、G9a 標的 Not I 部位の近傍のゲノム情報を示した。それぞれの Not I 部位は遺伝子が存在する領域に位置し、近傍 100 キロ塩基対内に、1 個(#110、188、289 および 291)から 12 個(#284)の遺伝子が存在した(図 1-4B)。これらの標的座位は、特定のゲノム領域に集中せず、染色体上に散在していた(図 1-4A)。10 箇所の Not I 部位の内、8 箇所の Not I 部位が CpG アイランド(#188)か CpG が高頻度に存在する領域(#110、258、282、284、287、289 および 291)に位置した(表 1-2A)。#284、289 および 290 の Not I 部位は、他の Not I 部位に比べてセントロメアかテロメアに近く存在したが、UCSC ゲノムブラウザによる 2005 年 5 月のゲノム配列情報(mm6、<http://genome.ucsc.edu/>)によると、これらの座位は少なくとも染色体の末端から 2 メガ塩基対分離れていた。これらの結果から、10 箇所の G9a 標的座位がユークロマチン領域の遺伝子領域に散在することが示された。

### G9a 欠損下で DNA の低メチル化状態となるゲノム座位では H3-K9 または K27 の低メチル化が起こる

G9a は H3-K9/K27 メチル転移酵素なので、G9a の真の標的ゲノム座位では、G9a の欠損が H3-K9 メチル化状態の変化を起こすはずである。野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞のクロマチンを抗ジメチル H3-K9 抗体で免疫沈降し、回収した DNA を鋳型とした PCR により、G9a 標的座位が増幅されるか解析した(クロマチン免疫沈降法、ChIP 法)。まず、既知の G9a 標的座位である *Mage-a2* 遺伝子領域(Tachibana *et al.*, 2002)において、野生型 ES 細胞に比べ、G9a 欠損 ES 細胞の方が、H3-K9 メチル化を表す PCR バンドが薄いことを確認した(図 1-5)。本章で同定した 10 箇所の G9a 標的座位の内、#284 を除く 9 箇所において野生型 ES 細胞で H3-K9 メチル化を表す PCR バンドが検出され、#284 座位では非常に弱いバンドが検出された。G9a 欠損 ES 細胞では、#284 を除く全てのゲノム座位において H3-K9 メチル化のレベルが低下していた。以上の結果より、G9a が、これらの 9 箇所のゲノム座位において、H3-K9 のメチル化を触媒していることが示された。

さらに、抗ジメチル H3-K27 抗体を用いた ChIP 法によって H3-K27 メチル化レベルを解析したところ、野生型 ES 細胞では全 10 箇所において、H3-K27 メチル化を表す PCR バンドが検出された(図 1-5)。G9a 欠損 ES 細胞では、#287 と 289 座位を除く全ての G9a 標的座位において



H3-K27 メチル化レベルの低下が見られた。このことにより、G9a がこれらのゲノム座位において H3-K27 メチル化も触媒していることが強く示唆された。

それぞれのゲノム座位における、G9a 欠損による H3-K9 と H3-K27 の脱メチル化レベルは一致しなかった。#284 Not I 部位では、G9a 欠損により H3-K27 メチル化レベルが低下したが、H3-K9 メチル化レベルは低下せず、その逆の変化が#287 と 289 座位では見られた(図 1-5)。これらの ChIP 解析により、全 10 箇所のゲノム座位の H3-K9 と K27 の両方か、もしくは片方のメチル化レベルが、G9a 欠損によって減少することが示された。

#### ヌクレオソーム単位を超えた範囲が G9a 欠損下において DNA 低メチル化状態となる

G9a 欠損細胞における DNA 低メチル化状態はどのくらいの長さまで及ぶのか？ バイサルファイトシーケンス法を用いて、野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞における、#110、291、282 および 284 の Not I 部位の周辺の DNA メチル化状態を解析した(図 1-6)。#110 座位において解析した 468 塩基対内に存在した全 16 個の CpG 配列は、野生型 ES 細胞で高メチル化状態(78-90%)であり、一方 G9a 欠損 ES 細胞では 53-63%まで DNA メチル化レベルが減少した(図 1-6A(a))。#291 座位においても、解析した 442 塩基対中に存在した14個の CpG 配列の全てで G9a 欠損下の方が低メチル化状態を示した(図 1-6A(b))。野生型細胞で H3-K9 メチル化レベルが低く、G9a 欠損によっても変化が見られなかった#284 座位においても、Not I 部位近傍の 559 塩基対内に存在する 30 個の CpG 配列は、野生型細胞に比べ、G9a 欠損細胞で低メチル化状態だった(図 1-6A(c))。さらに、この座位の低メチル化状態は、#284 の Not I 部位から 2.5 キロ塩基対離れた、*Tm7sf2* 遺伝子の上流域においても見られた(図 1-6A(c)、領域 II)。従って、G9a 欠損細胞における DNA 低メチル化領域は、ヌクレオソーム単位を超えた範囲において生じることが示された。

同様の低メチル化領域は#282 の Not I 部位の周辺においても見られた(図 1-6B(a); 領域 I)。この座位ではさらに、Not I 部位の 1、3、4 キロ塩基対下流の領域 II、III、IV においても、G9a 欠損下において低メチル化状態となっていた。これらの領域においては、G9a 欠損により H3-K9 と K27 メチル化レベルも減少した(図 1-6B(b))。図 1-6B(c)に、#282 の周辺 4 キロ塩基対内に位置する領域 I、II、III、IV における DNA メチル化、H3-K9 および H3-K27 メチル化レベルをまとめた。G9a 欠損によって数キロ塩基対の範囲において、H3-K9 と K27 の低メチル化

を伴った、DNA の低メチル化状態が引き起こされていることが示された。

## 考察

CpG アイランドや CpG 配列が密に存在するゲノム領域において、多数の T-DMR が発見されている (Ohgane *et al.*, 1998; Imamura *et al.*, 2001; Ohgane *et al.*, 2002; Shiota *et al.*, 2002; Kremenskoy *et al.*, 2003; Tomikawa *et al.*, 2006)。本章の研究により、G9a が、これらの CpG アイランドや CpG 配列が豊富なゲノム領域に DNA メチル化を誘導することが分かった。DNA メチル転移酵素の欠損 ES 細胞を用いた解析により、ES 細胞において、多数の CpG アイランドや CpG 配列に富む領域の DNA がメチル化されていることが明らかにされている (Hattori *et al.*, 2004a)。本研究において、G9a の欠損により DNA の脱メチル化が生じた Not I 部位は、解析対象とした Not I 部位の内、1.8% (35/2,000 Vi-RLGS スポット) だった。このことは、ES 細胞において DNA メチル化されている CpG アイランドや CpG 配列に富むゲノム座位の内、G9a が特定の座位の DNA メチル化に関与することを示した。マウスのゲノム中には約 22,000 遺伝子が存在し (Waterston *et al.*, 2002)、Not I 部位の 63% はこれらの遺伝子領域に存在する (Fazzari & Greally 2004)。ゲノム中の遺伝子の総数に基づくと、ES 細胞では少なくとも 240 の遺伝子が G9a の標的座位となっていると見積もることができる。

本章の研究により、野生型 ES 細胞でメチル化されていた CpG 配列が、G9a 欠損により低メチル化となることを示した。このことから、既にメチル化されている CpG を細胞分裂後もメチル化された状態に維持すること、即ち DNA メチル化の維持に G9a が寄与することが分かった。さらに G9a 欠損 ES 細胞に G9a 遺伝子を再導入した細胞株では、再び DNA メチル化が起きたことから、非メチル化 CpG がメチル化 CpG になる過程、即ち新規の DNA メチル化にも G9a が関与することが分かった。G9a は DNA に対するメチル基転移活性を持つドメインを有していないので、G9a 自身がシトシンにメチル基を転移することは起こりえず、G9a の関与は H3-K9 と K27 メチル化を介したものだと考えられる。シロイヌナズナでは、K9 と K27 がメチル化されたヒストン H3 分子が、DNA メチル転移酵素である CHROMOMETHYLASE3 (CMT3) と相互作用する (Lindroth *et al.*, 2004)。この相互作用は、CMT3 が持つクロモドメインと呼ばれる、メチル化リジンと相互作用するドメインを必要とするが、これまでにクロモドメインを持つほ乳類の DNA メチル転移酵素は報告されていない。ほ乳類では、メチル化 H3-K9 は heterochromatin protein 1 (HP1) とクロモドメインを介して相互作用し (Lachner *et al.*, 2001)、HP1 は DNA メチル転移酵素

と相互作用することが報告されている (Fuks *et al.*, 2003)。免疫染色により抗 HP1 抗体で強く染まるヘテロクロマチン領域には、G9a が存在しないことが示されているが (Tachibana *et al.*, 2001)、CpG アイランドを有し、組織特異的な発現様式を示す *cyclin E* 遺伝子座 (Geng *et al.*, 2001) などのユークロマチン領域においても HP1 が存在することが示されている (Nielsen *et al.*, 2001)。組織特異的遺伝子である *beta-Globin* や *Pgk-2* 遺伝子座における DNA のメチル化には、クロマチンの構造の変換に関与するクロマチン再構築因子群に属す Lsh が必要であることが報告されている (Dennis *et al.*, 2001)。G9a による DNA メチル化の誘導は、未知のタンパク質を含めた様々な分子を介していると考えられるが、本章の研究による多数の G9a の標的座位同定によって、この分子機構の解明が可能になると考えられる。

*In vitro* の研究では、G9a が H3-K9 と K27 の両方に対しジメチル転移活性を持つことが示されている (Tachibana *et al.*, 2001)。本章の研究により、G9a が *in vivo* でも H3-K27 のジメチル化に関与することを初めて示した。これまでの免疫染色法とウェスタンブロットティング法を用いた実験では、G9a 欠損 ES 細胞においても核全体の H3-K27 のジメチル化のレベルが低下しないことが示されており (Peters *et al.*, 2003)、このことから G9a が *in vivo* では H3-K27 のメチル化に関与しないと考えられてきた。さらに、*Xist* 遺伝子座においても、G9a の欠損が H3-K9 の低メチル化を引き起こすが、H3-K27 のメチル化のレベルは変化させないことが報告されていた (Rougeulle *et al.*, 2004)。一方、G9a が、ユークロマチン領域において、H3-K9 のジメチル化を触媒することは示されてきた (Tachibana *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2003; Xin *et al.*, 2003)。本章の研究は、G9a 欠損が H3-K9 だけでなく H3-K27 のジメチル化レベルを低下させることを多数のゲノム座位において明らかにした。このことから、G9a が、*in vivo* において、H3-K9 と K27 の両方のメチル化を触媒していることが強く示唆された。

本章の定量的な DNA メチル化解析により、多くのゲノム座位における G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルが、野生型 ES 細胞の DNA メチル化レベルの約半分であることを示した。さらに、DNA 低メチル化が生じたゲノム座位では、H3-K9 と K27 のメチル化も完全には消失しなかった。また、H3-K9 と K27 メチル化レベルの低下度合いも個々の領域によって異なった。これらのことを考えると、GLP (Tachibana *et al.*, 2005)、ESET (Schultz *et al.*, 2002)、Ezh2 (Cao *et al.*, 2002) などの G9a 以外の HMT が、ヒストンメチル化により G9a の機能を補い、不完全な DNA 脱メチル化が起きた可能性もある。特に、GLP は G9a と同一のタンパク質複合体中に存

在することが示されている(Ogawa *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Nishio & Walsh 2004)。第二章において、この仮説の検証を行なう。

ゲノム上に散在する T-DMR の DNA メチル化状態によって構成される DNA メチル化プロファイルは、細胞や組織の種類によって固有である(Shiota 2004)。DNA メチル転移酵素 1 (Dnmt1) が主に反復配列の DNA メチル化を制御するのに対し、Dnmt3a と Dnmt3b が主に T-DMR を含む CpG アイランドの DNA メチル化を制御する(Hattori *et al.*, 2004a)。このことから、DNA メチル化プロファイルの形成過程において、最終的に T-DMR の CpG 配列にメチル基を転移する役者が Dnmt3a と Dnmt3b であると考えられる。細胞の分化や発生過程のような DNA メチル化プロファイルが形成される過程では、特異的な T-DMR において DNA メチル化と脱メチル化が生じる。従って、どこの T-DMR に DNA メチル化を起こさせるかを定める別の分子が必要となる。Dnmt3a と Dnmt3b の欠損 ES 細胞を用いた RLGS 解析では 247 のゲノム座位で DNA が低メチル化状態となる(Hattori *et al.*, 2004a)。一方、G9a 欠損により DNA 低メチル化状態となったのは 35 のゲノム座位だった。この結果は、G9a の寄与により、特定のゲノム座位の DNA メチル化が制御されていることを示している。すなわち、G9a は、「どこの T-DMR に DNA メチル化を起こさせるかを定める役者」であると考えられる。

表 1-1 PCR 解析に用いたプライマーとプローブの配列

MS-qPCR 法および ChIP 法で用いたオリゴヌクレオチド			
ゲノム座位	PCR 効率*	センス (5'-3')	アンチセンス (5'-3')
110	1.05	GCAAGCGAAGAAAGATGTACGAAA	AAGGATTGCTTAGGTTGGCTACAT
188	1.05	GGGATCTCCTCTGGGGTCTG	GGGAGGGTCAAGATCATCGTG
258	0.935	CAGGTACACCACATGAGGTCTC	CTCCCAAGGTCGTTCTAAAGAGTA
		Fam-GACACAGCCATCTGGTGGTTTGCGT-Tamra (probe)	
282	1.06	TGGTCTCCATCGTCCCAAG	TTTGCCAGGTTATGAGGATTTGTG
284	1.00	TGGCAGCAGCCTACCAAGAG	CGCACCAGCAGTGAGTTGTC
287	1.07	GTTTGCCCAAGCCGGGAGAG	GGAGCCCAGTGATAATGAGAAGCA
289	0.940	GGCTAATGAACTGACTGCTGAG	CTCGCCATCTGGAGAATAAATCG
290	0.987	GCCTAACTACAAGCAGAGAAGAG	GGAGTACTACTTTGAGCAGCAC
291	0.999	AGCAGGAAAGACACAACACCA	GAGACTGTGAGCCCAAGTAGG
377	1.11	ACCATCCAGATCCTCAGCGG	GCAGCCACCGATCTTCCTTC
Ba01	0.807	TAATGGAAGATGTCAGAGGTTGGT	GGGTGTGTACGTGAGTGCTC
Cc15	0.705	AGTTCCACAGCAGCAGCATT	CTAGATTCCTCTCTTACAGCTCGA
Cd13	0.933	CGCTCACCACGAAGACGAAG	GGACGGCTGTTCTCAGTGAAG
Gb07	0.847	CTTAAACCCCACTCTAACGTGAGA	AAAGACCACTGATCTACCCACAC
Gd23	1.14	GATCTGGAGTCAGTCTCTTCACT	GTGAACATCTTTACTCCATGACCA
Fb25	1.21	GCTCGGCAGGCATTTAAATATCC	CCTTCCCGTAGGAGGCTGAT
He18	0.961	GCGACATGGCATCTAAGGCTAA	ATCCTCCACCTCATCCTCTTCTT
Met	1.03	TGACTATGCGTGGGCTGGA	ACGGAGTAAGTGAGGAGAAGGT
Xist1	1.08	CACACACACCCTGCCCAATC	GGGATTTCGCCTTGATTTGTGGT
5-lipo2	1.06	AGAGTACCTGTAGCTCCACGG	TTCCCACTACCACTAACCATTTC
Mage-a2		TTGGTGGACAGGGAAGCTAGGGGA	CGCTCCAGAACAAAATGGCGCAGA
バイサルファイトシークエンス法に用いたオリゴヌクレオチド			
ゲノム座位	領域	センス (5'-3')	アンチセンス (5'-3')
110		GGAAAGGTTATGAGAAGGATTTTTT	TATAAAAACATCCATCTCCAAACAA
291		GGAGTGGTAGTTTAATTTTGTTGAT	TTCCTTACAACATAAAACACCATCAA
284	I	TTATAGGGAAGGTTGTTTAGGTGTT	CTAACCACATTAACCAACAACCTCAA
	II	TTTTTGTTTAGAATTTGGATGTATT	AAAAAACTACTACTCTTATTCATTA
282	III	GATTTAGTAGAGTTTTTAGGTTTT	ACAATCCTAAAAACCATAACTATTA
	IV	GTAAGTGTTATATGGGATAGTGGT	TACACATCTTTCACATAAACCACAAA

\*MS-qPCR 解析に用いた

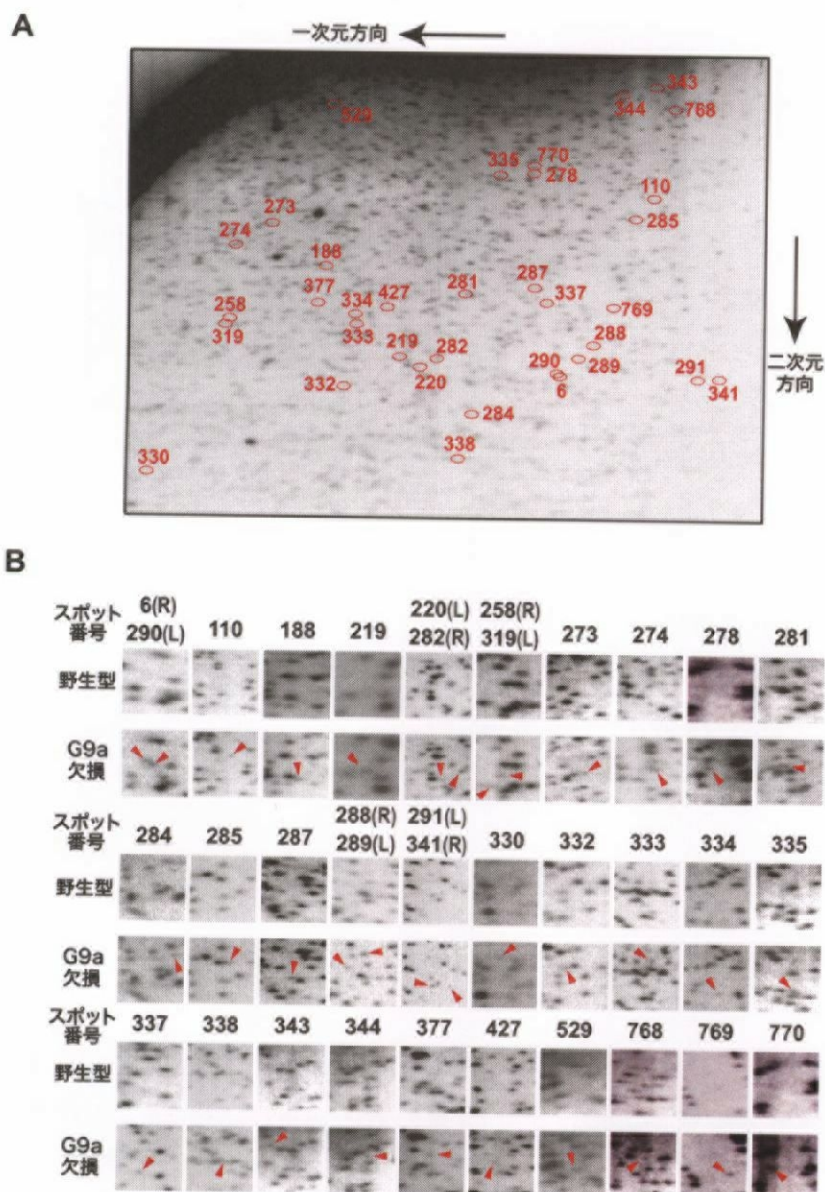


図 1-1 RLGS 法による、G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化解析

(A) G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 像。赤の楕円は、野生型 ES 細胞の RLGS 像には存在しないが、GLP 欠損 ES 細胞の RLGS 像には現れた 35 個のスポットの位置を示す。数字は、スポットの番号。(B) G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 像に出現した 35 のスポットの周辺の RLGS 像(下段)と、同じ領域の野生型 ES 細胞の RLGS 像(上段)。矢頭は 35 個のスポットを指す。スポット番号に付随する R、L の表示は、それぞれ、R、左の矢頭；L、右の矢頭を指す。



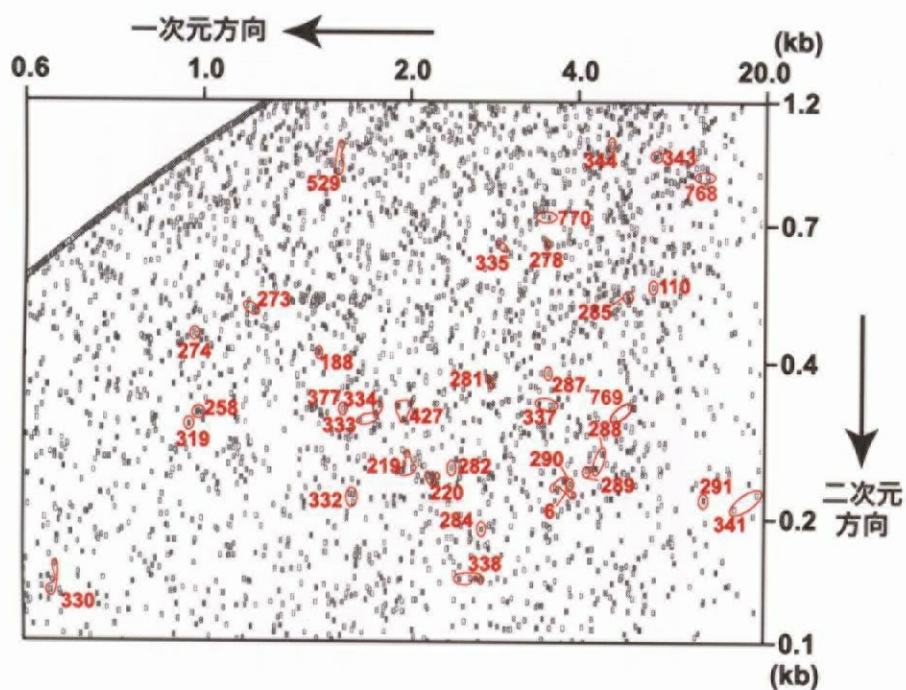


図 1-2 Vi-RLGS 像

線で囲まれている仮想スポットは、G9a 欠損 ES 細胞で出現した 35 個の RLGS スポットに対応する候補スポット。Vi-RLGS 像中の番号は 35 個のスポットの番号である。Vi-RLGS 像の上端と右端には、それぞれ一次元方向と二次元方向の DNA 断片の移動距離をキロ塩基対 (kbp) として表示した。図の Vi-RLGS 像の範囲は、図 1-1 の RLGS 像に対応する範囲である。



表 1-2  
A. G9a 標的座位

スポット番号 #	Not I のゲノム座標*		CpG アイランド / CpG 高頻度 領域†	近傍遺伝子**	遺伝子記号	登録番号	遺伝子との 位置関係††
	染色体	塩基対					
110	15	40,997,112	+	Zinc finger protein, multitype 2	Zfp62	NM_011766	Exn8
188	2	168,434,887	++	Zinc finger protein 64	Zfp64	NM_009564	Int5
258	18	50,298,731	+	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	Tnfai8	NM_134131	Int1
282	13	23,258,681	+	Tripartite motif-containing 38	Trim38	NM_001029935	Ups
284	19	5,859,632	+	Transmembrane 7 superfamily member 2	Tm7sf2	NM_028454	Ups
287	8	71,647,146	+	RIKEN cDNA 1110014N23 gene Cofactor required for Sp1 transcriptional activation, subunit 7	1110014N23Rik Crsp7	XM_283543 NM_027485	Exn5 Exn3
289	14	116,935,487	+	Hypothetical protein 60304.58H05 Citrate lyase beta like	n/a Clybl	NM_177766 NM_029556	Ups Int2
290	4	6,367,965	-	Neutral sphingomyelinase activation associated factor	Nsmaf	NM_010945	Int2
291	11	96,513,323	+	RIKEN cDNA 1700091G21 gene	1700091G21Rik	XM_203404	Int4
377	6	117,613,723	-	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	Cxcl12	NM_013655	Exn4

## B. G9a 非標的座位

Vi-RLGS スポット#	Not I のゲノム座標*		CpG アイランド / CpG 高頻度 領域†	近傍遺伝子**	遺伝子 記号	登録番号	遺伝子と 位置 関係¶	DNA メチル化レベル (%)‡	
	染色体	塩基対						野生型	G9a 欠損
(高メチル化コントロール座位)									
Ba01	6	137,933,486	-	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor	Rerg	NM_181988	Int2	78±10	77±5
Cc15	9	35,730,048	+	no	n/a	n/a	n/a	127±2	117±6
Cd13	10	78,398,276	+	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	Agpat3	NM_053014	Exn2	103±7	96±9
Gb07	X	76,866,637	-	no	n/a	n/a	n/a	100±4	100±3
Gd23	5	114,999,784	-	Citron	Cit	NM_007708	Int6	102±2	89±3
(低メチル化コントロール座位)									
Fb25	10	120,053,137	++	High mobility group AT-hook 2	Hmga2	NM_010441	Int1	0.1±0	0.1±0
Hc18	7	128,077,055	++	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	Bccip	NM_025392	Exn1	0.5±0	0.8±0
				Uroporphyrinogen III synthase	Uros	NM_009479	Ups		

\*ゲノムの配列情報は 2,005 年の 3 月のマウスゲノム配列から取得した。† CpG アイランドと CpG 高頻度領域の定義は材料及び方法の「Vi-RLGS 法とゲノム配列解析」項に記述した。\*\*Not I 部位から±5 キロ塩基対以内の遺伝子を記載した。¶ Exn, エクソン; Int, インترون; Ups, 遺伝子上流域。‡ DNA メチル化レベルは MS-qPCR 法によって解析した。これらのコントロール領域には DNA メチル化レベルに有意な差は見られなかった ( $p>0.01$ , Student's *t* test)。

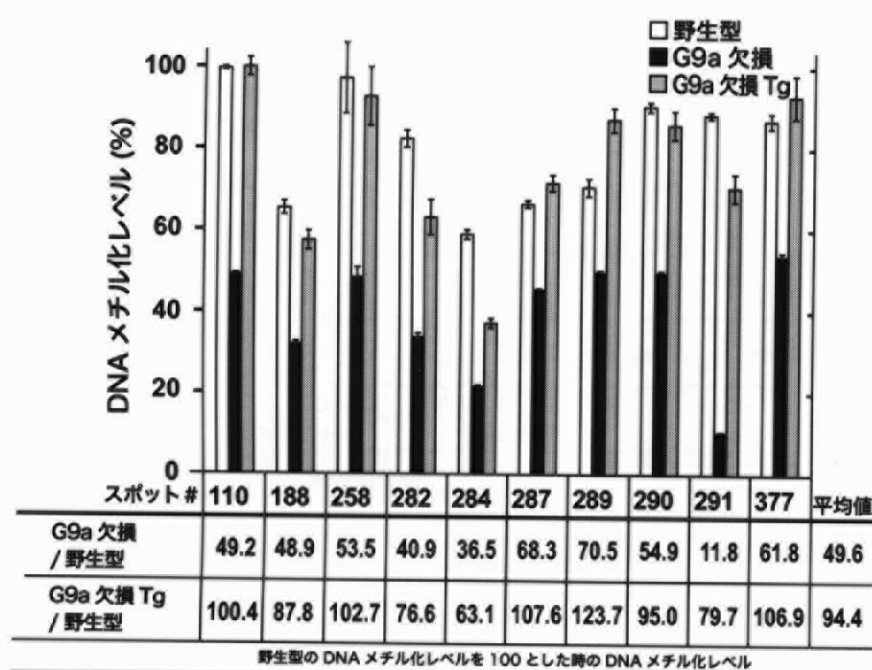


図 1-3 MS-qPCR 法による、10 箇所の G9a 標的 Not I 部位の DNA メチル化レベルの解析  
 (上) 野生型 ES 細胞、G9a 欠損 ES 細胞、G9a 欠損 TgES 細胞の DNA メチル化レベル。  
 グラフは、3 回の独立に行なった PCR の結果の平均  $\pm$  標準誤差を表示した。野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞の間 (#110、188、282、284、287、289、290、291、377、 $p < 0.001$ ; #258、 $p < 0.01$ )、野生型 ES 細胞と G9a 欠損 TgES 細胞の間 (#110、188、284、287、289、290、291、 $p < 0.001$ ; #282、377、 $p < 0.01$ ; #258、 $p < 0.05$ , Student の t 検定) に有意な差が見られた。(下) G9a 欠損による脱メチル化度合い (上段) と、G9a 欠損 TgES 細胞におけるメチル化レベルの復帰度合い (下段) を、野生型 ES 細胞の DNA メチル化レベルを 100 とした時のそれぞれの細胞の DNA メチル化レベルとして示した。

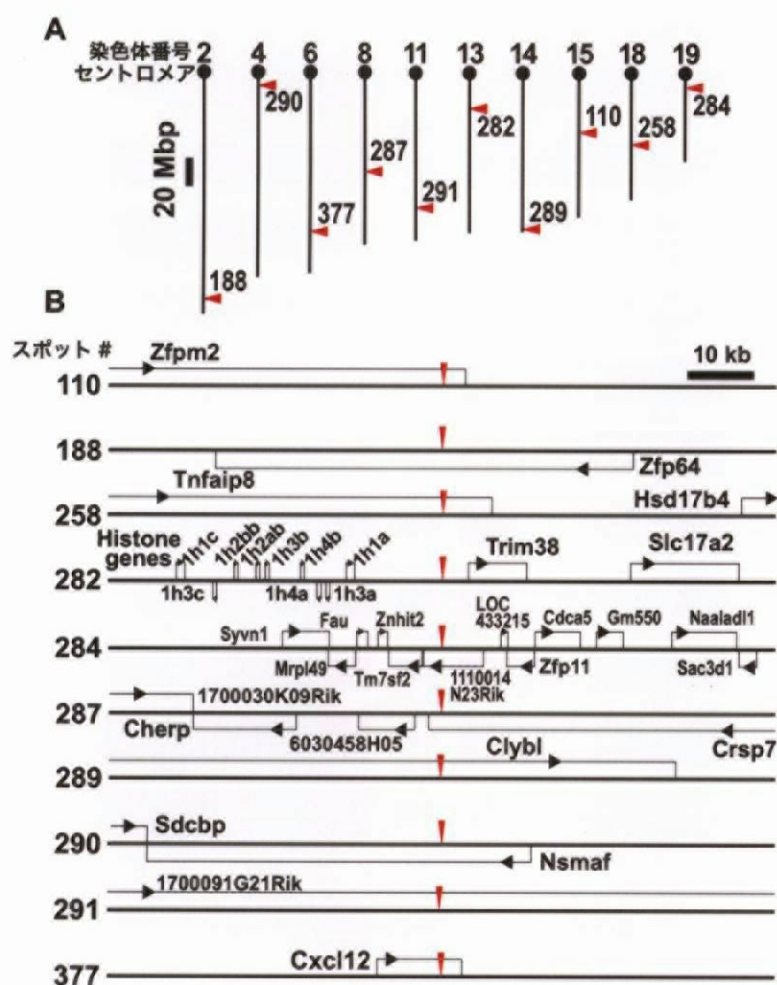


図 1-4 G9a 標的座位の染色体上の位置を示す模式図 (A) と G9a 標的座位の周辺 100 キロ塩基対のゲノム情報の模式図 (B)

赤の矢頭 (A、B) は、Not I 部位を示す。黒の矢印 (B) は、遺伝子の 5' から 3' への方向を示す。Mbp、メガ塩基対。ゲノム情報は、2005 年 3 月のマウスゲノム配列 (mm6) に基づく。

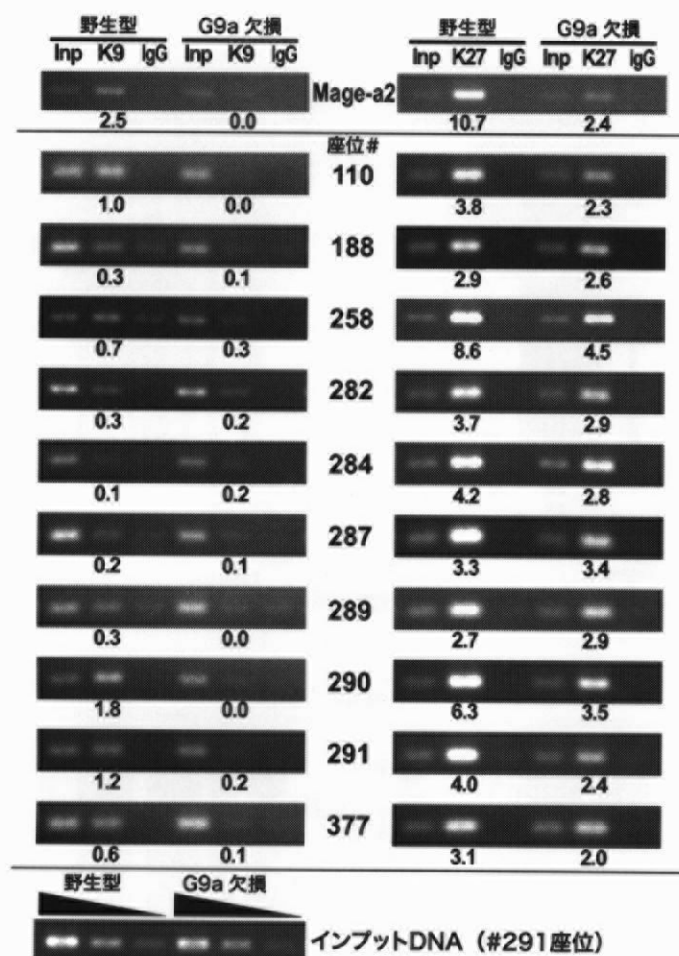


図 1-5 ChIP 法による、G9a 標的座位の H3-K9 と H3-K27 メチル化レベルの解析  
 (左列) H3-K9 メチル化レベル。(右列) H3-K27 メチル化レベル。各細胞から回収したクロマチンを抗ジメチル H3-K9 抗体 (右列、レーン「K9」) あるいは抗ジメチル H3-K27 抗体 (左列、レーン「K27」) もしくは非免疫ウサギ由来の IgG (レーン「IgG」) を用いてクロマチン免疫沈降し、回収した DNA を PCR 法にて増幅した。Mage-a2 遺伝子はコントロールとして用いた既知の G9a 標的座位。PCR のコントロールとして、免疫沈降に用いたクロマチン量の 0.25% から回収した DNA を増幅した (レーン「Input」)。(下段) インプット DNA の段階希釈 (1、1/4、1/16) 産物を PCR により増幅し、半定量 PCR のコントロールとした。#291 座位を代表例として示した。バンドの下の数字は、インプットの PCR バンドの強度に対する、H3-K9 と K27 メチル化のバンドの強度。

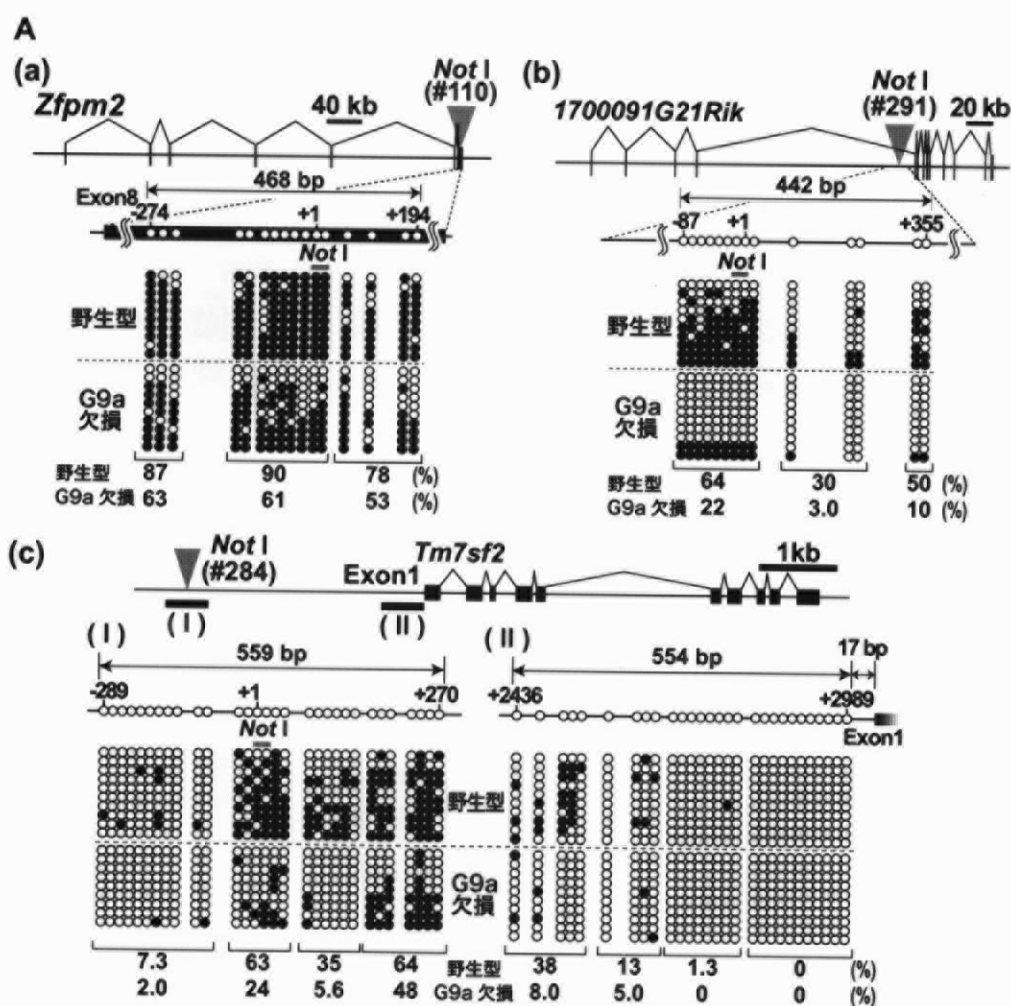


図 1-6 G9a 標的座位の周辺の DNA メチル化と H3-K9 と K27 メチル化状態の解析  
(A) バイサルファイトシーケンス法による、#110 (a)、291 (b)、284 (c) 座位の Not I 部位の周辺の DNA メチル化状態の解析。最上部に、各 G9a 標的座位の遺伝子構造を模式的に示した。上から 2 番目の図に、解析対象の CpG 部位の位置を白丸として、模式的に示した。Not I 配列の 2 番目のシトシン塩基 (GCGGCCGC) を +1 とした。上から 3 番目の図には、野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を示した (黒丸、メチル化 CpG; 白丸、非メチル化 CpG)。大腸菌から得た各クローン DNA 断片の CpG メチル化状態の結果を横一列に並べてある。最下段には、各領域中の総メチル化 CpG の数を総 CpG 数で割った値を百分率で示した。値は各領域の DNA メチル化レベルを示す。(次頁につづく)

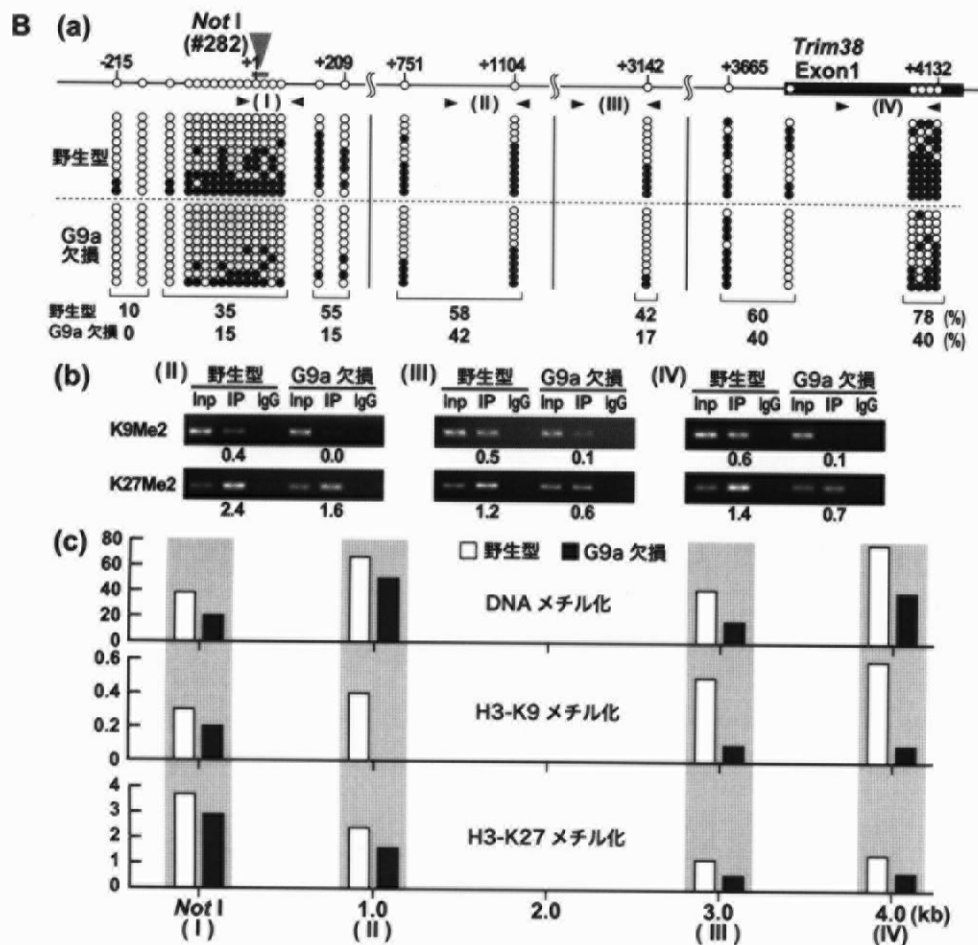


図 1-6 (つづき)

(B) #282 座位の周辺の DNA メチル化、H3-K9 および K27 メチル化状態。(a) バイサルファイトシーケンス法による、DNA メチル化状態の解析。領域 I (-22~+98) には Not I 部位 (+1) が含まれ、領域 II、III、IV はそれぞれ Not I 部位からの距離が、+920~1128、+2887~3148、+3938~4155 塩基対である。矢頭により、これらの領域を示した。(b) ChIP 法による、領域 II、III、IV の H3-K9 および K27 メチル化レベル。バンドの下に数字は、インプットの PCR バンドの強度に対する、H3-K9 または K27 メチル化のバンドの強度。(c) 領域 I、II、III、IV の DNA メチル化、H3-K9 および K27 メチル化レベルのまとめ。(上段) 各領域の CpG 部位における DNA メチル化レベル。(中、下段) 各領域の H3-K9 と K27 メチル化レベル。領域 I のヒストンメチル化レベルは、図 1-5 の結果、領域 II-IV は (b) の結果による。