

## 第二章

### GLP 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析

## 序論

第一章では、ヒストンメチル転移酵素(HMT)である G9a の欠損 ES 細胞において RLGS 法により解析可能な約 2,000 座位の内、35 箇所が低メチル化状態となることを示した。これは 35 箇所の DNA メチル化状態の維持に G9a が関与することを示している。一方、DNA メチル転移酵素の欠損 ES 細胞の RLGS 解析からは、ES 細胞ゲノム上の 247 箇所が DNA メチル化されていることが明らかになっている(Hattori *et al.*, 2004a)。このことは、ES 細胞において G9a に非依存的に DNA メチル化状態が維持されているゲノム座位が存在することを示している。第一章から明らかのように HMT は DNA メチル化に関与しうるので、G9a 以外の HMT が G9a の標的とは異なるゲノム座位の DNA メチル化に関与しているのかも知れない。

個々の G9a 標的座位について DNA メチル化レベルを定量的に解析すると、多くの座位では G9a 欠損下においても部分的に DNA メチル化が残ることが示された(第一章)。この時、H3-K9 と K27 メチル化レベルも完全に消失しなかった。このことから、G9a 標的座位の DNA メチル化レベルの維持にも G9a 以外の HMT が機能しているか、もしくは G9a 欠損を補っている可能性がある。

ほ乳類においては、G9a 以外に 4 種類の HMT が知られている(表 GI-1)。その中で GLP (G9a-like protein; Ehmt1)は、ヒストンメチル転移活性を持つ SET ドメインにおいて G9a との相溶性が 75%と高く、G9a と同様に、H3-K9 と K27 の両方にメチル転移活性を持つ。GLP の欠損マウスは、G9a 欠損マウスと同様に、胚性 12.5 日目までに致死となる(Tachibana *et al.*, 2005)。GLP もユークロマチン領域に局在し、GLP 欠損 ES 細胞ではこの領域のジメチル H3-K9 レベルが顕著に低下することが免疫染色実験により示されている(Tachibana *et al.*, 2005)。このことから、少なくとも ES 細胞では、GLP もユークロマチン領域の H3-K9 メチル化に不可欠である。

これまでに、GLP が G9a と同一の転写抑制複合体中に存在することが報告されている(Ogawa *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003; Nishio & Walsh 2004)。さらに最近、*in vivo* で GLP が SET ドメインを介して G9a と優先的にヘテロ二量体を構成することが示され、これが機能形態であると示唆されている(Tachibana *et al.*, 2005)。これらの報告から、GLP と G9a の標的座位は一致し、互いが機能を補い合うゲノム座位は存在しないと考えられてきた。

ところが、GLPあるいはG9aを2つの異なるタグで標識し強制発現させた系では、GLPもG9a

もそれぞれホモ二量体としても存在しうる (Tachibana *et al.*, 2005)。組織における発現パターンも GLP と G9a とでは異なり、特に ES 細胞では GLP の mRNA 量が G9a に比べ多く、精巣ではその逆である (Tachibana *et al.*, 2005)。さらに、GLP と G9a の推定上のヒストンとの相互作用ドメインである酸性アミノ酸ドメインの構造も、両者で異なる。これらの結果は、GLP と G9a が単独で作用するゲノム座位が存在することを示唆している。

これまでに GLP の標的として同定されたゲノム座位は *Mage-a2* 遺伝子がただ 1 つ知られているのみであり、これは G9a の標的座位でもある (Tachibana *et al.*, 2005)。第一章では G9a の例で示したように、HMT 欠損細胞で DNA メチル化状態が変化する領域をゲノムワイドに探索することで、HMT の標的座位を正確に多数検出できることを証明した。これは、DNA メチル化状態の方がヒストン修飾状態に比べて定性、定量のいずれにおいても検出の正確性が高いことを利用している。これにより、これまでクロマチン免疫沈降法による遺伝子毎の解析や、免疫化学的な核内でのメチル化ヒストンや HMT の局在では明らかにできなかった多数の遺伝子領域を一度に解析することが可能になった。

本章では、GLP 欠損が DNA メチル化状態に影響を及ぼすゲノム座位を、HELP 法と RLGS 法の 2 つのゲノムワイドな手法により解析することで GLP の標的遺伝子領域を同定し (図 2-1A)、G9a の標的領域との比較、解析を行なう。

## 材料および方法

### ES 細胞

GLP 欠損 ES 細胞および GLP・G9a 両欠損 ES 細胞は、Tachibana *et al.* (2005) によって TT2 ES 細胞株 (野生型 ES 細胞) から樹立された。培養方法は第一章の「ES 細胞」の項に準ずる。

### ゲノム DNA の抽出

それぞれ約  $5 \times 10^7$  個の細胞からゲノム DNA を抽出した。操作は第一章の「ゲノム DNA の抽出」の項に準ずる。

### Hpa II tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR (HELP) 法

HELP 法は、DNA メチル化感受性制限酵素 Hpa II によって切断された DNA 断片を増幅し、これをゲノム DNA 配列に相補なプローブを載せたマイクロアレイとハイブリダイゼーションさせ、検出されたシグナル強度により、Hpa II による消化の程度であるメチル化程度を知る方法である (図 2-1B)。本法は Khulan *et al.* (2006) によって開発され、本研究ではそれに従って行なった。HELP 法は、(1) マイクロアレイの設計、(2) Hpa II もしくは Msp I 消化断片の増幅 (LM-PCR)、(3) マイクロアレイ解析 (DNA 断片の標識、マイクロアレイとのハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションシグナルの検出)、(4) ハイブリダイゼーションシグナルの解析、(5) データの統計学的検定と可視化の 5 項目に分けられる。

#### (1) マイクロアレイの設計

マイクロアレイの設計は、マウス 11 番染色体上の #291 Not I の周辺、94,075,823 から 98,950,823 塩基対目 (Mouse March 2005, mm6 ゲノム) までの 5 メガ塩基対について行なった。LM-PCR (下記参照) では、200-2,000 塩基対の長さの DNA 断片が増幅されるため、5 メガ塩基対の内、2 つの Hpa II 認識部位 (CCGG) の間隔が 200-2,000 塩基対である領域 (Hpa II 領域) をプローブの設計の対象とした。各領域に 10 塩基対の間隔で、50 塩基のオリゴヌクレオチドプローブを設計し、その中から、Khulan *et al.* (2006) に準じ、特異性の低いプローブを除去し、領域毎に約 10 個のプローブを選択した。マイクロアレイの作製は、NimbleGen 社 (NimbleGen Systems Inc., Madison, WI) に委託し、Maskless Array Synthesizer (Nuwaysir *et al.*, 2002) を

用いて行なわれた。

## (2) Hpa II もしくは Msp I 消化断片の増幅

ES 細胞から抽出した 3-4  $\mu\text{g}$  のゲノム DNA を、100 U 以上の Hpa II (New England Biolabs, Ipswich, MA) もしくは Msp I (New England Biolabs) により、一晩かけて消化した。Msp I はメチル化非感受性で、消化 DNA 断片は、競合ハイブリダイゼーションの際のコントロールとして用いる。制限酵素消化 DNA 断片はフェノール-クロロホルム抽出法とイソプロパノール沈殿法により回収し、その内、それぞれ 1  $\mu\text{g}$  の DNA 断片を、リンカーとなるセンスオリゴヌクレオチド (JHpaII12) およびアンチセンスオリゴヌクレオチド (JHpaII24、表 2-1) と混合し、55°C で 5 分間インキュベートした後、1 時間かけて反応液を 4°C まで緩やかに冷やし、二本鎖リンカーの形成を行なった。

反応液が 4°C に達した後 T4-DNA リガーゼ (T4 DNA ligase, Invitrogen) を加え、16°C で一晩インキュベートし、DNA 断片とリンカー DNA の結合を行なった。Hpa II 消化サンプル由来の反応液の 1/25 (v/v) もしくは Msp I 消化サンプルの 1/50 (v/v) を、それぞれ別のチューブ内でリンカーのセンスオリゴヌクレオチドと混合し PCR (ligation mediated PCR; LM-PCR) を行なった。LM-PCR は、72°C で 10 分間インキュベートした後、Taq ポリメラーゼ (Taq Polymerase, native, Invitrogen) を加え、[95°C、30 秒間; 72°C、3 分間] のセットを 20 回繰り返す、最後に 72°C で 3 分間インキュベートし、完了した。尚、PCR は各サンプルにつき 3 つのチューブにて行なった。反応液中の増幅 DNA 断片は、カラム (Qiaquick PCR Purification Kit, Qiagen Valencia, CA) を用いて精製し、マイクロアレイ解析に用いた。

## (3) マイクロアレイ解析

DNA 断片の標識、マイクロアレイとのハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションシグナルの検出は、Khulan *et al.* (2006) の方法に準じ、NimbleGen 社に委託した。標識方法は Selzer *et al.* (2005) に準じ、クレノウフラグメントの存在下、5'-Cy3 標識または 5'-Cy5 標識ランダムオリゴヌクレオチドを、それぞれ Hpa II 消化または Msp I 消化 DNA 断片とインキュベートし、Cy3 標識 Hpa II 断片と Cy5 標識 Msp I 断片を得た。ハイブリダイゼーションは、Cy3 断片と Cy5 断片の競合ハイブリダイゼーション法で行ない、それぞれ 532 nm と 635 nm の蛍光シグナルとして検出した。

## (4) ハイブリダイゼーションシグナルの解析

各プローブについて得られた Hpa II シグナル値 (Cy3) を、同プローブについて得られた Msp I シグナル値 (Cy5) で割り、その自然対数値 ( $\log_e \text{Cy3/Cy5}$ , log 比) を求めた。Hpa II 部位が低メチル化であるほど、Hpa II シグナルが大きくなり、従って log 比が大きくなる。各サンプルには、プローブの log 比值から構成されるシグナル分布が存在するが、全サンプルの log 比値の平均値から、基準となるシグナル分布を得た。これをもとに、R (<http://www.r-project.org/>) ソフトウェアを用いて、Qspline 法 (Workman *et al.*, 2002) により各サンプルのシグナル分布を補正した。

#### (5) データの統計学的検定と可視化

個々の Hpa II 領域に対応する約 10 個のプローブから得られた補正後の log 比値について、野生型と各欠損 ES 細胞の間で Welch の *t*-検定により比較した。Welch の *t*-検定では、野生型よりも欠損細胞の log 比値の方が大きい、すなわち野生型に比べて欠損細胞の方が低メチル化か否かを問う、片側検定を行なった。また、Hpa II 領域毎に、約 10 個からのプローブの log 比値の中央値を求め、これを各 Hpa II 領域のシグナル値とした。これを UCSC ゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu/>) のカスタムトラック機能を用いて、ゲノム情報と共にブラウザ上に可視化した。

### バイサルファイトシーケンス法

抽出したゲノム DNA の内、約 2  $\mu\text{g}$  の DNA をバイサルファイト反応に用いた。操作は第一章の「バイサルファイトシーケンス法」の項に準ずる。PCR に用いたプライマーの配列は表 2-1 に示した。

### クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法

各  $1 \times 10^6$  細胞分のクロマチンを免疫沈降に用いた。操作は第一章の「ChIP 法」の項に準ずる。PCR に用いたプライマーの配列は表 2-1 に示した。

### Restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法

RLGS 法は、第一章と同様に Not I-Pvu II-Pst I の組み合わせにより行なった。それぞれの細胞株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。操作は第一章の

「RLGS 法」の項に準ずる。

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

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 SYBR グリーンを用いて定量的 PCR を行なった。操作は第一章の「MS-qPCR 法」の項に準ずる。PCR に用いたプライマーの配列は表 2-1 に示した。

## 結果

### GLP 欠損 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞の両方で DNA 低メチル化状態となるゲノム座位の発見

HELP 法を用いて GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析し、GLP の欠損が DNA メチル化状態に影響を与えるゲノム座位の同定を試みた。HELP 法は、メチル化感受性制限酵素 Hpa II の認識部位 (CCGG) のメチル化状態をゲノム配列に相補なプローブを載せたマイクロアレイ (タイリングアレイ) を用いて解析する方法であり、DNA メチル化状態が変化するゲノム座標を明らかにすることができる。ゲノム上の 200 から 2,000 塩基対以内にある 2 つの Hpa II 部位 (Hpa II 領域) の DNA メチル化状態から 1 つのシグナル値 ( $\log_2 \text{Cy3/Cy5}$ , log 比) が得られ、これが大きいほど低メチル化状態を表す (図 2-1B)。G9a 欠損 ES 細胞で DNA の低メチル化が生じる RLGS スポット #291 の Not I 部位を中心とした 5 メガ塩基対を対象に、3,451 箇所の Hpa II 領域について GLP 欠損 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した。

スポット #291 の Not I 部位の両隣に位置する 2 つの Hpa II 領域は、GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルの方が野生型に比べて有意に低かった ( $p < 10^{-5}$ , Welch 検定; 図 2-2A)。これらが G9a 欠損下でも低メチル化状態であることも HELP 法により確認され、GLP と G9a の両方の標的であることが示された (図 2-2A)。GLP および G9a 欠損 ES 細胞における低メチル化領域は 2 つの Hpa II 領域を合わせた少なくとも 2.3 キロ塩基対程度であり、Not I 部位から上下流に 4 キロ塩基対を超えた領域ではいずれの欠損細胞でも低メチル化状態とはならなかった (図 2-2A)。

バイサルファイトシーケンス法により、Not I 部位の上流 1 キロ塩基対の Hpa II 部位周辺の DNA メチル化状態をさらに検討した (図 2-2B)。Hpa II 部位の DNA メチル化レベルは野生型 ES 細胞では 50% であり、これに対し GLP および G9a 欠損細胞ではそれぞれ 10 および 0% であり、HELP 法の結果が確認された。近傍の 400 塩基対に存在するほぼ全ての CpG 部位でも同様の傾向であった。ChIP 法により、Not I 部位とその上流 1 キロ塩基対の領域における H3-K9 メチル化状態を解析したところ、野生型細胞では両方の領域において H3-K9 ジメチル化を表す PCR バンドが見られた (図 2-1C)。GLP 欠損および G9a 欠損ではこれらの H3-K9 ジメチル化レベルが低下した。従って、この領域において、GLP および G9a 単独欠損細胞では H3-K9 メチル化レベルの低下を伴って、DNA メチル化レベルの低下が生じていることが示され



た。

スポット#291Not I部位周辺の他にも、GLP および G9a 単独欠損細胞の両方で低メチル化状態となる Hpa II 領域が 3 箇所発見された(図 2-3A)。その内の 1 つは、*Abcc3* 遺伝子のイントロンに存在した。周辺の Hpa II 領域は野生型、欠損細胞の両方において高メチル化状態であり、特異的な領域の DNA メチル化レベルが GLP および G9a 単独欠損の両方で低下したことが示された。

### GLP または G9a 単独欠損 ES 細胞のどちらか一方だけで DNA 低メチル化状態となるゲノム座位の発見

HELP 法により、GLP 欠損 ES 細胞だけで低メチル化状態となるゲノム座位も発見された。推定上遺伝子 BC006923 の上流域には GLP 欠損だけで低メチル化状態となる 3 つの Hpa II 領域が近接して存在し、1.4 キロ塩基対に及んだ(図 2-3B)。発現遺伝子配列断片(EST)である AV306258 の上流域にも GLP 欠損だけで低メチル化状態となる Hpa II 領域が発見された(図 2-3B)。どちらの Hpa II 領域においても、近傍は GLP 欠損 ES 細胞でも高メチル化状態であったことから、GLP 欠損だけで特異的な領域の DNA メチル化レベルが低下したことが示された。

一方、G9a 欠損細胞だけで低メチル化状態となる Hpa II 領域も発見された。これらを図 2-3C に示した。*Izky3* 遺伝子のイントロン内に発見された Hpa II 領域も、*Skap1* 遺伝子のイントロン内に発見された Hpa II 領域も、近傍は野生型のみならず G9a 欠損 ES 細胞でも高メチル化状態であり、特異的な領域が G9a の欠損下だけで低メチル化状態となったことが示された。

HELP 法の結果を図 2-4 にまとめた。解析対象とした 5 メガ塩基対の領域に内には、GLP および G9a 単独欠損細胞の両方で DNA メチル化レベルが低下するゲノム座位と、どちらか一方でのみで低メチル化状態となるゲノム座位が散在することが分かった。

### GLP 欠損 ES 細胞では、G9a 欠損 ES 細胞より多くのゲノム座位が低メチル化状態となる

HELP 法で解析対象としたのは既知 G9a 標的座位を中心とした 5 メガ塩基対で、これは全ゲノムの約 0.2% である。RLGS 法を用いて解析対象をゲノム全体に拡大し、GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した(図 2-1A)。RLGS 法では、二次元泳動像上のスポットの有無がこれに対応する Not I 部位のそれぞれ低、高メチル化状態を表す。GLP 欠損 ES 細胞の RLGS

像には、野生型 ES 細胞の RLGS 像(第一章)には存在しない 46 個のスポット(GL01-GL46)が出現し(図 2-5A、B)、野生型 ES 細胞では高メチル化状態の 46 箇所の Not I 部位が、GLP 欠損下では低メチル化状態であることを示した。これに対し、G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 解析では 35 箇所が低メチル化状態となる(第一章、図 1-1)。このことから、GLP と G9a が DNA メチル化に関与する標的座位は完全に一致せず、数は GLP の方が多いことが示された。

### **GLP 欠損 ES 細胞で低メチル化状態となるゲノム座位の一部が G9a 欠損 ES 細胞でのそれと一致する**

GLP 欠損 ES 細胞の RLGS 解析結果を、G9a 欠損細胞の結果(第一章)と比較した時に予想されるスポットの出現パターンを図 2-5C に示した。野生型 ES 細胞の RLGS 像上に検出されないが、GLP 欠損および G9a 欠損 ES 細胞の両方で出現するスポットは、どちらの欠損下でも低メチル化状態となるゲノム座位に対応する。一方、どちらか一方でのみ現れるスポットは、どちらか一方のみの欠損で低メチル化状態となる座位に対応する。

GLP 欠損 ES 細胞において現れた 46 個のスポットの内、G9a 欠損においても出現するスポットは GL07、GL30、GL34 および GL36 を含む 16 個のスポットであった(図 2-5D(a))。それ以外の GL05、GL13、GL16 および GL31 を含む 30 個は、GLP 欠損細胞だけで出現した(図 2-5D(b))。一方、G9a 欠損でのみ出現したスポットは #273 と #278 を含む 17 個であった(図 2-5D(c))。これらの結果より、GLP 欠損 ES 細胞で低メチル化状態となるゲノム座位の一部が G9a 欠損 ES 細胞でのそれと一致し、これに対し、どちらか一方の欠損細胞だけで低メチル化状態となるゲノム座位の方が多いことが示された(図 2-5E、F)。

### **GLP・G9a 両欠損細胞で低メチル化状態となるゲノム座位は全て単独欠損で低メチル化状態となる座位に含まれる**

GLP と G9a が DNA メチル化に対する機能を互いに補完するゲノム座位があるならば、そこでは両方の欠損により初めて低メチル化状態になると予想される。RLGS 法により、GLP・G9a 両欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した。両欠損細胞では野生型には存在しない 45 個(DK01~45)のスポットが出現した(図 2-6A)。これらの全てのスポットが単独欠損により出現したスポットと共通し、新たなスポットは検出されなかった(図 2-6B、C)。従って、GLP と G9a が

DNA メチル化に対する機能を互いに補完するゲノム座位は存在しないことが示唆された。

これらとは反対に、単独欠損細胞では出現するが、両欠損 ES 細胞では出現しないスポットが発見された(図 2-6C)。両方の単独欠損細胞で出現したスポットの 1 個(GL38)と GLP 欠損細胞だけで出現したスポットの 4 個(GL11、GL21、GL22 および GL25)は両欠損細胞では検出されなかった。さらに G9a 欠損細胞だけで出現したスポットには 13 個(#6、188、273、278、287、319、330、332、233、334、335、337 および 377)と多く見られた(図 2-6B)。両欠損下において、G9a と GLP の機能が補完されていると示唆された。

#### 両欠損下でも単独欠損以上の DNA メチル化レベルの低下は生じない

GLP および G9a の両方の単独欠損 ES 細胞で低メチル化状態となるゲノム座位では、両欠損によりさらに DNA メチル化レベルが低下するかどうか、DNA メチル化感受性定量的リアルタイム PCR(MS-qPCR)法を用いて DNA メチル化レベルを解析した(図 2-7)。GLP および G9a 単独欠損 ES 細胞の両方の RLGS 像に出現したスポット DK18、DK22、DK43、DK44 および DK45 の Not I 部位の DNA メチル化レベルが、それぞれの単独欠損下で低下することを確認した(図 2-7A)。G9a 欠損 ES 細胞でも DNA メチル化レベルが低下しなかったコントロール座位である Cd13、Gb07 および Gd23(第一章)では、GLP 欠損下でも低メチル化状態とならず、これは両欠損下でも同様だった(図 2-7B)。DK18、DK22、DK43、DK44 および DK45 における両欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルを解析したところ、単独欠損細胞の DNA メチル化レベルとほぼ同レベルだった。特に、DK22、DK43、DK44 および DK45 では両欠損下においても 20-40%程度の DNA メチル化レベルが維持されており、両欠損でも単独欠損以上の DNA メチル化レベルの低下が生じず、部分的に DNA メチル化が残ることが示された。この結果より、GLP および G9a 単独欠損 ES 細胞における部分的な DNA メチル化レベルの維持が、それぞれ G9a または GLP の機能によるものではないと示唆された。

## 考察

本章では、GLP 欠損 ES 細胞を用いた RLGS 解析により、GLP が DNA メチル化に関与する 46 箇所の標的ゲノム座位を明らかにした。このうち第一章で明らかにした G9a の標的座位と一致するものは 16 箇所であった。このことは、GLP と G9a の両方が DNA メチル化に関与するゲノム座位と、どちらか一方のみが関与する座位が存在することを示している。これまで、GLP は G9a と優先的にヘテロ二量体を形成し、標的座位は同一であると考えられてきたが、GLP は G9a とは異なる固有の標的座位のセットを持っていることが明らかとなった。

核抽出物の解析から、GLP が G9a と優先的にヘテロ二量体を形成していることが示されていた (Tachibana *et al.*, 2005)。GLP と G9a がヘテロ二量体として機能している領域では、GLP と G9a のどちらの欠損においても H3-K9 もしくは K27 メチル化レベルの低下が生じると考えられる。これまで、そのような遺伝子として *Mage-a2* 遺伝子が知られていたが、これは唯一の例であった (Tachibana *et al.*, 2005)。ヘテロ二量体として機能している領域では、GLP と G9a のどちらの欠損細胞において、H3-K9/27 メチル化レベルだけでなく、DNA メチル化レベルも低下する可能性がある。本研究では、RLGS 解析によりそのようなゲノム座位を 16 箇所発見し、この結果は HELP 解析によっても確認された。このことから、GLP と G9a がヘテロ二量体として機能する領域がゲノムワイドに存在することが示唆された。一方、GLP と G9a はそれぞれホモ二量体としても存在しうるが、この形態で機能しているとされるゲノム座位は今まで 1 つも報告されていなかった。そのようなゲノム座位では、どちらか一方の欠損細胞において DNA メチル化レベルが低下する可能性がある。本章では、RLGS 解析によって GLP 欠損もしくは G9a 欠損 ES 細胞だけで DNA 低メチル化状態となるゲノム座位も存在することを明らかにした。これまで、ホモ二量体よりもヘテロ二量体の方が優先的に形成されると示唆されてきたが、本章で行なった RLGS 解析でも HELP 解析でも、どちらか一方の欠損細胞で DNA 低メチル化状態となるゲノム座位の方が多く検出された。GLP もしくは G9a がヒストン修飾だけでなく、DNA メチル化にも影響を与えているゲノム座位では、それぞれが優先的にホモ二量体として機能しているのかも知れない。本研究は、GLP と G9a がヘテロ二量体としてもホモ二量体としても機能していることを強く示唆した。

GLP と G9a の両方が DNA メチル化に関与しているゲノム座位では、それぞれの欠損により

DNA メチル化レベルが野生型の約半分に低下した。このことから、これらのゲノム座位では両方の存在により野生型の完全な DNA メチル化レベルが維持され、GLP もしくは G9a 単独欠損下では、残ったもう一方の酵素だけで残りの DNA メチル化レベルが維持されていると予測した。しかし、両方を欠損させた細胞においても部分的に DNA メチル化レベルが維持されていることから、これらの座位では GLP もしくは G9a 単独では DNA メチル化に関与せず、両方が存在することで初めて DNA メチル化に関与するようになることと示唆された。上述のように、GLP と G9a の両方が DNA メチル化に関与しているゲノム座位は、両者がヘテロ二量体として機能している可能性が高い。本研究から、GLP と G9a がヘテロ二量体として存在していても相乗的な DNA メチル化を引き起こさないことが示唆された。

GLP もしくは G9a の単独欠損下では低メチル化状態となるが、両欠損下では高メチル化状態が維持される領域が存在した。この結果は、GLP と G9a だけを考えた場合には論理的に解釈することが難しい。しかし、上述の GLP 欠損、G9a 欠損および両欠損のいずれによっても完全に脱メチル化されない領域が存在したと併せて考えると、別の因子もこれらの領域の DNA メチル化維持に関与していることが示唆される。Dnmt 自体は裸の DNA に対して領域特異性を持たないので、GLP と G9a 以外のヒストンメチル転移酵素が関与している可能性が高い。SUV39H1 が Dnmt1 および Dnmt3a と相互作用することが示され (Fuks *et al.*, 2003)、SETDB1 が DNMT3A と (Li *et al.*, 2006)、EZH2 が DNMT1、3A および 3B と相互作用する (Vire *et al.*, 2006) ことが報告された。GLP の標的座位が G9a のそれと一部重なることを考えると、GLP と G9a 以外の HMT も一部の GLP/G9a の標的座位において DNA メチル化に関与している可能性がある。

本章では二種類の異なる解析法である RLGS 法と HELP 法を用いて、いずれの場合にも GLP が DNA メチル化に関与するゲノム座位の方が G9a のそれよりも多く発見された。RLGS 法で解析した Not I 部位は、マウスゲノムでは 67% が CpG アイランドに属し (Fazzari & Greally 2004)、主に CpG 配列の含量の高いゲノム領域に存在する。一方、Hpa II 部位はユニーク配列内に位置するものでも 14% のみが CpG アイランドに位置し、HELP 法ではユニーク配列内の HpaII 部位を解析対象としているので、本法は RLGS 法よりも CpG 含量の低い領域のメチル化状態を反映する。これらの 2 つの方法による解析から、CpG 含量の多寡に関わらずゲノム全域において GLP が DNA メチル化に関与するゲノム座位の方が多いと示唆された。このことは、

ES 細胞では、G9a に比べ、GLP の発現量の方が多い(Tachibana *et al.*, 2005)ことに起因するのかもしれない。

本章で得られた結果は、いずれもこれまでに明らかにされたわずかな遺伝子領域や抗体を用いたジメチル H3-K9 の核内局在だけでは明らかにすることができなかったものである。本章は、DNA メチル化・ヒストン修飾を含むエピジェネティック修飾の中で、定性・定量的により正確に変化を検出することが可能な DNA メチル化を指標とした。これによって、G9a と相同性が高くヘテロ二量体を形成する GLP が G9a とは異なる固有の標的座位のセットを持っていることが明らかとなった。このことから、GLP/G9a と相同性の高くない他のヒストンメチル転移酵素(HMT)もまた固有の標的座位を持つと考えられる。HMT がそれぞれ固有の標的座位のセットで DNA メチル化に関与することで、DNA メチル化状態が遺伝子ごとに異なる機構で制御され、DNA メチル化プロファイルが維持されていると考えられる。

表 2-1 解析に用いたオリゴヌクレオチド

HELP 法で用いたリンカーおよびプライマー		
名称	配列	
JHpaII12	CGGCTGTTTCATG	
JHpaII24	CGACGTCGACTATCCATGAACAGC	
バイサルファイトシーケンス法で用いたプライマー		
ゲノム座位	センス (5'-3')	アンチセンス (5'-3')
#291Not I 上流	GTTTATAGTTTTTGGAAGTTTAGAT	CCTCCTACTTCCAATCAAATACTAA
ChIP 法で用いたプライマー		
ゲノム座位	センス (5'-3')	アンチセンス (5'-3')
#291NotI 上流	GTGCGCAGAGATGCTTGCAATTC	AGGCCTACCATTACTTCCTCAG
#291NotI 近傍	AGCAGGAAAGACACAACACCA	GAGACTGTGAGCCCAAGTAGG
MS-qPCR 法で用いたプライマー		
ゲノム座位	E*    センス (5'-3')	アンチセンス (5'-3')
DK22/282	1.06    TGGTCTCCATCGTCCCCAAG	TTTGCCAGGTTATGAGGATTTGTG
DK44/284	1.00    TGGCAGCAGCCTACCAAGAG	CGCACCAGCAGTGAGTTGTC
DK45/289	0.94    GGCTAATGAACTGACTGCTGAG	CTCGCCATCTGGAGAATAAATCG
DK43/290	0.99    GCCTAACTACAAGCAGAGAAGAG	GGAGTACTACTTTGAGCAGCAC
DK18/291	1.00    AGCAGGAAAGACACAACACCA	GAGACTGTGAGCCCAAGTAGG
Cd13	0.93    CGCTCACCACGAAGACGAAG	GGACGGCTGTTCTCAGTGAAG
Gb07	0.85    CTTAAACCCCACTCTAACGTGAGA	AAAGACCACTGATCTACCCACAC
Gd23	1.14    GATCTGGAGTCAGTCTCTTCACT	GTGAACATCTTTACTCCATGACCA
*MS-qPCR 解析に用いた PCR 効率		

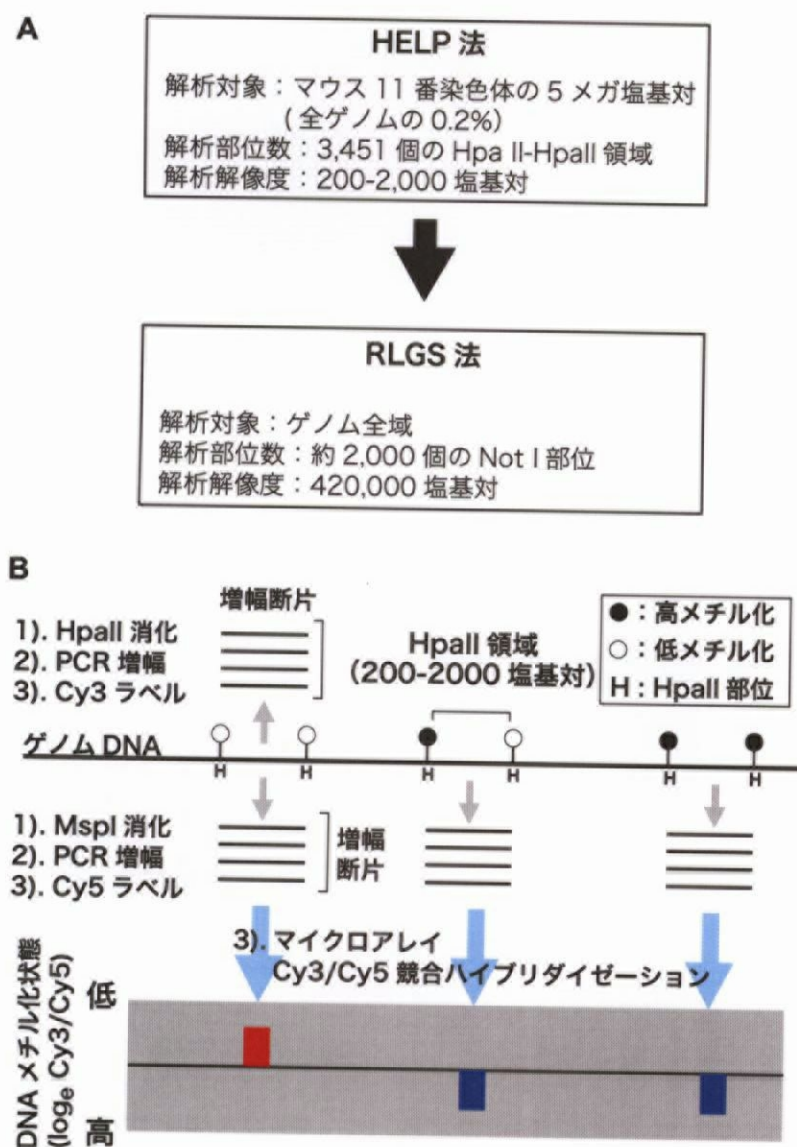


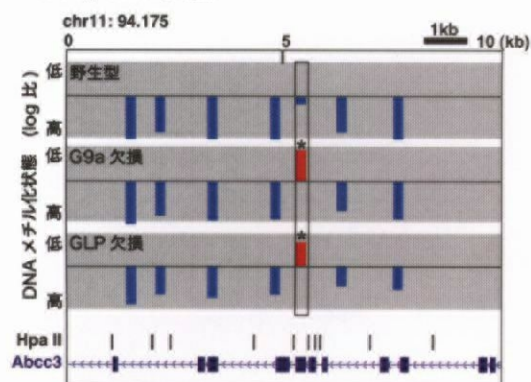
図 2-1 本章の解析の流れ

(A) 本章では、GLP および G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を、HELP 法を用いて 5 メガ塩基対について高解像度で解析した後、RLGS 法を用いて解析対象をゲノム全体に拡大した。(B) HELP 法の手順。メチル化感受性制限酵素 Hpa II の認識部位が 2 つ連続して低メチル化状態の時に切り出される DNA 断片を PCR で増幅し、Cy3 によりラベル後、マイクロアレイへのハイブリダイゼーションに供する。この時、コントロールとしてメチル化非感受性 Msp I を使い、Cy5 によりラベルし、Cy3 断片と競合的にハイブリダイゼーションを行なう。その結果、log<sub>2</sub>Cy3/Cy5 値 (log 比) が正の値の時は Hpa II 部位が低メチル化状態 (赤棒) であることを表し、log 比が負の値の時は高メチル化状態 (青棒) であることを示す。

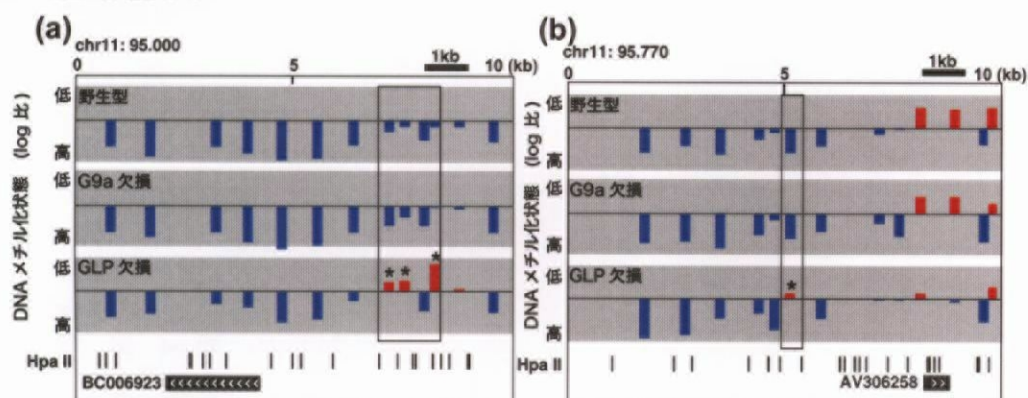




## A G9a/GLP 共通



## B GLP 欠損のみ



## C G9a 欠損のみ

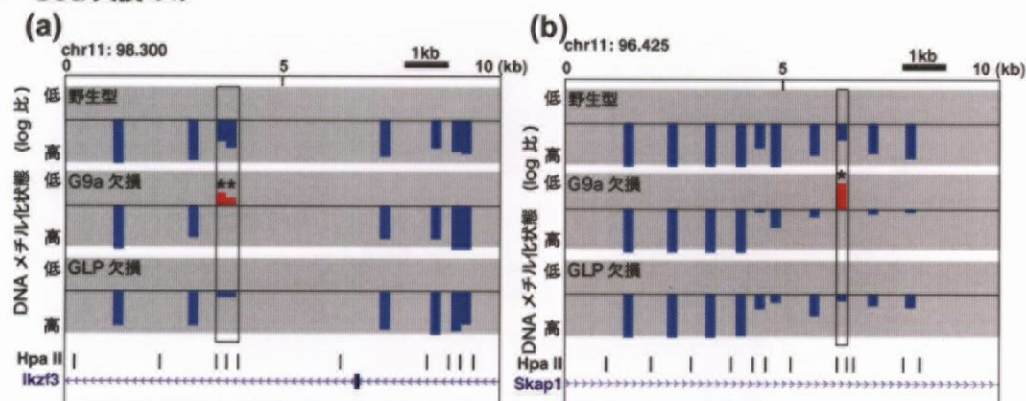


図 2-3 HELP 法によって発見された、GLP 欠損および G9a 欠損 ES 細胞において DNA 低メチル化状態のゲノム座位

(A) どちらの欠損 ES 細胞でも低メチル化状態のゲノム座位。(B) GLP 欠損下だけ、あるいは (C) G9a 欠損下だけで低メチル化状態のゲノム座位。縦軸は log 比の -1 から +1 までの範囲。\* は野生型 ES 細胞が高メチル化状態であり、それに対して欠損細胞が有意に ( $p < 10^{-5}$ , Welch の検定) 低メチル化状態である Hpa II 領域に付した。最下部に遺伝子の位置を示した。

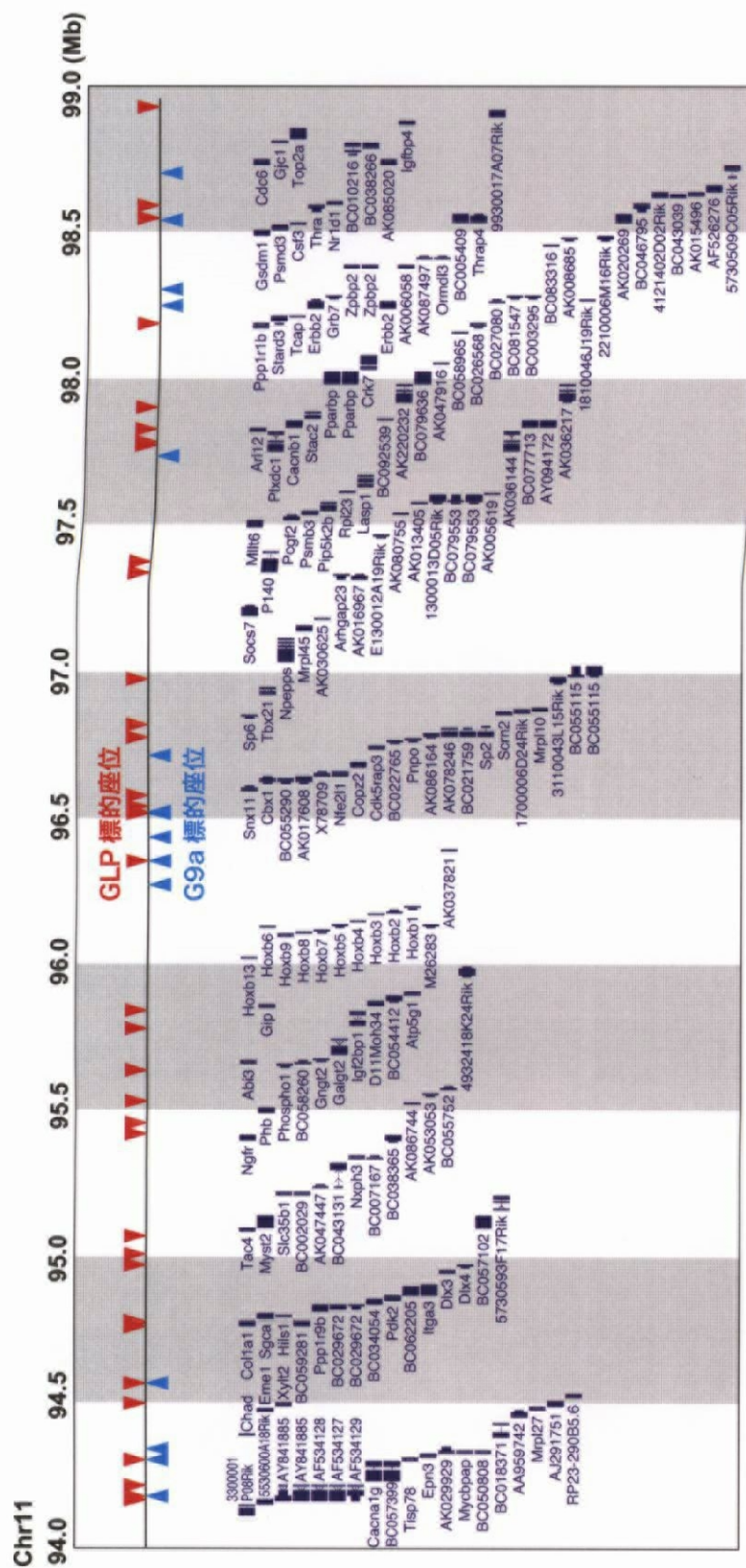
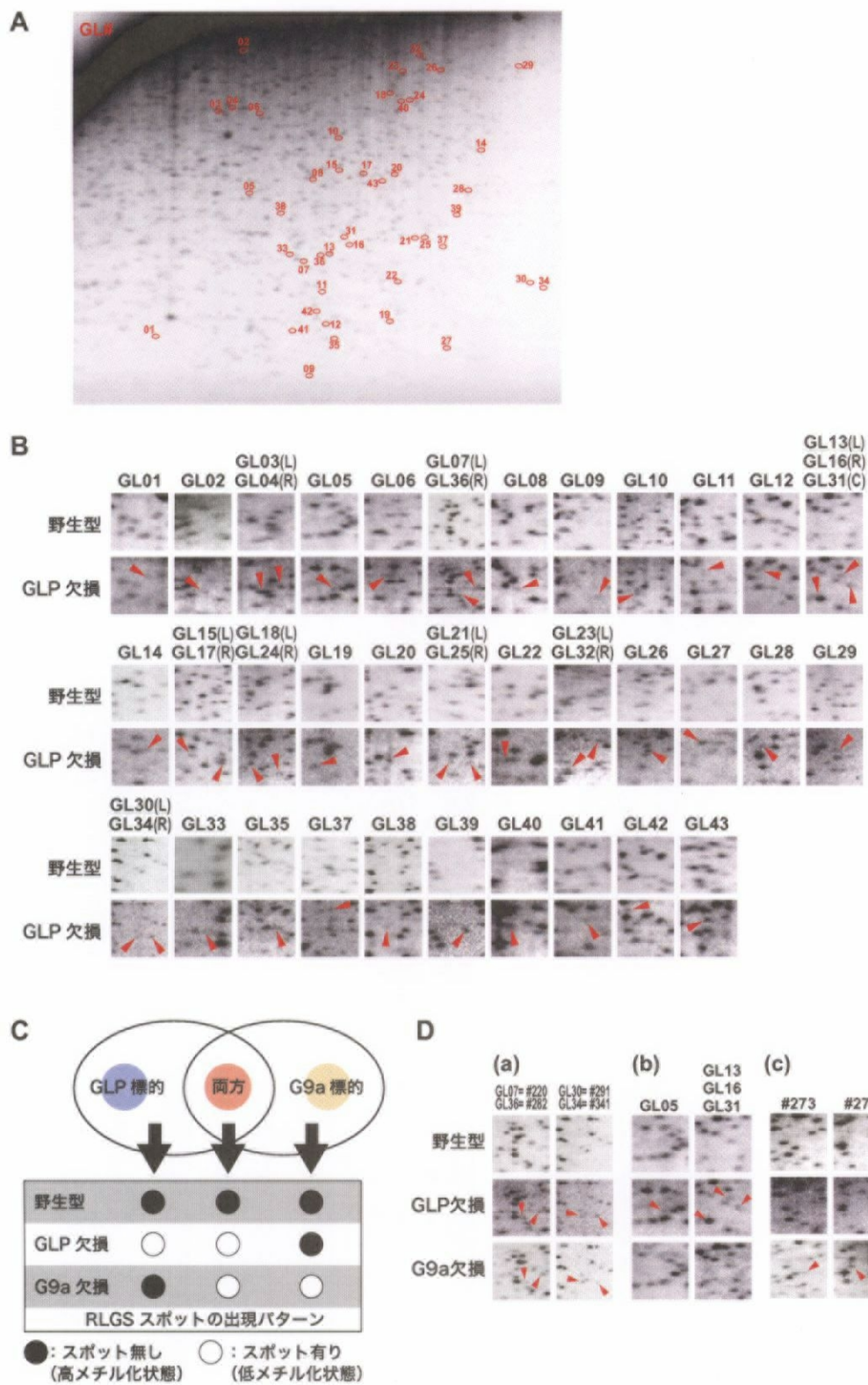


図 2-4 HELP 解析のまとめ

(上段) GLP 欠損 (赤矢頭) または G9a 欠損 ES 細胞 (青矢頭) で低メチル化状態となったゲノム座標を模式的に示した。(下段) 遺伝子 (Known gene) の位置。遺伝子情報はマウスゲノム mm6 に基づき、UCSC ゲノムブラウザ (<http://genome.ucsc.edu>) を通して入手した。





E

GLP ID#	GL02	GL07	GL14	GL30	GL33	GL34	GL35	GL36	GL37	GL38	GL39	GL29	GL40	GL44	GL45	GL46
G9a ID#	529	220	285	291	219	341	338	282	288	427	769	768	770	290	284	289
野生型	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
GLP欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G9a欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

GLP ID#	GL41	GL42	GL10	GL12	GL13	GL15	GL16	GL18	GL19	GL23	GL24	GL26	GL03	GL04	GL06	GL31	GL32	GL09	GL17	GL20	GL27	GL43	GL01	GL28	GL05	GL08	GL11	GL21	GL22	GL25
G9a ID#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
野生型	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
GLP欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G9a欠損	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

GLP ID#	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G9a ID#	332	287	188	335	319	273	330	333	334	337	278	6	377	110	274	281	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
野生型	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
GLP欠損	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G9a欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

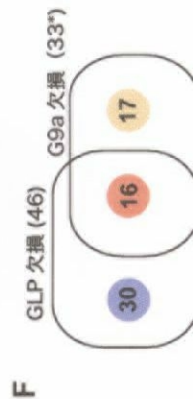


図 2-5 RLGs 法による、GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化解析

(A) GLP 欠損 ES 細胞の RLGs 像。GLP 欠損により現れた 46 個 (GL01-46) のスポットを囲んだ。(B) GLP 欠損細胞の 46 個のスポット (下段、矢頭) と、対応する位置の野生型の RLGs 像 (上段)。写真上の番号はスポットの番号で、付随する R、L、C の表示は、それぞれ左、右、中央の矢頭を指す。(C) GLP 欠損 ES 細胞の RLGs 像を G9a 欠損のそれと比較した時に予想されるスポット出現パターン。(D) GLP 欠損と G9a 欠損 ES 細胞の RLGs 像の比較。(a) GLP 欠損と G9a 欠損 ES 細胞の両方、(b) GLP 欠損だけ、(c) G9a 欠損だけで出現したスポット。(E) RLGs 解析のまとめ。(上) GLP 欠損と G9a 欠損 ES 細胞の両方、(中) GLP 欠損だけ、(下) G9a 欠損だけで出現したスポット。白丸、スポット有り (低メチル化状態)；黒丸、スポットなし (高メチル化状態)。(F) 各欠損細胞で出現したスポットのカテゴリ。枠内の数字は、当該スポットの数。括弧内の数字はスポット総数。\* G9a 欠損による全出現スポットは 35 個だったが、#343 と 344 は比較範囲外だった。



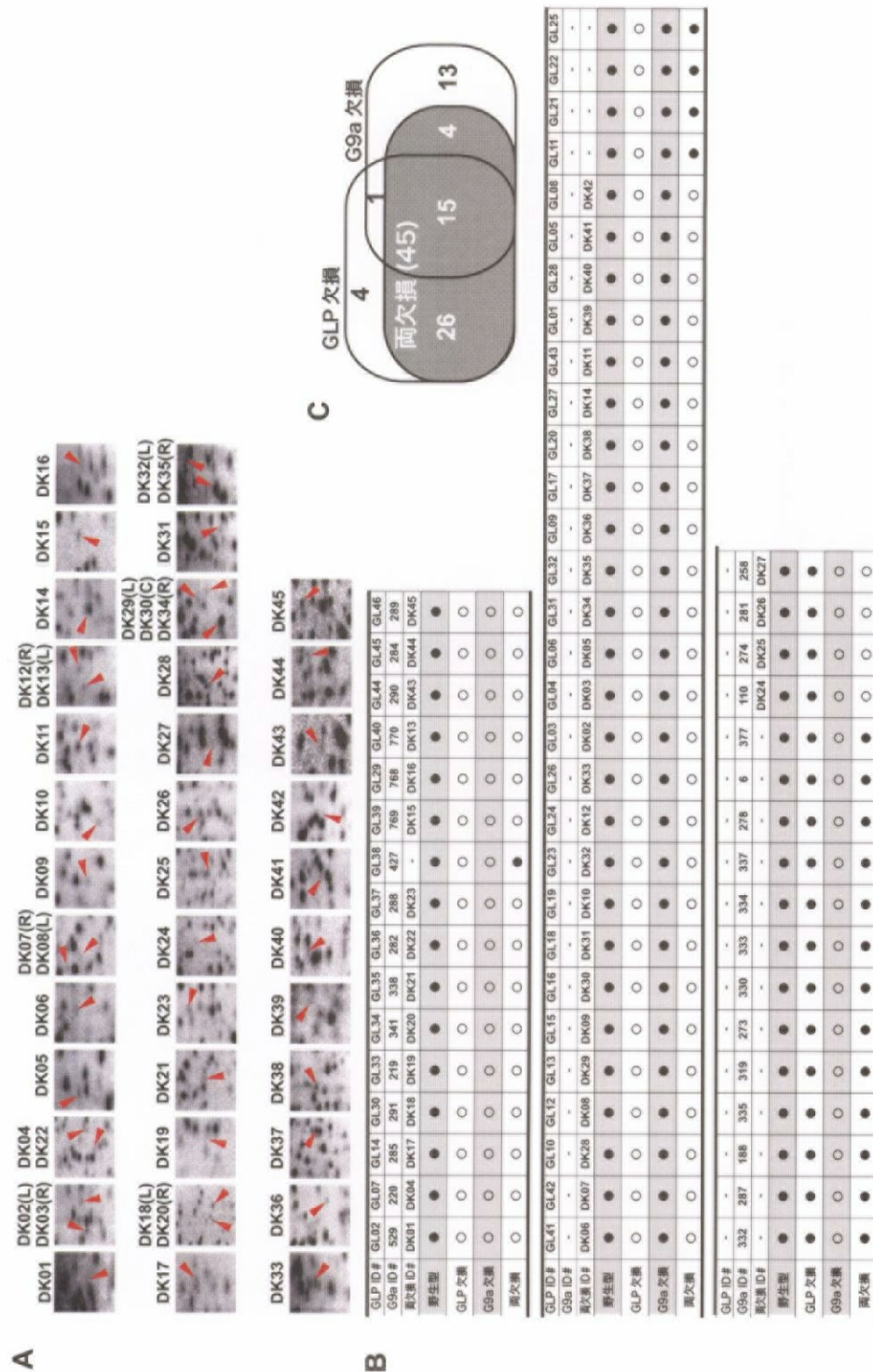


図 2-6 RLGS 法による、GLP・G9a 両欠損 ES 細胞の DNA メチル化解析  
(A) 両欠損 ES 細胞の RLGS 像に出現した 45 個の RLGS スポット (DK01~45、矢頭)。(B) 両欠損、GLP 欠損、G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 解析のまとめ。(上) GLP 欠損と G9a 欠損 ES 細胞の両方、(中) GLP 欠損だけ、(下) G9a 欠損だけで出現したスポットと、これらの両欠損下での出現状況。白丸、スポット有り (低メチル化状態)；黒丸、スポットなし (高メチル化状態)。(C) 両欠損、GLP 欠損、G9a 欠損細胞で出現したスポットのカテゴリ。枠内の数字は、当該スポットの数。括弧内の数字は両欠損細胞において出現したスポットの総数。

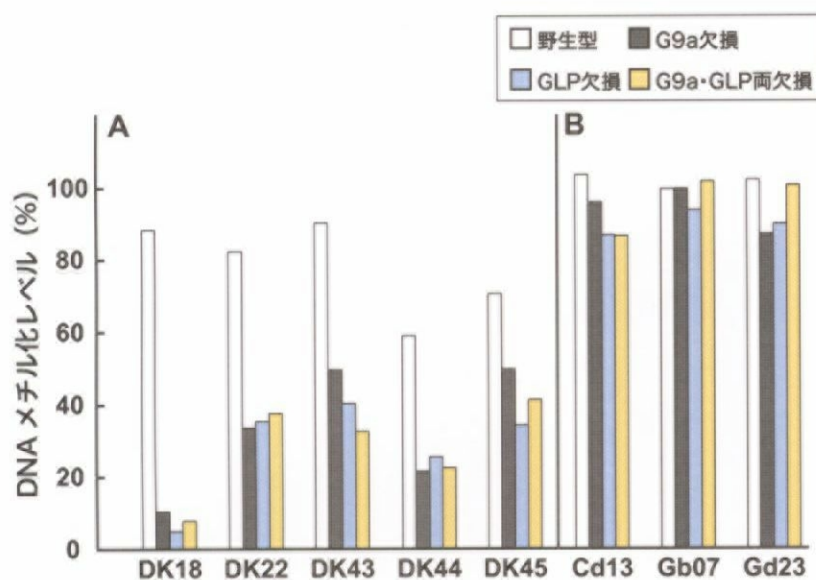


図 2-7 MS-qPCR 法による、GLP・G9a 両欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルの解析

(A) GLP および G9a 単独欠損 ES 細胞の両方で DNA メチル化レベルの低下が生じる座位。

(B) 単独欠損下で DNA メチル化レベルの低下が生じないコンロトル座位。