

第三章

G9a/GLP 欠損 ESd 細胞および胚様体のゲノムワイド DNA メチル化解析

序論

哺乳類の DNA メチル化は CpG 配列のシトシン塩基において起こるが、メチル化 CpG と相互作用する MeCP2 や MBD1 タンパク質はヒストン H3-K9 に対しメチル転移活性を持つ酵素と相互作用することが知られている (Fujita *et al.*, 2003; Fuks *et al.*, 2003)。このことは、DNA メチル化がクロマチン凝縮型のヒストン修飾を誘導することを示唆している。実際に、DNA メチル転移酵素 (DNMT) 1 の欠損細胞では、DNA メチル化レベルの低下のみならず、ヒストン H3-K9 メチル化レベルの低下が生じることが知られている (Espada *et al.* 2004)。一方、H3-K9 がメチル化されたヒストンは HP1 との相互作用を介して (Lachner *et al.*, 2001)、Dnmt と相互作用する (Fuks *et al.*, 2003) ことで DNA メチル化に関与することが示唆されていた。実際に、第一章、第二章で示したように、ヒストン H3-K9/K27 メチル転移酵素の欠損では DNA メチル化レベルが低下する。即ち、ヒストン修飾は逆に DNA メチル化を誘導することを示唆している。これらのことは、DNA メチル化とヒストン修飾が相互依存関係にあることを示している。この相互依存関係は、細胞に特有の DNA メチル化プロファイルの安定な維持に寄与していると考えられる。

ところが、DNA メチル化プロファイルは分化過程において変化する。ES 細胞の分化前後における DNA メチル化状態の違いを、RLGS 法を用いてゲノムワイドに比較した実験では、数 10 箇所程度の T-DMR において、低メチル化状態から高メチル化状態への変化、即ち新規メチル化と、その反対である脱メチル化が検出されている (Shiota *et al.*, 2002)。ほ乳類の初期発生過程の実験モデルである ES 細胞から胚様体への分化過程においても、同程度の数のゲノム座位において両方向の DNA メチル化の変化が生じる (Kremenskoy *et al.*, 2003)。分化過程においては、特定のゲノム座位において DNA メチル化状態が変化することで DNA メチル化プロファイルが変化するのである。

DNA メチル化とヒストン修飾が相互依存関係にあることを考えると、DNA メチル化プロファイルの変化は、ヒストン修飾状態が分化過程で変化することで可能になるのかも知れない。ES 細胞において、ヒストンメチル転移酵素の G9a と GLP はゲノム全域に存在する特定の遺伝子領域の DNA メチル化状態の維持に関与する (第一章、第二章)。G9a と GLP の DNA メチル化に対する関与は分化過程において変化するか、それとも分化過程でも DNA メチル化状態の維持に関与しているか？ 本章では、野生型 ES 細胞と欠損 ES 細胞からそれぞれ分化 ES 細胞

(ESd 細胞)と胚様体の両方を *in vitro* の分化により作製し(図 3-1)、遺伝子領域の DNA メチル化状態に対する G9a および GLP 欠損の影響を分化過程について解析する。

材料および方法

ES 細胞

野生型 (TT2 株)、G9a 欠損、G9a・GLP 両欠損 ES 細胞 (Tachibana *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2005) の培養は、第一章および第二章の「ES 細胞」の項に準じて行なった。これらの細胞を少なくとも 3 日間、ES 細胞として培養した後、DMEM 培地から白血病抑制因子 (LIF) を除いて 2 日間培養し、分化 ES (ESd) 細胞を得た (図 3-1)。胚様体は、まず ES 細胞を少なくとも 3 日間培養した後、大腸菌用培養皿に継代し、LIF を含まない DMEM (10% ウシ胎児血清、v/v) 中、浮遊条件で 4 日間培養し、回収した (図 3-1)。

ゲノム DNA の抽出

ES 細胞、ESd 細胞、胚様体からのゲノム DNA の抽出は全て同じ方法で行なった。約 5×10^7 個の細胞からゲノムを抽出した。操作は第一章の「ゲノム DNA の抽出」の項に準ずる。

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。それぞれの細胞あるいは胚様体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。プライマーは第一章でも用い、表 1-1 (第一章) に示した。

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

約 3-4 μ g のゲノム DNA からハイブリダイゼーション用のサンプルを調製した。操作は第二章の「HELP 法」の項に準ずる。

結果

分化前後共に G9a 欠損下で DNA が低メチル化状態となるゲノム座位は一部に限られる

野生型 ES 細胞と G9a 欠損 ES 細胞から、それぞれ作製した分化 ES 細胞 (ESd 細胞) と胚様体 (図 3-1) の DNA メチル化状態を RLGS 法によりゲノムワイドに解析した。RLGS 法では、スポットの有・無が各スポットに対応する Not I 部位のそれぞれ低・高メチル化状態を表す。ESd 細胞の段階では、野生型の RLGS 像に存在しない 25 個のスポットが G9a 欠損下で現れ、低メチル化状態を示した (図 3-2A)。胚様体の段階において同様の差異を示したスポットは 20 個だった。これらのスポットを、分化前の ES 細胞の段階において G9a 欠損下で現れた 35 個のスポット (第一章) と比較した。スポット #529 を除く比較可能な 34 個のスポットの内、ESd 細胞でも G9a 欠損下で出現したスポットは 22 個であり、胚様体と共通したのは 12 個だった (図 3-2B)。ES 細胞、ESd 細胞および胚様体のいずれの段階でも G9a 欠損下で出現したのは 10 個だった。これらの結果から、分化過程の前後に共通して G9a 欠損下で低メチル化状態となるゲノム座位は一部に限られることが示された。

分化前には G9a 欠損下で低メチル化状態となる座位の多くが、分化後、欠損下でも高メチル化状態となる

ES 細胞、ESd 細胞および胚様体のいずれの段階でも G9a 欠損下で出現したのは 10 個だったことは、24 個は分化後に野生型と G9a 欠損下で差が認められなくなったことを示している。ESd 細胞の段階では 13 個のスポットで差がなくなり、その内の 11 個は、分化後、G9a 欠損下でスポットが現れなくなり、高メチル化状態となったことが示された (図 3-3A)。残りの 11 個の胚様体の段階で差がなくなったスポットについては、全てが G9a 欠損下で現れなくなった (図 3-3B)。これらのスポットに対応するゲノム座位では、ES 細胞の段階では G9a 欠損下で低メチル化状態だったが、分化後には G9a 非依存的に DNA 高メチル化となっていると示唆される。

分化後に通常高メチル化状態に変化する座位の一部が、G9a 欠損下では変化しない

ESd 細胞の段階において G9a 欠損下で現れた 24 個のスポットには、ES 細胞での段階での 35 個のスポットとは異なる新規のスポットが 3 個存在した。胚様体では同様の新規のスポットが

9 個検出された。これらの内、それぞれ 2 個 (#29 と 275) と 6 個 (#286、331、336、340、342 および 523) は、野生型の分化過程において、ES 細胞で検出され低メチル化状態を示していたが、分化後には消失し高メチル化状態を示すスポットだった (図 3-4A)。一方、G9a 欠損下では、分化前も後もスポットが検出されたままであった。これらのスポットの対応する Not I 部位は野生型では分化過程で新規に DNA メチル化されるが、G9a 欠損下では低メチル化状態のままであることが示された。

同様に野生型 ES 細胞の分化過程でスポットが消失し、新規 DNA メチル化が生じることを示すスポットは、ESd 細胞への分化過程では全部で 45 個、胚様体への過程では 42 個見つかった (図 3-4B)。その内、G9a 欠損下の分化過程において消失しないスポットはそれぞれ 2 個と 6 個だったので、野生型の分化過程で低メチル化状態から高メチル化状態に変化するゲノム座位の内、一部が G9a 欠損下では低メチル化状態のままであることが示された。

分化後に新たに G9a 欠損により DNA メチル化レベルが低下するゲノム座位がある

分化後に新たに野生型と G9a 欠損下の間で出現状況に差が生じるスポットの内、上記に属さないスポット #277 は ES 細胞の段階では野生型および G9a 欠損下のいずれでも検出されず高メチル化状態を示した (図 3-5A、B)。ESd 細胞および胚様体の段階においては、野生型ではスポットが消失したままだが、G9a 欠損下ではスポットが現れ低メチル化状態となることが示された。同様に、スポット #530 は ES 細胞の段階では、野生型と G9a 欠損下のいずれでも検出されなかったが、胚様体の段階においては G9a 欠損下だけでスポットが現れた (図 3-5B)。このことは、ES 細胞の段階では G9a 欠損下でも高メチル化状態が維持されていたが、分化後になり初めて欠損下で低メチル化状態となることを示した。

MS-qPCR 法による、RLGS 解析結果の確認

G9a 欠損 ES 細胞で低メチル化状態となる RLGS スポット #110、188、258、282、284、287、290、291 および 377 のゲノム座標は第一章で同定されている。これらの Not I 部位の DNA メチル化状態を定量的メチル化感受性 PCR (MS-qPCR) 法により解析し、RLGS 解析の結果を検討した (図 3-6)。

G9a 欠損下では分化前後共に現れたスポット #282 と 291 の Not I 部位は、野生型のメチル化

レベルに比べて G9a 欠損下の DNA メチル化レベルの方が、ES 細胞、ESd 細胞、胚様体のいずれの段階においても低かった(図 3-6A)。特に#291 では DNA メチル化レベルに 80%程度の大きな差があった。一方、G9a 欠損下の胚様体ではスポットが出現しなくなる#110、188、258 および 284 においては、ESd 細胞の段階では G9a 欠損下の DNA メチル化レベルの方が野生型より低かったが、胚様体の段階では野生型と G9a 欠損下がほぼ同レベルか、もしくは G9a 欠損下の方が高かった(図 3-6B)。ESd 細胞と胚様体の段階の両方で G9a 欠損下でも出現しなくなるスポット#287、290 および 377 の Not I 部位の DNA メチル化レベルは、ES 細胞の段階では G9a 欠損下の方が低かったが、ESd 細胞および胚様体の段階では G9a 欠損下の方が野生型よりも高メチル化状態となることが確認された(図 3-6C)。これらの定量的な DNA メチル化解析により、RLGS 法の結果と対応する DNA メチル化の変化が確認された。

G9a 欠損下の分化過程でおこる DNA 高メチル化は、G9a・GLP 両欠損下でも起こる

分化後に、G9a 欠損下にも関わらず高メチル化状態となるのは G9a 欠損下において GLP が G9a の機能を補完するからなのかも知れない。もしそうならば、G9a と GLP の両欠損下ではそれが起こらず、分化後も低メチル化状態のままでであると予想される。ES 細胞および ESd 細胞のいずれの段階でも G9a 欠損下で低メチル化状態である#291 座位をコントロールとし、分化後では高メチル化状態となる#290 座位について、ES 細胞と ESd 細胞の段階での両欠損下の DNA メチル化レベルを MS-qPCR 法により解析した(図 3-7)。

スポット#291 座位の DNA メチル化レベルは、ES 細胞と ESd 細胞の両方の段階で、野生型より両欠損下の方が低かった(図 3-7)。一方、#290 座位では、ES 細胞の段階では野生型に比べて両欠損下の方が低いメチル化レベルで、差も 58%と大きかったが、ESd 細胞の段階では両欠損下で高メチル化状態となり、差が 20%に縮まった(図 3-7)。G9a 欠損下では差が 16%だったので、G9a と GLP の両欠損下でも、G9a の単独欠損下と同様に、高メチル化状態となったことが示された。このことより、G9a 欠損下の分化過程で高メチル化状態となるのは、GLP の機能によるものではないと示唆された。

HELP 法により、分化後に新たに G9a あるいは GLP 欠損下で低メチル化状態となるゲノム座位を同定した

第二章での HELP 法による解析では、スポット#291 の Not I 部位を中心とした 5 メガ塩基対の領域に、G9a もしくは GLP により DNA メチル化が制御されるゲノム領域が多数存在することを明らかにした。この 5 メガ塩基対を対象とした HELP 解析によって、分化後に G9a 欠損下あるいは GLP 欠損下で新たに低メチル化状態となるゲノム座位の同定を試みた。

Casc3 遺伝子内に野生型 ES 細胞では低メチル化状態だが ESd 細胞では高メチル化状態となる Hpa II 領域が発見された(図 3-8A)。G9a 欠損下では、ES 細胞の段階のみならず、ESd 細胞でも低メチル化状態のままだった。*Pparbp* 遺伝子のイントロン内にも同様に、野生型 ES 細胞の分化後に高メチル化状態となる Hpa II 領域が発見された(図 3-8B)。G9a 欠損および GLP 欠損下では、分化前と同様に、分化後も低メチル化状態のままだった。HELP 法により、G9a 欠損あるいは GLP 欠損下において分化後に新たに低メチル化状態となるゲノム座位が同定された。

考察

図 3-9 に本章の RLGS 解析の結果をまとめた。ES 細胞の RLGS 解析では、野生型で高メチル化状態であるが G9a 欠損により低メチル化状態となるゲノム座位が 35 箇所発見され、これらの座位の DNA メチル化状態の維持に G9a が関与していることが示された(第一章)。この内、ESd 細胞および胚様体でも G9a が DNA メチル化に関与したゲノム座位は 10 箇所、一部に限られた(図 3-9B)。一方、多くは G9a 欠損下にもかかわらず野生型と同様に高メチル化状態となることが本章によって示された。このことは、DNA メチル化状態が G9a 非依存的に維持されるようになったと考えられる。さらに、両欠損下でも高メチル化状態となったことから、GLP にも非依存的に DNA メチル化状態が維持されるようになったと考えられる。これらとは反対に、分化後に初めて G9a 欠損下で低メチル化状態となるゲノム座位も 10 箇所発見され、G9a が分化に伴い新たに DNA メチル化に関与したことが示された(図 3-9B)。これらのことから、分化過程では G9a と GLP が DNA メチル化に関与するゲノム座位が変化することが明らかとなった。

分化に伴い G9a もしくは GLP に非依存的に DNA メチル化状態が維持されるようになったことは、DNA メチル化状態が他のヒストンメチル転移酵素(HMT)によって維持されるように変化した可能性がある。なぜならば、G9a と GLP 以外の H3-K9 もしくは K27 メチル化を触媒する HMT について、DNA メチル転移酵素との相互作用が報告されている(Fuks *et al.*, 2003; Vire *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006)からである。あるいは、DNA メチル化が H3-K9 もしくは K27 メチル化に非依存的に維持されるように変化した可能性もある。G9a が分化後に新たに DNA メチル化維持に関与するゲノム座位も発見されたことから、これらと逆の変化も生じた可能性がある。分化過程では、特異的なゲノム座位において DNA メチル化の維持に関与する機構が変化すると考えられる。

これまで、DNA メチル化とヒストン修飾はリピート配列を中心に研究されてきた。アカパンカビとシロイヌナズナでは、ヒストン H3-K9 メチル転移酵素の欠損株でトランスポゾンの DNA メチル化レベルが低下する(Tamaru & Selker 2001; Jackson *et al.* 2002)。その逆に、CpG メチル転移酵素を欠損させたシロイヌナズナでは H3-K9 メチル化レベルがトランスポゾンや染色中心において低下する(Tariq *et al.*, 2003)。マウスでは、H3-K9 メチル転移酵素の Suv39h1/2 の欠損に

より、セントロメア近傍のサテライト配列の DNA メチル化レベルが低下する(Lehnertz *et al.* 2003)。トランスポゾンやセントロメア領域は細胞の種類によらずヘテロクロマチン化される傾向にあることから、DNA メチル化とヒストン修飾の相互依存関係は、分化の過程や細胞の種類間において不変であると考えられてきた。しかし、本章の研究により、遺伝子領域ではこれらのエピジェネティック修飾の相互依存関係が細胞の分化過程で変化することが明らかとなった。

本章の研究でも、野生型 ES 細胞から ESd 細胞ならびに胚様体への分化過程において、新たに DNA メチル化を受けるゲノム領域が存在することが確認された。G9a 欠損下の分化過程ではこの DNA メチル化領域の形成に異常が生じたことから、G9a は ES 細胞における DNA メチル化の維持だけでなく、分化過程における DNA メチル化領域の変化にも関与していることが明らかとなった。ES 細胞から ESd 細胞あるいは胚様体への分化過程において新規の DNA メチル化が生じるゲノム座位の 4-14%(2/45-6/42 座位)において G9a 欠損下ではそれが起こらなかったことから、この分化過程における DNA メチル化の誘導に G9a が領域特異的に関与していることが示唆された。

G9a と GLP は ES 細胞においてゲノム全域に存在する多数の遺伝子領域の DNA メチル化状態の維持に関与している。この状況が分化後も継続していくとすると、これらの領域の DNA のメチル化状態は変化し得ないことになる。しかし実際は、通常の分化の過程では多数の領域で DNA メチル化状態の変化が生じる。これが可能になるのは、ヒストン修飾酵素の DNA メチル化に対する関与が変化するためである。この変化は特定のゲノム座位において起こる。細胞の分化に伴い、特異的な T-DMR の DNA メチル化状態が変化することが DNA メチル化プロファイルの変化をもたらす。分化過程において G9a/GLP の DNA メチル化に対する関与が領域特異的に変化することで DNA メチル化プロファイルの変化が可能になると考えられる。

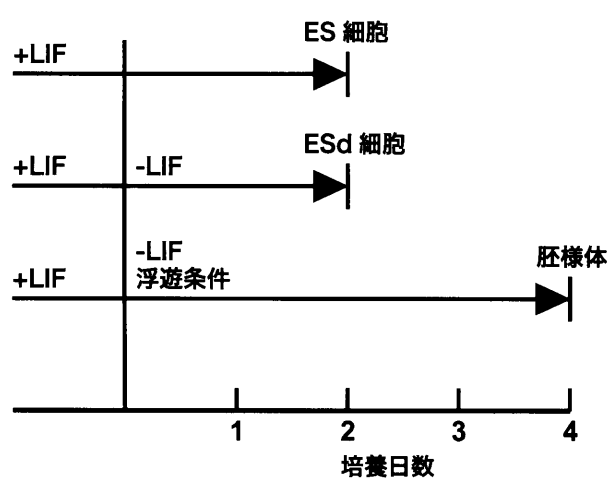


図 3-1 ESd 細胞と胚様体の作製

野生型、G9a 欠損および G9a・GLP 両欠損 ES 細胞のそれぞれから ESd 細胞と胚様体を作製した。ESd 細胞は LIF を培養液から除いて 2 日後に、胚様体は LIF を培養液から除き、浮遊条件での培養を開始してから 4 日後に回収した。

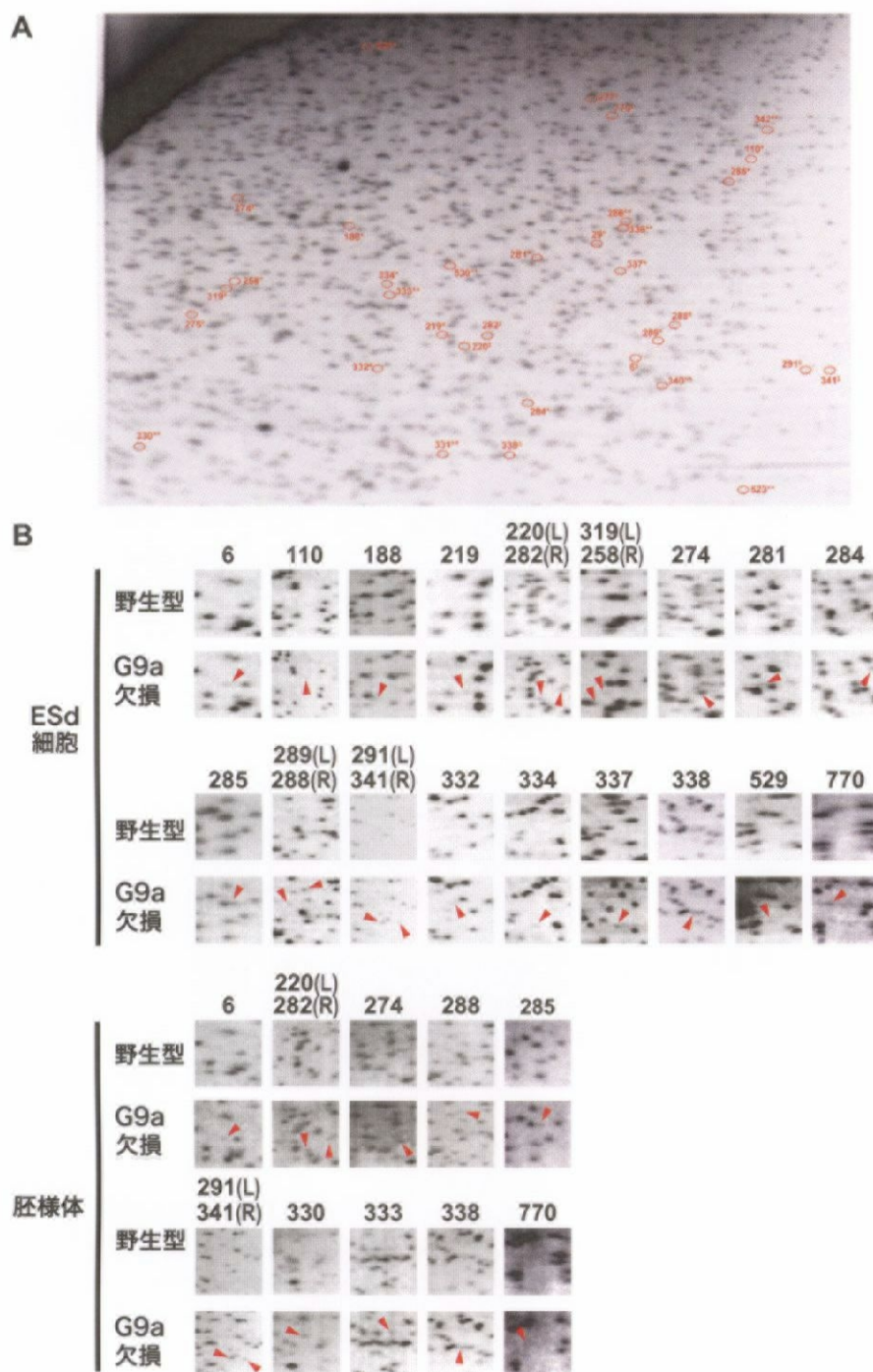


図 3-2 RLGS 法による、G9a 欠損 ESd 細胞および胚様体の DNA メチル化解析
 (A) G9a 欠損 ESd 細胞の RLGS 像。スポット番号を付した楕円は欠損下で特異的に出現したスポットの位置を指す。番号に*、**、あるいは†の付いたスポットは、それぞれ、G9a 欠損 ESd 細胞 (14 個)、欠損胚様体 (9 個)、あるいはその両方で現れたスポット (11 個)。(B) G9a 欠損 ESd 細胞 (上) および胚様体 (下) で出現したスポットの内、分化前の G9a 欠損 ES 細胞で出現したスポットと共通のもの。スポット番号に付随する R と L の表示は、それぞれ、R、左の矢頭 ; L、右の矢頭を指す。

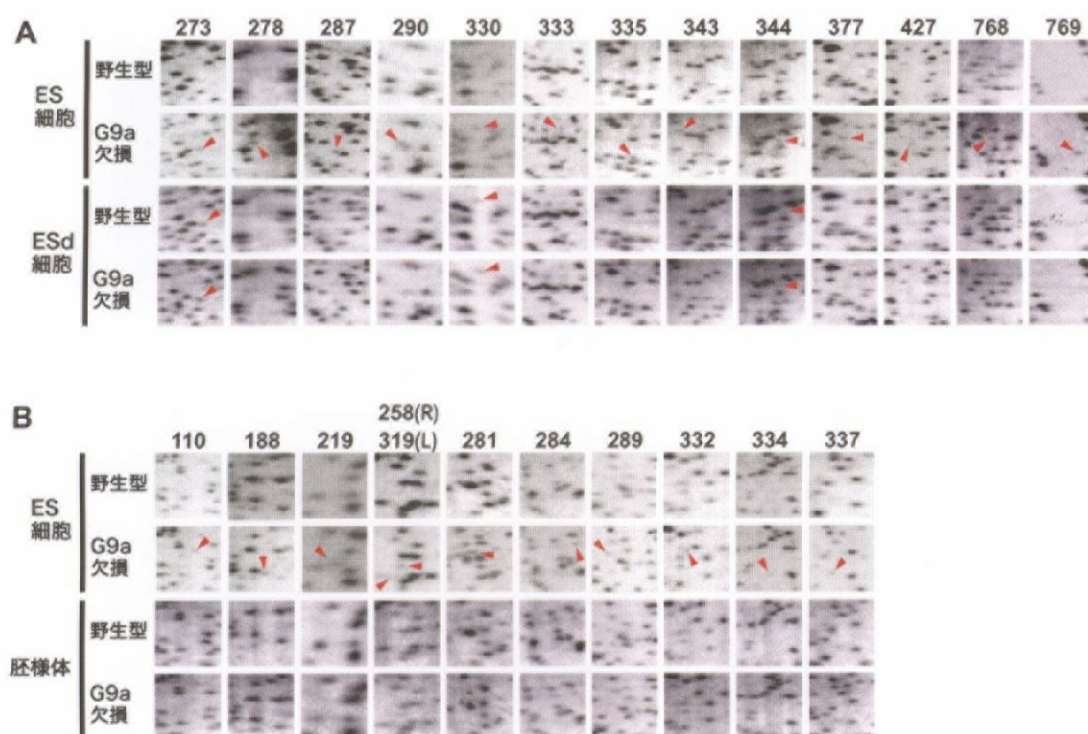


図 3-3 分化後、野生型と G9a 欠損下の間に出現状況の差がなくなる RLGS スポット
 (A) ESd 細胞および (B) 胚様体の段階でのスポットの比較。各上段は ES 細胞の段階における比較で、図 1-1 (第一章) に示したものをを使用した。

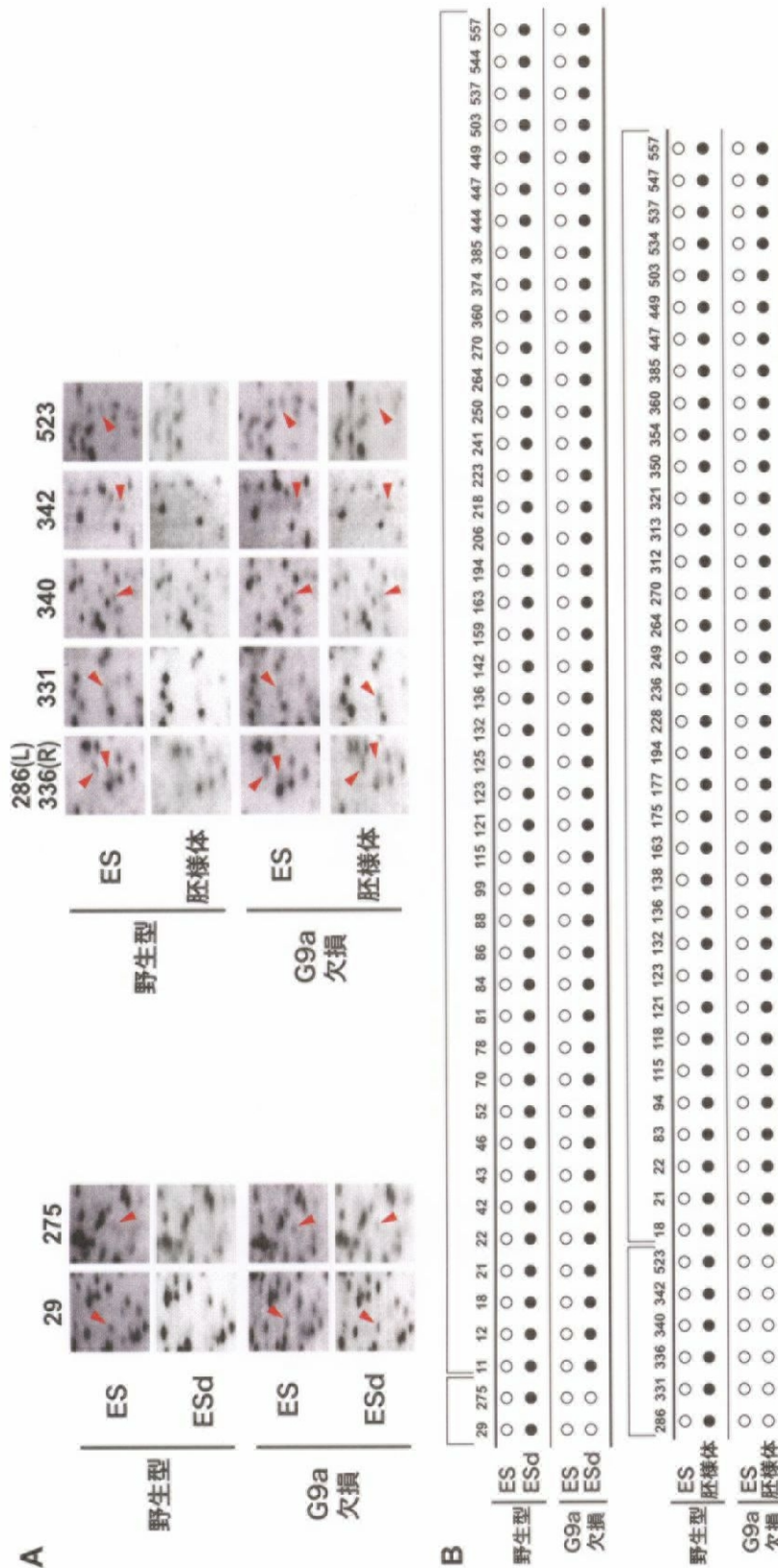


図 3-4 野生型 ES 細胞の分化に伴い消失するが、欠損下では出現し続け、分化後に出現状況に差が生じる RLGS スポット (A) ESd 細胞 (左) もしくは胚様体 (右) への分化過程におけるスポット出現状況の変化。 (B) 野生型 ES 細胞から ESd 細胞 (上段) もしくは胚様体 (下段) への分化過程で消失するスポットの、G9a 欠損下での出現状況。黒丸、スポットなし (高メチル化状態)；白丸、スポットあり (低メチル化状態)。分化後に野生型と G9a 欠損下で出現状況に差異が生じるスポットとそれ以外を枠で分けた。

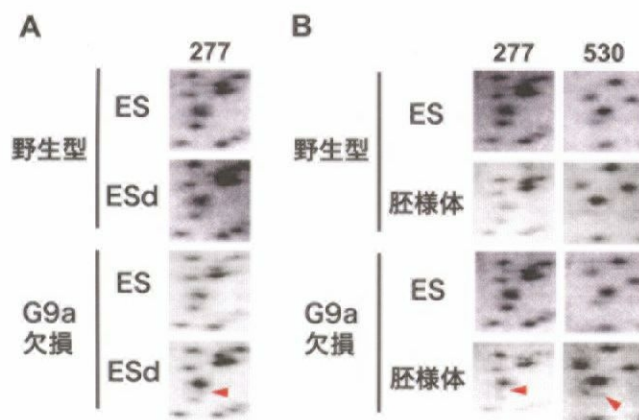


図 3-5 分化後特異的に G9a 欠損下でスポットが消失し、出現状況に差が生じるスポット (A) ESd 細胞、または (B) 胚様体への分化過程でのスポット出現状況の変化。

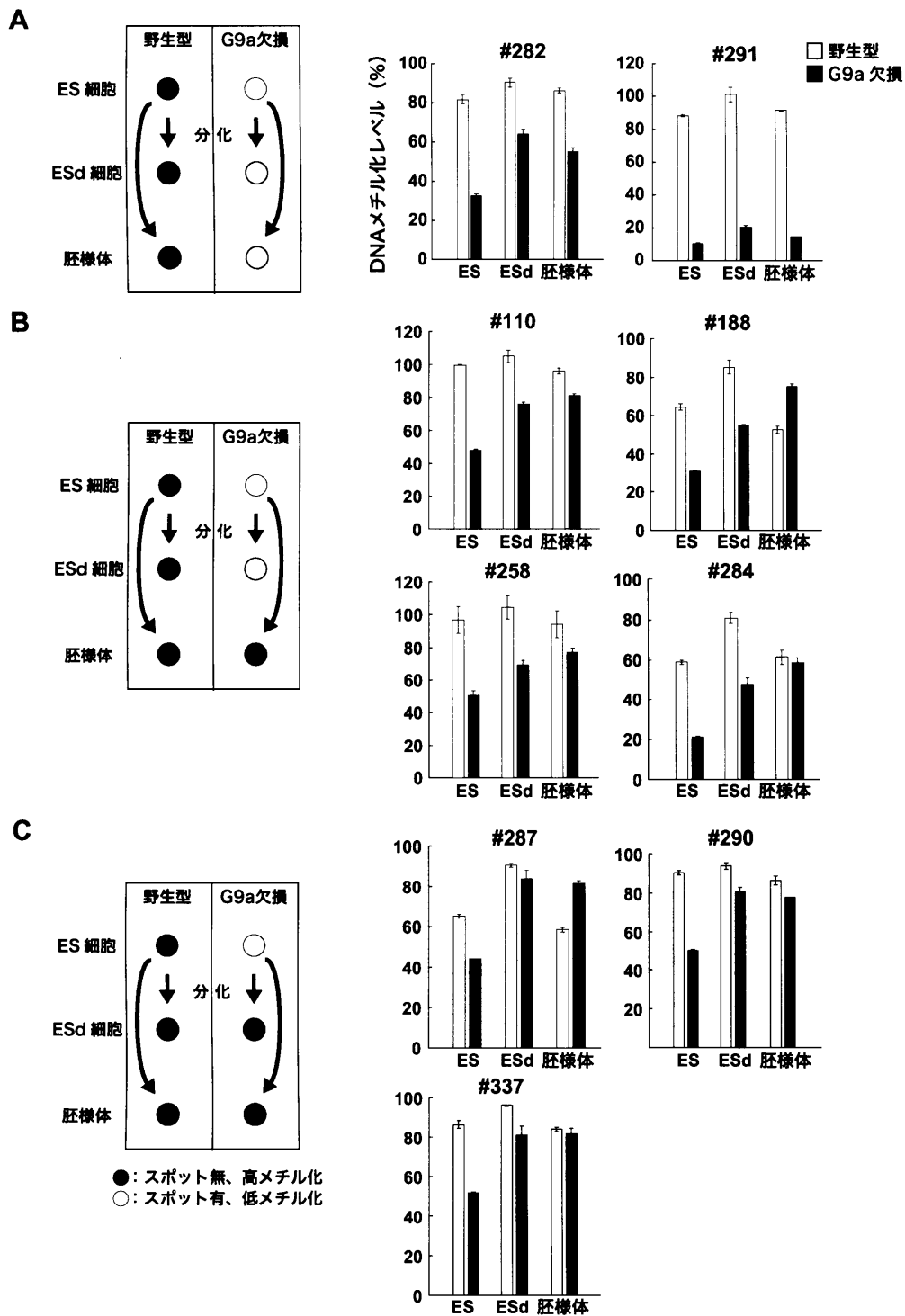


図 3-6 MS-qPCR 法による、G9a 欠損 ESd 細胞および胚様体の DNA メチル化レベルの解析 (A) #282、291、(B) #110、188、258、284、(C) #287、290、377 座位。(左列) A-C の各分類の座位に対応する RLGS スポットの出現状況の模式図。(右列) MS-qPCR 法によって明らかにした DNA メチル化レベル。ES 細胞のレベルは第一章で同方法により明らかにした値 (図 1-3)。

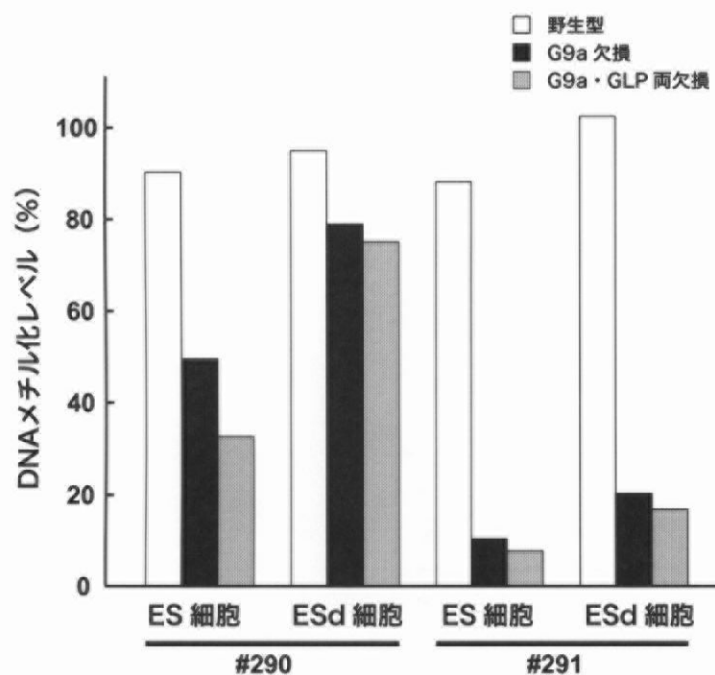


図 3-7 G9a・GLP 両欠損 ESd 細胞の DNA メチル化レベル

ESd 細胞の段階において、G9a 欠損下でも低メチル化状態とはならないスポット #290 座位（左）と低メチル化状態となる #291 座位（右）の両欠損下の DNA メチル化レベルを MS-qPCR 法で解析した。野生型と G9a 欠損 ESd 細胞、および両欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルは、それぞれ図 3-6 および図 2-7 で示したものを比較のため使用した。

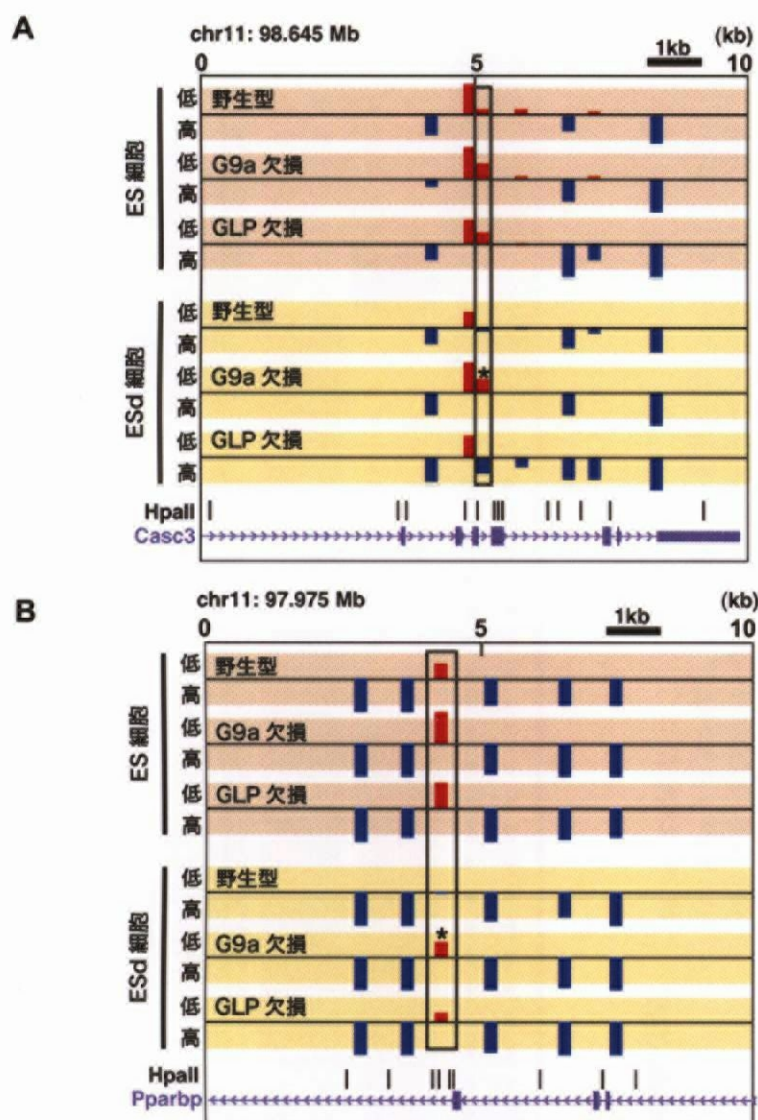


図 3-8 分化後に新たに G9a あるいは GLP 欠損下で低メチル化状態となるゲノム座位の HELP 法による同定

(A) *Casc3* (cancer susceptibility candidate 3) 遺伝子座、(B) *Pparbp* (peroxisome proliferator activated receptor binding protein) 遺伝子座。囲みは、野生型 ES 細胞の分化過程で新規に DNA メチル化が生じるが、G9a または GLP 欠損 ES 細胞の分化過程では低メチル化状態のままである Hpa II 領域。野生型で新規 DNA メチル化が起きた Hpa II 領域とは、野生型 ES 細胞が低メチル化状態で、分化後に有意に ($p < 10^{-5}$ 、Welch の検定) 高メチル化状態となる領域とした。縦軸は log 比の -1 から +1 までの範囲。* は野生型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。

A

		6	220	274	282	288	291	338	341	770	285	110	188	219	258	281	284	289	319	332	334	337	529	273	278	287	290	335	343	344	377	427	768	769	330	333	29	275	286	331	336	340	342	523	530	277		
ES細胞	野生型	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
	G9a欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
ESd細胞	野生型	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	G9a欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
胚様体	野生型	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	nd	nd	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
	G9a欠損	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

B

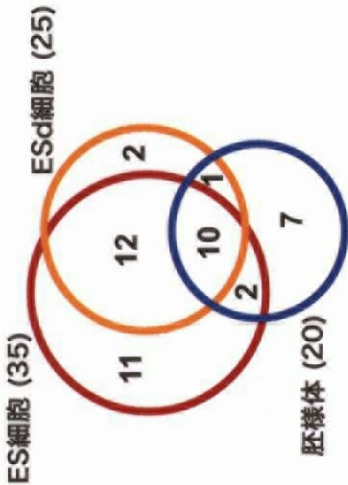


図 3-9 本章のまとめ
(A) G9a 欠損 ES 細胞、ESd 細胞、および胚様体の RLGS 解析のまとめ。
(B) 各分化段階において、G9a 欠損下で低メチル化状態となるゲノム座位の数とその重なり。括弧内の数字は、各段階で低メチル化状態となる全ゲノム座位数。

総括

哺乳類ゲノムには組織特異的に DNA がメチル化される領域(T-DMR)が多数存在し、細胞の種類に固有の DNA メチル化プロファイルが形成される(Shiota 2004)。ただし、DNA メチル化を触媒する DNA メチル転移酵素は *in vitro* で裸の DNA に対し標的配列の特異性を持たないため(Bestor 2000)、本研究では特異的な領域が DNA メチル化を受ける仕組みにクロマチンの状態が寄与しているとの仮説を立てた。第一章、二章において G9a および GLP が DNA メチル化に領域特異的に関与していることを明らかにした。G9a と GLP は互いに構造が類似しているが、それぞれが DNA メチル化に関与するゲノム座位は一部異なり、DNA メチル化に関与する固有の標的座位のセットを持つことも示された(第二章)。第三章では、G9a もしくは GLP の寄与が DNA メチル化に関与するゲノム座位は分化に伴い変化し、DNA メチル化プロファイルの分化に伴う変化を可能にしていることが示された。

これまで CpG アイランドにおいて多数の T-DMR が発見されてきた(Shiota *et al.*, 2004)。RLGS 法では Not I 部位を解析対象とし、その 67%が CpG アイランドに位置することから、CpG アイランドや CpG 配列が密に存在するゲノム領域の DNA メチル化状態の解析に適する。また、CpG 配列が密な領域は遺伝子上流域に高頻度に存在する。G9a および GLP 欠損 ES 細胞を用いた RLGS 解析により、これらのゲノム領域の DNA メチル化に対する G9a および GLP の寄与を明らかにすることができた。T-DMR は CpG アイランドを持つ遺伝子のみならず、CpG アイランドを持たない遺伝子の転写調節領域にも存在する(Cho *et al.*, 2001; Nishino *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2005)。さらに最近のゲノムワイドな研究では、T-DMR が遺伝子のイントロンや遺伝子間の領域にでさえ多数発見されている(Sakamoto 2006; Eckhardt *et al.*, 2006)。ユニーク配列内の Hpa II 部位の 15%程度が CpG アイランドに位置することから、これらの HpaII 部位を主に解析対象とする HELP 法は、CpG 配列が密集していないゲノム領域の DNA メチル化状態も解析可能である。G9a および GLP 欠損 ES 細胞の HELP 解析により、G9a および GLP が CpG 配列の多寡に関わらず DNA メチル化に関与していることが明らかにされ、標的座位も遺伝子上流域、内部、遺伝子間の領域に発見された。これらの領域の DNA メチル化に対する G9a および GLP の関与は分化に伴い変化することから、DNA メチル化状態は細胞種間で異なると考えられる。これらのことより、G9a および GLP は CpG の多寡に関わらず、遺伝子調節領域および遺伝子間領域の T-DMR の形成に寄与していると考えられる。

In vitro では DNA 中の全ての CpG 配列のシトシンが DNA メチル転移酵素によりメチル化され得るが、実際は、特定の T-DMR が DNA メチル化修飾を受け、DNA メチル化プロファイルを形成している。このことから *in vivo* では特定の T-DMR が DNA メチル化修飾を受けやすい、あるいは受けにくい環境におかれていると考えられる。核内で DNA はヒストンに巻き付いたヌクレオソーム構造をとり、ヌクレオソームが複雑に折り畳まれた高次のクロマチン構造をとる。クロマチン構造の決定にはヒストンの N 末端の修飾状況が関与している。本研究では、ヒストン H3-K9 と K27 のメチル転移酵素である G9a と GLP の欠損が、特定のゲノム座位において DNA メチル化レベルの低下を引き起こすことを明らかにした。これらのゲノム座位では H3-K9 または K27 メチル化レベルの低下が生じていた。これらのことより、G9a および GLP による H3-K9 または K27 のメチル化がクロマチン状態の変化を介して DNA メチル化を誘導していると示唆される。本研究により、ヒストン修飾が特定のゲノム領域の DNA メチル化を促進し、DNA メチル化プロファイルの形成に寄与していることが示唆された。

ヒストン修飾が DNA メチル化プロファイルの形成に寄与する様子を図 GD-2 にモデルとして示した。ゲノム中の CpG 配列の大部分は DNA メチル化されていて、このことは第二章および第三章の HELP 解析でも確認された。一方で、RLGS 像上では解析可能な 2,000 スポットの内、常に約 1,500 スポットが検出されることから、多くの CpG アイランドや遺伝子調節領域が DNA メチル化されないことも明らかである。このことは、遺伝子領域や CpG アイランドが、DNA メチル化される状態、言い換えれば、「被 DNA メチル化環境」から逃れていると考えることができる(図 GD-1)。しかし、遺伝子領域の全てが低メチル化状態ではなく、多数の T-DMR があり、これにより DNA メチル化プロファイルが形成されている。疑問は、「なぜ特異的な遺伝子領域だけが被メチル化環境に置かれるのか？」ということであった。G9a および GLP の欠損が H3-K9 メチル化と K27 メチル化状態の低下を伴って DNA 低メチル化状態を引き起こしたことから、G9a と GLP はヒストン修飾により、クロマチン構造の変化を介して、特定の遺伝子領域を被メチル化環境に置いていると考えられる。G9a と GLP の欠損により脱メチル化される領域が数 100 から数千塩基対であり、その近傍は通常、欠損下にあっても高メチル化状態であるという HELP 法の結果からも、G9a と GLP が特異的な範囲だけを被 DNA メチル化環境に維持し、他の多くは G9a と GLP に非依存的に被メチル化環境に置かれていると考えられる(図 GD-1)。分化過程に

においては、G9a と GLP は新たな低メチル化領域を被メチル化環境に置く。その一方、G9a または GLP の欠損は脱メチル化を引き起こすので、G9a と GLP の標的領域からの解離は、特定の領域を「非」DNA メチル化環境に置き、低メチル化状態を引き起こすと考えられる。これによって DNA メチル化プロファイルの変化が生じると推測できる。さて、細胞核には転写因子が集まった転写活性な三次元的なテリトリーと、不活性化因子が集まったテリトリーが存在する(Dillon 2006)。図 GD-1 のモデルの「非」DNA メチル化環境と「被」DNA メチル化環境は、それぞれこれらに対応すると考えることができる。T-DMR は高メチル化/低メチル化状態を細胞の種類によってとるので、これらのテリトリーを行き来していると考えられる。G9a と GLP は H3-K9 または K27 メチル化により、特異的な T-DMR のクロマチン構造の変換を介して、T-DMR のテリトリー間の行き来を促進し、DNA メチル化メチル化プロファイルの形成に関与すると考えられる。

結論

特異的な遺伝子領域の DNA メチル化状態の安定的な維持に G9a と GLP が関与することが明らかとなった。分化過程では G9a および GLP が DNA メチル化に新たに関与する、あるいは関与しなくなることで、DNA メチル化状態の変化を特異的なゲノム領域で引き起こす。G9a または GLP は、DNA メチル化に関与しているゲノム座位において、H3-K9 または K27 のメチル化を触媒している。組織に固有の DNA メチル化プロファイルの形成と維持に G9a および GLP によるヒストン修飾が関与していることが示された。

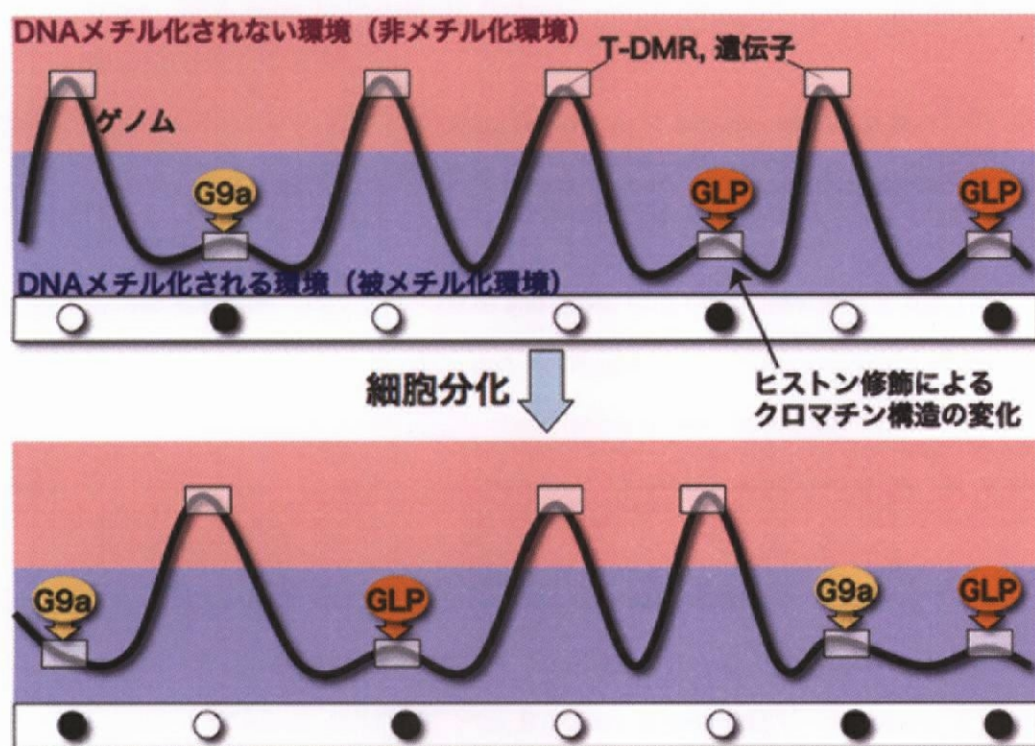


図 GD-1 G9a および GLP による、ヒストン修飾を介した DNA メチル化誘導のモデル
G9aとGLPによるH3-K9またはK27メチル化は、クロマチン構造の変化により特定の領域を「被」DNA メチル化環境に誘導する。

引用文献

- Bestor, T.H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395-2402.
- Bird, A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
- Cao, R., L. Wang, H. Wang, L. Xia, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, R.S. Jones, and Y. Zhang. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043.
- Cho, J.H., H. Kimura, T. Minami, J. Ohgane, N. Hattori, S. Tanaka, and K. Shiota. 2001. DNA methylation regulates placental lactogen I gene expression. *Endocrinology* 142: 3389-3396.
- Cross, S.H. and A.P. Bird. 1995. CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev* 5: 309-314.
- Dennis, K., T. Fan, T. Geiman, Q. Yan, and K. Muegge. 2001. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 15: 2940-2944.
- Dillon, N. 2006. Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus. *Chromosome Research* 14: 117-126.
- Eckhardt, F., J. Lewin, R. Cortese, V.K. Rakyan, J. Attwood, M. Burger, J. Burton, T.V. Cox, R. Davies, T.A. Down, C. Haefliger, R. Horton, K. Howe, D.K. Jackson, J. Kunde, C. Koenig, J. Liddle, D. Niblett, T. Otto, R. Pettett, S. Seemann, C. Thompson, T. West, J. Rogers, A. Olek, K. Berlin, and S. Beck. 2006. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38: 1378-1385.
- Espada, J., E. Ballestar, M.F. Fraga, A. Villar-Garea, A. Juarranz, J.C. Stockert, K.D. Robertson, F. Fuks, and M. Esteller. 2004. Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *J Biol Chem* 279: 37175-37184.
- Fazzari, M.J. and J.M. Greally. 2004. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 5: 446-455.
- Feldman, N., A. Gerson, J. Fang, E. Li, Y. Zhang, Y. Shinkai, H. Cedar, and Y. Bergman. 2006. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 8: 188-194.

- Fischle, W., Y. Wang, S.A. Jacobs, Y. Kim, C.D. Allis, and S. Khorasanizadeh. 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* 17: 1870-1881.
- Fujita, N., S. Watanabe, T. Ichimura, S. Tsuruzoe, Y. Shinkai, M. Tachibana, T. Chiba, and M. Nakao. 2003. Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278: 24132-24138.
- Fuks, F., P.J. Hurd, R. Deplus, and T. Kouzarides. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31: 2305-2312.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer. 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-282.
- Geng, Y., Q. Yu, W. Whoriskey, F. Dick, K.Y. Tsai, H.L. Ford, D.K. Biswas, A.B. Pardee, B. Amati, T. Jacks, A. Richardson, N. Dyson, and P. Sicinski. 2001. Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13138-13143.
- Hattori, N., T. Abe, N. Hattori, M. Suzuki, T. Matsuyama, S. Yoshida, E. Li, and K. Shiota. 2004a. Preference of DNA methyltransferases for CpG islands in mouse embryonic stem cells. *Genome Res* 14: 1733-1740.
- Hattori, N., K. Nishino, Y.G. Ko, N. Hattori, J. Ohgane, S. Tanaka, and K. Shiota. 2004b. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem* 279: 17063-17069.
- Imamura, T., J. Ohgane, S. Ito, T. Ogawa, N. Hattori, S. Tanaka, and K. Shiota. 2001. CpG island of rat sphingosine kinase-1 gene: tissue-dependent DNA methylation status and multiple alternative first exons. *Genomics* 76: 117-125.
- Jackson, J.P., A.M. Lindroth, X. Cao, and S.E. Jacobsen. 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416: 556-560.
- Khulan, B., R.F. Thompson, K. Ye, M.J. Fazzari, M. Suzuki, E. Stasiek, M.E. Figueroa, J.L.

- Glass, Q. Chen, C. Montagna, E. Hatchwell, R.R. Selzer, T.A. Richmond, R.D. Green, A. Melnick, and J.M. Greally. 2006. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 16: 1046-1055.
- Ko, Y.G., K. Nishino, N. Hattori, Y. Arai, S. Tanaka, and K. Shiota. 2005. Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development. *J Biol Chem* 280: 9627-9634.
- Kremenskoy, M., Y. Kremenska, J. Ohgane, N. Hattori, S. Tanaka, K. Hashizume, and K. Shiota. 2003. Genome-wide analysis of DNA methylation status of CpG islands in embryoid bodies, teratomas, and fetuses. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 884-890.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. Reinberg. 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16: 2893-2905.
- Lachner, M., D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, and T. Jenuwein. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116-120.
- Lachner, M. and T. Jenuwein. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14: 286-298.
- Lehnertz, B., Y. Ueda, A.A. Derijck, U. Braunschweig, L. Perez-Burgos, S. Kubicek, T. Chen, E. Li, T. Jenuwein, and A.H. Peters. 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 13: 1192-1200.
- Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3: 662-673.
- Li, H., T. Rauch, Z.X. Chen, P.E. Szabo, A.D. Riggs, and G.P. Pfeifer. 2006. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem* 281: 19489-19500.
- Lindroth, A.M., D. Shultis, Z. Jasencakova, J. Fuchs, L. Johnson, D. Schubert, D. Patnaik, S. Pradhan, J. Goodrich, I. Schubert, T. Jenuwein, S. Khorasanizadeh, and S.E. Jacobsen. 2004. Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction

- with CHROMOMETHYLASE3. *Embo J* 23: 4286-4296.
- Matsuyama, T., M.T. Kimura, K. Koike, T. Abe, T. Nakano, T. Asami, T. Ebisuzaki, W.A. Held, S. Yoshida, and H. Nagase. 2003. Global methylation screening in the *Arabidopsis thaliana* and *Mus musculus* genome: applications of virtual image restriction landmark genomic scanning (Vi-RLGS). *Nucleic Acids Res* 31: 4490-4496.
- Nielsen, S.J., R. Schneider, U.M. Bauer, A.J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R.E. Herrera, and T. Kouzarides. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412: 561-565.
- Nishino, K., N. Hattori, S. Tanaka, and K. Shiota. 2004. DNA methylation-mediated control of *Sry* gene expression in mouse gonadal development. *J Biol Chem* 279: 22306-22313.
- Nishio, H. and M.J. Walsh. 2004. CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11257-11262.
- Nuwaysir, E.F., W. Huang, T.J. Albert, J. Singh, K. Nuwaysir, A. Pitas, T. Richmond, T. Gorski, J.P. Berg, J. Ballin, M. McCormick, J. Norton, T. Pollock, T. Sumwalt, L. Butcher, D. Porter, M. Molla, C. Hall, F. Blattner, M.R. Sussman, R.L. Wallace, F. Cerrina, and R.D. Green. 2002. Gene expression analysis using oligonucleotide arrays produced by maskless photolithography. *Genome Res* 12: 1749-1755.
- Ogawa, H., K. Ishiguro, S. Gaubatz, D.M. Livingston, and Y. Nakatani. 2002. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296: 1132-1136.
- Ohgane, J., J. Aikawa, A. Ogura, N. Hattori, T. Ogawa, and K. Shiota. 1998. Analysis of CpG islands of trophoblast giant cells by restriction landmark genomic scanning. *Dev Genet* 22: 132-140.
- Ohgane, J., N. Hattori, M. Oda, S. Tanaka, and K. Shiota. 2002. Differentiation of trophoblast lineage is associated with DNA methylation and demethylation. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 701-706.
- Peters, A.H., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O'Sullivan, A.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A.

- Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H. Martens, and T. Jenuwein. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12: 1577-1589.
- Razin, A. and A.D. Riggs. 1980. DNA methylation and gene function. *Science* 210: 604-610.
- Rea, S., F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, and T. Jenuwein. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406: 593-599.
- Robinson, P.N., U. Bohme, R. Lopez, S. Mundlos, and P. Nurnberg. 2004. Gene-Ontology analysis reveals association of tissue-specific 5' CpG-island genes with development and embryogenesis. *Hum Mol Genet* 13: 1969-1978.
- Rougeulle, C., J. Chaumeil, K. Sarma, C.D. Allis, D. Reinberg, P. Avner, and E. Heard. 2004. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol Cell Biol* 24: 5475-5484.
- Sakamoto, H. 2006. Studies on genome-wide DNA methylation profile of cellular differentiation in mouse. 博士論文(東京大学大学院農学生命科学研究科)
- Schultz, D.C., K. Ayyanathan, D. Negorev, G.G. Maul, and F.J. Rauscher, 3rd. 2002. SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16: 919-932.
- Selzer, R.R., T.A. Richmond, N.J. Pofahl, R.D. Green, P.S. Eis, P. Nair, A.R. Brothman, and R.L. Stallings. 2005. Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes, Chromosomes & Cancer* 44: 305-319.
- Shi, Y., J. Sawada, G. Sui, B. Affar el, J.R. Whetstine, F. Lan, H. Ogawa, M.P. Luke, and Y. Nakatani. 2003. Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 422: 735-738.
- Shiota, K., Y. Kogo, J. Ohgane, T. Imamura, A. Urano, K. Nishino, S. Tanaka, and N. Hattori. 2002. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in

- mice. *Genes Cells* 7: 961-969.
- Shiota, K. 2004. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res* 105: 325-334.
- Song, F., J.F. Smith, M.T. Kimura, A.D. Morrow, T. Matsuyama, H. Nagase, and W.A. Held. 2005. Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 3336-3341.
- Suzuki, Y., T. Tsunoda, J. Sese, H. Taira, J. Mizushima-Sugano, H. Hata, T. Ota, T. Isogai, T. Tanaka, Y. Nakamura, A. Suyama, Y. Sakaki, S. Morishita, K. Okubo, and S. Sugano. 2001. Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res* 11: 677-684.
- Tachibana, M., K. Sugimoto, T. Fukushima, and Y. Shinkai. 2001. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J Biol Chem* 276: 25309-25317.
- Tachibana, M., K. Sugimoto, M. Nozaki, J. Ueda, T. Ohta, M. Ohki, M. Fukuda, N. Takeda, H. Niida, H. Kato, and Y. Shinkai. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev* 16: 1779-1791.
- Tachibana, M., J. Ueda, M. Fukuda, N. Takeda, T. Ohta, H. Iwanari, T. Sakihama, T. Kodama, T. Hamakubo, and Y. Shinkai. 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. *Genes Dev* 19: 815-826.
- Tamaru, H. and E.U. Selker. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-283.
- Tariq, M., H. Saze, A.V. Probst, J. Lichota, Y. Habu, and J. Paszkowski. 2003. Erasure of CpG methylation in *Arabidopsis* alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8823-8827.
- Tomikawa, J., K. Fukatsu, S. Tanaka, and K. Shiota. 2006. DNA methylation-dependent

- epigenetic regulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2 gene in trophoblast cell lineage. *J Biol Chem* 281: 12163-12169.
- Vire, E., C. Brenner, R. Deplus, L. Blanchon, M. Fraga, C. Didelot, L. Morey, A. Van Eynde, D. Bernard, J.M. Vanderwinden, M. Bollen, M. Esteller, L. Di Croce, Y. de Launoit, and F. Fuks. 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439: 871-874.
- Waterston, R.H. K. Lindblad-Toh E. Birney J. Rogers J.F. Abril P. Agarwal R. Agarwala R. Ainscough M. Alexandersson P. An S.E. Antonarakis *et al.* 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420: 520-562.
- Workman, C., L.J. Jensen, H. Jarmer, R. Berka, L. Gautier, H.B. Nielser, H.H. Saxild, C. Nielsen, S. Brunak, and S. Knudsen. 2002. A new non-linear normalization method for reducing variability in DNA microarray experiments. *Genome Biol* 3: research0048.
- Xin, Z., M. Tachibana, M. Guggiari, E. Heard, Y. Shinkai, and J. Wagstaff. 2003. Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *J Biol Chem* 278: 14996-15000.
- Yang, L., L. Xia, D.Y. Wu, H. Wang, H.A. Chansky, W.H. Schubach, D.D. Hickstein, and Y. Zhang. 2002. Molecular cloning of ESET, a novel histone H3-specific methyltransferase that interacts with ERG transcription factor. *Oncogene* 21: 148-152.
- Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-340.

論文内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 16 年度博士課程 進学

池上 浩太

指導教員 塩田 邦郎

論文題目 ヒストン修飾による DNA メチル化プロファイルの形成

【緒言】

ほ乳類のゲノム中には、組織特異的に DNA がメチル化される領域(T-DMR)が遺伝子領域に多数存在する。ゲノム全体に存在する T-DMR の DNA メチル化状態のパターンを、DNA メチル化プロファイルと呼ぶ。DNA メチル化プロファイルの形成機構を解明する為の鍵は、個々の T-DMR が、どのように、それぞれ異なる DNA メチル化状態となるか明らかにすることである。DNA のメチル化を触媒する DNA メチル転移酵素には、標的 DNA の配列特異性が存在しないため、特異的な T-DMR にメチル化を誘導する仕組みに、DNA の *in vivo* での環境、すなわち、クロマチンの構造が関与していると考えられる。

クロマチン構造はヒストンの修飾状態により変化する。ヒストン H3 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、転写が抑制されたゲノム領域に見られる。H3-K9 と K27 メチル転移酵素として G9a(Ehmt2)と GLP(Ehmt1)が同定されている。G9a と

GLP はユークロマチン領域に局在するが、これまでに標的ゲノム座位としてそれぞれ数個の遺伝子が同定されているのみである。

本研究では、ヒストンの修飾が 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た。仮説が正しければ、ヒストン修飾酵素の欠損細胞では、特異的なゲノム座位の DNA が低メチル化状態となると考えられる。

【第一章: G9a 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析】

本章では、G9a 欠損が DNA メチル化プロファイルの形成に与える影響を解析した。

Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法を用いて、約 2,000 箇所のゲノム座位における G9a 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した結果、野生型 ES 細胞の RLGS 像に存在しない、35 個のスポットが、G9a 欠損 ES 細胞の RLGS 像に出現し、35 箇所のゲノム座位が、G9a 欠損により低メチル化状態となったことが示された。*In silico* の Virtual image RLGS ソフトウェアを用いて、その中から 10 箇所の G9a 標的ゲノム座位を同定した。これらのゲノム座位では、G9a 遺伝子を欠損細胞に再導入した株において、DNA メチル化レベルが回復していることが確認された。G9a は H3-K9/K27 メチル転移酵素なので、標的座位では G9a の欠損により H3-K9 もしくは K27 が低メチル化状態となるはずである。クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて、G9a 欠損 ES 細胞の H3-K9 と K27 のメチル化状態を解析し、全 10 箇所において H3-K9 あるいは K27 が低メチル化状態となることを確認した。これらの G9a 標的座位では、欠損下でも数%から 50%程度の DNA メチル化は残るが、低メチル化状態となる領域は数キロ塩基対を超える範囲にも及ぶことが示された。

本章によって、多数の G9a 標的座位を明らかにすることができた。ゲノム中の遺伝子の総数に基づくと、少なくとも 240 の G9a 標的遺伝子が存在すると見積もることができる。DNA メチル転移酵素の欠損 ES 細胞を用いた RLGS 解析では 247 座位が低メチル化状態となることが知られている。一方、G9a 欠損により低メチル化状態となったのは 35 のゲノム座位だった。従って、G9a が特異的なゲノム座位の DNA メチル化の維持に関与することが明らかとなった。

【第二章: GLP 欠損 ES 細胞のゲノムワイド DNA メチル化解析】

G9a の欠損よりも、DNA メチル転移酵素の欠損で低メチル化状態となるゲノム座位の方が、

7 倍程度多かったことを考えると、G9a 以外のヒストンメチル転移酵素も DNA メチル化プロファイルの形成に寄与していると考えられる。G9a と同様にユークロマチン領域に存在する H3-K9/K27 メチル転移酵素として GLP が同定されている。GLP は G9a と優先的にヘテロ二量体を構成するとの報告がある。GLP の欠損は、G9a の欠損と同じゲノム座位の DNA メチル化に影響を与えているのだろうか、それとも異なるゲノム座位の DNA メチル化に影響を与えるのか？

RLGS 法を用いて GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化状態をゲノムワイドに解析したところ、46 箇所 GLP 欠損により低メチル化状態となることが示された。G9a 欠損では 35 箇所だったので(第一章)、GLP の欠損では、G9a 欠損よりも多数の座位で低メチル化を引き起こすことが示された。GLP 欠損および G9a 欠損により低メチル化状態となるゲノム座位を比較すると、両方で共通のものが 16 座位、GLP 単独で 30 座位、G9a 単独で 17 座位だった。従って、ゲノム上には GLP と G9a が協調して作用する領域と、お互いに独立して作用する領域が存在することが示された。第一章で記したように、G9a 標的座位では G9a 欠損下でも完全に脱メチル化されなかった。同様に、GLP 標的座位でも GLP 欠損により完全な脱メチル化は観察されなかった。これらの酵素の単独欠損下における部分的脱メチル化は、それぞれが相補的に作用している結果かも知れない。そこで、GLP と G9a の各単独欠損で共通して低メチル化状態となるゲノム座位に注目して G9a・GLP 両欠損 ES 細胞の DNA メチル化レベルを解析した結果、GLP あるいは G9a 単独欠損 ES 細胞と差がなかった。従って、G9a と GLP のヘテロ二量体においても相乗的な DNA メチル化が起こらないことが示唆された。

本章は、DNA メチル化を指標として、GLP の標的ゲノム座位をゲノムワイドに探索することで、GLP が G9a とは異なる固有の標的座位のセットを持つことが明らかになった。

【第三章:G9a/GLP 欠損 ESd 細胞・胚様体のゲノムワイド DNA メチル化解析】

DNA メチル化領域が凝縮型のクロマチン中に見られるヒストン修飾を誘導することが報告されている。一方、第一章、第二章で示したように、これらのヒストン修飾は DNA メチル化状態に影響を与える。このことから、DNA メチル化とヒストン修飾の相互依存によって細胞の安定なエピジェネティック状態が保たれていると考えられる。従って、ヒストン修飾状態が変化しなければ、DNA メチル化プロファイルは変化し得ないと考えられる。しかし、細胞の分化過程では DNA メ

チル化プロファイルが変化し、これにより細胞種固有の DNA メチル化プロファイルが形成される。事実、ES 細胞と、これを分化させることで得られる分化 ES 細胞および胚様体は異なる DNA メチル化プロファイルを持つ。では、G9a と GLP の標的座位は ES 細胞の分化に伴って変化するのか、それとも一定なのだろうか？

最初に野生型について、ES 細胞、分化 ES (ESd) 細胞、胚様体の DNA メチル化状態を RLGS 法によりゲノムワイドに解析し、分化過程において新たに DNA メチル化される領域が存在することを確認した。次に G9a 欠損 ES 細胞からも ESd 細胞および胚様体を作製し、野生型 ES 細胞で見られた新規のメチル化に対する G9a 欠損の影響を RLGS 法により解析した。その結果、通常 ESd 細胞への分化過程で新規のメチル化が生じる 45 箇所のゲノム座位の内、2 箇所では G9a 欠損下の分化過程で新規メチル化が生じなかった。さらに、胚様体への分化過程では 42 箇所で通常新規メチル化が生じるが、G9a 欠損下では 6 箇所において起こらなかった。このことは G9a の標的座位が分化に伴い変化し、DNA メチル化領域の新たな形成に関与することを示唆した。タイリングアレイにより、RLGS 法での解析対象である NotI 部位以外のゲノム領域について同様の解析を行なった。その結果、イントロン内や遺伝子間の特定の領域においても、分化に伴い、新規の G9a と GLP 標的座位が生じることが示された。本章の結果により、G9a と GLP の標的座位が分化に伴い変化することが分かった。G9a と GLP が分化に伴い新たに DNA メチル化を誘導することは、DNA メチル化プロファイルの変化に寄与していることを意味する。

【総括】

本研究では、細胞種に固有の DNA メチル化プロファイルの形成にヒストン修飾が関与するとの仮説を立てた。この仮説の検証には、ヒストン修飾酵素の標的座位を多数明らかにする必要があった。しかし、ヒストン修飾の解析は、DNA メチル化解析に比べて方法論的に定量性・正確性が劣る。本研究では、DNA メチル化を指標とし G9a と GLP の標的領域をゲノムワイドに探索した。第一章、第二章では G9a および GLP 欠損 ES 細胞の DNA メチル化解析により標的遺伝子座を多数同定した。このことにより、G9a と GLP が特異的な遺伝子領域の DNA メチル化状態の維持に関与することを明らかにすることができた。これらの領域では G9a と GLP が H3-K9 と K27 のメチル化を触媒していたことから、クロマチン構造の変化により DNA メチル化

が誘導されと考えられる。第三章では、G9a と GLP の標的座位は分化に伴い変化し、細胞の種類によって異なることを明らかにした。これらのことより、ヒストン修飾が細胞の種類に固有の DNA メチル化プロファイルの形成と維持に関与していることが示唆された。

謝辞

研究の遂行、論文作成にあたり適切な御指導を頂き、共に議論して下さいました細胞生化学研究室教授、塩田邦郎先生に心より感謝する。

八木慎太郎特任教授、田中智助教授、服部中前特任助教授、大鐘潤助手は日頃から親身になって論文作成の為に貴重な議論の機会を与えて下さり、深く感謝している。

京都大学ウイルス研究所、眞貝洋一教授、立花誠助教授からは、本研究で用いた G9a 欠損、GLP 欠損、G9a・GLP 両欠損 ES 細胞をご供与頂いた。尚、これらの細胞が私の研究に対する原動力と気力を与えてくれた。

アルバートアインシュタイン医学部のジョン M. グレリー助教授は、HELP 法の遂行に関して多大なるご協力を頂き、さらに私に広い知見を与えてくれた。

岩谷美沙氏には、本研究全般に渡っての細胞培養に関して多大なるご協力を頂き、また研究内容についても多数の貴重なご意見を賜った。

細胞生化学研究室の全てのメンバーが本研究の完成の為に快く、温かく協力してくれた。大変感謝している。

最後に、いつでも私を支えてくれる家族、親族と、家族同様に常に応援し、味方でいてくれる友人たちがいなければ、本論文は完成し得なかった。感謝してもし尽くせないほどである。