

# 博士論文

ハイドロキシメチルシトシン(hmC)を同一分子上の  
塩基単位で同定する Enzyme-assisted Identification of  
Genome Modification Assay (EnIGMA)法の開発と  
ビタミン C 欠乏マウスの解析

黒田 友紀子

ハイドロキシメチルシトシン(hmC)を同一分子上の塩基単位で同定する

Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA)法の

開発とビタミンC欠乏マウスの解析

所属：東京大学医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児科学教室

指導教員：岡 明

申請者：黒田 友紀子

## 要旨

mCが脱メチル化される過程で発生するhmCはBisulfite反応ではmCと同様の反応をするため鑑別は不可能であった。今回hmCを検出する新たな手法であるEnzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA)を開発した。DNMT1酵素反応を利用してmC, hmCを区別することができ、1回のシーケンスでmC, hmC, Cを同時検出することができるため正確な定量が可能であり、同一分子上での評価が唯一可能な方法である。方法を確立するとともにビタミンC欠乏マウス精子でEnIGMAを用いてメチル化解析をおこなった。

## 目次

序文	4
方法	17
ヘアピン型 DNA 合成	17
BJ マウスゲノム、 <i>SMP30</i> ノックアウトマウスゲノム抽出	20
DNMT1 反応	21
bisulfite 反応、EnIGMA	22
合成ヘアピン型 DNA の COBRA	24
dot blot	25
hMeDIP-seq	26
glucMS-qPCR アッセイ	27
結果	29
1. 合成 DNA を用いた EnIGMA の検証と DNMT1 反応の至適な条件の決定	29
2. マウスゲノムを用いた hmC 検出における EnIGMA 解析と従来法との比較検討	33
3. <i>SMP30</i> ノックアウトマウス精子の VC 欠乏実験後の組織中 VC 測定結果	36
4. dot blot によるマウス精子中の hmC 定量結果	37
5. hMeDIP-seq によるピーク検出と glucMS-qPCR, EnIGMA による確認	39
6. hMeDIP-seq による DhMR 検出と EnIGMA による確認	43
考察	47
結語	51
謝辞	52
参考文献	53

## 序文

### CpG メチル化について

DNA 塩基である A(アデニン)、T(チミン)、G(グアニン)、C (シトシン) の他に第 5 の塩基として mC(メチルシトシン)が発見された。mC は C にメチル基が付いた修飾塩基であり大部分は CpG 配列に存在する。mC はゲノムインプリンティング[1]、遺伝子発現制御、レトロトランスポゾン転写抑制[2]について重要な役割を担っている。一般的にプロモーターがメチル化された遺伝子では発現が抑制され、プロモーターの低メチル化とエクソン・イントロン (gene body) がメチル化されている遺伝子は発現する傾向にある[3-5]。 DNA メチル化異常は胚発生段階での致死、腫瘍発生、ゲノム不安定性、インプリンティング疾患をひきおこす。DNA メチル化は通常の A, T, G, C の塩基配列変異と異なり可逆性の変化である。初期胚の発生段階では受精後一度脱メチル化した後に再度メチル化されるといったダイナミックな変化が認められるが、個体が一旦構築されると体内のメチル化は維持される傾向にある。このように個体の発生、発生後の恒常性維持のためにも新規のメチル化修飾とメチル化の維持、脱メチル化 (非修飾 C に戻る過程) を制御するメカニズムの解明が必要であった。

## CpG のメチル化と脱メチル化

メチル化は DNMT によりおこなわれている。DNMT には新たにメチル化をするための新規メチル化酵素 DNMT3A, 3B と一度メチル化された CpG を維持するための維持メチル化酵素 DNMT1 が存在する。DNMT1 は DNA 2 本鎖の一方の鎖の CpG がメチル化されている状態（ヘミ mCpG）において反対側の非修飾 CpG を選択的にメチル化することができる。ヘミ mCpG は細胞分裂時に DNA 複製された状態で発生する。複製時の DNA は非修飾状態であり細胞分裂後もメチル化を維持するために DNMT1 を必要とする [2]。生体内では mC が細胞分裂時に希釈されていくため DNMT1 が働かない場合には受動的に脱メチル化されていく。生体内での受動的な脱メチル化は初期胚の脱メチル化など細胞分裂が活発な段階において認められる。脱メチル化は受動的におこるものと考えられていたが、能動的に脱メチル化する現象が存在することが明らかになった。能動的脱メチル化プロセスには酸化酵素 TET [6] が関与しており、mC は TET による酸化反応によりハイドキシメチルシトシン (hmC) へと変化し [7]、フォルミルシトシン (fC)、カルボキシルシトシン (caC) へ酸化されて最終的に base excision repair (BER) により非修飾 C に戻っていく [7,8]。脱メチル化過程で生じる hmC が発見され、機能や役割に注目が集まった。

## hmC とは

脱メチル化過程の中間体である hmC は全ての C の 1%以下とごくわずかに存在する塩基であり、小脳の Purkinje 細胞には比較的豊富に認められる [9,10]。hmC は遠位の調節領域などの転写因子結合部位周辺や転写が活性化されている遺伝子内(gene body)に多く存在する [11]。hmC は一部のプロモーターに集積しており、転写因子と DNA の結合にかかわっていると考えられている。ES 細胞では hmC が集積している転写開始点では転写を活性化するヒストン (H3K4me3)、抑制するヒストン(H3K27me3)の両方が共在している [12]。

hmC そのものが生物学的機能・役割をもっているのかは明らかになっていないが、疾患との関連はこれまでに複数指摘されている。Alzheimer 病 [13-16] では健常人脳と比較して hmC の分布に変化を、Huntington 病 [17,18] と Ataxia-telangiectasia [19] では hmC の減少を、Fragile X-associated tremor/ataxia (FXTAS) 症候群 [20] では疾患モデルマウスで小脳特異的エンハンサーでの hmC の増加を認めている。hmC が病態に直接関連している例も報告されており、Rett 症候群の原因遺伝子がコードしている MeCP2 は mC との結合タンパクで転写抑制にかかわっているが、hmC とも結合することが明らかになっている。MECP2 R133C 変異をもつ Rett 症候群患者の MeCP2 は mC との結合能

に変化はないものの、hmC との結合が著しく阻害されており病態には hmC が  
かかわっている可能性がある [21]。自閉症患者の脳でも関連遺伝子である  
*RELN* (Reelin), *GAD1* (glutamate decarboxylase) の mRNA 低下に伴い TET 発  
現上昇と mC の低下、hmC の変動を認めた報告がある [22]。自閉症や知的障  
害は共通した特徴的症状で説明できるが遺伝学的な異質性は非常に高く、  
whole exome sequencing などの網羅的解析で遺伝子変異が同定できない例も多  
く存在する [23,24]。未診断例ではプロモーターやエンハンサー領域の非コード  
領域バリエーションによる遺伝子発現異常が病態となっている可能性がある  
[25,26]。DNA 中の mC, hmC を正確に評価することでこうした患者の病態診  
断や、変異同定例においても共通した病態のアウトプットを把握することがで  
き、治療のターゲットになる可能性がある。メチル化の異常とされているイン  
プリンテイング疾患についても hmC の再評価がおこなわれている [27]。mC  
を検出するために汎用されている bisulfite 反応において hmC は mC と同じ反  
応をすることから両者が鑑別不可能であるためである。mC は通常のシークエ  
ンスでは C と区別ができないため、mC の検出には bisulfite 反応が広く用いら  
れてきた。bisulfite 反応では非修飾 C が化学反応により U (ウラシル) へ変化  
し最終的に T としてシークエンスされ、mC は変化せずに C のままであること

から両者を判別できる。mC とされていたものが実際は hmC である可能性があり、hmC の詳細な分布や機能を明らかにするために高精度の検出法が求められるものの実際の検出は容易ではない。

## hmC の検出方法

hmC を検出する方法はいくつか存在する。hmC の総量を評価する方法として、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) や dot blot, ELISA などの抗体免疫反応による検出が用いられる [28]。hydroxymethylated DNA immunoprecipitation (hMeDIP) は免疫沈降反応により hmC を含む DNA を濃縮する手法でありゲノムワイドの解析に用いられているが、解析は数百塩基ごとの評価であり、また客観的な定量は難しい [12,29,30]。glucMS-qPCR アッセイ (Glucosylation of genomic DNA followed by methylation-sensitive quantitative PCR) [31] は T4 Phage  $\beta$ -glucosyltransferase により hmC が glycosylation された glucosyl-5-hydroxymethylcytosine (5-ghmC) に対して感受性をもつ制限酵素により切断されにくくなることを利用して定量 PCR により検出する方法である。切断部位の CpG において評価する方法で制限酵素の認識配列に限られることからゲノムワイドへの応用は難しい。



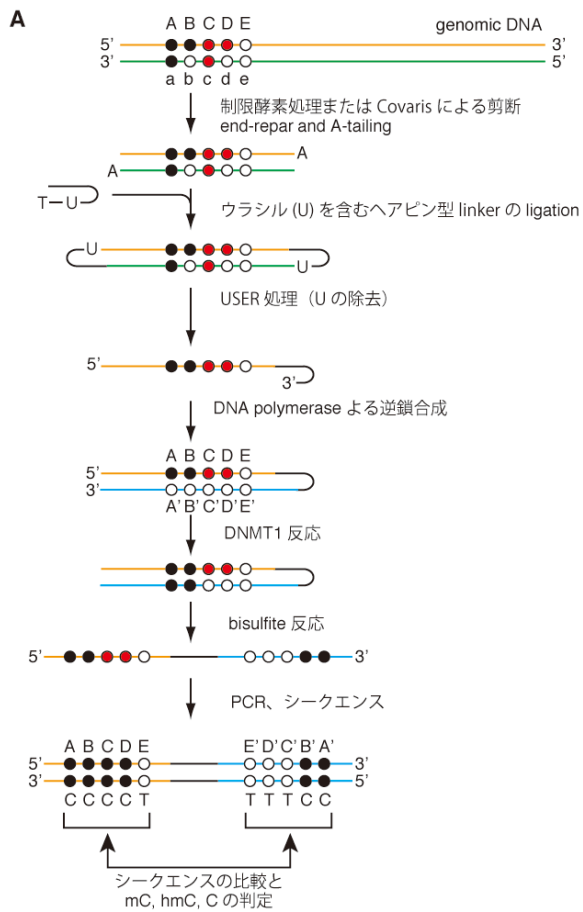
塩基単位で hmC を検出する方法として TAB sequencing (TAB-seq), oxidative bisulfite sequencing (oxBS-seq) がこれまでに報告されている [32,33]。いずれも bisulfite 反応前に別の反応を加えることで mC と hmC が bisulfite 反応で異なる変化をすることより hmC を検出する方法である。通常の bisulfite 反応と比較することで hmC を検出できる手法である。TAB-seq では mC は T、hmC は C、oxBS-seq では mC は C、hmC は T として判読される (表 1)。この結果を通常の bisulfite 反応と比較することで hmC を検出できる。この方法では mC と hmC を同時に検出できないことから正確な定量は困難であり、同一分子上での mC、hmC の分布をみることは不可能である。

表 1 これまでに報告されている方法と EnIGMA で出力されるシーケンスの比較

修飾	Bisulfite-seq	TAB-seq	oxBS-seq	EnIGMA
mC	C	T	C	C+C
hmC	C	C	T	C+T
C	T	T	T	T+T

## 新しい hmC の検出法 (EnIGMA) の開発

今回、同一分子上の塩基単位で mC, hmC を同時に検出する Enzyme-assisted Identification of Genome Modification Assay (EnIGMA)を開発した。ヘミ mCpG の反対側をメチル化する DNMT1 の酵素反応を利用して mC, hmC を区別することができ、1回のシーケンスで mC, hmC, C をそれぞれ判別することができるため従来よりも正確な定量ができる。またシーケンスリード内で連続した塩基を判別できるため同一分子上での分布の評価が唯一可能な方法である (図 1)。



**B**

	bisulfite 後の 正鎖配列 (元の配列)	合成した逆鎖配列 (DNMT1, bisulfite 後)	配列の判定
A	C	A'	mC
B	C	B'	mC
C	C	C'	hmC
D	C	D'	hmC
E	T	E'	C

図1 EnIGMA の解説図示

A. EnIGMA : 黒い丸がメチルシトシン (mCpG)、赤い丸がヒドロキシメチルシトシン(hmCpG)、白い丸が非修飾シトシン(CpG)を示す。ゲノムに由来する部分をオレンジ、新たに合成伸長した部分を青色で示す。逆鎖を新たに合成したヘアピン型の DNA に DNMT1 反応、bisulfite-PCR を施行する。シーケンス後ヘアピン内のそれぞれ対応する塩基を比較して修飾を判定する。

B. 出力されたシーケンスと CpG の修飾判定

二本鎖の DNA において片側の鎖上に mCpG, hmCpG, CpG が存在している状況で DNMT1 反応を行うと mCpG の反対鎖側 CpG のみがメチル化され、hmCpG, CpG の反対側はメチル化されない。すべて非修飾塩基である相補的な鎖を DNMT1 反応後に照合すると mC, hmC が区別できる。bisulfite 反応後に逆鎖が C のまま(メチル化されて mC となったもの)であるものは mC、逆鎖が T に変換されているもの(非修飾 C のまま)は hmC と判定できる。しかし二本鎖は bisulfite 反応により一本鎖になるため反応後に二本鎖を照合することは不可能である。この点を解決するために二本鎖を事前にヘアピンでつなぐことで bisulfite 後も照合することが可能になった。逆鎖は非修飾塩基である必要があるため、ヘアピン型の linker DNA をプライマーにして逆鎖を新たに合成伸長して逆鎖側をすべて非修飾塩基とした。効率的なヘアピン逆鎖合成伸長のため、3'末端にウラシル (U) が含む linker を二本鎖に対してギャップなくつないでから、U を特異的に切断する USER (Uracil DNA glycosylase and Endonuclease VIII)により一塩基ギャップを作りそのポイントから逆鎖の伸長反応をおこなうこととした。このようにいくつかの点を解決し、EnIGMA を考案した。

## EnIGMA の概略

図 1 に概略を示す。ゲノムを適切な制限酵素で切断後、end-repair により切断断端を平端化し dA-tailing をおこなう。次に U を含むヘアピン型 linker をライゲーションしてヘアピン型 DNA を合成する。USER 反応により linker 内のウラシルを切断し、ポリメラーゼにより逆鎖を合成して非修飾塩基からなる逆鎖をもつヘアピン型 DNA を合成した。ヘミ mCpG をメチル化する DNMT1 酵素反応により mCpG である A, B の CpG の逆鎖である A', B' はメチル化されるが、hmCpG である C, D、非修飾 CpG である E の逆鎖である C', D', E' はメチル化されない。その後 bisulfite 反応により A-D, A'-B' は C, E, C'-E' は T に変換される。結果は PCR、シーケンスされたデータでそれぞれを比較することにより判定した。この手順によってヘアピン型 DNA 合成、DNMT 1 反応を行いシーケンスにより mC, hmC, C を比較判定することが可能であることは明らかになっていたが、解析精度の高いかつ再現性の高い結果を得るためにはさらに検討が必要であった。解析精度は DNMT1 反応に依存するため最適な反応条件を決定する必要がある。合成 DNA で反応条件を検討した後、ゲノムでの解析を実際に施行し EnIGMA を確立するに至った。加えて、従来の解析方法との比較も同時におこなった。

## ビタミン C とメチル化

生体内で DNA メチル化が変動する要因やそれに伴う影響を EnIGMA により解析することにした。TET は iron and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase であり、反応には還元鉄( $\text{Fe}^{2+}$ )と 2-オキソグルタル酸(2-OG)が不可欠である [34]。酵素反応にはそれらに加えて鉄の還元状態を維持するためにビタミン C (VC)を必要とする [35,36]。多くの哺乳類はグルコースから VC を肝臓で合成しているため欠乏はおきないが、ヒトは VC 合成段階の最終酵素である L-gulonolactone oxidase (*Gulo*)の変異により VC 合成能を喪失していることから食物から摂取する必要がある [37]。VC が担っている抗酸化作用は VC 欠乏状態においても他の代償機構により保つことができるが、iron and 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase の機能維持は他で代用できないことから VC 欠乏は TET 反応に影響を及ぼす [38]。

培養細胞では培養液に VC を加えることにより TET を介して DNA プロモーター領域での mC の減少と hmC 増加がおきることが複数報告されている [35,36,39]。一方で個体でも同様のことがおきるのかは十分な報告はない。VC 合成酵素である *Gulo* ノックアウトマウスに VC 投与を行うことで未投与群と比較して小脳、肺、肝臓で hmC 全体量が増加することが報告されているが、

VC 欠乏期間と月齢や投与量の記載がなく VC が個体のメチル化に影響を与えることを示唆するにとどまっている[40]。個体での VC 欠乏状態が個体内でどの程度メチル化に影響をあたえるのかを調べる必要があった。特に hmC が減少する領域 (DhMR, differentially hydroxymethylated region) を同定することで実際の遺伝子発現変化など生体内に及ぼす影響を詳細に検討できると考えた。

### ビタミン C と精子のメチル化

生体内でも精子のメチル化に注目した。精子のメチル化変動は生殖能力、続いて次世代へ経代的に引き継がれる可能性があるからである。男性不妊と精子のメチル化異常との関連は複数報告されており、特にインプリンティング領域の *H19*-DMR 低メチル化が指摘されている[41,42]。精子機能と mC の関連は報告されているが、hmC がどのような影響を与えるのかは不明である。ヒト精子には hmC は  $0.797/10^4$  塩基とごくわずかに存在しており[43]、加齢とともに増加することが報告されている[44]。精子奇形の一つである頭部円形精子症 (globozoospermia) の患者中で正常・異常、頭部円形精子を比較すると hmC の総量の変化は認めなかったが、正常コントロールと比較して異なる分布を示した[45]。精子の評価は形態、動きなど外見上の評価で行われているのが現状である

が、mC, hmC の評価が新たな指標になる可能性がある。また不妊男性に VC 補充を行なうことで精子の数や形態が改善したという報告があり[46-48]、VC 欠乏状態での精子の mC, hmC の変動を解析することにした。まず VC 欠乏による精子中 hmC の変化を dot blot で評価し、hMeDIP-seq を用いて hmC の豊富なゲノム領域同定と DhMR の検出を行い EnIGMA, glucMS-qPCR で確認を行うこととした。



## 方法

### ヘアピン型 DNA 合成

マウスゲノム中の *H19*-DMR 領域(chr7:142580029-142580514/GRCm38) を参考にして mC, hmC, C を含むヘアピン型 DNA を合成した (図 2)。ヘアピンを構成する合成 DNA フラグメントを 8.3 mM ずつ混合して 98°C 15 分の熱変性後、lamping 0.1°C/秒で 25°C までクーリングした。その後フラグメントを T4 DNA ligase で 16°C 2 時間の反応により ligation した。ヘアピンの逆鎖を Takara ExTaqHS (Takara) により 98°C 10 秒、95°C 30 秒、72°C 1 分、68°C 1 分で合成した。

fragment A: CGACTCTGTCTCAGGGGATCTGCATATGTTTGCA

GCATACTTTAGGTGGGCCTTGGCTTC

fragment B: p-AGAATX1 GGTTATAGGX2 GGGAGACATAGAAACTGCX3

GX4 GTGX5 GTGX6 GTCCACX7 GAAAC

低メチル型 : X1, X4: mC, X2, X3, X5, X6, X7: C

高メチル型 : X1, X3, X4, X5, X6, X7:mC, X2:C

モザイク型 : X<sub>1</sub>, X<sub>4</sub>: mC, X<sub>2</sub>, X<sub>7</sub>: C, X<sub>3</sub>, X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>: hmC

fragment C: p- CCCATAGCCATAAAAAGCAGAGATG

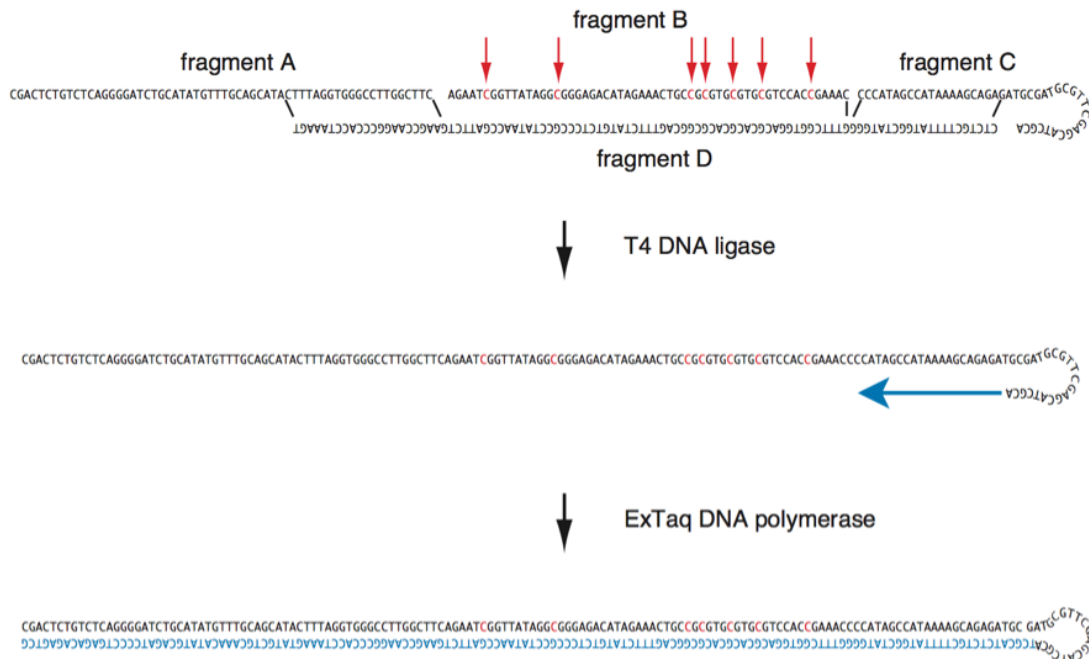
CGATGCGTTCGAGCATCGCA

fragment D: CTCT GCTTTTATGGCTATGGGGTTTCGGTGGACGCA

CGCACGCGGCAGTTTCTATGTCTCCCGCCTATAA

CCGATTCTGAAGCCAAGGCCACCTAAAGT

**A**



**B**



図2 DNMT1 反応確認に用いたヘアピン型合成 DNA

A. ヘアピン型 DNA の合成：DNA フラグメントを混合、アニーリングして fragment A-C を T4 ligase でライゲーションした。fragment C の 3' 末端をプライマーにして逆鎖を合成した。（青矢印はポリメラーゼ伸長方向、赤矢印は CpG）

B. bisulfite 後の合成 DNA 配列：CpG 以外の C は T に変換される。*Taq*  $\alpha$  I, *Bts* CI の認識部位を矢印で示す。

## BJ マウスゲノム

C57BL/6NcrSlc (B6)のオスとJapanese fancy mouse (JF1)メスを交配して得られたF1マウス大脳、肝臓組織よりAllPrep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。

## *SMP30* ノックアウトマウス、ゲノム抽出

VC 合成酵素である *SMP30/GNL* をノックアウトした C57BL/6NcrSlc マウス[49] 8 週齢雄 5 匹ずつをコントロール群 (1.5 g/L の VC 水、7 mg/day 摂取相当で野生型と同等)、欠乏群 (塩酸水) に分けて介入した[50]。1 回目欠乏実験では 8 週間介入 (交配なし)、2 回目は 16 週間介入 (14-16 週齢、18-20 週齢に交配) した。ペントバルビタール腹腔内投与下で後大静脈より全採血により安楽死させ、各臓器を採取した。短期間に改善しない 20%以上の急激な体重減少を認めた個体には人道的エンドポイントを適応し実験を中止して頸椎脱臼による安楽死をおこなうなど苦痛を最小限にするように配慮した。血漿、精巢、小腸の VC 測定を HPLC-ECD 法により行った[50]。マウス飼育および動物実験は東京都健康長寿医療センター分子老化制御老化制御研究チーム石神昭

人研究室で行った（実験承認番号 17073 号）。精巣上体を採取後 PBS 中で切開し精子を遊離した。分離した精子を 40mM dithiothreitol (DTT)、lysis buffer (0.1M Tris-HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 0.2M NaCl, 0.2% SDS) 中 Proteinase K 0.6mg/ $\mu$ l で加えて 55°C で 24 時間以上インキュベーションした。フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出で精製して精子ゲノムを抽出した。

## DNMT1 反応

大阪大学蛋白研究所エピジェネティクス研究室の田嶋正二教授から供与された recombinant human DNMT1 を使用した[51]。遺伝子組み換えタンパク実験は実験施設の承認を得て行われた（東京医科歯科大学遺伝子組換え生物等実験承認番号 2014-043A）。ヘアピン型ゲノム 200 ng（200ng 以下の場合には salmon sperm DNA を加えて総量を 200ng とした）を DNMT1 1  $\mu$ g とともに 50  $\mu$ l (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 0.2 mM S-adenosylmethionine (SAM), 0.01% BSA (Takara), 5% glycerol) 中で 37°C 15 分反応した。DNMT1 反応の評価のため、後述の合成 DNA を 3-4 fmol 加えて反応を行った。

## bisulfite 反応

bisulfite 反応液 130  $\mu$ l (sodium bisulfite 475mg/ml, 125mM hydroquinone, 0.3 M NaOH) と DNA 20  $\mu$ l (1  $\mu$ g 以下) を 98°C 10 分、64°C 2 時間半反応した。反応後 binding buffer 600  $\mu$ l (4.62 M guanidine thiocyanate, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 70% EtOH) と混合し Zymo Spin IC column にアプライして 15000 rpm 1 分間遠心、その後 washing buffer 100  $\mu$ l (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 70% EtOH) により洗浄後 desulphonate buffer 200  $\mu$ l (0.2 M NaOH, 80% EtOH) を加えて室温で 15 分脱スルホン化反応をした。その後遠心、washing buffer 200  $\mu$ l で 2 回洗浄し elution buffer 10  $\mu$ l (10 mM Tris-HCl pH 8.0) で 2 回溶出した。

## EnIGMA

ゲノム 1  $\mu$ g を制限酵素 (*Arhgap27* top strand は *Taq*  $\alpha$ I, *Arhgap27* bottom strand は *Bst* NI, *Nhlrc1* top strand は *Bfa* I, *Nhlrc1* bottom strand は *Cvi* QI, *Ptpn14*, *Zp1*, *Slit2*, *Zfp663* は *Hae* III, *Smtnl2* は *Bfa* I, *Ube2e2* は *Apo* I) で切断後、NEBNext Ultra II Endrepair/dA-Tailing Module (NEB) にて 20°C 30分、

65°C 30分でend-repair, dA-tailingを行った。次にNEBNext Ultra II Ligation Module(NEB)にてウラシルを含むlinkerをligation (20°C 30分、16°C 3時間以上) してヘアピン型DNAを合成した。USER enzyme (Uracil DNA glycosylase and Endonuclease VIII, NEB)で37°C 1時間処理してウラシルを切断後、Takara ExTaqHS (Takara)により98°C 15秒、96°C 45秒、72°C 5分、68°C 5分でヘアピンの逆鎖合成をおこなった。ヘアピンDNAにDNMT1反応後bisulfite反応を行い、MiSeq用アダプター付きの特異的なプライマー(表2)を用いてKOD Multi&Epi (Toyobo)でPCR反応 (94°C 2分の後、98°C 15秒、60°C 30秒、68°C 30秒を35サイクル(*Ptpn14*のみ32サイクル)、68°C 3分を行い増幅した。Nextera XT index kitを用いてPCR を5-8サイクル行いシーケンスはMiSeq (Illumina)を用いて行った。

U を含む linker DNA: p-ATGCGATGCGTTCGAGCATCGCAUT

+++++++ +++++++

(相補的な部分を灰色と+で示す)

表 2 : EnIGMA で用いたプライマー配列

EnIGMA primer	Primer 配列		シーケンス領域 (GRCm38)
MiSeq 用インデックス	F	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-	
	R	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-	
<i>Arhgap27</i> top strand	F	5'-TTTTAGATTAGGTGTTTGGATG	chr11: 103,333,922-103,333,851 (top strand)
EnIGMA primer	R	5'-CCCCAAACCAATATTTAAATAC	
<i>Arhgap27</i> bottom strand	F	5'-GGGGGGGGGGTTTTATTTTATTTAGTTTTTTAAAAG	
EnIGMA primer	R	5'-AAAAAAAAATCTCCACCTTAECTCC CTA AAAACC	
<i>Nhlrc1</i> top strand	F	5'-TTTTTTTTTAAATTGGTGTGT	chr13: 47,014,397-47,014,294 (top strand)
EnIGMA primer	R	5'-TCCCCCTTTTCTCCAACTAATATAC	
<i>Nhlrc1</i> bottom strand	F	5'-TAGTGAATTTATAGGGTTTGTATTGTGTTT TAAG	
EnIGMA primer	R	5'-TAAACCCACAAAACCTTACA CTATACCCCAAAACC	
<i>Ptpn14</i> EnIGMA primer	F	5'-TTTTAAAAGTAGTAGAGTTGTGAAGGAGAGAT	chr1: 189,731,592-189,731,668
	R	5'-AAAACACTACAAAATCAACCCAACAAAACCTTC	
<i>Smtnl2</i> EnIGMA primer	F	5'-TTTGAGTTGTGAAGGTTTTTAAGTTAGGTAG	chr11: 72,409,952-72,409,989
	R	5'-CCTCCAAATTAACA AAAAAACTAACTTTAA	
<i>Slit2</i> EnIGMA primer	F	5'-AGTTTTTAGTTTTTATAGGGATTGATATATTTGAA	chr5: 47,077,043-47,077,058
	R	5'-TTAATACACTTAAAAACAACAATATCCACTAAC	
<i>Ube2e2</i> EnIGMA primer	F	5'-AAATAAGAAATGTATAATGTAGGATTTGGAATATGG	chr14: 19,415,739-19,415,821
	R	5'-AACAAAAATACACAATATAAAACCTAAATATAAC	
<i>Zfp663</i> EnIGMA primer	F	5'-TTTGAGAGTTGAAAGTTGTTTATATAAAATTTGTATAAAAAG	chr2: 165,356,031-165,356,139
	R	5'-AAAACTATTTATACAAAACCTACACAAAAAC	
<i>Zp1</i> EnIGMA primer	F	5'-TTTTAGAGTGTATATGAAGGTAGGAGAGATT	chr19: 10,911,415 -10,911,467
	R	5'-TCTACAACTAACAACCTAAATCTAATCCTCA	

## 合成ヘアピン型 DNA の COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

EnIGMA の DNMT1 反応確認のため同じチューブ内で DNMT1 反応した前述のモザイク型合成 DNA (図 2) について bisulfite 反応後特異的プライマー



を用いて KOD Multi&Epi (Toyobo) で PCR 反応(94°C 2 分の後、98°C 15 秒、55°C 30 秒、68°C 30 秒を 30 サイクル、68°C 3 分)を行い増幅した。精製した PCR 産物について *Taq* αI, *Bts* CI(NEB)を用いて COBRA を行った。合成ヘアピン中の mC の逆鎖が DNMT1 によりメチル化されると *Taq* αI により切断されることにより DNMT1 のメチル化反応効率を評価した。また hmC の逆鎖が DNMT1 により誤ってメチル化されると *Bts* CI により切断されないことから DNMT1 の *de novo* メチル化能を評価した。それぞれの制限酵素で PCR 産物を切断して 2100 Bioanalyzer (Agilent) の DNA 1000 チップにより定量をおこなった。

#### dot blot

17.95 ng/μl の hmC を 7 個含む 57 mer 合成 DNA (図 2 中 fragment A, 分子量 17951.67, hmC 7 pmol/μl) を 100 ng/μl の hmC を含まない DNA で希釈して 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 0 fmol/μl の濃度を作成した。Qubit dsDNA BR assay (ThermoFisher Scientific) で定量した 1, 2 回目 VC 欠乏実験マウス (欠乏群、コントロール群を 5 匹ずつ、合計 20 匹) を 28.6 ng/μl に希釈した。ゲノム・検量線それぞれ 4.5 μl に 1 M NaOH を 0.5 μl 加えて 95°C 10 分間加熱後氷冷

を数分行った。その後 5 M CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> を 0.75 μl 加えて中和した。Hybond N+ メンブレン (GE) に 1.5 μl ずつスポット後 5 分風乾、80°C 30 分 bake、UV 70000 μj/cm<sup>2</sup> クロスリンクを行った。Blocking One (ナカライテスク) で 1 時間ブロッキング、TBST (0.1% tween20) バッファーでリンス後に Anti-hmC antibody (Active Motif #39770) (1/5000 CanGetSignal Solution 1 (Toyobo)) を室温で 2 時間一次抗体反応した。TBST バッファーでリンス、3 回洗浄後 Anti-rabbit IgG HRP (GE NA9340V) (1/5000 CanGetSignal Solution 2 (Toyobo)) を室温で 1 時間二次抗体反応した。ECL prime (GE), LAS4000mini (Fuji Film) で化学反応検出を行った。検量線から各サンプルの濃度を計算し、希釈操作による DNA ブロット量のばらつきを補正するため希釈後の DNA を再度 Qubit dsDNA HS assay で測定しシグナル強度の補正をおこなった。

### hMeDIP-seq

野生型 C57BL/6NcrSlc マウス (12 週齢)、1 回目欠乏実験マウス 2 匹ずつ (V3, V4, H3, H4) 計 4 匹の精子ゲノムを CovarisM220 (Covaris) で 200-400 bp をピークに剪断した。NEBNext Ultra II Endrepair/dA-Tailing Module (NEB), 同 Ligation Module (NEB) で Illumina シークエンス用アダプター (FastGene アダ

プターキット)を付加した。Diagenode hMeDIP kit を用いて抗 hmC 抗体による免疫沈降をプロトコールに従っておこなった後、GA II x (Illumina)でシーケンシング (36 cycle, single-end read) をおこなった。Bowtie2 でマッピング、SAM-tools でソート、インデックスを作成し MACS2[52]でピークコールと DhMR 検出、MEDIPS[53]で DhMR を検出した。

### glucMS-qPCR アッセイ

VC 欠乏・コントロールマウス精子ゲノム 1 µg を T4 Phage β-glucosyltransferase (T4-BGT,NEB)と UDP-glucose を用いてプロトコールに従って hmC を glycosylation して 5-ghmC へ変換した。NucleoMag で精製後 5-ghmC に感受性、すなわち切断効率が低下する制限酵素 *Msp*I (NEB)で処理をおこなった。処理後 DNA 60 ng に対して *Peg3*を no digestion control として、*Arhgap27*, *Nhlrc1*, *Ptpn14*, *Smtnl2*に対する特異的プライマー (表 3)で Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo), LightCycler 480 system (Roche)で quantitative PCR (95°C 30 秒の後、95°C 15 秒、60°C(*Arhgap27*, *Nhlrc1*)/63°C(*Ptpn14*, *Nhlrc1*) 30 秒、72°C 30 秒を 40 サイクル) をおこなっ

た。 *Peg3* でそれぞれ補正後、 T4-BGT を加えなかったコントロールとの差から切断部位の hmC の割合を算出した。

表 3 : glucMS-qPCR で用いたプライマー配列

glucMS-qPCR primer		Primer 配列	Position
<i>Peg3</i>	F	5'-TAAGCAATACGGGCAGCCT	chr7: 6,704,106-6,704,124
	R	5'-CCAACAAACTTCTGGTAACGC	chr7: 6,704,315-6,704,295
<i>Arhgap27</i>	F	5'-GTGAGGCGCTGCCTTGTCT	chr11: 103,333,805-103,333,823
	R	5'-CCAGACCAGGTGTTTGGATG	chr11: 103,333,942-103,333,923
<i>Nhlrc1</i>	F	5'-CTCTGCATCAGTCACCAGGA	chr13: 47,014,069-47,014,088
	R	5'-GGGAAGAGACGGGTCAAGAT	chr13: 47,014,335-47,014,316
<i>Ptpn14</i>	F	5'-ACACATTTGCGTCTCTTTCCACT	chr1: 189,731,560- 189,731,584
	R	5'-CGGTCAGAAAAGCTACAAAGTCAGCC	chr1: 189,731,710- 189,731,685
<i>Smtnl2</i>	F	5'-GCTTGAGTTGTGAAGGCCCTCC	chr11: 72,410,038-72,410,017
	R	5'-GCACATGTGACTCCAGGAACA	chr11: 72,409,869-72,409,892

## 結果

### 1. 合成 DNA を用いた EnIGMA の検証と DNMT1 反応の至適な条件の決定

EnIGMAで精度に最も影響するDNMT1反応の至適な条件をあらかじめ修飾状態がわかっている合成DNAで検討した。DNMT1反応効率が低い状況でヘミmCpGの逆鎖がメチル化されないと、メチル化されなかった塩基はhmCと判定されることになり、mCを過小評価、hmCを過大評価する。またDNMT1はヘミmCpG以外を*de novo*にメチル化する性質をもっておりDNMT1反応効率が高くなるにつれて*de novo*活性は上がる傾向にある。その結果、hmCpGの逆鎖をメチル化するとmCと判定され、CpGの逆鎖をメチル化すると判定不能になり精度が低下する。よってDNMT1反応活性と*de novo*活性を最適に保つことが必要であった。反応コントロールのためDNA量を200 ngと一定にし、少ない時にはsalmon sperm DNAを加えてDNA総量を一定にした。また活性がpH, 塩濃度に影響されるため[54]、様々な修飾パターンの合成DNAにより検討をおこなった。DNMT1活性に対する塩濃度の影響を検討するため、全てCpGがそれぞれmC, hmC, Cである3種類の合成DNAにおいてKCl濃度ごとに解析した結果、塩濃度が低いとメチル化効率が高いものの*de novo*活性が高くなる傾向にあり、

塩濃度が高いと *de novo* 活性が抑えられるがメチル化効率が下がる傾向にあった(図3A)。この実験から DNMT1 活性において KCl 50 mM を至適濃度とした。

次に合成DNAを用いて至適条件での EnIGMA の精度を確認した。図3B-Dに KCl 50 mM (至適濃度) での3種類の合成DNAでの解析を CpG ごとに示す。mC の93% は mC と判定することができ精度の高い解析ができた。一方で hmC の2.7%、C の1.5% が mC と判定されていた。C の0.3% は Bisulfite 反応により U(T) に変換されず C のままであった。このことから mC と判定された hmC、C のうち変換されなかった部分を除くと、それぞれ2.4%、1.2% は DNMT1 の *de novo* 活性による判定エラーと考えられた。mC と C が同一分子上に混在することが DNMT1 活性に影響する可能性があったため[54]、mC と C の両方を含む合成 DNA で確認したがいずれも93%以上の精度を確認し、混在そのものの影響は少ないことがわかった(図3E, F)。さらに同一分子上に mC、hmC、C が混在する状態でも mC、C については97%以上の精度で判定されたが、hmC の9-22% は mC と判定されており *de novo* のメチル化活性により hmC が少なく見積もられた。hmC は周囲に存在する C の修飾状態により DNMT1 反応への影響が認められた。

以上、EnIGMAの至適な反応条件を決定するとともに精度を検証することができた。ゲノムの解析をすすめるにあたり、DNMT1反応の確認をするため mC, hmC, Cを含む合成ヘアピンDNAをDNMT1反応液中に加えてspike in-controlとして反応効率を毎回確認できるようにし、精度コントロールを行った。

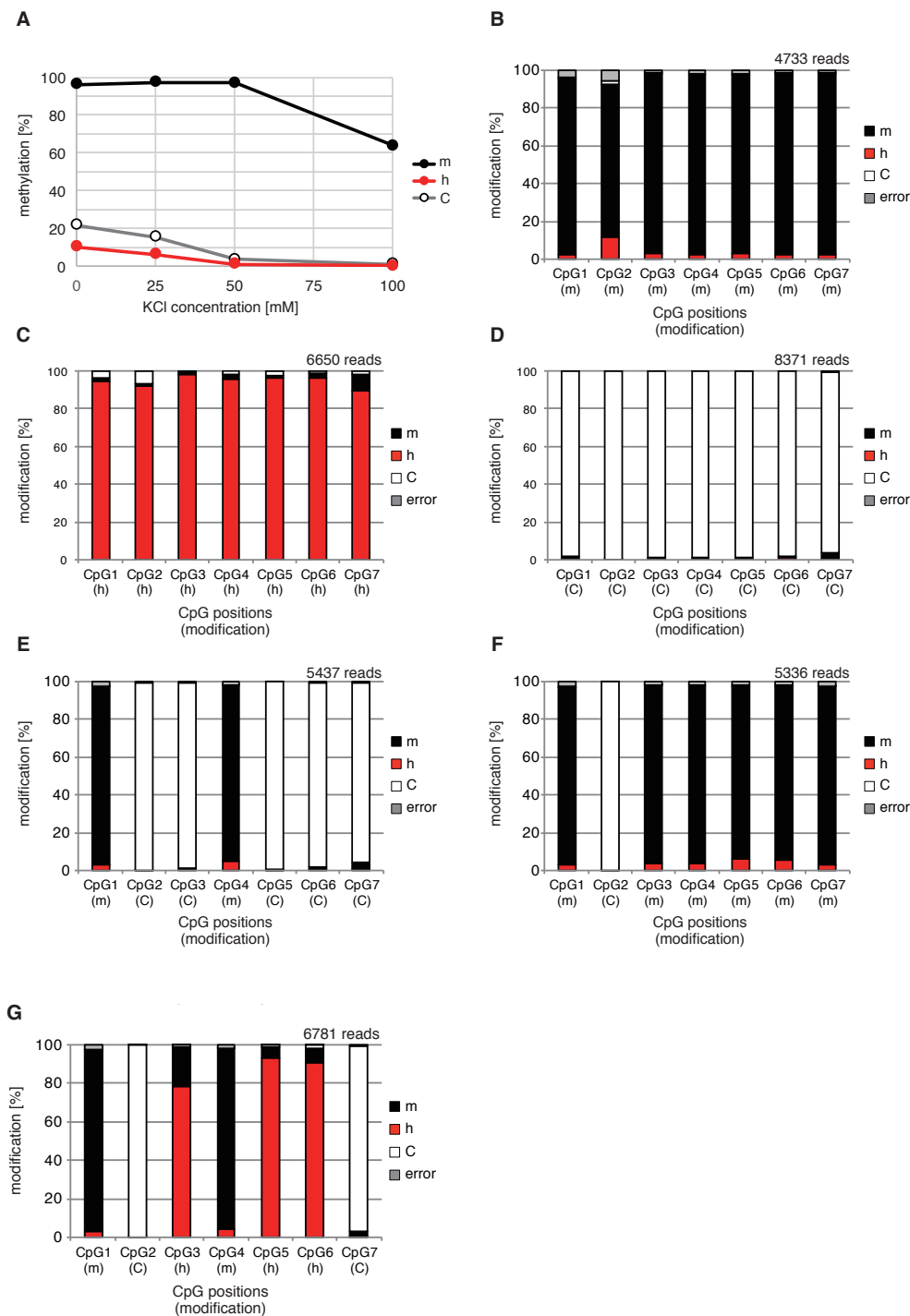


図3 合成DNAを用いたEnIGMA反応の検証

A. KCl濃度とDNMT1の反応

全てのCpGがそれぞれmC, hmC, Cの合成DNAについて検討した。KCl濃度が50 mMの時にmCの95%以上をmCと判定できており、かつhmC, Cに対してmCとの誤判定 (*de novo*のメチル化) が少なかった。

B-G. KCl 50 mMにおける各種配列の合成DNA解析結果

B: すべてmC、C: すべてhmC、D: すべて (非修飾) C

E: 低メチル型、F: 高メチル型、G:モザイク型

(Kawasaki et al. *Nucleic Acids Res.* 45, e24 (2017)より改変)



## 2. マウスゲノムを用いた hmC 検出における EnIGMA 解析と従来法との比較

### 検討

合成 DNA だけではなく実際のゲノムで EnIGMA 解析を施行し、従来からの解析方法との整合性を検証した。ES 細胞で hmC が豊富であると報告されていた *Arhgap27*, *Nhlrc1* 領域について [32] BJ マウス大脳ゲノム用いて EnIGMA により解析した。*Arhgap27* の top, bottom の両鎖をそれぞれ解析しシーケンスタデータからランダムに抜粋した 50 リードと、CpG ごとに修飾状態を集計して計算したメチル化比率を図 4A,B に示した。各リードは分子ごとのメチル化を反映しており、それぞれのリードで多様なメチル化パターンを認めた。CpG ごとに比率は異なるものの *Arhgap27* では mC が 17-38%、hmC が 3.5-25% であり、hmC が比較的多いことを確認した。*Nhlrc1* においても mC が 0-37%、hmC が 0-12% であった(図 4C, D)。*Nhlrc1* は解析領域中の多型により C56BL/6(B6)と JF1 のアレルを判別可能であり、亜種間で hmC の分布に差が認められた。glucMS-qPCR で *Arhgap27* CpG1 より 10 塩基はなれた CpG と *Nhlrc1* CpG7 の hmC を評価し、15-20%とそれぞれ EnIGMA と同等の結果が得られた (図 4E, F)。EnIGMA と従来からの評価法である glucMS-qPCR との整合性を確認することができた。

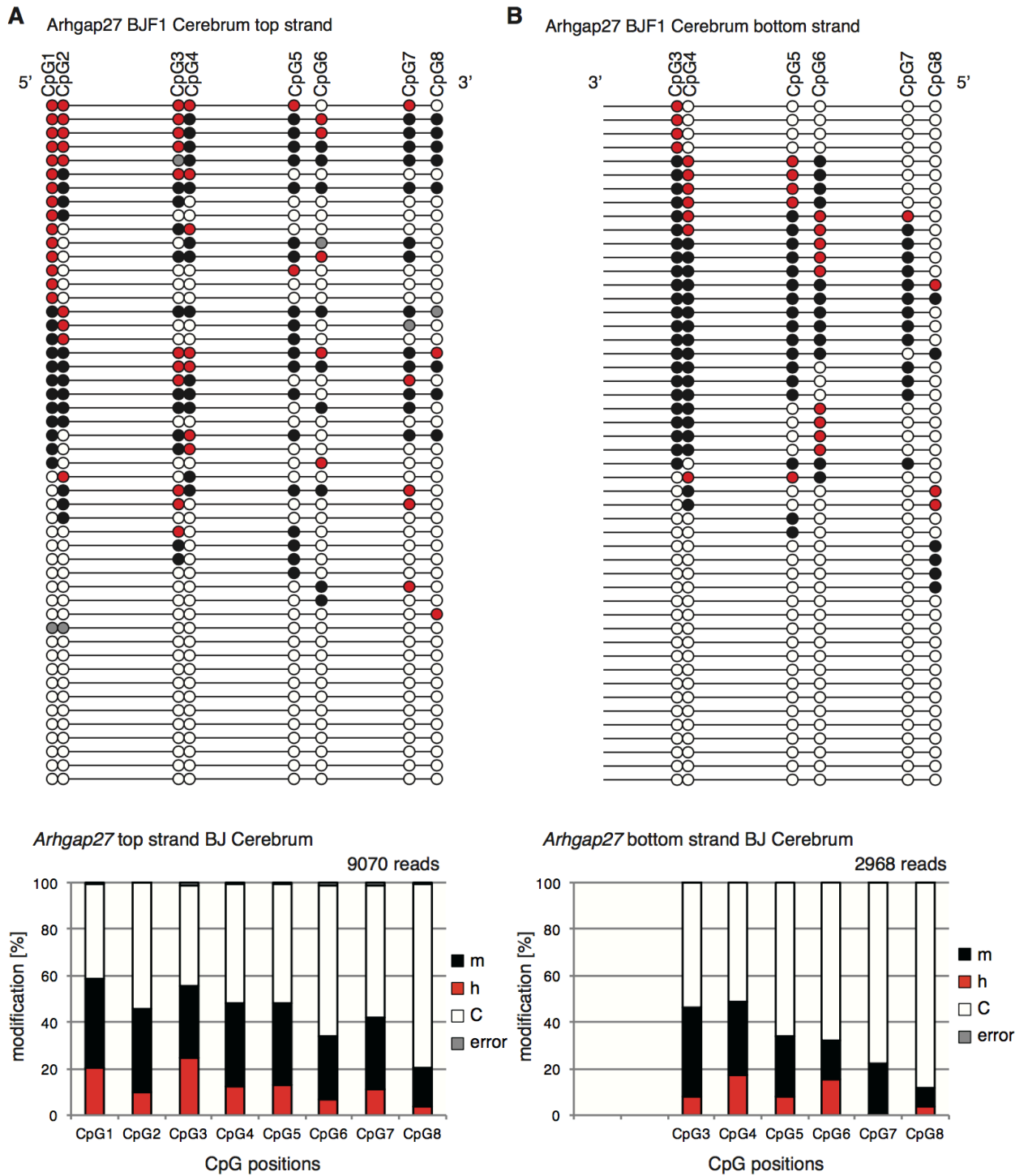
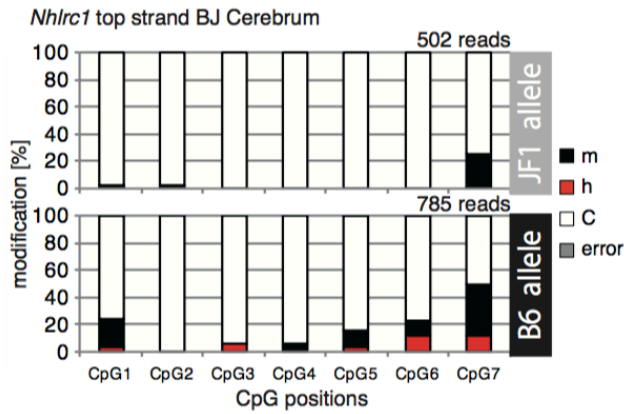


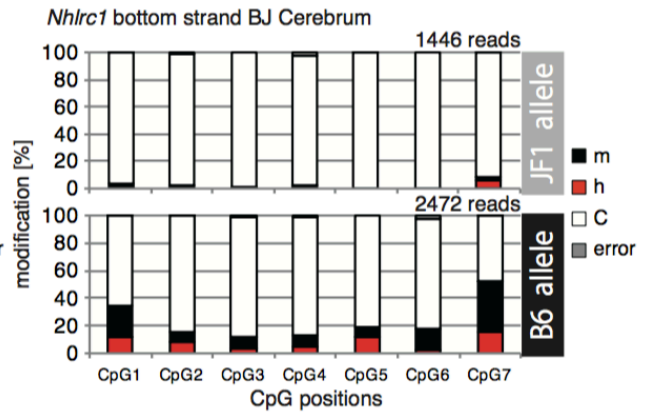
図4 BJマウス大脳ゲノムにおける *Arhgap27* (chr11:103,333,922-103,333,851), *Nhlrc1* (chr13:47,014,397-47,014,294) の両鎖での EnIGMA 解析結果と glucMS-qPCR による確認

A, B. EnIGMA 解析結果より *Arhgap27* の抜粋した 50 リードを図示：それぞれの塩基判定を mC (黒)、hmC (赤)、C (白) の円で示す。灰色は判定不能(err)であり図 1B の判定チャートに当てはまらないもの (元の配列が T、逆鎖が C) を示す。下段にそれぞれ集計した CpG ごとのメチル化比率を示す。

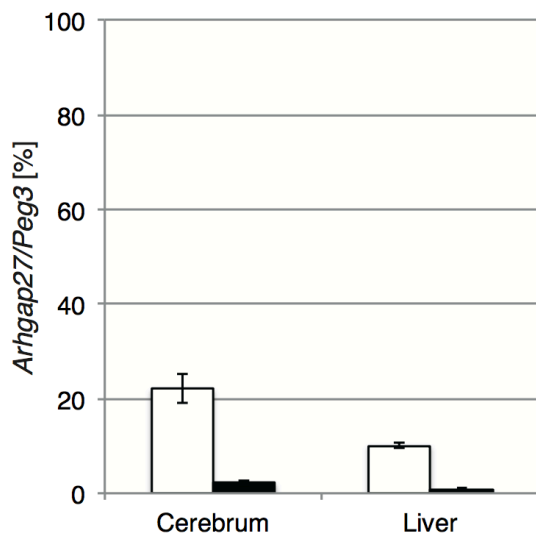
C



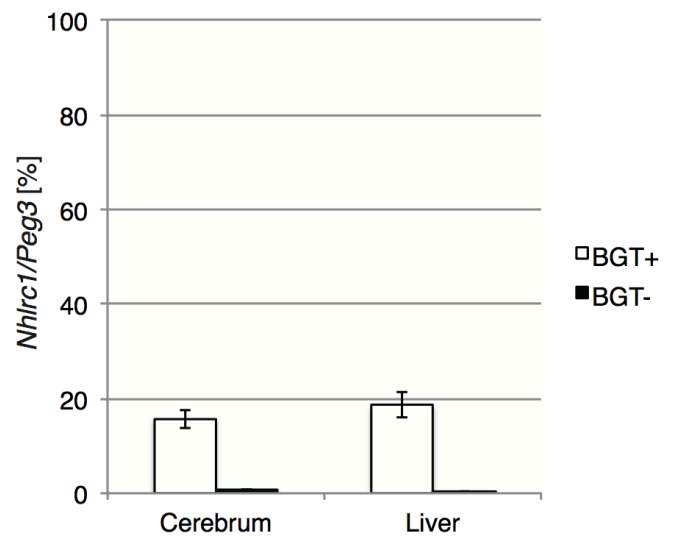
D



E



F



C, D. EnIGMA 解析による *Nhlrc1* の CpG ごとのメチル化比率

E, F. *Arhgap27* (E), *Nhlrc1* (F) の大脳、肝臓における glucMS-qPCR 結果より EnIGMA と同等の結果を得ることができた。

(Kawasaki et al. *Nucleic Acids Res.* 45, e24 (2017) より改変)

### 3. *SMP30* ノックアウトマウス精子の VC 欠乏実験後の組織中 VC 測定結果

マウスの精子形成周期が 35 日であることから 1 回目の VC 欠乏は VC 欠乏による易出血症状が出現する前の状態を評価するため欠乏期間を 8 週間、2 回目は VC 欠乏の影響を強くするため生存限界ぎりぎりの 16 週間まで延長した。生存限界は出血症状が現れる前段階である体重減少を目安とした。欠乏群とコントロール群の両群間で体重増加に有意差は認めなかった。血漿中 VC はコントロール群で平均 1 回目 29.51  $\mu\text{M}$ , 2 回目 34.61  $\mu\text{M}$ , 欠乏群で 1 回目検出感度以下、2 回目 0.29  $\mu\text{M}$  (コントロールの 0.8%) と 1 回目、2 回目ともに欠乏群では顕著な低下を認めた。一方、精巣組織では 1 回目のコントロール群で平均 1.42  $\mu\text{mol/g tissue}$ , 欠乏群で平均 0.053  $\mu\text{mol/g tissue}$  (コントロールの 3.8%) であった。2 回目の精巣組織でもコントロール群で平均 1.34  $\mu\text{mol/g tissue}$ 、欠乏群で 0.072  $\mu\text{mol/g tissue}$  (コントロールの 5.4%) でいずれも低下を認めていたが、小腸組織でのコントロール 2.25  $\mu\text{mol/g tissue}$ , 欠乏 0.03  $\mu\text{mol/g tissue}$  (コントロールの 1.3%) と比較すると VC の低下は緩やかであった。血漿中 VC は枯渇したが精巣の VC は残存する結果となった。

#### 4. dot blot によるマウス精子中の hmC 定量結果

1 回目、2 回目ともに VC 欠乏により精子中の hmC 総量は優位に低下が認められた (図 5)。いずれの群も 5 個体ずつ測定を行った。1 回目 (欠乏期間 8 週間) のコントロールマウスでは hmC 239.71 fmol/ $\mu$ g ゲノムであったが、欠乏マウスでは 122.95 fmol/ $\mu$ g ゲノムであった。2 回目 (欠乏期間 16 週間) も同様にコントロールの 177.18 fmol/ $\mu$ g ゲノムに対して 85.62 fmol/ $\mu$ g ゲノムと減少した。いずれもコントロールと比較して 50% 近く減少していた。VC 欠乏により精子の hmC は減少することが明らかになった。

群別 (平均)	hmC (fmol/μgゲノム)	比率、t検定
コントロール 1 回目	239.71	比率 : 0.51 p=0.0006
ビタミンC欠乏 1 回目	122.95	
コントロール 2 回目	177.18	比率 : 0.48 p=0.0138
ビタミンC欠乏 2 回目	85.62	

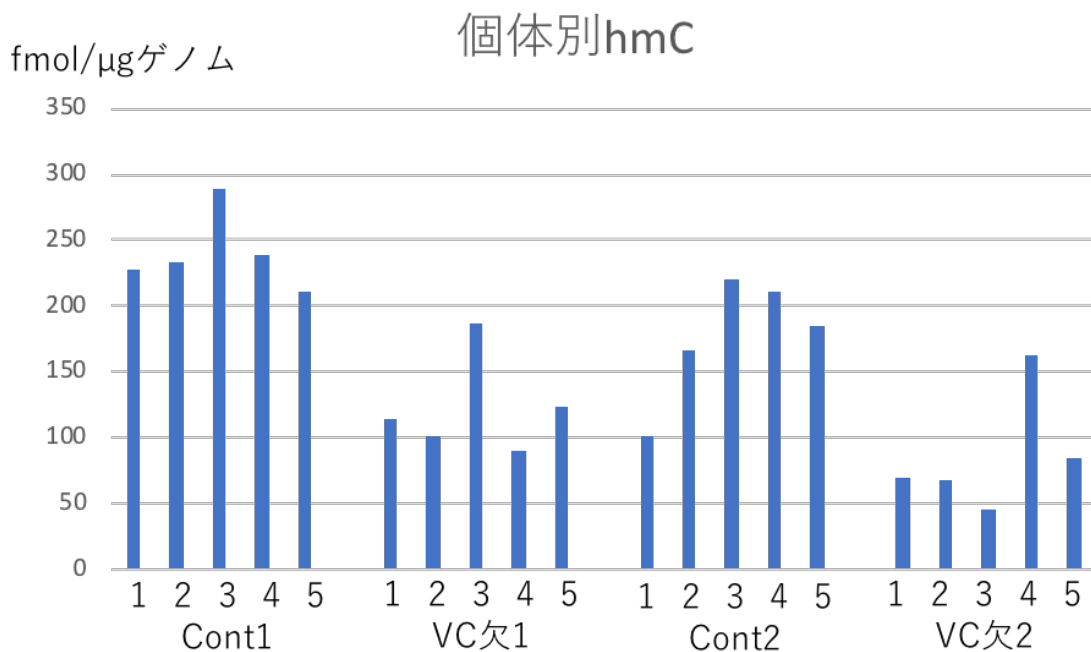
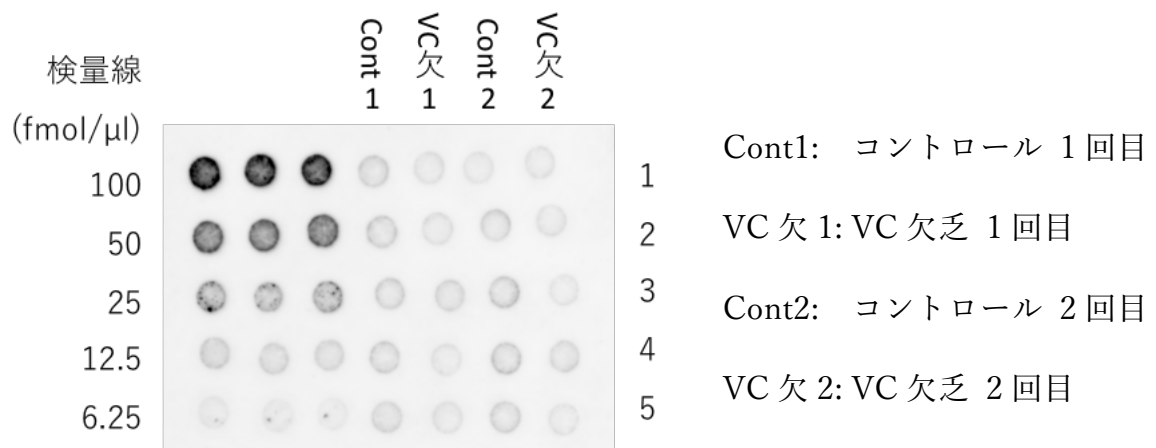


図5 dot blot による 1 回目、2 回目 VC 欠乏マウス精子における hmC 総量の評価  
100, 50, 25, 12.5, 6.25, 0 fmol/μl に希釈した合成 DNA の検量線より hmC (fmol/μg ゲノム) を計算した。1 回目、2 回目ともに著明に hmC の低下が認められた。

## 5. hMeDIP-seq によるピーク検出と glucMS-qPCR, EnIGMA による確認

精子中で hmC が変化する領域を同定するため、マウス精子中で hmC が豊富に存在する領域を同定した。1 回目のコントロールマウス 2 個体 (V3, V4 マウス)、12 週齢の野生型マウスについて MACS2 で hmC のピークを検出した。ピーク検出された *Chd3*, *Ptprs* について glucMS-qPCR による評価を行ったが hmC は検出できず偽陽性であった。さらに hMeDIP の手法による偽陽性を最小にするため、Gan et al.により報告された野生型マウス精子の glycosylation による hMeDIP-seq データ [28] を合わせてすべての個体で共通するピークを 5 領域検出した。

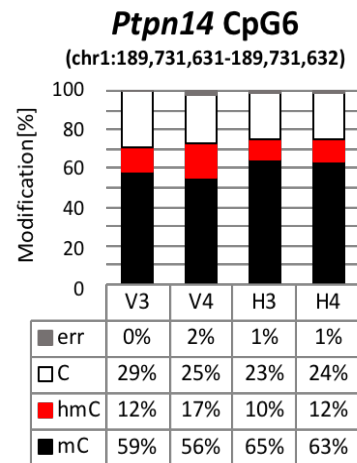
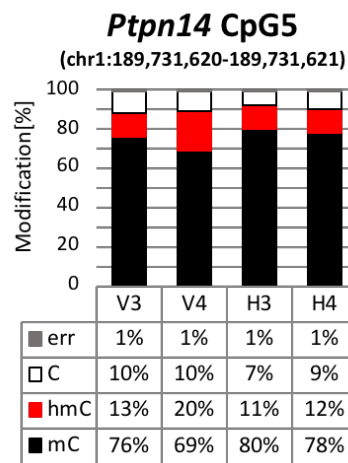
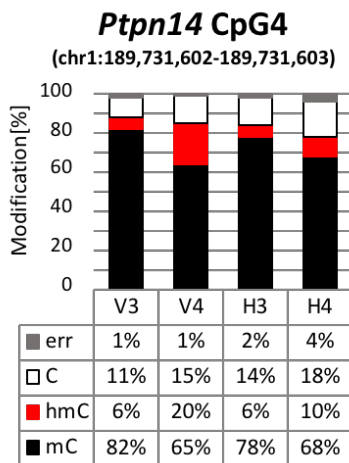
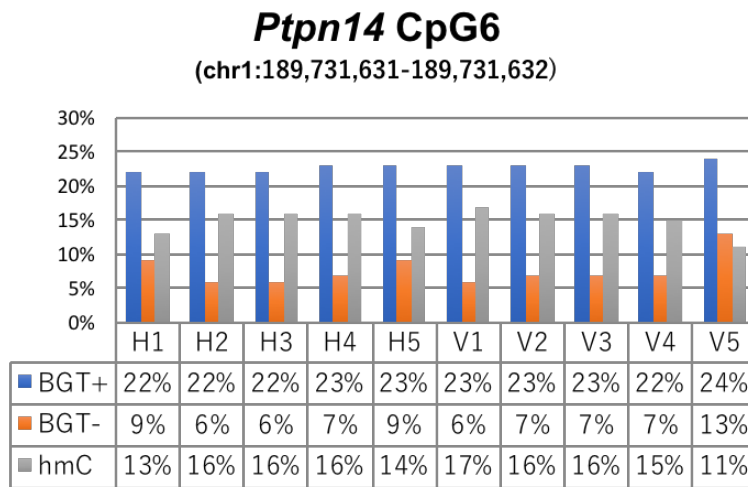
この領域のうち 2 領域、*Ptpn14* intron 1, *Smtnl2* intron 1 について glucMS-qPCR, EnIGMA を施行したが、2 群間で有意差は認めなかった(図 6)。

glucMS-qPCR では *Ptpn14* の CpG6 (chr1:189,731,631-189,731,632) においてコントロール 5 個体で 11-17%, 欠乏 5 個体で 13-16%、*Smtnl2* の CpG1 (chr11: 72,409,971-72,409,972) においてコントロール 5 個体で 5-10%, 欠乏 5 個体 (制限酵素処理が不十分な H5 を除く) で 3-9% といずれも有意差は認めなかった。(図 6A) EnIGMA は 2 群それぞれ 2 個体 (V3, V4, H3, H4) ずつ *Ptpn14* の CpG4-6, *Smtnl2* CpG1-2 の合計 5CpG で評価した(図 6B)。それぞ

れサンプル間のばらつきが多かったものの、*Ptpn14*で6-20%, *Smtnl2*で2-21%と両群に差は認めなかった。EnIGMA と glucMS-qPCR は概ね結果が一致していた。合成ヘアピン DNA による COBRA で DNMT1 活性 (*Taq αI*) 94-97%、*de novo* 活性 (*Bts CI*) 8-15%であり DNMT1 反応は問題なかった。この実験でマウス精子において hmC が局在する領域を特定することができたが、VC 欠乏による変化は認めなかった。



A



V3: 17489 reads  
 V4: 23410 reads  
 H3: 27686 reads  
 H4: 21479 reads

図6 hMeDIP-seqにより検出されたピークの解析結果

H1-H5: VC 欠乏 1 回目、V1-V5: コントロール 1 回目

A. *Ptpn14* の glucMS-qPCR と EnIGMA 解析結果

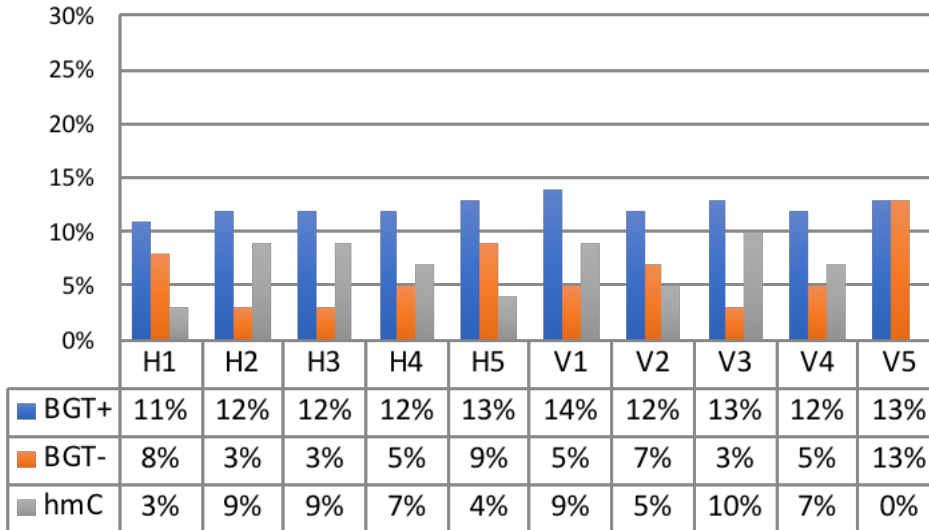
hmC に有意差は認められなかった。

B. *Smtnl2* の glucMS-qPCR と EnIGMA 解析結果

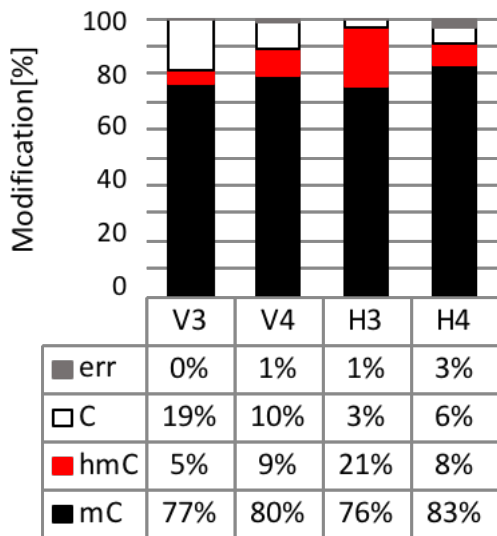
hmC に有意差は認められなかった。

B

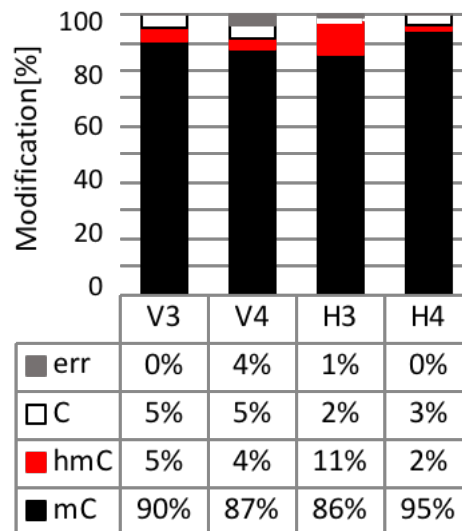
### ***Smtnl2* CpG1** (chr11:72,409,971-72,409,972)



### ***Smtnl2* CpG1** (chr11:72,409,971-72,409,972)



### ***Smtnl2* CpG2** (chr11:72,409,959-72,409,960)



V3: 46447 reads  
 V4: 47420 reads  
 H3: 59018 reads  
 H4: 47574 reads

## 6. hMeDIP-seq による DhMR 検出と EnIGMA による確認

欠乏マウス精子でコントロールマウス精子と比較して hmC が減少した領域を同定するために hMeDIP による DhMR 検出をおこなった。1 回目のコントロールマウス 2 個体 (V3, V4) に加えて欠乏マウス 2 個体 (H3, H4) に対して hMeDIP-seq を施行し、ChIP-seq 解析ツールである MACS2、MeDIP 解析ツールである MEDIPS の両方を用いて DhMR 検出を行ったが、hmC について有意差のある領域は検出できなかった(図 7A)。

MACS2 で検出した DhMR の 16 領域、MEDIPS で検出した DhMR の 11 領域について各々 2 領域について EnIGMA を行った。MACS2 で検出した 2 領域 (*Slit2* の 1 Mb 上流、*Zp1* 下流のともに intergenic region) では hmC がともに 2-3% と EnIGMA の検出限界以下であった(図 7A)。MEDIPS で検出した 2 領域 (*Ube2e2* の 0.5 Mb 上流、*Zfp663* の intron 4) でそれぞれ *Ube2e2* CpG8 で 8-20%、*Zfp663* CpG16 で 12-18% と hmC が豊富に存在する領域が認められたが 2 群で有意差は認められなかった(図 7B)。hMeDIP-seq では hmC が多い領域や DhMR を検出することはできなかった。

A

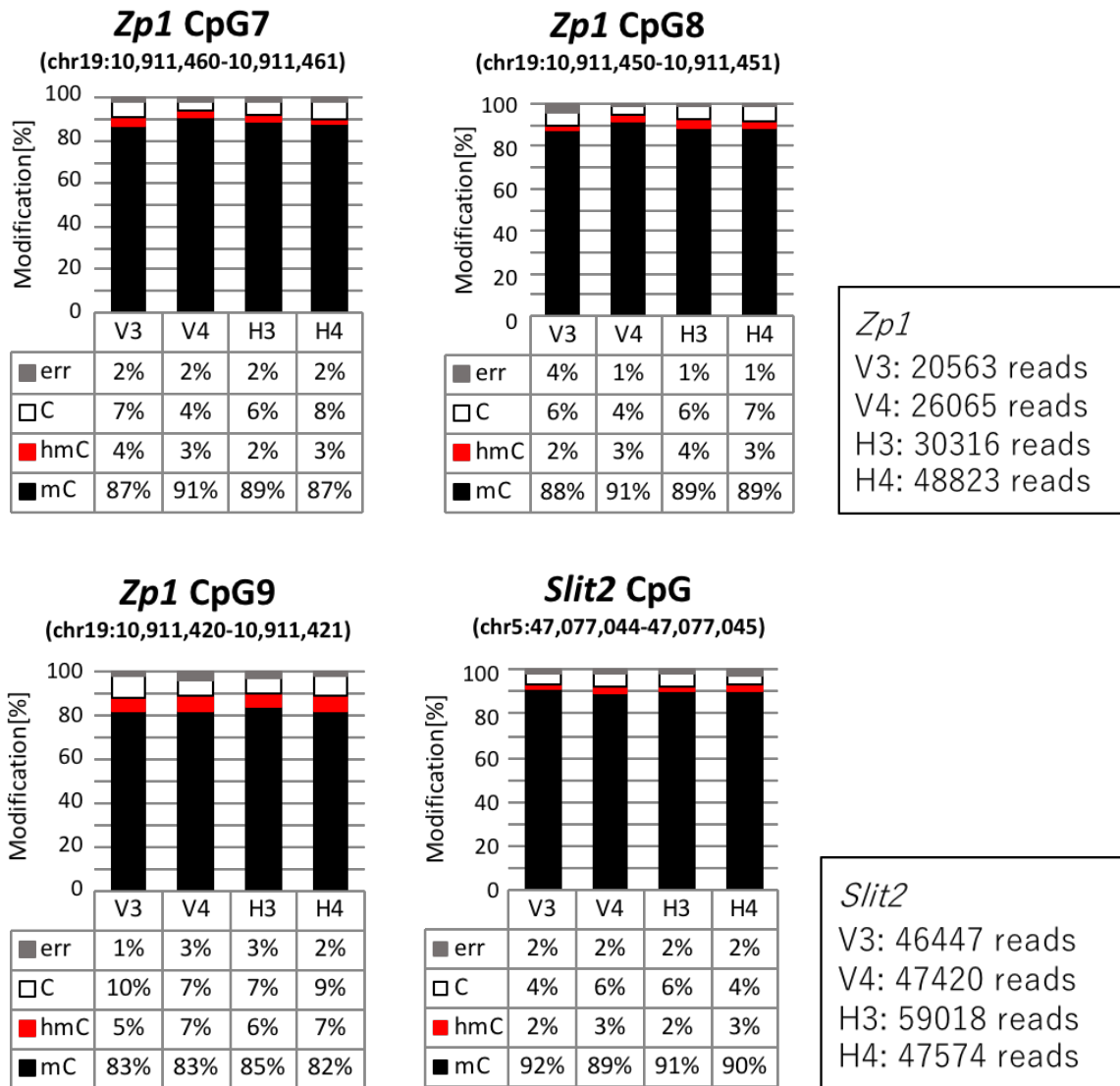


図7 hMeDIP-seqにより検出された DhMR の EnIGMA 解析結果

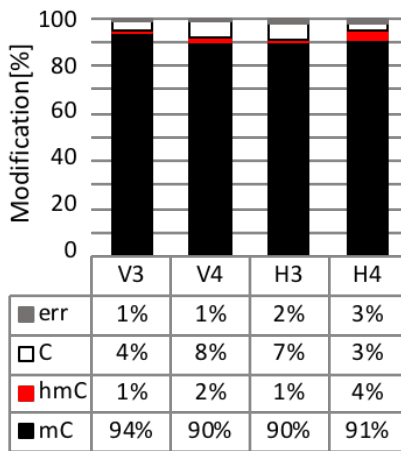
(H3, H4:VC 欠乏 1 回目、V3, V4:コントロール 1 回目)

- A. MACS2 で検出された DhMR (*Slit2*, *Zp1*)の解析：いずれの CpG にも mC, hmC ともに有意差は認めなかった。
- B. MEDIPS で検出された DhMR (*Ube2e2*, *Zfp663*)の解析：いずれの CpG にも mC, hmC ともに有意差は認めなかった。

B

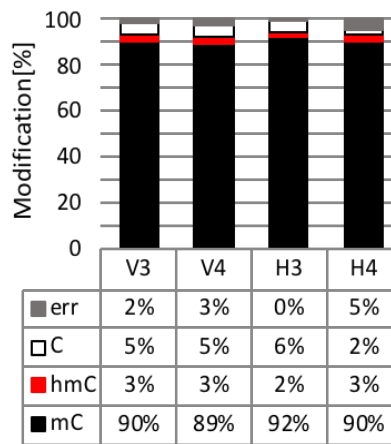
**Zfp663 CpG12**

(chr2:165,356,138-165,138,139)



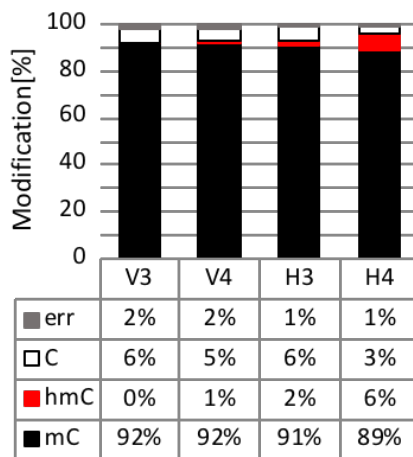
**Zfp663 CpG13**

(chr2:165,356,125-165,365,126)



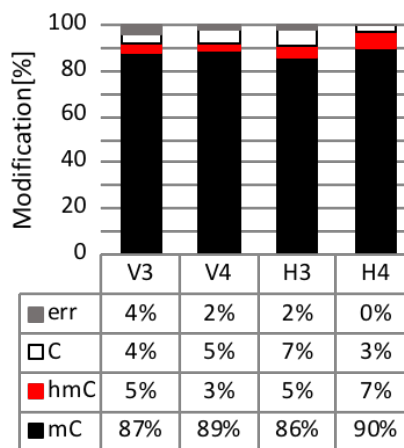
**Zfp663 CpG14**

(chr2:165,356,091-165,356,092)



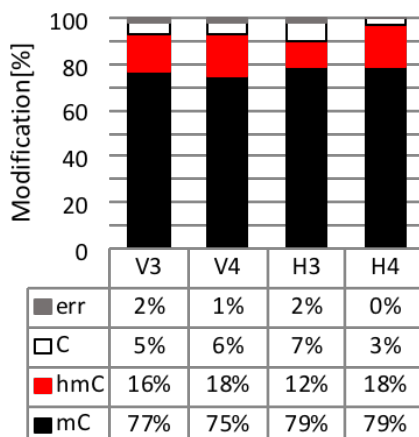
**Zfp663 CpG15**

(chr2:165,356,049-165,356,050)



**Zfp663 CpG16**

(chr2:165,356,043-165,356,044)

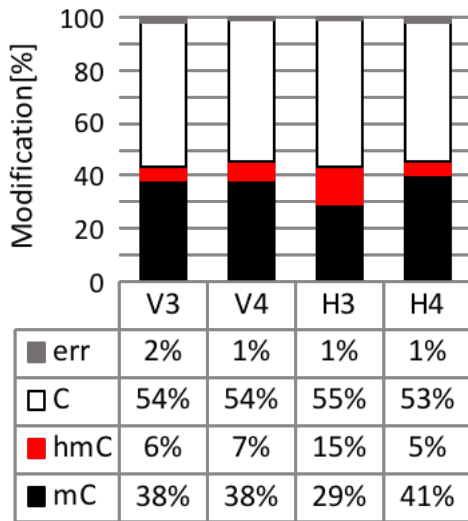


V3: 18869 reads  
 V4: 14799 reads  
 H3: 16428 reads  
 H4: 17140 reads

B

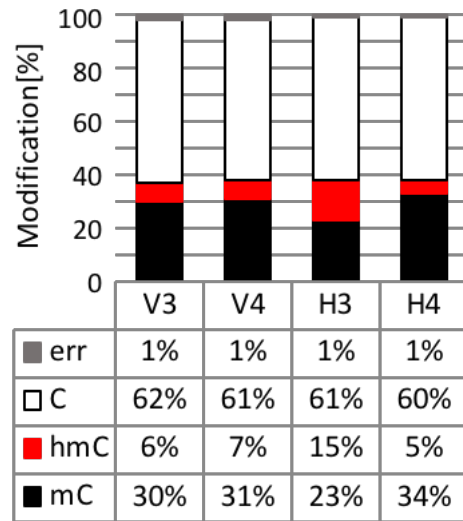
### *Ube2e2* CpG5

(chr14:19,415,796-19,415,797)



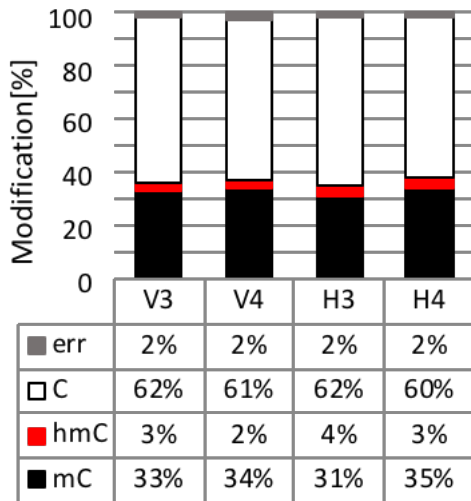
### *Ube2e2* CpG6

(chr14:19,415,786-19,415,787)



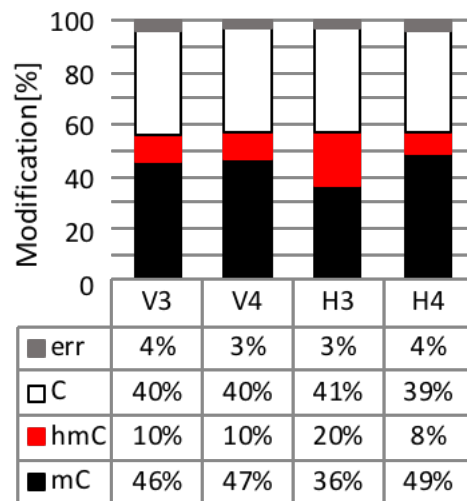
### *Ube2e2* CpG7

(chr14:19,415,758-19,415,759)



### *Ube2e2* CpG8

(chr14:19,415,740-19,415,741)



V3: 8877 reads  
 V4: 6055 reads  
 H3: 7041 reads  
 H4: 5169 reads

## 考察

hmC を同一分子上の塩基単位で同定する EnIGMA を開発した。合成 DNA による検討から mC, hmC, C を同時に、93%以上の精度で検出することができた。マウス大脳ゲノムを用いて hmC が豊富に存在する領域 (*Arhgap27*, *Nhlrc1*) を EnIGMA により解析した。EnIGMA により一分子ごとに mC, hmC, C の分布を評価することができ、かつ次世代シーケンサーを組み合わせることにより数千分子から数%しか存在しない hmC を定量することができた。EnIGMA の結果は従来の hmC の評価法である glucMS-qPCR でも同等の結果を得ることができた。合わせてわれわれのグループでおこなった実験において bisulfite-seq による mC と hmC の定量、TAB-seq による hmC の定量より同等の結果が得られることを確認しており [55]、EnIGMA を mC, hmC, C の新たな定量法として確立した。さらに EnIGMA に DNA 分子バーコード法を組み合わせることで GC 含有量などによる PCR 増幅の偏りに影響をうけにくくなり、分子ごとの修飾判定をより正確に行える余地がある [56]。

さらにマウス精子の解析を通してメチル化解析における EnIGMA の有用性を確認することができた。精子のように他の器官と比較して hmC が少ない細胞では、既存の hMeDIP では偽陽性が多く解析は困難であった。hmC 総量が

少ない状況では hmC 抗体による抗体反応では十分に DNA 濃縮ができない可能性が考えられる。EnIGMA では実際にゲノム上で hmC が 1-3%しか存在しない CpG を検出できており、glucMS-qPCR での結果と同等の結果であることを確認した。glucMS-qPCR は *Msp*I などの 5-ghmC に感受性のある制限酵素切断部位を有する CpG single site のみ評価可能であるのに対して、EnIGMA は選んだ任意の配列に対して解析することができる。また今回の EnIGMA は single locus 解析であったが、今後へアピン型 DNA のライブラリにメチル化アダプターを付加することでゲノムワイド解析に応用が可能である。より特異性の高いメチル化を目指して DNMT1 の反応条件を検討することで EnIGMA をさらに改良することができると考えている。現行ではゲノムの解析において合成 DNA による反応確認より mC の 5%が hmC と判定されていることから解析ノイズは 5%程度であると推定される。TAB-seq でも TET 反応により 5-10%程度は解析ノイズであること [33,57] と合わせると EnIGMA は従来の方法と比較して最も精度の高い方法の一つであるといえる。

VC 欠乏マウス精子のメチル化解析から VC 欠乏により精子の hmC が減少することが明らかになった。TET 活性の測定は VC 欠乏個体と同じ生体内の環境下で測定することが難しいが、VC 欠乏が TET 活性を低下させることを介し



て hmC が減少したと考えられた。欠乏が 8 週間、16 週間でも同程度の hmC の減少が認められた。マウスの精子形成周期が 35 日であることと合わせると精原細胞から精子の形成途中での VC 欠乏が精子のメチル化に影響を及ぼすこと、生存限界まで欠乏しても hmC は半分程度に保たれることがわかった。同じマウスで 14 週間欠乏した実験では肝臓、心臓、腎臓などの他臓器は小腸と同様にコントロールの 2%前後まで低下したのに対して、精巣では 5.6%と VC の残存が認められた[50]。VC は水溶性であり細胞中にトランスポーターを介して能動的に取り込まれる。トランスポーターの発現が他組織と比較して高いことにより VC 欠乏状況下でも濃度が保たれる可能性が考えられる。個体の生存限界まで欠乏期間を長くしたが精巣内の VC 濃度は検出感度以下にならず、生殖細胞である精子は VC 欠乏による影響を受けにくいことが示唆された。今回、VC 欠乏精子で数や運動能などの客観的な評価はおこなっていない。VC 欠乏群においても顕微鏡で確認する限り精巣上部より運動能をもつ精子を採取することができコントロール群と比較して抽出されたゲノム量に明らかな差は認めなかった。交配後に出生した 1 腹あたりの匹数にも大きな差は認めなかった。少なくとも若年マウスにおける VC 欠乏により乏精子症や不妊などの明らかな異常は認めなかった。

今回の解析から VC 欠乏で精子の hmC が減少することを明らかにしたが、減少した領域(DhMR)を特定することはできなかった。DhMR を hMeDIP-seq により検出できなかった原因として、精子の hmC が他臓器と比較して少ないことがあげられる。最も hmC が多かったコントロール 1 回目での測定値は精子で 239.71 fmol/ $\mu$ g ゲノム、小腸で 1618.62 fmol/ $\mu$ g ゲノムであった。マウスレファレンスゲノム(GRCm38)における CpG が 43,816,044 個 (48667 fmol/ $\mu$ g ゲノム) 存在していることから hmC は CpG 中の 0.49%と推定される。レファレンスゲノムにリピート配列の一部は含まれていないことからゲノム中の全 CpG 数はより多いと考えられるため実際の割合はより少ないものと思われる。ゲノムワイド解析へ EnIGMA を応用することでより高精度な解析ができ DhMR の特定につながる可能性がある。

## 結語

mC、hmC を同時に検出する新しい手法 EnIGMA を確立した。93%以上の精度で分子ごとの mC、hmC、C の分布をみることができ、10%以下の hmC を定量することができた。また、個体でも VC 欠乏により精子の hmC が減少することが明らかになった。今後 EnIGMA によるゲノムワイド解析により VC 欠乏精子の DhMR を同定できる可能性がある。

## 謝辞

本研究の機会を与えて下さり、多大なるご指導とあたたかなご助言を賜りました東京大学医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児科学教室教授、岡明先生に深謝申し上げます。

多大なるご指導とあたたかなご助言を賜りました東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野教授、石野史敏先生に深謝申し上げます。

本研究の初歩から導き、ご助言ご指導を賜りました東京医科歯科大学難治疾患研究所エピジェネティクス分野准教授、幸田尚先生、実験手法等について親身にご指導いただいた同教室助教の川崎佑季先生に心より深く御礼申し上げます。

EnIGMA に使用した DNMT1 を供与いただきました大阪大学蛋白研究所エピジェネティクス研究室の田嶋正二先生、末武勲先生、*SMP30* ノックアウトマウスの作成から飼育、動物実験を実施していただいた東京都健康長寿健康センター分子老化制御老化制御研究チーム研究部長の石神昭人先生に深く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Li, E., Beard, C., and Jaenisch, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**, 362-365 (1993).
2. Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**, 915-926 (1992).
3. Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q. M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., and Ecker, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**, 315-322 (2009).
4. Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsiganos, A., Ong, C. T., Low, H. M., Kin Sung, K. W., Rigoutsos, I., Loring, J., and Wei, C. L. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res* **20**, 320-331 (2010).
5. Zhang, Y., Rohde, C., Tierling, S., Jurkowski, T. P., Bock, C., Santacruz, D., Ragozin, S., Reinhardt, R., Groth, M., Walter, J., and Jeltsch, A. DNA

- methylation analysis of chromosome 21 gene promoters at single base pair and single allele resolution. *PLoS Genet* **5**, e1000438 (2009).
6. Ono, R., Taki, T., Taketani, T., Taniwaki, M., Kobayashi, H., and Hayashi, Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res* **62**, 4075-4080 (2002).
  7. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., and Rao, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930-935 (2009).
  8. Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., and Zhang, Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* **466**, 1129-1133 (2010).
  9. Globisch, D., Münzel, M., Müller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Brückl, T., Biel, M., and Carell, T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One* **5**, e15367 (2010).

10. Kriaucionis, S., and Heintz, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* **324**, 929-930 (2009).
11. Nestor, C. E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, D., Katz, E., Dixon, J. M., Harrison, D. J., and Meehan, R. R. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res* **22**, 467-477 (2012).
12. Pastor, W. A., Pape, U. J., Huang, Y., Henderson, H. R., Lister, R., Ko, M., McLoughlin, E. M., Brudno, Y., Mahapatra, S., Kapranov, P., Tahiliani, M., Daley, G. Q., Liu, X. S., Ecker, J. R., Milos, P. M., Agarwal, S., and Rao, A. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* **473**, 394-397 (2011).
13. Coppieters, N., Dieriks, B. V., Lill, C., Faull, R. L., Curtis, M. A., and Dragunow, M. Global changes in DNA methylation and hydroxymethylation in Alzheimer's disease human brain. *Neurobiol Aging* **35**, 1334-1344 (2014).
14. Chouliaras, L., Mastroeni, D., Delvaux, E., Grover, A., Kenis, G., Hof, P.

- R., Steinbusch, H. W., Coleman, P. D., Rutten, B. P., and van den Hove, D. L. Consistent decrease in global DNA methylation and hydroxymethylation in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* **34**, 2091-2099 (2013).
15. Condliffe, D., Wong, A., Troakes, C., Proitsi, P., Patel, Y., Chouliaras, L., Fernandes, C., Cooper, J., Lovestone, S., Schalkwyk, L., Mill, J., and Lunnon, K. Cross-region reduction in 5-hydroxymethylcytosine in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Aging* **35**, 1850-1854 (2014).
16. Bradley-Whitman, M. A., and Lovell, M. A. Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* **134**, 486-495 (2013).
17. Wang, F., Yang, Y., Lin, X., Wang, J. Q., Wu, Y. S., Xie, W., Wang, D., Zhu, S., Liao, Y. Q., Sun, Q., Yang, Y. G., Luo, H. R., Guo, C., Han, C., and Tang, T. S. Genome-wide loss of 5-hmC is a novel epigenetic feature of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* **22**, 3641-3653 (2013).
18. Reik, W., Maher, E. R., Morrison, P. J., Harding, A. E., and Simpson, S. A. Age at onset in Huntington's disease and methylation at D4S95. *J Med Genet* **30**, 185-188 (1993).



19. Jiang, D., Zhang, Y., Hart, R. P., Chen, J., Herrup, K., and Li, J. Alteration in 5-hydroxymethylcytosine-mediated epigenetic regulation leads to Purkinje cell vulnerability in ATM deficiency. *Brain* **138**, 3520-3536 (2015).
20. Yao, B., Lin, L., Street, R. C., Zalewski, Z. A., Galloway, J. N., Wu, H., Nelson, D. L., and Jin, P. Genome-wide alteration of 5-hydroxymethylcytosine in a mouse model of fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Hum Mol Genet* **23**, 1095-1107 (2014).
21. Mellén, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., and Heintz, N. MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell* **151**, 1417-1430 (2012).
22. Zhubi, A., Chen, Y., Guidotti, A., and Grayson, D. R. Epigenetic regulation of RELN and GAD1 in the frontal cortex (FC) of autism spectrum disorder (ASD) subjects. *Int J Dev Neurosci* **62**, 63-72 (2017).
23. Iossifov, I., O'Roak, B. J., Sanders, S. J., Ronemus, M., Krumm, N., Levy, D., Stessman, H. A., Witherspoon, K. T., Vives, L., Patterson, K. E., Smith, J. D., Paepker, B., Nickerson, D. A., Dea, J., Dong, S., Gonzalez, L. E.,

- Mandell, J. D., Mane, S. M., Murtha, M. T., Sullivan, C. A., Walker, M. F., Waqar, Z., Wei, L., Willsey, A. J., Yamrom, B., Lee, Y. H., Grabowska, E., Dalkic, E., Wang, Z., Marks, S., Andrews, P., Leotta, A., Kendall, J., Hakker, I., Rosenbaum, J., Ma, B., Rodgers, L., Troge, J., Narzisi, G., Yoon, S., Schatz, M. C., Ye, K., McCombie, W. R., Shendure, J., Eichler, E. E., State, M. W., and Wigler, M. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature* **515**, 216-221 (2014).
24. Gilissen, C., Hehir-Kwa, J. Y., Thung, D. T., van de Vorst, M., van Bon, B. W., Willemsen, M. H., Kwint, M., Janssen, I. M., Hoischen, A., Schenck, A., Leach, R., Klein, R., Tearle, R., Bo, T., Pfundt, R., Yntema, H. G., de Vries, B. B., Kleefstra, T., Brunner, H. G., Vissers, L. E., and Veltman, J. A. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. *Nature* **511**, 344-347 (2014).
25. Kumar, R., Ha, T., Pham, D., Shaw, M., Mangelsdorf, M., Friend, K. L., Hobson, L., Turner, G., Boyle, J., Field, M., Hackett, A., Corbett, M., and Gecz, J. A non-coding variant in the 5' UTR of DLG3 attenuates protein translation to cause non-syndromic intellectual disability. *Eur J Hum Genet*

- 24, 1612-1616 (2016).
26. Turner, T. N., Hormozdiari, F., Duyzend, M. H., McClymont, S. A., Hook, P. W., Iossifov, I., Raja, A., Baker, C., Hoekzema, K., Stessman, H. A., Zody, M. C., Nelson, B. J., Huddleston, J., Sandstrom, R., Smith, J. D., Hanna, D., Swanson, J. M., Faustman, E. M., Bamshad, M. J., Stamatoyannopoulos, J., Nickerson, D. A., McCallion, A. S., Darnell, R., and Eichler, E. E. Genome Sequencing of Autism-Affected Families Reveals Disruption of Putative Noncoding Regulatory DNA. *Am J Hum Genet* **98**, 58-74 (2016).
27. Matsubara, K., Kagami, M., Nakabayashi, K., Hata, K., Fukami, M., Ogata, T., and Yamazawa, K. Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions. *Clin Epigenetics* **7**, 90 (2015).
28. Gan, H., Wen, L., Liao, S., Lin, X., Ma, T., Liu, J., Song, C. X., Wang, M., He, C., Han, C., and Tang, F. Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine during mouse spermatogenesis. *Nat Commun* **4**, 1995 (2013).
29. Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C. H., Zhang, W., Jian, X., Wang, J., Zhang, L., Looney, T. J., Zhang, B.,

- Godley, L. A., Hicks, L. M., Lahn, B. T., Jin, P., and He, C. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* **29**, 68-72 (2011).
30. Pastor, W. A., Huang, Y., Henderson, H. R., Agarwal, S., and Rao, A. The GLIB technique for genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Protoc* **7**, 1909-1917 (2012).
31. Ficz, G., Branco, M. R., Seisenberger, S., Santos, F., Krueger, F., Hore, T. A., Marques, C. J., Andrews, S., and Reik, W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* **473**, 398-402 (2011).
32. Booth, M. J., Branco, M. R., Ficz, G., Oxley, D., Krueger, F., Reik, W., and Balasubramanian, S. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. *Science* **336**, 934-937 (2012).
33. Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C. X., Zhang, L., Kim, A., Li, X., Dai, Q., Shen, Y., Park, B., Min, J. H., Jin, P., Ren, B., and He, C. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome.

- Cell* **149**, 1368-1380 (2012).
34. Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., He, C., and Zhang, Y. Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* **333**, 1300-1303 (2011).
  35. Dickson, K. M., Gustafson, C. B., Young, J. I., Züchner, S., and Wang, G. Ascorbate-induced generation of 5-hydroxymethylcytosine is unaffected by varying levels of iron and 2-oxoglutarate. *Biochem Biophys Res Commun* **439**, 522-527 (2013).
  36. Minor, E. A., Court, B. L., Young, J. I., and Wang, G. Ascorbate induces ten-eleven translocation (Tet) methylcytosine dioxygenase-mediated generation of 5-hydroxymethylcytosine. *J Biol Chem* **288**, 13669-13674 (2013).
  37. Linster, C. L., and Van Schaftingen, E. Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J* **274**, 1-22 (2007).
  38. Mandl, J., Szarka, A., and Bánhegyi, G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. *Br J Pharmacol* **157**, 1097-1110 (2009).
  39. Blaschke, K., Ebata, K. T., Karimi, M. M., Zepeda-Martínez, J. A., Goyal,

- P., Mahapatra, S., Tam, A., Laird, D. J., Hirst, M., Rao, A., Lorincz, M. C., and Ramalho-Santos, M. Vitamin C induces Tet-dependent DNA demethylation and a blastocyst-like state in ES cells. *Nature* **500**, 222-226 (2013).
40. Yin, R., Mao, S. Q., Zhao, B., Chong, Z., Yang, Y., Zhao, C., Zhang, D., Huang, H., Gao, J., Li, Z., Jiao, Y., Li, C., Liu, S., Wu, D., Gu, W., Yang, Y. G., Xu, G. L., and Wang, H. Ascorbic acid enhances Tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals. *J Am Chem Soc* **135**, 10396-10403 (2013).
41. Marques, C. J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., and Sousa, M. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* **14**, 67-74 (2008).
42. Dong, H., Wang, Y., Zou, Z., Chen, L., Shen, C., Xu, S., Zhang, J., Zhao, F., Ge, S., Gao, Q., Hu, H., Song, M., and Wang, W. Abnormal Methylation of Imprinted Genes and Cigarette Smoking: Assessment of Their Association With the Risk of Male Infertility. *Reprod Sci* (2016).
43. Guz, J., Gackowski, D., Foksinski, M., Rozalski, R., and Olinski, R.

- Comparison of the absolute level of epigenetic marks 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine, and 5-hydroxymethyluracil between human leukocytes and sperm. *Biol Reprod* **91**, 55 (2014).
44. Jenkins, T. G., Aston, K. I., Cairns, B. R., and Carrell, D. T. Paternal aging and associated intraindividual alterations of global sperm 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine levels. *Fertil Steril* **100**, 945-951 (2013).
45. Wang, X. X., Sun, B. F., Jiao, J., Chong, Z. C., Chen, Y. S., Wang, X. L., Zhao, Y., Zhou, Y. M., and Li, D. Genome-wide 5-hydroxymethylcytosine modification pattern is a novel epigenetic feature of globozoospermia. *Oncotarget* **6**, 6535-6543 (2015).
46. Dawson, E. B., Harris, W. A., Teter, M. C., and Powell, L. C. Effect of ascorbic acid supplementation on the sperm quality of smokers. *Fertil Steril* **58**, 1034-1039 (1992).
47. Greco, E., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., and Tesarik, J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* **26**, 349-353 (2005).
48. Colagar, A. H., and Marzony, E. T. Ascorbic Acid in human seminal

- plasma: determination and its relationship to sperm quality. *J Clin Biochem Nutr* **45**, 144-149 (2009).
49. Amano, A., Tsunoda, M., Aigaki, T., Maruyama, N., and Ishigami, A. Effect of ascorbic acid deficiency on catecholamine synthesis in adrenal glands of SMP30/GNL knockout mice. *Eur J Nutr* **53**, 177-185 (2014).
50. Kondo, Y., Sakuma, R., Ichisawa, M., Ishihara, K., Kubo, M., Handa, S., Mugita, H., Maruyama, N., Koga, H., and Ishigami, A. Potato chip intake increases ascorbic acid levels and decreases reactive oxygen species in SMP30/GNL knockout mouse tissues. *J Agric Food Chem* **62**, 9286-9295 (2014).
51. Takeshita, K., Suetake, I., Yamashita, E., Suga, M., Narita, H., Nakagawa, A., and Tajima, S. Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9055-9059 (2011).
52. Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C. A., Eeckhoute, J., Johnson, D. S., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Myers, R. M., Brown, M., Li, W., and Liu, X. S. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**, R137 (2008).



53. Lienhard, M., Grimm, C., Morkel, M., Herwig, R., and Chavez, L. MEDIPS: genome-wide differential coverage analysis of sequencing data derived from DNA enrichment experiments. *Bioinformatics* **30**, 284-286 (2014).
54. Takahashi, S., Suetake, I., Engelhardt, J., and Tajima, S. A novel method to analyze 5-hydroxymethylcytosine in CpG sequences using maintenance DNA methyltransferase, DNMT1. *FEBS Open Bio* **5**, 741-747 (2015).
55. Kawasaki, Y., Kuroda, Y., Suetake, I., Tajima, S., Ishino, F., and Kohda, T. A Novel method for the simultaneous identification of methylcytosine and hydroxymethylcytosine at a single base resolution. *Nucleic Acids Res* **45**, e24 (2017).
56. Ogawa, T., Kryukov, K., Imanishi, T., and Shiroguchi, K. The efficacy and further functional advantages of random-base molecular barcodes for absolute and digital quantification of nucleic acid molecules. *Sci Rep* **7**, 13576 (2017).
57. Yu, M., Hon, G. C., Szulwach, K. E., Song, C. X., Jin, P., Ren, B., and He, C. Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat*

*Protoc 7*, 2159-2170 (2012).