

DNA メチル化の生化学

原核生物と真核生物の DNA メチル化修飾

DNA のシトシン塩基 5 位の炭素のメチル化 (5mC) は DNA が遺伝情報の本体であることが明らかになるかならないかの年、1948 年にはすでに仔牛胸腺にその存在が同定されている (1)。それに続いて原核生物でも DNA メチル化修飾が見つかった。原核生物ではシトシン 5 位の炭素のメチル化以外にもアデニン 6 位の N メチル化 (N6-mA) とシトシン 4 位のアミノ基 (N4-mC) もメチル化修飾を受けるのに対して、真核生物ではシトシン塩基の 5 位だけがメチル化修飾を受ける。

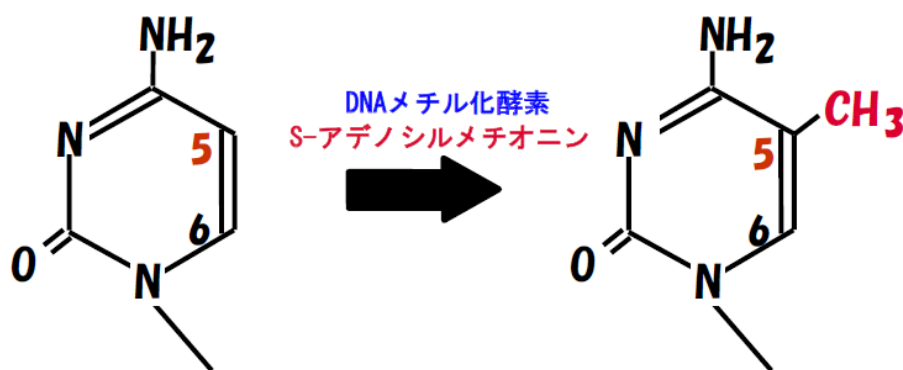


図1. ゲノム中のシトシン塩基の5位の炭素はDNAメチル化酵素の働きにより、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として、メチル化修飾を受ける。

原核生物の DNA メチル化はその発見が真核生物に遅れたが、メチル化酵素の同定やその機能については、その大部分が 1960 年代には明らかにされている。細菌では多くの DNA メチル化酵素が、制限-修飾系として存在している。細菌は一般に塩基配列特異的な DNA 切断酵素、エンドヌクレアーゼ (制限酵素)、を発現するとともに、その配列をメチル化する酵素 (修飾酵素) を同時に発現している。メチル化修飾を受けた DNA は制限酵素による切断を免れ、自らのゲノムを切断することはない。このメチル化修飾によって細菌の天敵であるバクテリオファージの感染を防御していると考えられている。原核生物のメチル化修飾は生体防御機構の一つである。

大腸菌では GATC 配列の中のアデニン 6 位の N がメチル化修飾を受ける。Dam メチル化と呼ばれるこの修飾は、複製過程で合成に間違いが起きた時、どちらの鎖がもとの鎖であるのかを見分ける目印となっている。ただ、どうも機能はこれだけにとどまらず、複製のタイミングや転写抑制など、真核生物で見

られる DNA メチル化修飾の機能に似た形質も観察されている (2)。

原核生物の DNA メチル化に対して、高等真核生物ではシトシン塩基の 5 位の炭素だけがメチル化修飾を受け、生理的な条件下で他の塩基や個所の修飾はない。DNA メチル化修飾は、選択的に結合するタンパク質とクロマチンの高次構造の制御を介して、遺伝情報の読み取りを抑制している。哺乳類や高等植物では、レトロトランスポゾンなど、ゲノムに組み込まれた外来ウイルスの残骸がメチル化され、不活性化されていることから、原核生物で見られた生体防御機構であるとの説もあるが (3)、一般には、遺伝情報の発現抑制機構であると考えられる (4)。

シトシンのメチル化機構

シトシン 5 位のメチル化反応は *S*-アデノシル-L-メチオニンをメチル基供与体、DNA のシトシン塩基をメチル基受容体とする 2 基質反応である。反応機構は、高等真核生物での解析が多くないものの、原核生物のものと同様であると考えられる。すなわち、DNA メチル化酵素の触媒活性中心にあるシステイン残基の -SH が求核試薬としてシトシン塩基ピリミジン環の 6 位の炭素をアタックし、反応中間体として共有結合する。これが 5 位の炭素を活性化して、*S*-アデノシル-L-メチオニンのメチル基の転移を促す。これに続いて、5 位のプロトンは酵素の塩基性アミノ酸により抜き取られ、その結果酵素はシトシンから離れる (5)。

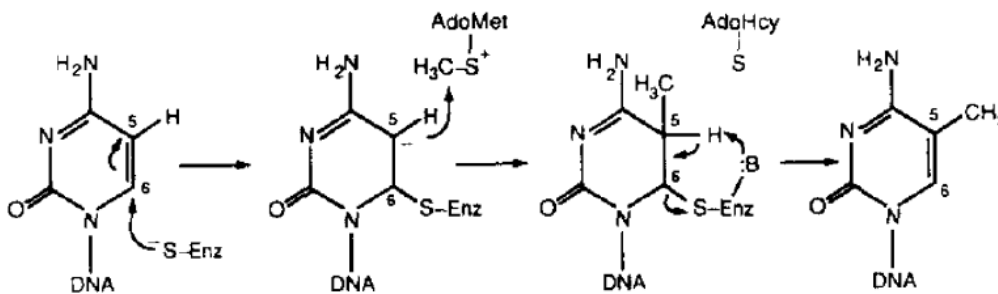


図2. DNAメチル化酵素の反応機構(文献5より)

この DNA メチル化反応を行う触媒領域は、原核生物から哺乳類まで 10 のよく保存されたモチーフから構成されている。中でも I、IV、VI、VIII、IX、X の 6 モチーフは全てのシトシンメチル化酵素でよく保存されている。モチーフ I が *S*-アデノシル-L-メチオニンの結合に寄与し、モチーフ VI に保存されている

PC がシトシン 6 位の炭素と反応中間体として共有結合する。モチーフ VIII と IX の間はメチル化酵素間で配列が似ていない。この配列で標的の塩基配列を選択的に認識している (target recognition domain; TRD)。

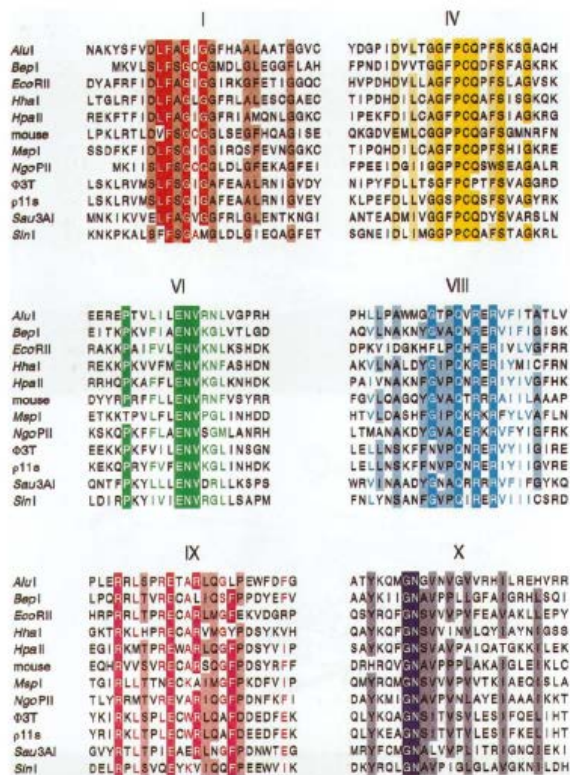


図3. 原核生物から哺乳類まで保存された10のモチーフのうち、特によく保存されている6モチーフのアミノ酸配列。Mouseとあるのは、マウスDnmt1よりとった。ほかは原核生物のシトシンメチル化酵素よりとった。(文献5より)

触媒活性に *S*-アデノシル-L-メチオニンが先に結合するのか、あるいは、DNA (シトシン塩基) が先に結合するのかなどの問題は個々のメチル化酵素で異なる可能性はあるが、触媒自身の反応機構はどのメチル化酵素でも大きな差はないと考えられる。

真核生物におけるシトシン (DNA) のメチル化修飾と進化

ゲノム中のシトシン塩基のメチル化修飾は、真核生物すべてに普遍的に存在するわけではない。もっとも単純な真核生物である酵母や、分子生物学の研究材料としてよく使われる線虫には DNA メチル化修飾は存在しない。昆虫であるショウジョウバエには存在するものの、限定された幼虫期にだけ存在する。これは、DNA メチル化修飾が、原核生物から真核生物に進化を遂げた段階でもともと存在しないで、さらに高等な生物種で新たに獲得されたわけではなく、酵母や線虫では必要がなかったために失われたと考えられる。例えば、同じ昆

虫でもコオロギやミツバチには DNA メチル化修飾が明確に存在する。ミツバチでは働き蜂の DNA メチル化を阻害すると、女王蜂となることが報告されている (6)。赤パンカビのような菌類にも DNA メチル化修飾は存在するが、DNA メチル化酵素を潰して、DNA メチル化修飾をなくしても、特に目立った形質は示さない (7)。DNA のメチル化修飾の機能は、必ずしも一様ではなく、生物種によって様々である可能性が高い。進化の進んだ脊椎動物以降は DNA のメチル化修飾は生命維持に必須で、特に哺乳類では胚発生にとり必須であり、これが乱されると致死となる。

DNA のメチル化修飾が生物の進化にとって必然であったのかを証明することはもちろんできないが、進化の系統樹の先端に位置する高等植物や哺乳類で特に発達しており、生命維持に欠くことができないことを考えると、進化にとって有利であったと考えられる。DNA のメチル化修飾は他のエピジェネティックな修飾である、ヒストンのアセチル化やメチル化に比較すると安定であり、一旦付加されると次世代の細胞に継承され、容易に外れることはない。この安定な修飾を遺伝情報の発現抑制に利用することによって獲得した利益は何であろうか？これには2つのことが考えられる。

1. 動く遺伝子と DNA メチル化

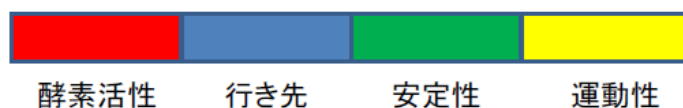
一つは、ヒトのゲノムの約半分を占めるレトロトランスポゾンの不活性化である。ゲノムにレトロトランスポゾン（動く遺伝子）を獲得したことは、遺伝子の再配分によって新しい遺伝子（タンパク質）が創出され、種の進化を著しく早める効果があったと考えられる。

しかし、レトロトランスポゾンは両刃の刃である。ゲノムの変化が、個体の生殖年齢に達するまでに頻繁に起きたのではまずい。このため外来の配列で、しかも動き回るレトロトランスポゾンを制御する機構が必要になる。これに DNA のメチル化が使われたとする説である。ただ、原索動物であるホヤでは、確かにゲノムのメチル化修飾は存在するのだから、ゲノムがもつレトロトランスポゾンは全くメチル化されておらず、遺伝子のプロモーターのメチル化も観察されない (8)。メチル化されているのは遺伝子本体 (gene body) に限られる。このように、かなり高等な原索動物でも、DNA メチル化による遺伝情報制御機能は確立していないように見える。

2. 組織特異的遺伝子の発現と DNA メチル化

さて、もう一つは、組織特異的な遺伝子の発現制御の補助機能である。哺乳類では複雑な体制を実現させるために、組織に特異的な遺伝子を発現させている。例えば、血清アルブミンは肝臓だけで発現しているし、インシュリンは膵臓でといった具合である。この時、発現しない組織特異的な遺伝子は DNA メチル化修飾を受けて、全く発現できないクロマチン状態におかれているのが一般的である。DNA メチル化を、いわば、整理箱のように使い、ある組織で発現させる遺伝子群はメチル化せず、それ以外は間違っても発現しないように DNA メチル化が抑制している。これは、限られた遺伝子の数で複雑な体制を実現させるためにとられた戦略である。ゲノムプロジェクトで明らかになったように、大腸菌の遺伝子は 10,000 であるのに対して、ヒトでは約 25,000 とされている。

1. 古い蛋白質の機能単位を組み合わせて新しい大きな蛋白質を作る



2. 少しずつ違う配列単位(エクソン)を組み合わせて似た蛋白質を作る

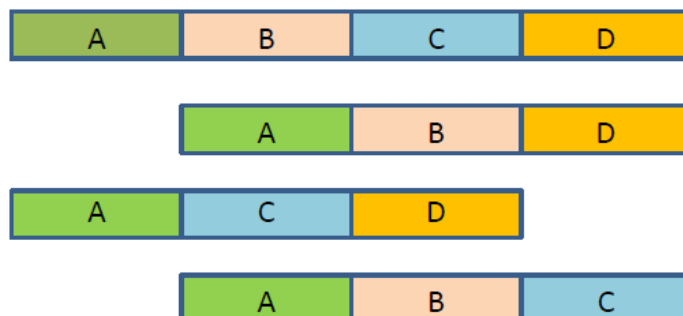


図4. 高等真核生物の進化を可能にさせた戦略

その体制の複雑さの違いからすると、遺伝子の数の差が小さいことに驚く。ただ、ひとつ一つの遺伝子がコードするタンパク質の大きさを比べると、ヒトの方が格段に大きい。これは、進化の過程でいろいろな遺伝子のパーツが寄せ集められ、新しい機能を獲得したタンパク質が多数できてきたことによる。例えば、下等な生物から保存された触媒活性を持つ配列に、その機能を調節する部分が増えられたようなタンパク質を想像してもらえばよい (図4)。また、選択的なスプライシングによって、1つの遺伝子から、少しずつ配列が異なるタンパク質も作り出されている。このような多様な、部分的によく似たタンパク質ができたことによって、それが正しい組織で、しかも、正しいタイミングで発現する、あるいは、発現してはいけないことが「厳密」に求められることになる。

例えば、細胞表面の受容体タンパク質や短い DNA 配列を認識する転写因子などがある。これらのよく似たタンパク質が、間違っただけで別の組織で発現したのでは、個体にとっては致命的である。限られたタンパク質の数で複雑な体制を実現させるために、大きくて互いによく似たタンパク質を作り出した結果、その発現場所と時期を厳密に制御する必要が出てきた。このために、エピジェネティクス、特に DNA のメチル化が利用されたと考えられる。

3. DNA メチル化は哺乳類で新たな機能を獲得した

DNA メチル化が寄与する機能に、哺乳類での X 染色体の不活性化(佐渡の章)やゲノムインプリンティング(石野の章)がある。これらの現象は、哺乳類で新たに獲得された機能であり、脊椎動物一般に普遍化できるものではない。いずれの機構にも DNA メチル化が深くかかわっている。

哺乳類の DNA メチル化と DNA メチル化酵素

ゲノムのメチル化や DNA メチル化酵素の研究は哺乳類と高等植物以外の生物ではあまり進んでいないこともあって、DNA メチル化修飾と進化をなかなか俯瞰的に見渡すことができない。以下、もっとも研究報告の多い哺乳類について、DNA メチル化とそれを触媒する DNA メチル化酵素について述べる。

高等真核生物で明らかになった、DNA メチル化修飾の特徴は、ゲノムにつけられたメチル化の様子が、複製の段階で正確に次の世代のゲノムに伝えられることにある。すなわち、DNA メチル化修飾は、一見“遺伝”するかのようには振る舞う。この特徴のために、DNA メチル化修飾が“エピジェネティクス”の主要な要因となっている。また、哺乳類のゲノムに書き込まれた DNA メチル化の様子は一世代限りで、生殖細胞が形成されるときには消去され、改めて書き込まれる(9)。この生殖細胞で DNA メチル化様子が消去されて書き換えられる現象は、脊椎動物一般に起きているのかについては明らかではない。高等植物では、安定に書き込まれた、あるいは、何らかの原因で消去されたゲノムのメチル化様子は、生殖細胞を経たあとも保持される。これにより、高等植物では次世代の“個体”に DNA メチル化様子が継承され“遺伝”するかのようには振る舞うことになる。

哺乳類では、生殖細胞や胚が発生する初期、それと、細胞が作るタンパク質を変化させる分化時期に、ゲノムのメチル化様子が変化する。DNA に新たにメチル化様を描き込む酵素に Dnmt3a と Dnmt3b、そして、一旦描き込まれた DNA メチル化様を複製の過程で次の世代の細胞に伝える酵素 Dnmt1、計 3 種の DNA メチル化酵素遺伝子が存在する。(図 5)

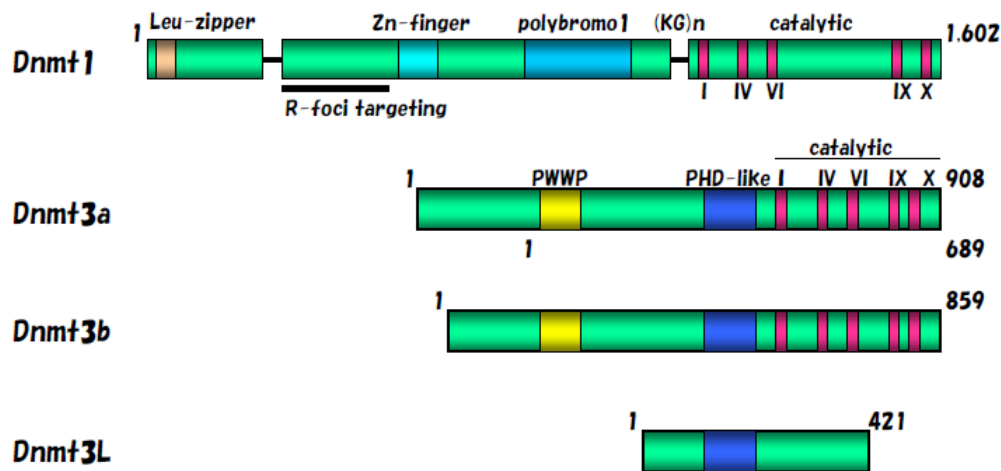


図5. 哺乳類のDNAメチル化酵素とそのファミリー

どのようにしてメチル化模様は描き込まれるのか

1. *De novo* 型 DNA メチル化酵素がゲノムのメチル化模様を描く

初期胚でゲノム全体にメチル化模様か描き込まれる。これに寄与する *de novo* 型の DNA メチル化酵素 Dnmt3a と Dnmt3b は、全くメチル化されていない相補 CpG/CpG も、ヘミメチル化された CpG/5mCpG でも区別なくメチル化できる。興味深いのは、Dnmt3a と Dnmt3b とともに CpG 配列にあるシトシンが主要なメチル化標的であるが、それだけでなく、Dnmt3a は CpA 配列、Dnmt3b は CpT と CpA 配列内のシトシンを、CpG 配列に比べて弱いながら、有意にメチル化する (10)。この生理的な意味については不明だが、複製を経ると、この非 CpG 配列のメチル化は Dnmt1 の働きによって排除されるので、恒常的にはゲノム上に残らない。Dnmt3a、Dnmt3b とともに標的配列として、基本的には CpG という 2 塩基配列以上の長い配列を認識していない。また、精製した Dnmt3a と Dnmt3b の活性は、酵素というには非常に活性が低い。非常に高純度に精製した酵素でも、酵素当たり一時間に高々 1~2 分子のメチル基を入れる程度である。このような低いメチル化活性で一体生理的なメチル化模様の形成に寄与しているのか不思議であるが、実際に DNA メチル化酵素遺伝子を潰すとゲノムのメチル化模様が低下するので、この低い活性で意味のある DNA メチル化に寄与していることは確かである (11)。

2. ゲノムにメチル化模様を描き込むシグナルはなにか

それでは、なにがメチル化模様を描き込むシグナルとなっていて、それがどのようにして *de novo* 型メチル化酵素がそのシグナルを認識しているのかである。高等植物や赤パンカビでは、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基 (H3K9) のメチル化修飾がシグナルになっていることや、siRNA が誘導の目印となっていることなど、かなりの部分明らかにされているが、哺乳類ではまだ確定していない。生体内では基質 DNA はクロマチン構造をとっていて、決して裸の状態では存在するわけではない。試験管内でヒストンと DNA からクロマチンの基本構造であるヌクレオソームを再構成して、Dnmt3a と Dnmt3b がどのようにヌクレオソーム内の DNA をメチル化するのかを調べると、両酵素ともヌクレオソームのコアをつなぐリンカーと呼ばれる、裸の DNA が剥きだしになった部分は効率よくメチル化する。これに対して、ヒストンに巻きついた DNA を Dnmt3a は全くメチル化できないのに対して、Dnmt3b は弱いながら、このコア部分に巻きついた DNA をメチル化できる (12, 13)。この違いが、Dnmt3b がゲノム全体をメチル化することの理由と考えられる。

肝心のゲノム上の何を認識して、どこをメチル化するのかについて決定的な機構は明らかではない。Dnmt3a と Dnmt3b の C 末端側の触媒責任領域ではなく、N 末端側半分がカギを握っていることは容易に想像できる。Dnmt3a と Dnmt3b の N 末端側には、N 末端側から、PWWP、PHD (plant homeodomain) と呼ばれるモチーフが存在する。PWWP は Dnmt3b で DNA に結合するモチーフであること、また、Dnmt3a と Dnmt3b をヘテロクロマチンにガイドすることが報告されている (14, 15)。PHD は Cys に富む配列で一般に様々なタンパク質と相互作用するモチーフとして知られている。Dnmt3a の PHD は発がん遺伝子産物の Myc や RP58 という転写抑制因子などと結合することや (16, 17)、最近ではヒストン H3 のメチル化されていない K4 を認識するなどが報告されている (18)。ただ、DNA メチル化酵素が特定の場所に呼びこまれたらその領域が必ずメチル化されるというわけでもなさそうである。次の段階として、クロマチン (ヌクレオソーム) の状態が何らかの構造変化を受ける必要があるようである。例えば、Lsh やシロイヌナズナの DDM1 のような ATPase 活性を持つクロマチンリモデリング因子を欠くと、ゲノムが低メチル化となる (19, 20)。新たにメチル化模様をゲノム上のどこに入れるのかを調節している機構として、Dnmt3a や Dnmt3b に結合して、標的の場所に連れて行く因子と、ゲノムをメチル化される状態に変化させる機構の両方が必要であることが考えられる。

3. DNA メチル化酵素の発現のタイミングは一つの要因

Dnmt3a と Dnmt3b はその発現時期や特徴的なメチル化時期などの特徴、相互作用因子、*in vitro* でヌクレオソーム中の DNA のメチル化特性など、断片的

な事実は数多く報告されている。発現時期であるが、Dnmt3a がどの組織や発生時期でも比較的発現ではあるが、コンスタントな発現をする。例外として生殖細胞形成期と胚性幹細胞の Dnmt3a がある。マウスでは、Dnmt3a の N 末端 218 アミノ酸残基を欠くアイソフォーム Dnmt3a2 がこの時期の細胞で著しく高い発現を示す (21, 22)。しかも、Dnmt3a2 は Dnmt3L と呼ばれる、Dnmt3a や Dnmt3b と構造がよく似ているが DNA メチル化活性を持たないタンパク質と強く結合して存在する (図 5)。Dnmt3a2 は生理的な塩濃度で DNA メチル化活性が阻害され、活性を示さないが、Dnmt3L が結合することにより、Dnmt3a2 は有意な活性を示すようになる (23)。雄の精細胞でゲノム全体にメチル化模様が描かれる時期には DNA メチル化酵素は Dnmt3a2 しか発現していない。このために、Dnmt3L が存在しないと生殖細胞で DNA メチル化模様が描けず、個体は不稔となる (24, 25)。

もう一つの *de novo* 型酵素 Dnmt3b は、細胞や組織が未分化状態でしばしば高発現し、それ以外の時期の細胞では発現が非常に低い特徴がある。また、非常に多くの選択的なスプライシング産物が存在している (26)。N 末端側半分の配列の選択的なスプライシング産物の中でも、エキソン 6 が抜けた Dnmt3b はメチル化活性が低い。特に体外受精胚で高発現していて、体外受精培養胚で観察されるゲノムの低メチル化の原因となっている (27)。Dnmt3b には触媒領域の中ほどをコードする配列がスプライシングで抜けた Dnmt3b3 がある。当然 DNA メチル化活性はもっていないが、これが活性型 Dnmt3b のドミナントネガティブとして機能しているのか、あるいは他の機能があるのかはわかっていない。Dnmt3b は細胞がまだ分化していない未分化な細胞で高発現し (28, 29)、ゲノム全体をメチル化していると考えられるが、ひとつ Dnmt3a とは異なる領域を選択的にメチル化しているところがある。中心体周辺のヘテロクロマチン領域である。Dnmt3b に異常があるとき、ICF 症候群という病気が発症する (11, 30)。どのようにして Dnmt3b がこの中心体周辺の DNA を選択的にメチル化するのか、よくわかっていない。

ゲノムのメチル化模様の維持

1. 維持型 DNA メチル化酵素はヘミメチル DNA を選択的にメチル化する

Dnmt3a と Dnmt3b によってゲノムに描かれた模様は細胞系列ごとに記憶され、細胞が増殖する過程で忠実に維持される (図 6)。これは、もう一つの DNA メチル化酵素 Dnmt1 の働きによる。Dnmt1 には、メチル化標的配列が一方の鎖がメチル化された (ヘミメチル) CpG であるという、原核生物の DNA メチル化酵素や *de novo* 型 Dnmt3a、Dnmt3b には見られない触媒特性があることによる。Dnmt1 はヘミメチル CpG のメチル化された側の 5mCpG (5 位がメチ

ル化された C を 5mC と表記) を触媒領域の中の TRD で捕捉して、反対鎖の CpG の C をメチル化する。この Dnmt1 のヘミメチル CpG を選択的に認識する機構によって、複製直後に現れる娘鎖のヘミメチル DNA をメチル化して、次世代の細胞にゲノムのメチル化模様を伝えている。Dnmt1 がヘミメチル DNA を選択的に認識する責任は C 末端の触媒領域に存在している (31)。Dnmt1 の標的配列は CpG であり、非 CpG 配列中の C はほとんどメチル化することはない。このため、Dnmt3a や Dnmt3b が非 CpG 配列をメチル化しても、次世代の細胞に継承されることはない。

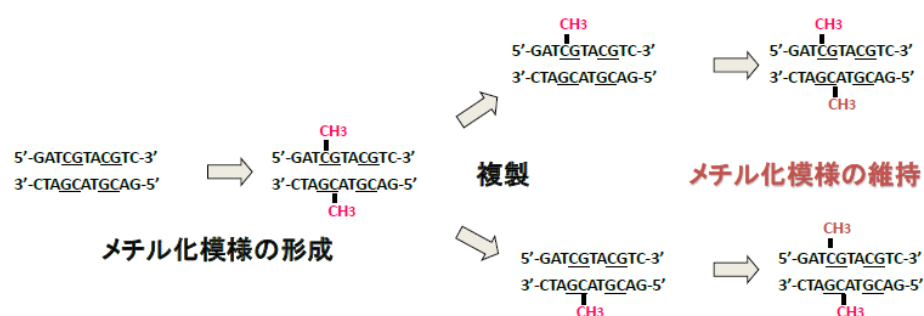


図6. DNAメチル化模様は次世代の細胞に正確に伝えられる

Dnmt1 の触媒領域は、X 線結晶構造が解かれている、細菌の DNA メチル化酵素 HhaI メチル基転移酵素 (32) の触媒領域の比較をすると、非常によく似ている。一つ大きく違うのは、細菌の DNA メチル化酵素で標的の DNA を見分けているとされる TRD 配列が Dnmt1 では著しく長く、立体構造では DNA に覆いかぶさるように位置して、疎水性のアミノ酸残基がメチル化したシトシン塩基を保持している (32、33)。もう一つ、HhaI メチル基転移酵素ではメチル基受容基質である DNA が結合すると始めて、メチル化修飾を受けるシトシン塩基の 6 位の炭素と共有結合する Cys の側鎖がシトシンの方に向くのに対して、Dnmt1 ではメチル基受容基質である *S*-アデノシルメチオニンを結合させると、DNA に結合する前に Cys 残基の側鎖が、シトシンと結合することが予想される位置に振り向くことが明らかになった (33)。これは Dnmt1 がメチル基受容基質に結合する前からメチル化活性に向けて準備が整っていることを示しており、Dnmt1 によるヘミメチル化 DNA 特異的なメチル化活性の反応機構を理解する端緒となる。

2. 複製フォークでの維持メチル化活性

Dnmt1 はマウスで全長が 1,620 アミノ酸残基からなる大きな分子であるが、触媒責任領域は C 末端の 500 アミノ酸残基で、全体の 2/3 を占める N 末端は“調節領域”と考えられている。Dnmt1 は、マウスを例にとると、N 末端側調節領域もいくつかの構造的、機能的領域に分けることができる。N 末端から 250 アミノ酸残基は独立の領域構造を形成している (34)。この N 末独立領域を欠く Dnmt1 は *in vitro* では全長の Dnmt1 と同様の性質を示すので、この N 末独立領域はヘミメチル DNA をメチル化する活性自身には寄与していないと考えられる (35)。この N 末独立領域は様々な因子、例えば転写抑制因子、細胞周期関連因子、Dnmt3a、Dnmt3b、PCNA (proliferating cell nuclear antigen)、リン酸化酵素、DNA が結合するので、Dnmt1 の運命や連れて行く先を決定する因子と相互作用する、プラットフォーム機能を果たしていると考えられる。この N 末領域の中でも、N 末端約 120 アミノ酸残基はロイシンジッパー様の構造で、ヒト、マウス、ニワトリ、ツメガエル、ウニなど広い生物種で保存されている。N 末端のプラットフォーム領域には PCNA 結合配列があり、これに Dnmt1 が DNA ポリメラーゼとともに結合して、複製直後に出現するヘミメチル化 DNA をメチル化して、メチル化模様を継承しているとのモデルが提唱されている (36)。しかし、Dnmt1 を複製フォークに連れて行く配列は以下に述べる、RFTS (replication foci targeting sequence) があり、この方が有力な決定因子である (37)。また、他の種であるツメガエルには明確な PCNA 結合配列が見当たらないなど (38)、Dnmt1 と PCNA の結合が複製時の維持メチル化活性に必須なものであるのか定かではない。Dnmt1 は *in vitro* でヘミメチル化 DNA 上をスライドして、片一方の鎖上に存在するヘミメチル化 CpG 配列のメチル化されていない CpG を順次メチル化していく性質を持っているが、この性質は PCNA 結合配列を欠く場合も同様になされる (35)。必ずしも PCNA に結合しなくても Dnmt1 は、少なくとも試験管内では、維持メチル化活性を発揮できる。

3. 複製フォークでのヘミメチル DNA の受け渡し

N 末の独立な構造領域以降、C 末端に位置する触媒領域までに明確な構造領域として、複製フォークに Dnmt1 を局在化させる領域 RFTS、2つの Zn フィンガー様モチーフ (CXXC)、2つの BAH (bromo-adjacent homology) 領域があり、触媒領域とは KG の繰り返し配列でつながっている (33)。RFTS は Dnmt1 を複製フォークに連れて行くうえで必須の配列であるが、立体構造を解いてみると、驚いたことに、触媒領域に突き刺さった配置をとっている。その状態で

は DNA が触媒中心に近づけず、DNA をメチル化することはできない。しかし、実際には、少なくとも試験管内では、十分な DNA メチル化活性を示す。このことは、Dnmt1 が DNA をメチル化するときは、RFTS が触媒ポケットから放り出されなければいけないことを意味している。RFTS は Dnmt1 を複製フォークに連れて行くだけでなく、Dnmt1 が DNA にアクセスする段階の制御機構として機能していることを示している。続く CXXC と BAH 領域の機能についてはわかっていないが、少なくとも CXXC まで欠いても試験管内での選択的ヘミメチル DNA メチル化活性は大きな影響を受けない。BAH 領域と触媒領域でヘミメチル DNA をメチル化する活性は十分である。

Dnmt1 が細胞内で維持メチル化活性を発揮するためには、Np95/Uhrf1 (Ubiquitin-like with PHD and ring finger domains 1) と呼ばれる補助因子が必要である (39) (図 7)。Np95/Uhrf1 は中ほどにある SRA (Set and ring finger associated) 領域で複製フォークに新たに合成されたヘミメチル化 DNA のメチル化された C (5mC) を二重鎖 DNA の外に引き出して結合している (40-42)。生体内では複製フォークで Np95/Uhrf1 から Dnmt1 にヘミメチル化 DNA が受け渡される。この受け渡しには Dnmt1 の RFTS が深くかかわっていることが予想される。

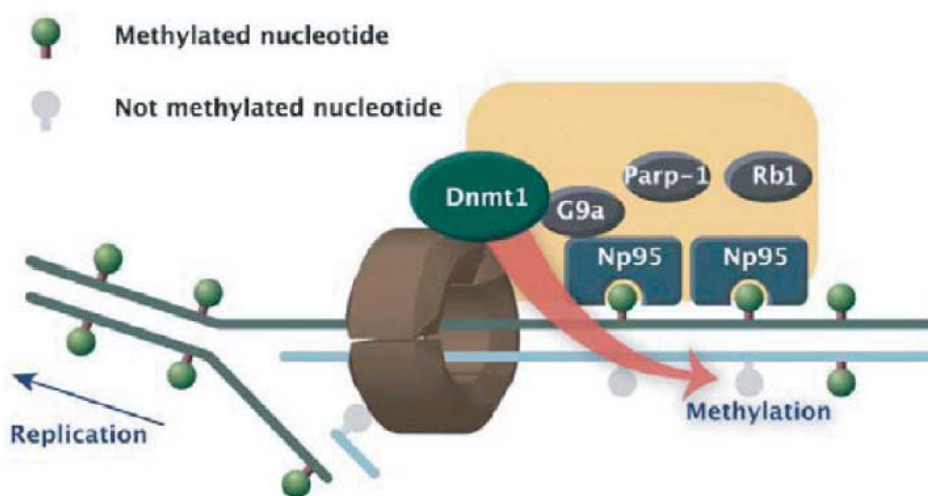


図7. メチル化模様を維持するためには、Dnmt1以外に、Np95/Uhrf1と呼ばれる補助因子が必要である。(文献39より)

生体内での DNA メチル化模様の維持を *in vitro* の Dnmt1 の性質では説明できないことがある。生体内ではゲノムの DNA メチル化模様は複製過程で 99.9% の信頼度で次世代のゲノムに継承される (43)。これに対して、組換え Dnmt1 ではその精度は 95%まで低下する (35)。また、組換え Dnmt1 はヘミメチル化状態の CpG だけでなく、全くメチル化されていない CpG も有意にメチル化する。これは、Dnmt1 だけでは生体内のゲノムのメチル化模様は維持できないこ

とを示唆している。*Dnmt3b* を欠落させた細胞では徐々にゲノムのメチル化が低下との報告もあることから、*de novo* 型の DNA メチル化酵素がゲノムのメチル化の維持に寄与している可能性がある (44)。さらに、*Np95/Uhrf1* が生体内ではゲノムのメチル化模様の維持に必須な因子であることが明らかになったことは、この因子がゲノムメチル化模様の継承の信頼性に寄与している可能性もある。

4. *Dnmt1* の例外的な発現と局在

興味深いことに、マウスやヒトでは、卵母細胞から初期胚ではこの N 末端ロイシンジッパー様構造を欠く卵母細胞型 *Dnmt1o* が発現している。しかも奇妙なことに、大部分の *Dnmt1o* は核外に存在している (45)。この大部分の *Dnmt1o* が核外に存在することにより、初期胚期にゲノム全体が脱メチル化される原因となっている。*Dnmt1* は修復された DNA のメチル化模様も保持するが、主として複製時に複製フォークで維持メチル化に寄与しているため、増殖が盛んな細胞で高発現している。卵母細胞は細胞が分裂していないにもかかわらず、例外的に *Dnmt1o* が著しく高発現している。もう一つ生体内で、細胞が分裂を停止しているにもかかわらず *Dnmt1* が高発現し、しかも、大部分が核外という異所的な局在を示すのがニューロン細胞である (46)。ニューロンでの高発現と核外局在は、後程 DNA 脱メチル化のところでも述べるが、脳神経系でのメチル化状態が想像以上にダイナミックに変化していることをうかがわせる。

ゲノムメチル化模様の消去

DNA のメチル化修飾はシトシン塩基の 5 位の炭素に付加される C-C 結合であるので、非常に安定な共有結合である。当初有力視されたのは、複製過程で維持メチル化活性が抑制されれば、DNA のメチル化模様は細胞周期が回ることで消去されるという、受動的な脱メチル化機構である (図 6)。この機構は多くの生物種で起きる発生初期の脱メチル化反応で機能していると考えられる。しかし、受動的な脱メチル化では説明できない、細胞周期を回らない、すなわち、複製を経ない、積極的な脱メチル化機構の存在がある。例えば、核受容体が制御する標的遺伝子や受精直後の雄性前核の脱メチル化である。後者は正確には、後述するように、細胞周期を介した受動的な脱メチル化である。

積極的な脱メチル化については様々な機構の報告があるが、哺乳類ではいくつかのもっともらしい因子の報告があるものの、まだ報告は断片的で、生化学的に全体像が明らかにされるのには今しばらくかかると考えられる。最終段階では、塩基除去修復系を経て、メチルシトシン (5mC) が取り除かれることになると予想されている (図 8)。植物ではすでに、ゲノム領域特異的な塩基除去

修復系が脱メチル化の機構であることが、これに関わる DNA グリコシラーゼが同定され、遺伝学的、生化学的に証明されている。哺乳類では、これに対応する DNA グリコシラーゼとして、メチル化 DNA 結合タンパク質の一つ MBD4 とチミン-DNA グリコシラーゼ (TDG) がある。いずれも T:G ミスマッチ塩基除去修復に関わる酵素である。5mC がそのまま T であるかのように認識されるのか、あるいは、4 位に結合しているアミノ基が酸化的脱アミノ反応で T に変換することにより、結果的に T:G ミスマッチが形成され、これが認識されるのかが予想されている。生体内には AID や APOBEC1 というシチジン脱アミノ化酵素があるので、これが 5mC を T に変換させ、T:G ミスマッチを形成させているという説がある (図 8) (47)。さらに、Gadd45 と呼ばれる因子がツメガエル卵抽出液を用いた活性測定系で同定されている (48)。この因子はヌクレオチド除去修復に関わることが報告されていたが、塩基除去修復系の構成因子でもあることが報告されている。塩基除去修復系が DNA 脱メチル化機構として働いている可能性が高いことから、Gadd45 が脱メチル化関連の必要因子であると考えられる。

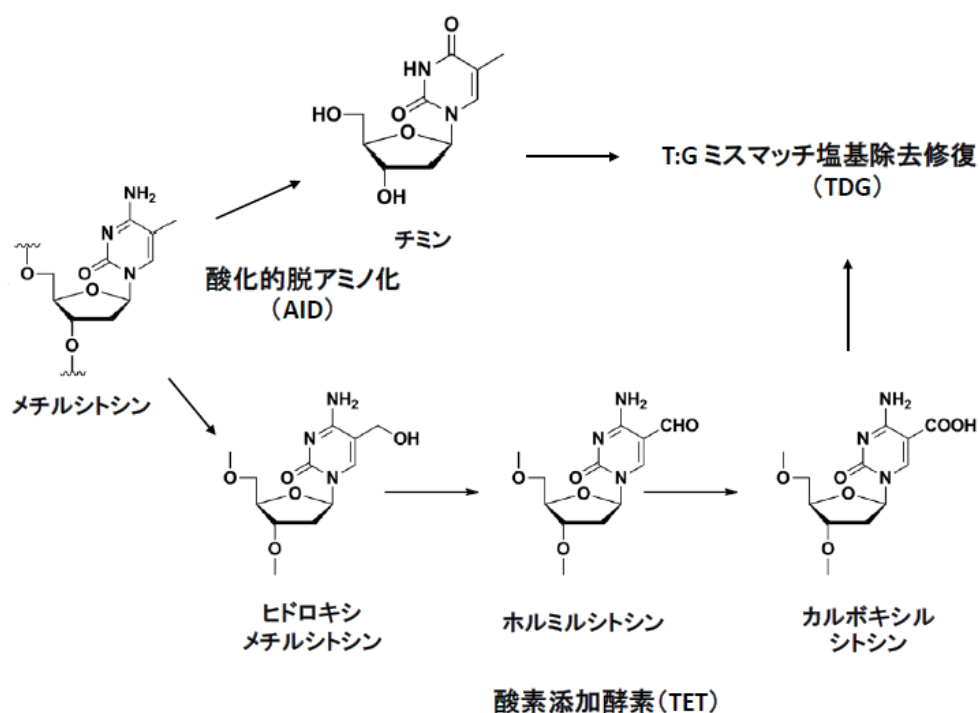


図8. 想定されている能動的脱メチル化機構

最近、5mC がヒドロキシル化された修飾 (5hmC) が発見され、脱メチル化のシグナルとなっている可能性が報告されている。この反応は酸素添加酵素 Tet (ten-eleven-translocation) によって触媒される (図 8) (49、50)。このヒド

ロキシ化された 5hmC がどのようにして除去されるのかについては諸説ある。さらに Tet により酸化が進められ、最終的に脱炭酸されて C に戻るのか、あるいは、5mC の酸化物が TDG によって塩基除去修復の系で除去されるのか、確定していない。一つ興味深いのは、5hmC に変換した CpG は複製後へミ 5hmC となるが、これは Dnmt1 にとって著しく悪い基質となる。したがって、ヒドロキシル化された DNA は複製過程を経ることによって、受動的に脱メチル化されることになる。受精直後の雄性前核ではゲノム全体の 5mC が 5hmC 修飾を受けるが、これは、細胞周期が進行することで受動的に脱メチル化されることによる (51)。

ゲノムメチル化修飾の読み取り

メチル化修飾を受けた CpG は、メチル化修飾を特異的に認識する一連の蛋白質により、転写抑制などの機能へと情報変換されている (図9)。メチル化 CpG を認識して結合する蛋白質には MBD (methyl-CpG binding domain) をもつもの、Zn フィンガーを介して結合するもの、そして、上述の SRA ドメインをもつ Np95/Uhrf1 がある。

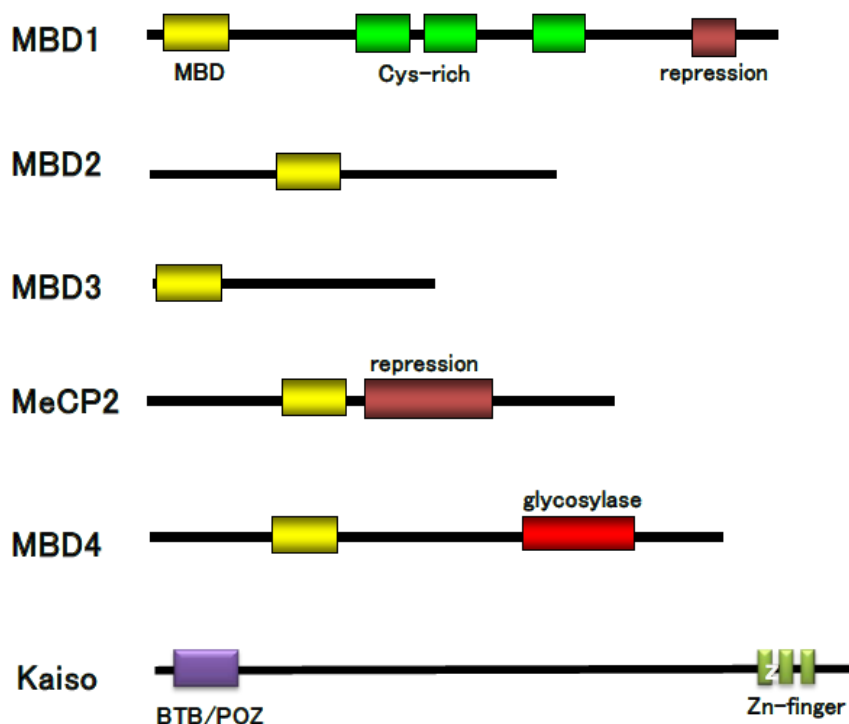


図9. メチル化DNA結合蛋白質

MBD 蛋白質

MBD 蛋白質は植物、昆虫を含めひろく存在し、特徴的な約 60 アミノ酸残基からなる MDB をもつ。哺乳類で解析されている典型的な 5 種類 MBD のうち、哺乳類の MBD3 はメチル化 CpG に結合できないが、アフリカツメガエルのオーソログはメチル化 CpG に結合し機能を果たしている。

1. MeCP2

特に神経細胞で高発現しており、神経疾患である RETT 症候群の原因遺伝子である。MeCP2 は Sin3A と呼ばれるコリプレッサー複合体と相互作用して、遺伝子の転写を抑制している。マウスで遺伝子をノックアウトすると、6 週令でヒトの RETT 症候群によく似た神経症状を示す。

2. MBD1

ポリコーム群蛋白質 PRC1 の一員 PC2 や Ring1B、ヒストン H3K9me3 メチル化酵素 SUV39H、SETDB1、ヘテロクロマチン結合蛋白質 HP1 など転写抑制に関わる因子と相互作用している。ノックアウトマウスでは特に発生の異常は示さないが、神経形成異常やゲノムの不安定性を呈する。

3. MBD2

メチル化 CpG 結合蛋白質として最初に同定された MeCP1 複合体 (MBD2 とコリプレッサー-NuRD の複合体) の一員。MBD2 はもう一つのコリプレッサー Sin3A とも相互作用する。ノックアウトマウスの発生は正常で、生殖能力も有するが、子育て行動に異常が認められる。

4. MBD3

哺乳類の MBD3 はメチル基を認識するアミノ酸残基が他の MBD とは異なるために、メチル化 CpG に結合することはできないが、ツメガエルでは認識に関わるアミノ酸残基が他の MBD と同等であるために、強いメチル化 CpG 結合活性を示すとともに、生理的にもメチル化 CpG を認識する活性が機能している (52)。NuRD 複合体の内在的な構成因子である。ノックアウトマウスは胚性致死である。

5. MBD4

他の MBD 蛋白質とは異なり MBD 以外に、T:G ミスマッチを認識して T を除去するグリコシラーゼ活性をもつ。メチル化シトシンが酸化的脱アミノ化反応を受けると、T に変換され、これにより T:G ミスマッチが形成されることから、発見当初から脱メチル化に関わることが予想されていたが、それを直接指示する確たる証拠はまだない。興味深いことに、メチル基を結合するポケットは他の MBD よりもやや広く、5hmC を結合する余地があり、実際に 5hmC を含む DNA に結合することができる (大谷他、私信)。

Zn フィンガー蛋白質

DNA に結合する型の Zn フィンガーには Kaiso をはじめとして、ZBTB4 と ZBTB38 がある。Kaiso ファミリーは脊椎動物だけに存在している。いずれの蛋白質も、N 末端に蛋白質間相互作用に関わる BTB/POZ ドメインを持つ。それぞれ 3~10 個の C2H2 型の Zn フィンガーをもち、そのうちの 3 つの連続した Zn フィンガーがメチル化 CpG 認識に与る。いずれも、NCoR、Sin3A、CtBP といったコリプレッサーと相互作用することから、転写抑制に寄与すると考えられる。ツメガエルでは胚発生に必須であるが、*Kaiso* ノックアウトマウスは特に発生異常を示さない。

ゲノムのメチル化を解析する技術

現在使われている、ゲノムのメチル化を解析する技術には大きく分けて、3 つの基本的な技術がある。化学修飾による方法、メチル化した DNA を濃縮・定量する方法、それと、メチル化した配列感受性の制限酵素による切断による方法である。これら基本技術を組み合わせる、あるいは、さらに他の解析手法と組み合わせて、様々な方法が利用されている。

1. 化学修飾を利用した技術

化学修飾法として、重亜硫酸塩（バイサルファイト）を用いる方法が定番である。この化学修飾は現岡山大学名誉教授の永津博士により発見され、オーストラリアの S. Clark 博士によりメチル化シトシンの同定に適用されたもので、現在ではゲノム内のメチル化シトシンを一塩基レベルで解析する手法として広く用いられている。シトシン塩基 (C) はバイサルファイト処理により酸化的脱アミノ反応でウラシル (U) に変換されるのに対して、5 位がメチル化されていると、バイサルファイト処理に抵抗性を示し、C のまま残る (図 10)。

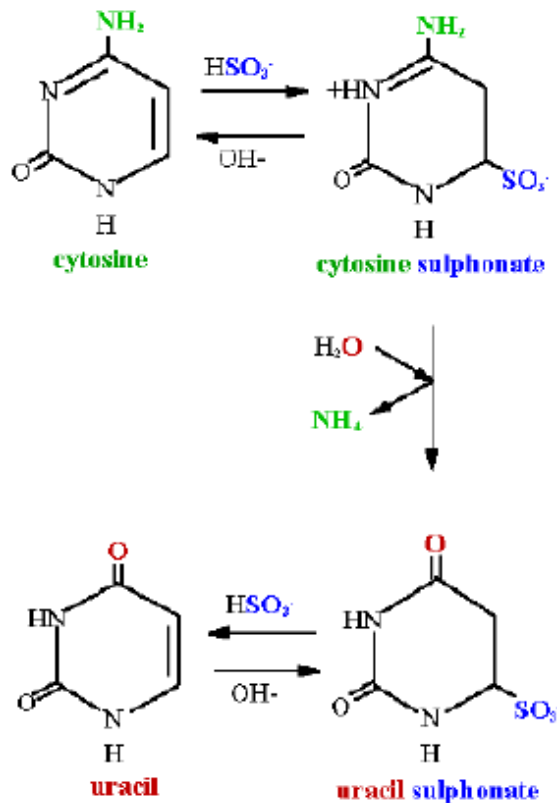


図10. バイサルファイトによるシトシン塩基の修飾(早津、1976)

シーケンシング反応、あるいは、PCR 反応によってこの U は T として読みかえられる。バイサルファイト処理前後の配列比較から、メチル化された C を同定することができる (図 11) (53)。一塩基レベルの解像度で 5mC を同定できるほとんど唯一の手法であるが、バイサルファイト処理のために 2 重鎖 DNA を一本鎖にしなければいけないこと、処理により DNA が断片化することが避けられず反応後の DNA の回収率が悪いこと、処理後は非メチル化 C を含む 2 本の鎖が相補的ではなくなるために PCR 増幅が必要であるなどの短所があるが、それを補って余りある情報を得ることができる。また、一塩基レベルではないが、バイサルファイト処理により非メチル化 C が U (T) に変換されることで、塩基配列は変化する。この変化前後の配列に相補する配列を用いた PCR により、特定の領域のメチル化の程度を評価することができる。

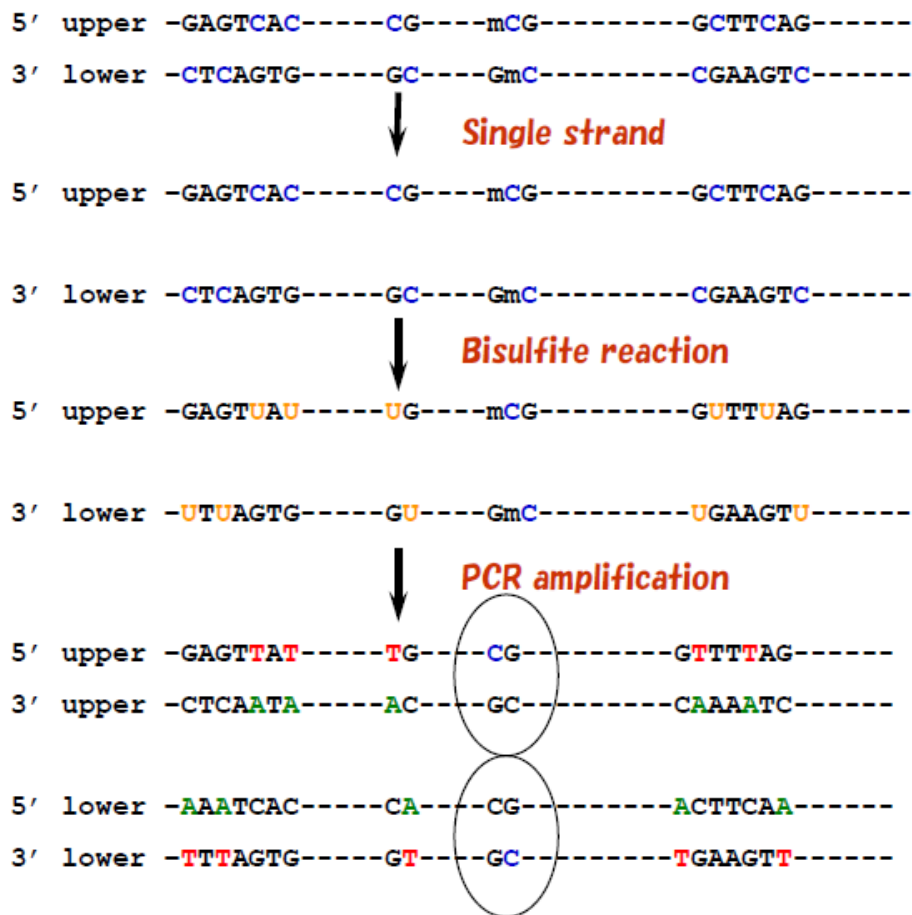


図11. バイサルファイト法による塩基配列決定法

上で述べたように、ゲノム中には 5mC がヒドロキシル化された 5hmC が発見され、5mC の脱メチル化反応の中間体であると予想されている。バイサルファイト法では 5hmC は 5mC と区別できないので、5mC の位置情報の結果には 5hmC が含まれ、区別できないことになる (54)。このため、一塩基レベルで 5hmC を解析する技術は急務である。最近 2 つの解析技術が報告されたが、安定に利用される技術に成熟されるためには今後の検証が必要である。

2. 抗体、組換え体を利用した技術

ゲノム内の 5mC を選択的に認識して沈降させるのに、5mC に対する抗体とメチル化した DNA に特異的に結合するタンパク質、メチル化 DNA 結合蛋白質 (MBD) が使われる。5mC に対する抗体は数種類のモノクローナル抗体が市販品として利用可能であるが、一般には、エピトープが小さいために結合の特異性に難があること、2 重鎖内のメチル基にアクセスできないために一本鎖にしななければならないなど、使用に当たっては注意が必要である。もう一つ、最近

よく利用される特異的な沈降法に、MBD の機能領域を利用してメチル化 DNA を選択的に認識、沈降させる手法がある。数種類ある MBD の中で、MBD1、MeCP2、MBD2 が使われている (55)。MBD はその由来により、5mC の存在密度に依存した結合を示すために、沈降されるメチル化 DNA 断片にはある種のバイアスがかかることがある。

メチル化された DNA のメチル化量を大まかに見積もる方法として、メチル化されていない CpG を酵素的に見積もる方法がある。対象の DNA を M.HpaII、M.HhaI、M.SssI などの細菌のメチルトランスフェラーゼと放射標識した AdoMet で反応させ、メチル化される余地から、メチル化量を見積もる手法である。定性的な評価には十分使える方法である。

一方、5hmC の濃縮には、市販の抗体が利用できる。やはり、5mC の沈降の場合と同じような注意が必要である。これ以外に、T4 フェージ由来の β -グルコシルトランスフェラーゼと UDP-グルコースから、5hmC を選択的にグルコシル化する方法がある (図 1 2)。この時に UDP-グルコースを放射標識したものを用いれば、5hmC の定量に (56)、また、UDP-グルコースにアジドを付加した化合物を使い、これにクリック反応でビオチンを結合させ、ストレプトアビジンで沈降させることで、5hmC を含む DNA 断片を沈降させる方法である (57)。この方法は定量性も高く、沈降も効率的である。一点、 β -グルコシルトランスフェラーゼによる 5hmC のグルコシル化がどれぐらい定量的に進行しているのかを検証することが重要である。

3. 制限酵素を用いる技術

細菌由来の、CpG を標的制限配列内にもつ制限酵素は、多くの場合 C がメチル化修飾を受けている場合、切断できない。これを利用した解析方法は古くから利用されている。特に CCGG という同じ制限配列を切断する MspI と HpaII では、MspI がメチル化非感受性のため、両者の切断を比較することによってメチル化の程度を見積もることができる。また、特定の遺伝子領域をプローブとしてサザンブロッティングを行えば、限定はされるものの、特定の配列のメチル化状態を知ることができる。また、MspI と HpaII の場合、切断個所に放射性の C を充足すれば、メチル化量を定量することも可能である。制限酵素の切断個所を挟むようにして PCR を行えば、メチル化状態により PCR により増幅される程度によりメチル化状態を評価できる。

5hmC をグルコシル化すると、MspI は認識部位を切断できなくなる。これを利用して、5hmC の位置の同定や定量する方法が報告されている。

上記 1-3 の基本手法をハイスループットな解析方法、ゲノムアレイ解析、次世

代シーケンサー解析などと組み合わせた方法が考えられ、実際多くの報告がある。

DNA メチル化酵素とヒドロキシル化酵素活性を測定する技術

DNA メチル化酵素の活性は、DNA をメチル基受容基質として、*S*-アデノシル-L-メチオニンからメチル基が転移する反応を測定する。この時、*S*-アデノシル-L-メチオニンの転移されるメチル基を放射標識したものをを用いて、DNA に取り込まれた放射活性を測定することで活性を測るのが一般的である。メチルシトシンは酸素添加酵素である、Tet (ten-eleven translocation) により、Fe(II) と α -ケトグルタル酸の存在下でヒドロキシル化される。Tet の活性は薄層クロマトグラフィー、質量分析で産物の測定可能であるが、定量的な測定法としては、上述の β -グルコシルトランスフェラーゼを用いた間接的な方法により定量できる (図12)。

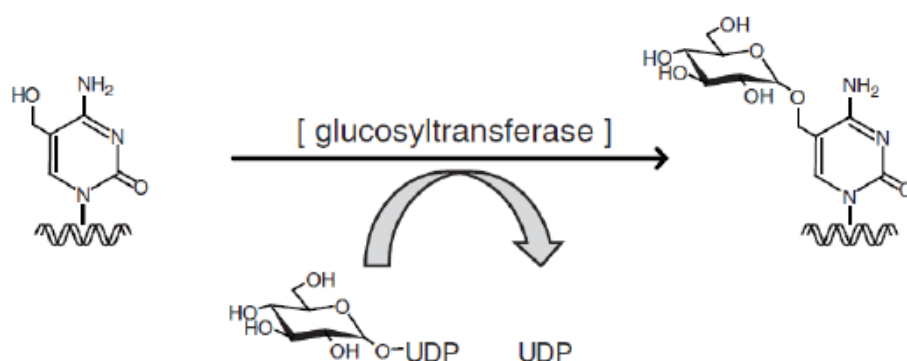


図12. 5-ヒドロキシメチルシトシンの定量法。(文献55より)

まとめ

この章では、DNA のメチル化が書き込まれる、次世代の細胞に継承される、そして消去される各素反応について、直接触媒に関係する酵素を中心にしてその制御機構を概説した。もちろん、各素反応も様々な因子によって、また組織や細胞特異的に制御されていること、そして、DNA メチル化模様の描き込み、継承、消去がお互いに関わりながら制御されていることは当然のことである。本章では、生体内で起きているであろう、高次の制御機構についてはあえて触れなかった。その部分については最新の報告が断片的であり、近い将来は書きかえられる可能性もまだ大きいと判断したためである。ここで述べた内容は、DNA のメチル化についての日々出版される膨大な量の論文を理解するうえで

基本となる事柄である。

引用文献

1. Rollin D. Hotchkiss The Quantitative Separation of Purines, Pyrimidines, and Nucleosides by Paper Chromatography. *J. Biol. Chem.* 175, 315-332 (1948)
2. M. Noyer-Weidner and T. A. Trautner. Methylation of DNA in prokaryote. pp 39-108. *In DNA methylation: Molecular biology and biological Significance.* J. P. Jost and H. P. Saluz eds. BirkHauser Verlag, Basel, 1993.
3. Jeffrey A. Yoder, Colum P. Walsh, and Timothy H. Bestor. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.* 13, 335-340 (1997)
4. Adrian P. Bird. Gene Number, Noise Reduction and Biological Complexity. *Trends Genet.* 11, 94-100 (1995)
5. Sanjay Kumar, Xiaodong Cheng¹, Saulius Klimasauskas¹, Sha Mi¹, Janos Posfai, Richard J. Roberts, and Geoffrey G. Wilson. The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* 22, 1-10 (1994).
6. R. Kucharski, J. Maleszka, S. Foret, and R. Maleszka. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation. *Science* 319, 1827-1830 (2008)
7. Hisashi Tamaru and Eric U. Selker. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414, 277-283, 2001.
8. Miho M. Suzuki, Alastair R.W. Kerr, Dina De Sousa and Adrian Bird. CpG methylation is targeted to transcription units in an invertebrate genome. *Genome Res.* 17, 625-631, 2007
9. Adrian Bird. DNA methylation patterns and epigenetic memory *Genes Dev.* 16, 6-21, 2002.
10. Isao Suetake, Junko Miyazaki, Chikako Murakami, Hideyuki Takeshima, and Shoji Tajima. Distinct enzymatic properties of recombinant mouse DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b. *J. Biochem.* 133, 737-744 (2003)
11. Masaki Okano, Daphne W. Bell, Daniel A. Haber, and En Li. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257, 1999.

12. Hideyuki Takeshima, Isao Suetake, Hideto Shimahara, Shin-ichi Tate, Kiyoe Ura, and Shoji Tajima. Distinct DNA methylation activity of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b towards the DNA in nucleosome. *J. Biochem.* 139, 503-515 (2006)
13. Hideyuki Takeshima, Isao Suetake, and Shoji Tajima. Mouse Dnmt3a preferentially methylates linker DNA, and is inhibited by histone H1. *J. Mol. Biol.* 383, 810-821 (2008)
14. Chen Qiu, Ken Sawada, Xing Zhang, and Xiaodong Chen. The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding fold. *Nat. Struct. Bio.* 9, 217-224, 2002.
15. Ying-Zi Ge, Min-Tie Pu, Humaira Gowher, Hai-Ping Wu, Jian-Ping Ding, Albert Jeltsch, and Guo-Liang Xu. Chromatin targeting of *de novo* DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J. Biol. Chem.* 279, 25447-25454, 2004.
16. Fuks, F., Burgers, W. A., Godin, N., Kasai, M., and Kouzarides, T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* 20, 2536-2544 (2001)
17. Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Vire, E., De Sumet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Croce, L. D., and Fuls, F. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 24, 336-346, 2005.
18. Otani, J., Nankumo, T., Arita, K., Inamoto, S., Ariyoshi, M., and Shirakawa, M. Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO Rep.* 10, 1235-1241, 2009.
19. Zhu, H., Geiman, T. M., Xi, S., Jiang, Q., Schmidtman, A., Chen, T., Li, E., and Muegge, K. Lsh is involved in *de novo* methylation of DNA. *EMBO J.* 25, 335-345 (2006)
20. Jeddelloh, J. A., Stokes, T. L, and Richards, E. J. Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat. genet.* 22, 94-97 (1999)
21. Yasuhiro Sakai*, Isao Suetake*, Fuminori Shinozaki, Shohei Yamashina, and Shoji Tajima. Co-expression of *de novo* DNA methyltransferase Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. *Gene Expr. Patterns* 5, 231-237 (2004)

22. Sato, N., Kondo, M., and Arai, K. The orphan nuclear receptor GCNF recruits DNA methyltransferase for *Oct-3/4* silencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344, 845-851 (2006)
23. Isao Suetake, Yuuki Morimoto, Takuya Fuchikami, Kuniya Abe, and Shoji Tajima. Stimulation effect of Dnmt3L on the DNA methylation activity of Dnmt3a2. *J. Biochem.* 140, 553-559 (2006)
24. Bourc'his, D., Xu, G., Lin, C., Bollman, B., and Bestor, T. H. Dnmt3L and establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536-2539 (2001)
25. Hata, K., Okano, M., Lei, H., and Li, E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of *de novo* DNA methyltransferase to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983-1993 (2002)
26. Ostler, K. R., Davis, E. M., Payne, S. L., Gosalia, B. B., Exposito-Cespedes, J., Le Beau, M. M., and Godley, L. A. Cancer cells express aberrant *DNMT3B* transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene* 26, 5553-5563 (2007)
27. Horii, T., Suetake, I., Yanagisawa, E., Morita, S., Kimura, M., Nagao, Y., Imai, H., Tajima, S., and Hatada, I. The Dnmt3b splice variant is specifically expressed in in vitro-manipulated blastocysts and their derivative ES cells. *J. Reprod. Dev.* 57, 579-585, 2011
28. Watanabe, D.*, Suetake, I.*, Tada, T., and Tajima, S. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. *Mech. Dev.* 118, 187-190 (2002) (*equal contribution)
29. Daisuke Watanabe, Isao Suetake, Shoji Tajima, Kazunori Hanaoka. Expression of Dnmt3b in mouse hematopoietic progenitor cells and spermatogonia at specific stages. *Gene Exp. Patterns* 5, 43-49 (2004)
30. Hansen, R. S., Wijmenga, C., Luo, P., Stanek, A. M., Canfield, T. K., Weemaes, C. M., and Gartler, S. M. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(, 14412-14417 (1999)
31. Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S., Patel, D. J. Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science* 335, 709-712 (2012)
32. Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., Cheng, X. HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* 76, 357-369 (1994)

33. 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. USA* **108**, 9055-9059, 2011.
34. Suetake, I., Hayata, D., and Tajima, S. The amino-terminus of mouse DNA methyltransferase 1 forms an independent domain and binds to DNA with the sequence involving PCNA binding motif. *J. Biochem.* **140**, 763 – 776, 2006.
35. Giedrius Vilkaitis, Isao Suetake, Saulius Klimašauskas, and Shoji Tajima. Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **280**, 64-72 (2005)
36. Chuang L. S. H., Ian, H., Koh, T., Ng, H., Xu, G., and Li, B. F. L. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* **277**, 1996-2000 (1997)
37. Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. -U., and Bestor, T. H. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* **71**, 865-8873 (1992)
38. Kimura, H., Ishihara, G., and Tajima, S. Isolation and expression of a *Xenopus laevis* DNA methyltransferase cDNA. *J. Biochem.* **120**, 1182-1189 (1996)
39. Jafar Sharif, Masahiro Muto, Shin-ichiro Takebayashi, Isao Suetake, Akihiro Iwamatsu, Takaho A. Endo, Jun Shinga, Yoko Mizutani-Koseki, Kunihiro Okamura, Shoji Tajima, Kohzoh Mitsuya, Masaki Okano, and Haruhiko Koseki. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**, 908-912 (2007)
40. Arita, K., Ariyoshi, M., Tochio, H., Nakamura, Y., and Shirakawa, M. Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature* **455**, 818-821 (2008)
41. Avvakumov, G. V., Walker, J. R., Xue, S., Li, Y., Duan, S., Bronner, C., Arrowsmith, C. H., Dhe-Paganon, S. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**, 822-825 (2008)

42. Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Bostick M, Jacobsen SE, Cheng X. The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* 455, 826-829 (2008)
43. Ushijima, T., Watanabe, N., Okochi, E., Kaneda, A., Sugimura, T., and Miyamoto, K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res.* 13, 868-874 (2003)
44. Dodge, J. E., Okano, M., Dick, F., Tsujimoto, N., Chen, T., Wang, S., Ueda, Y., Dyson, N., and Li E. Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J. Biol. Chem.* 280, 17986-17991 (2005).
45. Mertineit, C., Yoder, J. A., Taketo, T., Laird, D. W., , Trasler, J. M., and Bestor, T. H. Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* 125, 889-897 (1998)
46. Inano, K., Suetake, I., Ueda, T., Miyake, Y., Nakamura, M., Okada, M., and Tajima, S. Maintenance-type DNA methyltransferase is highly expressed in post-mitotic neurons and localized in the cytoplasmic compartment: *J. Biochem.* 128, 315-321 (2000)
47. Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S. E., and Reik, W. Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101-1106 (2010)
48. Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., and Niehrs, C. *Gadd45a* promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671-675 (2007)
49. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brundono, 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
50. Ito, S., D'Alesso, 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)

51. Inoue, A. and Zhang, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science* 334, 194 (2011)
52. Iwano, H., Nakamura, M. and Tajima, S. *Xenopus* MBD3 plays a crucial role in an early stage of development. *Dev. Biol.* 268, 416-428 (2004)
53. Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L., and Frommer, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl. Acids Res.* 1994 22, 2990-2997, (1994)
54. Nestor, C., Ruzov, A., Meehan, R., and Dunican, D. Enzymatic approaches and bisulfite sequencing cannot distinguish between 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in DNA. *Biotechniques* 48, 317-319 (2010)
55. Hendrich, B. and Tweedie, S. The methyl-CpG binding domain and the evolving role of DNA methylation in animals. *Trends Genet.* 19, 269-277 (2003)
56. Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C. S., Spada, F., Leonhardt H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucl. Acids Res.* 38, e181 (2010)
57. Chun-Xiao 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)