

<特集「エピジェネティクスと疾患」>

エピジェネティクスの研究方法

矢 追 毅

京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学*

Methods to Study Epigenetic Mechanisms

Takeshi Yaoi

Department of Pathology and Applied Neurobiology,
Kyoto Prefectural University of Medicine
Graduate School of Medical Science

抄 録

多細胞生物の体を構成する全ての細胞種は、同一の塩基配列情報を持つにも関わらず、細胞種ごとに異なる表現型とその基盤となる遺伝子発現プロファイルを有する。この表現型や発現プロファイルは、塩基配列に基づかない遺伝情報（エピゲノム情報）として、体細胞分裂や世代の壁を超えて伝達・維持される。エピジェネティクスと呼ばれる、こうした遺伝子発現のための情報とその制御機構を扱う研究分野が、この20年来、急速に発展してきた。エピゲノム情報を担う分子基盤として、DNA中のCpG配列のシトシンメチル化やヒストン化学修飾のゲノムワイドな局在化様式があげられる。現在、欧米などのエピゲノム解析計画では、これらの局在化様式を解読しゲノム配列上にマップした「エピゲノム情報標準地図」の作製を進めている。こうした現状を踏まえつつ、ゲノムワイドな情報が細胞種固有の表現型と対応することを鑑みて、本稿では、エピジェネティクスの研究方法のなかでも、エピゲノム情報の網羅的解析技術の概略を紹介する。現在の主要な研究技法は、これらの解析技術に代表される情報解読技術である。エピゲノム情報を自在に操作する技術の開発は今後の重要課題であろう。

キーワード：メチル化DNA、ヒストン化学修飾、マイクロアレイ法、次世代高速シーケンシング法。

Abstract

The phenotypic characteristics of each cell in a multicellular organism are determined by the unique gene-expression patterns in the cell. Each cell-type identity is transmitted to daughter cells. Epigenetic information which underlies these phenomena, is encoded in the epigenome that is determined with the cell type-specific, genome-wide distribution of both DNA methylation and post-translational histone modifications, but not in the genome sequence *per se*. One of the recent topics in epigenetics research is "Epigenome Project", in which epigenetic code in various cell types of some model organisms is being deciphered. A variety of powerful high-throughput methods have been developed, and greatly contribute to genome-wide mapping of the distribution of both DNA methylation and histone modifications. This short review summarizes the representative analytical methods and techniques for studying genome-

scale distribution pattern of either DNA methylation or post-translational histone modifications. It would be highly innovative techniques which enable us to manipulate epigenetic information that are required in the future.

Key Words: DNA methylation, Histone modification, DNA microarray, High-throughput sequencing.

はじめに

多細胞生物の体を構成する個々の細胞は、同一の塩基配列情報を持つにも関わらず、細胞種に固有の表現型を有している。これは、体細胞分裂や世代を超えて保持される、細胞固有の遺伝子発現パターンによって基礎づけられる。こうした遺伝子発現のための情報とその制御機構を扱う研究分野がエピジェネティクスである。制御機構としては、DNA中のCpG配列のシトシンメチル化、ヒストン化学修飾やクロマチン構造変換、更にmicro RNA, non-coding RNAやDNA修復機構も関与する。転写開始点近傍のCpG islandのDNAメチル化、ヌクレオソーム形成・クロマチン構造変換そして転写活性のon/offは互いに連関している¹⁾。従って遺伝子発現パターンがいかに確立されているかを知るためには、ゲノム上のメチル化シトシンの分布様式(DNAメチル化プロファイル)やクロマチン局在様式が重要な手掛りとなる。

現在、欧米で進行中のエピゲノム解析計画では、DNAメチル化状態やクロマチン局在様式の標準地図が種々のモデル生物において作製されつつある。今後、遺伝情報の発現調節に関する研究においては、DNAメチル化・ヒストン修飾の解析は必須となろう。本稿では、エピゲノム情報の解説と分子機構の解明に力が注がれる現状を踏まえ、DNAメチル化やヒストン化学修飾の網羅的解析技法・技術を紹介する。

DNAメチル化の検出原理

種々のDNAメチル化解析法は、検出感度・網羅性・解像度・定量性において異なる特徴を持つので、目的にあった技法を適切に選択しなければならない。ゲノム全体におけるDNAメチル化プロファイル解析では、目的に応じた適

切な解像度(領域レベルか1塩基レベルか)を考慮する。一方、特定遺伝子の転写抑制機構を明らかにする目的ならば、1塩基レベルの解像度で行い、転写活性と関連づけていく必要がある。メチル化の頻度を解析するならば、定量性・精度も考慮する。こうした判断をする上で、メチル化の検出原理を理解することが不可欠である。主な原理として、DNAメチル化感受性制限酵素の利用、Bisulfite反応の利用、抗体等による(非)メチル化DNA濃縮、がある(図1)。

1. DNAメチル化感受性制限酵素の利用

DNAの特定塩基配列を認識して切断する制限酵素の中には、認識配列中の塩基のメチル化により切断活性が阻害される(これをメチル化感受性と呼ぶ)ものがある。哺乳動物においてメチル化の標的となるCpGを認識配列中に含む酵素が知られている。全てのCpGメチル化を検出することはできないが、CpG islandや遺伝子転写開始点周囲においてゲノム中での出現頻度が高い配列を認識する*Not I*, *Hpa II*, *Hha I*などを選択することで^{2,3)}、有益な情報を得られる。

2. Bisulfite反応の利用

Bisulfite処理による塩基置換反応⁴⁾では、非メチル化シトシンが亜硫酸ナトリウムと反応して、ウラシルへと変換される。メチル化シトシンは反応しないので、原理上、全てのシトシンのメチル化状態を塩基の違いとして検出できる。Bisulfite処理後のDNAを鋳型とする塩基配列決定により、標的領域中のCpGメチル化パターンを一塩基レベルで解析する場合⁵⁾のほか、定量法も含む種々の方法に適用されている(図2)。従来用いられてきた反応条件によっては、塩基置換のエラー率が10%近くになるため⁶⁾、早津らの迅速法^{7,8)}が推奨される。市販

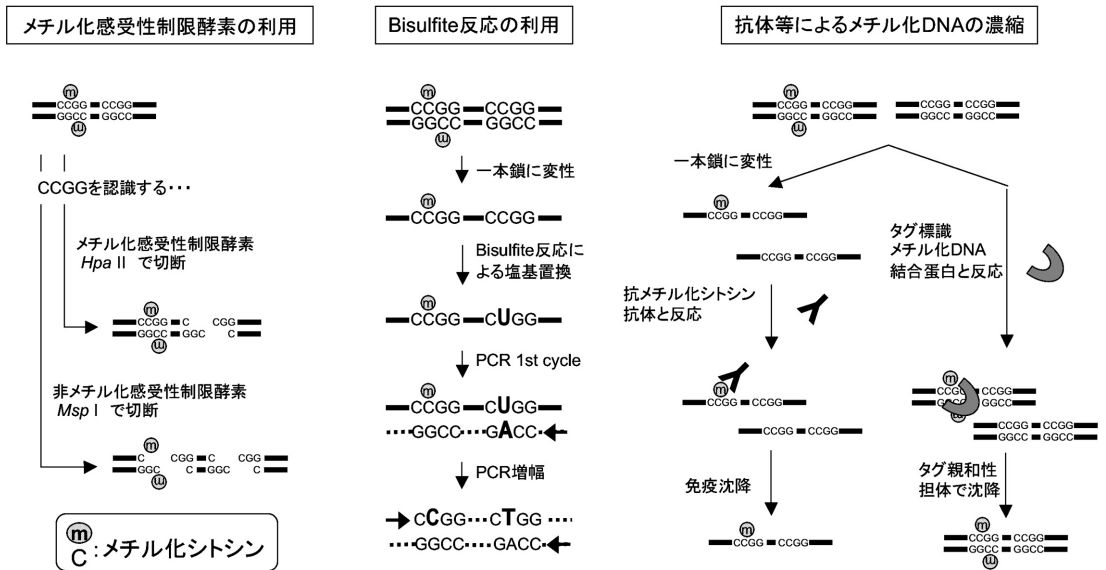


図1 メチル化シトシンの検出原理

キットといえども、その選択には注意が要る。また、反応中に、サンプルDNAの分解がある程度生ずる点に、課題が残る。

3. 抗体等による（非）メチル化DNAの濃縮

抗メチル化シトシン抗体⁹⁾やメチル化DNA結合タンパクとメチル化DNAの親和性を利用して、断片化したゲノムDNAからメチル化領域を捕捉し濃縮・回収する。抗体を使用する場合、ヘミメチル化部位も含めて一本鎖DNAとして回収される。制限酵素に比べ低密度メチル化領域の検出感度に劣る。一方、MeCP2, MBD2bのようなメチル化DNA結合ドメインを持つ組換えタンパクを使用すると、二本鎖DNA断片として回収できる。MBD2/MBD3L複合体¹⁰⁾を用いるMIRA法は、結合性が高く回収率がよい。逆に、非メチル化CpG部位に高親和性を示すMBD1による親和性捕捉を行って、非メチル化CGI領域を濃縮する方法もある¹¹⁾。

以上のような検出原理を、PCR法・シーケンス法・電気泳動法やマイクロアレイ法などの解析技術と組み合わせることにより、特定配列領域あるいはゲノム全体を対象としたメチル化プロファイルの解析が可能となる。リアルタ

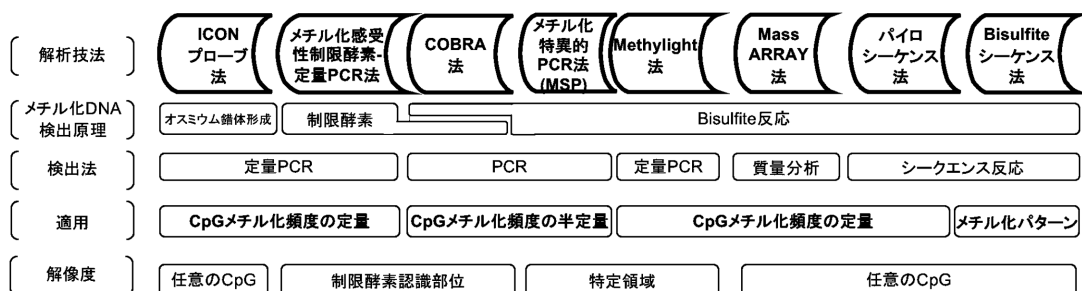
イムPCR法や質量分析を用いれば、個々のCpG部位におけるメチル化頻度を定量できる(図2)。

解析法の選択にあたり検出感度の観点から留意すべきことのひとつは、「解析対象ゲノム全体のメチル化頻度の高低」に応じてシトシンメチル化状態と非メチル化状態のどちらを検出対象とするのかということである。例えば、ヒトやマウスのゲノムは全体としては高頻度にメチル化されている。ここで、表現型の異なる多種類の細胞から成る組織において、少数特定の細胞集団でのみ生じた脱メチル化を検出する場合を考えよう。メチル化シトシンを検出すれば、比較群・対照群双方において、他の多くの細胞に由来するメチル化シトシンの強いシグナルが検出される。そのため変化量は相対的に極めて小さくなり、解析法によっては有意な変化を検出できなくなる。逆に、非メチル化シトシンを検出するなら、脱メチル化に対して鋭敏な結果を得られる。

DNAメチル化プロファイル解析法

ゲノムワイドな網羅的解析法の概略を紹介す

領域特異的メチル化CpG解析法



ゲノム網羅的解析法

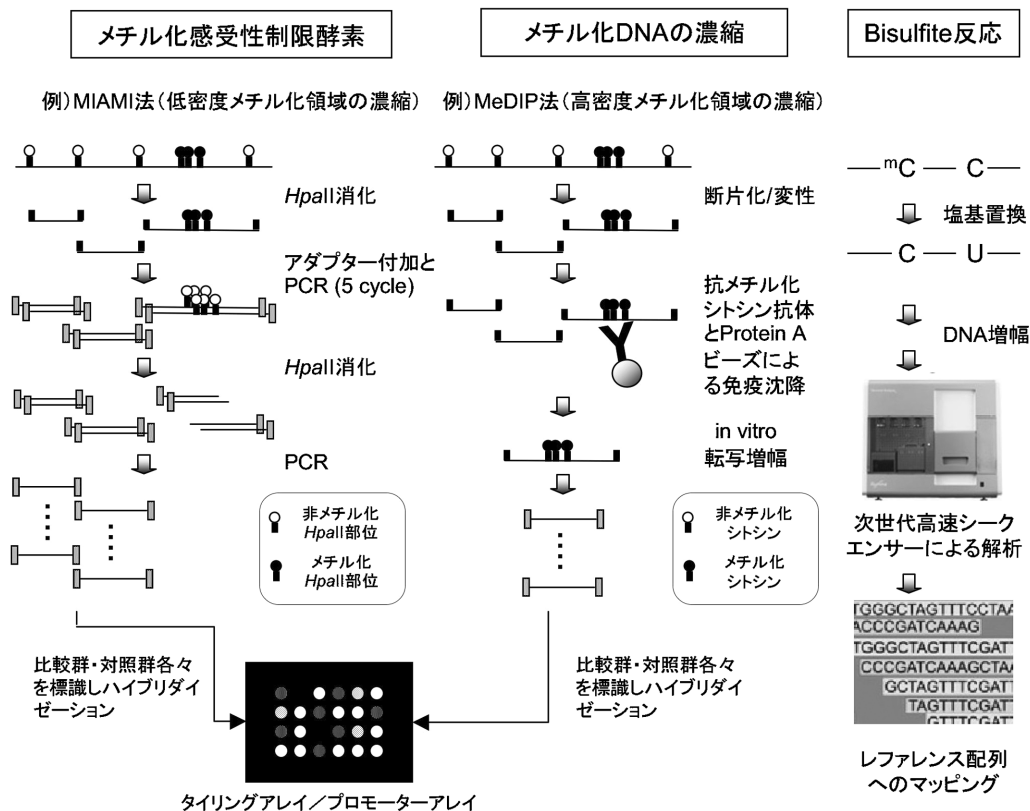


図2 種々のDNAメチル化解析法

主要な、領域特異的あるいはゲノム網羅的解析法を検出原理と対応させて示した。COBRA法は、制限酵素を利用した方法であるが、メチル化感受性には依拠していない。Bisulfite反応により変換されたTGと変換されないCGのうち一方を認識する制限酵素を利用して、その切断活性の違いにより検出する。なお、ICONプローブ法は新規技法であり(Okamoto A, Org. Biomol. Chem., 2009, 7, 21-26)、報告例こそ少ないが、Bisulfite反応の課題であるDNA分解の問題を解決する方法として注目されるため、ここに掲載した。

る。現在の主流は、上述の3つの原理のいずれかによって調整されたDNAを、マイクロアレイへのハイブリダイゼーションまたは高速シーケンサーにより解析する方法に分類される(図2)。

制限酵素とマイクロアレイの組み合わせには、HELP法¹²⁾やMIAMI法²⁾がある。MIAMI法を例にとり、原理を説明する(図2)。ゲノムDNAをHpa IIにより非メチル化CCGG配列で切断する。アダプターDNAを付加し、この配列に対するプライマーによりPCRを行う。増幅産物を再度、Hpa IIで切断後、アダプタープライマーによるPCRで増幅し蛍光標識を行う。この段階で、元々、非メチル化されていたHpa II部位に対応する領域が選択的に増幅・標識されたことになる。このあと、タイリングアレイやプロモーター・マイクロアレイにハイブリダイズさせ、低メチル化領域の候補を検出する。

メチル化DNAの濃縮とマイクロアレイの組み合わせでは、抗メチル化シトシン抗体による免疫沈降法を利用した方法が、これまで最も実績がある。MeDIP法⁹⁾、mDIP法¹³⁾、あるいはmCIP法¹⁴⁾といったバリエーションがある。いずれもDNAを超音波や制限酵素処理で断片化後、免疫沈降によりメチル化DNAを濃縮し、場合によっては増幅後、標識を行い、マイクロアレイにハイブリダイズさせる。最近では、タイリングアレイやプロモーターアレイを用いることで、ヒトや植物の全ゲノムを対象に高解像度マップを作製した報告がある¹⁵⁾¹⁶⁾。先述のDNA結合タンパクで濃縮するMIRA法の場合、ヒトB細胞や肺癌組織を対象に、タイリングアレイを用いて100bpの解像度でマッピングに成功している¹⁷⁾¹⁸⁾。

以上の方法は、全ゲノム中のメチル化シトシンが高密度もしくは低密度に存在する領域を明らかにすることはできても、一塩基レベルの解像度で情報を得ることはできない。解決策の一つが、Bisulfite反応と次世代高速シーケンサーの組み合わせである。次世代高速シーケンサーの原理の詳細は割愛するが、断片化された短いDNAを大量に(5千万~8千万本)読み

取り、既知の全ゲノムDNA配列にin silicoでマッピングし、それらをつなぐことで、最終的な配列を3~5日間を得る。解析に必要なDNA量がマイクロアレイ法より少なくすむ。また、アレイ法では得られないような、繰り返し配列や未解読領域の配列情報も得られる。すでに植物、ES細胞などで成果が得られている¹⁹⁾²⁰⁾。

ヒストン翻訳後修飾と ChIP法を用いた網羅的解析法

クロマチン構成単位であるヌクレオソームを形成するヒストンの化学修飾は、クロマチンの機能・構造の確立やその構造変換に重要な役割を担い、DNAメチル化と並ぶ重要な分子機構である。ヒストンの多彩な化学修飾の存在は、MALDI-TOF-MSなど質量分析技術の進歩によって明らかにされた(リン酸化・アセチル化・リジンメチル化・アルギニンメチル化・ユビキチン化・SUMO化・ADPリボシル化・脱イミノ化)²¹⁾。転写活性化領域と転写抑制領域の各クロマチン構造に存在するヒストンは、それぞれ異なる化学修飾を受けている。ここでは、細胞固有の遺伝子発現プロファイルの確立と深く関連する、染色体DNA上のヒストン修飾プロファイルの解析技法を紹介する。

1. ChIP法

基本技術は、クロマチン免疫沈降法(ChIP法)と呼ばれるヒストン-DNA相互作用解析法である²²⁾²³⁾。これは、化学修飾特異的かつヒストンバリエーション特異的な抗ヒストン抗体で免疫沈降を行う方法である。その際に共沈降してくるDNA配列を解析すれば、どのようなDNA領域で目的蛋白が複合体を形成しているかがわかる。解析対象の配列領域が決まっている場合には、その領域を、共沈降したDNAの中からPCRで検出することで、標的領域のクロマチン構造の情報を得られる。

ChIP法の工程はおおよそ次のようになる。i) 必要に応じて、DNA結合タンパクとDNAを化学架橋した後、超音波処理や酵素消化によりDNAを切断する、ii) 目的蛋白に対する抗体で

免疫沈降後、脱架橋し、DNAを精製する。一見、単純ではあるが、化学架橋、DNA断片化や免疫沈降の条件が、データの質・再現性を大きく左右するため、慎重な条件検討を要する。米国のプロジェクトでは、標準化抗体の作製すら試みられている。

種々の抗体によるChIP法とタイリングアレイ又は次世代高速シーケンサーを組み合わせた解析によって、染色体上のヒストン修飾局在領域を網羅的に解析し、クロマチン構造の動態を明らかにできる。各々ChIP-on-chip法、ChIP-seq法とよばれている。

2. ChIP-on-chip法

精製したDNAを、工夫を施したPCR法、*in vitro*転写増幅法あるいは全ゲノム増幅法で増幅し、標識後、マイクロアレイにハイブリダイズし、検出する。タイリングアレイを用いて500bp程度の解像度で解析できる。ロングオリゴヌクレオチド(50~75-mer)を使ったアレイを用いると検出感度がより高まる²⁴⁾。現状では、メーカー間におけるアレイの違いよりも、研究室間のプロトコルや解析アルゴリズムの違いが、データの変動度合いに大きく寄与するという指摘もある²⁴⁾。

3. ChIP-seq法

ChIP法で回収したDNAを次世代高速シーケンサーにより直接塩基配列決定する²⁵⁻²⁷⁾。ChIP-on-chip法に比べ、少量の精製DNAから高い解像度(50bp程度)で解析できるという利点を持つ。全ゲノムマッピングの最初の例²⁷⁾では、ES細胞のDNA 1-10ngを用いて解析している。

両者を比較すると、ChIP-on-chip法では、プローブ間のハイブリダイゼーション効率の偏りや蛍光シグナル検出系の使用に起因する、ノイズやアーティファクトのシグナル発生が問題となる。それゆえ、異なるゲノム領域間でのシグナルの定量的比較に問題が残る。一方、ハイブリダイゼーションに基づかないChIP-seq法では、この問題を回避できる²⁸⁾。個々のゲノム領域において読み取られた配列の出現頻度が、着目する化学修飾のレベルを反映した結果とな

り、異なる領域間での化学修飾のレベルの定量的比較が可能であるとされる。

4. ヌクレオソーム・マッピング

クロマチン構成単位であるヌクレオソームは、4種のコアヒストン蛋白の8量体1個とそれを取り巻く147bpのDNA領域からなる。したがって、ヌクレオソームを精度高くマッピングするには、この147bpのDNA領域に対応した解像度が必要となる。そのため、*micrococcal nuclease*を用いたモノヌクレオソームの調整がDNA断片化法として使われ、ChIP-seq法により、酵母²⁹⁾、ヒト、ショウジョウバエ³⁰⁾、線虫³¹⁾で、精度の高いマッピングがなされた。今後、ChIP-seq法が網羅的解析法の主流となろう。

5. 単一細胞レベルでの解析

エピジェネティクスが個々の細胞の表現型に関する遺伝情報を扱う以上、単一細胞レベルでの解析が必要な局面も出現するであろう。単一細胞における遺伝子発現プロファイルの解析は、これまでもマイクロアレイを用いてなされてきた。最近、次世代高速シーケンサーによる解析法が報告され³²⁾、新規のスプライシング・バリエーションも多数同定され、その有効性が示された。今後の改良による向上も見込まれる。それに対して、DNAメチル化やクロマチンの解析はどうか。今のところ網羅的解析の報告はないが、微量サンプルのための技術開発が進んでいる。

網羅的DNAメチル化解析法としてnanoHELP法がある³³⁾。制限酵素とアレイを用いる先述のHELP法の改良法で、細胞2000個レベルでの解析能力をもつ。特定の細胞種やその核を標識マーカーをもとにFACSで分離し³⁴⁾、本法で解析することも可能となろう。他にBisulfite反応処理後、全ゲノム増幅法で増幅し解析する試みもあるが³⁵⁾³⁶⁾、サンプルDNAの分解という根本的課題の解決を要する。一方、ChIP法については、細胞100~1,000個を対象に、特定遺伝子配列に対するプライマーを用いたPCR法によって解析するmicro ChIP法があり、凍結生検材料へ適用可能である³⁷⁾。網羅的解析の場合には、ChIP-on-chip法を用いて、細胞10,000個レ

ベルで解析を行った報告がある³⁸⁾。したがって、遺伝子発現プロファイルと相照らしてDNAメチル化やヒストン化学修飾を網羅的に解析しようとするならば、現状では、最低 10^4 オーダーの細胞数が必要になる。単一細胞での網羅的解析については今後の進展に期待したい。

おわりに

本稿では、DNAメチル化とヒストン化学修飾の網羅的解析法を紹介した。膨大なデータを扱う、これら解析法に共通することは、パイプライン全体のデザイン設計の重要性である。DNAメチル化、ヒストン化学修飾そして遺伝子発現のプロファイルは、相互に照らし合わせながら解析され、解釈されるべきものであり、バイオインフォマティストの果たす役割はとりわけ大きい。また、個別遺伝子の解析技法も同様の検出原理を利用しており、本稿では触れなかったmicro RNA研究技法共々、詳細は、他の文献に譲る。

これまでの技術開発史を振り返ると、早津らのBisulfite反応、林崎らのRLGS法³⁾など、日本発の技術が過去20年のエピジェネティクス研究に大きく寄与したことは特筆されるべきで

ある。これらも含めて、これまでの主なエピゲノム研究技法は、情報を「読み取る」技術であって、「操作する」技術ではない。ゲノムの特定領域を狙ってメチル化状態やクロマチン構造を操作する手法の開発は、今後の課題である。その点で興味深いのは野村らが開発した、Znフィンガードメインと融合させたスプリット型DNAメチラーゼによる標的配列特異的DNAメチル化技術である³⁹⁾。現時点では大腸菌系で機能することを確認した段階であるが、原理上、動植物細胞における技術としても十分に期待できる。

冒頭でも触れた欧米のプロジェクトでは、次世代技術開発がロードマップにあがっている。従来の塩基配列情報を扱う技術の歴史を見れば、何らかの分子機構が明かされると、その因子を利用した技術が登場することが多々あった。これにならって、様々な生物種におけるエピジェネティクス分子機構の知見を、新規技術開発の視点から、時に眺め直すことは有益であるにちがいない。優れた新技術は新しい発見への突破口を開く。今後も日本から有用な次世代技術が登場し、本研究分野の進展に寄与することを期待する。

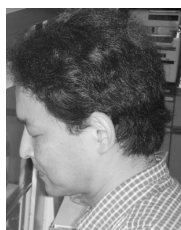
文 献

- 1) Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007; 128: 707-719.
- 2) Hatada I, Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamanaka S, Sakurada A, Endo C, Sato M, Kondo T, Horii A, Ushijima T, Sasaki H. Genome-wide profiling of promoter methylation in human. *Oncogene* 2006; 25: 3059-64.
- 3) Hayashizaki Y, Hirotsune S, Okazaki Y, Hatada I, Shibata H, Kawai J, Hirose K, Watanabe S, Fushiki S, Wada S, Sugimoto T, Kobayakawa K, Kawara T, Katsuki M, Shibuya T, Mukai T. Restriction landmark genomic scanning method and its various application. *Electrophoresis* 1993; 14: 251-258.
- 4) Hayatsu H, Wataya Y, Kai K, Iida S. Reaction of sodium bisulfite with uracil, cytosine, and their derivatives. *Biochemistry* 1970; 9: 2858-65.
- 5) Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 1827-31.
- 6) Genereux DP, Johnson WC, Burden AF, Stoger R, Laird CD. Errors in the bisulfite conversion of DNA: modulating inappropriate- and failed-conversion frequencies. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: e150.
- 7) Shiraishi M, Hayatsu H. High-speed conversion of cytosine to uracil in bisulfite genomic sequencing analysis of DNA methylation. *DNA Res* 2004; 11: 409-415.
- 8) Hayatsu H, Shiraishi M, Negishi K. Bisulfite Modification for Analysis of DNA Methylation. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* 2008; 6.10.1-6.10.
- 9) Weber M, Davies JJ, Wittig D, Oakeley EJ, Haase M,

- Lam WL, Schübeler D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* 2005; 37: 853-62.
- 10) Rauch T, Pfeifer GP. Methylated-CpG island recovery assay: a new technique for the rapid detection of methylated-CpG islands in cancer. *Lab Invest* 2005; 85: 1172-80.
 - 11) Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jørgensen H, Ellis P, Stalker J, Jackson D, Clee C, Plumb R, Rogers J, Humphray S, Cox T, Langford C, Bird A. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* 2008; 6: e22.
 - 12) Khulan B, Thompson RF, Ye K, Fazzari MJ, Suzuki M, Stasiak E, Figueroa ME, Glass JL, Chen Q, Montagna C, Hatchwell E, Selzer RR, Richmond TA, Green RD, Melnick A, Grealis JM. Comparative isoschizomer profiling of cytosine methylation: the HELP assay. *Genome Res* 2006; 16: 1046-55.
 - 13) Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, Issa JP. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 2007; 3: 2023-36.
 - 14) Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis. *Cell* 2006; 126: 1189-201.
 - 15) Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, Henikoff S. Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet* 2007; 39: 61-9.
 - 16) Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39: 457-66.
 - 17) Pfeifer GP, Rauch TA. DNA methylation patterns in lung carcinomas. *Cancer Biol* 2009; 19: 181-7.
 - 18) Rauch TA, Wu X, Zhong X, Riggs AD, Pfeifer GP, A human B cell methylome at 100-base pair resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 671-8.
 - 19) Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 2008; 452: 215-9.
 - 20) Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 2008; 454: 766-70.
 - 21) Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Freitas, MA. Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma* 2003; 112: 77-86.
 - 22) Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 1988; 7: 1395-1402.
 - 23) Solomon MJ, Larsen PL, Varshavsky A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 1988; 53: 937-47.
 - 24) Johnson DS, Li W, Gordon DB, Bhattacharjee A, Curry B, Ghosh J, Brizuela L, Carroll JS, Brown M, Flicek P, Koch CM, Dunham I, Bieda M, Xu X, Farnham PJ, Kapranov P, Nix DA, Gingeras TR, Zhang X, Holster H, Jiang N, Green RD, Song JS, McCuine SA, Anton E, Nguyen L, Trinklein ND, Ye Z, Ching K, Hawkins D, Ren B, Scacheri PC, Rozowsky J, Karpikov A, Euskirchen G, Weissman S, Gerstein M, Snyder M, Yang A, Moqtaderi Z, Hirsch H, Shulha HP, Fu Y, Weng Z, Struhl K, Myers RM, Lieb JD, Liu XS. Systematic evaluation of variability in ChIP-chip experiments using predefined DNA targets. *Genome Res* 2008; 18: 393-403.
 - 25) Johnson DS, Mortazavi A, Myers RM, Wold B. Genome-wide mapping of in vivo protein-DNA interactions. *Science* 2007; 316: 1497-502.
 - 26) Barski A, CS, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 2007; 129: 823-37.
 - 27) Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007; 448: 553-60.

- 28) Dohm JC, Lottaz C, Borodina T, Himmelbauer H. Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 105.
- 29) Albert I, Mavrich TN, Tomsho LP, Qi J, Zanton SJ, Schuster SC, Pugh BF and: 572-6. Translational and rotational settings of H2A.Z nucleosomes across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 2007; 446: 572-6.
- 30) Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, Zanton SJ, et al. Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* 2008; 453: 358-62.
- 31) Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T, Stuart J, Ranade S, Peckham H, et al. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res* 2008; 18: 1051-63.
- 32) Tang F, Barbacioru C, Wang Y, Nordman E, Lee C, Xu N, Wang X, Bodeau J, Tuch and S.A. BB, Lao K, Surani MA. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* 2009; 6: 377-82.
- 33) Oda M, Glass JL, Thompson RF, Mo Y, Olivier EN, Figueroa ME, Selzer RR, Richmond TA, Zhang X, Dannenberg L, Green RD, Melnick A, Hatchwell E, Bouhassira EE, Verma A, Suzuki M, Grealley JM. High-resolution genome-wide cytosine methylation profiling with simultaneous copy number analysis and optimization for limited cell numbers. *Nucleic Acids Res* 2009; [Epub ahead of print].
- 34) Jiang Y, Matevosian A, Huang HS, Straubhaar, J and Akbarian, S. Isolation of neuronal chromatin from brain tissue. *BMC Neuroscience* 2008; 9: 42-51.
- 35) Mill J, Petronis A. Profiling DNA methylation from small amounts of genomic DNA starting material: efficient sodium bisulfite conversion and subsequent whole-genome amplification. *Methods Mol Biol* 2009; 507: 371-81.
- 36) Mill J, Yazdanpanah S, Gückel E, Ziegler S, Kaminsky Z, Petronis A. Whole genome amplification of sodium bisulfite-treated DNA allows the accurate estimate of methylated cytosine density in limited DNA resources. *Biotechniques* 2006; 41: 603-7.
- 37) Dahl JA, Collas P. MicroChIP - a rapid micro chromatin immunoprecipitation assay for small cell samples and biopsies. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: e15.
- 38) Acevedo LG, Iniguez AL, Holster HL, Zhang X, Green R, Farnham PJ. Genome-scale ChIP-chip analysis using 10,000 human cells. *Biotechniques* 2007; 43: 791-7.
- 39) Nomura W, Barbas CF 3rd. In vivo site-specific DNA methylation with a designed sequence-enabled DNA methylase. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 8676-7.

著者プロフィール



矢追 毅 Takeshi Yaoi

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学・助教

略 歴：1987年3月 京都薬科大学（生化学Ⅱ教室）卒業

1989年3月 九州大学大学院薬学研究科修士課程（微生物薬品化学）修了

1989年4月～1998年9月

塩野義製薬株式会社医科学研究所研究員

この間、九州大学附属遺伝情報実験施設（榊佳之教授）・研究生、国立岡崎共同研究機構基礎生物学研究所・バイオサイエンストレーニングコース講師

1998年10月～現職

専門分野：分子生物学，分子神経生物学，環境エピジェネティクス

主な業績：1. Yaoi T, Itoh K, Nakamura K, Ogi H, Fujiwara Y, Fushiki S. Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 376: 563-567.

2. Yaoi T, Suzuki H, Kawai J, Watanabe S, RLCS, Restriction Landmark cDNA Scanning, in: Y. Hayashizaki, S. Watanabe (Eds.), *Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS)*, Springer-Verlag Tokyo 1997; pp. 129-156.