

## 【総 説】

# 哺乳動物の加齢に伴うDNAメチル化の変動

下田 修義

国立長寿医療研究センター再生再建医学研究部門

### 要約

DNA のメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック変化が老化に重要な役割を果たしているのではないかという見方が広まりつつある。これはひとつにはエピジェネティック修飾が環境により変化する、また細胞分化のために変化するよう運命づけられているなどの、多少の不安定性を内包していることによる。しかしその最大の理由は哺乳動物の初期発生においてエピジェネティック修飾が完全にリセットされることにあると筆者は考える。本稿では哺乳動物の加齢に伴う DNA メチル化の変化を記載した論文について方法論にやや重点を置いて紹介する。

キーワード：DNA methylation, CpG island, CpG island shore

### 1. はじめに

加齢とともに何らかの生体内高分子が微細な構造変化（ダメージ）を蓄積していき、それがやがて老化個体の表現型として表出されると古くから推測されている。この推測が正しければ、寿命は世代ごとにリセットされるから、変化した老化原因分子を次世代に伝えないための仕組みが存在するはずである。見方を変えれば次世代のスタート時、すなわち受精前後に加齢変化が解消されている分子は老化原因分子の候補になる。このような分子について次の三つのタイプが知られている。

一つ目は不変タイプで、体細胞でおこる加齢変化が例外的に生殖細胞では起きない。核ゲノムの一次構造がそれで、体細胞のDNA 配列は活性酸素や紫外線などの遺伝毒性ストレス（genotoxic stress）により徐々に突然変異を蓄積するのに対し、生殖細胞での変異は体細胞に比べ低く抑えられているという[1,2]。ただしこれには反論もある[3,4]。また体細胞では複製のたびに短縮してしまうヒトのテロメア配列も生殖細胞は高いテロメラーゼ活性をもつため一次構造が保存される。

二つ目は除外タイプで、加齢変化した分子が生殖細胞形成時に、あるいは初期胚で選択的に排除される。いくつかの生物種で加齢に伴いカルボニル化されたタンパク質が増えることが観察されているが、成熟期にある線虫の卵やマウスの栄養外胚葉からカルボニル化されたタンパク質が除去される [5,6]。また最近、老化した出芽酵母から配偶子(胞子)が形成される時に、老化酵母に蓄積した凝集タンパク質や染色体外環状リボソーム DNAが配偶子には伝わらないことが示された[7]。

三つ目は新生タイプで、その構造が生殖細胞で加齢変

化しているか否かはっきりしないが、受精後の胚において前世代でつくられた構造が一度解消され、新たに作り出される。これが哺乳動物ゲノムのメチル化で見られる [8-11]。この現象はこれまでインプリンティングや細胞の初期化を理解するための研究対象とされてきたが、変化が次世代でリセットされることから老化の視点から見てもおもしろい。そのためか最近のエピジェネティクス研究の興隆に伴い、一時下火となっていた、加齢に伴うDNAメチル化の増減を記載した研究が再び報告されるようになってきた。ただしそれらは研究ごとに採用された手法が異なるため、読み比べるのにも骨が折れる。そこで本稿ではそれぞれの手法をやや詳しく解説しつつ、哺乳動物の加齢に伴うDNAメチル化の変化を追跡した研究を解説する。読者の方々がメチル化解析を自身の研究に取り入れる際の参考になれば幸いである。

### 2. 脊椎動物におけるDNAメチル化のパターン

哺乳類染色体 DNAの5% のシトシンはピリミジン環5位の炭素にメチル基が共有結合している。メチル化を受けるシトシンはCpG というパリンドロミックな並びのシトシンに限られていて、CpG配列のシトシンはその7割がメチル化を受けている[12,13]。それ以外の並びの、非パリンドロミックなCpA, CpT, CpC、のシトシンがメチル化されるケースは体細胞ではほとんどない[12]。この CpG 配列の新規のメチル化は DNAメチル化酵素（DNA methyltransferase, Dnmt）、Dnmt3aとDnmt3bが行い、複製の際のメチル化の維持をDnmt1が担当する（図1）[14,15]。Dnmt1はDNA複製の際にDNA複製機構に局在しており、親鎖のCpG がメチル化されていると、それを認識して新生鎖の相補的な CpG 配列をメチル化することでメチル化パターンを維持する[16,17]。

哺乳動物ゲノムの半分を占めるレトロトランスポゾンをはじめ、遺伝子間領域、さらに大部分のジーンボディ、

連絡先：〒474-8522

愛知県大府市森岡町源吾 3 5

電話・ファックス：0562-46-8629

Email address: shimoda@ncgg.go.jp

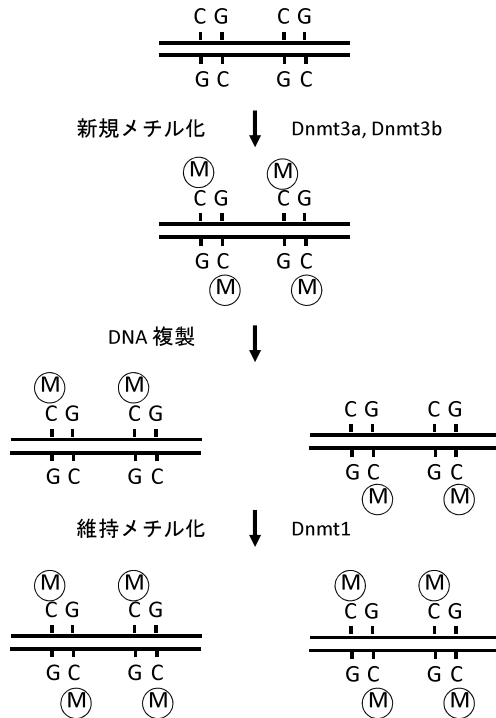


図1 哺乳動物のシトシンメチル化機構

新規メチル化酵素 Dnmt3a と Dnmt3b が CpG ジヌクレオチドのシトシンをメチル化する。複製に際してヘミメチル化状態になった DNA を維持メチル化酵素 Dnmt1 がメチル化することで、複製後もメチル化のパターンが保たれる。

すなわち遺伝子の転写領域部分も通常は重度にメチル化されている(図2)[18]。例外はおおよそ 70% の遺伝子のプロモーター領域周辺に見つかる「CpG アイランド」と名付けられた領域である [19]。CpG アイランドはシトシンとグアニンに富む平均して 1kb の領域で、この領域における CpG 配列は基本的に転写の有無によらず、ほぼ完全にメチル化を免れている [20]。CpG アイランドがどのようにしてメチル化を免れているのかは未だ解明されていないが、脱メチル化酵素の本命候補と目されている Tetタンパク質が関与している可能性がある

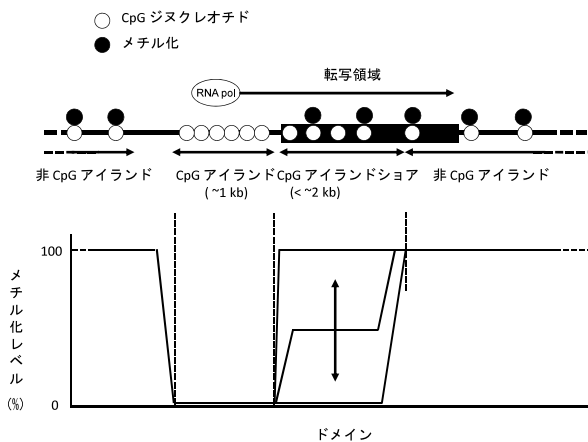


図2 脊椎動物ゲノムにおけるメチル化シトシンの分布様式

哺乳類を含め脊椎動物のゲノムは重度にメチル化されている。例外は遺伝子上流にある CpG アイランドで、この領域は通常転写の有無にかかわらずほぼ完全にメチル化を免れる。CpG アイランドの端にはしばしば中間的なメチル化レベルを示す CpG アイランドショアが存在する。

[11]。また CpG アイランドに隣接した、シトシンやグアニンがそれほど密に存在しないおおよそ 2 kb 以内の領域は CpG アイランドショアと名付けられ、ヒトの異なる組織の間やガン細胞と正常細胞の間[21]、造血前駆細胞の分化の過程[22]、あるいはiPS 細胞とその元になった繊維芽細胞の間 [23] でメチル化を比較したときに差異が頻繁に見られる領域として注目されている [24]。

このように哺乳動物核ゲノムのメチル化レベルは大まかに3つに分けられる：(1) CpG アイランド(非メチル化状態、プロモーター周辺に多い)、(2) CpG アイランドショア(中程度のメチル化、)、(3) 非 CpG アイランド(高メチル化状態、ゲノムの大半を占める)。

### 3. DNA メチル化の役割

Dnmt1, 3a, 3b のどれを欠損しても胚性、あるいは出生後致死となることから、DNA メチル化は哺乳動物の生存に不可欠であることが判明した[25,26]。Dnmt1 ノックアウトマウスではゲノム全体が極度に低メチル化し、遺伝子間領域やイントロンに存在するレトロエレメント IAP が過剰発現する[27]。一方、ガン細胞においてガン抑制遺伝子が抑制されているときにその CpG アイランドがメチル化されていること [28]、脱メチル化剤の5-アザシチジン処理すると、メチル化された CpG アイランドのメチル化が外れ遺伝子発現が回復することなどから[29]、DNAメチル化は転写を抑制する機能を持つことがわかっている。

DNA メチル化の発現抑制が哺乳動物の正常な発生過程において果たす役割としてはX染色体の不活性化とゲノムインプリンティングが有名である。X染色体の不活性化ではメスの2本ある X 染色体の内1本が発生初期にほぼ全域にわたって不活性化されるが、そのとき不活性化X染色体上の数百の CpG アイランドは活性 X 染色体上のそれに比べ高度にメチル化されている[29]。一方、ゲノムインプリンティングではインプリント遺伝子の発現調節に関わるメチル化可変領域 (CpG アイランド) を性別に依存してメチル化する。これによりインプリント遺伝子が父親のみ、あるいは母親のみで発現ようになる[30]。Dnmt1 変異胚ではメチル化可変領域の脱メチル化とともにインプリント遺伝子の発現異常が認められる[31]。

そのほか個別の遺伝子についてメチル化・脱メチル化が遺伝子発現のオン・オフに関与している例もいくつかあるがここでは文献を挙げるにとどめる[32-34]。

### 4. DNA メチル化と老化の関連

DNA メチル化が老化の原因であることを実験的に示した例はない。そのことを示唆するデータが一例あるのみである [35]。ここではその一例と、そのほかは加齢に伴うメチル化変動を記載した研究について紹介する。その記載は重要である。加齢に伴うメチル化変動の正確な記載があつてはじめて、将来そこに介入する有効な手立てをたてられ、その評価が可能になるからである。

## 1) メチル化低下によるマウスの早期老化症

クロマチンリモデリング因子である SNF に似た PASG/Lsh (proliferation associated SNF-2-like gene/lymphoid specific helicase) のノックアウトマウスのゲノムではリピート領域とシングルコピー領域がともに低メチル化し、出生前後に死亡する [35,36]。PASG/Lsh それ自身はメチル化酵素活性をもたないが、DNA メチル化酵素 Dnmt3a および 3b と複合体を形成する [37]。Arceci らが PASG/Lsh の機能低下型マウスを作製したところ、その6割は生後数日で死ぬが、残りの4割は数週間生き延び、そのとき成長遅滞と骨粗鬆症、脊柱後湾症、白髪、皮下脂肪の減少、悪液質等の老化の症状を示した (図3) [35]。その PASG/Lsh の機能低下マウスでもゲノムの低メチル化が見られ、またいくつかの組織で老化のバイオマーカーとされる SA- $\beta$  ガラクトシダーゼの発現が見られたことから、ゲノムのメチル化異常により老化表現型がもたらされることが示唆された。しかし PASG/Lsh の機能低下で見られるようなリピート領域の低メチル化は正常な加齢の過程では見られないことから、老化の表現型というアウトプットは似ているかもしれないが、そこに至る経路については正常な老化の場合と異なることも予想される。

## 2) 加齢に伴うメチル化の変化

バイサルファイトクロニング法 (後述) をするとわかるが、あるゲノム領域をみたとき、それが同じ組織由来であっても個々の CpG 部位でのメチル化の有無には多少のばらつきがみられる。つまり DNA 配列とは異なり DNA のメチル化は隣り合う細胞の間で違いが見

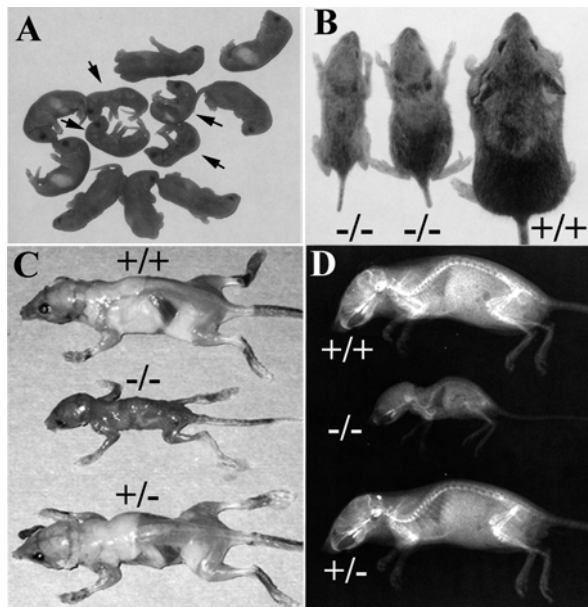


図3 DNA 低メチル化変異体 PASG-/-

PASG/Lsh のノックアウトマウスではゲノムのさまざまな領域で低メチル化が生じ、機能低下型の変異体では成長遅滞 (A, 矢印) の他、白髪やはげ (B)、筋萎縮 (C)、脊柱後湾症 (D) など早期老化症の表現型が現れる (Arceci 博士より提供)。

られることがある。ばらつきの度合いは細胞の種類やゲノム領域により異なる。このようにゲノムのメチル化は確率的なものであるが、集団としてみると細胞のタイプに典型的なゲノムのメチル化パターン (エピゲノム) をもつ。したがって、緩慢と予想されるメチル化加齢変化を見出すには、できるだけ正確に、かつ多くのサンプルについてメチル化の変化を測定し、統計学的な検定にかけなければならない。この技術的および労力的な問題が加齢とメチル化の関連を調べる研究の壁となってきたが、バイサルファイト法にスループットの高い塩基配列解析装置を組み合わせることでその問題も克服できるようになってきた。それらの技術が開発される以前の研究を含めて、以下に加齢とメチル化の関連を調べた研究を手法ごとに紹介する。現在老化のメチル化解析に用いられる手法は大別して、メチル化感受性制限酵素かバイサルファイト法のどちらかあるいは両方を基礎として用いている。これらの他にもう一つ、抗メチル化シトシン抗体やメチル化シトシン結合タンパク質を利用するメチル化解析法があるが、この手法はまだ老化研究に適応された報告がないので本稿では省略する。

### a) TLC/HPLC

1983年に、マウスとヒトの初代培養細胞に含まれるメチル化シトシン量が時間経過とともに低下することが薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いて示された [38]。これを端緒として加齢に伴うメチル化シトシン量の変化を、液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて記載する研究が続いた。そこではヒトやマウスのいくつかの組織でも加齢によりゲノムのメチル化シトシン含量が低下見られると報告されたが [39,40]、それに加えて、組織によっては加齢変化しない [41,42]、細胞の種類によっては、むしろ上昇するというデータも含まれていた [43]。これらの結果は生物の種や組織ごとのメチル化変動の違いを反映したものと見なせる一方で、加齢に伴う組織のメチル化変動をゲノム全体のレベルで解析することの難しさを示したとも考えられる。その理由は、TLC や HPLC によるメチル化解析では、ゲノム DNA をモノヌクレオシドやモノヌクレオチドにまで分解し、もともと全塩基のうちおよそ 1% しか含まれないメチル化シトシンの増減を検出するという技術が求められる上に、後でわかったことだが、組織では加齢によりメチル化の上昇する領域と低下する領域が存在し、それらが相殺されることによりメチル化シトシンのゲノム含量の変化が TLC や HPLC の検出限界付近の微々たるものになる可能性があるからである。また当然のことながら TLC や HPLC では、メチル化シトシンが増減するゲノム領域までは不明であった。

### b) メチル化感受性制限酵素

制限酵素にはその認識配列の中にある CpG 部位がメチル化されていると切断できないメチル化感受性制限酵

素が多くある。その一方で同じ認識配列をもちながら（アイソジマー）メチル化に非感受性の酵素もあり、両者を対にして用いるとメチル化の差を切断頻度の差に変換できる。この差を直接可視化したり、さらに PCR の増幅効率や増幅限界に転換したりすることでメチル化レベルを測定できる。当然ながら解析の対象となる領域は制限酵素部位の存在する領域に制限されるが、逆にそれを利用して CpG アイランドや CpG アイランドショアに出現しやすい酵素を使えば、それらの領域におけるメチル化変動を効率よく調べることもできる。

#### b)-1 サザンハイブリダイゼーションとの組み合わせ

特定の遺伝子領域における加齢に伴うメチル化変化を調べるため、最初に用いられたのがメチル化感受性制限酵素とサザンハイブリダイゼーションの組み合わせである。これはメチル化レベルの変化を、X線フィルム上のバンドパターンの変化としてとらえる。後述のバイサルファイトシーケンス法に比べれば一度に広い領域を調査できるという利点はあるが、解析したい領域に必ずしも適切な制限酵素部位が見つかるわけではないという点や、微妙なバンドの変化をもとにメチル化の定量を行うという手技上の難しさもあり、この解析法は現在あまり用いられない。しかし小野らはこの手法でマウスやヒトの *c-fos*、*c-myc* 遺伝子を詳細に解析し、いくつかの重要な知見を得た [44,45]。たとえば 1) これらの遺伝子において DNA メチル化レベルが加齢により上昇し、その上昇が現在でいう CpG アイランドショアに限定して起こること、2) *c-fos* の場合メチル化の上昇に伴い発現が低下すること、3) もともと同じ遺伝子でも組織によりメチル化レベルは異なり、加齢によるメチル化の変化も組織により異なること、4) 老化だけでなく発生の時期にも遺伝子のメチル化の変動は起こること。そして加齢の過程で見られるメチル化変動は、発生時期に起こる変動の傾向が続いたものであること、などである。小野らはこの最後の知見から、老化は「発生過程の継続」によるという着想を得た。

一方、Issa の研究グループはヒト大腸の腫瘍で発現が抑制されていたエストロゲン受容体遺伝子 (ER) のメチル化をサザンハイブリダイゼーションにより調べた [46]。その結果、腫瘍では ER の CpG アイランドがメチル化していることがわかったが、予期せぬことに、ER の CpG アイランドは正常な大腸粘膜においても加齢に伴い徐々にメチル化されていくことを見出した。彼らはその後、同じ手法で IGF2 [47]や MYOD [48]という遺伝子にも大腸粘膜で加齢依存的に CpG アイランドのメチル化が見られることを報告した。これらの結果は加齢が危険因子となる病気について、その下地にメチル化異常が潜んでいることを示唆した点で重要である。DNA のメチル化は確率的なもので、個体間である程度の差が生じる。この問題を克服するため、彼らはさまざまな年齢から多数の検体を得て解析することで、加齢依存的なメチル化を回帰分析により証明した。

#### b)-2 Methylated CpG island Amplification (MCA)との組み合わせ

Issa グループの豊田らは、*XmaI/SmaI* というともに CCGGGG配列を認識するアイソジマーを巧妙に使い分けることで、ガン細胞で異常なメチル化を受けた CpG アイランドを増幅できることを示し、この方法を Methylated CpG island Amplification (MCA) と名付けた [49]。大腸ガンから得られた33のMCAクローンのうちのひとつ Versican (CSPG2) を詳細に解析し、ER 遺伝子同様、加齢依存的なメチル化を受けること、同時に発現量が減少することを示した。彼らはこの Versican を含め、他4つの MCAクローンが CpG アイランドの端、つまり CpG アイランドショアに位置することを記述している。なお筆者が上記33の MCA クローンを現在のヒトゲノムデータベースに照らし合わせると、そのおよそ半数が CpG アイランドショアと予想される領域に位置しており、その数は CpG アイランドの内部に由来する MCA クローン数より多かった。MCA で使用された *XmaI/SmaI* 部位の出現頻度は CpG アイランドショアより CpG アイランド内部の方が高いはずだが、それにもかかわらず CpG アイランドショア由来の DNA が濃縮されたということは、CpG アイランドショアがガン細胞でメチル化されやすい領域であることを示唆する。その後、豊田らは大腸ガンでメチル化される30個の MCA クローンを新たに単離し、そのうちの19クローン (63%) が正常な大腸において加齢によるメチル化を受けることを見出した [50]。彼らはこれらの結果から、加齢に伴う遺伝子のメチル化が大腸ガンのリスクファクターになると考えた。

同じく Issa グループの Maegawa らは MCA にマイクロアレイを組み合わせた MCAM という方法で、マウス小腸の加齢依存的メチル化変化を網羅的に調べた [51]。彼らはまず3ヶ月齢と35ヶ月齢マウスのそれぞれの小腸ゲノムから MCA を行った。これによりメチル化された CpG アイランドおよびその周辺が選択的に増幅すると期待された。次いでそれぞれのアンプリコンを Cy3, Cy5 で別々にラベルした後、市販のプロモーターオリゴヌクレオチドアレイにかけ、メチル化の差のある遺伝子をスクリーニングした。これにより総遺伝子の1割程度、3,627 遺伝子がサーベイできると見積もられたがそのうち、加齢に伴いメチル化が亢進する遺伝子が2割、低下する遺伝子が1割、合計3割もの遺伝子においてメチル化の変化が認められた。一方、いくつかの反復性配列には加齢変化が検出されなかった。彼らはメチル化の変化する遺伝子数が予想以上に高いので、いくつかの遺伝子についてそのプロモーター領域の近辺についてバイサルファイトシーケンス法 (後述) やバイサルファイトシーケンス法という別の手法でもメチル化レベルを調べ、加齢変化を確かめた。さらに彼らは同じ方法でヒトの大腸に対しても調べ、サーベイした遺伝子の内1割が加齢によるメチル化を受け、1% が低メチル化することを報告した。

### b)-3 HELP 法

HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR の略称で、MCAM 法と同じく、メチル化感受性制限酵素とマイクロアレイの組み合わせでメチル化の変動した領域を同定する手法である。ただし制限酵素には HpaII (メチル化感受性) と MspI (メチル化非感受性) というどちらも CCGG を認識するアイソゾマーを用いる。2種類のゲノムをそれぞれの制限酵素で消化し、200 bp ~ 2,000 bp の断片を回収後、それぞれを PCR で Cy3、Cy5 標識しつつアンプリコンを作成し、最後にアレイにかける。Thompson らはラットの肝臓と脂肪細胞での加齢に伴うメチル化変化を HELP で調べるためにカスタムメイドのアレイを作製した [52]。まずラットゲノムのデータベースから *in silico* で4万の HpaII フラグメントを抽出し、それらの断片にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを設計、アレイに搭載した。彼らの解析では、肝臓と脂肪とも5%程度の領域で変化が見られること、ただし肝臓と脂肪ではメチル化に変動する領域に差があることが示された。この値は Maegawa が認めたマウスの3割の領域における加齢依存的なメチル化変動と比較すると随分低い。さらに、Thompson らは CpG アイランドやプロモーター領域でメチル化は変動するが、その割合が解析した他の領域、たとえば遺伝子間領域より低いという結果を得ている。このことは加齢依存的なメチル化変化が CpG アイランド、もしくは CpG アイランドショアで好んで起こるといった他の研究結果と異なる。これらの違いは実験上のいくつかの違い、たとえば使用された制限酵素やラベリング法、アレイのタイプによる感度の違い、種と組織の違い、などの複合的な要因によりもたらされたのかもしれない。また彼らは遺伝子近傍に存在し、メチル化変動した 347 の領域について、対応する遺伝子の発現を調べた結果、はっきりした変化を示したのはそのうちのおよそ1割であった。

### c) バイサルファイトシーケンス法

現在さまざまな手法でメチル化解析が行われているが、その多くに前段階として早津によりその原理が見出された、非メチル化シトシンをウラシルに変換させるバイサルファイト法が用いられる。このバイサルファイト反応後、さまざまな下流の分析の手法と組み合わせることで目的や予算に応じたメチル化解析を選択できる。たとえばゲノムの局所的なメチル化解析には、COBRA 法や MSP 法、あるいは手間は少しかかるが取り組みやすいクローンシーケンス法、機械が高額だがハイスループットで高い定量性が得られるパイロシーケンス法や質量分析法が用いられる。一方、ゲノム全体を対象にしたメチル化解析には、メチル化解析用のマイクロアレイが用いられている。以下に老化研究に用いられた例を紹介する。

### c)-1 ダイレクトシーケンスとの組み合わせ

Eckhardt らはバイサルファイト法を初めて染色体レベルの網羅的解析に利用し、加齢によるメチル化の変化の有無を調べた [53]。彼らはまず3つのヒト染色体を選び、それらを Ensemble のアノテーションに基づき、あらかじめ6つのカテゴリー (5'-UTR、コーティング領域、ノンコーディング領域など)に分けた。次に6つのカテゴリーの領域からアンプリコン (バイサルファイト処理した初代培養細胞や組織ゲノム由来の PCR 産物)を合計2,524 個作製し、それらのダイレクトシーケンスを行った。これは PCR 産物を直接シーケンサーにかけ、CpG のシトシンの位置でのメチル化シトシンのピークと非メチル化シトシンのピークの高さを比較することでメチル化レベルを計測する手法である。彼らは、肝臓、骨格筋、心筋について平均26歳と68歳のグループを比較したが、どのカテゴリー配列においても有意なメチル化の差を認めなかった。この結果から Eckhardt らは、メチル化の加齢変化はゲノムの中でかなり限定的に、上記のカテゴリーに取まらない領域で生じている可能性、あるいは彼らが使ったメチル化の測定法 (検出限界を20%のメチル化の差としている) では見過ごされる可能性があることを示唆した。ちなみにこの研究を指揮した Beck は後にこのプロジェクト (おそらく他の染色体も解析対象とする) は失敗したとサイエンス誌に語るところをみると [54]、彼らが採った手法には問題があったのかもしれない。

### c)-2 クローンシーケンス法

現在メチル化解析のスタンダードとされている方法で、他の手法で得られた結果を確認するため、あるいは試す前の予備実験としてもしばしば用いられる。まずゲノムをバイサルファイト処理後、MethPrimer などのソフトでバイサルファイト PCR 用のプライマーを選ぶ。このときプライマーは CpG 配列を含まない領域から選ぶことで、テンプレートのメチル化状態が増幅に偏りを与えないようにする。次にメチル化の解析をしたい領域を PCR で増幅後、適当なベクターにクローニングし、複数シーケンスして CpG 部位のメチル化、非メチル化を調べる。Jiang らは加齢によるインシュリン感受性の減少の原因を探るため、ラットの肝臓における糖分解の主要な酵素であるグルコキナーゼ遺伝子の発現量とメチル化を調べた [55]。彼らは30のクローンをシーケンスすることでグルコキナーゼ遺伝子のプロモーター領域が、幼若 (14週齢) からアダルト (40週齢)、そして老化 (80週齢) のどのステージの間でもメチル化が亢進することを示した。そしてリアルタイム PCR で、その発現がメチル化に反比例して加齢とともに低下していくことを明らかにした。

### c)-3 MSP 法

Methylation-specific PCR の略で、バイサルファイト処理後のゲノムに対してPCR を行い、増幅の有無からターゲット領域のメチル化を調べる方法である。この方法ではプライマーを設計する際、クローンシーケンス法の場合と逆で、プライマー配列がCpG 部位を含むようにする。プライマーの結合部位がメチル化されている場合と、メチル化されていない場合ではそれぞれアニールするプライマー配列が異なるので、両方のプライマーセットを用意し、メチル化選択プライマーと非メチル化選択プライマーでの増幅の度合いによりターゲット領域のメチル化のレベルを測定する。Akintola らは老化ラットの腎臓で N-cadherin が低下していることを見出し、その原因としてプロモーター領域のメチル化を疑った。そして4ヶ月齢と24ヶ月齢のラットの腎臓における N-cadherin の CpG アイランドショアを MSP で調べたところ、老化ラットではメチル化が起きていた [56]。また彼らは興味深いことに、カロリー制限により老化ラットでの N-cadherinメチル化が防げることも示した。カロリー制限が加齢によるメチル化変動を抑制する効果があるのか、今後の研究が期待される。

### c)-4 COBRA法

バイサルファイト処理の前後で、調べたいメチル化部位に制限酵素部位が生まれたり消えたりすることがある。その場合、バイサルファイト処理後のゲノムに対し、調べたい CpG サイトを挟むように PCR をかけ、続いて制限酵素で切断すると、PCR 産物の切断・非切断の比率からサンプル中のメチル化レベルを測定できる。これを COBRA 法 (combined bisulfite restriction analysis) と呼ぶ。

高杉はCOBRA法にマイクロチップ型の電気泳動を取り入れて、CpG アイランドの外ではあるが、マウス遺伝子の転写開始点からそれほど離れていない、316 個の CpG 配列のメチル化レベルを若齢 (3週齢)、アダルト (17週齢)、老化マウス (83週齢) の組織間で比較した [57]。その結果、メチル化の加齢変化は増加と減少の両方向あること、メチル化は若齢期からアダルトの過程ですでに始まっていて、アダルトから老化の過程での変化はその延長であること、などが示された。後者の結果は前述の小野らの結果と一致しており、メチル化の加齢変化が少なくとも老化の結果ではないことを示している。一方でメチル化の加齢変化と発現変化については有意な相関が見られないという結果が得られたが、その点について著者は、発現変化が偽陰性になった可能性を考察している。

### c)-5 パイロシーケンス法

プライマーからDNA の伸長反応をさせるときに通常は4種の塩基 (dNTP) を同時に加える。しかしここで

各塩基を個別に加えていくと、テンプレート鎖に相補的な「当たりの」塩基を加えたときだけプライマーの伸長反応が起きる。塩基が取り込まれたときにはピロリン酸 (PPi) が生じる。そのピロリン酸を化学発光に変換し、それを専用の装置で検出することができる。これを繰り返し行い、プライマーからDNA合成をしつつ塩基配列を決定する方法がパイロシーケンス法である。バイサルファイト処理後のゲノムから調べたいメチル化部位を PCR 増幅し、そのPCR 産物を直接パイロシーケンスにかけると、個々の CpG 部位のメチル化レベルを測定できる。調べられる領域はせいぜい 30 bpと短く、測定に必要とされる装置がやや高額という短所はあるが、定量性とスループットの点で優れている。

Issa らは大腸ガンだけでなく、前立腺ガンでも年齢依存的な遺伝子のメチル化が見られるかをパイロシーケンス法で調べた [58]。その結果、大腸ガンでのケース同様、前立腺ガンにおいてプロモーター領域にメチル化を受けることが知られているいくつかの遺伝子、pi-class glutathione S-transferase gene (GSTP1), ras association domain family protein 1, isoform A (RASSF1A), でも、正常な前立腺において年齢依存的なメチル化を受けること、ガンではそのメチル化が亢進していることを見出した。

### c)-6 DNAチップ法

イルミナ社からヒトゲノムのメチル化解析用チップが発売されている。このチップに載るプローブは、その3'末端がヒトゲノム上の特定の CpG 部位に来るように設計されている。ハイブリダイゼーション後にプローブの伸長反応を行うと、解析対象となるシトシンのメチル化、非メチル化に応じて、蛍光ラベルした塩基が取り込まれる、あるいはメチル化、非メチル化に対応した異なるプライマーが取り込まれるよう工夫しており、そのシグナルを読み取ることでメチル化レベルを測定する。Rakyan らはこのチップを用いて、ヒトの血液を対象にDNA メチル化の加齢変化を初めてゲノム規模で解析した [59]。彼らはまず全血液を対象に27,578 箇所の CpG を調べ 213 箇所で加齢に伴う高メチル化、147 箇所で低メチル化を検出し、高メチル化を示す CpG 部位が CpG アイランドに集中していること、さらに血液から CD4<sup>+</sup> T 細胞と CD14<sup>+</sup> 単球を分離して同様に測定しても全血液サンプルと同じゲノム領域でメチル化が変化していたことから、加齢のメチル化変化が造血前駆細胞 (中胚葉由来) に生じていることを示唆した。また血液でメチル化の加齢変化を示した領域は口腔粘膜 (外胚葉由来) でも同様にメチル化変化していることを見つけ、メチル化の加齢変化が異なる胚葉由来でも共通して起こりうることを見出した。Hernandez らはヒトの脳における加齢に伴うメチル化変化を同チップで解析し、27,578 箇所の CpGの内、およそ4%、1,141 箇所にメチル化変動を見つけた [60]。特徴的なのは、その8割、932 箇所もが CpG アイランド内に存在し、そのほ

100%が加齢とともにメチル化の上昇を示したということである。そして gene ontology 解析から、加齢によるメチル化を受ける CpG 部位の近くには DNA 結合因子や転写調節因子をコードする遺伝子がよく見られることを明らかにした。

本節では加齢とメチル化を調べる際に採られたいろいろな研究を紹介した。もともとできるだけ多くの手法を紹介したいとの意図があったが、まず筆者が注目した研究を列記してみたら結果として互いに手法が異なっていた。それにも関わらず1例を除いて他はすべてメチル化の加齢変化を検出しているということは、哺乳動物の加齢によるメチル化変動が確実で、手技によらず検出できることを示している。そして上記の結果をまとめると、哺乳動物ゲノムにおけるメチル化の加齢変化についていくつかの共通項が浮かび上がってくる。一つ目は変化する領域の多くがCpG アイランドショアや CpG アイランド内で起こること、ただしそれは特定のショアやアイランドに限られるうえ、さらに組織特異性が見られること、二つ目は、メチル化の上昇と減少の両方向の変化が見られること、三つ目はメチル化と遺伝子の発現には負の相関がしばしば見られること、最後はメチル化の変化は性成熟より前に始まっており、老化の結果ではなさそうだとということである。ここから筆者が浮かべるイメージは、加齢とともに性成熟までは必然性をもっていた組織特異的なメチル化変動が、もはやその必要がなくなったアダルトにおいてもゆるやかに継続し、しまいには細胞や組織のホメオスタシスを低下させるまでに遺伝子発現のプロファイルをゆがめていくというものだがどうだろうか。このイメージは Magalhães が主張する「老化の発生説 (developmental theory of aging)」— 発生のプログラムは発生終了時に完全に終わらず、アダルトから老化の過程でフェードアウトしていく。したがって発生のメカニズムがすでにそれを必要としなくなった時期にまで及び、それが老化を引き起こす— と合う [61]。またウイリアムズの老化の拮抗的多面発現理論にも近い。Somel らはヒトやサル的大脑で存在量が加齢変化するメッセンジャー RNAや miRNA そしてタンパク質について、その変化がやはり発生・成長段階ですでに始まっていたことから「老化の発生説」を支持し、老化を発生の延長と見なしている [62]。

## 5. 老化との因果関係の証明

加齢に伴うメチル化の変動と老化の因果関係をモデル動物で問うには、加齢依存的なメチル化の変動パターンを加速あるいは遅延させられればよい。マウスやラットでメチル化の可変領域が複数わかってきたので、その変化をマーカーとして、メチル化の変動パターンを加速あるいは遅延させる変異や低分子化合物のスクリーニングをモデル動物で行えるだろう。逆に早期老化症を示すとされるヒトやマウスで、エピゲノムの状態がどのようになっているかは上記の手法で直ちに解析が可能であるが未だ報告がない。それらの症状はしばしば “acceler-

ated aging” と表現されるが、もし本当に加齢の促進が起きているなら、DNA メチル化の変化も促進しているはずである。

一方、ヒトにおいて加齢によるメチル化変動と老化の因果関係は、高齢者特有の疾患の発症に関与すると認められるか、少なくとも発症を予測することが可能かどうかで問えるではないか。原因か結果かは不明であるが、高齢者で増加するガンにおいて遺伝子メチル化異常は明らかである。また最近では脳におけるリボソーム遺伝子のプロモーター領域のメチル化がアルツハイマー病のマーカーになり得ることが示されるなど [63]、老年病の発症原因としてメチル化異常がすでに注目されている。一方、エピゲノムを発症前後の診断に利用するとなれば細胞の非・低侵襲的なサンプリングが望まれる。たとえば血液中の DNA など病変部とは別の細胞由来のエピゲノムにマーカーを見つけることが必要になる。そのためにはまずさまざまなヒト細胞における加齢依存的なメチル化変動の部位と変動レベルの精緻な記載が不可欠である。イルミナ社は現在、解析できるヒトゲノムの CpG サイトを45 万カ所以上に増やし、レファレンス遺伝子の 99% を対象としたアレイを比較的安価に発売している。このアレイには CpG アイランドとは別に CpG アイランドショアも一つのカテゴリーとして組み込まれるなど、メチル化を調査できる領域が格段に広がっている。このような高密度メチル化アレイからヒトの加齢によるメチル化変動領域が細胞種類ごとに詳細にマッピングされるだろう。また究極的には後述の国際ヒトエピゲノムコンソーシアムにより、ほぼすべての CpG サイトについて老若の標準メチル化のレベルが次世代シーケンサーにより決定されるだろう。そしてそれらの情報をもとに、将来的にはメチル化の加齢変化を示す CpG 部位に特化したエイジチップとも呼ばれるマイクロアレイが作製され、老年病に関連したメチル化多型 (m-SNP) が見出されるようになるかもしれない。あるいは逆に、老年病に関連するメチル化多型を予断無くゲノムワイドで調べ、見つかった m-SNPが加齢変化で生じるということがわかれば、それにより加齢によるメチル化変化と老化の因果関係が認められるようになるかもしれない。そのための実験デザインがすでに提案されている [64]。

## 6. ヒトエピゲノムプロジェクト

ヒト細胞のエピゲノムのリファレンスマップを作成するために国際ヒトエピゲノムコンソーシアム (IHEC) が 2010 年に発足し、日本も 2011 年に参加を表明し承認された。ここでのエピゲノムは DNA メチル化の他、ゲノム全域にわたるヒストン修飾、ノンコーディング RNA 解析などを含む (<http://ihc-epigenomes.org/>)。解が一つしかなかったゲノムの一次配列と異なり、エピゲノムは組織や幹細胞の種類、生活環境、疾患の有無、そして年齢等によってそれぞれ異なる。そこで今後 7~10 年の間に少なくとも 1000 のエピゲノムを解読することを IHEC は目標にしている。このエピゲノムプ

プロジェクトではiPS 細胞や疾患と並び老化が6つの主要ターゲットのうちの一つとして選ばれており、近い将来、老化の組織別リファレンスエピゲノムマップができることが期待される。

## 7. まとめ

今回取り上げたDNA メチル化の変動と老化の関連を調べた研究は、ほぼすべて記載的なものである。それにも関わらず実利的な IHEC がエピゲノムプロジェクトの主要ターゲットの一つに老化を据えたのは、上記の研究が組織や種を超えた加齢に伴うメチル化変動を明確に示し、両者の因果関係を疑わずにはいられない説得力をもつからであろう。

ちなみにもし DNA メチル化のようなエピジェネティクスの乱れが老化に関与しているとしたら、酵母や線虫のようなDNA メチル化をもたない生物ではどうなのかという疑問がわく。同じエピジェネティクスであるヒストンの修飾変化を老化の原因に疑うのは単純に過ぎるだろうか。しかし寿命遺伝子として有名な *sir2* はヒストンの脱アセチル化酵素をコードしており、他にもヒストンヒストン修飾と寿命の関連を実証的に示した例がある [65,66]。総遺伝子のおよそ5%が機能阻害により寿命延長効果をもたらすという線虫の結果は [67]、寿命の変化に依る老化研究の難しさ、危うさを示しており、その判断は慎重になるべきだが、酵母の*Sir2*は加齢により減少するというヒストン修飾タンパク質の加齢変化も報告され [68]、ヒストン修飾が正常な老化に関与する可能性が出てきた。DNA のメチル化修飾とヒストン修飾は相互に依存的ともいわれ、またヒトの加齢で高メチル化する領域はクロマチンの二価領域 (bivalent domain) に対応するという報告もあり [59]、老化研究において今後、DNAメチル化修飾とヒストン修飾の両者が合わせて論じられる日も近いかもしれない。

すでにお気づきのように上記の研究には多くの日本人研究者が貢献している。今後も知恵と勇気を持った日本の若い研究者がこの分野に参加することを期待したい。

## 引用文献

1. Kohler SW, Provost GS, Fieck A, et al. Spectra of spontaneous and mutagen-induced mutations in the *lacI* gene in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA 88:7958-7962, 1991.
2. Walter CA, Intano GW, McCarrey JR, et al. Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice. Proc Natl Acad Sci USA 95:10015-10019, 1998.
3. Douglas GR, Gingerich JD, Gossen JA, et al. Sequence spectra of spontaneous *lacZ* gene mutations in transgenic mouse somatic and germline tissues. Mutagenesis 9:451-458, 1994.
4. Nishino H, Buettner VL, Haavik J, et al. Spontaneous mutation in Big Blue transgenic

- mice: analysis of age, gender, and tissue type. Environ Mol Mutagen 28:299-312, 1996.
5. Goudeau J and Aguilaniu H. Carbonylated proteins are eliminated during reproduction in *C. elegans*. Aging Cell 9:991-1003, 2010.
6. Hernebring M, Brolén G, Aguilaniu H, et al. Elimination of damaged proteins during differentiation of embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 103:7700-7705, 2006.
7. Ünal E, Kinde B and Amon A. Gametogenesis eliminates age-induced cellular damage and resets life span in yeast. Science 332:1554-1557, 2011.
8. Kaneko-Ishino T, Kohda T and Ishino F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. J Biochem 133:699-711, 2003.
9. Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. Hum Mol Genet 14:R47-R58, 2005.
10. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. Nature 447:425-432, 2007.
11. Wu SC and Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. Nat Rev Mol Cell Biol 11:607-620, 2010.
12. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature 462:315-322, 2009.
13. Li Y, Zhu J, Tian G, et al. The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. PLoS Biol 8: e1000533, 2010.
14. Siedlecki P and Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. Acta Biochim Pol 53:245-256, 2006.
15. Latham T, Gilbert N, Ramsahoye B. DNA methylation in mouse embryonic stem cells and development. Cell Tissue Res 331:31-55, 2008.
16. Chuang, LS, Ian HI, Koh TW, et al. Human DNA-(Cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21<sup>WAF1</sup>. Science 277:1996-2000, 1997.
17. Sharif J, Muto M, Takebayashi, S et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. Nature 450:908-912, 2007.
18. Suzuki MM and Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet 9:465-476, 2008.
19. Saxonov S, Berg P and Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in



- the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1412-1417, 2006.
20. Deaton AM and Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev* 25:1010-1022, 2011.
  21. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41:178-186, 2009.
  22. Ji H, Ehrlich LI, Seita J, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* 467:338-342, 2010.
  23. Doi A, Park IH, Wen B, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41:1350-1353, 2009.
  24. Pollard S, Stricker SH and Beck S. A shore sign of reprogramming. *Cell Stem Cell* 5:571-572, 2009.
  25. Li E, Bestor TH and Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69:915-926, 1992.
  26. Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257, 1999.
  27. Walsh CP, Chaillet JR and Bester TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20:116-117, 1998.
  28. Herman JG, Merio A, Mao L, et al. Inactivation of the *CDKN2/p16/MTS1* gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 55:4525-4530, 1995.
  29. Hansen RS and Gartler SM. 5-Azacytidine-induced reactivation of the human X chromosome-linked PGK1 gene is associated with a large region of cytosine demethylation in the 5' CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4174-4178, 1990.
  30. Grant SG and Chapman VM. Mechanisms of X-chromosome regulation. *Annu Rev Genet* 22:199-233, 1988.
  31. Li E, Beard C and Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366:362-365, 1993.
  32. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type-specific maspin expression. *Nat Genet* 31:175-179, 2002.
  33. Shimozaki K, Namihira M, Nakashima K, et al. Stage- and site-specific DNA demethylation during neural cell development from embryonic stem cells. *J Neurochem* 93:432-439, 2005.
  34. Mohn F, Weber M, Rebhan M, et al. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 30:755-766, 2008.
  35. Sun LQ, Lee DW, Zhang Q, et al. Growth retardation and premature aging phenotypes in mice with disruption of the SNF2-like gene, PASG. *Genes Dev* 18:1035-1046, 2004.
  36. Dennis K, Fan T, Geiman T, et al. Lsh, a member of the SNF2 family, is required for genome-wide methylation. *Genes Dev* 15:2940-2944, 2001.
  37. Zhu H, Geiman TM, Xi S, et al. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. *EMBO J* 25:335-345, 2006.
  38. Wilson VL and Jones PA. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* 220:1055-1057, 1983.
  39. Singhal RP, Mays-Hoopers, LL and Eichhorn GL. DNA methylation in aging of mice. *Mech Ageing Dev* 41:199-210, 1987.
  40. Golbus J, Palella TD and Richardson BC. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing. *Eur J Immunol* 20:1869-1872, 1990.
  41. Helden EG and Helden PD. Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs. *Mutation Res* 219:263-266, 1989.
  42. Tawa R, Ueno S, Yamamoto K, et al. Methylated cytosine level in human liver DNA does not decline in aging process. *Mech Ageing Dev* 62:255-261, 1992.
  43. Fuke C, Shimabukuro M, Petronis A, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentas: an HPLC-based study. *Ann Hum Genet* 68:196-204, 2004.
  44. Uehara Y, Ono T, Kurishita A, et al. Age-dependent and tissue-specific changes of DNA methylation within and around the *c-fos* gene in mice. *Oncogene* 4:1023-1028, 1989.
  45. Ono T, Takahashi N and Okada S. Age-associated changes in DNA methylation and mRNA level of the *c-myc* gene in spleen and liver of

- mice. *Mutat Res* 219:39-50, 1989.
46. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, et al. Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7:536-540, 1994.
  47. Issa JP, Vertino PM, Boehm CD, et al. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11757-11762, 1996.
  48. Ahuja N, Li Q, Mohan AL, et al. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 58:5489-5494, 1998.
  49. Toyota M, Ho C, Ahuja N, et al. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59:2307-2312, 1999.
  50. Ueki T, Toyota M, Skinner H, et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 61:8540-8546, 2001.
  51. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res* 20:332-340, 2010.
  52. Thompson RF, Atzmon G, Gheorghie C, et al. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell* 9:506-518, 2010.
  53. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38:1378-1385, 2006.
  54. Pennisi E. Are epigeneticists ready for big science? *Science* 319:1177, 2008.
  55. Jiang MH, Fei J, Lan MS, et al. Hypermethylation of hepatic *Gck* promoter in ageing rats contributes to diabetogenic potential. *Diabetologia* 51:1525-1533, 2008.
  56. Akintola AD, Crislip, ZL, Catania JM, et al. Promoter methylation is associated with the age-dependent loss of N-cadherin in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 294:F170-F176, 2008.
  57. Takasugi M. Progressive age-dependent DNA methylation changes start before adulthood in mouse tissues. *Mech Ageing Dev* 132:65-71, 2011.
  58. Kwabi-Addo B, Chung W, Shen L, et al. Age-related DNA methylation changes in normal human prostate tissues. *Hum Cancer Biol* 13:3796-3802, 2007.
  59. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, et al. Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res* 20:434-439, 2010.
  60. Hernandez DG, Nalls MA, Gibbs JR, et al. Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Hum Mol Genet* 20:1164-1172, 2011.
  61. de Magalhães JP and Church GM. Genomes optimize reproduction: aging as a consequence of the developmental program. *Physiology* 20:252-259, 2005.
  62. Somel M, Guo S, Fu N, et al. MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Res* 20:1207-1218, 2010.
  63. Pietrzak M, Rempala G, Nelson PT, et al. Epigenetic silencing of nucleolar rRNA genes in Alzheimer's disease. *PLoS One* 6:e22585, 2011.
  64. Rakyan VK, Down TA, Balding DJ, et al. Epigenome-wide association studies for common human diseases. *Nat Rev Genet* 12:529-541, 2011.
  65. Greer EL, Maures TJ, Hauswirth AG, et al. Members of the H3K4 trimethylation complex regulated lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466:383-387, 2010.
  66. Maures TJ, Greer EL, Hauswirth AG, et al. H3K27 demethylase UTX-1 regulates *C. elegans* lifespan in a germline-independent, insulin-dependent, manner. *Aging Cell* in press.
  67. Hamilton B, Dong Y, Shindo M, et al. A systematic RNAi screen for longevity genes in *C. elegans*. *Genes Dev* 19:1544-1555, 2005.
  68. Dang W, Steffen KK, Perry R, et al. Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan. *Nature* 459:802-807, 2009.

# Changes in DNA methylation upon mammalian aging

Nobuyoshi Shimoda

Department of Regenerative Medicine  
National Institute for Longevity Sciences  
National Center for Geriatrics and Gerontology

There is a growing perception that epigenetic modification, such as DNA methylation and histone modification, may play an important role for aging of the organism partly because epigenetic modification is susceptible to environmental changes and intrinsically destined to change for cellular differentiation, thus only partially stable. But I believe the main reason is that epigenetic modification is thoroughly reset during early development of mammals. Here I introduce studies describing age-related DNA methylation changes in mammals with the methodologies used.

Keywords: DNA methylation, CpG island, CpG island shore