

マウスセントロメア領域におけるDNAメチル化と
ヒストンコードの協調性に関する研究

平成 18 年 度

三重大学大学院生物資源学研究科
博士前期課程 生物圏生命科学専攻

中 出 真 理 子

修士論文

マウスセントロメア領域における DNA メチル化と
ヒストンコードの協調性に関する研究

平成 19 年 3 月

三重大学大学院生物資源学研究科

中出 真理子

目次

| | |
|---|-------|
| 略語表 | 3 |
| はじめに | 4-12 |
| 第1章 5-azadC 処理によるセントロメアヘテロクロマチン領域のヒストン修飾の変化 | |
| ● 序論 | 13-16 |
| ● 材料と方法 | 17-18 |
| ● 結果と考察 | 19-48 |
| ・ 5メチル化シトシンの検出 | |
| ・ 各種修飾ヒストンの検出 | |
| ・ 非同調培養における 5-azadC 処理時間とヒストン修飾の変化 | |
| ・ 同調培養における 5-azadC 処理時間とヒストン修飾の変化 | |
| 第2章 5-azadC 処理によるセントロメアヘテロクロマチン領域の DNA メチル化解析について | |
| ● 序論 | 49-50 |
| ● 材料と方法 | 51-55 |
| ● 結果と考察 | 56-61 |
| 総合考察 | 62-71 |
| 参考文献 | 72-78 |
| 謝辞 | 79 |

略語表

5-azadC: 5-aza-2'-deoxycytidine
AcH4: acetylated histone H4
Alexa: Alexa fluor®
Bio-dUTP: biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate
CAF-1: chromatin assembly factor-1
CSK: cytoskeleton (buffer)
DABCO: diazabicyclooctane
DAPI: 4', 6-diamino-2-phenylindole
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA: deoxyribonucleic acid
Dig-dUTP: digoxigenin-11-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate
diMeK4H3: dimethyl-histone H3 lysine4
Dnmt: DNA methyltransferase
FBS: fetal bovine serum
FISH: fluorescence *in situ* hybridization
HAT: histone acetyltransferase
HDAC: histone deacetylase
HMT: histone methyltransferase
HP 1 : heterochromatin protein 1
KHB: KCl and HEPES buffer
MBD: methyl-CpG binding domain protein 1
PBS: phosphate buffered saline
PFA: paraformaldehyde
RNA: ribonucleic acid
Rho: rhodamine
SDS: sodium dodecyl sulfate
SETDB1: SET domain bifurcated 1
SSC: standard saline citrate
triMeK4H3: trimethyl-histone H3 lysine4
triMeK9H3: trimethyl-histone H3 lysine9

はじめに

遺伝子の発現制御機構において、従来までのセントラルドグマによるタンパク質発現機構では説明できなかった重要な制御機構が明らかになりつつある。ゲノム上で、遺伝子領域のほかはジャンク DNA としてほとんど意味のないものと見なされてきた。

種の複雑さと個々の種のゲノムに含まれる遺伝子数の間には明瞭な相関がない。しかし、タンパク質情報を含まない部分の DNA 量は、複雑さとおおよそ比例しているようだ。そこでジャンクと呼ばれていた領域が、バクテリアからヒトにいたるまで全ての生物種の発生や特徴的な形質をコントロールしていると考えられ始めた。

《ヒトのゲノム DNA には何が書かれているのか?》



1) 遺伝子領域：ゲノム全体の 30%(900Mb)

● 構造遺伝子領域(90Mb=全体の 3%)

● 非コード領域(810Mb=全体の 27%)

- ・ 遺伝子を分断する イントロン、転写調節領域、5'-リーダーや 3'-トレーラー配列などがある。

2) 非遺伝子領域：ゲノム全体の 70%(2100Mb)

機能不明ものが多い→ガラクタ(junk)DNA といわれる。

● 繰り返し配列 (420Mb=全体の 18%)

[縦列型反復配列] 短い配列が同じ領域に数千回繰り返している

- ・ サテライト DNA(セントロメア近傍に局在)
- ・ ミニサテライト DNA(大きさが >500bp)→染色体末端に存在。

テロメアは TTAGGG という配列が 2000 回以上(12kbp)繰り返したミニサテライトである。

- ・ ミクロサテライト DNA (大きさが 500bp 以下) →染色体全体に散在。
- ・ 長分散型核因子 (LINE) : (例) L1→6.1kbp. 2 つの ORF をもつ。ゲノム全体の 4%。

- ・ ウィルス遺伝子の挿入痕跡→レトロウィルスのプロウィルス DNA (LTR)
- ・ トランスポゾン(transposons、動く遺伝子)→染色体をあちこち動き回る遺伝子

《Alu 配列》

制限酵素 Alu I で切断される部位を持つ全長 300bp の配列で、ゲノム全体にほぼ均一に存在。

●非繰り返し配列 (1680Mb=ゲノム全体の 52%)

- ・ 遺伝子重複で生じた非機能性の偽遺伝子(pseudogene)
- ・ スペース DNA→遺伝子間を区切っている無意味な配列
- ・ 応答エレメント (エンハンサーやサイレンサー配列)、複製開始点など

ゲノムの中には、タンパク質をコードする遺伝子だけでなく、もっと多くの役者がいる。

DNA のメチル化、ヒストン修飾

このように DNA 以外の因子によるタンパク発現調節機構を‘エピジェネティクス (後生遺伝学)’と言う。

生物がその遺伝情報を DNA テープに保存する前、生命は RNA として存在していたと考えられている。RNA ワールドと呼ばれる時代のことである。しかし、RNA テープは壊れやすいため、DNA テープに情報を書き換え保存し、複製する生き方を生物は選んだ。それが現在の生物である。

タンパク質との違い、タンパク質→アナログ、RNA→デジタル (配列特異的)

DNA は遺伝情報の保存媒体であり、DNA のメチル化、ヒストンの修飾は保存場所を示すタグのようなものだと考えられる。

DNA のメチル化により誘導されるヒストン修飾

DNA のメチル化

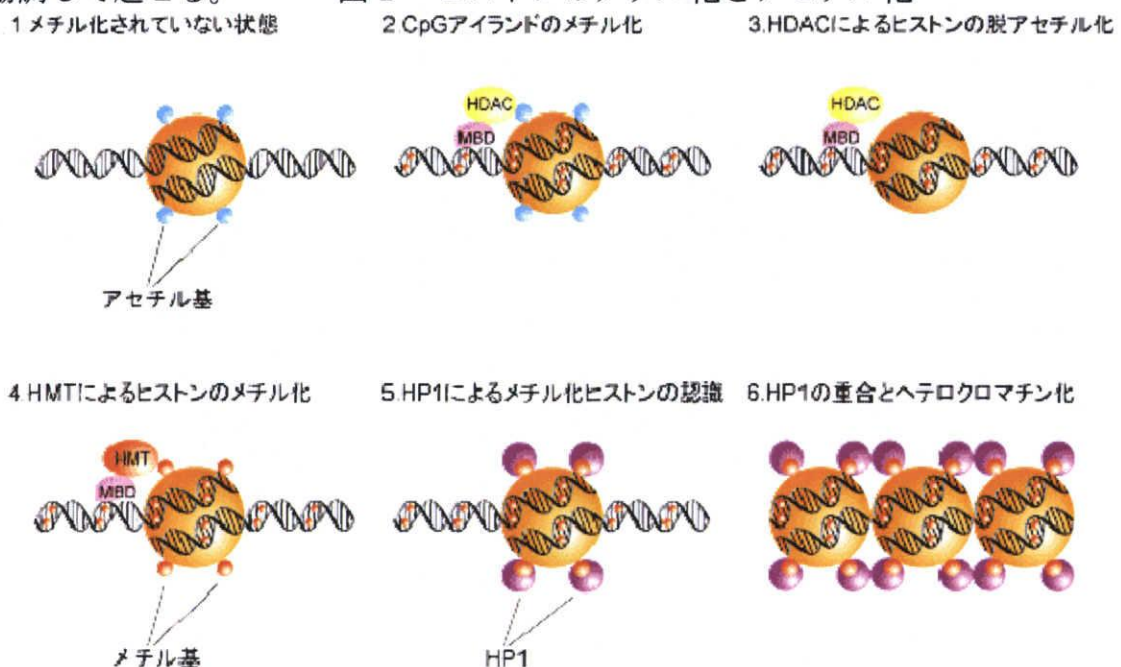
多くの真核生物ではゲノム中の CpG ジヌクレオチドのシトシンの 5 位炭素原子にメチル基が付加されている。ゲノム中の CpG ジヌクレオチドの 60~90% がメチル化を受けているが、多くの遺伝子のプロモーター領域にある CG 豊富な領域 (CpG アイランド) ではメチル化を受けていない。この例外として、インプリンティングされる遺伝子や女性の不活性化 X 染色体では CpG アイランドがメチル化され、転写が不活性化されている。また、癌細胞では癌抑制遺伝子のプロモーター領域で CpG がメチル化されていることが報告されている。

CpG アイランド以外では CpG は強くメチル化されている。メチル化 CpG は、反復配列を多く含むヘテロクロマチンやトランスポゾンに多くみられており、ウイルスやトランスポゾンの活性化を抑えていると考えられている。

哺乳類では 5 種類の DNA メチル化酵素遺伝子が単離されているが、そのうちメチル化酵素活性が認められているのは、Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の 3 つである。Dnmt1 は DNA 合成期のメチル化維持に関わるもので、Dnmt3a は胚盤胞期以降の *de novo* メチル化を起こし、Dnmt3b はインプリンティング遺伝子のメチル化を起こす。一方、脱メチル化は純粋な逆反応が起こらないので、5-メチルシトシン DNA グリコシラーゼによりメチルシトシンが除去され、DNA 修復酵素によってシトシンに置き換えられる。

メチル化 CpG に結合するタンパク質として、MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3 などが知られている。これらがメチル CpG に結合すると、HDAC や転写コリプレッサーの Sin3a と複合体を形成し、ヒストンの脱アセチル化や転写の抑制が協調して起こる。

図1 ヒストンのメチル化とアセチル化



また、ヒストン H3K9 のメチル化が引き金になり DNA メチル化酵素がリクルートされ、DNA メチル化が誘導されることもわかっている。このようにエピジェネティクスを担ういくつかの機構は、相互に協調し複雑なクロマチンの制御を行っている。

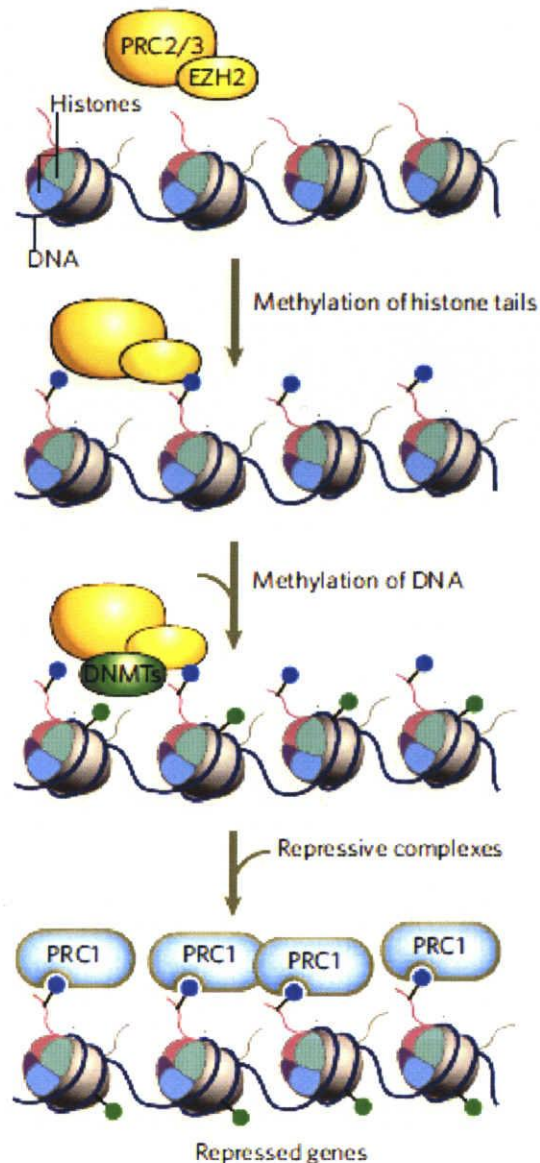


図2 ヒストン修飾からDNAメチル化が誘導されるモデル

ポリコーム群タンパク質 EZH2 (H3K27 または H3K26 をメチル化するヒストンメチルトランスフェラーゼ) は Dnmt1 と直接相互作用し DNA メチル化制御を行う
上: エピジェネティックなメチル化マークの構造

EZH2 がヒストンメチル化を行う。

EZH2 に Dnmts が結合する。

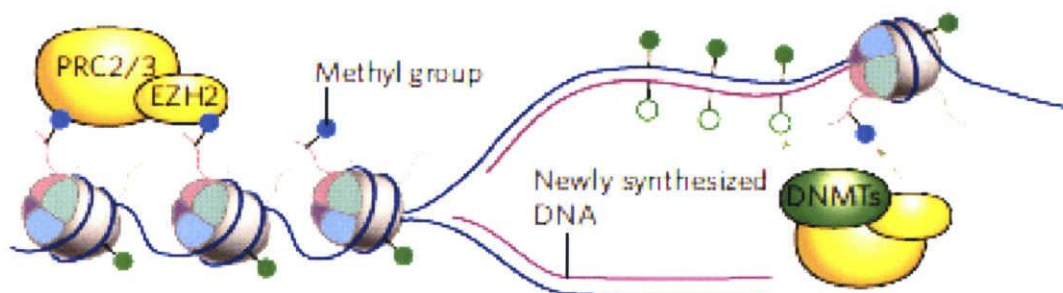
DNA がメチル化される。

ヒストン修飾が PRC1 (抑制に働く複合) を引きよせ沈黙状態 (サイレンシング) を広げる。

下: エピジェネティックな記憶の継承
EZH2 がヒストン修飾を行う。

Dnmts を含むヒストン修飾を認識する複合体がリクルートされ複製中の新生鎖 DNA にメチル基を付加する。このようにしてヒストン修飾を目印に DNA がメチル化する場所を認識すると考えられている。

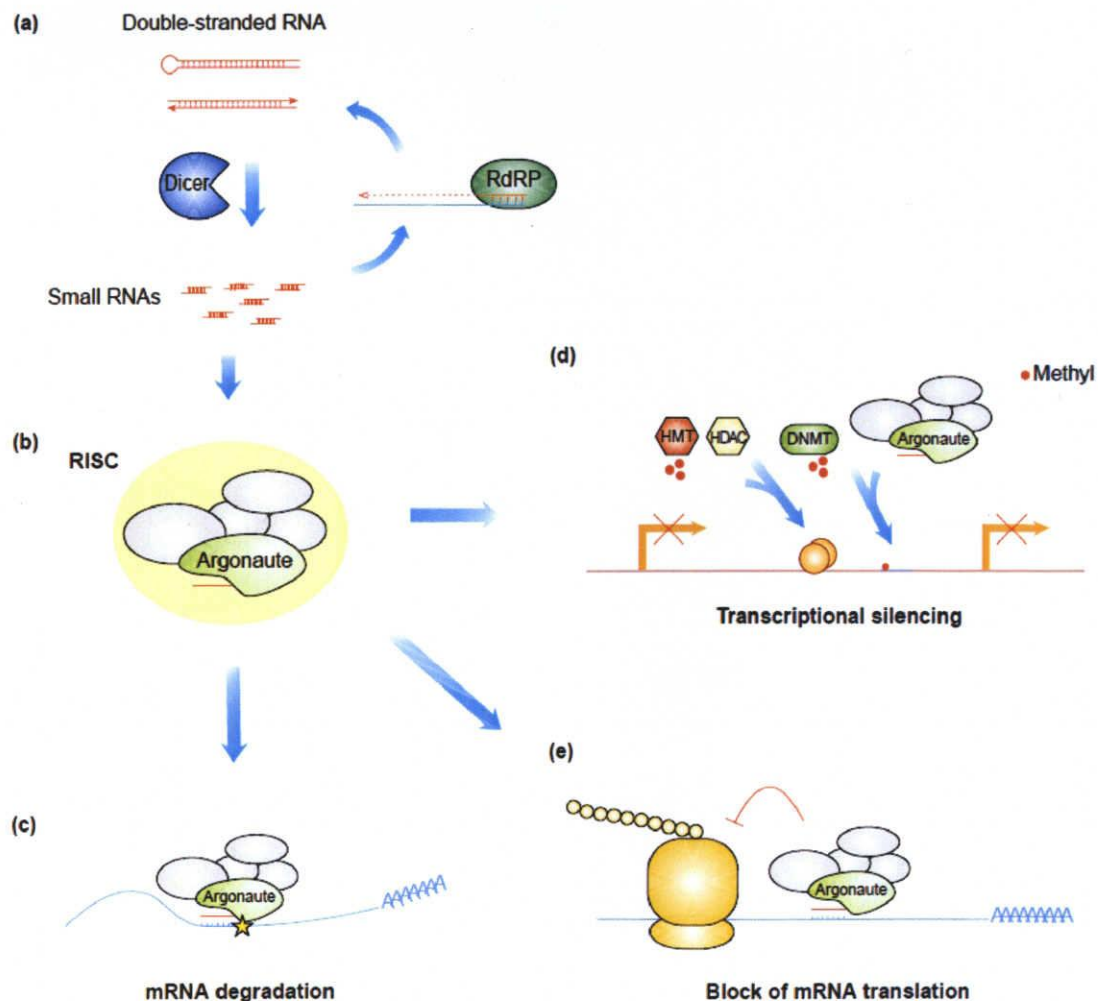
(Emmanuelle Vire 2006 nature)



RNAiによるセントロメアヘテロクロマチンの形成

Small RNAによるヘテロクロマチンの形成

RNAi (RNA interference) は、2本鎖 RNA で誘導される塩基配列特異的な遺伝子発現抑制である。2本鎖 RNA は Dicer と呼ばれる RNAIII 様酵素により分解されて約 22 塩基の短い RNA になる。この small RNA と Argonaute タンパクを取り込んだ RISC (RNA induced silencing complex) とよばれる複合体が、標的の mRNA を分解する。この分子機構は、動物だけではなく、植物でも転写後遺伝子サイレンシング、アカパンカビでは quelling とよばれる現象を起こす。また、mRNA を分解するだけではなく、mRNA と結合してタンパク質への翻訳をブロックして、発現を抑制する場合もある。



TRENDS in Cell Biology

図3 RNAi 機構 (Ricardo Almeida 2005 TRENDS in Cell Biology)

この small RNA は標的クロマチンに HMT や HDAC をリクルートし、ヒストン H3K9 メチル化ヒストンの脱アセチル化を誘導する。さらにヒストン H3K9 のメチル化が引き金となり、クロマチン領域のサイレンシングが誘導される。

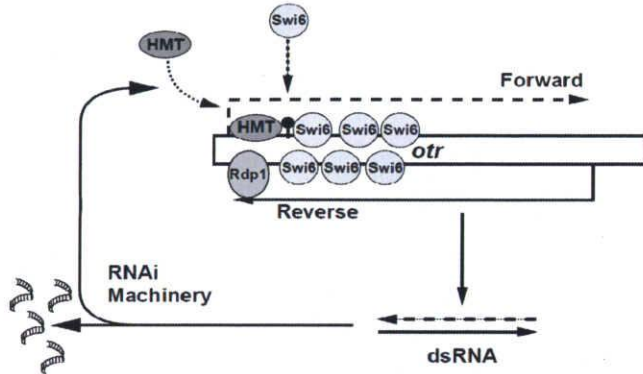


図4 分裂酵母における RNAi 機構による HMT のリクルートと Swi6 (HP1 ホモログ) によるヘテロクロマチンの伸長
(Thomas A 2002 SCIENCE)

例えば、分裂酵母では RNAi 関連遺伝子を欠損すると、セントロメア領域で正常なヘテロクロマチン構造を維持することができない。また、接合型領域では新規ヘテロクロマチンの形成が障害される。別の例として、Xist RNA は X 染色体の不活性化の開始に必要であり、X 染色体全体を不活性化させる過程で Xist RNA とヒストン H3K9 のメチル化がほぼ同時に拡張する。また、テトラヒメナのゲノムの再編成にも small RNA が関与している。このような small RNA → ヒストン修飾 → DNA メチル化という経路が、他の生物でも保存されている可能性は十分ある。

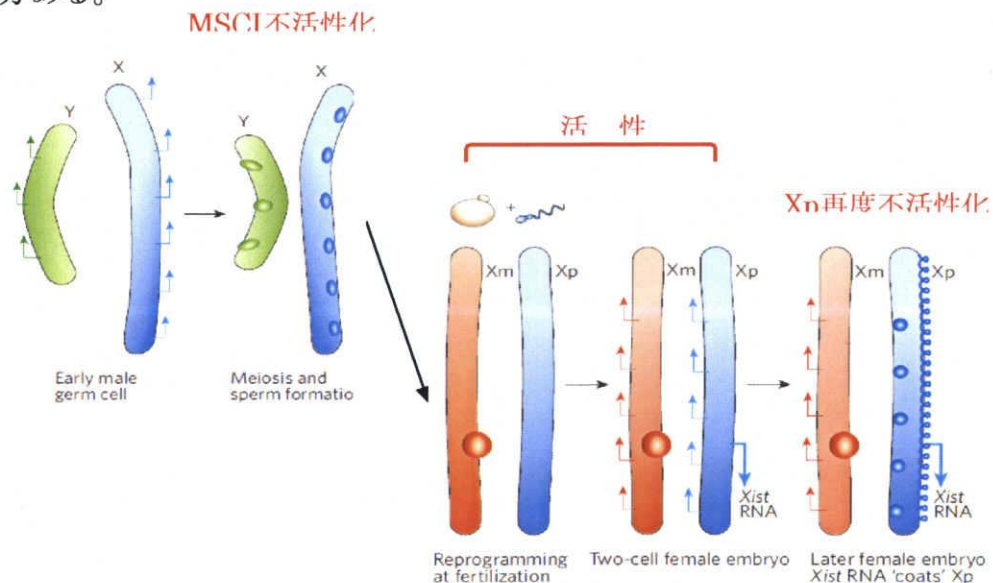


図4 ついたり消えたり X 染色体のスイッチ (Ikumuro Okamoto 2005 nature)
XistRNA が転写されるようになると Xp(父親由来 X 染色体:青)は不活性化する。

ヘテロクロマチンの主要な構成成分は反復配列であり、その多くはトランスポゾンから派生したと考えられている。また、RNAi 類似の反応がトランスポゾンの転写抑制にも関与している。RNAi 装置により誘起されるヘテロクロマチン形成や、テトラヒメナのゲノムの再編成も、トランスポゾンに対する防御から進化したのかもしれない。脊椎動物における免疫システムが、トランスポゾンに由来する DNA 組換え系を逆手に利用することにより進化したのによく似ている。このようなゲノムの相克という観点からクロマチン構造変換を眺めるのも興味深い。

図5 分裂酵母セントロメアにおける siRNA の供給
 セントロメアの H3K9 メチル化ヒストンに結合している RITS 複合体（オレンジ）に RNA 依存的 RNA ポリメラーゼを含む RDRC 複合体（グレー）が結合し RNA を合成する。これがまた、Dcr により切断され Ago を含む RITS 複合体にとりこまれ、Clr4（赤）依存的にヒストンに結合する。

(Mohammad R2004 Cell)

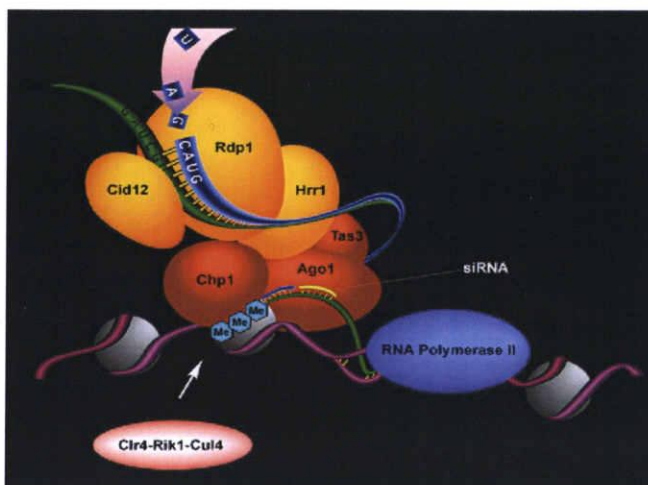
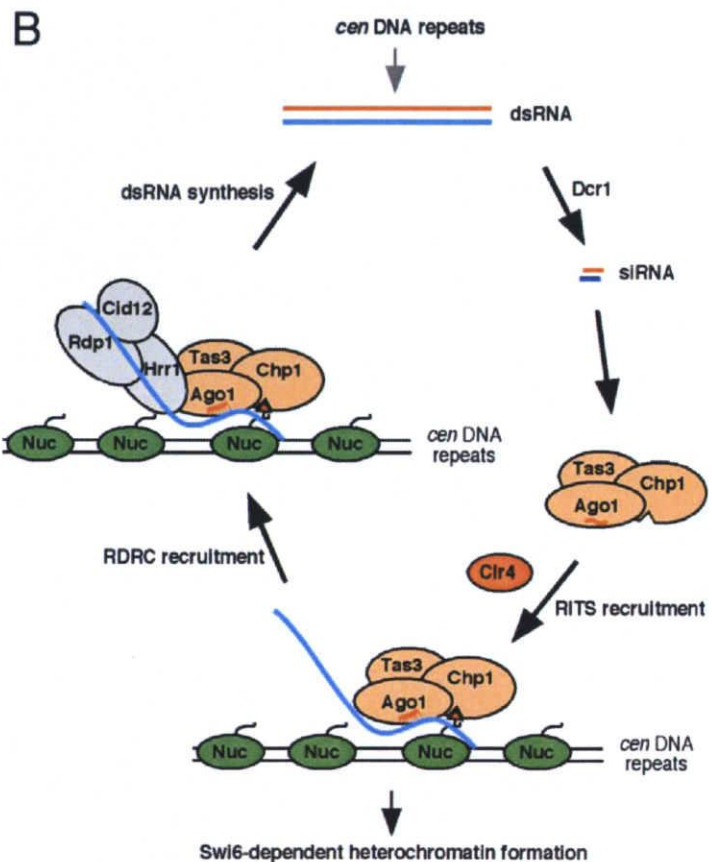


図6 上記の RITS と RDRC 複合体に RNA ポリメラーゼ II（青）を含むモデル図（Vera Schramke 2005 nature）

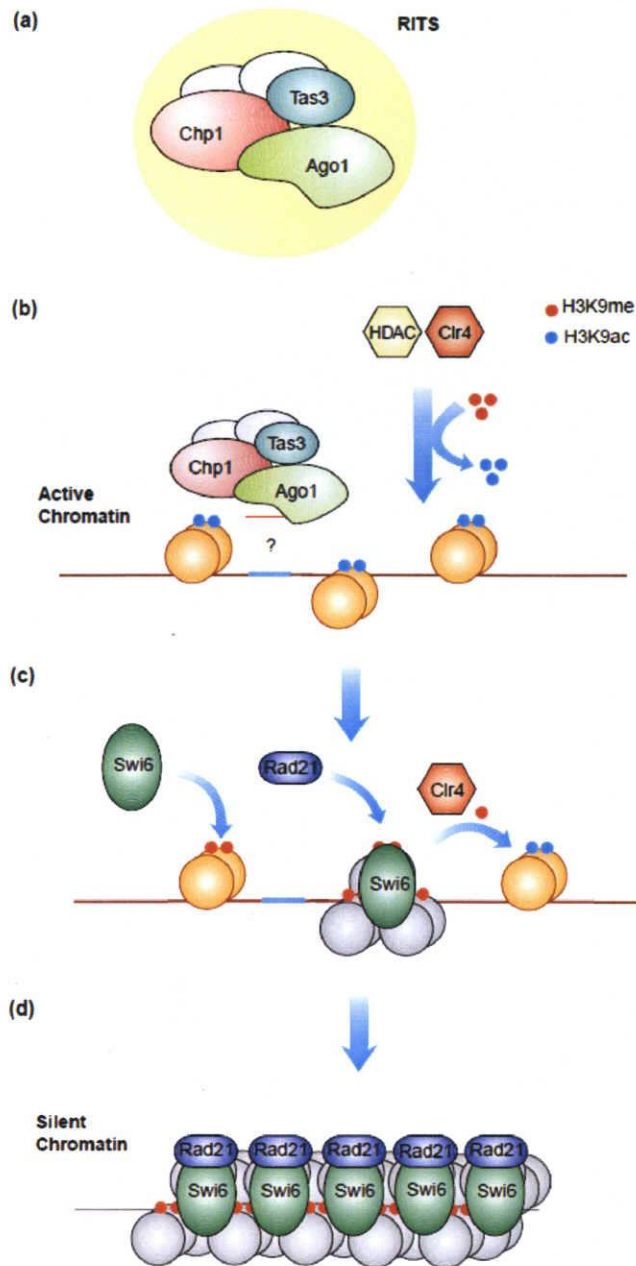


図7 RNAi 機構によるヒストン修飾の変換と Swi6 (HP1 ホモログ) によるヘテロクロマチンの伸長

(a) RITS 複合体

(b) 活性状態のクロマチン：ヒストンがアセチル化されている。RITS 複合体はこれを認識できない。ヒストンはHDACにより脱アセチル化され Ctr4 によりメチル化される。

(c) Swi6 はメチル化ヒストンと結合しクロマチンの状態を凝縮する。Rad21 はコヒーシン複合体のサブユニットであり姉妹染色分体への結合因子である。

(Ricardo Almeida 2005
TRENDS in Cell Biology)

TRENDS in Cell Biology

RNA の働きとしてよく知られているものに、mRNA tRNA rRNA noncoding small RNA などがあり、RNAi に関しては外来性の一本鎖である siRNA 内在性の二本鎖である miRNA などの分類がある。また触媒として働く RNA としてリボザイム 非翻訳領域に存在し特定の代謝産物と結合することで自身の構造を変化させ転写・翻訳制御を行う低分子 RNA リボスイッチなどが挙げられる。

RNAi は siRNA のようなノックダウンのツールとしての役割の他に、生体内ではたらく miRNA は発生・分化の制御も担っている。

植物においては、植物ホルモン オーキシシンによる側根形成や、その他子葉形成、背軸の決定に働くなど様々な miRNA による時空間的制御についての報告が蓄積している。

またショウジョウバエにおいてポリコームタンパク質 (PcG) が RNA によってプロモーターへ導かれること、線虫においては let-7 や lin-4 が有名であり、この小型 RNA が発生のタイミングを制御している。

低分子 RNA によって誘導されるものとして、X 染色体の不活性化、幹細胞の全能性の維持 (分化の制御) トランスポゾンの抑制、がんをはじめとするその他疾患、セントロメア・LINE・SINE・mat 座位 (リピート) のサイレンシング等が挙げられる。

これらの制御は種間、作用によって作られるコンプレックスが異なることにより特異性を持つと考えられる。

第1章

5-azadC 処理によるセントロメアヘテロクロマチン領域の ヒストン修飾の変化

序論

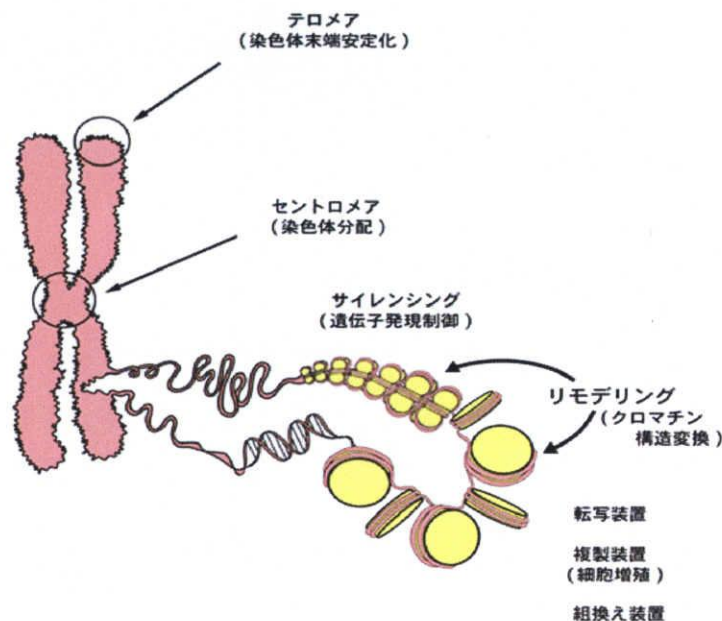
次の世代に受け継がれる遺伝情報の総体であるゲノムは、染色体の中に収められていて生物の発生・発達を制御している。しかし、ゲノムは次の世代にそっくりそのままの形で伝えられる文書とは違い、例えるなら非常に複雑な生化学的機械といえる。これは3次元空間で動き、独特の部品がダイナミックに相互しあっている。

染色体を作っている繊維状の集合体は「クロマチン（染色質）」と呼ばれ、DNAを支えているだけではなく酵素などがDNAに接触するのを調節する役目も果たしている。クロマチンの状態は、大きく分類してユークロマチンとヘテロクロマチンの2種類がある。ユークロマチンはクロマチン構造が緩まっており、転写されている遺伝子はこの部分に多く存在する。ヘテロクロマチンは密に凝集しており、この領域ではあまり転写が起きていない。DNAは非常に長いので絡まらないようにヒストンと呼ばれるタンパク質に糸のように巻きついてコンパクトに折りたたまれた構造をしている。ヘテロクロマチンはさらに次の2種類に分類することができ、遺伝子の発現がほとんどみられない構成ヘテロクロマチンと、条件によっては遺伝子の発現がみられる条件ヘテロクロマチンがある。この構成ヘテロクロマチンには、例えばテロメアやセントロメアのような複製装置といった細胞の増殖に関わるものがあり、この領域のDNAは繰り返し配列に富む。

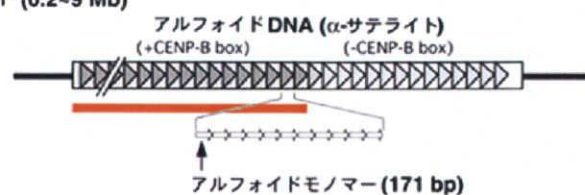
ヒトのセントロメアはアルフォイドDNA（アルファサテライト）と呼ばれる配列が反復しており、マウスの場合はメジャーサテライトとマイナーサテライトの2種類がある。マイナーサテライトはセントロメアを構成していて、その隣のメジャーサテライトはセントロメア周辺領域（ペリセントロメリックヘテロクロマチン）を構成している。このような細胞の機能に関与している構成ヘテロクロマチンの他に、転写に関与している条件ヘテロクロマチンがありこれはクロマチンのリモデリング（再構成）によりヒストンが入れ替えることで、クロマチンが凝縮し転写が起らない状態になる（サイレンシング）またはクロマチンが緩まって転写が起りやすい状態になるという調節が行われている。

このヘテロクロマチン形成の役割として考えられるものは、幹細胞の全能性の維持、つまり発生段階で全能性を持つ肝細胞が次第に分化していく過程の中で全能性を失っていく際の遺伝子の発現制御、染色体の中を動き回るウイルス由来の遺伝子トランスポゾンが動き回らないように抑制する働きをしていると考えられている。(X染色体の不活性化についても) 最近では短い RNA 鎖によるヘテロクロマチンの形成誘導や、開いた状態または閉じた状態のクロマチンの境界に関する研究報告があり、様々な疾患に関する DNA 配列のメチル化異常の解明や、再生医療への応用が期待されている。

染色体と基本機能装置



ヒト (0.2~9 Mb)



マウス (~Mb)

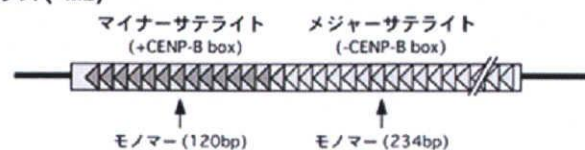


図8 上：染色体と基本機能装置

図9 下：ヒトとマウスのセントロメアリピート

| | ユークロマチン | ヘテロクロマチン | |
|----|-----------|-----------------------|--------------------------|
| 機能 | | 条件ヘテロクロマチン (転写に関与) | 構成ヘテロクロマチン (細胞の機能に関与) |
| 状態 | オープンクロマチン | | クローズクロマチン |

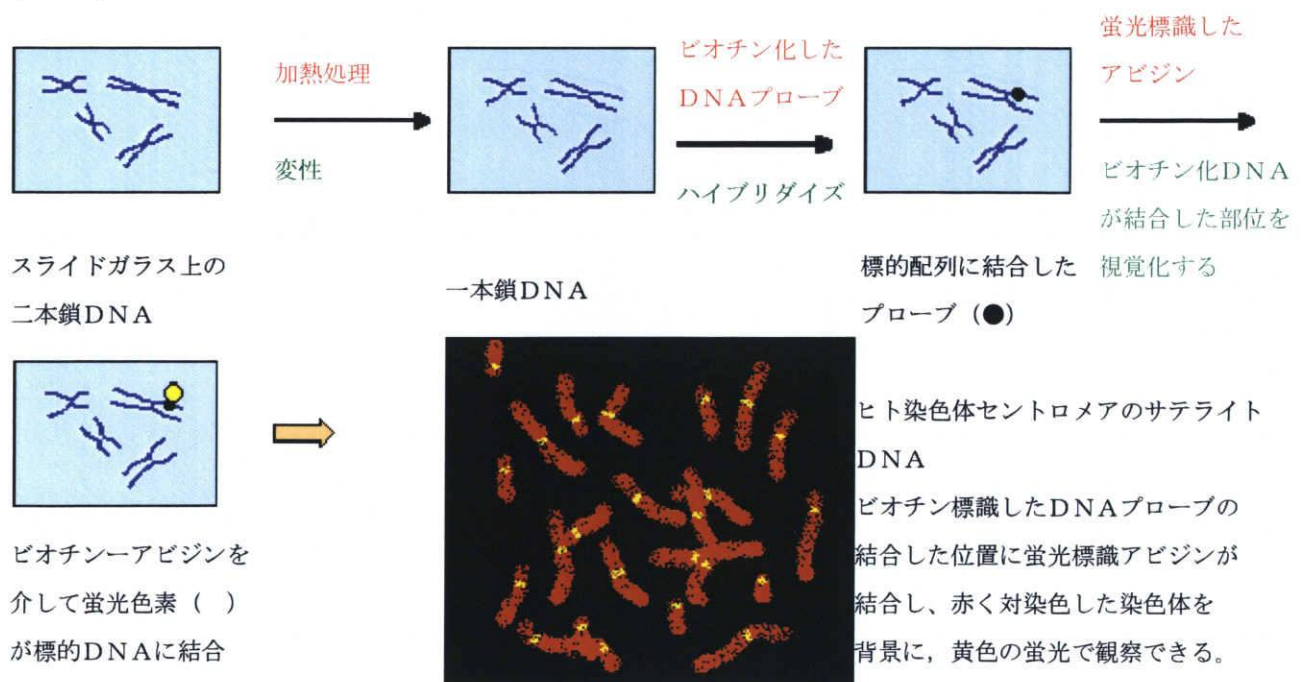
5azadC について

現在、DNA 複製時に 5 メチル化シトシンの代わりに取り込まれることで DNA のメチル化を阻害する機構と、Dnmt1 をトラップすることでユビキチンプロテアソーム系でタンパク分解する機構の 2 つがあると言われている。その他にも様々な作用や影響を及ぼすと思われるが、詳しくわかっていない。

FISH について

in situ ハイブリッド形成法(in situ hybridization)

クローン化された DNA 断片の染色体上の位置を決める方法。標識 DNA 断片(プローブ)を、細胞分裂中期の染色体に直接ハイブリッド形成させ、染色体上の結合部位を標識によって可視化する。組織の mRNA の解析にも用いられる。蛍光標識プローブを用い、蛍光で検出する方法を fluorescence in situ hybridization (FISH)という。



“in situ”（インサイチューあるいはインシツー）とは“本来の場所で”という意味のラテン語。粉砕していない細胞や組織にプローブを直接ハイブリダイズ（相補鎖結合）させ、DNA や mRNA などの核酸あるいは蛋白質の細胞または組織内の分布や局在を光学顕微鏡や電子顕微鏡により調べる形態学的方法。どのような組織あるいは細胞などで目的の遺伝子が発現しているかが明らかにできる。プローブとしては核酸の場合は相補鎖、蛋白質の場合は抗体などが用いられる。目的とする組織や細胞に応じていろいろなレベルのハイブリダイゼーションが可能である。

材料と方法

●細胞培養と同調

マウス m5S 細胞（京都大学放射線生物研究センター、佐々木正夫教授より提供）は、10% fetal bovine serum(FBS ; Sigma)入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM ; Gibco BRL)を培地として、培養ディッシュ（ ）において、5 %CO₂、37℃インキュベーターで培養を行った。

m 5 S 細胞を G0 期に同調するために、0.2%FBS 入りの DMEM 培地で 48 時間培養した。また、G1 / S 期に同調するために、G0 期の細胞を 5 μ g / ml aphidicolin 存在下、10 %FBS 入り DMEM 培地で 16 時間リリース培養した。

●薬剤処理

Aphidicolin ブロックから細胞をリリースするために、予め 37℃で暖めた PBS で 2 回洗浄した後、薬剤 5-aza-2'-deoxycytidine(5-azadC ; Sigma)処理に移る。予め 5 %CO₂、37℃のインキュベーターでプレインキュベートした培地（10 %FBS DMEM）に終濃度 8 μ M になるように 5-azadC を添加し、任意の時間培養して処理を行った。

●複製ラベル（Hyphotonic shift）

培地を除去し、KHB（10mM HEPES、pH7.4、30mM KCl）1ml をカバーガラス以外のところから加え、穏やかに洗浄した後、直ちに標識ヌクレオチド入り KHB(250 μ M biotin-dUTP または 250 μ M Dig-dUTP、10mM HEPES、pH7.4、30mM KCl)10 μ l をカバーガラスの部分に滴下し、これを 5 %CO₂、37℃インキュベーターで 10min 培養した。培地で洗浄した後に、10 %FBS DMEM で 5 %CO₂、37℃インキュベーターで 30min 培養した。

●2色複製ラベル

●細胞の固定と蛍光検出

(Immunofluorescence in situ hybridization (Immuno-FISH))

複製ラベル(Bio-dUTP、Dig-dUTP)や、タンパク質 (asetylated histone H4、tri-methylated histone H3、tri-di-methylated histone H4) と同時に FISH した場合は以下の方法で行った。

あらかじめ複製ラベルした DNA または検出したいタンパク質を、免疫蛍光染色し、蛍光抗体ごと 4 %PFA 室温 1 hr で再固定する

免疫蛍光検出

検出する前に、標本はブロッキング溶液（3%ブロッケー、0.1%Tween 20、1×PBS）を加えて、超純水で湿らせたチャンバー内で、37℃、30min 処理することで非特異的結合を抑える処理を行った。つづいてタンパク質を検出する場合ここで一次抗体 rabbit anti-acethyl histone H4(1/100 希釈、Upstate Biotechnology)、rabbit anti-trimethyl histone H3(Lys9)(1/100 希釈、Upstate Biotechnology)、rabbit anti-trimethyl histone H3(Lys4)(1/500 希釈、Upstate Biotechnology)、rabbit anti-dimethyl histone H3(Lys4)(1/500 希釈、Upstate Biotechnology)、を反応させた。洗浄液 PBST (0.1% Tween 20、1×PBS) で5min 洗浄し、これを3回繰り返した。Alexa 488 avidin(1/300 希釈、Molecular Probes)または anti-digoxigenine antibody Rhodamine(1/150 希釈、Roche)、Alexa 488 anti mouse or rabbit(1/300 希釈、Molecular Probes)を含む検出液（1%ブロッケー、0.1% Tween20、1×PBS）を加えて、37℃、30min 検出操作を行った。その後 PBST (0.1% Tween20、1×PBS) で5min 洗浄し、これを3回繰り返した。次に、4'6-diamino-2-phenylindole (DAPI)溶液に3min 浸し、DNAを染色した。これを2×SSCと超純水で洗浄し、脱塩処理を行った。最後に抗退色剤で封入した。

●イメージング

高感度冷却 CCD カメラ（MicroMax 1401E, 日本ローパー）を搭載した蛍光顕微鏡（Axiovert 200M or AxioPlan2 imaging e, Zeiss）を用い、制御ソフトウェア、MetaMorph version 6.1（Universal Imaging Corporation）で撮影した。また、同ソフトウェアおよび ImageJ（NIH）にて画像解析や、擬似カラー化した。

結果と考察

● 5 メチル化シトシンの検出

まず、蛍光免疫染色法を用いてマウス細胞培養核における 5・メチル化シトシンの検出を試みた。2 本鎖 DNA を変性させて 1 本鎖にし 5・メチル化シトシンを認識する抗体を結合させ検出を行う。変性条件と抗体濃度の検討を行った。変性条件については次の 3 種類の方法を使用。

- ・熱変性 (80℃または 90℃)、酸変性 (HC 1)、酵素処理 (DNase I と ExoIII)

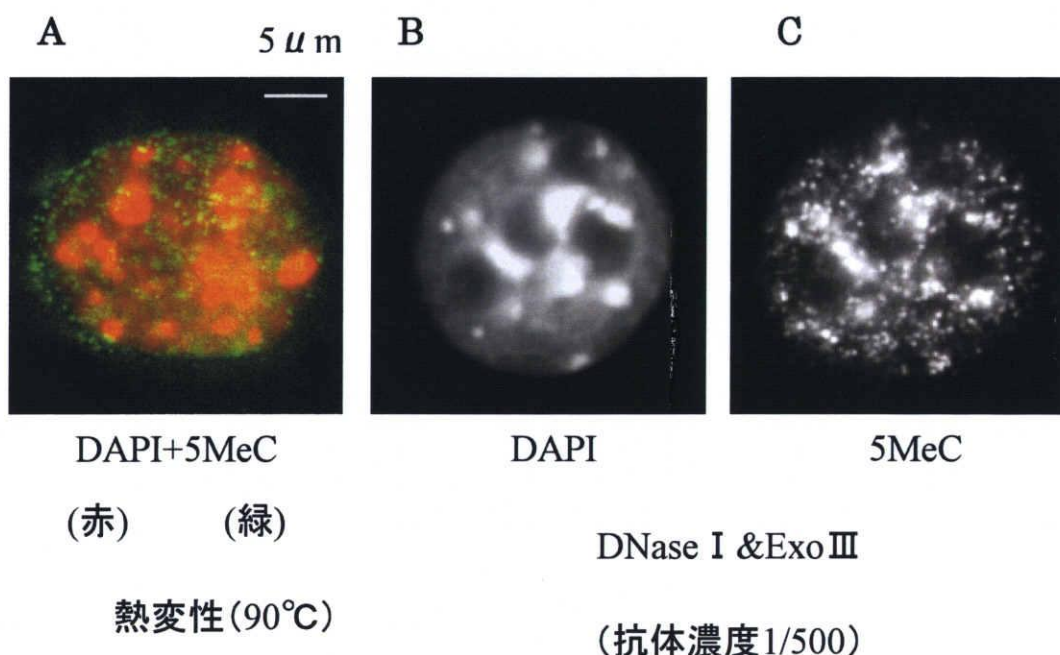


図 10 マウス m 5 S 細胞における 5 メチル化シトシンの検出

一次抗体 mouse anti 5-MeC、二次抗体 Biotinylated anti mouse IgM、三次抗体 strept avidin RhodaminX

A 熱変性 (90℃) 条件下における 5 メチル化シトシンの検出。染色したイメージを DAPI (赤) 5 MeC (緑) に擬似カラー化し重ね合わせた。

B 酵素処理 (DNase I と ExoIII) 条件下における 5 メチル化シトシンの検出。5 MeC 抗体濃度を 1/500 で調製、DAPI で染色したイメージ。

C 酵素処理 (DNase I と ExoIII) 条件下における 5 メチル化シトシンの検出。5 MeC 抗体濃度を 1/500 で調製、B と同じ細胞核を 5MeC で染色したイメージ。

◆プロトコル

| 熱変性(80℃ or 90℃) | 酸変性(HCl) | 酵素処理(DNase I and Exo III) |
|--|--|--|
| 4% PFA/PBS at RT.10min PBS wash 0.5% TritonX-100 at RT.10min PBS wash×3 <u>70% FA/2×SSC wash</u> <u>80℃ 70% FA/2×SSC wash</u> <u>※at 80℃ or 90℃ 10min</u> <u>-20℃ 70% EtOH 5min</u> <u>90% EtOH 5min</u> <u>100% EtOH 5min</u> <u>air dry</u> mouse IgM 5-MeC antibody(1/100) in blocking buffer(PBS) at 37℃ 1hr wash with PBS/0.1% Tween20 5min×3 Biotinylated-anti mouse IgM (1/150) in detection buffer(PBS) at 37℃ 30min PBS/Tween20(0.1%) 5min×3 Avidin-Alexa 488 (1/200) in detection buffer(PBS) at 37℃ 30min PBS/0.1% Tween20 5min×3 DAPI 2min PBS 5min Milli Q air dry VECTA SHIELD | 4% PFA/PBS at RT.10min PBS wash 0.5% TritonX-100 at RT.10min PBS wash×3 <u>0.1N HCl/PBS at RT.10min</u> mouse IgM 5-MeC antibody(1/100) in blocking buffer(PBS) at 37℃ 1hr wash with PBS/0.1% Tween20 5min×3 Biotinylated-anti mouse IgM (1/150) in detection buffer(PBS) at 37℃ 30min PBS/Tween20(0.1%) 5min×3 Avidin-Alexa 488 (1/200) in detection buffer(PBS) at 37℃ 30min PBS/0.1% Tween20 5min×3 DAPI 2min PBS 5min Milli Q air dry VECTA SHIELD | 4% PFA/PBS at RT.10min PBS wash 0.5% TritonX-100 at RT.10min PBS wash×3 <u>Blocking with 0.3% BSA/</u> <u>0.02% Tween20/PBS</u> <u>at RT.10min</u> <u>2×detection buffer.</u> <u>blocking buffer</u> <u>DNase I (1/500).ExoIII(1/600)</u> <u>mouse anti 5-MeC</u> <u>※(1/500 or 1/100 or 1/50 or 1/25)</u> <u>(50 μ l/dish)</u> <u>at 37℃ 30min</u> <u>wash with PBS/0.05%Tween20</u> <u>5min×3</u> Biotinylated-anti mouse IgM (1/150) in detection buffer(PBS) at 37℃ 30min PBS/Tween20(0.1%) 5min×3 Avidin-Alexa 488 (1/200) in detection buffer(PBS) at 37℃ 30min PBS/0.1% Tween20 5min×3 DAPI 2min PBS 5min Milli Q air dry VECTA SHIELD |

熱変性 80℃条件下では十分に 5MeC 抗体が結合しなかったため、温度を 90℃ に上げて変性を行った。80℃に比べ 90℃の方がよく検出されたが、細胞核の表

面上に留まっており、核内部まで検出できない。(図 10A) 酸変性 (HC1) も試みたが、全く検出できなかった。そこで、核内部に抗体が入るように酵素処理を行った。

酵素処理では、detection buffer と blocking buffer を 1 : 1 にした buffer に DNA 分解酵素 DNase I と ExoIII、5-MeC の抗体を加えて検出した。まず、5-MeC の抗体の希釈率を 1/100, 1/50, 1/25 にして検出したところ 1/100 で検出できた。いずれの場合でもまだ抗体量が多いようだったので、1/500 でも行ったところ検出はできるが退色が早く、今後 5-MeC の抗体は 1/250 の濃度で検出することとした。核内部の DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域と 5-MeC の検出される場所が重なり、メチル化 DNA が確認できる。(図 10B,C)

| 熱変性 | 酸変性 | 酵素変性 |
|-----------|------------|--------------|
| 80℃変性 → △ | HCl 変性 → × | 抗体量 1/25 → △ |
| 90℃変性 → △ | | 1/50 → △ |
| | | 1/100 → (○) |
| | | 1/500 → (○) |

●複製ラベル

DNA 複製時における複製パターンの進行を解析するために複製ラベルを行った。これは細胞を固定して免疫染色を行う前に、低張処理を行い標識ヌクレオチドを膜透過させて複製中の DNA を短時間ラベルする方法である。これにより細胞固定時が複製タイミングのどの段階であったのかを判断できる。

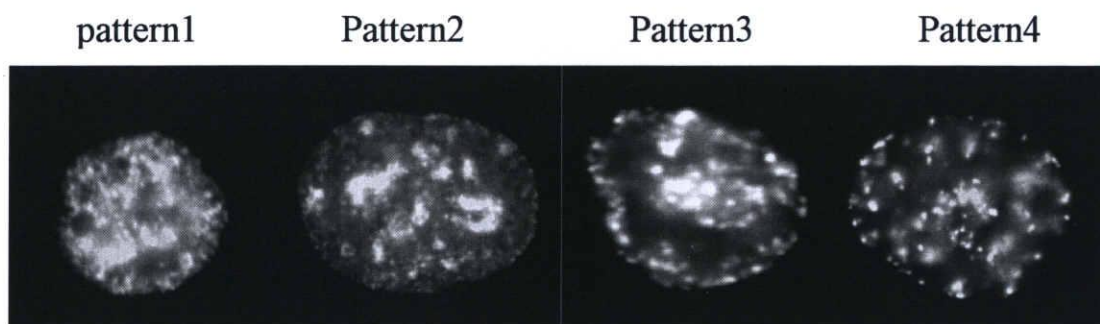


図 11 マウス m5S で DNA 複製期 (S 期) に観察される複製 foci パターンをハイポトニックシフトにより複製ラベル

時間の経過とともに現れるこの複製パターンを 4 つに大別し、解析を行う。

Pattern1 ユークロマチン領域を複製

Pattern2 DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域を複製

Pattern3 核膜周辺領域を複製

Pattern4 残りの部分を複製

●各種修飾ヒストンの検出

免疫蛍光染色により次の4種類の修飾ヒストンを抗体検出し、DAPIと修飾ヒストンの局在を比較した。

・ AcH4、 diMeK4H3、 triMeK4H3、 triMeK9H3

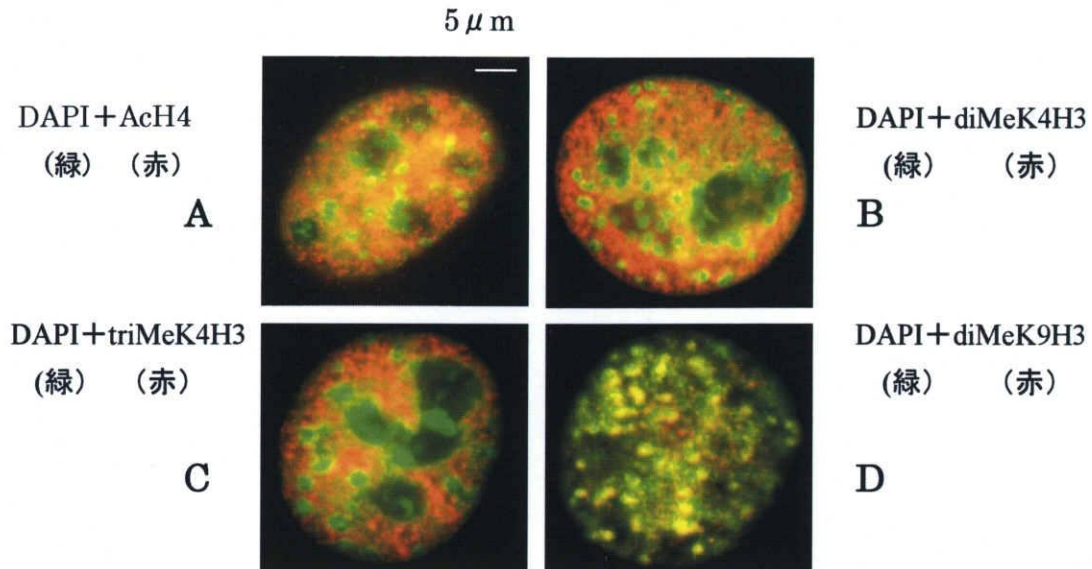


図 12 マウスm5S細胞における各種修飾ヒストンの検出

A 一次抗体に Rabbit α AcH4 を使用。染色したイメージを DAPI (緑) AcH4 (赤) に擬似カラー化し重ね合わせた。

B 一次抗体に Rabbit α triMeK9H3 を使用。染色したイメージを DAPI (緑) triMeK9H3 (赤) に擬似カラー化し重ね合わせた。

C 一次抗体に Rabbit α triMeK4H3 を使用。染色したイメージを DAPI (緑) triMeK4H3 (赤) に擬似カラー化し重ね合わせた。

D 一次抗体に Rabbit α diMeK9H3 を使用。染色したイメージを DAPI (緑) diMeK9H3 (赤) に擬似カラー化し重ね合わせた。

A~D ともに Rabbit の検出二次抗体に GAR Alexa488 を使用。

AcH4、 diMeK4H3、 triMeK4H3 ヒストン修飾はユークロマチン領域に存在するため、DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域とは一致しない。これらのヒストン修飾は転写を正に制御しているといえる。(エピジェネティクス p 41)

しかし、 diMeK9H3 ヒストン修飾はヘテロクロマチン領域に存在するため、DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域とは一致する。このヒストン修飾は転写を負に制御しているといえる。(エピジェネティクス p 38)

● 5メチル化シトシンと2種類修飾ヒストンを抗体検出

DNAのメチル化を調べるために5MeCと修飾ヒストンを同時に検出し、DAPI、修飾ヒストン、5MeCの局在を比較した。

・ 5MeC&diMeK4H3

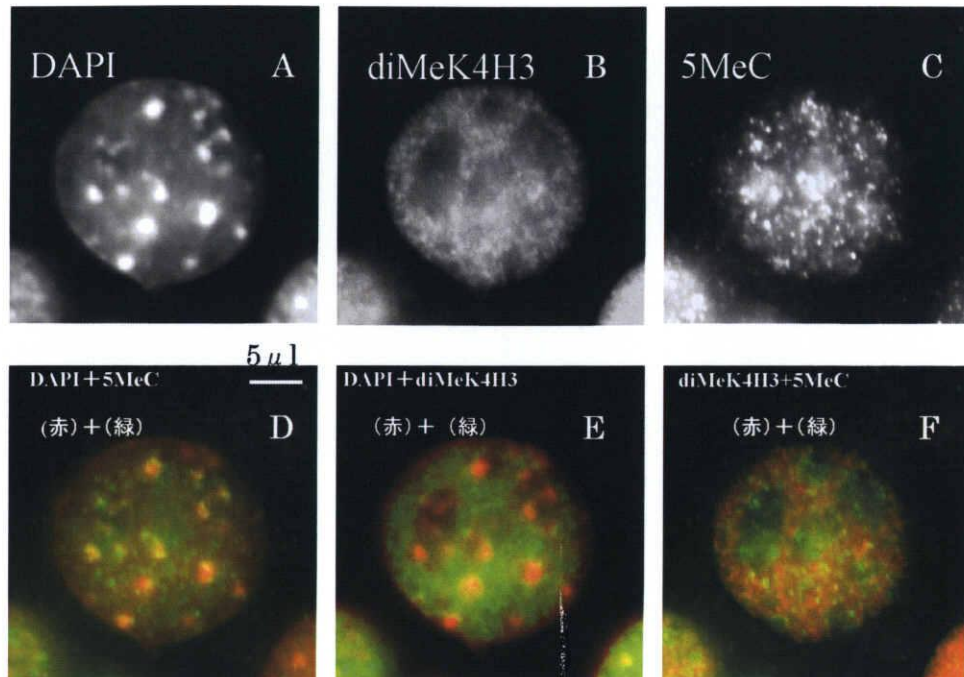


図 13 5MeC と diMeK4H3 修飾ヒストンを蛍光免疫染色により検出

上述の 5MeC 抗体と修飾ヒストンの抗体を使用して同時に検出した。

上段：(A) DAPI、(B) diMeK4H3、(C) 5MeC

下段：(D) DAPI(赤)+5MeC(緑)、(E) DAPI(赤)+diMeK4H3(緑)

(F) diMeK4H3(赤)+5MeC(緑)

DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域は一部が高度にメチル化されている。

(図 13D) ユークロマチン領域に存在する diMeK4H3 は DAPI と共局在しない。

(図 13E) diMeK4H3 の局在していない部分一帯に 5MeC の局在がみられ、ヘテロクロマチンとユークロマチンの境界で一部が高度にメチル化されているようである。(図 13F)

DNA がメチル化されている領域でヒストンの修飾がせき止められているようにもみえる。DAPI で濃く染まるような構成ヘテロクロマチンはリピート配列にコンプレックスが結合し高度に凝集してアッセンブリーを形成しているが、核内で必ずしも DAPI と 5MeC の局在において(検出強度)が一致しているわけではないようである。つまり DAPI で濃染する構成ヘテロクロマチン=DNA メチル化と単純には言えない。

・ 5MeC&triMeK9H3

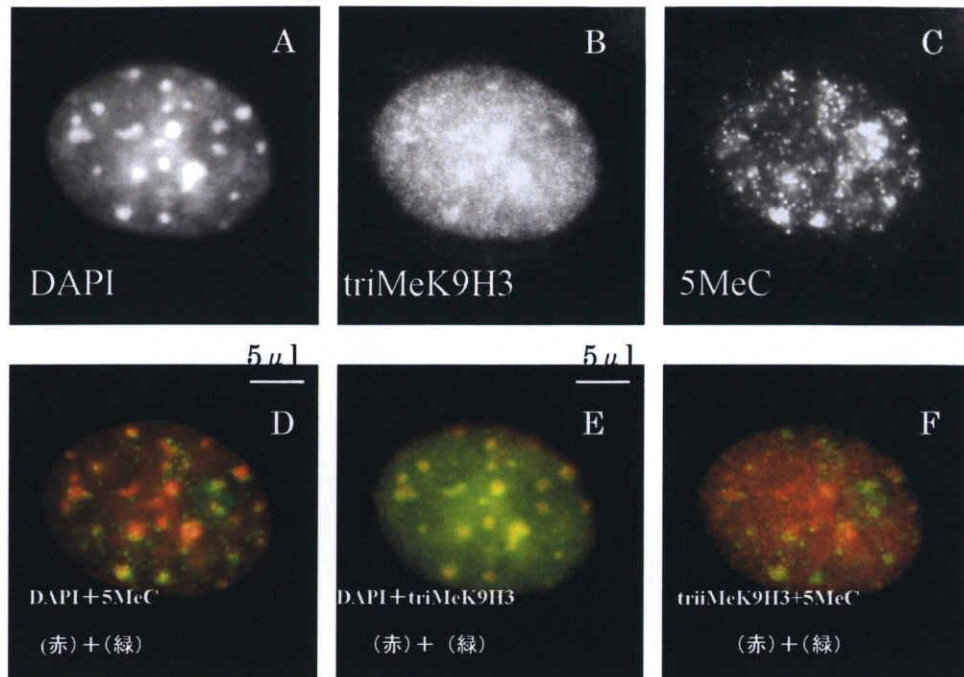


図 14 5MeC と triMeK9H3 修飾ヒストンを蛍光免疫染色により検出
 上述の 5MeC 抗体と修飾ヒストンの抗体を使用して同時に検出した。
 上段：(A) DAPI 、(B) triMeK9H3 、(C) 5MeC
 下段：(D)DAPI(赤)+5MeC(緑) 、(E)DAPI(赤)+triMeK9H3(緑)
 (F)triMeK9H3(赤)+5MeC(緑)

DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域は一部が高度にメチル化されている。

(図 14D) ヘテロクロマチン領域に存在する triMeK9H3 は DAPI と共局在する。(図 14E) triMeK9H3 の局在している部分に 5MeC の局在もみられるが、必ずしも一致しない。(図 14F)

図 13 と同様に核内で必ずしも DAPI と 5MeC の局在において検出強度の強い場所が一致しているわけではないようである。つまり構成ヘテロクロマチン＝DNA メチル化とは言えない。DAPI で濃く染まるヘテロクロマチンは高度に DNA がメチル化されている領域を含むがタンパク質によりヘテロクロマチン領域が伸長される。DAPI で濃く染まる場所でなくユークロマチン領域でもない場所に 5MeC が強く検出されているようである。(図 13D,F)哺乳類の不活性 X 染色体は、核内で凝縮して不活性クロマチンを形成した条件ヘテロクロマチンであるが、構成ヘテロクロマチンのように DAPI で濃染しない。この領域は、条件ヘテロクロマチン領域に確当するのではないだろうか。

●非同調培養における 5-azadC 処理とヒストン修飾の局在変化

DNA 維持メチル化酵素 Dnmt1 を阻害する薬剤 5azadC 処理による修飾ヒストンの局在変化を調べた。

・ 5azadC diMeK4H3+複製ラベル

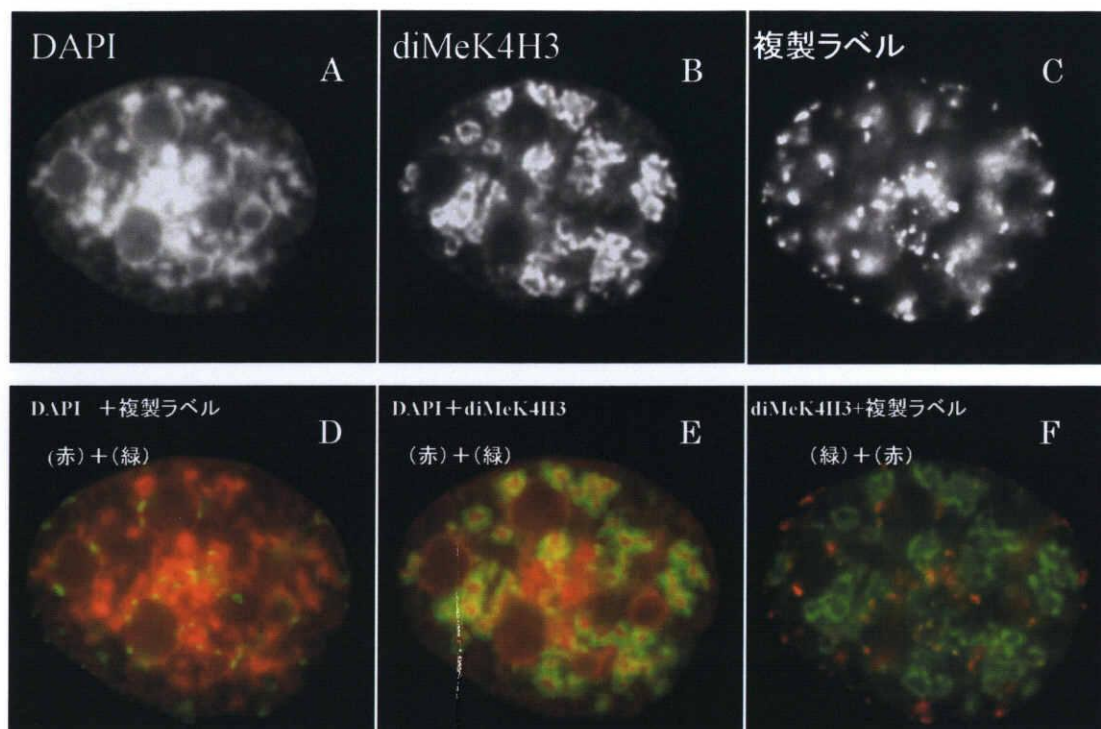


図 15 24 時間 5azdC 処理後の diMeK4H3 修飾ヒストンと複製ラベルを蛍光免疫染色により検出

24 時間 5azadC 処理後、ハイポトニックシフトにより複製ラベルし diMeK4H3 修飾ヒストンの局在変化と複製パターンを検出。

上段：(A) DAPI 、(B) diMeK4H3 、(C)複製ラベル (パターンIV)

下段：(D)DAPI(赤)+複製ラベル(緑) 、(E)DAPI(赤)+diMeK4H3(緑)

(F)diMeK4H3(緑)+複製ラベル(赤)

DAPI で濃く染まるヘテロクロマチン領域を取り囲むように修飾ヒストン diMeK4H3 が局在している。(図 15E) このように局在変化した細胞の複製ラベルを確認するとパターンⅢ、Ⅳのものが多かった。(図 15C はパターンⅣのもの) これはパターンⅡでヘテロクロマチンが複製される際、メチル化されていない DNA ができることで引き起こされる可能性を示唆している。また、DAPI で濃染される領域がコントロールではきれいな丸型をしていたものが崩壊して点在しているのが観察される。(図 15A)

●非同調培養における 5-azadC 処理時間 24 時間と diMeK4H3 修飾ヒストンの局在変化

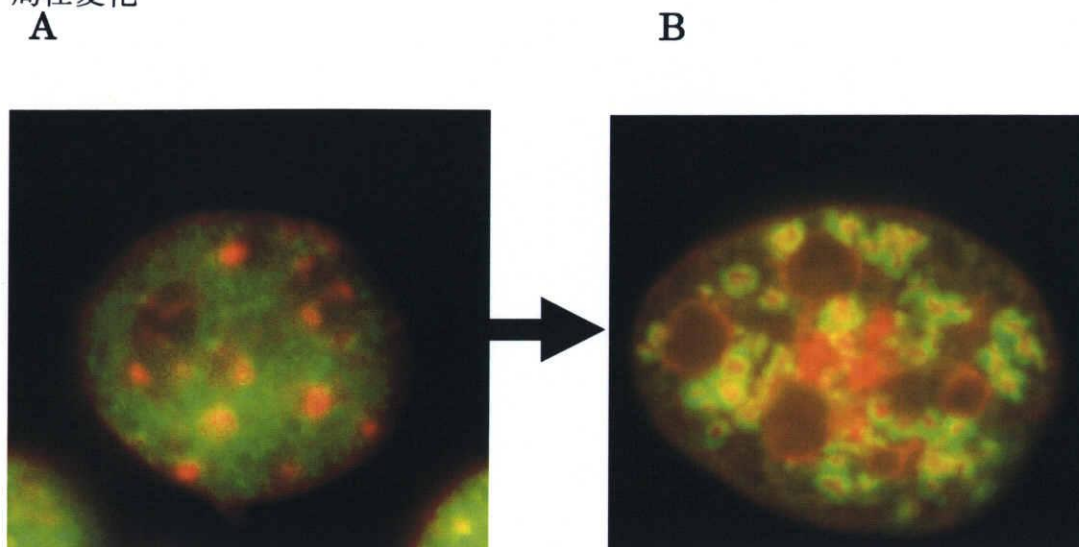


図 16 5-azadC 処理時間 24 時間と diMeK4H3 修飾ヒストンの局在変化

A DAPI (赤) diMeK4H3 (緑)

B DAPI (赤) diMeK4H3 (緑) 5azadC 処理 24 時間

5azadC 処理を 24 時間行うことによって DAPI で濃染される構成ヘテロクロマチンが崩壊するとともに、クロマチンを緩めるように働く修飾ヒストン diMeK4H3 の局在が変化する。図 16A (緑) のようにユークロマチン領域がべったりと染まっている状態から、図 16B (緑) のように崩壊している構成ヘテロクロマチンを取り囲むような局在へと変わる。このヒストンの局在変化は拡散している状態から特定の領域へと凝縮がおきている。これは diMeK4H3 がヘテロクロマチン周辺に積極的にリクルートされることで構成ヘテロクロマチンの崩壊を誘導しているようにも見える。この結果は 5azadC によって DNA が脱メチル化されることで、構成ヘテロクロマチン領域に正に制御を行う修飾ヒストンがリクルートされる可能性を示唆している。抑制的なヘテロクロマチンを形成ができなくなることと拮抗して活性なオープンクロマチンを形成するとも考えられる。図 16 の結果は、コントロール (A) では diMeK4H3 (緑) が DAPI で濃染されている (赤) を避けて染まるような形をしている。DAPI で濃染されるヘテロクロマチンは H3K9 のメチル化といった負に制御する修飾ヒストンの修飾を受けており、このタンパク質の電荷により起こる相互作用により脱凝縮が調節されている。この修飾ヒストンが外れることで、今まで染まっていなかった領域が染まるようになるといった変化ではなくて、むしろヘテロクロマチン領域を狙ったように凝縮して集まるのはなぜなのだろうか。

●非同調培養における 5-azadC 処理 48 時間と AcH 修飾ヒストンの局在変化

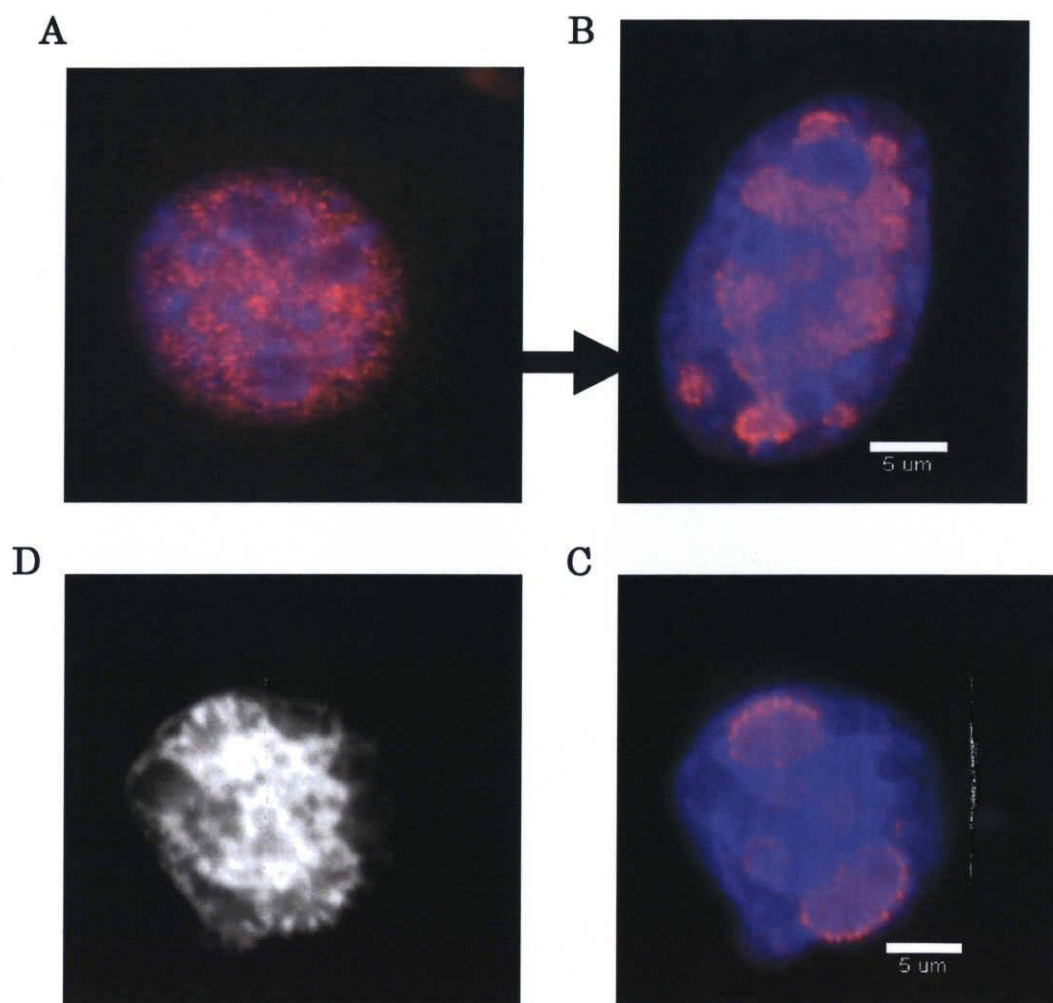


図 17 5-azadC 処理時間 48 時間と
AcH 修飾ヒストンの局在変化

- A DAPI (青) AcH (マゼンタ)
- B DAPI (青) AcH (マゼンタ) 5azadC 処理 48 時間
- C DAPI (青) AcH (マゼンタ) 5azadC 処理 48 時間
- D DAPI (白) C の図を DAPI 単色で表示

上述の 5azadC24 時間処理の結果 (図 16) と比較して、48 時間処理のものではヘテロクロマチンに凝縮しているリングの拡大が観察される (図 17B,C マゼンタ)。また、この段階になるとヘテロクロマチン領域の崩壊が進み、DAPI で濃染する領域が中央に大きく塊として観察されるようになる。5azadC 処理 48 時間のものでは死んだ細胞が半数近くにもなる。

5azadC 処理 24 時間、48 時間でそれぞれ違う修飾ヒストンの観察結果を示した

が、diMeK4H3、AcH どちらの修飾ヒストンでもほとんど同じような局在をとる。これらの修飾ヒストンは中央に大きな塊として DAPI で濃染される崩壊ヘテロクロマチンの周りを取り囲むような形で局在している。特に図 17B では、マゼンタの細かいリングが核スペック（核小体？）をよけて崩壊しているヘテロクロマチンに巻きつくような形で局在している。

さらに細かく観察すると、このマゼンタのリングは内側に向かってグラデーションになっていることがわかる。（図 17C）顕微鏡のステージを上下に動かし Z 軸方向で立体的に観察したところ、どの断面においても外周がひときわ濃く染まっていることがわかった。

これらの修飾ヒストンは何かの表面に取り付くような形で局在して球状の形をとっており、このリングが拡大しながらヘテロクロマチンは崩壊していく。

24 時間のヒストン修飾と DAPI の結果（図 16A、B）も同様に立体的に観察した時に、気のせいかもしれないが中心に向かって diMeK4H3 とヘテロクロマチンが尾をひいて伸びているような印象を受けた。クロモソームテリトリーと言われる核内構造のため、それぞれの染色が立体的に確認したときに中心に向かって観察されるのかと考えたが、48 時間の局在変化と合わせて考えると崩壊したヘテロクロマチンは核中央に緩く集まるのかもしれない。

このマゼンタのリング（図 17C）をさらにもう少し細かく観察すると、濃く染まっている外周が点線のようにになっているが、この点線の間から DAPI のブルーが引き込まれているようにも見える。濃い点状のマゼンタとブルーのコントラストで見える錯覚かと感じたが、よく観察すると外周だけでなくこの点線の間からさらに内側にまでブルーの細かいラインが伸びている。DAPI 染色のみを示した図 17D で確認できる。

これらの観察をまとめると、リングの外周で緩められたヘテロクロマチンは核の中央に引き込まれていくようだ。

●崩壊ヘテロクロマチンが中心に引き込まれる理由

崩壊ヘテロクロマチンといっても DAPI 染色により他の部分より色が濃いことから、緩んだといっても完全に緩んでほどけた状態にはなっていないようである。中心に引き込まれるのは物理的な作用によって、地球などの星の中心に存在する核（コア）のように質量の大きいものが中心に集まるといった質量による引力なのか、またはフィラメント状のもので、中心に引き込まれているのか等の理由が考えられる。

コントロールでは通常 DAPI で濃染する部分は核中心に存在するわけではなく、核全体に丸い斑状のように散らばっている。このことから、分子量の大きいものが引き寄せ合っかたまってしまいうのではなく、全体に散らばって維持

できるような繊維状の構造が存在しているようだ。(細胞質にはフィラメントとしてチューブリンやミオシンが存在し分裂期にはセントロメアヘテロクロマチンに接着し、キネトコアを形成して星状体を中心としたそれぞれの極に引き寄せて分裂を担う。) 核内ではラミンやアクチンが存在し核の構造を維持している。) 48 時間処理のものでは核がつぶれた形のものや、分裂に失敗し2つの細胞が融合したようなものも多い。5azadC 処理時間経過とともに核内の繊維状構造も崩壊していくのだろう。

●正に制御する修飾ヒストン局在の時間による変化

ここまで、修飾ヒストンによって引き起こされる DAPI で濃染するヘテロクロマチンの崩壊について観察した。では、これらの修飾ヒストンの局在変化はどのようにして引き起こされるのだろうか。

核内でヘテロクロマチン周辺以外の染色(バック)が5 azadC 処理時間経過とともに減っていく。それとは対照的にリングが拡大し内部へと局在が変化していく。ヘテロクロマチン境界を境に時間経過とともに外側にあった修飾ヒストンが境界に集まりリングを形成し、後にリングの内部へと以降していくことが観察された。

ここで、5azadC 処理時間経過とともに減少する修飾ヒストン染色のバックグラウンドに注目して観察した。24 時間のものと 48 時間の結果だけでは、判断しにくいのでさらに時間を増やしてイメージを撮ったものが図 18 である。

●

まばらに拡散していた修飾ヒストンの局在が時間経過とともにヘテロクロマチン領域に集まり始める。ここでいうリクルートとは、微小管などによってトランスポートされるものなのか、もしくはなんらかのシグナルが伝わり目的の場所に移動するような指示によるものなのか、どのような方法で修飾ヒストンの局在が変化するのだろうか。

図 18 のピンクもしくは緑で示す修飾ヒストンの局在変化を見ると、均一に拡散していた修飾ヒストンがヘテロクロマチンのスポットで接着もしくは固定されているように見える。不適切ではあるが例えるなら、いくつかの斑状の球体表面に接着物質をつけて固定しておき、均一にばらまいた砂を細かく振動させた時に見られる変化と似た挙動を示す。タンパク分子が核内で振動していると考え、5azadC 処理後にヘテロクロマチン周辺に修飾ヒストンを接着させるような物質が出現し時間経過とともに少しずつ固定されている可能性を示す。

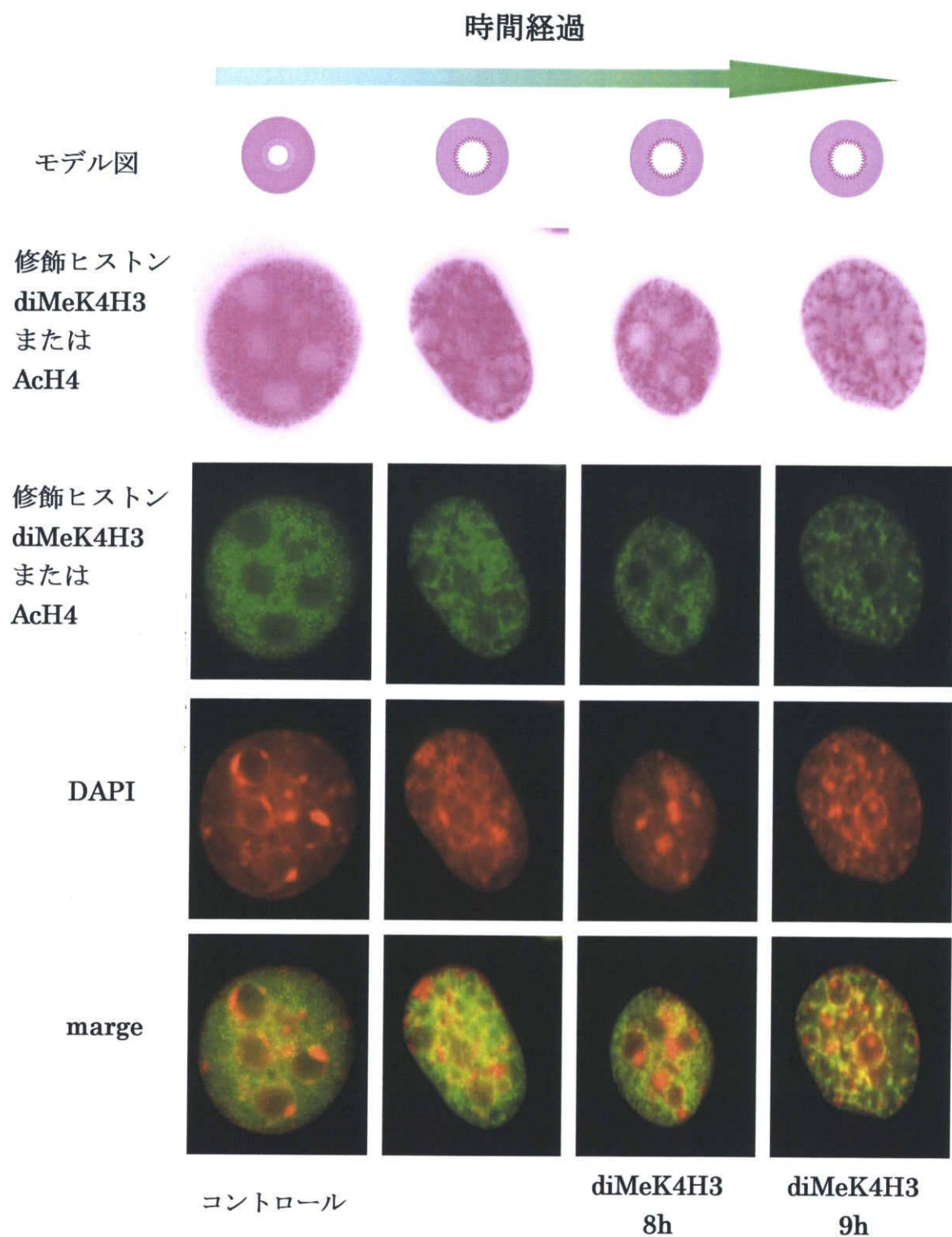


図 18 正に制御する修飾ヒストン局在の時間による変化
 上から一番目：修飾ヒストンの局在変化を示したモデル図
 上から二番目、三番目：修飾ヒストンの局在（ピンク、緑）
 上から四番目：DAPI 染色（赤）、上から五番目：marge 重ねた合わせた図

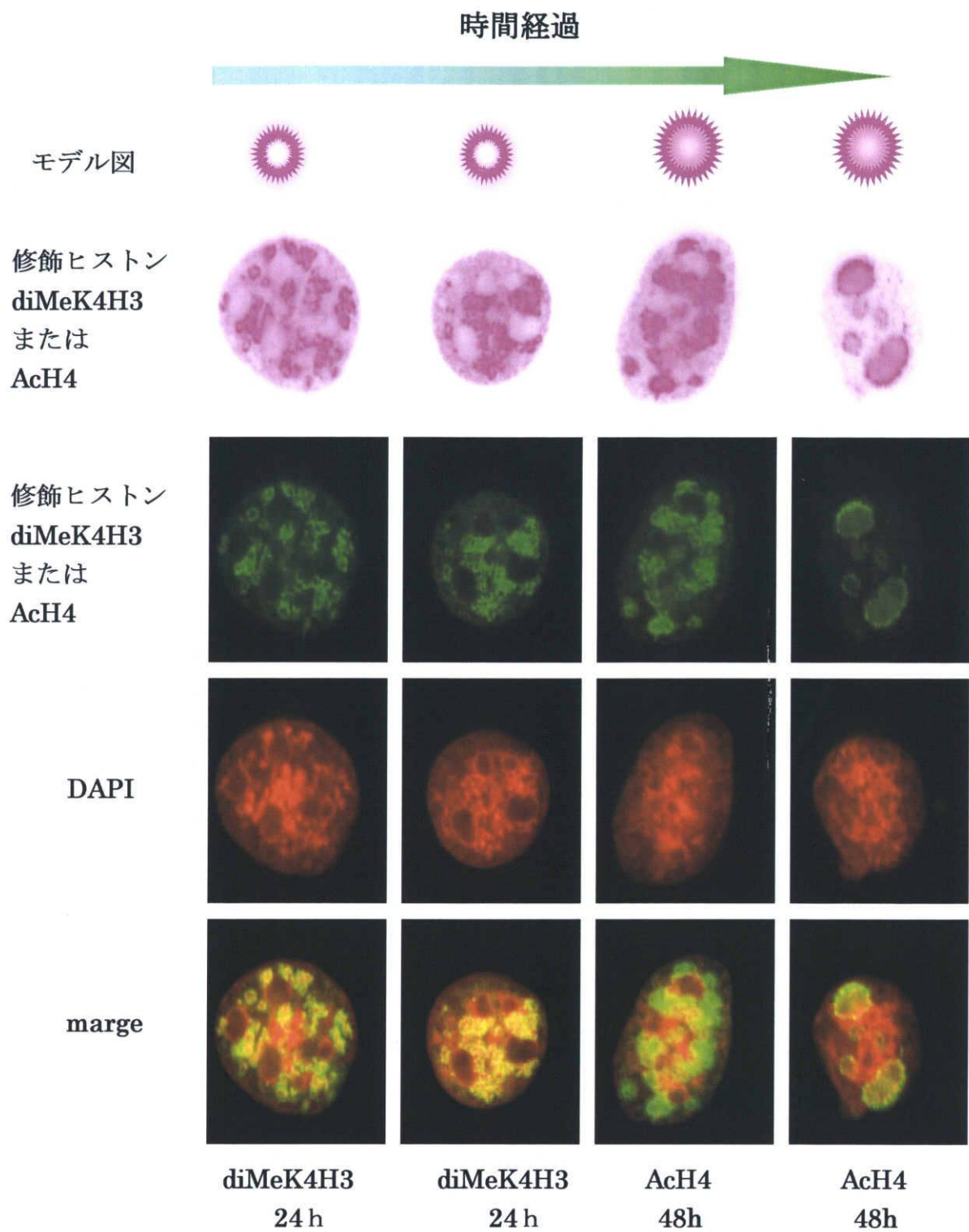


図 18 正に制御する修飾ヒストン局在の時間による変化
 上から一番目：修飾ヒストンの局在変化を示したモデル図
 上から二番目、三番目：修飾ヒストンの局在（ピンク、緑）
 上から四番目：DAPI 染色（赤）、上から五番目：marge 重ねた合わせた図

●非同調培養における 5-azadC 処理時間とヒストン修飾の変化

5azadC 処理により修飾ヒストンの局在変化が起こる核の複製パターンに偏りがあると感じられたため、局在変化が起きているものと変化のないものの複製パターンを調べることにした。

以下のグラフは顕微鏡より局在変化を確認し、その数をカウントして割合を求めたもの。(n=100)

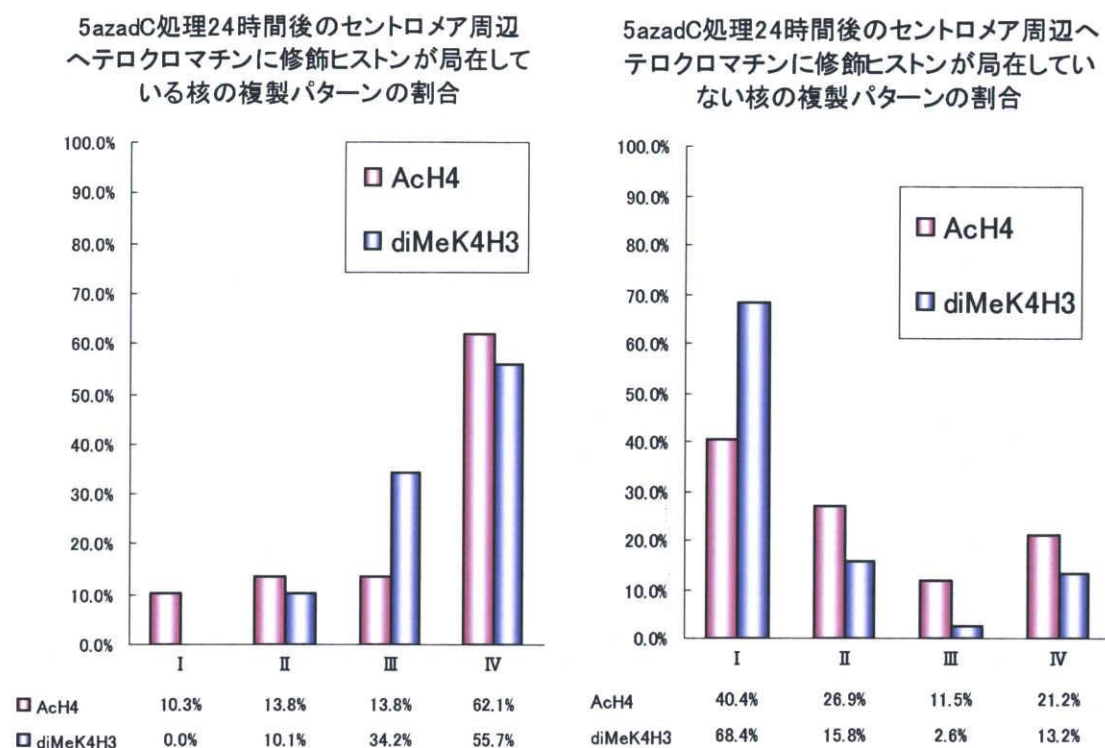


図 19 5azadC 処理 24 時間後の修飾ヒストン局在変化と複製パターンの割合
縦軸：割合 (%) 横軸：複製パターン (→解析 I)

左図：修飾ヒストンがヘテロクロマチン周辺に局在変化したもの

右図：修飾ヒストンが局在変化せずそのままのもの

マゼンタ：AcH4

ブルー：diMeK4H3

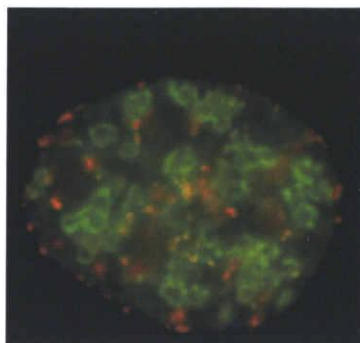
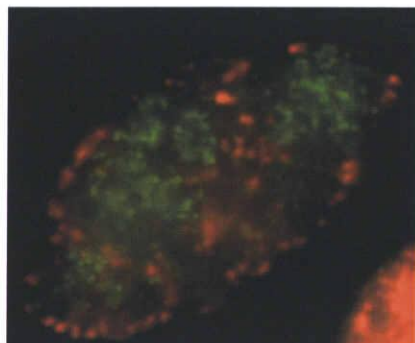


図 20 修飾ヒストンが局在変化している核と複製ラベルを重ね合わせたイメージ

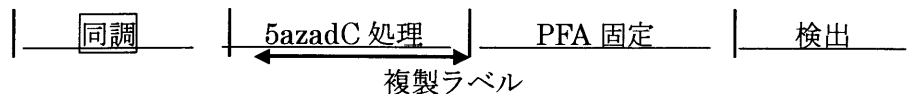
A 赤：複製パターン IV、緑：diMeK4H3

B 赤：複製パターン III、緑：diMeK4H3

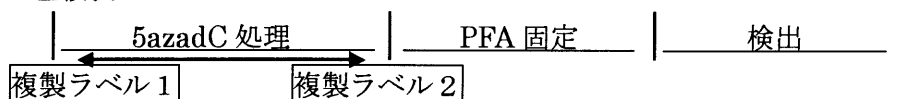
修飾ヒストンの局在変化が起きているものには、複製パターンⅢ、Ⅳのものが多く見られた。しかしパターンⅠ、Ⅱが全く観察されないわけでもない。Ⅲ、Ⅳのみ割合が急に増えるというドラスティックな変化ではなくて、時間経過とともに緩やかに変化しているのがわかる。5azadC 処理による DNA メチル化の阻害は複製依存的であるが、おそらく修飾ヒストンの局在変化は複製依存的というより経過時間の影響によるものなのではないだろうか。図 19 の結果からも緩やかな変化が伺える。

【実験の流れ】

<同調>

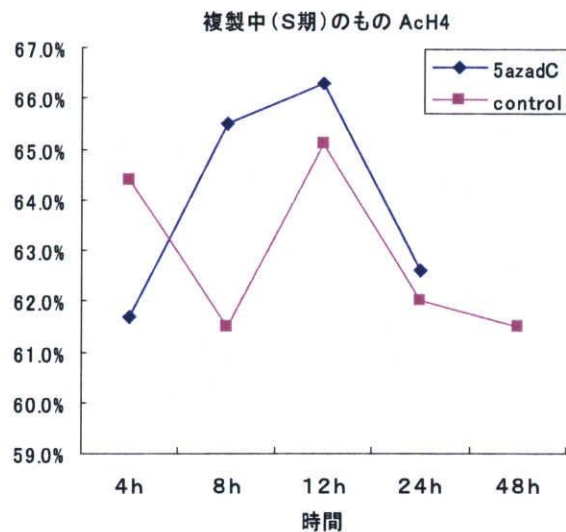
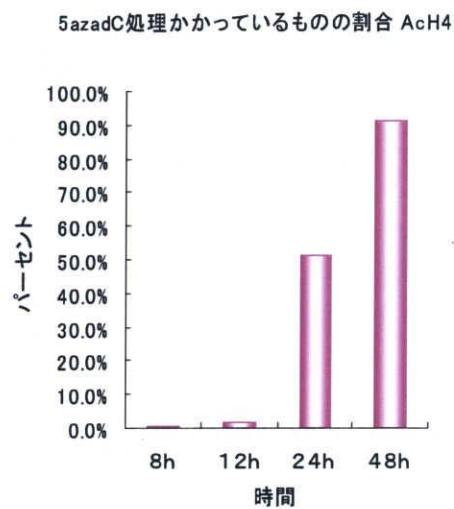


<2色複製ラベル>



| 5azadC or コントロール | 同調 | 複製 ラベル | 処理時間 | 複製 ラベル | 検出 | 解析 結果 |
|---------------------|-----|-----------|---------------|-----------|-----------|------------|
| 5azadC | 非同調 | × | 4.8.12.24.48h | Dig | AcH4 | 解析 I |
| コントロール | 非同調 | × | 4.8.12.24.48h | Dig | AcH4 | |
| 5azadC | 非同調 | × | 4.8.12.24.48h | Dig | DiMeK4H3 | 解析 I |
| コントロール | 非同調 | × | 4.8.12.24.48h | Dig | DiMeK4H3 | |
| 5azadC | 非同調 | Bio 赤外 | 12.16.20.24h | Dig 赤 | AcH4 | 解析 II |
| 5azadC | 非同調 | Bio 赤外 | 12.16.20.24h | Dig 赤 | DiMeK4H3 | |
| コントロール | 非同調 | Bio 赤外 | 12.16.20.24h | Dig 赤 | AcH4 | |
| 5azadC | 同調 | × | 0.3.6.9.12h | Dig | AcH4 | 解析 III |
| 5azadC | 同調 | × | 0.3.6.9.12h | Dig | DiMeK4H3 | |
| コントロール | 同調 | × | 0.3.6.9.12h | Dig | × | |
| Normal | 非同調 | Dig 赤 | 3h | Bio 赤外 | AcH4 | 抗体濃 度検討 |
| 5azadC | 同調 | × | 0.3.6.9.12 | Dig | DiMeK4H3 | 解析 IV |
| コントロール | 同調 | × | 15.18.21.24h | Dig | DiMeK4H3 | |
| 5azadC | 非同調 | Dig 赤外 | 12.16.20.24h | Bio 赤 | TriMeK9H3 | 解析 V |
| 5azadC | 非同調 | Dig 赤外 | 12.16.20.24h | Bio 赤 | DiMeK4H3 | |
| コントロール | 非同調 | Dig 赤外 | 12.16.20.24h | Bio 赤 | DiMeK4H3 | |

A



B

セントロメア周辺ヘテロクロマチンにAcH4が局在している核の割合

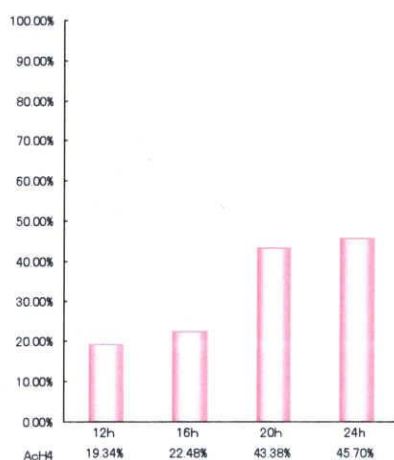


図 21 セントロメア周辺ヘテロクロマチンに修飾ヒストン AcH が局在している核の割合
A:5azadC 処理 8,12,24,48 時間後に修飾ヒストン AcH の局在変化が起こっている核の割合 (→解析 1)

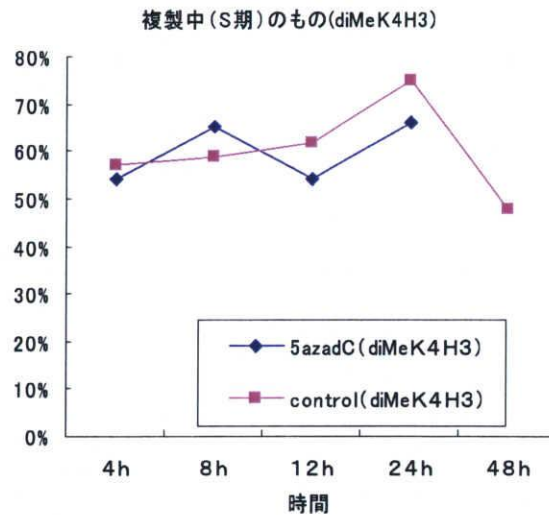
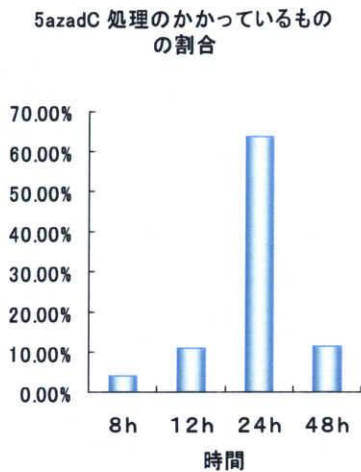
B:5azadC 処理 12,16,20,24 時間後に修飾ヒストン AcH の局在変化が起こっている核の割合 (→解析 II)

図 細胞中の S 期の核の割合を複製ラベルにより検出 (→解析 1)

青:5azadC 処理 4,8,12,24,48 時間後に複製ラベル

マゼンタ:コントロール

A



B

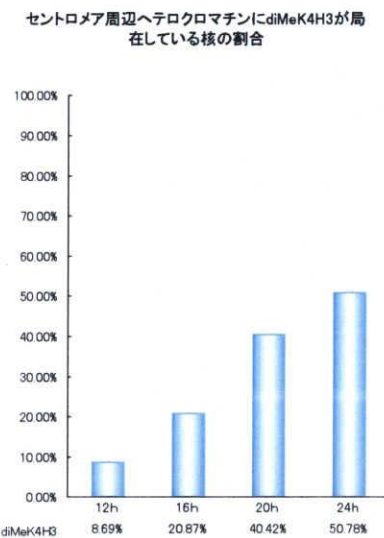


図 22 セントロメア周辺ヘテロクロマチンに修飾ヒストン diMeK4H3 が局在している核の割合

A:5azadC 処理 8,12,24,48 時間後に修飾ヒストン diMeK4H3 の局在変化が起こっている核の割合 (→解析 I)

B:5azadC 処理 12,16,20,24 時間後に修飾ヒストン diMeK4H3 の局在変化が起こっている核の割合 (→解析 II)

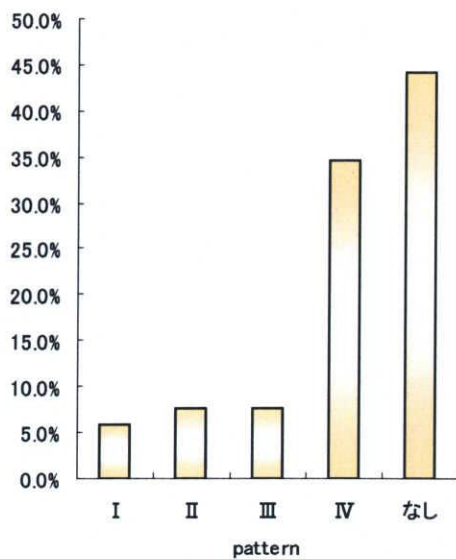
図 細胞中の S 期の核の割合を複製ラベルにより検出 (→解析 I)

青:5azadC 処理 4,8,12,24,48 時間後に複製ラベル

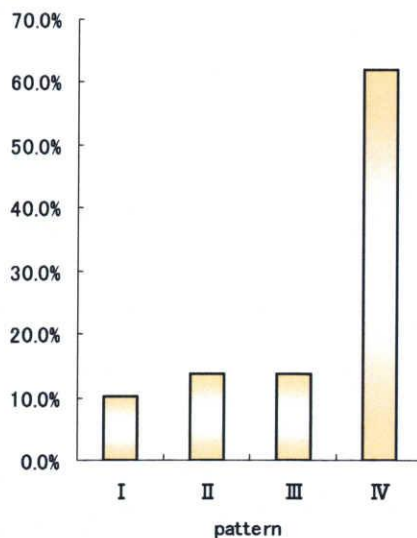
マゼンタ:コントロール

5azadC 処理 48 時間のものでは、マウス m5S 細胞が死んでいるものも多く、セントロメア周辺ヘテロクロマチンに局在変化している修飾ヒストンの割合が急激に下がる。(図 22A)

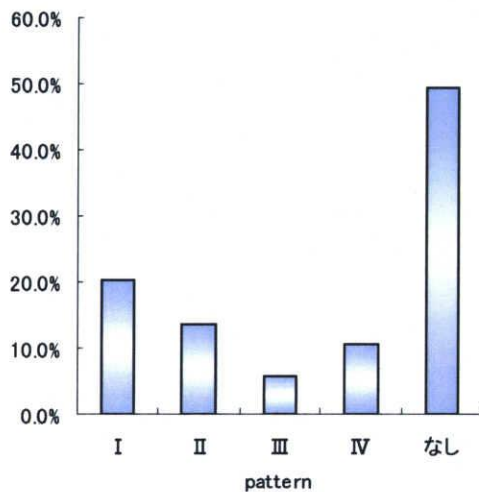
24h 5azadC pattern 処理のかかっているもの AcH4



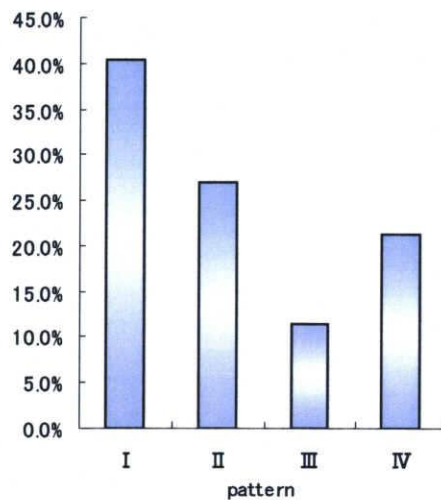
24h 5azadC pattern 処理のかかっているもの AcH4



24h 5azadC pattern 処理のかかっていないもの AcH4



24h 5azadC pattern 処理のかかっていないもの AcH4



5azadC(24h 処理)による
AcH4 pattern の変化

24h control pattern AcH4

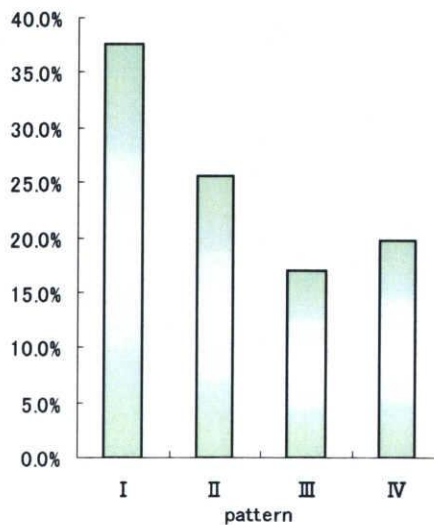


図 23 5azadC(24h 処理)による AcH4 pattern の変化 (→解析 I)

A AcH の修飾ヒストンの局在が変化した核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でないものの核の割合も表示)

B AcH の修飾ヒストンの局在が変化した核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でない核を除いて計算)

C AcH の修飾ヒストンの局在が変化していない核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でないものの核の割合も表示)

D AcH の修飾ヒストンの局在が変化していない核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でない核を除いて計算)

E 5azadC 処理していないコントロール

●**5azadC 処理 24 時間語の修飾ヒストン AcH4 の局在変化と複製パターン**

複製中でない核 (グラフ中になしと表記) に注目する。修飾ヒストンが局在変化していない核に比べ、局在変化した核は、複製中でない核が少ない。言い換えると、局在変化した核は複製中のものが多い。このことから修飾ヒストンの局在変化は複製をきっかけとして起こると考えられる。図 23 B、D では複製中の核においてどのパターンで局在変化が現れるのかを計算しなおしたもの。コントロールと比較すると局在変化していない核は同じような変化を示すが、局在変化した核では顕著にパターン IV のものが多く確認された。

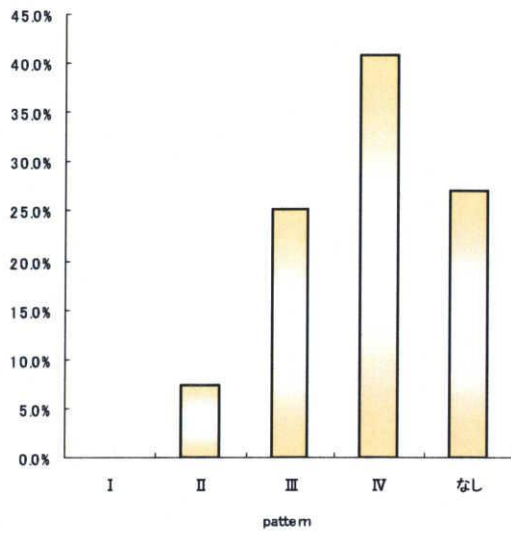
●**5azadC 処理 24 時間語の修飾ヒストン diMeK4H3 の局在変化と複製パターン**

複製中でない核 (グラフ中になしと表記) に注目すると、こちらも局在変化していない核において目立って多くみられる。局在変化したものでは、複製中の核が多い。同様にこれらの修飾ヒストンの局在変化が複製中に起こったものであることを示唆している。

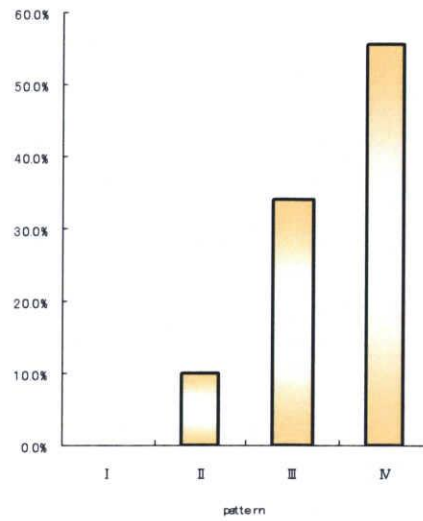
この時期には、DNA 複製中に 5azadC が DNA に取り込まれること、また DNA が脱メチル化されてることによる RNA の転写、HP 1 などのヘテロクロマチンを形成するタンパク質の再分配が起こると考えられる。

また複製中でない核のみ計算しなおした図 24 B、D においては、コントロールと局在変化していない核が同じような変化を示し、局在が変化したものではパターン II、III、IV と次第に増えていくことが確認された。

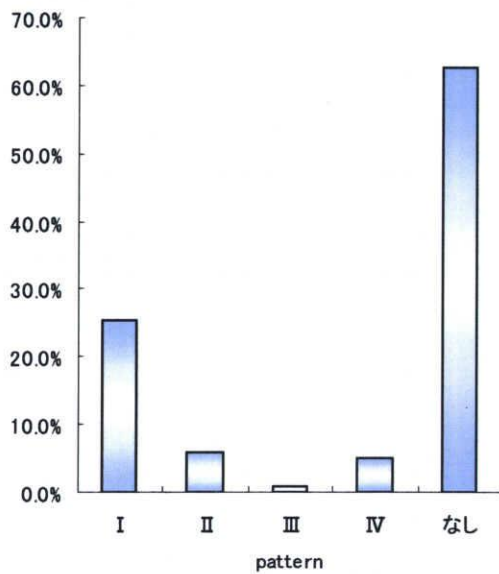
24h 5azadC pattern 処理のかかっているもの DI MeK4h3



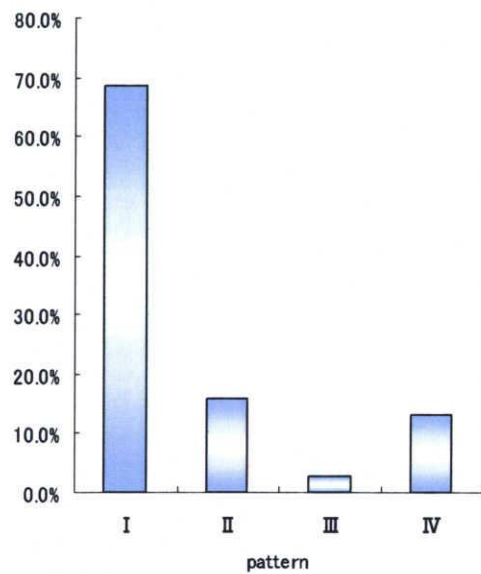
24h 5azadC pattern 処理のかかっているもの diMeK4H3



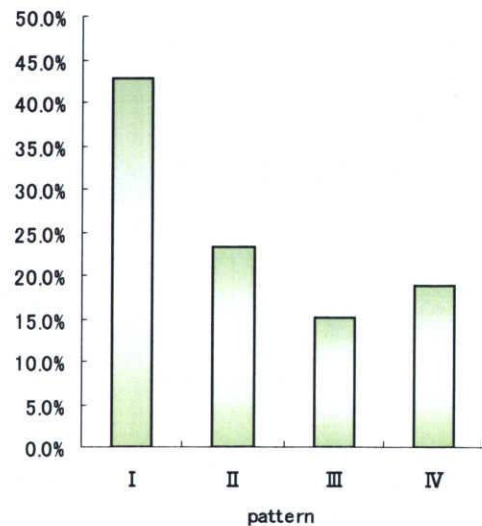
24h 5azadC pattern 処理のかかっていないもの
の diMeK4H3



24h 5azadC pattern 処理のかかっていないもの
diMeK4H3



24h control pattern diMeK4H3



5azadC(24h 処理)による
diMeK4H3 pattern の変化

図 24 5azadC(24h 処理)による diMeK4H3 pattern の変化 (→解析 I)

A diMeK4H3 の修飾ヒストンの局在が変化した核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でないものの核の割合も表示)

B diMeK4H3 の修飾ヒストンの局在が変化した核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でない核を除いて計算)

C diMeK4H3 の修飾ヒストンの局在が変化していない核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でないものの核の割合も表示)

D diMeK4H3 の修飾ヒストンの局在が変化していない核の複製タイミングをパターン別に分類 (S 期でない核を除いて計算)

E 5azadC 処理していないコントロール

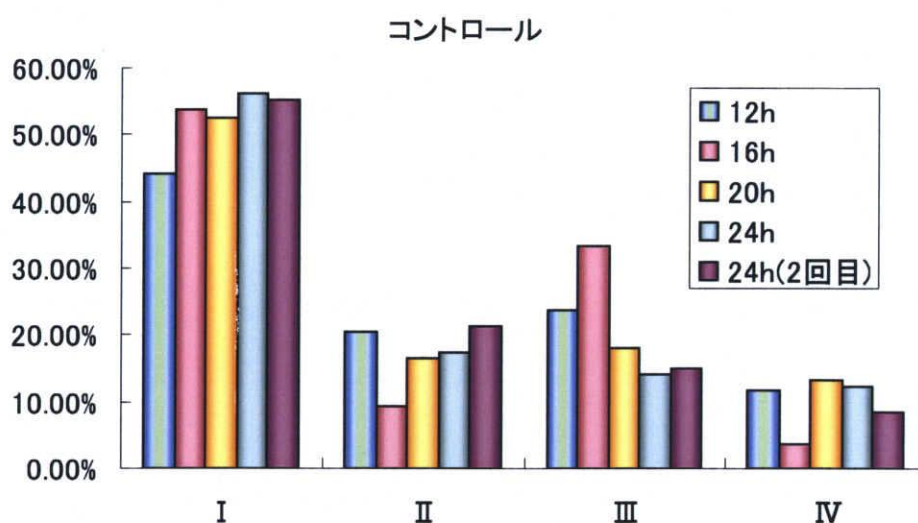


図 25 5azadC 処理をせず修飾ヒストン (AcH を使用) と複製ラベルの検出を同時に行ったコントロール (→解析 II)

青色 : 12 時間培養

マゼンタ : 16 時間培養

オレンジ : 20 時間培養

水色 : 24 時間培養

紫 : 24 時間培養 (カウント 2 回目) 念のため

5azadC 処理をする細胞と同数を同時間培養して検出にバラツキがでないかを確認したコントロール実験。

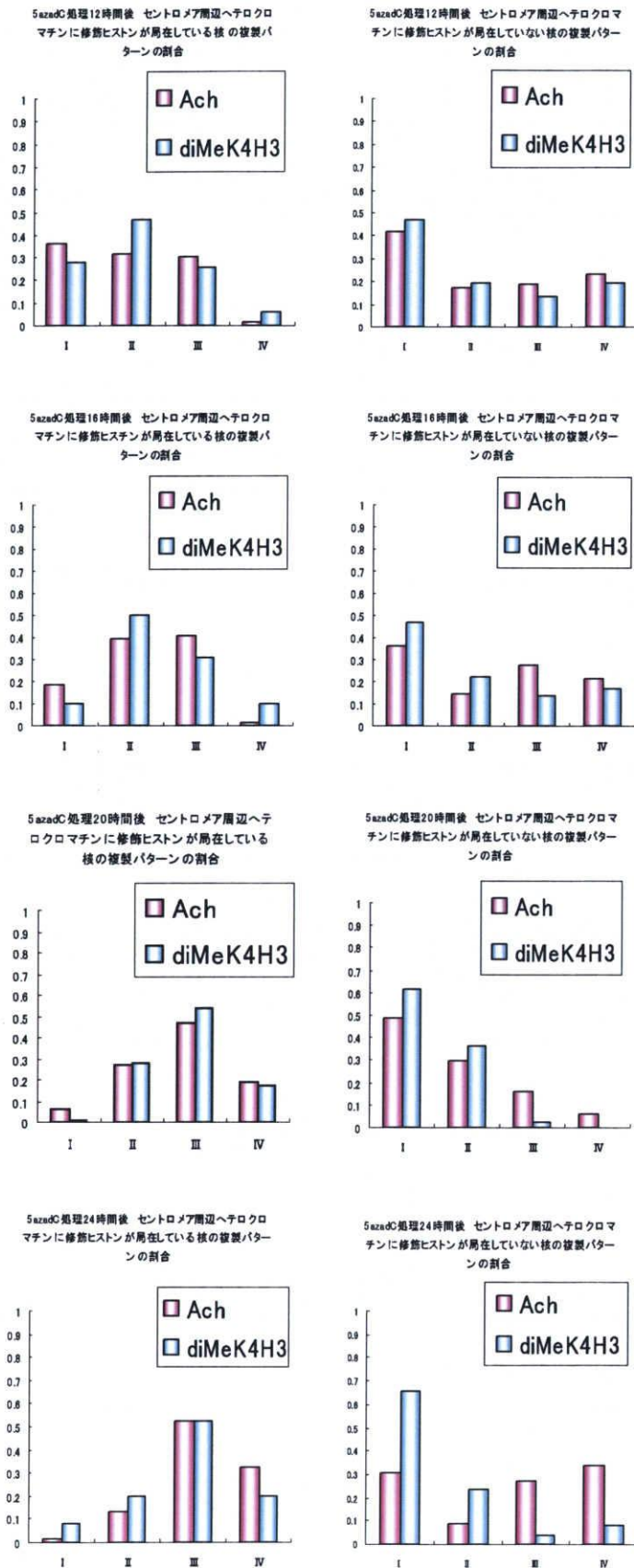


図 26 5azadC (12、16、20、24 時間処理) 修飾ヒストン (Ach、diMeK4H3) と複製ラベルを同時に検出 (→解析 II)
 左側: 修飾ヒストンの局在変化がみられるもの
 右側: 修飾ヒストンの局在変化がみられないもの
 上から順に 5azadC 処理 12,16,20,24 時間の結果

修飾ヒストンの局在が変化しているもの (図 26 左側) に注目すると 5azadC 処理 12 時間ではパターン IV が少なく、16 時間ではパターン II、III が多く見られる。20 時間処理のものではパターン III をピークに山ができ、24 時間も同様の結果となっている。24 時間処理の場合は解析 I と解析 II で同様の実験をしており図 19 で示したように解析 I ではパターン IV をピークとする山ができています。時間経過とともにピークの山が移行しているようである。

局在変化していない核の方 (図 26 右側) では、だいたい左側のグラフの反対のような結果となっている。

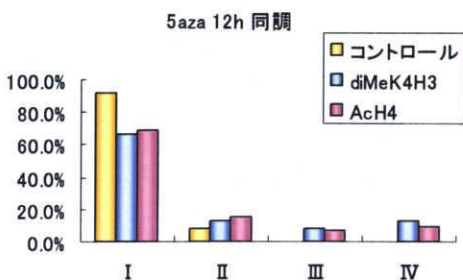
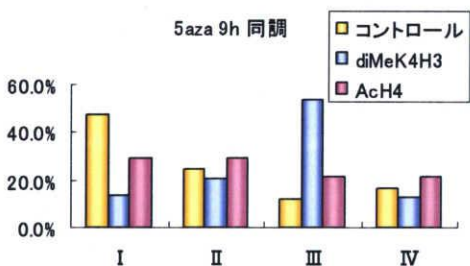
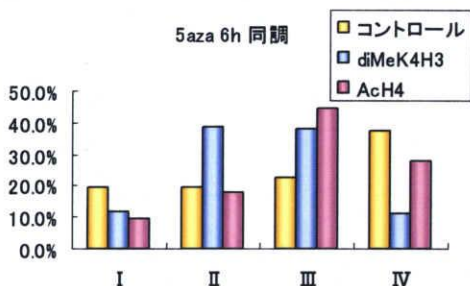
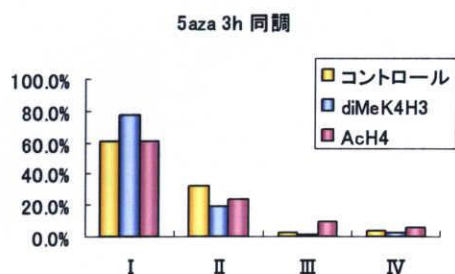
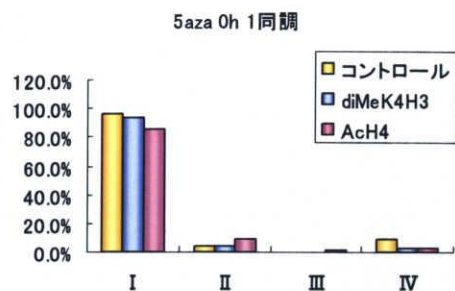


図 27 同調培養の結果 (→解析Ⅲ)

黄色：コントロールは複製ラベルのみ検出。5azadC 処理はしていない

青：diMeK4H3 修飾ヒストンと複製ラベルを同時に検出。アフィジコリンリリース後 5azadC 処理。

マゼンタ：AcH4 修飾ヒストンと複製ラベルを同時に検出。アフィジコリンリリース後 5azadC 処理。

同調リリース 6 時間のものでは 5azadC 処理しているもの (青、マゼンタ) よりコントロール (黄色) の方が複製の進行が早い。9 時間においてコントロールは細胞周期を一周して 2 回目のパターン I に入るものが出始める。5 azadC 処理のものはまだ複製パターン III、IV のものがみられる。同調培養 12 時間のものではコントロールと 5azadC 処理したものが並ぶようになる。

5azadC 処理したものは複製期において DNA に 5azadC を取りこむため進行が遅れるのかもしれない。しかし、ヘミメチル状態になった DNA は (DNA メチルによる立体障害がなくなる?) アクセスビリティがよくなるなどの理由で細胞周期が早まり、コントロールと並ぶのかもしれない。

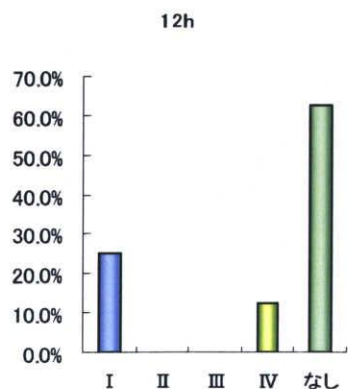
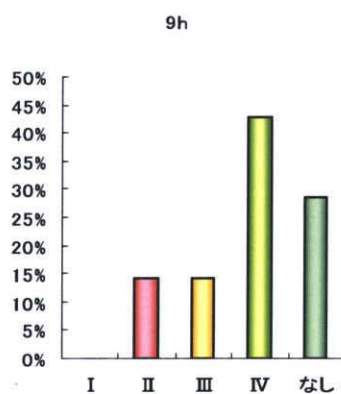
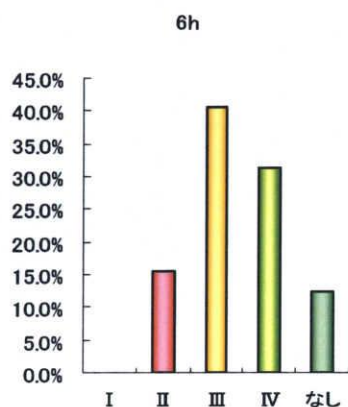
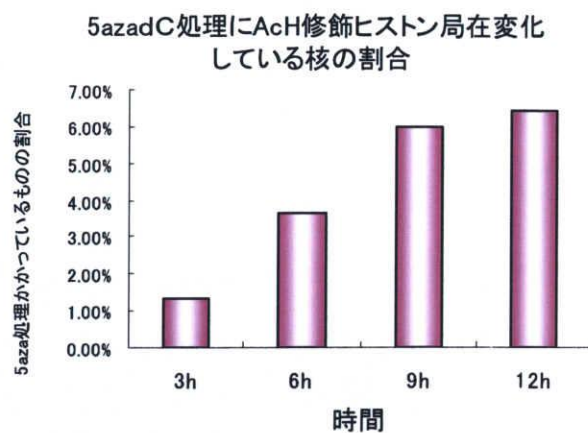
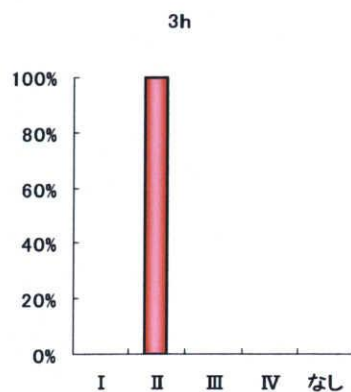


図 28 同調培養の結果 (→解析Ⅲ)

上記図 の同調培養細胞のうち修飾ヒストン AcH4 の局在が変化した核を解析

5azadC 処理時間は 3,6,9,12 時間

右側：時間経過により増加する修飾ヒストンの局在が変化した核の割合

左側：修飾ヒストンの局在が変化した核の複製パターンの割合

同調リリース 5azadC 処理 3 時間のものでは修飾ヒストンが局在変化する核はパターンⅡのみであった。同調培養ではばらつきがほとんどないことがわかる。

6,9,12 時間と時間が経つにれて修飾ヒストンの局在が変化した核の割合が横にずれて進行していくことが確認された。3,6,9 時間のグラフではパターンⅠで局在変化した核はなくパターンⅡを境に修飾ヒストンの局在変化した核が現れるようになる。

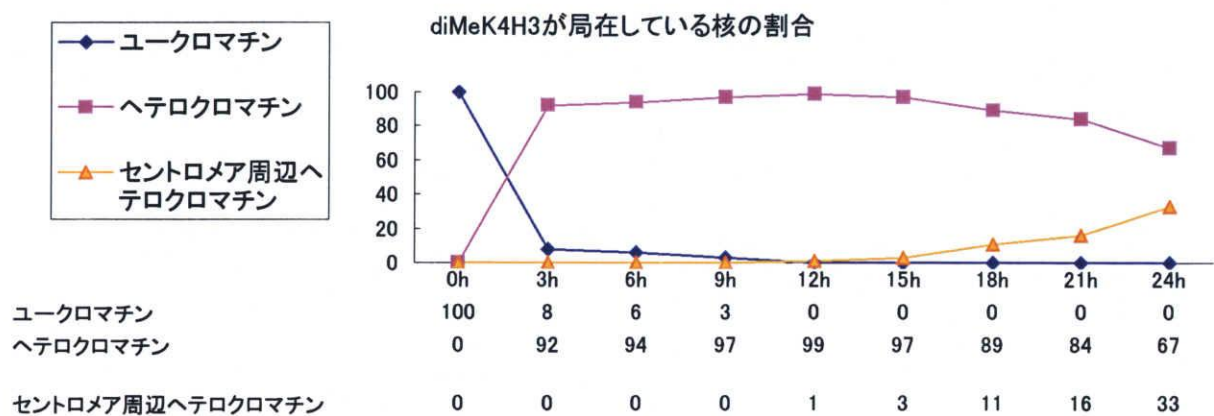
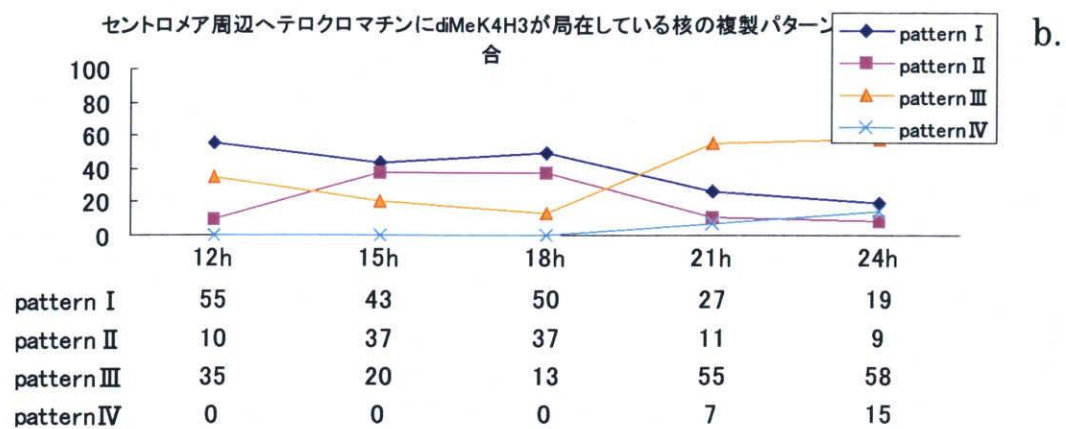


図 29 同調培養の結果 (→解析Ⅳ)
解説 p 6 2 へ

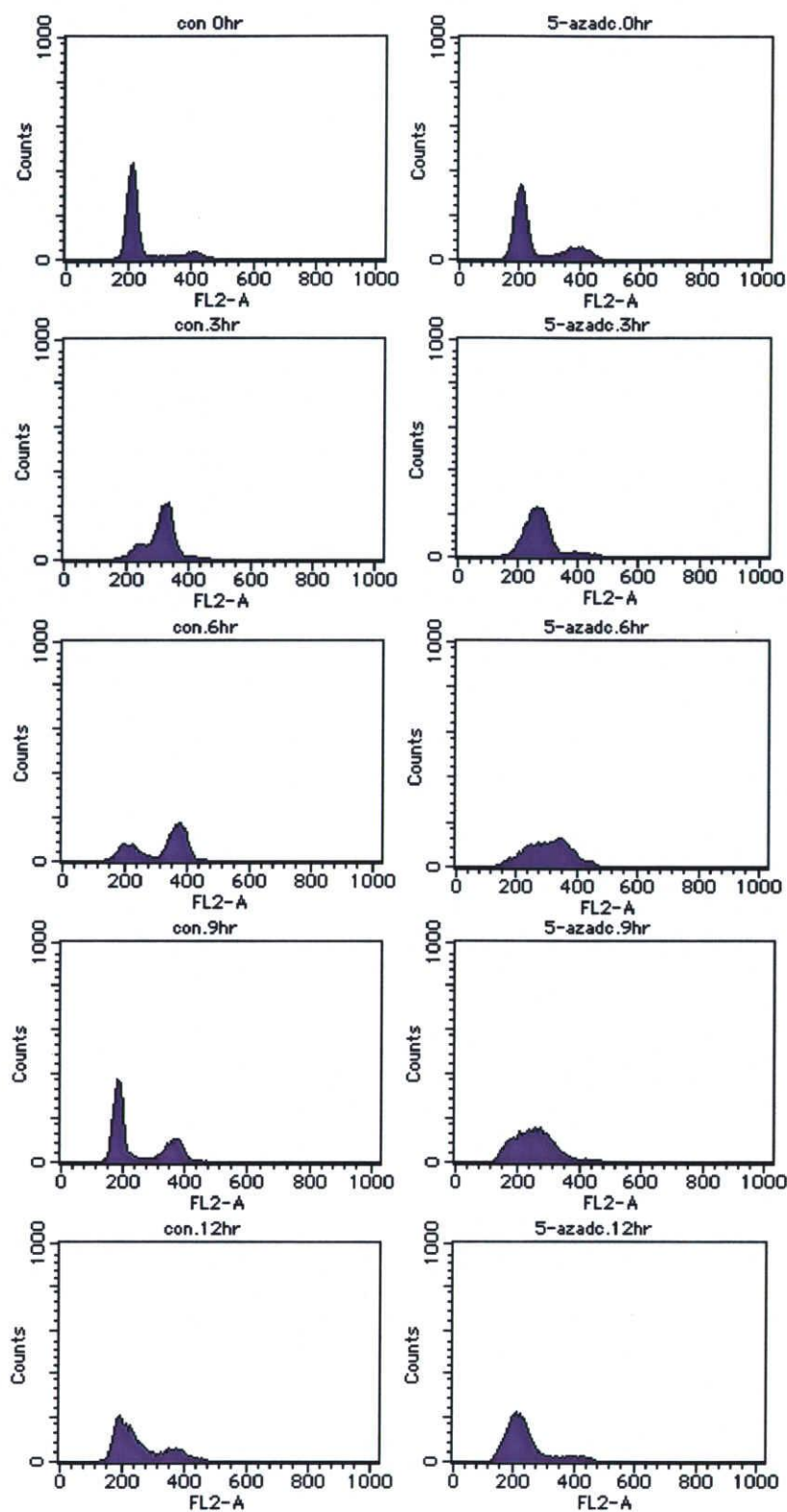


図 30 同調培養の結果
(→解析IV)

同調培養したものを
FACS で解析

左側：コントロール

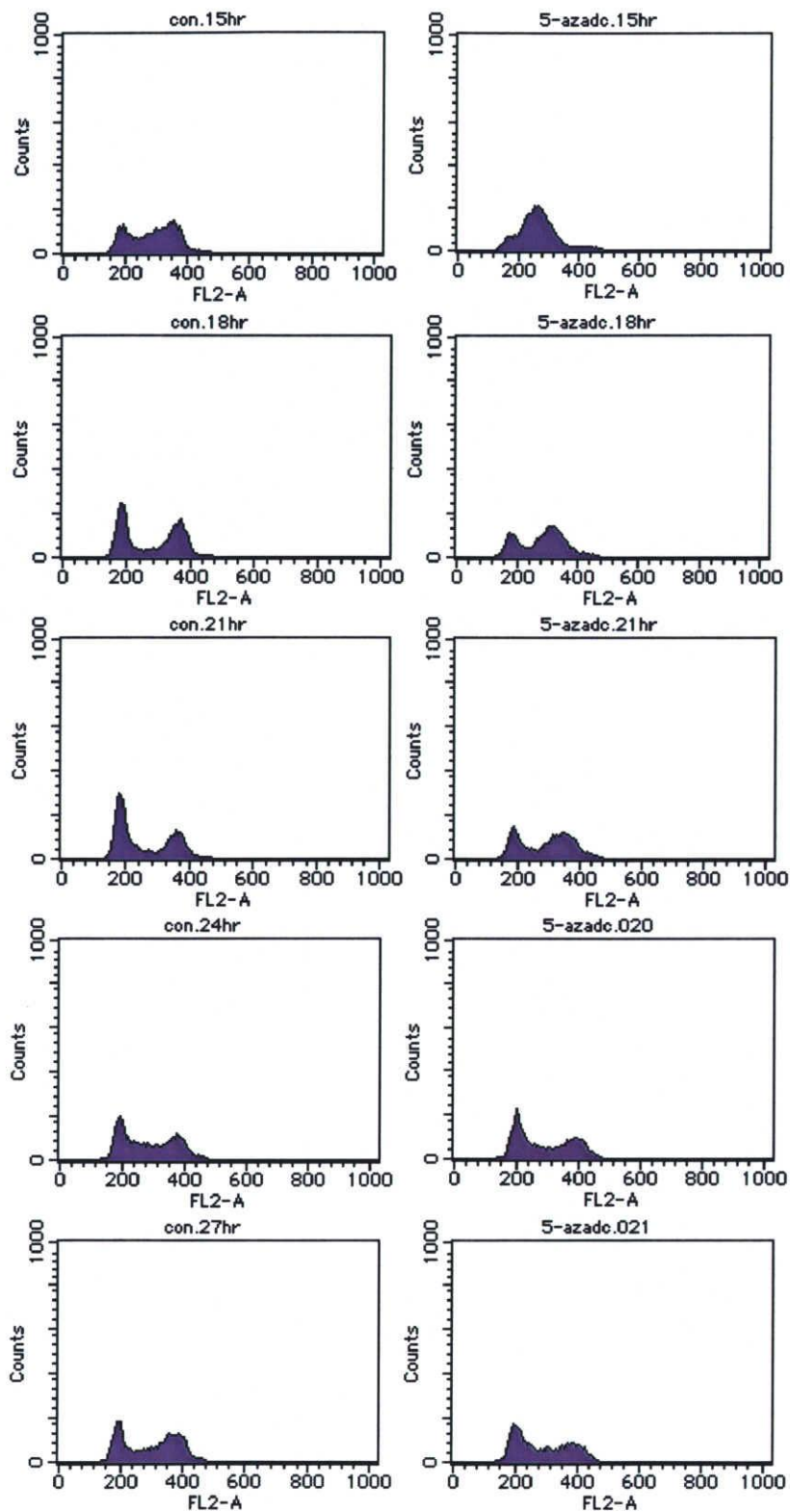
右側：5azadC 処理

左側コントロールでは同調リリース3時間でS期を通るが、右側5azadC 処理のものでは3,6,9時間で1回目のS期を通過する。これは解析Ⅲ図27と似た結果である。

また、12,18,21時間ではコントロールと5azadC 処理の細胞周期が並ぶ。

解析Ⅲと合わせて考えると1回目のS期はコントロールの方が早く、2回目のS期では5azadC 処理のものと並ぶ。

複製タイミングと複製フォークの進行について本研究室竹林(先輩) 杉村(先輩)



福島 (先輩) 石田 (先輩) 境 (くん) により詳しく解析されている。竹林 (先輩) 博士論文によると、複製フォークはS期中期で減速し後期へと移行するにつれて加速するとある。

AT リッチなRバンド領域から GC リッチなGバンド領域へと転換する時期に複製が遅れる結果と、CpG領域のメチル期が外れることによって複製が早まることは関連しているのかもしれない。

解析IV

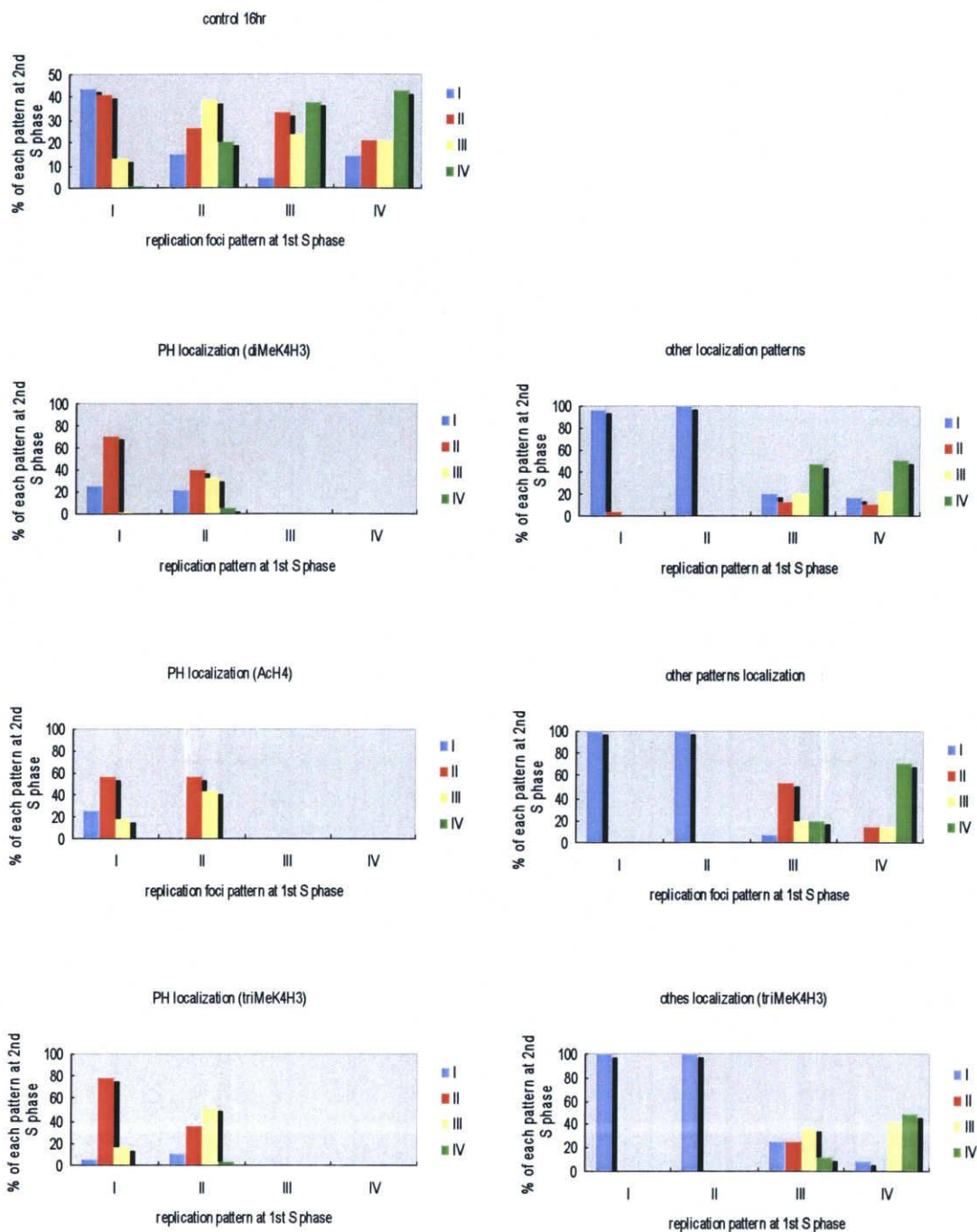


図 31 dig&bio 二色複製ラベル

(→解析 V)

非同調培養、5azadC 処理において二色複製ラベルを行った。

複製タイミングの進行は、1回目のパターン II (3~6hr) ではヘミメチル化となる。2回目のパターン II (18~21hr) で複製タイミングが早まると考えられている。この結果は 5azadC 処理 16 時間 (細胞周期 1 周) のもので、2 回目のパターン II は複製タイミングが早くなるという考察のもと、修飾ヒストンの局在変化している核はパターン I のものをパターン II にカウントするという方法

で解析を行った。解析は杉村（先輩）によるもの。

左上：コントロール（5azadC 処理していないもの）

左側：修飾ヒストンが局在変化している核

上から順に diMeK4H3, AcH4, triMeK4H3

右側：修飾ヒストンが局在変化していない核

上から順に diMeK4H3, AcH4, triMeK4H3

グラフ横軸は複製ラベル 1 回目のパターン、縦軸はその割合

4 色で分類したものが複製ラベル 2 回目のパターン

青：パターン I、赤：パターン II、黄：パターン III、緑：パターン IV

左側のセントロメア周辺ヘテロクロマチン（PH）に局在変化しているものは複製ラベル 1 回目がパターン I、II のものだけである。つまり、1 回目の複製パターンが III、IV のものは局在変化しない。

修飾ヒストンの局在が変化していないものは 1 回目がパターン I、II のもの、2 回目のパターンがほぼ I のものが多い。つまり、まだ細胞周期 2 週目のパターン II を通過していない。

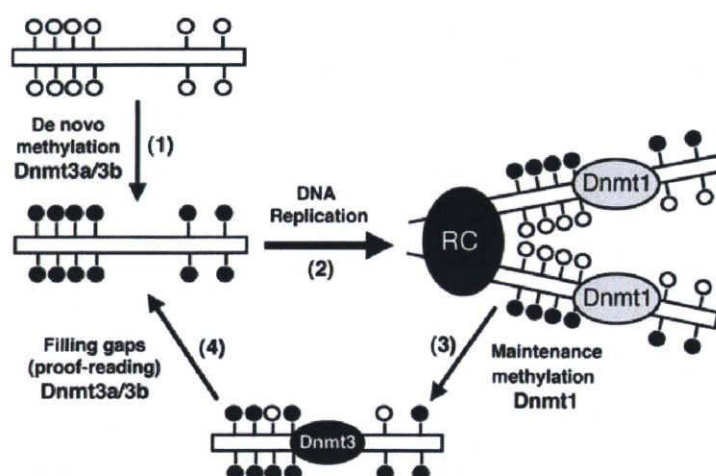
1 回目にパターン III、IV のものは 2 回目も III、IV とほとんど変化しない。

複製ラベル 1 回目の S 期でパターン I、II の時点で 5azadC が効いてるもの（ヘミメチル化状態になっているもの）では複製ラベル 2 回目のパターン I、II を過ぎた後でリング状の局在を示すようになる。

第2章

5-azadC 処理によるセントロメアヘテロクロマチン領域の DNA メチル化解析について

序論



染色体DNAのメチル化状態は、メチル化されていない配列をメチル化することでパターンを作り出し (de novo メチル化)、細胞が増殖する過程でこれを維持し (維持メチル化)、必要に応じて消去する (脱メチル)、過程の総和として決定されている。(エピジェネティクス p 9)

主にDNA複製により合成された新生鎖にメチル基を付加する役割をしているのが Dnmt 1 (維持メチル化酵素)である。これは、一方の鎖のみメチル化しているヘミメチル化状態の CpG を優先的に認識し、相補鎖上のシトシンをメチル化することで、DNA複製を通じて同じメチル化状態を維持する。しかし、ある種のヒトがん細胞では Dnmt1 を欠損させてもDNAメチル化は2割程度しか減少しないことから維持型DNAメチル化はDnmt 3bによっても行われていることが示唆されている。またES細胞(胚性肝細胞)でも Dnmt1 に加えて Dnmt3a と Dnmt3b が必要であることが報告されている。

DNMT1



DNMT3A



DNMT3B



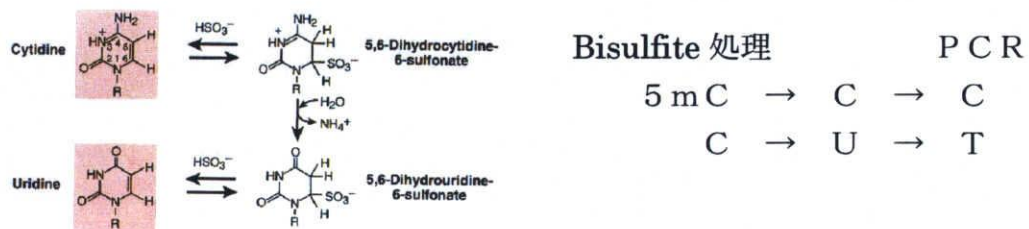
一般的に Dnmt3a,3b は新生メチル化酵素 (de novo) であり、3a はセントロメア以外を、3b はセントロメアをメチル化すると考えられている。いずれも C 末端側にメチル化活性を持つ触媒領域が存在する。

●Dnmt1 と相互作用するタンパク質

PCNA(proliferating cell nuclear antigen 増殖細胞核抗原)複製に必須の因子。

Dnmt3a,Dnmt3b MeCP2 メチル化DNA結合タンパク質 C末端メチル化DNA結合領域、N末端MBD結合、MBD、HDAC・・・などが挙げられる。

●バイサルファイトシーケンスについて 特定領域のDNAメチル化の解析を行う際に用いられる方法のひとつ。DNAを bisulfite で処理するとシトシンは上記の3段階の化学反応によりウラシルに変換される。一方メチル化シトシンは変換速度が極めて遅く、ほとんどすべてが変換されずに残る。さらにPCRを経ることで、ウラシルはTとして、メチル化シトシンはCとして検出される。



〈同調・バイサルファイトシーケンシング〉

同調 5aza 処理 DNA 抽出 バイサル PCR DNA 抽出 プラスミドブレップ シーケンス

(0, 1 2, 2 4 h) 制限酵素 処理 ゲル切り出し ライゲーション シーケンス PCR

◆コントロール 1

〈nomal m5S・non バイサル シーケンシング〉

DNA 抽出 PCR DNA 抽出 プラスミドブレップ シーケンス

制限酵素 ゲル切り出し ライゲーション シーケンス PCR

◆コントロール 2

〈nomal m5S・バイサルファイトシーケンシング〉

DNA 抽出 バイサル PCR DNA 抽出 プラスミドブレップ シーケンス

制限酵素 処理 ゲル切り出し ライゲーション シーケンス PCR

◆コントロール 3

〈同調・FACS〉

同調 5aza 処理

(0, 1 2, 2 4 h) FACS 解析

材料と方法

●細胞培養と同調

マウス m5S 細胞（京都大学放射線生物研究センター、佐々木正夫教授より提供）は、10% fetal bovine serum(FBS ; Sigma)入りの Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM ; Gibco BRL)を培地として、培養ディッシュ (TISSUE CULTURE DISHES ϕ 100×20mm ; TPP) において、5%CO₂、37℃インキュベーターで培養を行った。

※（同調培養する際は、細胞が40%コンフルエントになった時点で行うため、直径10cm ディッシュの場合は 4×10^5 個の細胞を6時間培養しディッシュに付着させた後に、同調培養に移る。）

m5S 細胞を G0 期に同調するために、0.2%FBS 入りの DMEM 培地で48時間培養した。また、G1/S 期に同調するために、G0 期の細胞を5 μ g/ml aphidicolin 存在下、10%FBS 入り DMEM 培地で16時間リリース培養した。

●薬剤処理

Aphidicolin ブロックから細胞をリリースするために、予め37℃で暖めた PBS で2回洗浄した後、薬剤 5-aza-2'-deoxycytidine(5-azadC ; Sigma)処理に移る。予め5%CO₂、37℃のインキュベーターでプレインキュベートした培地（10%FBS DMEM）に終濃度8 μ M になるように5-azadC を添加し、任意の時間（今回は0 h、12 h、24 h）培養して処理を行った。

※（5-azadC 処理後、細胞が80%コンフルエント、直径10cm ディッシュの場合は約 1.0×10^6 個になる）

●DNA 抽出

培養細胞をトリプシンで剥がし、Wizard genomic DNA purification kit (PROMEGA A1120)を用いてDNA抽出を行い、DNA濃度を確認した。

※（培養細胞は大体 1.0×10^6 個くらいの細胞から約10 μ g とれる）

●制限酵素消化

●バイサルファイト反応

Genomic DNA は、5 μ g を使用する。変性、脱アミノ反応、DNA 精製、エタノール沈殿を行いSQ 水20 μ l に溶解する。

DNA 精製は Wizard DNA clean-UP system(PROMEGA A7280)を使用。

●PCR

プライマー配列一覧

| primer | | | | | |
|--------|--------------------------------|------------|----|------|------|
| | major | Tm | bp | # GC | %GC |
| 1 | Li-maj-forward | | | | |
| | AAATCTAGAAATGTTTATTGTAGGA | 50.6(45) | 25 | 6 | 24 |
| 2 | Li-maj-reverse | | | | |
| | TTCGGATCCTAAAATATATATTTCTCAT | 53.2(44.8) | 28 | 7 | 25 |
| 3 | Meth-maj-forward | | | | |
| | AAAGTTGGAAAATTTAGAAATGTTTATTTT | 51 | 30 | 5 | 16.7 |
| 4 | Meth-maj-reverse | | | | |
| | TCCATATTCCAAATCCTTCAATATAC | 54.2 | 26 | 8 | 30.8 |
| | minor | | | | |
| 5 | Meth-min-forward | | | | |
| | TTATATTGTAGAATATATTAGATGAGTGAG | 53.7 | 30 | 7 | 23.3 |
| 6 | Meth-min-reverse | | | | |
| | ATATAATTTTATCATTTTCCATATTTCTC | 50.9 | 30 | 5 | 16.7 |

(1) Li major

➤Primer mix

| | |
|-------------------------------|------------|
| TE buffer | 8 μ l |
| Li major forward(100 μ M) | 1 μ l |
| Li major reverse(100 μ M) | 1 μ l |
| | 10 μ l |

➤反応液組成

| | |
|-----------------------------|------------|
| 10×Accu Prime PCR buffer II | 5 μ l |
| Primer mix | 1 μ l |
| SQ 水 | 41 μ l |
| Taq pol (Accu Prime) | 1 μ l |
| Bisulfite DNA | 2 μ l |
| | 50 μ l |

➤反応条件

| | | | | |
|---|------|-----|-----|---------|
| 1 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 1 サイクル |
| 2 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 3 サイクル |
| | アニール | 40℃ | 30秒 | |
| | 伸長 | 68℃ | 30秒 | |
| 3 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 27 サイクル |
| | アニール | 50℃ | 30秒 | |
| | 伸長 | 68℃ | 30秒 | |
| 4 | 保存 | 4℃ | ∞ | |

(2) Meth major

➤Primer mix

| | |
|----------------------------|-------|
| TE buffer | 8 μl |
| Meth major forward(100 μM) | 1 μl |
| Meth major reverse(100 μM) | 1 μl |
| | 10 μl |

➤反応液組成

| | |
|-----------------------------|-------|
| 10×Accu Prime PCR buffer II | 5 μl |
| Primer mix | 1 μl |
| SQ 水 | 41 μl |
| Taq pol (Accu Prime) | 1 μl |
| Bisulfite DNA | 2 μl |
| | 50 μl |

➤反応条件

| | | | | |
|---|------|-----|-----|---------|
| 1 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 1 サイクル |
| 2 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 30 サイクル |
| | アニール | 50℃ | 30秒 | |
| | 伸長 | 68℃ | 30秒 | |
| 3 | 保存 | 4℃ | ∞ | |

(3) Meth minor

>Primer mix

| | |
|---------------------------------|------------|
| TE buffer | 8 μ l |
| Meth minor forward(100 μ M) | 1 μ l |
| Meth minor reverse(100 μ M) | 1 μ l |
| <hr/> | |
| | 10 μ l |

>反応液組成

| | |
|-----------------------------|------------|
| 10×Accu Prime PCR buffer II | 5 μ l |
| Primer mix | 1 μ l |
| SQ 水 | 41 μ l |
| Taq pol (Accu Prime) | 1 μ l |
| Bisulfite DNA | 2 μ l |
| <hr/> | |
| | 50 μ l |

>反応条件

| | | | | |
|---|------|-----|-----|--------|
| 1 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 1サイクル |
| 2 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 30サイクル |
| | アニール | 50℃ | 30秒 | |
| | 伸長 | 68℃ | 30秒 | |
| 3 | 保存 | 4℃ | ∞ | |

(4) Oct

>Primer mix

プライマーは Operon の合成プライマーを使用し、TE buffer 8 μ l に 100 μ M の forward と reverse それぞれ 1 μ l を加えて全量 10 μ l のプライマーmixを作った。

>反応液組成

| | |
|-----------------------------|------------|
| 10×Accu Prime PCR buffer II | 5 μ l |
| forward primer(10 μ M) | 1 μ l |
| reverse primer(10 μ M) | 1 μ l |
| Primer mix | 1 μ l |
| SQ 水 | 40 μ l |
| Taq pol (Accu Prime) | 1 μ l |
| Bisulfite DNA | 2 μ l |
| <hr/> | |
| | 50 μ l |

➤反応条件

| | | | | |
|---|------|-----|-----|--------|
| 1 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 1サイクル |
| 2 | 変性 | 94℃ | 30秒 | 30サイクル |
| | アニール | 50℃ | 30秒 | |
| | 伸長 | 68℃ | 30秒 | |
| 3 | 保存 | 4℃ | ∞ | |

●PCR

Taq ポリメラーゼは AccuPrime Taq DNA polymerase System(Invitrogen)を使用し、0.2ml チューブ (0.2ml 8-Strip PCR Tube with Attached Individual Cap,Natural,SNAPSTRIP ; フナコシ) に上述の組成とおり反応液を混合し、サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 9700 ; Applied Biosystems) により、上述の反応条件のとおり PCR を行った。

※ (AccuPrime Taq DNA polymerase System は pol I 型の酵素で、抗体と熱安定性のアクセサリタンパク質により、全サイクル中でのミスプライミングを抑える。)

●電気泳動 (PCR 確認時)

PCR 産物 1 μ l、TAE buffer 4 μ l、6×Loading Dye(Fermentas) 1 μ l を混合し全量 6 μ l を 1 レーンにアプライした。1.2%アガロースゲルで電気泳動 (Mupid ミニゲル泳動槽) した後、エチジウムブロマイド で 30 分染色し UV 下で撮影。

●ゲルの切り出し

●DNA 抽出

●ライゲーション

●形質転換

●インサートチェック

●プラスミド精製

●シーケンス PCR とエタノール沈殿

結果と考察

●同調 (FACS) の結果

FACS より、コントロールとして同調培養していないもの (コントロール 2 にあたる)、同調培養したのち 5azadC 処理を 0 h、12 h、24 h したものの結果。図 30 の同調結果と比較したところ、12 h には見られない G2 の山が少し確認され、24 h のものでは G1 と G2 には含まれた S 期の部分が多く、21 h から 27 h までの結果に相当すると考えられる。

備考：同調培養する 5 日前に細胞をおこした。

●制限酵素消化

制限酵素消化前の DNA 濃度測定

<泳動結果>



レーン (左から順に)

- | | | |
|---|-------|---------|
| 1 | λ DNA | 0.1 μ g |
| 2 | λ DNA | 0.2 μ g |
| 3 | λ DNA | 0.5 μ g |

- | | | | | | | | | | | | |
|------------|---------|---|--------|---------|------|----|-------|--|-----|------------|------|
| 4 | コントロール① | { <table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>DNA</td></tr> <tr><td>5 μ l を</td></tr> <tr><td>アプライ</td></tr> </table> | DNA | 5 μ l を | アプライ | 12 | 0 h ① | { <table border="0" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr><td>DNA</td></tr> <tr><td>2. 5 μ l を</td></tr> <tr><td>アプライ</td></tr> </table> | DNA | 2. 5 μ l を | アプライ |
| DNA | | | | | | | | | | | |
| 5 μ l を | | | | | | | | | | | |
| アプライ | | | | | | | | | | | |
| DNA | | | | | | | | | | | |
| 2. 5 μ l を | | | | | | | | | | | |
| アプライ | | | | | | | | | | | |
| 5 | コントロール② | | 13 | 0 h ② | | | | | | | |
| 6 | 0 h ① | 14 | 12 h ① | | | | | | | | |
| 7 | 0 h ② | 15 | 12 h ② | | | | | | | | |
| 8 | 12 h ① | 16 | 24 h ① | | | | | | | | |
| 9 | 12 h ② | 17 | 24 h ② | | | | | | | | |
| 10 | 24 h ① | | | | | | | | | | |
| 11 | 24 h ② | | | | | | | | | | |

<NanoDrop による OD 260 値の測定>

| | OD 260 (ng/ μ l) | 260/280 | 泳動結果より |
|--------------------|----------------------|---------|--------|
| 目分量で (ng/ μ l) | | | |
| コントロール① | 245.9 | 2.02 | 60 |
| コントロール② | 217.5 | 2.03 | 70 |
| 0 h ① | 525.6 | 2.01 | 80 |
| 0 h ② | 426.1 | 2.05 | 80 |
| 12 h ① | 740.6 | 2.04 | 120 |
| 12 h ② | 641.2 | 2.04 | 100 |
| 24 h ① | 505.9 | 2.04 | 90 |
| 24 h ② | 468.0 | 1.98 | 80 |

泳動結果と OD260 値を比較すると、泳動結果の方が 5～7 倍うすい結果となった。原因は NanoDrop の特性によるものと考えられ、濃度が高すぎるなど閾値を越える場合は OD 260 値の測定を控え、泳動する必要がある。対策としては、 λ DNA などで NanoDrop の濃度検定を試みることをあげられる。

この結果をもとに制限酵素処理 (EcoR I) を行った。これはゲノム DNA を断片化し、バイサルファイト反応を効率的にするための操作である。

制限酵素消化後の DNA 濃度測定

<泳動結果>



| レーン | | | レーン | | OD260 | 目分量 (ng/2.5 μ l) |
|-----|---------------|-------------|-----|-----------|------------------------------|----------------------|
| 1 | λ DNA | 0.1 μ g | 4 | control①② | DNA 2.5 μ l を アプライ | 536.6 200 |
| 2 | λ DNA | 0.2 μ g | 5 | 0 h ①② | | 862.5 200 |
| 3 | λ DNA | 0.5 μ g | 6 | 12 h ①② | | 1155.8 ? |
| | | | 7 | 24 h ①② | | 955.4 ? |

●バイサルファイト反応

制限酵素消化後の DNA 濃度をもとにバイサルファイト反応を行った。

備考：回収した DNA 量が少なかったため、泳動結果ではなく OD 260 値の濃度を参考に計算した。

(泳動結果より 7～10 倍以上うすい量でバイサルファイト反応を行った。)
バイサルファイト処理が完全にかかっていない可能性があるため、反応に使う DNA 量を検討する必要があるということから、DNA 5 μ g で反応させる場合と DNA 2.5 μ g で反応させる場合の 2 種類を行った。

●バイサルファイト処理後の PCR

同調培養 5azadC 処理 24 h のバイサルファイト処理したサンプルを用いて PCR を行った。

| 同調培養&5azadC 処理 2 4 h | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-------------------|-----|-----|-----|---------------------|-----|-----|-----|----------|--|--|--|
| サイズ | non | | | | バイサル | | | | バイサル DNA5 μ g | | | | バイサル DNA2.5 μ g | | | | 佐藤先生バイサル | | | |
| マーカー | (1) | (2) | (3) | (4) | (1) | (2) | (3) | (4) | (1) | (2) | (3) | (4) | (1) | (2) | (3) | (4) | | | | |

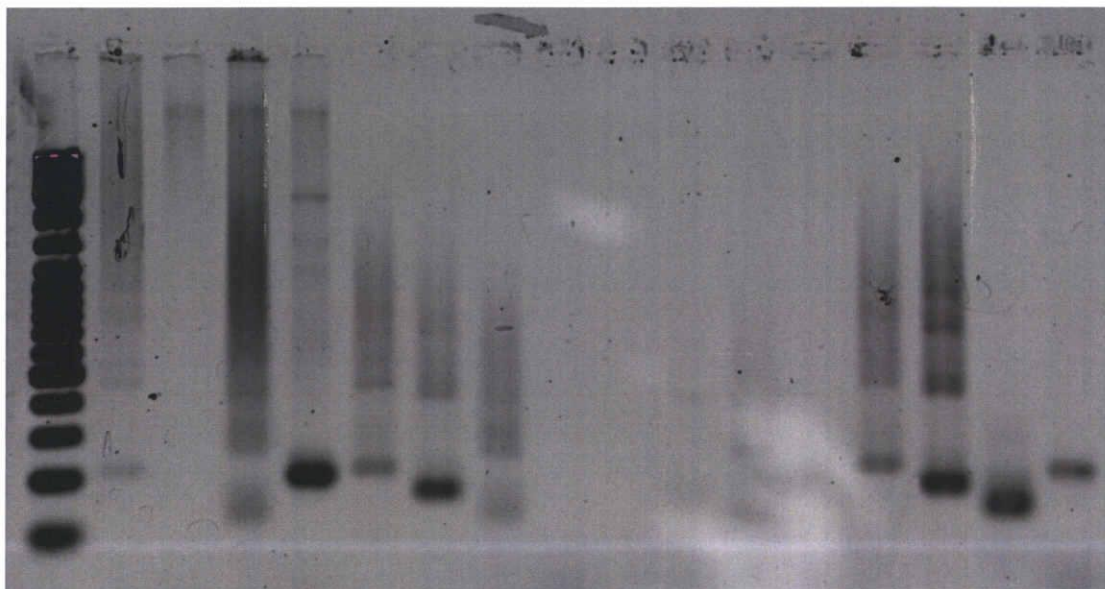


図 32 バイサルファイト処理後 PCR の泳動結果

1. 2%アガロースゲル TBE buffer サイバーゴールドで染色
taq<accu prim>

泳動時 DNA 2 μ l を流した。

DNA 抽出時イソプロパノールの濃度を間違え、操作上のミスをした DNA 2.5 μ g は、ほとんど検出できなかった。

結果として、non バイサルファイト (2) meth major と、自分でバイサルファイト反応を行った DNA 5 μ g (4) oct4 のバンドが出なかった。

原因として non バイサルファイト (2) は PCR 反応液中の DNA 濃度が濃いこ

とが考えられ、バイサルファイト DNA5 μ l (4) は DNA 量が少ない可能性がある。non バイサル (2) に関しては DNA 量を減らす、バイサルファイト DNA5 μ g (4) は、DNA 量を増やす、サイクル数を上げるなどの対策が考えられる。

●同調培養&5azadC 処理 バイサルファイト処理後の PCR

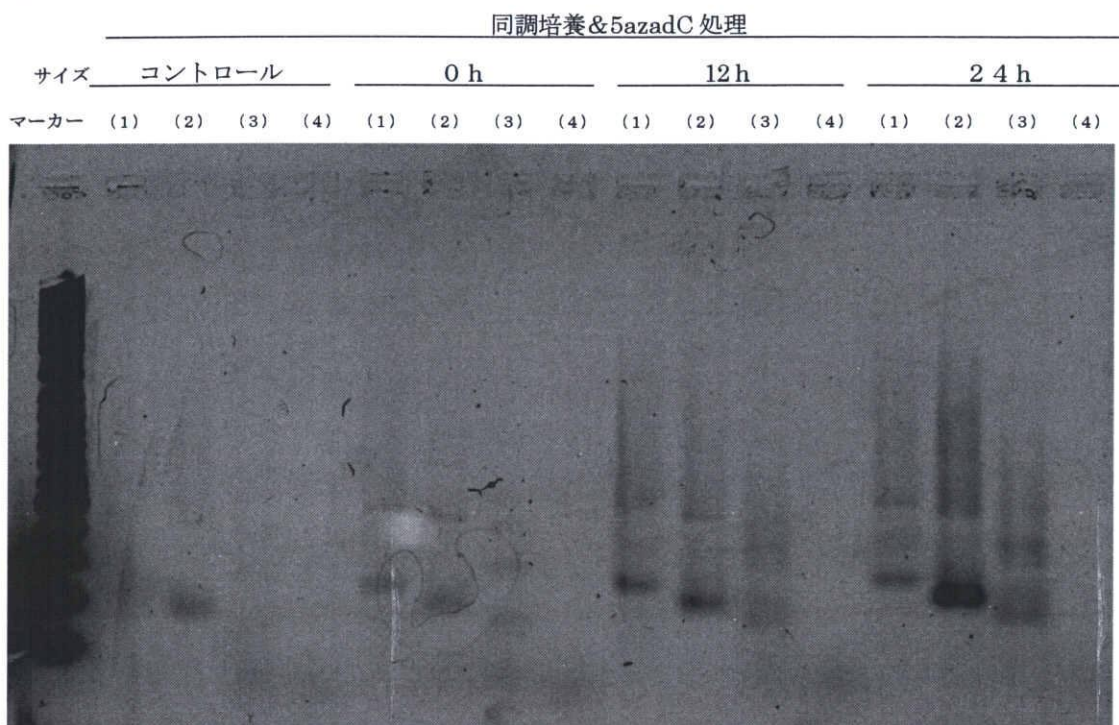


図 33 同調培養 5azadC 任意の時間処理 バイサルファイト処理後の PCR 泳動結果

1. 2%アガロースゲル TBE buffer サイバーゴールドで染色
taq<accu prim>

泳動時 DNA 1 μ l を流した。

バンドが出たものでライゲーションを行った。

| | DNAサンプル | 培養 | 5azadC 処理 | プライマー |
|---|------------|-------|------------|-----------------|
| ③ | バイサルファイト × | nomal | | (1) (3) (4) |
| | バイサルファイト ○ | nomal | | (1) (2) (3) (4) |
| ② | バイサルファイト ○ | 同調 | コントロール | (1) (2) |
| | バイサルファイト ○ | 同調 | 5azadC 0h | (1) (2) |
| | バイサルファイト ○ | 同調 | 5azadC 12h | (1) (2) (3) |
| ① | バイサルファイト ○ | 同調 | 5azadC 24h | (1) (2) (3) |

↑

確認したいサンプルの優先順位。丸で囲ったサンプル (1) (2) プライマーでライゲーションをした。

| | DNA抽出物より | ベクター | インサート | 計 | Abuffer | Bbuffer |
|------------|----------|------|-------|---|---------|---------|
| | OD 260値 | | | | | |
| ☆non(4) | 5.5→×4 | 0.8 | : 3.2 | 4 | 16 | 4 |
| コントロール | 1.3 | | | | | |
| ☆12h (2) | 3.5→×7 | 0.5 | : 3.5 | 4 | 16 | 4 |
| 148bp ポジコン | 21.4→×1 | 1 | : 1 | 2 | 8 | 2 |
| ネガコン | | 1 | 0 | 1 | 4 | 1 |

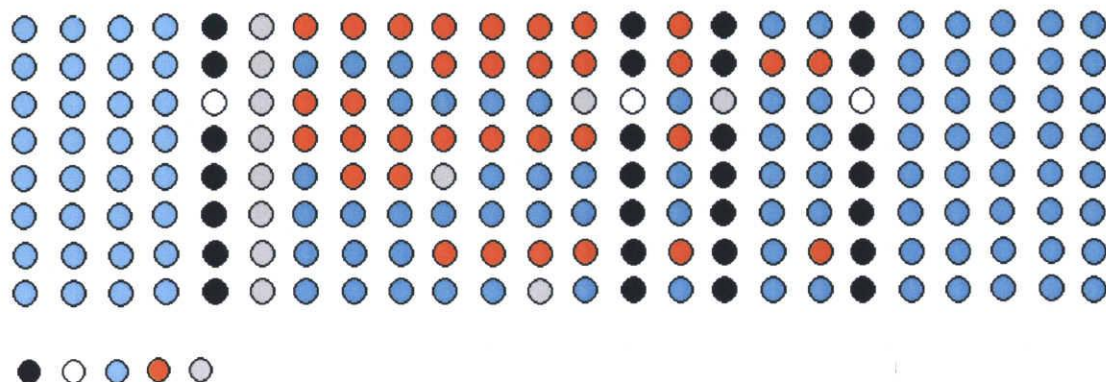


図 34 5 azadC 処理 12 時間 major サテライト領域 使用プライマー-meth
約 7%脱メチル化

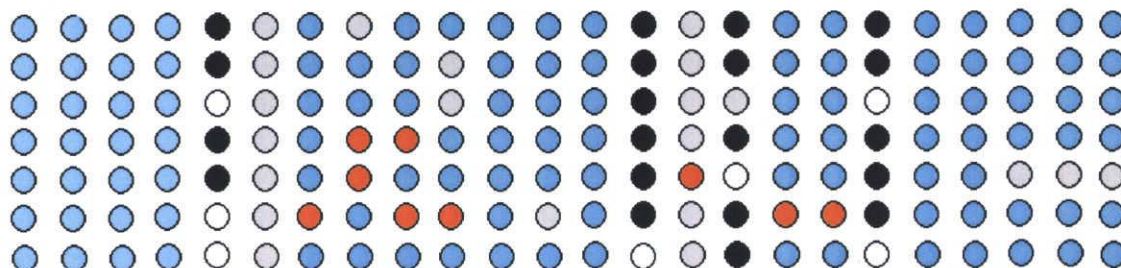


図 35 5 azadC 処理 24 時間 major サテライト領域 使用プライマー-meth
約 20%脱メチル化

黒丸：メチル化 DNA (C のまま)

白丸：メチル化していない DNA (C が T に変換) →脱メチル化 DNA

水色：バイサルファイト処理ができていないもの (C が T に変換)

赤丸：バイサルファイト処理ができていないもの (C のまま)

灰丸：リピートのバリエーション、もしくは一塩基多型 (SNIPs)

実際には黒と白の丸のみ表記する。この領域が CpG サイトである。今回はバイサルファイト反応が完全にできていないため、その他の配列に存在する C (シトシン) が T に変換できているかを確認するために、変換できているものを水色、できていないものを赤で示した。

メジャー配列の両端はきちんと変換されているが、中央部分は赤丸が多くバイサルファイト反応が不十分であることがわかる。あまり関係ないかもしれないが、特に CpG サイトの内側でバイサルファイト処理が不十分である。CG リッチな領域は結合しやすいためか、CpG のメチル基が作用しているのか、何か立体的に架橋を作っているのか、配列特異的に反応が左右されるようだ。

5azadC 処理 12 時間のものに比べ、24 時間のサンプルのほうに変換されやすい。24 時間のサンプルの方が細胞数が多く DNA 濃度が高かったことが原因のひとつと思われる。まだ、始めたばかりの実験で今回の 1 データしかでていないので十分検討の余地がある。今回のバイサルファイト反応は試薬調整から行った。反応において pH 条件が非常に重要ということで、細かく条件を合わせることができるキットの使用も有効と思われる。

●まとめ

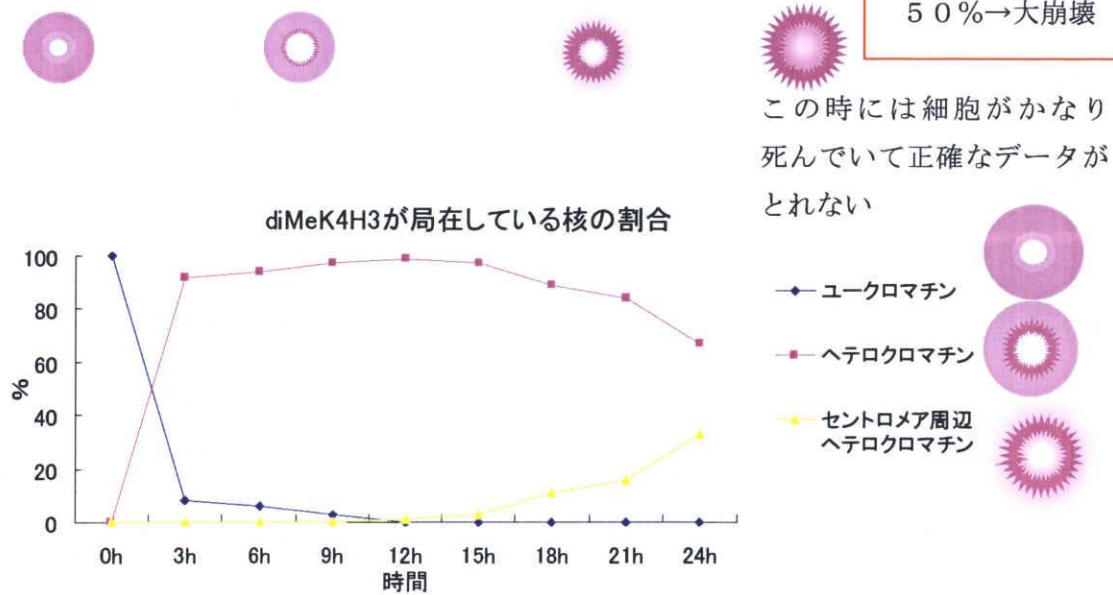
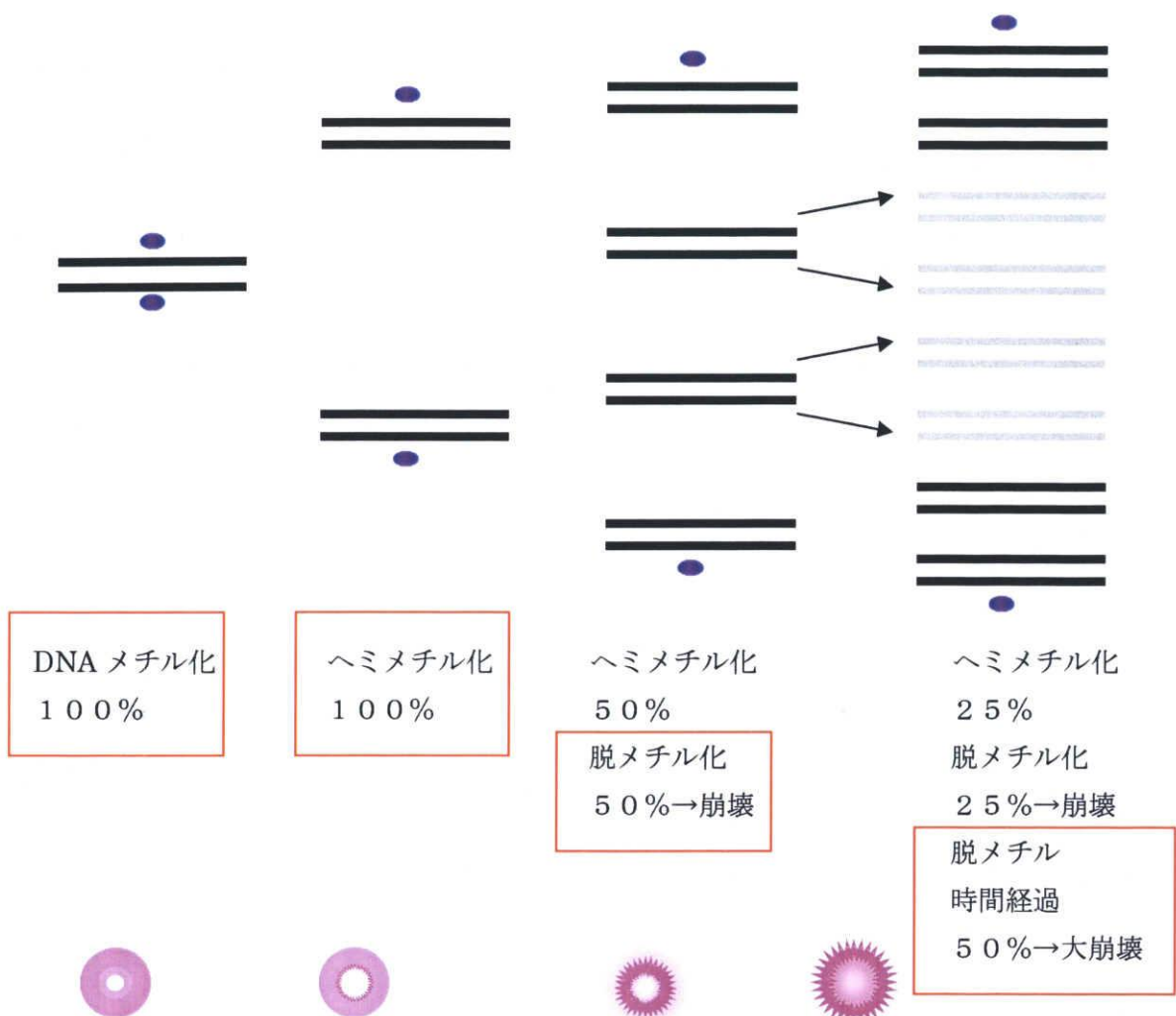
バリエーションが 20 種類以上存在する反復配列を解析しているためシングルコピージーンのようにスペシフィックな結果が得られなかった。

信頼できる結果を得るためにはデータの蓄積が必要である。バイサルファイト反応を左右するパラメーターとして使用する反応系と配列の特異性があり、解析する領域、また使用するプライマーによりバイサルファイト反応時の DNA 濃度、スルホン化時間などを検討する必要がある。

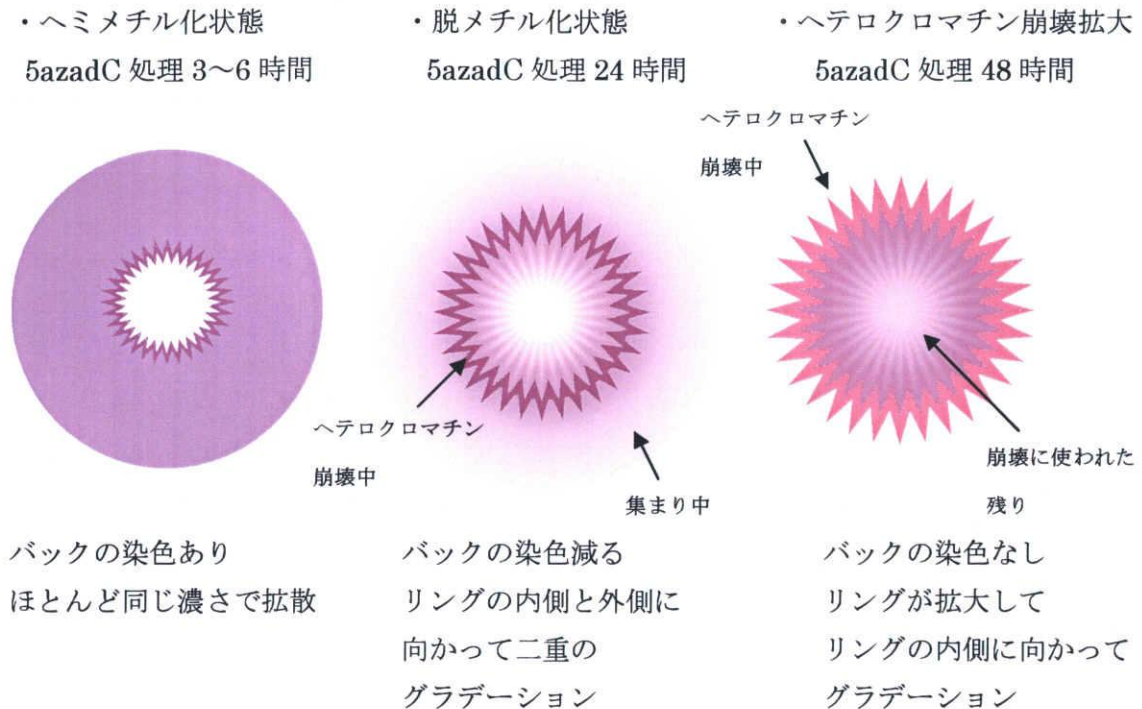
適確なコントロールの設定と、統計処理に基づいたデータ解析により信頼性の向上が期待される。

DNA の脱メチル解析は哺乳類の場合、植物と違い DNA 脱メチル致死であるため解析困難と思われる。

哺乳類でのバイサルファイトは、発生・分化、インプリント、疾患などにおけるメチル化の解析に適用できる。



diMeK4H3、AcH 修飾ヒストンの局在変化



● 5azadC 処理による時間の経過にしたがって、Dnmt1 阻害による複製依存的な DNA メチル化の解除が起こると考えられている。(En Li)

これにより新生鎖には DNA メチル基が付加されない。

このことから DNA メチル基結合タンパク質 MBD によるヘテロクロマチン形成が阻害されると考えられた。しかし MBD 欠損によるヘテロクロマチンの崩壊は確認されないという報告もある。

今回の結果から時間の経過とともにクロマチンを緩める修飾ヒストンのリクルートが観察された。これは、拡散状態にあった修飾ヒストンが特定の領域に凝縮し、脱メチル化した細胞がさらに細胞周期を一周することでヘテロクロマチンの崩壊が進行、修飾ヒストンの局在が拡大することから言える。

これらの修飾ヒストンは何によりリクルートされるのだろうか。

5azadC 処理により major, minor の RNA 転写が確認されることから、DNA メチル化解除による転写産物が関与している可能性が考えられる。これは 5azadC 処理をして短時間で転写が確認されること、また図 同調 の結果より、5azadC 処理 3~6 時間で修飾ヒストンの局在変化が見られることから推測した。すなわち 5azadC 処理後、短時間でヘテロクロマチン周辺に修飾ヒストンを接着する物質が現れる。もしこれがクロマチンリモデリング因子のようなものとしたら、このタンパク質がヘテロクロマチン周辺に集まるまで、もしくはタンパク質が発現するまでのタイムラグが考えられる。また敏速な応答としては、

5azadC 処理によりヘテロクロマチン周辺に存在するクロマチンリモデリング因子が働くようなシグナルが出るのかもしれない。

しかし、もしこれがタンパク質でなく転写された RNA の場合はどうだろうか。5azadC 処理により DNA 複製パターン II でヘミメチル化状態になり、メチル基がついていない新生鎖から RNA が転写されるのではないだろうか。この RNA がヘテロクロマチン領域に配列特異的に結合することで、修飾ヒストンをリクルートするタンパク質が結合するプラットフォームが提供されインデューサーとしての働きをしているのかもしれない。5 メチル化シトシンの局在観察結果において、構成ヘテロクロマチンがメチル化 DNA の局在と完全に一致していないことから、ヘテロクロマチンの崩壊が起こる前であっても、DNA 脱メチル化による転写が起こると考えられる。また、配列特異的に修飾ヒストンがとどまっていないことから、崩壊の進行には何らかの他のタンパク質が関与している可能性も示唆される。

●ヘテロクロマチン形成におけるメチル化 DNA の意義

セントロメアにおける DNA のメチル化は、ウイルス性トランスポゾン由来のリピート配列が DNA の他の配列に飛び回るのを防ぐための機構であると考えられる。5azadC 処理によって DNA が脱メチルすることで、トランスポゾン様の転写抑制が解除され、ウイルス由来の本来の働きを取り戻すのかもしれない。DNA メチル化解除とともに内在性 siRNA の阻害に働くサイレンシングも解除される。

今回の結果は、DNA メチル化解除により内在性 siRNA の転写が起こり、何らかの機構により修飾ヒストン diMeK4H3、AcH が（積極的に）ヘテロクロマチン周辺にリクルート（もしくはヘテロクロマチン周辺で接着・固定）されたものと考えられる。

どの領域から解除された転写産物か、それが RNA かタンパク質か何によるリクルートなのかは疑問が残る。

DNA のメチル化解除によって転写されると考えられるものとして、トランスポゾン由来の転写産物、不活性 X 染色体などが挙げられる。

またリクルートするタンパク質としては、ヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング因子などが考えられる。

本研究室竹林（先輩）の実験結果のよると、5azadC 処理した細胞ではヘテロクロマチン構造の脱凝縮が観察され、核内の特定の領域でヒストン高アセチル化が誘導されているのが確認されている。考察において、5azadC 処理した細胞では、核質に検出されるアセチル化ヒストンH4の蛍光がコントロール細胞に比べ弱いことについて次のように説明している。高アセチル化が誘導された領域の蛍光が強すぎて、それよりも弱い核質の蛍光が検出されにくくなっているだけであり、処理細胞でもコントロールと同様なアセチル化ヒストンH4の分布が観察されるとしている。しかし、石田（先輩）のウエスタンブロットによる修飾ヒストンの定量的解析によると、修飾ヒストンの核内での局在は変化するが、その量は核全体で見た場合 5azadC 処理のものとコントロールとほぼ同じであるとの結果がある。

また、竹林（先輩）の結果からは、10 日以前の胎児から細胞を採取した Dnmt1 ノックアウトマウスではセントロメアヘテロクロマチンが脱アセチル化状態であること、また 5azadC 処理後のセントロメアヘテロクロマチンに HDAC2 の局在が観察されることから次のような仮説を立てている。5azadC 処理によるヒストン高アセチル化の誘導は DNA の脱メチル化に無関係であり、5azadC を取り込んだ DNA と HDAC2 の異常な相互作用によるものではないか。

以上をふまえると私の RNA 関与説は全く意味のないものになるのだろうか？内容を整理すると、ヒストン高アセチル化誘導の原因として考えられるものには、Dnmt1 のノックアウト (~~Dnmt1~~ と相互作用する ~~タンパク質~~ が機能しないため、) DNA の脱メチル化によるもの (~~MBD~~、~~HDAC~~ が結合しないため、RNA 転写が起こらないため) 5azadC を取り込んだ DNA との異常な相互作用によるもの、5azadC の別の作用に (Dnmt1 トラップ、ユビキチンプロテアソーム系による影響?) によるものなどが挙げられる。

5azadC が Dnmt1 をトラップするという報告、また Dnmt1 が HDAC と相互作用すること (エピジェネティクス?) から、HDAC の異常な蓄積が説明できる。では、ユークロマチン領域に存在するヒストンの凝集も異常な相互作用によるものなのだろうか？

疑問に感じたのは、10 日以前の胎児は RNA を発現しているのだろうか？
→3 日以降は発現していそう。

10 日以前の胎児はヘテロクロマチンが崩壊していないのだろうか？

→竹林（先輩）の結果から DAPI で濃染されるヘテロクロマチンの崩壊は確認されない。

ヘテロクロマチン領域に蓄積するヒストン修飾は原因なのだろうか、それとも結果なのだろうか？

今回の実験データのみで推測するのは難しいため文献を参考に考察したい。

ヒストン修飾と DNA メチル化、RNA による制御機構において次のような報告がある。

まず、DNA メチル化とヒストン修飾について。

- ・ ウイルス由来リピート配列の転写抑制に働くクロマチンリモデリング因子として Lsh が知られている。Lsh 欠損は CpG の低メチルとヒストンの高アセチルを誘導する。しかしヘテロクロマチンは維持されている？

- ・ microH2A の論文より、セントロメア周辺ヘテロクロマチンは CpG メチル化欠損中で保持されるが有意な形態変化を同時に示す。
- ・ microH2A は XistRNA によりリクルートされている可能性がある。
- ・ 植物シロイナズナにおいて。トランスポゾン由来 LINE 配列は RNA 直接 DNA メチル化と siRNA により DNA メチル化が起きている。
- ・ MBD 欠損においてもヘテロクロマチンの崩壊はみられない。

DNA メチルトランスフェラーゼの欠損によってみられるゲノムインプリンティングの消失や X 染色体不活性化の消失、トランスポゾン領域の活性化といった通常抑制されている遺伝子の発現とそれに伴う個体発生の異常は MBD タンパク質の欠損によってはみることができない。このことから、MBD タンパク質が DNA メチル化依存的な転写調節に関わるかどうかは疑問が残る。(細胞核ダイナミクス)

- ・ 5azadC 処理によるヘテロクロマチン領域における HDAC の蓄積
- ・ サテライト III の研究より。

ストレスにより一時的な核ストレスボディ(nSB)と呼ばれる核内構造を引き起こす。核ストレスボディはサテライト III DNA を含む特異的なセントロメア周辺ヘテロクロマチンドメインで形成される。ストレス応答でのこれらのドメインは、そのエピジェネティックな状態をヘテロクロマチンからユークロマチンに変え nSB と結合したままポリ A 化 RNA に転写される。(05/10/21 勉強会)

- ・ Ura4 変異の研究より。

Rdp1 Dicer などの遺伝子変異株を作製。それぞれの変異によって転写抑制が解除されることがわかった。この時、反復配列の相補鎖からそれぞれの RNA が転写されることも示された。クロマチンの H3K9 メチルが低下し、H3K4 メチルが上昇する。(クロマチンと遺伝子機能制御 P64、65、66)

- ・ 反復配列がすべてヘテロクロマチンを形成するわけではない。(クロマチンと遺伝子機能制御)

- ・ H3K4 のメチル化、H4K16 のアセチル化がユークロマチンの形成の原

因か結果かは明らかでないが、ユークロマチン状態の維持に働いていることは十分に考えられる。(クロマチンと遺伝子機能制御 P 66)

- ・ セントロメア周辺ヘテロクロマチンの抑制に関わる RNA はセントロメアコアから離れた場所にある。
- ・ 5azadC 処理で脱メチル化されやすい配列とされにくい配列がある。(エピジェネティクス p 199)
- ・ トランスポゾンの再活性化。Spm 転移酵素である TnpA の話。単一プロモーターから転写され選択的スプライシングにより形成される mRNA にコードされる。これ自体をコードする遺伝子の転写制御と DNA メチル化解除が関連している。TnpA 発現系を導入したタバコ培養細胞では Spm プロモーターと下流調節領域メチル化解除が再現されている。TnpA がメチル化解除に関わるタンパク質を直接あるいは間接的にプロモーターと下流領域に呼び込むモデルが提唱されている。(エピジェネティクス p 169)
- ・ 植物ホルモンのカスケードにおいても上記と同様の機構がある。詳しく理解できていないが、おそらくホルモンが受容体に結合しシグナルが出てある遺伝子が発現し、それがプロモーター領域に結合してまた別の遺伝子発現を促し、スプライシングバリエーションができる。それがさらに新たなプロモーターに結合し情報を伝えるという miRNA を介した発現制御の話。

植物の場合は RNA 依存性 DNA メチル化があるようにヒストンを介さずに直接制御するものもあるが、マウスなど哺乳類ではこの機構にさらにヒストンやタンパクによる制御を含んでいるようである。植物の例がそのまま当てはまるわけではないが、トランスポゾンの再活性化によりその他の領域の発現解除が起こる可能性は十分考えられる。このことが修飾ヒストン diMeK4H3 または AcH の蓄積と関係があるのかは定かではない。今回、竹林（先輩）の考察にあるように AcH のみならず diMeK4H3 も同様の局在変化を示すことがわかった。5azadC による異常な相互作用がどれほど影響するのかわからないが、おそらくユークロマチン領域に存在する修飾ヒストンはヘテロクロマチン領域に凝集する傾向があるらしい。

挿絵の紹介

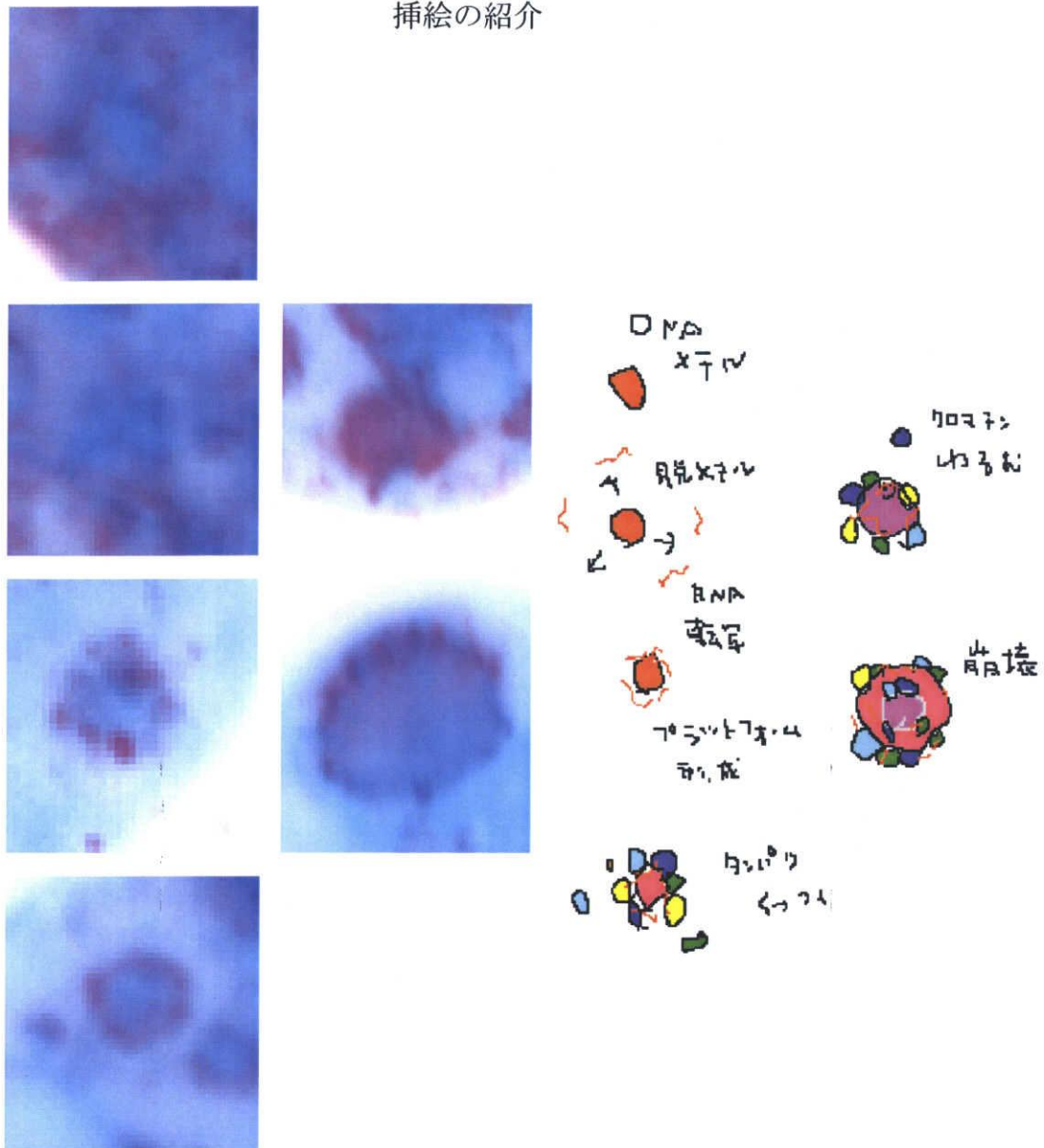


図 36 5azadC 処理時間経過による修飾ヒストンの凝集・蓄積と局在の変化(リングの形成と拡大)

左：コントロール、5azdC 処理 12 時間、24 時間、48 時間

紫：diMeK4H3 または AcH 修飾ヒストン、DAPI スポットにみられるリングを拡大したもの、水色：DAPI 染色

右：予想モデル図

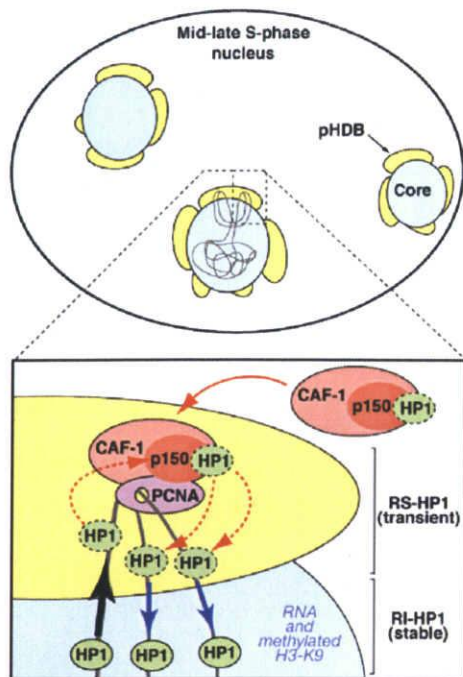


図 37 クロマチンリモデリング因子 CAF1 による複製依存的なヘテロクロマチンへの HP1 の再分配モデル。DAPI で濃染されるヘテロクロマチンの外周で CAF1、PCNA がリング状に観察される。水色の領域は RNA と H3K9me によりヘテロクロマチンが安定化している。

Rnase 処理により崩壊する。(それぞれのタンパクの結合が外れる)

このことから RNA がタンパク結合の足場を作っていると考えられる。(Quivy JP 2004 EMBO)

図 38 上：セントロメアコアから離れた領域から転写された RNA がセントロメアのサイレンシングに関わるモデル図。(この RNA は宿主の都合で働いている RNA。トランスポゾン由来の RNA を宿主が逆手にとって利用している例)

下：セントロメア周辺から転写された RNA がセントロメアの崩壊に関わる予想モデル図。

(セントロメア RNA はウイルス由来の働きをしているのでは？ヘテロ凝縮して閉じ込められているトランスポゾン由来のリピー特解除に働いているのではないだろうか。)

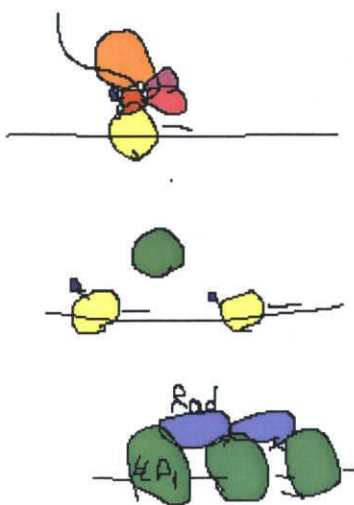
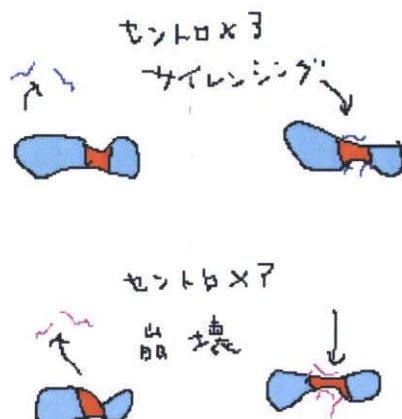


図 39 siRNA によって引き起こされるセントロメアヘテロクロマチン形成モデル

黄色：ヒストン DNA がまきつくタンパク質

小さい青の丸：H3K9me ヘテロクロマチンに存在するヒストン修飾、赤：Chp1 H3K9me を認識して結合、マゼンタ：Ago1 siRNA を含み特定の DNA 配列に結合、オレンジ：哺乳類では不確定？

緑：HP1 二量体を形成しており H3K9me と結合することでヘテロクロマチンをループ状に凝縮させアセンブリーを作る。よってセントロメア DNA は 3 重鎖。青：Rad 姉妹染色分体の結合因子。

ヘテロクロマチン形成における RNA→ヒストン→DNA メチル化

制御モデル図

ドア：遺伝子領域（ノンコーディング領域の場合もあり）

1. 転写された RNA がどの遺伝子の発現制御を行うか指示
 2. 酵素（HMT suv39h Clu4 など）によるヒストン修飾
 3. ヒストン修飾と協調的に働く Dnmt により DNA がメチル化される。
- このような遺伝子の発現抑制が行われている。



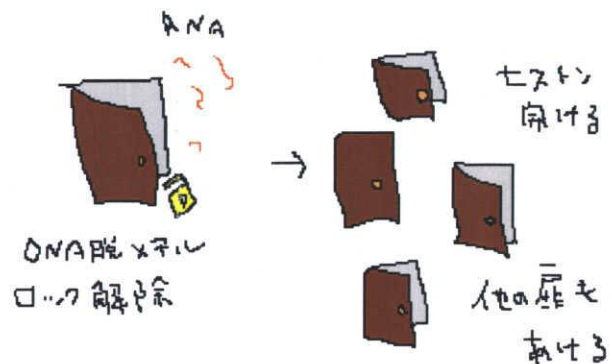
新仮説

RNA による転写誘導

DNA 脱メチル化→RNA→ヒストン

制御モデル図

1. DNA メチル化解除により RNA の転写が起きる
2. 他の領域のヒストン修飾変換



という予想。

もしくは転写された RNA が拮抗阻害（競合？）となってヘテロクロマチンを形成する siRNA を阻害するのか。（Major over expression の論文 B4 伊藤くん紹介より）

では AcH などの修飾ヒストン凝集の意味は？

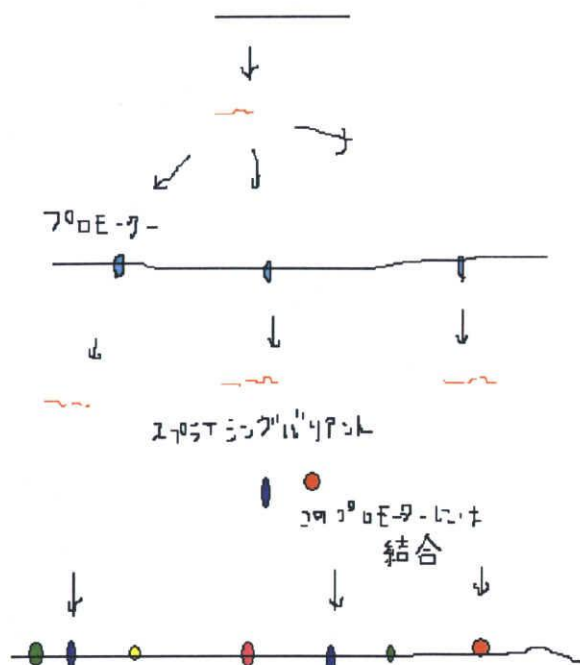


図 39 植物ホルモンにおける遺伝子発現制御のカスケードモデル

転写された RNA が特定のプロモーター領域を認識して下流域の遺伝子発現を制御する。スプライシングバリエーション、プロモーターの特異性から状況に合わせ制御されている。

ユークロマチン領域に存在する修飾ヒストンがヘテロクロマチン領域に凝集するというのは結果か原因かという、結果でもあり原因でもあるのではないだろうか。ヘテロクロマチンは崩壊しながら次々と転写抑制が解除されているようだ。

それぞれの変化が現れる順にまとめると、複製タイミングパターンⅡで DNA に 5azadC が取り込まれる。Dnmt1 を阻害して新生鎖がメチルされない。RNA の転写が起こる。ユークロマチン領域のヒストン修飾の局在が変化する。DAPI で濃染されるヘテロクロマチンの局在が変化する。

●あとなぎ

RNA ワールドを起源とするウイルス由来の経路が進化することによって、現在の様々な種のゲノムシステムが出来上がったと考えられる。ウイルス由来のトランスポゾン は生命の進化を飛躍的に加速させた。セントロメアはウイルス由来の配列を利用したゲノムシステムと言える。内在性 siRNA により DNA のメチル化やヒストン修飾が配列特異的に誘導され様々なタンパク質を呼び込んでアッセンプリーを形成することでゲノムの機能を果たしていると考えられる。

エピジェネティック修飾変換のインデューサーとして、モルフォゲン、ホルモン、代謝産物、シグナル伝達物質、薬剤、レクチン、酸化ストレス、熱ストレス、RNA など様々な要素があり今後、発生・分化、環境応答における制御機構が明らかになるだろう。この研究を通して、先人の言う 'seeing is believing' を実感した。定量的解析に比べ定性的な解析は発見が多い。高感度 CCD カメラと FISH による詳細な核内構造の解析は、新しい未来を開くかもしれない。

顕微鏡の向こう側は小宇宙である。

参考文献

Ai Leen Lam, Christopher D. Boivin, Caitlin F. Bonney, M. Katharine Rudd, and Beth A. Sullivan(2006)

Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA. PNAS 2006 March 14; 103(11): 4186–4191

Alessandro Brero, Hariharan P. Easwaran, Danny Nowak, Ingrid Grunewald, Thomas Cremer, Heinrich Leonhardt, and M. Cristina Cardoso (2005)

Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation. JCB, Volume 169, Number 5, 733-743

Amy E. Pasquinelli, Brenda J. Reinhart, Frank Slack, Mark Q. Martindale, Mitzi I. Kuroda, Betsy Maller, David C. Hayward, Eldon E. Ball, Bernard Degnan, Peter Müller, Jürg Spring, Ashok Srinivasan, Mark Fishman, John Finnerty, Joseph Corbo, Michael Levine, Patrick Leahy, Eric Davidson and Gary Ruvkun(2000).

Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature 408, 86-89(2 November 2000)

André Verdel, Songtao Jia, Scott Gerber, Tomoyasu Sugiyama, Steven Gygi, Shiv I. S. Grewal, Danesh Moazed(2004)

RNAi-Mediated Targeting of Heterochromatin by the RITS Complex.
Science 30 January 2004:Vol. 303. no. 5658, pp. 672 – 676

Andrew J. Bannister and Tony Kouzarides. (2005)

Reversing histone methylation. Nature 436, 1103-1106 (25 August 2005)

Brian E. Schwartz and Kami Ahmad(2005)

Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3.
Genes & Development 19:804-814, 2005

Chryssa Kanellopoulou, Stefan A. Muljo, Andrew L. Kung, Shridar Ganesan, Ronny Drapkin, Thomas Jenuwein, David M. Livingston and Klaus Rajewsky(2005)

Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. Genes& Development 19:489-501, 2005

Emmanuelle Viré, Carmen Brenner, Rachel Deplus, Loïc Blanchon, Mario Fraga, Céline Didelot, Lluís Morey, Aleyde Van Eynde, David Bernard, Jean-Marie Vanderwinden, Mathieu Bollen, Manel Esteller, Luciano Di Croce, Yvan de Launoit and François Fuks(2006)

The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation.

Nature 439, 871-874(16 February 2006)

Gabriel D. Hayes, Alison R. Frand and Gary Ruvkun(2006)

The mir-84 and let-7 paralogous microRNA genes of *Caenorhabditis elegans* direct the cessation of molting via the conserved nuclear hormone receptors NHR-23 and NHR-25.

Development 133, 4631-4641 (2006)

Gunter Meister, Markus Landthaler, Yair Dorsett, and Thomas Tuschl(2006)

Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing RNA.

2004 March; 10(3): 544–550.

György Hutvágner, Martin J Simard, Craig C Mello, and Phillip D Zamore. (2004)

Sequence-Specific Inhibition of Small RNA Function1: PLoS Biol. 2004 Apr;2(4): E98.

Hariharan P Easwaran, Lothar Schermelleh, Heinrich Leonhardt, and M Cristina Cardoso(2004)

Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases.

EMBO Rep. 2004 December; 5(12): 1181–1186.

Ikuhiro Okamoto, Danielle Arnaud, Patricia Le Baccon, Arie P. Otte, Christine M. Disteche, Philip Avner and Edith Heard(2005)

Evidence for de novo imprinted X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice.

Nature 438, 369-373(17 November 2005)

Ilya Shamovsky, Maxim Ivannikov, Eugene S. Kandel, David Gershon and Evgeny Nudler(2005)

RNA-mediated response to heat shock in mammalian cells. Nature 440, 556-560(23 March 2006)

Jean-Pierre Quivy, Danièle Roche, Doris Kirschner, Hideaki Tagami, Yoshihiro Nakatani, and Geneviève Almouzni(2004)

A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication.

EMBO J. 2004 September 1; 23(17): 3516–3526.

Julien Dubrulle & Olivier Pourquie(2004)

fgf8 mRNA decay establishes a gradient that couples axial elongation to patterning in the vertebrate embryo.

Nature 427, 419-422(29 January 2004)

Jürg Müller, Craig M. Hart, Nicole J. Francis, Marcus L. Vargas, Aditya Sengupta, Brigitte Wild, Ellen L. Miller, Michael B. O'Connor, Robert E. Kingston and Jeffrey A. Simon(2002)

Histone Methyltransferase Activity of a Drosophila Polycomb Group Repressor Complex.

1: Cell. 2002 Oct 18;111(2):197-208

Kannanganattu V. Prasanth, Supriya G. Prasanth, Zhenyu Xuan, Stephen Hearn, Susan M. Freier, C. Frank Bennett, Michael Q. Zhang and David L. Spector(2005)

Regulating Gene Expression through RNA Nuclear Retention.

Volume 123, Issue 2 , 21 October 2005, Pages 249-263 Cell

Kathrin Muegge(2005)

Lsh, a guardian of heterochromatin at repeat elements.

Biochemistry and Cell Biology 83 pp 548-554

M. F. Mette, A. J. M. Matzke and M. A. Matzke(2001)

Resistance of RNA-mediated TGS to HC-Pro, a viral suppressor of PTGS, suggests alternative pathways for dsRNA processing.

Current Biology Volume 11, Issue 14 , 24 July 2001, Pages 1119-1123

Mani Larijani, Darina Frieder, Timothy M. Sonbuchner, Ronda Bransteitter, Myron F. Goodman, Eric E. Bouhassira, Matthew D. Scharff and Alberto Martin(2005)

Methylation protects cytidines from AID-mediated deamination.

Molecular Immunology Volume 42, Issue 5 , March 2005, Pages 599-604

Manika Pal-Bhadra, Utpal Bhadra and James A. Birchler(2002)

RNAi Related Mechanisms Affect Both Transcriptional and Posttranscriptional Transgene Silencing in Drosophila.

Molecular Cell, Vol. 9, 315–327, February, 2002, Copyright 2002 by Cell Press

Michael D. Blower, Maxence Nachury, Rebecca Heald^a and Karsten Weis,(2005)
A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly.¹
Cell. 2005 Apr 22;121(2):223-34.

Michael F. Dion, Steven J. Altschuler, Lani F. Wu, and Oliver J. Rando(2005)
Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code.
PNAS 2005 April 12; 102(15): 5501–5506.

Naoki Aono¹, Tan Inoue and Hideaki Shiraishi(2005)
Genes Specifically Expressed in Sexually Differentiated Female Spheroids of *Volvox carteri*J.
Biochem. 138, 375–382 (2005)

Natalia Ivanova, Radu Dobrin, Rong Lu, Iulia Kotenko, John LeVorse, Christina DeCoste,
Xenia Schafer, Yi Lun and Ihor R. Lemischka(2006)
Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference.
Nature 442, 533-538 (3 August 2006)

Peter B. Becker (2006)
A finger on the mark.
Nature 442, 31 - 32 (2006).news&views

Petra Hajkova^a, Sylvia Erhardt^b, Natasha Lanec, Thomas Haaf^d, Osman El-Maarrie, Wolf
Reik^c, Jo^orn Waltera, M. Azim Surani(2002)
Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells Mechanisms of Development
117 (2002) 15–23

Pierre-Olivier Estève, Hang Gyeong Chin, Andrea Smallwood, George R. Feehery,
Omkaram Gangisetty, Adam R. Karpf, Michael F. Carey, and Sriharsa Pradhan(2006)
Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation
during replication.
Genes & Development 20:3089-3103, 2006

Ronald Berezney, Kishore S. Malyavanthama, Artem Plissa, Sambit Bhattacharyab and
Raj Acharya.(2005)
Spatio-temporal dynamics of genomic organization and function in the mammalian cell nucleus.

Ronald Berezney , Kishore S. Malyavanthama, Artem Plissa, Sambit Bhattacharyab
and Raj Acharya. (2005)

Spatio-temporal dynamics of genomic organization and function in the mammalian cell nucleus.
J Cell Biochem. Volume 45, Issue 1 , 2005, Pages 17-26

†Rong Wu, Anna V. Terry, Prim B. Singh , and David M. Gilbert(2005)

Differential Subnuclear Localization and Replication Timing of Histone H3 Lysine 9 Methylation States.
Vol. 16, Issue 6, 2872-2881, June 2005 MBC

Rut Valgardsdottir, Ilaria Chiodi, Manuela Giordano, Fabio Cobianchi, Silvano Riva,
and Giuseppe Biamonti(2005)

Structural and Functional Characterization of Noncoding Repetitive RNAs
Transcribed in Stressed Human Cells. Vol. 16, Issue 6, 2597-2604, June 2005

S. D. Hatfield , H. R. Shcherbata , K. A. Fischer , K. Nakahara , R. W. Carthew
and H. Ruohola-Baker.(2005)

Stem cell division is regulated by the microRNA pathway.
Nature. 2005 Jun 16;435(7044):974-8.

Shireen A. Sarraf and Irina Stancheva(2004)

Methyl-CpG Binding Protein MBD1 Couples Histone H3 Methylation at Lysine 9 by SETDB1
to DNA Replication and Chromatin Assembly.

Volume 15, Issue 4 , 27 August 2004, Pages 595-605 Molecular Cell

Susana Gonzalo, Isabel Jaco, Mario F. Fraga, Taiping Chen, En Li, Manel Esteller & María A.
Blasco(2006)

DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells.
Nature Cell Biology - 8, 416 - 424 (2006) Published online: 26 March 2006;

Taiping Chen, Yoshihide Ueda, Jonathan E. Dodge, Zhenjuan Wang, and En Li(2003)
Establishment and Maintenance of Genomic Methylation Patterns in Mouse Embryonic
Stem Cells by Dnmt3a and Dnmt3b.

Molecular and Cellular Biology, August 2003, p. 5594-5605, Vol. 23, No. 16

Thomas A. Volpe, Catherine Kidner, Ira M. Hall, Grace Teng, Shiv I. S. Grewal, Robert A. Martienssen (2002)

Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi.
Science 13 September 2002:Vol. 297. no. 5588, pp. 1833 – 1837

Ulf Dühring, Ilka M. Axmann, Wolfgang R. Hess, and Annegret Wilde.(2006)

An internal antisense RNA regulates expression of the photosynthesis gene *isiA*.
7054–7058 PNAS May 2, 2006 vol. 103 no. 18

Wade Winkler, Ali Nahvi and Ronald R. Breaker(2002)

Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression.
Nature 419, 952-956(31 October 2002)

†Yinghong Ma, Stephanie B. Jacobs, Laurie Jackson-Grusby, Mary-Ann Mastrangelo,
José A. Torres-Betancourt, Rudolf Jaenisch and Theodore P. Rasmussen(2005)

DNA CpG hypomethylation induces heterochromatin reorganization involving the histone
variant macroH2A.

Journal of Cell Science 118, 1607-1616 (2005)

堀越正美 編「クロマチンと遺伝子機能制御」シュプリンガー・フェアラーク
東京 2 0 0 3

佐々木裕之 編「エピジェネティクス」シュプリンガー・フェアラーク東京 2
0 0 4

Gregory J,Hannon 編 中村義一 監修「RNAi」メディカル・サイエンス・
インターナショナル 2 0 0 4

竹安邦夫・米田悦啓 編「細胞核のダイナミクス」シュプリンガー・フェアラ
ーク東京 2 0 0 4

T.A Brown 編 「ゲノム 2」メディカル・サイエンス・インターナショナル
2 0 0 3

竹林慎一郎（２０００）「哺乳類染色体DNAの複製とその制御機構に関する研究」博士論文

杉村和人（２００４）「哺乳類ゲノム複製機序とその破綻により働く機能的複製制御機構に関する研究」修士論文

福島義之（２００５）「マウスセントロメアヘテロクロマチン領域におけるDNA複製のエピジェネティックな制御に関する研究」修士論文

石田素子（２００６）「マウスセントロメアヘテロクロマチン領域におけるDNA複製依存的クロマチン再編成」修士論文

謝辞

本研究をすすめるにあたり、終始御指導を賜りました分子細胞学研究室教授 奥村 克純先生に誠に深く感謝申し上げます。

また、研究方針や実験結果について適切な御指導、御助言を賜りました分子細胞生物学研究室教授 田口 寛先生に深く感謝申し上げます。

そして、有益な御助言、指導を賜りました分子細胞学研究室助手 緒方 進先生、貴重な実験材料を提供していただき、実験方法について御指導賜りました遺伝子実験施設助手 加賀谷 安章先生に深く感謝申し上げます。

直接御指導頂き、御助言を賜りました分子細胞生物学研究室 杉村 和人先輩に深く感謝申し上げます。

最後に、研究室生活においていろいろな面で至らない点の多い私を支えて頂いた分子細胞学研究室の皆様には深く感謝申し上げます。