



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（理学）
報告番号	乙第1881号
学位記番号	論 第12号
氏 名	川口 隆之
授与年月日	平成 29 年 7 月 27 日
学位論文の題名	ヒストンメチル化修飾によるエピジェネティック制御機構の解明 Elucidating the mechanisms underlying epigenetic gene regulation mediated by histone methylation
論文審査担当者	主査： 田上英明 副査： 奥津光晴，中山潤一，大隅圭太

名古屋市立大学 博士学位論文

ヒストンメチル化修飾による
エピジェネティック制御機構の解明

2017 年

川口隆之

名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科

要旨	1
第一章 序論	4
第二章 ヘテロクロマチン形成における Suv39h1 のクロモドメインの 核酸結合能の解析	8
2-1 緒言	9
2-2 実験方法	11
2-2-1 プラスミドの作製	11
2-2-2 レトロウイルス感染細胞	11
2-2-3 リコンビナントタンパク質の発現	11
2-2-4 GST 融合タンパク質の精製	11
2-2-5 Electrophoretic mobility-shift assays (EMSAs)	11
2-2-6 RNA 免疫沈降法	12
2-2-7 ドットブロット	13
2-2-8 クロマチン分画	13
2-2-9 FRAP 解析	13
2-2-10 使用した抗体	14
2-3 結果	15
2-3-1 Suv39h1-CD の核酸結合能の解析	15
2-3-2 Suv39h1-CD の核酸結合に重要なアミノ酸残基の同定	15
2-3-3 Suv39h1 の核酸結合能の細胞内での機能解析	18
2-3-4 Suv39h1 の核酸結合能の細胞内での解析	19
2-3-5 Suv39h1-CD の核酸及び H3K9me3 結合能のヘテロクロマチン結合に おける役割の解析	22
2-3-6 Major satellite RNA のノックダウン細胞による Suv39h1 の局在へ の影響	24
2-4 考察	26
2-5 参考文献	28
第三章 CBX2 の翻訳後修飾によるクロマチン結合の解析	31

3-1 緒言	32
3-2 実験方法	34
3-2-1 プラスミドの作製	34
3-2-2 リコンビナントタンパク質の発現	34
3-2-3 GST 融合タンパク質の精製	34
3-2-4 Electrophoretic mobility-shift assays (EMSAs)	34
3-2-5 細胞培養の条件とトランスフェクション方法	34
3-2-6 細胞からの RNA 抽出方法と定量リアルタイム PCR	35
3-2-7 使用した抗体	35
3-2-8 リン酸化アッセイ	35
3-2-9 ペプチドプルダウンアッセイ	36
3-2-10 ヌクレオソームプルダウンアッセイ	36
3-3 結果	38
3-3-1 ヒトの細胞内におけるリン酸化状態の解析	38
3-3-2 SR 領域のリン酸化酵素の同定	40
3-3-3 SR 領域のリン酸化による H3K27me3 結合の影響	40
3-3-4 AT-hook ドメインの核酸結合能の解析	43
3-3-5 リン酸化 CBX2 の生理学的役割の解析	45
3-4 考察	48
3-5 参考文献	50
第四章 結論	55
研究業績	59
謝辞	61

要旨

近年、DNA の一次配列だけでは説明できないエピジェネティクスという遺伝子の発現制御機構が注目されている。エピジェネティクスでは、DNA のメチル化、ヒストンの化学修飾、ノンコーディング RNA などとその制御に関与していることが知られている。

真核生物の細胞内において、DNA はヒストン H2A、H2B、H3、H4 それぞれ二分子から形成される八量体と結合し、ヌクレオソームという基本単位を構築している。このヌクレオソームはさらに非ヒストンタンパク質と共にクロマチンという分子複合体を形成している。クロマチンは、高度に凝縮され、遺伝子発現が抑制されたヘテロクロマチンと、構造が弛緩し、遺伝子発現が活発なユークロマチンに大別できる。ヘテロクロマチンはさらに、恒常的に凝縮されている構成的ヘテロクロマチンと、発生段階で形成される条件的ヘテロクロマチンに分けられる。構成的及び条件的ヘテロクロマチンの形成には、それぞれヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K9me3) と、27 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K27me3) が重要な役割を果たしている。これらのメチル化されたヒストンは、クロモドメイン (CD) と呼ばれる進化的に良く保存されたドメインを持つタンパク質によって認識され、その結合によって高次クロマチン構造が形成される。このように、クロマチン構造をダイナミックに変化させ、遺伝子発現を制御しているヒストンのメチル化修飾は、エピジェネティックな制御機構の代表例だと言える。

最近の研究結果から、一部の CD はメチル化ヒストンに加えて核酸への結合能を持ち、この核酸結合がヘテロクロマチン形成における CD タンパク質の機能に重要であることが示唆されている。しかし、核酸結合能がどのように CD の機能と共役しているのか、その分子機構の実体には不明な点が多く残されている。そこで本研究は、哺乳類 CD タンパク質である Suv39h1 と CBX2 に着目し、それぞれの核酸結合能の有無、またヘテロクロマチン形成における核酸結合能の役割を解明することを目的とした。

セントロメア近傍領域の構成的ヘテロクロマチンの形成には、H3K9 のメチル化酵素である Suv39h1 が必須である。Suv39h1 の CD が H3K9me3 に結合することは報告されているが、Suv39h1 がどのように標的クロマチン領域を認識するのかなど、Suv39h1 によるヘテロクロマチン形成機構は不明な点が多く残されている。

そこで本研究ではまず、Suv39h1 の CD (Suv39h1-CD) の核酸結合能に着目して解析を行った。その結果、Suv39h1-CD が強い核酸結合能を持つこと、さらに二本鎖 DNA に比べて一本鎖 RNA に対して高いアフィニティーで結合することを見出した。また、Suv39h1-CD の変異体による解析から、C 末端側の α ヘリックスの中の塩基性アミノ酸が Suv39h1-CD の核酸結合に関与していることを明らかにした。細胞を用いた解析から、Suv39h1 が実際に CD を介してセントロメア近傍から発現している major satellite RNA と結合することを見出した。さらに細胞内での Suv39h1 の機能解析を行ったところ、RNA 及び H3K9me3 との結合がセントロメア近傍領域への自身のターゲティング、および特定のクロマチン領域への安定的な結合に重要な役割を果たすことが明らかになった。これらの結果から、Suv39h1 によるヘテロクロマチン形成に、Suv39h1-CD を介した RNA との結合が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

発生段階で形成される条件的ヘテロクロマチンの特徴である H3K27me3 修飾は、CBX ファミリーと呼ばれる CD タンパク質に認識され、この結合が中心的な役割を果たして条件的ヘテロクロマチンが形成される。CBX ファミリーに属する CBX2 は、哺乳類の初期発生や性分化などに関与する遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしている。また、CBX2 はマウスの組織や細胞株でリン酸化されていること、AT-hook (AT) という特徴的な DNA 結合ドメインが CBX2 のクロマチン結合に関与することが報告されているが、それらの機能的な関連については未だ不明な点が多い。本研究では、CBX2 の標的クロマチン部位への結合に核酸結合能と翻訳後修飾がどのように関わるのか、その分子機能の解明を目指した。

ヒトの CBX のクロマチン結合の分子メカニズムを解析するために、まず HEK293T 細胞で CBX2 のリン酸化状態を解析した。その結果、CBX2 は細胞内でリン酸化されており、その主なリン酸化部位は AT 近傍のセリンリッチ (SR) 領域であること、そしてリン酸化酵素のカゼインキナーゼII (CK2) が SR 領域を *in vitro* でリン酸化できることを見出した。次に CBX2 のリン酸化が H3K27me3 結合に与える影響について解析を遂行したところ、SR 領域のリン酸化が H3K27me3 ペプチド及びヌクレオソームへの結合特異性を高めることが明らかになった。次に CBX2 の核酸結合能を解析したところ、AT が強い DNA 結合能を有すること、さらに SR 領域のリン酸化によってこの核酸結合能が阻害されることを見出した。これらの結果より、CK2 による SR 領域のリン酸化が CBX2 の H3K27me3 の結合を強め、さらに DNA の結合を阻害することによって H3K27me3 ヌクレオソームへの

結合特異性を高めていることが示唆された。次に、CBX2 のリン酸化の細胞内での生理的役割の知見を得るため、CBX2 をノックダウンした HEK293T 細胞に、野生型及びリン酸化部位欠損型 CBX2 を発現させ、CBX2 の標的遺伝子の発現状態を評価する、機能回復（レスキュー）実験を行った。その結果、野生型 CBX2 は標的遺伝子を抑制できるのに対し、リン酸化部位を欠損させた CBX2 は、標的遺伝子の発現を抑制できないことが明らかになった。これらの結果から、CBX2 の SR 領域のリン酸化が標的遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

CD タンパク質によるメチル化ヒストンの認識はこれまでに多く研究されてきたが、CD タンパク質によるクロマチン結合の分子機構には依然不明な点が多く残されている。今後、本研究のように CD タンパク質の核酸結合や翻訳後修飾を検討することが、ヘテロクロマチン形成の分子機構をさらに理解する上で重要であると考えられる。

第一章 序論

真核生物では、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 それぞれ二分子ずつで構成される八量体にゲノム DNA が巻き付いて、ヌクレオソームと呼ばれる構成単位を構築している。ヌクレオソームは様々なタンパク質と結合し、クロマチンという構造を形成している。クロマチンは、凝縮度が高く転写が抑制されているヘテロクロマチンと、遺伝子の発現が活発であり凝縮度が比較的低いユークロマチンに大別される。ヘテロクロマチンはさらに 2 種類に大別することができる。1 つは主にセントロメア近傍やテロメア領域に形成され、細胞周期を通して恒常的に凝縮している構成的ヘテロクロマチンである。この領域には繰り返し配列やトランスポゾン配列が存在しており、ヘテロクロマチンはこれらの発現の抑制に寄与している。構成的ヘテロクロマチンの機能は転写抑制だけでなく、減数分裂期の染色体分配やゲノムの安定性におけるセントロメア近傍領域の機能にも重要な役割を果たしている (Allshire *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 2001)。もう 1 つは発生や分化段階で凝縮構造を形成する条件的ヘテロクロマチンである。この条件的ヘテロクロマチンは発生時期や組織特異的に可逆的に形成され、特定の遺伝子の発現を制御している。近年このように、DNA の塩基配列の変化を伴わずにクロマチンの構造を変化させることによって遺伝子の発現を制御するメカニズムのエピジェネティクスが注目されている。これまでにエピジェネティックな遺伝子発現制御には、ヒストンの化学修飾、DNA のメチル化、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA などが重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

クロマチン構造の変化にはヒストンの化学修飾が重要な役割を果たしている。ヒストンはアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化などの翻訳後化学修飾を受ける。さらにこのようなヒストンの化学修飾はクロマチン構造をダイナミックに変化させて、遺伝子発現、DNA 複製、DNA 修復などの過程を制御していることが明らかになってきている。ヘテロクロマチン構造の形成にはヒストン H3 のリジン残基のメチル化が重要な役割を果たしている。上述した構成的ヘテロクロマチン領域では、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化 (H3K9me3) が重要なマークとして働いている。さらに、クロモドメイン (CD) という進化的に良く保存されたドメインを持つヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) が CD を介してこの H3K9me3 に結合することで、抑制的な高次のクロマチン構造が形成される (Nakayama *et al.*, 2001)。H3K9 をメチル化する酵素として哺乳類では Suv39h1 及び Suv39h2 が同定され、またセントロメア近傍の H3K9

をメチル化する構成的ヘテロクロマチンの重要な因子であることが明らかにされた(Rea *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2003)。事実、Suv39h 欠損細胞ではセントロメア近傍の H3K9me3 は完全に消失し、HP1 の蓄積も消失することが明らかにされており、Suv39h は構成的ヘテロクロマチン形成に必須の因子だと考えられている(Lachner *et al.*, 2001)。

一方、条件的ヘテロクロマチン領域では、ポリコームと呼ばれるタンパク質が重要な役割を果たしている。ポリコームタンパク質の一つである Pc は、ショウジョウバエの発生段階で体の前後軸や体節を決定するホメオティック遺伝子の発現を抑制する因子として同定された(Di Croce and Helin, 2013; Muller *et al.*, 1995)。その後の解析により、ポリコームタンパク質が様々な現象において遺伝子発現を抑制する役割を果たしていることが明らかにされた(Di Croce and Helin, 2013; Muller *et al.*, 1995; Simon and Kingston, 2013)。また、生化学的解析によりポリコームタンパク質は、ポリコーム抑制タンパク質複合体 1 (PRC1)、2 (PRC2) に分けられることが明らかにされている(Aranda *et al.*, 2015; Czermin *et al.*, 2002; Francis *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2002; Shao *et al.*, 1999; Simon and Kingston, 2013)。哺乳類では、PRC2 の構成因子である EZH2 がヒストン H3 の 27 番目のリジン残基をメチル化 (H3K27me3) し、さらに PRC1 に含まれる Chromobox (CBX) ファミリータンパク質が CD を介してこの H3K27me3 に結合し、PRC1 複合体全体をリクルートすることで凝縮したヘテロクロマチン構造が形成され则认为られている(Cao *et al.*, 2002; Kaustov *et al.*, 2011; Min *et al.*, 2003; Shao *et al.*, 1999)。

CBX ファミリーの中の CBX2 (M33) は、体軸形成を制御するショウジョウバエの Pc の相同因子として同定された (Di Croce and Helin, 2013; Muller *et al.*, 1995)。その後、哺乳類では CBX ファミリーとして CBX2、4、6、7、8 が存在することが明らかになった(Muller *et al.*, 1995; Senthilkumar and Mishra, 2009)。これら CBX タンパク質は、N 末端側に H3K27me3 の結合に関わる CD と、C 末端側にクロマチンの凝縮に関わる Polycomb repressor box (Pcbox) を共通して持っている(Muller *et al.*, 1995; Senthilkumar and Mishra, 2009)。さらに最近の研究結果より、CBX2 に特徴的に見出される AT-hook (AT) ドメインが、CBX2 の標的クロマチン領域への結合に関与していることが示唆されている (Tardat *et al.*, 2015; Zhen *et al.*, 2014)。

分裂酵母を用いた近年の研究成果から、RNAi 機構が構成的ヘテロクロマチン

形成に重要であることが報告されている (Castel and Martienssen, 2013; Goto and Nakayama, 2012; Grewal and Jia, 2007; Moazed, 2009)。さらに中山研究室 (以下、当研究室) の過去の研究から、分裂酵母の RNAi 経路で中心的な役割を果たす Chp1 の CD がメチル化ヒストンに加えて核酸への結合能を持ち、この核酸結合との共役がヘテロクロマチン形成に重要であることが明らかにされている (Ishida *et al.*, 2012)。しかし、哺乳類ではヘテロクロマチン領域から転写される RNA が構成的ヘテロクロマチンの形成に関与しているかについては不明な点が多い。そもそも Suv39h がどのようにメチル化されていない特定の領域を認識し、メチル化するのか、その分子機構ですら未だに明らかにされていない。一方、条件的ヘテロクロマチン形成においても、CD タンパク質である CBX ファミリーの核酸結合能がその機能に重要なことが知られている。例えば、Cbx2 の AT がクロマチン結合に重要であること、また同じ CBX ファミリーの CBX7 の CD がメチル化ヒストンとの結合だけではなく核酸結合能を有し、両方が標的遺伝子領域への結合に重要であることが報告されている (Bernstein *et al.*, 2006; Yap *et al.*, 2010)。したがって、ヘテロクロマチン形成における CD タンパク質の機能を理解するためには、核酸結合能との関連を解析することが重要であると考えられる。本研究では、CD タンパク質であるマウス Suv39h1 とヒト CBX2 に着目し、それぞれの核酸結合能を中心に解析することによってヒストンのメチル化領域へのターゲティングの分子機構を解明することを目的とした。

第二章

ヘテロクロマチン形成における

Suv39h1 のクロモドメインの核酸結合能の解析

2-1 緒言

ヘテロクロマチンの形成はヒストンの化学修飾によって厳密に制御されている。Suv39h1 は H3K9 のメチル化酵素であり構成的ヘテロクロマチンの形成に必須である。Suv39h1 は機能的に二つの特徴的なドメインを持つ。一つは N 末端側にあるクロモドメイン (CD) であり、もう一つは C 末端側に存在し H3K9 をメチル化する酵素活性を担う SET ドメインである。CD は H3K9me3 と結合し、ヘテロクロマチン領域を効率的に広げ、H3K9me3 を維持していく役割を持つことが明らかになっている (Al-Sady *et al.*, 2013; Noma *et al.*, 2004; Ragunathan *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008) (図 2-1)。CD が H3K9 のトリメチル化されたクロマチン領域を標的とするのは容易に理解できるが、Suv39h1 がどのようにメチル化されていない特定のクロマチン領域を認識し、呼び込まれるのかは分かっていない。

セントロメア近傍に存在する、繰り返し配列である major satellite 領域には構成的ヘテロクロマチンが形成されている。さらに過去の報告として、major satellite 領域からはノンコーディング RNA が発現していることが明らかにされている (major satellite RNA) (Bulut-Karslioglu *et al.*, 2012)。興味深いことに、Suv39h 欠損細胞では major satellite RNA の発現が上昇することが明らかになっている。また、分裂酵母やショウジョウバエなどのモデル生物を用いた研究から、繰り返し配列の転写抑制に RNA 自身が重要な役割を果たしていることが報告されており (Ishida *et al.*, 2012)、Suv39h1 のクロマチン結合に major satellite RNA との相互作用が関与する可能性が考えられる。そこで本研究では、Suv39h1 の核酸結合能に着目し、標的領域へのターゲティング機構の解明を目指し解析を行った。

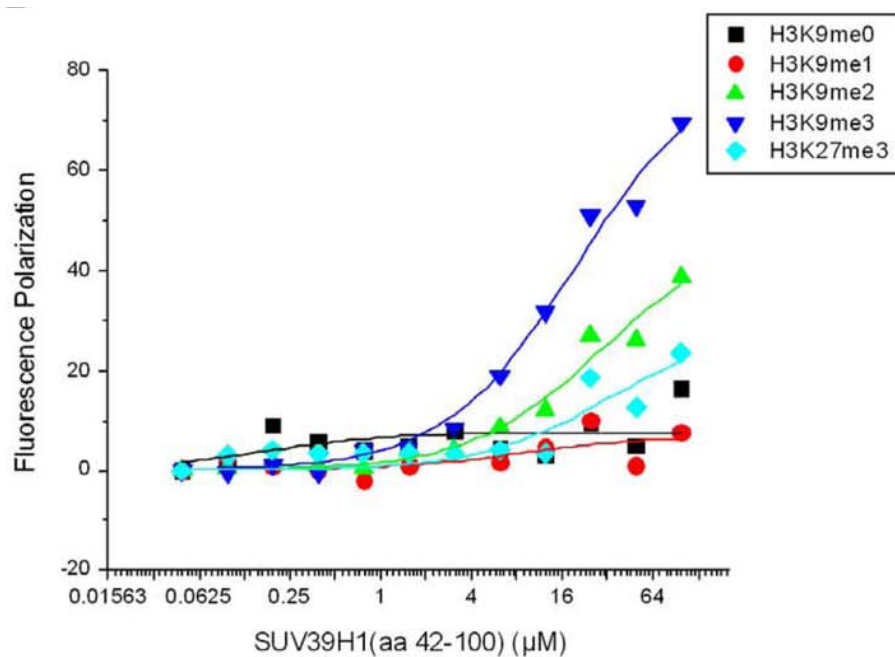
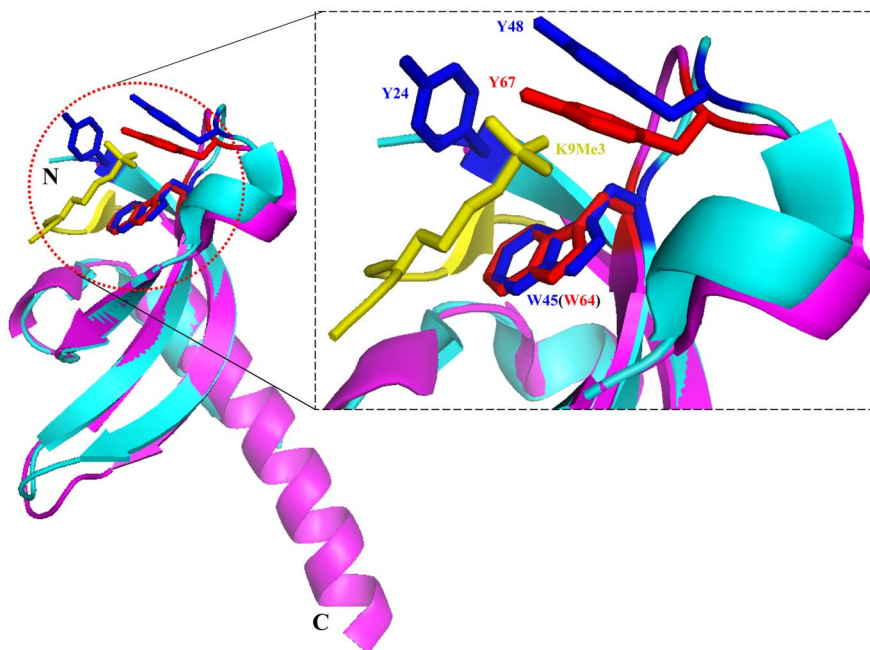


図 2-1 ヒトの SUV39H1 と H3K9me3 との結合

Wang らの論文 (PloS one, 7, e52977, 2012) の図を一部改変して引用。(上図) SUV39H1-CD と H3K9me3 ペプチドとの共結晶構造。(下図) 蛍光偏光法を用いた SUV39H1-CD とペプチドとの相互作用を計測したグラフ。

2-2 実験方法及び実験材料

2-2-1 プラスミドの作製

pCAG-IRES-Puro-FLAG-Suv39h1 (Muramatsu *et al.*, 2016) プラスミドを PCR で増幅し、マウスの Suv39h1 の全長 (1-412 aa) 及び CD (39-105 aa) を TOPO-TA cloning kit (Clontech) で pCRIIベクターにクローニングした。大腸菌でリコンビナントタンパク質を発現させるために、それぞれの Suv39h1 をコードする断片を pGEX-6P-3 (GE Healthcare) ベクターにそれぞれ組み込んだ。変異体作製にはプライマーに変異を入れ、PCR で増幅したものをクローニングし、使用した。

2-2-2 レトロウイルス感染細胞

レトロウイルス感染細胞は理化学研究所の眞貝研究室に作製していただいた。

2-2-3 リコンビナントタンパク質の発現

大腸菌を大量発現させるために、目的のプラスミドを BL21 (DE3) 株に導入し、抗生物質のアンプシリンを含んだ 2xYT プレートにまき、一晚培養した。生えてきたコロニーを 3 ml の 2xYT 培地で 2-3 時間培養し、その後 1 L の培地に加えた。GST 融合タンパク質の発現は、OD₆₀₀ 値が 0.5 になるまで 37°C で振盪培養した後、25°C まで冷やした。十分に温度が下がったのを確認した後に、最終濃度が 200 μ M になるようにイソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) を加えて 2 時間発現を誘導した。大腸菌を集菌し PBS で洗浄した後、-80°C で保存した。

2-2-4 GST 融合タンパク質の精製

保存していた大腸菌を融解し、PBS で懸濁した後に超音波破碎した。その後、10% Triton-X100 を終濃度 1% になるように加え、30 分間反応させた。Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を加えて 2 時間 4°C で反応させた後、PBS でビーズを洗浄したのち溶出バッファー (20 mM Tris [pH 8.0], 50 mM 還元型グルタチオン) で溶出した。溶出後のタンパク質はそれぞれ Source 15Q カラム (GE Healthcare) で精製した。

2-2-5 Electrophoretic mobility-shift assays (EMSAs)

EMSA は (Ishida *et al.*, 2012) らの方法に従った。PCR で増幅した major satellite 配列を二本鎖 DNA (dsDNA) プローブとして用いた。一本鎖 RNA (ssRNA)

プローブ (major satellite RNA) を作製するために、PCR で T7 プロモーター配列を含んだプライマーで配列を増幅した。T7 RNA polymerase (Toyobo) で RNA を転写させたのちに 0.5 × Tris-borate EDTA buffer (TBE)、7 M 尿素入りのポリアクリルアミドゲルで RNA を泳動し、BioMasher-I (Assist) によって RNA を抽出した。精製した dsDNA 及び ssRNA は 5' EndTag Nucleic Acid Labeling System (Vector Laboratories, Cat# MB-9001) 及び Fluorescein Maleimide (Vector Laboratories SP-1502) で蛍光標識をした。GST タンパク質と蛍光プローブは Binding buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 100 mM KCl, 0.01% NP-40, and 1 mM dithiothreitol [DTT], 4 U RNaseOUT [Invitrogen]) 中にて 30 分間氷上で反応させた。ペプチドを加えた EMSA は、GST タンパク質と蛍光プローブ及びペプチドを Binding buffer 中にて 30 分間氷上で反応させた。反応させたサンプルは 0.5 × TBE、5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行なった。蛍光プローブの検出には Typhoon 9400 (GE Healthcare) を用いた。非結合蛍光プローブの定量には ImageMaster 1D software を使用し、カーブフィッティングには Igor Pro software (WaveMetrics) を使用した。

2-2-6 RNA 免疫沈降法

セミコンフルエントまで培養した iMEF 細胞を 1% の formaldehyde で 10 分間常温にて固定した後に回収した。SDS lysis buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 1% SDS, and 10 mM EDTA) で細胞を再懸濁し 10 分間氷上で処理した後に、RIP dilution buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 167 mM NaCl, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, and 5 mM EDTA) を加え、Bioruptor (Cosmo Bio) で超音波破碎した。FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich, F3165) と反応させた Dynabeads (sheep anti-mouse IgG, Invitrogen) と共に 4°C で一晩反応させた。反応させたビーズを冷やした low-salt buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, and 20 U/ml RNaseOUT)、high-salt buffer (20 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 500 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, and 20 U/ml RNaseOUT)、LiCl buffer (10 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, and 20 U/ml RNaseOUT)、diethylpyrocarbonate RNase-Free の精製水で洗浄した。RIP elution buffer (10 mM HEPES-KOH [pH 7.6], 300 mM NaCl, 0.5% SDS, 5 mM EDTA, and 40 U/ml RNaseOUT, 0.8 µg/ml ProteinaseK) を加えて、42°C で 1 時間反応させた後に 65°C

で4時間以上反応させ、脱クロスリンクした。TRIzol LS Reagent (Invitrogen) でサンプルを抽出後、2 U の DNase Turbo を含む、総量 50 μ l の付属の reaction buffer 中にて 37°C で 20 分間反応させ DNA を分解し、RNA を精製した。

2-2-7 ドットブロット

免疫沈降したサンプルを loading buffer (6.6% formaldehyde, 50% formamide, 20 mM MOPS [pH 7.0], 1 mM EDTA, 5 mM sodium acetate, and 0.1 U RNaseOUT) に溶解し 65°C で熱変性した後に氷上で急冷した。Bio-Dot (Biorad) に Hybond N+ nylon membrane (GE Healthcare) を設置し、RNA サンプルをロードした後に吸引をしてサンプルを吸着させた。さらに UV Stratalinker (Stratagene) でクロスリンクを行なった。Alkphos Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare) でラベルしたプローブを Blocking buffer に添加したのちに、55°C でメンブレンと一晩反応させた。反応後、first-wash buffer (2 M Urea, 0.1% SDS, 50 mM NaHPO₄ [pH 7.0], 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.1% blocking reagent) で 55°C、2 回、second-wash buffer (50 mM Tris, 100 mM NaCl, and 1 mM MgCl₂) で常温、1 回洗浄した。検出は Alkphos Direct Labeling and Detection System の kit に含まれる CDP-star を用いて LAS-3000 で検出を行なった。

2-2-8 クロマチン分画

回収した iMEF 細胞を 200 μ l の Chromatin Fractionation Buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0.2% NP-40, 10% Glycerol, 1 mM NaF) に懸濁し、10 分間氷上で静置後、100 μ l を Whole Cell Lysate として取り分け、残りの 100 μ l を 14,010 $\times g$ で 10 分間遠心した。上清を Supernatant フラクションとして別のチューブに移し、等量の 2 \times SDS サンプルバッファーを加えた。ペレットには 200 μ l の SDS サンプルバッファーを加えて、それぞれ超音波破碎後、数分間煮沸した。それぞれのフラクションは H3、tubulin 抗体を用いたウェスタンブロットにて確認を行なった。

2-2-9 FRAP 解析

本研究の FRAP 解析、GFP-Suv39h1 のヘテロクロマチン領域の局在の解析は全て東京工業大学の木村研究室に行っていただいた。

2-2-10 使用した抗体

- anti- α -tubulin (T5168: Sigma, RRID: AB_477579)
- anti-Suv39h1 (8729: Cell Signaling, RRID: AB_10829612)
- anti-H3 (ab21054: Abcam, RRID: AB_880437)
- anti-H3K9me3 (ab8898: Abcam, RRID: AB_306848 and 2F3 (RRID: AB_2616099))
- anti-FLAG-M2 (F3165: Sigma-Aldrich, RRID: AB_259529)
- anti-FLAG-M2-HRP (A8592: Sigma-Aldrich, RRID: AB_439702)

本研究は遺伝子組換え実験等安全委員会の許可を得て行なった。
承認番号 No. 12-301、No. 13-302

2-3 結果

2-3-1 Suv39h1-CD の核酸結合能の解析

当研究室の過去の報告より、酵母のクロモドメインタンパク質 Chp1-CD の核酸結合能がヘテロクロマチンのサイレンシングに重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Ishida *et al.*, 2012)。同じ報告で Suv39h のホモログである分裂酵母の Clr4 も H3K9me と結合することによって核酸と結合することが示されているが、その生理的な役割は解明されていない。そこで本研究では哺乳類の Suv39h1 に着目し、Suv39h1 が同様な核酸結合能を有しているか検討した。まず大腸菌からリコンビナントタンパク質として GST、GST-Chp1-CD、GST-Suv39h1-CD を精製した (図 2-2A, B)。精製したタンパク質と *in vitro* で発現させた major satellite に相当する一本鎖 RNA (ssRNA) との結合を EMSA (ゲルシフトアッセイ) により解析したところ、Suv39h1-CD は単独で ssRNA と結合することを見出した (図 2-2C)。同様に major satellite に相当する二本鎖 DNA (dsDNA) をプローブとして用いて解析を行った結果、Suv39h1-CD は dsDNA にも結合できるが、詳細な滴定ゲルシフトアッセイによる比較を行ったところ、Suv39h1-CD は ssRNA により強く結合することが分かった (図 2-2D-G)。

2-3-2 Suv39h1-CD の核酸結合に重要なアミノ酸残基の同定

次に、Suv39h1-CD の核酸との結合するアミノ酸を同定するために変異体を作製して解析を行った。当研究室の先行論文において、分裂酵母の Chp1 及び Clr4 の CD は、それぞれ C 末端側の α ヘリックスの中の塩基性アミノ酸クラスターを介して RNA と結合することが明らかになっている (Ishida *et al.*, 2012)。そこで Suv39h1-CD の C 末端側に存在している α ヘリックスの塩基性アミノ酸に着目して、いくつかの組み合わせでアラニンに置換した変異体 Suv39h1-CD タンパク質を作製した (図 2-3A, B, mut1-4, 4A)。これらの変異 Suv39h1-CD を用いたゲルシフトアッセイによって、91 番目のリジン、95、99、100、102、103 番目のアルギニンが核酸との結合に関与していることが明らかになった (図 2-3C, D)。

当研究室の過去の報告において、分裂酵母の Chp1 はメチル化 H3K9 と結合することで核酸結合能が促進されることが示されている (Ishida *et al.*, 2012)。そこで Suv39h1-CD にも同様なメチル化ヒストンの認識と核酸結合の共役が存在するか検討を進めた。まず、Suv39-CD の H3K9me3 結合に必要なアミノ酸残基を

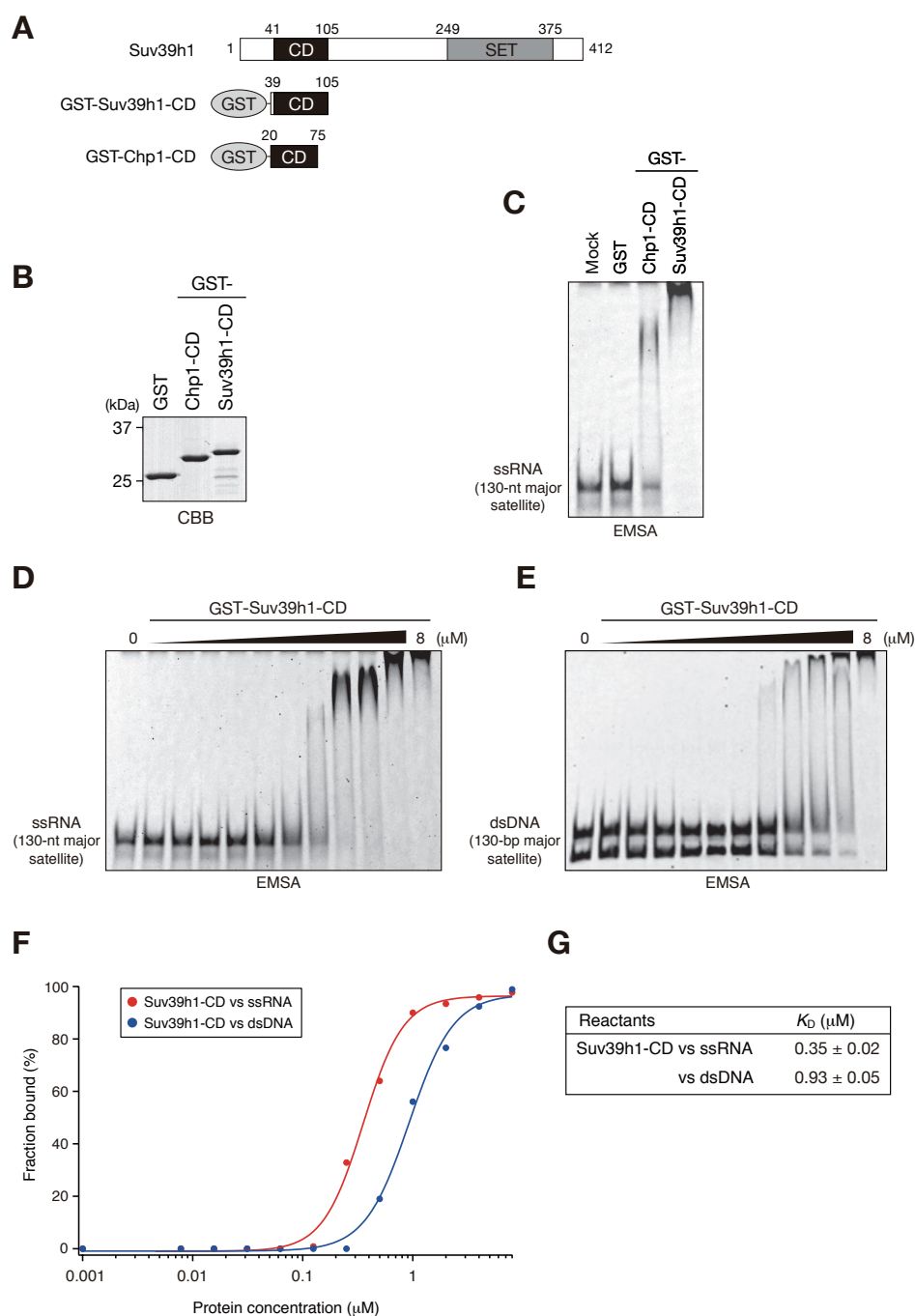


図 2-2 Suv39h1-CD は核酸結合能を持つ

(A) Suv39h1 の全長と GST-Suv39h1-CD (39-105 aa)、GST-Chp1-CD (20-75 aa) の模式図。(B) ゲルシフトアッセイに用いた GST、GST-Chp1-CD、GST-Suv39h1-CD の CBB 染色像。(C-E) ゲルシフトアッセイの結果。130 塩基の ssRNA プローブを用いたゲルシフトアッセイの結果 (C)。GST-Suv39h1-CD を段階希釈し、130 塩基の ssRNA プローブ (D)、130 塩基対の DNA プローブ (E) と反応させたゲルシフトアッセイの結果。(F) D、E の結合した核酸の量を定量化したグラフ。(G) グラフより算出した解離定数。

ペプチドプルダウンアッセイによって確認した。CD は一般的に 3 つの芳香環を持つ残基からなる、アロマティックケージを介してメチル化ヒストンを認識する (Jacobs and Khorasanizadeh, 2002; Wang *et al.*, 2012)。野生型及びメチル化ヒストンの結合に関わる 67 番目のチロシン (Y67) をアラニンに置換した変異型 Suv39h1-CD (Y67A) を作製し、ペプチドプルダウンアッセイを行った (図 2-3E)。その結果、野生型 Suv39h1-CD は過去の報告通り H3K9me3 に結合することが確認できたが (図 2-3F)、Y67A は野生型とは異なり H3K9me3 に対する特異的な結合はほとんど見られなかった (図 2-3F)。この結果から Y67 は Suv39h1-CD が H3K9me3 と結合するために重要なアミノ酸であることが確認できた。次に Suv39h1-CD の H3K9me3 結合が Suv39h1 の核酸結合能に与える影響について解析を行なった。Chp1-CD は過去の報告通り、メチル化 H3K9 ペプチドを添加すると、その結合が促進されたが (図 2-3G)、Suv39h1 はメチル化 H3K9 ペプチドを添加しても結合状態の変化は確認できなかった。また、核酸結合変異体 (4A) を用いたペプチドプルダウンアッセイにおいて、4A 変異体は野生型と同様に H3K9me3 に対する結合を示した (図 2-3F)。これらのことから、Suv39h1-CD の核酸結合と H3K9me3 結合はそれぞれ独立して働いているということが示唆された。

2-3-3 Suv39h1 の核酸結合能の細胞内での機能解析

さらに、ヘテロクロマチン形成における Suv39h1-CD の核酸結合能の役割を解析するため、理化学研究所眞貝細胞記憶研究室との共同研究として以下の実験を遂行した。まず FLAG タグをつけた Suv39h1 の全長の核酸結合能変異体 (4A)、H3K9 結合変異体 (Y67A)、及び核酸と H3K9me3 の両方に結合できない変異体 (Y67A-4A) を、ウィルスベクターを用いて、Suv39h1 及び Suv39h2 を欠損した iMEF 細胞 (Suv39h dn 細胞) (Lachner *et al.*, 2001) に発現させ、ヘテロクロマチンの指標である H3K9me3 を観察した (図 2-4A, B)。細胞を DAPI で染色した場合、濃く染まった (DAPI-dense) 領域は DNA が凝縮しているヘテロクロマチン領域であり、その領域には H3K9me3 が局在している。Suv39h dn 細胞では H3K9me3 シグナルが消失するが、野生型の Suv39h1 を導入すると DAPI-dense 領域の H3K9me3 が回復する (感染 3 日目; $64.0 \pm 7.9\%$ 、感染 6 日目; $97.0 \pm 1.3\%$) (図 2-4C, D)。一方、FLAG-Suv39h1-4A、FLAG-Suv39h1-Y67A、及び FLAG-Suv39h1-(Y67A-4A) を野生株と同様に Suv39h dn 細胞に発現させ、その細胞を観察した。その結果、感染 3、6 日目の 4A 変異体は野生型と比較して H3K9me3

の回復が遅かったが（感染 3 日目； $40.3 \pm 1.9\%$ 、感染 6 日目； $87.3 \pm 0.6\%$ ）、Y67A は野生型と比較して有意な差は確認できなかった（図 2-4C, D）。さらに Y67A-4A 変異体は 6 日目でも $71.9 \pm 1.9\%$ までしか回復しなかった（図 2-4D）。H3K9me3 が減少するということは DAPI-dense 領域上の HP1 の局在も減少していることが推測される。そこで、Suv39h1 を発現させた感染 6 日目の細胞について、DAPI-dense 領域と共局在する HP1 β を計測し、比較した。その結果、4A 及び Y67A-4A 変異体の DAPI-dense 領域上の HP1 β の局在が野生型と比較して明らかに少ないことが分かった（図 2-4E）。これらの結果から、Suv39h1 の核酸結合能は標的クロマチン領域への H3K9me3 の導入及び HP1 β の局在に重要な役割を担っていることが示唆された。

2-3-4 Suv39h1 の核酸結合能の細胞内での解析

in vitro 解析によって Suv39h1-CD が major satellite RNA に結合することが明らかになったが、細胞内で実際に Suv39h1 が major satellite RNA に結合しているかは不明である。そこで細胞内で Suv39h1 が major satellite RNA と結合しているか、RNA 免疫沈降法によって検討した。まず、Suv39h dn 細胞に FLAG タグを付加した野生型の Suv39h1-WT、核酸に結合できない CD (4A) を持つ変異 Suv39h1-4A をそれぞれ発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降を行った（図 2-5A）。その後、メンブレンにブロットし、major satellite プローブにて沈降した核酸を検出したところ、野生型 Suv39h1 と major satellite RNA との結合を検出することができた。このシグナルは RNase 処理によって完全に消失してしまうため、このシグナルが major satellite RNA であることを示している（図 2-5B）。興味深いことに、Suv39h1-4A を免疫沈降したサンプルでは major satellite RNA シグナルはほとんど検出できなかった（図 2-5B）。以上の結果から、Suv39h1 は細胞内で CD を介して major satellite RNA と結合していることが強く示唆された。

転写された通常の mRNA は核と細胞質両方に存在している。実際に Suv39h1 が核内のクロマチンに近い領域で major satellite RNA と結合しているか確認するため、クロマチン分画解析を行い、細胞内の Suv39h1 の局在をウェスタンブロットで確認した。まず内在性の Suv39h1 の局在を確認したところ、ほとんどの Suv39h1 はクロマチンフラクションに局在していることが明らかになった（図 2-5C）。次に 4A 変異体がどのフラクションに局在しているのかを解析した結果、野生型と大きな差は確認できなかった（図 2-5D）。すなわち、4A 変異体はクロ

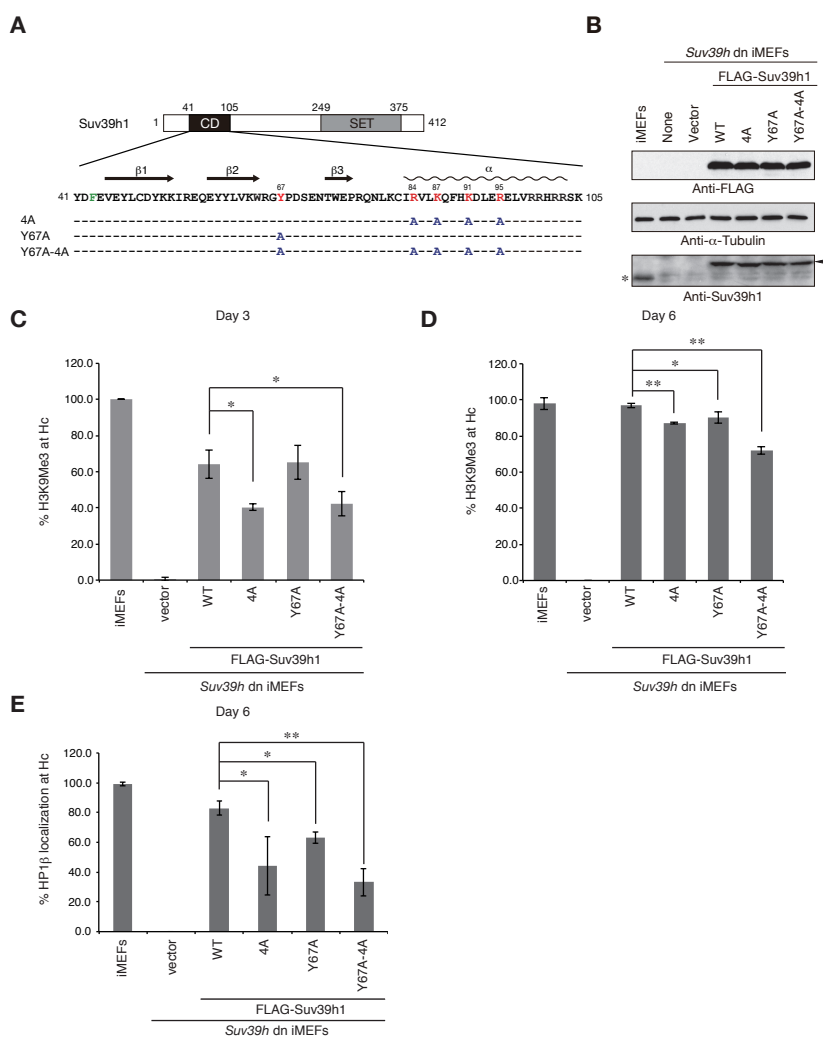


図 2-4 Suv39h1-CD の核酸及び H3K9me3 結合はヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たしている

(A) 野生型 Suv39h1 及び 4A (核酸結合変異型)、Y67A (H3K9me3 結合変異型)、Y67A-4A (核酸及び H3K9me3 結合変異型) Suv39h1 のアラインメント。(B) Suv39h dn 細胞に発現させた FLAG-Suv39h1 のウェスタンブロット。各 FLAG-Suv39h1 は内在性の Suv39h1 と同等もしくは少し発現が高い。(C, D) Suv39h dn 細胞に野生型及び変異型 FLAG-Suv39h1 を発現後、H3K9me3 抗体で免疫染色し、DAPI-dense 領域に H3K9me3 が集積している細胞を感染 3 日後 (C)、6 日後 (D) にそれぞれカウントしたグラフ。(E) Suv39h dn 細胞に野生型及び変異型 FLAG-Suv39h1 を発現後、HP1β抗体で免疫染色し、DAPI-dense 領域に HP1βが集積している細胞を感染 6 日後にカウントしたグラフ。これらの解析は理化学研究所の眞貝研究室との共同研究によるものである。

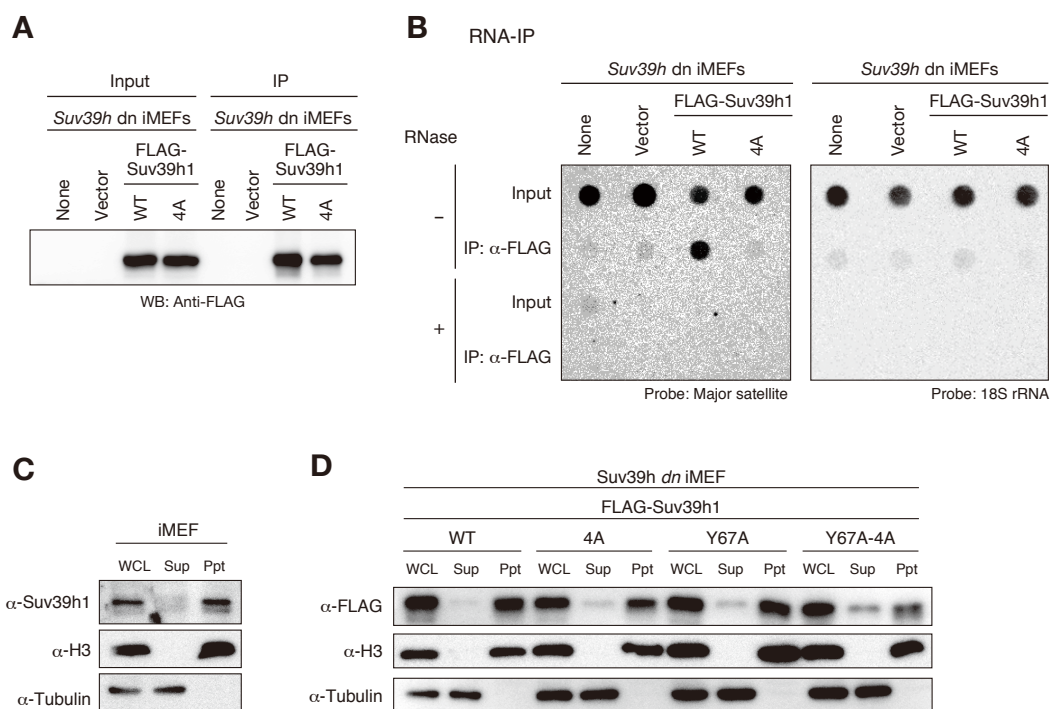


図 2-5 Suv39h1 は細胞内で major satellite RNA と CD を介して結合する

(A) Suv39h 欠損細胞に野生型及び変異型 FLAG-Suv39h1 を発現後、FLAG 抗体で免疫沈降し、FLAG 抗体でウェスタンブロットをした結果。(B) 免疫沈降したサンプルをドットブロットで解析した結果。左図は major satellite プローブで検出。右図は 18s rRNA プローブで検出している。免疫沈降した核酸が RNA であることを確認するために RNase 処理をした。(C, D) クロマチン分画の結果。可溶性画分 (Sup) を Tubulin 抗体、クロマチン画分 (Ppt) を H3 抗体でウェスタンブロットしている。内在性 Suv39h1 の局在 (C)。野生型及び変異型 FLAG-Suv39h1 の局在 (D)。

マチンフラクションに局在しているにも関わらず major satellite RNA と結合することができないということを示唆している。興味深いことに、Y67A-4A 変異体は 4A 及び Y67A 単独の変異体と比較して、可溶性フラクションに局在する量が増えていることが分かった (図 2-5D)。これらの結果から、Suv39h1 のクロマチン結合には、CD による H3K9me3 への結合と RNA への結合の両方が必要であることが示唆された。

2-3-5 Suv39h1-CD の核酸及び H3K9me3 結合能のヘテロクロマチン結合における役割の解析

これまでの結果より、Suv39h1 は CD を介して major satellite RNA に結合し、この RNA 結合能が H3K9me3 を最初に確立する過程に重要なことが分かった。興味深いことに、Y67A-4A 変異体はクロマチンから解離しやすくなっていることから、Suv39h1 の RNA 結合能は H3K9me3 の存在する通常の細胞においても Suv39h1 のクロマチン結合に寄与している可能性が考えられる。そこで次に、Suv39h1 のクロマチン結合における Suv39h1-CD の核酸及び H3K9me3 結合能の役割を明らかにするため、東京工業大学の木村宏博士の協力を得て解析を行った。まず、Suv39h dn 細胞に GFP を融合させた野生型及び各変異を持つ Suv39h1 を安定発現させた株を単離した (図 2-6A)。以前の報告と同じように、野生型 GFP-Suv39h1 は核に発現しており、Hoechst で濃く染色される領域に局在していた (図 2-6A)。また、変異 GFP-Suv39h1 も核に発現しており、そのほとんどは Hoechst で濃く染色される領域に存在していた (図 2-6A)。そこでヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の蛍光強度の比率を定量したところ、Y67A-4A 変異体は野生型と比較してユークロマチン領域のシグナルが有意に増加していた (図 2-6B)。この結果は Y67A 単独の変異体よりも顕著であるため、4A が付加的に影響を与えていると考えられる (図 2-6B)。次に FRAP 解析によって各 Suv39h1 のダイナミクスを定量的に解析した。その結果、4A 及び Y67 変異体の光褪色後の蛍光の回復時間が野生型と比較して明らかに早く (野生型の Suv39h1 が約 20 s であるのに対し、4A、Y67A は約 6 s)、蛍光強度の最大回復値である Mobile fraction も増加していた (野生型は約 73%であるのに対して、4A と Y67A は 88-89%) (図 2-6C, D)。さらに興味深いことに、Y67A-4A 変異体はさらにダイナミックな挙動を示すということが分かった (約 3 s、mobile fraction は約 91%) (図 2-6D)。これらの結果から、Suv39h1-CD の RNA 及び H3K9me3 結合能はどちらも自身のへ

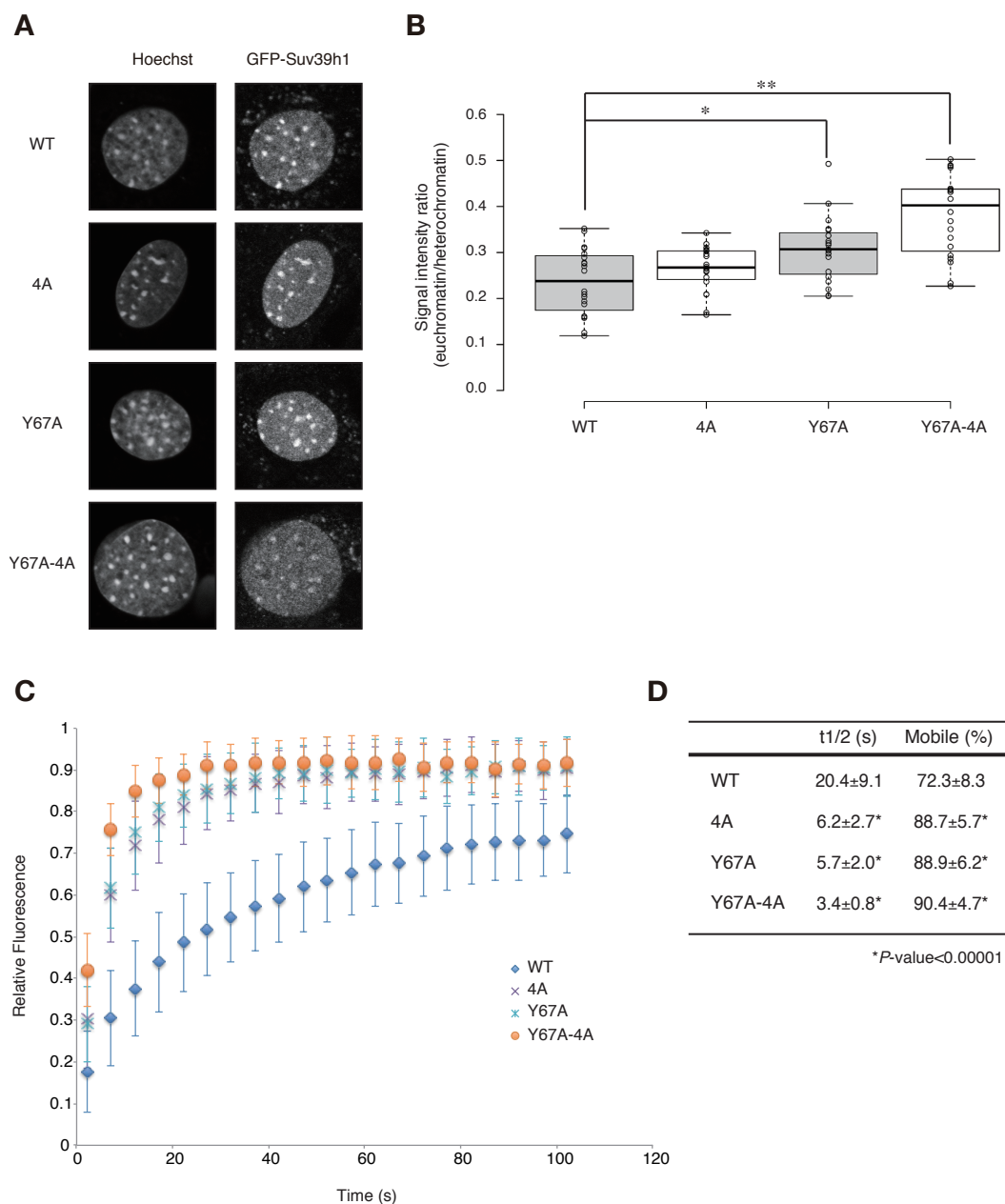


図 2-6 Suv39h1-CD の核酸及び H3K9me3 結合は自身のヘテロクロマチンへの安定的な結合に重要である

(A) Hoechst 染色及び野生型及び変異型 GFP-Suv39h1 の局在の解析。(B) ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の GFP シグナルの強度の比率を表した結果。(C) 野生型及び変異型 GFP-Suv39h1 のヘテロクロマチン領域における FRAP 解析の結果。(D) FRAP 解析の結果を定量化したもの。(これらの結果は東京工業大学の木村宏博士と理化学研究所の白井温子博士によって得られた結果である)

テロクロマチン領域の安定的な結合に重要な役割を果たしているということが明らかになった。

2-3-6 Major satellite RNA ノックダウン細胞による Suv39h1 の影響

Suv39h1-CD の核酸結合能が自身のヘテロクロマチン領域への安定的な結合に重要なことが明らかになったことから、major satellite RNA 自身が Suv39h1 のヘテロクロマチン領域の安定的な結合に関与している可能性が強く示唆された。そこで次に locked nucleic acid (LNA)-DNA gapmers 法を用い major satellite RNA をノックダウンして、Suv39h1 の動向を観察した (Probst *et al.*, 2010) (図 2-7)。まず、定量リアルタイム PCR で major satellite RNA の発現を解析したところ、major satellite に対する LNA を導入した GFP-Suv39h1 発現細胞は major satellite RNA の発現が劇的に減少していることを確認した (図 2-7A)。そして major satellite RNA ノックダウン細胞を用いてヘテロクロマチン領域における FRAP 解析を行ったところ、GFP-Suv39h1 の挙動が明らかに可動的になっていることが明らかとなった (図 2-7B)。この結果から major satellite RNA は Suv39h1 のセントロメア近傍への安定的な結合に重要な役割を果たしているということが強く示唆された。

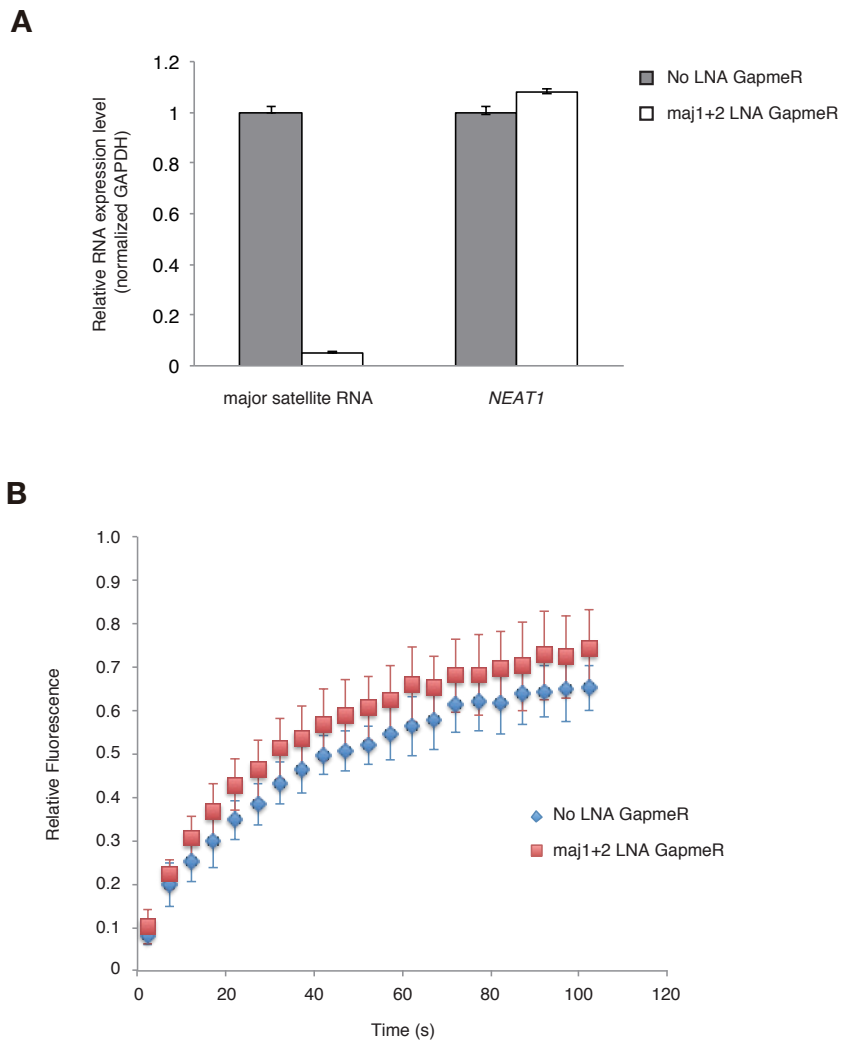


図 2-7 major satellite RNA は Suv39h1 の安定的な結合に重要である

(A) 定量リアルタイム PCR の結果。Suv39h 欠損細胞に野生型 GFP-Suv39h1 発現細胞に LNA-DNA GapmeRs をトランスフェクション後、RNA を回収した。核内で発現しているノンコーディング RNA の NEAT1 をネガティブコントロールとした。

(B) (A) で使用した細胞で FRAP 解析をした結果（これらの結果は東京工業大学の木村宏博士と理化学研究所の白井温子博士によって得られた結果である）。

2-4 考察

本研究でSuv39h1-CDが核酸結合能を持ち、DNAよりもRNAに結合の嗜好性を持つことが明らかになった。また、培養細胞を用いた解析により、Suv39h1は細胞内のクロマチンフラクションでmajor satellite RNAと結合することが示唆された。さらに、major satellite RNAと結合できない変異体（4A）は野生型と比較して有意にH3K9me3の回復が遅れた。これらの結果からSuv39h1のリクルートにはヘテロクロマチン領域から転写されたmajor satellite RNAが重要な役割を果たしていることが考えられる。しかし、核酸と結合することができない変異体のSuv39h1は野生型と比較してH3K9me3の回復が有意に遅延するとはいえ、Suv39h1の標的領域へリクルートされる分子機構を完全に説明できた訳ではない。したがって、Suv39h1-CDとmajor satellite RNAとの結合以外にもSuv39h1がセントロメア近傍へ呼び込まれる機能が存在することが示唆される。過去の報告ではSuv39h1-CDよりN末端側の領域がHP1と結合することや、SUMO化されたHP1 α がmajor satellite RNAと結合することが明らかにされている (Maison *et al.*, 2011; Muramatsu *et al.*, 2016)。これらことから、major satellite RNAと結合したHP1がRNA結合変異体Suv39h1をヘテロクロマチン領域にリクルートできた可能性が考えられる。また、最近の報告で、Suv39h1-CDよりN末端側がSuv39h1のクロマチン結合に重要な役割を果たすことが報告されている (Muller *et al.*, 2016)。さらに本研究により、Suv39h1はCD単独よりも全長の方が強い結合力を持つことが明らかになっている (筆者ら未発表)。これらのことから、Suv39h1のクロマチン結合にはN末端側、CDがそれぞれ重要な役割を果たしており、各領域が協調的に働いていることが考えられる。

図 2-6 の Hoechst 染色及び野生型及び変異 GFP-Suv39h1 の局在の解析結果より、Y67A-4A 変異体は野生型と比較してユークロマチン領域のシグナルが有意に増加していた。この結果より、RNA 及び H3K9me3 結合の両方がヘテロクロマチン領域特異的に結合するために重要な役割を果たしていることが見出された。さらに、生化学的解析により CD の RNA 結合と H3K9me3 結合はそれぞれが独立していることを見出した。このことから CD の RNA 結合能及び H3K9me3 結合能は独立して働き、さらに両方の結合能が標的クロマチン領域への結合力を高めている可能性が示唆された。

Major satellite RNA と結合できない変異体の解析及び major satellite RNA のノックダウン実験により、Suv39h1 が CD を介して major satellite RNA と結

合すること、さらに major satellite RNA 自身が Suv39h1 のヘテロクロマチン領域への安定的結合に重要であることを見出した。しかし、生化学的解析では Suv39h1-CD の核酸結合に配列特異性が存在することを見出すことができなかった（筆者ら未発表）。ヒトの SUV39H1 はテロメア領域からの転写産物である TERRA と結合することが報告されている（Porro *et al.*, 2014）。テロメア領域もセントロメア領域と同様に繰り返し配列が存在する。したがって、繰り返し配列を持つ領域からの新規に転写された RNA が形成する特定の性質や構造が、Suv39h1 の特異的な領域への結合に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。それに加え、major satellite RNA が標的クロマチン領域上に結合していることも Suv39h1 の結合に重要な役割を果たしているのではないかと考えられる。

本研究は DAPI-dense 領域や major satellite 領域を解析したのみで、他の領域にどのような影響があるのかは解析をしていない。Suv39h1 と結合している RNA を網羅的に解析すれば、Suv39h1 とノンコーディング RNA との関係性のさらなる知見を得ることができると考えられる。

2-5 参考文献

- Al-Sady, B., Madhani, H.D., and Narlikar, G.J. (2013). Division of labor between the chromodomains of HP1 and Suv39 methylase enables coordination of heterochromatin spread. *Molecular cell* **51**, 80-91.
- Allshire, R.C., Nimmo, E.R., Ekwall, K., Javerzat, J.P., and Cranston, G. (1995). Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes Dev* **9**, 218-233.
- Bulut-Karslioglu, A., V. Perrera, M. Scaranaro, I. A. de la Rosa-Velazquez, S. van de Nobelen, N. Shukeir, J. Popow, B. Gerle, S. Opravil, M. Pagani, S. Meidhof, T. Brabletz, T. Manke, M. Lachner and T. Jenuwein (2012). A transcription factor-based mechanism for mouse heterochromatin formation. *Nature structural & molecular biology* **19**, 1023-1030.
- Castel, S.E., and Martienssen, R.A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature reviews. Genetics* **14**, 100-112.
- Goto, D.B., and Nakayama, J. (2012). RNA and epigenetic silencing: insight from fission yeast. *Development, growth & differentiation* **54**, 129-141.
- Grewal, S.I., and Jia, S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet* **8**, 35-46.
- Ishida, M., Shimojo, H., Hayashi, A., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Uegaki, K., Nishimura, Y., and Nakayama, J. (2012). Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. *Molecular cell* **47**, 228-241.
- Jacobs, S.A., and Khorasanizadeh, S. (2002). Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science* **295**, 2080-2083.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins.

Nature **410**, 116–120.

Maison, C., D. Bailly, D. Roche, R. Montes de Oca, A. V. Probst, I. Vassias, F. Dingli, B. Lombard, D. Loew, J. P. Quivy and G. Almouzni (2011) SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 α to pericentric heterochromatin. Nat Genet **43** (3):220–227.

Moazed, D. (2009). Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. Nature **457**, 413–420.

Muller, M.M., Fierz, B., Bittova, L., Liszczak, G., and Muir, T.W. (2016). A two-state activation mechanism controls the histone methyltransferase Suv39h1. Nature chemical biology **12**, 188–193.

Muramatsu, D., H. Kimura, K. Kotoshiba, M. Tachibana and Y. Shinkai (2016). Pericentric H3K9me3 Formation by HP1 Interaction-defective Histone Methyltransferase Suv39h1. Cell Struct Funct **41** (2): 145–152.

Nakayama, J., J. C. Rice, B. D. Strahl, C. D. Allis and S. I. Grewal (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. Science **292** (5514): 110–113.

Nielsen, P.R., Nietlispach, D., Mott, H.R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A.G., Murzina, N.V., and Laue, E.D. (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. Nature **416**, 103–107.

Noma, K., Sugiyama, T., Cam, H., Verdel, A., Zofall, M., Jia, S., Moazed, D., and Grewal, S.I. (2004). RITS acts in cis to promote RNA interference-mediated transcriptional and post-transcriptional silencing. Nature genetics **36**, 1174–1180.

Peters, A. H., S. Kubicek, K. Mechtler, R. J. O’Sullivan, A. A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J. H. Martens and T. Jenuwein (2003). Partitioning and plasticity of

repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular cell* **12**, 1577–1589.

Peters, A. H., D. O’Carroll, H. Scherthan, K. Mechtler, S. Sauer, C. Schofer, K. Weipoltshammer, M. Pagani, M. Lachner, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Doyle, M. Sibilia and T. Jenuwein (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* **107**, 323–337.

Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., and Lingner, J. (2014). Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nature communications* **5**, 5379.

Probst, A.V., Okamoto, I., Casanova, M., El Marjou, F., Le Baccon, P., and Almouzni, G. (2010). A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* **19**, 625–638.

Ragunathan, K., Jih, G., and Moazed, D. (2015). Epigenetics. Epigenetic inheritance uncoupled from sequence-specific recruitment. *Science* **348**, 1258699.

Rea, S., F. Eisenhaber, D. O’Carroll, B. D. Strahl, Z. W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C. P. Ponting, C. D. Allis and T. Jenuwein (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599.

Wang, T., C. Xu, Y. Liu, K. Fan, Z. Li, X. Sun, H. Ouyang, X. Zhang, J. Zhang, Y. Li, F. Mackenzie, J. Min and X. Tu. (2012). Crystal Structure of the Human SUV39H1 Chromodomain and Its Recognition of Histone H3K9me2/3. *PloS one* **7**, e52977.

Zhang, K., Mosch, K., Fischle, W., and Grewal, S.I. (2008). Roles of the Ctr4 methyltransferase complex in nucleation, spreading and maintenance of heterochromatin. *Nature structural & molecular biology* **15**, 381–388.

第三章

CBX2 の翻訳後修飾によるクロマチン結合の解析

3-1 緒言

ショウジョウバエの発生段階で、体の前後軸や体節を決定するホメオティック遺伝子の発現制御に関わる因子の遺伝学的スクリーニングの結果、転写の抑制状態の維持に関わるポリコームタンパク質群と転写の活性状態の維持に関わるトライソラックスタンパク質群が同定された (Di Croce and Helin, 2013; Muller *et al.*, 1995)。その後の精力的な研究により、ポリコームタンパク質が様々な現象において遺伝子発現を制御する調節因子としての役割を果たしていることが明らかになってきた (Di Croce and Helin, 2013; Muller *et al.*, 1995; Simon and Kingston, 2013)。また、生化学的解析により、ポリコームタンパク質は大別してヒストンの H3K27 をトリメチル化 (H3K27me3) する活性を持つポリコーム抑制タンパク質複合体 2 (PRC2) と、クロマチンの凝縮に関わるポリコーム抑制タンパク質複合体 1 (PRC1) に分けられることが明らかになっている。

PRC1 に属する CBX2 は胚発生や性決定、幹細胞の分化、細胞の癌化、細胞周期や増殖など様々な生命現象に関わる遺伝子発現を制御している (Bel-Vialar *et al.*, 2000; Clermont *et al.*, 2016; Core *et al.*, 2004; Katoh-Fukui *et al.*, 2012; Morey *et al.*, 2012; Takada *et al.*, 2007; van den Boom *et al.*, 2013)。CBX2 は CD、Pcbox の他に AT-hook (AT) ドメインやセリンリッチ (SR) 領域など特徴的な配列が存在しており、それらのドメインもゼブラフィッシュからヒトまで非常によく保存されているが、その生物学的役割は不明な点が多い (Kawamura *et al.*, 2002; Senthilkumar and Mishra, 2009) (第三章、図 3-2)。また、一般的に CBX ファミリーの H3K27me3 結合能は、HP1 の H3K9me3 結合能と比較して非常に結合力が弱く、他のドメインもしくは相互作用しているタンパク質がクロマチン結合に関与していることが考えられる (Kaustov *et al.*, 2011) (図 3-1)。興味深いことに、CBX2 はマウスの組織や細胞株でリン酸化されていることや AT ドメインが CBX2 の標的クロマチン領域への結合に関与していることが示唆されているが、標的クロマチン領域への結合様式については明らかになっていない点が多い (Hatano *et al.*, 2010; Noguchi *et al.*, 2002; Tardat *et al.*, 2015; Zhen *et al.*, 2014)。そこで CBX2 の核酸結合能や翻訳後修飾に着目し、標的クロマチン領域への結合のメカニズムの解明を目指した。

Protein	K _d	
	H3K9me3	H3K27me3
CBX1 (HP1β)	5 ± 2	N/B
CBX3 (HP1γ)	15 ± 8	N/B
CBX5 (HP1α)	30 ± 5	N/B
CBX2	>500	185 ± 20
CBX4	70 ± 7	205 ± 20
CBX6	>500	>500
CBX7	55 ± 5	110 ± 17
CBX8	>500	>500

図 3-1 CBX タンパク質とヒストンのメチル化ペプチドとの結合

Kaustov らの論文 (*J Biol Chem.* 286, 521-529, 2011) のデータを一部改変し引用した。各タンパク質の CD とペプチドとの結合を蛍光偏光法で解析した結果。

3-2 実験方法

3-2-1 プラスミドの作製

HEK293T 細胞から RNA を抽出後、SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) で cDNA ライブラリーを作製した。ヒトの CBX2 をコードする領域を Pfu Turbo PCR system (Agilent) で増幅し、TOPO-TA cloning kit (Invitrogen) で pCRII ベクターにクローニングした。大腸菌でリコンビナントタンパク質を発現させるためにそれぞれの CBX2 の断片をコードする領域を pGEX-6P-3 (GE Healthcare) ベクターにそれぞれ組み込んだ。変異体作成にはプライマーに変異を入れ、PCR で増幅したものをクローニングし使用した。

3-2-2 リコンビナントタンパク質の発現

大腸菌を大量発現させるために、目的のプラスミドを BL21 (DE3) 株に導入し、抗生物質のアンプシリンを含んだ 2xYT プレートにまき、一晚培養した。生えてきたコロニーを 3 ml の 2xYT 培地で 2~3 時間培養し、その後 1 L の培地に加えた。OD₆₀₀ 値が 0.5 になるまで 37°C で振盪培養した後、25°C まで冷やした。十分に温度が下がったのを確認した後に、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド (IPTG) を最終濃度が 200 μM になるように添加し 2 時間発現を誘導した。集菌し PBS で洗浄した後、-80°C で保存した。

3-2-3 GST 融合タンパク質の精製

保存していた大腸菌を融解し、PBS で懸濁した後に超音波破碎した。その後、10% Triton-X100 を終濃度 1% になるように加え、30 分間反応させた。Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を加えて 2 時間 4°C で反応させた後、PBS でビーズを洗浄したのち溶出バッファー (20 mM Tris [pH 8.0], 50 mM 還元型グルタチオン) で溶出した。溶出後のタンパク質はそれぞれ Source 15Q カラム (GE Healthcare) で精製した。

3-2-4 Electrophoretic mobility-shift assays (EMSAs)

2-2-5 参照

3-2-5 細胞培養の条件とトランスフェクション方法

HEK293T 細胞は 10% Fetal Bovine Serum (GIBCO) を Dulbecco' s Modified

Eagle' s Medium (Nacalai Tesque) に添加した培地で培養した。siRNA の導入には Lipofectamine RNAi MAX reagents (Invitrogen) を用いた。siRNA を導入後、各 pFLAG-CBX2 プラスミドを Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて細胞に導入した。プラスミド導入 72 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロット及び定量リアルタイム PCR を行なった。

以下に使用した siRNA の配列を記す。

siCBX2-3'UTR (cocktail),

- 5'-CGUUGUUGCUGAGUUUGAATT-3'
- 5'-UUCAAACUCAGCAACAACGTT-3'
- 5'-CUCACUGCCUUGUUGGUCUTT-3'
- 5'-AGACCAACAAGGCAGUGAGTT-3'

3-2-6 細胞からの RNA 抽出方法と定量リアルタイム PCR

RNA の抽出には Trizol Reagent (Invitrogen) を使用した。抽出後 2.5 U DNase I (Takara) で 37°C、20 分間処理をした。定量リアルタイム PCR は Power SYBR Green RNA-to-Ct 1-Step Kit (Applied Biosystems) を用いて StepOnePlus Real Time PCR system (Applied Biosystems) で解析を行った。各遺伝子発現量は β -ACTIN mRNA で補正を行なった。

3-2-7 使用した抗体

以下に使用した抗体を記す。

- anti-CBX2 (ab80044; Abcam)
- anti- α -Tubulin (T5168; Sigma)
- horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-FLAG M2 (A8592; Sigma)
- HRP-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (A6667; Sigma)
- HRP-conjugated anti-histone H3 (ab21054; Abcam)
- Anti-GST rabbit polyclonal antibodies は (Ishida *et al.*, 2012) の論文で使用したもの

3-2-8 リン酸化アッセイ

In vitro リン酸化アッセイは以前報告された方法に従った (Nishibuchi *et al.*, 2014)。各 GST-CBX2 を 1 μ g と 100 U のリコンビナントカゼインキナーゼII (CK2;

NEB)を 25 μ l の reaction buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 50 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, and 200 mM adenosine triphosphate [ATP])中で 30°C、3 時間反応させた。*In vitro* 脱リン酸化アッセイは HEK293T 細胞に各 pFLAG-CBX2 プラスミドを導入し、48 時間発現させた細胞を回収して解析を行った。回収した細胞を RIPA buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS]) , 10 mM sodium fluoride (NaF) and protease inhibitor cocktail [Complete, EDTA-free, Roche]) で溶解した。遠心した上清に等量の 2× alkaline-phosphatase reaction buffer (50 mM Tris-HCl [pH 9.0] and 5 mM $MgCl_2$, 160 U shrimp alkaline phosphatase [SAP, TaKaRa]) を添加し、37°Cで少なくとも 3 時間以上反応させた。SDS サンプルバッファーを添加し煮沸後 SDS-PAGE を行い、ゲルを CBB 染色して確認した。

3-2-9 ペプチドプルダウンアッセイ

ペプチドプルダウンアッセイは以前報告されている方法に多少の変更を加えて行った (Hamada *et al.*, 2011)。C 末端側にシステイン残基を付加した未修飾及び H3K27me3 のヒストンペプチド (18~33 aa)、50 nmol と Sulfolink Coupling Resin (Pierce)、500 μ l (ベッドボリューム) を 5 時間以上室温でクロスリンクさせた。GST-CBX2 とヒストン-ペプチドの比率が 1:1000 になるように混ぜ、150 μ l の binding buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.1% Triton X) 中にて 1 時間、室温で反応させた。反応後、1 ml の binding buffer で 3 回洗浄し、SDS サンプルバッファーを添加し、SDS-PAGE 後、GST 抗体を用いたウェスタンブロットで検出した。

3-2-10 ヌクレオソームプルダウンアッセイ

再構成ヌクレオソームは早稲田大学の胡桃坂研究室に提供をしていただいた。ビオチン化ヌクレオソームを 1 μ g と T1 beads (Invitrogen)を総量 100 μ l の binding buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 0.1% Triton X, 5% glycerol, 0.025 mM EDTA, 0.1 mg/ml bovine serum albumin [BSA], and 1 mM DTT) 中で 4°C、4 時間反応させた。ビーズを binding buffer で 2 回洗浄後、ヌクレオソームが結合したビーズと GST-CBX2 を binding buffer 中で 4°C、1 時間反応させた。wash buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 300 mM NaCl, 0.1% Triton-X, 5% glycerol, and 0.025 mM EDTA)で 3 回洗浄後、SDS サンプルバッファーを加

えて溶出を行った。SDS-PAGE 後、GST 抗体を用いてウェスタンブロットで検出した。

本研究は遺伝子組換え実験等安全委員会の許可を得て行なった。
承認番号 No. 12-301、No. 13-302

3-3 結果

3-3-1 ヒトの細胞内におけるリン酸化状態の解析

ヒトの CBX2 のクロマチン結合の分子メカニズムを解析するために、まず HEK293T 細胞で CBX2 のリン酸化状態について、CBX2 抗体でウェスタンブロット解析によって検討した (図 3-2)。その結果、CBX2 の計算上の分子量はおよそ 56 kDa であるが、73 kDa 付近にバンドを確認した (図 3-2B)。このバンドシフトがリン酸化によるものかを検討するため、細胞抽出液を脱リン酸化酵素 (shrimp alkaline phosphatase: SAP) で処理したところ、移動度の速いバンドが検出された (図 3-2B)。この結果から、マウスと同様に、ヒトの CBX2 が細胞内でリン酸化されていることが確認できた。

CBX2 のアミノ酸配列を注意深く見てみると、CD よりも C 末端側にセリン残基がクラスターを成しているセリンリッチ (SR) 領域、さらにその後ろに酸性アミノ酸に富む領域 (AR) が存在しており、これらがカゼインキナーゼ II (CK2) の標的配列に一致することに気付いた (図 3-2A) (Pinna *et al.*, 2002)。泳動度の違いとして検出される CBX2 のリン酸化に、これらの領域が関与しているか検討するため、FLAG タグを付加した野生型及び SR、AR 領域を欠損した変異体 (Δ SR、 Δ AR) を HEK293T に発現させ、それらの移動度を検討した (図 3-2C-E)。また、以前の報告でリン酸化されていることが示唆されている 42 番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (S42A) も同時に検討した (図 3-2D, E) (Hatano *et al.*, 2010)。その結果、野生型 CBX2 で見られた大きなバンドシフトは、 Δ SR 及び Δ AR では確認できず、弱い移動度の変化が観察された (図 3-2D)。一方、以前報告された S42 を置換した S42A では、野生株と比較して大きな移動度の変化は観察されなかった。これらの結果から、CBX2 の SR や AR 領域を含む領域が細胞内でリン酸化されていることが示唆された。さらに詳細な解析をするために CBX2 の N 末端側 (1-129 aa) について、野生型及び Δ SR、 Δ AR、S42A 変異体をそれぞれ発現させて同様に解析を行った (図 3-2E)。その結果、 Δ SR は SAP 処理前後でバンドシフトの変化は確認できなかった (図 3-2E)。また、 Δ AR では部分的にリン酸化されている CBX2-N が確認された (図 3-2E)。さらに全長の CBX2 の結果と同様に、CBX2-N においても S42A の影響はほとんど確認できなかった (図 3-2D, E)。これらの結果より、ヒトの CBX2 は細胞内でリン酸化されており、その主なリン酸化部位は SR 領域であること、さらに AR 領域がそのリン酸化に関与することが示唆された。

3-3-2 SR 領域のリン酸化酵素の同定

次に CBX2 の SR 領域が実際に CK2 によってリン酸化されるか確認するため、*in vitro* のリン酸化アッセイを行った (図 3-3)。まず GST 及び GST を融合させた CBX2 の N 末部分断片 (CBX2-CD、CD+AT、N) をそれぞれ作成し、リコンビナント CK2 と反応させて SDS-PAGE でリン酸化状態を解析した (図 3-3A, B)。その結果、CD、CD+AT は CK2 反応前後でマイナーなリン酸化バンドしか検出できないのに対し、SR 及び AR 領域を含む N 末端は CK2 反応後の主なバンドの移動度が明らかに遅くなった (図 3-3B)。このことから CBX2 の SR 領域は CK2 によって効率良くリン酸化されることが分かった。さらに CBX2 の SR 領域のリン酸化の機能を *in vitro* で解析するために、大腸菌内で CK2 と CBX2 を共発現させてリン酸化 CBX2 を作製した (図 3-3C)。

3-3-3 SR 領域のリン酸化による H3K27me3 結合の影響

次に CK2 による SR 領域のリン酸化が CD の H3K27me3 結合に与える影響について、3-3-2 で精製したリン酸化 CBX2-N を用いて解析を行った (図 3-4)。まず未修飾及びメチル化されたヒストン H3 ペプチド (18-33 aa) を用いてペプチドブルダウンアッセイを行った (図 3-4A)。過去の報告通り、CBX2 の CD は H3K27me3 と結合し、未修飾ペプチドにはほとんど結合しなかった (Kaustov *et al.*, 2011, Bernstein *et al.*, 2006) (図 3-4A)。興味深いことに、CD+AT 及び CBX2-N は H3K27me3 ペプチドにほとんど結合しなかった (図 3-4A)。この結果は、AT と H3 ペプチド間で静電的な相互作用があり、その結果、結合が見られなくなったと考えられる。さらに興味深いことに、CBX2-N は CK2 によってリン酸化されると H3K27me3 に対する結合嗜好性が回復することを見出した (図 3-4A)。これらの結果から、CK2 による CBX2 の SR 領域のリン酸化は CD の H3K27me3 ペプチドへの結合を促進する重要な役割を果たしていることが明らかになった。

当研究室の以前の報告より、HP1 α の N 末端のリン酸化は H3K9me3 ヌクレオソームの結合特異性を高めることを明らかにした (Nishibuchi *et al.*, 2014)。そこで CK2 による CBX2 の SR 領域のリン酸化がヌクレオソームの結合に与える影響についてヌクレオソームブルダウンアッセイによって解析を行った (図 3-4B, D)。未修飾及び H3Kc27me3 ヌクレオソームは早稲田大学の胡桃坂研究室に作製していただいた。その結果、リン酸化をされていない CBX2-N は、H3K27me3

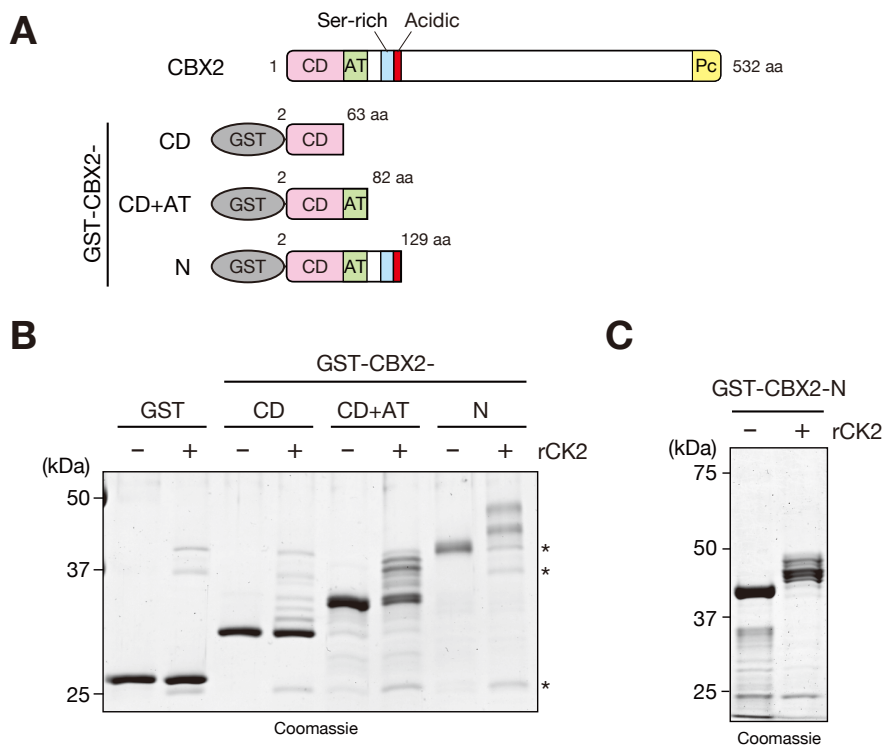


図 3-3 CBX2 の SR 領域は CK2 によってリン酸化される

(A) ヒト CBX2 の全長と精製した GST-CBX2-CD (2-63 aa)、CD+AT (2-82 aa)、N 末端 (2-129 aa) の模式図。(B) *In vitro* リン酸化アッセイの CBB 染色像。精製した GST、GST-CBX2-CD、GST-CBX2-CD+AT、GST-CBX2-N とリコンビナント CK2 を反応させた。(C) 大腸菌内で GST-CBX2-N と CK2 を共発現させて精製したタンパク質の CBB 染色像。

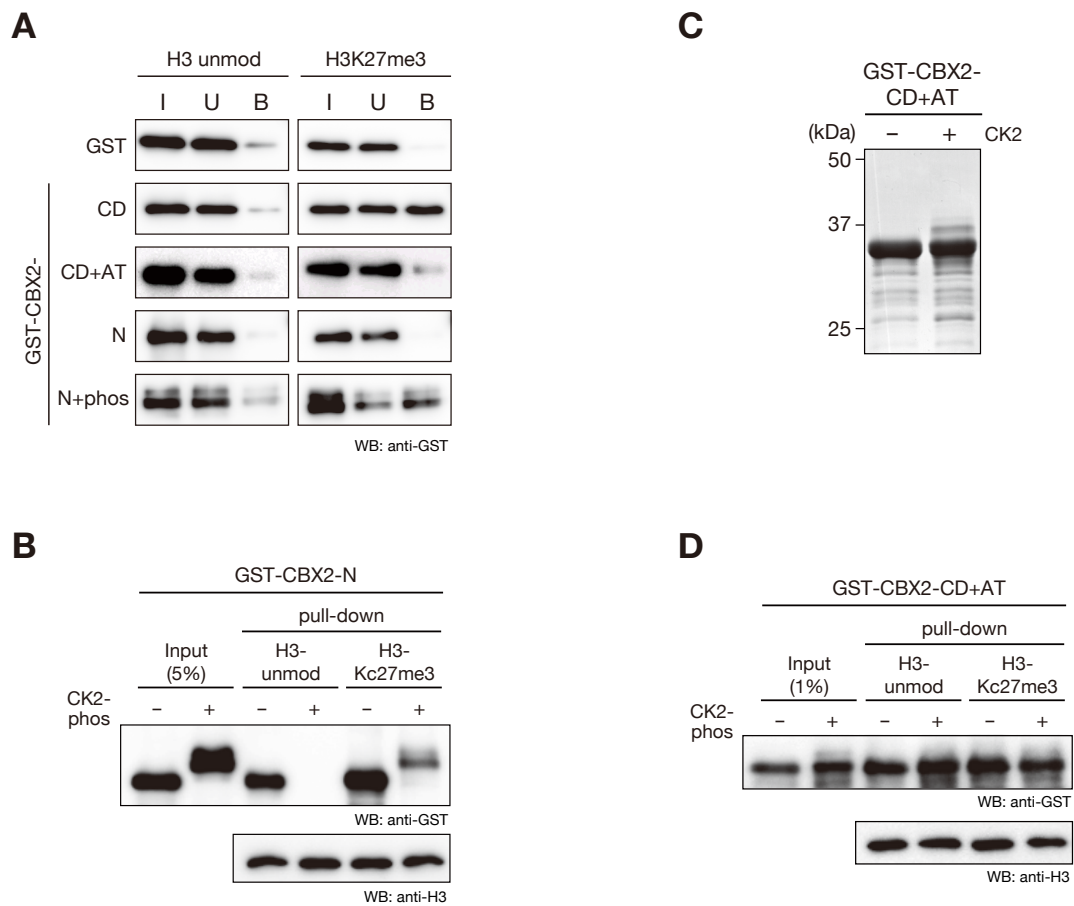


図 3-4 CK2 による CBX2 の SR 領域のリン酸化は H3K27me3 の結合を促進する

(A) ペプチドを用いたプルダウンアッセイの結果。GST 抗体によってウェスタンブロットによって検出した。(B) 再構成ヌクレオソームを用いた GST-CBX2-N とのプルダウンアッセイの結果。(C) リン酸化 GST-CBX2-CD+AT の CBB 染色図。(D) 再構成ヌクレオソームを用いた GST-CBX2-CD+AT とのプルダウンアッセイの結果。GST 抗体と H3 抗体を使用したウェスタンブロットによって検出した。

の有無に関わらずヌクレオソームに強く結合することを見出した (図 3-4B)。興味深いことに、CK2 によって SR 領域がリン酸化されると、CBX2-N による未修飾 H3 ヌクレオソームへの結合はほぼ完全に阻害された (図 3-4B)。この結合特異性が SR 領域のリン酸化によるものかを明らかにするために SR 及び AR 領域を含まないリン酸化 CD+AT を作成し、ヌクレオソームプルダウンアッセイを行った (図 3-4C)。その結果、CBX2-CD+AT はリン酸化の有無に関係なく未修飾及び H3K27me3 ヌクレオソームに結合し、特にリン酸化による影響は確認できなかった (図 3-4D)。以上の結果から CBX2 は CK2 によって SR 領域がリン酸化されることによって未修飾ヌクレオソームへの非特異結合を阻害され、その結果 H3K27me3 ヌクレオソームへの結合特異性を生み出していることが示唆された。

3-3-4 AT-hook ドメインの核酸結合能の解析

当研究室の以前の研究において、HP1 α の N 末端のリン酸化は HP1 α が持っている DNA 結合能を抑制し、その結果 H3K9me3 ヌクレオソームへの結合特異性を高めるということを明らかにした (Nishibuchi *et al.*, 2014)。Cbx2-CD は RNA と結合しないという報告がされているが (Bernstein *et al.*, 2006)、CBX2 には AT-hook(AT) という DNA 結合ドメインが CD の C 末端側に存在している (Aravind *et al.*, 1998)。最近、AT ドメインが CBX2 のクロマチン結合に関与しているという報告がされたが、AT の核酸結合能を詳細に解析された報告は未だされていない (Tardat *et al.*, 2015)。そこで次に、CBX2 のリン酸化が核酸との結合にどのような影響を及ぼすのか検討するため、ゲルシフトアッセイによって CBX2 の DNA 結合能を解析した (図 3-5)。まず CD の核酸結合能を解析したが、その結合能は非常に弱いものであった (図 3-5A, F, G)。次に AT ドメインの DNA 結合能を解析したところ、非常に強い結合能を有しており、さらに CBX2-N も同等かそれ以上に強い核酸結合能を持っていることを見出した (図 3-5B-D, F, G)。興味深いことに、CK2 による SR 領域のリン酸化によって CBX2-N の強い DNA 結合能が阻害されることが分かった (図 3-5E-G)。これらの結果から CBX2 の AT ドメインは強い DNA との結合能を持つこと、また CK2 による SR 領域のリン酸化によってその結合が阻害されることが明らかとなった。

近年、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA が CD タンパク質の標的領域の結合に関係しているという報告がされている (Hamada *et al.*, 2014)。そこで次に CBX2-N が RNA と結合するかを検討した (図 3-6)。その結果、CD の

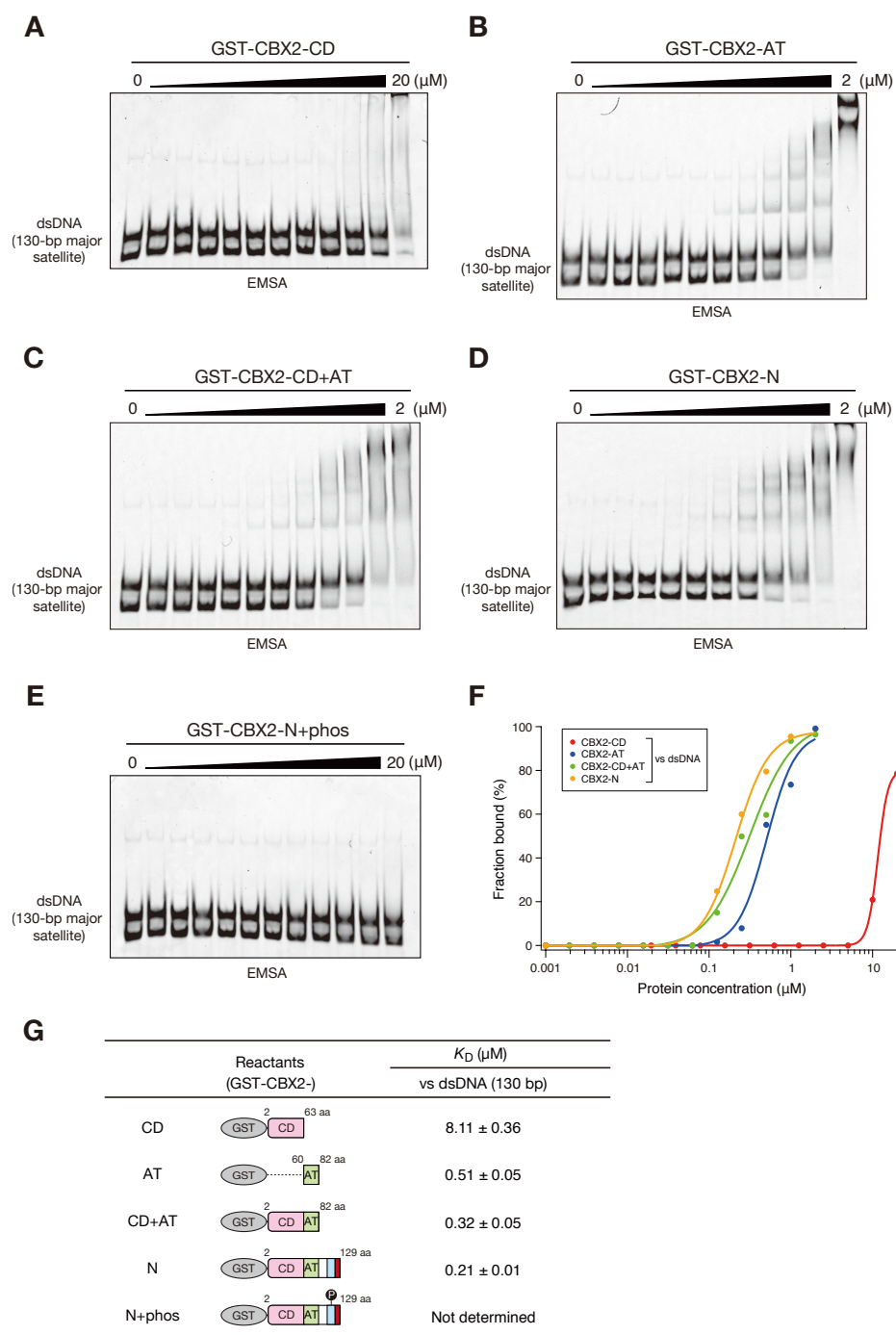


図 3-5 CK2 による CBX2-N のリン酸化は AT-hook の DNA 結合能を阻害する
 (A-E) GST-CBX2-CD, CBX2-AT, CBX2-CD+AT, CBX2-N 及びリン酸化 CBX2-N を用いたゲルシフトアッセイ。それぞれタンパク質を 1/2 ずつ段階希釈している。
 (F) 結合した DNA を定量化したグラフ。(G) グラフより算出した解離定数。

RNA との結合は非常に弱いものであるのに対し、AT、CD+AT、N は非常に強い RNA 結合能を持つことを見出した (図 3-6A-D, F, G)。また DNA と同様に CBX2-N は CK2 によって SR 領域がリン酸化されることによって RNA との結合が阻害されることが明らかとなった (図 3-6E-G)。これらの結果は、クロマチンに結合している RNA が CBX2 のクロマチン結合を調節し、さらに CK2 によるリン酸化が CBX2 の RNA との相互作用を調節する可能性を示唆している。

3-3-5 リン酸化 CBX2 の生理学的役割の解析

CBX2 の SR 領域のリン酸化の生理的役割の解明をするために、CBX2 をノックダウンした HEK293T 細胞に野生型及びリン酸化部位欠損型 CBX2 を発現させるレスキュー実験を行った。まず CBX2 の標的遺伝子を同定するために、HEK293T 細胞に CBX2 をターゲットとした siRNA を導入して CBX2 をノックダウンし、PRC1 の標的遺伝子の発現解析を行なった。その結果、HEK293T 細胞では *p21* (*CDKN1A*) 遺伝子発現が他の候補標的遺伝子に比べて顕著に CBX2 のノックダウンの影響を受けることを見出した (図 3-7A, B)。さらに過去の報告では、CD34 陽性細胞で CBX2 が直接 *p21* 遺伝子の発現を制御しているということが明らかにされている (van den Boom, V. et al., 2013)。そこで本研究では *p21* にターゲットを絞って遺伝子解析をすることにした。

まず野生型及び変異型 CBX2 プラスミドを作成し (図 3-7C)、CBX2 をノックダウンした細胞に発現させた (図 3-7D)。約 72 時間、各 CBX2 を発現させた後に *p21* 遺伝子の発現を解析したところ、野生型では CBX2 のノックダウンによって脱抑制されていた *p21* の発現抑制機能が回復することが確認できた (図 3-7E)。次に変異体を発現させたところ、SR、AR 領域及び CD 欠損変異体では野生型とは異なり *p21* の発現を抑制することができなかった (図 3-7E)。このことから CD に加えて SR 領域と AR 領域は CBX2 の細胞内での標的遺伝子の転写抑制機能に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

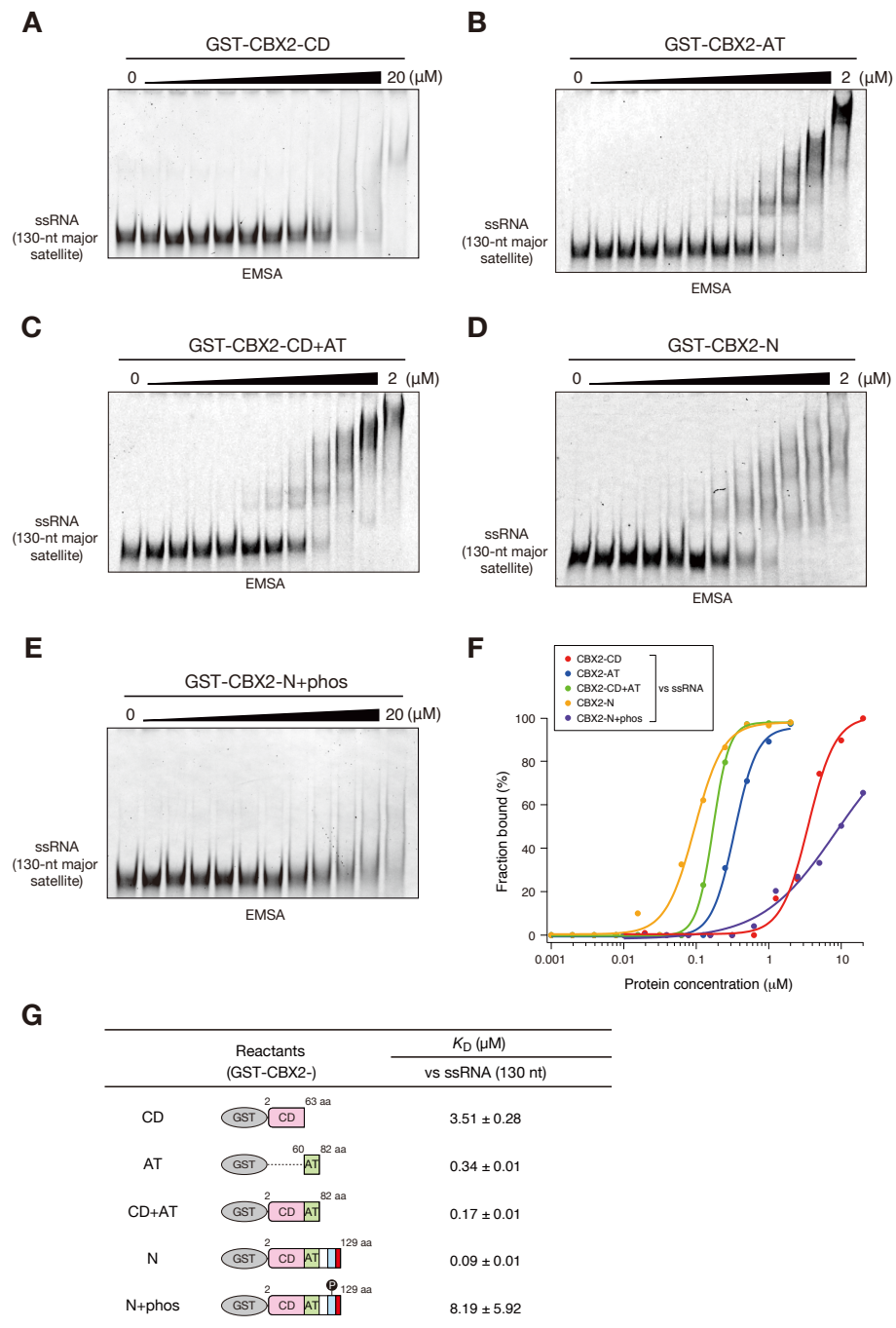


図 3-6 CK2 による CBX2-N のリン酸化は AT-hook の RNA 結合能を阻害する
 (A-E) GST-CBX2-CD, CBX2-AT, CBX2-CD+AT, CBX2-N 及びリン酸化 CBX2-N を用いたゲルシフトアッセイ。それぞれタンパク質を 1/2 ずつ段階希釈している。
 (F) 結合した RNA を定量化したグラフ。(G) グラフより算出した解離定数。

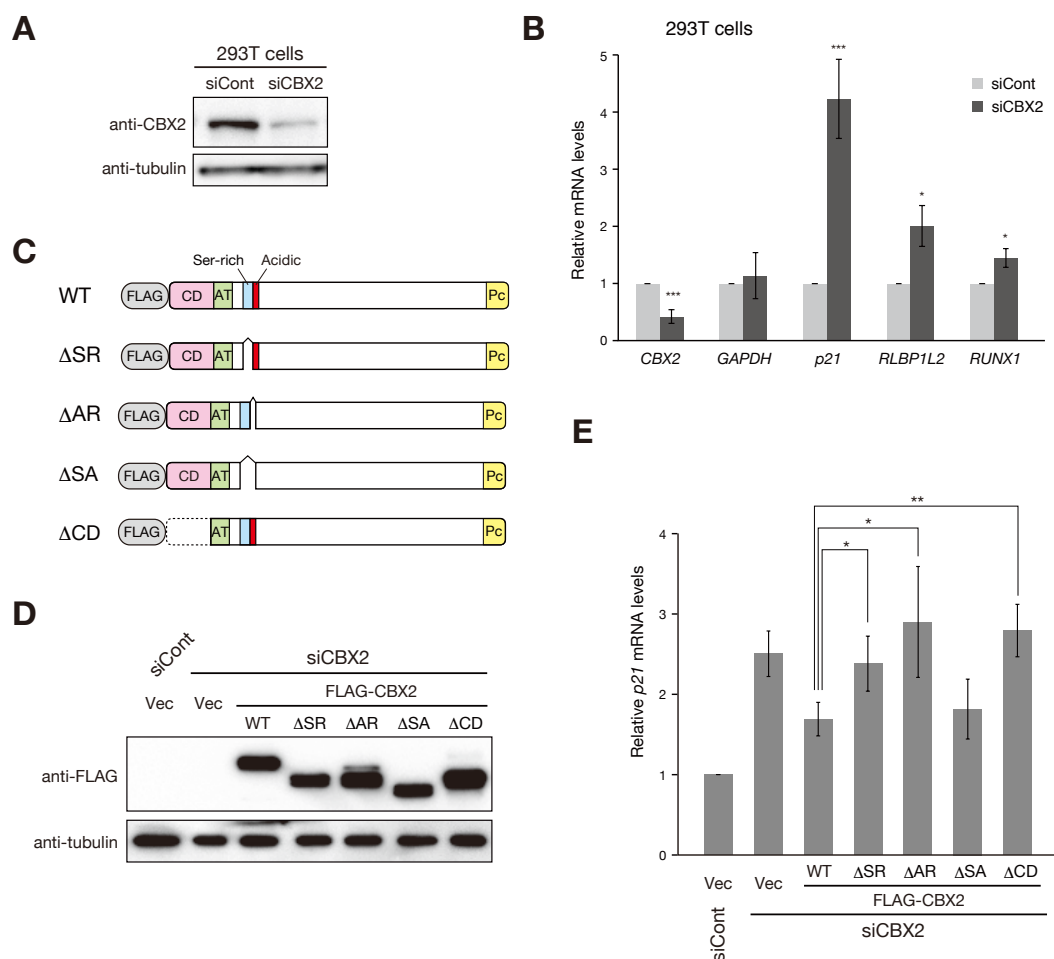


図 3-7 CBX2 の SR 及び AR 領域は *p21* 遺伝子の転写抑制に必要である

(A) HEK293T細胞でCBX2をノックダウンし、ウェスタンブロットでCBX2の発現を確認した。(B) CBX2ノックダウン細胞の遺伝子発現解析。*p21*、*RLBP1L2*、*RUNX1*はそれぞれPRC1のターゲット遺伝子として知られている。(C) レスキュー実験に用いたFLAG-CBX2の模式図。(D) CBX2ノックダウン細胞に発現させたFLAG-CBX2のウェスタンブロット。(E) 定量リアルタイム PCRによる*p21*遺伝子の発現解析。*β-ACTIN*の発現量で補正をしている。

3-4 考察

本研究では、ヒトの CBX2 が細胞内で SR 領域が主にリン酸化されており、そのリン酸化は H3K27me3 ヌクレオソームの結合特異性に重要であるということを示明らかにした。さらに細胞を用いた解析により、SR 領域が CBX2 の細胞内での機能に必須であることが分かった。

以前の報告では、マウスの Cbx2-CD の 42 番目のセリン残基 (S42) がリン酸化されていることが検出されていたが (Hatano *et al.*, 2010)、本研究の *in vitro* リン酸化アッセイでは S42 に明確なリン酸化が入ることは確認できなかった。別の報告では、マウスの Cbx2 は核移行や細胞増殖の際にリン酸化の状態が変化することが確認されている (Noguchi *et al.*, 2002)。また、本研究で用いた HEK293T 細胞ではほとんどの CBX2 がリン酸化されていたが、マウスと同様にヒトの他の細胞種や組織特異的にリン酸化の状態が異なる可能性があると考えられる。さらに、細胞種や組織によっては CD の S42 がリン酸化されることによって、SR 領域のリン酸化と共に H3K27me3 の結合を制御している可能性は考えられる (図 3-8)。本研究により、SR 領域が CBX2 の主なリン酸化領域であることは明らかにしたが、SR 領域の全てのセリン残基がリン酸化されているか否かは不明である。今後、質量解析等でリン酸化されているセリン残基を特定することや、セリン残基をアラニン置換した変異体を作製し、さらに詳細な解析をすることが必要である。

本研究により、SR 領域のリン酸化によって CBX2-AT の核酸結合能が抑制されることが明らかになった。しかし、注意深く解析をするとリン酸化 CBX2-N は弱い核酸結合が見られる。過去の報告では、CD と AT はそれぞれクロマチン結合に重要であることが見出されている (Tardat *et al.*, 2015)。したがって、CD のメチル化ヒストン結合能と SR 領域のリン酸化によって抑制された CBX2-N の弱い核酸結合能がクロマチン結合に貢献していると考えられる。さらに、ゲルシフトアッセイの結果より CBX2-AT は DNA よりも RNA の方が高い結合親和性があることを明らかにした (図 3-5, 6)。過去の報告で AT は DNA と結合することが明らかにされていたが (Aravind *et al.*, 1998)、RNA と結合することを明らかにしたのは本研究が初めてである。近年、様々なノンコーディング RNA が CD タンパク質のクロマチン結合に重要な役割を果たしていることが明らかになっている (Hamada *et al.*, 2014)。しかし、ノンコーディング RNA と PRC1 や CBX タンパク質との関係性は明らかになっていない点が多い。本研究はヒトの培養細胞

でリン酸化状態を解析し、ほとんどの CBX2 は恒常的にリン酸化されていることが確認されたが、組織や発生時期特異的にリン酸化状態が変化することでノンコーディング RNA と相互作用する可能性が考えられる。(図 3-8)

CBX2 の標的遺伝子のレスキュー実験では *p21* の発現に着目して解析を行った。過去の報告で CBX2 が直接 *p21* の発現を制御しているということが明らかにされているが (van den Boom, V. et al., 2013)、本研究では直接 CBX2 が制御しているという結果までは得ていない。したがって、クロマチン免疫沈降法などによって CBX2 が *p21* 遺伝子のプロモーター領域に結合しているか等の解析を行うことが今後の課題である。

CBX2 のクロマチン結合の分子機構のさらなる解明には核酸だけでなく他の因子との相互作用を解析することもヘテロクロマチン形成の分子機構の解明に重要であると考えられる。

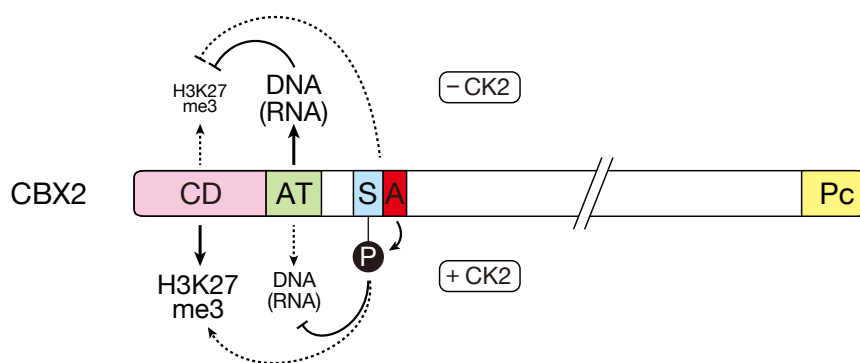


図 3-8 CBX2 の SR 領域のリン酸化修飾によるクロマチン結合のモデル図

3-5 参考文献

- Aranda, S., Mas, G., and Di Croce, L. (2015) Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci Adv.* **1**, e1500737
- Aravind, L., and Landsman, D. (1998) AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4413-4421
- Bel-Vialar, S., Core, N., Terranova, R., Goudot, V., Boned, A., and Djabali, M. (2000) Altered retinoic acid sensitivity and temporal expression of Hox genes in polycomb-M33-deficient mice. *Dev Biol.* **224**, 238-249
- Bernstein, E., Duncan, E.M., Masui, O., Gil, J., Heard, E., and Allis, C.D. (2006) Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol Cell Biol.* **26**, 2560-2569
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science.* **298**, 1039-1043
- Clermont, P.L., Crea, F., Chiang, Y.T., Lin, D., Zhang, A., Wang, J.Z., Parolia, A., Wu, R., Xue, H., Wang, Y., Ding, J., Thu, K.L., Lam, W.L., Shah, S.P., Collins, C.C., Wang, Y., and Helgason, C.D. (2016) Identification of the epigenetic reader CBX2 as a potential drug target in advanced prostate cancer. *Clin Epigenetics.* **8**, 16
- Czermin, B., Melfi, R., McCabe, D., Seitz, V., Imhof, A., and Pirrotta, V. (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell.* **111**, 185-196
- Di Croce, L., and Helin, K. (2013) Transcriptional regulation by Polycomb

group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* **20**, 1147–1155

Francis, N.J., Kingston, R.E., and Woodcock, C.L. (2004) Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science.* **306**, 1574–1577

Hatano, A., Matsumoto, M., Higashinakagawa, T., and Nakayama, K.I. (2010) Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem Biophys Res Commun.* **397**, 93–99

Hiragami-Hamada, K., Shinmyozu, K., Hamada, D., Tatsu, Y., Uegaki, K., Fujiwara, S., and Nakayama, J. (2011) N-terminal phosphorylation of HP1{alpha} promotes its chromatin binding. *Mol Cell Biol.* **31**, 1186–1200

Hiragami-Hamada, K. and W. Fischle (2014). "RNAs – physical and functional modulators of chromatin reader proteins." *Biochim Biophys Acta* **1839**(8): 737–742.

Ishida, M., Shimojo, H., Hayashi, A., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Uegaki, K., Nishimura, Y., and Nakayama, J. (2012) Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. *Mol Cell.* **47**, 228–241

Katoh-Fukui, Y., Miyabayashi, K., Komatsu, T., Owaki, A., Baba, T., Shima, Y., Kidokoro, T., Kanai, Y., Schedl, A., Wilhelm, D., Koopman, P., Okuno, Y., and Morohashi, K. (2012) Cbx2, a polycomb group gene, is required for Sry gene expression in mice. *Endocrinology.* **153**, 913–924

Kaustov, L., Ouyang, H., Amaya, M., Lemak, A., Nady, N., Duan, S., Wasney, G.A., Li, Z., Vedadi, M., Schapira, M., Min, J., and Arrowsmith, C.H. (2011) Recognition and specificity determinants of the human cbx chromodomains. *J Biol Chem.* **286**, 521–529

- Kawamura, A., Yokota, S., Yamada, K., Inoue, H., Inohaya, K., Yamazaki, K., Yasumasu, I., and Higashinakagawa, T. (2002) *pc1* and *pscl*, zebrafish homologs of *Drosophila* Polycomb and Posterior sex combs, encode nuclear proteins capable of complex interactions. *Biochem Biophys Res Commun.* **294**, 456–463
- Min, J., Zhang, Y., and Xu, R.M. (2003) Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. *Genes Dev.* **17**, 1823–1828
- Morey, L., Pascual, G., Cozzuto, L., Roma, G., Wutz, A., Benitah, S.A., and Di Croce, L. (2012) Nonoverlapping functions of the Polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* **10**, 47–62
- Muller, J., Gaunt, S., and Lawrence, P.A. (1995) Function of the Polycomb protein is conserved in mice and flies. *Development.* **121**, 2847–2852
- Muller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E., and Simon, J.A. (2002) Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* Polycomb group repressor complex. *Cell.* **111**, 197–208
- Nishibuchi, G., Machida, S., Osakabe, A., Murakoshi, H., Hiragami-Hamada, K., Nakagawa, R., Fischle, W., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., Tagami, H., and Nakayama, J. (2014) N-terminal phosphorylation of HP1 α increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Res.* **42**, 12498–12511
- Noguchi, K., Shiurba, R., and Higashinakagawa, T. (2002) Nuclear translocation of mouse polycomb m33 protein in regenerating liver. *Biochem Biophys Res Commun.* **291**, 508–515
- Pinna, L.A. (2002) Protein kinase CK2: a challenge to canons. *J Cell Sci.*

Senthilkumar, R., and Mishra, R.K. (2009) Novel motifs distinguish multiple homologues of Polycomb in vertebrates: expansion and diversification of the epigenetic toolkit. *BMC Genomics*. **10**, 549

Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J.R., Wu, C.T., Bender, W., and Kingston, R.E. (1999) Stabilization of chromatin structure by PRC1, a Polycomb complex. *Cell*. **98**, 37–46

Simon, J.A., and Kingston, R.E. (2013) Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. *Mol Cell*. **49**, 808–824

Tardat, M., Albert, M., Kunzmann, R., Liu, Z., Kaustov, L., Thierry, R., Duan, S., Brykczynska, U., Arrowsmith, C.H., and Peters, A.H. (2015) Cbx2 targets PRC1 to constitutive heterochromatin in mouse zygotes in a parent-of-origin-dependent manner. *Mol Cell*. **58**, 157–171

van den Boom, V., Rozenveld-Geugien, M., Bonardi, F., Malanga, D., van Gosliga, D., Heijink, A.M., Viglietto, G., Morrone, G., Fusetti, F., Vellenga, E., and Schuringa, J.J. (2013) Nonredundant and locus-specific gene repression functions of PRC1 paralog family members in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood*. **121**, 2452–2461

Yap, K.L., Li, S., Munoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.M. (2010) Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*. **38**, 662–674

Zhen, C.Y., Duc, H.N., Kokotovic, M., Phiel, C.J., and Ren, X. (2014) Cbx2 stably associates with mitotic chromosomes via a PRC2- or PRC1-independent

mechanism and is needed for recruiting PRC1 complex to mitotic chromosomes.

Mol Biol Cell. **25**, 3726–3739

第四章 結論

本研究により、Suv39h1-CD が強い核酸結合能を持つことを見出した。さらに培養細胞を用いた解析から、Suv39h1 が実際に CD を介してセントロメア近傍から発現している major satellite RNA と結合することを見出した。Suv39h1 のターゲティング機能はこれまでにほとんど報告がされていないことから、本研究は哺乳類の構成的ヘテロクロマチン形成の確立機構の解明の糸口になることが期待される。また、本研究によって、過去にほとんど明らかになっていなかった、セントロメア近傍から発現する major satellite RNA の新たな機能を発見することができたと考えられる。

クロマチン分画法によって Suv39h1 の大半はクロマチン画分に存在するということを見出した (図 2-5)。すなわち Suv39h1 と結合している major satellite RNA の大半もクロマチン上に存在しているということが考えられる。また、Suv39h1-CD の RNA 結合能が安定的にヘテロクロマチン領域に結合するために重要な役割を果たすことを示した。これらのことから Suv39-CD の RNA 結合能及びクロマチン上の major satellite RNA は、ヘテロクロマチンの維持機構にも重要な役割を果たしていることが明らかになった。

Suv39h1 の RNA 結合能が自身の標的クロマチン領域へのターゲティングに重要であることを見出したが、RNA 結合変異体を発現させた細胞の DAPI-dense 領域の H3K9me3 は、発現 6 日後には野生型と同等まで回復するということが分かった。しかし今回の解析は major satellite 領域以外の領域にどのような影響があるのかは解析をしていない。すなわち RNA もしくは H3K9me3 と結合できない変異体はセントロメア近傍を正確に認識できず、それ以外の領域の H3K9 をメチル化している可能性があると考えられる。事実、図 2-6 で RNA 結合及び H3K9me3 結合変異体 Suv39h1 は野生型とは異なり、ユークロマチン領域にも局在するという結果を得た。今回は解析を遂行しなかったが、変異体を用いた ChIP-seq 等でゲノムワイドに Suv39h1 及び H3K9me3 の局在を解析することによって、Suv39h1-CD の RNA 結合能のさらなる重要性が見出されるであろう。また、以上のことから Suv39h1-CD の major satellite RNA との結合はセントロメア近傍領域だけに正確にメチル化を導入するために必須な機能であることが考えられる。今後、Suv39h1 だけに限らずヘテロクロマチン因子の標的クロマチン領域への結合の分子機構を解析する上で、major satellite RNA との結合を解析することが重要視されるであろう。

本研究で CBX2 の SR 領域が CK2 によってリン酸化され、さらにそのリン酸化

が H3K27me3 ペプチド及びヌクレオソームへの結合特異性を高めることを見出した。また、当研究室の以前の報告で、HP1 α の CK2 によるリン酸化が同様な制御機構を持つことを見出している。これらのことから、CD タンパク質が核酸結合能を持ち、リン酸化によってヌクレオソームへの結合特異性を制御するという分子機構は非常に保存されていると考えられる。また、本研究では HEK293T 細胞株を用いて解析を行ったが、リン酸化されていない CBX2 はほとんど確認をすることができなかった (図 3-2)。しかし、他の細胞種やマウスの組織ではリン酸化状態は異なることが予想される (Noguchi *et al.*, 2002)。したがって CBX2 のリン酸化抗体等で詳細な解析を行えば CBX2 の分子機能のさらなる解明につながる事が期待できる。

CBX2 は、一般的に PRC2 が導入した H3K27me3 に CD を介して結合することによって PRC1 タンパク質群を呼び込み、条件的ヘテロクロマチン構造を形成すると考えられている。しかし、過去の生化学的な研究結果では、CBX2 の H3K27me3 結合は HP1 の H3K9me3 結合と比較して非常に弱く、CD の結合だけでは不十分だということが示唆されていた。本研究によって明らかになった AT の核酸結合能は CBX2-CD の弱いメチル化ヒストン結合能を補い、協調的に働いて標的クロマチン領域に結合しているということが示唆されている。また、図 3-6 のゲルシフトアッセイの結果より、CBX2 は RNA と相互作用をすることを見出した。実際に細胞内で RNA と結合するかの検討は行っていないが、CD タンパク質がノンコーディング RNA と結合することがいくつも報告されていることから、CBX2 が細胞内で RNA と結合していることは十分に考えられる。今後、CBX2 と RNA との結合が明らかになることで CBX2 のクロマチン結合のさらなる解明につながる事が期待される。

構成的及び条件的ヘテロクロマチンは一般的には同じ領域で構造を取ることではない。しかし過去の興味深い報告で、Suv39h 欠損細胞ではセントロメア近傍の major satellite 領域に H3K27me3 が集積し、Cbx2 も結合していることが報告されている (Tardat *et al.*, 2015)。この現象は Suv39h 欠損によるヘテロクロマチンの破綻から凝縮構造を維持しようとする機能が働いているため引き起こされると考えられるが、詳細な分子機構は不明である。本研究によって Suv39h1 が major satellite RNA によってリクルートされること、CBX2 が RNA 結合能を持つことを見出された。したがって Suv39h 欠損細胞では Cbx2 が major satellite RNA と結合し、セントロメア近傍にリクルートされている可能性は十分にあると

考えられる。本研究は Suv39h1、PRC タンパク質、major satellite RNA の関係性を明らかにする糸口になることが期待される。

本研究によって major satellite RNA 及び H3K9me3 結合能が Suv39h1 のクロマチン結合に重要な役割を果たしていることを見出した。一方で、発生や分化段階で形成される条件的ヘテロクロマチン形成に必須である H3K27 のトリメチル化酵素群の PRC2 も、ノンコーディング RNA によって標的領域にリクルートされると考えられている (Aranda *et al.*, 2015)。さらに本研究によって、CBX2 は HP1 α と同様に、CK2 によるリン酸化がメチル化された H3 を含むヌクレオソームの結合特異性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。これらのことから、構成的及び条件的ヘテロクロマチンは、因子は異なるが、共通の分子機構によって凝縮構造を形成していると考えられる。今後、ヘテロクロマチン形成の分子機構の解析には核酸結合やタンパク質の化学修飾を考慮することが重要であると考えられる。

研究業績

参加学会一覧

1. 川口隆之、町田晋一、村越大夢、胡桃坂仁志、中山潤一
CBX2によるH3K27me3ヌクレオソーム認識の分子機構
名市大エピジェネティクス研究会 合同リトリート、2016年9月、愛知、口頭発表
2. 川口隆之、白井温子、村松大輔、石田真由美、眞貝洋一、中山潤一
ヒストンメチル化酵素Suv39h1によるクロマチン制御機構の解明
第7回高次クロマチン研究会、島根大学、2016年8月、口頭発表
3. 川口隆之、町田晋一、村越大夢、胡桃坂仁志、中山潤一
クロモドメインタンパク質 CBX2 の核酸結合能とその機能の解析
第38回日本分子生物学会、神戸、2015年12月、1P0622
4. 川口隆之、町田晋一、村越大夢、胡桃坂仁志、中山潤一
CBX2 による H3K27me3 ヌクレオソーム認識の分子機構
名市大エピジェネティクス研究会 合同リトリート、豊田、2015年10月、口頭発表
5. 川口隆之、町田晋一、村越大夢、胡桃坂仁志、中山潤一
CBX2 による H3K27me3 ヌクレオソーム認識の分子機構
第6回高次クロマチン研究会、明星大学、2015年9月、口頭発表
6. Takayuki Kawaguchi, Shinichi Machida, Hiromu Murakoshi, Hitoshi Kurumizaka, and Jun-ichi Nakayama
Mechanisms of H3K27me3-nucleosome binding by CBX2
International Symposium 『Non-coding DNA and Chromosomal Integrity』
August 2015, Awaji island, Japan, P-21

7. 川口隆之、町田晋一、村越大夢、胡桃坂仁志、中山潤一
クロモドメインタンパク質 CBX2 の機能解析
第5回高次クロマチン研究会、北海道大学、2014年9月、口頭発表
8. 川口隆之、町田晋一、村越大夢、胡桃坂仁志、中山潤一
クロモドメインタンパク質 hsCBX2 の機能解析
第1回名市大エピジェネティクス研究会、長野、2014年9月、口頭発表
9. 川口隆之、白井温子、村松大輔、石田真由美、眞貝洋一、中山潤一
Suv39h1のヘテロクロマチン局在には自身のクロモドメインを介した核酸結合が重要な役割を果たす
第8回日本エピジェネティクス研究会、2014年5月、一橋講堂、P-114

関連発表論文一覧

Shirai A*, **Kawaguchi T***, Shimojo H, Muramatsu D, Ishida-Yonetani M, Nishimura Y, Kimura H, Nakayama JI and Shinkai Y. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *eLIFE*, accepted. *Equal contribution.

Kawaguchi T, Machida S, Kurumizaka H, Hideaki Tagami and Nakayama J. Phosphorylation of CBX2 controls its nucleosome-binding specificity. *Journal of Biochemistry*, in press.

謝辞

博士課程時を含め約 4 年半、一から全てご指導していただいた中山潤一先生に感謝致します。日々ディスカッションをしていただき、たくさんのアドバイスをいただきましたシステム自然科学研究科准教授の田上英明先生に心より感謝申し上げます。

中山研究室の皆様のおかげでここまで来ることができたと思っております。大屋恵梨子さんには毎日夜遅くまでアドバイスをいただき、本当に感謝しております。金沢大学の堀家慎一先生には博士入学前から現在まで大変お世話になりました。

共同研究では理化学研究所の眞貝洋一先生、白井温子さん、東京工業大学の木村宏先生、早稲田大学の胡桃坂仁志先生、町田晋一さん、横浜市立大学の西村善文先生に大変お世話になりました。

最後に、いつも支えてくれた家族と母親に深く感謝の意を述べさせていただきます。