

# 修士学位論文

## ヒストン修飾およびクロマチン構造 変化による転写制御機構の解明

指導教授

廣田 耕志

教授

平成 29年 2月 17日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 分子物質化学専攻

学修番号 15880302

足立 朗

## 学位論文要旨（修士（理学））

足立 朗

### ヒストン修飾およびクロマチン構造変化による 転写制御機構の解明

#### 【序論】

核内に存在する DNA はヒストンタンパク質に巻き付くことでヌクレオソームを形成し、それらが高次に凝集することによってクロマチン構造を形成している (Fig.1)。転写をはじめとする様々な DNA を基質とする生化学反応は、ヒストンタンパク質の化学的修飾とクロマチン構造の凝縮・弛緩によって制御されている。転写は SAGA アセチル化酵素複合体によるヒストンタンパク質のアセチル化と、その後のアセチル化ヒストンを目印として動員されるリモデリング因子によるクロマチン再構成によって、緩んだ構造のクロマチンが形成されることによって活性化される (Fig.2)。ヒトにおけるこれらの因子の変異は、発ガンリスクの上昇や重篤な遺伝的疾患につながるといわれているが、その詳細な理由については未解明な部分が多く残されている。私の所属研究室では、モデル系としてグルコース飢餓により転写活性化される *fbp1* 遺伝子のクロマチン再構成の研究を行い、これまでに、非コード RNA の転写と共役した上流からの段階的なクロマチン構造変化を伴う転写活性化機構を発見している [1]。私は、*fbp1* 遺伝子をモデル系として、ヒストン修飾とクロマチン構造変化による転写制御機構の詳細なメカニズムの解明を目指し研究を行った。

#### 【結果・考察】

クロマチン構造の解析のため、球菌ヌクレアーゼを用いてクロマチンの限定消化を行った。この実験では、クロマチン構造が弛緩していると球菌ヌクレアーゼがヌクレオソーム形成していない DNA を消化し、クロマチン構造が密であると消化できない性質を利用して、クロマチン構造が凝集しているか弛緩しているか調べることができる [2]。また、*fbp1* mRNA の転写状態を見るために

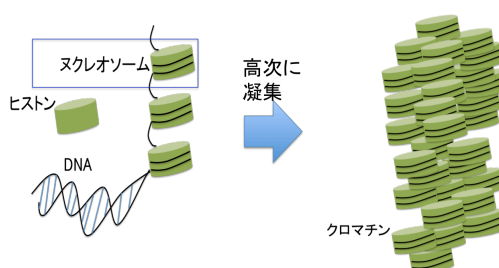


Fig.1 クロマチン構造の概略図

#### SAGAアセチル化酵素複合体

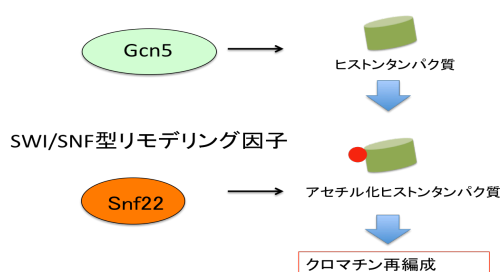


Fig.2 ヒストンアセチル化とリモデリング因子によるクロマチン再構成のモデル

Northern Blot 解析 も行った。ヒストンの修飾状況は、クロマチン免疫沈降実験で解析した。グルコース飢餓時における *fbp1* 遺伝子の転写は、プロモーター上流領域からの段階的なクロマチン再編成によって制御される。グルコース飢餓時における *fbp1* 遺伝子上流のヒストンアセチル化は、クロマチン再編成と同じタイミングで起こることから、ヒストンアセチル化と転写活性化の相関が見出せる。ヒストンアセチル化酵素 Gcn5 とブロモドメインを持った SWI/SNF リモデリング因子 Snf22 の二つのタンパク質に注目し解析を行ったところ、それぞれの遺伝子破壊によって転写活性化が部分的に不良となった。また、Gcn5 と Snf22 の 2 重破壊によって、完全に *fbp1* 遺伝子の転写活性化が見られなくなった。また、同じ遺伝子破壊株においてクロマチン構造解析を行ったところ、Snf22 欠損株において上流からのクロマチン構造変化が起こらなくなり、TATAbox 周辺のみクロマチンが開くことで転写活性化することが判明した。また、Gcn5 と Snf22 の 2 重破壊によって、Snf22 欠損株で見られた TATAbox 周辺のみクロマチン構造変化が見られなくなった。このことから、ヒストンアセチル化とリモデリング因子が独立に転写活性化に寄与することが示唆された。また、他のリモデリング因子と Gcn5 の関係を調べるために CHD ファミリーのリモデリング因子である Hrp3 の欠損株における転写活性化を調べたところ、転写活性化が不良となり、Snf22 との 2 重欠損によって *fbp1* 転写活性化が全く見られなくなった。また、興味深いことに Gcn5 と Hrp3 の二重欠損においても *fbp1* の転写活性化が見られなくなった。これらの結果は、これら 3 つの因子がそれぞれ別々に *fbp1* 転写活性化に寄与していることを示唆している。

#### 【展望】

これまでヒストンアセチル化とブロモドメインタンパク質によるアセチル化ヒストンの認識は連続的に行われ、同一経路で働くと考えられていたが、本研究ではヒストンアセチル化がブロモドメインを持った SWI/SNF リモデリング因子 Snf22 と独立で働きうることを発見した。分裂酵母には 13 種のブロモドメインを持ったタンパク質があり、Gcn5HAT と協調的に機能する分子経路を今後解明したい。

#### 【参考文献】

- [1] Hirota, K., Miyoshi, T., Kugou, K., Hoffman, C. S., Shibata, T., and Ohta, K. Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456, 130-135 (2008)
- [2] Hirota, K., Hoffman, C.S., Shibata, T. and Ohta, K. (2003) Fission yeast Tup1-like repressors repress chromatin remodeling at the *fbp1*<sup>+</sup> promoter and the *ade6-M26* recombination hotspot. *Genetics*, 165, 505-515.

# 目次

略語一覧(p3)

## 1. 序論(p4-6)

- 1.1 クロマチン構造
- 1.2 ヒストン修飾およびヒストンアセチル化酵素
- 1.3 クロマチン構造変化とリモデリング因子
- 1.4 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子
- 1.5 研究の目的

## 2. 使用した試薬および実験方法(p7-27)

### 2.1 試薬

#### 2.1.1 購入試薬・キット

#### 2.1.2 調整試薬

### 2.2 実験で使用した装置

### 2.3 実験に用いた分裂酵母株

### 2.4 実験に用いたプライマー

### 2.5 実験操作

- アガロースゲル電気泳動
- エタノール沈殿
- PCR
- ゲル精製
- TOP0クローニング
- ライゲーション
- 形質転換（大腸菌）
- ミニプレ
- フェノール・クロロホルム抽出
- Slice法を用いた欠損株作成
- 酵母ゲノムDNAの抽出
- 形質転換（酵母）
- Southern blotting
- ハイブリダイゼーション
- Northern blotting
- ヘキストを用いたDNA濃度測定

- クロマチン解析
  - クロマチン免疫沈降
3. 結果と考察 (p28-37)
    - 3.1 Snf22 および Gcn5 による分裂酵母 *fbp1* 転写制御機構の解明
    - 3.2 Gcn5 依存的に働くクロマチンリモデリング因子の探索
      - 3.2.1 Snf21 および Snf22 による転写制御機構
      - 3.2.2 Swr1、Ino80 および Snf22 による転写制御機構の解明
      - 3.2.3 Hrp1、Hrp3 および Snf22 による転写制御機構の解明
    - 3.3 Gcn5 および Hrp3 による転写制御機構の解明
    - 3.4 Snf22 および Hrp3 とヒストン H3 アセチル化の関係性の解明
    - 3.5 まとめと考察
  4. 参考文献 (p38-39)
- 謝辞 (p40)

## 略語一覧

|        |   |
|--------|---|
| AcOH   | acetic acid   |
| ADCR   | ATP dependent chromatin remodeler   |
| Amp    | ampicilin   |
| ATP    | adenosine triphosphate  |
| bp     | base pair   |
| dCTP   | deoxycytidine triphosphate  |
| DDW    | distilled deionized water   |
| DMSO   | dimethyl sulfoxide  |
| dNTP   | deoxynucleotide triphosphate  |
| EDTA   | ethylenediaminetetraacetic acid   |
| EGTA   | ethylene glycol bis ( $\beta$ -aminoethylether) -N, N, N, N' - tetraacetic acid |
| HAT    | histone acetyltransferase   |
| HEPES  | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid                              |
| IP     | immunoprecipitation   |
| KOAc   | potassium acetate   |
| Kan    | Kanamycin   |
| LiOAc  | lithium acetate   |
| MNase  | micrococcal nuclease  |
| MOPS   | 3-Morpholinopropanesulfonic   |
| NaOAc  | sodium acetate  |
| ORF    | open reading frame  |
| PBS    | phosphate buffered saline   |
| PCR    | polymerase chain reaction   |
| PEG    | Polyethylene glycol   |
| qPCR   | quantitative PCR  |
| RNAPII | RNA polymerase II   |
| rpm    | rotation per minute   |
| RT     | room temperature  |
| SDS    | sodium dodecyl sulfate  |
| TBS    | tris buffered saline  |
| UAS    | upstream activation sequence  |
| 2ME    | 2-mercaptoethanol   |

## 1 序論

### 1.1 クロマチン構造

生物は遺伝情報を DNA 上の塩基配列として記録しており、真核生物においては細胞内の核にゲノム DNA を格納している。長大な分子であるゲノム DNA は、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 が 2 分子ずつによって構成されるコアヒストンというタンパク質に約 2 周巻き付くことでヌクレオソームを形成し、それらが高度に凝集することによってクロマチン構造を形成している<sup>1</sup> (Fig. 1)。クロマチン構造は、ゲノム DNA を細胞内に凝集させ格納し、物理的なダメージから保護することに有効な反面、DNA を基質とする生化学反応には阻害的に働く。しかし、真核生物はクロマチン構造の凝集、弛緩を利用することで、転写や複製、DNA 修復など様々な生化学反応の制御を行う機構を持っている<sup>2</sup>。

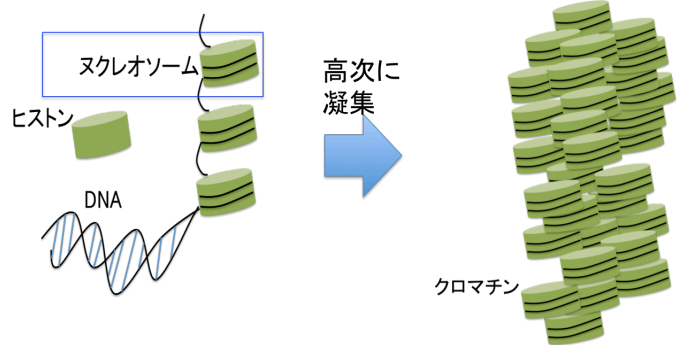


Fig.1 クロマチン構造の概略図

### 1.2 ヒストン修飾およびヒストンアセチル化酵素

ヒストンの N 末端はヒストンテールとよばれ、ヌクレオソーム外部に露出している<sup>2</sup>。ヒストンへのアセチル化やメチル化などの化学的修飾は主にヒストンテール部分にあるリジン残基やセリン残基に行われ、様々な制御につながる<sup>2</sup>。アセチル基を導入する因子を Histone Acetyltransferase (HAT) とよび、いくつかのサブファミリーに分かれる。その中の 1 つに GNAT ファミリーに属する Gcn5

#### SAGA アセチル化酵素複合体

#### SWI/SNF 型リモデリング因子

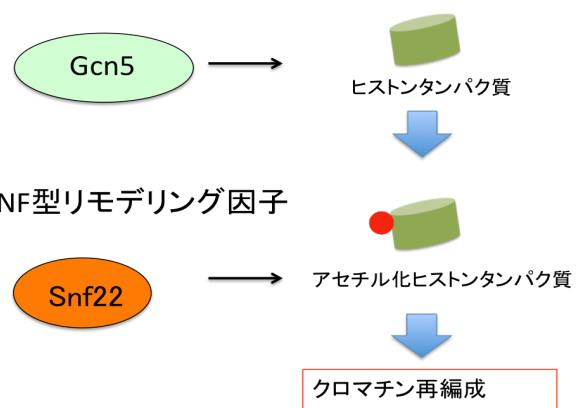


Fig.2 ヒストンアセチル化とリモデリング因子によるクロマチン再構成のモデル

を触媒サブユニットとする SAGA アセチル化酵素複合体がある<sup>3</sup>。遺伝子が発現する際、遺伝子領域上流に mRNA を転写する RNA ポリメラーゼ複合体が結合することが必要であるが、クロ

マチンが密な構造をとっている場合、RNA ポリメラーゼ複合体の接近性が制限され、mRNA を転写することができない。そこで、Gcn5 を触媒サブユニットとする SAGA アセチル化酵素複合体が遺伝子領域のプロモーター領域に存在するヒストン H3 の 9 番目のリジンにアセチル基を導入する<sup>3</sup>。そして、Snf22 を活性サブユニットに持つ SWI/SNF 型リモデリング因子が ATP 依存的にクロマチン構造を緩んだ状態に再構成することによって、遺伝子領域を開いた構造となり遺伝子の発現が可能になることが知られている<sup>4</sup>。(Fig. 2) また、SAGA コンプレックスの他に MYST ファミリーに属する NuA4 コンプレックスなどの HAT があり、修飾されるヒストンやリジン残基の位置がそれぞれ異なり、制御機構もそれぞれ異なる<sup>2,3</sup>。

### 1.3 クロマチン構造変化とリモデリング因子

ATP 依存的にクロマチン構造変化を起こす因子を ATP Dependent Chromatin Remodeler (ADCR) とよび、分子構造や機能によってサブファミリーに分かれている<sup>5</sup>。真核生物においてそれら因子は広く保存され、生体において重要な役割を持っている。サブファミリーの 1 つに SWI/SNF ファミリーのリモデリング因子があり、SWI/SNF 型リモデリング因子が含まれている<sup>5</sup>。SWI/SNF 型リモデリング因子はプロモーター領域のクロマチン構造を変化することによって、遺伝子の発現制御をすることが知られている<sup>6</sup>。このリモデリング因子は、分子内にヒストンアセチル化を認識するブロモドメインを持っており、HAT によるヒストンアセチル化を認識しすることでクロマチン構造変化を行う<sup>6</sup> (Fig. 2)。また、SWI/SNF ファミリーの他に、分子内にクロモドメインを持つ CHD ファミリーや、ヒストンバリエーションの交換反応を行う INO80 ファミリーのリモデリング因子があり、転写活性化に寄与すると言われている<sup>7,8</sup>。ヒトにおけるこれらの因子の変異は、発ガンのリスクの上昇や重篤な遺伝的疾患につながるといわれているが、その詳細な理由は未解明な部分が多い<sup>9,10</sup>。

### 1.4 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子

分裂酵母 *fbp1* 遺伝子は fructose-1, 6-bisphosphatase をコードする遺伝子で、糖新生に必要な遺伝子である。*fbp1* 遺伝子は、グルコースが豊富な条件下で、転写が抑制されているが、グルコース飢餓ストレスに応答し転写活性化される<sup>11,12</sup>。*fbp1* 上流には UAS1、UAS2 という 2 つ cis-regulatory element が存在することが知られ、Atf1 が UAS1 に結合し Rst2 が UAS2 に結合することで転写制御が行われることが分かっている<sup>13</sup>。当研究室では、*fbp1* 遺伝子領域上流から段階的なクロマチン構造変化と共役した metabolic stress induced long non-coding



RNA (mlon RNA) と呼ばれる長鎖ノンコーディングRNAが転写されることを明らかにした<sup>14</sup>。(Fig. 3)。

#### グルコース豊富

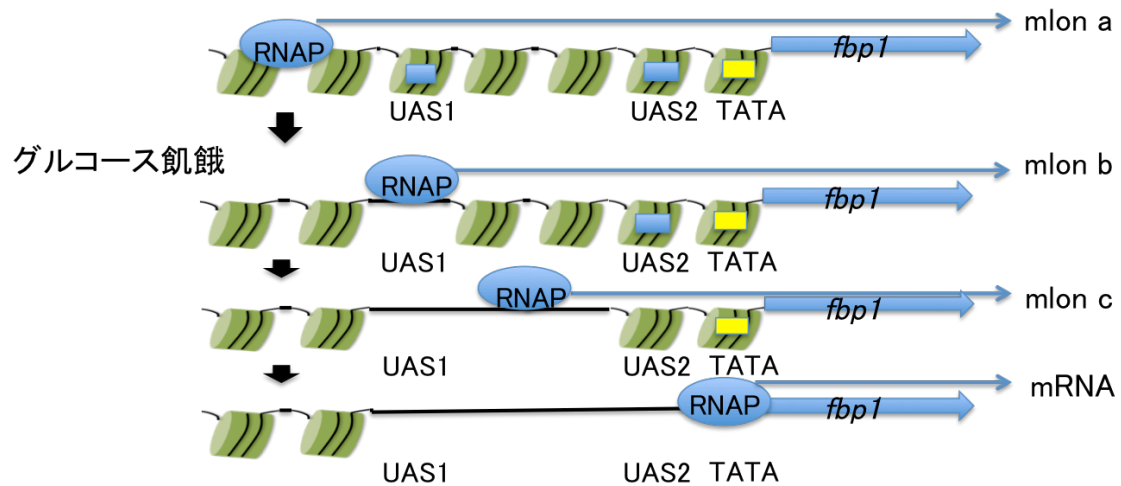


Fig.3 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子転写における上流からの段階的なクロマチン構造変化と共役したノンコーディング RNA の転写

### 1.5 研究の目的

ヒストン修飾とクロマチン構造変化による転写制御機構の基本的な部分、つまりどの修飾がどのような機能を持つか、もしくはどのリモデリング因子がクロマチン構造変化を起こすかなどは解明が進められつつある。しかし、実際に転写制御の詳細なメカニズムに関しては未知な部分が多く、また多くの遺伝子の発現制御に関わる重要なステップである。本研究では、分裂酵母 *fbp1* 遺伝子をモデルケースとして用い、ヒストン修飾とクロマチン構造変化による転写制御の詳細なメカニズムの解明を目指して研究を行った。

## 2 使用した試薬および実験方法

### 2.1 試薬

#### 2.1.1 購入試薬・キット

|  |            |
|--|------------|
| AcOH(試薬特級)                                     | 和光純薬       |
| Adenine(試薬一級)                                  | 和光純薬       |
| Agarose  | ナカライ       |
| Amersham Megaprime DNA Labeling System         | GE         |
| Anti-Histone H3 antibody                       | abcam      |
| Anti-Acetyl-Histone H3 antibody                | millipore  |
| Bacto Agar                                     | BD         |
| Bacto Trypton                                  | BD         |
| Bacto Yeast Extract                            | BD         |
| Bromophenol blue (試薬特級)                        | 和光純薬       |
| BSA  | ナカライ       |
| CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (分子生物学用) | 和光純薬       |
| <i>Cl</i> aI                                   | NEB        |
| complete EDTA free                             | Roche      |
| Difco yeast nitrogen base w/o amino acid       | BD         |
| DMSO (分子生物学用)                                  | 和光純薬       |
| DTT (SH 基酸化防止用)                                | 和光純薬       |
| Dynabeads ProteinA                             | Novex      |
| EDTA   | SIGMA      |
| EGTA   | 東京化学工業     |
| Ethanol (試薬特級)                                 | 和光純薬       |
| Ex taq   | TaKaRa     |
| Ficoll 400                                     | SIGMA      |
| Formaldehyde solution (分子生物学用)                 | 和光純薬       |
| GeneArt® Seamless Cloning and Assembly kit     | Invirtogen |
| Gen とるくん                                       | TaKaRa     |
| Glucose (試薬特級)                                 | 和光純薬       |
| Glycerol (試薬特級)                                | 和光純薬       |
| Glycine (試薬特級)                                 | 和光純薬       |

|   |            |
|---|------------|
| Glycogen  | Roche      |
| G50 カラム   | GE         |
| HCl (試薬特級)  | 和光純薬       |
| HEPES   | SIGMA      |
| Histidine (試薬特級)                                      | 和光純薬       |
| Hoechst   | 同仁化学研究所    |
| HpaI  | NEB        |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (試薬特級)                 | 和光純薬       |
| IGEPAL CA-630   | SIGMA      |
| KCl (試薬特級)  | 和光純薬       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (試薬特級)                | 和光純薬       |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (試薬特級)                | 和光純薬       |
| KOAc (試薬特級)   | 和光純薬       |
| KOH (試薬特級)  | 和光純薬       |
| Leucine (試薬特級)  | 和光純薬       |
| Ligation high   | TOYOBO     |
| LiCl  | ナカライ       |
| LiOAc (試薬特級)  | 和光純薬       |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (試薬特級)          | 和光純薬       |
| MgSO <sub>4</sub> (試薬特級)                              | 和光純薬       |
| MNase   | Roche      |
| MOPS  | SIGMA      |
| NaCl (試薬特級)   | 和光純薬       |
| Na-deoxycholate                                       | SIGMA      |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O | 国産化学       |
| NaOAc · 3H <sub>2</sub> O (アミノ酸自動分析用)                 | 和光純薬       |
| NaOH (試薬特級)   | 和光純薬       |
| Nicotinic Acid  | ナカライ       |
| NH <sub>4</sub> OAc (試薬特級)                            | 和光純薬       |
| OrangeG   | WALDECK    |
| pCR-Blunt II-TOPO                                     | invitrogen |
| PEG4000   | ナカライ       |
| PEG6000   | ナカライ       |
| Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol (25:24:1)       | ナカライ       |
| Primestar GXL   | TaKaRa     |

|                                    |                |
|------------------------------------|----------------|
| Proteinase K (遺伝子研究用)              | 和光純薬           |
| <i>Pst</i> I                       | Takara         |
| RNaseA                             | ナカライ           |
| SDS                                | ナカライ           |
| <i>Sna</i> BI                      | NEB            |
| Sorbitol (試薬一級)                    | 和光純薬           |
| <i>Sph</i> I                       | NEB            |
| THUNDERBIRD SYBR qPCR mix          | TOYOBO         |
| Tris (試薬特級)                        | 和光純薬           |
| Trisodium citrate dihydrate (試薬特級) | 和光純薬           |
| TritonX-100                        | MP Biomedicals |
| Uracil (試薬特級)                      | 和光純薬           |
| Xylene cyanol (試薬特級)               | 和光純薬           |
| Zymolyase 100T                     | ナカライナカライ       |
| $\alpha$ 32P-dCTP                  | パーキンエルマー       |
| $\lambda$ EcoT14I                  | TaKaRa         |
| 2-mercaptoethanol (分子生物学用)         | 和光純薬           |
| 2-propanol (試薬特級)                  | 和光純薬           |
| 10×cutsmart buffer                 | NEB            |
| 10×loading dye                     | TaKaRa         |
| ガラスビーズ                             | 安井器械           |
| ジルコニアビーズ                           | 安井器械           |
| ゲル精製キット                            | QIAGEN         |

### 2.1.2 調整試薬

#### ● 50x TAE buffer

| 試薬              | 使用量    |
|-----------------|--------|
| Tris            | 242g   |
| AcOH            | 57.1ml |
| 0.5M EDTA pH8.0 | 100ml  |
| 計               | 1L     |

#### ● 10xTE buffer

| 試薬             | 使用量   |
|----------------|-------|
| Tris-HCl pH8.0 | 100mM |

|      |      |
|------|------|
| EDTA | 10mM |
| 計    | 1 L  |

調整後オートクレーブをかけた。

● LB 培地

| 試薬            | 使用量         |
|---------------|-------------|
| Trypton       | 10g         |
| Yeast extract | 5g          |
| NaCl          | 5g          |
| 5M NaOH       | 200 $\mu$ l |
| 計             | 1 L         |

オートクレーブをかけて滅菌した。プレート培地を造るときは、オートクレーブ前に Agar 20g/L 加えた。オートクレーブ後に 100mg/ml のアンピシリン、または、50mg/ml のカナマイシンを 1000 倍希釈になるように加えた。

● SOC 培地

| 試薬                   | 使用量         |
|----------------------|-------------|
| Trypton              | 20g         |
| Yeast extract        | 5g          |
| NaCl                 | 0.5g        |
| 1M KCl               | 2.5ml       |
| 1M MgCl <sub>2</sub> | 10ml        |
| 1M MgSO <sub>4</sub> | 10ml        |
| 1M glucose           | 20ml        |
| 5M NaOH              | 200 $\mu$ l |
| 計                    | 1L          |

● ミニプレ sol I

| 試薬             | 濃度   |
|----------------|------|
| Glucose        | 50mM |
| Tris-HCl pH8.0 | 25mM |
| EDTA           | 10mM |

● ミニプレ sol II

| 試薬 | 濃度 |
|----|----|
|----|----|

|      |      |
|------|------|
| NaOH | 0.2M |
| SDS  | 1%   |

● ミニプレ sol III

| 試薬   | 濃度       |
|------|----------|
| KOAc | 5M       |
| AcOH | to pH5.2 |

● YE 培地

| 試薬            | 使用量 |
|---------------|-----|
| Yeast extract | 5g  |
| Glucose       | 20g |
| 計             | 1L  |

オートクレーブをかけて滅菌した。ade-の株には adenine を 100mg/L 加えた。プレート培地を作るときは、オートクレーブ前に Ager 20g/L 加えた。G418 セレクションを行う場合は、オートクレーブ後に G418 を 0.1mg/ml になるように加えた。

● YER 培地

| 試薬            | 使用量 |
|---------------|-----|
| Yeast extract | 5g  |
| Glucose       | 60g |
| 計             | 1L  |

オートクレーブをかけて滅菌した。ade-の株には adenine を 100mg/L 加えた。

● YED 培地

| 試薬            | 使用量  |
|---------------|------|
| Yeast extract | 5g   |
| Glucose       | 1g   |
| Glycerol      | 30ml |
| 計             | 1 L  |

オートクレーブをかけて滅菌した。ade-の株には adenine を 100mg/L 加えた。

● 10xLiOAc buffer

| 試薬                | 使用量   |
|-------------------|-------|
| LiOAc             | 10.2g |
| 1M Tris-HCl pH7.5 | 10ml  |
| 0.5M EDTA         | 2ml   |
| 計                 | 100ml |

オートクレーブをかけて滅菌した。

● PEG4000 buffer

| 試薬             | 使用量        |
|----------------|------------|
| PEG4000        | 4g (40%)   |
| 1xLiOAc buffer | up to 10ml |

● Hybridization buffer

| 試薬  | 使用量   |
|---|-------|
| BSA   | 1g    |
| SDS   | 7g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O | 8.95g |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                        | 0.2ml |
| 0.5M EDTA   | 0.2ml |
| 計   | 100ml |

● Hybridization wash buffer

| 試薬  | 使用量    |
|---|--------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 12H <sub>2</sub> O | 7.16g  |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>                        | 0.16ml |
| SDS   | 10g    |
| 0.5M EDTA   | 2ml    |
| 計   | 1L     |

● Northern blot resuspend buffer

| 試薬             | 濃度    |
|----------------|-------|
| NaCl           | 0.5M  |
| Tris-HCl pH7.5 | 0.2M  |
| EDTA           | 0.01M |

|     |    |
|-----|----|
| SDS | 1% |
|-----|----|

● 10×Northern blot electrophoresis buffer

| 試薬                      | 使用量    |
|-------------------------|--------|
| MOPS                    | 41.86g |
| NaOAc・3H <sub>2</sub> O | 6.8g   |
| EDTA                    | 3.72g  |
| NaOH                    | 4g     |
| 計                       | 1L     |

調整後オートクレーブをかけた。

● Northern blot loading dye

| 試薬               | 濃度    |
|------------------|-------|
| Glycerol         | 50%   |
| EDTA             | 1mM   |
| Bromophenol blue | 0.40% |
| Xylene cyanol    | 0.40% |

● 20x SSC

| 試薬                          | 使用量    |
|-----------------------------|--------|
| NaCl                        | 175.3g |
| Trisodium citrate dihydrate | 88.2g  |
| 計                           | 1L     |

● 10x TNE

| 試薬             | 濃度    |
|----------------|-------|
| Tris-HCl pH7.5 | 100mM |
| NaCl           | 2M    |
| EDTA           | 10mM  |

調整後オートクレーブをかけた。

● Pre-incubation buffer

| 試薬                | 使用量   |
|-------------------|-------|
| 2-mercaptoethanol | 500μl |



|                   |       |
|-------------------|-------|
| 0.5M EDTA         | 60μl  |
| 1M Tris-HCl pH8.0 | 200μl |
| 計                 | 10ml  |

● MNase zymolyase solution

| 試薬                | 使用量   |
|-------------------|-------|
| Glucose           | 150mg |
| 1M Sorbitol       | 9ml   |
| 0.5M EDTA         | 150μl |
| 1M Tris-HCl pH7.5 | 450μl |
| 計                 | 12ml  |

Zymolyase ありの場合は、25mg の Zymolyase 100T を加えた。

● MNase lysis buffer

| 試薬                                    | 濃度     |
|---------------------------------------|--------|
| Ficoll 400                            | 18%    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 10mM   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>       | 10mM   |
| MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O | 1mM    |
| EGTA                                  | 0.25mM |
| EDTA                                  | 0.25mM |

● MNase Buffer A

| 試薬             | 濃度    |
|----------------|-------|
| Tris-HCl pH8.0 | 10mM  |
| NaCl           | 150mM |
| KCl            | 5mM   |
| EDTA           | 1mM   |

使用前に complete を加えた。

● Orange G loading dye

| 試薬       | 濃度    |
|----------|-------|
| Orange G | 0.30% |
| EDTA     | 5mM   |

|                |      |
|----------------|------|
| Tris-HCl pH7.5 | 10mM |
|----------------|------|

● 10xTBS

| 試薬                | 使用量   |
|-------------------|-------|
| 1M Tris-HCl pH7.5 | 200ml |
| 5M NaCl           | 300ml |
| 計                 | 1L    |

調整後オートクレーブをかけた。

● 10xPBS

| 試薬                               | 濃度     |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 137mM  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 8.1mM  |
| KCl                              | 2.68mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1.47mM |

調整後オートクレーブをかけた。

● ChIP Lysis 140 buffer

| 試薬              | 濃度    |
|-----------------|-------|
| Na-deoxycholate | 0.10% |
| EDTA            | 1mM   |
| HEPES-KOH pH7.5 | 50mM  |
| NaCl            | 140mM |
| TritonX-100     | 1%    |

● ChIP Lysis 500 buffer

| 試薬              | 濃度    |
|-----------------|-------|
| Na-deoxycholate | 0.10% |
| EDTA            | 1mM   |
| HEPES-KOH pH7.5 | 50mM  |
| NaCl            | 500mM |
| TritonX-100     | 1%    |

● ChIP LiCl/detergent buffer

| 試薬              | 濃度    |
|-----------------|-------|
| Na-deoxychorate | 0.50% |
| EDTA            | 1mM   |
| LiCl            | 250mM |
| IGAPEL CA-630   | 0.50% |
| Tris-HCl pH8.0  | 10mM  |

#### ChIP Elution buffer

| 試薬             | 濃度   |
|----------------|------|
| EDTA           | 10mM |
| SDS            | 1%   |
| Tris-HCl pH8.0 | 50mM |

## 2.2 実験で使用した装置

|  |                            |
|--|----------------------------|
| Mupid-2-plus                               | ADVANCE                    |
| Nanodrop ND1000                            | Thermo Fishier Schientific |
| PCR thermal Cyclor Dice                    | TaKaRa                     |
| Thermal Cyclor Dice Real Time System TP800 | TaKaRa                     |
| Multi beads shocker                        | 安井器械                       |
| FLUOROSKAN ASCENT FL                       | Thermo Fishier Schientific |
| FLA7000                                    | FUJIFILM                   |
| FASIV                                      | 日本ジェネティクス                  |
| Handy Sonic                                | TOMY                       |
| Micro Vac                                  | TOMY                       |

## 2.3 実験に用いた分裂酵母株

| Strain | Genotype  |
|--------|---|
| SPH1   | <i>h- leu1-32</i>   |
| SPH98  | <i>h+ ade6-M26 ura4-D18 his5-303 gcn5::ura4</i>             |
| SPH100 | <i>h+ ade6-M26 snf22::ura4 ura4-D18 his5-303</i>            |
| SPH101 | <i>h+ ade6-M26 snf22::ura4 gcn5::ura4 ura4-D18 his5-303</i> |
| SPH103 | <i>h+ ade6-M26 hrp3::ura4 ura4-D18 his5-303</i>             |
| SPH105 | <i>h+ ade6-M26 hrp3::ura4 gcn5::ura4 his5-303 ura4-D18</i>  |
| SPH112 | <i>h+ ade6-M26 hrp3::ura4 snf22::ura4 his5-303 ura4-D18</i> |
| SPH243 | <i>h- leu1-32 snf21-36</i>                                  |

SPH331 *h- leu1-32 snf21-36 snf22<<kanMX6*  
 SPH332 *h+ ura4-D18 leu1-32 swr1<<kanMX6*  
 SPH333 *h+ ade6-M26 snf22::ura4 ura4-D18 his5-303 swr1<<kanMX6*  
 SPH334 *h+ ura4-D18 leu1-32 arp8<<kanMX6*  
 SPH335 *h+ ade6-M26 snf22::ura4 ura4-D18 his5-303 arp8<<kanMX6*

## 2.4 実験に用いたプライマー

| Name                 | Sequence (5' -3' )                    |
|----------------------|---------------------------------------|
| arp8 Left F          | GCGGCCGCTCTAGAACGCAATTCCTAAAGCCGAG    |
| arp8 Left R          | AGCCCGGGGATCCAGCGGAGTCTCGCCATATATAC   |
| arp8 PCRcheck R      | AACTTCCGGAAGTAGGCTTC                  |
| arp8 Right F         | TCGATACCGTCGACCCCTGGAAGAGCGTATCCATTCC |
| arp8 Right R         | GTACCGGGCCCCCCCCGAAGGCTCCTTTGCTTCGG   |
| gcn5 Left F          | GCGGCCGCTCTAGAAAGTTAAGTAAGCAACGGGAAG  |
| gcn5 Left R          | AGCCCGGGGATCCACGCATTTGGAAAGTTGGAAG    |
| gcn5 PCRcheck R      | GACCAAACGCAGAATAAGAAAAG               |
| gcn5 Right F         | TCGATACCGTCGACCATGGTGCAAGGAAATGGAAG   |
| gcn5 Right R         | GTACCGGGCCCCCCCCATTGCCGAAGTGTTTTAGTG  |
| kanMX PCRcheck F     | CGCTATACTGCTGTCGATTC                  |
| ORF F                | CGCCGATACAATCAGAAGC                   |
| ORF R                | CGATGAGTTTGCAGCATCC                   |
| prp3 F               | GCACAGTCGTTGTACAAATTCGTATTCCC         |
| prp3 R               | ACGATTCTAAACGCCTCTTGTTACGATCC         |
| snf22 AflIII Check F | CAATGTGTCAAGGTAAGTGC                  |
| snf23 AflIII Check R | CAGAATGGAAGACGAACTGC                  |
| swr1 Left F          | GCGGCCGCTCTAGAAAGCCTCGCAACTATACTTGTCC |
| swr1 Left R          | AGCCCGGGGATCCACCCACTGTGAGTAACCAACAG   |
| swr1 PCRcheck R      | AAAGCGGGCTATCATTGAGC                  |
| swr1 Right F         | TCGATACCGTCGACCGGGGCACATTGATGAGTACATG |
| swr1 Right R         | GTACCGGGCCCCCCCCACCAATACAGAGACCAGCTTC |
| TATA F               | CGCGGAACTAAACATAGCG                   |
| TATA R               | GCTAGAAACCGAGTGGTG                    |
| UAS1 F               | GGGATGAAAACAATCAACCTC                 |
| UAS1 R               | GGAATGCAGCAACGAAAATC                  |
| UAS2 F               | GGGTGGAATGAGTCCGC                     |

UAS2 R

GTTCCGCGAATCATAAGCC

## 2.5 実験操作

### ● アガロース電気泳動

TAE bufferの入った電気泳動層にアガロースゲルをおき、10xloading dyeを加えた試料をウェルにアプライした。100Vの定電圧で泳動した後にFASIVで撮影し、DNAを検出した。

### ● エタノール沈殿

DNA溶液(もしくはRNA溶液)の1/10倍量の3M CH<sub>3</sub>COONa, pH5.2と2.5倍量のエタノールまたは等量の2-プロパノールを加え、よく攪拌した。15000rpm、4℃で5分間遠心分離した後、上清を取り除いた。70%エタノールを適量加えて沈殿を洗浄し、15000rpm、4℃で1分間遠心分離した後、上清を取り除いた。風乾またはmicro vacを用いて乾燥後、TE bufferで沈殿を溶解した。

### ● PCR

0.2ml PCRチューブに10×Ex taq Buffer(5 μl)、2.5mM dNTP mix(4 μl)、5U/μl Ex Taq(0.2 μl)、各10 μM プライマー(1 μl)、100ng/μl 鋳型DNA(1 μl)、DDW(38 μl)または、5×Primestar GXL Buffer(10 μl)、2.5mM dNTP mix(4 μl)、1.25U/μl Primestar GXL(0.5 μl)、各10 μM プライマー(1 μl)、100ng/μl 鋳型DNA(1 μl)、DDW(33 μl)を加えた後、PCR thermal cyclerを利用して増幅した。PCRのTime Programは以下のように行った。

|           |     |         |   |
|-----------|-----|---------|---|
| 1. 初期変性   | 94℃ | 2min    | primestar GXL の場合 98℃                     |
| 2. 変性     | 94℃ | 30sec   | primestar GXL の場合 98℃                     |
| 3. アニーリング | 54℃ | 30sec   | アニーリング時の温度は<br>プライマーの T <sub>m</sub> 値で行う |
| 4. 伸長     | 72℃ | 1min/kb | Step2-4x30cycle                           |
| 5. 最終伸長   | 72℃ | 2min    |   |

### ● 制限酵素消化 1.5ml

エッペンチューブに基質 DNA、10×Buffer (用いる酵素に至適なもの)、制限酵素、DDW を加えて混和した後、37℃で消化した。

### ● ゲル精製

PCR産物や制限酵素消化したDNAサンプルをアガロースゲル電気泳動により分離し、目的断片を切り出した後、ゲル精製キット(QIAGEN)を用いて精製した。

- TOP0 クローニング

Primestar GXL を用いて増幅した PCR 産物をゲル精製した。その断片 10-20ng、salt solution(1  $\mu$ l)、pCR-Blunt II-TOP0ベクター (0.5  $\mu$ l)を混ぜて15分室温で放置した後、competent cell (70  $\mu$ l)を加えて形質転換し、X-gal を塗った LB kanプレートで培養した。生えてきた白いコロニーをミニプレし、PCR 産物がクローニングされたプラスミドを抽出した。

- ライゲーション

酵素消化したベクターとインサートをモル比で 1:5 となるように混合し、DNAと等量のLigation highを加えて攪拌した後に室温で1時間反応させた。そのDNAを大腸菌に形質転換し、プラスミドを回収した。

- 形質転換(大腸菌)

Competent cell DH5  $\alpha$ を氷上で解凍し、DNA(液量がDH5  $\alpha$ の 1/10 になるように)を加え、氷上で30分静置した。42° Cで30秒加熱した後、氷上で少しの間静置した。アンピシリン を用いてセクションする場合、その懸濁液を LB Amp プレートに塗り広げ、37°Cで培養した。カナマイシンを用いてセクションする場合、500  $\mu$ l の SOC 培地を用いて 37°Cで2時間培養した後、5000rpm、30sec 遠心し上清を約100  $\mu$ l 残るように取り除き LB Kanプレートに塗り広げ、37°Cで培養した。青白セクションを行う場合は、大腸菌をプレートに塗り広げる前に1000×X-galを30  $\mu$ lプレートに塗った。

- ミニプレ

形質転換した大腸菌のコロニーを1.5mlのLB AmpまたはKan培地で、37°Cで16時間培養した。大腸菌の培養液を1.5mlエッペンチューブに移し、15000rpmで1分遠心分離して上清を取り除いた。150  $\mu$ lのミニプレsolIを加え vortexにより混和した。次に、ミニプレsolIII150  $\mu$ l加え 5回転倒混和した後、ミニプレsolIIII150  $\mu$ lを加え再び5回転倒混和した。15000rpm、4° C、5分遠心分離した後、上清を回収した。この上清をエタノール沈殿し、ペレットを50  $\mu$ lの TE/RNaseAで溶かした。

- フェノール・クロロホルム抽出

DNA溶液に等量のPhenol / Chloroform / Isoamyl alcohol (25:24:1)を加えて vortexで混和した後、14800rpm、RT5分間遠心分離した。上から順に水層、中間層、有機層の3層に分かれ、そのうちの水層を回収した。

#### ● SliCE法を用いた遺伝子破壊コンストラクトの作成

遺伝子欠損を行う遺伝子の5'側の領域を増幅するフォワードプライマー5'側にpBS-KanMX6 (pBluescript KS+plasmid)にKanMX6 sequenceを *Sma*I/*Eco*RIで挿入したもの。ストック番号#143)の *Spe*I酵素サイト上流15塩基 (5' GCGGCCGCTCTAGAA 3')、リバープライマーの5'側に *Spe*I酵素サイト下流15塩基 (5' AGCCCGGGGATCCA 3')を追加しPCRによって増幅し、ゲル抽出を行った。同様に、遺伝子欠損を行う遺伝子の3'側の領域を増幅するフォワードプライマー5'側にpBS-KanMX6の *Xho*I酵素サイト上流15塩基 (5' TCGATACCGTCGACC 3')、リバープライマーの5'側に *Xho*I酵素サイト下流15塩基 (5' GTACCGGGCCCCCCC3')を追加しPCRによって増幅し、ゲル抽出を行った。増幅産物各200ngと、*Spe*Iと *Xho*Iで消化したpBS-KanMX6 50ngを混合し、GeneArt® Seamless Cloning and Assembly Enzyme mixを等量加えた。ピペッティングを5回、タッピングを3回行った後、室温で30分インキュベートした。その後大腸菌に形質転換し、ampでセクションを行った。その後ミニプレを行い、制限酵素消化によって目的の部分で組み替えが起きていることを確認した後分裂酵母に形質転換した。

#### ● 酵母ゲノムDNAの抽出

分裂酵母をYEプレートに塗り、30°C (温度感受性の場合25°C)で培養した。生えてきた酵母を楊枝で適量掻き取り、Genとるくん (TaKaRa)を用いてゲノム抽出した。

#### ● 形質転換 (分裂酵母)

形質転換に用いるプラスミドDNAを目的の制限酵素で切断し、エタノール沈殿を行い10  $\mu$ lのTEに溶解した。目的の分裂酵母株を10mlのYE培地で $1.0 \times 10^7$ /mlになるまで培養した。培養液を3000rpm、4°C、2分遠心して上清を取り除き、1mlの滅菌水で懸濁して1.5mlチューブに移した。7000rpm、4°C、10秒遠心して上清を取り除き、1mlのLiOAc bufferで懸濁した。再び7000rpm、4°C、10秒遠心して上清を取り除き、50  $\mu$ lのLiOAc buffer、10  $\mu$ lのDNA、300  $\mu$ lのPEG4000 bufferを加えて混ぜ、30°Cで30分インキュベートした。温度感受性株に形質転換をする場合、25°Cで1時間Rotateした。その後、40  $\mu$ lのDMSOを加え、42°C

(温度感受性株の場合30℃)で15分インキュベートした。7000rpm、4℃、5秒遠心して上清を取り除き、100  $\mu$  lの滅菌水に懸濁した後、目的のセクション用のプレート培地に塗り、30℃ (温度感受性株の場合25℃) でコロニーが形成するまで培養した。G-418を用いてセクションする場合、はじめ YEプレートで一晩培養し、その後滅菌したベルベット生地のリプリカ布に押し付けて転写し、さらにこれを YE+G-418プレートに転写して、30℃ (温度感受性株の場合25℃) で培養した。シングルコロニーを8個 YE プレートに塗りつぎ、増殖してきた菌体からゲノムDNAを抽出してPCRもしくはSouthern blottingにより形質転換されたかを確認した。

#### ● Southern blotting

抽出した分裂酵母ゲノムDNA5  $\mu$  lを37℃で一晩制限酵素消化し、エタノール沈殿によって濃縮した後、1%アガロースゲルで泳動した。泳動度を確認後、0.1N HClにゲルを浸し15分間浸透した。その後、0.4N NaOHに替え、15分浸透した。厚紙に0.4N NaOHを吸わせ、厚紙の上にアガロースゲル、ろ紙2枚、メンブレン、紙タオル一束の順で下から重ねた。室温で一晩放置し、DNAをメンブレンに転写した。2xSSCで2回メンブレンをWashし、紙タオルではさんで乾燥させた。標的プローブを用いてハイブリダイゼーションし、形質転換されたかを確認した。

#### ● ハイブリダイゼーション

<sup>32</sup>PラベルされたDNAプローブをAmersham Megaprime DNA Labelling System (GE)を用いて作製した。1.5mlチューブに鋳型DNAプローブ50ngと2.5  $\mu$  lのprimer solutionを加え、合計25  $\mu$  lになるようにDDWを加えた。5分間ボイルした後室温で数秒放置し、5  $\mu$  lのlabeling bufferを加えた。そこに、2.5  $\mu$  l の $\alpha$  32P-dCTPと1  $\mu$  lのklenowを加え軽く混ぜた後、37℃で15分インキュベートした。溶液を3000rpm、1分の遠心でbufferを取り除いておいたG50カラム (GE)に加えて、3000rpm、3分遠心してカラムを通し、50  $\mu$  lのTEが入った1.5mlチューブに移して未反応の $\alpha$  32P-dCTPを取り除いた。この溶液を5分間ボイルし、氷上で3分間冷却した。ハイブリダイゼーションチューブに作製したメンブレンを入れ、Hybridization bufferを適量加え、62℃、30分でローテーションした。Hybridization bufferを交換し、<sup>32</sup>PでラベルされたDNAプローブを加え、62℃で一晩ローテーションした。Hybridization bufferを除去し、Wash bufferを適量加え、ハイブリダイゼーションチューブの中ですすいだ。さらにWash buffer を適量加え、62℃、5分間ローテーションし、洗浄を3回行った。メンブレンを取り出し、トレイ中でWash bufferで3回すすぎ、メンブレンをラップで包んだ。ラップ包んだメン



ブレンとイメージングプレート (BAS2040) をカセット内で1日から数日間挟み、FLA7000で検出した。

#### ● Northern blot

分裂酵母株を2mlのYE培地に植菌し、30°C（温度感受性株の場合25°C）で一晩培養した。増殖した後、400mlのYER培地に移して $2.0 \times 10^7$ /mlになるまで30°C（温度感受性株の場合25°C）で培養した。培養液50mlを50mlチューブに移して後述の操作を行い、残りを500mlの遠心管に移し、3000rpm、4°C、5分遠心分離し上清を取り除いた。適量の滅菌水を加えwashし、3500rpm、4°C、1分遠心分離し再び上清を取り除いた。ペレットをYED培地で懸濁して350mlのYED培地に移してグルコース飢餓状態にし、30°C（温度感受性株の場合34°C）で培養した。グルコース飢餓後の各時間で50mlの培養液を50mlチューブに移し、3500rpm、4°C、1分遠心分離し上清を取り除いた。ペレットを1mlの滅菌水で懸濁し、1.5mlチューブに移した。このうち、100 $\mu$ lを別の1.5mlチューブに移して、これらを15000rpm、4°C、一瞬遠心分離し上清を取り除いた後、液体窒素で凍結した。凍結したサンプルのうち100 $\mu$ lの方をNorthern blotに、残りをクロマチン解析に使用した。回収した分裂酵母サンプルに300 $\mu$ lのNorthern blot resuspend bufferを加え懸濁し、0.5gの0.5mm ガラスビーズが入ったマルチビーズショッカー用2mlチューブに移し、そこに300 $\mu$ lのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールを加え2300rpm、30秒、30秒休み、3サイクルの条件でマルチビーズショッカーを用いて破碎した。その後、フェノール・クロロホルム抽出を2回行い、エタノール沈殿を行い50 $\mu$ lのTE RNase freeに溶解した（ただしこのとき、100%エタノールを加えた段階で2時間、-20°Cでインキュベート、風乾は室温5分行った）。Nanodropで濃度を測定し、各サンプル10 $\mu$ gになるように5 $\mu$ lのRNAを希釈して用意した。そこに、10 $\times$ Northern blot electrophoresis buffer 2 $\mu$ l、ホルムアルデヒド3 $\mu$ l、ホルムアミドを10 $\mu$ l、エチジウムブロマイド適量を加え混和した後、60°Cで5分インキュベートした。2 $\mu$ lのNorthern blot loading bufferを加え、2 $\mu$ lだけTAEゲルで電気泳動して各RNAの濃度が一定であるかどうか確認した。濃度が一定になるように10 $\mu$ l程度MOPSゲル、100Vで電気泳動した。ゲルをFASIVで撮影しリボソームRNAを確認した後、10 $\times$ SSCで10分washした。厚紙に10x SSC bufferを吸わせ、厚紙の上に順にMOPSゲル、メンブレン、ろ紙2枚、紙タオル1束の順で下から上へ重ねた。室温で一晩放置し、メンブレンにRNAを転写した。メンブレンを80°C、2時間インキュベートし、RNAをメンブレンに固定した。このメンブレン、目的のプロブを用いてハイブリダイゼーションし、目的RNAを検出した。 *fbp1* 検出用プロブは *fbp1* ORF F, R

プライマーを、コントロールとして用いた *cam1* 検出用プローブは *cam1* F, R プライマーを使用して PCR により作製した。

- ヘキストを用いたDNA濃度測定

10×TNE buffer 500  $\mu$ l、1mg/mlヘキスト0.5  $\mu$ l、DDW 4.5mlを混ぜてpremixを作った。検量線用に250  $\mu$ g/ml、125  $\mu$ g/ml、62.5  $\mu$ g/ml、31.25  $\mu$ g/mlの  $\lambda$  EcoT14Iマーカールを用意した。96 wellプレートに検量線用サンプルと測定したい DNAサンプル、ブランクとして用いるDDWを各2  $\mu$ lずつ入れ、そこにpremixを200  $\mu$ lずつ加えた。ヘキストによる蛍光をFLUOROSKAN ASCENT FL を用いて検出し、 $\lambda$  EcoT14Iマーカールの強度から検量線を作製し、サンプルのDNA濃度を定量した。

- クロマチン解析

回収した分裂酵母サンプルにpre-incubation bufferをペレットの2倍量加えvortexにより懸濁した後、water bathを用いて30°C、10分インキュベートした。3500rpm、4°C、5分遠心分離して上清を取り除いた後、1mlの1Mソルビトール、20  $\mu$ lの0.5M EDTAを加えvortexにより懸濁した。3500rpm、4°C、5分遠心分離して上清を取り除いた後、500  $\mu$ lのzymolyaseが入っていないzymolyase solutionを加えvortexにより懸濁した。そこに500  $\mu$ lのzymolyaseを加えた zymolyase solutionを加え混和した後、water bathを用いて 30°C、5分インキュベートした。3500rpm、4°C、5分遠心分離して上清を取り除いた後、1mlの1Mソルビトールを加え、ピペッティングにより懸濁した。3500rpm、4°C、5分遠心分離して上清を取り除いた後、1mlのLysis bufferでピペッティングにより懸濁した。13000rpm、4°C、30分遠心分離して上清を取り除いた後、1.5mlのBuffer Aでピペッティングにより懸濁し、3本の1.5mlチューブに500  $\mu$ lずつ分注した。それぞれに5  $\mu$ lの1M  $\text{CaCl}_2$  を加えて混和した後、各チューブに0、1、2.5  $\mu$ lの10U/mlのMNase(0、20、50U/ml)を加えwater bathを用いて37°C、5分インキュベートした。その後、40  $\mu$ lの0.5M EDTAを加え、MNaseの反応を停止させた。50  $\mu$ lの10%SDS、10  $\mu$ lのproteinase K、5  $\mu$ lの2MEを加え混和した後、55°Cで一晩インキュベートした。15000rpm、4°C、15分遠心分離して上清を回収してフェノール・クロロホルム抽出を行い、2-プロパノールを用いてエタノール沈殿を行った。ペレットを200  $\mu$ l TE/RNaseAで懸濁した後、37°Cで 30分インキュベートした。フェノール・クロロホルム抽出を2回行った後、2-プロパノールを用いてエタノール沈殿を行い、ペレットを50  $\mu$ lのTEで溶解した。ヘキストを用いてDNAの濃度を測定し、1000ngのDNAを100  $\mu$ l スケールで*Cla*I消化し、エタノール沈殿を行い10  $\mu$ l

のOrange G loading dye を含んだTEに溶解した。これを40cmのTAEアガロースゲルを用いて 65Vで16時間程度電気泳動した。吸引装置を用いてメンブレンにDNAを転写し、ハイブリダイゼーションしてクロマチン構造を解析した。プローブは fbp1 ORF F, R, プライマーを用いてPCRにより作製した。

## ● クロマチン免疫沈降 (ChIP)

### 〈cell lysateの作製〉

分裂酵母株を2mlのYE培地に植菌し、30℃（温度感受性株の場合25℃）で一晩培養し増殖した後、1サンプルあたり 50mlのYER培地に移して $1.0 \times 10^7$ /ml になるまで30℃（温度感受性株の場合25℃）で培養した。培養液50mlを 50ml チューブに移して後述の操作を行い、残りを500mlの遠心管に移し、3000rpm、4° C、5分遠心分離し上清を取り除いた。適量の滅菌水を加えwashし、3500rpm、4° C、1分遠心分離し再び上清を取り除いた。ペレットをYED培地に移してグルコース飢餓状態にし、30℃（温度感受性株の場合34℃）培養した。グルコース飢餓後の各時間で50mlの培養液を50mlチューブに移し、1.4ml のホルムアルデヒド液(37%)を加えよく混ぜた後、室温で20分インキュベートした。その後、2.5ml の2.5Mグリシンを加えよく混ぜた後、3500rpm、4° C、1分遠心分離して上清を取り除いた。20ml の冷えた TBS で wash して 3500rpm、4° C、1分遠心分離して上清を取り除く操作を 2 回繰り返した。ペレットを 1ml の冷えた TBSで懸濁し、1.5mlチューブに移して、15000rpm、4° C、一瞬遠心分離し上清を取り除き、液体窒素で凍結した。ホルムアルデヒドでクロスリンクした分裂酵母サンプルを400  $\mu$  lのLysis buffer 140、8  $\mu$  l の 50 $\times$ complete を加えて懸濁し、0.5mm、0.6ml のジルコニアビーズが入ったマルチビーズショッカー専用2mlチューブに移した。2480rpm、30秒、30秒休み、5 サイクルの条件でマルチビーズショッカーを用いて破碎した。2mlチューブの底にがびょうを用いて穴をあけ、5000rpmで一瞬遠心分離して懸濁液を1.5mlチューブに移した。Handy Sonic (TOMY)を用いて、ダイヤル 8、30秒の条件で、氷水で冷やしながら6回ソニケーションを行った。15000rpm、4° C、5分遠心分離して上清を1.5mlチューブに回収して IP サンプルとして使用し、そのうち1%を別チューブに回収して INPUT サンプルとして使用した。

### 〈免疫沈降〉

1.5mlチューブに使用する抗体量の10倍量のDynabeads ProteinAを加え、磁気フォルダーを用いて上清を分離して取り除いた。ビーズを500  $\mu$  lのPBS/0.5%BSAで2回washした。80  $\mu$  lのPBS/0.5%BSAでビーズを懸濁し、任意の量

の抗体を加え、4° Cで一晩ローテーションした。磁気フォルダーで上清を取り除いた後、PBS/0.5%BSAで2回washし、IP用に調製した上記の細胞抽出液を加えよく懸濁した後、4° Cで一晩ローテーションした。その後、磁気 フォルダーで上清を分離して回収した。この上清はソニケーションによる DNA 切断具合を調べることに使用した（下記の<IP Supサンプルの作製>）。残った磁気ビーズを500  $\mu$  lのLysis buffer 140で2回、Lysis buffer 500で1回、LiCl/detergent bufferで2回、TEで1回washした。磁気フォルダーを使用して完全に上清を取り除いた後、40  $\mu$  lのElution bufferで懸濁し、65° Cで10分インキュベートした。その後、磁気フォルダーを用いて上清を新しい1.5mlチューブに回収した。残ったビーズに100  $\mu$  lのElution buffer、150  $\mu$  lのTE/0.67%SDSを加えて懸濁した。再び、65° Cで15分インキュベートし、磁気フォルダーを使用して上清を先ほど回収したチューブに回収した。回収した上清に4.2  $\mu$  lの20mg/mlのProteinase Kを加えよく混和した後、37° Cで一晩インキュベートした。

#### <IP Supサンプルの作製>

ソニケーションによるDNAの切断具合を確認するために免疫沈降後に回収しておいた上清を100  $\mu$  lチューブに移した。そこに、390  $\mu$  lのLysis buffer 140、10  $\mu$  lの0.5M EDTA、4.2  $\mu$  lの20mg/mlのProteinase Kを加え混和した後、37° Cで一晩インキュベートした。

#### <INPUT サンプルの作製>

INPUT用に回収した細胞抽出液に合計100  $\mu$  lになるようにLysis buffer 140を加えた。さらに、400  $\mu$  lのTE/1%SDS、4.2  $\mu$  lの20mg/mlのProteinase Kを加え混和した後、37° Cで一晩以上インキュベートした。

#### <DNA サンプルの精製>

Proteinase K処理した各サンプルを65° Cで6時間インキュベートした。免疫沈降サンプルには、210  $\mu$  lのTEを加えた。その後、1  $\mu$  lの20mg/mlのグリコーゲンを加え、フェノール・クロロホルム抽出を2回行った。その後、エタノール沈殿を行い、30  $\mu$  lのTE/RNaseAに溶かし、37° Cで1時間インキュベートした（ただしエタノール沈殿の際、100%エタノール、NaOAcを加えた段階で一晩、-20° Cでインキュベートした）。

#### <DNAの定量>

qPCRによりChIP サンプルのDNA量を定量した。1サンプルあたり、DNA サンプル1  $\mu$  l、10mM プライマーを1  $\mu$  lずつ、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix 10  $\mu$  l、DDW 7.8  $\mu$  lを96 well PCR plate (バイオ・リジェネレーションズ)に入れて混ぜ、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800を用いて定量した。PCR のTime Programは以下のように行った。

|           |      |       |   |
|-----------|------|-------|---|
| 1. 初期変性   | 95°C | 30sec | アニーリング時の温度はプライマーのT <sub>m</sub> 値で行う<br>Step2-4×45cycle |
| 2. 変性     | 95°C | 5sec  |   |
| 3. アニーリング | 50°C | 10sec |   |
| 4. 伸長     | 72°C | 30sec |   |
| 5. 最終伸長   | 72°C | 2min  |   |
| 6. 融解曲線分析 | 95°C | 15sec |   |
|           | 60°C | 30sec |   |
|           | 95°C | 15sec |   |

プライマーは UAS1 F, R、UAS2 F, R、TATA F, R、prp3 F,Rを用いた。

### 3 結果と考察

#### 3.1 Snf22 および Gcn5 による分裂酵母 *fbp1* 転写制御機構の解明

クロマチンリモデリング因子とヒストンアセチル化酵素が *fbp1* 転写活性化にどのように関わるかを調べる為に、Gcn5、Snf22 遺伝子破壊株および二重破壊株において、ノーザンブロッティングによって *fbp1* の転写状況を解析した (Fig. 4)。野生型では、グルコースが豊富な条件下において *m1on a* が転写され、*mRNA* の転写は抑制されていた。グルコース飢餓ストレスに晒されると、*m1onRNA* の転写開始点が下流へと移動し、*m1on b* および *m1on c* が転写され、60 分になると *fbp1* *mRNA* が大量に転写されるようになった。ヒストンアセチル化酵素 Gcn5 欠損株では、*fbp1* 転写活性化に不良化が見られた。Snf22 欠損株では、*m1on c* の転写活性化に不良化が見られ、*fbp1* 転写活性化に遅れが見られたが、*fbp1* *mRNA* の転写は野生型とほぼ同等までに行われた。また、Gcn5 と Snf22 の二重破壊株では、*fbp1* 転写活性化が全く見られなくなった。このことから、Gcn5 と Snf22 は *fbp1* 転写活性化において独立して働いていることが示唆された。

Fig.4

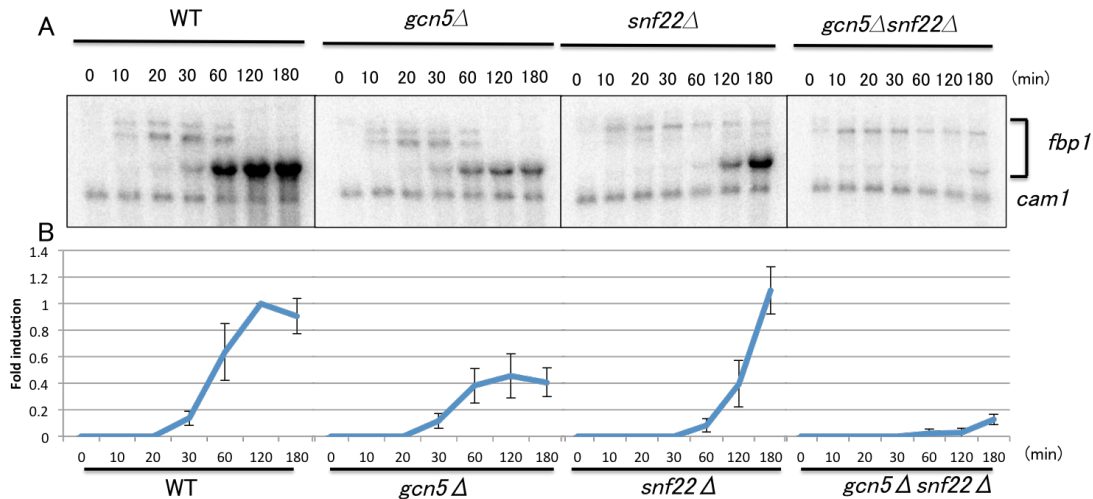


Fig.4 Gcn5 と Snf22 は独立して働く。

(A)Gcn5、Snf22 欠損株および二重欠損株におけるノーザンブロッティングの結果。数字は飢餓ストレスを与えてからの時間(分)。*fbp1* mRNAおよび*m1on* RNAは*fbp1* ORF内部のプロープを用いて検出した。コントロールとして*cam1* 遺伝子内部のプロープを用いた。(B)mRNA のバンド強度の定量結果。バンド定量は *cam1* のバンド強度で標準化した後、野生型の 120 分の値を 1 とした。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差で示した。

ノーザンブロッティングの結果から Gcn5 と Snf22 が独立に働くことが示唆された。これらの因子による *fbp1* 転写制御のメカニズムの解析を試みた (Fig. 5)。*fbp1* 転写は *m1onRNA* の転写に共役した上流領域からの段階的なクロマチン構造変化によって制御されているので、各欠損株および二重欠損株を用いてグルコース飢餓により誘導されるクロマチン構造変化を、MNase を利用した実験により調べた。この実験は、細胞から抽出した核成分 DNA 切断酵素である micrococcal nuclease (MNase) で限定分解することで、クロマチン構造をとり接近性が制限される DNA は切断できないがクロマチンが開いている領域は切断できるという性質を利用し、その切断具合でクロマチンの状態を調べることができる実験である。野生型においては、グルコース飢餓後 10 分で UAS1 付近のクロマチンが開き、20~30 分で下流のクロマチン構造が段階的に開いていく。さらに、*fbp1* 転写活性化が起こる 60 分になると TATAbox 付近のクロマチン大きく開くことが分かる。Gcn5 欠損株では、上流からの段階的なクロマチン構造変化が正常に起きた。Snf22 欠損株では、野生型で見られた UAS1 付近のクロマチン構造変化と下流の段階的なクロマチン構造変化が見られなくなり、120 分以降に TATAbox 周辺のクロマチンのみが開かれた。(Fig. 5A 赤矢印) Gcn5 と Snf22 の二重欠損株においては、Snf22 単独欠損と同様に上流からのクロマチン構造変化が起こらなくなり、TATAbox 周辺のクロマチン構造変化も起こらなくなった。このことから、Snf22 は *fbp1* 転写活性化において、上流からのクロマチン構造変化を担う因子であることが示唆された。また、Snf22 が不在の場合に Gcn5 依存的に TATAbox 周辺のクロマチン構造を開くことで転写活性化を促す転写制御機構が存在する可能性が浮かび上がった。

Fig.5

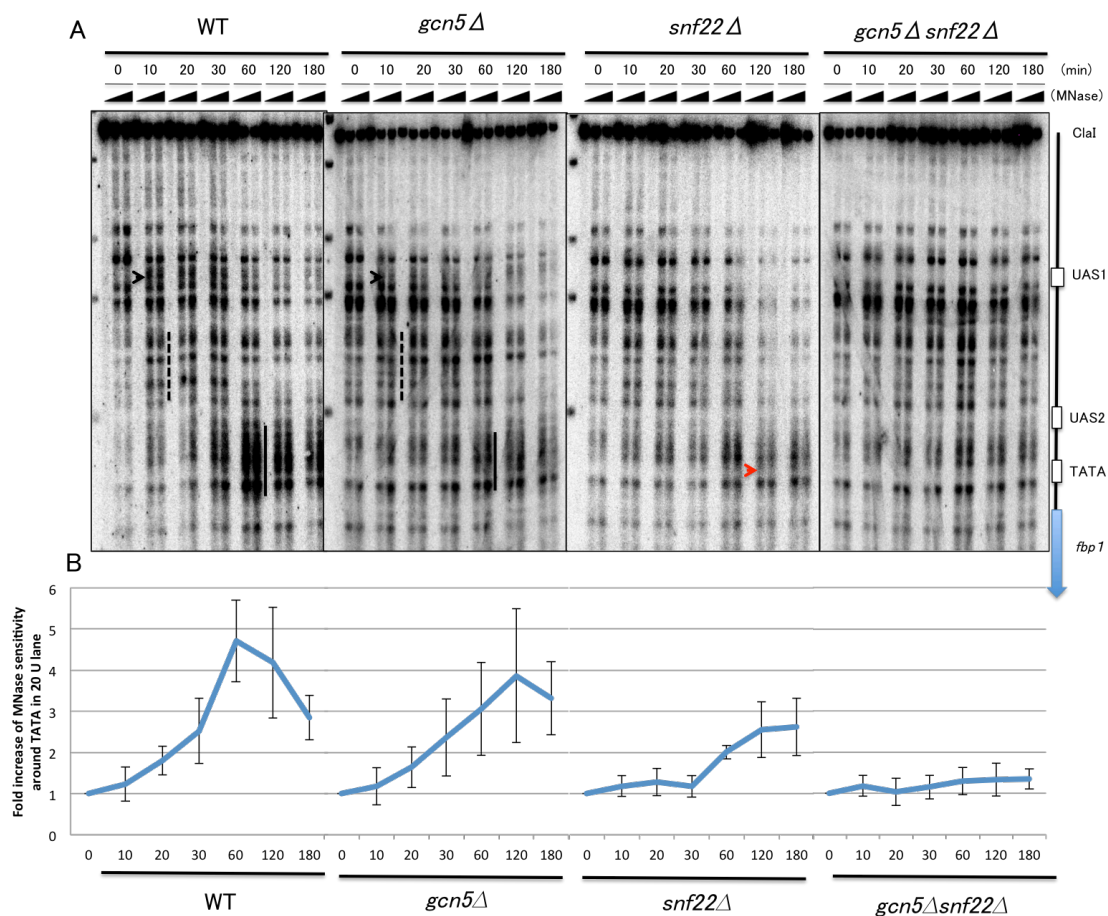


Fig.5 Snf22 欠損によって上流のクロマチンが開かず、TATAbox のみが開かれる。  
 (A)野生型、Gcn5 欠損株、Snf22 欠損株および二重欠損株におけるクロマチン解析の結果。数字は飢餓ストレスを与えてからの時間。上部 MNase の欄は使用した MNase の量 (0U,10U,25U) を模式的に表した。右欄にバンドの位置関係を示した。(B) TATAbox 周辺のバンド強度の定量結果。20U レーン全体で TATAbox 周辺のバンド強度を平均化し、各株 0 分のサンプルからの増加量を計算した。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差で示した。



### 3.2 Gcn5 依存的に働くクロマチンリモデリング因子の探索

Snf22 欠損株において、上流からの段階的なクロマチン構造変化を起こさず、TATAbox 周辺のみクロマチン構造変化によって *fbp1* の転写活性化が促進される。そして Gcn5 との二重欠損によって TATAbox 周辺のクロマチン構造変化が起こらなくなり転写活性化も起こらなくなる。このことから、Gcn5 依存的にクロマチン構造変化を促す他のリモデリング因子の関与が考えられる。そこで、リモデリング活性を持つと報告されている遺伝子の破壊株および Snf22 との二重欠損株を作成し、*fbp1* 転写活性化を調べることで、Gcn5 依存的に働くリモデリング因子の同定を試みた

#### 3.2.1 Snf21 および Snf22 による転写制御機構

Snf22と同じSWI/SNFファミリーのリモデリング因子であるSnf21について解析を行った。Snf21は単独欠損で致死となるため、Snf21の変異体である*snf21-36*を用いて解析を行った。(Fig. 6)この株は、25℃で培養した場合は通常通り増殖するが、34℃で培養した場合にSnf21の機能が失われる温度感受性株である。野生型、Snf22欠損株、*snf21-36*および*snf21-36*からSnf22を欠損させた株(*snf22Δsnf21-36*)において、ノーザンブロットングを用いて*fbp1*の転写状況を解析した。*snf21-36*では、*m1on b*および*m1on c*の転写が不良となり、mRNAの転写活性化が不良化した。*snf22Δsnf21-36*では、Snf22単独欠損にそろうた。このことから、Snf21はSnf22と同一経路で働くことが示唆された。

#### 3.2.2 Swr1、Ino80およびSnf22による転写制御機構

Swr1およびIno80は、どちらもINO80ファミリーに属するリモデリング因子であり、Swr1はヒストンH2Aをヒストンバリエントの一つであるヒストンH2A.Zへ交換し、Ino80はその逆反応を行っていると言われている。Swr1単独欠損株と、Snf22との二重欠損株を作成し、ノーザンブロットングによって*fbp1*の転写活性化を解析したところ、Swr1単独欠損株では野生型と同じ表現型を示し、Snf22との二重欠損はSnf22単独欠損株と同じ表現型を示した(Fig. 7A)。このことから、Swr1は*fbp1*転写活性化には寄与しないことが分かった。また、Ino80は単独欠損で致死となる為、Ino80と複合体を作り、Ino80のリモデリング活性に関わるArp8の遺伝子破壊を行った。その結果、Arp8の単独欠損で*fbp1*のmRNAの転写量が増大し、Snf22との二重欠損では、Snf22単独欠損でみられた*m1on c*の転写不良が見られ、mRNAの転写活性化の遅れも見られたが、Snf22単独欠損に比べ*fbp1* mRNAの転写量が増大した(Fin. 7B)。これらの事実から、Swr1、Ino80はSnf22とは独立して*fbp1* mRNAの転写量調節に関わることが示唆された

Fig.6

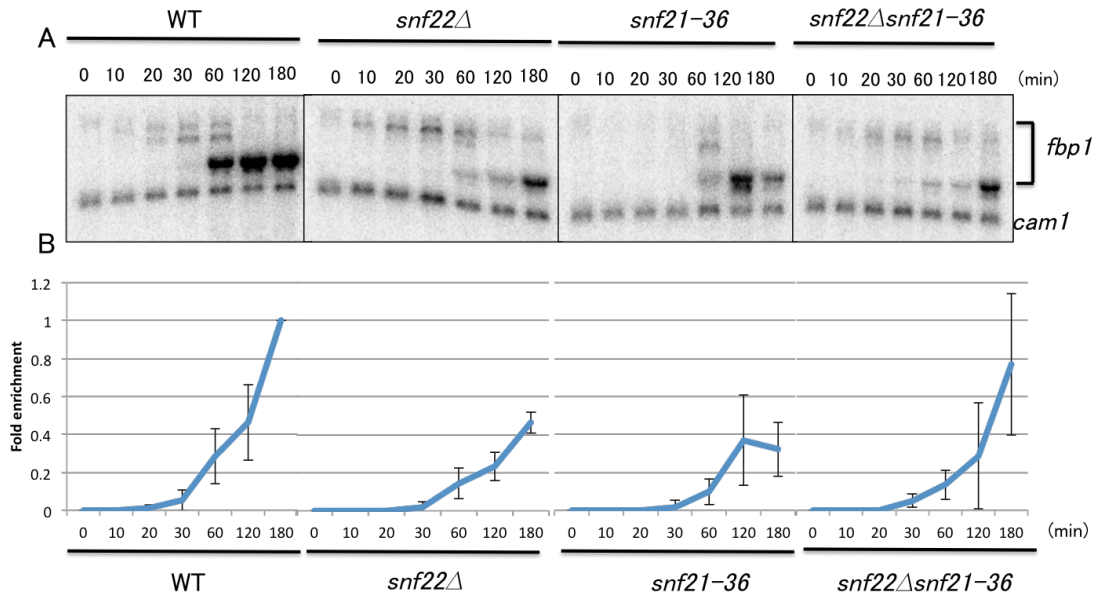


Fig.6 Snf21 は Snf22 と同一経路で働く。

(A)野生型。Snf22 欠損株、*snf21-36*および *snf22Δsnf21-36*におけるノーザンブロッティングの結果。Fig.4A と同様に行った。(B)mRNA のバンド強度の定量結果。バンド定量は Fig4B と同様に行い、野生型 180 分の値を 1 とした。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差で示した。

Fig.7

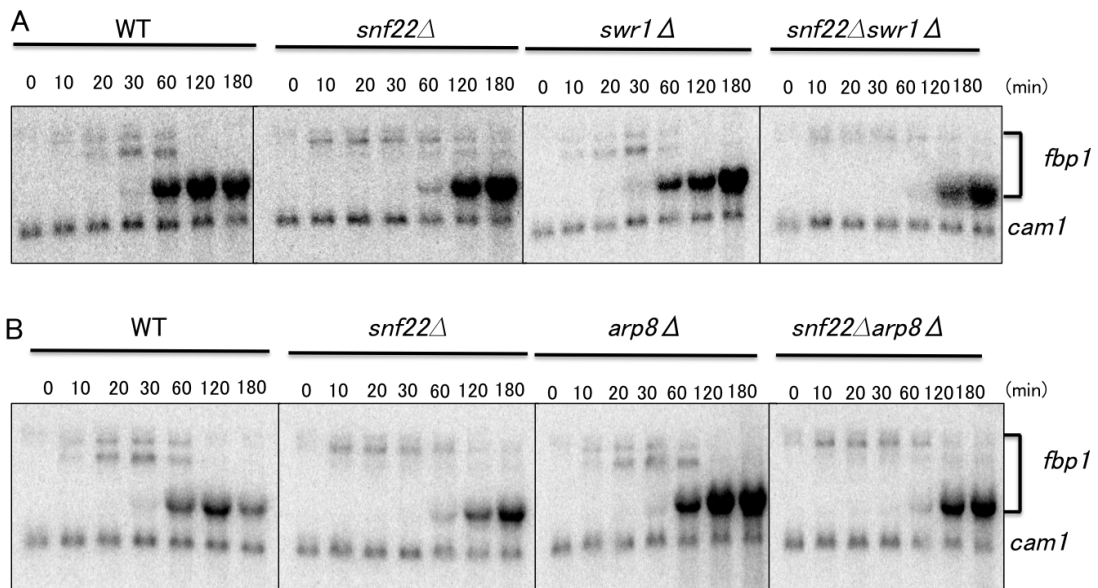


Fig. 7

(A)野生型。Snf22 欠損株、Swr1 欠損株および二重欠損株におけるノーザンブロッティングの結果。Fig.4A と同様に行った。(B) 野生型。Snf22 欠損株、*arp8Δ* 欠損株および二重欠損株におけるノーザンブロッティングの結果。Fig.4A と同様に行った。

### 3.2.3 Hrp3およびSnf22による転写制御機構

Hrp3はCHDファミリーに属するリモデリング因子であり、分子内にヒストンメチル化を認識するクロモドメインを持つ。ヒストンメチル化は転写抑制やヘテロクロマチン化などのシグナルとであり、CHDファミリーのモデリング因子はヘテロクロマチン化などに関わると言われている。Hrp3とSnf22との二重欠損株において、*fbp1*転写活性化を解析したところ、Hrp3欠損株で*fbp1* mRNAの転写が不良化した。Snf22との二重欠損株では、*fbp1* 転写活性化が全く見られなくなった。(Fig. 8) このことから、Gcn5依存的にTATAbox周辺のみのクロマチン構造変化を行う因子はHrp3である可能性が示された。実際にTATAbox周辺のクロマチン構造変化が起きなくなっているかを調べる為に、野生型、Snf22欠損株、Hrp3欠損株、Snf22とHrp3の二重欠損株でMNaseを用いたクロマチン解析を行った。その結果、Hrp3欠損株では、野生型と同様な上流からのクロマチン構造変化が起きたが、Snf22とHrp3の二重欠損では、Gcn5とSnf22の二重欠損株と同様にTATAbox周辺のクロマチン構造変化が起きなくなった。(Fig. 9) このことから、Gcn5依存的に働くリモデリング因子がHrp3である可能性が高いことが判明した。

Fig.8

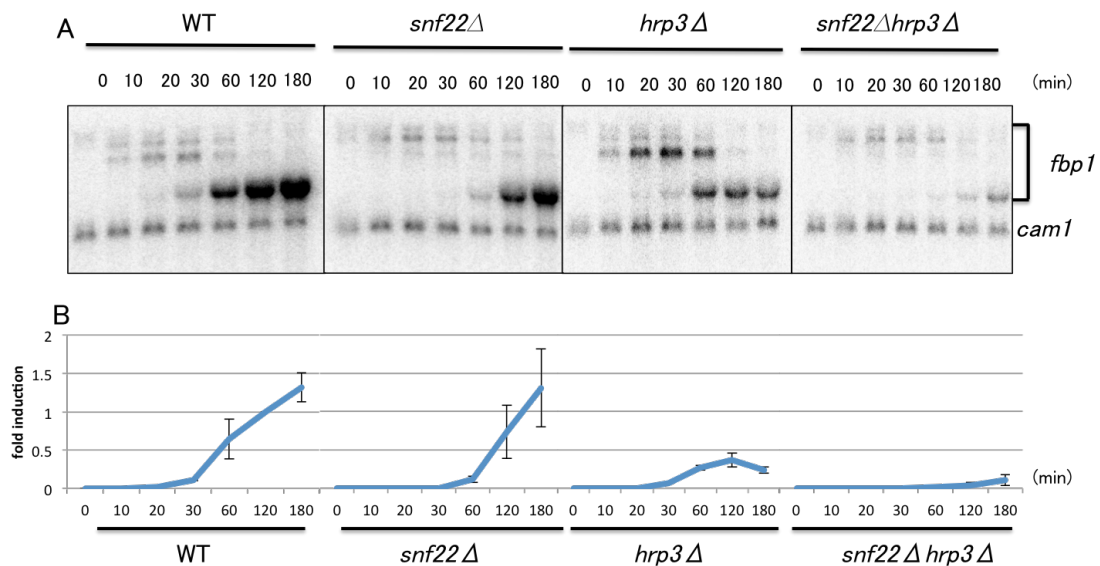


Fig.8 Snf22 と Hrp3 の二重欠損によって *fbp1* 転写活性化が起きなくなる。

(A)野生型、Snf22 欠損株、*hrp3* 欠損株および二重欠損株におけるノーザンブロッティングの結果。Fig.4A と同様に行った。(B)mRNA のバンド強度の定量結果。バンド定量は Fig4B と同様に行い、野生型 120 分の値を 1 とした。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差で示した。

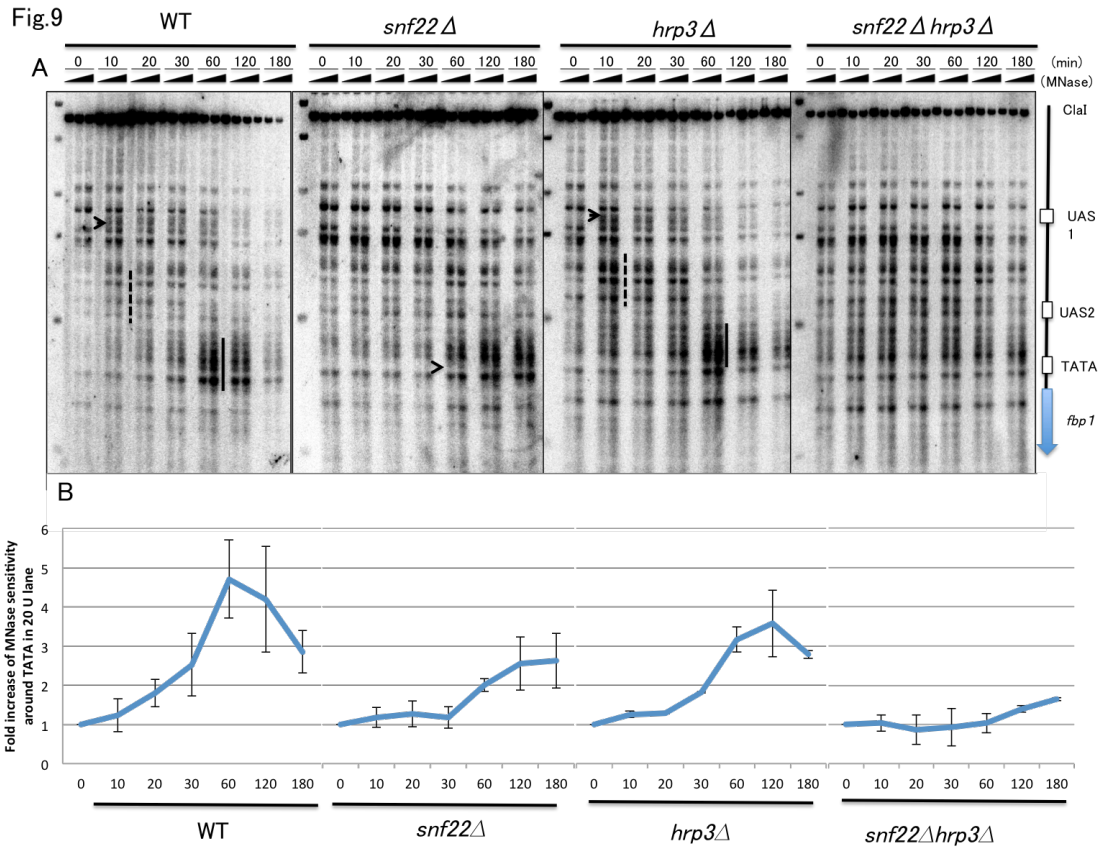


Fig.9 Snf22 と Hrp3 の二重欠損によって TATAbox 周辺のクロマチン構造変化が起きなくなる

(A)野生型、Snf22 欠損株、Hrp3 欠損株および二重欠損株におけるクロマチン解析の結果。Fig.5A と同様に行った。(B) TATAbox 周辺のバンド強度の定量結果。Fig5B と同様に行った。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差で示した。

### 3.3 Gcn5およびHrp3による転写制御機構

Gcn5依存的に働くリモデリング因子がHrp3である可能性が示唆されたため、Gcn5とHrp3の二重欠損株でノーザンブロッティングを用いて*fbp1*の転写活性化を解析した。その結果、予想外なことに二重欠損株によって*fbp1*転写が全く見られなくなった。(Fig. 10) また、この株をもちいてクロマチン解析を行ったところ、それぞれの単体欠損で見られていた上流からのクロマチン構造変化が不良化し、60分以降にUAS1周辺のクロマチンが開くことが判明した (Fig. 11 赤矢印)。Gcn5、Snf22およびHrp3のうち2つが欠損すると*fbp1*転写活性化が起こらなくなることから、3つの因子が複雑に関与する転写制御機構であることが示唆された。

Fig.10

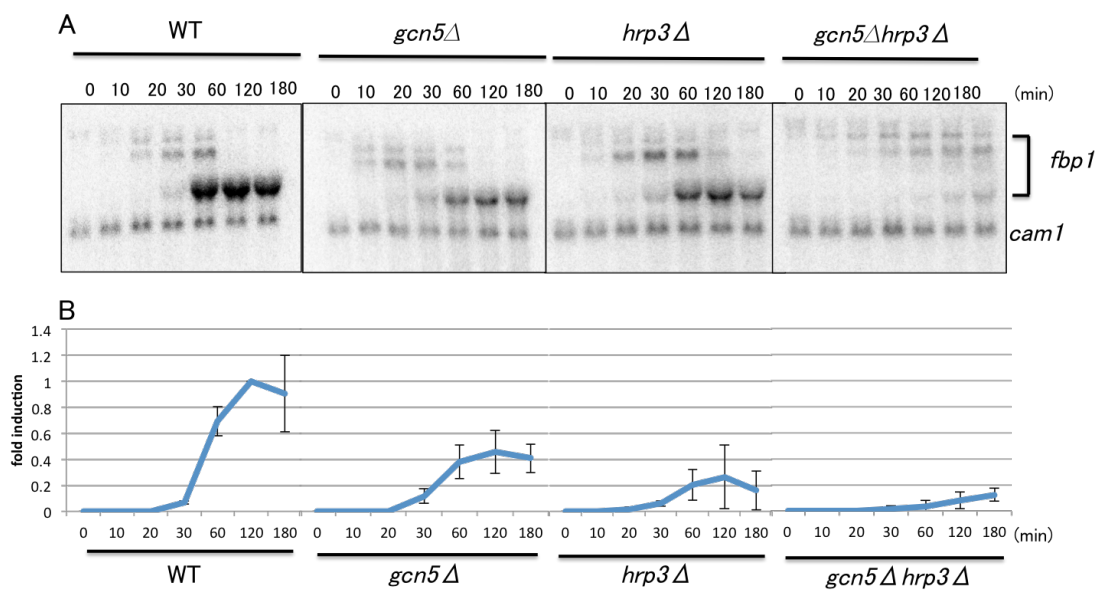


Fig. 10 Gcn5 と Hrp3 の二重欠損によって *fbp1* 転写活性化が起きなくなる。  
(A)野生型。Gcn5 欠損株、Hrp3 欠損株および二重欠損株におけるノーザンブロッティングの結果。Fig.4A と同様に行った。(B)mRNA のバンド強度の定量結果。バンド定量は Fig4B と同様に行い、野生型 120 分の値を 1 とした。エラーバーは 3 回の独立した実験の標準偏差で示した。



Fig.11

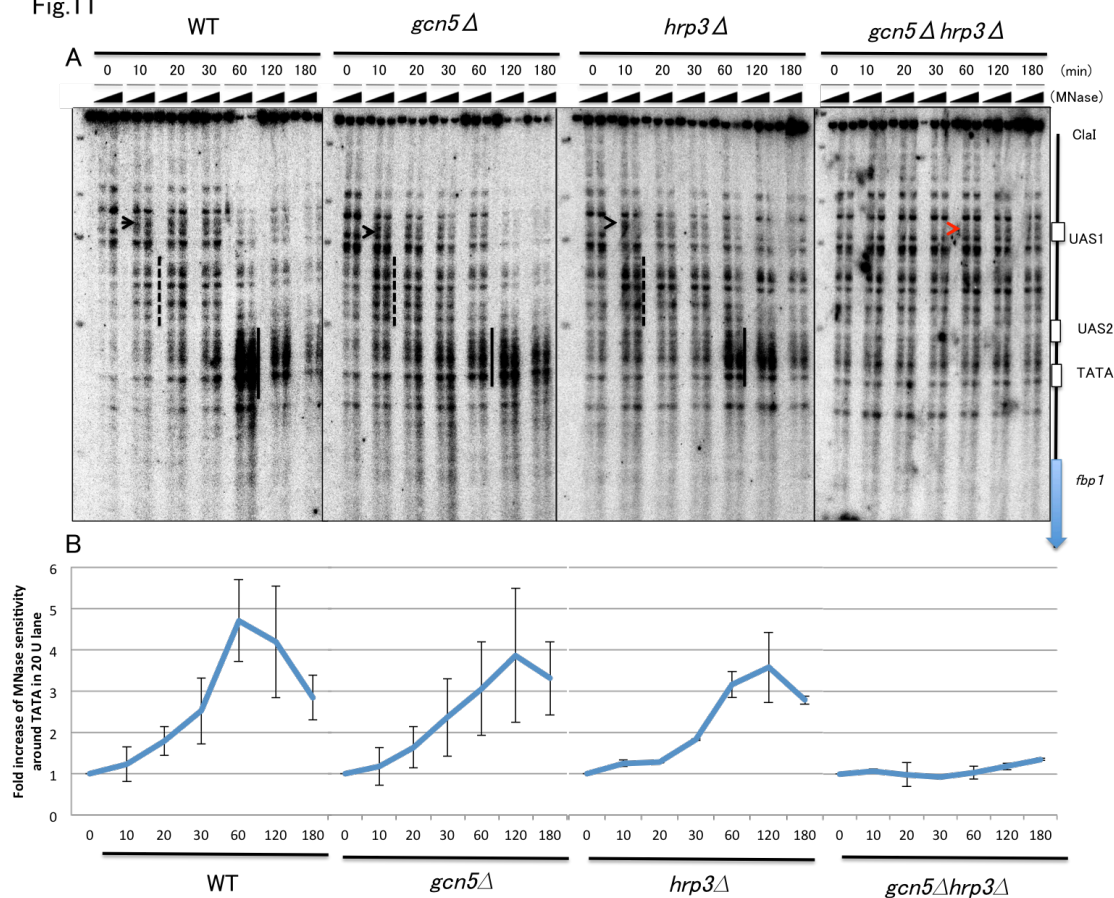


Fig.11 Gcn5 と Hrp3 の二重欠損で *fbp1* 上流のクロマチン構造変化が不良化する。(A) 野生型、Gcn5 欠損株、Hrp3 欠損株および二重欠損株におけるクロマチン解析の結果。Fig.5A と同様に行った。(B) TATAbox 周辺のバンド強度の定量結果。Fig.5B と同様に行った。

### 3.4 Snf22およびHrp3におけるヒストンH3アセチル化との関係

*fbp1*転写活性化時においてGcn5によるヒストンアセチル化が起きているかを調べるために、アセチル化ヒストンH3抗体を用いたChIPを行った。その結果、Gcn5欠損株においてヒストンH3アセチル化はほとんど起こらなくなった (Fig. 12)。このことから、*fbp1*転写活性化時においてGcn5がヒストンH3アセチル化を行うことが判明した。また、Hrp3欠損株では野生型とほぼ同じ程度ヒストンH3アセチル化が起こった (Fig. 12)。Snf22欠損株では、UAS1ではヒストンH3アセチル化が起こったが (Fig12A)、UAS2およびTATAbox周辺ではヒストンアセチル化が起こらなかった (Fig12B, Fig12C)。また、Snf22とHrp3の二重欠損によってSnf22単独欠損でおこったUAS1のアセチル化が起こらなくなった (Fig. 12)。こ

のことから、Snf22およびHrp3が*fbp1*周辺の領域でのGcn5の働きに関わる可能性が示唆された。

Fig.12

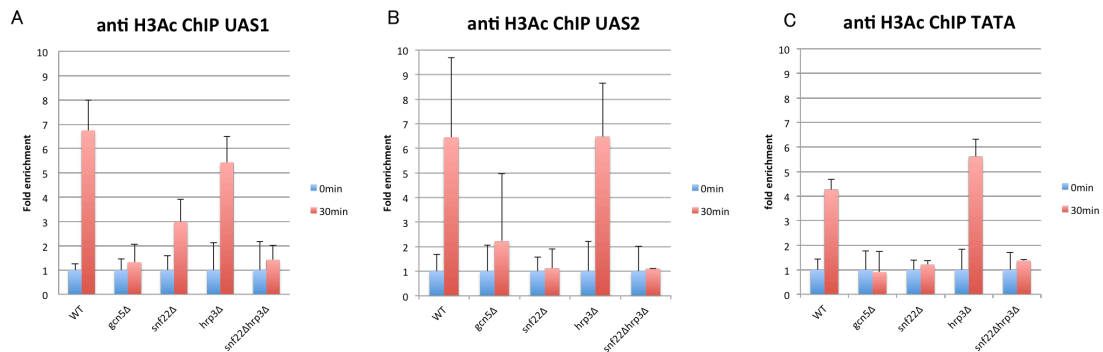


Fig.12 Snf22 および Hrp3 は Gcn5 によるヒストン H3 アセチル化に関わる。

(A) ~ (C) 野生型、Gcn5 欠損株、Snf22 欠損株、Hrp3 欠損株および Snf22 と Hrp3 の二重欠損株における *fbp1* 遺伝子の UAS1 周辺(A)、UAS2 周辺 (B) ,TATAbox 周辺 (C) のヒストンアセチル化割合。ヒストンアセチルの割合は total H3 および H3Ac の%IP を *prp3* の%IP で標準化した後、全体のヒストンのアセチル化の割合を算出したのち、各株の 0min のサンプルで標準化を行った。エラーバーは 2 回の独立した実験の標準偏差で示した。

### 3.5 まとめと考察

Snf22欠損によって上流からのクロマチン構造変化が起こらなくなることから、Snf22が上流からのクロマチン構造変化を担う因子であると言える。またそれは、Gcn5単独欠損において通常とほぼ同じように行われることから、Snf22によるクロマチン構造変化はGcn5には依存しない。Snf22欠損株において、TATAbox周辺のみが開かれることによって*fbp1*転写活性化が起こるが、Gcn5との二重欠損によってそれが行われなくなることから、Gcn5依存的に他のリモデリング因子がクロマチン構造変化を起こすと考え、様々なリモデリング因子の解析を行った。結果、Hrp3がTATAbox周辺のクロマチンのみを開く可能性が高いと判明した。しかし、Hrp3とGcn5の二重欠損によっても*fbp1*転写活性化が行われなくなることから、Gcn5とHrp3も独立に働くということが判明した。また、Snf22とHrp3が*fbp1*上流のGcn5によるヒストンアセチル化に関与することが示唆された。

これらの結果から、Snf22、Hrp3が*fbp1*周辺の領域にHATを動員し、動員されたHATによって行われるヒストンアセチル化を認識してSnf22が上流からのクロマチン構造変化を行うことが考えられる。そして、Hrp3はSnf22不在の際バックアップとしてGcn5依存的にTATAbox周辺のみリモデリングを行う。Gcn5単独欠損で上流からの段階的なクロマチン構造変化が起こること、また、*fbp1*上流領

域においてヒストンH3だけでなくH4のアセチル化も行われることから、NuA4コンプレックスのようなGcn5以外のHATの寄与が考えられる。今後は、Gcn5以外のHATについて、NuA4コンプレックスの活性サブユニットであるMst1について研究をするとともに、Snf22およびHrp3がどのようにしてHATを動員するかの機構について調べる予定である。また、Hrp3はヒストンアセチル化を認識するブロモドメインをもっていないため、ブロモドメインをもつタンパク質と複合体形成していると考えられる。そこで、ブロモドメインを持つタンパク質を遺伝子破壊し、Hrp3とともに働く遺伝子の同定を行う予定である。

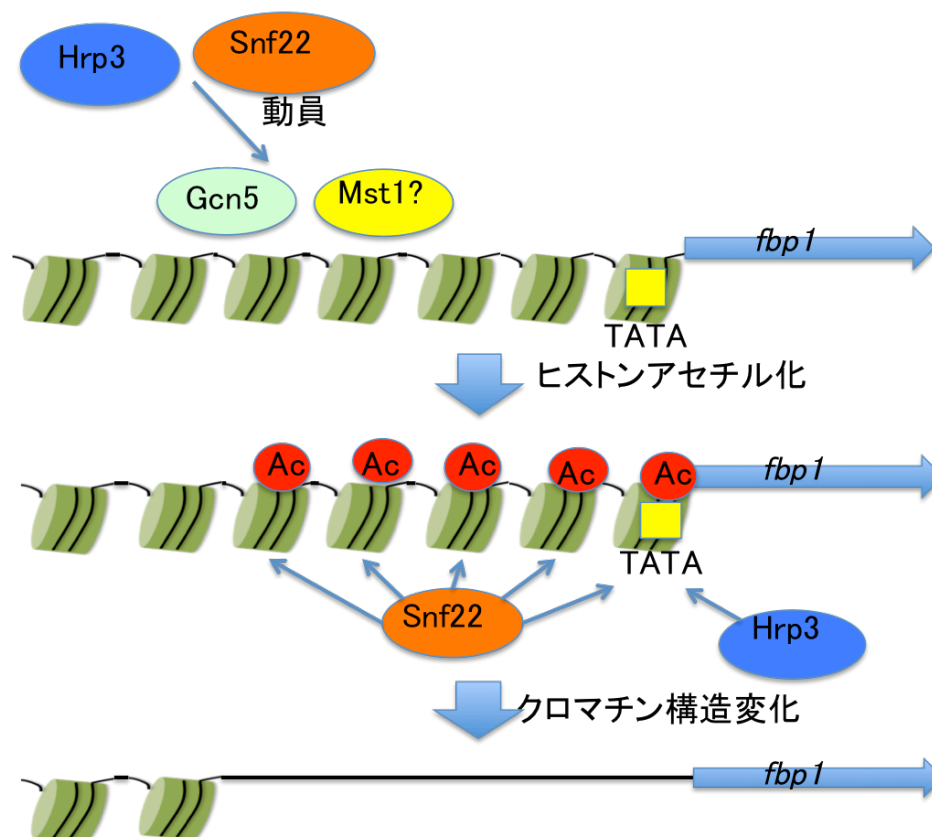


Fig.13 現在想定中のモデル

Hrp3 および Snf22 が *fbp1* 上流領域に HAT を動員し、HAT によるヒストンアセチル化を認識して Snf22 が上流からクロマチン構造変化を行う。Hrp3 は Snf22 が不在の場合のバックアップとして働き、Gcn5 依存的に働く。



#### 4 参考文献

- 1 Thomas Jenuwein<sup>1</sup>, C. David Allis Translating the Histone Code  
*Science* 10 Aug 2001:Vol. 293, Issue 5532, pp. 1074-1080 DOI:  
10.1126/science.1063127
- 2 Tony Kouzarides Chromatin Modifications and Their Function *Cell*  
Volume 128 Issue 4 February 2007, Pages 693-705
- 3 D.E. Sterner, S.L. Berger Acetylation of histones and  
transcription-related factors *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64 (2000),  
pp. 435-459
- 4 Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The biology of chromatin remodeling  
complexes. *Annual review of biochemistry* 78 , 273-304,  
doi:10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223 (2009).
- 5 Bradley R Cairns Chromatin remodeling complexes: strength in diversity,  
precision through specialization *Current Opinion in Genetics &  
Development* Volume 15, Issue 2, April 2005, Pages 185-190
- 6 G. J. Narlikar, H. Y. Fan, R. E. Kingston Cooperation between complexes that  
regulate chromatin structure and transcription *Cell*, 108 (2002), pp. 475-  
48
- 7 C. Alen, N. A. Kent, H. S. Jones, J. O'Sullivan, A. Aranda, N. J. Proudfoot  
A role for chromatin remodeling in transcriptional termination by RNA  
polymerase II *Mol Cell*, 10 (2002), pp. 1441-1452
- 8 G. Mizuguchi, X. Shen, J. Landry, W. H. Wu, S. Sen, C. Wu ATP-driven  
exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling  
complex *Science*, 303 (2004), pp. 343-348
- 9 Herpel E, Rieker RJ, Dienemann H, Muley T, Meister M, Hartman  
n A, Warth A, Agaimy A. SMARCA4 AND SMARCA2 deficiency in non-small cell  
lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens.  
*Ann Diagn Pathol.* 2017Feb; 26:47-51.  
doi:10.16/j.anndiagpath.2016.10.006.

- 10 Tang S, Hughes E, Lascelles K, Simpson MA, Pal DK. New SMARCA2 Mutation in a patient with Nicolaides-Baraister syndrome and myoclonic astatic epilepsy. *Am J Med Genet A*. 2017 Jan;173(1):195–199. doi: 10.1002/ajmg.a.37935.
- 11 Hoffman, C. S. & Winston, F. A transcriptionally regulated expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 84, 473–479 (1989).
- 12 Hoffman, C. S. & Winston, F. Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes & development* 5, 561–571 (1991).
- 13 Neely, L. A. & Hoffman, C. S. Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites. *Molecular and cellular biology* 20, 6426–6434 (2000).
- 14 Hirota, K. et al. Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456, 130–134, doi:10.1038/nature07348 (2008).

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻をいただきました、首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学研究室 廣田耕志教授に心から深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

また、一方ならぬご協力いただきました首都大学東京 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学研究室内の田岡万悟准教授、阿部拓也助教、柴田武彦客員教授、中川万紀子氏、八巻佑佳氏、佐藤亘氏、浅田隆大氏、藤井稔彦氏、高沢浩則氏、早川健太郎氏、添野公雄氏、上原清孝氏、川澄遼太郎氏、小林香氏、高木季代氏、石川大輔氏、梅田未来氏、大岡正人氏、清水直登氏、鍛冶田絹美氏、小林宏次氏、小山慎司氏、中里亜利咲氏、梅村小雪氏、鈴木雄也氏、千松賢史氏に謝意を申し上げます。

最後に、研究生活を経済的に支えていただいた両親に深く感謝致します。