

修士学位論文

転写活性化因子と抑制因子による
クロマチン構造の拮抗的な制御が
mRNAの転写開始点を決定する

指導教授 廣田 耕志 教授

平成 27年 2月 20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 13880301

氏 名 浅田 隆大

学位論文要旨（修士（理学））

浅田 隆大

転写活性化因子と抑制因子によるクロマチン構造の拮抗的な制御がmRNAの転写開始点を決定する

[序論]

真核生物のゲノム DNA はクロマチン構造をとり高次に凝集して核内に収納されている。そのため、転写などの DNA 上で起こる反応を制御する際にクロマチン構造は重要な役割を果たすことが考えられる。

Tup family corepressor は酵母からヒトまで広く保存されている global corepressor で、ストレス応答や細胞分化などに関連する多くの遺伝子の発現をクロマチン構造の制御を介して制御することが報告されているが、Tup family corepressor による遺伝子発現制御メカニズムは不明な点が多く残されている。当研究室ではこれまでに分裂酵母の Tup family corepressor である Tup11, Tup12 が、グルコース飢餓に応答する遺伝子 *fbp1* の発現制御において中心的な働きをすることを見いだしている[1-3]。また、*fbp1* 転写活性化の際には、長鎖非コード RNA 転写に共役した *fbp1* 上流領域から *fbp1* 転写開始点領域における段階的クロマチン構造変化が転写活性化に寄与することを見いだし[4]、長鎖非コード RNA のクロマチン制御における新機能を提唱している[5]。そこで、本研究では分裂酵母 *fbp1* 遺伝子の発現制御系をモデルとして、Tup family corepressor を中心とした各種の転写活性化因子や非コード RNA によるクロマチン構造制御や高次染色体構造制御におけるクロストークの解明をめざし解析を行った。

[結果・考察]

fbp1 転写制御に関わる転写活性化因子である Atf1, Php5, Rst2 の欠損株やこれらと Tup11/12 の三重欠損株を作製し解析した。3つの転写活性化因子の欠損株では、いずれも *fbp1* 転写ができなくなっていたが、非コード RNA の転写状況について異なる表現型を示した。また、Tup11/12 との三重欠損株にすると *fbp1* 転写不良が回復しており、Tup11/12 による異なる3種の抑制メカニズムを Atf1, Php5, Rst2 が解消するという拮抗的な制御が存在することが示唆された。さらに、これら欠損株を用いてクロマチン構造変化や転写装置の結合を解析したところ、次に示す3種の Tup11/12 の抑制メカニズムを各々の転写活性化因子が解消することが明らかとなった。(1) *fbp1* 上流の転写因子結合部位でのクロマチン構造変化の抑制を Atf1 が解消、(2) *fbp1* mRNA 転写開始点付近の開いたクロマチン構造構築の抑制を Php5 が解消、(3) 転写装置の結合安定化の抑制を Rst2 が解消する。先行研究により Tup11/12 欠損株ではグルコース飢餓以外のストレスでも *fbp1* 転写が活性化してしまうことがわかっており[2]、このような Tup11/12 を中心としたクロマチンを介した段階的な拮抗制御は、遺伝子発現の特異性を与えるメカニズムであることが示唆された。また、*php5* 欠損株での *fbp1* 活性化不良は Tup11/12 をともに欠損させることで回復するが、*fbp1* mRNA の転写開始点が定まらず野生型に比べて著しく不正確になっていた。*php5ΔtupΔΔ*株では転

写開始点付近のクロマチンの開きが野生型に比べて不良になっていたことから、Php5 と Tup11/12 による転写開始点付近のクロマチンの精密制御が正確な転写開始点の決定に必要であると考えられる。ここまでの研究から、Tup11/12 の多段階的抑制機構とその解除機構や、転写開始点での精密クロマチン制御機構に関する新しい知見を明らかにすることが出来た [6]。

Tup11/12 は転写活性化時にその結合量が大きく増大することから、単純な global corepressor ではないと考えている。そこで、Tup11/12 による転写制御の分子機構を究明することを次の課題とした。Tup11/12 や Atf1, Php5, Rst2 のグルコース飢餓時の *fbp1* 遺伝子上流領域での結合分布を調べると、興味深いことにすべての因子が2つのピーク（既知の Atf1 結合配列と Rst2 結合配列）を持った分布をしていることが明らかとなった。さらに、Rst2 と Php5 はその欠損により相互の分布に影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの結果から、この領域で高次の染色体構造が形成されていることが想定された。実際に 3C 解析によりこの構造がグルコース飢餓時に形成されていることが明らかとなった。

[展望]

高次の染色体構造の形成機構やその意義に焦点を当てて今後研究を継続する。クロマチンのストレス応答性や精密制御の鍵となる Tup11/12 とこの領域で転写されている非コード RNA が複合体形成している証拠が得られつつあり、非コード RNA の転写された遺伝子座への cis への作用が疑われる。そこで、非コード RNA 分子と Tup11/12 の関係や、活性化因子とのクロストークを中心にさらに研究を推進する。

1. Hirota K, Hoffman CS, Shibata T, Ohta K (2003) Fission yeast Tup1-like repressors repress chromatin remodeling at the *fbp1+* promoter and the *ade6-M26* recombination hotspot. *Genetics* 165: 505-515.
2. Hirota K, Hasemi T, Yamada T, Mizuno KI, Hoffman CS, et al. (2004) Fission yeast global repressors regulate the specificity of chromatin alteration in response to distinct environmental stresses. *Nucleic Acids Res* 32: 855-862.
3. Hirota K, Hoffman CS, Ohta K (2006) Reciprocal nuclear shuttling of two antagonizing Zn finger proteins modulates Tup family corepressor function to repress chromatin remodeling. *Eukaryot Cell* 5: 1980-1989.
4. Hirota K, Miyoshi T, Kugou K, Hoffman CS, Shibata T, et al. (2008) Stepwise chromatin remodelling by a cascade of transcription initiation of non-coding RNAs. *Nature* 456: 130-134.
5. Hirota K, Ohta K (2009) Cascade transcription of mRNA-type long non-coding RNAs (lncRNAs) and local chromatin remodeling. *Epigenetics* 4: 5-7.
6. Asada R, Takemata N, Hoffman CS, Ohta K, Hirota K (2015) Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. *Mol Cell Biol* in press.

目次

略語一覧	3
1. 序論	5
1.1 クロマチン構造	5
1.2 転写活性化因子と抑制因子	5
1.3 Tup family corepressor	6
1.4 分裂酵母 <i>fbp1</i>	6
1.5 本研究の目的	8
2. 使用した試薬および実験方法	9
2.1 試薬	9
2.1.1 購入試薬・キット	9
2.1.2 調製試薬	11
2.2 実験で使用した装置	18
2.3 実験に用いた分裂酵母株	19
2.4 実験に用いたプライマー	20
2.5 実験操作	21
● アガロースゲル電気泳動	21
● エタノール沈殿	21
● PCR	21
● 制限酵素消化	22
● ゲル精製	22
● TOPO クローニング	22
● ライゲーション	22
● 形質転換（大腸菌）	22
● ミニプレ	22
● フェノール・クロロホルム抽出	23
● 酵母ゲノム DNA の抽出	23
● 形質転換(分裂酵母)	23
● 四分子解析（テトラド）	23
● <i>php5</i> 欠損株作製	24
● 3Flag タグ付きタンパク質発現株の作製	24
● ハイブリダイゼーション	24
● Northern blot	25
● ヘキストを用いた DNA 濃度測定	26

● クロマチン解析	26
● クロマチン免疫沈降(ChIP)	27
● 5'-RACE	29
● 3C アッセイ	29
3. 結果と考察	31
3.1 Tup family corepressorを中心とした <i>fbp1</i> 転写制御機構の解明	31
3.1.1 転写活性化因子とTup corepressorの拮抗的な <i>fbp1</i> 転写制御	31
3.1.2 Atf1とTup11/12による転写因子結合部位の拮抗的なクロマチン構造の制御	32
3.1.3 Php5 (CBF)とTup11/12のによるTATA周辺領域の拮抗的なクロマチン構造の制御	34
3.1.4 Rst2とTup11/12による拮抗的な転写装置結合の制御	35
3.1.5 転写活性化因子間の結合の依存性	37
3.1.6 Tup corepressorとCBF complexによる転写開始点の決定	39
3.1.7 まとめと考察	40
3.2 グルコース飢餓特異的な <i>fbp1</i> 上流の高次構造	42
3.2.1 転写制御因子の <i>fbp1</i> 上流領域における結合分布	42
3.2.2 3Cアッセイによるゲノム高次構造の解析	43
3.2.3 転写制御因子と高次構造の関係	44
3.2.4 まとめと考察	46
4. 参考文献	48
謝辞	52

略語一覽

AcOH	acetic acid
Amp	ampicilin
ATP	adenosine triphosphate
bp	base pairs
BSA	bovine serum albumin
dCTP	deoxycytidine triphosphate
DDW	distilled deionized water
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol bis (β -aminoethylether) -N,N,N',N' - tetraacetic acid
HDAC	histone deacetylase
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
NH ₄ OAc	ammonium acetate
ORF	open reading frame
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
qPCR	quantitative PCR
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNAP II	RNA polymerase II
rpm	rotation per minute
RT	room temperature
SDS	Sodium dodecyl sulfate

TBS	tris bufferd saline
UAS	upstream activation sequence
2ME	2-mercaptoethanol

1. 序論

1.1 クロマチン構造

ヒトなどの真核生物では、ゲノム DNA は核に収納されている。長大な分子である DNA を微小な空間である核に収納するには高度に凝集しなければならない。その問題を解決するために真核生物のゲノム DNA はクロマチン構造をとっている。ゲノム DNA は、タンパク質であるヒストン H2A、H2B、H3、H4 それぞれ 2 分子ずつにより構成されるヒストン八量体の周りを約 2 周巻きついたヌクレオソーム構造をとり、それが高次に折りたたまれてクロマチン構造となり核内に収納される。クロマチン構造をとることで凝集することができるという利点の反面、DNA 上で起こる反応に必要なタンパク質の接近性が制限されるので DNA 上で起こる反応に対しては阻害的に働く。しかし、真核生物は局所的にクロマチン構造を変化させることでクロマチン構造が持つ性質をうまく利用し、転写や複製、修復、組換えといった反応を制御している^{1,2}。

クロマチン構造はヒストン修飾酵素や ATP 依存性クロマチンリモデリング因子によって変化させられる。クロマチンを構成するヒストンの N 末端領域はヌクレオソームから飛び出しており、メチル化やアセチル化など様々な修飾を受ける。ゲノムワイドなヒストン修飾解析によりそれぞれの修飾パターンは特徴を持って分布していることがわかっている。例えば、転写が活発に起きている遺伝子のプロモーター領域は H3 がアセチル化され、ORF 内部の 5' 側では H3K4 のトリメチル化、遺伝子内部全体に H3K36 のトリメチル化が起こる。また、転写が抑制されている領域では H3K9 や H3K27 がメチル化され repressive なクロマチンとなり転写が抑制されている。さらに、DNA 損傷が起こると H2A.X のリン酸化がおき DNA 修復の機構が誘導される。このようにヒストン修飾により転写や修復など DNA 上で起こる反応は適切に制御される^{3,4}。ヒストン修飾が起こるとそれを認識するドメインを持つタンパク質がそのクロマチン領域にリクルートされる。アセチル化やメチル化されたヒストンを認識するプロモドメインやクロモドメインを持つ ATP 依存性クロマチンリモデリング因子もその 1 つである⁵。クロマチンリモデリング因子はその領域のヒストンの位置をずらしたり外したり、再構築したりしてクロマチンを編集する因子である。ヒストン修飾やクロマチンリモデリング因子などが協調的に働いて複雑にクロマチンの制御さらには転写など DNA 上で起こる反応を制御している。

1.2 転写活性化因子と抑制因子

クロマチン構造は転写の過程で大きく影響を与える⁶。DNA がヌクレオソーム構造をとると転写開始反応である Pre-initiation complex 形成の過程で阻害的に働く⁷。そのため、転写を活性化するにはプロモーター領域のヒストンははずされ、不活性化するときには再構築される⁸⁻¹⁰。ゲノム DNA には、細胞が生存する過程で常に必要な遺伝子や特殊な状況

化でのみ必要な遺伝子など多数の遺伝子が存在し、転写を制御する際にはどの遺伝子を活性化または抑制するかを区別しなければならない。多くの場合遺伝子の上流領域には特定の制御配列である *cis-regulatory element* が存在し、そこにその配列を認識するドメインを持つ DNA 結合タンパク質が結合する¹¹。この DNA 結合タンパク質を転写活性化因子や転写抑制因子と呼ぶ。これら転写因子はヒストン修飾酵素や ATP 依存性クロマチンリモデリング因子、メディエーターなど転写を活性化する因子である *coactivator* や転写を抑制する *corepressor* をリクルートする¹²⁻¹⁴。これら *coactivator* や *corepressor* がクロマチン構造制御や基本転写因子の結合の制御を介して転写を制御する。

1.3 Tup family corepressor

Tup family corepressor は酵母からヒトまで広く保存されており、出芽酵母では Tup1、ショウジョウバエでは Groucho、ヒトでは TLE と呼ばれる *global corepressor* である^{13,15}。*Saccharomyces cerevisiae* の Tup family corepressor である Tup1 はグルコースや DNA 損傷、mating type などによって制御される 300 以上の遺伝子の抑制に関わる^{16,17}。Tup1 自身は DNA 結合ドメインを持っておらず、DNA 結合タンパク質である転写抑制因子と相互作用して標的遺伝子の領域にリクルートされる。Tup1 と相互作用する転写抑制因子としては、グルコース関連遺伝子のプロモーター領域に結合配列がある Mig1 や DNA 損傷反応の遺伝子を制御する Crt1、低酸素応答の遺伝子を制御する Rox1、性特異的遺伝子を抑制する $\alpha 2$ などがあり、これらの因子の標的遺伝子が Tup1 により抑制される¹⁶。

Tup1 による抑制メカニズムはクロマチンや転写装置に作用する様々な機構が報告されている。その 1 つがヒストン脱アセチル化酵素である HDAC をリクルートする機構である。上述のようにヒストンのアセチル化が起こると転写が活性化するが、Tup1 は HDAC と相互作用し標的遺伝子のプロモーター領域を脱アセチル化することで転写を抑制する¹⁸⁻²⁰。第 2 に、ヌクレオソームのポジションを制御する機構がある。Tup1 存在化では標的遺伝子の TATA ボックスや転写因子結合部位などにはヌクレオソームが存在し、活性化因子の接近性を制限している²¹⁻²³。また、Tup1 とクロマチンリモデリング因子である ISW2 が協調してヌクレオソームポジションを制御して転写を抑制する²⁴。第 3 に、Tup1 はメディエーターと相互作用して転写装置に影響を与えて転写を抑制する²⁵。このように、Tup1 による抑制メカニズムは多様で標的遺伝子によって異なるが、これらすべての抑制機構を利用して転写を抑制している標的遺伝子もある²⁶。様々な標的遺伝子をモデルとして研究が行われているが、Tup family corepressor による転写制御の分子メカニズムは不明な点が多く残っている。

1.4 分裂酵母 *fbp1*

分裂酵母 *fbp1* は fructose-1,6-bisphosphatase をコードする糖新生に必要な遺伝子であり、グルコースが豊富な条件下では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て

著しく転写が活性化される^{27,28}。この遺伝子は細胞外環境に反応するシグナル伝達経路である MAPK、PKA 経路によって転写が制御され、これらの経路で活性化される転写因子である Atf1, Rst2 により制御される。*fbp1* 上流の遺伝子間領域には UAS1、UAS2 という 2 つの cis-regulatory element が存在することが知られている(Fig.1)。UAS1 は cyclic AMP response element (CRE)配列であり、MAPK 経路により活性化される転写活性化因子である Atf1 の結合配列である²⁹。UAS2 は stress response element (STRE) 配列であり、PKA 経路により制御される転写活性化因子の Rst2 の結合配列である^{30,31}。また、PKA 経路が不良化する変異株のマルチコピーサプレッサースクリーニングにより Php5, Tup11, Tup12 が *fbp1* 転写を制御する因子として同定された³²。Php5 は Histone fold domain を持ち、Php2, Php3 と 3 量体を形成して CCAAT という配列に結合する転写活性化因子であり CCAAT-binding factor (CBF) とよばれる³³。Tup11, Tup12 は分裂酵母の Tup family corepressor であり *fbp1* 上流領域のクロマチン構造の制御を介して *fbp1* 転写を制御している^{30,34,35}。

当研究室では、*fbp1* の転写に先立って *fbp1* 上流領域からの長鎖非コード RNA 転写に共役したクロマチンリモデリングが起こることを発見している³⁶。この非コード RNA は少なくとも 3 種転写されており(Fig1)、グルコースが豊富な条件では最上流から転写される a の RNA が転写されていて、グルコース飢餓になると転写開始点が下流に移行していき b, c の RNA が転写され、この転写と共役してクロマチンリモデリングが起こる(Fig2)。このような長鎖非コード RNA 転写に共役したクロマチンリモデリング機構は窒素源飢餓時に誘導される減数分裂期の組換えホットスポットである *ade6-M26* 部位でも生じていることを発見した³⁷。当研究室では、このような長鎖非コード RNA を metabolic stress induced long non-coding RNA (mlonRNA)と名付け、非コード RNA のクロマチン制御における新機能を提唱している^{38,39}。

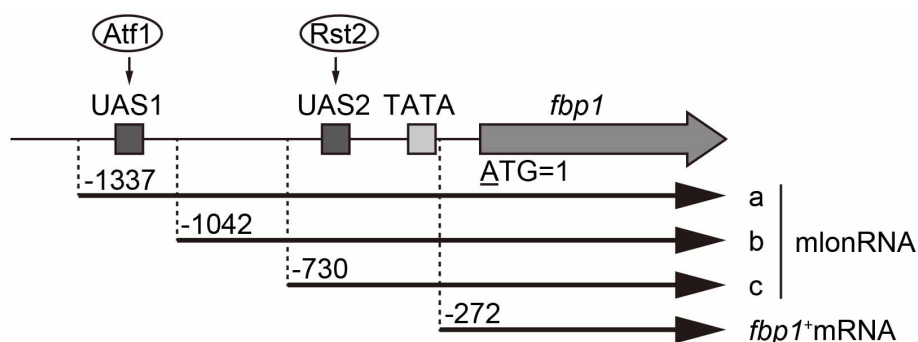


Fig.1 *fbp1* locus と転写物の模式図。

上線、四角、グレー矢印はゲノム DNA の転写因子結合部位、TATA ボックス、*fbp1* ORF を示し、下部の黒矢印は転写物を示す。黒矢印に付属する数字は ORF の開始コドン ATG の A を+1bp をしたときの転写開始点の距離(bp)を示す。

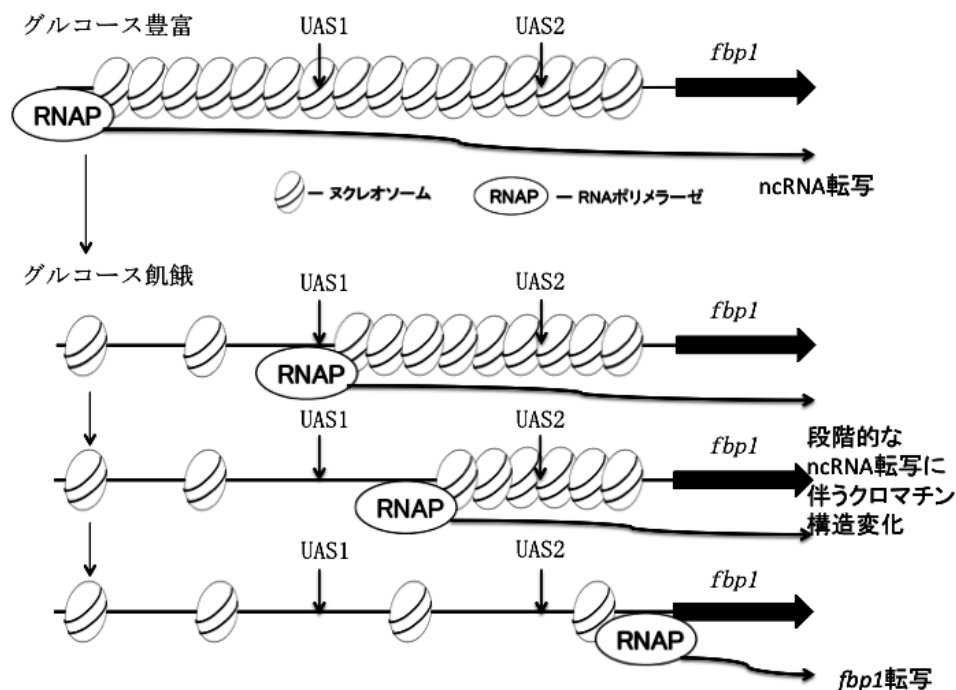


Fig.2 *fbpl* 転写活性化過程の長鎖非コード RNA 転写に共役したクロマチン構造変化
グルコース飢餓になると長鎖非コード RNA の転写開始点が段階的に下流に移動し、その転写に共役して *fbpl* 上流領域のクロマチンが開いていく。

1.5 本研究の目的

クロマチン構造が生体内のDNA上で起こる反応を制御する上で重要な働きをする。細胞外の環境変化やシグナル物質による遺伝子発現の変化は細胞の生存や分化など生命維持にとって大変重要である。ゲノムには様々な遺伝子がコードされる中、特定の遺伝子の適切な応答制御がどのように行われているのか、そのメカニズムは不明な点が多い。本研究では、グルコース飢餓ストレスに応答する分裂酵母*fbpl*遺伝子の発現制御系をモデルシステムとして用い、転写活性化因子やglobal corepressorであるTup family corepressorの解析を行い、クロマチン構造を介した転写の制御機構やクロマチン構造が果たす意義を解明することを目的として研究を行った。さらに、近年クロマチン構造だけでなくゲノムの高次構造もDNA上で起こる反応の制御に重要な役割を果たすことが示唆されてきている。*fbpl*遺伝子をモデルとして高次構造による制御の可能性を検討し、クロマチン構造とゲノム高次構造がどのようにクロストークして転写を制御するのかを明らかにすることを試みた。

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

Acc I	NEB
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 Labelling System	GE
anti-FLAG M2	SIGMA
ATP	NEB
Bacto Agar	BD
Bacto Trypton	BD
Bacto Yeast Extract	BD
Biotin	ナカライ
Bromophenol blue (試薬特級)	和光純薬
BSA	ナカライ
CaCl ₂ · 2H ₂ O (分子生物学用)	和光純薬
Cla I	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
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
Hha I	NEB
Hoechst	同仁化学研究所
Hpa I	NEB
H ₃ PO ₄ (試薬特級)	和光純薬
IGEPAL CA-630	SIGMA
Inositol (試薬特級)	和光純薬
KCl (試薬特級)	和光純薬
KH ₂ PO ₄ (試薬特級)	和光純薬
K ₂ HPO ₄ (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 ₂ · 6H ₂ O (試薬特級)	和光純薬
MgSO ₄ (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 ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	国産化学
NaOAc · 3H ₂ 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 ₄ 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
Pst I	TaKaRa
Quick ligase	NEB
RNaseA	ナカライ
SDS	ナカライ
SMARTer RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
SnaB I	NEB
Sorbitol (試薬一級)	和光純薬
Sph 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
α 32P-dCTP	パーキンエルマー
λ EcoT14 I	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 調製試薬

● 50×TAE buffer

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

● 10×TE buffer

試薬	濃度
Tris-HCl pH8.0	100mM
EDTA	10mM

調製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 μ l
計	1L

オートクレーブをかけて滅菌した。プレート培地を作るときは、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 ₂	10ml
1M MgSO ₄	10ml
1M glucose	20ml
5M NaOH	200 μ 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 solIII

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 になるように加えた。プレート培地を作るときは、オートクレーブ前に Agar 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 になるように加えた。

● YED 培地

試薬	使用量
Yeast extract	5g
Glucose	1g
Glycerol	30ml
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 になるように加えた。

● SD 培地

試薬	使用量
Yeast nitrogen base w/o amino acid	6.7g
Glucose	10g
必要なアミノ酸	100mg
計	1L

オートクレーブをかけて滅菌した。プレート培地を作るときは、オートクレーブ前に Agar 20g/L 加えた。

● 3-vitamines2

試薬	使用量
Calcium pantothenate	100 mg
Nicotinic Acid	100 mg
Inositol	1 g
計	1L

● Biotin solution

試薬	使用量
Biotin	10 mg
Ethanol	500 ml
計	1L

● SPA 培地

試薬	使用量
KH ₂ PO ₄	1 g
Glucose	10 g
3-vitamines2	1ml
Biotin solution	1ml
計	1L

最後に Agar を 30g 加えオートクレーブして滅菌した。

● 10×LiOAc 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%)
1×LiOAc buffer	up to 10ml

● Hybridization buffer

試薬	使用量
BSA	1g
SDS	7g

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	8.95g
H ₃ PO ₄	0.2ml
0.5M EDTA	0.2ml
計	100ml

● Hybridization wash buffer

試薬	使用量
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	7.16g
H ₃ PO ₄	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 ₂ O	6.8g
EDTA	3.72g
NaOH	4g
計	1L

調製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	0.4%
Xylene cyanol	0.4%

● 20× SSC

試薬	使用量
----	-----

NaCl	175.3g
Trisodium citrate dihydrate	88.2g
計	1L

● 10×TNE

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

調製後オートクレーブをかけた。

● Pre-incubation buffer

試薬	使用量
2-mercaptoethanol	500 μ l
0.5M EDTA	60 μ l
1M Tris-HCl pH8.0	200 μ l
計	10ml

● MNase zymolyase solution

試薬	使用量
Glucose	150mg
1M Sorbitol	9ml
0.5M EDTA	150 μ l
1M Tris-HCl pH7.5	450 μ l
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 ₂ PO ₄	10mM
K ₂ HPO ₄	10mM
MgCl ₂ · 6H ₂ 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	0.3%
EDTA	5mM
Tris-HCl pH7.5	10mM

● 10×TBS

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

調製後オートクレーブをかけた。

● 10×PBS

試薬	濃度
NaCl	137mM
Na ₂ HPO ₄	8.1mM
KCl	2.68mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM

調製後オートクレーブをかけた。

● ChIP Lysis 140 buffer

試薬	濃度
Na-deoxycholate	0.1%
EDTA	1mM
HEPES-KOH pH7.5	50mM
NaCl	140mM
TritonX-100	1%

● ChIP Lysis 500 buffer

試薬	濃度
Na-deoxycholate	0.1%

EDTA	1mM
HEPES-KOH pH7.5	50mM
NaCl	500mM
TritonX-100	1%

● ChIP LiCl/detergent buffer

試薬	濃度
Na-deoxycholate	0.5%
EDTA	1mM
LiCl	250mM
IGEPAL CA-630	0.5%
Tris-HCl pH8.0	10mM

● ChIP Elution buffer

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

● FA Lysis buffer

試薬	濃度
Na-deoxycholate	0.1%
EDTA	1mM
HEPES-KOH pH7.9	50mM
NaCl	140mM
TritonX-100	1%

● Quick ligation buffer

試薬	濃度
Tris-HCl pH7.6	132mM
MgCl ₂	20mM
DTT	2mM
ATP	2mM
PEG6000	15%

2.2 実験で使用した装置

Mupid-2plus

ADVANCE

Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific
PCR Thermal Cycler Dice	TaKaRa
Thermal Cycler Dice Real Time System TP800	TaKaRa
Multi beads shocker	安井器械
FLUOROSKAN ASCENT FL	Thermo Fisher Scientific
FLA7000	FUJI FILM
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>
SPH13	<i>h- ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 tup11::ura4 tup12::ura4</i>
SPH18	<i>h+ ade6-M26 ura4-D18 his3-D1 atf1::ura4</i>
SPH19	<i>h- ade6-M26 leu1-32 rst2::kanr</i>
SPH20	<i>h- ade6-M26 rst2-3Flag<<kanMX leu1-32</i>
SPH113	<i>h+ ade6-M216 ura4::fbp1-lacZ leu1-32 his7-366 atf1::ura4 tup11::ura4 tup12::ura4</i>
SPH117	<i>h+ ura4-D18 php5::kanMX6</i>
SPH141	<i>h- ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 rst2::kanMX6 tup11::ura4 tup12::ura4</i>
SPH156	<i>h+ ade6-M26 ura4-D18 php5::kanMX6 tup11::ura4 tup12::ura4</i>
SPH157	<i>h+ ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 php5::kanMX6 rst2-3flag::kanMX6</i>
SPH161	<i>h- leu1-32 atf1-3flag::LEU2</i>
SPH164	<i>h+ ade6-M26 ura4-D18 his3-D1 atf1::ura4 rst2-3flag::kanMX6</i>
SPH166	<i>h+ ade6-M26 ura4-D18 his3-D1 atf1::ura4 php2-3flag::kanMX6</i>
SPH167	<i>h- ade6-M26 leu1-32 rst2::kanr php2-3flag::LEU2</i>
SPH168	<i>h- leu1-32 ura4-D18 php2-3flag::LEU2</i>
SPH191	<i>h- leu1-32 atf1-3flag::LEU2 php5::kanMX6</i>
SPH192	<i>h- ade6-M26 leu1-32 rst2::kanr atf1-3flag::LEU2</i>
SPH194	<i>h- ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 tup11::ura4 tup12::ura4 php2-3flag::kanMX6</i>
SPH196	<i>h- ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 tup11::ura4 tup12::ura4 rst2-3flag::kanMX6</i>
SPH197	<i>h- ade6-M26 leu1-32 tbp1-3flag::LEU2</i>
SPH198	<i>h- ade6-M26 leu1-32 rst2::kanr tbp1-3flag::LEU2</i>
SPH199	<i>h- ade6-M26 leu1-32 ura4-D18 tup11::ura4 tup12::ura4 atf1-3flag::LEU2</i>
SPH216	<i>h- ade6-M26 ura4-D18 leu1-32 atf1::ura4 tup11::ura4 tup12::ura4 rst2-3flag<<kanMX6</i>

2.4 実験に用いたプライマー

Name	Sequence (5'-3')
php5 deleion cloning F	CTGGATTGAAGTCAATTACT
php5 deleion cloning R	CAACTGATAGTTTTAGCAAC
php5 deleion check F	GCGTAAGATTCAATTAACAAGG
php5 deleion check R	GTCGATAATTTGTTAGCAGC
tbp1-3flag cloning F	CATATGCTGTTATTGACCAAACATAG
tbp1-3flag cloning R	CATATGTTTTCGAAATTCAGAC
tbp1-3flag linearize F	GAGTAAGCCAAACCTTCC
tbp1-3flag linearize R	CCACGGTACTTTCTCATC
tbp1-3flag check	GGATGATACGTCTCGTTAAC
php2-3flag F	GTCGACATGAATCCATATGAGCC
php2-3flag R	GTCGACTTCATGGTTCCTGAAG
php2-3flag check	CGAGACGAATATAACCGTAAC
atf1-3flag F	CTCGAGATGTCCCCGTCTCCCGTCAA
atf1-3flag R	CTCGAGTACCCTAAATTGATTC
atf1-3flag check	CGTCATCTCTTAATACATTTTG
nmtT	ATGCAGCTTGAATGGGCTTCCATAG
fbp1 ORF F	CGCCGATACAATCAGAAGC
fbp1 ORF R	CGATGAGTTTGCAGCATCC
cam1 F	CTACCCGTAACCTTACAG
cam1 R	TGGAAGAAATGACACGAG
fbp1-1 F	GGTAGAAGCTTTACCTTTAAG
fbp1-1 R	CCCTTTG TGGACATTTAGAC
fbp1-2 F	GAAAATTCCACGGGACATTAG
fbp1-2 R	CCCTTCCTATTAGCAATAAGG
UAS1 F	GGGATGAAAACAATCAACCTC
UAS1 R	GGAATGCAGCAACGAAAATC
fbp1-4 F	GATTTTCGTTGCTGCATTCC
fbp1-4 R	CCTATGATTTGATGTCTAGC
fbp1-5 F	GCTAGACATCAAATCATAGG
fbp1-5 R	CATTCCACCCTATTCATC
UAS2 F	GGGTGGAATGAGTCCGC

UAS2 R	GTTCCGCGAATCATAAGCC
TATA F	CGCGGAACTAAACATAGCG
TATA R	GCTAGAAACCGAGTGGTG
fbp1-8 F	GCCCAACTTAACTCAGCTC
fbp1-8 R	GCTTCTGATTGTATCGGCG
5'-RACE fbp1 mRNA	CACCGGCGTCAATGTTGGAAGAGCCATC
3C Hha1 F2	CCTTTAGCACTTCCCAATCATCTACG
3C Hha1 F3	GCCCCTCGTTTTTTGAAGATTAGG
act1 ORF F	CACCATGGTATTATGGTAGG
act1 ORF R	GACAATACCGTGCTCAATG

2.5 実験操作

● アガロースゲル電気泳動

TAE buffer の入った電気泳動槽にアガロースゲルを置き、10×loading 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 CH₃COONa, 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。15000g、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、15000g、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(5μl)、2.5mM dNTP mix(4μl)、5U/μl Ex Taq(0.2μl)、各10μM プライマー(1μl)、100ng/μl 鋳型DNA(1μl)、DDW(38μl)または、5×Primestar GXL Buffer(10μl)、2.5mM dNTP mix(4μl)、1.25U/μl Primestar GXL(0.5μl)、各10μM プライマー(1μl)、100ng/μl 鋳型DNA(1μl)、DDW(33μl)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℃	2 min	Primestar の場合 98℃
2. 変性	94℃	30 sec	Primestar の場合 98℃
3. アニーリング	54℃	30 sec	アニーリング時の温度はプライマーの T _m 値で行う
4. 伸長	72℃	1 min / kbp	Step 2-4 × 30 cycle
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。

● TOPO 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 (1μl)、pCR-Blunt II -TOPO ベクター (0.5μl)を混ぜて 15 分室温で放置した後、competent cell (70μl)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 α を氷上で解凍し、DNA (液量が DH5 α の 1/10 になるように)を加え、氷上で 30 分静置した。42℃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℃で培養した。カナマイシンを用いてセクションする場合、500μl の SOC 培地を用いて 37℃で 2 時間培養した後、5000rpm、30sec 遠心し上清を約 100μl 残るように取り除き LB kan プレートに塗り広げ、37℃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 30μl 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℃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。150μl のミニプレ sol I を加え vortex により混和した。次に、ミニプレ sol II 150μl 加え 5 回転倒混和した後、ミニプレ sol III 150μl を加え再び 5 回転倒混和した。15000rpm、4℃、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 μ 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、14800g、RT で 5 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。

● 酵母ゲノム DNA の抽出

分裂酵母を YE プレートに塗り 30℃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 μ l の TE に溶解した。目的の分裂酵母株を 10ml の YE 培地で 1.0×10^7 /ml になるまで培養した。培養液を 3000rpm、4℃、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℃、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℃、10 秒遠心して上清を取り除き、50 μ l の LiOAc buffer、10 μ l の DNA、300 μ l の PEG4000 buffer を加えて混ぜ、30℃で 30 分インキュベートした。その後、40 μ l の DMSO を加え、42℃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 μ 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℃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 of レ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℃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 により形質転換されたかを確認した。

● 四分子解析 (テトラド)

減数分裂により2つの株の遺伝子は交差し、新たな遺伝子のセットを持つ孢子が形成される。接合型(h+/h-)の異なる2つの株を SPA プレート上で混合し、30℃で一晩培養し、接合させることで孢子を形成させた。SPA プレート上で培養した酵母を YE プレートに塗り広げ、顕微鏡 (OLYMPUS CK2 のステージに Nikon T1-SM を取り付けたもの) で目視しながら、NARISHIGE のマニピュレーターを用いて孢子を分離した後、30℃で3時間程度培養した。孢子それぞれを単離して YE プレートで培養した。生えてきたコロニーを目的のセクション培地に植えつぎ、表現型を解析した。

● *php5* 欠損株作製

php5 遺伝子を含む領域を *php5* deletion cloning F, R プライマーを用いて PCR して増幅し、TOPO クローニングした。クローニングした *php5* 遺伝子領域から *Acc* I -*Hpa* I 領域(約 1kb) を制限酵素消化して取り除き、pFA6a-kanMX6 プラスミドから取り出した kanMX6 遺伝子をライゲーションにより挿入した⁴⁰。このプラスミドを *Sna*B I 消化した *php5::kanMX6* 断片を目的の分裂酵母株に形質転換した。G418 セレクションし、生えてきたコロニーからゲノム DNA を抽出して、*php5* deletion check F, R プライマーを用いて PCR し、欠損を確認した。

● 3Flag タグ付きタンパク質発現株の作製

int1, *int2* integration ベクター⁴¹ の GFP タグを 3Flag タグに置換した *int15*, *int16* (耐性マーカーとしてそれぞれ LEU2, kanMX6 を使用)を用い、組込み反応を利用して 3Flag タグ付きタンパク質発現株を作製した。標的遺伝子領域をクローニングして得た断片を *int15* または *int16* ベクターのマルチクローニングサイトに挿入して integration ベクターを作製し、クローニングした領域内のみで 1 カ所切断できる制限酵素で処理し、目的分裂酵母株に形質転換した。セレクションを行い生えてきたコロニーのゲノム DNA を抽出して、遺伝子特異的なプライマーと integration ベクター内の *nmtT* プライマーを用いて PCR し、3Flag タグが挿入されたか確認した。

<Php2-3Flag>

php2-3Flag F, R プライマーを用いてクローニングし、作製した integration ベクターを *Sph* I で切断して形質転換した。*php2*-3Flag check プライマーを用いて確認した。

<Tbp1-3Flag>

tbp1-3Flag F, R プライマーを用いてクローニングし、作製した integration ベクターもとに *tbp1*-3Flag linearize F,R プライマーで PCR した産物を形質転換した。*tbp1*-3Flag check プライマーを用いて確認した。

<Php2-3Flag>

atf1-3Flag F, R プライマーを用いてクローニングし、作製した integration ベクターを *Pst* I で切断して形質転換した。*atf1*-3Flag check プライマーを用いて確認した。

● ハイブリダイゼーション

³²P 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 2.5μl の primer solution を加え、合計 25μl 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、5μl の labeling buffer を加えた。そこに、2.5μl の α ³²P-dCTP と 1μl 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、3000rpm、3 分遠心してカラムを通し、50μl の TE が入った 1.5ml チュー

ブに移して未反応の α ^{32}P -dCTP を取り除いた。この溶液を 5 分間 boil 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°C 、30 分でローテーションした。Hybridization buffer を交換し、 ^{32}P でラベルされた DNA プローブを加え、 62°C 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°C 、5 分でローテーションし、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。ラップで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 培地で一晩培養し増殖した後、400ml の YER 培地に移して $2.0 \times 10^7/\text{ml}$ になるまで培養した。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 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 μl 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 μl 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 μl 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 μl 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 μl 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 でインキュベートし、風乾は室温 5 分行った)。Nanodrop で濃度を測定し、各サンプル 10 μg になるように 5 μl の RNA を希釈して用意した。そこに、10 \times Northern blot electrophoresis buffer 2 μl 、ホルムアルデヒド 3 μl 、ホルムアミド 10 μl 、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 μl の Northern blot loading buffer を加え、1 μl 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 μl 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。厚紙を 10x SSC buffer 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℃、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* 検出用プロブは *cam1* F, R プライマーを使用して PCR により作製した⁴²。

● ヘキストを用いた DNA 濃度測定

10×TNE buffer 500μl、1mg/ml ヘキスト 0.5μl、DDW 4.5ml を混ぜて premix を作った。検量線用に 250μg/ml、125μg/ml、62.5μg/ml、31.25μg/ml の λ EcoT14 マーカーを用意した。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 2μl ずつ入れ、そこに premix を 200μl 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、λ EcoT14 I マーカー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℃、10 分インキュベートした。3500rpm、4℃、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、20μl の 0.5M EDTA を加え vortex により懸濁した。3500rpm、4℃、5 分遠心分離して上清を取り除いた後、500μl 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 500μl の zymolyase を加えた zymolyase solution を加え混和した後、water bath を用いて 30℃、5 分インキュベートした。3500rpm、4℃、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℃、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℃、40 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 500μl ずつ分注した。それぞれに 5μl の 1M CaCl₂ を加えて混和した後、各チューブに 0、1、2.5μl の 10U/ml の MNase(0、20、50U/ml)を加え water bath を用いて 37℃、5 分インキュベートした。その後、40μl の 0.5M EDTA を加え、MNase の反応を停止させた。50μl の 10%SDS、10μl の proteinase K、5μl の 2ME を加え混和した後、55℃で一晩インキュベートした。15000rpm、4℃、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 200μl TE/RNaseA で懸濁した後、37℃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 50μl 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 100μl スケールで Cla I 消化し、エタノール沈殿を行い 10μl 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 70V で一晩電気泳動した。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 1.0×10^7 /ml になるまで培養した。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℃、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℃、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℃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、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℃、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℃、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℃、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 400μl の Lysis buffer 140、8μl の 50×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℃、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 500μl の PBS/0.5%BSA で 2 回 wash した。80μl の PBS/0.5%BSA でビーズを懸濁し、任意の量の抗体を加え、4℃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℃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 500μl の Lysis buffer 140 で 2 回、Lysis buffer 500 で 1 回、LiCl/detergent buffer で 2 回、TE で 1 回の順番で 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、40μl の Elution buffer で

懸濁し、65℃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 100μl の Elution buffer、150μl の TE/0.67%SDS を加えて懸濁した。再び、65℃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 4.2μl の 20mg/ml の Proteinase K を加えよく混和した後、37℃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 100μl チューブに移した。そこに、390μl の Lysis buffer 140、10μl の 0.5M EDTA、4.2μl の 20mg/ml の Proteinase K を加え混和した後、37℃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 100μl になるように Lysis buffer 140 を加えた。さらに、400μl の TE/1%SDS、4.2μl の 20mg/ml の Proteinase K を加え混和した後、37℃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℃で 6 時間インキュベートした。免疫沈降サンプルには、210μl の TE を加えた。その後、1μl 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、30μl の TE/RNaseA に溶かし、37℃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℃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 1μl、10mM プライマーを 1μl ずつ、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix 10μl、DDW 7.8μl を 96 well Hi-Plate for Real Time (TaKaRa)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℃	30sec	アニーリング時の温度はプライマーの Tm 値で行う Step2-4×45cycle
2. 変性	95℃	5 sec	
3. アニーリング	50℃	10 sec	
4. 伸長	72℃	30sec	
5. 最終伸長	72℃	2min	
6. 融解曲線分析	95℃	15sec	
	60℃	30sec	
	95℃	15sec	

プライマーは fbp1-1 F, R, fbp1-2 F, R, UAS1 F, R, fbp1-4 F, R, fbp1-5 F, R, UAS2 F, R, TATA F, R, fbp1-8 F, R, fbp1 ORF F,R を用いた (それぞれ、Fig. 7A の 1-9 に対応する)。

● 5'-RACE

使用する各株のグルコース飢餓後 120 分の RNA を抽出し、SMARTer RACE cDNA Amplification Kit を使用して 5'-RACE を行った。5'-RACE 産物をキットに付属する universal primer mix と 5'-RACE *fbp1* mRNA プライマーを用いて PCR し *fbp1* 領域から転写される mRNA の 5'端を増幅した。電気泳動を行い *fbp1* mRNA の長さとは一致するバンドをゲル精製し、TOPO クローニングを行った。得られたクローンを、M13 プライマーを用いてシーケンス解析した。

● 3C アッセイ

分裂酵母株を 2ml の YE 培地で一晚培養し増殖した後、1 サンプルあたり 50ml の YER 培地に移して 2.0×10^7 /ml になるまで培養した。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°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、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 15 分放置した。その後、2.5ml の 2.5M グリシンを加えよく混ぜた後、室温で 5 分放置した。3000rpm、4°C、5 分遠心分離して上清を取り除いた。10ml の冷えた TBS/1%TritonX-100 で wash して 8000rpm、4°C、5 分遠心分離して上清を取り除いた。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、3000rpm、4°C、5 分遠心分離し上清を取り除いた。ペレットを 1ml の FA Lysis buffer に懸濁し、液体窒素で凍結した。

氷上で凍結した酵母サンプルを溶かし、20 μ l の 50 \times complete を加えた。その懸濁液を 0.6mm ガラスビーズが入った 2 本のマルチビーズショッカー用 2ml チューブに 600 μ l ずつ分注した。2500rpm、1 分、30 秒休み、10 サイクルの条件でマルチビーズショッカーにより破碎した。チューブの底にがびょうで穴をあけ、5000rpm で一瞬遠心して 1.5ml チューブに懸濁液を移した。10000rpm、4°C、5 分遠心して上清を取り除いた。ペレットを冷えた FA Lysis buffer (complete を含む)でピペッティングによりやさしく懸濁して wash した後、同一サンプルを 1 本のチューブにあわせた。13000rpm、10 分、4°C で遠心分離して上清を取り除き、500 μ l の 10mM Tris-HCl pH7.6 でピペッティングによりやさしく懸濁した。10 本の 1.5ml チューブに 50 μ l ずつ分注し、液体窒素で凍結した。

50 μ l のクロスリンクされたクロマチンサンプル、0.5 μ l の 10%SDS を 2ml チューブに加え、water bath を用いて 65°C で 15 分インキュベートした。8 μ l の 10%TritonX-100、26.5 μ l の DDW を加え、37°C でシェイクしながら 30 分インキュベートした。10 μ l の 10 \times cutsmart buffer (NEB)、Hha I を加え、37°C でシェイクしながら 5 時間インキュベートした。2.5 μ l の Hha I をさらに加えて、37°C でシェイクしながら一晚インキュベートした。10 μ l の 10%SDS を加え、water

bath を用いて 65°C で 20 分インキュベートした。75μl の 10% TritonX-100、164μl の DDW を加え、37°C でシェイクしながら 30 分インキュベートした。13000rpm、5 分、室温で遠心分離し、上清を 1.5ml チューブに回収した。350μl の 2×Quick ligation buffer、1μl の ligase (NEB) を加え混和した後、16°C で一晩放置した。2μl の 10mg/ml の RNaseA を加え、37°C で 10 分インキュベートし、その後、7.5μl の 10% SDS、5μl の Proteinase K を加え、65°C で一晩インキュベートした。溶液を 350μl ずつ 2 本の 1.5ml チューブに分注し、フェノール・クロロホルム抽出を 2 回行った後、300μl の 5M NH₄OAc、2μl の 20mg/ml のグリコーゲンを加え混和した後、300μl ずつ 2 本の 1.5ml チューブにさらに分注した。750μl の 100% エタノールを加えよく混和した後、14800rpm、室温、15 分遠心分離した。ペレットを 300μl の 70% エタノールを加え wash した後、14800rpm、室温、5 分遠心し上清を取り除き、ペレットを風乾した。ペレットを 50μl の TE で溶解し、Nanodrop で濃度を測定した。

3C サンプル 1μl を目的のプライマー、Ex taq を用いて 32 サイクルで PCR した。PCR 産物 20μl を 4% TAE アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドを添加した TAE buffer に浸して 20 分間シェイクした。DNA バンドを、FASIV をもちいて検出し、Multi Gauge を用いて強度を定量した。プライマーは *fbp1* locus を検出する 3C Hha I F2, F3、コントロールの act1 ORF F, R を使用した (ただし、コントロールの PCR の際は 25 サイクルで行った)。

3. 結果と考察

3.1 Tup family corepressorを中心とした*fbp1*転写制御機構の解明

3.1.1 転写活性化因子とTup corepressorの拮抗的な*fbp1*転写制御

転写活性化因子とTup corepressorはどのように*fbp1*転写を制御するのかを調べるために、*atf1*, *rst2*, *php5*, *tup11/12*の欠損株と各転写活性化因子と*tup11/12*の三重欠損株を作製し、*fbp1*転写状況をノーザンブロットによって解析した。野生型株では、グルコースが豊富な条件下ではmlonRNA aが転写されており*fbp1* mRNAの転写は抑制されていた。グルコース飢餓になるとmlonRNAの転写開始点が下流に移行していきmlonRNA b,cが転写され、60分後になると*fbp1* mRNAが大量に転写されることが確認された。抑制因子であるTup11/12欠損株では*fbp1* mRNAの転写量が増大していた。*atf1*Δ株では、mlonRNA a, bの転写は起こるがcの転写が起こらず*fbp1* mRNAの転写も全く起こらなかった。*rst2*Δ株では、mlonRNAの転写は野生型と変わらず正常だったが、*fbp1* mRNAの転写がほとんど起こらなかった。*php5*Δ株では、mlonRNAは3種すべて転写されたが、グルコース飢餓後時間が経過してもmlonRNA cの転写が止まらず増大しており、*fbp1* mRNAの転写はほとんど起きていなかった。以上の結果から、これら3種の転写活性化因子は*fbp1* mRNAの転写活性化において重要な役割を果たしており、その作用メカニズムはそれぞれ異なることが示された (Fig.3)。

次に各転写活性化因子と*tup11/12*の三重欠損株の解析を行った。転写活性化因子単独の欠損では*atf1*Δ, *rst2*Δ, *php5*Δともに*fbp1* mRNAの転写活性化が不良化していたが、*tup11/12*を各転写活性化因子とともに欠損させることで*fbp1* mRNAの転写が回復した (Fig.3)。このことから、Tup11/12による異なる3つの抑制機能が存在し、それぞれの機能を転写活性化因子が活性化されることで解消するという転写活性化因子とTup corepressorによる拮抗的な制御機構が存在することが考えられた。

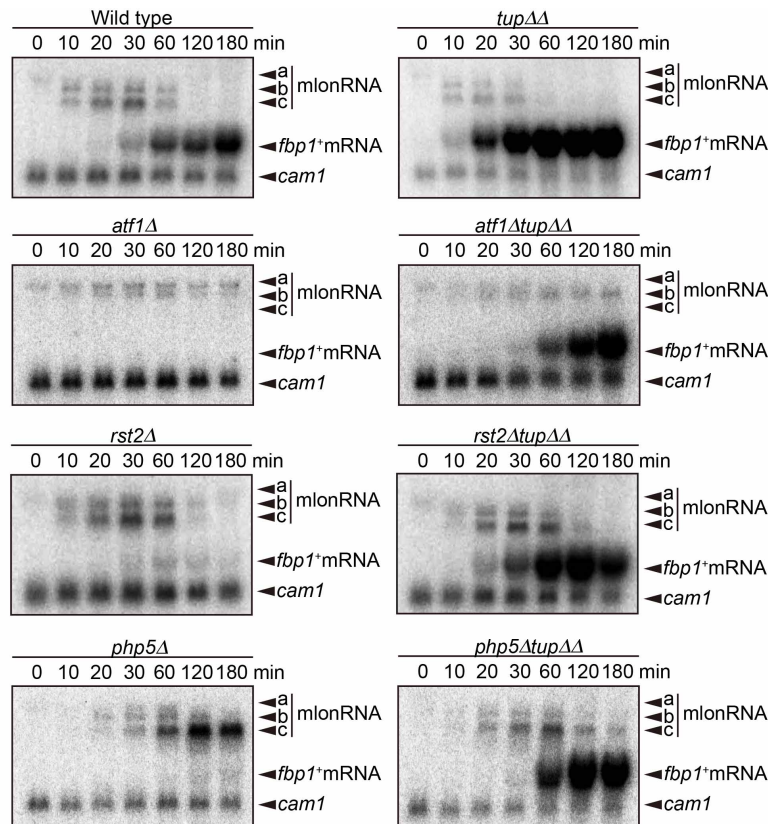


Fig.3 転写制御因子欠損株におけるノーザン解析の結果
グルコース飢餓後、示された時間で分裂酵母サンプルを回収し RNA を抽出し、ノーザンブロットティングを行った。mlonRNA a, b, c、*fbp1* mRNA は *fbp1* ORF 内部のプロープを用いて検出した。コントロールとして *cam1* 遺伝子内部のプロープを用いて解析した。

3.1.2 Atf1とTup11/12による転写因子結合部位の拮抗的なクロマチン構造の制御

ノーザン解析により転写活性化因子とTup corepressorによる拮抗的な制御機構が存在することが示唆された。それぞれの制御がどのように行われているのか、その制御メカニズム解明を試みた。*fbp1* 転写はmlonRNA転写に共役した上流領域のクロマチン構造変化により制御されているので、各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の状態を、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を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。

野生型株では、グルコース飢餓後10分でUAS1の位置のクロマチンが開き(Fig.4A 矢頭)、20-30分後には*fbp1*上流領域の転写因子結合部位を含むUAS1からUAS2の領域のクロマチンが段階的に開いていく(Fig.4A 点線)。さらに、*fbp1*転写が活性化する60分後になるとTATAボックス付近のクロマチンが大きく開くことがわかる(Fig.4A 黒線)。 *atf1Δ*では、グルコー

ス飢餓になった後でも*fbp1*上流領域のクロマチン構造変化が全く起こらずそれに引き続くTATAボックス周辺のクロマチン構造変化も全く起こらなかった。このことは、Atf1が*fbp1*上流の一連のクロマチン構造変化の誘導開始に必要であることを示している。*atf1*とともに*tup11/12*も欠損させた*atf1ΔtupΔΔ*株では、UAS1付近のクロマチン構造変化は完全に回復しており、また、TATA周辺のクロマチン構造変化も部分的に回復していた(Fig.4A, B)。これらの結果から、Tup11/12は*fbp1*上流領域を抑制的な閉じたクロマチン構造を構築する機能があり、それをAtf1が解消することで一連のクロマチン構造変化のカスケードが誘導されることが考えられる。

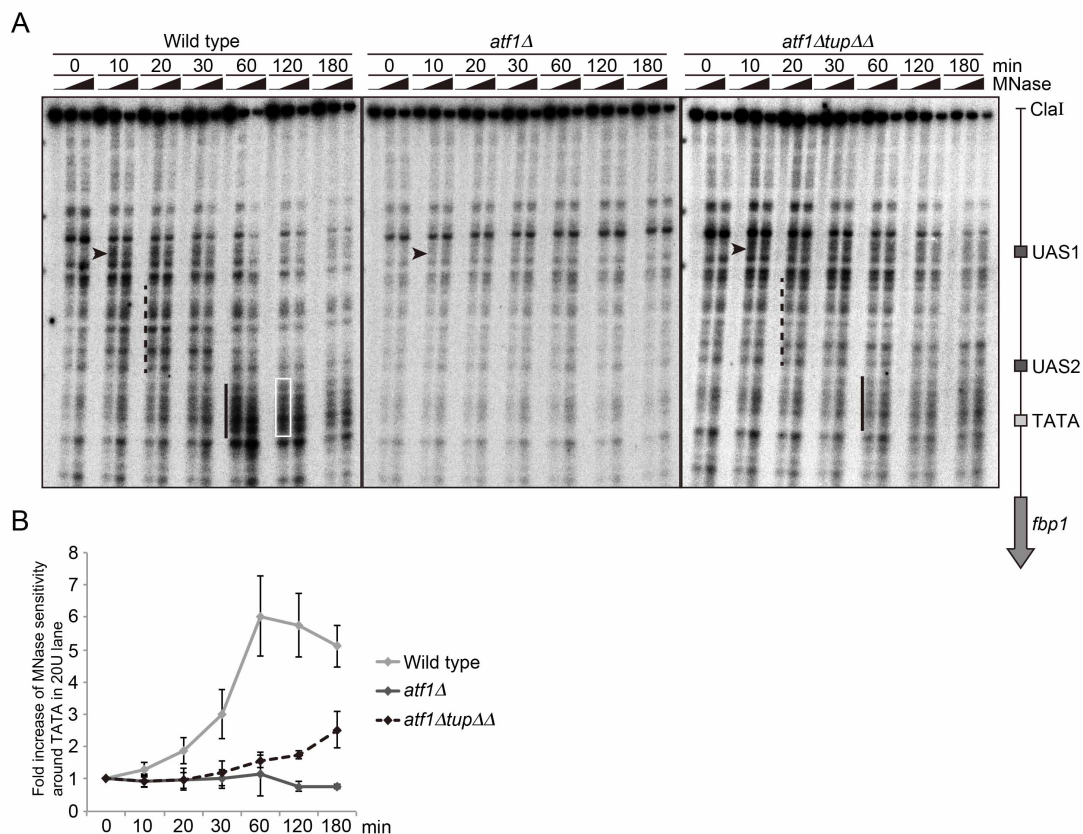


Fig.4 Tup11/12 と Atf1 の拮抗的なクロマチン構造の制御

(A) 野生型、*atf1Δ*、*atf1ΔtupΔΔ*のクロマチン解析の結果。グルコース飢餓後の示された時間でサンプルを回収しクロマチン解析を行った。上部 MNase の欄は使用した MNase の量を模式的に示した(0, 20, 50U/ml)。右端にバンドの位置関係を示した。(B) TATA ボックス周辺のクロマチン構造変化の定量結果。A の 20U のレーンすべてと白四角で囲った領域のバンド定量を行いその比を計算した。各株におけるバンド強度の 0 分からの増加量をグラフに示した。

3.1.3 Php5 (CBF)とTup11/12のによるTATA周辺領域の拮抗的なクロマチン構造の制御

次に、Php5とTup corepressorがどのようなメカニズムで拮抗的な制御をしているのかを調べるためにこれら欠損株を用いてクロマチンを解析した。*php5Δ*では、UAS1の位置のクロマチンリモデリングは正常に起きていたが(Fig.5A矢頭)、60-180分のTATAボックス付近のクロマチン構造変化は不良化しており(Fig.5A黒線)、代わりにUAS1-2領域のMNase sensitivityが高くなっていた(Fig.5A点線, B)。また、*php5Δ*では、TATAボックスの位置のヌクレオソームの有無に由来するバンドを見ると、ほとんどそのバンド強度が変化していなかった(Fig.5A, C)。*php5ΔtupΔΔ*株では、バンドパターンが野生型に近くなりTATA領域のクロマチン構造変化も回復しているように見える。実際に、TATAボックスの位置のバンドを定量すると、*php5*とともに*tup11/12*を欠損させることでクロマチンリモデリングが部分的に回復していた。これらの結果から、Tup11/12はTATAボックス周辺のクロマチン構造変化を抑制する機能を持ち、Php5が活性化することでそれが解消されることが考えられる。

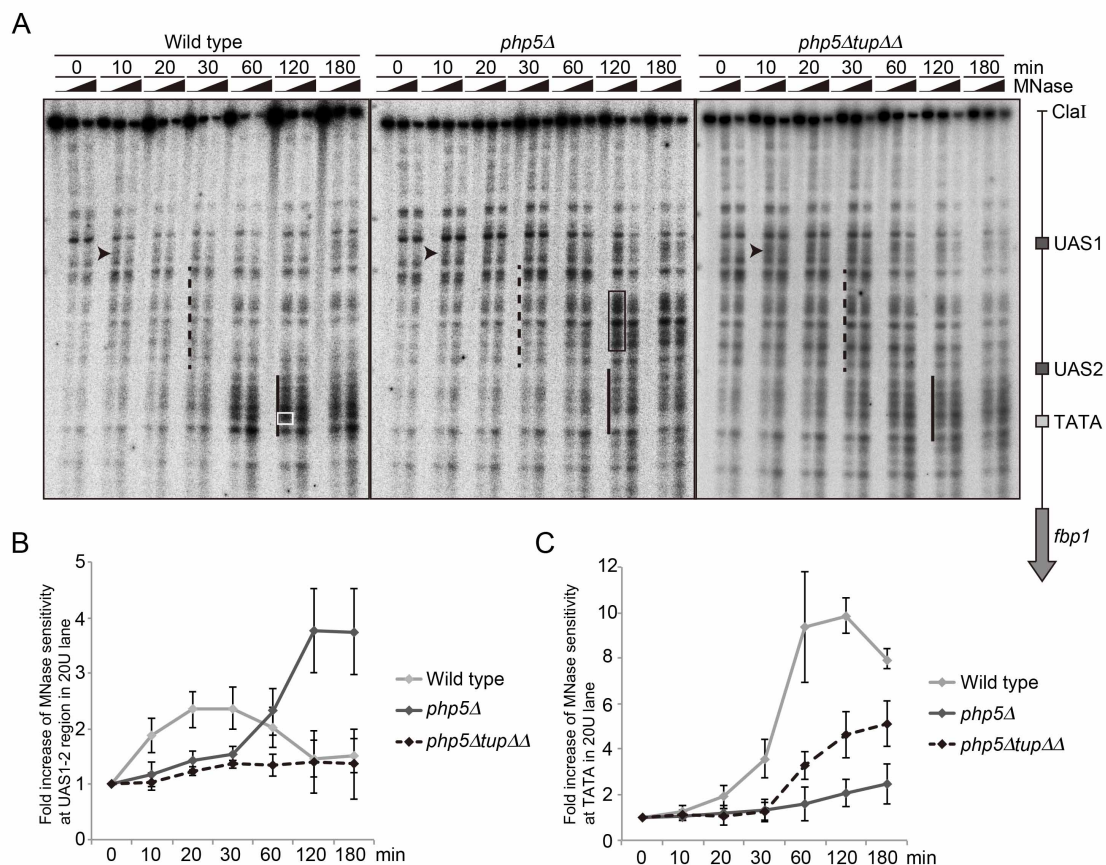


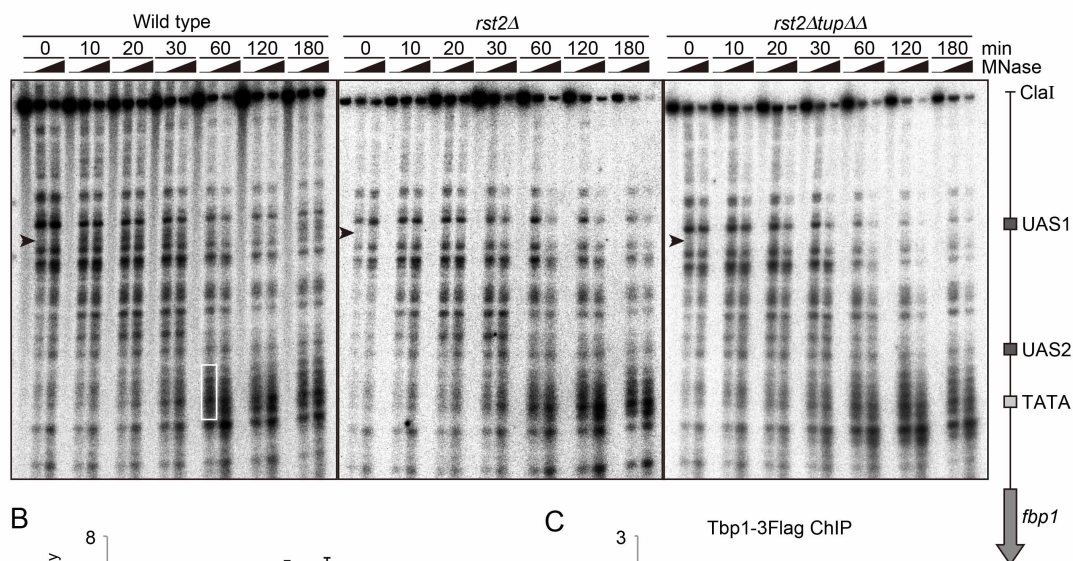
Fig.5 Tup11/12 と Php5 の拮抗的なクロマチン構造の制御

(A) 野生型、*php5Δ*、*php5ΔtupΔΔ*株でのクロマチン解析結果(Fig.2A と同様)。 (B) UAS1-2 領域のバンド定量結果。 Fig.2B と同様に A の黒四角の領域のバンド定量を行った。 (C) TATA ボックスのバンド定量結果。 Fig.2B と同様に A の白四角の領域のバンド定量を行った。

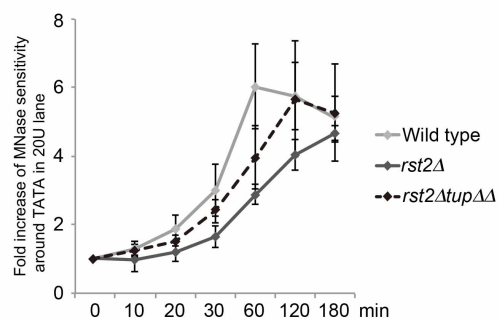
3.1.4 Rst2とTup11/12による拮抗的な転写装置結合の制御

次に、Rst2とTup corepressorがどのようなメカニズムで拮抗的な制御をしているのかを調べるためにこれら欠損株を用いてクロマチンを解析した。*rst2Δ*株では、UAS1付近のクロマチン構造変化が起きていなかったが(Fig.6A 矢頭)、*fbp1*上流領域やTATAボックス周辺領域のクロマチン構造変化は正常に起きていた(Fig.6A, B)。*rst2ΔtupΔΔ*株でクロマチンを解析したところ、UAS1付近のクロマチン構造変化の不良化は回復しなかった。ノーザン解析では、*rst2Δ*による*fbp1* mRNAの転写不良化は*tup11/12*とともに欠損させることで完全に回復していたが、UAS1付近のクロマチンの開きは回復していないことから、Rst2とTup11/12の*fbp1* mRNAの拮抗的な制御はクロマチンの制御ではなく、クロマチン構造変化が起きた後に行われる制御であることが考えられた。そのため、TATAボックスを認識し転写装置を呼び込む役割を果たすTATA binding proteinをコードするTbp1の結合をクロマチン免疫沈降実験(ChIP)により解析した。その結果、*rst2Δ*では、*fbp1* mRNA転写が活性化する時間であるグルコース飢餓後60分において、TATAボックスへの結合が不良になっていた(Fig.6C)。このことは、*rst2Δ*株において、グルコース飢餓後*fbp1* mRNAのTATAボックスへのRNAポリメラーゼ II の結合が不良になるという先行研究のデータと一致する³⁶。これらの結果から、Tup11/12はクロマチン構造変化が起きた後に転写装置の結合安定化を阻害する転写抑制機能を持ち、Rst2が活性化することでこれを解消するという拮抗的な制御メカニズムが存在することが考えられる。

A



B



C

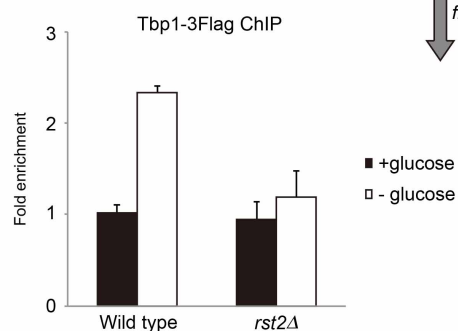


Fig.6 Tup11/12 と Rst2 の拮抗的な転写装置結合の制御

(A) 野生型、*rst2Δ*、*rst2ΔtupΔΔ*株でのクロマチン解析結果(Fig.2A と同様)。 (B) TATA ボックス周辺領域のバンド定量結果。 Fig.2B と同様に A の白四角の領域のバンド定量を行った。 (C) TATA binding protein (Tbp1)の結合解析。野生型、*rst2Δ*株において Tbp1 の結合をクロマチン免疫沈降(ChIP)により解析した。Tbp1-3Flag が発現している細胞をグルコース飢餓後 0, 60 分にクロスリンクして調製したサンプルを FLAG 抗体で免疫沈降した。共沈降した DNA を *fbp1* の TATA ボックス、*prp3* 遺伝子を含むプライマーセットでリアルタイム PCR により定量した。TATA プライマーセットの定量値をコントロールである *prp3* の定量値でノーマライズした結果をグラフに示した。

3.1.5 転写活性化因子間の結合の依存性

Tup corepressorと転写活性化因子Atf1, Php5, Rst2によるクロマチン構造や転写装置の3種の拮抗的な制御が存在することが明らかとなった。これらはいずれもTup11/12による抑制を転写活性化因子が*fbp1*上流領域に結合することで解消されている。次に、これら転写活性化因子の結合は互いに影響を与えるのかどうかを検証した。Atf1とRst2の*fbp1* locusの結合部位はそれぞれUAS1とUAS2であるが、Php5の*fbp1* locusの結合部位はわかっていない。そこで、Php5が*fbp1* locusのどの位置に結合するのかを調べることにした。Php5にFlagタグをつけた株を作製しChIP解析を行ったが、十分なシグナルが得られなかったため、Php5とともにCBF複合体を形成しているPhp2に3Flagタグをつけた株を作製しChIP解析を行った³²。*fbp1*上流領域の結合分布を調べるために、*fbp1*上流からORF内部にわたる領域を約250bpごとに区切るようにプライマーペアを設計し解析に用いた(Fig.7A)。その結果、UAS2を含むプライマーセットの領域で最大のピークを示したので、今後の解析ではこのプライマーセットを使用することとした(Fig.7A)。また、Atf1のChIP解析にはAtf1特異抗体を、Rst2のChIP解析にはRst2-3Flag株を用いて、それぞれUAS1、UAS2を含むプライマーセットで解析を行った。

まず、Atf1の結合を*php5Δ*、*rst2Δ*の株で調べた。*php5Δ*株ではAtf1の結合は上昇し、*rst2Δ*株では減少していたが、いずれの場合でもAtf1の*fbp1* locusへの結合は検出された(Fig.7B)。*rst2Δ*での結合量減少は、*rst2Δ*株でのUAS1付近のクロマチン構造変化が起こらないことが原因であることが考えられるが、*rst2Δ*株でのUAS1より下流の領域でのクロマチン構造変化は正常に起こっているため、Atf1結合量減少による*fbp1*転写制御における影響はほとんどないと考えられる。次に、Php2の結合を*atf1Δ*、*rst2Δ*の株で調べた。*atf1Δ*では、Php2の結合はグルコース飢餓になっても全く起らなかったが、*rst2Δ*では、正常にUAS2への結合が検出された(Fig.7B)。Rst2の結合を*atf1Δ*、*php5Δ*の株で調べたところ、*atf1Δ*では全く結合しなかったが、*php5Δ*ではUAS2への結合は正常に検出された(Fig.7B)。このことは、Php5とRst2は互いに非依存的に結合し、両因子の結合にはAtf1が必要であることを示している。*atf1Δ*株では*fbp1*上流領域のクロマチン構造変化が起こらないので、Atf1依存的なPhp5、Rst2の結合はクロマチン構造が影響を与えていることが考えられたので、次にこれを検証した。*atf1ΔtupΔΔ*株ではクロマチン構造変化は部分的に回復しているため(Fig.4B)、この株でPhp2、Rst2の結合を調べたところ、Rst2の結合は部分的に回復したがPhp2の結合は回復しなかった(Fig.7C)。このことは、Rst2の結合は結合部位のクロマチン構造によって制御され、Php2の結合にはクロマチン構造だけでなくAtf1タンパク質自身が必要であることを示している。

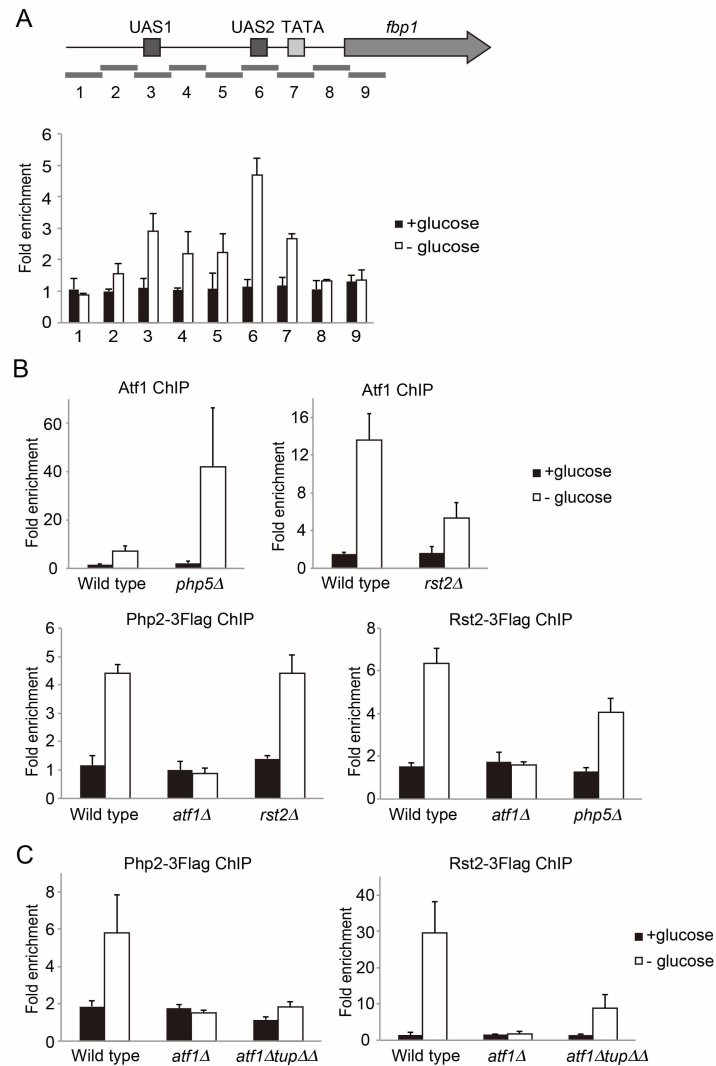


Fig.7 転写活性化因子の *fbp1* locus への結合

(A) 上図は定量 PCR に使用したプライマーの位置を模式図で示した。3, 6, 7 がそれぞれ UAS1, UAS2, TATA を含むプライマーセットである。下グラフは、Php2 の結合分布を解析した結果である。Php2-3Flag を発現している細胞をグルコース飢餓後 0, 120 分にクロスリンクして調製したサンプルを FLAG 抗体で免疫沈降した。共沈降した DNA を上図のセットまたは *prp3* 遺伝子を含むプライマーセットでリアルタイム PCR により定量した。*fbp1* locus の各プライマーセットの定量値をコントロールである *prp3* の定量値でノーマライズした結果をグラフに示した。(B) 転写活性化因子の欠損株での各転写活性化因子の結合解析。図に示した各株を用いて B と同様の方法で ChIP 解析を行った。Atf1 ChIP は Atf1 特異抗体を用いて免疫沈降し、UAS1 を含むプライマーセットを用いて定量した。Php2, Rst2 ChIP は Php2-3Flag, Rst2-3Flag を発現している細胞を用いて FLAG 抗体で免疫沈降し、UAS2 を含むプライマーセットを用いて定量した。(C) *atf1ΔtupΔΔ* 株での Php2, Rst2 の結合解析。B と同様の方法で *atf1ΔtupΔΔ* 株を用いて ChIP 解析した。

3.1.6 Tup corepressorとCBF complexによる転写開始点の決定

ここまでの研究で、Tup corepressorを中心としたクロマチン構造の制御が行われ、*fbp1* mRNAが転写されることがわかった。Php5とTup11/12はTATAボックス周辺のクロマチン構造制御を介して*fbp1*転写の制御を行っており、転写開始反応において何か影響を与えることが考えられ、その生物学的意義を見つけることを試みた。ノーザン解析の結果、*php5Δ*で不良化していた*fbp1* mRNAの転写活性化は*tup11/12*をとともに欠損させることで回復していたが、*php5ΔtupΔΔ*株では*fbp1* mRNAのバンドが少なくとも2本に分かれていることを発見した(Fig.8A)。このことから、転写開始点がぶれてしまっている可能性が考えられた。この可能性を検証するため、5'-RACE法により*fbp1* mRNAの転写開始点を解析した。野生型株や*tupΔΔ*株では転写開始点のばらつきはほとんど10bp程度と小さかったが、*php5ΔtupΔΔ*株では250bp程度のばらつきが観測された(Fig.8B)。このことから、Php5とTup11/12によるTATA周辺のクロマチン構造の適切な制御が、正確な転写開始点の決定に必要であることが示された。

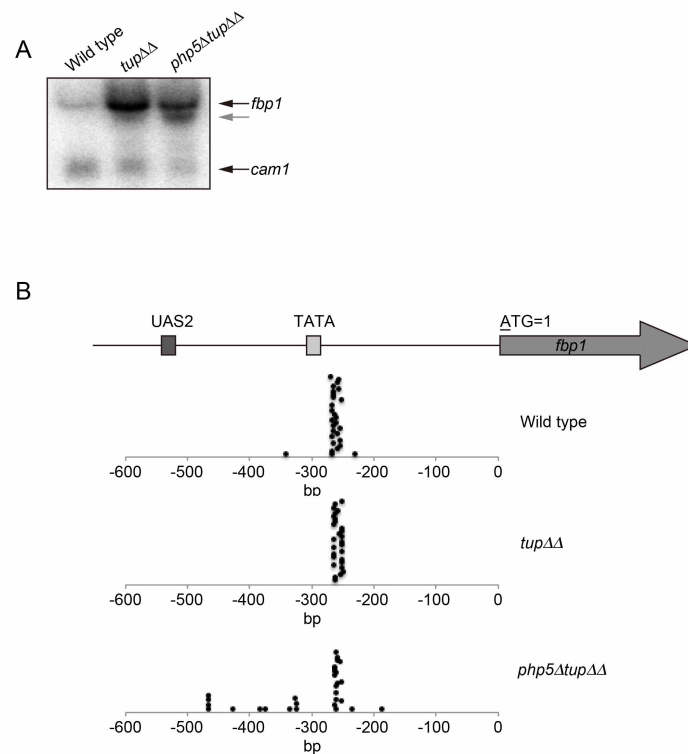


Fig.8 Php5による正確な転写開始点の決定

(A) *fbp1* mRNA のノーザン解析。Fig.1 と同様の方法で図に示された各株を用いてグルコース飢餓後 120 分のサンプルを用いてノーザン解析を行った。(B) 野生型、*tupΔΔ*、*php5ΔtupΔΔ* 株を用いた 5'-RACE 解析。各株のグルコース飢餓後 120 分のサンプルから RNA を回収し、*fbp1* ORF 内部の遺伝子特異的プライマーを用いて 5'-RACE PCR を行い、*fbp1* mRNA の長さの PCR 産物をゲル精製してその産物をクローニングした。野生型、*tupΔΔ*、*php5ΔtupΔΔ* 株の 5'-RACE 産物をそれぞれ 28, 28, 30 クローンのシーケンスを解析した。黒点は、シーケンス解析した結果の転写開始点の位置を示す。

3.1.7 まとめと考察

本研究では、*fbp1*転写制御をモデルとして、Tup family corepressorによる転写制御メカニズムの一端を明らかにした。*fbp1*転写活性化の過程でTup11/12は段階的なクロマチン構造変化の抑制、転写装置の結合安定化の抑制といった異なる3種類の抑制機能を発揮し、その抑制を転写活性化因子であるAtf1、Php5、Rst2が解消するという以下のような転写制御モデルが構築された。グルコースが豊富な条件化ではTup11/12により抑制的なクロマチン構造が構築されており*fbp1*転写が抑制されている(Fig9 i)。グルコース飢餓になると、まずAtf1が活性化されUAS1に結合し、長鎖非コードRNA転写に共役した転写因子結合部位を含む上流領域のクロマチン構造変化を誘導しTup11/12の抑制を解消する(Fig9 ii)。このときTup11/12はTATAボックス付近のクロマチン構造変化を抑制している。Atf1の結合や上流領域のクロマチン構造変化が起こることで、Php5やRst2が結合できるようになる。Php5が結合することでTup11/12により抑制されていたTATAボックスの位置のクロマチン構造変化が誘導される(Fig9 iii)。さらに、Tup11/12は転写装置の結合安定化を阻害する機能を発揮するが、UAS2に結合したRst2によりその抑制機能が解消され、大規模な*fbp1*転写が誘導される(Fig9 iv)。

Tup family corepressorによる抑制機構としては、ヒストン脱アセチル化酵素のリクルート、プロモーター領域のヌクレオソームポジションの制御、転写装置に直接影響を与える機構の3つが考えられている。*fbp1*転写制御における3段階のTup11/12による抑制はこれら3種類の機構と一致しているようにみえる。*fbp1*上流領域のUAS1-TATAの領域のヒストンH3はグルコース飢餓後高度にアセチル化されることがわかっており(Hirota *et al* 未発表データ)、グルコース飢餓になる前は、Tup11/12によって脱アセチル化されていることが予想される。また、プロモーター領域のヌクレオソームポジションの制御や転写装置への制御は本研究でも確認されている。本研究では、Tup family corepressorによる既知の3種の抑制機構は1つの標的遺伝子において段階的に発揮されうることを示し、それぞれの抑制機能を異なる転写活性化因子が解消するという拮抗的な転写制御機構を明らかにした。先行研究により、Tup11/12の欠損株では*fbp1*転写が窒素源飢餓や浸透圧性ストレスといったグルコース飢餓以外のストレスでも発現してしまうことから³⁴、本研究で明らかにしたようなTup11/12を中心とした3段階の拮抗的な制御は遺伝子発現のストレス応答特異性を獲得するためのメカニズムであることが考えられる。

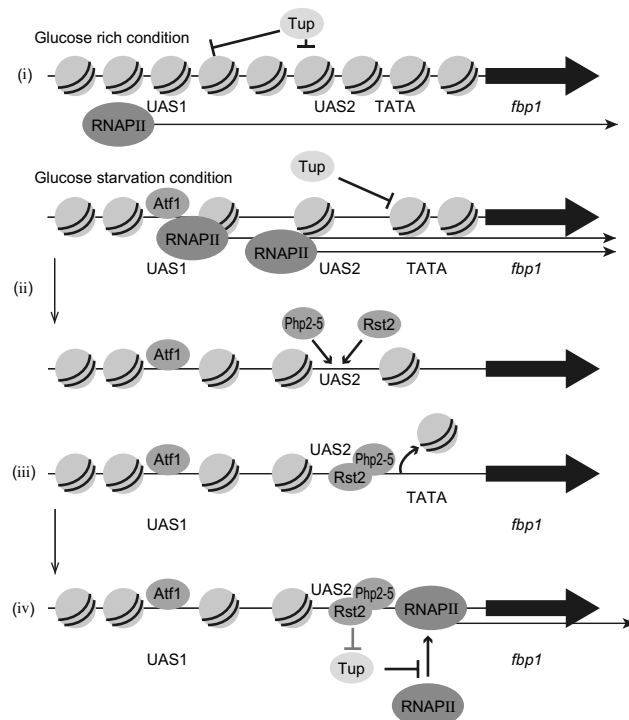


Fig.9 *fbp1*転写制御モデル

また、本研究では、CBF複合体が正確な転写開始点の決定に重要な役割を果たすことを見いだした。*php5*欠損株では、TATAボックス周辺のクロマチンの開きが不良化していて*fbp1* mRNAの転写が活性化できないが、Php5とともにTup11/12を欠損させることで*fbp1* mRNAの転写は回復するが転写開始点が大きくぶれていた。*php5ΔtupΔΔ*株でのクロマチン解析ではTATAボックスの位置のクロマチン構造変化は部分的にしか回復していなかったため、TATA周辺のヌクレオソームの的確な配置がとれなくなっていることが考えられる。これは、1細胞ごとに見ると正確にTATAボックスが露出している細胞とそうではない細胞が存在し、クロマチンが開いたところから転写が行われたため転写開始点が大きくずれてしまっていることが考えられる。Php3, Php5はHistone fold domainを持ち、CBF複合体のヒトなどのorthologであるNF-Y複合体の結晶構造解析からCBF複合体はヒストンH2A、H2Bと似た構造をとりDNAに巻き付く形で結合することがわかっている⁴³。これは、CBF複合体がHistone variantとして働く可能性があると考えられる⁴⁴。H2AのvariantであるH2A.Zは転写開始点付近のnucleosome free region (NFR)の端に取り込まれておりNFRの位置を規定していると言われている⁴⁵。同様の機構で、CBF複合体がプロモーター領域に結合し、TATAボックス周辺のヌクレオソームポジションを決定していることが可能性としてあげられる。また、NF-Yの研究では、これらが結合することでアセチル化を含む様々なヒストン修飾が変化することが報告されている⁴⁶⁻⁵¹。そのため、TATA周辺のヒストン修飾が変化しクロマチン構造変化が誘導されヌクレオソームポジションを調節していることも考えられる。

3.2 グルコース飢餓特異的な*fbp1*上流の高次構造

クロマチン構造をとったゲノムDNAは無作為に核内に収納されているわけではなく高度に組織化されている⁵²。このようなゲノムの三次元構造は転写などDNA上で起こる反応を制御している⁵³。

ここまでの*fbp1*をモデルとした研究で、ゲノムの収納方法であるクロマチン構造がストレス応答特異性や転写開始点の決定といった転写の精密な制御に重要であることを示唆し、クロマチン構造レベルでの*fbp1*転写制御分子メカニズムを明らかにした。さらなる精密な転写制御のためにゲノムの高次構造を利用した制御を行っている可能性は十分に考えられる。実際に、先行研究による*fbp1*上流領域のTup11, Tup12の結合分布とPhp2の結合分布は同様の分布で2つのピークを示している。そのため、*fbp1*制御においてゲノム高次構造レベルでの制御の存在を疑い、その分子メカニズムや意義を解明することを目的として研究を行った。

3.2.1 転写制御因子の*fbp1*上流領域における結合分布

先行研究によるTup11, Tup12のグルコース飢餓後の結合分布の解析から、Tup11, Tup12はUAS1とUAS2にピークを持つことがわかっている³⁰。これは、Fig.7Aで示したPhp2の結合分布と同様であった。そのため、他の転写活性化因子についても同様に解析した。その結果、Atf1とRst2についてもUAS1からUAS2にかけての2ピークを示した(Fig.10)。Atf1はUAS1が、Rst2はUAS2が認識部位であるにも関わらず、すべての転写制御因子が同じ領域に結合のピークを示した。このことは、ホルムアルデヒドを用いたクロスリンクにより相互作用しているDNA領域がタンパク質を介して連結し免疫沈降され検出されていることが考えられ、グルコース飢餓後に*fbp1*上流のUAS1とUAS2の位置が近づくような特殊な高次構造を形成している可能性が示唆された。

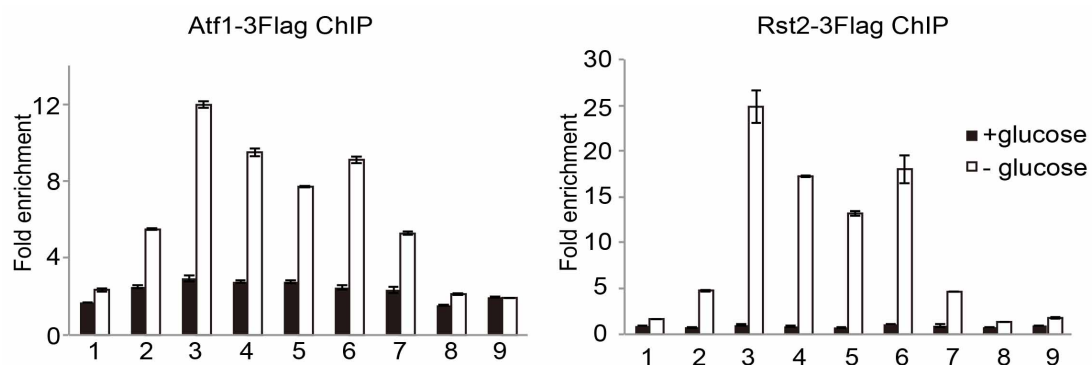


Fig.10 転写活性化因子 Atf1、Rst2 の *fbp1* 上流領域における結合分布

Fig.7(A)と同様の方法で ChIP 解析を行った。下部に記載してあるプライマーの位置を示す数字は Fig.7(A)の模式図に対応する。Atf1-3Flag 株は *fbp1* mRNA の転写量が減弱してしまっているが、UAS1 への結合は Atf1 特異抗体を使用したときと同様であった。

3.2.2 3Cアッセイによるゲノム高次構造の解析

転写制御因子の結合分布からUAS1とUAS2の位置が近づくような高次構造を形成している可能性が示唆されたので、ゲノム高次構造を直接観測する3Cアッセイにより検証することを試みた。3Cアッセイは、染色体構造をクロスリンクした後、相互作用を調べたい領域の近傍で切断する制限酵素で処理し、希薄な条件でライゲーションしてPCRにより相互作用を検出する実験である(Fig.11)。2つの目的領域がはなれた位置に存在するとライゲーションされないが、相互作用し近づいているとライゲーション効率が高くなるためPCRによって検出されるようになる。UAS1とUAS2付近で切断する制限酵素を用いて3Cアッセイを行った結果、グルコース飢餓後60分以降で3Cのシグナルが増加していた(Fig.12)。このことから、グルコース飢餓後60分以降にUAS1とUAS2が近づいたような特殊な高次構造が形成されていることが明らかとなった。

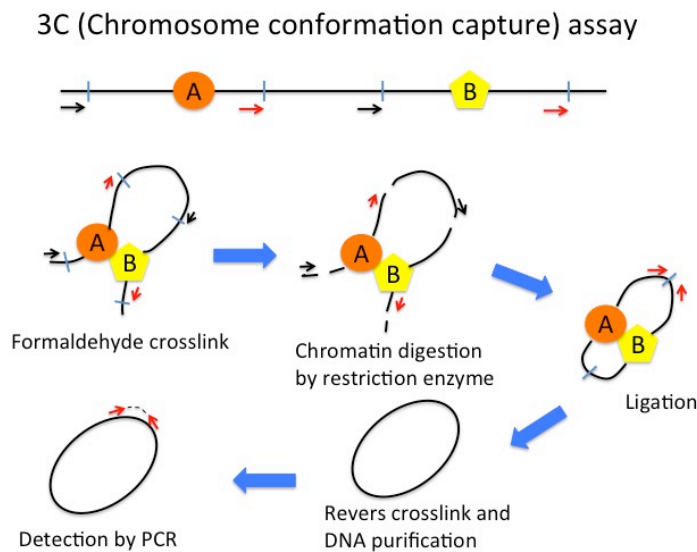


Fig.11 3C アッセイの概略図

ホルムアルデヒドによるクロスリンクの後、青線の位置の制限酵素で切断する。希薄な条件でライゲーションすると相互作用していて近い位置にあるDNA領域のみがライゲーションされる。A, Bの領域が近づいていると、通常ではPCRがかからない赤矢印のペアのプライマーでPCRがかかるようになる。

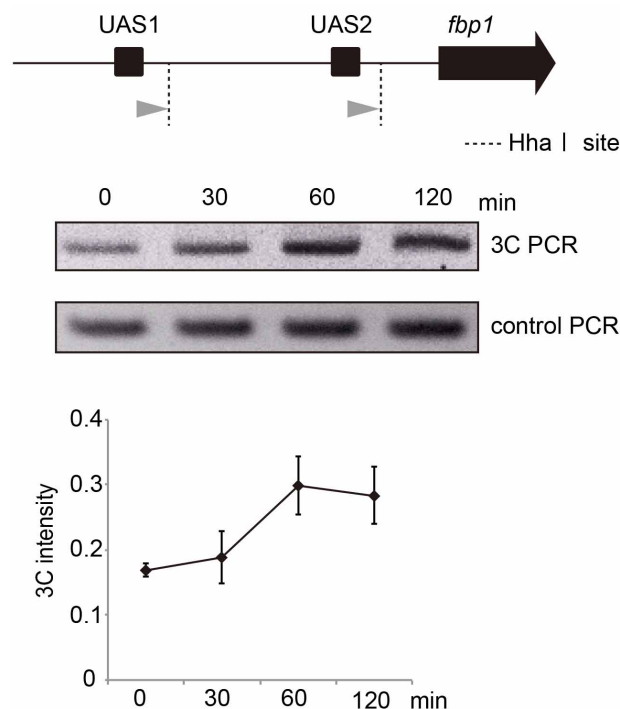


Fig.12 *fbp1* 上流領域の高次構造

fbp1 上流領域で 3C アッセイを行った。使用した制限酵素は Hha I で、上部点線の位置で切断する。使用したプライマーの位置と方向をグレーの矢頭で示した。真ん中に PCR 後の泳動図を示した。3C PCR は上記グレーの位置のプライマーで PCR した結果で、control PCR は Hha I 消化、ライゲーションの過程で影響を受けない位置での PCR である。下部に、バンド定量結果を示した。3C PCR のバンド強度を control PCR のバンド強度で normalize した値を縦軸の 3C intensity とした。

3.2.3 転写制御因子と高次構造の関係

転写制御因子すべての結合ピークが一致することから、これらの因子が高次構造形成に重要な役割を果たすことが予想できる。まず、転写活性化因子の結合タイミングを調べた。その結果、高次構造が形成される 60 分にはすべての因子の結合が確認された (Fig13)。また、高次構造形成され始めるグルコース飢餓後 60 分のタイミングは、Php2, Rst2 が結合するタイミングと一致していた。次に、これら因子の欠損により他の因子の結合分布が影響を受けるかどうかを調べた。*php5Δ* では、Atf1, Rst2 の結合が大きく UAS1 側にシフトした (Fig14A)。*rst2Δ* では、Atf1 の UAS2 側のピークが減少し、Php2 の UAS1 側のピークが消滅した (Fig.14B)。また、*tupΔΔ* では、各転写活性化因子の結合量は大きく増加するが、結合分布には大きな影響はなく UAS1 から UAS2 のピークを示した (Fig.14C)。このことから、*fbp1* 上流の高次構造形成には転写活性化因子が重要な役割を果たすことが示唆された。

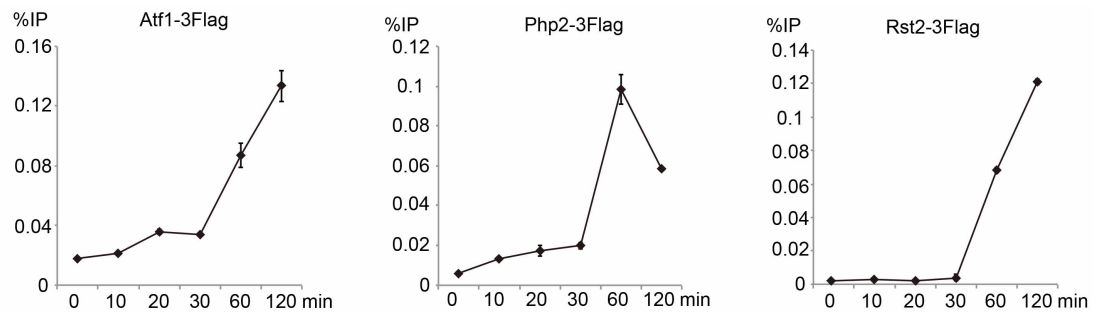


Fig.13 転写活性化因子の結合タイミング

Fig.7 と同様の方法でグルコース飢餓後の各グラフに示された時間で細胞を回収し、ChIP 解析を行った。Atf1 ChIP では UAS1 を、Php2, Rst2 ChIP では UAS2 を含むプライマーセットで qPCR を行った。

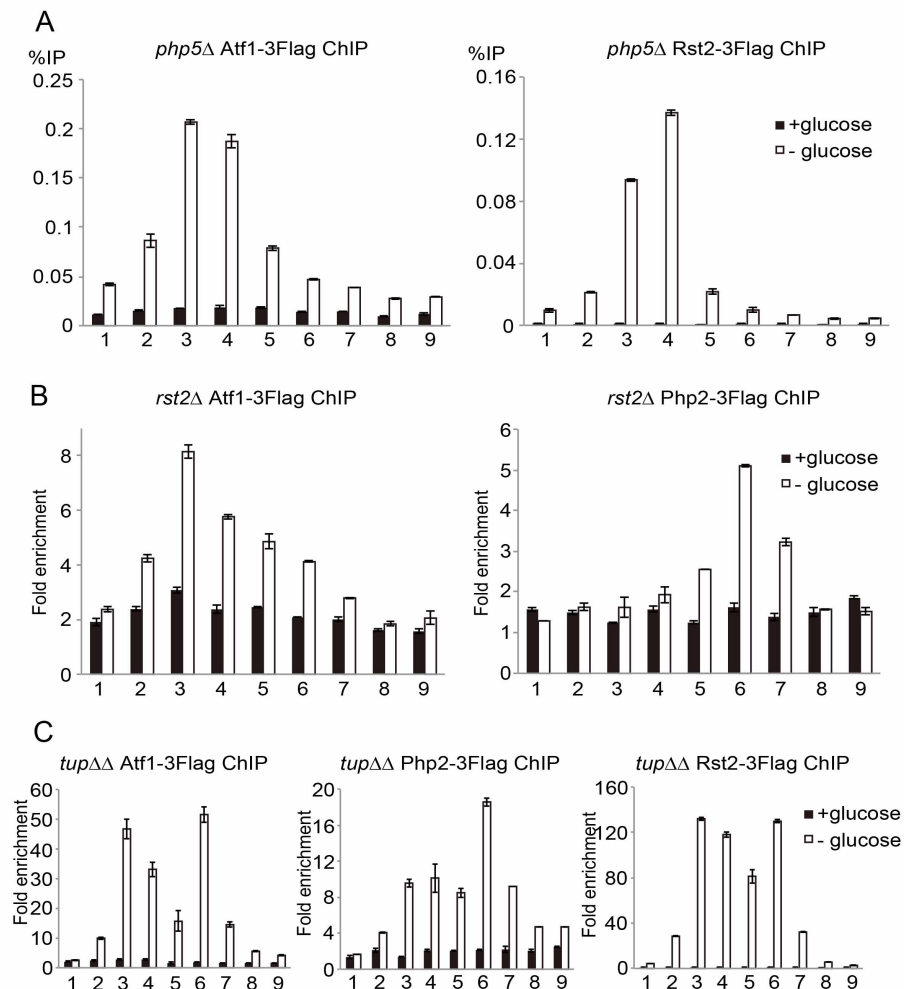


Fig.14 転写制御因子の欠損株による各転写活性化因子の結合分布

(A, B, C) 各転写制御因子の欠損株を用いて、Fig.7(A)と同様の方法で ChIP 解析を行った。下部に記載してあるプライマーの位置を示す数字は Fig.7(A)の模式図に対応する。

3.2.4 まとめと考察

本研究では、グルコース飢餓後*fbp1*上流領域においてUAS1とUAS2が近づくような特殊な高次構造が形成されていることを明らかにした。*php5Δ*や*rst2Δ*により他の因子の結合分布が変化し、1つのピークとなりUAS1, UAS2のどちらかに偏ることから、転写活性化因子がすべて結合することで高次構造形成が促されることが考えられる。この高次構造形成メカニズムとして最も簡単に考えられるのは、転写活性化因子間の直接の相互作用があげられる。実際、Atf1とPhp2のヒトのorthologであるATF2とNF-YAは直接相互作用することが報告されている⁵⁴。また、*fbp1*上流からは*mlon*RNAが転写されており、このRNAが高次構造形成を促進することも考えられる。

ヒトなどでは、遠位のエンハンサーがchromatin loopを形成してプロモーターと相互作用し、標的遺伝子の転写を制御することが報告されている⁵⁵⁻⁵⁸。また、出芽酵母では遺伝子のプロモーターとターミネーターを近づけるgene loopが転写のメモリーとなっていることや双方向性のプロモーターのからの不要な非コードRNA転写の抑制をするという報告があり、ローカルな高次構造も転写の制御に重要な役割を果たすことが考えられている^{59,60}。そのため、今回発見した*fbp1*上流のローカルな高次構造も何らかの転写制御に関わることが予想される。*fbp1*転写制御に最も重要な因子であるTup11/12は抑制因子であるにも関わらず*fbp1*転写活性化時にその結合量が増加する³⁰。もしかすると、Tup corepressorは転写のストレス応答特異性獲得や精密制御のために転写活性化時も常に機能していて、その機能を制御しているのが今回発見した*fbp1*上流の高次構造なのかもしれない。この高次構造の形成は、(1)Php2, Rst2が結合してくるタイミングと一致していたこと、(2)Php2とRst2はクロマチン構造変化後に結合することから、クロマチン構造変化後に起こる現象であることが考えられる。クロマチンレベルの制御を経た後に高次構造レベルの制御が起こっており、このような多段階の制御を経ることでストレス応答特異性獲得や転写の精密制御を達成していることが予想される(Fig.15)。

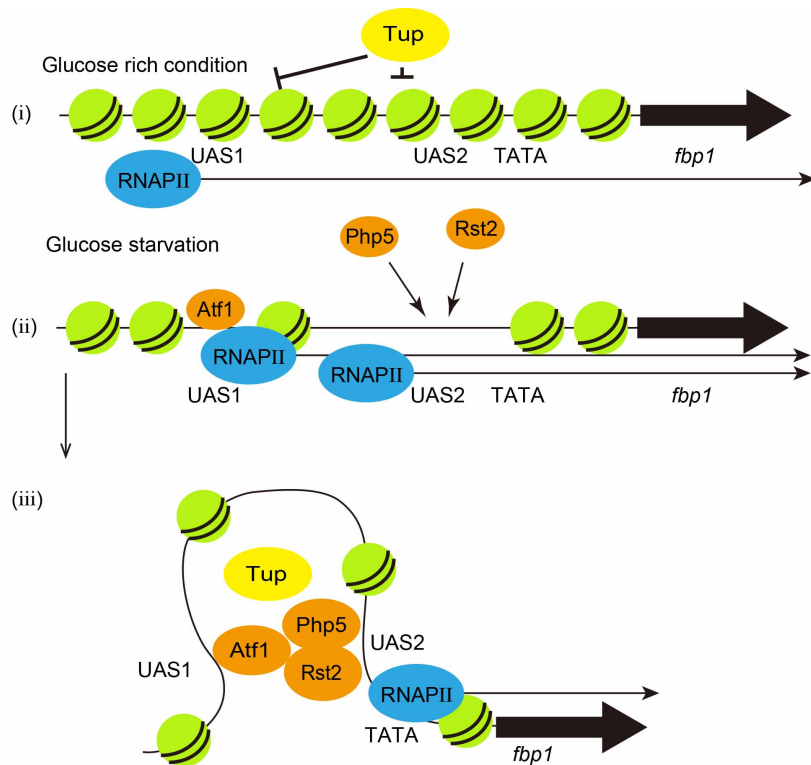


Fig.15 クロマチン構造、ゲノム高次構造を利用した *fbp1* 転写制御モデル

(i) グルコースが豊富な状況では *fbp1* 上流は抑制的なクロマチン構造をとる。(ii) グルコース飢餓になると、はじめに *mfonRNA* 転写に共役したクロマチン構造変化が起き、クロマチン構造レベルでの転写制御が行われる。(iii) クロマチン構造変化により転写活性化因子が結合できるようになり、*fbp1* 上流領域の高次構造レベルでのさらなる転写制御を経て、*fbp1* 転写活性化が誘導される。

4. 参考文献

- 1 Wolffe, A. P. Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem Sci* **19**, 240-244 (1994).
- 2 Wolffe, A. P. Histones, nucleosomes and the roles of chromatin structure in transcriptional control. *Biochemical Society transactions* **25**, 354-358 (1997).
- 3 Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705, doi:10.1016/j.cell.2007.02.005 (2007).
- 4 Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* **21**, 381-395, doi:10.1038/cr.2011.22 (2011).
- 5 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).
- 6 Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719, doi:10.1016/j.cell.2007.01.015 (2007).
- 7 Kornberg, R. D. & Lorch, Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* **98**, 285-294 (1999).
- 8 Adkins, M. W. & Tyler, J. K. Transcriptional activators are dispensable for transcription in the absence of Spt6-mediated chromatin reassembly of promoter regions. *Molecular cell* **21**, 405-416, doi:10.1016/j.molcel.2005.12.010 (2006).
- 9 Boeger, H., Griesenbeck, J., Strattan, J. S. & Kornberg, R. D. Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Molecular cell* **14**, 667-673, doi:10.1016/j.molcel.2004.05.013 (2004).
- 10 Zanton, S. J. & Pugh, B. F. Full and partial genome-wide assembly and disassembly of the yeast transcription machinery in response to heat shock. *Genes & development* **20**, 2250-2265, doi:10.1101/gad.1437506 (2006).
- 11 Ptashne, M. & Gann, A. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**, 569-577, doi:10.1038/386569a0 (1997).
- 12 Naar, A. M., Lemon, B. D. & Tjian, R. Transcriptional coactivator complexes. *Annual review of biochemistry* **70**, 475-501, doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.475 (2001).
- 13 Malave, T. M. & Dent, S. Y. Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* **84**, 437-443, doi:10.1139/o06-073 (2006).
- 14 Rosenfeld, M. G., Lunyak, V. V. & Glass, C. K. Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes & development* **20**, 1405-1428, doi:10.1101/gad.1424806 (2006).
- 15 Courey, A. J. & Jia, S. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes & development* **15**, 2786-2796, doi:10.1101/gad.939601 (2001).
- 16 Smith, R. L. & Johnson, A. D. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **25**, 325-330 (2000).
- 17 Green, S. R. & Johnson, A. D. Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* **15**,

- 4191-4202, doi:10.1091/mbc.E04-05-0412 (2004).
- 18 Bone, J. R. & Roth, S. Y. Recruitment of the yeast Tup1p-Ssn6p repressor is associated with localized decreases in histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* **276**, 1808-1813, doi:10.1074/jbc.M008668200 (2001).
 - 19 Wu, J., Suka, N., Carlson, M. & Grunstein, M. TUP1 utilizes histone H3/H2B-specific HDA1 deacetylase to repress gene activity in yeast. *Molecular cell* **7**, 117-126 (2001).
 - 20 Davie, J. K., Edmondson, D. G., Coco, C. B. & Dent, S. Y. Tup1-Ssn6 interacts with multiple class I histone deacetylases in vivo. *The Journal of biological chemistry* **278**, 50158-50162, doi:10.1074/jbc.M309753200 (2003).
 - 21 Kastaniotis, A. J., Mennella, T. A., Konrad, C., Torres, A. M. & Zitomer, R. S. Roles of transcription factor Mot3 and chromatin in repression of the hypoxic gene ANB1 in yeast. *Molecular and cellular biology* **20**, 7088-7098 (2000).
 - 22 Fleming, A. B. & Pennings, S. Antagonistic remodelling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for FLO1 gene regulation. *The EMBO journal* **20**, 5219-5231, doi:10.1093/emboj/20.18.5219 (2001).
 - 23 Li, B. & Reese, J. C. Ssn6-Tup1 regulates RNR3 by positioning nucleosomes and affecting the chromatin structure at the upstream repression sequence. *The Journal of biological chemistry* **276**, 33788-33797, doi:10.1074/jbc.M104220200 (2001).
 - 24 Zhang, Z. & Reese, J. C. Ssn6-Tup1 requires the ISW2 complex to position nucleosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **23**, 2246-2257, doi:10.1038/sj.emboj.7600227 (2004).
 - 25 Gromoller, A. & Lehming, N. Srb7p is a physical and physiological target of Tup1p. *The EMBO journal* **19**, 6845-6852, doi:10.1093/emboj/19.24.6845 (2000).
 - 26 Zhang, Z. & Reese, J. C. Redundant mechanisms are used by Ssn6-Tup1 in repressing chromosomal gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **279**, 39240-39250, doi:10.1074/jbc.M407159200 (2004).
 - 27 Hoffman, C. S. & Winston, F. A transcriptionally regulated expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **84**, 473-479 (1989).
 - 28 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).
 - 29 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).
 - 30 Hirota, K., Hoffman, C. S. & Ohta, K. Reciprocal nuclear shuttling of two antagonizing Zn finger proteins modulates Tup family corepressor function to repress chromatin remodeling. *Eukaryotic cell* **5**, 1980-1989, doi:10.1128/EC.00272-06 (2006).
 - 31 Higuchi, T., Watanabe, Y. & Yamamoto, M. Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast. *Molecular and cellular biology* **22**, 1-11 (2002).

- 32 Janoo, R. T., Neely, L. A., Braun, B. R., Whitehall, S. K. & Hoffman, C. S. Transcriptional regulators of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1* gene include two redundant Tup1p-like corepressors and the CCAAT binding factor activation complex. *Genetics* **157**, 1205-1215 (2001).
- 33 McNabb, D. S., Tseng, K. A. & Guarente, L. The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Molecular and cellular biology* **17**, 7008-7018 (1997).
- 34 Hirota, K. *et al.* Fission yeast global repressors regulate the specificity of chromatin alteration in response to distinct environmental stresses. *Nucleic acids research* **32**, 855-862, doi:10.1093/nar/gkh251 (2004).
- 35 Hirota, K., Hoffman, C. S., Shibata, T. & Ohta, K. Fission yeast Tup1-like repressors repress chromatin remodeling at the *fbp1+* promoter and the *ade6-M26* recombination hotspot. *Genetics* **165**, 505-515 (2003).
- 36 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).
- 37 Hirota, K., Mizuno, K., Shibata, T. & Ohta, K. Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot *ade6-M26*. *Molecular biology of the cell* **19**, 1162-1173, doi:10.1091/mbc.E07-04-0377 (2008).
- 38 Hirota, K. & Ohta, K. Transcription of mRNA-type long non-coding RNAs (mlonRNAs) disrupts chromatin array. *Communicative & integrative biology* **2**, 25-26 (2009).
- 39 Hirota, K. & Ohta, K. Cascade transcription of mRNA-type long non-coding RNAs (mlonRNAs) and local chromatin remodeling. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* **4**, 5-7 (2009).
- 40 Bahler, J. *et al.* Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**, 943-951, doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y (1998).
- 41 Hirota, K., Tanaka, K., Watanabe, Y. & Yamamoto, M. Functional analysis of the C-terminal cytoplasmic region of the M-factor receptor in fission yeast. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **6**, 201-214 (2001).
- 42 Takeda, T. & Yamamoto, M. Analysis and in vivo disruption of the gene coding for calmodulin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 3580-3584 (1987).
- 43 Nardini, M. *et al.* Sequence-specific transcription factor NF-Y displays histone-like DNA binding and H2B-like ubiquitination. *Cell* **152**, 132-143, doi:10.1016/j.cell.2012.11.047 (2013).
- 44 Gnesutta, N., Nardini, M. & Mantovani, R. The H2A/H2B-like histone-fold domain proteins at the crossroad between chromatin and different DNA metabolisms. *Transcription* **4**, 114-119 (2013).
- 45 Soboleva, T. A., Nekrasov, M., Ryan, D. P. & Tremethick, D. J. Histone variants at the transcription start-site. *Trends in genetics : TIG* **30**, 199-209, doi:10.1016/j.tig.2014.03.002 (2014).

- 46 Jin, S. & Scotto, K. W. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Molecular and cellular biology* **18**, 4377-4384 (1998).
- 47 Li, Q. *et al.* Xenopus NF-Y pre-sets chromatin to potentiate p300 and acetylation-responsive transcription from the Xenopus hsp70 promoter in vivo. *The EMBO journal* **17**, 6300-6315, doi:10.1093/emboj/17.21.6300 (1998).
- 48 Peng, Y. *et al.* Irradiation modulates association of NF-Y with histone-modifying cofactors PCAF and HDAC. *Oncogene* **26**, 7576-7583, doi:10.1038/sj.onc.1210565 (2007).
- 49 Imbriano, C. *et al.* Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Molecular and cellular biology* **25**, 3737-3751, doi:10.1128/mcb.25.9.3737-3751.2005 (2005).
- 50 Currie, R. A. NF-Y is associated with the histone acetyltransferases GCN5 and P/CAF. *The Journal of biological chemistry* **273**, 1430-1434 (1998).
- 51 Gurtner, A. *et al.* NF-Y dependent epigenetic modifications discriminate between proliferating and postmitotic tissue. *PloS one* **3**, e2047, doi:10.1371/journal.pone.0002047 (2008).
- 52 Cremer, T. & Cremer, M. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a003889, doi:10.1101/cshperspect.a003889 (2010).
- 53 Phillips, J. E. & Corces, V. G. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**, 1194-1211, doi:10.1016/j.cell.2009.06.001 (2009).
- 54 Lindaman, L. L., Yeh, D. M., Xie, C., Breen, K. M. & Coss, D. Phosphorylation of ATF2 and interaction with NFY induces c-Jun in the gonadotrope. *Molecular and cellular endocrinology* **365**, 316-326, doi:10.1016/j.mce.2012.11.012 (2013).
- 55 Chavanas, S. *et al.* Long-range enhancer associated with chromatin looping allows AP-1 regulation of the peptidylarginine deiminase 3 gene in differentiated keratinocyte. *PloS one* **3**, e3408, doi:10.1371/journal.pone.0003408 (2008).
- 56 Mishiro, T. *et al.* Architectural roles of multiple chromatin insulators at the human apolipoprotein gene cluster. *The EMBO journal* **28**, 1234-1245, doi:10.1038/emboj.2009.81 (2009).
- 57 Schmidt, D. *et al.* A CTCF-independent role for cohesin in tissue-specific transcription. *Genome research* **20**, 578-588, doi:10.1101/gr.100479.109 (2010).
- 58 Gheldof, N. *et al.* Cell-type-specific long-range looping interactions identify distant regulatory elements of the CFTR gene. *Nucleic acids research* **38**, 4325-4336, doi:10.1093/nar/gkq175 (2010).
- 59 Laine, J. P., Singh, B. N., Krishnamurthy, S. & Hampsey, M. A physiological role for gene loops in yeast. *Genes & development* **23**, 2604-2609, doi:10.1101/gad.1823609 (2009).
- 60 Tan-Wong, S. M. *et al.* Gene loops enhance transcriptional directionality. *Science* **338**, 671-675, doi:10.1126/science.1224350 (2012).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を頂きました、首都大学東京大学院 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。

論文作成や実験のご協力をしていただいた東京大学 太田邦史教授、竹俣直道氏、Boston college Charls. S. Hoffman 教授、実験方法のアドバイスを頂いた東京工業大学 岩崎博史教授、筒井康博助教に心から感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

また、一方ならぬご協力を頂きました首都大学東京大学院 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助教、中川万紀子氏、田島愛実氏、照喜名悟朗氏、加賀裕之氏、竹内藍子氏、添野公雄氏、高橋尚史氏、早川健太郎氏、堀正之氏、木下暁喜氏、高沢浩則氏、藤井稔彦氏、石川大輔氏、上原清孝氏、川澄遼太郎氏、小林香氏、高木季代氏、足立朗氏、大岡正人氏、梅田未来氏、清水直登氏に謝意を申し上げます。

最後に、研究生生活を精神的、経済的に支えていただいた両親に深く感謝致します。