

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	SUV420H2のヘテロクロマチン局在化メカニズム
Title(English)	
著者(和文)	中尾勝
Author(English)	Masaru Nakao
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12657号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木村 宏,徳永 万喜洋,田口 英樹,野澤 佳世,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12657号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

SUV420H2 のヘテロクロマチン局在化メカニズム

2024年3月

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学コース

木村研究室 博士後期課程

中尾 勝

目次

略語表	4
発表要旨	6
論文要旨	8
第1章 研究背景と研究目的	
1-1. クロマチンの高次構造とヒストン修飾	11
1-2. ヘテロクロマチン	12
1-3. ヘテロクロマチンタンパク質1 (HP1)	12
1-4. HP1 結合タンパク質群と HP1 の結合様式	13
1-5. HP1 の局在・動態の制御	14
1-6. ヒストン修飾 H4K20me3 と修飾酵素 SUV420H2	15
1-7. SUV420H2 のヘテロクロマチン局在メカニズム	16
1-8. 研究目的	16
第2章 材料と実験	
2-1. 細胞培養	17
2-2. 発現ベクタープラスミド構築	17
2-3. 安定発現細胞の作製	24
2-4. 生細胞顕微鏡観察	26
2-5. 免疫染色	29
2-6. 免疫沈降とウェスタンブロッティング	33
2-7. SUV420H1/H2 ダブルロックアウト細胞の作製	35
2-8. 増殖曲線	36
2-9. 統計解析とデータの成形	36
2-10. アミノ酸配列のアライメント	36
第3章 SUV420H2 HTM と HP1 の結合様式と双方向の局在制御	
3-1. 先行研究の再現性の確認	37
3-2. ヘテロクロマチン局在に必要な最小領域の探索	39
3-3. 進化的に保存されたアミノ酸配列の HP1 結合への関与	43
3-4. HP1 結合モチーフの立体配置がヘテロクロマチン局在に与える影響	50
3-5. HTM の発現が HP1 の局在に与える影響	52
3-6. HTM の発現が HP1 の動態に与える影響	49

3-7. 内在性 SUV420H2 が HP1 の局在に与える影響	59
3-8. HTM の発現が細胞増殖に与える影響	63
3-9. 小括	64
第4章 ヘテロクロマチン可視化プローブへの応用可能性の検証	
4-0. 目的	66
4-1. HTM V374D-sfGFP と sfGFP 融合 HP1 α の局在の比較	66
4-2. H3K9me3 が豊富なヘテロクロマチン動態の追跡への応用	71
4-3. 小括	73
第5章 考察	
5-1. モチーフ②と zinc finger-like モチーフによる HP1 相互作用の安定化 ...	75
5-2. HP1 結合タンパク質による HP1 動態の制御	78
5-3. HTM-N がクロマチン上で 2 つの HP1 二量体と結合する可能性 ...	80
5-4. H4K20me3 による HP1 のヘテロクロマチン結合安定化	81
5-5. HTM V374D-sfGFP を用いたヘテロクロマチン動態の追跡	82
5-6. H3K9me3 ヘテロクロマチンの生細胞イメージングプローブ	82
引用文献	84
謝辞	94

略語表

53BP1	Tumor protein p53-binding protein 1
Aurora B	Aurora kinase B
aa	Amino acid
ACF1	ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor 1
Alexa488	Alexa Fluor® 488 dye
BRD4	Bromodomain containing 4
CAF1	Chromatin assembly factor 1
CD	Chromodomain
cDNA	Complementary DNA
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
CSD	Chromoshadow domain
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DKO	Double knockout
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNMT1	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GFP	Green fluorescent protein
GPS	L-glutamine, penicillin, streptomycin
H3K9me3	Trimethylation on the 9th lysine of histon H3
H4K16ac	Acetylation on the 16th lysine of histon H4
H4K20me3	Trimethylation on the 20th lysine of histon H4
HP1	Heterochromatin protein 1
HTM	Heterochromatic targeting module
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IgG	Immunoglobulin G
KAP-1	KRAB-associated protein 1
KDM4D	Lysine demethylase 4D
KO	Knockout
LBR	Lamin B receptor
mRNA	Messenger RNA
ORC	Origin recognition complex

ORCA/LRWD1	ORC-associated protein/ Leucine-rich repeat and WD repeat-containing protein
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyde
pLDDT	The predicted local distance difference test
PML	Progressive multifocal leukoencephalopathy
P-TEFb	Positive transcription elongation factor b
SDS	Sodium dodecyl sulfate
s.e.m.	Standard error of the mean
SENP7	Sentrin/SUMO-specific protease 7
Setdb1	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax domain bifurcated histone lysine methyltransferase 1
sfGFP	Superfolder GFP
sfCherry	Superfolder Cherry
Sgo1	Shugoshin 1
Suv39h1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TBS-T	Tris buffered saline with Tween 20
TE	Tris-EDTA buffer (pH 8.0)
TIF1	Transcriptional intermediary factor 1
TMR	Tetramethylrhodamine
WT	Wild type

発表要旨

【はじめに】

繰り返し配列を豊富に含むゲノム領域は、凝縮したクロマチン構造であるヘテロクロマチンを形成し、転写が抑制されている。このようなヘテロクロマチンにはヒストン H3 の 9 番目リジンのトリメチル化 (H3K9me3) とヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) が豊富に存在している。HP1 がそのクロモドメインを介して H3K9me3 に結合し、さらに様々なタンパク質が HP1 のクロモシャドウドメインと結合することで、遺伝子発現が抑制されると考えられている。ヒストン H4 の 20 番目リジンのトリメチル化 (H4K20me3) は H3K9me3 と同様にヘテロクロマチンに豊富に存在するヒストン修飾である。H4K20me3 の修飾酵素 SUV420H2 は、そのヘテロクロマチン標的モジュール (HTM) が HP1 と結合することでヘテロクロマチンに局在化することが報告されている (Schotta et al. *Genes Dev*, **18**, 1251, 2004; Hahn et al. *Genes Dev*, **27**, 859, 2013)。しかしながら、SUV420H2 HTM のクロマチン結合は HP1 依存的であるにも関わらず、その結合は HP1 よりも安定であるなど (Souza et al. *BMC Cell Biol*, **10**, 41, 2009)、SUV420H2 HTM のヘテロクロマチン局在化機構は明らかではなかった。そこで本研究は、SUV420H2 の HP1 との結合様式を調べることで、SUV420H2 の安定的なヘテロクロマチン局在化のメカニズムや HP1 動態の制御機構を明らかにすることを目的として行った。

【方法】

① SUV420H2 HTM やその変異体のヘテロクロマチンへの集積を評価するために、sfGFP 融合タンパク質をマウスやヒトの培養細胞で発現させ、共焦点顕微鏡を用いて解析した。② HTM 変異体と HP1 との結合は、免疫沈降とウェスタンブロッティングで検証した。③ HTM の発現が内在性 HP1 の局在に与える影響は、抗 HP1 β 抗体を使った免疫染色により解析した。④ HTM 変異体の発現が HP1 の動態に与える影響の解析は、sfCherry-HP1 α に対する光褪色後蛍光回復法により行った。⑤ 内在性 SUV420H2 による HP1 のヘテロクロマチン結合への寄与については、SUV420H1/H2 ダブルノックアウト細胞を作製し野生型細胞との比較を行った。

【結果】

SUV420H2 HTM の N 末端側 (HTM-N) と C 末端側 (HTM-C) はそれぞれ独立にヘテロクロマチンに集積する。様々な動物種の HTM のアミノ酸配列

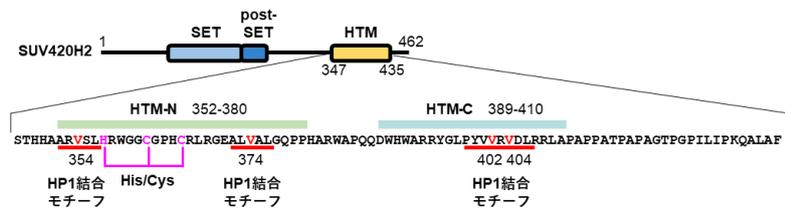


図 SUV420H2 の構造と HTM のアミノ酸配列

HTM 内部のヘテロクロマチン集積に必要な領域および点変異を導入したアミノ酸残基を示す。

を比較解析した結果、HP1 クロモシヤドウドメインに結合するコンセンサス配列 (PXVXL; X は任意のアミノ酸) に似たモチーフが HTM-N 内に 2 つ、HTM-C 内に 1 つ見つかった。これらのモチーフの点変異体はヘテロクロマチンに集積せず、HP1 との結合も失われた。HTM-N は、2 つのモチーフが協調的に働くことでヘテロクロマチンへ強く集積した。また、この 2 つのモチーフの協調的な作用には、進化的に保存されたヒスチジンとシステインが必要であり、適切な立体配置が重要であることが示唆された。

次に、HTM と各種変異体の発現が内在性 HP1 の局在および動態に与える影響を解析した。その結果、HTM および HTM-N の発現は、HP1 のヘテロクロマチンへの集積を促進することが分かった。反対に HTM-C の発現は HP1 のヘテロクロマチンへの集積を減弱させた。HTM の持つ 3 つの HP1 結合モチーフのうち 2 番目に点変異を導入した HTM V374D の発現は、HP1 の局在および動態に影響を与えなかった。これらの結果は、HP1 のヘテロクロマチンへの結合が HTM および HTM-N の発現によって安定化され、HTM-C の発現によって不安定化されることを示唆した。また、内在性 SUV420H2 を欠失させた場合、わずかながら HP1 のヘテロクロマチン結合が減弱した。HP1 のヘテロクロマチン結合安定性に影響を与えない HTM V374D は、ヘテロクロマチンのライブイメージングプローブとして応用可能であった。

【考察】

本研究では、SUV420H2 の効率的なヘテロクロマチン局在には HTM 中の複数の HP1 結合モチーフが必要であることを明らかにした。また SUV420H2 が HP1 の局在・動態を制御する可能性について解析し、過剰発現させた SUV420H2 HTM が HP1 のヘテロクロマチンへの結合を安定化させることを明らかにした。さらに、HP1 結合タンパク質の安定的なヘテロクロマチンへの集積には、HP1 結合モチーフの数に加えて結合モチーフの立体的な配置が重要であることが示唆された。これらのことから、細胞内での HP1 のヘテロクロマチン結合は、協調的に働く複数の HP1 結合モチーフを持つタンパク質による安定化と単一の HP1 結合モチーフを持つタンパク質による不安定化のバランスにより制御されていると考えられた。HeLa 細胞の内在性 SUV420H2 を欠失させても HP1 の動態はわずかしき変化しなかったことから、HeLa 細胞における SUV420H2 の発現量は他の HP1 結合タンパク質に比べて低いと考えられた。発現レベルが低い状態において SUV420H2 HTM に 3 つの HP1 結合モチーフが存在することは、ヘテロクロマチンへの局在を促進し、限局的な H4K20me3 の付加に重要であると考えられる。

以上のように、HP1 結合モチーフを持つタンパク質の過剰発現は HP1 の細胞内動態に影響を与えうるが、協調的に働かない二つの結合モチーフを持つ変異体 (HTM V374D) はほとんど影響を与えなかった。従って、この変異体は、HP1 が結合するヘテロクロマチンの細胞内動態の追跡に応用可能であると考えられた。

論文要旨

繰り返し配列を豊富に含むゲノム領域は、凝縮したクロマチン構造であるヘテロクロマチンを形成し、転写が抑制されている。このようなヘテロクロマチンにはヒストン H3 の 9 番目リジンのトリメチル化 (H3K9me3) とヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) が豊富に存在している。HP1 はそのクロモドメインを介して H3K9me3 に結合し、さらに様々なタンパク質が HP1 のクロモシャドウドメインと結合することで、遺伝子発現の抑制に関与する。ヒストン H4 の 20 番目リジンのトリメチル化 (H4K20me3) は H3K9me3 と同様にヘテロクロマチンに豊富なヒストン修飾である。H4K20me3 の修飾酵素 SUV420H2 は、そのヘテロクロマチン標的モジュール (HTM) が HP1 と結合することでヘテロクロマチンに局在化することが報告されている。しかし、SUV420H2 HTM のクロマチン結合は HP1 依存的であるにも関わらず、その結合は HP1 よりも安定であるなど、SUV420H2 HTM のヘテロクロマチン局在化機構は明らかではなかった。本研究では、SUV420H2 の HP1 との結合様式を調べることで、SUV420H2 の安定的なヘテロクロマチン局在化のメカニズムや HP1 動態の制御機構を明らかにすることを目的とした。

はじめに、superfolder GFP を融合した各種欠損変異体の細胞内局在を観察し、ヘテロクロマチンへの集積に必須な領域を絞り込んだ。その結果、HTM の N 末端側(aa 352-380)および C 末端側 (aa 389-410) の二つの領域が特定され、これらを HTM-N、HTM-C と名付けた。この領域はマウス SUV420H2 についての過去の報告とほぼ一致した。次に、進化的に保存されたアミノ酸は重要であると仮定し、生物種間のアミノ酸配列の保存性を調べた。その結果、HTM-N 内に 2 つ、HTM-C 内に 1 つ、HP1 結合モチーフが保存されていた。これらのモチーフの点変異体ではヘテロクロマチンへの集積が消失し、また、免疫沈降実験によって HP1 と相互作用しないことが確認された。これらの結果から、HP1 との相互作用を介して SUV420H2 HTM がヘテロクロマチンにリクルートされることがわかった。また HTM-N 内には 1 つのヒスチジン (His) と 2 つのシステイン (Cys) が進化的に保存されており、4 つの His と Cys からなる zinc finger モチーフに似た構造をとる可能性があった。これらの His/Cys の点変異体とフレキシブルリンカーである 3x(GGGGS)配列の挿入変異体は、それぞれ、ヘテロクロマチンへの集積が消失または大幅に減弱した。このことから、2 つの HP1 結合モチーフの適切な立体配置が安定的なヘテロクロマチン局在に必要であることが示唆された。

次に HTM の発現が HP1 のヘテロクロマチンへの結合に与える影響について調べた。HTM の発現細胞と野生型細胞について抗 HP1 抗体を用いた免疫染色を行い比較した結果、HTM 発現細胞ではヘテロクロマチンに結合する HP1 のシグナルが顕著に増加していた。HTM-N、HTM-C および HTM V374D (HTM の 2 つ目の HP1 結合モチーフ

フの点変異体) についても同様の実験を行なったところ、HP1 のヘテロクロマチン濃縮率は HTM-N の発現によって増加し、HTM-C の発現によってわずかに低下した。このことから、HP1 のヘテロクロマチン結合安定化には HP1 結合モチーフの数が重要であることが示唆された。他方で、HTM V374D 変異体は、2つの HP1 結合モチーフを持つが、その変異体の発現は HP1 のヘテロクロマチン濃縮率に変化をもたらさなかった。同様の結果が光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence recovery after photobleaching; FRAP) による HP1 の動態解析でも得られた。これらの結果から、HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化させるには、複数のモチーフが協調して作用することが重要であることが示唆された。この安定化現象は、二つの HP1 結合モチーフを持つ SENP7 などでも報告されている。したがって細胞内において HP1 の動態は単一もしくは複数の HP1 結合モチーフを持つタンパク質群のバランスを反映している可能性がある。

以上をまとめると、本研究では SUV420H2 HTM 内部の 3つの HP1 結合モチーフおよびそれらの適切な立体配置が、SUV420H2 の安定的な局在と HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化に必要であることが分かった。これらの結果から、SUV420H2 は HP1 の動態を制御することでヘテロクロマチン構造の形成・維持に働く可能性が示唆された。ただし、内在性 SUV420H2 を欠失させても HP1 の局在性にはほとんど影響を与えなかった。HP1 のヘテロクロマチン結合安定化の生理学的意義を明らかにすることが今後の課題である。

最後に、これらの知見を活用し、ヘテロクロマチン動態の可視化プローブを開発した。特に、HTM V374D 変異体は HP1 の動態に影響を与えないことから、ヘテロクロマチン動態の追跡に応用できると考えた。HTM V374D-sfGFP は sfGFP 融合型 HP1 α と比べてコントラストよくヘテロクロマチン上に集積した。また、H3K9me3 非依存的に HP1 の集積が見られる構造体 (PML ボディや M 期染色体上のセントロメア) には集まらなかった。HTM V374D を用いて複製中のヘテロクロマチン動態を追跡した結果、複製 foci では HTM V374D が薄く見られた。このことから、複製中のヘテロクロマチンからは HP1 が外れている、もしくはクロマチンの脱凝縮が起きていることが示唆された。以上から、HTM V374D はヘテロクロマチン動態の可視化プローブとして応用可能であることが実証された。

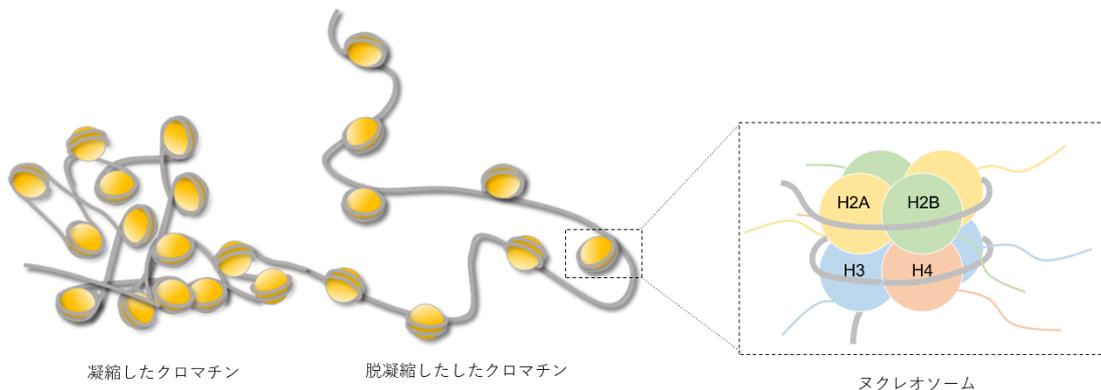
論文要旨 (英語)

The genomic regions rich in repetitive sequences form condensed chromatin structures called heterochromatin, characterized by histone H3 Lys9 trimethylation (H3K9me3) and heterochromatin protein 1 (HP1), which recruit various effectors to suppress transcription. SUV420H2, a methyltransferase responsible for histone H4 Lys20 trimethylation, is recruited to heterochromatin by binding to HP1 through its Heterochromatic Targeting Module (HTM). Despite SUV420H2's heterochromatin localization depending on HP1, it binds to heterochromatin more stably than HP1. I aim to uncover the binding mode of SUV420H2 to HP1 and elucidate the mechanism of SUV420H2 heterochromatin retention and the regulation of HP1 dynamics. By expressing a series of deletion mutants fused with the superfolder GFP, I identified HTM regions that are essential for heterochromatin accumulation at the N-terminus (aa 352-380) and C-terminus (aa 389-410), which were designated HTM-N and HTM-C, respectively. Point mutation analyses revealed that evolutionarily conserved HP1 binding motifs in HTM-N and HTM-C play a critical role in heterochromatin accumulation and interaction with HP1. Within HTM-N, evolutionally conserved one histidine and two cysteine residues, resembling a zinc finger-like motif, were observed. Point mutations in these residues or an insertion mutant with a flexible linker (3xGGGGS) had defects in heterochromatin accumulation, suggesting that a specific configuration of HTM-N is required for stable HP1 binding and heterochromatin localization. I also found that HTM stabilizes HP1 binding to heterochromatin by immunostaining and fluorescence recovery after photobleaching. The impacts on HP1 stabilization varied among HTM, HTM-N, HTM-C, and HTM V374D (a mutant harboring a mutation in the second HP1 binding motif). These results indicated that not only the number of HP1 binding motifs but also the configuration of the HP1 binding motifs within HTM are crucial for stabilizing HP1 binding to heterochromatin. In conclusion, this study reveals the mechanism of SUV420H2's heterochromatin localization and the regulation of HP1 dynamics via multiple and properly configured HP1 binding motifs. In addition, HTM V374D, which does not affect HP1 dynamics, could serve as a probe for tracking heterochromatin dynamics, demonstrating its applicability in visualizing replication-associated heterochromatin changes.

第1章 研究背景と研究目的

1-1. クロマチンの高次構造とヒストン修飾

真核生物の細胞核内においてDNAはヒストンタンパク質と結合しクロマチンとして存在している。クロマチンはヒストンタンパク質八量体の周りに約1.7回転巻き付いたヌクレオソームを基本単位として、ヌクレオソームが数珠繋ぎになった構造を形成している。クロマチンはさらにヒストンH1や非ヒストンクロマチン結合タンパク質と相互作用することで、凝縮度合の異なる高次構造を形成している。クロマチンの高次構造は転写因子などのアクセシビリティに影響し、遺伝情報であるDNAの維持や遺伝子発現の調節に重要である。凝縮したクロマチンはヘテロクロマチンと呼ばれ、脱凝縮したクロマチンはユークロマチンと呼ばれる。



一般に、クロマチンの高次構造は、異なる調節タンパク質によって可逆的に形成され、

図1 クロマチンとヌクレオソームの構造

転写やDNA複製、DNA修復、外部刺激への応答に応じて動的に調節されている。特に、ヒストンタンパク質への翻訳後修飾は、様々な調節因子が結合するためのエピジェネティックなマークとして働き、クロマチンの機能制御に強く関与すると考えられている。

ヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質八量体は4種類のヒストンが二分子ずつ集まって形成される。これら4種類のヒストンはH2A、H2B、H3、H4から成り、コアヒストンと呼ばれている。コアヒストンのN末端およびC末端領域はヒストンテールと呼ばれ、ヌクレオソームから突出しており、メチル化 (me)、アセチル化 (ac)、リン酸化 (ph)、ユビキチン化 (ub) など、多種の翻訳後修飾の標的となっている。ヒストン修飾は、修飾を受けるアミノ酸残基と修飾の種類によって、それぞれ機能が異なることが知られている。メチル化は、モノメチル (me1)、ジメチル (me2)、トリメチル (me3) の3段階がある。例えば、一般に、H3K9ac、H4K16ac、H3K27acなどのア

セチル化は転写活性化に働き、H3K9me3、H4K20me3、H3K27me3などのメチル化は転写抑制的に働く。各ヒストン修飾はリーダーと呼ばれるヒストン修飾特異的な結合ド

1-2. ヘテロクロマチン

凝縮したクロマチンであるヘテロクロマチン構造は転写の抑制や染色体の安定性の維持に重要であり、ヘテロクロマチン構造の破綻は誤った転写や染色体の不安定化を引き起こす (Janssen et al., 2018; Allshire et al., 2018)。ヘテロクロマチンは、さらに条件的ヘテロクロマチンと構成的ヘテロクロマチンの二種類に大別される。条件的ヘテロクロマチンは主に不活性 X 染色体上や細胞種特異的に発現する遺伝子上で形成され、それらの遺伝子の発現を抑制する。構成的ヘテロクロマチンは主にテロメア、ペリセントロメア上のノンコーディングリピートが豊富な領域に恒常的に形成され、トランスポゾンの転写などを抑える。

1-3. ヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1)

ヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) は構成的ヘテロクロマチンの形成・維持に中心的な役割を担う主要構成因子である。HP1 は真核生物である分裂酵母からヒトで高度に保存されており、N 末端側にクロモドメイン (CD)、C 末端側にクロモシャドウドメイン (CSD) と呼ばれる二つのドメイン、そしてそれらをつなぐ天然変性領域のヒンジ領域から構成される。HP1 は CD を介して H3K9me2/me3 に特異的に結合することでペリセントロメア領域に集積する (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2002)。哺乳類の HP1 には α 、 β 、 γ の 3 つのサブタイプが存在しており (Jones et al., 2000)、マウスの細胞核内において HP1 α と HP1 β はヘテロクロマチンに局在するが、HP1 γ はユークロマチンに見られることが一般的に知られている (Nielsen et al., 2001; Minc et al., 2000)。CSD を介した HP1 の二量体化は H3K9me3 が豊富なクロマチン繊維上の二つのヌクレオソーム間を橋渡しすることによってヘテロクロマチンの凝縮を促進する (Hiragami-Hamada et al., 2016; Machida et al., 2018)。また、二量体化した CSD は HP1 結合タンパク質群として知られる多様なタンパク質が結合するプラットフォームとして働く (Smothers & Henikoff,

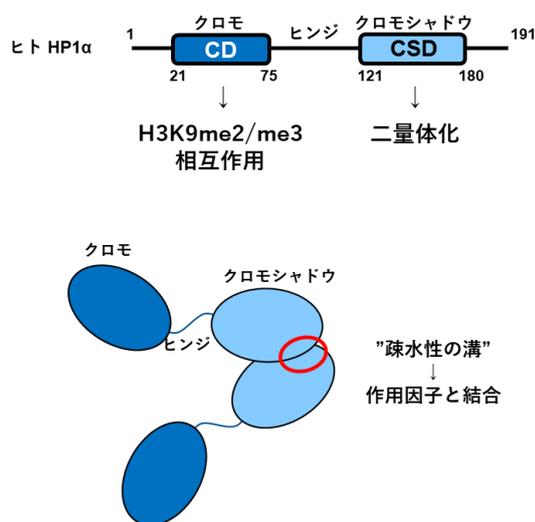


図2 HP1 の構造の模式図

2000; Nozawa et al., 2010; Yan et al., 2018)。さらに、HP1 の CD と CSD をつなぐリンカー部分は天然変性領域によって相分離を引き起こすことで、ヘテロクロマチンの凝集を促進すること (Strom et al., 2017; Larson et al., 2017; Sanulli et al., 2019; Qin et al., 2021) が報告されている。

1-4. HP1 結合タンパク質群と HP1 の結合様式

これまでに HP1 結合タンパク質として、クロマチンの多様な機能に関連する 82 種類のタンパク質が同定されている (Nozawa et al., 2010)。その中の多くのタンパク質、例えば CAF1 (chromatin Assembly factor 1) や TIF1 (transcriptional intermediary factor 1)、KAP-1 (KRAB-associated protein 1)、Sp100、LBR (lamin B receptor)、Sgo1 (Shugoshin 1)、EMSY などは HP1 の CSD と結合することが知られている (Thiru et al., 2004; Lechner et al., 2005; Murzina N et al., 1999; Brasher et al., 2000; Lechner et al., 2000; Kang et al., 2011)。HP1 CSD に結合するタンパク質群にはコンセンサス配列 PXVXL が共通してみられ、この配列特異性は、ファージディスプレイ法によっても検証されている (Smothers and Henikoff, 2000; Thiru et al., 2004; Lechner et al., 2000)。HP1 結合タンパク質の PXVXL モチーフへの点変異導入は HP1 との相互作用を失わせ (Murzina N et al., 1999; Lechner et al., 2000)、二量体形成能を失った HP1 α CSD の 165 番目イソロイシンの置換変異体 (I165K、I165E など) は PXVXL モチーフとの相互作用を失わせる (Lechner et al., 2005)。したがって、一般に HP1 結合タンパク質の多くは PXVXL モチーフを持ち、そのモチーフを介して HP1 の CSD 二量体と結合すると考えられている。PXVXL モチーフと HP1 CSD 二量体の複合体の構造解析が CAF-1、Sgo1、EMSY などで行われており、HP1 CSD は二量体を形成した際に生じる疎水性の溝 (hydrophobic groove) を使って PXVXL モチーフを挟み込むようにして結合することが示された (Thiru et al., 2004; Kang et al., 2011; Huang et al., 2006)。以上のことから、HP1 結合タンパク質群の多くは PXVXL モチーフを持ち、それを介して HP1 CSD 二量体と結合すると考えられている。

一方で、HP1 CSD は典型的な PXVXL のみならず、類似の配列も HP1 CSD と結合することが報告されている (例、核内構造体 PML ボディの主要構成因子 SP100 の CXVXL やラミン B 受容体 LBR の VXVXL など) (Lechner et al., 2005)。これらのバリエーション配列も典型的な PXVXL と同様に HP1 CSD の結合ポケットに結合することが示唆されている (Lechner et al., 2005)。さらに、HP1 CSD 二量体が PXVXL に似た 1 アミノ酸挿入モチーフ PXXVXL とも結合すること (Liu et al., 2017; Maeda et al., 2022)、PXVXL 周囲のアミノ酸配列も CSD 二量体との結合に貢献していることなどが報告されている (Thiru et al., 2004; Lechner et al., 2005)。反対に HP1 と結合しない PXVXL モチーフも存在しており (例、Sgo1 のもつ二つの PXVXL モチーフの片方; Kang et al.,

2011)、HP1 結合モジュールとして機能するためには PXVXL の配列のみならずその周囲のアミノ酸配列の関与も重要であると考えられる。また、PXVXL モチーフのバリエーションや PXVXL の周囲のアミノ酸配列は3つの HP1 サブタイプとの親和性の違いを生み出しているとも考えられているが、その詳細についてはまだ未解明である (Canzio et al., 2014)。

1-5. HP1 の局在・動態の制御

ヘテロクロマチンの主要な制御因子である HP1 は、その動態・局在の制御についても盛んに調べられてきた。当初、HP1 のリクルートに H3K9me3 が必須であることから (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2002)、H3K9me3 と HP1 CD の相互作用が HP1 のクロマチン結合に大きく寄与すると考えられていた。しかし現在では、ヘテロクロマチン上の HP1 の安定的な維持には Hinge 領域での RNA との相互作用 (Maison et al., 2002) や、CSD での HP1 結合タンパク質との相互作用による補助 (Eskeland et al., 2007) も必要であることが報告されている。HP1 のヘテロクロマチン局在化に寄与する因子として、クロマチンリモデリング因子 ACF1 や HP1 と結合する H3K9me3 のヒストンメチル化酵素 Suv39h1、脱 SUMO 化酵素 SENP7 や複製起点認識複合体 (ORC) 構成因子 (Orc2 や Orc3) が知られている。ACF1 は DNA やヒストンに結合するドメインを介してクロマチンに結合することで HP1 のクロマチン結合を安定化する (Eskeland et al., 2007)。Suv39h1 はその N 末端側領域を介して HP1 α の SUMO 化を引き起こし、Hinge 領域と RNA との結合を促進し、H3K9me3 非依存的に HP1 α をクロモセーターへと集積させる (Maison et al., 2016, Eskeland et al., 2007)。さらに、脱 SUMO 化活性をもち、かつヘテロクロマチンに局在する SENP7 が、HP1 のヘテロクロマチン局在化に必須であることが報告され、SUMO 化された HP1 α がヘテロクロマチンに集積し、つづく脱 SUMO 化が H3K9me3 依存的な HP1 α の保持に必要であるというモデルが提唱された (Maison et al., 2012)。しかしながら、SENP7 の詳細なドメイン解析によって、SENP7 による HP1 のヘテロクロマチン局在化の決定因子は、脱 SUMO 活性ではなく、二つの HP1 結合モチーフからなる HP1 結合モジュールであることが明らかになった (Romeo et al., 2015)。同様に HP1 α の局在化に必要であることが示された ORC 構成因子 Orc2、Orc3 も複数の HP1 結合モジュールを持つ (Prasanth et al., 2004; Prasanth et al., 2010)。この二価の HP1 結合サイトを介して、HP1 のヘテロクロマチンの結合を安定化する現象は、「HP1 locking」と呼ばれている。

1-6. ヒストン修飾 H4K20me3 と修飾酵素 SUV420H2

H4K20me3 は H3K9me3 とともに構成的ヘテロクロマチンに豊富に存在することが知られている (Schotta et al., 2004; Hahn et al., 2013)。近年、H4K20me3 が転写抑制、

DNA の複製・修復と関連することが報告され、H4K20me3 はヘテロクロマチンの機能調節に関与することが示唆された。例えば、H4K20me3 は同一ヒストン上の H4K16 アセチル化を阻害し、転写活性化因子である BRD4、P-TEFb のクロマチンへの結合を妨げることで、転写のサイレンシングを促す (Kapoor-Vazirani et al., 2011)。また、細胞老化においては、H4K20me3 の修飾レベルの増加が見られ、遺伝子の抑制状態をより強固にすると考えられている (Nelson et al., 2016)。さらに最近では、維持 DNA メチル化酵素である DNMT1 が H4K20me3 の存在下で LINE-1 への DNA メチル化を促進すること (Ren et al., 2021)、ORC の安定化に働く ORCA/LRWD1 と結合し、ヘテロクロマチンでの複製タイミングを遅く調節すること (Brustel et al., 2017; Giri & Prasanth., 2015)、主要な DNA 損傷修復経路の一つである NHEJ を促進する因子 53BP1 の tudor ドメインが結合すること (Botuyan., 2006) などが報告され、構成的ヘテロクロマチンにおける H4K20me3 の多面的な機能が明らかになってきている。

H4K20me3 のヒストンメチル基転移酵素として、SUV420H1、SUV420H2、SMYD3、SMYD5 の 4 つが知られている (Schotta et al., 2004; Kidder et al., 2017; Stender et al., 2012; Foreman et al., 2011)。マウス胚性繊維芽細胞では、Suv4-20h2 のノックアウト (KO) によってほぼ完全に H4K20me3 が消失することが示されていることから、SUV420H2 が H4K20me3 の主要なメチル化酵素であると考えられている (Schotta et al., 2008)。SUV420H2 ノックアウトマウスは正常に生育することが知られるが、細胞レベルでは SUV420H2 の欠失はヘテロクロマチンの脱凝縮、クロモセーター (マウスやハエの細胞核に存在する DNA 染色で濃染されるヘテロクロマチンの凝集体で、斑点状の構造のもの) の形態の細分化、染色体分配の異常の増加を引き起こす。このことから、SUV420H2 はヘテロクロマチン形成に関与すると考えられている (Hahn et al., 2013)。発生過程においてノックアウトの影響が小さいのは、Suv4-20h2 の発現量の低さに加え高度に類似した SET ドメインを持つ SUV420H1 による補償効果を受けるためであると考えられている (Schotta et al., 2008)。実際に、精製した SUV420H1 および SUV420H2 の SET ドメインはどちらも *in vitro* においてヌクレオソームに H4K20me2、H4K20me3 を導入する (Schotta et al., 2004)。Suv4-20h2 の欠失がマウスの発生にほとんど影響しない一方で、着床前マウス胚への SUV420H2 の異所的な発現は胚発生を停止させる。これは、S 期への進行が妨げられるためであるとされる (Eid et al., 2016)。またセントロメア領域への人為的なテザリングは、Aurora B の局在化と機能の制御を阻害し、染色体分配の異常を増加させる (Herlihy et al., 2021)。以上のことから、SUV420H2 の適切な局在はゲノムの機能制御に重要であると考えられる。

1-7. SUV420H2 のヘテロクロマチン局在メカニズム

SUV420H2 および H4K20me3 のヘテロクロマチン局在化のメカニズムは主にハエとマウスの培養細胞を使って検証されてきた (Schotta et al., 2004; Hahn et al., 2013)。SUV420H2 はヘテロクロマチン標的モジュール (Heterochromatic targeting module; HTM) と呼ばれる領域を C 末端側に持ち、この領域を介して HP1 と相互作用することが報告されている (Schotta et al., 2004; Hahn et al., 2013)。HTM を欠失した Suv4-20h2 欠損変異体は、クロモセーターに集積しない (Hahn et al., 2013)。しかしながら、SUV420H2 と HP1 の結合様式については詳しく調べられていない。特に、GFP-HTM と GFP-HP1 の動態を蛍光

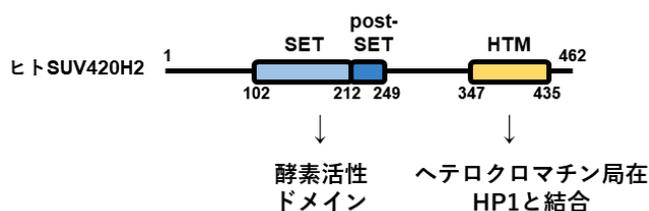


図3 SUV420H2 の構造の模式図

退色回復法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching; FRAP) によって調べた報告では、SUV420H2 HTM が HP1 よりも安定的にクロモセーターに結合していることが示されている (Souza et al., 2009; Hahn et al., 2013)。このような異なる動態は HTM 内部に複数の HP1 結合モジュールが存在することに起因する (Souza et al., 2009)。HTM を二分割した場合、それぞれの断片は HP1 と結合し、クロモセーターへと集積する (Hahn et al., 2013)。しかしながら、SUV420H2 HTM が HP1 とどのように相互作用するかはよくわかっていなかった。

1-8. 研究目的

本研究では、SUV420H2 と HP1 の結合様式を調べることで、SUV420H2 の安定的なヘテロクロマチン局在化のメカニズムを明らかにし、さらに HP1 のヘテロクロマチン結合安定性への SUV420H2 の寄与を明らかにすることを目的とした。

第2章 材料と実験

2-1. 細胞培養

細胞は HeLa, A9, NIH3T3 を扱った。これらの細胞は、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), high-glucose (Nacalai Tesque) に 10%ウシ胎児血清(FBS) (Gibco、Thermo Fisher Scientific) および 1% L-グルタミン-ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (GPS ; Sigma-Aldrich) を加えたものを培地とし、37°C、5% CO₂ 雰囲気下で培養した。

2-2. 発現ベクタープラスミドの構築

本研究では以下の発現ベクターを用いて、各種遺伝子を細胞内に発現させた。

既報の発現ベクタープラスミド

- ・ HaloTag 融合型 KDM4D 発現ベクター (FHC06842 ; Promega)
- ・ PB533 ベースの H2B-Halo 発現用ベクター (Uchino et al., 2021)
- ・ PB533 ベースの mCherry-PCNA 発現用ベクター (Uchino et al., 2021)

本研究で構築した発現ベクタープラスミド

- ・ sfGFP 融合型 HTM 各種変異体の一過性発現用ベクター
- ・ sfGFP 融合型 HTM 各種変異体の安定発現用ベクター
- ・ 蛍光タンパク質融合型 HP1 α の一過性発現用ベクター
- ・ CRSIPR/Cas9 System 用発現ベクター

これらの発現ベクターは以下のプラスミドを元に構築した。

プラスミド構築に使用した発現ベクター骨格

一過性発現用ベクター骨格

- ・ psfGFP-N1 (Addgene 54737)
- ・ psfGFP-C1 (Addgene 54579)
- ・ psfCherry-C1 (psfGFP-C1 と psfCherry-N2 (Kono et al., 2022) から構築した)

安定発現細胞作製用ベクター骨格

- ・ PB-EF1-MCS-IRES-Neo cDNA Cloning and Expression Vector (SBI, PB533A-2)

CRISPR/Cas9 用発現ベクター骨格

- ・ pX330 と pKN7 (Addgene 42230, Addgene DU70250)
- ・ pX459 (Addgene 62988)

鋳型 DNA として PCR 反応に用いたプラスミド

- ・ HaloTag 融合型 SUV420H2 発現ベクター (FHC26822 ; Promega)
- ・ GFP-HP1 α 発現ベクター (Nozawa et al., 2010)

PCR 反応に用いたプライマー

25 ページに一覧表 (表 1) にしてまとめた。

2-2-1. SUV420H2 HTM 欠損変異体の一過性発現ベクターの構築

SUV420H2 の各種欠損変異体をコードする DNA 領域を、Halo-SUV420H2 の発現ベクタープラスミドを鋳型として PCR で増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動に供して分離し、目的サイズのコンドを切り出して QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精製した。精製した PCR 産物は制限酵素 EcoRI と BamHI で切断した psfGFP-N1 ベクタープラスミドに In-Fusion HT Cloning Kit (TaKaRa) を用いて連結した。以下に具体的な PCR に用いたプライマーの設計方法と PCR 反応条件、InFusion 反応条件を記す。

PCR プライマー設計

Fw: 5'-CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGTCCACCCACCACGCTGCC-3'

psfGFP-N1 vector kozak 開始コドン PCR プライマー

Rv: 5'-TGGTGGCGACCGGTGGATCCTTGAAGGCGAGGGCCTGCTTCGGGATCAGG-3'

psfGFP-N1 vector (フレーム調整) PCR プライマー

各種プライマーの配列は表 1 にまとめた。

PCR 反応組成

template plasmid (100 ng/μL)	0.4 μL
5 x Prime Star Buffer	4.0 μL
dNTP mix (2.5 mM each)	1.6 μL
forward primer (10 μM)	0.4 μL
reverse primer (10 μM)	0.4 μL
MQ water	13 μL
Primer Star polymerase	0.2 μL
	<hr/>
	20 μL

PCR 反応条件

最初の変性(ホットスタート)	94.0 °C	2 min	
変性	98.0 °C	10 sec	x 35 cycles
アニーリング	72.0 °C	15 sec	
伸長反応	72.0 °C	30 sec	
最後の伸長反応	72.0 °C	4 min	
	10.0 °C		

In-Fusion 反応液組成

Insert fragment	1.0 μL
Vector	0.5 μL
MQ	2.5 μL
5×In-Fusion HD Enzyme Premix	1.0 μL
	<hr/>
	5.0 μL

In-Fusion 反応条件

50°Cに設定した Heat Block 上で 15 分間インキュベーションした。

In-Fusion 反応後、5 μL の反応液全量を使って 50 μL の大腸菌コンピテントセル (DH5 α , in house) にヒートショック (42°C、60 秒間) で形質転換した。その後、Plusgrow II (nacalai tesque) を 170 μL 加え、30 分間の回復培養後、カナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌した。37°C で一晩培養し、翌日に寒天培地上に生えたコロニーを得た。シングルコロニーを爪楊枝でつつき、カナマイシンを含む Plusgrow II 2 mL が入った Falcon[®] round tube (Corning) に移して、37°C で一晩震盪培養した。大腸菌培養液を回収し、Mini Plus[™] Plasmid DNA Extraction System (VIOGENE) を用いて plasmid DNA を精製した。精製したプラスミドはサンガーシーケンシングにより塩基配列を確認した。すべてのプラスミド DNA の増幅と精製はこれと同様に行った。以降は簡単に miniprep と呼ぶ。

2-2-2. 点変異導入

各種 HTM 欠損変異体の一過性発現ベクターを鋳型 DNA とし、変異の入ったプライマーを用いて inverse PCR を行うことで、点変異導入を行った。以下に PCR に用いたプライマーの設計方法と PCR 反応条件を記す。

プライマー設計

プライマーは、デザインした点変異に対応するコドンとその前後 30 塩基分の相同な塩基配列を持つように設計した。



各種プライマーの配列は表 1 にまとめた。

PCR 反応液組成

template plasmid (10 ng/ μ L)	0.7 μ L
5 x Prime Star Buffer	5 μ L
dNTP mix (2 mM each)	2.5 μ L
forward primer (10 μ M)	1.25 μ L
reverse primer (10 μ M)	1.25 μ L
MQ water	14.05 μ L
Primer Star polymerase	0.25 μ L
	<hr/>
	25 μ L

PCR 反応条件

最初の変性(ホットスタート)	98.0 $^{\circ}$ C	30 sec	} x 18 cycles
変性	98.0 $^{\circ}$ C	10 sec	
アニーリング	55.0 $^{\circ}$ C	15 sec	
伸長反応	68.0 $^{\circ}$ C	5.5 min	
最後の伸長反応	68.0 $^{\circ}$ C	7 min	
	10.0 $^{\circ}$ C		

PCR 反応後、反応液中に制限酵素 DpnI 0.5 μ L を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートし、鋳型 DNA を消化した。DpnI はアデニンがメチル化された GATC を選択的に切断するため、PCR 産物を残しながら大腸菌由来の鋳型 DNA を消化することができる。DpnI 処理後、5 μ L の反応液を 50 μ L の大腸菌コンピテントセル(DH5 α , in house)に加え、ヒートショックにより形質転換した。以降は前述の miniprep と同様の操作を行った。

2-2-3. 安定発現細胞作製用発現ベクター

各種 HTM 欠損変異体の安定発現細胞作製用発現ベクターは、一過性発現用ベクターから HTM 変異体-sfGFP をコードする DNA 領域を安定発現用ベクタープラスミド骨格 (PB533A-2) に移し替えて構築した。具体的には一過性発現用ベクタープラスミドを制限酵素 EcoRI、NotI で切断し、アガロースゲル電気泳動に供し、HTM 変異体-sfGFP をコードする DNA 断片を精製した。PB533A-2 も同様に EcoRI と NotI で切断、BAP による脱リン酸化反応を行った後、アガロースゲル電気泳動に供した。直線化された PB533A-2 を精製し、先に精製した HTM 変異体-sfGFP をコードする DNA 断片と Ligation 反応により連結させた。コンピテントセル(DH5 α)に形質転換後、前述の方法で miniprep を行った。ただし、2 mL のカナマイシンの代わりにアンピシリンを含有した LB プレートおよび液体培地を用いた。Ligation 反応は以下の条件で行った。

Ligation 反応液組成

PCR 産物	1.0 μ L
ベクタープラスミド骨格	0.5 μ L
MQ 水	1.0 μ L
<u>2 x ligation mix</u>	<u>2.5 μL</u>
	5.0 μ L

Ligation 反応条件

30 分間、16 °C でインキュベート

2-2-4. psfCherry-C1 発現ベクタープラスミド骨格の作製

sfCherry をコードする DNA 領域を psfCherry-N2 (Kono et al., 2022) を鋳型に PCR で増幅した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動に供して分離後、目的サイズのコリドを切り出して精製した。精製した PCR 産物は、BsrGI と AgeI で切断した psfGFP-C1 ベクタープラスミドと In-Fusion HT Cloning Kit を用いて連結した。PCR 反応は以下の条件で行った。In-Fusion 反応は (2-2-1) と同様の条件で行った。

PCR 反応組成

5 x Prime Star Buffer	4 μ L
dNTP mix (2.5 mM each)	1.6 μ L
template plasmid (100 ng/ μ L)	0.4 μ L
forward primer (10 μ M)	0.8 μ L
reverse primer (10 μ M)	0.8 μ L
MQ water	12.2 μ L
Primer Star polymerase	0.2 μ L
	<hr/>
	20 μ L

PCR 反応条件

最初の変性(ホットスタート)	94.0 $^{\circ}$ C	2 min	} x 35 cycles
変性	98.0 $^{\circ}$ C	10 sec	
アニーリング	55.0 $^{\circ}$ C	15 sec	
伸長反応	72.0 $^{\circ}$ C	60 sec	
最後の伸長反応	72.0 $^{\circ}$ C	4 min	
	10.0 $^{\circ}$ C		

2-2-5. pHP1 α -sfGFP、psfGFP-HP1 α 、psfCherry-HP1 α の作製

pHP1 α -GFP を鋳型として HP1 α をコードする DNA 領域を PCR により増幅した。PCR 産物はゲル精製後、適切な制限酵素で切断した psfGFP-N1、psfGFP-C1、psfCherry-C1 に In Fusion 反応で連結した。In-Fusion 反応は (2-2-1) と同様の条件で行った。ベクタープラスミドの切断に用いた制限酵素と PCR 反応液組成、PCR 反応条件を以下に記す。

使用した制限酵素

pHP1 α -sfGFP	psfGFP-N1 → EcoRI, BamHI
psfGFP-HP1 α	psfGFP-C1 → EcoRI
psfCherry-HP1 α	psfCherry-C1 → EcoRI

PCR 反応液組成

5 x Prime Star Buffer	4 μ L
dNTP mix (2 mM each)	1.6 μ L
template plasmid (10 ng/ μ L)	2 μ L
forward primer (10 μ M)	0.8 μ L
reverse primer (10 μ M)	0.8 μ L
MQ water	10.6 μ L
Primer Star polymerase	0.2 μ L
	<hr/>
	20 μ L

PCR 反応条件

最初の変性(ホットスタート)	94.0 $^{\circ}$ C	2 min	} x 35 cycles
変性	98.0 $^{\circ}$ C	10 sec	
アニーリング	72.0 $^{\circ}$ C	15 sec	
伸長反応	72.0 $^{\circ}$ C	30 sec	
最後の伸長反応	72.0 $^{\circ}$ C	4 min	
	10.0 $^{\circ}$ C		

2-2-6. CRISPR/Cas9 用プラスミドの作製

CRISPR/Cas9 用のプラスミドの構築には、pX330 と pKN7 (Addgene 42230, Addgene DU70250)、pX459 (Addgene 62988) の 3 種類を使用した。Feng Zhang 研究室が公開している「Target Sequence Cloning Protocol」に従った。使用したプライマーの配列は補足資料にまとめた。

SUV420H1、SUV420H2 の第一エクソンを標的とするプラスミドは、それぞれ pX330 と pKN7 を元に構築した。pX330 は Cas9 と 1 つの sgRNA をコードし、pKN7 は 1 つの sgRNA とピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミドで、コトランスフェクションにより 2 種類の sgRNA、Cas9、ピューロマイシン耐性遺伝子を発現させることができる。pX330 には SUV420H1 の第一エクソンを標的する配列、pKN7 には SUV420H2 の第一エクソンを標的する配列を組み込んだ。触媒活性ドメイン内のエクソン (SUV420H1: exon8、SUV420H2: exon4) を標的とするプラスミドは pX459 を元に構築した。pX459 は Cas9、sgRNA、ピューロマイシン耐性遺伝子 3 つをコードする発現ベクタープラスミドである。sgRNA の標的配列は、「CRISPR Finder」(Wellcome Sanger Institute Genome Editing) を使用して設計した。

2-3. 安定発現細胞の作製

細胞を 35-mm ガラスボトムディッシュ (AGC Technology Solutions) に、40–70% コンフルエントで播種して一晩培養した。翌日、1.8 μg の PB533 または PB510 ベースの PiggyBac プラスミド (System Biosciences) と 0.2 μg のトランスポザーゼ発現ベクター (System Biosciences) を混合してトランスフェクションした。トランスフェクションから二日後、1 mg/mL G418 (Nacalai Tesque) を含む選択培地に交換し、そこから一週間、薬剤選択を続けた。異なる変異体間の比較を行うために同程度の発現量の細胞を選択する必要がある場合は、セルソーター (SH800 ; Sony) を使用して、輝度が同程度の細胞を分取した。

培養液量 2 mL の細胞に対するトランスフェクションは以下のように行った。2 μg の DNA を 100 μL の Opti-MEM に加えて vortex 後、6 μL の FuGENE HD (Promega) を加えて素早くタッピングで混合し、スピンドウン後、室温で 10 分間インキュベートした。その後、この溶液を均一に細胞に添加し、37°C で培養した。

表1. 使用したプライマー一覧	
name	sequence (5' → 3')
SUV420H2 HTM欠損変異体発現ベクターの構築	
pSUV420H2[347-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGTCCACCCACCACGCTGCC
pSUV420H2[352-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGCCCGGCTCTCCCTGC
pSUV420H2[356-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGTCTGCACCGATGGGGAGGC
pSUV420H2[381-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGCACGCCCGCTGGGCCCTC
pSUV420H2[389-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGACTGGCACTGGGCCCGG
pSUV420H2[391-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGCACTGGGCCCGGCGTATG
pSUV420H2[397-]_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGGGCTGCCTTACGTGGTG
pSUV420H2[435]_sfGFP_InF_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTGAAGGCGAGGGCCTGCTTCGGGATCAGG
pSUV420H2[438]_sfGFP_InF_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTGGGGGGCTGGCCAGGGC
pSUV420H2[474]_sfGFP_InF_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTGGCCAGGGCCACCAGG
pSUV420H2[463]_sfGFP_InF_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTGGCCAGCCCTCCCATCG
pSUV420H2[410]_sfGFP_InF_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTGGCCAGGGCGACGAAGTCCACACGC
pSUV420H2[404]_sfGFP_InF_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTCCACGCACCACGTAAGGCAGCCC
点変異体、リンカー挿入変異体発現ベクターの構築	
V354D_s	GAATTCACCATGCGCGACTCCCTGCACCGATGG
V354D_as	CCATCGGTGCAGGGAGTCGCGCATGGTGAATTC
pSUV420H2[352-]_V354D_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGCCCGCGACTCCCTGC
pSUV420H2[352-]_H357A_sfGFP_InF_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGCCCGGCTCTCCCTGG
V354D-HBM-FL_s	CAACCAACGCTGCCCGGCACTCCCTGCACCGATGG
V354D-HBM-FL_as	CCATCGGTGCAGGGAGTCGCGGGGCGACGGTGGTG
V374D_s	CGAGGAGAGGCCCTGGACGCCCTGGGCCAGCCC
V374D_as	GGGCTGGCCAGGGCGTCCAGGGCCTCTCCTCG
H357A_s	ATGCGGCTCTCCCTGGCCCGATGGGGAGGCTGT
H357A_as	ACAGCCTCCCATCGGGCCAGGGAGACGCGCAT
C362V_s	CACCGATGGGGAGGGCTGGGCCCCCACTGCCGC
C362V_as	GCGGCAGTGGGGGCCACGCTCCCATCGGGTG
C366V_s	GGCTGTGGCCCCCACGTGGCCTCGCAGGAGAG
C366V_as	CTCTCCTCGCAGGCGCACGTGGGGGCCACAGCC
V402D_s	GGGCTGCCTTACGTGGACCGTGTGGACCTTCGT
V402D_as	ACGAAGTCCACACGGTCCACGTAAGGCAGCCC
V404D_s	CCTTACGTGGTGGGTGACGACCTTCGTCCGCTG
V404D_as	CAGGCGACGAAGTCTGTACGCAACCACGTAAGG
V402DV404D_s	GGGCTGCCTTACGTGGACCGTGAACGCTTCGTCCGCTG
V402DV404D_as	CAGGCGACGAAGTCTGTACGCTCCACGTAAGGCAGCCC
LINK.AMP5T	GTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCCAGGCGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG
LINK.AMP3T	CGATCCGCCACCAGGCGCAGCCACTCCGCTTGAACCGCCTCCACCTGAGGAGAC
SUV420H1 SUV420H2ダブルノックアウト用プラスミドの構築	
hSUV420H2 gRNA_2_s	CACCG TTCTCGTGTCTCACTCTGT
hSUV420H2 gRNA_2_as	AAAC ACAGAGTGACAGCACGAGAA
hSUV420H1 gRNA_2_s	CACCG AATCAAATTTACAGCACAGC
hSUV420H1 gRNA_2_as	AAAC CGTGTGCTGTAATTTTGATT
H-KMT5B-crispr_s	CACCG TCGAGATACAGCATGTGTGA
H-KMT5B-crispr_as	AAAC TCACACATGCTGTATCTCGAC
hSUV420H2-SET gRNA_1_s	CACCG TCATGTACTCAACCCGCAAG
hSUV420H2-SET gRNA_1_as	AAAC CTTGCGGGTTGAGTACATGAC
SUV420H1, SUV420H2 mRNAの逆転写PCR	
hSUV420H1-UTR-54_s	GGAGAGAACATTGAAAGTATTCTC
hSUV420H1-exon8-9junction_as	ACCAGTGCCCCGCTCTTTC
hSUV420H2-UTR-31_s	CCTCACCTGCTCCTGCTCTC
hSUV420H2-exon4+11_s	GAGAAGCTGGAGCTGCTGG
hSUV420H2-exon6+18_as	TTCACGCAGGCTGCGTTC
傾向タンパク質融合HP1発現ベクターの構築	
InF_psfCherry-C1_s	GATCCGCTAGCGCTAACGGTCGCCACCATGGTG
InF_psfCherry-C1_as	AGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATGC
psfFP-N1_HP1α_s	CGAGCTCAAGCTTCGAATTCACCATGGGAAAGAAAACAAGC
psfFP-N1_HP1α_as	TGGTGGCGACCCGGTGGATCCTTGCCTTTTGTGTTTCTTTTC
psfFP-C1_HP1α_s	CTCAAGCTTCGAATTCGAATGGGAAAGAAAACAAGC
psfFP-C1_HP1α_as	GTCGACTGCAGAATTTTAGCTCTTGTGTTTCTTTTC

2-4. 生細胞顕微鏡観察

細胞を $0.6-1.2 \times 10^5$ cells/well の細胞密度で 24 ウェルガラスボトムプレート (AGC Technology Solutions) に播種した。翌日、細胞接着していることを確認し、各種発現ベクタープラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションの1日後、培地を FBS および 1% GPS を加えた FluoroBrite (Thermo Fisher Scientific) に交換した。プレートを 37° C、5% CO₂ に維持された加熱ステージ (Tokai Hit) 上に設置し、共焦点顕微鏡で観察した。使用した顕微鏡と周辺機器は表 2 を参照。

2-4-1. 細胞内における各種 HTM 変異体の局在観察 (図 6-9, 12-14, 17, 18)

A9 細胞に sfGFP タグ付き SUV420H2 変異体を発現させ、FV-1000 で観察した。

画像取得の設定

レーザーライン 488-nm : 2.0%

ラインシーケンシャルイメージングモード 解像度 : 1024 × 1024 ピクセル

ピンホール 200 μm、3 倍ズーム、ラインカルマンフィルタリング : 2

画像解析には NIS-elements Analysis ソフトウェア ver. 5.1 (Nikon) を使用した。背景をサブトラクション後、クロモセーターおよび核全体を Magic Wand ツールで選択し、その領域の蛍光強度を測定した。クロモセーターの平均輝度を核全体の平均輝度で除算した値をヘテロクロマチン濃縮率とした。

2-4-2. KDM4D-Halo を共発現した HTM-sfGFP の細胞内局在の観察 (図 5)

HTM-sfGFP を安定発現する A9 細胞に Halo-KDM4D を発現させ、終濃度 100 nM の HaloTag TMR Ligand (Promega) で 30 分間染色した後、FV-1000 で観察した。

画像取得の設定

レーザーライン 405-nm : 0.2% 488-nm : 2.0% 633-nm : 44%

ラインシーケンシャルイメージングモード 解像度 : 640 × 640 ピクセル

ピンホール 200 μm、3 倍ズーム、ラインカルマンフィルタリング : 2

2-4-3. HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α-sfGFP、sfGFP-HP1 α の生細胞内局在の比較 (図 31-33)

HeLa 細胞と A9 細胞に、H2B-Halo と HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α-sfGFP、または sfGFP-HP1 α の発現ベクタープラスミドをコトランスフェクションした。トランスフェクションから 3 日後、1 μg/mL Hoechst または 100 nM HaloTag TMR Ligand (Promega) を含む培地で 30 分間染色した後、A1R で観察した。

画像取得の設定

レーザーライン (A9) 405-nm: 0.8%、488-nm: 0.2%

(HeLa) 488-nm: 0.1%、561-nm: 0.1%

ラインシーケンシャルイメージングモード 1024 × 1024 ピクセル

ピンホール 39.59 μm HeLa: 2 倍ズーム、A9: 3 倍ズーム

ラインカルマンフィルタリング: 2

2-4-4. HTM-sfGFP または HTM V374D-sfGFP と共発現した際の M 期細胞内での sfCherry-HP1 α 局在観察 (図 34)

HeLa 細胞に sfCherry-HP1 α と HTM-sfGFP または HTM V374D-sfGFP の発現ベクタープラスミドをコトランスフェクションした。トランスフェクションから 2 日後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst を含む培地で 30 分間染色後、A1R で観察した。

画像取得の設定

レーザーライン 405-nm: 1.0%、488-nm: 0.2%、561-nm: 0.5%

ラインシーケンシャルイメージングモード 解像度: 512 × 512 ピクセル

ピンホール 39.59 μm 、6 倍ズーム、ラインカルマンフィルタリング: 2

2-4-5. 複製中のクロモセーターでの HP1 動態の観察 (図 35)

sfGFP-HTM-C、mCherry-PCNA、H2B-Halo を安定的に共発現した A9 細胞を、35mm のガラスボトムディッシュ (AGC テクノロジーソリューションズ) に播種した。翌日、Janelia Fluor 646[®] HaloTag Ligand[®] を培地に終濃度 100 nM で 30 分間染色後、Nikon-CSU で撮影した。

画像取得の設定

LDI-7 Laser Diode Illuminator (Chroma Technologies Japan)

470-nm: 10%, 555-nm: 20%, 640-nm: 50%

EM-CCD カメラ (iXon+, Andor)

露光時間 470-nm: 1s, 555-nm: 1s, 640-nm: 500 ms

5 分おきに z 軸方向 0.5 μm 間隔で 9 枚撮影した

2-4-6. 光褪色後蛍光回復法 (FRAP) による HP1 locking のアッセイ (図 24、図 25)

24 ウェルガラスボトムプレートに播種した A9 細胞に、HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP、または HTM V374D-sfGFP の一過性発現プラスミドと sfCherry-HP1 α 発現プラスミドをコトランスフェクションし、翌日に FV-1000 で観察を行った。sfGFP 融合タンパク質および sfCherry-HP1 α を共発現する細胞を探し、sfGFP と sfCherry チャンネルを撮影後、同じ細胞について sfCherry-HP1 α の FRAP 解析を行った。FRAP 解析では、クロモセンターに集積する sfGFP 融合タンパク質を解析の対象とし、20 枚の画像を撮影したのち、直径 1.38 μ m の円形の領域内を光褪色させ、その後、追加で 80 枚の画像を連続で撮影した。光褪色には、458-、488-、515-、543-nm のレーザーラインを 100% のトランスミッションで使用し 364.32 ミリ秒間照射した。連続撮影中のインターバルは 0.117 秒であった。蛍光強度の測定は、NIS Elements ver. 5.30.02 を使用して行った。各タイムフレームで、核外のバックグラウンドの輝度を差し引いた後、ブリーチの対象とした領域内の輝度値を測定した。撮影による全体的な蛍光の褪色を補正するため、各タイムフレームにおいてブリーチされた領域の輝度をブリーチされていない領域の輝度で除算した。最後にブリーチ前の平均強度で、ブリーチ後の輝度を除算し、相対的な強度 (蛍光回復) を計算した。平均値をプロットし、標準誤差 (s.e.m.) をエラーバーで表した。

画像取得の設定

撮影範囲：128 \times 32 ピクセル；ピンホール 800 μ m；12 倍ズーム

撮影用レーザー 543-nm を 10% トランスミッションで使用

光褪色用レーザー 458nm、488nm、515nm、543-nm レーザーラインを 100% で使用；
持続時間 364.32 ミリ秒；直径 1.38 μ m の円形の ROI 内を光褪色

撮影条件 20 枚撮影後、光褪色、その後 80 枚分の連続撮影を 0.117 秒間隔で行った。

2-5. 免疫染色

2-5-1. HTM-sfGFP と H3K9me3 の共局在の確認 (図 4)

24 ウェルガラスボトムプレートに播いた HeLa、NIH3T3、および A9 細胞に HTM-sfGFP の発現プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションの 1 日後、細胞を室温で 5 分間、固定液 (250 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、4% パラホルムアルデヒド (PFA; Electron Microscopy Sciences)) で固定し、Dulbecco リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; Fujifilm Wako Chemicals) で洗浄後、膜透過液 (1% Triton X-100 (Nacalai Tesque)、PBS) を加えて 20 分間、室温で震盪した。膜透過液を取り除き、ブロッキング液 (Blocking-One P (Nacalai Tesque)) を加えて、室温で 20 分間震盪した。ブロッキング液を除去後、Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および Cy3 で直接標識された抗 H3K9me3 モノクローナル抗体 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chandra et al., 2012) を含む抗体反応液 (10% Blocking-One-P、PBS) を加えて染色した。PBS で 3 回洗浄した。顕微鏡観察は Nikon-CSU を用いた。抗体反応の条件は表 3 を参照。

画像取得の設定

レーザーライン (LU-N4; Nikon)

405-nm : 100%、488-nm : 100%、561-nm : 100%

EM-CCD カメラ (iXon+; Andor)

405-nm : 200ms、488-nm : 200ms、561-nm : 200ms

2-5-2. HeLa および SUV420H1/2 DKO 細胞の比較 (ヒストン修飾の免疫染色、図 26)

HeLa および SUV420H1/2 DKO 細胞を 24 ウェルガラスボトムプレートに播種した。翌日、細胞に固定液 (250 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、4% PFA、0.1% TritonX-100) を加え、室温で 5 分間静置し、その後、膜透過処理、ブロッキングを前述と同様の方法で行った。Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および蛍光色素で直接標識された抗 H4K20me3 抗体 (Cy3)、抗 H4K20me2 抗体 (Alexa488)、抗 H4K20me1 抗体 (Cy5) (それぞれ 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む抗体反応液を加えて、室温で一晩反応させた (Hayashi-Takanaka et al., 2015 を参照)。PBS で 3 回洗浄し、顕微鏡観察を行った。顕微鏡観察には Apo TIRF 60 \times (NA 1.49) の油浸対物レンズを取り付けた共焦点顕微鏡 (A1R; Nikon) を使用し、ソフトウェア NIS Elements ver. 5.21.00, Nikon で操作した。抗体反応の条件は表 3 を参照。

画像取得の設定

レーザーライン

405-nm: 0.1%、488-nm: 0.1%、561-nm: 0.1%、640-nm: 0.1%

ラインシーケンシャルイメージングモード 解像度：1024 × 1024 ピクセル

ピンホール 255.43 μm 、2 倍ズーム、ラインカルマンフィルタリング：2

定量解析

個々の核を NIS Elements ver. 5.30.02 の Magic Wand ツールで定義し、次に細胞外のバックグラウンドの輝度を差し引いた後、各細胞核内の H4K20me1、H4K20me2、H4K20me3 の平均輝度値を測定した。

2-5-3. 免疫染色による HP1 locking のアッセイ

安定発現細胞を使用した場合 (図 19、21、23)

HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP、HTM V374D-sfGFP の安定発現 HeLa 細胞と野生型の HeLa 細胞を 1:1 の割合で混合し、合計 $4-5 \times 10^5$ 個の細胞を 35-mm ガラスボトムディッシュに播種した。その後、下に記す以降の操作を行った。

一過性発現の場合(図 28)

$2-2.5 \times 10^5$ 個の野生型 HeLa 細胞または SUV420H1、SUV420H2 のダブルノックアウト細胞を 35-mm ガラスボトムディッシュに播種した。翌日、HTM-sfGFP 一過性発現ベクタープラスミドをトランスフェクションした。その後、下に記す以降の操作を行った。

細胞の播種またはトランスフェクションの 1 日後に、細胞を固定、透過、ブロッキングを上記の方法と同様に行った。固定液の組成は (250 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、4% PFA)。その後、一次抗体 (抗 HP1 β 抗体、抗 H3K9me3 抗体) および二次抗体 (抗ラビット抗体、抗マウス抗体) で染色した。抗体反応の条件は表 3 を参照。顕微鏡観察は A1R で行った。

画像取得の設定

レーザーライン

405-nm: 0.3-0.6%、488-nm: 0.3-0.4%、561-nm: 0.1%-4%、640-nm: 0.3-0.8%

ラインシーケンシャルイメージングモード 撮影範囲：1024 × 1024 ピクセル

ピンホール 26.82 μm 、2 倍ズーム、ラインカルマンフィルタリング：2

画像解析では、個々の核を Magic Wand ツールを使用して定義し、単一の核を含む最小の長方形領域を別々の nd2 ファイルとして保存した (UI 上の左上のタブ"ROI"→"Create Documents from Selected ROI"→出力される個々の nd2 ファイルをマクロ機能"SaveAll()"で 1 つのフォルダに保存)。個々の核の nd2 ファイルから各チャンネルの画像を TIF ファイルとしてエクスポートした (マクロ機能

の "_ND_BatchExport()" を使用)。各細胞核の 4 チャンネルすべてについて、各ピクセルの強度を R の「TIFF」パッケージ (<https://www.r-project.org/>) を使用して測定した。ヘキストのピクセル強度から、閾値以上の強度を持つピクセルを抽出し、これを細胞核のピクセルとした。細胞核のピクセルについて sfGFP の平均強度をもとめ、これが閾値以上である細胞核を sfGFP 融合タンパク質の安定発現細胞とした。次に、細胞核のピクセルの中から H3K9me3 チャンネルで最も高い強度を示す上位 10% のピクセルを抽出し、これをヘテロクロマチンのピクセルとした。細胞核およびヘテロクロマチンのピクセル上の HP1 β の平均強度をそれぞれ算出し、ヘテロクロマチン上の HP1 β 平均強度を細胞核のピクセルで除算して正規化した値を HP1 β 濃縮率とした。

HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ それぞれに対する HTM-N-sfGFP 発現の影響の比較(図 23) には、以下のように解析を行った。まず、個々の核を NIS Elements ver. 5.30.02 の Magic Wand ツールで定義した。次に、各細胞核の GFP のチャンネルの平均輝度値を測定し、閾値以上の細胞核を HTM-N-sfGFP 発現細胞とした。コントロール細胞の各細胞核の HP1 平均輝度値の算術平均を算出し、この値ですべての細胞核の HP1 平均輝度値を除算して標準化した。

表2. 使用した共焦点顕微鏡と周辺機器の一覧

顕微鏡名	顕微鏡	種類	対物レンズ	レーザーライン	マイクロイクミラー	エミッションフィルター	ソフトウェア
FV-1000	FV-1000	一点走査型	PlanSApo 60× (NA 1.40)	FV5-LDPSU(Olympus) 05-LPL-951-065(M elles Grät) SAN 7460 A.J(LASOS)	405/488/543/633	430-470, 505-525	Fluoview ver. 4.2, Olympus
A1R	A1R	一点走査型	Apo TIRF 60× (NA 1.49)	LU-N4 (Nikon)	405/488/551/640	450/50, 525/50, 595/50, 700/75	NIS Elements ver. 5.21.00, Nikon
Nikon-CSU	Ti-E Yokogawa CSU-W1	多点走査型	PlanApo VC 100× (NA 1.4)	・LDI-7 Laser Diode Illuminator (Chroma Technologies Japan) (図35)	405/488/551/640	447/60, 520/60, 600/50, 690/50	NIS Elements ver. 5.11.03, Nikon

表3. 使用した抗体と蛍光色素の一覧

	抗体	クロールン名	メーカー	品番	免疫染色	ウェスタンブロッティング
一次抗体	Rabbit monoclonal anti-HP1α	EPR5777	Abcam	ab109028	×250, 4°C, o/n (図23)	×10,000
	Rabbit monoclonal anti-HP1β	D2F2	CST signaling	8676S	×800, 4°C, o/n (図23)	×1,000
	Rabbit polyclonal anti-HP1β		MBL	BMP002	×500, RT, o/n	未使用
	Rabbit polyclonal anti-HP1γ		CST signaling	2619S	×100, 4°C, o/n (図23)	×1,000
	Rabbit polyclonal anti-GFP		MBL	No.598	未使用	×2,000
	Mouse anti-H3K9me3	CMA318	in-house (Chandra et al., 2012)		×1,000, RT, o/n	未使用
	Cy3-conjugated Mouse anti-H3K9me3	CMA318	in-house (Chandra et al., 2012)		×500, RT, o/n	未使用
	Alexa488-conjugated Mouse anti-H4K20me3	CMA423	in-house (Hayashi-Takanaka et al., 2015)		×500, RT, o/n	未使用
	Cy3-conjugated Mouse anti-H4K20me3	CMA423	in-house (Hayashi-Takanaka et al., 2015)		×1,000, RT, 2hr	未使用
	Alexa488-conjugated Mouse anti-H4K20me2	CMA422	in-house (Hayashi-Takanaka et al., 2015)		×1,000, RT, 2hr	未使用
Cy5-Mouse anti-H4K20me1	CMA421	in-house (Hayashi-Takanaka et al., 2015)		×1,000, RT, 2hr	未使用	
二次抗体	Donkey anti-mouse IgG		Jackson ImmunoResearch	715-005-150	2 μg/ml	未使用
	Donkey anti-rabbit IgG		Jackson ImmunoResearch	711-005-152	2 μg/ml	未使用
	HRP-conjugated goat anti-Rabbit IgG		Jackson ImmunoResearch	111-035-045	未使用	×10,000
蛍光色素	Alexa Fluoro 488		Thermo Fisher Scientific	A30052		
	Cy3		GE Healthcare	Q13108		
	Cy5		GE Healthcare	Q15108		
	Hoechst 33342		Thermo Fisher Scientific	C10329		
	HaloTag TMR Ligand		Promega	G8251		
	Janelia Fluor 646 HaloTag Ligand		Promega	GA1121		

2-6. 免疫沈降とウェスタンブロッティング (図 15、16)

各種 sfGFP 融合タンパク質の安定発現 HeLa 細胞を 4.4×10^6 cells/dish で 10 cm ディッシュ (Greiner) に播種した。翌日、培地を取り除き、10 mL の氷冷 PBS (Takara) で 3 回洗浄後、セルリフター (Corning) で細胞を回収し、1.5 mL Protein Lobind[®] tube (Eppendorf) に移した。遠心し上清を捨てて集めた細胞塊に氷冷した 500 μ L の細胞溶解バッファーを細胞に加えた。素早く 2-3 回ピペティング後、20 μ L を "Whole cell" としてウェスタンブロッティング用に分取した。残った細胞溶解液を遠心分離後 (20,000 \times g, 20 分, 4[°] C)、上清 (470 μ L) を回収した。ペレットに細胞溶解バッファーを 500 μ L 添加後、軽くソニケーションを行って再懸濁し、20 μ L を不溶性画分 "ppt" として分取した。上清には、DNA/RNA による相互作用を除去するために Benzonase (Novagen) 625 U を添加し、30 分間氷上でインキュベーションした。450 μ L を新しいチューブに分取し、そこに NaCl を含まない希釈バッファーを等量加えて塩濃度を 500 mM に低下させた。遠心分離 (20,000 \times g, 20 分, 4[°] C) 後、上清を回収し、20 μ L のアリコットをウェスタンブロッティング用に "IP input" として分取した。残りの上清 (約 880 μ L) は、IP バッファーで予め洗浄しておいた GFP-Trap 磁気ビーズ (各サンプルに 8 μ L のスラリー; Chromotek, gtma-20) と混合し、4[°] C で一晩、回転させながら反応させた。磁気スタンド (Thermo Fisher Scientific) を使用してビーズを収集した後、上清を新しいチューブに移し、"Unbound" サンプルとした。ビーズに氷冷した IP バッファーを加えて、10 分間、4[°] C で回転させた後、磁気スタンドを使用してビーズを収集し、上清を捨てた。この洗浄作業を 3 回繰り返した。洗浄後、上清を取り除き、ビーズを 20 μ L の IP バッファーに再懸濁し、"IP" サンプルとした (input と比較して $\times 44$ 濃縮)。"Whole cell" および "ppt" には、希釈率および塩濃度を "IP input" と等しくするために、等量の希釈バッファーを加えた。すべてのサンプルに等量の 2 \times Sample-Loading Buffer を加え、95[°] C で 10 分間加熱した。各サンプルを 5 μ L ずつ 15% ポリアクリルアミドゲル (SuperSep[™] Ace, 17 well pre-cast; Fujifilm Wako Chemicals) で分離し、FluoroTrans W PVDF トランスファーメンブレン (Pall; 90 分間; 170 mA constant for a 9 cm \times 9 cm membrane) へと転写した。トランスファーバッファーには EzFastBlot (Atto) を使用した。メンブレンを Blocking One (Nacalai Tesque) に浸して、30 分間優しく振とうした。TBST でメンブレンを洗浄後、Can-GetSignal[®] Solution 1 (Toyobo) に希釈した一次抗体 (ウサギモノクローナル抗 HP1 α 抗体 (1 : 10,000 ; Abcam ; ab109028)、ウサギモノクローナル抗 HP1 β 抗体 (1 : 1,000 ; Cell Signaling Technology ; D2F2, # 8676)、ウサギポリクローナル抗 HP1 γ 抗体 (1 : 1,000 ; Cell Signaling Technology ; # 2619)、およびウサギポリクローナル抗 GFP 抗体 (1 : 2,000 ; MBL ; No.598)) と 2 時間、室温で反応させた。メンブレンを TBST で 3 回洗浄後、Can-GetSignal[®] Solution 2 (Toyobo) に希釈した二次抗体 (ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識したヤギ抗マウス抗体または抗ウサギ抗体 (1 : 10,000 ; Jackson

ImmunoResearch)) と室温で 1 時間反応させた。反応後、メンブレンを TBST で 3 回洗淨した。ケミルミネセンス試薬には Western Lightning® Plus-ECL 試薬(PerkinElmer) を使用した。

・ 細胞溶解バッファー

[1 M NaCl、HEPES-NaOH (pH 7.4、Nacalai Tesque)、300 mM sucrose (Nacalai Tesque)、0.1% Triton X-100 (Nacalai Tesque)、1 mM MgCl₂ (Sigma Aldrich)、1 mM EGTA (Nacalai Tesque)]

・ 希釈バッファー

[HEPES-NaOH (pH 7.4)、300 mM Sucrose、0.1% Triton X-100、1 mM MgCl₂、1 mM EGTA]

・ IP バッファー

[500 mM NaCl、HEPES-NaOH (pH 7.4、Nacalai Tesque)、300 mM sucrose (Nacalai Tesque)、0.1% Triton X-100 (Nacalai Tesque)、1 mM MgCl₂ (Sigma Aldrich)、1 mM EGTA (Nacalai Tesque)]

・ 2× Sample-Loading バッファー

[125 mM Tris-HCl、pH 6.8、20% glycerol (Fujifilm Wako Chemicals)、4% sodium dodecyl sulfate (SDS; Fujifilm Wako Chemicals)、0.01% bromophenol blue (Fujifilm Wako Chemicals)、10% dithiothreitol (Fujifilm Wako Chemicals)]

・ TBST バッファー

[20 mM Tris-HCl、pH 8.0、150 mM NaCl、0.02% Tween 20]

2-7. SUV420H1/H2 ダブルノックアウト細胞の作製

SUV420H2 のノックアウトの検証に十分な特異性を持つ抗体の入手が不可能であったため、代替法としてヒストン修飾抗体を用いてスクリーニングを行うことができる SUV420H1/H2 ダブルノックアウト (DKO) 細胞の樹立を試みた。これらの細胞では、H4K20me3 および H4K20me2 がほとんど存在せず、H4K20me1 のレベルが高くなることが報告されている (Schotta et al., 2008)。SUV420H1 および SUV420H2 の DKO 細胞の樹立には、CRISPR/Cas9 システム (pX330、Addgene 42230 ; pKN7、Addgene DU70250 ; および pX459、Addgene 62988) を使用した。いくつかのスプライシングアイソフォームを考慮し、最初のエクソン(exon1)および SET ドメイン(SUV420H1: exon8、SUV420H2: exon4)内に標的配列を設定した。プラスミドの構築は 2-2 を参照。

DKO 細胞は 3 つのステップで作製した。第一に、SUV420H1 および SUV420H2 の exon1 を同時に標的とし、遺伝子のノックアウトを試みた(具体的な操作は下に示す)。pX330 には SUV420H1 の標的配列、pKN7 には SUV420H2 の標的配列を組み込んだプラスミドを使用し、これらをコトランスフェクションした。いくつかのクローンでヒストン修飾レベルの変化が見られたが、残存する H4K20me2 および H4K20me3 のシグナルが見られた。第二に SUV420H1 の SET ドメインを標的として同様の操作を行った。1 つのクローン(#20)では、免疫染色によるスクリーニングの後、H4K20me2 のシグナルは背景レベルにまで低減したが、H4K20me3 のシグナルは一部残っていた。第三に、SUV420H2 の SET ドメインを標的に同様の操作を行った。3 つのクローン (B6、C9、および D2) において、H4K20me2 および H4K20me3 の両方のシグナルがバックグラウンドレベルまで低いことを免疫染色により確認した。また、各クローンで発現している mRNA の配列を逆転写 PCR により増幅し、シーケンシングを行い、indel が含まれていることを確認した。

ノックアウト細胞樹立とのスクリーニングの実験操作

HeLa 細胞を 6 ウェルプレートに 2.4×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。翌日、KO のためのプラスミドを、Lipofectamin 2000 を使用して細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションの 1 日後と 3 日後に、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ プロマイシンを含む DMEM 培地に交換し、薬剤選択を行った。薬剤選択後、単一細胞をクローニングするために、ピューロマイシン耐性を持つ細胞を 10 cm ディッシュに 50-100 細胞/ウェルの密度で播種した。1 週間後、シングルコロニーをピックアップし、ストック用のプラスチックボトム 96 ウェルプレートと、スクリーニング用のガラスボトム 96 ウェルプレートに播種した。スクリーニング用のガラスボトムプレートを使って免疫染色を行った。蛍光色素で直接標識されたマウスモノクローナル抗体 H4K20me3 (Cy3)、H4K20me2 (Alexa488)、および H4K20me1 (Cy5) を使用し、H4K20me2、H4K20me3

が消失し H4K20me1 が増加している細胞をスクリーニングした。詳しい実験操作と抗体反応条件は (2-5-2.) および表 3 を参照。

mRNA 配列のシーケンシング解析

各クローン(野生型、#20、B6、C9、D2)をそれぞれ 6 ウェルプレートに約 1.0×10^6 細胞/ウェルの密度で播種し、翌日、TRIzol RNA isolation Reagents (Thermo Fisher Scientific)を用いて total RNA を精製した。精製した RNA を鋳型に、OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN)を用いて RT-PCR を行った。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動に供したのちに、QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)を用いて精製し、シーケンシング解析を行った。

2-8. 増殖曲線

野生型 HeLa 細胞、sfGFP 安定発現細胞、HTM-sfGFP 安定発現細胞、HTM-C 安定発現細胞を 6-well plate に 2.0×10^5 cells/mL の細胞密度でそれぞれ 3 ウェルずつ播種した。12 時間後、24 時間後、36 時間後、48 時間後、60 時間後、72 時間後に細胞をトリプシン処理によって剥がし、2 mL の DMEM 培地で懸濁後、各サンプルについて 3 ウェル分の細胞濃度をそれぞれ測定し、これらの平均値と標準偏差を算出しプロットを作製した。

2-9. 統計解析とデータの成形

統計解析には、Dunnett's、Tukey-Kramer、Student's t-test を行った。これらの解析にはソフトウェア R 内の lawstat パッケージ (Student's t-test) と multcomp パッケージ (Dunnett's と Tukey-Kramer tests)を用いた。ボックスプロット、ドットプロットは R を使って作成した。FRAP の折れ線グラフは excel で作成した。

2-10. アミノ酸配列のアライメント

アミノ酸配列のアライメント作製には長尾恒治 博士、西原秀則 博士にご協力いただいた。最終的なデータは web 上で利用可能な MAFFT version 7 の L-ins-i プロトコルを用いて作製した。使用した配列の accession number を以下に示す。

Homo sapiens, CCDS12922.1

Mus musculus, CCDS20743.2

Phascolarctos cinereus, XP_020859355.1

Ornithorhynchus anatinus, XP_028930021.1

Alligator mississippiensis, XP_014459640.1

Chrysemys picta, XP_023969116.1

Anolis carolinensis, XP_016851995.1

Gallus gallus, XP_040550951.1.

第3章 SUV420H2 と HP1 の結合様式と双方向の局在制御

3-1. 先行研究の再現性の確認

はじめに SUV420H2 HTM がヘテロクロマチンに集積するか再検証した。super folder GFP(sfGFP)を融合した HTM (HTM-sfGFP)の発現ベクターを作製し(図 4A)、HeLa 細胞、NIH3T3 細胞、A9 細胞にトランスフェクション後、抗 H3K9me3 抗体を用いて免疫染色を行い、HTM-sfGFP と H3K9me3 の局在を共焦点顕微鏡により観察した。その結果、どの細胞においても HTM-sfGFP が H3K9me3 と共局在することが確認された(図 4B)。

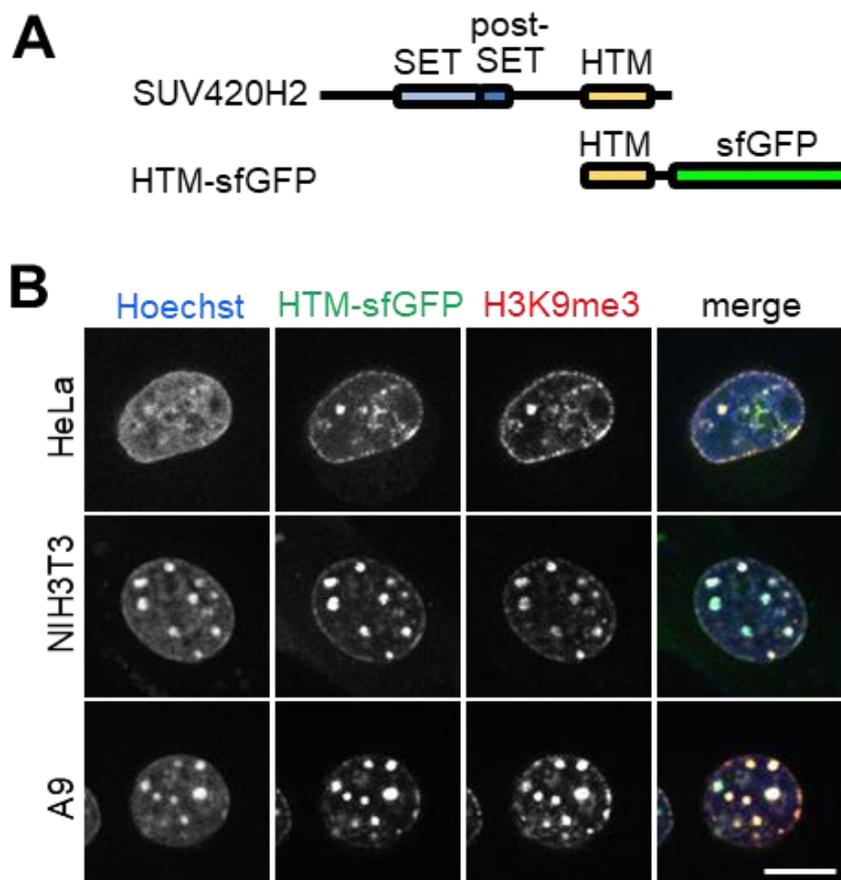


図 4 HTM-sfGFP の細胞内局在と Halo-KDM4D の過剰発現の影響

(A) SUV420H2 と HTM-sfGFP の構造 (B) HeLa、NIH3T3、A9 細胞に HTM-sfGFP を一過的に発現させ、抗 H3K9me3 抗体を用いて免疫染色した画像。スケールバー：10 μ m

また、H3K9me2/me3 の特異的なヒストン脱メチル化酵素 KDM4D の HaloTag 融合タンパク質を発現した A9 細胞内では、HTM-sfGFP はクロモセーターに集積せず、核質中に均一に分布した (図 5)。この結果は、HTM が H3K9me2/me3 に結合する HP1 を介してヘテロクロマチンに局在するという通説を支持した。

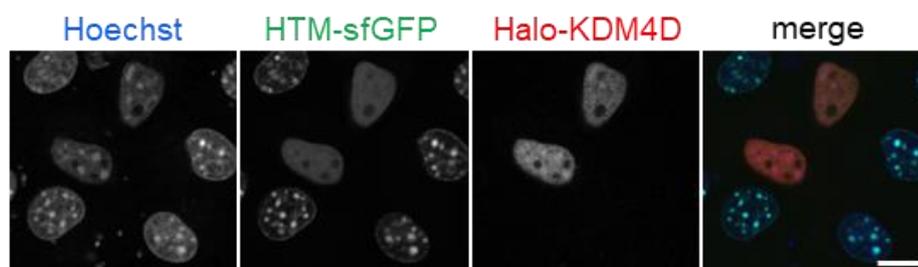


図 5 Halo-KDM4D を共発現した HTM-sfGFP の生細胞内局在パターン

Halo-KDM4D の発現は HTM-sfGFP をクロモセーターから非局在化させた。HTM-sfGFP 安定発現 A9 細胞に Halo-KDM4D を一過的に発現させ、HaloTag TMR Ligand で染色した。DNA は Hoechst33342 で染色した。スケールバー：10 μ m

3-2. ヘテロクロマチン局在に必要な最小領域の探索

先行研究から、HTM 内部にある二つの領域が HP1 と結合し、クロモセーターへと集積することが示されていたが (Hahn et al., 2013)、具体的な HP1 結合モチーフは決定されていなかった。HTM 内部のヘテロクロマチン局在に必要な最小限の領域を決定するため、sfGFP を融合した種々の欠損変異体の発現ベクターを作製し、A9 細胞に一過性に発現させ、その細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。先行研究の報告通り、HTM の N 末端側欠損変異体(aa 347-380)と C 末端側欠損変異体(aa 381-435)はどちらもクロモセーターへと集積したが (Hahn et al., 2013)、これらの集積パターンは HTM 全長と比べるとコントラストが低い傾向が見られた (図 6)。これを定量するために、クロモセーター上の平均輝度値を核内の平均輝度値で割った値を算出し、ヘテロクロマチン濃縮率 (Heterochromatin enrichment ratio) とした。個々の細胞核のヘテロクロマチン濃縮率のドットプロットおよびボックスプロットを図 6 に示す。aa 347-435(HTM 全長)、347-380、381-435 のヘテロクロマチン濃縮率の中央値はそれぞれ 3.22、2.67、1.87 となり、ヘテロクロマチンへの濃縮率が異なることを示した。

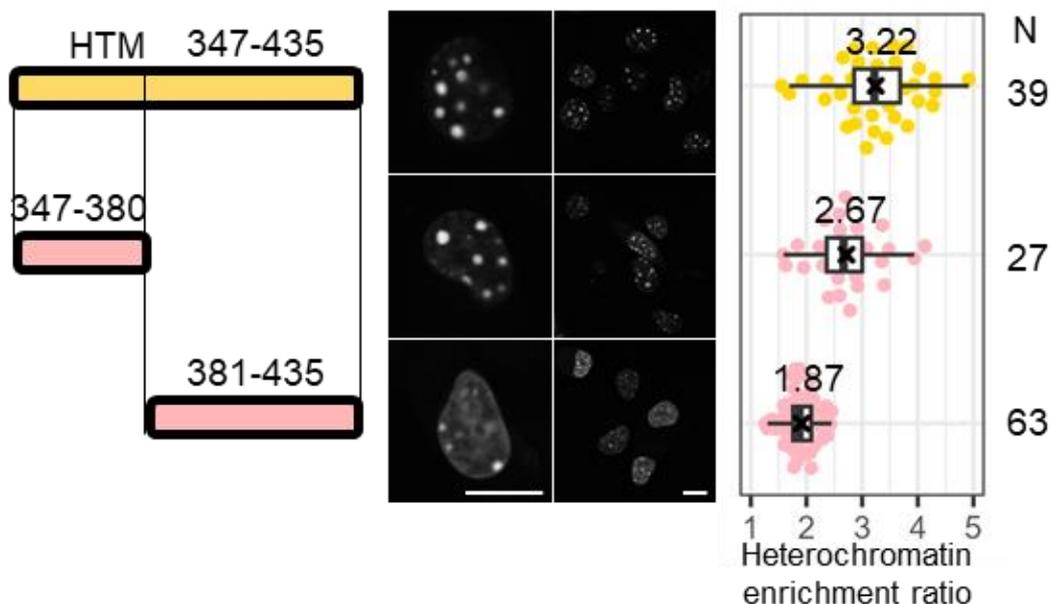


図 6 A9細胞における HTM とその欠損変異体の局在パターン

sfGFP を融合した HTM (aa 347-435) および HTM を二分割した断片 (aa 347-380、381-435) の構造 (左) と細胞内局在パターン (中央)。クロモセーター様の斑点状の輝点に集積が見られる。クロモセーターへの集積率のプロットを右に示す。中央値の値をプロットの上に記載した。定量解析に用いた細胞数(N)をプロットの右側に示す。スケールバー：10 μ m

次に、N 末端側欠損変異体(aa 347-380)、C 末端側欠損変異体(aa 381-435)それぞれについて、さらなる削り込みを行った変異体を作製し、ヘテロクロマチンへの標的に必須な最小限の領域を決定した。その結果、N 末端側では、aa 352-380 の欠損変異体がクロモセーターへの集積パターンを示し、ヘテロクロマチン濃縮率もオリジナルの領域に近い値を示した(aa 352-380 : 2.59、aa 347-380 : 2.67)。aa 352-380 からさらに N 末端側を削り込むと (aa 356-380)、ヘテロクロマチン局在が完全に失われ、C 末端側を削り込むと (aa 352-374)、ヘテロクロマチン濃縮率が低下した (2.59→1.65) (図 7)。

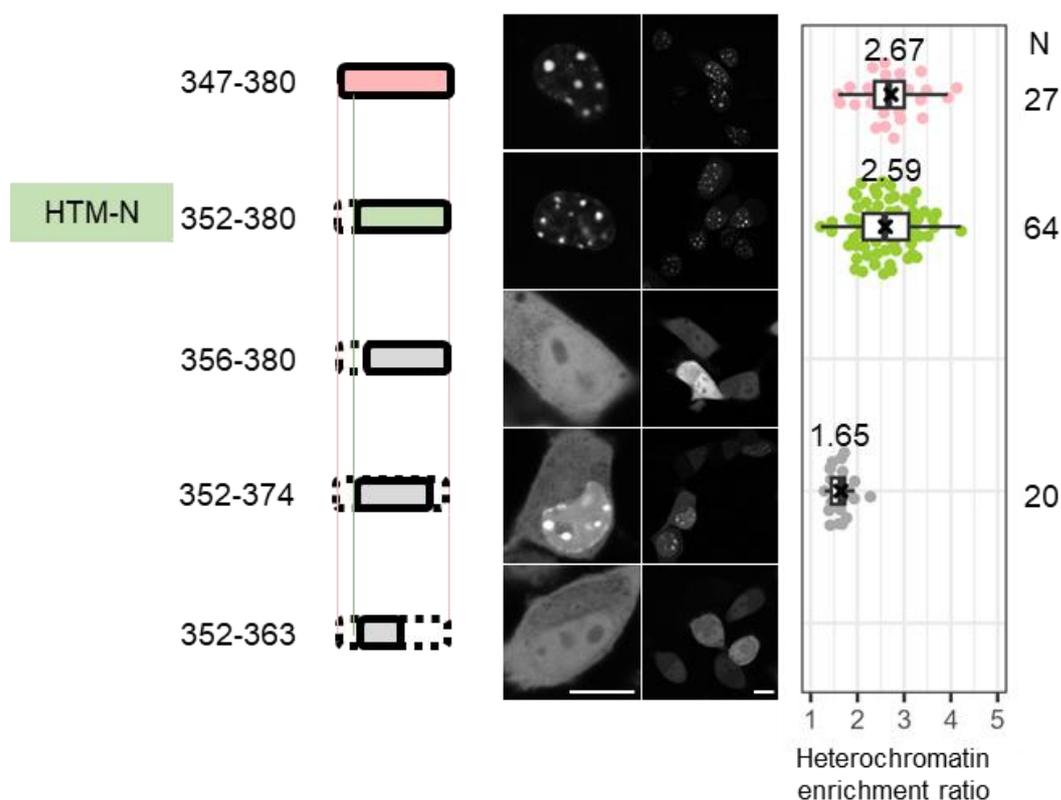


図 7 A9細胞における HTM N 末端領域側の欠損変異体の局在

sfGFP を融合した 347-380 およびさらなる欠損変異体 (aa 347-380、352-380、356-380、352-374、352-363) の細胞内局在パターン。352-380 よりも短く削られた変異体はクロモセーターへの集積率が低下した。スケールバー: 10 μ m 右はクロモセーターへの集積率のプロットと箱ひげ図。中央値の値を箱ひげ図の上に記載した。定量解析に用いた細胞数(N)を右側に示す。347-380 の画像とプロットは図 2 と同じものを載せている。

HTM の C 末端領域内では、aa 389-410 の領域がクロモセーターに集積し、ヘテロクロマチン濃縮率も近い値を示した(aa 389-410: 1.73、381-435: 1.87)。C 末端側をさらに削り込んだ変異体 (aa 389-404) は細胞質内を均一に分布し、N 末端側をさらに削り込んだ変異体 (aa 391-410) はクロモセーターへの集積が弱まった (ヘテロクロマチン濃縮率: 1.73→1.39)。(図 8)

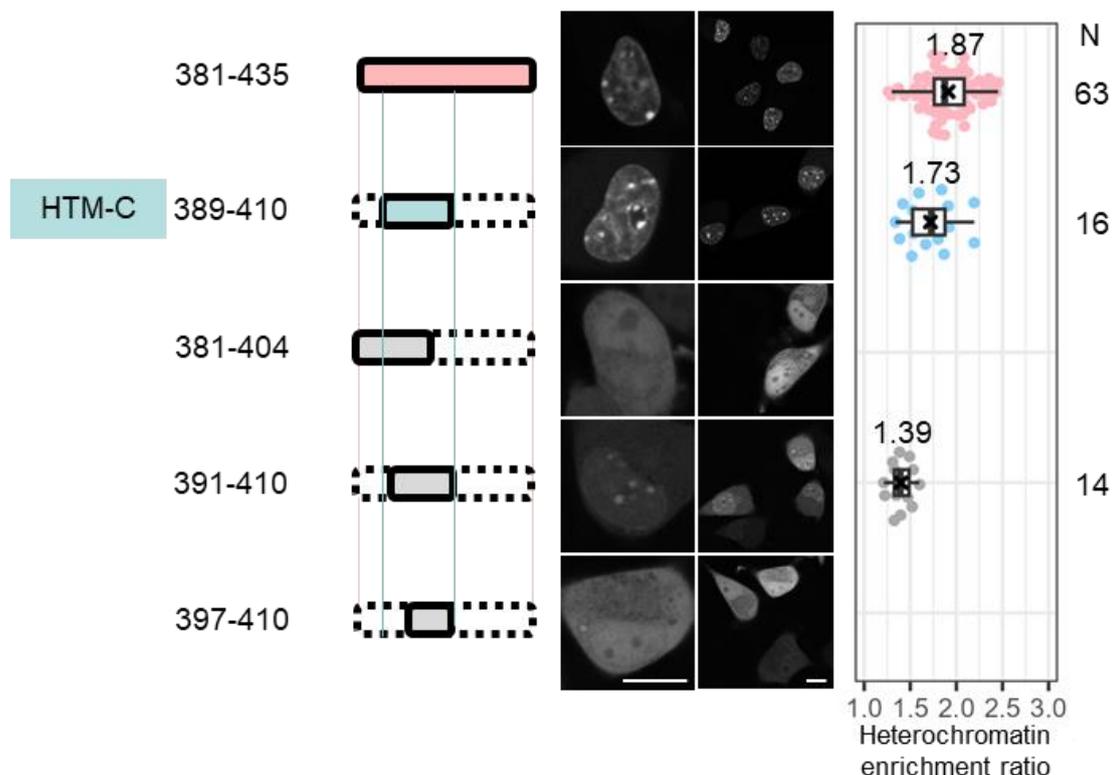


図 8 A9細胞における HTM C 末端側領域の欠損変異体の局在パターン

sfGFP を融合した 381-435 およびさらなる欠損変異体 (aa 389-410、381-404、391-410、397-410) の細胞内局在パターン。389-410 よりも短く削られた変異体はクロモセーターへの集積率が低下した。スケールバー: 10 μ m 右はクロモセーターへの集積率のプロットと箱ひげ図。中央値の値を箱ひげ図の上に記載した。定量解析に用いた細胞数(N)を右側に示す。381-435 の画像は図 3 と同じものを載せている。

aa 352-380 と aa 389-410 がオリジナルの領域 (347-380、389-410) と似たクロモセーター濃縮率を示したことから、それぞれ HTM-N、HTM-C と名付け、これらに対して点変異導入によるさらなる解析を行うこととした。

以上の変異体の局在パターンとヘテロクロマチンの集積率のプロットは、比較のため図 9 にまとめなおした。

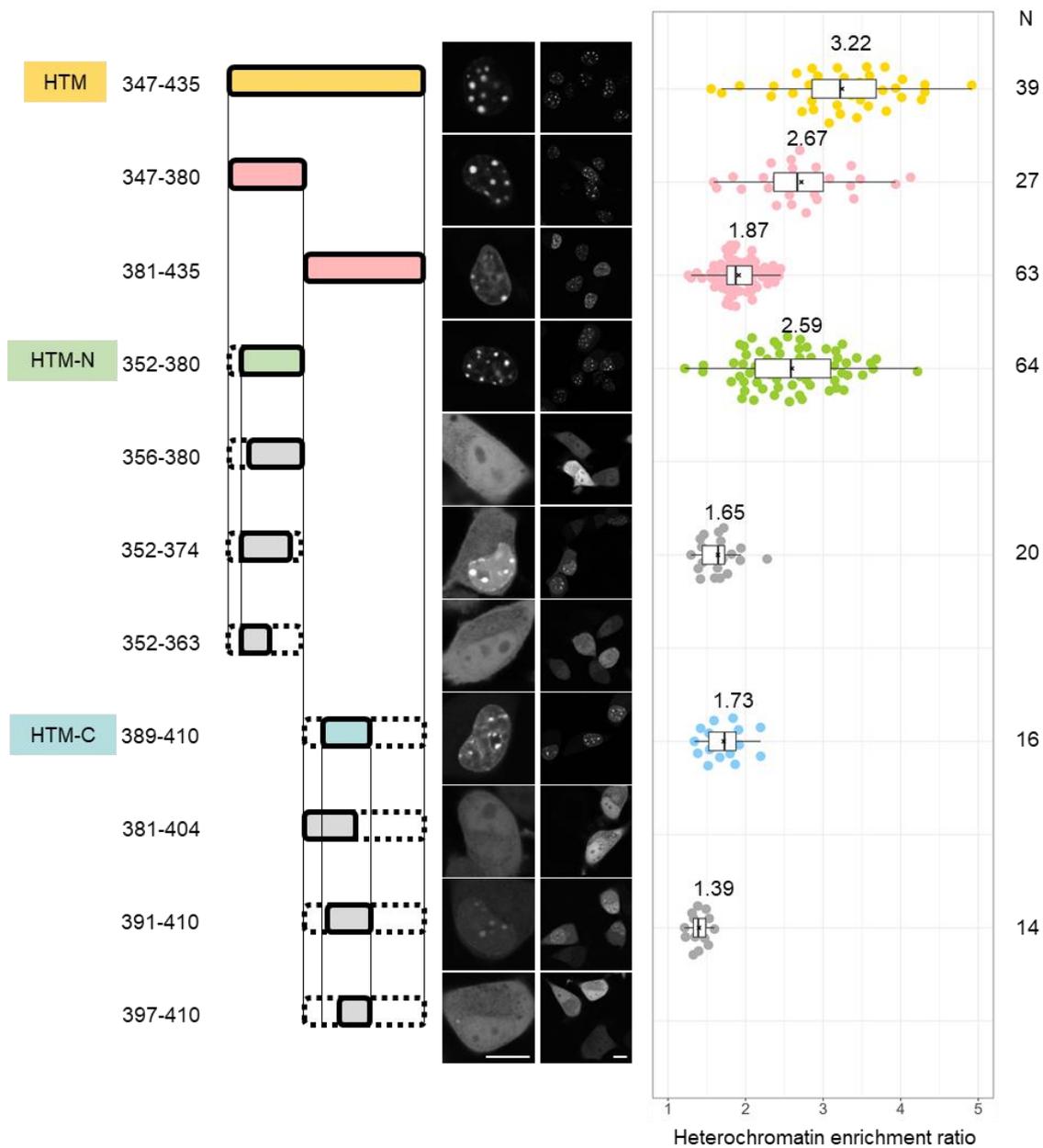


図9 各欠損変異体の局在パターンのおまとめ

図6-8に乘せたデータのまとめ。右はクロモセンターへの集積率のプロットと箱ひげ図。中央値の値を箱ひげ図の上に記載した。定量解析に用いた細胞数(N)を右側に示す。スケールバー：10 μm

3-3. 進化的に保存されたアミノ酸配列の HP1 結合への関与

次に、ヘテロクロマチン局在に重要なアミノ酸を探索した。進化的に保存されたアミノ酸は重要であると仮定し、異なる生物種間でのアミノ酸配列の保存性を調べることにした。そこで、オルソログのアミノ酸配列のアライメントを長尾恒治 博士、西原秀典 博士に作成していただいた (図 10)。先行研究から、全長の HTM は HP1 CSD と結合することが知られていたため (Souza et al., 2009)、HP1 結合モチーフ (PXVXL) が HTM 内部、特に HTM-N、HTM-C にそれぞれ保存されている可能性が高い。作成されたアライメントを見ると、HTM-N には二つの PXVXL-like モチーフが aa 352-356 (ヒトでは ARVSL) と 372-276 (ヒトでは ALVAL) の位置に見つかった (図 10A、10B)。これらのモチーフは *Homo sapiens* (ヒト)、*Mus musculus* (ハツカネズミ)、*Phascolarctos cinereus* (コアラ)、*Ornithorhynchus anatinus* (カモノハシ)、*Alligator mississippiensis* (ミシシッピワニ)、*Chrysemys picta* (ニシキガメ)、*Anolis carolinensis* (アノールトカゲ)、*Gallus gallus* (ニワトリ) を含む *Amniota* (有羊膜類) で保存されていた (図 10B)。HTM-C には PXVXL-like モチーフと PXXVXL-like モチーフが組み合わさったような伸びたモチーフが aa 389-406 (PYVVRVDL) の位置に見つかった。このモチーフは哺乳類でのみ保存されていた (図 10A)。一般的に HP1 結合モチーフとされているのは PXVXL だが、ヒストン H3 の [44-49] (PGTVAL) や Setdb1 の [616-621] (PLLVPL) には PXXVXL 型の HP1 結合サイトが存在し、これらは実際に HP1 α と結合することが確認されている (Liu et al., 2017)。以降は、これらの PXVXL-like モチーフを N 末端側から順に、モチーフ①、モチーフ②、モチーフ③と呼ぶ。

これらのモチーフがクロモセンターへの集積に重要であるか調べるため、疎水性の高いバリン (V) を親水性の高いアスパラギン酸 (D) に置換した変異体を作製した (図 11)。PXVXL の V を D に置換する変異は HP1 CSD との疎水性相互作用を破壊することで複合体の形成が損なわれることが報告されている (Vassallo et al., 2002, Liu et al., 2017)。

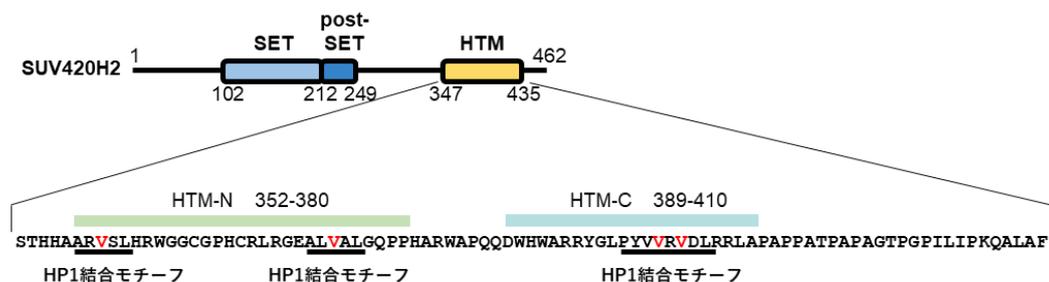


図 11 SUV420H2 の構造とアミノ酸配列

点変異導入の対象にしたバリン残基を赤色で示した。左から順に、V354、V374、V402、V404 を示す。

HTM-N のモチーフ①の変異体 (HTM-N V354D) は細胞内に均一に分散し、ヘテロクロマチンへの局在を示さなかった (図 12A)。このことは、HTM-N の HP1 との結合にはモチーフ①が不可欠であることを示唆した。対照的に、モチーフ②の変異体 (HTM-N V374D) はクロモセンターへの集積を示したが、ヘテロクロマチン濃縮率が低下した (2.59 → 1.59) (図 12A, B)。したがって、aa 372-376 の PXVXL-like モチーフ (ALVAL) は単独では HP1 と結合しないものの、aa 352-356 の PXVXL-like モチーフ (ARVSL) と HP1 との結合をアシストしていると考えられた。

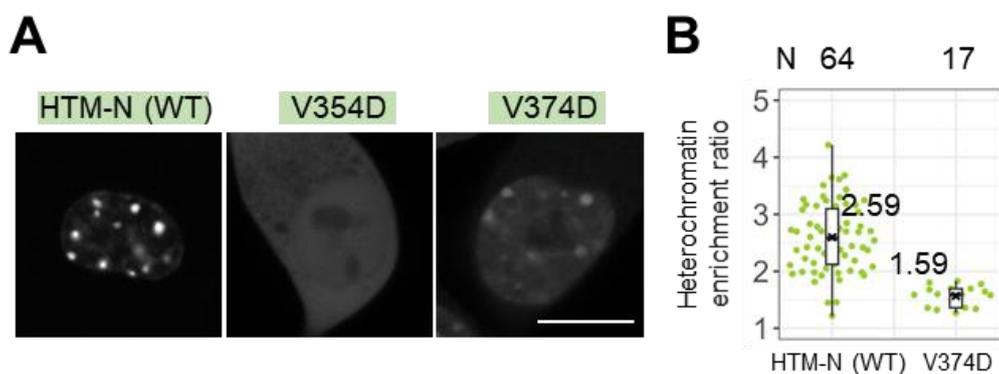


図 12 HTM-N と HP1 結合モチーフ点変異体の細胞内局在

(A) HTM-N-sfGFP および HP1 結合モチーフの点変異体 (V354D、V374D) の細胞内局在パターン。HTM-N はクロモセンターに局在する。V354D 変異体は細胞内に一様に分散した。V374D 変異体はクロモセンターへの集積が見られるものの、コントラストが低下した。(B) ヘテロクロマチン集積率のプロット。プロット内の数値は中央値を示す。解析に使った細胞数 (N) を上に示す。HTM-N に関しては、図 17 と同じデータを示している。スケールバー: 10 μ m

HTM-C については V402D 変異体、V404D 変異体および V402D-V404D の二重の点変異体を作製し、それらの細胞内局在を観察した。その結果、いずれの変異体もクロモセーターへの集積を示さなかった (図 13)。したがって、V402、V404 のいずれも HP1 との相互作用に必須であることが示唆された。ただし、V402D 変異体、V404D 変異体は核内に多く集積していたことから、クロモセーターへの標的には不十分であるものの HP1 との結合活性を弱く保持している可能性が示唆された。V402D-V404D の二重の点変異体では核内への集積が見られず、細胞内に均一に分散した。

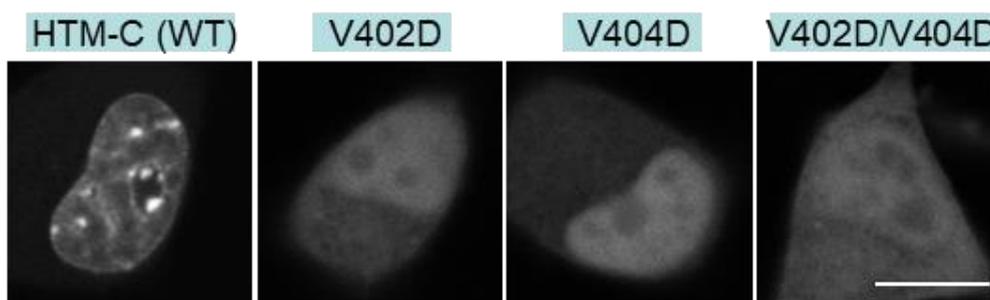


図 13 HTM-C と HP1 結合モチーフ点変異体の細胞内局在

HTM-C-sfGFP (HTM-C (WT)) および HP1 結合モチーフの点変異体(V402D、V404D、V402D-404D)の細胞内局在パターン。HTM-C-sfGFP はクロモセーターに集積する。点変異体はクロモセーターへの集積が見られなくなった。ただし、V402D、V404D 変異体は核内への集積が見られた。スケールバー:10 μ m

HTM-N および HTM-C それぞれのクロモセーター標的を失わせたモチーフ①の変異 (V354D)、モチーフ③の変異 (V402D-V404D) を全長 HTM に導入し、その変異体の細胞内局在を観察した。HTM 全長の V354D 変異体と V402D-V404D 変異体はいずれもクロモセーターへと集積した (図 14A)。それらのヘテロクロマチン濃縮率 (中央値) は 2.05 と 2.95 となり、それぞれ HTM-C (1.73)、HTM-N (2.59) の値と同程度であった (図 14B)。全長 HTM の V354D-V402D-V404D の三重の点変異体はクロモセーターに集積しなかった (図 14A)。これらの結果は、SUV420H2 HTM のヘテロクロマチン標的を担う HP1 結合モチーフが他に存在しないことを示唆した。

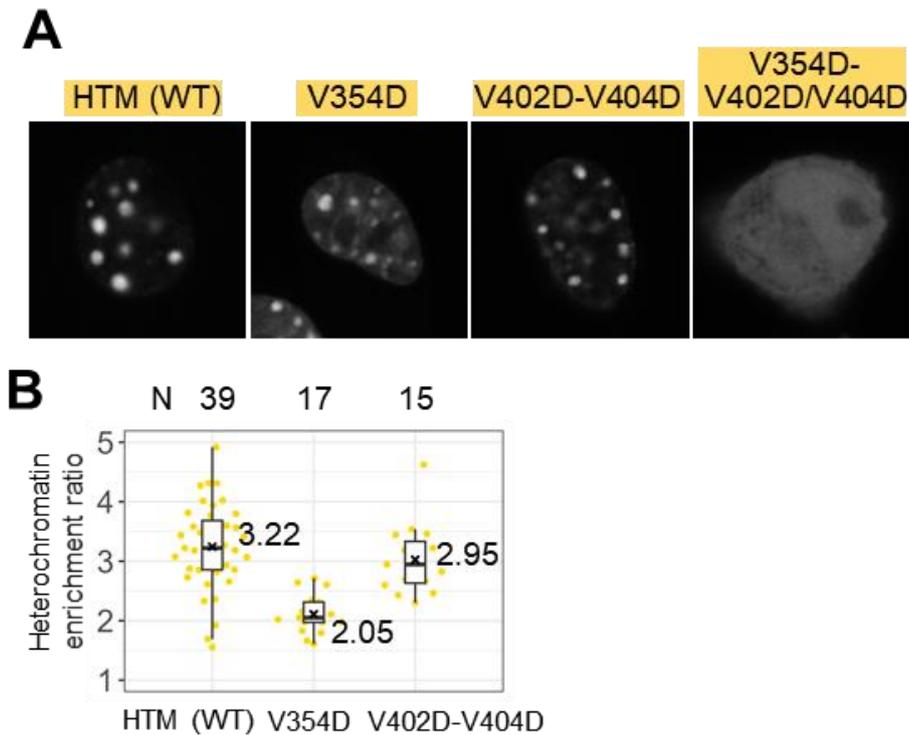


図 14 HTM と HP1 結合モチーフ点変異体の細胞内局在

(A) HTM-N-sfGFP および HP1 結合モチーフの点変異体の細胞内局在パターン。V354D、V402D-V404D どちらかの変異導入では HTM のクロモセンターへの集積は失われなかった。3 重の変異 V354D-V402D-V404D の導入により HTM はクロモセンターへの集積が完全に失われた。(B) ヘテロクロマチン集積率のプロット。プロット内の数値は中央値を示す。解析に使った細胞数 (N) を上に示す。HTM V354D と HTM V402D-V404D はそれぞれ HTM-C、HTM-N と同程度のヘテロクロマチン濃縮率を示した。

HTM-N、HTM-C および PXVXL-like モチーフへの点変異体と HP1 との相互作用を調べるため、共免疫沈降アッセイを行った。sfGFP を融合した各種の変異体 (sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP、HTM-N V354D-sfGFP、HTM-C V402D-V404D-sfGFP) を安定発現する HeLa 細胞から高塩濃度 (1 M NaCl) の細胞抽出バッファーを使って細胞抽出液を作製し、GFP Trap (抗 GFP ナノボディが結合された磁性ビーズ) と反応させ、HP1 の共沈をウェスタンブロッティングにより調べた。一般に、塩濃度が高くなるほど、タンパク質間の相互作用が弱まりクロマチンに強く結合するタンパク質も抽出されやすくなる。生理的塩濃度が約 145 mM であるのに対してヒストンの抽出は 2 M NaCl で行われる (Shechter et al., 2007)。一般的には 300 mM 程度の塩濃度で多くのタンパク質が溶出されてくるため、1 M NaCl はヒストンの溶出が少ない範囲ではかなり高めの塩濃度である。この抽出バッファーを用いて細胞抽出を行ったが、

HTM-N V374D-sfGFP や sfGFP の安定発現細胞に比べて、HTM-N-sfGFP の安定発現 HeLa 細胞では HP1 (特に HP1 β) と HTM-N-sfGFP 自体の抽出効率が著しく低かった。全細胞画分(図 15、レーン 2)内に見られる HP1 β の量に対し、抽出液中(図 15、レーン 5)に含まれる HP1 β の量が著しく減少している一方で、不溶性画分 (図 15、レーン 14) 内の HP1 β が増加していることが分かる。このことは、HTM-N の発現が HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化している可能性を示唆しており、このことについては 3 章後半 (3-5 以降) で詳しく解析を行った。対照的に、HTM-C-sfGFP は HP1 とともに十分に抽出された (図 16 レーン 2)。

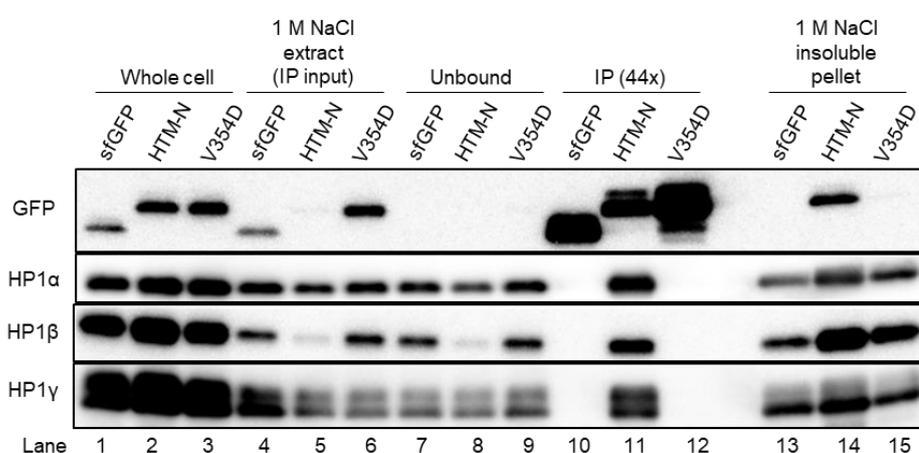


図 15 共免疫沈降による HTM-N-sfGFP と HP1 との相互作用の確認

HTM-N-sfGFP、HTM-N V354D-sfGFP、sfGFP との共免疫沈降アッセイ。共免疫沈降には抗 GFP ナノボディを担持した磁性ビーズ(GFP-Trap)を用いた。共沈したサンプル内の HP1 サブタイプをウェスタンブロッティングにより検出した。HTM-N-sfGFP の発現細胞からは HTM-N および HP1 の抽出効率が顕著に低下した。すべての HP1 サブタイプが HTM-N-sfGFP と共沈したが、コントロールの sfGFP や PXXVL-like モチーフに変異が入った HTM-N V354D-sfGFP とは共沈しなかった。Whole cell: 全細胞画分、1M NaCl extract: 1M NaCl を含む抽出バッファーで作製された細胞抽出画分。(IP の input として使用した。)、Unbound: IP におけるフロースルー画分。IP : GFP-Trap に結合した共沈サンプル。抽出操作における不溶性画分。

免疫沈降には GFP Trap を使用し、共沈した画分内の sfGFP 融合タンパク質および 3 つの HP1 サブタイプ (HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ) をウェスタンブロッティングによって検出した。その結果、すべての HP1 サブタイプが HTM-N-sfGFP と共沈することが示された (図 15 レーン 11)。対照的に、モチーフ①の点変異体 (HTM-N V354D-sfGFP) や sfGFP 単体ではどの HP1 サブタイプも共沈されなかった(図 15 レーン 10、12)。この結果から、HTM-N はモチーフ①を介して HP1 と結合することが示唆された。また、HTM-N V354D 変異体はモチーフ②を残していることを踏まえる

と、モチーフ②単体では HP1 との安定的な複合体の形成には不十分であることを示唆している。これらの結果は、細胞内局在の観察結果（図 12）と一致した。

HTM-C-sfGFP についても同様の結果が得られた。すべての HP1 サブタイプが HTM-C-sfGFP と共沈される一方で（図 16 レーン 8）、モチーフ③の点変異体（HTM-C V402D-V404D-sfGFP）や sfGFP 単体ではどの HP1 サブタイプも共沈されなかった（図 16 レーン 7、9）。このことから、HTM-C はモチーフ③を介して HP1 と結合することが示唆された。これらの結果も、細胞内局在の観察結果（図 13）と一致した。

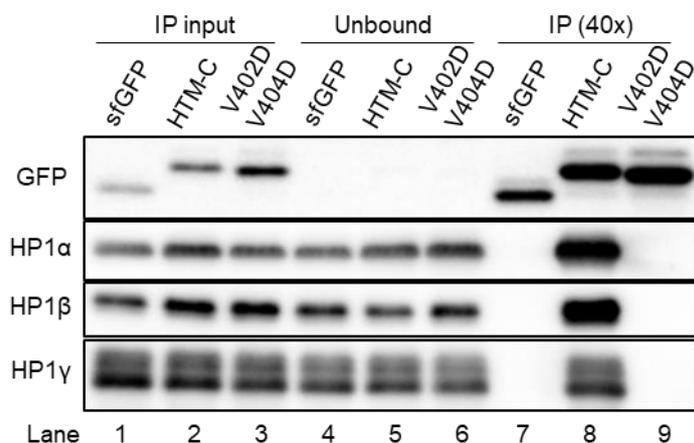


図 16 共免疫沈降による HTM-C-sfGFP と HP1 との相互作用の確認

HTM-C-sfGFP、HTM-C V402D-V404D-sfGFP、sfGFP との共免疫沈降アッセイ。共免疫沈降には抗 GFP ナノボディを用いた。共沈したサンプル内の HP1 サブタイプをウェスタンブロッティングにより検出した。すべての HP1 サブタイプが HTM-C-sfGFP と共沈したが、コントロールの sfGFP や PXVXL-like モチーフに変異が入った HTM-C V402D-V404D-sfGFP とは共沈しなかった。

まとめると、以上の結果は SUV420H2 HTM が PXVXL-like モチーフ①と③を介して HP1 CSD と結合し、クロモセンターへとリクルートされることを示唆した。

3-4. HP1 結合モチーフの立体配置がヘテロクロマチン局在に与える影響

作製したアライメントによると、HTM-N 内部のモチーフ①と②の間に存在する 3 つのアミノ酸 (H357、C362、C366) が生物種間で高度に保存されていた (図 10A、10B)。これらの保存されたアミノ酸残基がヘテロクロマチンへの集積に必要であるか調べるため、HTM-N-sfGFP の H357A、C362V、C366V 変異体を A9 細胞に発現させ、細胞内局在を観察した。その結果、いずれの変異体も核質および細胞質中に広がって分布した (図 17)。このことから、これらのヒスチジンおよびシステインが HP1 との結合に必須であることが示唆された。ヒスチジンとシステインが重要であることから、この領域は 4 つの Cys/His 残基を持つジンクフィンガードメインに似た構造を形成することで、モチーフ①、②の立体的な配置や配向を適切に制御している可能性が考えられた (Neuhaus, 2022)。

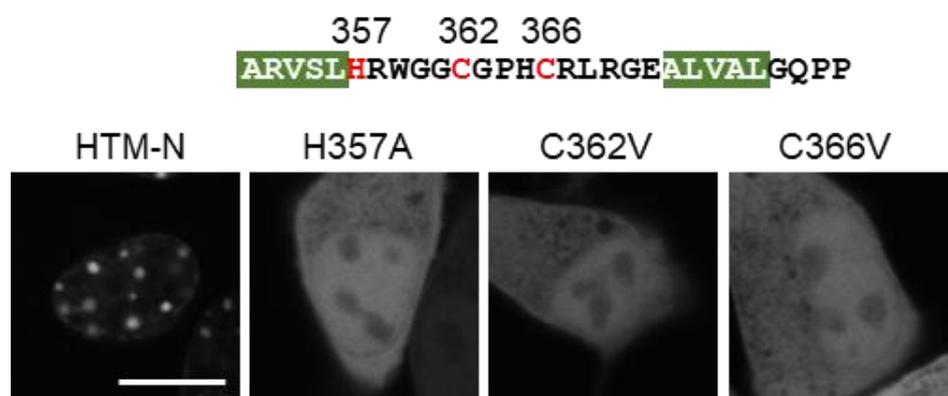


図 17 HTM-N 内の高度に保存されたヒスチジンおよびシステインの点変異体の細胞内局在。

HTM-N の一アミノ酸置換変異体 (H357A、C362V、C366V) を A9 細胞に一過的に発現させ、共焦点顕微鏡で観察した。すべての点変異体はクロモセーターへの集積を示さなかった。スケールバー:10 μ m

モチーフ①、②の適切な立体配置が重要であるかを調べるため、HTM-N に柔軟なリンカーとして知られる 3 \times (GGGGS) リピート配列を挿入した変異体を A9 細胞に発現させ、細胞内局在を観察した。この変異体はクロモセーターに集積したが、ヘテロクロマチン濃縮率が HTM-N と比べて著しく低かった (図 18)。このことから HTM-N 内の二つの HP1 結合モチーフの適切な立体配置が、安定的な HP1 との相互作用に必要であることが示唆された。特に、モチーフ②を欠損した変異体 (aa 352-368) がリンカー挿入変異体と同等の局在パターン、ヘテロクロマチン濃縮率を示したことから (図 18)、リンカーの挿入によってモチーフ①と HP1 の結合に対するモチーフ②の補助効果が失われたことを示唆した。ただし、リンカーを挿入した変異体が生じたクロモセーターへの弱い集積パターンは、ヒスチジンやシステインの点変異体が生じた細胞内での一様な分布とは異なっていた (図 17)。このことは、これらのヒスチジンおよびシステインが

二つの PXVXL-like モチーフの立体配置を調節するだけでなく、モチーフ①と HP1 との結合により直接的に関与する可能性を示唆している。

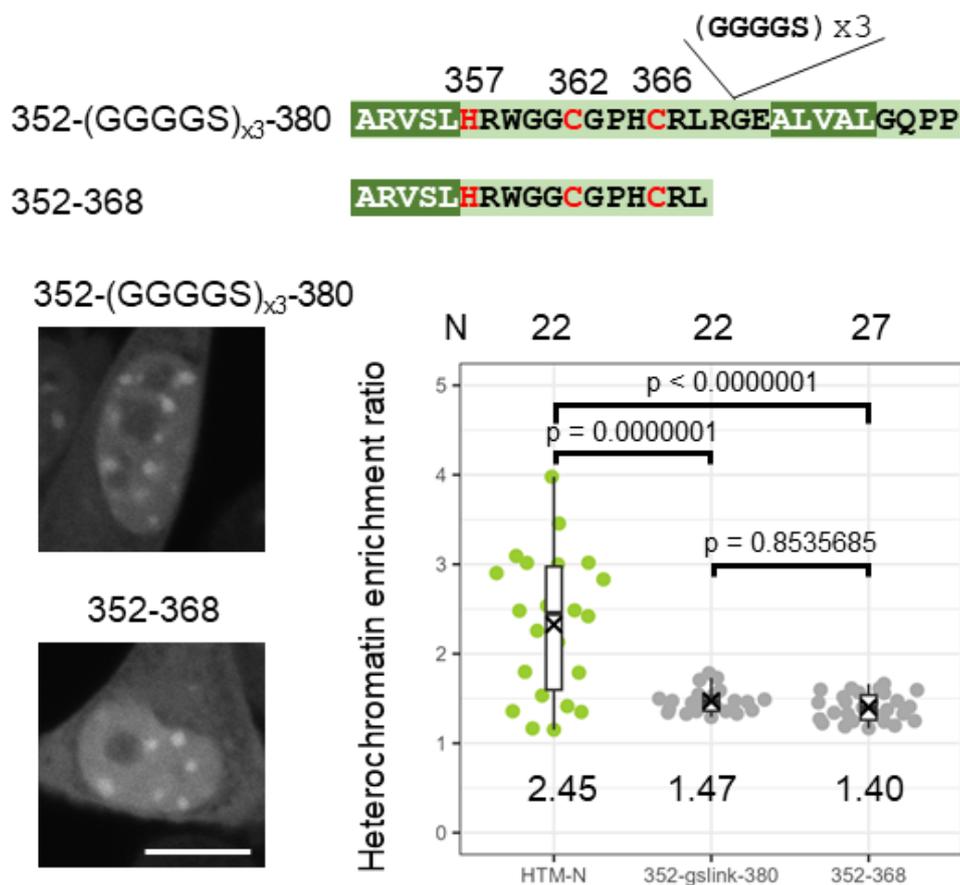


図 18 フレキシブルリンカーの挿入が HTM-N-sfGFP の局在に与える影響。

HTM-N の二つの HP1 結合モチーフの間への柔軟なリンカー挿入した変異体と 2 番目の HP1 結合モチーフを欠失させた欠損変異体のアミノ酸配列 (上) と、それらの局在パターン (左下)。個々の核のヘテロクロマチン集積率のドットおよびボックスプロットを右下に示す。解析に使用した細胞数(N)を上記、中央値をプロット内に記す。P 値は Tukey Kramer 検定で得られた。スケールバー : 10 μ m。

3-5. HTM の発現が HP1 の局在に与える影響

免疫沈降の実験では、HTM-N-sfGFP 発現細胞では HP1 が抽出されづらくなった(図 15)。このことは、SUV420H2 HTM が HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化することを示唆した。HTM による HP1 への影響を一細胞レベルで調べるため、抗 HP1 β 抗体を用いて免疫染色を行い、野生型の細胞と HTM-sfGFP を発現した細胞での HP1 β のシグナルを比較した。この実験には、HP1 がクロモセンターに高度に濃縮されているマウス細胞では、HTM の発現による HP1 β シグナルの増加が検出されづらい可能性があったため、HP1 β の基底レベルが低いヒトの HeLa 細胞を用いた。また、HTM-sfGFP の発現による影響を同一の視野内で直接比較するため、HTM-sfGFP 安定発現 HeLa 細胞と野生型 HeLa 細胞を混合して同一の well に播種し、抗 HP1 β 抗体、抗 H3K9me3 抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、HTM-sfGFP を発現した HeLa 細胞では H3K9me3 に顕著な変化は見られなかったが、ヘテロクロマチン上の HP1 β のシグナルは顕著に増加していた (図 19)。

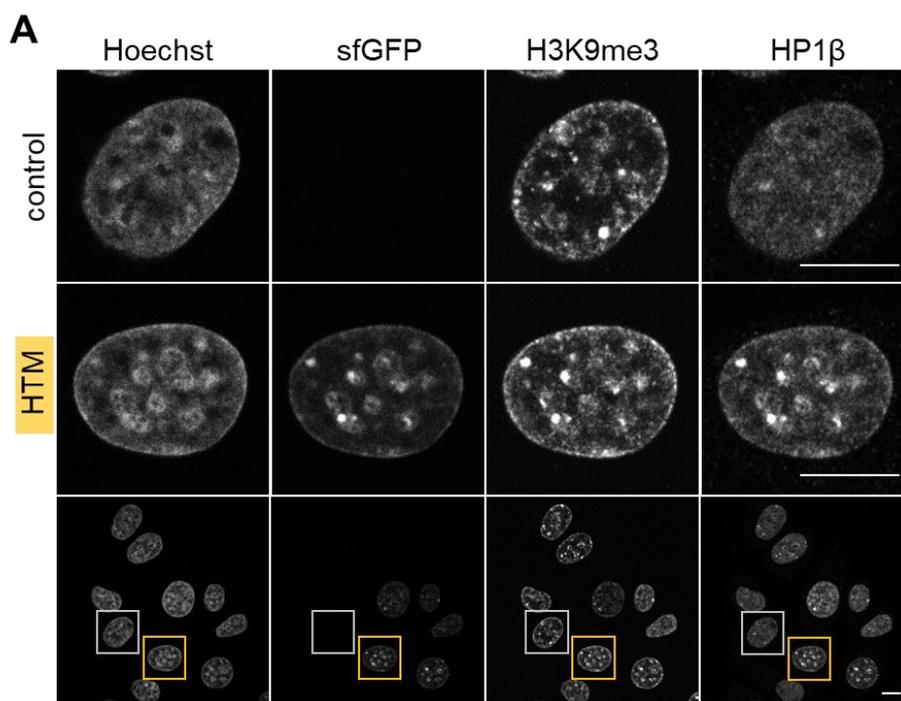


図 19 HTM-sfGFP 過剰発現による内在性 HP1 β の輝度および局在変化の代表的な画像

野生型 HeLa 細胞(control)と HTM-sfGFP 安定発現 HeLa 細胞(HTM)を同一 well 内に播種したサンプルを、H3K9me3、HP1 β の免疫染色画像。DNA は Hoechst33342 で染色した。上から、control の細胞核、HTM の細胞核、2つの画像を含む広視野の画像。核の拡大図は、枠で囲った細胞核を見せている。Control : 白枠、HTM : 黄枠 スケールバー : 10 μ m

H3K9me3 が豊富な領域に結合する HP1 β のシグナルを定量するため、H3K9me3 シグナルが高い上位 10% のピクセル上の HP1 β 平均輝度値を測定し、核全体の HP1 β 平均輝度値で除算した値を算出した。この値を HP1 β 濃縮率 (HP1 β enrichment) とし、個々の細胞の HP1 β 濃縮率からプロットを作成したところ、HTM-sfGFP を発現した細胞で HP1 β 濃縮率が顕著に高くなっていることが分かった (図 20)。

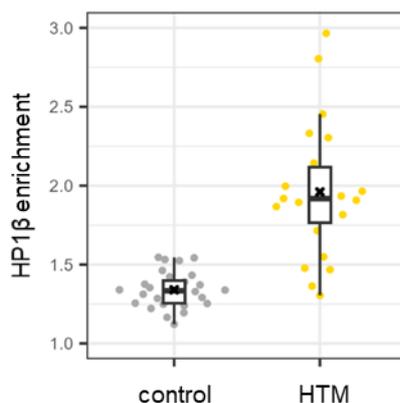


図 20 HTM-sfGFP の発現による HP1 β 濃縮率への影響

野生型 HeLa 細胞(control)と HTM-sfGFP 安定発現 HeLa 細胞(HTM)の HP1 β の濃縮率。HP1 β の濃縮率はヘテロクロマチン上の HP1 β のシグナル強度を核内の平均強度で除算した値を示す。HTM の発現は、HP1 β の濃縮率を増加させた。

HTM-N、HTM-C、および HTM V374D (下で説明する) についても同様の実験を行った (図 21、図 22)。その結果、これらの発現はどれも全体の H3K9me3 レベルには影響しなかった (図 22A)。HTM-N は、HTM と比べて弱く HP1 β 濃縮率を増加させた一方で、HTM-C の発現は HP1 β 濃縮率をわずかに減少させた (図 21B、22B)。これらの結果は、2つの HP1 結合モチーフをもつタンパク質の発現が HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化を引き起こし、単一の HP1 結合モチーフしか持たないタンパク質の発現はドミナントネガティブに働くことで HP1 をヘテロクロマチンから解離しやすくすることを示唆した。過去の報告によると、HP1 のクロモセーター局在を促進する SENP7 という HP1 結合タンパク質は、2つの HP1 結合モチーフからなる HP1 結合モジュールを介して、HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化を引き起こすと報告されている (Romeo et al., 2015)。その報告では、2つの HP1 結合モチーフの片方に変異導入した HP1 結合モジュールの発現が HP1 のヘテロクロマチン結合の不安定化を引き起こすことも示されている (Romeo et al., 2015)。今回の実験結果においても、HP1 のヘテロクロマチン結合は複数の PXVXL-like モチーフを持つ HTM (3つ)、HTM-N (2つ) によって安定化され、単一の PXVXL-like モチーフを持つ HTM-C によって不安定

化されたことから、HTM による HP1 のヘテロクロマチン結合安定化も SENP7 による HP1 動態の制御と同様の仕組みで起きていると考えられた。

HTM がもつ3つの PXVXL-like モチーフのうちモチーフ②は、単独では HP1 と安定的な結合には不十分であるものの、モチーフ①および zinc finger-like モチーフと協調的に働くことで安定的な HP1 との結合に寄与することが示唆されていた (図 12、図 15)。このモチーフ②の HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化への寄与についても、点変異体 (HTM V374D) を用いて調べた。その結果、HTM V374D 発現細胞では野生型細胞と比べて HP1 β 濃縮率の増加も減少も見られなかった (図 21、図 22)。このことは、モチーフ②が HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化を引き起こすのに重要であることを示唆した。HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化には、二つの HP1 結合モチーフを持つだけでは不十分であり、それらが協調的に働くことが必要である可能性がある。

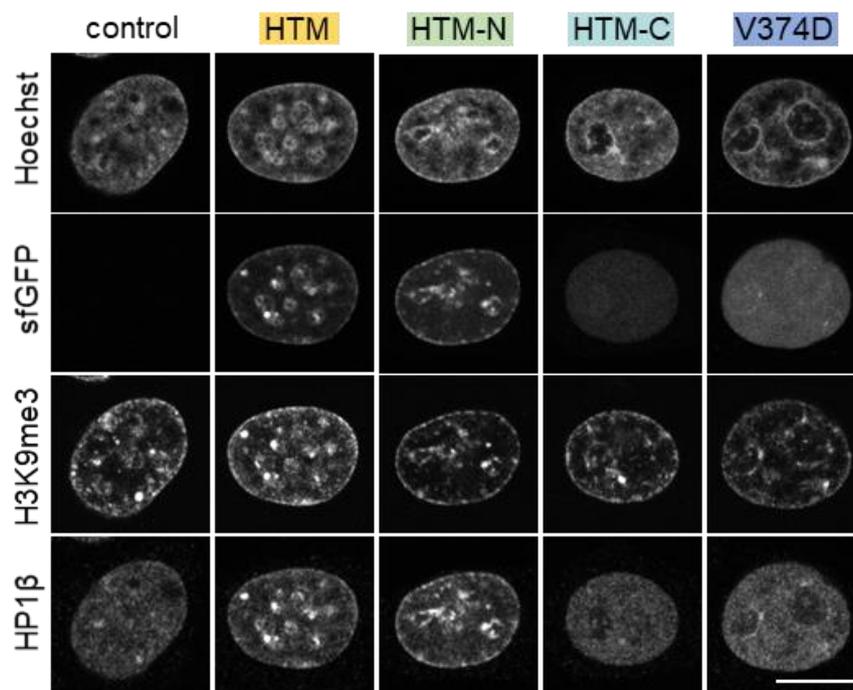


図 21 HTM 各種変異体の過剰発現による内在性 HP1 β の輝度および局在変化の代表的な画像

抗 H3K9me3 抗体、抗 HP1 β 抗体を用いた免疫染色画像。DNA は Hoechst33342 で染色した。左から、野生型 HeLa 細胞、HTM-sfGFP (HTM)、HTM-N-sfGFP (HTM-N)、HTM-C-sfGFP (HTM-C)、HTM V374D-sfGFP (V374D) を安定発現する細胞核。Control と HTM は図 19 と同じデータを示す。スケールバー：10 μ m

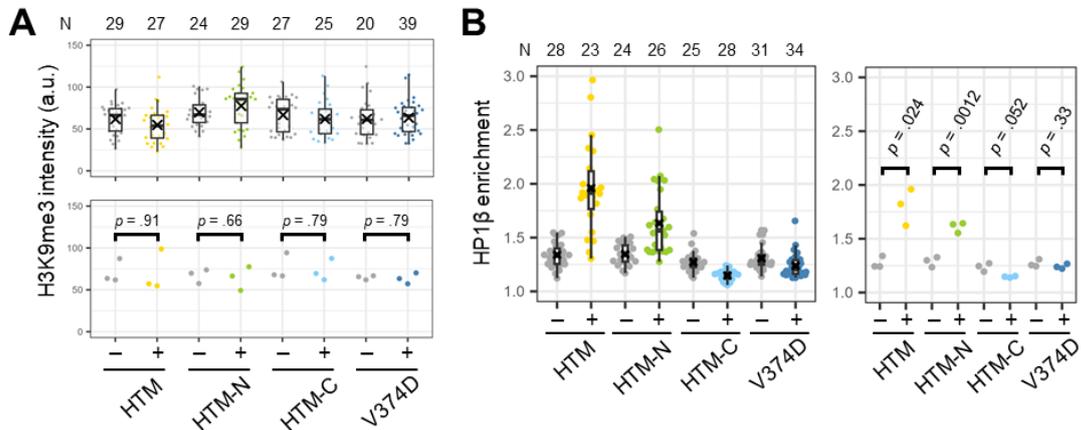


図 22 各種 HTM 変異体の発現による H3K9me3 レベルと HP 1 β 濃縮率の変化

(A) 各種 HTM 変異体の発現による H3K9me3 の核内平均輝度値の変化。(上) 個々の細胞核の H3K9me3 の平均輝度値のプロット。プロットした核の数 (N) を上に示した。(下) バイオロジカルトリプレケートでの個々の実験の平均値をプロットした。p 値は Student t 検定 (対応あり、paired) から得た値を示す。(B) 各種 HTM 変異体の発現による HP1 β 濃縮率の変化。(左) 個々の細胞核の HP1 β 濃縮率のプロット。プロットした核の数 (N) を上に示した。(右) バイオロジカルトリプレケートでの個々の実験の平均値をプロットした。p 値は Student t 検定 (対応あり、paired) から得た値を示す。

各 HP1 サブタイプに対する HTM-N-sfGFP の発現が与える影響を免疫染色によって調べた。その結果、HTM-N-sfGFP を発現する細胞ではすべての HP1 サブタイプ HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ について核内の平均輝度値が高くなった(図 23)。このことから、HTM-N の発現はすべての HP1 サブタイプのヘテロクロマチン結合を安定化させることが示唆された。また、3つの HP1 サブタイプの中で HP1 β の平均輝度値が最も顕著な変化を示した。このことは、HTM によって HP1 β が最もヘテロクロマチン結合の安定化を受けやすいことを示唆した。この結果はイムノブロットティングのデータとも一致した (図 15)。

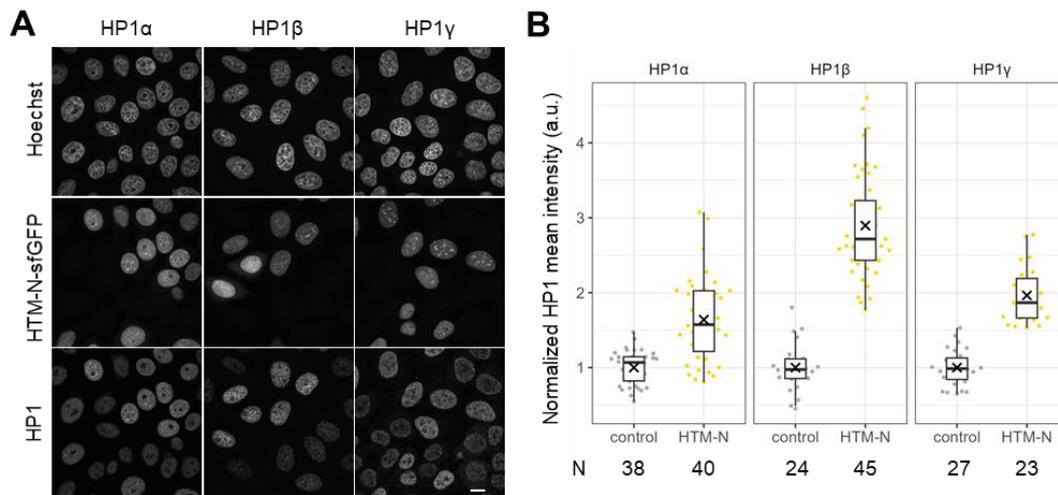


図 23 HTM-N-sfGFP の発現が内在性 HP1 α 、HP1 β 、HP1 γ に与える影響

(A) 各 HP1 サブタイプに対する抗体を用いた免疫染色画像。HTM-N-sfGFP の安定発現細胞と野生型細胞を同一 well 内に混合して播種されている。野生型に比べて HTM-N-sfGFP の発現細胞ではすべての HP 1 サブタイプの核内の輝度値が増加した。(B) 各 HP1 について、個々の核の平均輝度値を野生型の HeLa 細胞の平均輝度値で正規化した値をドットおよびボックスプロットとして示す。HP1 β で最も顕著に変化した。解析に使用した細胞核の数 (N) を下に示す。スケールバー：10 μ m

3-6. HTM の発現が HP1 の動態に与える影響

HTM-sfGFP の発現が HP1 のヘテロクロマチン結合安定性に与える影響について、光褪色後蛍光回復法 (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) を用いて解析した。FRAP は蛍光標識された標的タンパク質の拡散速度を生き細胞内で計測する方法で、クロマチンに強く結合するタンパク質ほど拡散速度が遅くなり、蛍光回復が遅くなる。したがって、蛍光回復を比較することでクロマチンへの結合の強さを比較することができる。ここでは、A9 細胞に一過的に発現させた sfCherry-HP1 α について FRAP 解析を行い、HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP、HTM V374D-sfGFP の共発現による sfCherry-HP1 α の蛍光回復曲線の変化を調べた。まず、A9 細胞に sfCherry-HP1 α と HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP または HTM V374D-sfGFP をコトランスフェクションし、細胞内局在を観察した。その結果、HTM、HTM-N を共発現した細胞では sfCherry-HP1 α がクロモセーター上により濃縮される様子が観察された (図 24)。HTM-C-sfGFP、HTM V374D を共発現した細胞では sfCherry-HP1 α の細胞内局在に大きな変化は見られなかった。

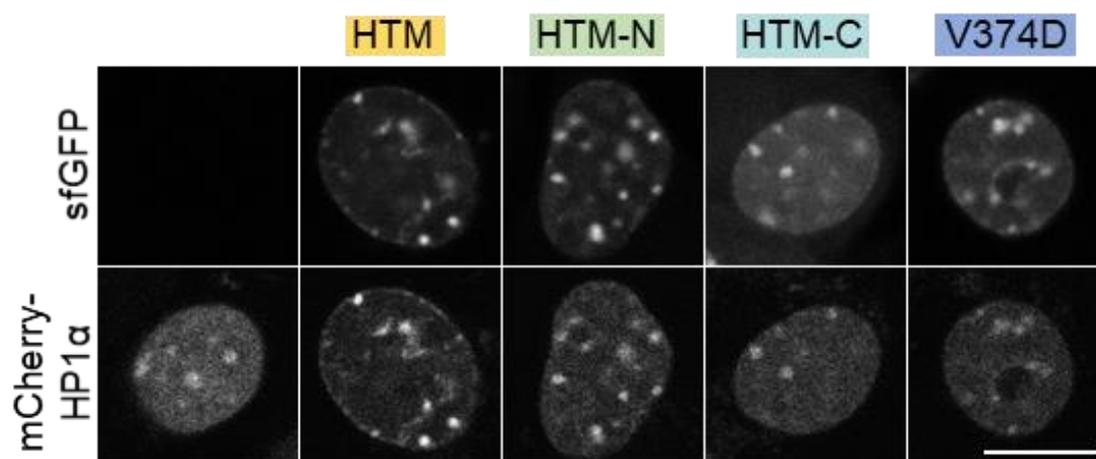


図 24 各種 HTM 変異体の共発現が sfCherry-HP1 α の局在パターンに与える影響

A9 細胞における sfCherry-HP1 α の局在パターン。sfCherry-HP1 α 単独で発現させた細胞と HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP、HTM V374D-sfGFP それぞれと共発現させた細胞の代表例。HTM または HTM-N を共発現させた場合に sfCherry-HP1 α はクロモセーターにより濃縮された。スケールバー：10 μ m

FRAP 解析の結果、HTM-sfGFP を共発現した細胞では sfCherry-HP1 α の蛍光回復が著しく遅れた (図 25)。HTM-N-sfGFP の発現は、HTM-sfGFP ほど顕著ではないものの、sfCherry-HP1 α の蛍光回復を遅らせた。対照的に、HTM-C-sfGFP の発現は sfCherry-HP1 α の蛍光回復をやや早めた。HTM V374D の共発現は sfCherry-HP1 α の蛍光回復に変化は与えなかった。これらの結果は、HP1 のヘテロクロマチンへの結合が HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP の共発現により安定化されること、HTM-C-sfGFP の共発現によって不安定化されること、また、HTM V374D-sfGFP の共発現には影響されないことを示唆した。このことは免疫染色の結果と完全に一致している (図 21、22)。

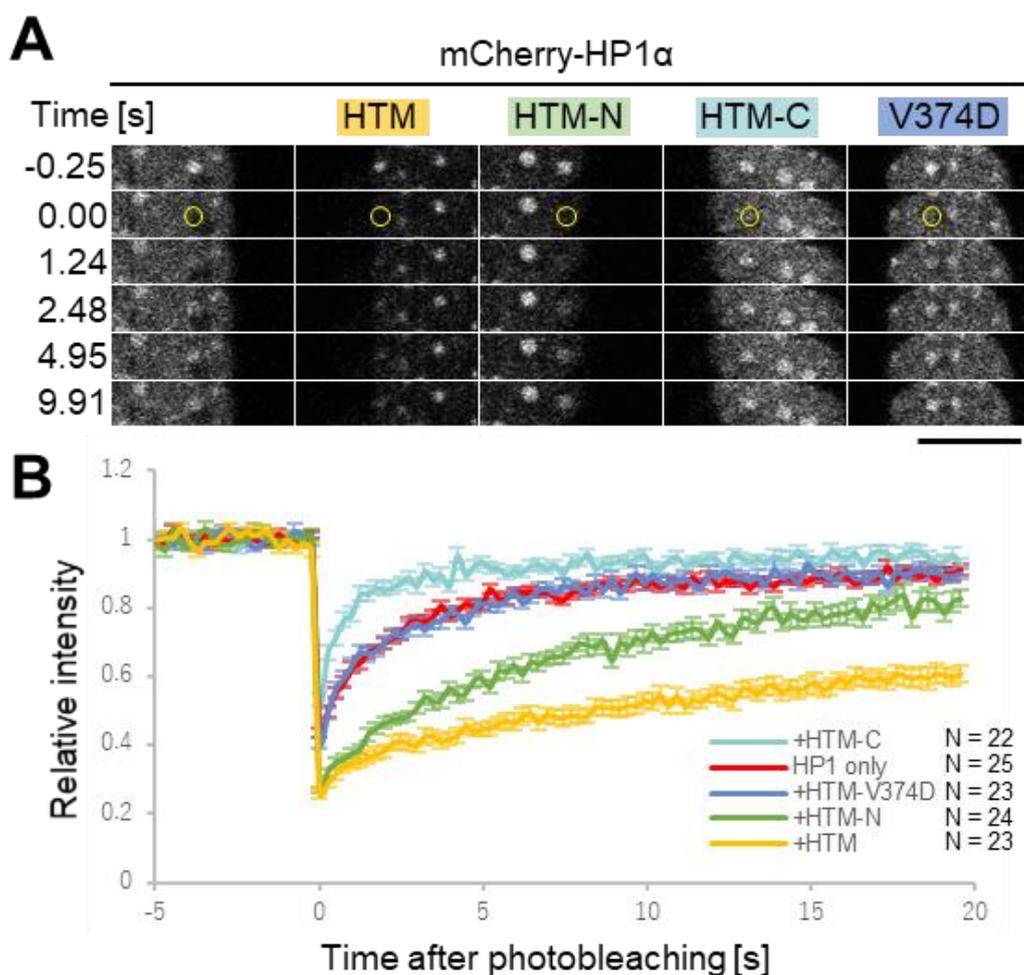


図 25 各種 HTM 変異体の共発現が sfCherry-HP1 α の動態に与える影響

A9 細胞に sfCherry-HP1 α を単独で発現、もしくは HTM-sfGFP、HTM-N-sfGFP、HTM-C-sfGFP、HTM V374D-sfGFP と共発現させ、FRAP 解析(光褪色後蛍光回復法)を行った。(A) 代表的な光褪色後の蛍光回復の様子。黄色の円は光褪色を行った領域を示す。(B) 蛍光回復曲線。解析に使用した細胞の数 (N) を凡例の右に記す。エラーバーは標準誤差(s.e.m.)を示す。スケールバー: 10 μ m

3-7. 内在性 SUV420H2 が HP1 の局在に与える影響

内在性 SUV420H2 が HP1 のヘテロクロマチン結合安定性にどの程度寄与しているかを調べるため、SUV420H2 ノックアウト HeLa 細胞の樹立を CRISPR/Cas9 によるゲノム編集によって試みた。しかしながら、SUV420H2 に対して十分な特異性を持った抗体が入手不可能であったため、代替法として SUV420H1、SUV420H2 (SUV420H1/H2) のダブルノックアウト (DKO) 細胞の樹立を、木村研究室卒業生の相澤亜莉彩氏と共同で行った。SUV420H1/H2 の DKO 細胞では H4K20me3 と H4K20me2 がほぼ完全に失われることが報告されている (Schotta et al., 2008)。CRISPR/Cas9 によるノックアウトの操作後、クローニングしたいくつかの細胞では H4K20me2 および H4K20me3 がバックグラウンドレベルまで失われ、H4K20m1 が増加していることが免疫染色によって確認され、SUV420H1、SUV420H2 の両方がノックアウトされていることが示唆された (図 26A、B)。また、SUV420H1 mRNA、SUV420H2 mRNA のシーケンス解析を行い、それぞれに indel 変異が導入されていることが確認された (図 26C)。

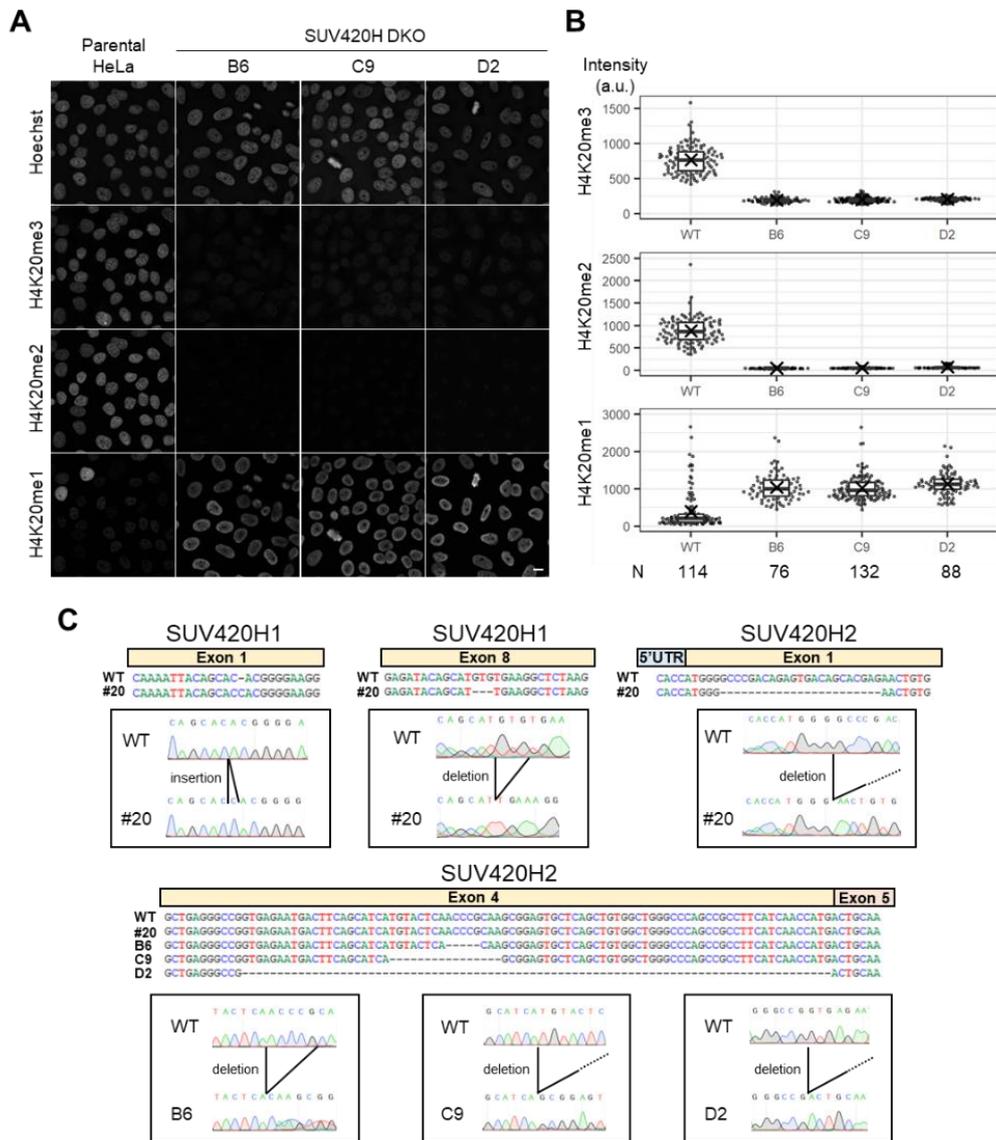


図 26 SUV420H1/H2 のダブルノックアウトの検証

SUV420H1/H2 ダブルノックアウト細胞の H4K20me1、me2、me3 レベルを、異なる蛍光色素を直接結合した特異的抗体を用いた免疫染色で検出した。(A) 共焦点顕微鏡の単一セクション (B) 個々の核内の HP1 平均輝度値を示すドットおよびボックスプロット。解析に使用した細胞数を下に記す。(C) CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の確認。発現している mRNA を鋳型に標的の領域 (SUV420H1 の exon1 と exon8、SUV420H2 の exon1 と exon4) を逆転写 PCR によって増幅し、PCR 産物を直接シーケンス法で塩基配列を調べた。#20 クローンには、SUV420H1 の開始コドン付近 (exon1) に 1 塩基の挿入と触媒活性ドメイン (exon8) に 3 塩基の欠損、SUV420H2 の開始コドン付近 (exon1) に広範囲の欠損が見られた。B6、C9、D2 クローンは、親株である #20 クローンと同じ変異に加えて、SUV420H2 の触媒活性ドメイン (exon4) にそれぞれ異なる変異が見られる。スケールバー: 10 μ m。

これらの細胞について抗 HP1 β 抗体を用いて免疫染色を行った結果、SUV420H1/H2 DKO 細胞では野生型 HeLa 細胞に比べて HP1 β 濃縮率がわずかに減少した (図 27A、B)。ただし、この変化は統計的に有意であるとは限らなかった。HTM-sfGFP を DKO 細胞に過剰発現させると、HP1 β 濃縮率は有意に増加したが、野生型細胞と比べてその増加分は小さくなった (図 28A、B)。これらの結果は、一方では内在性 SUV420H2 が HP1 のヘテロクロマチン結合安定性にほとんど寄与していないことを示唆している。これはおそらく内在性の SUV420H2 が他の HP1 結合タンパク質と比べて発現レベルが低いためであると考えられる。他方で、DKO 細胞では HTM の過剰発現による HP1 β のシグナル増加が野生型に比べて制限されていることから、SUV420H2 の他の機能、例えば H4K20me3 の付加が HP1 のヘテロクロマチン結合を補助する可能性を示唆している。

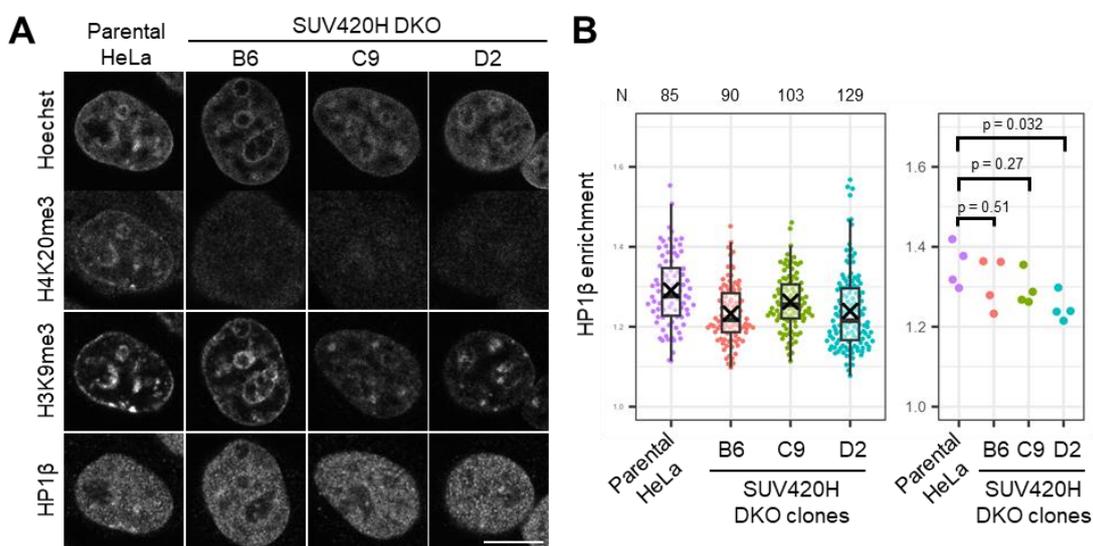


図 27 内在性 SUV420H1/H2 の枯渇による HP1 β の濃縮率への影響

(A) HeLa の親株の細胞と SUV420H1/H2 ダブルノックアウト細胞を抗 H4K20me3 抗体、抗 H3K9me3 抗体、抗 HP1 β 抗体で免疫染色した顕微鏡画像。スケールバー：10 μ m (B) 一回の実験で解析した個々の核について、HP1 β enrichment をドットおよびボックスプロットとして左に示す。解析された核数 (N) は、ボックスプロットの上に示す。バイオロジカルトリプレケートでの個々の実験の平均値をプロットした。各変細胞について、一回の実験で 83-136 個の核を解析した。P 値は Dunnett 検定から得た。

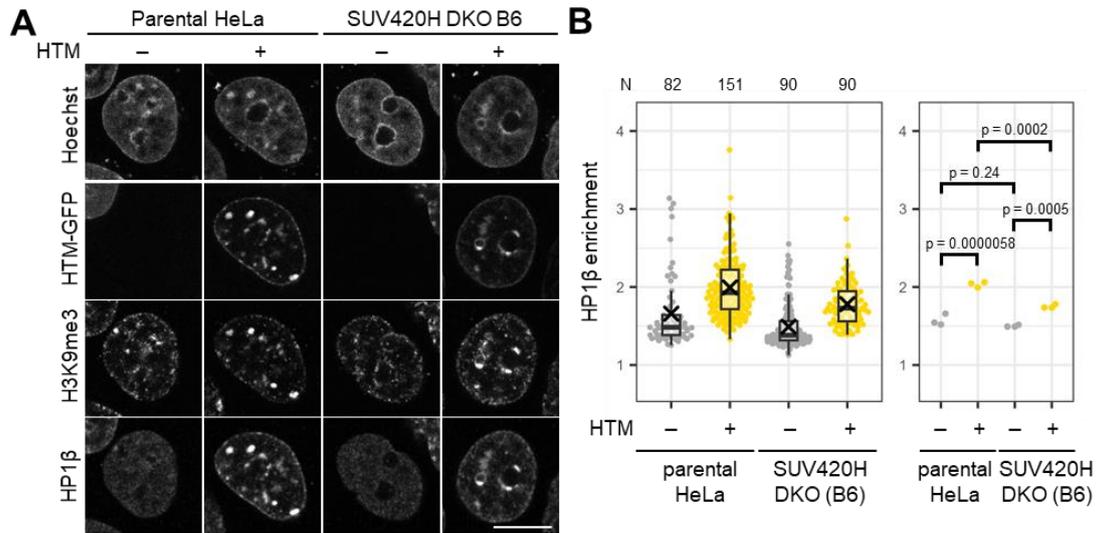


図 28 SUV420H1/H2 ダブルノックアウト細胞 (SUV420H DKO 細胞) における HTM 過剰発現による HP1 locking の影響

(A) 野生型 HeLa 細胞と SUV420H DKO 細胞に HTM-sfGFP を一過的に発現させ、抗 H3K9me3 抗体、抗 HP1β 抗体を用いた免疫染色画像。(B) HP1β 濃縮率(HP1β enrichment)の定量結果。一回の実験で解析した個々の核について、HP1β enrichment をドットおよびボックスプロットとして左に示す。グレーのプロットは同一 well 内の HTM-sfGFP を発現しない HeLa 細胞の核を示す。解析された核数 (N) を上に示す。バイオロジカルトリプレケートでの個々の実験の平均値を右にプロットした。各条件について、一回の実験で 52-156 個の核を解析した。P 値は Tukey Kramer 検定から得た値を示す。

3-8. HTM の発現が細胞増殖に与える影響

HP1 のヘテロクロマチン結合安定性の変化が細胞増殖に及ぼす影響を調べるため、HTM-sfGFP、HTM-C-sfGFP および sfGFP 安定発現 HeLa 細胞の増殖速度を測定した。その結果、HTM-sfGFP および HTM-C-sfGFP 安定発現細胞は sfGFP 安定発現細胞と同程度の速さで増殖した (図 29)。HTM や HTM-C による HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化または不安定化が与える影響は小さいことを示唆した。先行研究では SUV420H2 の過剰発現は染色体分配の異常の増加や胚発生の停止を引き起こすことが報告されているが (Herlihy et al., 2021; Eid et al., 2016)、HTM による HP1 locking ではなく、異所的な H4K20me3 の付加による影響である可能性が高いと考えられる。

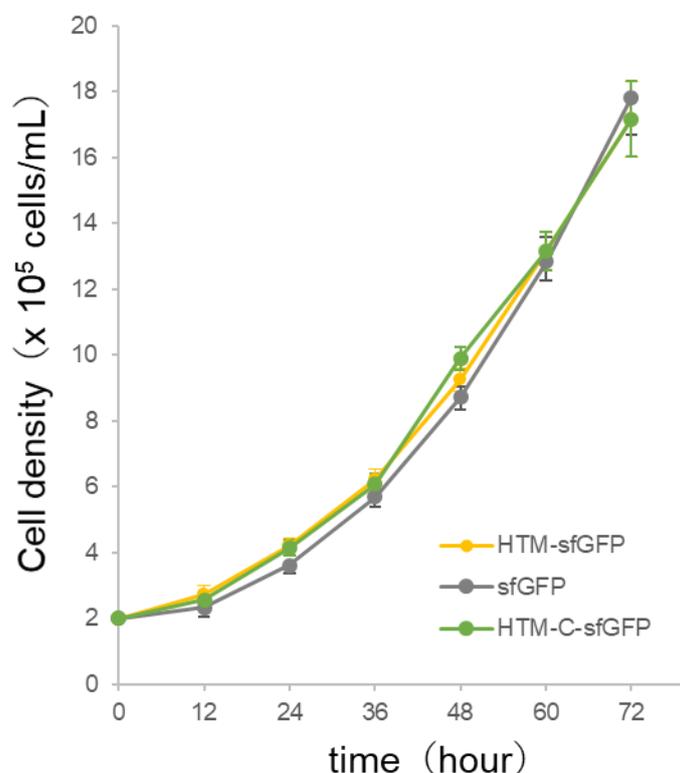


図 29 HTM-sfGFP、HTM-C-sfGFP の過剰発現が細胞増殖に与える影響

HTM-sfGFP、HTM-C-sfGFP、sfGFP を安定発現する HeLa 細胞の細胞増殖曲線。細胞増殖に大きな影響は見られなかった。6well ディッシュに 2×10^5 cells/mL で播種し、12 時間おきに細胞を回収し細胞密度を測定した。

SUV420H2 HTM による HP1 のヘテロクロマチン結合安定化

第3章後半では SUV420H2 HTM を過剰発現した細胞内での HP1 の細胞内局在や動態を解析し、SUV420H2 HTM の発現が HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化することを明らかにした (図 19、図 20、図 24、図 25)。各種 HTM 変異体についても HP1 の局在、動態に及ぼす影響について解析を行った (図 21、図 22、図 24、図 25)。HTM と比べると穏やかであるものの、HTM-N の発現は同様の効果を示した。反対に、HTM-C の発現は HP1 のヘテロクロマチン結合を不安定化させることが明らかになった。HTM、HTM-N、HTM-C に含まれる PXVXL-like モチーフの数に注目すると、複数の PXVXL-like モチーフを持つことが HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化に重要であるように思われた。先行研究ではクロモセーターに集積する HP1 が、SENP7 というタンパク質が持つ 2 つの PXVXL モチーフとの相互作用によって維持されていることが示唆されている (Romeo et al., 2015)。さらに、同論文では 1 つの PXVXL モチーフしか持たない HP1 結合モジュールの発現が HP1 のクロモセーターへの結合を不安定化させることが示された。このことを踏まえると、SUV420H2 HTM の発現も同様のメカニズムで HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化していると考えられた。ただし、HTM のモチーフ②の点変異体は、独立して HP1 と結合するモチーフ①とモチーフ③を残しているにもかかわらず、HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化しなかった (図 21、図 22、図 24、図 25)。このことから、HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化を引き起こす条件は単に 2 つの HP1 結合モチーフを持っているだけでは不十分であり、HTM による HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化にはモチーフ②が必須であることが示唆された。HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化には、二つの HP1 結合モチーフを持つだけでは不十分であり、それらが協調的に働くことが必要である可能性がある。HeLa 細胞において内在性 SUV420H2 による HP1 β のヘテロクロマチン結合安定性の制御についてノックアウト細胞を免疫染色することで調べたが、その影響はほとんど見られなかった。これはおそらく、SUV420H2 の発現量が低いためであると考えられた。

第4章 ヘテロクロマチン可視化プローブとしての 応用可能性の検証

4-0. 目的

第3章では、SUV420H2 HTM が複数の HP1 結合モチーフを使って安定的にヘテロクロマチンへ集積すること、HTM または HTM-C の過剰発現がそれぞれ HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化または不安定化させることを示した。ただし、HTM および HTM-C の発現は、増殖速度を遅らせることがなかったことから、低い発現レベルにおいてこれら HP1 結合モチーフの発現の細胞毒性は小さいことが示唆された。特に、HTM V374D は HP1 のヘテロクロマチン結合安定性にほとんど影響を及ぼさなかったことから、細胞への毒性やヘテロクロマチン構造への影響がさらに小さいと考えられる。これらの知見から、HP1 が結合する H3K9me3 が豊富なヘテロクロマチンの可視化プローブとして HTM V374D が応用可能であると考え、この応用可能性について検討を行った。

4-1. HTM V374D-sfGFP と sfGFP 融合 HP1 α の局在の比較

これまで、生細胞でヘテロクロマチンを追跡するためには GFP 融合型 HP1 が用いられてきた。しかしながら、ヒトの細胞などでは GFP 融合型 HP1 α の局在はヘテロクロマチン構造をはっきりと示さないことが知られていた (Nozawa et al., 2010, Dialynas et al., 2007)。そこで、HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP (HP1 α の C 末端に sfGFP が連結されたもの)、sfGFP-HP1 α (HP1 α の N 末端に sfGFP が連結されたもの) それぞれの局在パターンをマウス A9 細胞とヒト HeLa 細胞の両方で比較した。A9 細胞では、それら 4 つのタンパク質がヘキストで濃染されるクロモセーターに集積する様子が観察された (図 31A, B)。HTM-sfGFP と HTM V374D-sfGFP は、HP1 α -sfGFP および sfGFP-HP1 α に比べてコントラスト高くクロモセーターが標識された。

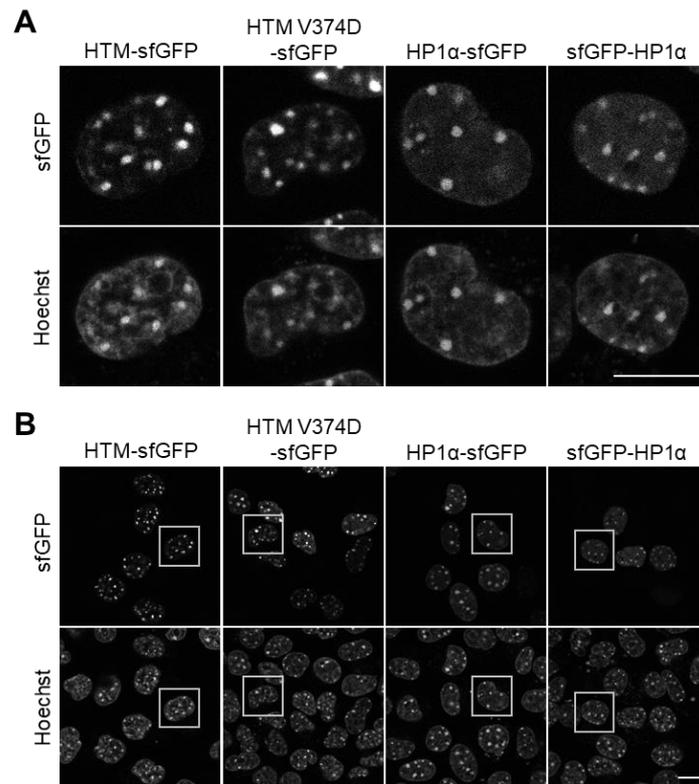


図 31 A9 細胞内での HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α の局在パターンの比較

(A) A9 細胞における HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α の核内局在。4 つすべてのタンパク質はヘキストでの羽扇されるクロモセーターを標識した。ただし、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α のコントラストは HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP に比べて低く見られた。(B) 複数の核を含む広視野の画像。白い枠線で囲った核が(A)で拡大されている。スケールバー:10 μ m

クロモセーターが見られない HeLa 細胞内では、これらのタンパク質の局在により顕著な違いが見られた。HTM V374D-sfGFP は H2B-Halo が豊富なヘテロクロマチン領域に濃縮されていたが、HP1 α -sfGFP や sfGFP-HP1 α は核内により広がっていた (図 32A、B)。画像のコントラストを定量的に比較するため、sfGFP の輝度値の変動係数 (Coefficient of variation) を求めた。この変動係数は、各々の核についてピクセル当たりの輝度値の標準偏差を核内の平均輝度値で標準化した値で、ヘテロクロマチン上の sfGFP の輝度値が高く、かつ、ヘテロクロマチン以外での sfGFP の輝度値が低いほど、大きな値を示す (Hilbert et al., 2021)。この変動係数のプロットは、HTM-sfGFP で最もコントラストが高いことを示した (図 32C)。これは、HTM-sfGFP が HP1 locking を引き起こすことと一貫している。HTM V374D-sfGFP は HTM-sfGFP より低いコントラストを示したが、HP1 α -sfGFP と sfGFP-HP1 α よりも高いコントラストを示した (図 32C)。このことは HP1 α の N 末端、C 末端に対する GFP の付加は HP1 α の局在に影響する可能性を示唆している。先行研究の多くは、HP1 の C 末端側への GFP 付

加が CSD を介した HP1 結合タンパク質との相互作用を阻害することを懸念して、N 末端側に GFP を付加した HP1 を用いているが(Hayakawa et al., 2003; Nozawa et al., 2010; Romeo et al., 2015)、ヒトの細胞では GFP-HP1 α が核内に分散したパターンを示すことが知られていた (Nozawa et al., 2010)。これはおそらく HP1 α の N 末端への sfGFP の付加が、N 末端側に存在する CD と H3K9me3 の相互作用に干渉するためであると考えられる。本実験結果においても、sfGFP-HP1 α は HP1 α -sfGFP よりも核質中のバックグラウンドが明るく見られた (図 32B)。また、HeLa 細胞では sfGFP-HP1 α と HP1 α -sfGFP では H2B-Halo とは排斥する領域に PML ボディと思われる微細な輝点が見られた (図 32B、赤矢印)。HP1 CSD は PML ボディの構成因子である SP100 と相互作用し、PML ボディに集積することが過去に報告されている (Lehming et al., 1998; Seeler et al., 1998; Hayakawa et al., 2003; Everett et al., 1999)。対照的に HP1 の CSD と結合する HTM V374D は、CSD を介して特定の領域に集積している HP1 には結合しないため PML ボディへの集積が見られない。この結果は HTM V374D-sfGFP が H3K9me3 に結合した HP1 を特異的に標識することを示している。

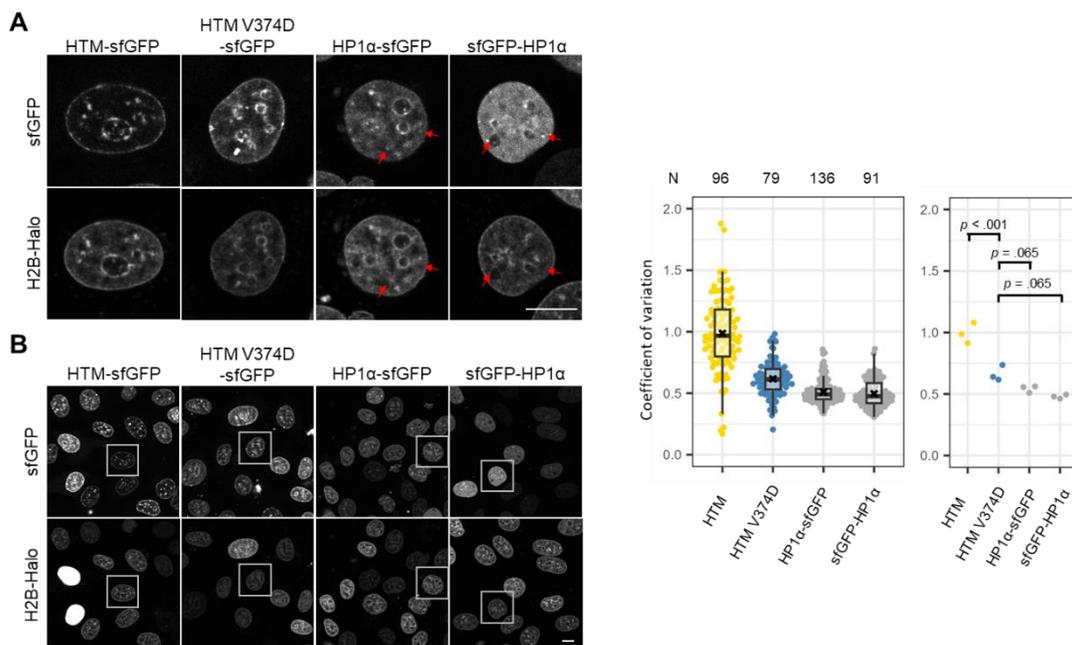


図 32 HeLa 細胞内での細胞内局在パターンの比較

(A) HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α それぞれの HeLa 細胞での核内局在。クロマチンマーカーとして H2B-Halo を共発現させた。HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP は、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α と比較して H2B-Halo が濃縮されているヘテロクロマチンをコントラスト高く標識した。赤矢印は H2B-Halo が重ならない sfGFP 融合 HP1 α の輝点 (PML ボディ) を指す。(B) 複数の核を含む広視野の画像。白い枠線で囲った核が(A)で拡大されている。(C) HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α の画像のコントラストの定量。HTM V374D-sfGFP は HTM ほどコントラストが高くないが、HP1 よりもコントラストが高かった。スケールバー:10 μ m P 値は Dunnett 検定から得た値を示す。

M期の細胞における HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α の局在パターンの比較を行った。M期では、リン酸化酵素 Aurora B の活性化によって H3 の S10 がリン酸化され、隣にある K9 の me2/me3 への HP1 CD の結合がブロックされる (Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2015)。そのため、HP1 α は染色体ほぼ全域から解離し、さらに CSD を介して染色体パッセンジャー複合体と結合することでセントロメア領域に再配置されることが知られている (Ainsztein et al., 1998; Minc et al., 1999; Hayakawa et al., 2003; Nozawa et al., 2010)。実際に、M期の細胞では HP1 α -sfGFP と sfGFP-HP1 α は、凝縮した染色体上にセントロメア様の輝点が見られた (図 33)。一方で HTM V374D-sfGFP はそのような輝点を示さなかった。これは、PML ボディへの集積が見られなかったことと同様に、CSD を介して集積している HP1 には結合しないためであると考えられる。しかしながら、予想外なことに、HTM-sfGFP は凝集した染色体の表面に結合していた (図 33)。このことは HTM が HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化によって、HP1 の異常な局在パターンを引き起こすことを示唆している。おそらく HTM によってヘテロクロマチンへの結合が安定化された HP1 が G2-M 期において Aurora B のヘテロクロマチンへの侵入またはヒストンテールへの結合をブロックしているためである。HTM-sfGFP が染色体表面に多く結合しているという観察結果は、Aurora B がインナーセントロメア領域に局在し、そのリン酸化活性は外側に向かって進むにつれて低下するという知見とも一貫している (Fuller et al., 2008)。

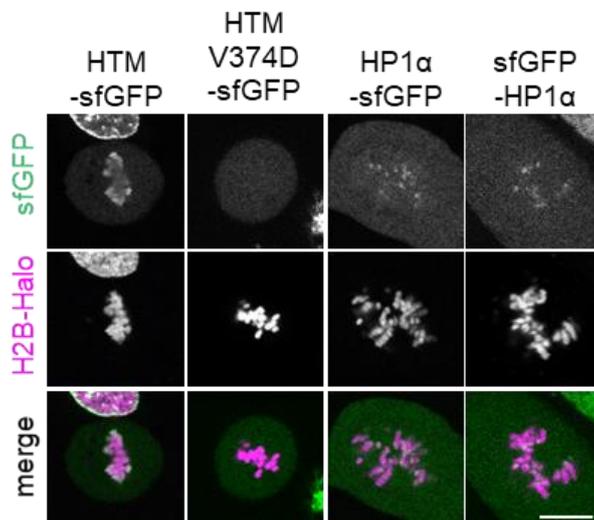


図 33 HTM-sfGFP は M 期の染色体上に結合する。

HeLa 細胞における HTM-sfGFP、HTM V374D-sfGFP、HP1 α -sfGFP、sfGFP-HP1 α の M 期細胞内局在パターン。グローバルなクロマチンマーカーとして H2B-Halo も共発現させている。HP1 α -sfGFP と sfGFP-HP1 α は M 期染色体上のセントロメアに集積した一方で、HTM-sfGFP は染色体表面に結合している様子が観察された。HTM V374D は細胞質中に分散して存在した。スケールバー:10 μ m

HTM-sfGFP 発現細胞における M 期での HP1 の局在を観察するため、sfCherry-HP1 α と HTM-sfGFP を共発現した HeLa 細胞の観察を行った。その結果、どちらのタンパク質も大部分が細胞質に分散したが、凝集した染色体の表面に集積している様子が観察され、セントロメア上の sfCherry-HP1 α の集積は見られなくなった (図 34)。これらの結果から、HP1 のヘテロクロマチン結合安定化を引き起こす HTM-sfGFP の発現は、HP1 のヘテロクロマチン結合安定性に影響するだけでなく、HP1 の誤った局在化を引き起こすことが示唆された。対照的に、HTM V374D-sfGFP 発現細胞では、HTM V374D-sfGFP は M 期の染色体から解離し、かつ、sfCherry-HP1 α はセントロメアに集積した (図 34)。したがって、HTM V374D-sfGFP は HP1 の動態に影響が小さく、HP1 が結合するヘテロクロマチンの可視化プローブとして応用できる可能性がある。

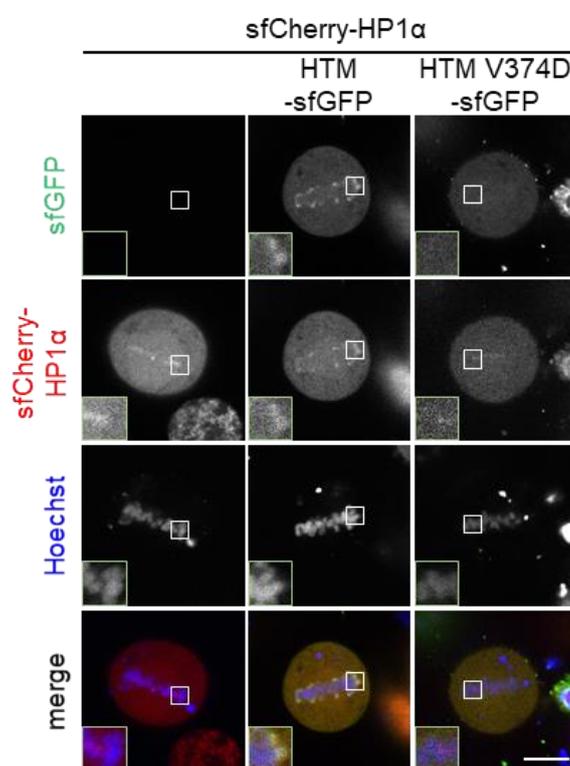


図 34 HTM-sfGFP の発現により、sfCherry-HP1 α の誤った局在を促進する。

HTM-sfGFP または HTM V374D-sfGFP と共発現した HeLa 細胞における sfCherry-HP1 α の局在パターン(M 期)。DNA はヘキストによって染色した。HTM-sfGFP の共発現により、sfCherry-HP1 α は染色体表面に集積し、セントロメア上の集積は見られなくなった。HTM V374D-sfGFP の共発現では sfCherry-HP1 α 誤った局在は見られなかった。スケールバー:10 μ m

4-2. 生細胞内における H3K9me3 が豊富なヘテロクロマチンの追跡への応用

HTM V374D-sfGFP が生細胞ヘテロクロマチンマーカーとして利用可能であるかを検証するために、複製中のクロモセンターにおける HTM V374D-sfGFP の動態を追跡した。過去の研究では、ヘテロクロマチンの複製は HP1 リッチドメインの縁から始まり、複製された DNA はヘテロクロマチンの中心部へと移動することが報告されている (Quivy et al., 2004)。しかしながら、複製を受けるヘテロクロマチン上での HP1 の動態を生細胞で追跡した例はなかった。そこで、HTM V374D-sfGFP に加えて、DNA 複製反応が進行中の領域のマーカーとして汎用される PCNA-mCherry とグローバルなクロマチンマーカーである H2B-Halo との安定共発現 A9 細胞を作製した (Chagin et al., 2016; Leonhardt et al., 2000)。PCNA (proliferating cell nuclear antigen) は DNA ポリメラーゼ (δ , η) をリクルートする DNA 複製反応に必須な補助因子で、まさに複製されている最中の DNA に結合する (Leonhardt et al., 2000)。

タイムラプス観察の結果、mCherry-PCNA は HTM V374D-sfGFP が豊富なドメインの周囲から集積し始め (図 35、03:30)、つづいて、クロモセンターの中心方向に拡大していく様子が観察された (図 35、3:30-5:00)。その後、mCherry-PCNA はクロモセンターの中心まで進行する一方で、同時期にクロモセンターの縁から徐々に解離し始め、最終的には DNA 複製が完了するとクロモセンターの中心部からも解離し foci が消失した (図 35、5:00-8:00)。これに対して、HTM-V374D-sfGFP の輝点ははじめに輪郭がぼやけ、中心部が暗くなり、その後ドーナツ型の形状に変化した (図 35、03:30-05:00)。DNA 複製が完了し mCherry-PCNA のシグナルが減少すると、HTM-V374D-sfGFP は再び楕円形の輝点を再形成した (図 35、05:00-8:00)。この観察から、DNA 複製中のヘテロクロマチンでは HP1 が一時的に解離する、またはヘテロクロマチン構造の脱凝縮が起きていることを示唆した (Chagin et al., 2019; Leonhardt et al., 2000)。以上から、HTM V374D は HP1 が結合する H3K9me3 が豊富なヘテロクロマチンの追跡に利用可能であることが実証された。

先行研究によると PCNA は代表的な HP1 結合タンパク質の一つであるクロマチン構築因子 CAF-1 のサブユニット p150 と結合する (Moggs et al., 2000)。さらに、CAF-1 p150 の HP1 結合活性はクロモセンター上に濃縮された HP1 の取り外しとヘテロクロマチンの複製に必要であり、p150 のノックダウンは S 期の停止を引き起こすことが報告されている (Quivy et al., 2008)。H3K9me3 のヒストンメチル化酵素の Suv39h1 と Suv39h2 のダブルノックアウト細胞では、H3K9me3 の枯渇によって、クロモセンター上に HP1 の集積が見られないが、この細胞への CAF-1 p150 ノックダウンは S 期の停止を引き起こさない (Quivy et al., 2008)。このことから、CAF-1 は HP1 をクロマチンから引き離すことで、ヘテロクロマチンの複製の進行を促進することが示唆されていた。こうした過去の知見と合わせて考えると、複製中のヘテロクロマチン内で PCNA が蓄

積した部分において HTM V374D-sfGFP のシグナルが薄まっていたという観察結果は、ヘテロクロマチンの複製時には、HP1 が一時的にクロマチンから引き離すというモデルを補強した (図 35)。

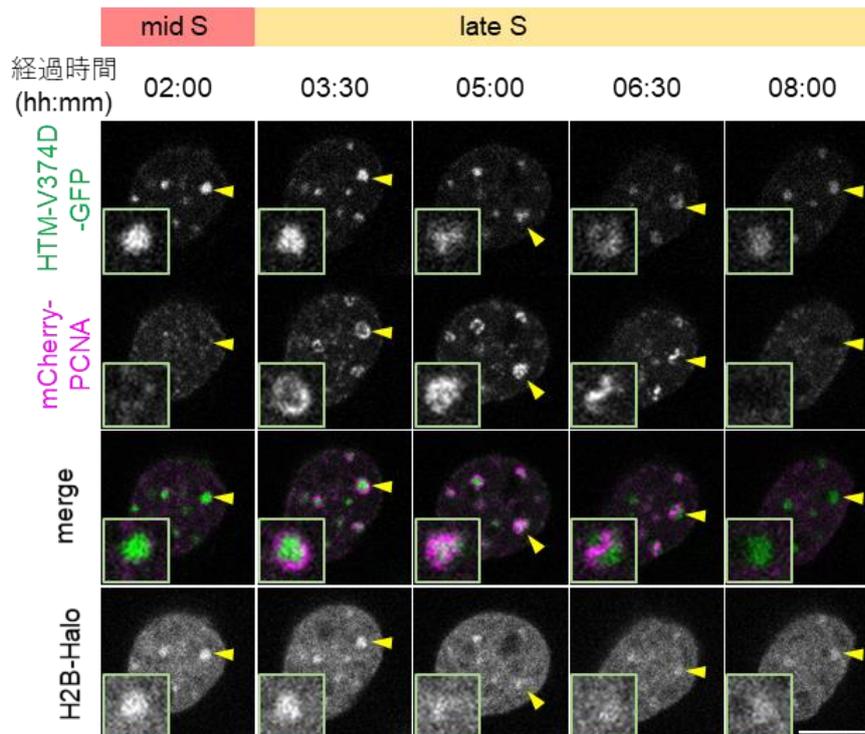


図 35 複製中のクロモセンターにおける HTM V374D-sfGFP の動態

S 期中期(mid S)の後半から S 期後期(late S)にクロモセンターが複製される様子の観察。HTM V374D-sfGFP に加えて、複製中の DNA 領域のマーカ―とクロマチン全体のマーカ―として mCherry-PCNA、H2B-Halo を安定的に共発現する A9 細胞を作製し、タイムラプス観察を行った。撮影は 5 分間隔で行い、各タイムポイントで Z 軸方向に 0.5 μ m 間隔で 9 枚撮影した。mCherry-PCNA が集積する領域で HTM V374D および H2B-Halo のシグナルが薄いことが観察された。スケールバー：10 μ m

4-3. 小括

第4章では、第3章でHP1のヘテロクロマチン結合安定性に影響しないことが示唆されたHTM V374D-sfGFPについて、ライブイメージングプローブへの応用可能性を検証した。これまでヘテロクロマチンの標識や追跡に用いられていたGFP融合型HP1 α と比較して、HTM V374D-sfGFPはより高いコントラストでヘテロクロマチンを標識した。このことは、GFPのようなかさ高いタグの付加がHP1 α の局在に影響することを示唆した。HTM-sfGFPの発現はM期のsfCherry-HP1 α の誤った局在化を引き起こしたのに対して、HTM V374D-sfGFPの発現ではsfCherry-HP1 α の局在に大きな変化は見られなかった。さらに、GFP融合型HP1 α ではPMLボディやM期染色体上のセントロメアへの集積が見られるのに対して、HTM V374Dでは見られなかった。このことはHTM V374D-sfGFPがH3K9me3に結合するHP1を特異的に可視化するプローブとして使用可能なことを示唆した(図36)。

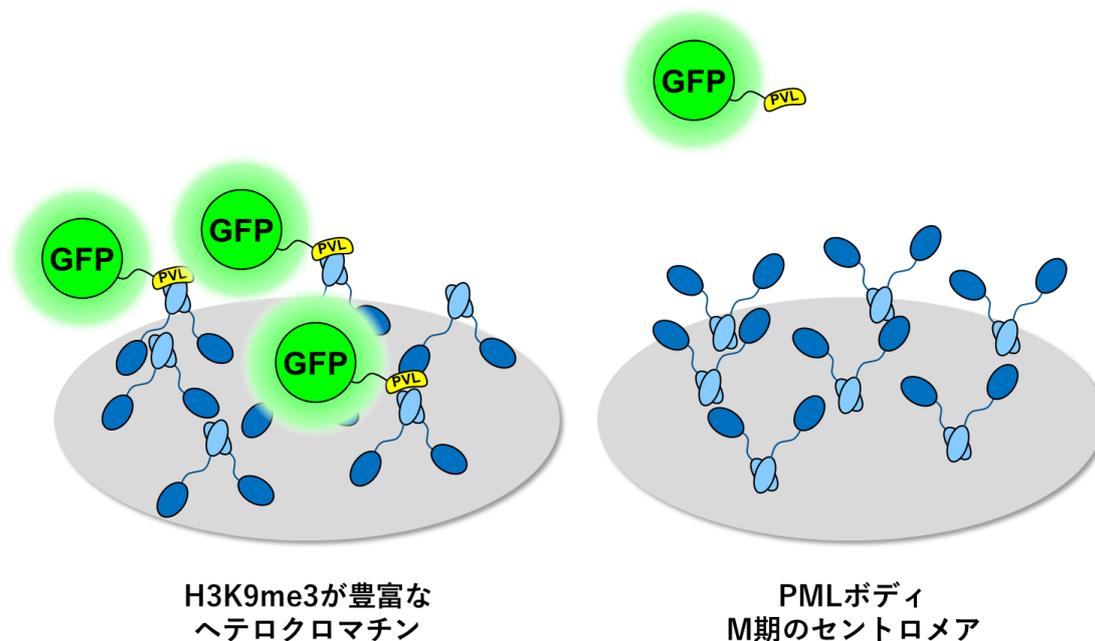


図36 HP1結合モチーフベースのヘテロクロマチンプローブはセントロメアやPMLボディに集積しない

最後に、HTM V374Dを利用してクロモセンターの複製におけるHP1の動態を追跡し、HTM V374DがH3K9me3の濃縮されたヘテロクロマチンの可視化に応用可能であることを実証した(図35)。これまでに、クロモセンターの複製時におけるHP1の動態を生細胞で追跡した例はなかった。今回、HTM V374D-sfGFPのタイムラプス観察の結果から、HP1は複製されているクロマチンから外されているもしくはクロマチンが脱凝縮している可能性が示唆された。過去の報告によると、PCNAはクロマチン構築因子CAF1をリクルートすること、CAF-1はHP1をヘテロクロマチンから外

すことでヘテロクロマチンの複製の進行を促すことが示唆されている (Quivy et al., 2008)。今回の観察の結果は、複製中の領域において HP1 が実際に薄くなっていることを示しており、ヘテロクロマチンの複製中には CAF-1 による HP1 の取り外しが行われるというモデルを支持した。

第5章 考察

5-1. モチーフ②、zinc finger-like モチーフによる HP1 相互作用の安定化

本研究では、SUV420H2 HTM の安定的にヘテロクロマチンに集積するメカニズムを調べた。SUV420H2 は HP1 の結合モチーフのコンセンサス配列 PXVXL に似た配列 (PXVXL-like モチーフ) を 3 つ持つことで安定的にヘテロクロマチンに結合することを明らかにした (図 10-16、図 37)。HTM-N にある 2 つのモチーフ (モチーフ①と②) と HTM-C にある 1 つのモチーフ (モチーフ③) は独立に HP1 と結合し、クロモセーターへの集積を示した (図 12、図 13、図 15、図 16)。モチーフ①と②は協調的に働き、HTM-N の安定的なクロモセーターへの集積には両方のモチーフが必要であった一方で (図 12)、HP1 との相互作用およびクロモセーターへの集積を破壊するにはモチーフ①の点変異導入で十分であった (図 12、図 15)。このことは、モチーフ①が HP1 と結合しており、モチーフ②はモチーフ①と HP1 との相互作用を補助することを示唆した。さらに、モチーフ①と②の間に 1 つのヒスチジンと 2 つのシステインが進化的に保存されていることを見出し、ヘテロクロマチンへの集積に必須であることを示した。また、柔軟なリンカー挿入により立体構造が取れなくなった変異体はクロモセーターへの集積が弱まったことから、モチーフ①と②の立体的な配置が重要であることが示唆された。システイン/ヒスチジンの重要性から、zinc finger モチーフに似た構造を取っていると予想された。この構造を取ることで HTM-N の 2 つの PXVXL-like モチーフの立体配置を調節し、協調的な HP1 およびヘテロクロマチンとの結合に寄与していることが示唆された。

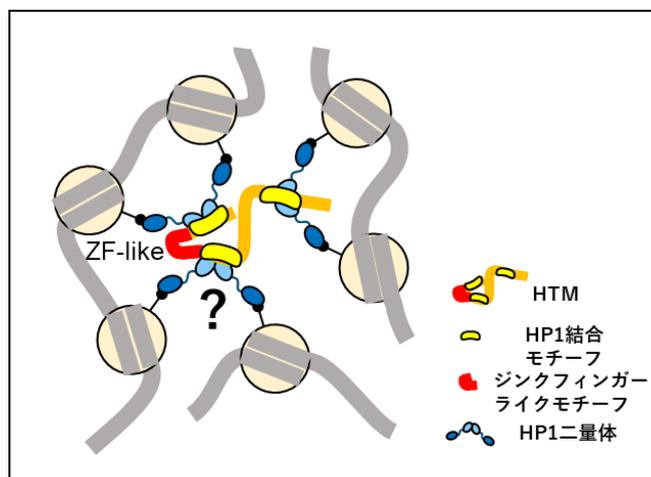


図 37 HTM の安定的なヘテロクロマチン結合のモデル図

しかしながら、HP1 が結合する PXVXL を含むモジュールの多くは天然変性領域に存在する。現在のところ、SUV420H2 HTM の構造解析は行われていない。そこで、AlphaFold2 によって予測された SUV420H2 の立体構造を Uniprot のデータベースから調べた (図 38)。AlphaFold2 は AI を使ってアミノ酸配列情報からタンパク質の立体構

造を精度よく予測するソフトウェアで、Uniprot に公開されているタンパク質は、AlphaFold2 による予測構造が公開されている。予想された通り、HTM 周辺の構造については、信頼度を意味する pLDDT 値が低く、HTM が天然変性領域である可能性が示唆された。保存された3つのヒスチジン/システインはターンを形成しており(図 38)、それらのアミノ酸残基はターンの内側を向くように配置されていた。ただし、pLDDT 値が低いことから、実際に HTM がこの構造を取るかは実験的に調べる必要がある。現時点で AlphaFold2 の構造予測では亜鉛イオンの有無などを条件に設定できないため、亜鉛イオンを含む構造と含まない構造を参照し構造を予測していることも、pLDDT 値が低い要因の一つである可能性がある。

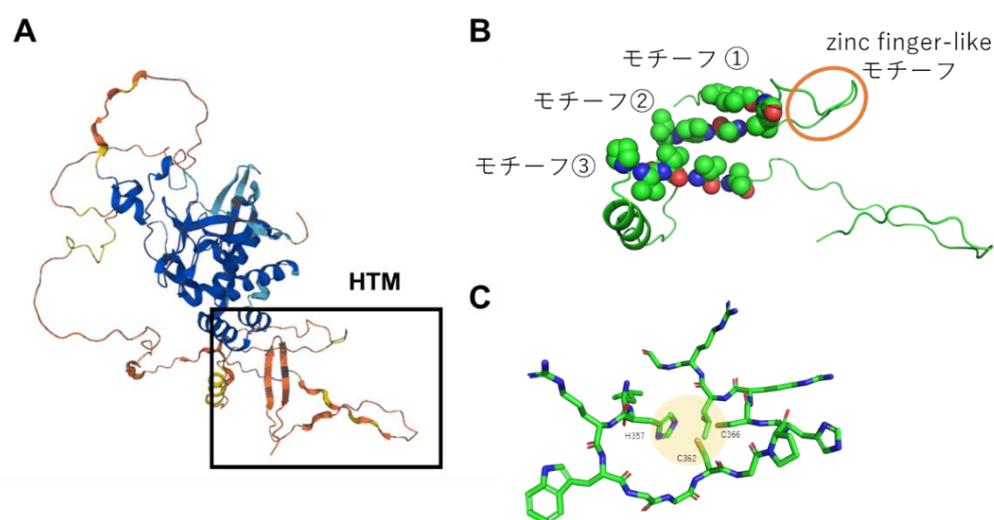


図 38 AlphaFold で予測された SUV420H2 HTM の構造

(A) SUV420H2 全体の予測構造 (AF-Q86Y97-F1)。色は構造の信頼度の指標である pLDDT 値を示す。青色：100>pLDDT>90、水色：90>pLDDT>70、黄色：70>pLDDT>50、橙色：50>pLDDT。(B) HTM 領域の拡大図。PXVXL-like モチーフを sphere で表示した。zinc finger like モチーフの部分でターンを形成している。(C) zinc finger like モチーフ周辺部分の詳細な構造。保存されたヒスチジン/システイン残基はターンの中心方向に向いている。

zinc finger モチーフには構造的な特徴が異なる様々なバリエーションが存在することが知られているが、どの構造においても、一つの亜鉛イオンは4つのヒスチジン/システインと相互作用する (Neuhaus, 2022)。HTM は保存されたヒスチジン/システインを3つしか持たないため(図 17)、このヒスチジン/システインが本当に亜鉛イオンと相互作用をするのかについては、実験的に検証する必要がある。興味深いことに、マウス HP1 β の CSD と CAF1 p150 由来の HP1 結合モジュールの複合体の構造を見る

と、HP1 は CSD dimer が形成する hydrophobic groove の横にヒスチジン残基 (H171) を持っていた (図 39)。私は、hydrophobic groove の横に存在する HP1 のヒスチジン残基 (H171) と HTM-N のもつ 3 つのヒスチジン/システインが、分子間で zinc finger モチーフを形成し亜鉛イオンと結合することで、モチーフ①と HP1 の結合の安定性に寄与しているというモデルを提唱する。このモデルでは、分子間での zinc finger モチーフの形成は、HTM-N のモチーフ①と CSD 二量体の結合を補助する可能性があるだけでなく、モチーフ②の配置および配向性を CSD 二量体から離れる方向に調節し、別の HP1 CSD との二量体形成を促進している可能性がある。このモデルは、本研究における二つの実験結果、HTM-N のヒスチジン、システイン点変異体が細胞内に均一に分布したこと (図 17)、リンカー挿入変異体がクロモセーターに集積するものの低いヘテロクロマチン濃縮率を示したこと (図 18) の両方を説明可能である。このモデルを実証するためには、HP1 と HTM-N の複合体形成の化学両論比や個々の PXVXL-like モチーフと HP1 の親和性、HP1 の H171 の点変異体との相互作用を調べるのが今後の課題である。

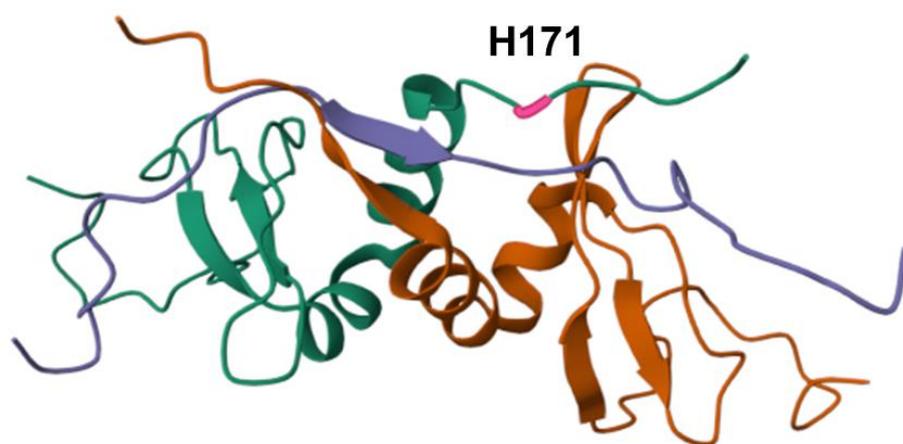


図 39 既知の HP1 β CSD 二量体と CAF-1 p150 の PXVXL モチーフの複合体の構造
マウス HP1 β の CSD 二量体 (緑色と橙色) と CAF-1 p150 の PXVXL モチーフを含むペプチド (紫色) の複合体構造 (1S4Z)。結合部分の近傍に CSD の C 末端のヒスチジン (H171、ピンク色で示すアミノ酸) が配置されている。

5-2. HP1 結合タンパク質による HP1 動態の制御

第3章後半では、HTM および各種変異体が HP1 のヘテロクロマチン結合安定性にどのように影響するかについて解析した。HTM、HTM-N の発現は HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化させ（図 19-25）、対照的に、HTM-C の発現は HP1 のヘテロクロマチン結合を不安定化した（図 21、図 22、図 24、図 25）。このことから、ヘテロクロマチンに結合する HP1 は、複数の HP1 結合モチーフを持つタンパク質によって安定化され、単一の HP1 結合モチーフを持つタンパク質によって不安定化されており、それらの発現量のバランスによって調節されていると考えられる（図 40）。実際に、過去の報告によると、クロモセンターに集積する HP1 は複数の HP1 結合モチーフを持つ SENP7 や ORC によって維持されていることが示されている。SUV420H2 のノックアウトによって HP1 β の局在に影響が見られなかったことは、HeLa 細胞において SUV420H2 の発現量が他の HP1 結合タンパク質に比べて低いことを示唆している。

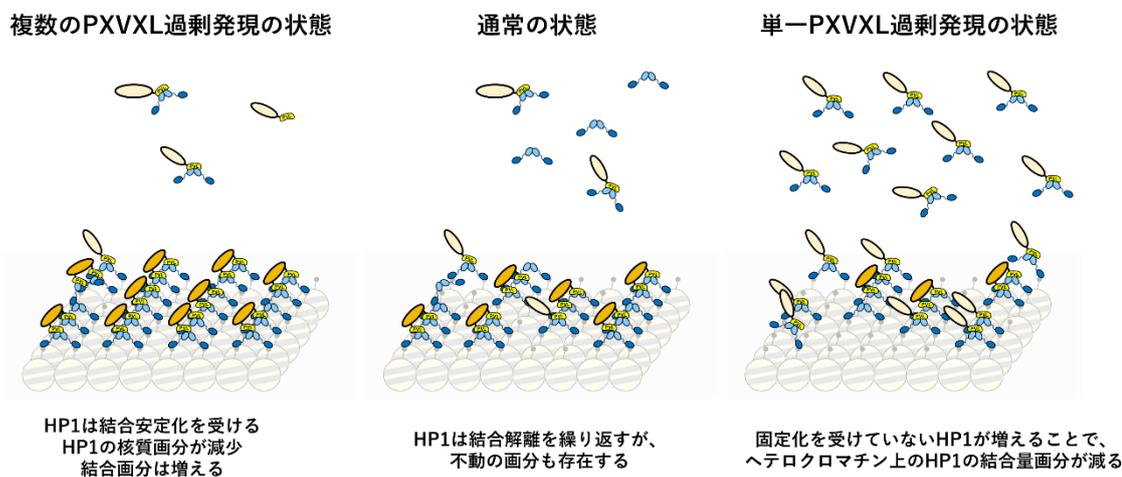


図 40 ヘテロクロマチンに結合する HP1 は HP1 結合タンパク質群により調節・維持される

通常の条件下では複数の PXVXL モチーフを持つタンパク質と単一の PXVXL モチーフを持つタンパク質が混在しており、ヘテロクロマチンに結合する HP1 はそれらの発現量のバランスによって調節されている（中央）。複数の PXVXL モチーフを含む HP1 結合モジュールの過剰発現は HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化を促進する（左）。反対に単一の PXVXL モチーフを含む HP1 結合モジュールの過剰発現は HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化させる（右）。

予想外にも、HTM V374D は HP1 結合モチーフを 2 つ持つが、HP1 のヘテロクロマチン結合安定化を引き起こさなかった (図 21、図 22、図 24、図 25)。このことは HP1 のヘテロクロマチン結合安定化の作用を持つか決定する要因として、HP1 結合モチーフの数だけでなく、2 つの HP1 結合モチーフの適切な立体配置をとることが重要であることを示唆した。HTM-N 内の 2 つの PXVXL-like モチーフは間に 16 アミノ酸しか持たない上に、zinc finger-like モチーフによってターンが形成されている可能性があり、より近接していることが予想される。クロモセンターに局在する HP1 の維持に働く ENP7 は 2 つの PXVXL モチーフを持つが、一次構造ではそれらは aa 91-95 と 157-161 の位置に存在し、67 アミノ酸も離れている。立体構造を形成した場合には空間的に近い位置に存在する可能性があるため、AlphaFold2 による予測構造を調べると、2 つの HP1 結合モチーフは近くに存在していた (図 41)。さらに PXVXL モチーフのすぐ横に位置する 2 つの領域 aa 98-110、164-173 は、信頼度は低いものの局所的なヘリックス構造を示しており、これらが相互作用するかは不明であるが、2 つの PXVXL モチーフの立体的な位置関係を制御している可能性がある。以上のことから、HP1 のヘテロクロマチン結合安定化には 2 つの HP1 結合モチーフが立体的に近い位置に存在することが重要である可能性がある。

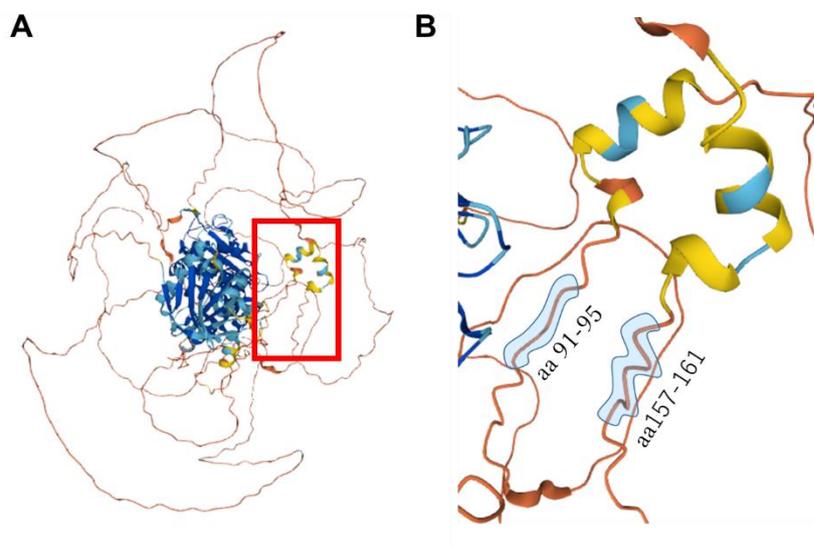


図 41 AlphaFold によって予測された SENP7 の構造

(A) SENP7 全体の予測された構造 (AF-Q8BUH8-F1)。色は構造の信頼度の指標である pLDDT 値を示す。青色：pLDDT>90、水色：90>pLDDT>70、黄色：70>pLDDT>50、橙色：50>pLDDT。この予測された構造では 2 つの PXVXL モチーフは近傍に存在した。これらのモチーフが存在する大まかな位置を赤枠で示す。(B) 2 つの HP1 結合モチーフの位置と周囲の予測された構造。2 つの PXVXL モチーフ (aa91-95 と 157-161 に位置する) はどちらも二次構造形成を示さなかった。pLDDT 値は低いものの、隣接するアミノ酸配列がヘリックス構造を形成していた。

5-3. HTM-N がヘテロクロマチン上で2つの HP1 二量体と結合する可能性

HTM-N の 2 つの HP1 結合モチーフは、間に 16 アミノ酸しか持たず近接しているからこそ立体的な障害が増えることで、かえって 2 つの HP1 CSD 二量体と結合できない可能性も考えられる。しかしながら、EMSY という HP1 結合タンパク質は間に 8 アミノ酸しか持たない近接する 2 つの HP1 結合モチーフを持ち、これらはそれぞれ異なる HP1 CSD 二量体と結合することが結晶構造解析により明らかにされた (Huang et al., 2006, RCSB PDB: 2FMM) (図 42)。したがって、HTM-N の持つ 2 つの HP1 結合モチーフについても、それぞれ異なる HP1 CSD 二量体と結合する可能性がある。

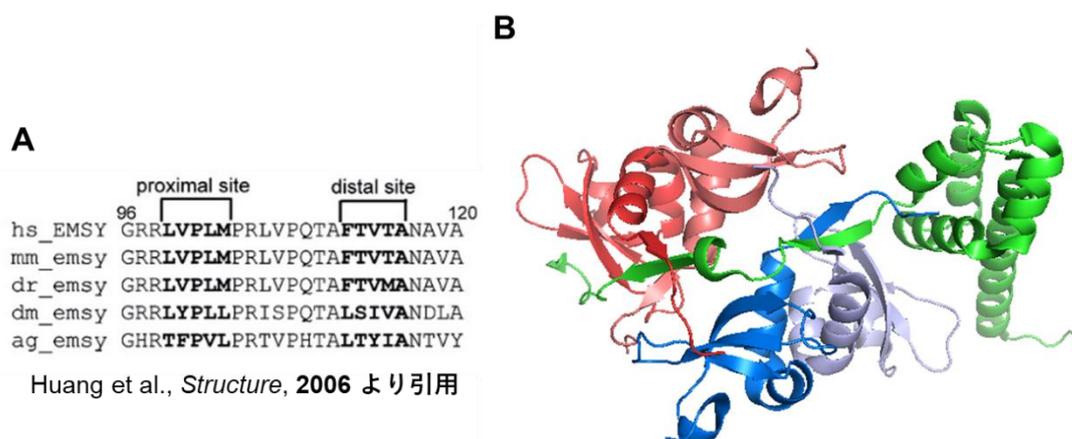


図 42 EMSY の HP1 結合モジュールの配列と HP1 との複合体の立体構造

(A) EMSY の HP1 結合モジュールのアミノ酸配列。Huang et al., *Structure*, 2006 の図から引用した。(B) EMSY と 4 つの HP1 CSD の複合体の立体構造 (RCSB PDB: 2FMM)。EMSY を緑で表示し、4 つの HP1 CSD はそれぞれ赤色、ピンク、青色、灰色で表示した。赤色とピンク、青色と灰色の CSD がそれぞれ二量体を形成し、それぞれ異なる HP1 結合モチーフ (β ストランド構造を取った領域) と結合している。

では HTM-N と 4 分子の HP1 の複合体がヘテロクロマチンに結合できるのだろうか? Machida らの報告によれば、HP1 二量体はリンカーDNA でつながった隣り合う 2 つのヌクレオソーム (ジヌクレオソーム) と橋渡しするように結合することができる (Machida et al., 2018)。したがって、HTM-N と 4 分子の HP1 の複合体は立体的に近傍に存在するジヌクレオソーム間を橋渡しする可能性がある。Kilic らは 12-mer のヌクレオソームが連なったクロマチン繊維を再構成して構造解析を行い、さらに FRET を用いてヌクレオソーム間やリンカーDNA 間の距離を測定している (Kilic et al., 2018)。この報告によればシスに並んだトリヌクレオソームのリンカーDNA 間が最短で 4.2 nm まで近づきうることが示されている。EMSY との複合体の立体構造 (Huang et al., 2006, RCSB PDB: 2FMM) から測定すると、HP1 CSD 二量体の厚さは > 2 nm 程度であった。このことを踏まえると、4.2 nm という距離は、HTM-N と 4 つの HP1 の複合体が結合するのに十分に近い位置であると予想

される。したがって HTM-N はシスに並んだヌクレオソームに結合する 2つの HP1 とも結合する可能性がある。

5-4. H4K20me3 による HP1 のヘテロクロマチン結合安定化

SUV420H1/H2 のダブルノックアウト細胞では H3K9me3 が豊富なヘテロクロマチン上の HP1 のシグナルに大きな減少は見られなかった (図 27)。一方で、HTM-sfGFP の過剰発現による HP1 のヘテロクロマチン結合安定化の効果が野生型 HeLa と比べて減少した (図 28)。すなわち、SUV420H1/H2 ダブルノックアウト細胞では、HP1 が HTM によるヘテロクロマチン結合の安定化を受けにくくなっていることを示している。このことは H4K20me3 に HP1 の集積およびヘテロクロマチンの形成を促進するフィードバックの機能があることを示唆している。H4K20me3 の濃縮が HP1 の局在制御に関与するかについては、より直接的に調べる必要がある。近年、DNA メチル基転移酵素 DNMT1 や ORC に結合する ORCA/LRWD1 が H4K20me3 に結合することが報告された (Vermeulen et al., 2010; Ren et al., 2021)。これらのタンパク質には HP1 も結合することから、H4K20me3 はこれらの因子と結合することで、HP1 が安定的に結合できる足場の形成に貢献している可能性がある。(図 43)。

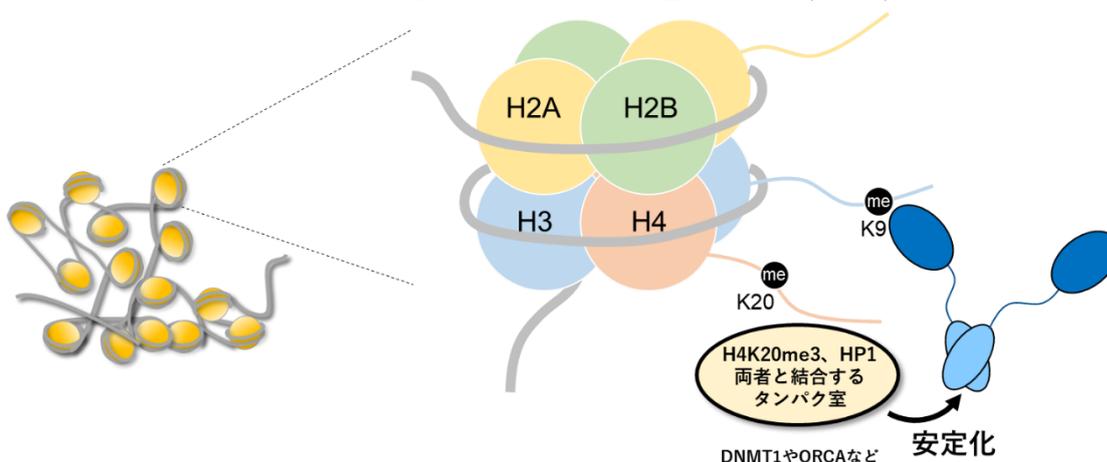


図 43 H4K20me3 が HP1 のヘテロクロマチン結合量の許容量を上昇させるモデル

H4K20me3 に結合する DNMT1 や ORCA/LRWD1 は HP1 とも結合することが知られている。H4K20me3 はこれらの因子と結合することで、HP1 の安定的な結合の足場の形成に貢献しているのかもしれない。

5-5. HTM V374D-sfGFP を用いたヘテロクロマチン動態の追跡

HTM V374D-sfGFP は HP1 のヘテロクロマチン結合安定化、不安定化のどちらも引き起こさないことから (図 19-25)、H3K9me3 に結合する HP1 を介してヘテロクロマチンの可視化に利用可能であると考えられた。特に、FRAP 解析の結果 (図 25) は、HTM V374D-sfGFP が sfCherry-HP1 α のヘテロクロマチンとの結合解離速度に影響しないことを直接的に示しており、生細胞イメージングへの応用に適当であることを強く示唆している。実際に、HTM-sfGFP は分裂期の細胞内において HP1 の誤った局在化を引き起こした一方で、HTM V374D-sfGFP ではこうした HP1 の局在への影響は見られなかった。ヘテロクロマチンは蛍光タンパク質を融合した HP1 で可視化することも可能であり、実際に GFP を付加した HP1 はマウスではクロモセーターを標識するが (図 33)、ヒトの細胞内ではコントラストが低かった (図 34)。このことは、N 末端もしくは C 末端へのかさ高いタンパク質の付加が H3K9me3 との結合または HP1 結合タンパク質との結合に干渉することを示唆している。また、GFP 融合型 HP1 は CSD を介して H3K9me3 非依存的に PML ボディや M 期染色体のセントロメアに集積する様子も見られ、必ずしもヘテロクロマチンを示さなかった。対照的に、HTM V374D-sfGFP はすでに他の HP1 結合タンパク質と結合した HP1 を認識できないため、ヘテロクロマチンに結合した HP1 を特異的に可視化する。HTM V374D-sfGFP は HP1 CSD と他の HP1 結合因子をブロックする可能性があるが、HTM V374D-sfGFP は HP1 の動態に影響を与えないことから、比較的低い発現レベルではブロッキングの効果は最小限に抑えられると考えられる。実際に、HTM V374D-sfGFP は、mCherry-PCNA と共発現させることで S 期中期から S 期後期に複製されるクロモセーター内の DNA 複製を追跡することができた (図 35)。その観察から、HTM V374D-sfGFP のシグナルは複製 foci で薄くなっており、複製中のクロモセーターから HP1 が解離する、または、クロマチンが脱凝縮することが示唆された。以上から、HTM 374D-sfGFP が生細胞内ヘテロクロマチン動態追跡に応用可能であると結論付ける。

5-6. H3K9me3 ヘテロクロマチンの生細胞イメージングプローブ

本研究で開発した HTM V374D-sfGFP は、H3K9me3 ヘテロクロマチン上に結合する HP1 と結合することで、ヘテロクロマチン領域を標識した。対照的に、HP1 のクロモドメインを利用して H3K9me3 に直接結合する生細胞内プローブとして過去に開発されている (Sánchez et al., 2019; Villaseñor et al., 2020; Sasaki et al., 2022)。ただし、HP1 のクロモドメインを利用しているため、HP1 結合モチーフ型のプローブや内在性 HP1 と同様に H3S10ph に結合を阻まれる可能性がある (図 44)。また、HP1 結合モチーフ型のプローブの懸念点には、本研究結果で示したように、HP1 のヘテロクロマチンへの結合を安定化する可能性や、HP1 結合タンパク質をブロックする可能性が考えられる一方で、クロモドメインを利用したプローブはクロドメイン 2 つを連結させるこ

とで親和性を増強しているため、HP1 などの H3K9me3 の結合因子を直接的にブロックする可能性やクロマチンを圧縮する効果が見られる潜在的な危険性がある (図 44)。

生細胞イメージングプローブは、生きたまま観察対象の動態を観察できる代わりに、標的分子との結合による阻害効果について常に注意を払わなければならない。今回開発したヘテロクロマチン可視化プローブは既存のものとは標的分子が異なるヘテロクロマチン動態の観察方法を提供しており、より多層的なヘテロクロマチン動態の理解につながると期待される。

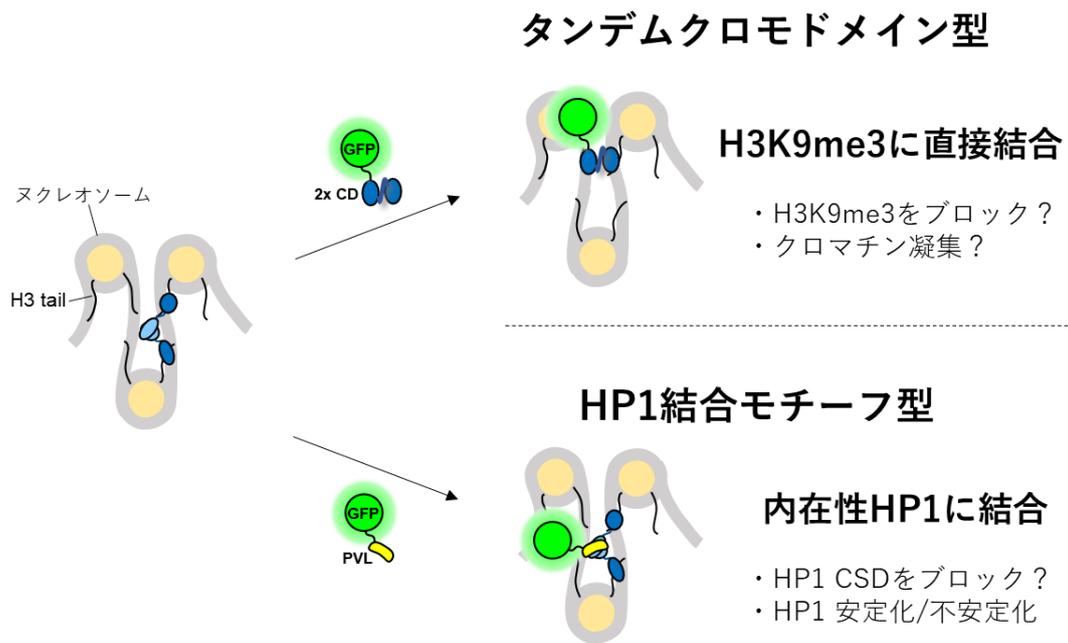


図 44 クロモドメインを応用したプローブと HP1 結合モチーフを応用したプローブの違い

引用文献

Allshire, R. C., & Madhani, H. D. (2018). Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(4), 229–244. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.119>

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C., & Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410(6824), 120–124. <https://doi.org/10.1038/35065138>

Becker, J. S., Nicetto, D., & Zaret, K. S. (2016). H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. *Trends in genetics*, 32(1), 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>

Boonsanay, V., Mosa, M. H., Looso, M., Weichenhan, D., Ceteci, F., Pudelko, L., Lechel, A., Michel, C. S., Künne, C., Farin, H. F., Plass, C., & Greten, F. R. (2023). Loss of SUV420H2-Dependent Chromatin Compaction Drives Right-Sided Colon Cancer Progression. *Gastroenterology*, 164(2), 214–227. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.10.036>

Bosch-Presegué, L., Raurell-Vila, H., Thackray, J. K., González, J., Casal, C., Kane-Goldsmith, N., Vizoso, M., Brown, J. P., Gómez, A., Ausió, J., Zimmermann, T., Esteller, M., Schotta, G., Singh, P. B., Serrano, L., & Vaquero, A. (2017). Mammalian HP1 Isoforms Have Specific Roles in Heterochromatin Structure and Organization. *Cell reports*, 21(8), 2048–2057. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.092>

Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J., & Mer, G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, 127(7), 1361–1373. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.043>

Brasher, S. V., Smith, B. O., Fogh, R. H., Nietlispach, D., Thiru, A., Nielsen, P. R., Broadhurst, R. W., Ball, L. J., Murzina, N. V., & Laue, E. D. (2000). The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *The EMBO journal*, 19(7), 1587–1597. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1587>

Brustel, J., Kirstein, N., Izard, F., Grimaud, C., Prorok, P., Cayrou, C., Schotta, G., Abdelsamie, A. F., Déjardin, J., Méchali, M., Baldacci, G., Sardet, C., Cadoret, J. C., Schepers, A., & Julien, E. (2017). Histone H4K20 tri-methylation at late-firing origins ensures timely heterochromatin replication. *The EMBO journal*, 36(18), 2726–2741. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796541>

- Canzio, D., Larson, A., & Narlikar, G. J. (2014). Mechanisms of functional promiscuity by HP1 proteins. *Trends in cell biology*, 24(6), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.01.002> .
- Chagin, V. O., Casas-Delucchi, C. S., Reinhart, M., Schermelleh, L., Markaki, Y., Maiser, A., Bolius, J. J., Bensimon, A., Fillies, M., Domaing, P., Rozanov, Y. M., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2016). 4D Visualization of replication foci in mammalian cells corresponding to individual replicons. *Nature communications*, 7, 11231. <https://doi.org/10.1038/ncomms11231>
- Chagin, V. O., Reinhart, B., Becker, A., Mortusewicz, O., Jost, K. L., Rapp, A., Leonhardt, H., & Cardoso, M. C. (2019). Processive DNA synthesis is associated with localized decompaction of constitutive heterochromatin at the sites of DNA replication and repair. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 10(1), 231–253. <https://doi.org/10.1080/19491034.2019.1688932>
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J. Y., Pope, B. D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S. A., Salama, R., Carroll, T., Stark, R., Janky, R., Narita, M., Xue, L., Chicas, A., Núñez, S., Janknecht, R., Hayashi-Takanaka, Y., Wilson, M. D., Marshall, A., ... Narita, M. (2012). Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Molecular cell*, 47(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010>
- Corvalan, A. Z., & Collier, H. A. (2021). Methylation of histone 4's lysine 20: a critical analysis of the state of the field. *Physiological genomics*, 53(1), 22–32. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00128.2020>
- Dialynas, G. K., Terjung, S., Brown, J. P., Aucott, R. L., Baron-Luhr, B., Singh, P. B., & Georgatos, S. D. (2007). Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells. *Journal of cell science*, 120(Pt 19), 3415–3424. <https://doi.org/10.1242/jcs.012914> .
- Dialynas, G. K., Vitalini, M. W., & Wallrath, L. L. (2008). Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression. *Mutation research*, 647(1-2), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.09.007>
- Eid, A., Rodriguez-Terrones, D., Burton, A., & Torres-Padilla, M. E. (2016). SUV4-20 activity in the preimplantation mouse embryo controls timely replication. *Genes & development*, 30(22), 2513–2526. <https://doi.org/10.1101/gad.288969.116>
- Eskeland, R., Eberharter, A., & Imhof, A. (2007). HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors. *Molecular and cellular biology*, 27(2), 453–465. <https://doi.org/10.1128/MCB.01576-06>

Fischle, W., Tseng, B. S., Dormann, H. L., Ueberheide, B. M., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Funabiki, H., & Allis, C. D. (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature*, *438*(7071), 1116–1122. <https://doi.org/10.1038/nature04219>

Foreman, K. W., Brown, M., Park, F., Emtage, S., Harriss, J., Das, C., Zhu, L., Crew, A., Arnold, L., Shaaban, S., & Tucker, P. (2011). Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3. *PLoS one*, *6*(7), e22290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022290>

Giri, S., & Prasanth, S. G. (2015). Association of ORCA/LRWD1 with repressive histone methyl transferases mediates heterochromatin organization. *Nucleus (Austin, Tex.)*, *6*(6), 435–441. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1102814>

Hahn, M., Dambacher, S., Dulev, S., Kuznetsova, A. Y., Eck, S., Wörz, S., Sadic, D., Schulte, M., Mallm, J. P., Maiser, A., Debs, P., von Melchner, H., Leonhardt, H., Schermelleh, L., Rohr, K., Rippe, K., Storchova, Z., & Schotta, G. (2013). Suv4-20h2 mediates chromatin compaction and is important for cohesin recruitment to heterochromatin. *Genes & development*, *27*(8), 859–872. <https://doi.org/10.1101/gad.210377.112>

Hayakawa, T., Haraguchi, T., Masumoto, H., & Hiraoka, Y. (2003). Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *Journal of cell science*, *116*(Pt 16), 3327–3338. <https://doi.org/10.1242/jcs.00635>

Hayashi-Takanaka, Y., Maehara, K., Harada, A., Umehara, T., Yokoyama, S., Obuse, C., Ohkawa, Y., Nozaki, N., & Kimura, H. (2015). Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome research*, *23*(4), 753–766. <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9486-4>

Herlihy, C. P., Hahn, S., Hermance, N. M., Crowley, E. A., & Manning, A. L. (2021). Suv420 enrichment at the centromere limits Aurora B localization and function. *Journal of cell science*, *134*(15), jcs249763. <https://doi.org/10.1242/jcs.249763>

Hiragami-Hamada, K., Soeroes, S., Nikolov, M., Wilkins, B., Kreuz, S., Chen, C., De La Rosa-Velázquez, I. A., Zenn, H. M., Kost, N., Pohl, W., Chernev, A., Schwarzer, D., Jenuwein, T., Lorincz, M., Zimmermann, B., Walla, P. J., Neumann, H., Baubec, T., Urlaub, H., & Fischle, W. (2016). Dynamic and flexible H3K9me3 bridging via HP1 β dimerization establishes a plastic state of condensed chromatin. *Nature communications*, *7*, 11310. <https://doi.org/10.1038/ncomms11310>

- Hirota, T., Lipp, J. J., Toh, B. H., & Peters, J. M. (2005). Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature*, *438*(7071), 1176–1180. <https://doi.org/10.1038/nature04254>
- Huang, Y., Myers, M. P., & Xu, R. M. (2006). Crystal structure of the HP1-EMSY complex reveals an unusual mode of HP1 binding. *Structure (London, England : 1993)*, *14*(4), 703–712. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.01.007>
- Isin, H., Özgür, E., Talu, C. K., Trabulus, D. C., Karaçetin, D., & Gezer, U. (2020). Impact of histone methyltransferase SUV420H2 in breast cancer. *Biomedical reports*, *13*(4), 29. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1336>
- Janssen, A., Colmenares, S. U., & Karpen, G. H. (2018). Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annual review of cell and developmental biology*, *34*, 265–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>
- Jones, D. O., Cowell, I. G., & Singh, P. B. (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays*, *22*(2), 124–137. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200002\)22:2<124::AID-BIES4>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<124::AID-BIES4>3.0.CO;2-E)
- Kang, J., Chaudhary, J., Dong, H., Kim, S., Brautigam, C. A., & Yu, H. (2011). Mitotic centromeric targeting of HP1 and its binding to Sgo1 are dispensable for sister-chromatid cohesion in human cells. *Molecular biology of the cell*, *22*(8), 1181–1190. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-01-0009>
- Kapoor-Vazirani, P., Kagey, J. D., & Vertino, P. M. (2011). SUV420H2-mediated H4K20 trimethylation enforces RNA polymerase II promoter-proximal pausing by blocking hMOF-dependent H4K16 acetylation. *Molecular and cellular biology*, *31*(8), 1594–1609. <https://doi.org/10.1128/MCB.00524-10>
- Kidder, B. L., Hu, G., Cui, K., & Zhao, K. (2017). SMYD5 regulates H4K20me3-marked heterochromatin to safeguard ES cell self-renewal and prevent spurious differentiation. *Epigenetics & chromatin*, *10*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0115-7>
- Kilic, S., Felekyan, S., Doroshenko, O., Boichenko, I., Dimura, M., Vardanyan, H., Bryan, L. C., Arya, G., Seidel, C. A. M., & Fierz, B. (2018). Single-molecule FRET reveals multiscale chromatin dynamics modulated by HP1 α . *Nature communications*, *9*(1), 235. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02619-5>
- Kiseleva, A. A., Cheng, Y. C., Smith, C. L., Katz, R. A., & Poleshko, A. (2023). PRR14 organizes H3K9me3-modified heterochromatin at the nuclear lamina. *Nucleus (Austin, Tex.)*, *14*(1), 2165602. <https://doi.org/10.1080/19491034.2023.2165602>

Kono, Y., Adam, S. A., Sato, Y., Reddy, K. L., Zheng, Y., Medalia, O., Goldman, R. D., Kimura, H., & Shimi, T. (2022). Nucleoplasmic lamin C rapidly accumulates at sites of nuclear envelope rupture with BAF and cGAS. *The Journal of cell biology*, 221(12), e202201024.

<https://doi.org/10.1083/jcb.202201024>

Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., & Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, 410(6824), 116–120. <https://doi.org/10.1038/35065132>

Larson, A. G., Elnatan, D., Keenen, M. M., Trnka, M. J., Johnston, J. B., Burlingame, A. L., Agard, D. A., Redding, S., & Narlikar, G. J. (2017). Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*, 547(7662), 236–240.

<https://doi.org/10.1038/nature22822>

Lechner, M. S., Begg, G. E., Speicher, D. W., & Rauscher, F. J., 3rd (2000). Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Molecular and cellular biology*, 20(17), 6449–6465.

<https://doi.org/10.1128/MCB.20.17.6449-6465.2000>

Lechner, M. S., Schultz, D. C., Negorev, D., Maul, G. G., & Rauscher, F. J., 3rd (2005). The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(4), 929–937.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.016>

Leonhardt, H., Rahn, H. P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D., & Cardoso, M. C. (2000). Dynamics of DNA replication factories in living cells. *The Journal of cell biology*, 149(2), 271–280. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.2.271>

Liu, Y., Qin, S., Lei, M., Tempel, W., Zhang, Y., Loppnau, P., Li, Y., & Min, J. (2017). Peptide recognition by heterochromatin protein 1 (HP1) chromoshadow domains revisited: Plasticity in the pseudosymmetric histone binding site of human HP1. *The Journal of biological chemistry*, 292(14), 5655–5664.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M116.768374>

Machida, S., Takizawa, Y., Ishimaru, M., Sugita, Y., Sekine, S., Nakayama, J. I., Wolf, M., & Kurumizaka, H. (2018). Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Molecular cell*, 69(3), 385–397.e8.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.011>

Maeda, R., & Tachibana, M. (2022). HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases and demethylases. *EMBO reports*, 23(4), e53581.

<https://doi.org/10.15252/embr.202153581>

Minc, E., Courvalin, J. C., & Buendia, B. (2000). HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenetics and cell genetics*, 90(3-4), 279–284. <https://doi.org/10.1159/000056789>

Maison, C., Bailly, D., Peters, A. H., Quivy, J. P., Roche, D., Taddei, A., Lachner, M., Jenuwein, T., & Almouzni, G. (2002). Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nature genetics*, 30(3), 329–334. <https://doi.org/10.1038/ng843>

Maison, C., Romeo, K., Bailly, D., Dubarry, M., Quivy, J. P., & Almouzni, G. (2012). The SUMO protease SENP7 is a critical component to ensure HP1 enrichment at pericentric heterochromatin. *Nature structural & molecular biology*, 19(4), 458–460. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2244>

Maison, C., Bailly, D., Quivy, J. P., & Almouzni, G. (2016). The methyltransferase Suv39h1 links the SUMO pathway to HP1 α marking at pericentric heterochromatin. *Nature communications*, 7, 12224. <https://doi.org/10.1038/ncomms12224>

Moggs, J. G., Grandi, P., Quivy, J. P., Jónsson, Z. O., Hübscher, U., Becker, P. B., & Almouzni, G. (2000). A CAF-1-PCNA-mediated chromatin assembly pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular and cellular biology*, 20(4), 1206–1218. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.4.1206-1218.2000>

Nelson, D. M., Jaber-Hijazi, F., Cole, J. J., Robertson, N. A., Pawlikowski, J. S., Norris, K. T., Criscione, S. W., Pchelintsev, N. A., Piscitello, D., Stong, N., Rai, T. S., McBryan, T., Otte, G. L., Nixon, C., Clark, W., Riethman, H., Wu, H., Schotta, G., Garcia, B. A., Neretti, N., ... Adams, P. D. (2016). Mapping H4K20me3 onto the chromatin landscape of senescent cells indicates a function in control of cell senescence and tumor suppression through preservation of genetic and epigenetic stability. *Genome biology*, 17(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1017-x>

Neuhaus D. (2022). Zinc finger structure determination by NMR: Why zinc fingers can be a handful. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy*, 130-131, 62–105. <https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2022.07.001>

Nielsen, A. L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J. A., Remboutsika, E., Chambon, P., & Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Molecular cell*, 7(4), 729–739. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00218-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00218-0)

Nielsen, P. R., Nietlispach, D., Mott, H. R., Callaghan, J., Bannister, A., Kouzarides, T., Murzin, A. G., Murzina, N. V., & Laue, E. D. (2002). Structure of the HP1 chromodomain bound to histone H3 methylated at lysine 9. *Nature*, 416(6876), 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature722>

- Nozawa, R. S., Nagao, K., Masuda, H. T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., & Obuse, C. (2010). Human POGZ modulates dissociation of HP1 α from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nature cell biology*, *12*(7), 719–727. <https://doi.org/10.1038/ncb2075>
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., Siddiqui, K., Spector, D. L., & Stillman, B. (2004). Human Orc2 localizes to centrosomes, centromeres and heterochromatin during chromosome inheritance. *The EMBO journal*, *23*(13), 2651–2663. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600255>
- Prasanth, S. G., Shen, Z., Prasanth, K. V., & Stillman, B. (2010). Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15093–15098. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009945107>
- Smothers, J. F. & Henikoff, S. (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Current biology*, *10*(1), 27–30. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)00260-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)00260-2)
- Qin, W., Stengl, A., Ugur, E., Leidescher, S., Ryan, J., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2021). HP1 β carries an acidic linker domain and requires H3K9me3 for phase separation. *Nucleus (Austin, Tex.)*, *12*(1), 44–57. <https://doi.org/10.1080/19491034.2021.1889858>
- Quivy, J. P., Gérard, A., Cook, A. J., Roche, D., & Almouzni, G. (2008). The HP1-p150/CAF-1 interaction is required for pericentric heterochromatin replication and S-phase progression in mouse cells. *Nature structural & molecular biology*, *15*(9), 972–979. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1470>
- Ren, W., Fan, H., Grimm, S. A., Kim, J. J., Li, L., Guo, Y., Petell, C. J., Tan, X. F., Zhang, Z. M., Coan, J. P., Yin, J., Kim, D. I., Gao, L., Cai, L., Khudaverdyan, N., Çetin, B., Patel, D. J., Wang, Y., Cui, Q., Strahl, B. D., ... Song, J. (2021). DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation. *Nature communications*, *12*(1), 2490. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22665-4>
- Romeo, K., Louault, Y., Cantaloube, S., Loiodice, I., Almouzni, G., & Quivy, J. P. (2015). The SENP7 SUMO-Protease Presents a Module of Two HP1 Interaction Motifs that Locks HP1 Protein at Pericentric Heterochromatin. *Cell reports*, *10*(5), 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.004>
- Sánchez, O. F., Mendonca, A., Min, A., Liu, J., & Yuan, C. (2019). Monitoring Histone Methylation (H3K9me3) Changes in Live Cells. *ACS omega*, *4*(8), 13250–13259. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01413>

Sanulli, S., Trnka, M. J., Dharmarajan, V., Tibble, R. W., Pascal, B. D., Burlingame, A. L., Griffin, P. R., Gross, J. D., & Narlikar, G. J. (2019). HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin. *Nature*, *575*(7782), 390–394. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1669-2>

Sasaki, K., Suzuki, M., Sonoda, T., Schneider-Poetsch, T., Ito, A., Takagi, M., Fujishiro, S., Sohtome, Y., Dodo, K., Umehara, T., Aburatani, H., Shin-Ya, K., Nakao, Y., Sodeoka, M., & Yoshida, M. (2022). Visualization of the dynamic interaction between nucleosomal histone H3K9 tri-methylation and HP1 α chromodomain in living cells. *Cell chemical biology*, *29*(7), 1153–1161.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2022.05.006>

Sato, Y., Mukai, M., Ueda, J., Muraki, M., Stasevich, T. J., Horikoshi, N., Kujirai, T., Kita, H., Kimura, T., Hira, S., Okada, Y., Hayashi-Takanaka, Y., Obuse, C., Kurumizaka, H., Kawahara, A., Yamagata, K., Nozaki, N., & Kimura, H. (2013). Genetically encoded system to track histone modification in vivo. *Scientific reports*, *3*, 2436. <https://doi.org/10.1038/srep02436>

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., & Jenuwein, T. (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & development*, *18*(11), 1251–1262. <https://doi.org/10.1101/gad.300704>

Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I. A., Espejo, A., Bedford, M. T., Nussenzweig, A., Busslinger, M., & Jenuwein, T. (2008). A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes & development*, *22*(15), 2048–2061. <https://doi.org/10.1101/gad.476008>

Seeler, J. S., Marchio, A., Sitterlin, D., Transy, C., & Dejean, A. (1998). Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7316–7321. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7316>

Shechter, D., Dormann, H. L., Allis, C. D., & Hake, S. B. (2007). Extraction, purification and analysis of histones. *Nature protocols*, *2*(6), 1445–1457. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.202>

Smothers, J. F., & Henikoff, S. (2000). The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer. *Current biology* : CB, *10*(1), 27–30. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)00260-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)00260-2)

Souza, P. P., Völkel, P., Trinel, D., Vandamme, J., Rosnoblet, C., Héliot, L., & Angrand, P. O. (2009). The histone methyltransferase SUV420H2 and

Heterochromatin Proteins HP1 interact but show different dynamic behaviours. *BMC cell biology*, 10, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-41>

Stender, J. D., Pascual, G., Liu, W., Kaikkonen, M. U., Do, K., Spann, N. J., Boutros, M., Perrimon, N., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (2012). Control of proinflammatory gene programs by regulated trimethylation and demethylation of histone H4K20. *Molecular cell*, 48(1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.020>

Strom, A. R., Emelyanov, A. V., Mir, M., Fyodorov, D. V., Darzacq, X., & Karpen, G. H. (2017). Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, 547(7662), 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature22989>

Tanaka, M., Harada, H., & Kimura, H. (2023). The role of H3K9me3 in oral squamous cell carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 640, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.11.102>

Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H. R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P. R., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, N. V., & Laue, E. D. (2004). Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *The EMBO journal*, 23(3), 489–499. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600088>

Uchino, S., Ito, Y., Sato, Y., Handa, T., Ohkawa, Y., Tokunaga, M., & Kimura, H. (2022). Live imaging of transcription sites using an elongating RNA polymerase II-specific probe. *The Journal of cell biology*, 221(2), e202104134. <https://doi.org/10.1083/jcb.202104134>

Vassallo, M. F., & Tanese, N. (2002). Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 5919–5924. <https://doi.org/10.1073/pnas.092025499>

Vermeulen, M., Eberl, H. C., Matarese, F., Marks, H., Denissov, S., Butter, F., Lee, K. K., Olsen, J. V., Hyman, A. A., Stunnenberg, H. G., & Mann, M. (2010). Quantitative interaction proteomics and genome-wide profiling of epigenetic histone marks and their readers. *Cell*, 142(6), 967–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.020>

Villaseñor, R., Pfaendler, R., Ambrosi, C., Butz, S., Giuliani, S., Bryan, E., Sheahan, T. W., Gable, A. L., Schmolka, N., Manzo, M., Wirz, J., Feller, C., von Mering, C., Aebersold, R., Voigt, P., & Baubec, T. (2020). ChromID identifies the protein interactome at chromatin marks. *Nature biotechnology*, 38(6), 728–736. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0434-2>

Viotti, M., Wilson, C., McClelland, M., Koeppen, H., Haley, B., Jhunjunwala, S., Klijn, C., Modrusan, Z., Arnott, D., Classon, M., Stephan, J. P., & Mellman, I.

(2018). SUV420H2 is an epigenetic regulator of epithelial/mesenchymal states in pancreatic cancer. *The Journal of cell biology*, 217(2), 763–777.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201705031>

Yan, H., Xiang, X., Chen, Q., Pan, X., Cheng, H., & Wang, F. (2018). HP1 cooperates with CAF-1 to compact heterochromatic transgene repeats in mammalian cells. *Scientific reports*, 8(1), 14141.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32381-7>

謝辞

本研究を行うにあたり、研究方針、実験手法、データの解釈、トラブルシューティング、その他、研究活動に関するあらゆることに関してご指導賜りました木村宏教授、佐藤優子助教に感謝申し上げます。また、恥ずかしい話ではありますが、博士課程に進んだ後も、何事をするにしても腰が重い自分を、常日頃からなんとかやる気にさせようと様々なアドバイスをくださった木村先生、佐藤先生には頭が上がりません。研究内容に関しては、自分が考えなしに路頭に迷いこみたがるばかりに、まとめることにより一層の苦勞を掛けさせてしまいました。このような自分を 8 年間も面倒を見ていただき、最後まで面倒見ていただけたことには感謝してもしきれません。本当にありがとうございました。また、西原秀典准教授、半田哲也氏、志見剛先生、小田春佳氏、河野洋平氏、Marinela 氏にも日常的に研究の相談や心の悩み等、親身に相談に乗っていただきました。理解力が乏しく、いただいたアドバイスを自然体で受け止められないことが多くありましたが、それでも皆様に丁寧にご助言いただければということ、当たり前なことではありませんでした。私の目線に合わせていろいろな話を聞いて下さり、真正面から返事をしていただけただけのおかげで、自分の成長につながりました。いつも強い気持ちで支えてくれた友人の倉澤光氏にも感謝申し上げます。このような周りに恵まれた環境で研究活動および自分の人生との対峙をさせていただけたことは私にとって、この上ない幸運であったと感じています。心よりお礼申し上げます。

本研究を行うにあたって、必要であった実験手技の多くは木村先生、佐藤先生、半田先生にご教授いただきました。アミノ酸配列のアライメントの作製では、大阪大学長尾恒治氏に行っていただきました。この情報がなければ何もわからないことばかりでした。その情報をきっかけに、西原先生に具体的なアライメントの作り方をご教示いただきました。ありがとうございました。また、本論文では実験結果として示せませんでした。リコンビナントタンパク質の精製を行った際に、分解が激しく精製が難しいときに夜遅くまで一緒になって手伝ってくださった小田春佳氏に感謝申し上げます。また、SUV420H1/H2 のノックアウト細胞の作製ができたのは、相澤亜莉彩氏のご尽力のおかげです。ありがとうございました。DNA シーケンシングは東京工業大学オープンファシリティセンターに行っていただきました。また、博士在学中にプログラミングの基礎の勉強や海外留学の機会を与えてくださった、ACLS の先生方、スタッフの方々、渡航先を提案してくださった木村先生、受け入れてくださった Fujinaga Koh 先生、および奥様の Ant さんに感謝申し上げます。

最後に、これまで何度もくじけた私を、私自身よりも信じ続けて励まして続けてくださった家族にこの場を借りて感謝申し上げます。