

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヘテロクロマチン上のヒストンH3リジン36ジメチル化の局在化機構と意義
Title(English)	Localization mechanism and significance of histone H3 lysine 36 dimethylation on heterochromatin
著者(和文)	後藤尚紀
Author(English)	Naoki Goto
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12805号, 授与年月日:2024年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木村 宏,岩崎 博史,加納 ふみ,白木 伸明,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12805号, Conferred date:2024/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

ヘテロクロマチン上のヒストン H3 リジン 36 ジメチル化の局在化機構と意義

2024 年 6 月

東京工業大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース
木村研究室
後藤 尚紀

審査教員

木村宏 教授

岩崎博史 教授

加納ふみ 准教授

白木伸明 准教授

藤田尚信 准教授

目次

要旨	4
謝辞	7
博士課程における研究発表・eAPRIN 修了番号	8
略語リスト	9
1 章 研究背景と研究目的	11
1.1 クロマチンとエピジェネティクス	11
1.2 エピジェネティクスの分子基盤	13
1.3 高次クロマチン構造	15
1.4 H3K36 メチル化	20
1.5 クロマチンリモデリング	24
1.6 研究目的	28
2 章 実験方法	29
3 章 H3K36me2 の核内分布の観察	64
3.1 H3K36me2 の核内分布観察	64
3.1.1 細胞種ごとの H3K36me2 分布の比較	
3.1.2 H3K36me2 と他のヒストン修飾の多重染色	
3.1.3 H3K36me2 の生細胞動態	
3.2 小括	69
3.3 補遺	70
4 章 H3K36me2 のヘテロクロマチン局在化機構	73
4.1 ヘテロクロマチンの H3K36me2 の責任酵素の同定	73
4.1.1 H3K9me3 および DNA メチル化経路の検討	
4.1.2 H3K36 メチル化関連酵素の核内分布観察	
4.1.3 NSD2 が PCH の H3K36me2 に与える影響	
4.2 NSD2 の制御因子の同定	78
4.2.1 NSD2 によるポジティブ・フィードバック機構の検討	
4.2.2 ノックダウンによる NSD2 の上流因子の探索	
4.2.3 SMARCA5 が PCH の H3K36me2 と NSD2 に与える影響	
4.3 SMARCA5 の制御因子の同定	83
4.3.1 ISWI 複合体に着目した SMARCA5 の上流因子の探索	
4.3.2 BAZ1B が PCH の H3K36me2、NSD2、SMARCA5 に与える影響	
4.4 NSD2 と WICH 複合体の相互作用の検討	88

4.4.1	NSD2 と SMARCA5、BAZ1B の相互作用解析	
4.4.2	SMARCA5 と相互作用する NSD2 ドメインの検討	
4.5	BAZ1B のヘテロクロマチン認識機構の検討	91
4.5.1	顕微鏡観察による PCH 局在に必要な BAZ1B ドメインの探索	
4.5.2	BAZ1B の AT-hook 様モチーフと DNA の結合アッセイ	
4.6	H3K36me2 のヘテロクロマチン分布の規定要因の検討	97
4.6.1	PCH の H3K36me2 制御因子の発現量比較	
4.6.2	PCH の H3K36me2 制御因子の過剰発現	
4.7	小括	99
5 章	ヘテロクロマチンの H3K36me2 の生理的意義	102
5.1	H3K36me2 が MajSat 転写に与える影響の検討	102
5.1.1	標的特異的な H3K36me2 誘導による MajSat 転写量変化	
5.1.2	H3K36me2 制御因子 KO 細胞での MajSat 転写量比較	
5.2	マウス生体における H3K36me2 の核内分布観察	104
5.2.1	マウス成熟組織の H3K36me2 の核内分布観察	
5.2.2	マウス 13.5 日胚の H3K36me2 の核内分布観察	
5.3	小括	106
5.4	補遺	107
6 章	考察と展望	112
	引用文献	117

要旨

真核生物のゲノム DNA はクロマチンを形成し細胞核内に収納される。クロマチンは高度に凝縮したヘテロクロマチンと脱凝縮したユークロマチンに分類できる。ヒストンの化学修飾（ヒストン修飾）はこれらヘテロクロマチンまたはユークロマチンのいずれか一方に分布し、転写や複製といったクロマチン機能を制御すると考えられてきた。ヒストン H3 リジン 36 ジメチル化（H3K36me2）は典型的にはユークロマチンに存在するヒストン修飾で、転写開始点以外で起こる異所的な転写の抑制や、遺伝子間領域の DNA メチル化の確立に寄与する。しかし本研究では、いくつかのマウス細胞種において、H3K36me2 が AT 塩基の豊富なメジャーサテライト（MajSat）リピートから構成されるペリセントロメア・ヘテロクロマチン（PCH）に強く集積することを発見した。そこで本研究は、H3K36me2 が PCH に局在する分子機構とその意義を明らかにすることを目的として行った。

本研究では、H3K36me2 が PCH に局在するマウス NIH3T3 細胞、不死化マウス胚性繊維芽細胞（iMEF）と、ユークロマチンに局在する Pmi28 筋芽細胞を用いた。

H3K36me2 がヘテロクロマチンに分布するメカニズムを解明するため、まず、PCH H3K36me2 を制御するヒストン修飾酵素の同定を試みた。NIH3T3 において各酵素の核内分布を観察したところ、ヒストンメチル化酵素 NSD2 が PCH に局在した。CRISPR/Cas9 法で樹立した NSD2-KO iMEF では、H3K36me2 の PCH 局在率が低下し、それは NSD2 導入によってレスキューできた。このことから、PCH H3K36me2 は NSD2 によって制御されることが分かった。

次に、NSD2 を PCH にリクルートする上流因子を明らかにするため、先行研究のプロテオーム解析で同定された NSD2 相互作用因子のうち、7 種類の既知 PCH 局在タンパク質に着目した。iMEF において、shRNA 法で各因子をノックダウンしたところ、クロマチンリモデリング因子 SMARCA5 の発現低下が PCH H3K36me2 レベルを最も減少させた。SMARCA5-KO iMEF では、H3K36me2 と NSD2 の PCH 局在率が低下し、それらは SMARCA5 導入によって部分的にレスキューできた。以上から、SMARCA5 によって NSD2 は PCH へリクルートされることが示唆された。

SMARCA5 は BAZ1A、BAZ1B、BAZ2A 等のパートナー因子と共に ISWI クロマチンリモデリング複合体を形成する。SMARCA5 の局在はパートナー因子によって制御される。そこでこれらの因子のうち、PCH に局在し、かつ KO が可能であった BAZ1B に着目した。BAZ1B-KO iMEF では、H3K36me2、NSD2、SMARCA5 の PCH 局在率が低下し、それらは BAZ1B 導入でレスキューできた。次いで共免疫沈降により、NSD2

が SMARCA5 および BAZ1B と直接相互作用することを確認した。さらに顕微鏡観察と生化学的解析から、BAZ1B は C 末端領域にある AT-hook 様モチーフを介して AT 含量の豊富な DNA と直接結合することが分かった。以上より、BAZ1B の AT-DNA 認識を発端として、BAZ1B-SMARCA5 複合体が NSD2 をリクルートすることで、PCH に H3K36me2 が付加されることが明らかとなった (図 1)。

ヘテロクロマチンにおける H3K36me2 の意義を明らかにするため、まず、MajSat 転写に対する PCH H3K36me2 の機能を検討した。CRISPR/dCas9 法で Pmi28 の PCH に H3K36me2 を導入すると、MajSat 転写は増大したことから、H3K36me2 は MajSat の転写に影響することが示唆された。一方、マウス成体と着床後胚の観察を通じた PCH H3K36me2 の生理的意義の検討においては、H3K36me2 が PCH に局在する組織は確認できなかった。

本研究から、ヘテロクロマチン上の H3K36me2 は、BAZ1B の AT-hook 様モチーフと AT リッチな DNA の結合を根底とする BAZ1B-SMARCA5-NSD2 経路によって制御されることが明らかとなった。これまで報告された PCH ヒストン修飾の多くは、ヘテロクロマチンに豊富に蓄積する H3K9me3 あるいは DNA メチル化の制御下にある。AT-DNA 依存的な本経路は PCH エピジェネティック修飾の新たな分子機構である可能性が高い。加えて、ユークロマチンで働く NSD2 も含め、NSD2 が標的ゲノム領域へ動員されるメカニズムはこれまで不明だったことをふまえると、本研究結果が当該研究分野に与えるインパクトは大きい。さらに本研究は、この特徴的なヒストン修飾分布の意義を検討し、ヘテロクロマチンの H3K36me2 が MajSat の転写制御に関わる可能性を示唆した。共同研究者と実施した補足実験では、マウス着床前胚の免疫染色を行い、2 細胞期の PCH に H3K36me2 が局在する観察結果を得ている。同時期には一過的に MajSat 転写が起こり、それは発生の進行に不可欠であることが知られている。2 細胞期の PCH H3K36me2 は、MajSat 転写を促進することで着床前胚の発生に寄与する可能性がある。初期胚に着目し、ヘテロクロマチンの H3K36me2 の機能を明らかにすることが、今後の課題である。

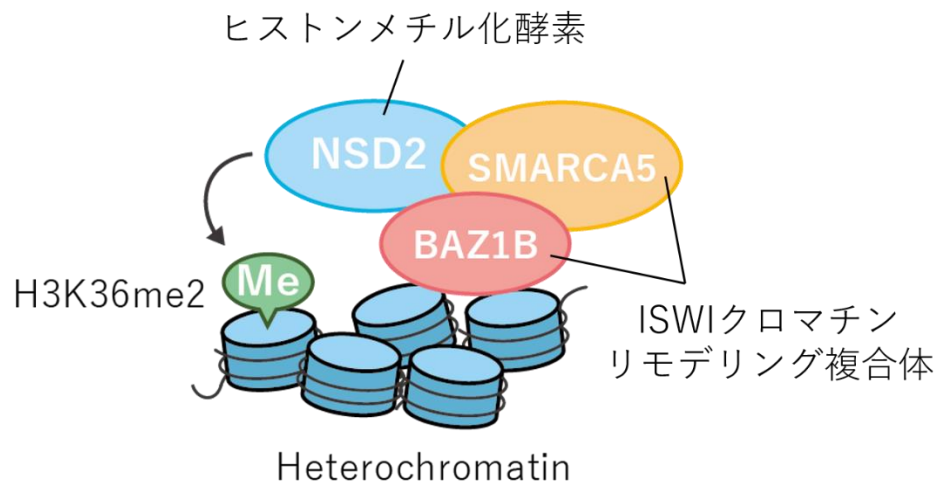


図1 本研究成果の概要図

ISWI クロマチンリモデリング複合体がヒストンメチル化酵素 NSD2 をリクルートすることで、ヘテロクロマチンに H3K36me2 が修飾される。このリクルート機構の根底には、BAZ1B の AT-hook 様モチーフと DNA の直接的な結合がある。

謝辞

本研究ならびに私の大学院生活は、多くの方々に支えられました。ここで謝辞を述べさせていただきます。

木村宏教授には、修士・博士課程と一貫してご指導を賜りました。本論文の研究に至るまでに私はテーマを三度変更しましたが、それを容認していただき、また必要なリソースを惜しみなく提供いただいた先生には感謝しかありません。顕微鏡で観た現象を分子レベルで説明しその実態にせまる過程を一つひとつ経験できたことはとても幸せでしたし、それは先生の指導があつてこそできたことでした。木村研究室での経験を糧に、今後も研究に励みたいと思います。

木村研究室スタッフの佐藤優子助教、西原秀典博士（現・近畿大学准教授）、小田春佳博士（現・フランス IGH Montpellier 研究員）にも感謝いたします。佐藤助教にはマウスの組織・胚の免疫染色で大変お世話になりました。初めて生体を観察した時の感動は忘れられません。また佐藤助教に開発していただいた mintbody を使うことで、H3K36me2 の生細胞動態を観察することができました。西原博士には、ChIP-seq 解析でお力添えをいただきました。H3K36me2 のヘテロクロマチン分布をシーケンズレベルでも示すことができ、論文の主張をより強固にできました。また、これをきっかけとして、レトロトランスポゾンのエピジェネティック制御に興味を持つようになりました。小田博士にはデータ解析の面で大変助力いただきました。R に関してまったくゼロの状態から丁寧に教えていただいたおかげで、論文データをまとめることができました。学内外含め、修士・博士課程で出会った先輩、同期、後輩にもお礼申し上げます。

山縣一夫教授（近畿大学）、米澤直央さん（同・修士課程学生）、壽系和真さん（同・学士課程学生）には、マウス初期胚の免疫染色で大変ご尽力いただきました。H3K36me2 が生体内でもヘテロクロマチンに分布することを示すことができました。胚性クロマチン形成のダイナミックさにあらためて気づく機会になりました。

胡桃坂仁志教授（東京大学）、鯨井智也助教（同研究室）には再構成ヌクレオソームをご提供いただきました。BAZ1B の AT-hook 様モチーフはヌクレオソームに結合する、という重要なデータを得ることができました。感謝申し上げます。

最後に、これまでの人生と大学院生活を支え続けてくれた家族に感謝します。どんな時も、私のやりたいことを温かく応援してくれたことは、とても励みになりました。ありがとうございました。

博士課程における研究発表

国内学会

○後藤 尚紀、木村 宏、分化した筋細胞のクロマチン構造、第 43 回日本分子生物学会年会、2020 年 12 月 2 日～4 日、オンライン

○後藤 尚紀、木村 宏、細胞種特異的にみられる H3K36me2 のヘテロクロマチン局在、第 16 回日本エピジェネティクス研究会年会、2023 年 6 月 19 日・20 日、東京

国際学会

○Goto N, Kimura H, Cell type-specific heterochromatin localization of H3K36me2. EMBO NUCLEAR STRUCTURE & DYNAMICS WORKSHOP 2022, 2022, Montpellier, France

論文

○Handa T, ○Harada A, ○Maehara K, Sato S, Nakao M, Goto N, Kurumizaka H, Ohkawa Y, Kimura H. (2020) Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input. *Nat Protoc*, 15: 3334-3360. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0375-8>

○Kojima S, ○Shiochi N, Sato K, Yamaura M, Ito T, Yamamura N, Goto N, Odamoto M, Kobayashi S, Kimura T, Sekita Y. (2022) Epigenome editing reveals core DNA methylation for imprinting control in the Dlk1-Dio3 imprinted domain. *Nucleic Acids Res*, 50 (9): 5080-5094. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac344>

○Goto N, Suke K, Yonezawa N, Nishihara H, Sato Y, Kujirai T, Kurumizaka H, Yamagata K, Kimura H. (2023) ISWI chromatin remodeling complexes recruit NSD2 and H3K36me2 in pericentromeric heterochromatin. *J Cell Biol*, 223 (8): e202310084. <https://doi.org/10.1083/jcb.202310084>

総説

○後藤 尚紀、木村 宏、(2022) クロマチンの高次構造と転写制御、遺伝子医学、12 (1): 135-140、ISBN: 4909508171

eAPRIN 修了番号

APRIN eLearning 「JST コース（１）生命医科学系」修了証番号：JB0000692580

略語リスト

ADP	Adenosine di-phosphate
AML	Acute Myeloid Leukemia
AT-DNA	Adenine thymine-DNA
ATP	Adenosine tri-phosphate
BSA	Bovine serum albumin
CBB	Coomassie brilliant blue
ChIP-seq	Chromatin immuno precipitation sequencing
circRNA	circular RNA (環状 RNA)
DDW	Deionized distilled water
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ES cell	Embryonic stem cell
FBS	Fetal bovine serum
GC-DNA	Guanine cytosine-DNA
ICM	Inner cell mass
iMEF	immortalized mouse embryonic fibroblast
IP	Immuno precipitation
KD	Knock down
KO	Knock out
LAD	Lamina associated domain
LIF	Leukemia inhibitory factor
LINE	Long interspersed nuclear element
LTR	Long terminal repeat
MajSat	Major satellite
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MERV1	Murine endogenous retrovirus-L
NEAA	Non essential amino acids
MinSat	Minor satellite
PAD	Pericentromere associated domain
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	PBS with Tween-20
PCH	Pericentromeric heterochromatin
PN	Pronuclei

SINE	Short interspersed nuclear element
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
TAD	Topologically associating domain
TBST	Tris buffered saline with Tween-20
TE	Trophectoderm
TES	Transcription end site
TSS	Transcription start site
ZGA	Zygotic genome activation
5mC	5-methylcytosine

1 章 研究背景と研究目的

1.1 クロマチンとエピジェネティクス

ヌクレオソームとクロマチン

真核生物の細胞核内で、DNA はヒストン 8 量体（各二分子のヒストン H2A、H2B、H3、H4 からなる複合体）に巻きつきヌクレオソームを形成する（図 2）（Woodcock and Ghosh, 2010）。多数のヌクレオソームが連なった構造はクロマチンと呼ばれ、真核生物特有のゲノム制御を可能とする。その一つが、ゲノムの折りたたみ（＝圧縮）である。ヒトの場合、全長 2 m にもなるゲノム DNA を直径 10 μm の核に収納する必要があるが、それはクロマチンが高度に折りたたまれ、強く圧縮されることで達成される。これによって真核生物は膨大な遺伝情報を担うことができる。M 期の染色体凝縮、S 期の DNA 複製、間期の全体的な脱凝縮と、細胞周期を通じてクロマチンはダイナミックに構造変化するにも関わらず、個々のゲノム領域は入り乱れることなく正確に遷移する。このことからゲノムの折りたたみは厳密に制御されることが分かる。クロマチンはまた、ゲノム機能をより緻密に制御することを可能にする。DNA がクロマチンとして核内に存在する以上、転写や DNA 複製、組換え、修復といったゲノム機能はクロマチンという「場」を介して起こる。例えば転写活性化に際し、転写因子や RNA ポリメラーゼを効率的に動員するためには、クロマチン構造変化によって遺伝子領域のアクセシビリティを高め、転写に適した場を構築する必要がある。これは DNA が露出した原核生物にはない制御メカニズムであり、転写の量や活性化の時期をより精密に調節できる。最近では真核生物に限らず、ある種のウイルスもヒストン様タンパク質を持ち、ヌクレオソームを形成することが報告されている（Liu et al., 2021）。クロマチンによるゲノム制御はこれまでの定説よりも広く保存されているかもしれない。

ヌクレオソーム

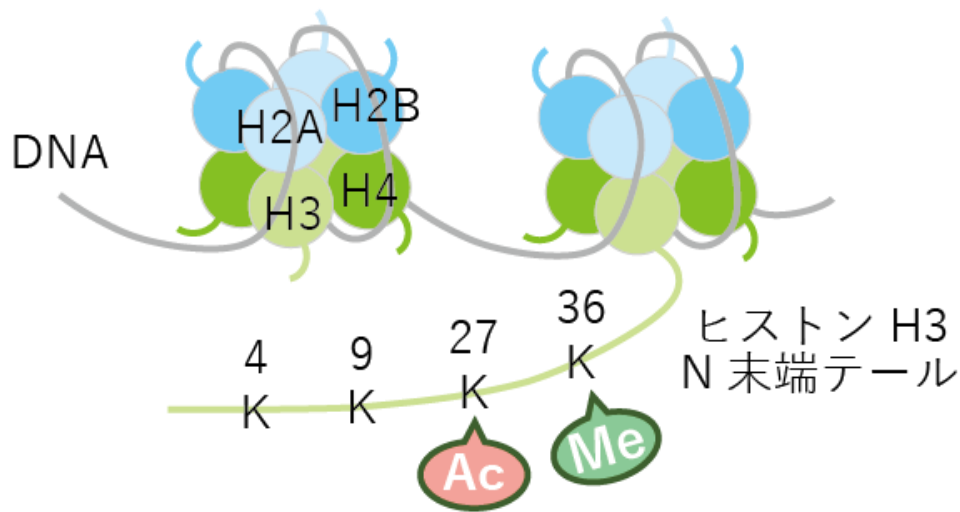


図2 ヌクレオソームとヒストン修飾

真核生物の核内 DNA は、各 2 分子のヒストン H2A、H2B、H3、H4 からなるヒストン 8 量体に巻きつき、ヌクレオソームを形成する。それぞれのヒストンはヌクレオソームから突出したテールを持ち、テール上のアミノ酸残基には様々な化学修飾（ヒストン修飾）が付加される。ここではヒストン H3 の N 末端テールのリジン残基（K）を示す。Ac：アセチル化、Me：メチル化。

遺伝子発現とエピジェネティクス

遺伝子発現は、転写、RNA プロセッシング、翻訳の過程で生じた分子（RNA やタンパク質）が機能を発揮することを指す。一方エピジェネティクスとは、DNA 配列によらずゲノム機能を制御する分子メカニズムを意味する。「**ヌクレオソームとクロマチン**」で述べたように、真核生物のゲノム制御はクロマチンを介して起こるため、エピジェネティクスは遺伝子発現の中で、特に転写との関連が深い。近年、転写制御の本質はクロマチンの構造変化にあり（Kujirai et al., 2018）、エピジェネティクスはその構造変化の重要な分子基盤であることが明らかとなってきた。すなわち、エピジェネティクスの作用によってクロマチン構造が緩まると転写は活性化し、反対に凝縮すると転写は抑制される。エピジェネティクスの実態は、広義にはノンコーディング RNA や核内ボディ等も含まれるが、本論文ではクロマチンに付加される化学修飾（DNA メチル化とヒストン修飾。詳細は「1.2 エピジェネティクスの分子基盤」を参照）を、エピジェネティクスを引き起こす分子とする。エピジェネティクスの特長はその可塑性にあり、DNA メチル化とヒストン修飾状態、ひいてはクロマチン構造が動的に変化することが、分化や発生あるいは個体の外部環境に応じた遺伝子発現制御を可能にする。ところで最近ではヒ

ストン修飾が、スプライシングや RNA 修飾といった転写後制御と関係することが報告されている (Luco et al., 2010; Huang et al., 2019)。RNA プロセシングの変化は核外で起こる翻訳にも影響することから、エピジェネティクス (=クロマチンから生じる分子シグナル) は転写だけでなく、他の遺伝子発現制御層にも波及すると考えられる。

1.2 エピジェネティクスの分子基盤

DNA メチル化

原核生物から真核生物まで保存された DNA の化学修飾のひとつである。真核生物では一般に、シトシンとグアニンが隣接する (CpG) とき、シトシンの 5 位炭素のメチル化 (5mC) が起こり得る。メチル化 DNA は CpG 含有量が多い遺伝子のプロモーター領域や、遺伝子間領域、レトロトランスポゾン、リピート配列などにみられ、メチル化領域では転写が抑制される傾向にある (Moore et al., 2012)。この転写抑制は、メチル化 DNA 認識ドメインである MBD (methyl-CpG binding domain) をもつ MBD タンパク質ファミリー (MECP2 など) や、ジンクフィンガータンパク質のメチル化 DNA への結合、あるいは DNA メチル化それ自体によって、転写因子の標的領域との親和性が低下することに起因する (Greenberg and Bourc'h, 2019)。またこの転写抑制には、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9 メチル化) をはじめとするヒストン修飾 (詳細は**ヒストン修飾**を参照) も深く関与する。DNA メチル化による遺伝子発現制御は、X 染色体の不活性化のほか、哺乳類の生殖細胞と初期胚の発生過程で確立されるゲノムインプリンティングにおいても重要である (Smith and Meissner, 2013)。

DNA メチル基転移酵素としては、de novo メチル化を担う DNMT3A および DNMT3B と、DNA 複製時の片アレルメチル化状態 (ヘミメチル化) を解消する DNMT1 がある (Moore et al., 2012)。DNMT3A と DNMT3B は N 末端領域に PWWP ドメインをもつ。近年、DNMT3A と DNMT3B は、PWWP ドメインを介して H3K36 メチル化 (詳細は**ユークロマチンにおける H3K36 メチル化の機能**を参照) を認識し DNA をメチル化することが報告された。これは先述のゲノムインプリンティングの確立にも関与しており、ヒストンと DNA の化学修飾間のクロストークが注目されている。

DNA の脱メチル化は、受動的経路と能動的経路の二つによって起こる。受動的経路は、DNA 複製時にヘミメチル化が解消されなかった際に、5mC が希釈されることで起こる。能動的経路は、TET (ten-eleven translocation) タンパク質の酵素活性によって起こる。TET タンパク質は TET1、TET2、TET3 の 3 種類があり、それぞれ C 末端領域に α -ケトグルタル酸誘導型ジオキシゲナーゼドメインをもつ。このドメインの活性により 5mC を段階的に酸化することでシトシンは未修飾状態へと脱メチル化される (Wu and Zhang, 2017)。

ヒストン修飾

ヒストン修飾は、ヌクレオソームを構成するヒストンに付加される化学修飾で、これまでにアセチル化 (ac)、メチル化 (me)、リン酸化 (ph)、ユビキチン化、SUMO 化、O-GlcNAc 化、ADP-リボシル化、ブチル化、クロトニル化など多くのヒストン修飾が報告されている (図 2、表 1) (Millan-Zambrano et al., 2022)。通常ヌクレオソームから突出したヒストン尾部は、アルギニンとリジンを多く含むため正に荷電しており、負に荷電した DNA と引き付け合う関係にある。ヒストン修飾の機能のひとつは、化学修飾それ自体によってヒストンの電荷を変え、結果としてヌクレオソームおよびクロマチンの構造を調節することにある (Dion et al., 2005)。もう一つの機能は、ゲノム機能を直接駆動する因子を標的領域に呼び込む目印として働くことである。そうした因子は種々のヒストン修飾を特異的に認識するドメインをもっており、これまでに多くのドメインが報告されている (Yun et al., 2011)。このためヒストン修飾はヒストン・マークとも呼ばれる。

これらの機能を介して、ヒストン修飾はゲノム制御に密接に関係する。例えば Aurora キナーゼ B に触媒される H3S10ph は、有糸分裂期の染色体凝縮時に付加される (Hayashi-Takanaka et al., 2009)。また DNA の二本鎖切断が起きた際には、数種のキナーゼによってヒストン H2AX (H2A のバリエーション) が迅速にリン酸化され、DNA 修復関連因子が動員される目印となる (Trakarnphornsombat and Kimura, 2023)。

遺伝子発現の出発点である転写の制御においても、ヒストン修飾は重要な役割を果たす。転写が活発な遺伝子のプロモーター領域には、アセチルトランスフェラーゼ p300/CBP が付加する H3K27ac や、MLL メチルトランスフェラーゼファミリーによる H3K4me3 が高レベルにみられ、転写因子や RNA ポリメラーゼ II、メディエーター複合体などのリクルートメントに関与する (Li et al., 2007; Sato et al., 2019)。転写中のジーンボディには、SETD2 によって H3K36me3 が付加され、転写開始点以外で発生する異所的転写の抑制に寄与する (Carrozza et al., 2005)。また転写活性化遺伝子のエンハンサー領域には、H3K4me1 が強く認められる。転写抑制にはたらく代表的なヒストン修飾は、H3K27me3 と H3K9me2/3 である (Kimura, 2013; Zhang et al., 2015)。H3K27me3 はポリコーム複合体 2 (PRC2) によって、プロモーターやエンハンサー領域、不活性 X 染色体に分布し、転写抑制に寄与する。H3K9me2/3 は G9a、GLP、SETDB1、SUV39H1、SUV39H2 によって付加される。H3K9me2 は典型的には抑制遺伝子領域に分布し、H3K9me3 はペリセントロメアやテロメア、レトロトランスポゾン、リピート配列に局在する (Zhang et al., 2015)。H3K9me3 にはクロモドメインをもつ種々のタンパク質 (HP1 など) が結合し、クロマチン凝縮に寄与する (Hiragami-Hamada et al., 2016)。H3K27me3 の分布パターンは細胞分化や発生を通じて変動する一方、H3K9me3 は細胞状態によらず常に似た分布を示す。また H3K27me3 と H3K9me3 は同じ転写抑制型ヒ

ストン修飾でありながら、互いに排他的に分布することが知られているが、そのメカニズムと意義はよく分かっていない。転写活性化型および抑制型のヒストン修飾は、ほとんどの場合排他的に分布するが、一部のゲノム領域では共局在する。代表例は分化や発生に関わる遺伝子の bivalent プロモーターで、H3K4me3 と H3K27me3 が共に集積しており、時期に応じた転写調節を容易にする仕組みと考えられている (Bernstein et al., 2006)。このようにヒストン修飾は転写制御にとって重要と思われるが、最近では DNA 複製後の転写再開にヒストン修飾は不要という報告もあり (Fenstermaker et al., 2023)、これらの関係にはより深い理解が必要である。

表 1 代表的なヒストン修飾の分布と転写への影響

ヒストン修飾	ゲノム上の分布	転写への影響
H3K4me1	活性化遺伝子のエンハンサー	活性化
H3K4me3	活性化遺伝子のプロモーター	
H3K9ac	活性化遺伝子のエンハンサー	
H3K27ac	活性化遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー	
H3K36me2	活性化遺伝子のジーンボディ、遺伝子間領域	
H3K36me3	活性化遺伝子のジーンボディ	
H3K79me3	活性化遺伝子のジーンボディ	
H2AK119ub	抑制遺伝子のプロモーター	抑制
H3K9me2	抑制遺伝子、非遺伝子領域	
H3K9me3	非遺伝子領域、ペリセントロメア、テロメア	
H3K27me3	不活性 X 染色体、抑制遺伝子のプロモーターとエンハンサー	
H4K20me3	ペリセントロメア	

1.3 高次クロマチン構造

クロマチンの階層構造

クロマチンは折りたたまれることで高次の階層構造をなす (Jerkovic' and Cavalli, 2021)。小スケールから順に、クロマチン・ループ (10-100kb)、Topology Associating Domain (TAD, 100kb-1Mb)、クロマチン・コンパートメント (数 Mb)、染色体テリトリー (数十 Mb-数百 Mb) が知られている。こうした階層性の理解は、近年開発が著しい染色体構造捕捉 (Chromosome Conformation Capture: 3C) 法関連技術や (Lieberman-Aiden

et al., 2009)、超解像顕微鏡を用いた解析によるところが大きい。

クロマチン・ループは環状の Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) タンパク質複合体を DNA が通り抜けることで形成される (Davidson and Peters, 2021)。ループはプロモーターとエンハンサーの近接をもたらし、転写を活性化する。エンハンサー制御は複雑で、複数のエンハンサーが単一のプロモーターを制御する場合や、逆に単一のエンハンサーが複数のプロモーターを制御する場合がある (Kieffer-Kwon et al., 2013)。したがってループは必要に応じて動的に調節されることが考えられる。TAD は複数のクロマチン・ループを内包する。TAD 間の境界には、TAD の安定化に関わる CTCF のほか (Nora et al., 2017)、RNA ポリメラーゼ II および III や種々のヒストン修飾が分布する (Dixon et al., 2012)。単一の TAD 内のゲノムは細胞種ごとに固有であるが、分化にともなって TAD がより上層のクロマチン・コンパートメント間を移動することで、内包する遺伝子の転写を調節することがある (Miura et al., 2019)。クロマチン・コンパートメントは Hi-C などのクロマチン相互作用解析により規定され、クロマチン密度の小さい A コンパートメントと、クロマチン密度の大きい B コンパートメントに分けられる (Lieberman-Aiden et al., 2009)。これらはそれぞれ、後述するユークロマチンとヘテロクロマチン (ユークロマチンとヘテロクロマチンを参照) に相当する。A コンパートメントでは転写が起りやすく、B コンパートメントでは転写は抑制される傾向にある。染色体テリトリーは、間期細胞核において各染色体が示すパッチワーク状の分布を指す。多くの細胞核では核膜周辺部は転写が抑制され、核内部は転写が活発な傾向にあるが、染色体はある程度その規則にしたがう配置となることが知られている (Bickmore and Steensel, 2013)。

上記に加え、最近ではさらに新たな染色体ドメインが報告されており (Mohana et al., 2023)、クロマチンの折りたたみの様式と、各階層における転写制御の理解は今後も深まることが期待される。

ユークロマチンとヘテロクロマチン

ヘキストや DAPI で染色した間期細胞核内を蛍光顕微鏡で観察すると、クロマチン密度に濃淡があるようすが見てとれる。低密度領域はユークロマチン、高密度領域はヘテロクロマチンと呼ばれ、それぞれ数百 kb-数 Mb のゲノムから構成される (図 3)。ヘテロクロマチンはさらに、分化や発生段階によって密度が変わり得る条件的ヘテロクロマチンと (Trojer and Reinberg, 2007)、細胞状態によらず常に凝縮する構成的ヘテロクロマチンに分類される (Saksouk et al., 2015)。前者は H3K27me3 に、後者は H3K9me3 に富む点がエピジェネティックな特徴である。

一般的に転写は、ユークロマチンで起りやすくヘテロクロマチンで起こりにくい (Allshire and H Madhani, 2018)。これは、転写因子や RNA ポリメラーゼが、密度の

低いクロマチンによりアクセスしやすいためと考えられる。クロマチンの密度制御には、DNA のメチル化やヒストン修飾、ヒストンバリエーション、クロマチンリモデリング複合体、ノンコーディング RNA など様々な因子が関わる。例えばクロマチンリモデリング複合体は、ヌクレオソーム間の距離の調節やヌクレオソームの添加・除去を直接担うことで、クロマチン密度を制御する (Clapier et al., 2017)。不活性 X 染色体上で転写される Xist RNA は、PRC2 複合体のリクルートと H3K27me3 の沈着を誘導することで X 染色体の凝縮に寄与する (Brockdorff, 2013)。タンパク質や RNA の天然変性領域の集合により生じるゲノムの区画化 (液-液相分離) もまた、クロマチン制御にとって重要である。転写が活発なユークロマチンでは、転写因子、RNA ポリメラーゼ、メディエーター複合体、スプライシング因子、新生 RNA などが液-液相分離により濃縮し、局所的かつ効率的な転写を促進する (Boija et al., 2018; Boehning et al., 2018)。ヘテロクロマチンでは、メチル化 DNA に MECP2 が (Li et al., 2020)、H3K9me3 に HP1 が結合し (Larson et al., 2017)、各タンパク質どうしが液-液相分離を起こすことで、クロマチンの高密度状態と転写抑制を維持する。また、クロマチン密度はある程度空間的にも制御されている。多くの細胞では、核質内部、特に核スペckルを内包するクロマチン間領域周辺は、クロマチン密度が低く転写が活発である (Brown et al., 2008)。一方、核膜と核小体近傍のゲノムは大部分がヘテロクロマチンで、転写はほとんど起こらない (Van Steensel and Belmont, 2017)。これは核膜を裏打ちする核ラミナがクロマチンと相互作用するためで、そうした相互作用ドメインは Lamina-associated-domain (LAD) と呼ばれる。ただし夜行性種の桿体視細胞では、こうしたクロマチンの核内配向性が逆転しているなど (Solovei et al., 2013)、全ての細胞種に当てはまるわけではない。

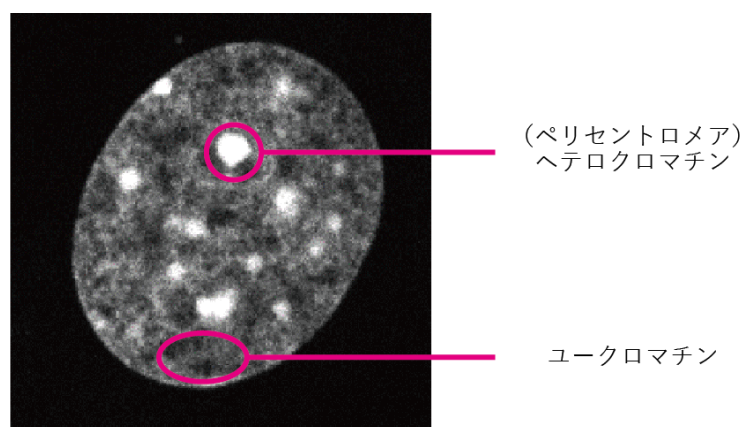


図3 マウス細胞核内のクロマチン分布

マウス胚性繊維芽細胞 NIH3T3 の Hoechst33342 染色画像。間期細胞核のクロマチンは不均一に分布し、高密度のヘテロクロマチンと低密度のユークロマチンに分けられる。

ペリセントロメア・ヘテロクロマチン

ペリセントロメアは染色体のセントロメアに隣接したゲノム領域で、セントロメアとは大きく異なる配列要素とエピジェネティックな特徴をもつ。セントロメアは、ヒトでは α -サテライトリピート、マウスではマイナーサテライト (MinSat) リピートを主とする配列から構成される (Smurova and Wulf, 2018)。一方ペリセントロメアは、ヒトでは非 α -サテライトリピートおよびレトロトランスポゾン (Altemose et al., 2022)、マウスではメジャーサテライト (MajSat) リピートに富み (Saksouk et al., 2015)、AT 含量が高い。またセントロメアは CENP-A (ヒストン H3 のバリエーション) ヌクレオソーム、H3K4me2、H4K5ac、H4K12ac を多く含むが、ペリセントロメアは典型的なヒストン H3 や H2A.Z (ヒストン H2A のバリエーション) ヌクレオソームからなり、H3K9me3、H4K20me3、ヒストンの低アセチル化、マウスではさらに DNA の高メチル化を特徴とする (Smurova and Wulf, 2018)。ゆえにペリセントロメアは、高度に凝縮したペリセントロメア・ヘテロクロマチン (PCH) を形成し、構成的ヘテロクロマチンとして細胞周期や分化を通じて高密度状態を保つ。マウスの間期細胞核では、各染色体の PCH が集まり、やや丸みのある構造体 (クロモセーター) を形成する (Probst and Almouzni, 2011)。クロモセーターは顕微鏡下で容易に観察できることから、PCH に関する研究はマウス細胞を用いて盛んにおこなわれてきた。その結果、PCH には上述のヒストン修飾に加え、H3K27me1 (Peters et al., 2003) や、H3K79me3 (Ooga et al., 2008)、H3K64me3 (Lange et al., 2013)、H3K56me3 (Jack et al., 2013) も分布し、その多くは H3K9me3 依存的なことが示されたが、それらの詳細な分子メカニズムと生理的意義はよく分かっていない。H3K9 メチル化酵素の欠損による H3K9me3 レベルの低下や (Montavon et al., 2021)、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤による高アセチル化は (Taddei et al., 2005)、PCH の HP1 分布を乱し、クロモセーターの形成を阻害する。また先述のように、クロマチン凝縮は HP1 や MECP2 を介した液-液相分離によって促進されるが、これらのタンパク質の足場としてメチル化 CpG と H3K9me3 は不可欠である。したがって、PCH の確立と維持に対するヒストン修飾の寄与は大きいと考えられる。PCH での転写は基本的には抑制されているものの、特定の細胞状態では活性化する。なかでも PCH の確立と維持に関わる反復配列の転写は、詳細な分子メカニズムが調べられている。分裂酵母 (*S pombe*) では、S 期にセントロメア近傍の dh リピートから RNA ポリメラーゼ II によって転写が起こる (Chen et al., 2008)。この転写物は RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (Rdr1) によって二本鎖 RNA に変換されたのち、Dicer (Dcr1) と Argonaute (Ago1) が担う RNAi 経路を経て、PCH への Clr4/Suv39h と H3K9me3 の集積を促進する。また dh リピートの転写にともない、同領域には H3K36me3 が蓄積する。この H3K36me3 は HDAC 複合体の足場となり、脱アセチル化亢進に寄与する

(Carrozza et al., 2005)。複製後のペリセントロメアは、こうした一連のヒストン修飾調節によって再凝縮すると考えられる。RNAi 経路に依存したヘテロクロマチン維持は酵母のほか、ショウジョウバエや植物でも保存されている (Janssen et al., 2018)。一方 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼをもたない哺乳類細胞での PCH 維持機構は長らく不明であったが、最近マウス細胞では Suv39h1 がクロモドメインを介して直接一本鎖 RNA に結合することが分かり (Shirai et al., 2017; Johnson et al., 2017; Velazquez Camacho et al., 2017)、転写依存的なクロマチン凝縮はあらゆる種で重要なことが明らかとなった。また、分化・発生、細胞老化、疾患、細胞ストレスに応じてヒトおよびマウスの PCH 転写が起こることも知られている (Smurova and Wulf, 2018)。それらの転写が能動的であるのか、あるいはエピジェネティック修飾の乱れによる受動的なものなのかについては、議論の余地がある。いずれにせよ、ペリセントロメアは高密度化と転写活性化という一見相反する機能を発揮し得るゲノム領域であり、それにはクロマチンと転写の緻密な制御を要することが推察される。

ペリセントロメアは、マウス胸腺組織や ES 細胞などにおいて pericentromere-associated-domain (PAD) と呼ばれる数 kb-数 Mb のサイズの領域と相互作用することが報告されている (Wijchers et al., 2015)。PAD 内の遺伝子は概してクロマチン・アクセシビリティと発現量が低く、分化段階によってドメインの数は変動する。またペリセントロメアには LAD が相互作用することも知られている。実際、顕微鏡観察すると核膜近傍に位置するクロモセンタールが散見されるが、その意義は定かではない (Van Steensel and Belmont, 2017)。

マウス初期胚発生のクロマチン再編成

有性生殖をおこなう種では、親ゲノムが会う受精を出発点として発生がはじまる。別々の個体に由来するゲノムが交ざり、胚ゲノムが構築される発生初期では、種によってタイミングに差はあるものの、非常にダイナミックなクロマチン再編成が起こる。マウスの場合、卵細胞は、精子の進入刺激を受けると細胞分裂し第二極体を放出する。卵細胞質に残存した染色体はやがて母性前核を形成する。一方精子核は卵細胞進入とそれに伴う核膜崩壊のち、それまで DNA と強く結合していたプロタミタンパク質をヒストンに置き換え (プロタミン-ヒストン置換)、卵細胞由来の因子をもとに父性前核を形成する。父母由来の両前核は、アクチン、微小管、ダイニンの働きによって接合体 (Zygote) 中心部に移動し (Scheffler et al., 2021)、それぞれの前核膜の消失を経て、両親の染色体による有糸分裂がはじまる。接合体は卵割を繰り返し、2、4、8 細胞期、桑実胚期、胚盤胞期の順に発生していく。

父母ゲノムそれぞれのクロマチン三次元構造は受精と同時に失われるため、接合体ゲノムでは TAD や LAD はほとんど見られないが、2 細胞期の zygotic-genome-activation

(ZGA) と前後して胚特有のクロマチン構造化が進行する (Xia and Xie, 2020)。また初期胚発生過程では DNA メチル化パターンも大きく変化する。接合体以降、父性ゲノムは TET により能動的かつ急速に、母性ゲノムは複製時の 5mC 希釈により受動的かつ緩やかに DNA の脱メチル化が起こり、着床以降に DNMT3A、DNMT3B によって新たなメチル化パターンが確立される (Monk et al., 2019)。PCH も同様に、形態的かつエピジェネティックな変化を起こす。PCH は、接合体から 2 細胞期にかけて核小体前駆ボディ (nucleolus-precursor-body; NPB) 周囲にリング状に分布し、4 細胞期～胚盤胞期において徐々に集合してクロモセンターを形成する (Lavin et al., 2012)。母性前核の PCH は H3K9me3 と H4K20me3 に富む一方、父性前核の PCH にそうした分布は見られない。2 細胞期以降は一般的な体細胞の PCH と同様のエピジェネティック修飾を持つようになる (Probst and Almouzni, 2008)。

上述のように 2 細胞期は ZGA やクロマチンの三次元構造化、エピジェネティック修飾パターンの変化がはじまる重要な発生段階である。興味深いことに、この時期には MajSat (Probst et al., 2010)、レトロトランスポゾンに属する Long Interspersed Nuclear Element (LINE) (Jachowicz et al., 2017) および MERVL (Sakashita et al., 2023) といった、体細胞では抑制されているゲノムからの転写が一過的に起こる。これらの転写を人為的に抑制あるいは過剰活性化させると胚発生に異常が生じることから、適切な転写制御が重要であることが示唆されるが、その詳しいメカニズムは不明である。

1.4 H3K36 メチル化

H3K36 メチル化酵素 NSD2

ヒストン H3 の 36 番目のリジンは、モノ/ジ/トリメチル化 (H3K36me1/2/3) を受ける。この修飾を担うヒストンメチル化酵素は高等真核生物では多数同定されており、nuclear receptor binding SET domain protein 1 (NSD1)、NSD2、NSD3、SETD2、SETD3、SETD7、SETD8、ASH2L、SMYD2、SMYD3、SETMAR が知られている (Wagner and Carpenter, 2012)。H3K36me2 から H3K36me3 へのメチル基転移は SETD2 のみが触媒でき、それ以外の酵素は非メチル化状態の H3K36 (H3K36me0) から H3K36me1、H3K36me2 へのメチル化を段階的に起こす。なお酵母では SETD2 のパラログである Set2 が H3K36me1/2/3 すべてのメチル化を担う。一方脱メチル化酵素としては KDM2A、KDM2B、KDM4A、KDM4B、KDM4C が報告されている。KDM4A-C は H3K36me3→H3K36me2→H3K36me1 を、KDM2A/B は H3K36me2→H3K36me1→H3K36me0 の脱メチル化を触媒する (Sharda and Humphrey, 2022)。各酵素は細胞種によって発現量が異なり、リダンダントに機能することもあれば独立してはたらくこともある。ここでは代表的な H3K36 メチル化酵素である NSD2 について詳説する。

NSD2 は、ウォルフヒルシュホーン症候群 (Wolf-Hirschhorn syndrome; WHS) 患者の

多くで欠損あるいは変異がみられる遺伝子として同定された。そのため NSD2 は WHS candidate 1 (WHSC1) と呼ばれる。主なアイソフォームとしては、全長 (152 kDa) の NSD2-long (以下、単に NSD2 と表記)、その半分ほどの NSD2-short、さらに短いイントロン由来アイソフォームである RE-II BP の 3 つが報告されている (Wagner and Carpenter, 2012)。NSD2 は proline-tryptophan-tryptophan-proline (PWWP) ドメイン、SET ドメイン、PHD フィンガー、HMG ボックスから構成される (図 4)。PWWP ドメインは N 末端側と C 末端側に二つあり、疎水性の芳香族ケージを含む N 末端側の PWWP ドメインを介して、NSD2 は H3K36me2 を認識する (Sankaran et al., 2016)。SET ドメインは N 末端側から pre-SET、SET、post-SET の 3 つのサブドメインに分かれる。メチル化活性を有するのは真ん中の SET ドメインで、post-SET ドメインは NSD2 がヌクレオソームに結合するまでメチル化活性を抑える自己阻害能をもつ (Bennett et al., 2017)。NSD2 は先述の WHS 以外にもいくつかの疾患と関連している。多発性骨髄腫患者の 15-20%では、4 番染色体の NSD2 と 14 番染色体の Immunoglobulin Heavy Chain (IGH) の遺伝子転座に起因した NSD2 の過剰発現が見られる。一部の急性リンパ性白血病患者の NSD2 では、1099 番目のグルタミン酸からリジンへのアミノ酸置換変異 (E1099K) や T1150A による NSD2 の過剰活性化が確認されている (Bennett et al., 2017)。いずれの疾患においても、NSD2 活性変化はゲノムワイドな H3K36me2 の異常蓄積と H3K27me3 の分布変化 (詳細は **ユークロマチンにおける H3K36 メチル化の機能** を参照) をもたらし、遺伝子発現パターンに影響をおよぼす (Popovic et al., 2014; Oyer et al., 2014)。最近では、NSD2 は脂肪細胞の増殖と分化に必要であること (Zhuang et al., 2018)、細胞老化を抑制するはたらきがあることが報告されており (Tanaka et al., 2020)、疾患以外の一般的な細胞機能における寄与も明らかとなりつつある。



図 4 NSD2 のドメイン構成
H3K36 メチル化酵素 NSD2 は、PWWP ドメイン (N 末端側と C 末端側に一つずつ)、HMG ボックス、PHD フィンガー (中間から C 末端側にかけて計 5 つ)、SET ドメインから構成される。全長型は 152 kDa である。

ユークロマチンにおける H3K36 メチル化の機能

遺伝学の適用の容易さから、H3K36 メチル化 (特にトリメチル) の機能解析には酵母が広く用いられてきた。しかしながら **H3K36 メチル化酵素 NSD2** で述べたように、酵母とは乳類ではメチル化酵素の種類数に大きな差があり、ほ乳類の H3K36 メチル化の

方がより緻密に制御される。したがって、これまで酵母で明らかとなった知見は、必ずしもほ乳類に当てはまらなかったり、あるいは別のメチル化レベルに対応している可能性がある。加えて、ほ乳類細胞の H3K36 ジメチルとトリメチルの機能が、それぞれ独立しているのか、あるいは重複しているのかについても議論の余地がある。そこで、本研究は H3K36 ジメチルに着目しているものの、本節ではジメチルだけでなくトリメチルの機能も記述する。なお、モノメチルの機能解析はほとんど進められていない。

最もよく知られた H3K36 メチル化の機能は、転写中の遺伝子ボディにおける異所的な転写の抑制である。酵母の Set2 およびマウスの SETD2 はそれぞれ RNA ポリメラーゼ II の C 末端ドメインにリン酸化依存的に結合する。これにより、RNA ポリメラーゼ II の転写伸長依存的に、遺伝子ボディに H3K36me3 が付加される。酵母ではヒストン脱アセチル化酵素複合体 RPD3 (Carrozza et al., 2005; Guan et al., 2023) が、マウス ES 細胞では DNMT3B (Neri et al., 2017) が、この H3K36me3 を足場として遺伝子ボディに結合することで、転写開始点以外で起こる異常な転写を抑制する。なお、H3K36me2 も遺伝子ボディに存在するが、その機能はよく分かっていない。一方で遺伝子間領域に分布する H3K36me2 については近年解析が進んでおり、DNMT3A を呼び込む足場となることで同領域の DNA メチル化パターンの確立に寄与する (図 5) (Weinberg et al., 2019)。この H3K36 メチル化—DNA メチル化間の関係性は、新たなエピジェネティック修飾間クロストークとして注目されており、生殖細胞系列の発生過程においても重要な役割を果たすことが報告されている (Xu et al., 2019; Shirane et al., 2020)。H3K36me2 はまた、H3K27me3 と拮抗的な分布を示す。これは H3K27me3 を担う PRC2 複合体の構成因子が H3K36me2 クロマチンに結合しにくいことに起因しており、マウス ES 細胞の H3K36me2 は、PRC2 依存的な H3K27me3 の過剰蓄積からゲノムを保護している (Streubel et al., 2018; Chen et al., 2022)。同様の拮抗作用は、NSD2 を高発現する多発性骨髄腫でも確認されており、H3K36me2 過多に伴う H3K27me3 の異常分布が、グローバルな遺伝子発現変動を引き起こす (Popovic et al., 2014)。

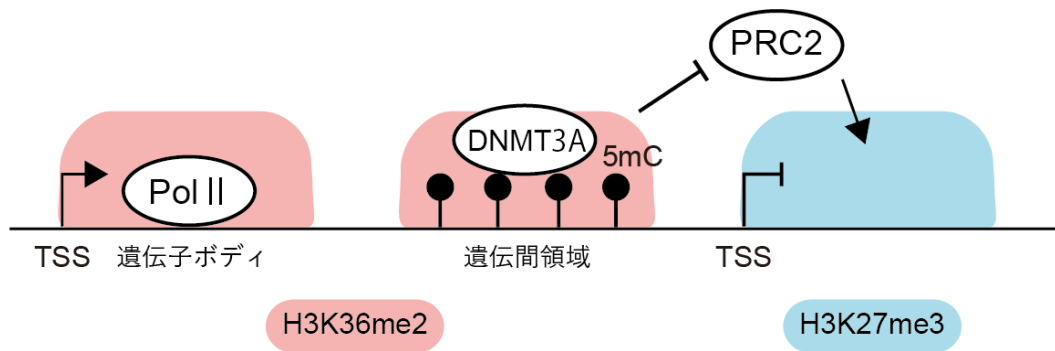


図5 H3K36me2 の一般的な分布と機能

(左) H3K36me2 は転写中の遺伝子ボディに分布する。Pol II : RNA ポリメラーゼ II。
(中央) 遺伝子間領域の H3K36me2 は DNMT3A の足場となり、同領域の DNA メチル化 (5mC) パターンの確立に寄与する。(右) H3K36me2 は PRC2 リクルートに抵抗することで、H3K27me3 の拡散をふせぐ。

ヘテロクロマチンにおける H3K36 メチル化の機能

H3K36 メチル化は、ヘテロクロマチンの転写と構造制御にも寄与している。まず分裂酵母では、Set2 による H3K36me3 は、ペリセントロメアとサブテロメアの転写抑制 (Georgescu et al., 2020) や、RNAi 依存的なヘテロクロマチン形成 (Chen et al., 2008)、サブテロメア近傍のヘテロクロマチン維持 (Matsuda et al., 2015) に必要である。またショウジョウバエの眼球円板の PCH に濃縮する H3K36me2 は、LINE や Long Terminal Repeat (LTR) といったトランスポゾンの転写を抑制する (Chaouch et al., 2021)。一方哺乳類 (マウス、ヒト) 細胞では、H3K36me2 脱メチル化酵素 KDM2A の欠損が、PCH の H3K36me2 レベルと MajSat 転写量の増大を引き起こす (Frescas et al., 2008)。H3K36me3 が PCH に蓄積することもマウス ES 細胞で報告されている (Chantalat et al., 2011)。ほ乳類とその他の種間で、H3K36 メチル化のヘテロクロマチン転写への影響が異なる理由はよく分かっていない。**ユークロマチンにおける H3K36 メチル化の機能**で触れたように、哺乳類の多様なメチル化酵素による複雑な制御が影響している可能性がある。また転写増大を H3K36 メチル化が直接転写を活性化すると捉えるか、あるいは異所的転写を抑えることで正規の転写が活性化すると捉えるかによって、H3K36 メチル化の機能的解釈が変わることも考慮する必要がある。

H3K36me2 可視化プローブ

ヒストン修飾を生細胞で可視化するプローブとしては、Fab (antigen binding fragment) と mintbody (modification-specific intracellular antibody) がある。Fab は抗体の抗原結合断片のことで、蛍光標識 Fab を細胞に導入することでヒストン修飾動態を追跡する

ことができる (Hayashi-Takanaka et al., 2011)。一方 mintbody は、抗体の scFv (重鎖と軽鎖の可変領域をリンカーでつないだ断片) に蛍光タグを付加したプラスミドベースのプローブで、培養細胞だけでなく生体内でもヒストン修飾を安定的に可視化できる (Sato et al., 2013; Sato et al., 2016)。本研究では、木村研究室の佐藤助教が開発した H3K36me2 に対する mintbody (2C3LH-sfGFP、未発表) を用いることで、PCH の H3K36me2 動態を解析した。

1.5 クロマチンリモデリング

ISWI クロマチンリモデリング複合体

高等真核生物の ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体は、switch/sucrose non-fermenting (SWI/SNF)、chromodomain-helicase DNA-binding (CHD)、imitation SWItch (ISWI)、inositol-requiring 80 (INO80) という 4 つのサブファミリーに分類される (表 2) (Hasan and Ahuja, 2019)。これらの複合体は、ATP 加水分解由来のエネルギーを利用して、転写、DNA 複製、修復の過程で、DNA-ヒストン相互作用変化、ヌクレオソームの間隔調節または除去、ヌクレオソームの構造変化および組立てを制御する (Clapier et al., 2017)。どの複合体も共通して、SWI2/SNF2-family ATPase ドメインを有する酵素活性タンパク質をコア因子として、酵素活性調節や標的認識を担うタンパク質をアクセサリ因子として内包する。SWI/SNF と INO80 複合体は 15 個以上の構成因子からなる一方、ISWI と CHD 複合体のほとんどは 4 個以下の因子から構成される。なお、このサブファミリーには属さないがクロマチンリモデリング活性が示唆される複合体として、 α -サラセミア/精神遅滞症候群 X 連鎖型 (ATRX) 複合体およびコケイン症候群 B 群 (CSB) 複合体がある。ここでは ISWI 複合体について詳説する。高等真核生物の ISWI サブファミリーは 7 つの複合体から構成される。SMARCA1/SNF2L を ATPase 活性因子とする CERF および NURF と、SMARCA5/SNF2H を ATPase 活性因子とする CHRAC (BAZ1A/ACF1、CHRAC15、CHRAC17)、ACF (BAZ1A)、NoRC (BAZ2A/TIP5)、RSF (RSF1)、WICH (BAZ1B/WSTF) である。ここで () 内はアクセサリ因子を意味する (Bartholomew, 2014)。なお、酵母ではこれらに対応する複合体として ISW サブファミリーが保存されており、Isw1/Isw1p を ATPase 活性因子とする ISW1a および ISW1b、Isw2/Isw2p を ATPase 活性因子とする ISW2 から構成される (Gelbart et al., 2001; Vary et al., 2003)。in vitro での生化学的解析から、ISWI 複合体は、ヌクレオソームの間隔調節と組立てを担うことが分かっている。転写や DNA 複製の過程では、H3-H4 四量体および H2A-H2B 二量体の再構成が起こる。この時 ISWI 複合体はヌクレオソーム間のスペース調節やヒストンの 8 量体化を制御することで、ヌクレオソームの成熟を促進する (Clapier et al., 2017)。CTCF 結合サイトのクロマチンアクセシビリティを高める働きもあるこ

とから、TAD の形成・維持にも関わることを示唆されている (Wiechens et al., 2016)。

表 2 クロマチンリモデリング複合体の分類

サブファミリー	クロマチン リモデリング複合体	ATPase 活性因子	主なアクセサリ因子
SWI/SNF	BAF	SMARCA4/BRG1, SMARCA2/BRM	ARID1A, ARID1B
	PBAF		ARID2
	ncBAF		BRD9
CHD	NuRD	CHD3, CHD4	HDAC1, MBD2
ISWI	CERF	SMARCA1/SNF2L	CECR2
	NURF		BPTF
	CHRAC	SMARCA5/SNF2H	CHRAC15, CHRAC17
	ACF		BAZ1A/ACF1
	NoRC		BAZ2A/TIP5
	RSF		RSF1
	WICH		BAZ1B/WSTF
INO80	INO80	INO80	ARP4
	P400/TIP60	P400	TIP60, TRRAP
	SRCAP	SRCAP	ARP4, H2AZ

SMARCA5

SMARCA5/SNF2H は上述の通り、ISWI 複合体の中核をなす ATPase 活性因子である。主要なドメインは、N 末端側の ATPase ドメインと C 末端側の HAND-SANT-SLIDE (HSS) ドメインである (図 6) (Clapier et al., 2017)。ATPase ドメインはさらに DE_{xx} と HELIC_c という二つのパートに分けられる。HSS ドメインはヒストンやリンカー DNA、その他のタンパク質との結合に必要な領域で、例えば SLIDE ドメインは BAZ1A および BAZ1B と相互作用する (Aydin et al., 2014)。この他、ATPase ドメインの N 末端側と C 末端側にはそれぞれ、AutoN、NegC と呼ばれる自己抑制ドメインが隣接する。これらのドメインは SMARCA5 の立体構造を調節することで、SMARCA5 が標的クロマチンに結合するまで ATPase 活性を抑える働きを持つ (Clapier and Cairns, 2012)。SMARCA5 は、組織としては、肺、脾臓、精巣、脳、心臓、腎臓、肝臓で (Palasca et al., 2018)、疾患としては、急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia; AML)、乳が

ん、卵巣がん、肝細胞腫瘍で高発現する (Li et al., 2021)。例えば SMARCA5 は CD34 陽性 AML 前駆細胞で高く発現しており、抑制することで AML 細胞の異常増殖が抑えられる (Stopka et al., 2000)。このように SMARCA5 が組織あるいは細胞レベルの表現型に影響することは示唆されているものの、それに対し、クロマチンリモデリング活性がどのように寄与しているのかはよく分かっていない。最近では、SMARCA5 遺伝子座から転写される環状 RNA (circular RNA; circRNA) の機能解析も進んでおり、子宮頸がんや乳がんでは、SMARCA5 circRNA の異常な低発現が、細胞増殖や遊走能を亢進することが報告されている (Zhu et al., 2022)。このようにクロマチンリモデリング非依存的な SMARCA5 の役割も明らかになりつつある。

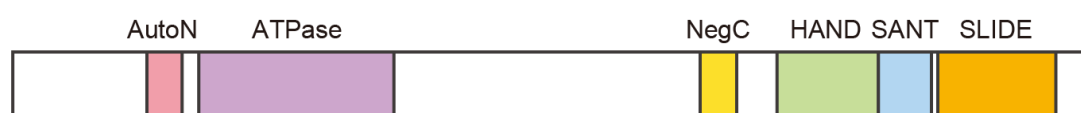


図 6 SMARCA5 のドメイン構成

クロマチンリモデリング因子 SMARCA5 は、ATPase 活性を有する ATPase ドメイン、他タンパク質との相互作用に関わる HAND、SANT、SLIDE (HSS) ドメイン、自己抑制ドメインである AutoN、NegC から構成される。

BAZ1B

BAZ1B/WSTF は、ウィリアムズ症候群 (Williams Syndrome; WS) 患者で欠失が見られるタンパク質の一つとして同定された (Lu et al., 1998)。WS 患者では WBSCR9 遺伝子座周辺の約 1Mb が、片染色体で欠失している。この欠失領域には 20 数個の遺伝子が含まれており、BAZ1B はそのうちの一つである。

主なドメインとしては N 末端側から順に、WAC (WSTF/Acf1/cbp146) ドメイン、DDT ドメイン、WSD ドメイン、PHD フィンガー、ブロモドメインがある (図 7)。WAC ドメインを含む N 末端周辺にはキナーゼ活性があり、ヒストン H2AX の Tyr142 をリン酸化する (Xiao et al., 2008)。WSD ドメインは、WHIM (WSTF, HB1, Itc1p, MBD9) モチーフを内包し、BAZ ドメインと呼ばれることもある。DDT から WSD にかけての領域は SMARCA5 の SLIDE ドメインとの結合に必要である (Sharif et al., 2021)。PHD フィンガーは種々のヒストンと親和性があり、BAZ1B の場合は H3K4me3, H3K4me0, H3R2, H3K14ac に結合できる。ブロモドメインはアセチル化ヒストンと相互作用する。この他、BAZ1B は中間から C 末端領域にかけて 4 つの PCNA 結合モチーフを持ち、PCNA 依存的に DNA 複製部位に局在する (Poot et al., 2004)。なお、BAZ1B は BAZ1A とよく似たドメインからなるものの、アミノ酸構成と電荷の違いにより、同じドメインであっても標的に対する親和性は異なる。例えば BAZ1A の PHD フィンガーは DNA

と結合するが、BAZ1B の同フィンガーは DNA に結合できない (Oppikofer et al., 2017)。BAZ1B は全身の組織で発現し、特に脳と肝臓で発現量が高い。疾患では乳がん和大腸がんで高発現が見られる (Sharif et al., 2021)。BAZ1B の機能は多くの場合、単独ではなく ISWI 複合体の構成因子として発揮されると思われる。

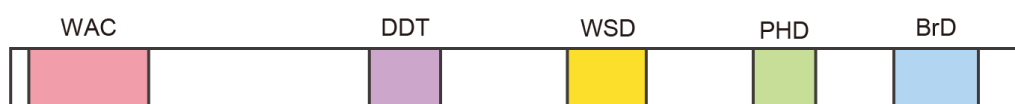


図7 BAZ1B のドメイン構成

クロマチンリモデリング因子 BAZ1B は、N 末端側から順に、WAC ドメイン、DDT ドメイン、WSD ドメイン、PHD フィンガー、ブロモドメイン (BrD) からなる。

ヘテロクロマチンにおける ISWI 複合体の機能

4 つの ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体サブファミリーのうち、ヘテロクロマチンでの機能がよく知られているのは、CHD と ISWI である。CHD の一つである NuRD 複合体は、ATPase 活性因子 CHD4 の PHD ドメインを介した H3K9me3 認識と (Musselman et al., 2012)、MBD2 サブユニットを介したメチル化 DNA 認識によって (Zhang et al., 1999)、ヘテロクロマチンの構造制御に関わる。一方 ISWI は、ACF、WICH、NoRC 複合体の機能が報告されている。ACF はマウス細胞の S 期に PCH に集積する。ACF のサブユニットである BAZ1A の欠損は S 期後期の進行を遅らせることから、ACF は PCH 複製を調節する可能性が示唆されている (Collins et al., 2002)。WICH も同様にマウス細胞の S 期に PCNA 依存的に PCH に局在する。SMARCA5 や BAZ1B を欠失させると、H3K9me3 と HP1 α/β のレベルが上昇し、複製後のクロマチン・アクセシビリティが低下することから、WICH は複製過程の PCH の密度制御に関与すると考えられている (Poot et al., 2004)。また、WICH はヒト細胞の S 期に不活性 X 染色体に局在することから、条件的ヘテロクロマチンの複製にも寄与している可能性がある (Culver-Cochran and Chadwick, 2012)。NoRC は、rDNA プロモーターの DNA メチル化とヒストン脱アセチル化を誘導することにより、rRNA の転写を抑制するなど、核小体ヘテロクロマチンでの機能がよく調べられてきた (Zhou et al., 2002; Santoro et al., 2002)。一方でマウス細胞における BAZ2A 欠失は、rDNA だけでなく MajSat の H4K20me3 と H3K9me3 レベルを減少させ、ゲノムの不安定化を引き起こすことから、NoRC は PCH 制御にも寄与すると考えられる (Guetg et al., 2010)。ISWI 複合体の標的クロマチンの認識は、各アクセサリ因子が持つドメインに依存しているが (Ito et al., 1999; Ribeyre et al., 2016; Strohner et al., 2001; Li et al., 2006; Tallant et al., 2015)、PCH を認識する分子機構についてはよく分かっていない。

1.6 研究目的

H3K36me2 は、これまでユークロマチンに分布するヒストン修飾として分子メカニズムと機能の解析が進められてきた。一方、ヘテロクロマチンに分布する H3K36me2 については、主にシーケンス解析でその存在が示唆されていたものの、その局在化機構と意義は不明だった。本研究は、いくつかのマウス細胞種において、H3K36me2 が PCH に局在することを顕微鏡観察で発見したことに端を発し、その分子メカニズムと意義を明らかにすることを目的として行った。この目的を達成することで、単一のヒストン修飾が持つ多面性の理解が深まると期待される（図 8）。

先行研究

H3K36me2 は一般的に **ユークロマチン** に分布し機能する

本研究

特定のマウス細胞種において H3K36me2 は **ヘテロクロマチン** に分布することを発見した



H3K36me2 をヘテロクロマチンに導く
分子機構とその**生理的意義**は何か？

単一のヒストン修飾が持つ多面性の理解が期待される

図 8 本研究の目的

本研究が見出した H3K36me2 のヘテロクロマチン分布に関して、その分子機構と生理的意義を明らかにすることを本研究の目的とする。

2 章 実験方法

蛍光タグ付きプラスミド構築

市販プラスミド

本研究で使用した市販プラスミドを以下に記す。

Halo タグ付きプラスミド（かずさ DNA 研究所より供与；Hayashi-Takanaka et al., 2020）：

NSD2 (FHC00177)、NSD3 (FHC00329)、SETD2 (FHC00272)、SETD3 (FHC12875)、SETD7 (FHC00270)、SETD8 (FHC06789)、ASH2L (FHC01483)、SMYD2 (FHC27765)、SMYD3 (FHC03496)、SETMAR (FHC05461)、KDM2A (FHC 00712)、KDM3C (FHC36094E)、KDM4A (FHC00602)、KDM4B (FHC13945E)、KDM4C (FHC00635)、SMARCA5 (FHC01216)

emerald-green GFP (emGFP) タグ付きプラスミド（Addgene より購入）：

BAZ1A (65371)、BAZ1B (65372)、BAZ2A (65373)

供与プラスミド

本研究で使用したプラスミドのうち、他の研究者から供与していただいたものを以下に記す。

Dr. Y. Markaki から供与（Anton et al., 2014）：

pCAG-dCas9-EGFP、pEX-A-U6-gRNA for MajSat, MinSat

ケンブリッジ大学・半田博士から供与：

PB510-dCas9-Halo、PB510-sgRNA for MajSat

In-Fusion によるプラスミド構築

全長タンパク質をコードする蛍光タグ付きプラスミドとして、SMARCA5-sfGFP、emGFP-SMARCA5、PB510-dCas9-Halo-NSD2 を、特定のドメインからなる欠失変異体を発現するプラスミドとして、EGFP-BAZ1B 誘導体を作製した。まず PB533-N1-sfGFP-Neo、PB533-mEmerald-C1-Puro、PB510-dCas9-Halo、pEGFP-C1 ベクターを以下のように制限酵素で処理した。

ベクター	3 µg 分
10×rCutSmart Buffer [B6004S; NEB]	5 µL
制限酵素	0.5 µL
NotI-HF [R3189L; NEB]	PB510-dCas9-Halo
EcoRI-HF [R3101L; NEB]	それ以外のベクター
DDW	up to 50 µL

1.5 mL チューブで反応液を調製した。

ヒートブロックに静置し、37°Cで一晩反応させた。

以下のように PrimeSTAR HS DNA Polymerase (R010A; タカラバイオ) を用いて PCR をおこなった。

5×PrimerSTAR Buffer	10 µL
dNTP mix [2.5 µM each]	4 µL
Forward Primer [10 µM]	1.5 µL
Reverse Primer [10 µM]	1.5 µL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 µL
Template プラスミド [1 ng/µL]	0.5 µL
DDW	up to 50 µL

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラーに静置し、以下の条件で PCR 反応に供した。

Halo-SMARCA5 ベクター (FHC01216 ; かずさ) をテンプレートとした場合

98°C	10 秒間	×30 サイクル
55°C	5 秒間	
72°C	4 分 15 秒間	

Halo-NSD2 ベクター (FHC00177 ; かずさ) をテンプレートとした場合

98°C	10 秒間	×30 サイクル
55°C	15 秒間	
72°C	4 分間	

emGFP-BAZ1B (65372; Addgene) をテンプレートとした場合

98°C	10 秒間	×30 サイクル
55°C	x	
72°C	y	

x = プライマーTm 値が 55°C以上 : 5 秒間、55°C未満 : 15 秒間

y = 1 分間/kb

制限酵素処理後の 1.5 mL チューブおよび PCR 反応後の 0.2 mL チューブに 6×Gel Loading Dye (B7024A; NEB) を添加し、0.8 %アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。Gel Red (41002; Biotium) でゲルを 30 分間染色した後、UV 照射下で目的長のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (28704; QIAGEN) でゲル抽出した (メーカーのプロトコルに従った)。ゲル抽出後のベクターとインサートを In-Fusion 反応に供した (詳細は **In-Fusion** を参照)。In-Fusion 産物を大腸菌に形質転換した (詳細は**大腸菌の形質転換**を参照)。翌日、プレートからピックアップしたコロニーをアンピシリンまたはカナマイシン含有プラスグロウ溶液 (ナカライテスク) 2 mL に加え、37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (GF2002; VIOGENE) によりプラスミドを精製した (メーカーのプロトコルに従った)。DNA シーケンス解析により配列を確認した (詳細は **DNA シーケンス解析**を参照)。配列が正しいクローンを、アンピシリンまたはカナマイシン含有プラスグロウ溶液 50 mL に加え、37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (K210015; Thermo Fisher Scientific) によりプラスミドを精製した (メーカーのプロトコルに従った)。

Inverse-PCR によるプラスミド構築

まず以下のようにプライマーの 5'末端をリン酸化した。

プライマー [100 μM]	1 μL
10×T4 PNK buffer [B0201S; NEB]	1 μL
T4 PNK [M0201S; NEB]	0.5 μL
ATP [100 mM]	0.1 μL
DDW	7.4 μL

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラーにセットし、以下の条件でリン酸化反応に供した。

37°C 30 分間

65°C 20 分間

リン酸化プライマー、Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (M0493L; NEB)、Halo-NSD2 (FHC00177 ; かずさ) または In-Fusion によるプラスミド構築 で作製した EGFP-BAZ1B プラスミドをテンプレートとして用い、以下の条件で Inverse-PCR をおこなった。

5 × Q5 Reaction Buffer	5 µL
5 × Q5 High GC Enhancer	5 µL
dNTP mix [2 mM each]	2.5 µL
Forward Primer [10 µM]	1.25 µL
Reverse Primer [10 µM]	1.25 µL
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0.25 µL
Template プラスミド [1 ng/µL]	0.5 µL
DDW	9.25 µL

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラーに静置し、以下の条件で PCR 反応に供した。

98°C	30 秒間	× 35 サイクル
98°C	10 秒間	
x°C	30 秒間	
72°C	y	
72°C	2 分間	

x = NEB Tm Calculator を用いて算出した。

(<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>)

y = 50 秒間/kb

PCR 反応後の 0.2 mL チューブに 6 × Gel Loading Dye (B7024A; NEB) を添加し、2 % アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。Gel Red (41002; Biotium) でゲルを 30 分間染色した後、UV 照射下で目的長のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (28704; QIAGEN) でゲル抽出した (メーカーのプロトコルに従った)。ゲル抽出産物を以下のように Ligation 反応に供した。

ゲル抽出産物	2.5 μ L
2×Ligation mix [319-05961;ニッポンジーン]	2.5 μ L

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラー上で 16°C、15 分間インキュベートした。

Ligation 反応産物を大腸菌に形質転換した（詳細は**大腸菌の形質転換**を参照）。翌日、プレートからピックアップしたコロニーをアンピシリンまたはカナマイシン含有プラスグロウ溶液 2 mL に加え、37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (GF2002; VIOGENE) によりプラスミドを精製した（メーカーのプロトコルに従った）。DNA シークエンス解析により配列を確認した（詳細は**DNA シークエンス解析**を参照）。

使用したプライマーを表 3 にまとめた。

In-Fusion

In-Fusion HD Cloning Kit (639650 ; タカラバイオ) を用いた。ベクターとインサートの DNA 量 比 の 計 算 に は 、 In-Fusion molar ratio calculator (<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools/in-fusion-molar-ratio-calculator>) を利用した。In-Fusion 反応は以下の通りである。

5×HD	1 μ L
ベクター	x μ L (In-Fusion molar ratio calculator で算出)
インサート	y μ L (In-Fusion molar ratio calculator で算出)
DDW	up to 5 μ L

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラー上で 50°C、15 min の In-Fusion 反応に供した。

大腸菌の形質転換

-80°Cから取り出した DH5 α コンピテントセル (1.5 mL チューブ) を氷上で溶かした。プラスミドをコンピテントセルに加え、タッピングして混ぜた後、氷上に 5 分間静置した。42°Cのヒートブロックで 50 秒間加熱し、氷上に 2 分間静置した。プラスグロウ溶液でコンピテントセルを懸濁した。アンピシリン耐性遺伝子をコードするプラスミドの場合は、アンピシリン含有プレートに播種した。カナマイシン耐性遺伝子をコードする

プラスミドの場合は、37°Cのインキュベーターで 60 分間回復培養した後、カナマイシン含有プレートに播種した。その後、プレートを 37°Cのインキュベーターに一晩静置した。

DNA シーケンス解析

以下の反応液を 0.2 mL チューブで作製した。

プライマー [10 μ M]	0.32 μ L
プラスミド DNA	300 ng 分
DDW	up to 10 μ L

反応チューブを東京工業大学オープンファシリティセンターバイオ部門に提出した。シーケンス結果を Snapgene ビューワー上でアライメントすることで、DNA 配列を確認した。

マウスの飼育

マウスの飼育と実験は、東京工業大学動物実験委員会の承認を得たうえでおこなった（承認番号：D2023004）。マウスは 12 時間ごとに明暗し、室温 22-23°C に保たれた部屋で、自由に水と餌をとれる状態で飼育した。

マウス組織/胚の回収・凍結切片作製

逃亡防止策を講じた部屋で、マウスを頸椎脱臼により安楽死させた。マウスをキムタオルの上に置き、全身にエタノールをスプレーした。腹部をハサミで切断し、目的の組織・胚を摘出した。組織・胚を、あらかじめ PBS を入れた 10 cm ディッシュ上で洗浄した。組織は 5×5 mm サイズにカットした。キムワイプで組織片・胚から PBS を除いた後、4 % PFA in PBS を入れた 1.5 mL チューブに移し、4°C で一晩チューブを回転しながら固定した。1.5 mL チューブから固定液を除去し、PBS を加え、4°C、10 分間回転しながら洗浄した。この PBS 洗浄を計 3 回繰り返した。キムワイプで組織片・胚から PBS を除いた後、あらかじめ OCT-compound (45833 ; SAKURA) を入れた保存容器に組織片・胚を移し、液体窒素で凍結した。その後、ミクロトームを用いて厚さ 10 μ m の組織・胚切片を作製し、スライドガラス上に貼り付けた。切片は -80°C で保存した。

細胞培養

本研究で使用した細胞種

セルライン名	由来	出典
NIH3T3	マウス胚性繊維芽細胞	北大・高木博士から供与
MC12	マウス胚性腫瘍細胞	Abe et al., 1988
C2C12	マウス筋芽細胞	JCRB から購入
Pmi28	マウス筋芽細胞	独・Solovei 博士から供与
iMEF (3-12)	不死化マウス胚性繊維芽細胞	理研・眞貝博士から供与
iMEF (5KO)	iMEF (3-12) から Setdb1、G9a、Glp、Suv39h1/2 をノックアウトした細胞	Fukuda et al., 2023
ES (TT2)	マウス胚性幹細胞	理研・眞貝博士から供与
ES (TKO)	Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b をノックアウトした ES 細胞	Tsumura et al., 2006
HEK293T	不死化ヒト胎児腎細胞	札医大・藤永博士から供与

本研究で使用した培地の組成

試薬の正式名称	略称	製造メーカー
Dulbecco's Modified Eagle Medium	高グルコース DMEM	08458-16; ナカライテスク
Ham's F-10 Nutrient Mixture	F-10 ハム	N6908; Gibco
牛胎児血清	FBS	10270-106; Gibco
ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液	P/S	26253-84; ナカライテスク
MEM 非必須アミノ酸溶液	NEAA	139-15651; WAKO
2-メルカプトエタノール	2-ME	21985-023; Gibco
L-グルタミン	L-Glu	25030-081; Gibco
Leukemia Inhibitory Factor	LIF	NU0012-2; ナカライテスク
ピルビン酸ナトリウム	S/P	11360-070; Gibco

NIH3T3、MC12、C2C12、HEK293T :

10 % FBS、1 % P/S、高グルコース DMEM

iMEF (3-12)、iMEF (5KO) :

10 % FBS、1 % P/S、1 % NEAA、55 μ M 2-ME、高グルコース DMEM

ES (TT2) :

10 % FBS、1 % P/S、1 % NEAA、100 μ M 2-ME、1 % L-Glu、

10³ unit/mL LIF、高グルコース DMEM

ES (TKO) :

15 % FBS、1 % P/S、1 % NEAA、100 μ M 2-ME、1 mM S/P、

10³ unit/mL LIF、高グルコース DMEM

Pmi28 :

15 % FBS、1 % P/S、F-10 ハム

細胞の培養・継代・ストック

マウスおよびヒト培養細胞は、10 cm ディッシュ (培地 10 mL) に播種し、37°C、5 % CO₂ 濃度のインキュベーターで培養した。細胞継代は以下の手順でおこなった。ディッシュから培地を除き、PBS を 10 mL 加えた。PBS を除き、Trypsin/EDTA (35554-64 ; ナカライテスク) を 1 mL 加えた。Trypsin/EDTA を除き、ディッシュを叩くことで細胞をはがした。培地 10 mL を加え懸濁した後、その細胞懸濁液 3 mL を、あらかじめ培地 7 mL を入れた 10 cm ディッシュに移した。細胞のストックは以下の手順でおこなった。ディッシュから培地を除き、PBS を 10 mL 加えた。PBS を除き、Trypsin/EDTA を 1 mL 加えた。Trypsin/EDTA を除き、ディッシュを叩くことで細胞をはがした。培地 10 mL を加え懸濁した後、全量を 15 mL チューブに回収した。1,200 rpm、2 分間遠心し、上清を除いた。セルバンカー (CB021 ; タカラバイオ) 1 mL で細胞ペレットをよく懸濁し、細胞保存用チューブに移した。細胞ストックは-80°Cで保存した。細胞ストックの播種は次の手順にしたがった。-80°Cから取り出した細胞ストックチューブを37°Cの恒温槽で加温した。溶けた細胞懸濁液をあらかじめ 9 mL の培地を入れた 15 mL チューブに移し、1,200 rpm、2 分間遠心した。上清を除き、培地 10 mL で懸濁した後、10 cm ディッシュに播種した。

ノックアウト細胞の作製

CRISPR/Cas9 システム用プラスミドの作製

ガイド RNA (gRNA) は CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) を利用して設計した。センスオリゴとアンチセンスオリゴを以下のようにリン酸化およびアニーリング処理した。

センスオリゴ [100 μ M]	0.5 μ L
アンチセンスオリゴ [100 μ M]	0.5 μ L
10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer [B0201S; NEB]	0.5 μ L
T4 PNK [M0201S; NEB]	0.2 μ L
ATP [100 mM]	0.1 μ L
DDW	3.2 μ L

0.2 mL チューブで反応液を調製した。
次の温度条件のサーマルサイクラーにかけた。

37°C 30 分間
95°C 5 分間
-0.1°C/秒ずつ 25°Cまで温度低下

反応後の 0.2 mL チューブに DDW 45 μ L を追加した。

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 ベクター (62988; Addgene) を以下のように制限酵素処理した。

ベクター	3 μ g 分
10 $\times$ CutSmart Buffer [B7204S; NEB]	5 μ L
BbsI-HF [R3539L; NEB]	0.5 μ L
DDW	up to 50 μ L

1.5 mL チューブで反応液を調製した。
ヒートブロックに静置し、37°Cで一晩反応させた。

BAP [TOYOBO] 2 μ L
を追加し、さらに 37°Cで 1 時間反応させた。

制限酵素および BAP 処理後の 1.5 mL チューブに 6 $\times$ Gel Loading Dye(B7024A; NEB) を添加し、2 %アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。Gel Red (41002; Biotium) でゲルを 30 分間染色した後、UV 照射下で目的長のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (28704; QIAGEN) でゲル抽出した (メーカーのプロトコルに従った)。

以下の Ligation 反応により、リン酸化・アニーリングしたオリゴをゲル抽出したベクターに挿入した。

リン酸化・アニーリング済みオリゴ	0.5 μ L
ゲル抽出ベクター	0.2 μ L
2×Ligation mix [319-05961;ニッポンジーン]	2 μ L
DDW	1.3 μ L

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラー上で 16°C、15 分間インキュベートした。

Ligation 産物を大腸菌に形質転換した（詳細は**大腸菌の形質転換**を参照）。翌日、プレートからピックアップしたコロニーをアンピシリン含有プラスグロウ溶液 2 mL に加え、37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (GF2002; VIOGENE) によりプラスミドを精製した（メーカーのプロトコルに従った）。DNA シークエンス解析により配列を確認した（詳細は **DNA シークエンス解析**を参照）。配列が正しいクローンを、アンピシリン含有プラスグロウ溶液 50 mL に加え、37°C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (K210015; Thermo Fisher Scientific) によりプラスミドを精製した（メーカーのプロトコルに従った）。

CRISPR/Cas9 システムの導入とクローン選択

iMEF 細胞を 2×10^5 cell/mL 濃度で 6 well プレートに播種した。翌日、以下のように Lipofectamine3000 (L3000075; Thermo Fisher Scientific) を用いて、gRNA を挿入した PX459 プラスミドをトランスフェクションした。

反応液 A :	
プラスミド	2.5 μ g 分
P3000 Reagent	5 μ L
Opti-MEM Medium	up to 125 μ L

反応液 B :	
Lipofectamine3000 Reagent	7.5 μ L
Opti-MEM Medium	117.5 μ L

反応液 A と B をピペッティングで混ぜ、室温、15 分間静置した。
全量を 6 well プレートに添加した。

翌日、培地を除去し、2 µg/mL 濃度の Puromycin 含有培地を加えた。2 日後、培地を除去し、抗生物質を含まない新しい培地を加えた。2 日後、Puromycin 選択細胞を 500 cells/20 mL 濃度で 15 cm ディッシュに播種した。1 週間後、顕微鏡下で単一細胞由来のコロニーをピペッティングで回収し、半量を 96 well ガラス底プレートに、残りの半量を 96 well プラスチック底プレートに播種した。3 日後、ガラス底プレートの細胞を固定し、それぞれ以下の抗体で免疫染色した（詳細は**免疫染色** 培養細胞を参照）。

NSD2 ノックアウト候補細胞	抗 H3K36me2-Alexa488 抗体
SMARCA5 ノックアウト候補細胞	抗 SMARCA5 抗体
BAZ1B ノックアウト候補細胞	抗 BAZ1B 抗体

SMARCA5 と BAZ1B は、一次抗体反応後、Alexa488 ラベル化二次抗体を反応させた。

翌日、免疫染色した細胞を共焦点顕微鏡で観察した（詳細は**顕微鏡観察** 免疫染色（培養細胞）を参照）。NSD2 ノックアウト候補細胞については、ヘテロクロマチンへの H3K36me2 集積が比較的少ないクローンを、SMARCA5 および BAZ1B ノックアウト候補細胞については、それぞれのタンパク質の蛍光シグナルが弱いクローンを目視で判別した。該当クローンを 96 well プラスチック底プレートから 6 cm ディッシュ（2 枚）まで繰り返し継代し、細胞数を徐々に増やした。6 cm ディッシュ 1 枚分の細胞はストックし、もう 1 枚分の細胞からはタンパク質を回収した。回収したタンパク質を試料として、以下の抗体でウェスタンブロッティングし、ノックアウトできたクローンを判別した（詳細は**ウェスタンブロッティング**を参照）。

NSD2 ノックアウト候補細胞	抗 NSD2 抗体
SMARCA5 ノックアウト候補細胞	抗 SMARCA5 抗体
BAZ1B ノックアウト候補細胞	抗 BAZ1B 抗体

使用したオリゴは表 3 に、抗体は表 4 にまとめた。

ノックダウン細胞の作製

shRNA ノックダウン用プラスミドの作製

shRNA は GPP Web Portal (<https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/>) を用いて設計した。センスオリゴとアンチセンスオリゴを以下のようにアニーリングした。

センスオリゴ [100 μM]	1 μL
アンチセンスオリゴ [100 μM]	1 μL
10×NEB buffer2 [B7002S; NEB]	5 μL
DDW	43 μL

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

次の温度条件のサーマルサイクラーにかけた。

95°C 4 分間

70°C 10 分間

-0.1°C/秒ずつ 25°Cまで温度低下

pLKO.1-Hygro ベクター (24150; Addgene) を以下のように制限酵素処理した。

ベクター	3 μg 分
10×CutSmart Buffer [B7204S; NEB]	5 μL
EcoRI-HF [R3101L; NEB]	0.5 μL
AgeI-HF [R3552S; NEB]	0.5 μL
DDW	up to 50 μL

1.5 mL チューブで反応液を調製した。

ヒートブロックに静置し、37°Cで一晩反応させた。

制限酵素処理後の 1.5 mL チューブに 6×Gel Loading Dye (B7024A; NEB) を添加し、2%アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。Gel Red (41002; Biotium) でゲルを 30 分間染色した後、UV 照射下で目的長のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (28704; QIAGEN) でゲル抽出した (メーカーのプロトコルに従った)。以下の Ligation 反応により、アニーリングしたオリゴをゲル抽出したベクターに挿入した。

ゲル抽出ベクター	20 ng 分
アニーリング済みオリゴ	2 μ L
10 $\times$ T4 DNA Ligase buffer [B0201S; NEB]	2 μ L
T4 DNA Ligase [WAKO]	1 μ L
ATP [100 mM]	0.2 μ L
DDW	up to 20 μ L

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラーで 16°C、一晚インキュベートした。

Ligation 産物を大腸菌に形質転換した（詳細は**大腸菌の形質転換**を参照）。翌日、プレートからピックアップしたコロニーをアンピシリン含有プラスグロウ溶液 2 mL に加え、37°C、180 rpm で一晚振とう培養した。翌日、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (GF2002; VIOGENE) によりプラスミドを精製した（メーカーのプロトコルに従った）。DNA シークエンス解析により配列を確認した（詳細は **DNA シークエンス解析**を参照）。配列が正しいクローンを、アンピシリン含有プラスグロウ溶液 50 mL に加え、37°C、180 rpm で一晚振とう培養した。翌日、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (K210015; Thermo Fisher Scientific) によりプラスミドを精製した（メーカーのプロトコルに従った）。

shRNA ノックダウンシステムの導入と細胞選択

HEK293T 細胞を 4×10^5 cell/mL 濃度で 6 cm ディッシュに播種した。翌日、以下のよう に Lipofectamine3000 (L3000075; Thermo Fisher Scientific) を用いて、shRNA プラスミドをトランスフェクションした。なお、コントロールには Scramble シークエンスを挿入した pLKO.1-Hygro ベクターを用いた。

反応液 A :

pLKO.1-Hygro ベクター [shRNA 挿入済み]	2.7 μ g 分
psPAX2 ベクター [12260; Addgene]	2.1 μ g 分
pCMV-VSV-G ベクター [PT3343-5; Clontech]	0.7 μ g 分
P3000 Reagent	11 μ L
Opti-MEM Medium	up to 265.5 μ L

反応液 B :

Lipofectamine3000 Reagent	16.5 μ L
Opti-MEM Medium	250 μ L

反応液 A と B をピペティングで混ぜ、室温、15 分間静置した。
全量を 6 cm ディッシュに添加した。

翌日、トランスフェクションした HEK293T 細胞ディッシュから培地を除き、新しい培地を加えた。またノックダウンする iMEF 細胞を 1×10^5 cell/mL 濃度で 6 well プレートに播種した。翌日、HEK293T 細胞ディッシュから回収したウイルス含有培地 (5 mL) を 0.45 μ m フィルター (25AS045AS; ADVANTEC) でろ過し、終濃度 4 μ g/mL となるように Polybrene を添加した。iMEF 細胞プレートから培地を除き、ウイルス含有培地を 2 mL 加えた。翌日、ウイルス含有培地を除き、400 μ g/mL 濃度の Hygromycin 含有培地を加えた。3 日後、培地を除去し、抗生物質を含まない新しい培地を加えた。翌日以降、6 well プレートから 6 cm ディッシュ (2 枚) まで繰り返し継代し、細胞数を徐々に増やした。6 cm ディッシュ 1 枚分の細胞はストックし、もう 1 枚分の細胞からは RNA を回収した。回収した RNA を試料として、RT-qPCR をおこなうことで、ノックダウン効率を算出した。
使用したオリゴを表 3 にまとめた。

安定発現細胞の作製

PiggyBac 法を用いた。

2C3-mintbody 安定発現 iMEF 細胞

iMEF 細胞を 2×10^5 cell/mL 濃度で 6 well プレートに播種した。翌日、Lipofectamine3000 (L3000075; Thermo Fisher Scientific) を用いて、以下のようにプラスミドをトランスフェクションした。

反応液 A :

PB533-2C3LH-sfGFP-Neo	0.75 μ g 分
PB533-H2B-Halo-Puro	0.75 μ g 分
PB533-mCherry-PCNA-Neo	0.75 μ g 分
mPB	0.25 μ g 分
P3000 Reagent	5 μ L
Opti-MEM Medium	up to 125 μ L

反応液 B :

Lipofectamine3000 Reagent	7.5 μ L
Opti-MEM Medium	117.5 μ L

反応液 A と B をピペッティングで混ぜ、室温、15 分間静置した。
全量を 6 well プレートに添加した。

翌日、培地を除去し、2 μ g/mL 濃度の Puromycin 含有培地を加えた。2 日後、培地を除去し、500 μ g/mL 濃度の Neomycin 含有培地を加えた。10 日後、培地を除き、抗生物質を含まない新しい培地を加えた。

dCas9-Halo 安定発現 Pmi28 細胞

Pmi28 細胞を 2×10^5 cell/mL 濃度で 6 well プレートに播種した。翌日、Lipofectamine3000 を用いて、以下のようにプラスミドをトランスフェクションした。

反応液 A :

PB510-dCas9-Halo または PB510-dCas9-Halo-NSD2	1.5 μ g 分
PB510-sgRNA for MajSat	0.75 μ g 分
mPB	0.25 μ g 分
P3000 Reagent	5 μ L
Opti-MEM Medium	up to 125 μ L

反応液 B :

Lipofectamine3000 Reagent	7.5 μ L
Opti-MEM Medium	117.5 μ L

反応液 A と B をピペッティングで混ぜ、室温、15 分間静置した。
全量を 6 well プレートに添加した。

翌日、培地を除去し、2 μ g/mL 濃度の Puromycin 含有培地を加えた。2 日後、培地を除去し、抗生物質を含まない新しい培地を加えた。

IgG 抗体または Fab の蛍光ラベリング

以下の抗体ラベリング反応液を 1.5 mL Protein LoBind チューブ (Eppendorf) で作製した。

IgG 抗体または Fab	100 µg 分
NaHCO ₃ [1M]	10
Dye	x µL
PBS	up to 100 µL
x = Alexa488: 1.5 µL、Cy3: 4 µL、Cy5: 3.5 µL	

1.5 mL をアルミホイルで遮光した。

室温で 1 時間回転しながらインキュベートした。

PD Mini-Trap G-25 カラム (28918007; Cytiva) をカラム立てに静置し、保存液を自然落下させた。上から注いだ PBS を自然落下させる操作を 3 回繰り返す、カラムを洗浄した。1 時間の蛍光標識反応後のサンプルを全量カラムにアプライした。フローズルーを自然落下させた。G-25 カラムの下に Amikon 10k カラムチューブ (UFC5010BK; Millipore) をセットし、PBS 500 µL を加えてフローズルーを回収した。Amikon 10k カラムチューブを 14,000×g、4°C で 15 分間遠心した。Amikon 10k カラム上の残存溶液を新しい 1.5 mL Protein LoBind チューブに回収した。フローズルーを捨てた Amikon 10k カラムチューブに PBS 500 µL を追加し、14,000×g、4°C で 15 分間遠心した。Amikon 10k カラム上の残存溶液を 1.5 mL Protein LoBind チューブに追加回収した。Nanodrop (OneC; Thermo Fisher Scientific) により蛍光標識された抗体または Fab の濃度を計測した。

免疫染色

培養細胞

カバーガラス (12 well プラスチック底プレートに静置) またはガラス底プレート/ディッシュに播種した細胞から培地を除き、固定液を加えた。固定条件は以下の通り。

ヒストン修飾の免疫染色：

4 % PFA、250 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、0.1 % Triton X-100 in PBS 溶液
室温、5 分間

ヒストン修飾以外の免疫染色およびトランスフェクション後の免疫染色：

4 % PFA in PBS 溶液

室温、5 分間

トランスフェクションの手順は、

顕微鏡観察 生細胞（一過的トランスフェクション） の項を参照。

固定液を除き、PBS を加え、室温で 5 分間振とうした。PBS を除き、新しい PBS を加え、室温で 5 分間振とうした（以下、PBS 洗浄）。PBS を除き、1 % Triton X-100 in PBS を加え、室温で 20 分間振とうした。3 回 PBS 洗浄した。PBS を除き、Blocking One-P（05999-84；ナカライテスク）を加え、室温で 20 分間振とうした。Blocking One-P を除き、抗体反応液を加え、4°Cで一晩静置した。抗体反応液の組成は以下の通り。

抗ヒストン修飾抗体 2 µg/mL

抗非ヒストン修飾抗体 0.5 µg/mL

JF646 HaloTag ligand 2 nM（Halo タグ付きプラスミド使用時）

抗体反応液の溶媒としては共通して、1 µg/mL Hoechst33342（ナカライテスク）、10 % Blocking One-P in PBS を使用した。

抗ヒストン修飾抗体は、ウサギ由来抗体を除き、Alexa488、Cy3、Cy5 のいずれかでラベルした抗体を用いた。

翌日、抗体反応液を除き、3 回 PBS 洗浄した。二次抗体反応が必要な場合は、PBS を除き、1 µg/mL Alexa488 ラベル化二次抗体溶液（溶媒は一次抗体反応時と同じ）を加え、室温、1 時間静置した。抗体反応液を除き、3 回 PBS 洗浄した。またカバーガラスで免疫染色した場合は、PBS 洗浄後、ProLong Diamond Antifade Mountant（P36961; Thermo Fisher Scientific）を用いてスライドガラス上に封入した。

マウス組織および胚

組織・胚切片（スライドガラス上に貼付）を-80°Cから取り出し、室温に 15 分間静置することで解凍した。PBST 40 mL を入れたガラス瓶に切片スライドガラスを立て、室温で 5 分間振とうした（PBST 洗浄）。これを計 3 回繰り返した。次に、賦活化装置 NxGen（FUNAKOSHI）を用い、切片を抗原賦活化処理した。賦活化バッファーとして 10 mM クエン酸（pH2.0）を用い、温度条件は 95°C、20 分間とした。切片スライドガラスをガラス瓶に立て、PBST 洗浄を 3 回おこなった。PBST を除き、1 % TritonX-100 in PBS 40 mL を加え、室温で 25 分間振とうした。PBST 洗浄を 3 回おこなった後、切片スラ

イドガラスを湿潤箱に静置し、LIQUID BLOCKER(大道産業)で切片周囲をかこんだ。Blocking One-P 300 μ L を切片に添加し、室温で 25 分間ブロッキングした。ブロッキング液を除き、抗体反応液 200 μ L を切片スライドガラスにかけ、室温で 3 日間免疫染色した。抗体反応液は以下の通りである。

抗 H3K36me2-Alexa488-Fab	20 μ g/mL
抗 H3K9me3-Cy3 抗体	10 μ g/mL (組織切片の場合)
抗 H3K9me3-Cy5 抗体	10 μ g/mL (胚切片の場合)
Hoechst33342	1 μ g/mL

抗体反応液の溶媒としては 10 % Blocking One-P in PBS を使用した。

3 日後、PBST 洗浄を 3 回おこなった。切片上に ProLong Diamond Antifade Mountant (P36961; Thermo Fisher Scientific) を垂らし、その上からカバーガラス (MICRO COVER GLASS 24 $\times$ 32mm ; MATSUNAMI) を被せることで切片を封入した。

使用した抗体を表 4 にまとめた。

顕微鏡観察

顕微鏡の設定条件 (共通)

Nikon A1 システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

倒立顕微鏡	Ti-2 (Nikon)
ソフトウェア	NIS-elements AR version 5.21.00
レーザー	405 nm、488 nm、561 nm、640 nm (LU-N4; Nikon)
検出器/カメラ	GAsP detector
ダイクロイックミラー	405/488/561/640
蛍光フィルター	450/50、525/50、595/50、700/75

Olympus Ixlore SpinSR システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

倒立顕微鏡	IX-83 (Olympus)
ソフトウェア	CellSens Dimension 3.2
レーザー	405 nm、488 nm、561 nm、640 nm (OBIS)
検出器/カメラ	sCMOS カメラ (ORCA Flash 4.0 ; 浜松ホトニクス)
ダイクロイックミラー	405/488/561/640
蛍光フィルター	447/60、525/50、617/73、685/40

横河電機 CSU-W1 システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

倒立顕微鏡	Ti-E (Nikon)
ソフトウェア	NIS-elements v5.11.03
レーザー	405 nm、470 nm、555 nm、640 nm
検出器/カメラ	EM-CCD (iXon 3; Andor)
ダイクロイックミラー	405/470/555/640
蛍光フィルター	440/40、520/60、690/50

生細胞（一過的トランスフェクション）

細胞を 2×10^5 cell/mL 濃度で 24 well ガラス底プレートに播種した。翌日、Lipofectamine3000 (L3000075; Thermo Fisher Scientific) を用いて、以下のようにプラスミドをトランスフェクションした。

反応液 A :

プラスミド DNA	0.5 μ g 分
P3000 Reagent	1 μ L
Opti-MEM Medium	up to 25 μ L

反応液 B :

Lipofectamine3000 Reagent	1.5 μ L
Opti-MEM Medium	23.5 μ L

反応液 A と B をピペッティングで混ぜ、室温、15 分間静置した。

全量を 24 well プレートに添加した。

Halo タグ付きプラスミドを導入した場合は、翌日、培地を除いた後、2 nM Janelia Fluor 646 (JF646) HaloTag リガンド (Promega) および 0.5 μ g/mL Hoechst33342 を含む培地で 37°C、30 分間培養した。それ以外の場合は、Hoechst33342 のみを含む培地で培養した。染色後は培地を除き、蛍光色素を含まない新しい培地を加えた。この洗浄を計 2 回繰り返した後、10 % FBS、1 % P/S 含有 FluoroBrite DMEM (A1896701; Gibco) に培地交換し、共焦点顕微鏡のヒートステージ (37°C、5 % CO₂) にセットした。顕微鏡の撮影条件は以下の通りである。

Nikon A1 システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

レンズ	Plan Apo VC 60x WI DIC N2 (NA 1.2)
Z 設定	範囲：5 μm ステップ：1 μm
ピンホールサイズ	43.42 μm
スキャナー設定	スキャナーズーム：1.5 倍 スキャンサイズ：512×512 pixels スキャンスピード：1 フレーム/秒

生細胞（安定発現）

安定発現細胞を 35 mm ガラス底ディッシュに播種した翌日、培地を除き、2 nM JF646 HaloTag リガンドを含む培地で 37°C、30 分間培養した。染色後は培地を除き、蛍光色素を含まない新しい培地を加えた。この洗浄を計 2 回繰り返した後、10 % FBS、1 % P/S 含有 FluoroBrite DMEM に培地交換し、共焦点顕微鏡のヒートステージ（37°C、5 % CO₂）にセットした。顕微鏡の撮影条件は以下の通りである。

Nikon A1 システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

レンズ	Plan Apo λ 100x OFN25 DIC N2 (NA 1.45)
Z 設定	範囲：6 μm ステップ：2 μm
T 設定	間隔：15 分間 合計：38 時間 45 分
ピンホールサイズ	63.86 μm
スキャナー設定	スキャナーズーム：1.2 倍 スキャンサイズ：512×512 pixels スキャンスピード：1 フレーム/秒

免疫染色（培養細胞）

図 10、図 14 では以下の条件で撮影した。

Olympus Ixprove SpinSR システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

レンズ	UplanApoN 60× OSC2 (NA 1.4)
Z 設定	範囲：8 μm ステップ：0.5 μm
スキャンサイズ	2048×2048 pixels

それ以外の画像は生細胞（一過的トランスフェクション）と同様の条件で取得した。

免疫染色（組織切片）

以下の条件で撮影した。

Nikon A1 システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

レンズ	Plan Apo VC 60x WI DIC N2 (NA 1.2)
Z 設定	範囲：5 μm ステップ：1 μm
ピンホールサイズ	43.42 μm
スキャナー設定	スキャナーズーム：1 倍
	スキャンサイズ：512×512 pixels
	スキャンスピード：1 フレーム/秒

免疫染色（胚切片）

以下の条件で撮影した。

横河電機 CSU-W1 システム搭載共焦点レーザー顕微鏡

レンズ	Plan Apo 40x/0.95 DIC M/N2
Z 設定	範囲：5 μm ステップ：1 μm
スキャンサイズ	1024×1024 pixels

画像解析

ラインプロファイル

NIS-Elements AR Analysis version 5.01.00 (Nikon) を用い、焦点面の Z スライスのマージ画像を作成した。次に Image J Fiji (ver 1.54f) の Plot Profile 機能を使って画像上に任意の直線を引き、直線上の位置と輝度を計測した。その後、R (ver 4.2.1) を用いて、x 軸が直線の距離 (μm)、y 軸が輝度となるプロットを作成した。

PCH 局在率 (Intensity ratio)

NIS-Elements AR Analysis version 5.01.00 (Nikon) を用いてバックグラウンドを差し引いた。次に AIVIA version 10.5.1 (DRVision) の Cell Analysis レシピを実行し、Hoechst チャンネルに基づいて PCH と細胞核の領域を指定したうえで、領域内の平均輝度を測定した。PCH 局在率 (PCH の平均輝度を、PCH を除いた核の平均輝度で割った値。結果図内では Intensity ratio と表記) は R により算出した。

ピアソン相関

二つのチャンネルの輝度のピアソン相関は、Image J Fiji の Coloc2 機能を用いて算出した。プロットと有意差検定には R を用いた。

RNA 抽出・RNA 精製

RNA を回収するため、6 cm ディッシュに細胞を播種した。翌日、培地を除き、TRIzol Reagent (15596026; Thermo Fisher Scientific) を 500 μ L 加えた。セルスクレーパーで細胞をはがした後、全量を 1.5 mL チューブに回収した。以降は、RNase およびゲノムのコンタミネーションを防ぐため、マスクと手袋を着用して実験した。実験機とピペットマンは RNase Zap (AM9780; Thermo Fisher Scientific) でよく拭き、フィルターチップを使用した。TRIzol Reagent で懸濁した RNA 抽出液に対し、クロロホルムを 100 μ L 加え、10 秒間のボルテックス後、室温に 3 分間静置した。12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、15 分間遠心し、上層を新しい 1.5 mL チューブに回収した。イソプロパノールを 250 μ L 加え、5 秒間のボルテックス後、室温に 10 分間静置した。12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、10 分間遠心し、上清を除いた。75 % エタノール 700 μ L を加え、5 秒間のボルテックス後、12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、5 分間遠心し、上清を除去した。再度 12,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、2 分間遠心し、上清を丁寧除去した。チューブの蓋を開けた状態で室温、3 分間風乾した。Nuclease free water を 20 μ L 加え、5 秒間のボルテックス後、ヒートブロックで 55 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした。Nanodrop (OneC; Thermo Fisher Scientific) により RNA 濃度と精製度を計測した。

DNase 処理

以下の反応液を 0.2 mL チューブで調製し、サーマルサイクラーで 37 $^{\circ}$ C、30 分間インキュベートした。

精製 RNA	1 μ g 分
10 $\times$ RQ1 Reaction buffer [M198A; Promega]	3 μ L
RQ1 RNase-free DNase [M610A; Promega]	
MajSat および MinSat RNA を定量する場合	10 μ L
それ以外の遺伝子 RNA を定量する場合	1 μ L
Nuclease free water	up to 30 μ L

RQ1 Stop Solution (M199A; Promega) 1 μ L を追加し、ボルテックス後、サーマルサイクラーで 65 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした。RNeasy MinElute Cleanup Kit (74204; QIAGEN) により、RNA を精製した (メーカーのプロトコルに従った)。Nanodrop

(OneC; Thermo Fisher Scientific) により RNA 濃度と精製度を計測した。

cDNA 合成

以下の反応液を 0.2 mL チューブで調製し、サーマルサイクラーで 65°C、5 分間インキュベートした。

DNase 処理・精製済み RNA	100 ng 分
random hexamer [1 µg/µL, 58875; Thermo Fisher]	0.25 µL
dNTPs mix [2.5 mM each, 639125; タカラバイオ]	4 µL
Nuclease free water	up to 13 µL

以下の反応液を 0.2 mL チューブに追加した。

5×First strand buffer [y01129; Thermo Fisher]	4 µL
DTT [0.1 M, y00147; Thermo Fisher]	1 µL
RNaseOUT [100000840; Thermo Fisher]	1 µL
SuperScript III Reverse Transcriptase [56575; Thermo Fisher]	1 µL

サーマルサイクラーにセットし、以下の条件でインキュベートした。

25°C	5 分間
50°C	60 分間
70°C	15 分間

さらに RNaseH [2 U/µL, 100004927; Thermo Fisher] を 0.2 µL 追加し、サーマルサイクラーで 37°C、60 分間インキュベートした。

RT-qPCR

PowerUP SYBR Green (A25778; Thermo Fisher Scientific)

以下の反応ミックスを調製した。

Nuclease free water	8.6 µL
Fw primer [20 µM]	0.2 µL
Rv primer [20 µM]	0.2 µL
2×PowerUP SYBR Master Mix	10 µL

96 well プレーットのウェル底に cDNA 1 μ L をアプライした。なお検量線を引くため、cDNA 原液から作製した希釈系列 (1/4、1/16、1/64、1/256、1/1024) もアプライした。cDNA 添加後のウェルに上から反応ミックス 19 μ L を追加した。全アプライ完了後、96 well プレーートをシールし、4,800 rpm、室温で 1 分間遠心した。96 well プレーートを軽くボルテックスし、4,800 rpm、室温で 3 分間遠心した。qPCR マシン Mx3000P (Agilent Technologies) に 96 well プレーートをセットし、以下の条件で qPCR に供した。

50°C	2 分間	
95°C	2 分間	
95°C	15 秒間	× 40 サイクル
60°C	1 分間	
95°C	1 分間	
55°C	30 秒間	
95°C	30 秒間	

検量線法により遺伝子の発現量を定量した。コントロール遺伝子には GAPDH を用いた。

Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (E3005L; NEB)

MajSat および MinSat RNA を定量する場合は、DNase 処理済み RNA をテンプレートとして、以下の反応ミックスを調製した。

Nuclease free water	7.2 μ L
Fw primer [20 μ M]	0.4 μ L
Rv primer [20 μ M]	0.4 μ L
2×Luna Universal One-Step Reaction Mix	10 μ L
20×Luna WarmStart RT Enzyme Mix	1 μ L

96 well プレーットのウェル底に DNase 処理済み RNA 1 μ L をアプライし、さらに上から反応ミックス 19 μ L を追加した。全アプライ完了後、96 well プレーートをシールし、4,800 rpm、室温で 1 分間遠心した。96 well プレーートを軽くボルテックスし、4,800 rpm、室温で 3 分間遠心した。qPCR マシン Mx3000P (Agilent Technologies) に 96 well プレーートをセットし、以下の条件で qPCR に供した。

55°C	10 分間	× 40 サイクル
95°C	1 分間	
95°C	10 秒間	
60°C	30 秒間	
95°C	1 分間	
55°C	30 秒間	
95°C	30 秒間	

Δ ΔCt 法により遺伝子の発現量を定量した。コントロール遺伝子には GAPDH を用いた。

使用したプライマーを表 3 にまとめた。

タンパク質抽出

共免疫沈降および結合アッセイ（**DNA とタンパク質の結合アッセイ**を参照）で用いるタンパク質を以下の手順で抽出した。

共免疫沈降の場合

HEK293T 細胞を 2×10^5 cell/mL 濃度で 6 cm ディッシュ×4 枚に播種した。翌日、Lipofectamine2000 (11668019; Thermo Fisher Scientific) を用いて、以下のように各プラスミドをトランスフェクションした。

プラスミドの組み合わせ：

#1	Halo-NSD2	emGFP-SMARCA5
#2	Halo-NSD2	emGFP-BAZ1B
#3	Halo	emGFP-SMARCA5
#4	Halo	emGFP-BAZ1B

反応液 A：

2 種のプラスミド（組み合わせは上述）

Opti-MEM Medium

8 μg 分

up to 0.5 mL

反応液 B :

Lipofectamine2000 Reagent	20 μ L
Opti-MEM Medium	up to 0.5 mL

1.5 mL チューブで両反応液を混合した後、室温で 20 分間静置した。
全量を 6 cm ディッシュに添加した。

結合アッセイの場合

HEK293T 細胞を 4×10^5 cell/mL 濃度で 10 cm ディッシュ $\times$ 4 枚に播種した。翌日、Lipofectamine2000 を用いて、以下のように各プラスミドを 10 cm ディッシュ $\times$ 2 枚にトランスフェクションした。

反応液 A :

pEGFP-BrD+AT1-3 または pEGFP-BrD+AT1-3mut	24 μ g 分
Opti-MEM Medium	up to 1.5 mL

反応液 B :

Lipofectamine2000 Reagent	60 μ L
Opti-MEM Medium	up to 1.5 mL

15 mL チューブで両反応液を混合した後、室温で 20 分間静置した。
全量を 10 cm ディッシュに添加した。

以下、10 cm ディッシュスケールの手順を記した。6 cm ディッシュスケールの場合、各試薬は半量とした。翌日、培地を除去し、PBS 10 mL を加えた。PBS を除き、Trypsin/EDTA 1 mL を加え、ディッシュを叩くことで細胞を完全にはがした。培地を 9 mL 加え、細胞を懸濁した後、全量を 15 mL チューブに回収した。1,200 rpm、4°C、2 分間遠心した。以降は氷冷した試薬を用い、氷上で操作した。上清を捨て、PBS 5 mL を加えて懸濁後、10 cm $\times$ 2 枚分を 15 mL チューブ $\times$ 1 本にまとめた。1,200 rpm、4°C、2 分間遠心し、上清を除いた。PBS 10 mL を加え懸濁後、再度 1,200 rpm、4°C、2 分間遠心した。上清を慎重に捨て、PBS 1 mL で懸濁し、1.5 mL Protein LoBind チューブ (Eppendorf) に移した。Whole サンプルとして 15 μ L を分取し、残りは 700 $\times$ g、4°C、5 分間遠心した。上清を慎重に捨て、タッピングでペレットをほぐした。IP buffer (300 mM NaCl, 10 mM HEPES-NaOH [pH7.4], 0.1 % Triton X-100) 1 mL を加えピペティング $\times$ 3 回で懸濁した。20,000 $\times$ g、4°C で 20 分間遠心し、上清を新しい 1.5 mL

Protein LoBind チューブに回収した。Sup サンプルとして 15 μ L を分取した。残りの上清 (以降、IP サンプル。約 1 mL) には Protease Inhibitor (03969-21; ナカライテスク) 10 μ L を加えた。沈殿は IP buffer 1 mL で懸濁し、Pellet サンプルとして 15 μ L を分取した。Whole、Sup、Pellet サンプル各 15 μ L に 2 $\times$ SDS loading buffer (4 % SDS、20 % グリセロール、120 mM Tris-HCl [pH 6.8]、100 mM DTT、0.01 % ブロモフェノールブルー) 15 μ L を加え、ボルテックス後、95°C で 5 分間加熱し、SDS-PAGE に供した (共免疫沈降では 5-20 % SDS-PAGE ゲルを、結合アッセイでは 15 % SDS-PAGE ゲルを用いた。1 $\times$ SDS-PAGE-Buffer を使用し、定電流 30 mA で 60 分間泳動した)。ゲルを CBB (13542-65; ナカライテスク) で染色し、LuminoGraph II (WSE-6200; ATTO) で撮影した。

免疫沈降

以下、10 cm ディッシュから抽出したタンパク質の手順を記した。6 cm ディッシュの抽出タンパク質の場合、各試薬は半量とした。**タンパク質抽出**で得られた IP サンプル (約 1 mL) から input として 15 μ L を分取した。Dilution/Wash buffer (10 mM Tris-HCL [pH7.5]、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA) 1 mL を入れた 1.5 mL Protein LoBind チューブに、GFP-Trap Magnetic Agarose beads (Proteintech) 80 μ L を加え、4°C で 3 分間回転しながらインキュベートした。スピンドウンし、マグネティックラック (Thermo Fisher Scientific) に静置した後、上清を捨て、Dilution/Wash buffer 1 mL を加えた。再び 4°C で 3 分間回転しながらインキュベートし、スピンドウン後、マグネティックラックに静置した。上清を捨て、IP サンプル (約 1 mL) を加えた。パラフィルムとアルミホイルで 1.5 mL チューブをシールし、4°C で一晩回転しながらインキュベートした。翌日、1.5 mL チューブをスピンドウンし、マグネティックラックに静置した。上清は Flow-through として分取した。ペレットは Dilution/Wash buffer 1 mL で懸濁し、4°C で 30 分間回転しながらインキュベートした。スピンドウン→マグネティックラックに静置→上清除去という操作を計 3 回繰り返した。3 回目の上清除去後のペレットを Dilution/Wash buffer 100 μ L で懸濁し、そこから IP sample として 3 μ L を分取した。input、Flow-through、IP sample それぞれに等量の 2 $\times$ SDS loading buffer (4 % SDS、20 % グリセロール、120 mM Tris-HCl [pH 6.8]、100 mM DTT、0.01 % ブロモフェノールブルー) を加え、ボルテックスした後、95°C で 5 分間加熱した。それらを SDS-PAGE に供した (共免疫沈降では 5-20 % SDS-PAGE ゲルを、結合アッセイでは 15 % SDS-PAGE ゲルを用いた。1 $\times$ SDS-PAGE-Buffer を使用し、定電流 30 mA で 60 分間泳動した)。結合アッセイの場合は、検量線作成用 BSA (ウシ血清アルブミン。1 レーンあたり 0.4、0.2、0.1、0.05、0.025 μ g となるように希釈系列を作製) を隣接ウェルにアプライした。ゲルを CBB 染色し、LuminoGraph II (WSE-6200; ATTO) で撮影した。

input、Flow-through、IP sample のバンドを比較し、精製度を確認した。また ImageJ の Gels 機能を用いて、BSA のバンドから検量線を作成し、IP sample のタンパク質量を算出した。共免疫沈降サンプルは、ウエスタンブロットに供した（**ウエスタンブロットティング**を参照）。

DNA とタンパク質の結合アッセイ

標的 DNA の作製

AT 含量の多い標的 DNA として、以下のように Major Satellite リピート配列を NIH3T3 細胞由来の cDNA から増幅した。0.2 mL チューブに以下の PCR 反応液を調製した。

5×Q5 Reaction Buffer	10 µL
dNTP mix [2 mM each]	5 µL
Forward Primer [10 µM]	2.5 µL
Reverse Primer [10 µM]	2.5 µL
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0.5 µL
NIH3T3 cDNA [0.5 ng/µL]	1.5 µL
DDW	28 µL

0.2 mL チューブで反応液を調製した。

サーマルサイクラーに静置し、以下の条件で PCR 反応に供した。

98°C	30 秒間	×30 サイクル
98°C	10 秒間	
63°C	30 秒間	
72°C	5 秒間	
72°C	2 分間	

PCR 産物を 6×Gel Loading Dye (B7024A; NEB) と混ぜ、2%アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。Gel Red (41002; Biotium) でゲルを 30 分間染色した後、UV 照射下で 250 bp 付近のバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (28704; QIAGEN) でゲル抽出した（メーカーのプロトコルに従った）。次いでゲル抽出産物を PCR Cloning Kit (E1202S; NEB) で pMiniT ベクターに挿入した（メーカーのプロトコルに従った）。大腸菌への形質転換後（詳細は**大腸菌の形質転換**を参照）、Mini-Prep 精製した 4 クローンのうち、シークエンス解析（詳細は**DNA シークエンス解析**を参照）により配列の正確さを確認した 1 クローンを Midi-Prep 精製し、以下のように制限酵素処理した。

ベクター	17 µg 分
10×CutSmart Buffer [B7204S; NEB]	10 µL
EcoRI-HF [R3101L; NEB]	1.5 µL
DDW	up to 100 µL

1.5 mL チューブで反応液を調製した (×3 本分)。

ヒートブロックに静置し、37°Cで一晩反応させた。

制限酵素処理産物を先述と同様にゲル抽出することで、AT 含量の多い標的 DNA として 289 bp の Major Satellite リピート配列を得た。

一方、GC 含量の多い標的 DNA としては、EF1 α プロモーター配列を用いた。PB533-Halo ベクターを以下のように制限酵素処理した。

ベクター	17 µg 分
10×CutSmart Buffer [B7204S; NEB]	10 µL
AsiSI [R0630S; NEB]	0.5 µL
MfeI-HF [R3589S; NEB]	0.5 µL
DDW	up to 100 µL

1.5 mL チューブで反応液を調製した (×2 本分)。

ヒートブロックに静置し、37°Cで一晩反応させた。

制限酵素処理産物を先述と同様にゲル抽出することで、GC 含量の多い標的 DNA として 78 bp の EF1 α プロモーター配列を得た。

使用したプライマーを表 3 にまとめた。

標的ヌクレオソーム

再構成ヌクレオソーム (リンカー有およびリンカー無) と Widom 601 DNA (193bp と 145bp) は、東京大学胡桃坂研究室の鯨井助教に作製・供与していただいた。

結合アッセイ

GFP-Trap で免疫沈降した EGFP-BrD+AT1-3 および EGFP-BrD+AT1-3mut タンパク質 0.14 pmol 分を 0.2 mL チューブに分注し、マグネティックラックに静置した。上清

を除き、High-salt buffer (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.5], 1 mM DTT) を加えて懸濁後、マグネティックラックに静置した。上清を除き、Reaction buffer (20 mM Tris-HCl [pH7.5], 1 mM DTT) を加えて懸濁後、マグネティックラックに静置した。上清を除き、標的 DNA またはヌクレオソーム 0.28 pmol を含む 10 μ L の Reaction buffer を加え、穏やかに回転しながら室温で 30 分間インキュベートした (この時 input としてタンパク質不含チューブも用意した)。次いで、反応後の 0.2 mL チューブを氷上に 5 分間静置した後、マグネティックラックに置き、上清を回収した (Sup)。Wash buffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.5], 1 mM DTT) を 10 μ L 加え懸濁後、穏やかに回転しながら室温で 5 分間インキュベートした。0.2 mL チューブをマグネティックラックに置き、上清を回収した (Wash)。Elution buffer (350 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH7.5], 1 mM DTT) を 10 μ L 加え懸濁後、穏やかに回転しながら室温で 5 分間インキュベートした。0.2 mL チューブをマグネティックラックに置き、上清を回収した (Elution)。input、Sup、Wash、Elution を 6 $\times$ Gel Loading Dye (B7021; NEB) と混ぜ、2 % アガロースゲルで 30 分間電気泳動した。Gel Red (Biotium) でゲルを 30 分間染色した後、LuminoGraph II (WSE-6200; ATTO) で撮影した。

ウェスタンブロッティング

タンパク質を回収するため、6 cm ディッシュに細胞を播種した。翌日、培地を除き、氷冷した PBS を加えた。この PBS 洗浄を計 3 回繰り返した。PBS を除き、2 $\times$ Laemmli バッファー (4 % SDS、20 % グリセロール、120 mM Tris-HCl [pH 6.8]) を 500 μ L 加えた。セルスクレーパーで細胞をはがし、全量を 1.5 mL チューブに回収した。ヒートブロックで 95 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした。このタンパク質抽出液を DTT (終濃度 0.1 M) およびブロモフェノールブルー (終濃度 0.01 %) と混ぜ、ヒートブロックで 95 $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートした後、SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE には、7.5 % SDS-PAGE ゲル (SuperSep Ace; 富士フイルム)、1 $\times$ SDS-PAGE-Buffer (25 mM Tris、250 mM グリシン、0.1 % SDS) を使用し、定電流 (ゲル 1 枚の時は 30 mA、2 枚の時は 60 mA)、60 分間泳動した。タンパク質ラダーマーカー (19593-25; ナカライテスク) と共に泳動した。PVDF 膜 (FluoroTrans W; Pall 社。あらかじめメタノールに馴染ませたもの)、泳動後のゲル、フィルターを 1 $\times$ Ez Fast Blot (AE-1465; ATTO) に浸した。転写装置 (Trans-Blot Turbo; BioRad) の電極パネルに、下から順にフィルター 1 枚、PVDF 膜、ゲル、フィルター 3 枚を重ね、定電流 1.3 A、15 分間の条件で転写した。転写後の PVDF 膜を TBST (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1% Tween-20, 150 mM NaCl) に浸し、室温で 10 分間振とうしながら洗浄した後、Blocking One (03953-95; ナカライテスク) に浸し、室温で 20 分間ブロッキングした。ブロットするタンパク質サイズに相当する部分の PVDF 膜を清潔なカッターナイフで切り出した。Can Get Signal Solution I (NKB-201; TOYOBO) で希釈した一次抗体反応液を PVDF 膜に添加し、室温で 2 時間インキュベートした。PVDF 膜を

TBST で室温・10 分間振とうし洗浄した。この TBST による洗浄を計 3 回繰り返した後、Can Get Signal Solution II (NKB-301; TOYOBO) で希釈した二次抗体反応液を PVDF 膜に添加し、室温で 1 時間インキュベートした。TBST により PVDF 膜を 3 回洗浄した後、発光試薬 ImmunoStar LD (富士フイルム) をかけ、LuminoGraph II (WSE-6200; ATTO) でシグナルを検出・撮影した。

使用した抗体を表 4 にまとめた。

アミノ酸配列の保存性解析

NCBI から以下の BAZ1B ホモログ配列をダウンロードした。

H. sapiens (NP_115784.1)	M. musculus (NP_035844.2)
G. gallus (XP_001233717.3)	X. tropicalis (XP_004911823.1)
D. rerio (XP_003200529.2)	

GENETYX version 11 software (Genetyx)を用いて配列をアライメントすることで、アミノ酸の保存性を比較した。

統計解析

有意差検定は R を用いて行った。2 群間の比較には Mann-Whitney U 検定または Student の t 検定を適用した。3 群以上の比較には、Hommel 補正を加えた Mann-Whitney U 検定を用いた。

表 3 本研究で使したプライマーおよびオリゴ DNA

Primers	Sequence (5'-3')
Primers for generating truncated Halo-NSD2	
NSD2_F1	TCGACGCTCGAGATTTCCGGCATGGAATTTAGCATCAAGCAG
NSD2_R1	TCGCAGATCCTTCGCGGCCGCTTATTTGCCCTCTGTGACTCTC
NSD2_PWWP1_R	CAGGTGGTCTTTGTCTCTTC
NSD2_PWWP1_F	GAGGAGCGGAAAGCCAAG
NSD2_N_R	GGCGATCGCGTTATCGCTC
NSD2_AWS_F	GAAATCCCTAAGTGCAACTGCAAG
NSD2_AWS_R	TGAAATATCCGCTGTGTAGATC
NSD2_C_F	GTTTAAACGAATTCGGGCTC
Primers for generating SMARCA5-sfGFP and emGFP-SMARCA5	
SMARCA5_F	CTCAAGCTTCAATTATGTCGTCCGCGGCCGAG
SMARCA5_R2	CGGTACCGTCGACTGCAGAATTAGTTTCAGCTTCTTTTTCTTCC
Primers for generating truncated BAZ1B	
FL_F	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAAATGGCGCCGCTCCTGGGC
FL_R	GTCGACTGCAGAATTCTTCTGTCTTCGTCCCC
Δ PHD,BrD_F	CATAAACACCTTCCTGGCC
Δ PHD,BrD_R	GTACCTCTTCTCTAGTCTCTCTTAAG
PHD+BrD+AT1-3_F	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAACAGGACATTATCACTCTATTC
PHD_R	GTCGACTGCAGAATTGCAAGCTGGGCACTGCCAC
BrD+AT1-3_F	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAACAGCCGCTACTGCCAGG
BrD+AT1-2_R	GTCGACTGCAGAATTCAACAGAGCCACTAGACACTG
BrD+AT3_F	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAAGAGCTGCAGAAGTGTAAGAG
AT1-2_R	GTCGACTGCAGAATTGAGCTTTGCCTCCGGGAG
AT3_F	ATCTCGAGCTCAAGCTTCGAACATAAACACCTTCCTGGCCAC
AT1_mut_F	GATGGCGATAACTATACTGAAGAGTCTGCTTCTG
AT1_mut_R	GGAGTTGCGCCTGGC
AT2_mut_F	GGCGATGATCCGGGTAAGAAGCCACAC
AT2_mut_R	TGACCTTGCTGCAGGG
AT3_mut_F	GATGGAGATGATCAGAAGAAGAATTCTGCAGTCGAC
AT3_mut_R	GGACTGTCCAACGGCCTC
gRNAs for dCas9 system	
MaSgRNA-F (Anton et al., 2014)	GGCAAGAAAACAGAAATCAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
MaSgRNA-R (Anton et al., 2014)	TGATTTTCAGTTTTCTTGCCCGGTGTTTCGTCTTTCCAC
MiSgRNA-F (Anton et al., 2014)	ACACTGAAAAACACATTCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG
MiSgRNA-R (Anton et al., 2014)	ACGAATGTGTTTTTCAGTGTCGGTGTTTCGTCTTTCCAC

dCas9-Halo_InF_Fw	ACGCCACCATGGGCGATCGCATCCAAAGAAGAAGAGAAAGGTCATGGCAGAAATCGGTAC
dCas9-Halo_InF_Rv	ACGGGCACCGGAGCGATCGCAGATCCTTCGCGGCCGCTTAGCCGGA
sgMaS_s	CACCGGGCAAGAAAACGAAAATCA
sgMaS_as	AAACTGATTTTCAGTTTTCTTGCCC
gRNAs for generating knockout cells	
Nsd2_gRNA_1_s (PWWP1 domain)	CACCGAAAATACAACGTTGGTGATT
Nsd2_gRNA_1_as (PWWP1 domain)	AAACAATCACCAACGTTGTATTTTC
Nsd2_gRNA_2_s (SET domain)	CACCGTGGGGCCAGCATCAATTATG
Nsd2_gRNA_2_as (SET domain)	AAACCATAATTGATGCTGGCCCCAC
Smarca5_gRNA_1_s	CACCGCTTGCTCCGTTCTACGGTGT
Smarca5_gRNA_1_as	AAACACACCGTAGAACGGAGCAAGC
Baz1b_gRNA_1_s	CACCGTTCCTGGCTTCTTGCGGCGC
Baz1b_gRNA_1_as	AAACGCCGCCAAGAAGCCAGGGAAC
shRNAs for generating knockdown cells	
Smarca5_shRNA_1_s	CCGGGTCCGAGTGTTTCGCTTTATACTCGAGTATAAAGCGAAACACTCGGACTTTTTG
Smarca5_shRNA_1_as	AATTCAAAAAGTCCGAGTGTTTCGCTTTATACTCGAGTATAAAGCGAAACACTCGGAC
Smarca5_shRNA_2_s	CCGGCGTCGAATTAAGCTGATGTTCTCGAGAACATCAGCTTTAATTCGACGTTTTTG
Smarca5_shRNA_2_as	AATTCAAAAACGTCGAATTAAGCTGATGTTCTCGAGAACATCAGCTTTAATTCGACG
Parp1_shRNA_1_s	CCGGGCCCTTGGAACATGTATGAACTCGAGTTCATACATGTTTCCAAGGGCTTTTTG
Parp1_shRNA_1_as	AATTCAAAAAGCCCTTGGAACATGTATGAACTCGAGTTCATACATGTTTCCAAGGGC
Parp1_shRNA_2_s	CCGGTCGACGTCAACTACGAGAAACCTCGAGGTTTCTCGTAGTTGACGTCGATTTTTG
Parp1_shRNA_2_as	AATTCAAAAATCGACGTCAACTACGAGAAACCTCGAGGTTTCTCGTAGTTGACGTCGA
Orc2_shRNA_1_s	CCGGATCAATCCTGAACTCTATAACCTCGAGGTTATAGAGTTCAGGATTGATTTTTTG
Orc2_shRNA_1_as	AATTCAAAAATCAATCCTGAACTCTATAACCTCGAGGTTATAGAGTTCAGGATTGAT
Orc2_shRNA_2_s	CCGGGCATCTATTGACCATCTCAATCTCGAGATTGAGATGGTCAATAGATGCTTTTTG
Orc2_shRNA_2_as	AATTCAAAAAGCATCTATTGACCATCTCAATCTCGAGATTGAGATGGTCAATAGATGC
Mki67_shRNA_1_s	CCGGGACAGTCTAGGGCAAGTATAACTCGAGTTATACTTGCCCTAGACTGTCTTTTTG
Mki67_shRNA_1_as	AATTCAAAAAGACAGTCTAGGGCAAGTATAACTCGAGTTATACTTGCCCTAGACTGTC
Mki67_shRNA_2_s	CCGGCTACTGTTCTGATCCATTAATCTCGAGATTAATGGATCAGAACAGTAGTTTTG
Mki67_shRNA_2_as	AATTCAAAAACACTGTTCTGATCCATTAATCTCGAGATTAATGGATCAGAACAGTAG
Mecp2_shRNA_1_s	CCGGCTGACAAAGCTTCCCGATTAACCTCGAGTTAATCGGGAAGCTTTGTCAGTTTTG
Mecp2_shRNA_1_as	AATTCAAAAACAGTACAAAGCTTCCCGATTAACCTCGAGTTAATCGGGAAGCTTTGTCAG
Mecp2_shRNA_2_s	CCGGGCTGGAAGATATGATGTATATCTCGAGATATACATCATACTTTCCAGCTTTTTG
Mecp2_shRNA_2_as	AATTCAAAAAGCTGGAAGATATGATGTATATCTCGAGATATACATCATACTTTCCAGC
Kdm2a_shRNA_1_s	CCGGGCTCCAAACCAACAAATATAACTCGAGTTATATTTGTTGGTTTGGAGCTTTTTG
Kdm2a_shRNA_1_as	AATTCAAAAAGCTCCAAACCAACAAATATAACTCGAGTTATATTTGTTGGTTTGGAGC
Kdm2a_shRNA_2_s	CCGGCGATGTCTTGATAGATAAGTTACTCGAGTAACCTATCTACAAGACATCGTTTTTG
Kdm2a_shRNA_2_as	AATTCAAAAACGATGTCTTGATAGATAAGTTACTCGAGTAACCTATCTACAAGACATCG
Hmgb1_shRNA_1_s	CCGGTGACAAGGCTCGTTATGAAAGCTCGAGCTTTCATAACGAGCCTTGTCATTTTTG
Hmgb1_shRNA_1_as	AATTCAAAAATGACAAGGCTCGTTATGAAAGCTCGAGCTTTCATAACGAGCCTTGTCAT
Hmgb1_shRNA_2_s	CCGGGATGACAAGCAGCCCTATGAGCTCGAGCTCATAGGGCTGCTTGTCATCTTTTTG
Hmgb1_shRNA_2_as	AATTCAAAAAGATGACAAGCAGCCCTATGAGCTCGAGCTCATAGGGCTGCTTGTCATC
Nsd2_shRNA_1_s	CCGGCCTGGTGCTCATGATACTAACTCGAGTTTAGTATCATGAGCACCAGGTTTTTG

Nsd2_shRNA_1_as	AATTCAAAAACCTGGTGCTCATGATACTAAACTCGAGTTTAGTATCATGAGCACCAGG
Nsd2_shRNA_2_s	CCGGCCCACTCCTTCACAATCATACCTCGAGGTATGATTGTGAAGGAGTGGGTTTTTG
Nsd2_shRNA_2_as	AATTCAAAAACCCACTCCTTCACAATCATACCTCGAGGTATGATTGTGAAGGAGTGGG
Scramble_s	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTG
Scramble_as	AATTCAAAAACAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTG
Primers for RT-qPCR	
Smarca5_RT_F	TGCCTTGGGGATCAAAAGCT
Smarca5_RT_R	TGGAGGCAAACTCTTTCAACA
Parp1_RT_F	GTCAAGAAGACGGCCGAGG
Parp1_RT_R	CCCAATGTCTTCTCCGCCTT
Orc2_RT_F	ACATCTGATCGAACGCTGCA
Orc2_RT_R	TCAGCAGAAAAGGAAGGCACA
Mki67_RT_F	ACCGAAAAGTGGACTTCAGTGA
Mki67_RT_R	TCTGCTGCTGCTTCTCCTTC
Mecp2_RT_F	TGTATATTGATCAATCCCCAGGG
Mecp2_RT_R	TCATTAGGGTCCAAGGAGGTG
Kdm2a_F	GTGCATCTCACCCATTTGAAC
Kdm2a_R	ATCGCTACTGGCAAGTTCTTCC
Hmgb1_RT_F	GGCTGACAAGGCTCGTTATG
Hmgb1_RT_R	TGCATTGGGGTCCTTGAAC
Nsd2_RT_F	GTGGCCTTGCATGGTTTCTG
Nsd2_RT_R	ATCCAAGCTCTTCTGGGGC
MajSat_qPCR_Fw	GACGACTTGAAAAATGACGAAATC
MajSat_qPCR_Rv	CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC
MinSat_qPCR_2_Fw	GGAAAATGATAAAACCTACACTG
MinSat_qPCR_2_Rv	ATGTTTCTAATTGTAACCTATTG
Primers for cloning major satellites	
MajSat_2_Fw	TATGGCGAGGAAAACTGAAAAAG
MajSat_2_Rv	TTTCACGTCCTAAAGTGTGTATTC

表 4 本研究で使用した抗体

Primary antibody				Immunofluorescence				
Antigen	Animal	Clone/Name (Source)	RRID	for cultured cells	for tissues	for 13.5-day embryo	for preimplantation embryos	Western blotting
H3K36me2	Mouse	CMA332/2C3 (Rechtsteiner et al., 2010)	AB_2650523	2 µg/mL (Alexa Fluor 488 or Cy3-conjugated)	-	-	5 µg/mL (Cy3-conjugated)	-
H3K36me2	Rabbit	ab176921 (Abcam)	AB_2941920	2 µg/mL	-	-	-	-
H3K36me3	Mouse	CMA333/13C9 (Rechtsteiner et al., 2010)	AB_2614986	2 µg/mL (Cy5-conjugated)	-	-	-	-
H3K9me2	Mouse	CMA317/6D11 (Hayashi-Takanaka et al., 2011)	AB_2793304	2 µg/mL (Cy5-conjugated)	-	-	-	-
H3K9me3	Mouse	CMA318/2F3 (Hayashi-Takanaka et al., 2011)	AB_2887767	2 µg/mL (Cy3-conjugated)	10 µg/mL (Cy3-conjugated)	10 µg/mL (Cy5-conjugated)	10 µg/mL (Alexa Fluor 488-conjugated)	-
H3K27me3	Mouse	CMA323/1E7 (Hayashi-Takanaka et al., 2011)	AB_2614987	2 µg/mL (Cy5-conjugated)	-	-	-	-
NSD2	Rabbit	HPA015801 (Atlas Antibodies)	AB_1858830	-	-	-	-	1:2000
SMARCA5	Rabbit	ab72499 (Abcam)	AB_1270821	0.5 µg/mL	-	-	-	1:2000
BAZ1B	Mouse	sc-514287 (Santa Cruz)		0.5 µg/mL	-	-	-	1:500
LAMIN B1/2	Mouse	2D8 (Chen et al., 2018)		-	-	-	-	1:2000
GFP	Rabbit	598-7 (MBL)	AB_10597267	-	-	-	-	1:2000 (HRP-conjugated)
Halo	Rabbit	G9281 (Promega)	AB_713650	-	-	-	-	1:1000
Secondary antibody								
Mouse IgG	Donkey	715-005-150 (Jackson ImmunoResearch)	AB_2340758	1 µg/mL (Alexa Fluor 488-conjugated)	-	-	-	-
Rabbit IgG	Donkey	711-005-152 (Jackson ImmunoResearch)	AB_2340585	1 µg/mL (Alexa Fluor 488-conjugated)	-	-	-	-
Mouse IgG	Goat	115-005-003 (Jackson ImmunoResearch)	AB_2338447	-	-	-	-	1:10000 (HRP-conjugated)
Rabbit IgG	Goat	111-005-144 (Jackson ImmunoResearch)	AB_2337919	-	-	-	-	1:10000 (HRP-conjugated)
Fab								
H3K36me2	Mouse	CMA332/2C3 (Rechtsteiner et al., 2010)	AB_2650523	-	20 µg/mL (Alexa Fluor 488-conjugated)	20 µg/mL (Alexa Fluor 488-conjugated)		

3 章 H3K36me2 の核内分布の観察

3.1 H3K36me2 の核内分布観察

3.1.1 細胞種ごとの H3K36me2 分布の比較

マウス培養細胞において H3K36me2 の核内分布を調べるため、H3K36me2 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (2C3/CMA332; Rechtsteiner et al., 2010) を用いて免疫染色を行い、Nikon A1 共焦点顕微鏡で観察した (以下、言及がない限り共焦点顕微鏡画像は Nikon A1 で取得した)。このとき H3K9me3 をクロモセンターのマーカーとして共染色した。その結果、Pmi28、C2C12 (いずれも筋芽細胞) および MC12 (胚性腫瘍細胞) では、H3K36me2 は典型的なユークロマチン分布を示した (図 9)。一方、iMEF (不死化胚性繊維芽細胞)、NIH3T3 (胚性繊維芽細胞)、ES (胚性幹細胞) では、H3K36me2 は H3K9me3 と共にクロモセンターに局在した (図 9)。

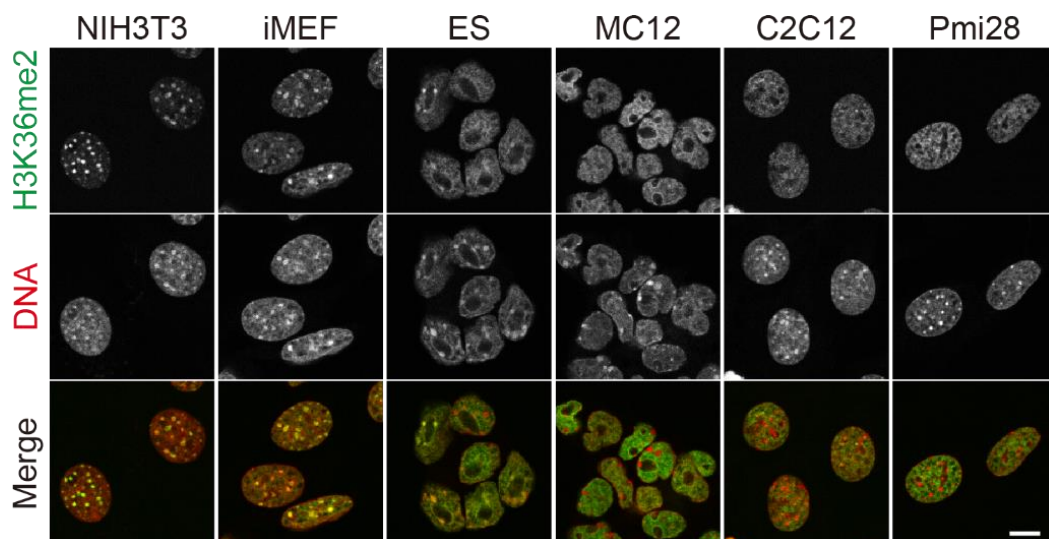


図 9 マウス培養細胞の H3K36me2 分布観察

種々のマウス培養細胞の免疫染色画像。細胞を固定し、H3K36me2 に対するモノクローナル抗体 (緑) と Hoechst33342 (赤) で染色した。Nikon A1 共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。スケールバーは 10 μ m。

Pmi28 と iMEF についてはより解像度の高い Olympus Ixplorer SpinSR 共焦点顕微鏡で観察し、クロモセンター上の蛍光強度をラインプロファイル解析した (図 10)。これは Nikon A1 共焦点顕微鏡での観察結果 (図 9) を支持し、iMEF の H3K36me2 はクロモセンター全体と一致することが分かった。

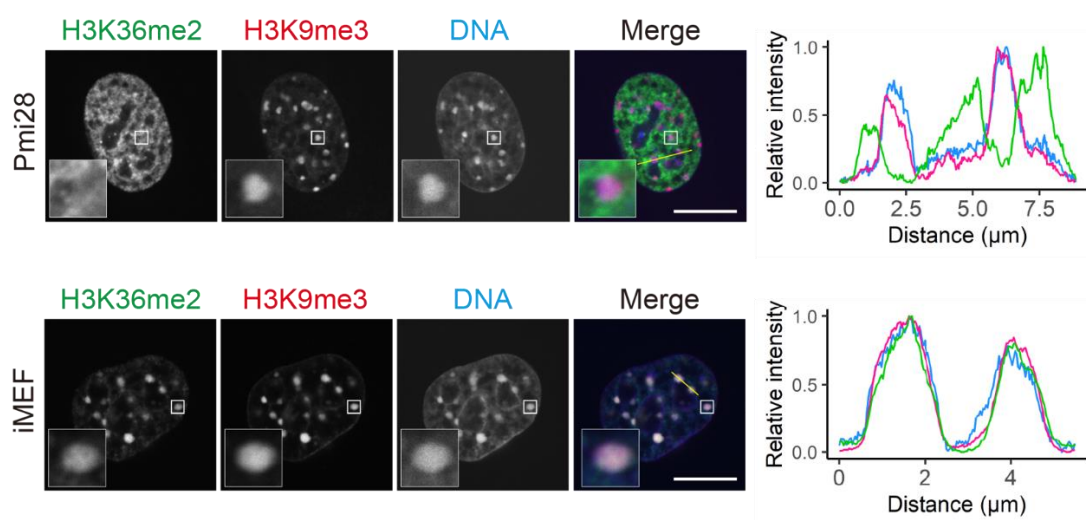


図 10 SpinSR 共焦点顕微鏡による H3K36me2 観察とラインプロファイル
Pmi28 (上) と iMEF (下) の免疫染色画像。H3K36me2 抗体 (緑)、H3K9me3 抗体 (赤)、Hoechst33342 (青) で染色した。Olympus Ixplorer SpinSR 共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。各チャンネル左下の挿入図は、四角で囲った範囲の拡大図である。右のラインプロファイルは、Merge 画像の黄線に沿った H3K36me2、H3K9me3、DNA の蛍光強度を示す。スケールバーは 10 μm 。

H3K36me2 が強く集積したクロモセンターは、MajSat リピートを多含する PCH から構成されるか確認するため、CRISPR/dCas9 システムを用い、MajSat リピート配列の可視化を試みた。本システムは、DNA 切断活性を失活させた Cas9 (dCas9) に、エフェクタータンパク質やドメインを連結することで、標的ゲノム領域を可視化、あるいは操作する系である。ここでは dCas9-EGFP と共に、MajSat リピートまたは MinSat リピートを標的する gRNA を iMEF 細胞に一過性導入し、免疫染色した。その結果、H3K36me2 は、H3K9me3 と同様、dCas9-EGFP が標識した MajSat とは共局在したが、MinSat とは一致しなかった (図 11)。このことから、iMEF 細胞において H3K36me2 は、MajSat リピートから構成される PCH に強く分布することが確かめられた。

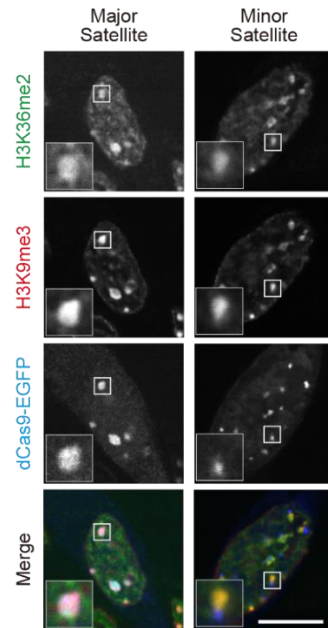


図 11 MajSat および MinSat の局在観察

dCas9-EGFP（青）と共に、MajSat（左）または MinSat（右）を標的する gRNA を iMEF に一過性発現させ、固定後、H3K36me2 抗体（緑）、H3K9me3 抗体（赤）で染色した。共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。各チャンネル左下の挿入図は、四角で囲った範囲の拡大図である。スケールバーは 10 μm 。

なお、他のモノクローナル抗体（EPR16994(2); Bressan et al., 2021）による免疫染色でも、H3K36me2 の PCH 局在は観察されたことから（図 12）、この特徴的なヒストン修飾分布は抗体のアーティファクトではないと判断した。

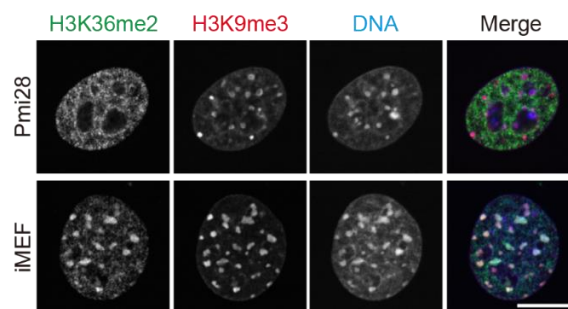


図 12 他のモノクローナル抗体による H3K36me2 分布観察

Pmi28（上）と iMEF（下）の免疫染色画像。他の結果図とは異なる H3K36me2 モノクローナル抗体（緑）、H3K9me3 抗体（赤）、Hoechst33342（青）で染色した。共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。スケールバーは 10 μm 。

細胞種ごとの H3K36me2 分布の差を定量的に比較するため、H3K36me2 の PCH 局在率（蛍光輝度値の PCH/核質比）を算出したところ（定量法の詳細は「2 章画像解析 PCH 局在率」を参照）、iMEF、NIH3T3、ES の H3K36me2 の PCH 局在率は、ばらつきはあるものの他の 3 細胞種よりも有意に高いことが示された（図 13）。

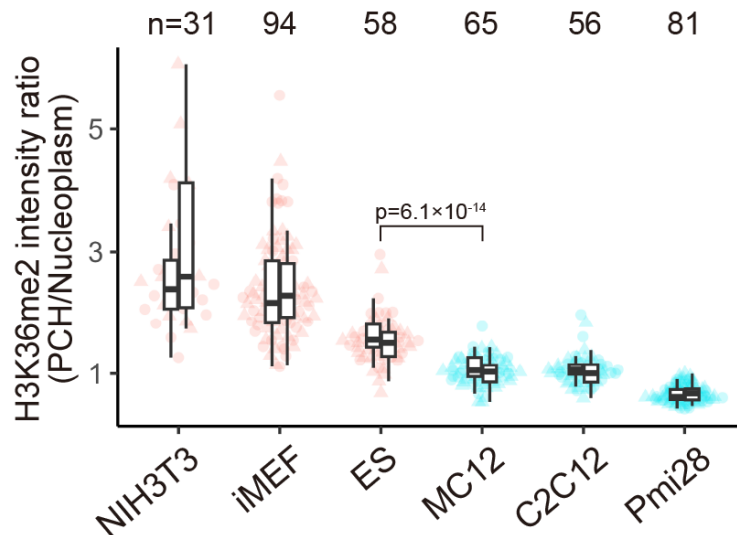


図 13 H3K36me2 の PCH 局在率の細胞種間比較

種々のマウス培養細胞における、H3K36me2 の PCH 局在率（Intensity ratio = PCH 平均輝度に対する核質の平均輝度の比）の定量結果。2 つの箱ひげ図はそれぞれ、2 回の実験データ分布を、各点は個々の細胞を表す（1 回目の実験結果は丸、2 回目の実験結果は三角）。箱内の横線は中央値を、箱の上・下辺は第三四分位数と第一四分位数を、箱外のひげは各四分位線から四分位範囲間の 1.5 倍を示す。n は 2 回分の実験の全細胞数、p はマン・ホイットニーの U 検定を用いて算出した ES 細胞と MC12 細胞の検定結果を表す。

3.1.2 H3K36me2 と他のヒストン修飾の多重染色

異なる種類のヒストン修飾は互いに影響し合うことがある。したがって H3K36me2 が PCH に局在する細胞では、他のヒストン修飾も非典型的な分布を示す可能性が考えられた。そこで H3K36me2 と拮抗的に働く H3K27me3、ヘテロクロマチンによく見られる H3K9me2、同じ H3K36 メチル化に属する H3K36me3 をそれぞれ H3K36me2 と共染色した。その結果、3 種のヒストン修飾は従来の報告と同様の典型的な分布を示し、PCH への濃縮は見られなかった（図 14A-C）。

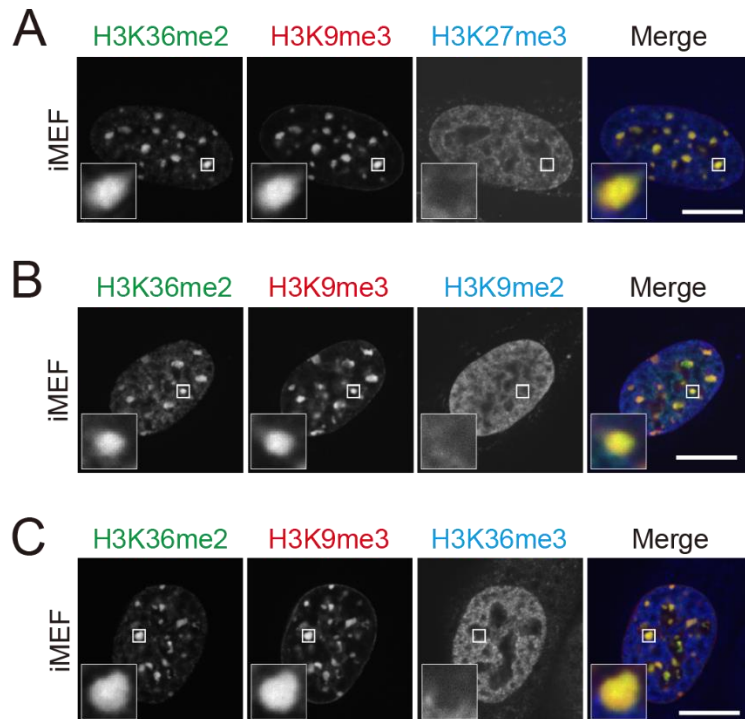


図 14 H3K36me2 と他のヒストン修飾の対比染色
iMEF の免疫染色画像。H3K27me3 (A)、H3K9me2 (B)、H3K36me3 (C、それぞれ青) を、H3K36me2 (緑)、H3K9me3 (赤) と共に染色した。Olympus Ixplorer SpinSR 共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。各チャンネル左下の挿入図は、四角で囲った範囲の拡大図である。スケールバーは 10 μ m。

3.1.3 H3K36me2 の生細胞動態

3.1.1 の定量解析から、同じ細胞種であっても H3K36me2 の PCH 局在率には不均一性があったことから (図 13)、H3K36me2 分布は細胞周期によって変化し得る可能性が考えられた。そこで、H3K36me2 を可視化する 2C3LH-mintbody-sfGFP、クロマチンを可視化する H2B-Halo、細胞周期段階を判定するための mCherry-PCNA を安定発現する iMEF 細胞を作製し、共焦点顕微鏡で長時間ライブセルイメージングを行った。なお PCNA は DNA 複製関連タンパク質の一種で、間期は核質全域に、S 期早期はユークロマチンに、S 期中～後期はヘテロクロマチンに分布する。この性質を利用することで、細胞が細胞周期のどのステージにあるのかを判定することができる。生細胞観察の結果、H3K36me2 の PCH 局在は細胞周期全体を通じて見られ、その傾向は特に S 期で顕著であること、その分布パターンは安定的に娘細胞に受け継がれることが明らかとなった (図 15)。

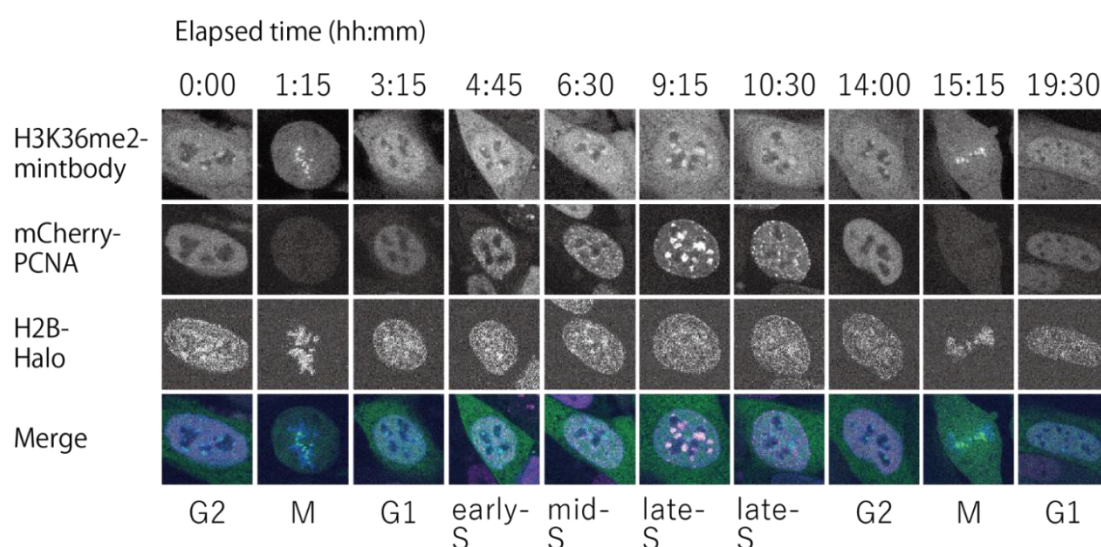


図 15 H3K36me2 の生細胞動態観察

iMEF のタイムラプス画像。H3K36me2-mintbody (緑)、mCherry-PCNA (赤)、H2B-Halo (青) を安定発現する iMEF をライブセルイメージングした。共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。画像上には左から順に観察経過時間 (時間: 分) を、画像下には PCNA 分布パターンから推定される細胞周期ステージを表示した。

3.2 小括

本章では免疫染色と生細胞イメージングにより、H3K36me2 の核内分布を解析した。

3.1.1 の複数のマウス培養細胞の免疫染色から、本研究では 3 つの細胞種 (NIH3T3、iMEF、ES) で H3K36me2 が PCH に局在することを発見した。また高解像度の Olympus Ixprove SpinSR 共焦点顕微鏡による観察から、少なくとも Z 断面では H3K36me2 はクロモセンターの一部ではなく全面と一致している様子が確認された。さらに dCas9-EGFP を用いた標的ゲノム領域の可視化によって、このクロモセンターは定義通り、MajSat リピートを多含する PCH から構成されることを裏付けた。クロモセンターが球形であることを考慮すると、今後は超解像顕微鏡を用いてクロモセンター全球を観察することで、H3K36me2 が球内のどこにどの程度分布するかを調べる余地がある。また、一見したところ H3K36me2 の PCH 局在の有無はクロモセンターの形態 (核内の総数や個々のサイズ) にほとんど影響しないようであるが、PCH 上のエピジェネティック修飾 (H3K9me3、H4K20me3、DNA メチル化) に対する影響は検討する必要がある。

3.1.2 の多重免疫染色から、少なくとも共焦点顕微鏡の解像度で観察可能な H3K36me2 の PCH 分布と他のヒストン修飾の分布パターンは互いに影響しないと考えられた。ただし本研究では、PCH 以外のゲノム領域における H3K36me2 変化につ

いては検討していない。したがって、ChIP-seq 等によって他のヒストン修飾をゲノムワイドに解析すると、H3K36me2 の PCH 局在の影響が見られるかもしれない。特に、H3K36me2 と拮抗的に働く H3K27me3 に対する影響は大きい可能性がある。なお先行研究で報告されていた H3K36me3 の PCH 局在 (Chantalat et al., 2011) は、本研究では確認できなかった。その理由は不明であるが、当該論文と本研究で使用された MEF と ES の由来・継代数の違い、あるいは、当該論文の抗体の特異性に問題があった可能性などが考えられる。

3.1.3 の mintbody を用いたライブセルイメージングから、H3K36me2 は細胞周期全体を通じて PCH に局在し、S 期には特に強く集積することが明らかとなった。**3.1.1** の定量で見られた H3K36me2 の PCH 局在率のばらつきは、細胞周期段階の違いを部分的に反映していると考えられる。S 期の観察結果は、H3K36me2 が PCH の DNA 複製に関与している可能性を示唆する。最近、H3K36me2 は H3K9me3 と共に複製ストレス下の複製フォークに蓄積し、複製の再開を促進することが報告された (Gaggioli et al., 2023)。PCH 複製においても H3K36me2 は働き、ゲノムの安定性に寄与しているのかもしれない。

3.3 補遺

顕微鏡観察で見出した H3K36me2 の PCH 分布を、ゲノムワイドなシーケンス解析で補完するため、近畿大学・西原秀典准教授に公共 ChIP-seq データベースを用いた解析を行っていただいた。解析には、3 種のマウス培養細胞 (ES 細胞、B 細胞、脾臓がん細胞) に由来する H3K36me2 と H3K9me3 の ChIP-seq データセットを用いた (Barral et al., 2022; Vian et al., 2018; Yuan et al., 2020)。ここでその結果をまとめる。

まずゲノム全体の相関解析を行ったところ、H3K36me2 と H3K9me3 は、ES 細胞では高い正の相関を、B 細胞と脾臓がん細胞では負の相関を示した (図 16)。このことから、顕微鏡の観察結果はゲノムワイド解析によって補完できることが分かった。

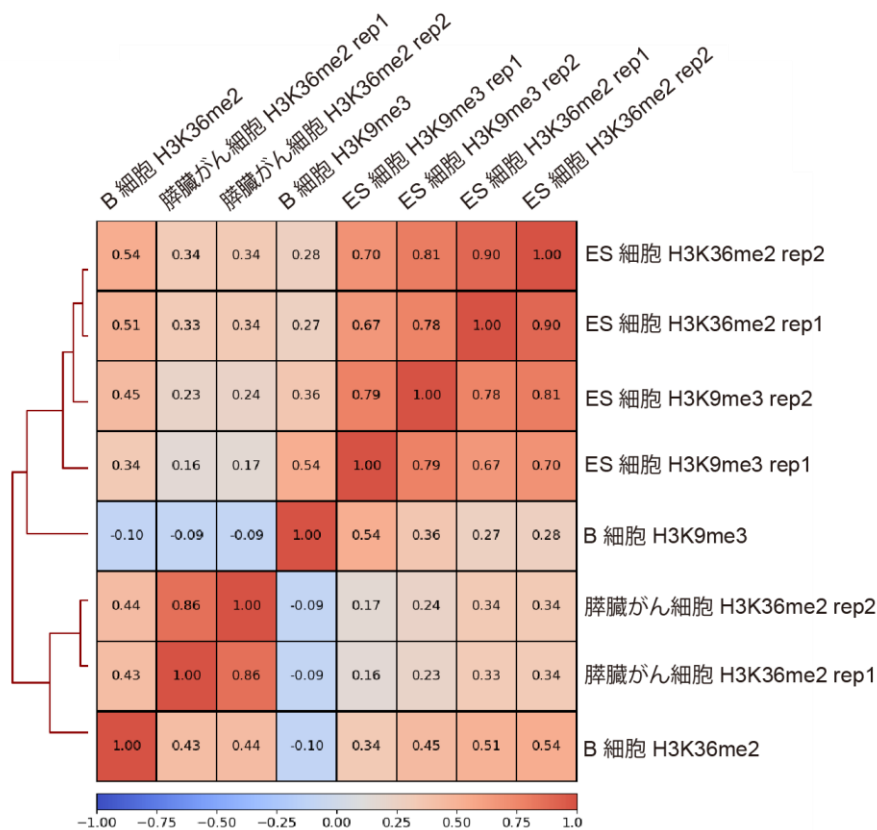


図 16 ゲノムワイドな H3K36me2 と H3K9me3 の相関ヒートマップ

公共 ChIP-seq データを用いた H3K36me2 と H3K9me3 の相関ヒートマップ。マウス ES 細胞、B 細胞、膵臓がん細胞由来のデータを解析した。各データ名の rep1、rep2 は ChIP-seq の生物学的反復実験回を意味する。セル内の数値はスピアマンの相関係数で、図下部に示すように数値に応じてセルの色を変えた。

PCH は MajSat リピートから構成される。そこで他のリピート配列 (LINE、LTR、SINE) 上のヒストン修飾濃縮率を解析した。H3K9me3 はリピート配列の転写抑制に働くことが知られており、実際、ES 細胞と B 細胞のいずれにおいても H3K9me3 は LINE と LTR の転写開始点 (TSS) に沈着した (図 17A、B)。一方、H3K36me2 は ES 細胞では LINE と LTR に濃縮したが、B 細胞ではそのようなピークは検出されなかった (図 17A、B)。したがって、H3K36me2 が PCH 局在する細胞では、MajSat リピートだけでなく、LINE や LTR などトランスポゾンリピートにも H3K36me2 が蓄積することが明らかとなった。なお、SINE では ES 細胞と B 細胞の両方で H3K36me2 のピークが見られた (図 17A、B)。SINE はメチル化を受ける CpG 配列

を豊富に含む (Varshney et al., 2015)。H3K36me2 は DNA メチル化の確立に寄与することを考えると (Weinberg et al., 2019)、この解析結果は妥当であると考えられた。

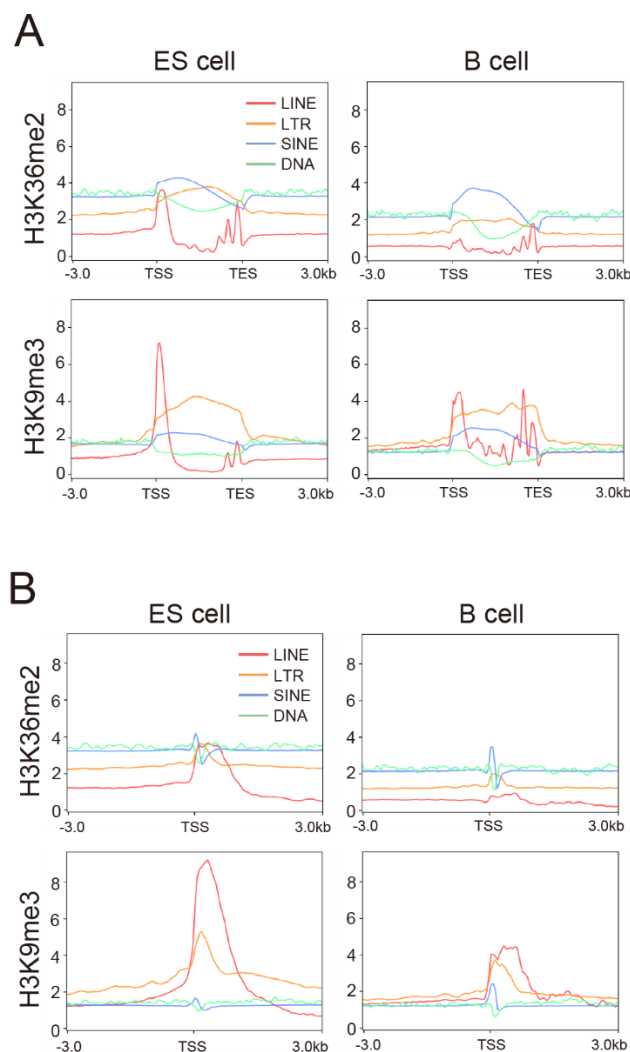


図 17 リpeat配列上の H3K36me2 および H3K9me3 濃縮率
ES 細胞（左、H3K36me2 が PCH に局在する細胞）と B 細胞（右、H3K36me2 がユークロマチンに局在する細胞）のリpeat配列における H3K36me2（上）と H3K9me3（下）の濃縮率。図 16 と同じ ChIP-seq データセットから解析した。LINE は赤、LTR はオレンジ、SINE は青、DNA は緑で表示した。(A) 転写開始点 (TSS) から TES (転写終結点) までの濃縮率。(B) TSS $\pm$ 3kb の濃縮率。

4 章 H3K36me2 のヘテロクロマチン局在化機構

4.1 ヘテロクロマチンの H3K36me2 の責任酵素の同定

4.1.1 H3K9me3 および DNA メチル化経路の検討

マウス細胞の PCH に分布するエピジェネティック修飾の多くは、H3K9me3 または DNA メチル化の下流に位置する。H3K36me2 がこれらの経路によって制御されるかどうかを調べるため、それぞれの修飾を欠く KO 細胞株を免疫染色した。ここでは H3K9me3 欠失細胞として、5 つの H3K9me2/3 メチル化酵素 (SUV39H1、SUV39H2、SETDB1、G9a、GLP) がノックアウト (KO) された 5KO iMEF (Fukuda et al., 2023) を、DNA メチル化欠失細胞として、3 つの DNA メチル化酵素 (DNMT1、DNMT3A、DNMT3B) が無い TKO ES (Tsumura et al., 2006) を用いた。定量的結果、野生型と比較した H3K36me2 の PCH 局在率は、5KO iMEF でわずかに減少したものの、TKO ES ではほとんど変化しないことが明らかとなった (図 18A、B)。

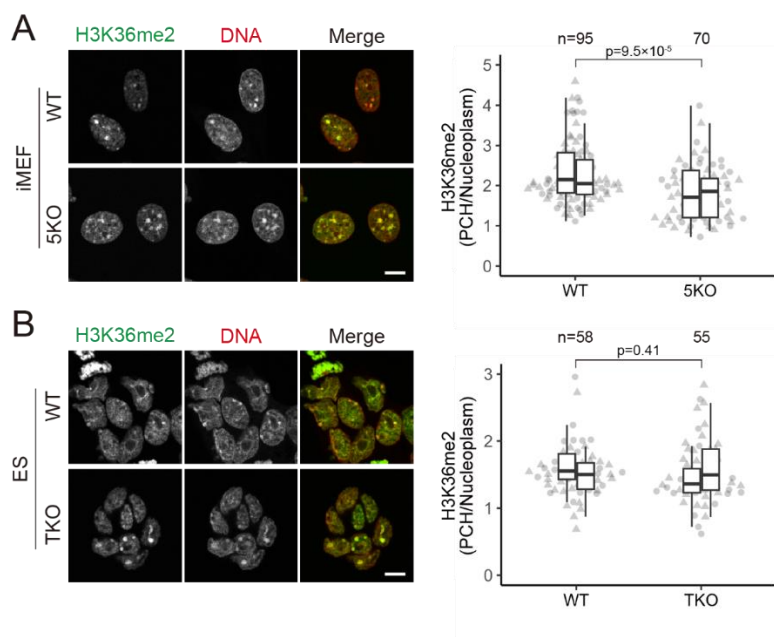


図 18 H3K9me3 または DNA メチル化欠失が H3K36me2 分布に与える影響
H3K9me2/3 欠失細胞 (A) と DNA メチル化欠失細胞 (B) の免疫染色画像。
H3K36me2 抗体 (緑) と Hoechst33342 (赤) で染色した。共焦点顕微鏡像の単一 Z
スライスを示す。右の箱ひげ図は H3K36me2 の PCH 局在率を示す。箱ひげ図の詳細
は図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μm 。

4.1.2 H3K36 メチル化関連酵素の核内分布観察

4.1.1 の結果を受け、H3K9me3 および DNA メチル化に依存しない H3K36me2 の制御経路を検討することとした。そこで H3K36 メチル化関連ヒストン修飾酵素に着目し、どの酵素が PCH 上の H3K36me2 を触媒するのかを同定するため、NIH3T3 にトランスフェクションした Halo タグ付きタンパク質の局在を観察した (図 19)。10 種類のメチル化酵素と 5 種類の脱メチル化酵素のうち、NSD2/WHSC1 と KDM2A/JHDM1A が PCH に局在した。先行研究より KDM2A は HP1 依存的に PCH に局在することが知られていた (Borgel et al., 2017)。しかし HP1 の PCH 局在には H3K9me3 が必要である一方 (Lachner et al., 2001)、H3K9me3 を欠く 5KO iMEF において H3K36me2 は依然として PCH に濃縮されていたことから (図 18A)、KDM2A は PCH の H3K36me2 を制御する主要因子ではないと考えられた。

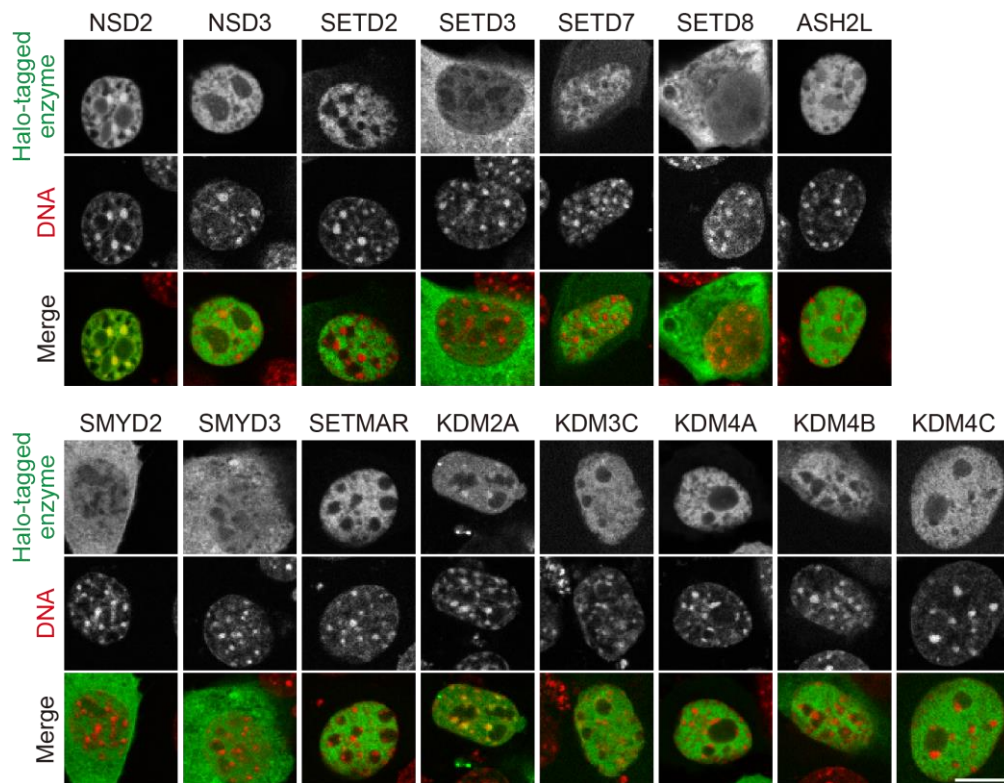


図 19 H3K36 メチル化関連酵素の核内分布観察

NIH3T3 のライブセルイメージング画像。Halo タグ付き H3K36 メチル化酵素または脱メチル化酵素をトランスフェクションした翌日、JF646 Halo タグリガンド (緑) と Hoechst33342 (赤) で染色した。共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示す。スケールバーは 10 μm 。

4.1.3 NSD2 が PCH の H3K36me2 に与える影響

4.1.2 の結果より、NSD2 による H3K36me2 制御に着目することとした。なお、以降は H3K36me2 が PCH に局在する細胞として iMEF を、局在しない細胞として Pmi28 を用い実験を行った。

過剰発現した Halo-NSD2 は、iMEF では PCH に局在したが、Pmi28 では明瞭な局在を示さなかった (図 20A、B)。定量解析の結果はこれと一致し、iMEF における Halo-NSD2 の PCH 局在率は Pmi28 よりも有意に高かった (図 20C)。次に過剰発現した Halo-NSD2 が H3K36me2 の PCH 局在に及ぼす影響を解析した。その結果、iMEF での Halo-NSD2 の発現は H3K36me2 の PCH 局在率に影響しなかった (図 20D)。一方、Pmi28 での Halo-NSD2 発現は H3K36me2 の PCH 局在をある程度誘導したが、そのレベルは iMEF に比べて低かった (図 20D)。

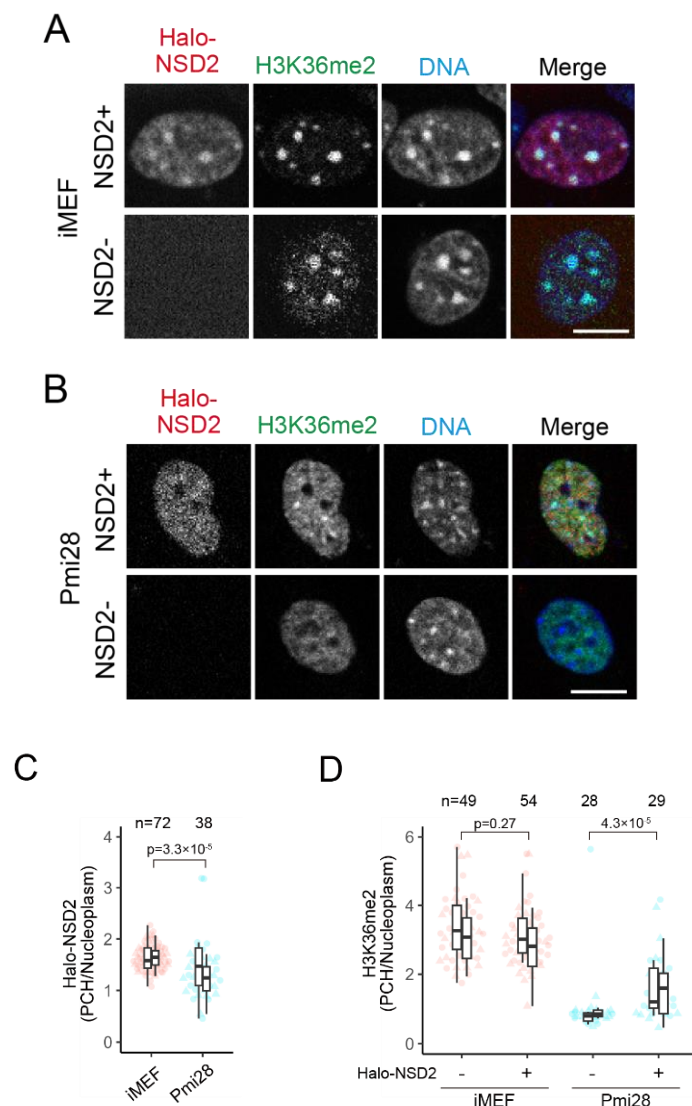


図 20 Halo-NSD2 過剰発現が H3K36me2 の PCH 局在に与える影響
iMEF と Pmi28 に Halo-NSD2 発現ベクターをトランスフェクションし、翌日 JF646 Halo タグリガンドと Hoechst33342 で処理した。生細胞観察後、細胞を固定し、H3K36me2 抗体で染色した。(A、B) JF646 Halo タグリガンド (赤)、H3K36me2 抗体 (緑)、Hoechst33342 (青) で染色した iMEF (A) と Pmi28 (B) の免疫染色画像。Halo-NSD2 発現 (NSD2+) および非発現 (NSD2-) 細胞核について、共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示した。(C、D) 生細胞における Halo-NSD2 (C) と免疫染色による H3K36me2 の PCH 局在率 (D)。箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

PCH の H3K36me2 に対する NSD2 の役割をさらに検討するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて NSD2-KO iMEF を作製した (図 21)。

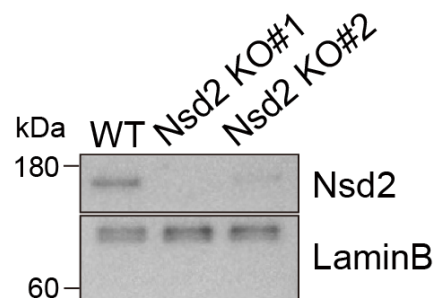


図 21 NSD2-KO iMEF のウエスタンブロッティング
NSD2 抗体と LaminB 抗体を用いたウエスタンブロッティング画像。LaminB はローディングコントロールとした。左端の数値はプロテインラダーマーカから推定されるタンパク質サイズ (kDa) を示す。

この細胞を用いた定量解析の結果、NSD2 欠損は H3K36me2 の PCH 局在率を低下させた。この低下は、NSD2 欠損細胞に Halo-NSD2 を発現させると回復させることができた (図 22A、B)。以上の結果から、NSD2 は PCH の H3K36me2 を触媒するメチル化酵素であると考えられた。

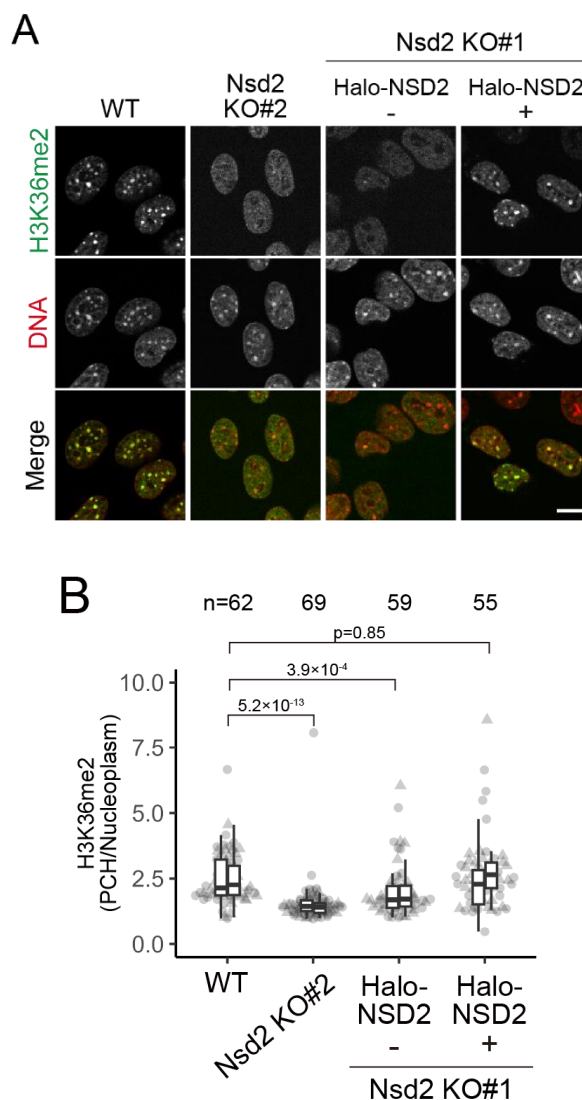


図 22 NSD2-KO が H3K36me2 の PCH 局在に与える影響

NSD2-KO#1 にのみ Halo-NSD2 をトランスフェクションし、翌日 H3K36me2 抗体で免疫染色した。(A) H3K36me2 抗体 (緑) と Hoechst33342 (赤) で染色した WT、NSD2-KO#2、-KO#1 (Halo-NSD2 非発現および発現細胞核) の免疫染色画像について、共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示した。(B) (A) で取得した画像から定量した H3K36me2 の PCH 局在率。箱ひげ図の詳細については図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

4.2 NSD2 の制御因子の同定

4.2.1 NSD2 によるポジティブ・フィードバック機構の検討

4.1.3 において、Halo-NSD2 の過剰発現は、Pmi28 の PCH に低レベルながら H3K36me2 を誘導した (図 20D)。NSD2 の PWWP1 ドメインは、H3K36me2 に結合し、NSD2 をクロマチン上で安定化させる (Sankaran et al., 2016)。このことから、NSD2 が偶発的であれ一旦 PCH 上に H3K36me2 を付加すると、以降は NSD2 自身がその H3K36me2 を認識し、PCH 上の同修飾が増幅するポジティブ・フィードバック機構が働く可能性が考えられた。それを検証するため、PWWP1 ドメインを欠失し、かつ SET ドメインにメチル化活性を失活させるアミノ酸置換 (Y1092A; Kuo et al., 2011) を導入した Halo-NSD2 変異体 (Δ PWWP1, Y1092A) を作製し、Pmi28 における PCH 局在率を定量した。もしフィードバック機構が存在する場合、 Δ PWWP1, Y1092A の PCH 局在率は、Halo-NSD2 全長型 (FL) よりも低くなると予想した。反対にフィードバック機構が存在しない場合は、 Δ PWWP1, Y1092A と FL の PCH 局在率は、同程度となると予想した。定量の結果、 Δ PWWP1, Y1092A は、Halo-NSD2 全長型 (FL) より低い Halo タグ単独 (Halo) より高い PCH 局在率を示した (図 23)。

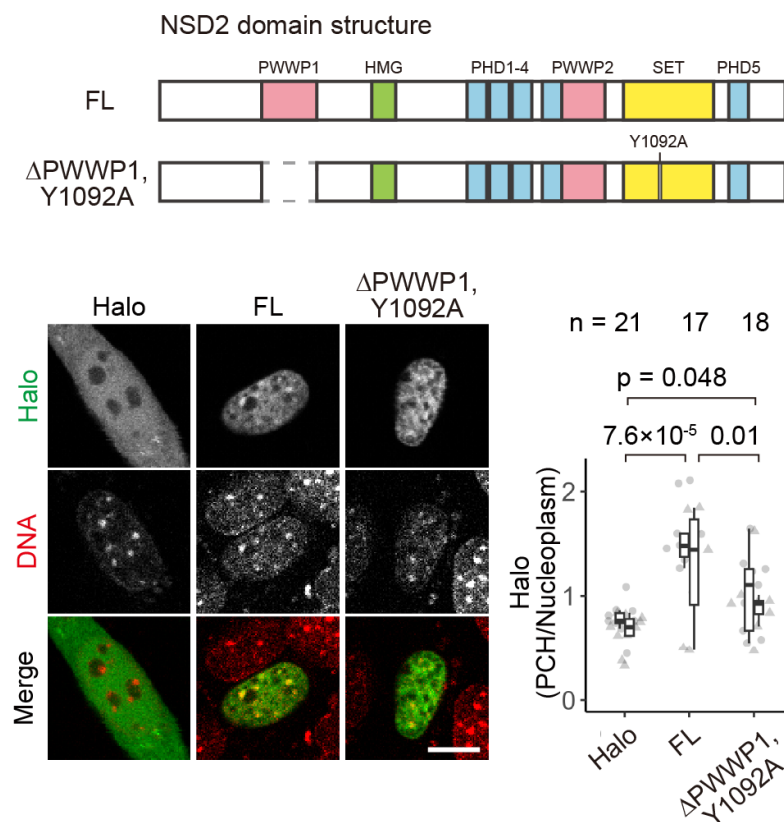


図 23 NSD2 変異体の局在観察

Halo タグ単独 (Halo)、Halo-NSD2 全長型 (FL)、Halo-NSD2 変異体 (Δ PWWP1, Y1092A) を Pmi28 に一過性導入した。翌日、JF646 Halo タグリガンドと Hoechst33342 で染色し、生細胞観察した。(上) NSD2 のドメイン構造。PWWP1 は H3K36me2 と結合するドメインである。Y1092A は SET ドメインのメチル化活性を失活させるアミノ酸置換である。(左下) Halo (緑) と Hoechst33342 (赤) の生細胞単一 Z スライス画像。(右下) 生細胞における Halo の PCH 局在率。箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

4.2.2 ノックダウンによる NSD2 の上流因子の探索

4.2.1 より、PCH の H3K36me2 は NSD2 によるポジティブ・フィードバック機構によって、部分的に増幅または維持されると考えられた。しかし、Halo-NSD2 変異体 (Δ PWWP1, Y1092A) の PCH 局在率が Halo タグ単独 (Halo) より高いことをふまえると (図 23)、NSD2 が PCH に標的する最初期のメカニズムは依然として不明であった。

そこで、NSD2 を PCH へリクルートする上流因子の探索を試みた。NSD2 相互作用因子を網羅解析した先行研究を参照し (Huang et al., 2019)、その中から PCH 局在が既に報告されているタンパク質である SMARCA5、PARP1、ORC2、MKI67、MECP2、KDM2A、HMGB1 を NSD2 上流因子の候補とした (図 24A) (Malla et al., 2023; Quenet et al., 2008; Prasanth et al., 2010; Sobiecki et al., 2016; Nan et al., 2007; Frescas et al., 2008; Pallier et al., 2003)。これらの候補因子を、レンチウイルス shRNA 発現系を用いて iMEF でノックダウン (KD) し、PCH に H3K36me2 が局在する細胞数を計測した (図 24B)。ここで KD 効率は RT-qPCR で確認し、NSD2-KD 細胞を本実験系のポジティブコントロールとした。7 種類の候補タンパク質の中では、クロマチンリモデリング因子 SMARCA5/SNF2H の KD が、PCH に H3K36me2 が局在する細胞数を最も減少させた。

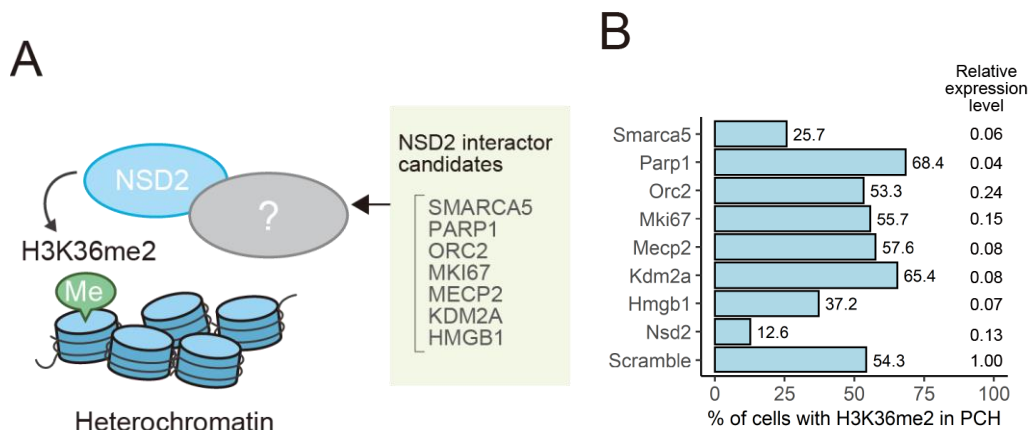


図 24 NSD2 を制御する候補因子のノックダウンスクリーニング

(A) NSD2 の PCH 局在を制御する因子を探索するストラテジー。先行研究より、NSD2 と相互作用し、かつ PCH に局在する既知のタンパク質を候補とした。(B) 各候補タンパク質 (左端に表記) の KD 後、H3K36me2 が PCH に局在する iMEF 細胞の割合。NSD2-KD は本実験系のポジティブコントロールとした。KD 効率は RT-qPCR によって測定し、Scramble shRNA に対する相対発現量として右端に示した。

4.2.3 SMARCA5 が PCH の H3K36me2 と NSD2 に与える影響

SMARCA5 の機能解析を進めるため、まず、iMEF と Pmi28 に一過性発現させた Halo-SMARCA5 と H3K36me2 の局在を調べた。Halo-SMARCA5 は iMEF では PCH に局在したが、Pmi28 ではほとんど局在しなかった (図 25A、B)。また SMARCA5 の過剰発現は、iMEF と Pmi28 いずれにおいても PCH の H3K36me2 レベルには影響しなかった (図 25C)。

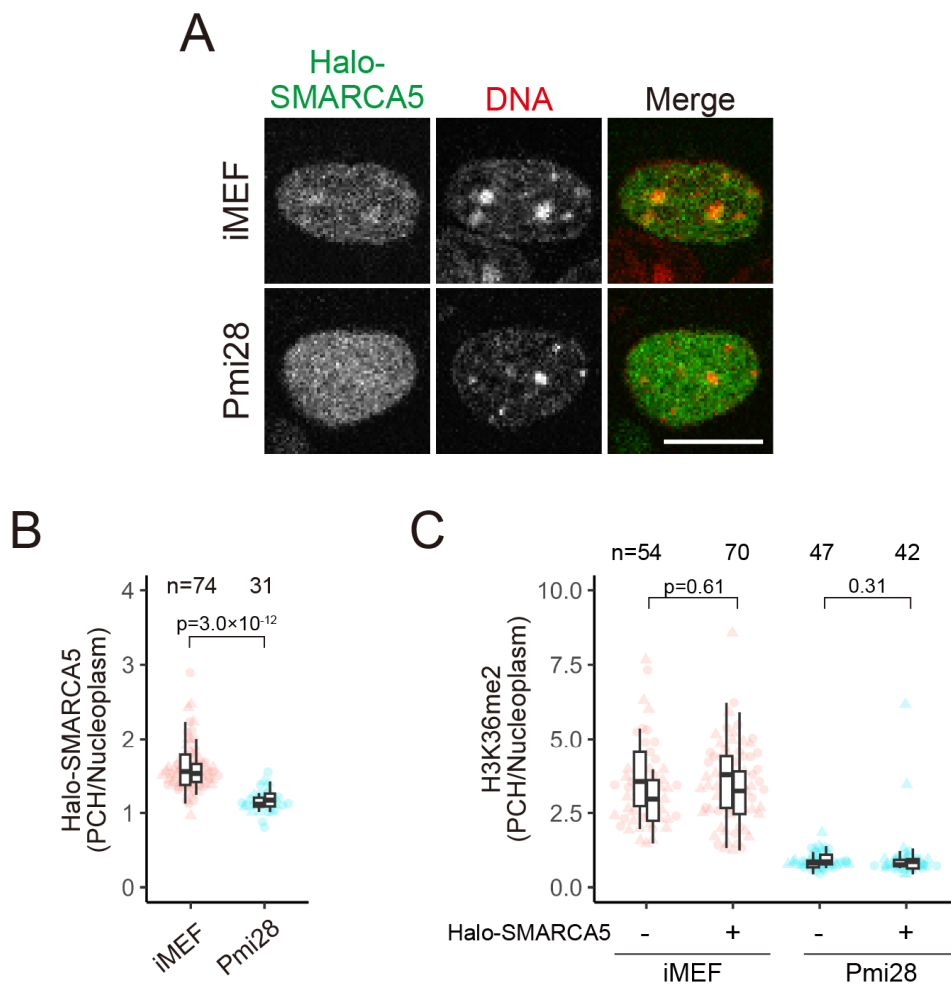


図 25 Halo-SMARCA5 過剰発現が H3K36me2 分布に与える影響

iMEF と Pmi28 に Halo-SMARCA5 発現ベクターをトランスフェクションし、翌日 JF646 Halo タグリガンドと Hoechst33342 で処理した。生細胞観察後、細胞を固定し、H3K36me2 抗体で染色した。(A) iMEF (上) と Pmi28 (下) における Halo-SMARCA5 (緑) と Hoechst33342 (赤) の生細胞単一 Z スライス画像。(B、C) 生細胞における Halo-SMARCA5 (B) と免疫染色による H3K36me2 の PCH 局在率 (C)。箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

次に、H3K36me2 と NSD2 の PCH 局在に対する SMARCA5 の影響を調べるため、SMARCA5-KO iMEFs を樹立した (図 26)。

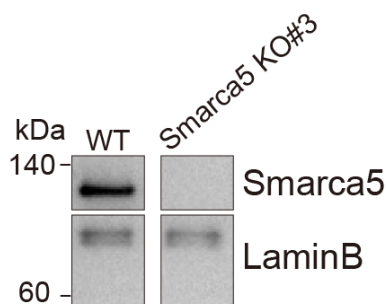


図 26 SMARCA5-KO iMEF のウエスタンブロッティング

SMARCA5 抗体と LaminB 抗体を用いたウエスタンブロッティング画像。LaminB はローディングコントロールとした。左端の数値はプロテインラダーマーカーから推定されるタンパク質サイズ (kDa) を示す。

この細胞を用いた定量解析の結果、SMARCA5 欠損は PCH の H3K36me2 レベルを減少させ、それは Halo-SMARCA5 の発現によってある程度回復した (図 27A、B)。さらに SMARCA5-KO 細胞では、Halo-NSD2 の PCH 局在率が低下したが、それは SMARCA5-sfGFP 発現によって部分的に補完できた (図 27C)。

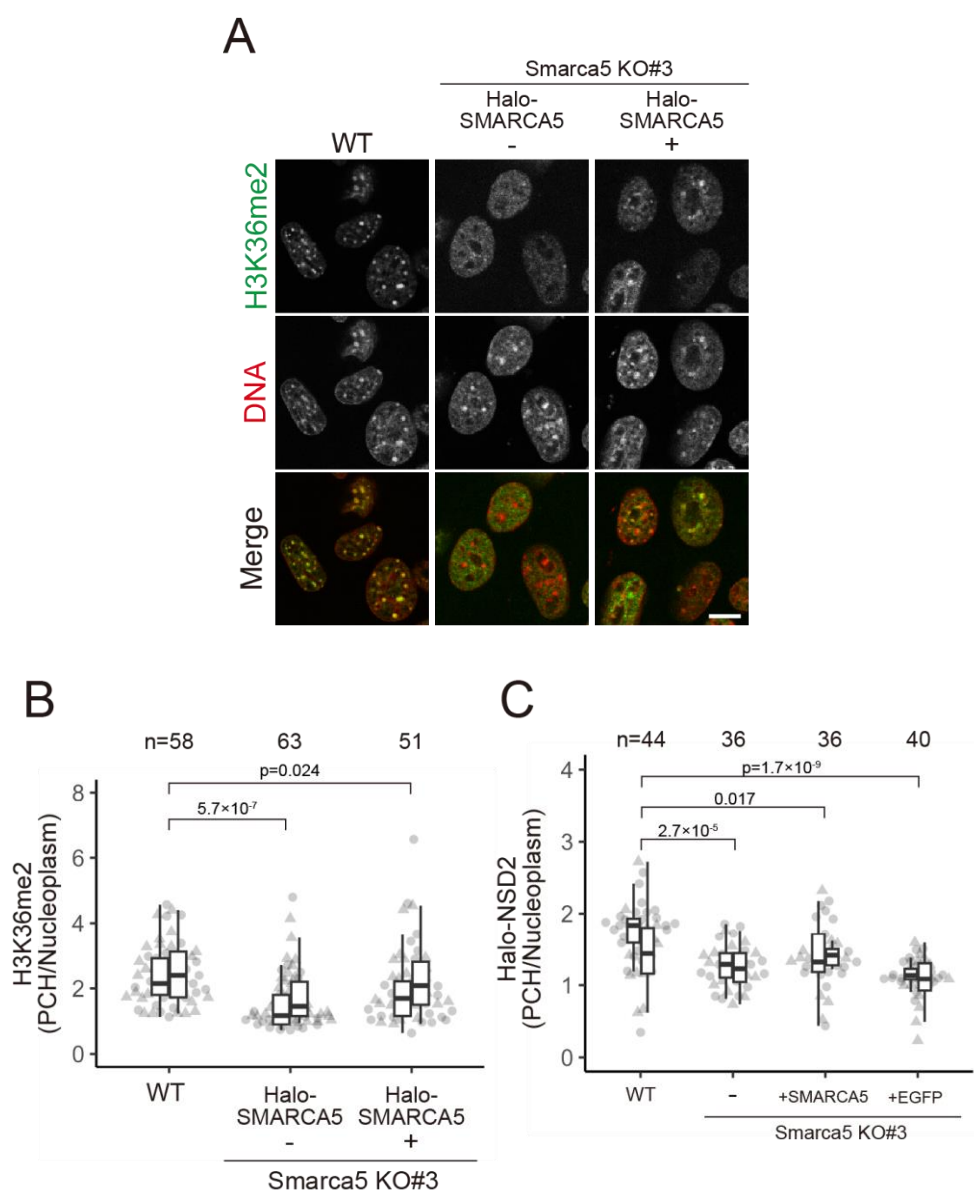


図 27 SMARCA5-KO が H3K36me2 と NSD2 の PCH 局在に与える影響

(A、B) SMARCA5-KO#3 に Halo-SMARCA5 をトランスフェクションし、翌日 H3K36me2 抗体で免疫染色した。(A) H3K36me2 抗体 (緑) と Hoechst33342 (赤) で染色した WT、SMARCA5-KO#3 (Halo-SMARCA5 非発現および発現細胞核) の免疫染色画像について、共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示した。(B) (A) で取得した画像から定量した H3K36me2 の PCH 局在率。(C) WT には Halo-NSD2 のみを、SMARCA5-KO#3 にはさらに SMARCA5-sfGFP または EGFP をトランスフェクションし、翌日 JF646 Halo タグリガンドと Hoechst33342 で染色した。生細胞観察で得た画像から Halo-NSD2 の PCH 局在率を定量した。箱ひげ図の詳細については図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

4.3 SMARCA5 の制御因子の同定

4.3.1 ISWI 複合体に着目した SMARCA5 の上流因子の探索

高等真核生物の SMARCA5 は、異なるアクセサリ因子と共に 5 種類の ISWI クロマチンリモデリング複合体を形成する (Bartholomew, 2014)。このうち PCH 局在が報告されているのは、ACF (BAZ1A)、WICH (BAZ1B)、NoRC (BAZ2A) 複合体である。() 内はアクセサリ因子を示す。ISWI 複合体の標的認識はアクセサリ因子によることから (Ito et al., 1999; Ribeyre et al., 2016; Strohner et al., 2001)、ISWI 複合体中の BAZ1A、BAZ1B または BAZ2A が、SMARCA5 を介して NSD2 を PCH へリクルートしているのではないかと考えた (図 28)。

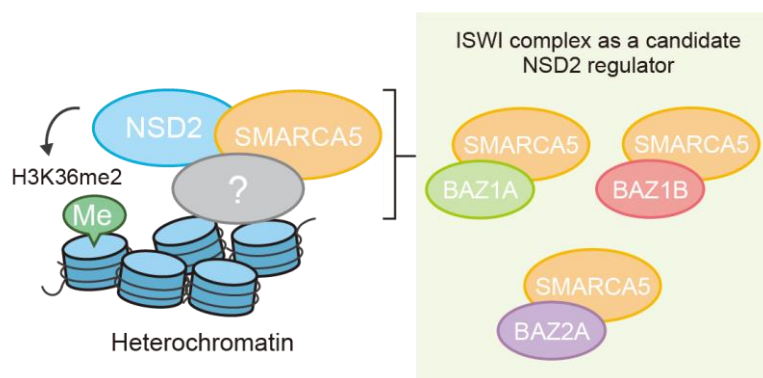


図 28 NSD2 を制御する ISWI 複合体探索の概要図

NSD2 の PCH 局在を制御する ISWI 複合体を探索するストラテジー。ISWI 複合体のアクセサリ因子のうち、PCH に局在することが報告されている BAZ1A、BAZ1B、BAZ2A に着目した。

そこで、iMEF と Pmi28 に Emerald-green fluorescent protein (emGFP) タグ付き BAZ タンパク質を発現させ、核内分布を観察した。その結果、BAZ1A は両細胞の大半で核質全域に拡散したが (図 29A)、BAZ1B と BAZ2A は両細胞で PCH に局在した (図 29B-E)。

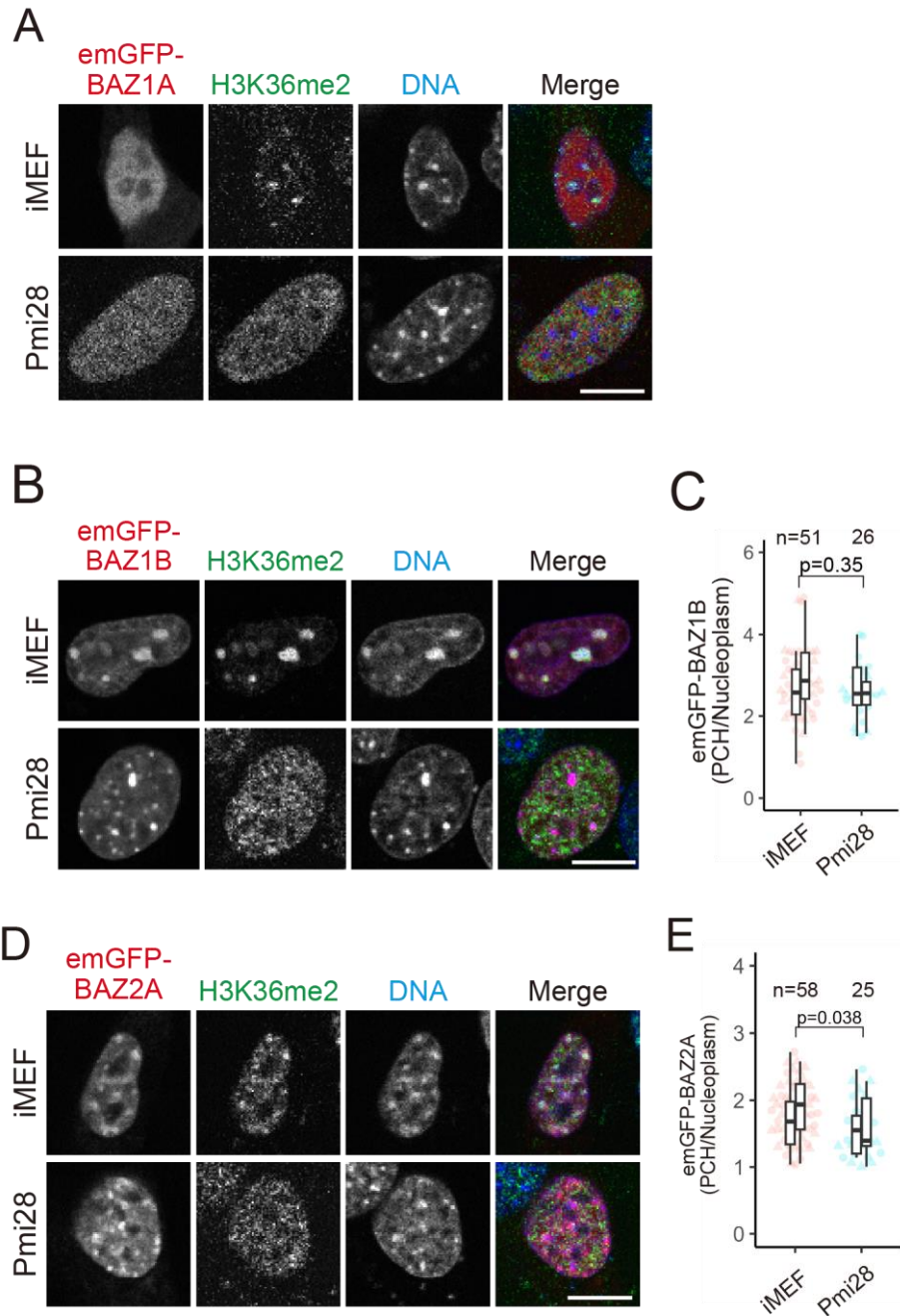


図 29 BAZ1A、BAZ1B、BAZ2A の核内分布と PCH 局在率

(A、B、D) iMEF (各上部) と Pmi28 (各下部) に emGFP-BAZ1A (A)、emGFP-BAZ1B (B)、emGFP-BAZ2A (D) 発現ベクター (赤) をトランスフェクションし、翌日 Hoechst33342 (青) で処理した。生細胞観察後、細胞を固定し、H3K36me2 抗体 (緑) で免疫染色した。共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示した。

(C、E) 生細胞における emGFP-BAZ1B (C) と emGFP-BAZ2A (E) の PCH 局在率。箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

4.3.2 BAZ1B が PCH の H3K36me2、NSD2、SMARCA5 に与える影響

4.3.1 の観察結果をふまえ、BAZ1B と BAZ2A に着目することとした。iMEF と Pmi28 での BAZ1B と BAZ2A の過剰発現は、H3K36me2 の PCH 局在率にほとんど影響しなかった (図 30A、B)。

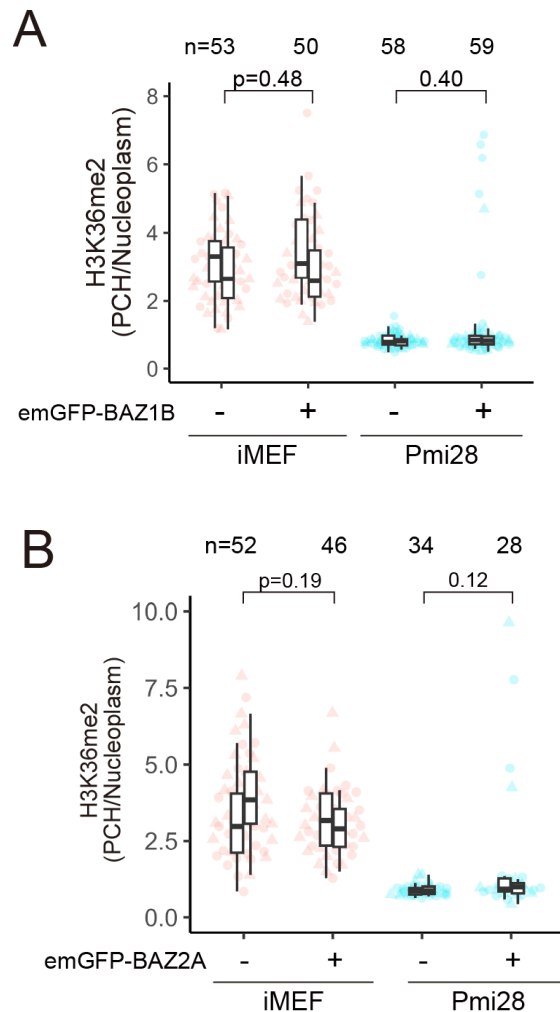


図 30 emGFP-BAZ1B または emGFP-BAZ2A 過剰発現が H3K36me2 の PCH 局在に与える影響

(A) 図 29 (B) の一連の観察画像から定量した、emGFP-BAZ1B 非発現または発現 iMEF、Pmi28 細胞核における H3K36me2 の PCH 局在率。(B) 図 29 (D) の一連の観察画像から定量した、emGFP-BAZ2A 非発現または発現 iMEF、Pmi28 細胞核における H3K36me2 の PCH 局在率。箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。

PCH の H3K36me2 に対する BAZ1B と BAZ2A の役割を明らかにするため、各遺伝子のシングル KO およびダブル KO 細胞の樹立を試みた結果、BAZ1B-KO iMEF を得た (図 31)。

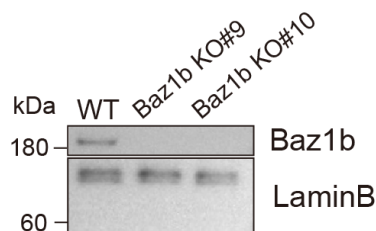


図 31 BAZ1B-KO iMEF のウエスタンブロッティング

BAZ1B 抗体と LaminB 抗体を用いたウエスタンブロッティング画像。LaminB はローディングコントロールとした。左端の数値はプロテインラダーマーカーから推定されるタンパク質サイズ (kDa) を示す。

次に、WT および BAZ1B-KO iMEF で BAZ2A の KD を行った。しかし用いた 2 種の shRNA では KD 効率が低く、またそれによる H3K36me2 の PCH 局在率の変化は確認できなかった (図 32)。

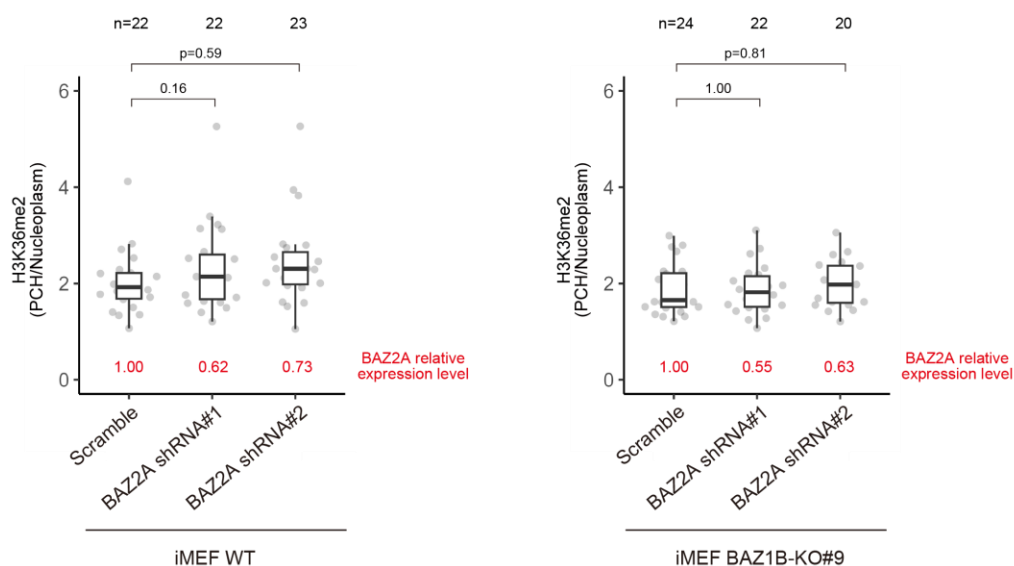


図 32 BAZ2A-KD による PCH H3K36me2 変化

WT (左) または BAZ1B-KO (右) iMEF において、BAZ2A-KD を行い、H3K36me2 の PCH 局在率を定量した。KD 効率は RT-qPCR によって測定し、Scramble shRNA に対する相対発現量として赤字で示した。箱ひげ図の詳細は図 13 を参照。

そこで以降は BAZ1B の機能に注目することとした。定量解析の結果、PCH の H3K36me2 レベルは BAZ1B-KO 細胞で減少し、それは emGFP-BAZ1B の導入によって部分的に補完できた (図 33A、B)。また Halo-NSD2 と Halo-SMARCA5 の PCH 局在率は、BAZ1B-KO 細胞で低下した一方、emGFP-BAZ1B 発現によって完全に補完することができた (図 33C、D)。

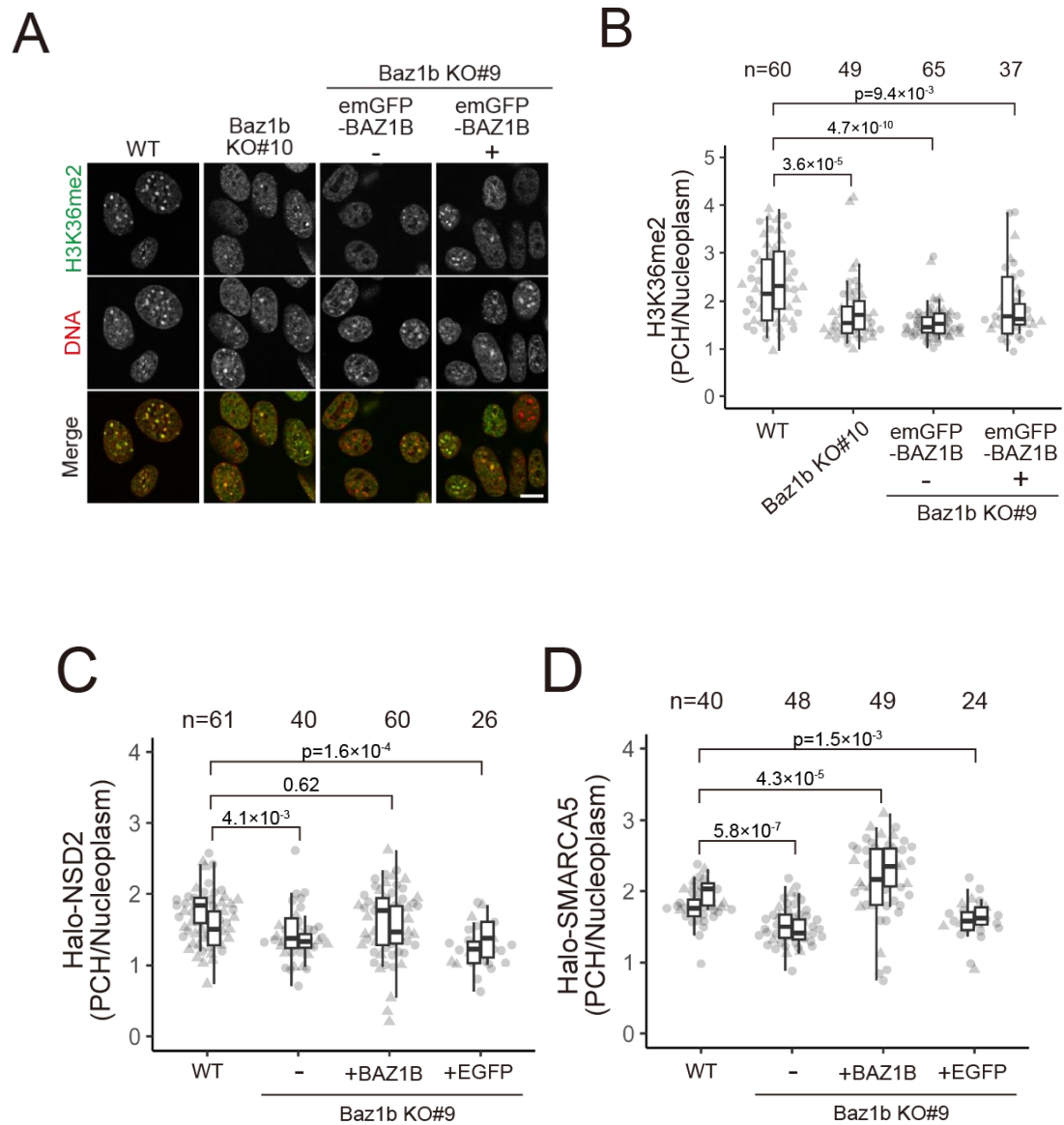


図 33 BAZ1B-KO が H3K36me2、NSD2、SMARCA5 の PCH 局在に与える影響
(A、B) BAZ1B-KO#9 にのみ emGFP-BAZ1B をトランスフェクションし、翌日 H3K36me2 抗体で免疫染色した。(A) H3K36me2 抗体 (緑) と Hoechst33342 (赤) で染色した WT、BAZ1B-KO#10、-KO#9 (emGFP-BAZ1B 非発現および発現細胞核) の免疫染色画像について、共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスを示した。(B) (A) で取得した画像から定量した H3K36me2 の PCH 局在率。(C、D) WT には Halo-NSD2 (C) または Halo-SMARCA5 (D) のみを、BAZ1B-KO#9 にはさらに emGFP-BAZ1B または EGFP をトランスフェクションし、翌日 JF646 Halo タグリガンドと Hoechst33342 で染色した。生細胞観察で得た画像から Halo-NSD2 (C) と Halo-SMARCA5 (D) の PCH 局在率を定量した。箱ひげ図の詳細については図 13 の凡例を参照。スケールバーは 10 μ m。

4.4 NSD2 と WICH 複合体の相互作用の検討

4.4.1 NSD2 と SMARCA5、BAZ1B の相互作用解析

以上の結果から、NSD2 は SMARCA5 と BAZ1B によって PCH に動員されることが示唆された。これと一致して、先行研究のプロテオミクス解析でも (Huang et al., 2019)、NSD2 は SMARCA、BAZ1B 両方と相互作用し得ることが示されている。そこで、NSD2 がこれらのタンパク質と直接結合するかを確認するため、共免疫沈降 (co-IP) を行った。まず emGFP-SMARCA5 または emGFP-BAZ1B を、Halo-NSD2 または Halo タグ単独ベクターと共に HEK293T 細胞にトランスフェクションし、タンパク質を抽出した。抗 GFP ビーズにより co-IP したタンパク質をウエスタンブロッティングで検出した。その結果、emGFP-SMARCA5 および emGFP-BAZ1B いずれの沈降物にも Halo-NSD2 が含まれた (図 34)。

HEK293T 細胞に導入し、タンパク質を抽出後、抗 GFP ビーズで co-IP した。その結果、いずれの NSD2 変異体も emGFP-SMARCA5 の沈降物に含まれた (図 35)。

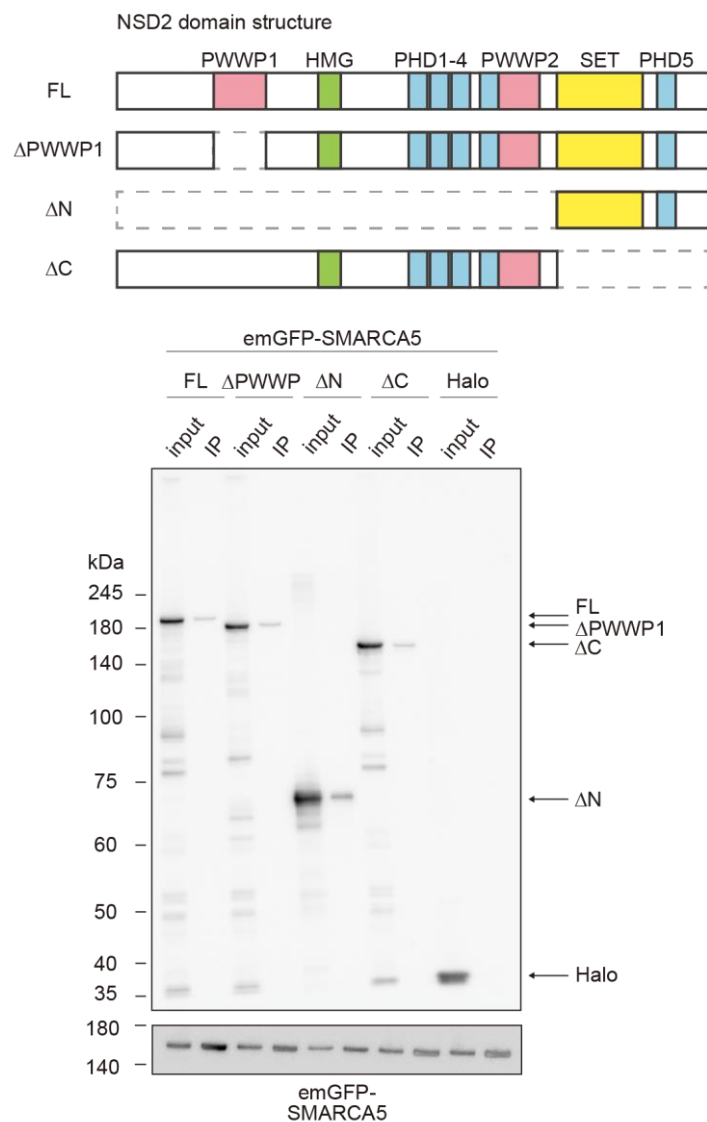


図 35 NSD2 変異体と SMARCA5 の co-IP

種々の Halo-NSD2 (FL、ΔPWWP1、ΔN、ΔC；上のドメイン構造図) または Halo タグ単独ベクター (Halo) を、emGFP-SMARCA5 と共に HEK293T 細胞にトランスフェクションした。抽出したタンパク質 (input) を抗 GFP ビーズで co-IP し、Halo 抗体または GFP 抗体でウェスタンブロッティングした (下)。免疫沈降物 (IP) は input の 10 倍濃度である。左右の数字は推定タンパク質サイズ (kDa)。

4.5 BAZ1B のヘテロクロマチン認識機構の検討

4.5.1 顕微鏡観察による PCH 局在に必要な BAZ1B ドメインの探索

これまでの結果から、BAZ1B が PCH の H3K36me2 を制御する最上流因子であると考えられたため、次に BAZ1B の PCH 認識機構を明らかにすることとした。

まず EGFP タグが付いた BAZ1B 変異体を iMEF に発現させ、その核内分布を観察した。その結果、BAZ1B の PCH 局在には、ブロモドメイン (BrD) と隣接した C 末端領域が必要であることが分かった (図 36)。

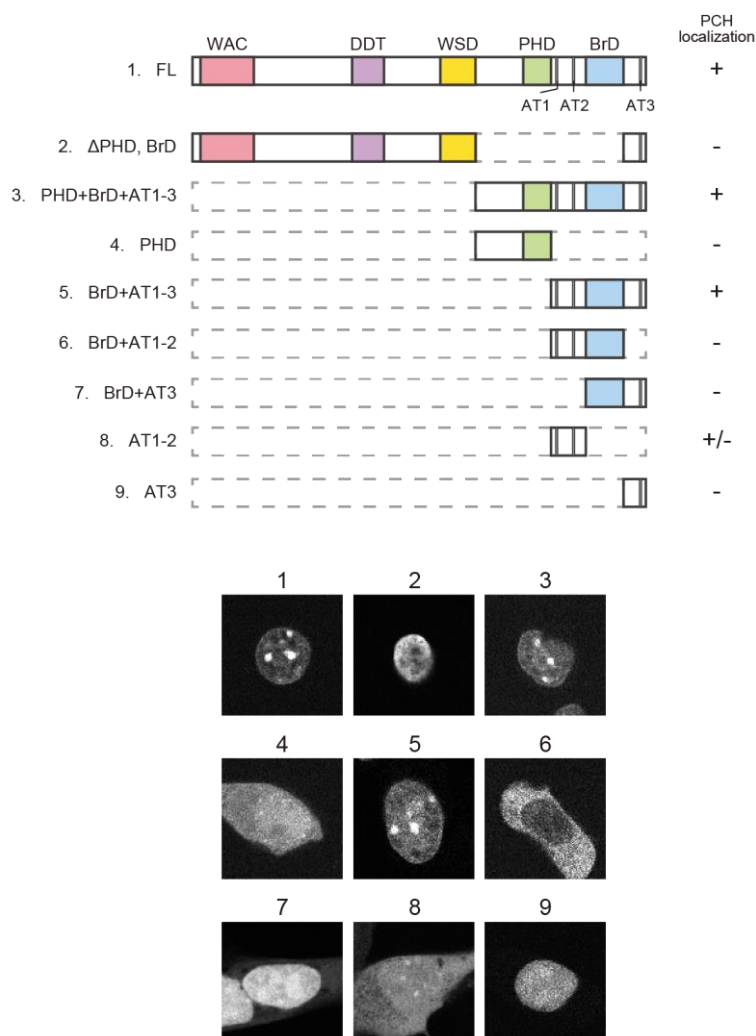


図 36 BAZ1B 変異体の核内分布

(上) 検討した BAZ1B 変異体のドメイン構造。右端にそれぞれの核内分布を表記した。明確に PCH 分布する場合は+、分布しない場合は-、PCH 分布するが拡散もする場合 +/-とした。(下) N 末端側に EGFP タグが付いた BAZ1B 変異体の生細胞観察画像。画像上の数字は(上)の模式図に示した各変異体に対応する。

H3K36me2 の PCH 分布には H3K9me3 も DNA メチル化も不要だったことから (図 18A、B)、BAZ1B は DNA 配列に直接結合している可能性が示唆された。PCH を構成する MajSat リピートは AT 含量が多い。また AT が豊富な DNA には、AT-hook と呼ばれるアミノ酸モチーフが結合できることが知られている (Arg-Gly-Arg-Pro; Aravind and Landsman, 1998)。ここで BAZ1B の C 末端領域のアミノ酸配列に注目すると、脊椎動物での保存性が高い 3 つの AT-hook 様モチーフが存在することが分かった (BrD+AT1-3; 図 37)。さらにこれらの AT-hook 様モチーフのアミノ酸を置換した BAZ1B 変異体 (BrD+AT1-3mut) は、PCH に局在しなかった (図 37)。加えて、3 つ目の AT-hook 様モチーフを欠いた BAZ1B 変異体 (AT1-2) は比較的弱い PCH 局在を示したことから (図 36)、BAZ1B が安定的に PCH に局在するには 3 つの AT-hook 様モチーフが必要であることが分かった。

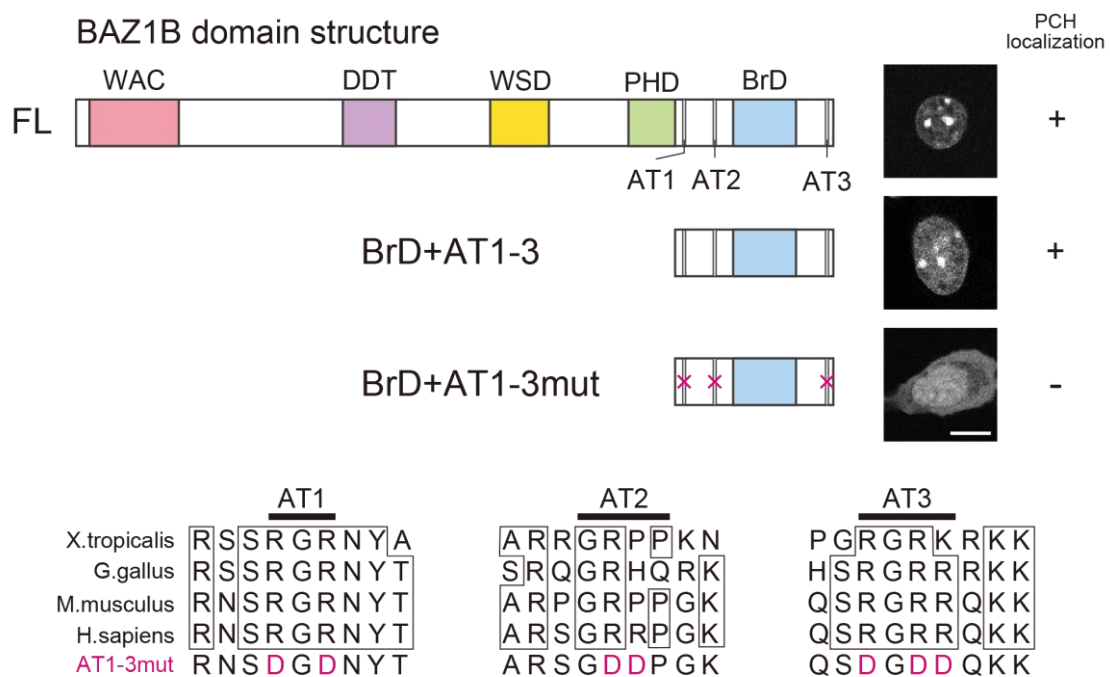


図 37 AT-hook 様モチーフへの変異導入が BAZ1B の核内分布に与える影響
BAZ1B のドメイン構造と核内分布。BAZ1B 全長型 (FL)、ブロモドメイン (BrD) と 3 つの AT-hook 様モチーフからなる切断型 (BrD+AT1-3)、それらのモチーフの変異型 (BrD+AT1-3mut) の模式図を示す。右側には EGFP タグが付いた各変異体の生細胞観察画像を置いた。下部には 3 つの AT-フック様モチーフの生物種ごとのアミノ酸配列と AT1-3mut の置換アミノ酸を示した。スケールバーは 10 μ m。

4.5.2 BAZ1B の AT-hook 様モチーフと DNA の結合アッセイ

次に、3つの AT-フック様モチーフを含む BAZ1B ドメインが、AT リッチ DNA に直接結合するかどうかを生化学的解析により調べた。EGFP-BrD+AT1-3 と EGFP-BrD+AT1-3mut をそれぞれ HEK293T 細胞で発現させ、抗 GFP マグネティックビーズを用いて精製した (図 38)。

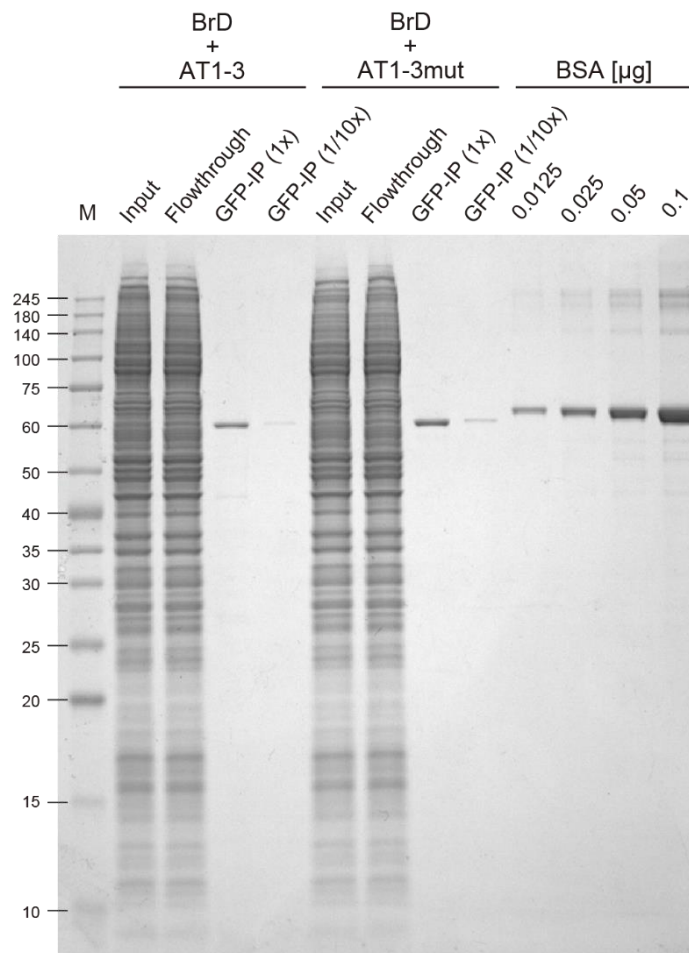


図 38 EGFP-BrD+AT1-3 と EGFP-BrD+AT1-3mut のタンパク質精製
精製した EGFP タグ付き BAZ1B BrD+AT1-3 および BrD+AT1-3mut の SDS-PAGE 画像。タンパク質は CBB 染色により可視化した。M：タンパク質ラダーマーカー。左端の数字は推定タンパク質サイズ (kDa)。input：BAZ1B 変異体発現ベクターのトランスフェクション後、HEK293T 細胞から抽出したタンパク質の上清。Flowthrough：抗 GFP ナノボディ磁気ビーズ (GFP Trap) と結合しなかった画分。GFP-IP：ビーズと結合した画分。BSA：ウシ血清アルブミン。希釈系列から検量線を作成することで、GFP-IP タンパク質量を推定した。

これらのビーズ付きタンパク質を、AT リッチな MajSat リピート、GC リッチな EF1 α プロモーター、または 601 配列 (Lowary and Widom, 1998) の DNA と混合した (図 39A-C)。結合しなかった DNA を除去した後、ビーズを洗浄し、結合した DNA を溶出した (図 40)。

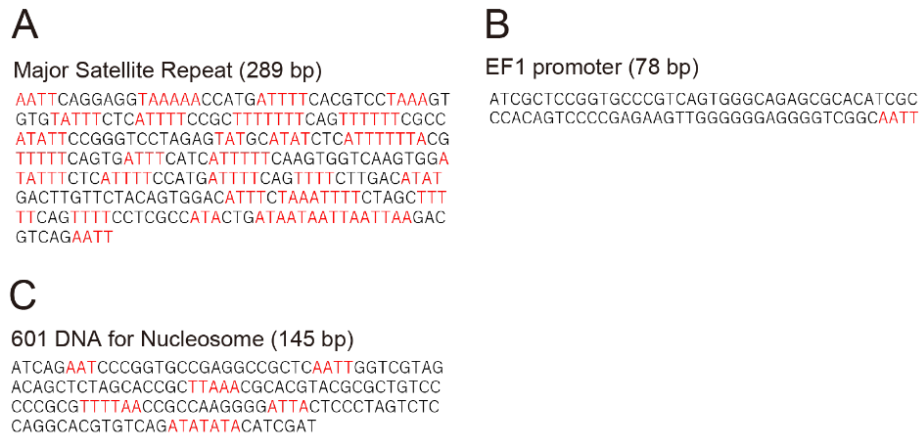


図 39 BAZ1B との結合アッセイに用いた標的 DNA 配列
EGFP-BrD+AT1-3 および EGFP-BrD+AT1-3mut との結合アッセイで使

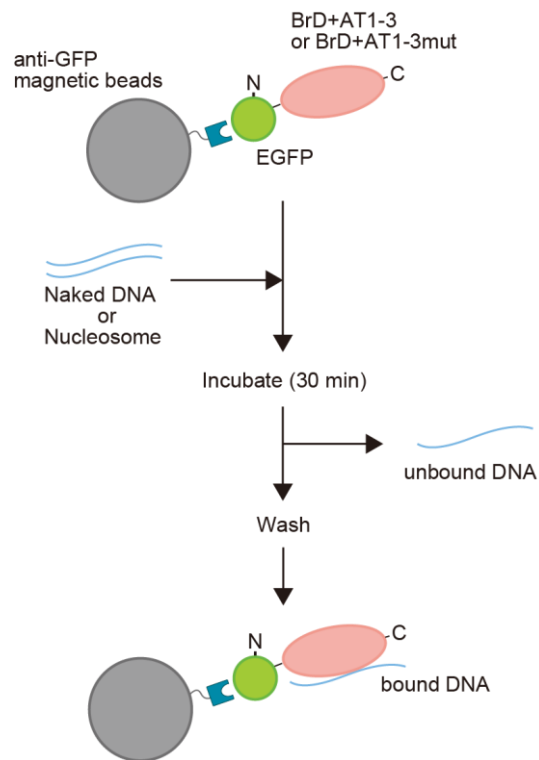


図 40 BAZ1B と DNA の結合アッセイ概要図

EGFP-BAZ1B BrD+AT1-3 および EGFP-BrD+AT1-3mut と DNA の結合アッセイの実験デザイン。抗 GFP ビーズと結合した BAZ1B ドメイン（図 38 で精製）を、20mM Tris-HCl [pH7.5] バッファー中で裸の DNA またはヌクレオソームと 30 分間インキュベートした。未結合 DNA またはヌクレオソームを回収した（unbound DNA）。50 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl [pH7.5] バッファーで洗浄後（Wash）、350 mM NaCl を含む 20 mM Tris-HCl [pH7.5] バッファーにより、結合した DNA またはヌクレオソームを溶出した（bound DNA）。BAZ1B ドメインを含めずに同じ処理を行った DNA またはヌクレオソームを input とした。

溶出 DNA をアガロースゲル電気泳動で検出した結果、MajSat リピートは BrD+AT1-3 と結合したが、BrD+AT1-3mut とは結合しなかった (図 41)。また EF1 α プロモーターと BrD+AT1-3 との結合は非常に弱かった。BrD+AT1-3 はヌクレオソームとも結合したが、その結合親和性は裸の DNA に比べて弱かった。

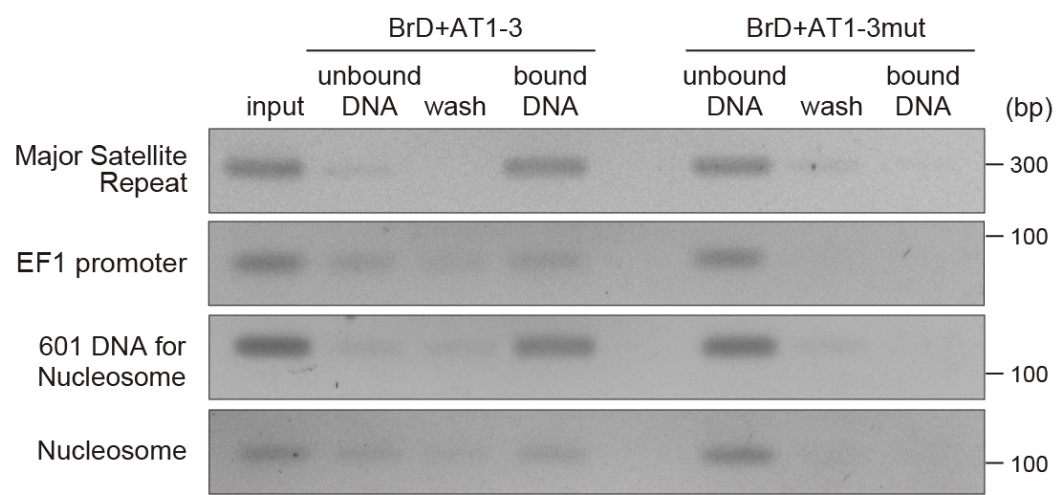


図 41 BAZ1B と DNA の結合アッセイ結果
電気泳動したアガロースゲル画像。ゲル上部に記載した input~bound DNA の詳細は図 40 の凡例を参照。右端は DNA ラダーマーカーから推定された DNA サイズ (bp)。

4.6 H3K36me2 のヘテロクロマチン分布の規定要因の検討

4.6.1 PCH の H3K36me2 制御因子の発現量比較

PCH に H3K36me2 が局在する細胞としない細胞の分子レベルの違いを明らかにするため、ウェスタンブロッティングにより NSD2、SMARCA5、BAZ1B のタンパク質発現量を比較した (図 42)。その結果、H3K36me2 が PCH に局在する NIH3T3 と iMEF の方が、局在しない細胞 (MC12、C2C12、Pmi28) よりも NSD2 と SMARCA5 を強く発現していた。また iMEF では BAZ1B も高発現だった。一方 ES は、SMARCA5 を比較的高く、NSD2 と BAZ1B を中程度に発現した。

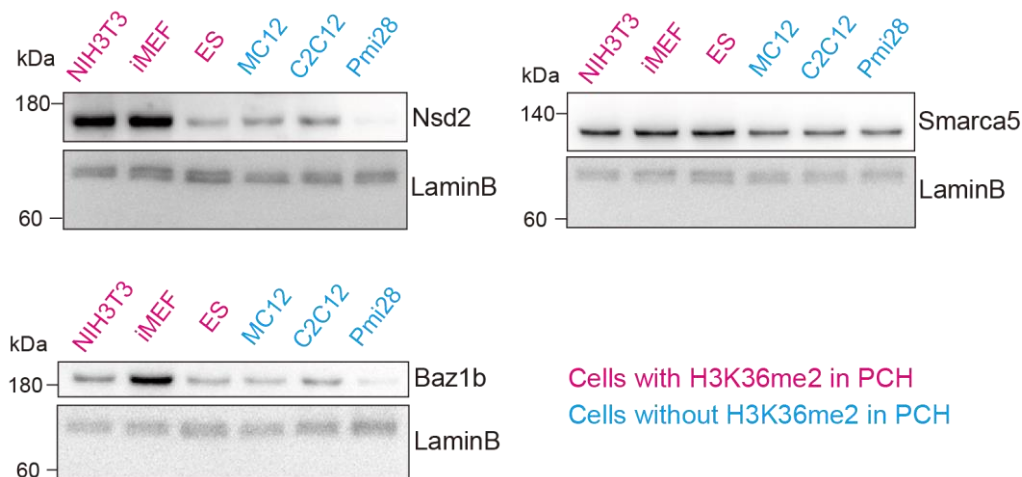


図 42 NSD2、SMARCA5、BAZ1B の細胞種間発現量比較

NSD2 抗体、SMARCA5 抗体、BAZ1B 抗体、LaminB 抗体を用いたウェスタンブロッティング画像。LaminB はローディングコントロールとした。図 13 の定量から、H3K36me2 が PCH に局在した細胞は赤字で、局在しなかった細胞は青字で示した。左端の数値はプロテインラダーマーカーから推定されるタンパク質サイズ (kDa) を示す。

4.6.2 PCH の H3K36me2 制御因子の過剰発現

H3K36me2 がユークロマチンに分布し、かつ NSD2 と BAZ1B の発現量が最も低かった Pmi28 を用いて、NSD2、SMARCA5、BAZ1B または BAZ2A のうち、どのタンパク質を発現させると PCH に H3K36me2 を誘導できるか調べた (図 43)。

各タンパク質を単独で発現させた場合は、これまでの結果と同様に (図 20D、図 25C、図 30)、NSD2 だけが PCH に H3K36me2 を誘導した。2 種類のタンパク質を共発現させた場合は、一方を NSD2 にした場合のみ H3K36me2 の PCH 分布を誘導できた。これは H3K36me2 増大にはメチル化酵素が必要であるためと考えられた。3 種類のタンパク質を同時に発現させた場合、BAZ1B (+NSD2、SMARCA5) は PCH の H3K36me2 レベルをさらに増大させた。

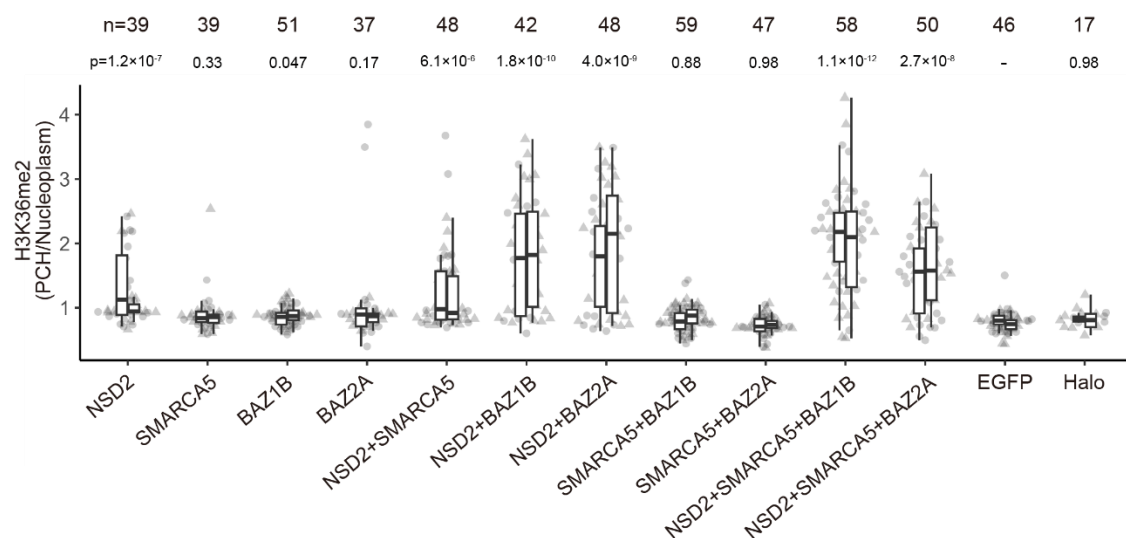


図 43 制御因子の過剰発現が H3K36me2 の PCH 局在に与える影響

H3K36me2 の PCH 局在率。Pmi28 に各タンパク質の発現ベクターをトランスフェクションした。2 日後に固定し、H3K36me2 抗体、JF646 Halo タグリガンド、Hoechst33342 で染色した。共焦点顕微鏡の一連の Z スライス画像から H3K36me2 の PCH 局在率を定量した。3 つのタンパク質を発現させた場合は、各発現ベクターを等量導入した。1 つまたは 2 つのタンパク質を発現させる場合は、三重発現の場合と同量の発現ベクターを導入し、EGFP-または Halo-発現ベクターを用いて総 DNA 量を調整した。箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。なお、p 値は EGFP を基準とし、マン・ホイットニーの U 検定と Hommel 補正を用いて計算した。

4.7 小括

本章では H3K36me2 が PCH に局在する分子メカニズムを解析した。

4.1.1 より、H3K36me2 は H3K9me3、DNA メチル化、それらと関連するメチル化酵素には依存せずに PCH に局在することが示唆された。これまでに報告された PCH 上のエピジェネティック修飾のほとんどが H3K9me3 または DNA メチル化の下流に位置することを考えると (Peters et al., 2003; Ooga et al., 2008; Lange et al., 2013; Jack et al., 2013)、この結果は予想外であった。これは同時に、H3K36me2 を PCH に誘導する因子は、DNA や RNA あるいはヒストンバリエーションなど、他の PCH 成分を標的としている可能性を示唆した。

4.1.2 では、H3K36 メチル化関連酵素の核内分布を網羅的に観察し、メチル化酵素 NSD2 と脱メチル化酵素 KDM2A が PCH に局在することを見出した。ほ乳類には十数種類の H3K36 メチル化関連酵素が保存されているにも関わらず、2 つのみが PCH に局在したことは、ほ乳類の H3K36 メチル化制御は高度に細分化されており、かつ PCH においてはこれら 2 つの酵素が重要な役割を果たすことを意味する。先行研究より、KDM2A は HP1、ひいては H3K9me3 依存的に PCH に局在することが明らかとなっていたため (Borgel et al., 2017)、**4.1.1** の結果をふまえ、本研究では KDM2A の機能解析は行わなかった。メチル化酵素と脱メチル化酵素で分子的な制御経路が違うらしいことは、ヒストン修飾状態をより精密に調節することに寄与しているのかもしれない。

4.1.3 より、PCH の H3K36me2 は NSD2 が触媒していることが明らかとなった。一方で、NSD2 を過剰発現した時、PCH の H3K36me2 レベルは iMEF ではほとんど変化しなかったが(これは iMEF の H3K36me2 が既に飽和している可能性も示唆する)、Pmi28 では、わずかではあるものの有意に上昇した。NSD2 は H3K36me2 と結合可能な PWWP ドメインを有することをふまえると (Sankaran et al., 2016)、強制的あるいは偶発的な NSD2 発現によって PCH に一度 H3K36me2 が導入されると、ポジティブ・フィードバックによってその局在が維持される可能性が考えられた。そこで **4.2.1** では、Halo-NSD2 変異体を使ってその可能性を検討し、結果的に、NSD2 によるポジティブ・フィードバック機構は存在することが示唆された。しかし、NSD2 過剰発現による PCH H3K36me2 誘導効果は有意だが低いこと、Halo-NSD2 変異体は Halo タグ単独よりは PCH に局在することを鑑みると、ポジティブ・フィードバックの影響は限定的であり、NSD2 を PCH にリクルートする因子が存在すると結論した。

このことから、**4.2.2** では KD スクリーニングを、**4.2.3** では KO と過剰発現実験を組み合わせるにより、SMARCA5 を NSD2 の制御に関わる因子として同定した。しかし SMARCA5 の過剰発現は、H3K36me2 を PCH にほとんど誘導せず、また、SMARCA5-KO iMEF に外部から SMARCA5 を導入したレスキュー実験の効果は限定

的であった。これらのことから、SMARCA5 は PCH への NSD2 リクルートに必要なが十分ではないことが示唆された。ISWI 複合体の標的認識は ATPase 因子である SMARCA5 ではなく、アクセサリ因子によって担われる (Ito et al., 1999; Ribeyre et al., 2016; Strohner et al., 2001; Li et al., 2006; Tallant et al., 2015)。したがって NSD2 の PCH 局在は SMARCA5 単独ではなく ISWI 複合体によって制御されると考えられた。

そこで **4.3.1** と **4.3.2** では、ISWI 複合体のアクセサリ因子に着目した解析を行い、その結果として、BAZ1B が NSD2、SMARCA5、H3K36me2 の PCH 局在を制御することを明らかにした。BAZ1B と同様に PCH 局在を示した BAZ2A については KO 細胞を作製できなかったため、代替実験として KD を行った。しかし BAZ2A を発現低下させても PCH H3K36me2 レベルは変化せず、少なくとも iMEF 細胞において BAZ2A が BAZ1B と重複して機能することは確認できなかった。また BAZ1A は、先行研究では PCH 局在が報告されていたものの (Collins et al., 2002)、本研究ではその再現性は得られなかった。BAZ1A は多様なドメインから構成されるため、分子や細胞の状態によって認識する標的が切り替わる可能性がある。

4.4.1 では、SMARCA5、BAZ1B が NSD2 と直接結合することを co-IP によって明らかにした。これは、WICH 複合体が NSD2 の PCH 局在を制御する可能性を補強した。次いで **4.4.2** で SMARCA5 との結合に要する NSD2 ドメインを検討した結果、NSD2 は複数のドメインを介して SMARCA5 と相互作用することが示唆された。今後は NSD2 だけでなく SMARCA5 のドメイン解析も行うことで、両者の結合様式を詳説できる。その際は、タンパク質複合体の構造予測が可能な Alphafold2 (Jumper et al., 2021) を活用できるかもしれない。

4.5.1 の顕微鏡観察と **4.5.2** の生化学的解析では、BAZ1B の PCH 認識メカニズムを検討した。その結果、BAZ1B は C 末端領域の AT-hook 様モチーフを介して AT 含量の多い DNA に直接結合することを明らかにした。なお、生化学的な BAZ1B と DNA の結合アッセイでは、プロモドメイン (BrD) を含む C 末端領域を用いたが、BrD が PCH 結合に必須であるかどうかは不明である。なぜなら本来 BrD はアセチル化ヒストンを認識するドメインであるが、PCH のアセチル化レベルは低いためである。顕微鏡観察では BrD がない変異体もある程度は PCH に局在したことから、この場合 BrD は標的認識ドメインとしてではなく、AT-hook 様モチーフを構造的に安定化させるリンカーとして働いた可能性が高い。BrD の役割を明らかにするためには、他のリンカーと交換した変異体を用いた検討が必要である。また AT-hook 様モチーフは単に DNA に結合するだけでなく、GC 配列よりも AT 配列に強い親和性を示すという点において、典型的な AT-hook とよく似た性質を持つ。AT-hook のアミノ酸配列にはある程度のバリエーションがあることは既に報告があり (Aravind and Landsman, 1998; Filarsky et al.,

2015)、本研究が見出した AT-hook 様モチーフはその一例であると考えられる。

本章のここまでの結果から、H3K36me2 が PCH に局在する分子メカニズムは次のようにまとめられる。まず BAZ1B が AT-hook 様モチーフによって AT リッチな DNA と結合し、その後 SMARCA5 を介して NSD2 がリクルートされることで PCH に H3K36me2 が局在する。

4.6.1 と **4.6.2** では、これまでに明らかとなった分子機構をふまえ、H3K36me2 が PCH に分布するか否かは何によって規定されるのかを検討した。Pmi28 に対する過剰発現実験の結果、H3K36me2 の PCH 局在は、NSD2、SMARCA5、BAZ1B または BAZ2A の協調した高発現に依存することが示唆された。この過剰発現による H3K36me2 PCH の誘導効果は、細胞種ごとの内在性タンパク質の発現量と関連すると思われる。Pmi28 は内在性 NSD2 と BAZ1B の発現量がかなり低いため、NSD2 と BAZ1B(または BAZ2A) の共発現は PCH の H3K36me2 レベルを大きく上昇させた。一方 Pmi28 の SMARCA5 発現量はそれほど低くないため、NSD2 と SMARCA5 の共発現の効果は限定的だった。また **3.1.1** において ES の H3K36me2 の PCH 局在率が iMEF や NIH3T3 より低かったのは、ES の NSD2 と BAZ1B の発現量が低いことで説明できると思われる。

5 章 ヘテロクロマチンの H3K36me2 の生理的意義

5.1 H3K36me2 が MajSat 転写に与える影響の検討

5.1.1 標的的特異的な H3K36me2 誘導による MajSat 転写量変化

MajSat は一般的に転写抑制状態にあるが、細胞周期あるいは細胞ストレス依存的に転写され得る (Smurova and Wulf, 2018)。PCH 上の H3K36me2 が MajSat 転写に及ぼす影響を調べるため、dCas9-Halo (dCas9-Halo-empty) または NSD2 を連結した dCas9-Halo (dCas9-Halo-NSD2) と共に、MajSat を標的する gRNA を安定発現した Pmi28 を作製した。免疫染色から、dCas9-Halo-NSD2 は PCH H3K36me2 を誘導可能なことを確認した (図 44A)。RT-qPCR によって MajSat 転写量を定量したところ、dCas9-Halo-NSD2 発現細胞では dCas9-Halo 発現細胞よりも MajSat を高発現した (図 44B)。

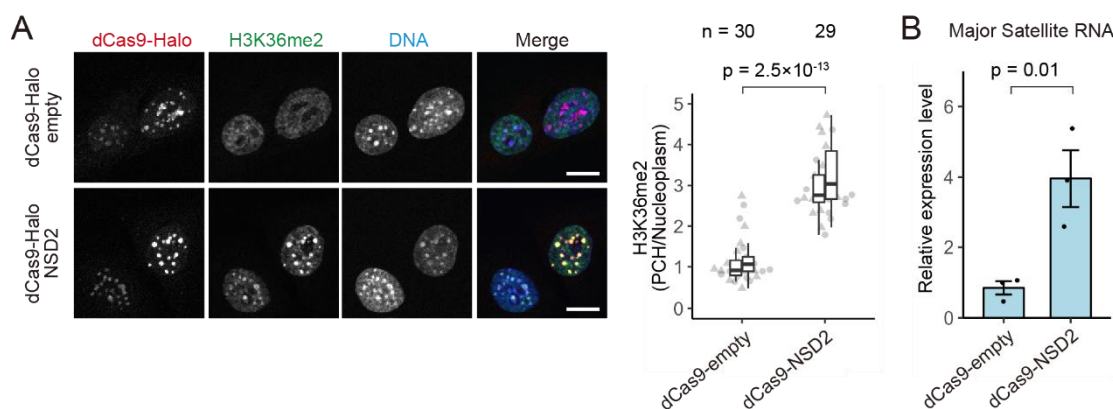


図 44 dCas9-Halo-NSD2 による H3K36me2 の PCH 局在率と MajSat 転写量の変化
(A) MajSat を標的する gRNA と共に、dCas9-Halo-empty (左上) または dCas9-Halo-NSD2 (左下) を安定発現する Pmi28 を固定し、JF646 Halo タグリガンド (赤)、H3K36me2 抗体 (緑)、Hoechst33342 (青) で染色した。共焦点顕微鏡像の単一 Z スライスから、各細胞における H3K36me2 の PCH 局在率を定量した (右)。ここでの箱ひげ図の詳細は図 13 の凡例を参照。(B) (A) の各細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR によって MajSat 転写量を定量した。ここで、各点は 3 回の生物学的反復実験の値を示し、それらの平均値は箱ひげ図の上辺として、標準偏差はエラーバーとして描画した。p 値は Student の t 検定により算出した。スケールバーは 10 μ m。

5.1.2 H3K36me2 制御因子 KO 細胞での MajSat 転写量比較

5.1.1 の結果をさらに検討するため、4 章で作製した NSD2、SMARCA5、BAZ1B-KO 細胞で MajSat と MinSat の転写量を定量した（図 45）。野生型と比較して、NSD2-KO iMEF において MajSat 転写は低下し、MinSat 転写は変化しなかった。これは 5.1.1 の結果と矛盾しない。一方、SMARCA5 および BAZ1B-KO iMEF では、MajSat 転写が増大し、MinSat 転写にも有意な増減が見られた。

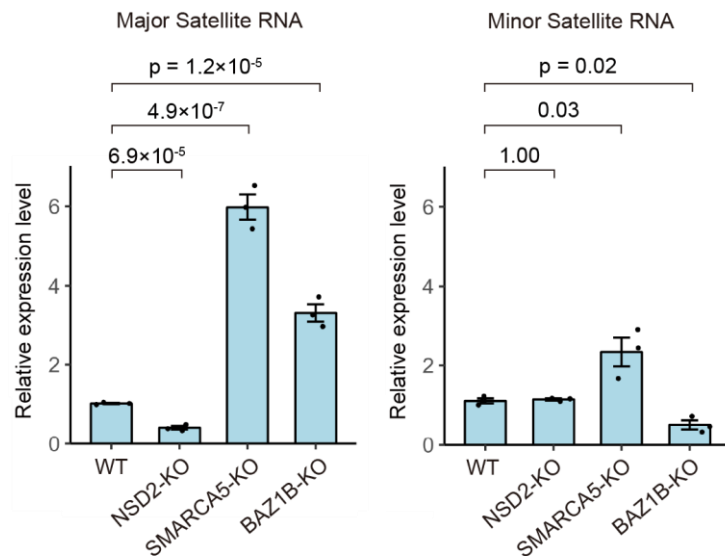


図 45 PCH H3K36me2 制御因子 KO 細胞における MajSat と MinSat 転写量
野生型 (WT) および NSD2、SMARCA5、BAZ1B-KO iMEF 細胞から RNA を抽出し、RT-qPCR によって MajSat (左) と MinSat (右) の転写量を定量した。箱ひげ図の詳細は図 44B の凡例を参照。p 値は WT を基準とし、マン・ホイットニーの U 検定と Hommel 補正を用いて計算した。

5.2 マウス生体における H3K36me2 の核内分布観察

5.2.1 マウス成熟組織の H3K36me2 の核内分布観察

PCH の H3K36me2 の生理的意義を調べる一環として、H3K36me2 がマウス生体の PCH にも局在し得るかどうかを調べた。**4.6.1** および **4.6.2** より、H3K36me2 の PCH 分布には制御因子の高発現が関わることを示唆されたため、NSD2、SMARCA5、BAZ1B、BAZ2A のうち少なくとも 2 つのタンパク質を高発現するマウス組織を公共データベースで探索した (Palasca et al., 2018)。該当した脾臓、肺、精巣、肝臓、脳を成体マウスから摘出し、組織切片を免疫染色したが、いずれの組織においても H3K36me2 は PCH に分布しなかった (図 46)。

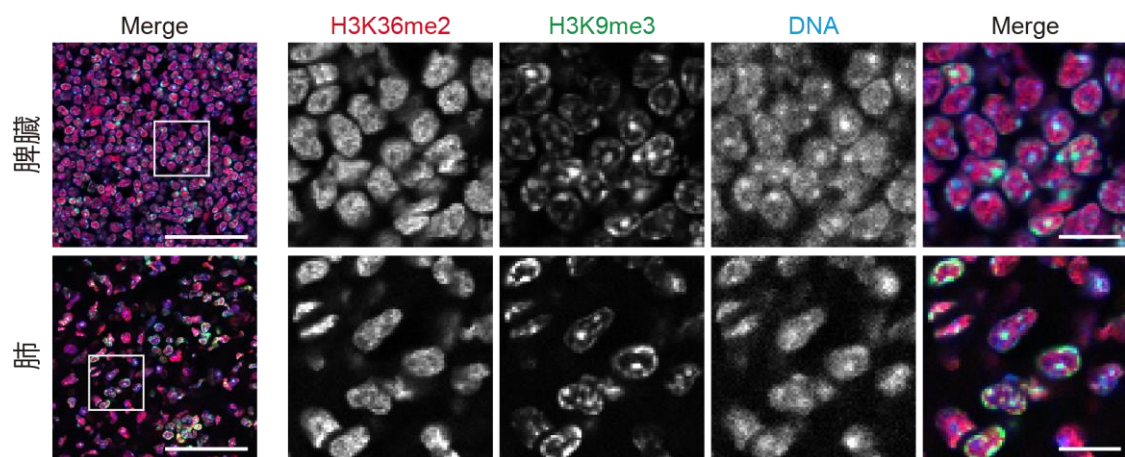


図 46 マウス生体組織の H3K36me2 分布

マウス脾臓（上）と肺（下）の免疫染色画像。それぞれの組織切片を H3K36me2 抗体（赤）、H3K9me3 抗体（緑）および Hoechst33342（青）で染色した。共焦点顕微鏡画像の単一 Z スライスを示す。左に Merge の低倍率図（スケールバーは 50 μm ）を示し、その画像上の四角で囲んだ領域の拡大図（スケールバーは 10 μm ）を右に示す。

5.2.2 マウス 13.5 日胚の H3K36me2 の核内分布観察

次に、発生段階がより早期のマウス 13.5 日胚を免疫染色した。しかしながら、どの組織、部位においても H3K36me2 の PCH 局在は確認できなかった（図 47）。

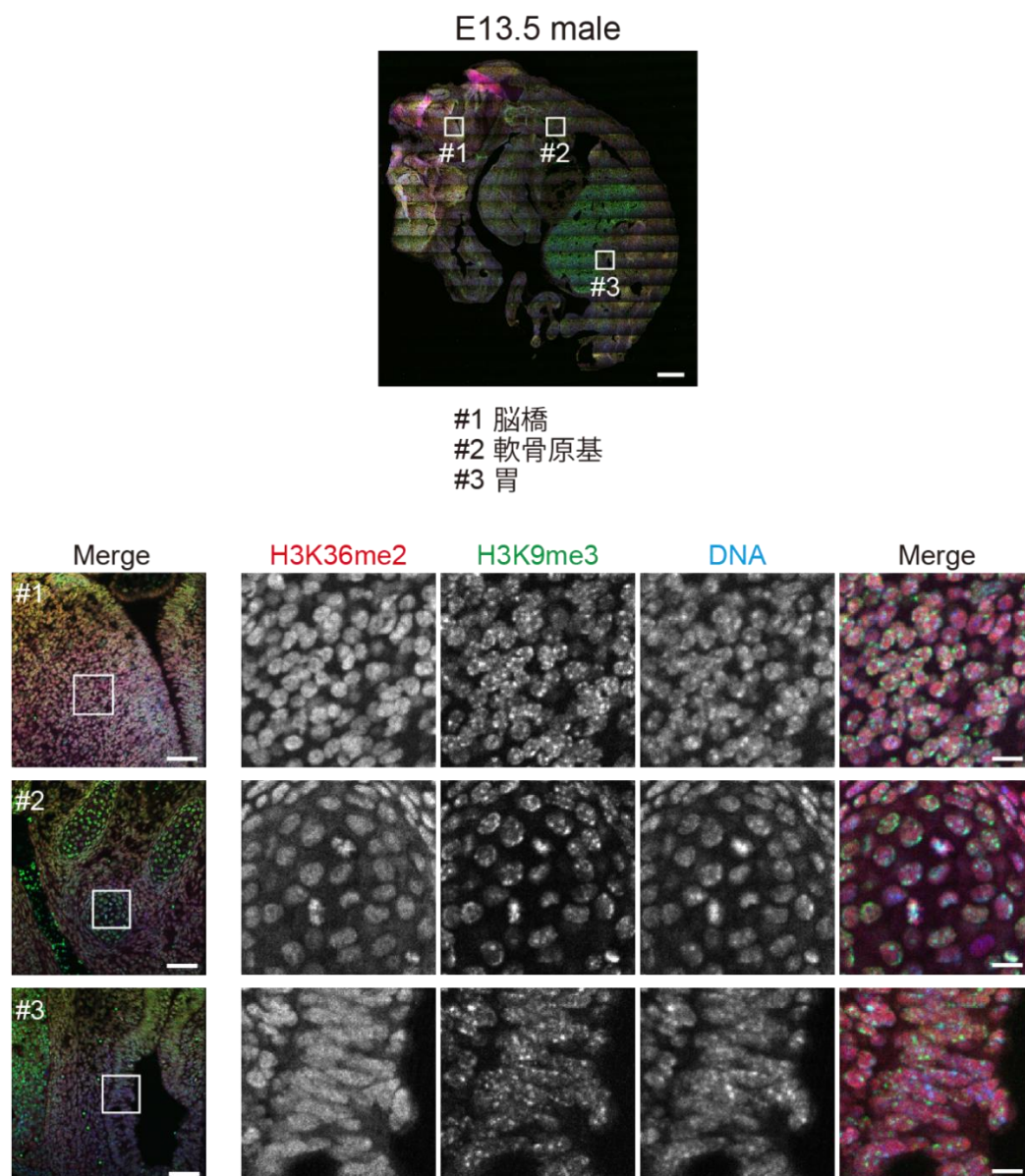


図 47 マウス 13.5 日胚の H3K36me2 分布

マウス 13.5 日胚の免疫染色画像。胚切片を H3K36me2 抗体（赤）、H3K9me3 抗体（緑）および Hoechst33342（青）で染色した。CSU-W1 共焦点顕微鏡画像の単一 Z スライスを示す。胚全体の画像を上を示す（スケールバーは 500 μm ）。脳橋（#1）、軟骨原基（#2）、胃（#3）の拡大図（スケールバーは 50 μm ）を左に、その拡大図上の四角で囲んだ領域の拡大画像（スケールバーは 10 μm ）を右に示す。

5.3 小括

本章では PCH に局在する H3K36me2 の生理的意義を検討した。

5.1.1 と **5.1.2** では、H3K36me2 が MajSat 転写に及ぼす影響を調べた。dCas9-Halo-NSD2 によって PCH 特異的に H3K36me2 を誘導した Pmi28 では MajSat 転写は増大し、NSD2-KO によって PCH H3K36me2 が低下した iMEF では MajSat 転写は減少した。このことから、PCH 上の H3K36me2 は MajSat 転写の活性化に寄与することが示唆された。しかし、SMARCA5 および BAZ1B-KO iMEF では、NSD2-KO と同様に PCH H3K36me2 が低下するにも関わらず、MajSat 転写は増大し、MinSat 転写にも有意な変化が見られた。クロマチンリモデリング因子は広範な遺伝子発現制御に関わることを考慮すると、それらの KO 細胞を用いた実験系よりも、dCas9 実験系で得られた結果の方が、より直接的に H3K36me2 の機能を評価できると思われる。なお、先行研究においても MajSat 転写に対する H3K36me2 の効果は統一の見解に至っていない。マウスとヒト細胞で H3K36 脱メチル化酵素 KDM2A を欠損させると、MajSat の H3K36me2 レベルと転写量が増大する (Frescas et al., 2008)。これは **5.1.1** の結果と一致する。一方、H3K36 メチル化酵素 Set2 を欠損した酵母では、PCH を構成する dh リピートで H3K36me2 レベルが低下し、転写量が増大する (Suzuki et al., 2016)。また H3.3K36M を導入したショウジョウバエでも同様に、PCH の H3K36me2 レベルが低下し、転写量は増大する (Chaouch et al., 2021)。これらは H3K36me2 が PCH 転写の抑制に働くことを示唆しており、**5.1.2** の SMARCA5 および BAZ1B-KO iMEF の結果と一致する。この場合の H3K36me2 の機能は種によって異なる可能性もあるが、いずれにせよ、今後の研究の進展に期待される。

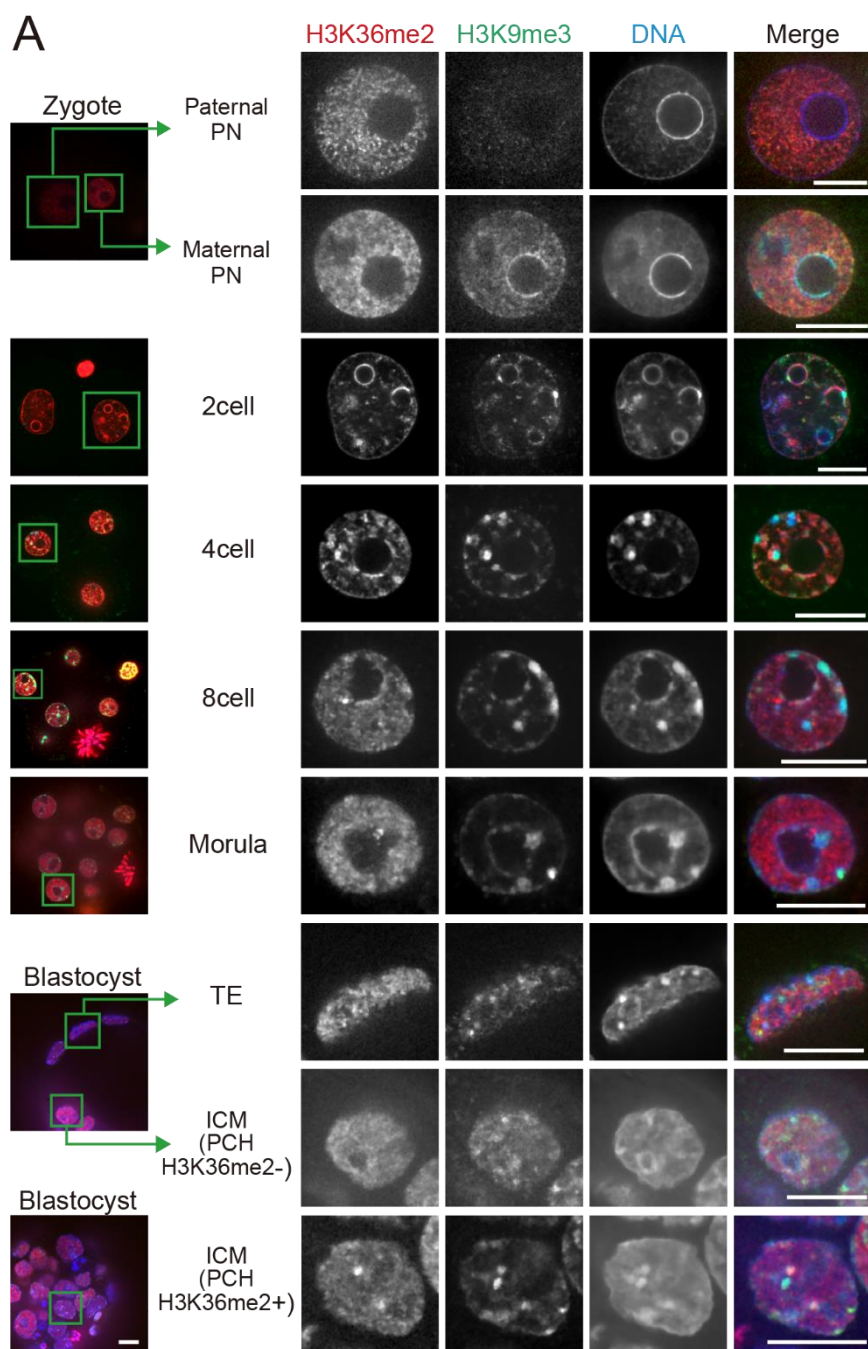
5.2.1 では免疫染色したマウス組織（脾臓、肺、精巣、肝臓、脳）を観察したが、H3K36me2 が PCH に分布する組織は見つからなかった。**4.6.1** および **4.6.2** より、培養細胞の PCH H3K36me2 は制御因子の発現量に依存していたものの、組織ではその関係は必ずしも当てはまらないと考えられる。例えば NSD2 と SMARCA5 が高発現だったとしても、BAZ1B や BAZ2A 以外の ISWI 複合体アクセサリ因子の発現が強いと、H3K36me2 は PCH に導入されない可能性がある。すなわち、制御因子自体の発現量だけでなく、その他の相互作用因子も含めた発現バランスによっても H3K36me2 分布は左右されると思われる。なお、脾臓、肺、精巣、肝臓、脳以外は観察していないため、H3K36me2 が PCH に分布する組織が存在する可能性は残されている。

5.2.2 ではマウス 13.5 日胚を免疫染色し観察した。組織免染時のアプローチとは異なり、PCH H3K36me2 の制御因子の発現量によらず、胚全体をくまなく観察したが、H3K36me2 の PCH 局在は見つからなかった。

5.4 補遺

3.1.1 から、ES は PCH に H3K36me2 が分布する細胞であった。そこで、ES 細胞の由来となるマウス着床前胚は PCH H3K36me2 を呈するのではないかと考え、近畿大学・山縣一夫教授、壽系和真さん（山縣研・学士課程学生）、米澤直央さん（同・修士課程学生）に着床前胚の免疫染色と観察を行っていただいた。ここでその結果をまとめる。

受精卵から 2 細胞期にかけては、PCH は核小体前駆ボディ（nucleolus-precursor-body; NPB）の周囲にリング状に分布し、その後、胚盤胞期までにクロモセンターを形成することが知られている（Aguirre-Lavin et al., 2012）。受精卵の父方および母方の前核では H3K36me2 は PCH に分布しなかったが、2 細胞期と 4 細胞期では H3K36me2 は部分的に NPB 周辺の PCH とクロモセンターに集積した（図 48A）。これはラインプロファイル解析からも明らかだった（図 48B）。



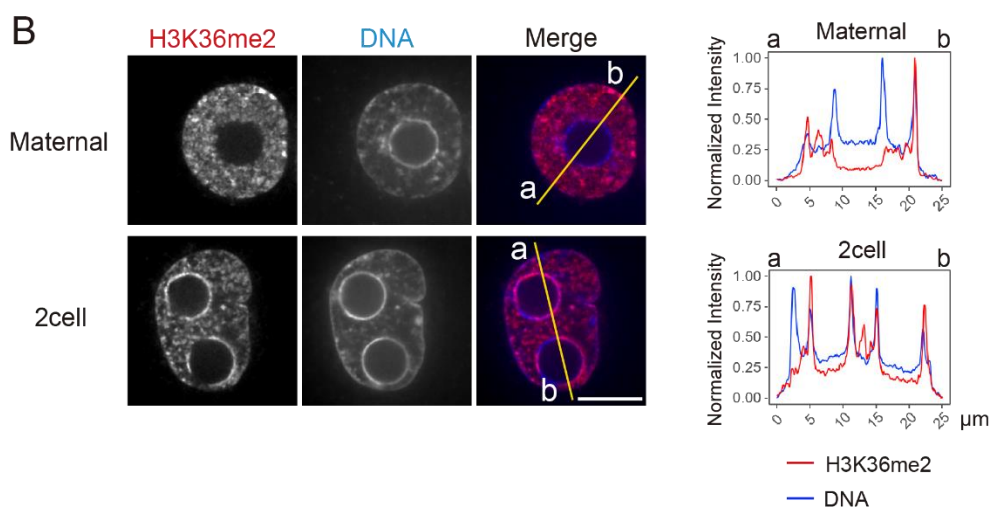


図 48 マウス着床前胚の各ステージにおける H3K36me2 分布

マウス着床前胚の H3K36me2 免疫染色画像。各発生段階の胚を固定し、H3K36me2 抗体（赤）、H3K9me3 抗体（緑）、Hoechst33342（青）で染色した。CSU-W1 SoRa 共焦点顕微鏡画像の単一 Z スライスを示す。(A) 左には低倍率の Merge 画像を示し、その画像上の四角で囲んだ領域の拡大図を右に示す。PN は前核、TE は栄養外胚葉、ICM は内部細胞塊を意味する。(B) 母方前核と 2 細胞期核の免疫染色画像。右のラインプロファイルは、Merge 画像の黄線に沿った H3K36me2 と DNA の蛍光輝度を示す。スケールバーは 10 μm 。

また個々の核について共局在解析すると、他のステージと比較して、2細胞期と4細胞期の H3K36me2 は DNA と高い相関を示した (図 49)。

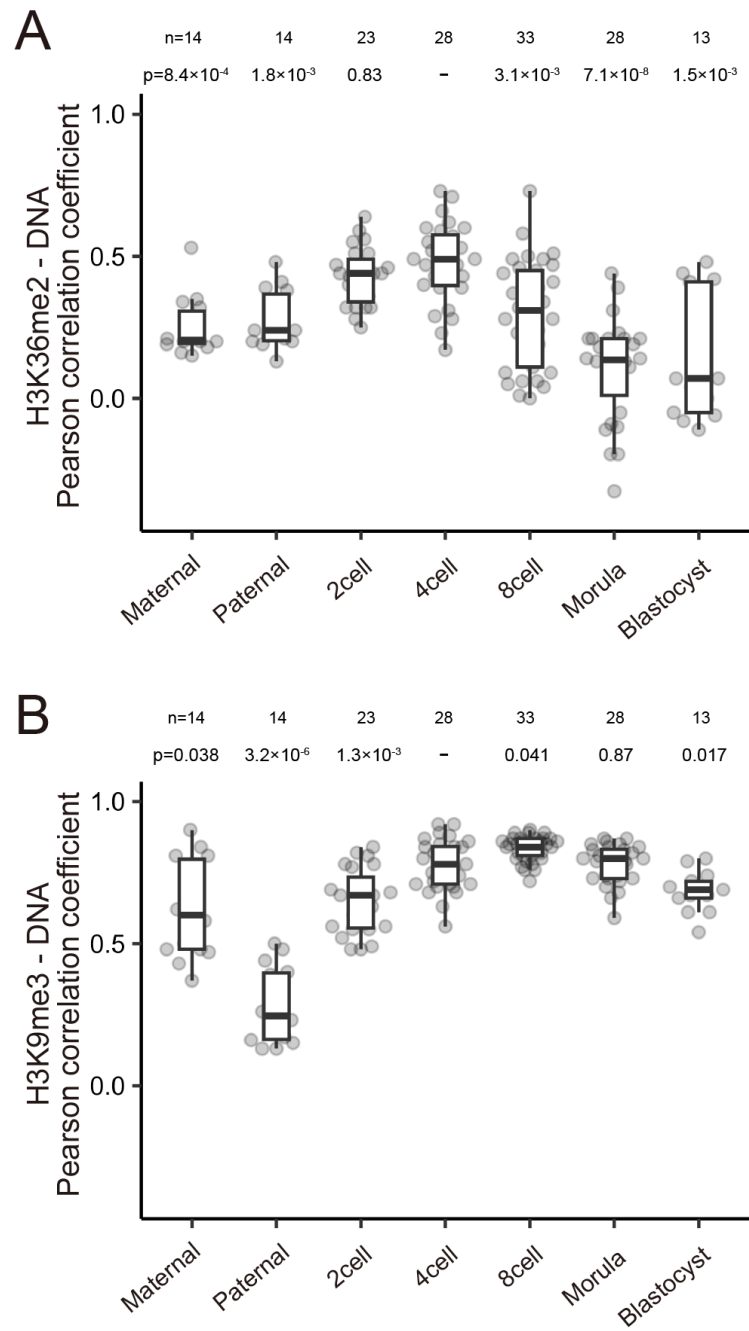


図 49 マウス着床前胚の DNA と H3K36me2 または H3K9me3 のピアソン相関
各発生段階の DNA と H3K36me2 (A) または H3K9me3 (B) のピアソン相関係数。
n は定量した核の数を示す。p 値は 4 細胞期胚を基準とした Mann-Whitney U 検定と
Hommel 補正により算出した。箱ひげ図の詳細については、図 13 の凡例を参照。

さらに発生が進んだ桑実胚期と胚盤胞期では、ほとんどの細胞で H3K36me2 はユークロマチンに分布したが、ES の起源となる胚盤胞期内部細胞塊では、少数の細胞で H3K36me2 が PCH に局在した (図 48A)。これらの結果は、H3K36me2 が生体の限られた発生段階で PCH に集積され得ることを示唆する。哺乳類の着床前胚発生過程では、ヘテロクロマチンは転写されながら動的に再編成される。今回見出した H3K36me2 の PCH 局在は、これらの過程に関与する可能性がある。

ただし、NSD2-KO マウスは初期胚で発生停止することなく出生に至ること (Nimura et al., 2009)、RNA-seq データベース DBTMEE (<http://dbtmee.hgc.jp/>; Park et al., 2015) を用いた解析から、PCH H3K36me2 制御因子の発現量は、2-4 細胞期で特段高くないことを考慮すると (図 50)、この時期の PCH H3K36me2 は別の分子経路で制御される可能性がある。

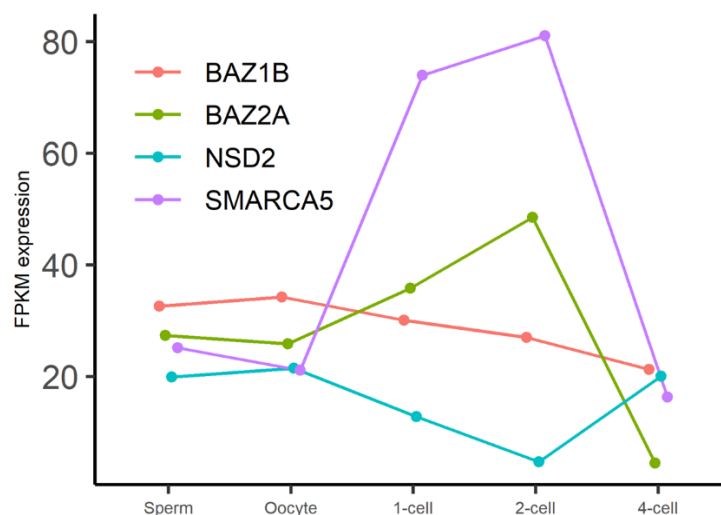


図 50 マウス生殖細胞および着床前胚における PCH H3K36me2 制御因子の発現量 RNA-seq データベース DBTMEE (Park et al., 2015) を用いて、各発生段階における BAZ1B、BAZ2A、NSD2、SMARCA5 の発現量を解析した。

6 章 考察と展望

PCH ヒストン修飾の新たな制御経路

本研究では、共焦点顕微鏡で観察可能な PCH 局在ヒストン修飾として、新たに H3K36me2 を発見した。そして H3K36me2 の PCH 局在化メカニズムとして、BAZ1B—SMARCA5—NSD2 経路を明らかにした。この経路は、これまで報告された PCH 上のヒストン修飾を制御する経路と異なり (Peters et al., 2003; Ooga et al., 2008; Lange et al., 2013; Jack et al., 2013)、H3K9me3 および DNA メチル化を標的 (=経路の出発点) としない。本経路の標的は PCH に豊富に含まれる AT-DNA であり、BAZ1B の AT-hook 様モチーフが DNA を直接認識することで、SMARCA5、NSD2、そして H3K36me2 が PCH に誘導される。

ヒストン修飾酵素とクロマチンリモデリング複合体の相互作用は、これまでのところ、ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC—NuRD 複合体を除けば (Allen et al., 2013)、ほとんど報告がない。その点においても、NSD2-ISWI 複合体の直接結合と機能を明らかにした本研究の新規性は高い。なお、NSD2 インタラクトームを解析した論文によれば (Huang et al., 2019)、NSD2 は CHD 複合体のコアサブユニットである CHD4 や、ATPase ドメインをもつ ATRX とも相互作用し得る。これは、NSD2 が様々なクロマチンリモデリング因子と共役し、転写や複製といったクロマチン・コンテキストに応じた機能を発揮することを示唆する。

本研究では BAZ1B だけでなく、BAZ1A、BAZ2A の機能性も検討した。BAZ1A は BAZ1B とよく似たドメイン構造を持ち、培養系では NIH3T3 で (Collins et al., 2002)、組織では精子形成過程の Diplotene 期で PCH に局在する (Dowdle et al., 2013)。しかし、本研究ではいずれの培養細胞でも BAZ1A の PCH 局在を確認できなかった。一方、BAZ2A は PCH に局在し、Pmi28 で過剰発現させると BAZ1B と同様に PCH H3K36me2 を誘導できた。これは、典型的な AT-hook モチーフを持つ BAZ2A が (Chen et al., 2021; Filarsky et al., 2015)、BAZ1B と機能重複することを示唆する。予想に反し、iMEF で BAZ2A を KD しても PCH H3K36me2 レベルは低下しなかったが、BAZ1B-KO iMEF の PCH H3K36me2 が極めて低レベルであることを考えると、iMEF では BAZ1B が優位に機能しているのかもしれない。本研究の過剰発現実験が示すように、PCH H3K36me2 は ISWI 複合体構成因子の発現量比に依存すること、BAZ1B・BAZ2A は AT-hook 様モチーフ・AT-hook モチーフだけでなく複数のドメインを有するため、標的クロマチンに対する親和性は変わり得ることは、両因子の機能重複性が細胞種・組織によって異なる可能性を示唆する。最近、マウス ES 細胞のヒストンメチル化酵素 DOT1L は SMARCA5 依存的に PCH に局在し、H3K79me3 を付加することが報告された (Malla et al., 2023)。この時の SMARCA5 の相互作用因

子は不明であるが、本研究をふまえると、BAZ1B または BAZ2A である可能性がある。そうであるならば AT-DNA を標的とする本経路は、様々なヒストン修飾酵素を PCH にリクルートするかもしれない。その全容解明は今後の研究に期待される。

AT リッチゲノム領域に分布する H3K36me2

ヘテロクロマチンの本来の定義は、「密度が高いクロマチン領域」である。一方で本研究が明らかとした BAZ1B—SMARCA5—NSD2 経路は、AT-DNA を標的とした。これは、H3K36me2 が局在するヘテロクロマチンの実態は、「AT が豊富なクロマチン」であることを示唆する。実際、このことは本研究の二つの実験結果から支持される。一つは免疫染色像で、H3K36me2 は H3K9me3（高密度クロマチンに分布するヒストン修飾）よりも Hoechst33342（AT-DNA の染色試薬）とより似たパターンを示した。二つ目は ChIP-seq 解析で、ES 細胞の H3K36me2 は LINE 配列（AT-DNA が豊富に含まれる）に強く集積した。ただし本研究では H3K36me2 とクロマチン密度の関係は検討していない。AT リッチ領域のクロマチン密度は概して高いため、H3K36me2 分布にとってクロマチンの高密度状態が必要である可能性は依然として残されており、その点は今後検討しなければならない。いずれにしても AT リッチ領域の H3K36me2 に関する報告はこれまでなく、本研究はその分子メカニズムとして BAZ1B—SMARCA5—NSD2 経路を初めて提案した。加えて、その機能的意義として MajSat 転写制御との関連を示した。今後の研究は、AT リッチゲノム上の H3K36me2 が持つ生理的な意義の解明をめざす必要がある。

PCH の DNA 複製に H3K36me2 が寄与する可能性

mintbody を用いたライブセルイメージングから、H3K36me2 はヘテロクロマチンが複製される S 期後期に強く PCH 分布することが分かった。これは以前報告された BAZ1B および SMARCA5（すなわち WICH 複合体）の細胞周期動態とよく似ており、このとき WICH 複合体は複製前後のクロマチン凝縮制御に関わることが示唆されている（Collins et al., 2002; Bozhenok et al., 2002; Poot et al., 2004）。さらに、複製ストレス下の複製フォークには、WICH 複合体に加え（Ribeyre et al., 2016）、H3K36me2 も動員される（Gaggioli et al., 2023）。本研究の BAZ1B-DNA 結合アッセイにおいて、BAZ1B の AT-hook 様モチーフがヌクレオソームよりも裸の DNA に強い親和性を示したことは、BAZ1B が開裂し裸の状態にある複製フォーク DNA に結合可能なことを支持する。NSD2 の細胞周期動態はよく分かっていないが、これらをふまえると、生理的条件下において BAZ1B—SMARCA5—NSD2 経路は S 期に働く可能性が高い。PCH 複製における H3K36me2 の理解を深めるためには、今後は H3K36me2-mintbody、蛍光タグ付き ISWI 複合体、NSD2 および PCNA を組み合わ

せた生細胞観察に加え、bromodeoxyuridine (BrdU)や 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)ラベルを用いた新生 DNA 解析が必要となるだろう。

ところで、少なくとも本研究結果からは、H3K36me2 がヘテロクロマチンあるいはユークロマチンに分布することの違いを、細胞種や細胞の分化段階によって説明することはできなかった。しかし興味深いことに、H3K36me2 が PCH に局在する 3 つの細胞種 (NIH3T3、iMEF、ES) は、細胞増殖速度が速いという点で共通している。H3K36me2 が PCH の DNA 複製に関わるならば、それは細胞の増殖速度とも関係しているかもしれない。

着床前胚のクロマチン制御に H3K36me2 が関与する可能性

本研究では PCH H3K36me2 の生理学的意義を明らかにするため、マウスの成熟組織、13.5 日胚、着床前胚を観察した。結果として、着床前胚の各ステージのうち、2 細胞期、4 細胞期、胚盤胞期の内部細胞塊 (ICM) において、H3K36me2 が PCH 局在する核を見つけた。ICM で PCH H3K36me2 を呈する核はごく一部だったものの、これは ES 細胞の PCH H3K36me2 が、培養細胞系だから生じるのではなく、in vivo の分布状態を反映していることを意味する。

マウス 2 細胞期には、接合体ゲノムの活性化 (Zygotic Genome Activation; ZGA) のほか、MajSat (Probst et al., 2010)、rRNA (Yu et al., 2021)、レトロトランスポゾン LINE (Jachowicz et al., 2017) および MERVL (Sakashita et al., 2023) から一過的かつ発生に必須な転写が起こる。同時期には PCH がリング状から球状 (すなわちクロモセンター) へ形態的に再編成されるが、その形態変化は MajSat の転写によって促進される (Casanova et al., 2013)。先行研究から、ほ乳類細胞では H3K36me2 が MajSat 転写を活性化することが示唆されており (Frescas et al., 2008)、本研究でもそれを支持する結果を得た。これらのことから、2 細胞期の PCH に強く分布する H3K36me2 は MajSat 転写を促進し、その結果、クロマチン再編成が起こる可能性が考えられる。なお、ブタ 2 細胞期胚でもリング状 PCH への H3K36me2 局在は観察されている (Diao et al., 2014)。したがって、着床前胚 PCH の H3K36me2 の機能は種間で保存されており、その重要性が示唆される。

「H3K36me2 は BAZ1B—SMARCA5—NSD2 経路によって、DNA メチル化・H3K9me3 非依存的に PCH 局在できる」という本研究の提案は、「生殖細胞あるいは接合体において、H3K36me2/3 は他のエピジェネティック修飾分布を制御する」ことを示した先行研究とよく整合する。マウスの卵形成 (Yano et al., 2022) および精子形成 (Shirane et al., 2020) 過程で起こる DNA メチル化の確立は、H3K36me2/3 を足場に要し、それは受精後の接合体エピゲノムに受け継がれる (Xu et al., 2019)。PCH 上の DNA メチル化も H3K36me2/3 依存的に制御されるかもしれない。また

H3K36me2/3 は H3K27me3 と拮抗的に分布し、H3K27me3 の偏った蓄積をふせいでいる。実際、SETD2 欠失によって H3K36me3 が低下した卵細胞では H3K27me3 が異常沈着し、発生が停止する (Xu et al., 2019)。この拮抗分布はブタとウシの着床前胚でも保存されていることから、初期胚発生における重要性が示唆される (Cao et al., 2015; Lu et al., 2021)。H3K9me3 が失われたゲノム領域には H3K27me3 が侵入することから (Fukuda et al., 2023)、H3K36me2 の一過的な PCH 蓄積は、接合体で H3K9me3 の分布が確立する前に、H3K27me3 が PCH へ侵入することをふせぐ役割を持つ可能性がある。胚発生における PCH H3K36me2 の意義の理解が今後の課題である。

ヒストン修飾の多面性—H3K36me2 を例として

H3K36 メチル化は、やや奇妙なヒストン修飾である。最も機能解析が進む H3K36me3 は、転写中の遺伝子ボディにあって、そこで生じる異所的転写を抑制する (Carrozza et al., 2005; Neri et al., 2017)。ペリセントロメア上の H3K36me2 は、酵母とハエでは転写抑制に (Suzuki et al., 2016; Chaouch et al., 2021)、哺乳類では転写活性化に働く (Frescas et al., 2008)。さらに H3K36me2 は、遺伝子間領域にも見出される (Weinberg et al., 2019)。あるヒストン修飾は、ヘテロクロマチンかユークロマチンのどちらかにのみ分布し、前者では転写の抑制に、後者では転写の活性化に寄与する—H3K36 メチル化は、分布という観点でも、機能という観点でも、そのような通説に当てはまらない「多面性」を備えているらしい。

本研究の重要性の一つは、哺乳類細胞のクロモセーター（蛍光顕微鏡で観察可能なヘテロクロマチン・クラスター）に H3K36me2 が集積することを発見し、本修飾が比較的マクロな解像度においても「分布的多面性」を持つことを示した点にある。今後は顕微鏡観察によって、H3K36me2 の動態と機能の理解が深まるだろう。本研究のもう一つの、そしてより重要な点は、H3K36me2 のヘテロクロマチン分布が達成される分子機構を解明したことである。哺乳類には多様な H3K36 メチル化酵素が保存されており、それぞれ異なるゲノム領域を支配する (Huang et al., 2018)。これは他のヒストン修飾でも同様である。しかし各酵素が特定の領域に動員される仕組みはほとんど明らかになっていない。ゆえに本研究成果は、H3K36 メチル化、ひいてはヒストン修飾研究に対し大きなインパクトを与える。

翻って今後は、ユークロマチン型 H3K36me2 にも目を向ける必要がある。ユークロマチン、具体的には遺伝子領域・遺伝子間領域の H3K36me2 を制御する分子経路は何か。ヘテロクロマチン、ユークロマチンの H3K36me2 は互いにどのような関係にあるのか。相互に影響し合うのか、独立しているのか。加えて、H3K36me2 の「機能的多面性」の理解も肝要である。例えば転写に着目した時、ヘテロクロマチンあるいはユ

一クロマチンに分布する H3K36me2 に機能的ちがいはあるのか。両クロマチンでは、H3K36me2 をとり巻くクロマチン環境は、明らかに異なる。他のエピジェネティック修飾や生体分子とのクロストークを通じて、H3K36me2 はどのような機能を発揮するのか。これらを明らかにして初めて、H3K36 メチル化の分布的・機能的多面性を包括的に議論することが可能となるだろう。

引用文献

- Abe, K., N. Takagi, and M. Sasaki. 1988. Nonhistone nuclear proteins specific to certain mouse embryonal carcinoma clones having an inactive X chromosome. *Exp. Cell Res.* 179:590–594. doi:10.1016/0014-4827(88)90297-2.
- Aguirre-Lavin, T., P. Adenot, A. Bonnet-Garnier, G. Lehmann, R. Fleurot, C. Boulesteix, P. Debey, and N. Beaujean. 2012. 3D-FISH analysis of embryonic nuclei in mouse highlights several abrupt changes of nuclear organization during preimplantation development. *BMC Dev. Biol.* 12:30. doi:10.1186/1471-213X-12-30.
- Allen, H.F., P.A. Wade, and T.G. Kutateladze. 2013. The NuRD architecture. *Cell. Mol. Life Sci.* 70:3513–3524. doi:10.1007/s00018-012-1256-2.
- Allshire, R.C., and H.D. Madhani. 2018. Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19:229–244. doi:10.1038/nrm.2017.119.
- Altomose, N., G.A. Logsdon, A. V. Bzikadze, P. Sidhwani, S.A. Langley, G. V. Caldas, S.J. Hoyt, L. Uralsky, F.D. Ryabov, C.J. Shew, M.E.G. Sauria, M. Borchers, A. Gershman, A. Mikheenko, V.A. Shepelev, T. Dvorkina, O. Kunyavskaya, M.R. Vollger, A. Rhie, A.M. McCartney, M. Asri, R. Lorig-Roach, K. Shafin, J.K. Lucas, S. Aganezov, D. Olson, L.G. de Lima, T. Potapova, G.A. Hartley, M. Haukness, P. Kerpedjiev, F. Gusev, K. Tigyi, S. Brooks, A. Young, S. Nurk, S. Koren, S.R. Salama, B. Paten, E.I. Rogaev, A. Streets, G.H. Karpen, A.F. Dernburg, B.A. Sullivan, A.F. Straight, T.J. Wheeler, J.L. Gerton, E.E. Eichler, A.M. Phillippy, W. Timp, M.Y. Dennis, R.J. O'Neill, J.M. Zook, M.C. Schatz, P.A. Pevzner, M. Diekhans, C.H. Langley, I.A. Alexandrov, and K.H. Miga. 2022. Complete genomic and epigenetic maps of human centromeres. *Science*. 376:eabl4178. doi:10.1126/science.abl4178.
- Anton, T., S. Bultmann, H. Leonhardt, and Y. Markaki. 2014. Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*. 5:163–172. doi:10.4161/nucl.28488.
- Aravind, L., and D. Landsman. 1998. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 26:4413–4421. doi:10.1093/nar/26.19.4413.

- Aydin, Ö.Z., J.A. Marteiijn, C. Ribeiro-Silva, A. Rodríguez López, N. Wijgers, G. Smeenk, H. Van Attikum, R.A. Poot, W. Vermeulen, and H. Lans. 2014. Human ISWI complexes are targeted by SMARCA5 ATPase and SLIDE domains to help resolve lesion-stalled transcription. *Nucleic Acids Res.* 42:8473–8485. doi:10.1093/nar/gku565.
- Barral, A., G. Pozo, L. Ducrot, G.L. Papadopoulos, S. Sauzet, A.J. Oldfield, G. Cavalli, and J. Déjardin. 2022. SETDB1/NSD-dependent H3K9me3/H3K36me3 dual heterochromatin maintains gene expression profiles by bookmarking poised enhancers. *Mol. Cell.* 82:816–832.e12. doi:10.1016/j.molcel.2021.12.037.
- Bartholomew, B. 2014. ISWI chromatin remodeling: One primary actor or a coordinated effort? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24:150–155. doi:10.1016/j.sbi.2014.01.010.
- Bennett, R.L., A. Swaroop, C. Troche, and J.D. Licht. 2017. The role of nuclear receptor-binding SET domain family histone lysine methyltransferases in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7:a026708. doi:10.1101/cshperspect.a026708.
- Bernstein, B.E., T.S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D.J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S.L. Schreiber, and E.S. Lander. 2006. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell.* 125:315–326. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041.
- Bickmore, W.A., and B. Van Steensel. 2013. Genome architecture: Domain organization of interphase chromosomes. *Cell.* 152:1270–1284. doi:10.1016/j.cell.2013.02.001.
- Boehning, M., C. Dugast-Darzacq, M. Rankovic, A.S. Hansen, T. Yu, H. Marie-Nelly, D.T. McSwiggen, G. Kokic, G.M. Dailey, P. Cramer, X. Darzacq, and M. Zweckstetter. 2018. RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25:833–840. doi:10.1038/s41594-018-0112-y.
- Boija, A., I.A. Klein, B.R. Sabari, A. Dall’Agnese, E.L. Coffey, A. V. Zamudio, C.H. Li, K. Shrinivas, J.C. Manteiga, N.M. Hannett, B.J. Abraham, L.K. Afeyan, Y.E. Guo, J.K. Rimel, C.B. Fant, J. Schuijers, T.I. Lee, D.J. Taatjes, and R.A. Young. 2018. Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell.* 175:1842–1855.e16. doi:10.1016/j.cell.2018.10.042.
- Borgel, J., M. Tyl, K. Schiller, Z. Pusztai, C.M. Dooley, W. Deng, C. Wooding, R.J. White, T. Warnecke, H. Leonhardt, E.M. Busch-Nentwich, and T. Bartke. 2017. KDM2A integrates

- DNA and histone modification signals through a CXXC/PHD module and direct interaction with HP1. *Nucleic Acids Res.* 45:1114–1129. doi:10.1093/nar/gkw979.
- Bozhenok, L., P.A. Wade, and P. Varga-Weisz. 2002. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J.* 21:2231–2241. doi:10.1093/emboj/21.9.2231.
- Bressan, R.B., B. Southgate, K.M. Ferguson, C. Blin, V. Grant, N. Alfazema, J.C. Wills, M.A. Marques-Torres, G.M. Morrison, J. Ashmore, F. Robertson, C.A.C. Williams, L. Bradley, A. von Kriegsheim, R.A. Anderson, S.R. Tomlinson, and S.M. Pollard. 2021. Regional identity of human neural stem cells determines oncogenic responses to histone H3.3 mutants. *Cell Stem Cell.* 28:877–893.e9. doi:10.1016/j.stem.2021.01.016.
- Brockdorff, N. 2013. Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *Rna.* 19:429–442. doi:10.1261/rna.037598.112.
- Brown, J.M., J. Green, R.P. Das Neves, H.A.C. Wallace, A.J.H. Smith, J. Hughes, N. Gray, S. Taylor, W.G. Wood, D.R. Higgs, F.J. Iborra, and V.J. Buckle. 2008. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J. Cell Biol.* 182:1083–1097. doi:10.1083/jcb.200803174.
- Camacho, O.V., C. Galan, K. Swist-Rosowska, R. Ching, M. Gamalinda, F. Karabiber, I. De La Rosa-Velazquez, B. Engist, B. Koschorz, N. Shukeir, M. Onishi-Seebacher, S. Van De Nobelen, and T. Jenuwein. 2017. Major satellite repeat RNA stabilize heterochromatin retention of Suv39h enzymes by RNA-nucleosome association and RNA:DNA hybrid formation. *Elife.* 6:e25293. doi:10.7554/eLife.25293.
- Cao, Z., Y. Li, Z. Chen, H. Wang, M. Zhang, N. Zhou, R. Wu, Y. Ling, F. Fang, N. Li, and Y. Zhang. 2015. Genome-wide dynamic profiling of histone methylation during nuclear transfer-mediated porcine somatic cell reprogramming. *PLoS One.* 10:e0144897. doi:10.1371/journal.pone.0144897.
- Carrozza, M.J., B. Li, L. Florens, T. Suganuma, S.K. Swanson, K.K. Lee, W.J. Shia, S. Anderson, J. Yates, M.P. Washburn, and J.L. Workman. 2005. Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell.* 123:581–592. doi:10.1016/j.cell.2005.10.023.

- Casanova, M., M. Pasternak, F. ElMarjou, P. LeBaccon, A. V. Probst, and G. Almouzni. 2013. Heterochromatin Reorganization during Early Mouse Development Requires a Single-Stranded Noncoding Transcript. *Cell Rep.* 4:1156–1167. doi:10.1016/j.celrep.2013.08.015.
- Chantalat, S., A. Depaux, P. Héry, S. Barral, J.Y. Thuret, S. Dimitrov, and M. Gérard. 2011. Histone H3 trimethylation at lysine 36 is associated with constitutive and facultative heterochromatin. *Genome Res.* 21:1426–1437. doi:10.1101/gr.118091.110.
- Chaouch, A., J. Berlandi, C.C.L. Chen, F. Frey, S. Badini, A.S. Harutyunyan, X. Chen, B. Krug, S. Hébert, A. Jeibmann, C. Lu, C.L. Kleinman, M. Hasselblatt, P. Lasko, M. Shirinian, and N. Jabado. 2021. Histone H3.3 K27M and K36M mutations de-repress transposable elements through perturbation of antagonistic chromatin marks. *Mol. Cell.* 81:4876-4890.e7. doi:10.1016/j.molcel.2021.10.008.
- Chen, E.S., K. Zhang, E. Nicolas, H.P. Cam, M. Zofall, and S.I.S. Grewal. 2008. Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly. *Nature.* 451:734–737. doi:10.1038/nature06561.
- Chen, H., B. Hu, C. Horth, E. Bareke, P. Rosenbaum, S.Y. Kwon, J. Sirois, D.N. Weinberg, F.M. Robison, B.A. Garcia, C. Lu, W.A. Pastor, and J. Majewski. 2022. H3K36 dimethylation shapes the epigenetic interaction landscape by directing repressive chromatin modifications in embryonic stem cells. *Genome Res.* 32:825–837. doi:10.1101/gr.276383.121.
- Chen, S., M. Zhou, A. Dong, P. Loppnau, M. Wang, J. Min, and K. Liu. 2021. Structural basis of the TAM domain of BAZ2A in binding to DNA or RNA independent of methylation status. *J. Biol. Chem.* 297:101351. doi:10.1016/j.jbc.2021.101351.
- Chen, Y., Y. Zhang, Y. Wang, L. Zhang, E.K. Brinkman, S.A. Adam, R. Goldman, B. Van Steensel, J. Ma, and A.S. Belmont. 2018. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *J. Cell Biol.* 217:4025–4048. doi:10.1083/jcb.201807108.
- Clapier, C.R., and B.R. Cairns. 2012. Regulation of ISWI involves inhibitory modules antagonized by nucleosomal epitopes. *Nature.* 492:280–284. doi:10.1038/nature11625.

- Clapier, C.R., J. Iwasa, B.R. Cairns, and C.L. Peterson. 2017. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18:407–422. doi:10.1038/nrm.2017.26.
- Collins, N., R.A. Poot, I. Kukimoto, C. García-Jiménez, G. Dellaire, and P.D. Varga-Weisz. 2002. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat. Genet.* 32:627–632. doi:10.1038/ng1046.
- Culver-Cochran, A.E., and B.P. Chadwick. 2012. The WSTF-ISWI Chromatin Remodeling Complex Transiently Associates with the Human Inactive X Chromosome during Late S-Phase Prior to BRCA1 and γ -H2AX. *PLoS One.* 7:e50023. doi:10.1371/journal.pone.0050023.
- Davidson, I.F., and J.M. Peters. 2021. Genome folding through loop extrusion by SMC complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22:445–464. doi:10.1038/s41580-021-00349-7.
- Diao, Y.F., R.K. Oqani, X.X. Li, T. Lin, J.W. Kang, and D. Il Jin. 2014. Changes in histone H3 lysine 36 methylation in porcine oocytes and preimplantation embryos. *PLoS One.* 9:e100205. doi:10.1371/journal.pone.0100205.
- Dion, M.F., S.J. Altschuler, L.F. Wu, and O.J. Rando. 2005. Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:5501–5506. doi:10.1073/pnas.0500136102.
- Dixon, J.R., S. Selvaraj, F. Yue, A. Kim, Y. Li, Y. Shen, M. Hu, J.S. Liu, and B. Ren. 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature.* 485:376–380. doi:10.1038/nature11082.
- Dowdle, J.A., M. Mehta, E.M. Kass, B.Q. Vuong, A. Inagaki, D. Egli, M. Jasin, and S. Keeney. 2013. Mouse BAZ1A (ACF1) Is Dispensable for Double-Strand Break Repair but Is Essential for Averting Improper Gene Expression during Spermatogenesis. *PLoS Genet.* 9:e1003945. doi:10.1371/journal.pgen.1003945.
- Fenstermaker, T.K., S. Petruk, S.K. Kovermann, H.W. Brock, and A. Mazo. 2023. RNA polymerase II associates with active genes during DNA replication. *Nature.* 620:426–433. doi:10.1038/s41586-023-06341-9.

- Filarsky, M., K. Zillner, I. Araya, A. Villar-Garea, R. Merkl, G. Längst, and A. Németh. 2015. The extended AT-hook is a novel RNA binding motif. *RNA Biol.* 12:864–876. doi:10.1080/15476286.2015.1060394.
- Frescas, D., D. Guardavaccaro, S.M. Kuchay, H. Kato, A. Poleshko, V. Basrur, K.S. Elenitoba-Johnson, R.A. Katz, and M. Pagano. 2008. KDM2A represses transcription of centromeric satellite repeats and maintains the heterochromatic state. *Cell Cycle.* 7:3539–3547. doi:10.4161/cc.7.22.7062.
- Fukuda, K., T. Shimi, C. Shimura, T. Ono, T. Suzuki, K. Onoue, S. Okayama, H. Miura, I. Hiratani, K. Ikeda, Y. Okada, N. Dohmae, S. Yonemura, A. Inoue, H. Kimura, and Y. Shinkai. 2023. Epigenetic plasticity safeguards heterochromatin configuration in mammals. *Nucleic Acids Res.* 51:6190–6207. doi:10.1093/nar/gkad387.
- Gaggioli, V., C.S.Y. Lo, N. Reverón-Gómez, Z. Jasencakova, H. Domenech, H. Nguyen, S. Sidoli, A. Tvardovskiy, S. Uruci, J.A. Slotman, Y. Chai, J.G.S.C.S. Gonçalves, E.M. Manolika, O.N. Jensen, D. Wheeler, S. Sridharan, S. Chakrabarty, J. Demmers, R. Kanaar, A. Groth, and N. Taneja. 2023. Dynamic de novo heterochromatin assembly and disassembly at replication forks ensures fork stability. *Nat. Cell Biol.* 25:1017–1032. doi:10.1038/s41556-023-01167-z.
- Gelbart, M.E., T. Rechsteiner, T.J. Richmond, and T. Tsukiyama. 2001. Interactions of Isw2 Chromatin Remodeling Complex with Nucleosomal Arrays: Analyses Using Recombinant Yeast Histones and Immobilized Templates. *Mol. Cell. Biol.* 21:2098–2106. doi:10.1128/mcb.21.6.2098-2106.2001.
- Georgescu, P.R., M. Capella, S. Fischer-Burkart, and S. Braun. 2020. The euchromatic histone mark H3K36me3 preserves heterochromatin through sequestration of an acetyltransferase complex in fission yeast. *Microb. Cell.* 7:80–92. doi:10.15698/mic2020.03.711.
- Greenberg, M.V.C., and D. Bourc'his. 2019. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20:590–607. doi:10.1038/s41580-019-0159-6.
- Guan, H., P. Wang, P. Zhang, C. Ruan, Y. Ou, B. Peng, X. Zheng, J. Lei, B. Li, C. Yan, and H. Li. 2023. Diverse modes of H3K36me3-guided nucleosomal deacetylation by Rpd3S. *Nature.* 620:669–675. doi:10.1038/s41586-023-06349-1.

- Guettg, C., P. Lienemann, V. Sirri, I. Grummt, D. Hernandez-Verdun, M.O. Hottiger, M. Fussenegger, and R. Santoro. 2010. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *EMBO J.* 29:2135–2146. doi:10.1038/emboj.2010.17.
- Hasan, N., and N. Ahuja. 2019. The emerging roles of atp-dependent chromatin remodeling complexes in pancreatic cancer. *Cancers.* 11:1859. doi.org/10.3390/cancers11121859.
- Hayashi-Takanaka, Y., Y. Kina, F. Nakamura, L.E. Becking, Y. Nakao, T. Nagase, N. Nozaki, and H. Kimura. 2020. Histone modification dynamics as revealed by multicolor immunofluorescence-based single-cell analysis. *J. Cell Sci.* 133. doi:10.1242/jcs.243444.
- Hayashi-Takanaka, Y., K. Yamagata, N. Nozaki, and H. Kimura. 2009. Visualizing histone modifications in living cells: Spatiotemporal dynamics of H3 phosphorylation during interphase. *J. Cell Biol.* 187:781–790. doi:10.1083/jcb.200904137.
- Hayashi-Takanaka, Y., K. Yamagata, T. Wakayama, T.J. Stasevich, T. Kainuma, T. Tsurimoto, M. Tachibana, Y. Shinkai, H. Kurumizaka, N. Nozaki, and H. Kimura. 2011. Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Res.* 39:6475–6488. doi:10.1093/nar/gkr343.
- Hiragami-Hamada, K., S. Soeroes, M. Nikolov, B. Wilkins, S. Kreuz, C. Chen, I.A. De La Rosa-Velázquez, H.M. Zenn, N. Kost, W. Pohl, A. Chernev, D. Schwarzer, T. Jenuwein, M. Lorincz, B. Zimmermann, P.J. Walla, H. Neumann, T. Baubec, H. Urlaub, and W. Fischle. 2016. Dynamic and flexible H3K9me3 bridging via HP1 β dimerization establishes a plastic state of condensed chromatin. *Nat. Commun.* 7:11310. doi:10.1038/ncomms11310.
- Huang, C., and B. Zhu. 2018. Roles of H3K36-specific histone methyltransferases in transcription: antagonizing silencing and safeguarding transcription fidelity. *Biophys. Reports.* 4:170–177. doi:10.1007/s41048-018-0063-1.
- Huang, H., H. Weng, K. Zhou, T. Wu, B.S. Zhao, M. Sun, Z. Chen, X. Deng, G. Xiao, F. Auer, L. Klemm, H. Wu, Z. Zuo, X. Qin, Y. Dong, Y. Zhou, H. Qin, S. Tao, J. Du, J. Liu, Z. Lu, H. Yin, A. Mesquita, C.L. Yuan, Y.C. Hu, W. Sun, R. Su, L. Dong, C. Shen, C. Li, Y. Qing, X. Jiang, X. Wu, M. Sun, J.L. Guan, L. Qu, M. Wei, M. Müschen, G. Huang, C. He, J. Yang, and J. Chen. 2019. Histone H3 trimethylation at lysine 36 guides m6A RNA modification co-transcriptionally. *Nature.* 567:414–419. doi:10.1038/s41586-019-1016-7.

- Huang, X., R.D. LeDuc, L. Fornelli, A.J. Schunter, R.L. Bennett, N.L. Kelleher, and J.D. Licht. 2019. Defining the NSD2 interactome: PARP1 PARylation reduces NSD2 histone methyltransferase activity and impedes chromatin binding. *J. Biol. Chem.* 294:12459–12471. doi:10.1074/jbc.RA118.006159.
- Ito, T., M.E. Levenstein, D. V. Fyodorov, A.K. Kutach, R. Kobayashi, and J.T. Kadonaga. 1999. ACF consists of two subunits, Acf1 and ISWI, that function cooperatively in the ATP-dependent catalysis of chromatin assembly. *Genes Dev.* 13:1529–1539. doi:10.1101/gad.13.12.1529.
- Jachowicz, J.W., X. Bing, J. Pontabry, A. Bošković, O.J. Rando, and M.E. Torres-Padilla. 2017. LINE-1 activation after fertilization regulates global chromatin accessibility in the early mouse embryo. *Nat. Genet.* 49:1502–1510. doi:10.1038/ng.3945.
- Jack, A.P.M., S. Bussemer, M. Hahn, S. Pünzeler, M. Snyder, M. Wells, G. Csankovszki, I. Solovei, G. Schotta, and S.B. Hake. 2013. H3K56me3 Is a Novel, Conserved Heterochromatic Mark That Largely but Not Completely Overlaps with H3K9me3 in Both Regulation and Localization. *PLoS One.* 8:e51765. doi:10.1371/journal.pone.0051765.
- Janssen, A., S.U. Colmenares, and G.H. Karpen. 2018. Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34:265–288. doi:10.1146/annurev-cellbio-100617-062653.
- Jerković, I., and G. Cavalli. 2021. Understanding 3D genome organization by multidisciplinary methods. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22:511–528. doi:10.1038/s41580-021-00362-w.
- Johnson, W.L., W.T. Yewdell, J.C. Bell, S.M. McNulty, Z. Duda, R.J. O'Neill, B.A. Sullivan, and A.F. Straight. 2017. RNA-dependent stabilization of SUV39H1 at constitutive heterochromatin. *Elife.* 6:e25299. doi:10.7554/elife.25299.
- Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S.A.A. Kohl, A.J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A.W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, and D. Hassabis. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 596:583–589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2.

- Kieffer-Kwon, K.R., Z. Tang, E. Mathe, J. Qian, M.H. Sung, G. Li, W. Resch, S. Baek, N. Pruett, L. Grøntved, L. Vian, S. Nelson, H. Zare, O. Hakim, D. Reyon, A. Yamane, H. Nakahashi, A.L. Kovalchuk, J. Zou, J.K. Joung, V. Sartorelli, C.L. Wei, X. Ruan, G.L. Hager, Y. Ruan, and R. Casellas. 2013. Interactome maps of mouse gene regulatory domains reveal basic principles of transcriptional regulation. *Cell*. 155:1507–1520. doi:10.1016/j.cell.2013.11.039.
- Kimura, H. 2013. Histone modifications for human epigenome analysis. *J. Hum. Genet.* 58:439–445. doi:10.1038/jhg.2013.66.
- Kujirai, T., H. Ehara, Y. Fujino, M. Shirouzu, S. ichi Sekine, and H. Kurumizaka. 2018. Structural basis of the nucleosome transition during RNA polymerase II passage. *Science*. 362:595–598. doi:10.1126/science.aau9904.
- Kuo, A.J., P. Cheung, K. Chen, B.M. Zee, M. Kioi, J. Lauring, Y. Xi, B.H. Park, X. Shi, B.A. Garcia, W. Li, and O. Gozani. 2011. NSD2 Links Dimethylation of Histone H3 at Lysine 36 to Oncogenic Programming. *Mol. Cell*. 44:609–620. doi:10.1016/j.molcel.2011.08.042.
- Lachner Monika, O’Carroll Donald, Rea Stephen, Mechtler Karl, and Jenuwein Thomas. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 410: 116–120. doi.org/10.1038/35065132
- Lange, U.C., S. Siebert, M. Wossidlo, T. Weiss, C. Ziegler-Birling, J. Walter, M.E. Torres-Padilla, S. Daujat, and R. Schneider. 2013. Dissecting the role of H3K64me3 in mouse pericentromeric heterochromatin. *Nat. Commun.* 4:2233. doi:10.1038/ncomms3233.
- Larson, A.G., D. Elnatan, M.M. Keenen, M.J. Trnka, J.B. Johnston, A.L. Burlingame, D.A. Agard, S. Redding, and G.J. Narlikar. 2017. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*. 547:236–240. doi:10.1038/nature22822.
- Li, B., M. Carey, and J.L. Workman. 2007. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*. 128:707–719. doi:10.1016/j.cell.2007.01.015.
- Li, C.H., E.L. Coffey, A. Dall’Agnese, N.M. Hannett, X. Tang, J.E. Henninger, J.M. Platt, O. Oksuz, A. V. Zamudio, L.K. Afeyan, J. Schuijers, X.S. Liu, S. Markoulaki, T. Lungjangwa, G. LeRoy, D.S. Svoboda, E. Wogram, T.I. Lee, R. Jaenisch, and R.A.

- Young. 2020. MeCP2 links heterochromatin condensates and neurodevelopmental disease. *Nature*. 586:440–444. doi:10.1038/s41586-020-2574-4.
- Li, H., S. Ilin, W. Wang, E.M. Duncan, J. Wysocka, C.D. Allis, and D.J. Patel. 2006. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. 442:91–95. doi:10.1038/nature04802.
- Li, Y., H. Gong, P. Wang, Y. Zhu, H. Peng, Y. Cui, H. Li, J. Liu, and Z. Wang. 2021. The emerging role of ISWI chromatin remodeling complexes in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 40:346. doi:10.1186/s13046-021-02151-x.
- Lieberman-aiden, E., N.L. Van Berkum, L. Williams, M. Imakaev, T. Ragoczy, A. Telling, I. Amit, B.R. Lajoie, P.J. Sabo, M.O. Dorschner, R. Sandstrom, B. Bernstein, M.A. Bender, M. Groudine, A. Gnirke, J. Stamatoyannopoulos, L.A. Mirny, E.S. Lander and J. Dekker. 2009. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*. 326:289–293. doi:10.1126/science.1181369.
- Liu, Y., H. Bisio, C.M. Toner, S. Jeudy, N. Philippe, K. Zhou, S. Bowerman, A. White, G. Edwards, C. Abergel, and K. Luger. 2021. Virus-encoded histone doublets are essential and form nucleosome-like structures. *Cell*. 184:4237-4250.e19. doi:10.1016/j.cell.2021.06.032.
- Lowary, P.T., and J. Widom. 1998. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* 276:19–42. doi:10.1006/jmbi.1997.1494.
- Lu, X., X. Meng, C.A. Morris, and M.T. Keating. 1998. A novel human gene, WSTF, is deleted in Williams syndrome. *Genomics*. 54:241–249. doi:10.1006/geno.1998.5578.
- Lu, X., Y. Zhang, L. Wang, L. Wang, H. Wang, Q. Xu, Y. Xiang, C. Chen, F. Kong, W. Xia, Z. Lin, S. Ma, L. Liu, X. Wang, H. Ni, W. Li, Y. Guo, and W. Xie. 2021. Evolutionary epigenomic analyses in mammalian early embryos reveal species-specific innovations and conserved principles of imprinting. *Sci. Adv.* 7:eabi6178. doi:10.1126/sciadv.abi6178.
- Luco, R.F., Q. Pan, K. Tominaga, B.J. Blencowe, O.M. Pereira-Smith, and T. Misteli. 2010. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science*. 327:996–1000. doi:10.1126/science.1184208.

- Malla, A.B., H. Yu, D. Farris, S. Kadimi, T.T. Lam, A.L. Cox, Z.D. Smith, and B.J. Lesch. 2023. DOT1L bridges transcription and heterochromatin formation at mammalian pericentromeres. *EMBO Rep.* 24:e56492. doi:10.15252/embr.202256492.
- Matsuda, A., Y. Chikashige, D.Q. Ding, C. Ohtsuki, C. Mori, H. Asakawa, H. Kimura, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2015. Highly condensed chromatin is formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nat. Commun.* 6:7753. doi:10.1038/ncomms8753.
- Millán-Zambrano, G., A. Burton, A.J. Bannister, and R. Schneider. 2022. Histone post-translational modifications — cause and consequence of genome function. *Nat. Rev. Genet.* 23:563–580. doi:10.1038/s41576-022-00468-7.
- Miura, H., S. Takahashi, R. Poonperm, A. Tanigawa, S. ichiro Takebayashi, and I. Hiratani. 2019. Single-cell DNA replication profiling identifies spatiotemporal developmental dynamics of chromosome organization. *Nat. Genet.* 51:1356–1368. doi:10.1038/s41588-019-0474-z.
- Mohana, G., J. Dorier, X. Li, M. Mouginot, R.C. Smith, H. Malek, M. Leleu, D. Rodriguez, J. Khadka, P. Rosa, P. Cousin, C. Iseli, S. Restrepo, N. Guex, B.D. McCabe, A. Jankowski, M.S. Levine, and M.C. Gambetta. 2023. Chromosome-level organization of the regulatory genome in the *Drosophila* nervous system. *Cell.* 186:3826-3844.e26. doi:10.1016/j.cell.2023.07.008.
- Monk, D., D.J.G. Mackay, T. Eggermann, E.R. Maher, and A. Riccio. 2019. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat. Rev. Genet.* 20:235–248. doi:10.1038/s41576-018-0092-0.
- Montavon, T., N. Shukeir, G. Erikson, B. Engist, M. Onishi-Seebacher, D. Ryan, Y. Musa, G. Mittler, A.G. Meyer, C. Genoud, and T. Jenuwein. 2021. Complete loss of H3K9 methylation dissolves mouse heterochromatin organization. *Nat. Commun.* 12:4359. doi:10.1038/s41467-021-24532-8.
- Moore, L.D., T. Le, and G. Fan. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology.* 38:23–38. doi:10.1038/npp.2012.112.
- Musselman, C.A., J. Ramírez, J.K. Sims, R.E. Mansfield, S.S. Oliver, J.M. Denu, J.P. Mackay, P.A. Wade, J. Hagman, and T.G. Kutateladze. 2012. Bivalent recognition of nucleosomes

- by the tandem PHD fingers of the CHD4 ATPase is required for CHD4-mediated repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:787–792. doi:10.1073/pnas.1113655109.
- Nan, X., J. Hou, A. Maclean, J. Nasir, M.J. Lafuente, X. Shu, S. Kriaucionis, and A. Bird. 2007. Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:2709–2714. doi:10.1073/pnas.0608056104.
- Neri, F., S. Rapelli, A. Krepelova, D. Incarnato, C. Parlato, G. Basile, M. Maldotti, F. Anselmi, and S. Oliviero. 2017. Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. *Nature*. 543:72–77. doi:10.1038/nature21373.
- Nimura, K., K. Ura, H. Shiratori, M. Ikawa, M. Okabe, R.J. Schwartz, and Y. Kaneda. 2009. A histone H3 lysine 36 trimethyltransferase links Nkx2-5 to Wolf-Hirschhorn syndrome. *Nature*. 460:287–291. doi:10.1038/nature08086.
- Nora, E.P., A. Goloborodko, A.L. Valton, J.H. Gibcus, A. Uebersohn, N. Abdennur, J. Dekker, L.A. Mirny, and B.G. Bruneau. 2017. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell*. 169:930–944.e22. doi:10.1016/j.cell.2017.05.004.
- Ooga, M., A. Inoue, S.I. Kageyama, T. Akiyama, M. Nagata, and F. Aoki. 2008. Changes in H3K79 methylation during preimplantation development in mice. *Biol. Reprod.* 78:413–424. doi:10.1095/biolreprod.107.063453.
- Oppikofer, M., M. Sagolla, B. Haley, H.M. Zhang, S.K. Kummerfeld, J. Sudhamsu, E.M. Flynn, T. Bai, J. Zhang, C. Ciferri, and A.G. Cochran. 2017. Non-canonical reader modules of BAZ1A promote recovery from DNA damage. *Nat. Commun.* 8:862. doi:10.1038/s41467-017-00866-0.
- Oyer, J.A., X. Huang, Y. Zheng, J. Shim, T. Ezponda, Z. Carpenter, M. Allegretta, C.I. Okot-Kotber, J.P. Patel, A. Melnick, R.L. Levine, A. Ferrando, A.D. MacKerell, N.L. Kelleher, J.D. Licht, and R. Popovic. 2014. Point mutation E1099K in MMSET/NSD2 enhances its methyltransferase activity and leads to altered global chromatin methylation in lymphoid malignancies. *Leukemia*. 28:198–201. doi:10.1038/leu.2013.204.

- Palasca, O., A. Santos, C. Stolte, J. Gorodkin, and L.J. Jensen. 2018. TISSUES 2.0: An integrative web resource on mammalian tissue expression. *Database*. 2018: bay028. doi:10.1093/database/bay003.
- Pallier, C., P. Scaffidi, S. Chopineau-Proust, A. Agresti, P. Nordmann, M.E. Bianchi, and V. Marechal. 2003. Association of Chromatin Proteins High Mobility Group Box (HMGB) 1 and HMGB2 with Mitotic Chromosomes. *Mol. Biol. Cell*. 14:3414–3426. doi.org/10.1091/mbc.e02-09-0581.
- Park, S.J., K. Shirahige, M. Ohsugi, and K. Nakai. 2015. DBTMEE: A database of transcriptome in mouse early embryos. *Nucleic Acids Res*. 43:D771–D776. doi:10.1093/nar/gku1001.
- Peters, A.H.F.M., S. Kubicek, K. Mechtler, R.J. O’Sullivan, A.A.H.A. Derijck, L. Perez-Burgos, A. Kohlmaier, S. Opravil, M. Tachibana, Y. Shinkai, J.H.A. Martens, and T. Jenuwein. 2003. Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin. *Mol. Cell*. 12:1577–1589. doi:10.1016/S1097-2765(03)00477-5.
- Poot, R.A., L. Bozhenok, D.L.C. van den Berg, S. Steffensen, F. Ferreira, M. Grimaldi, N. Gilbert, J. Ferreira, and P.D. Varga-Weisz. 2004. The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatic remodelling by ISWI to replication foci. *Nat. Cell Biol*. 6:1236–1244. doi:10.1038/ncb1196.
- Popovic, R., E. Martinez-Garcia, E.G. Giannopoulou, Q. Zhang, Q. Zhang, T. Ezponda, M.Y. Shah, Y. Zheng, C.M. Will, E.C. Small, Y. Hua, M. Bulic, Y. Jiang, M. Carrara, R.A. Calogero, W.L. Kath, N.L. Kelleher, J.P. Wang, O. Elemento, and J.D. Licht. 2014. Histone Methyltransferase MMSET/NSD2 Alters EZH2 Binding and Reprograms the Myeloma Epigenome through Global and Focal Changes in H3K36 and H3K27 Methylation. *PLoS Genet*. 10:e1004566. doi:10.1371/journal.pgen.1004566.
- Prasanth, S.G., Z. Shen, K. V. Prasanth, and B. Stillman. 2010. Human origin recognition complex is essential for HP1 binding to chromatin and heterochromatin organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 107:15093–15098. doi:10.1073/pnas.1009945107.
- Probst, A. V., and G. Almouzni. 2011. Heterochromatin establishment in the context of genome-wide epigenetic reprogramming. *Trends Genet*. 27:177–185. doi:10.1016/j.tig.2011.02.002.

- Probst, A. V., and G. Almouzni. 2008. Pericentric heterochromatin: Dynamic organization during early development in mammals. *Differentiation*. 76:15–23. doi:10.1111/j.1432-0436.2007.00220.x.
- Probst, A. V., I. Okamoto, M. Casanova, F. El Marjou, P. Le Baccon, and G. Almouzni. 2010. A Strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev. Cell*. 19:625–638. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.002.
- Qu  net, D., V. Gasser, L. Fouillen, F. Cammas, S. Sanglier-Cianferani, R. Losson, and F. Dantzer. 2008. The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1   and the heterochromatin protein HP1  . *FASEB J*. 22:3853–3865. doi:10.1096/fj.08-113464.
- Rechtsteiner, A., S. Ercan, T. Takasaki, T.M. Phippen, T.A. Egelhofer, W. Wang, H. Kimura, J.D. Lieb, and S. Strome. 2010. The Histone H3K36 Methyltransferase MES-4 Acts Epigenetically to Transmit the Memory of Germline Gene Expression to Progeny. *PLoS Genet*. 6:e1001091. doi:10.1371/journal.pgen.1001091.
- Ribeyre, C., R. Zellweger, M. Chauvin, N. Bec, C. Larroque, M. Lopes, and A. Constantinou. 2016. Nascent DNA Proteomics Reveals a Chromatin Remodeler Required for Topoisomerase I Loading at Replication Forks. *Cell Rep*. 15:300–309. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.027.
- Sakashita, A., T. Kitano, H. Ishizu, Y. Guo, H. Masuda, M. Ariura, K. Murano, and H. Siomi. 2023. Transcription of MERVL retrotransposons is required for preimplantation embryo development. *Nat. Genet*. 55:484–495. doi:10.1038/s41588-023-01324-y.
- Saksouk, N., E. Simboeck, and J. Déjardin. 2015. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics and Chromatin*. 8:3. doi:10.1186/1756-8935-8-3.
- Sankaran, S.M., A.W. Wilkinson, J.E. Elias, and O. Gozani. 2016. A PWWP Domain of histone-lysine N-methyltransferase NSD2 binds to dimethylated lys-36 of histone H3 and regulates NSD2 function at chromatin. *J. Biol. Chem*. 291:8465–8474. doi:10.1074/jbc.M116.720748.

- Santoro, R., J. Li, and I. Grummt. 2002. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat. Genet.* 32:393–396. doi:10.1038/ng1010.
- Sato, Y., L. Hilbert, H. Oda, Y. Wan, J.M. Heddlestone, T.L. Chew, V. Zaburdaev, P. Keller, T. Lionnet, N. Vastenhouw, and H. Kimura. 2019. Histone H3K27 acetylation precedes active transcription during zebrafish zygotic genome activation as revealed by live-cell analysis. *Development.* 146. doi:10.1242/dev.179127.
- Sato, Y., T. Kujirai, R. Arai, H. Asakawa, C. Ohtsuki, N. Horikoshi, K. Yamagata, J. Ueda, T. Nagase, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, A. Kimura, H. Kurumizaka, and H. Kimura. 2016. A Genetically Encoded Probe for Live-Cell Imaging of H4K20 Monomethylation. *J. Mol. Biol.* 428:3885–3902. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.010.
- Sato, Y., M. Mukai, J. Ueda, M. Muraki, T.J. Stasevich, N. Horikoshi, T. Kujirai, H. Kita, T. Kimura, S. Hira, Y. Okada, Y. Hayashi-Takanaka, C. Obuse, H. Kurumizaka, A. Kawahara, K. Yamagata, N. Nozaki, and H. Kimura. 2013. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. *Sci. Rep.* 3:2436. doi:10.1038/srep02436.
- Scheffler, K., J. Uraji, I. Jentoft, T. Cavazza, E. Mönnich, B. Mogessie, and M. Schuh. 2021. Two mechanisms drive pronuclear migration in mouse zygotes. *Nat. Commun.* 12:841. doi:10.1038/s41467-021-21020-x.
- Sharda, A., and T.C. Humphrey. 2022. The role of histone H3K36me3 writers, readers and erasers in maintaining genome stability. *DNA Repair (Amst).* 119:103407. doi:10.1016/j.dnarep.2022.103407.
- Sharif, S.B., N. Zamani, and B.P. Chadwick. 2021. Baz1b the protean protein. *Genes (Basel).* 12:1541. doi:10.3390/genes12101541.
- Shirai, A., T. Kawaguchi, H. Shimojo, D. Muramatsu, M. Ishida-Yonetani, Y. Nishimura, H. Kimura, J.I. Nakayama, and Y. Shinkai. 2017. Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly. *Elife.* 6:e25317. doi:10.7554/ELIFE.25317.
- Shirane, K., F. Miura, T. Ito, and M.C. Lorincz. 2020. NSD1-deposited H3K36me2 directs de novo methylation in the mouse male germline and counteracts Polycomb-associated silencing. *Nat. Genet.* 52:1088–1098. doi:10.1038/s41588-020-0689-z.

- Smith, Z.D., and A. Meissner. 2013. DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14:204–220. doi:10.1038/nrg3354.
- Smurova, K., and P. De Wulf. 2018. Centromere and Pericentromere Transcription: Roles and Regulation ... in Sickness and in Health. *Front. Genet.* 9:674. doi:10.3389/fgene.2018.00674.
- Sobecki, M., K. Mrouj, A. Camasses, N. Parisi, E. Nicolas, D. Llères, F. Gerbe, S. Prieto, L. Krasinska, A. David, M. Eguren, M.C. Birling, S. Urbach, S. Hem, J. Déjardin, M. Malumbres, P. Jay, V. Dulic, D.L.J. Lafontaine, R. Feil, and D. Fisher. 2016. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife.* 5:e13722. doi:10.7554/eLife.13722.
- Solovei, I., A.S. Wang, K. Thanisch, C.S. Schmidt, S. Krebs, M. Zwerger, T. V. Cohen, D. Devys, R. Foisner, L. Peichl, H. Herrmann, H. Blum, D. Engelkamp, C.L. Stewart, H. Leonhardt, and B. Joffe. 2013. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell.* 152:584–598. doi:10.1016/j.cell.2013.01.009.
- Stopka, T., D. Zakova, O. Fuchs, O. Kubrova, J. Blafkova, J. Jelinek, E. Necas, and J. Zivny. 2000. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia.* 14:1247–1252. doi:10.1038/sj.leu.2401807.
- Streubel, G., A. Watson, S.G. Jammula, A. Scelfo, D.J. Fitzpatrick, G. Oliviero, R. McCole, E. Conway, E. Glancy, G.L. Negri, E. Dillon, K. Wynne, D. Pasini, N.J. Krogan, A.P. Bracken, and G. Cagney. 2018. The H3K36me2 Methyltransferase Nsd1 Demarcates PRC2-Mediated H3K27me2 and H3K27me3 Domains in Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell.* 70:371-379.e5. doi:10.1016/j.molcel.2018.02.027.
- Strohner, R., A. Nemeth, P. Jansa, U. Hofmann-Rohrer, R. Santoro, G. Längst, and I. Grummt. 2001. NoRC - A novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J.* 20:4892–4900. doi:10.1093/emboj/20.17.4892.
- Suzuki, S., H. Kato, Y. Suzuki, Y. Chikashige, Y. Hiraoka, H. Kimura, K. Nagao, C. Obuse, S. Takahata, and Y. Murakami. 2016. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 44:4147–4162. doi:10.1093/nar/gkw008.

- Taddei, A., D. Roche, W.A. Bickmore, and G. Almouzni. 2005. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: Implications for anticancer therapy? *EMBO Rep.* 6:520–524. doi:10.1038/sj.embor.7400441.
- Tallant, C., E. Valentini, O. Fedorov, L. Overvoorde, F.M. Ferguson, P. Filippakopoulos, D.I. Svergun, S. Knapp, and A. Ciulli. 2015. Molecular basis of histone tail recognition by human TIP5 PHD finger and bromodomain of the chromatin remodeling complex NoRC. *Structure.* 23:80–92. doi:10.1016/j.str.2014.10.017.
- Tanaka, H., T. Igata, K. Etoh, T. Koga, S. ichiro Takebayashi, and M. Nakao. 2020. The NSD2/WHSC1/MMSET methyltransferase prevents cellular senescence-associated epigenomic remodeling. *Aging Cell.* 19:e13173. doi:10.1111/accel.13173.
- Trakarnphornsombat, W., and H. Kimura. 2023. Live-cell tracking of γ -H2AX kinetics reveals the distinct modes of ATM and DNA-PK in the immediate response to DNA damage. *J. Cell Sci.* 136. doi:10.1242/jcs.260698.
- Trojer, P., and D. Reinberg. 2007. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Mol. Cell.* 28:1–13. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.011.
- Tsumura, A., T. Hayakawa, Y. Kumaki, S.I. Takebayashi, M. Sakaue, C. Matsuoka, K. Shimotohno, F. Ishikawa, E. Li, H.R. Ueda, J.I. Nakayama, and M. Okano. 2006. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to Cells.* 11:805–814. doi:10.1111/j.1365-2443.2006.00984.x.
- Van Steensel, B., and A.S. Belmont. 2017. Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell.* 169:780–791. doi:10.1016/j.cell.2017.04.022.
- Varshney, D., J. Vavrova-Anderson, A.J. Oler, V.H. Cowling, B.R. Cairns, and R.J. White. 2015. SINE transcription by RNA polymerase III is suppressed by histone methylation but not by DNA methylation. *Nat. Commun.* 6:6569. doi:10.1038/ncomms7569.
- Vary, J.C., V.K. Gangaraju, J. Qin, C.C. Landel, C. Kooperberg, B. Bartholomew, and T. Tsukiyama. 2003. Yeast Isw1p Forms Two Separable Complexes In Vivo. *Mol. Cell. Biol.* 23:80–91. doi:10.1128/mcb.23.1.80-91.2003.

- Vian, L., A. Pękowska, S.S.P. Rao, K.R. Kieffer-Kwon, S. Jung, L. Baranello, S.C. Huang, L. El Khattabi, M. Dose, N. Pruett, A.L. Sanborn, A. Canela, Y. Maman, A. Oksanen, W. Resch, X. Li, B. Lee, A.L. Kovalchuk, Z. Tang, S. Nelson, M. Di Pierro, R.R. Cheng, I. Machol, B.G. St Hilaire, N.C. Durand, M.S. Shamim, E.K. Stamenova, J.N. Onuchic, Y. Ruan, A. Nussenzweig, D. Levens, E.L. Aiden, and R. Casellas. 2018. The Energetics and Physiological Impact of Cohesin Extrusion. *Cell*. 173:1165-1178.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.03.072.
- Wagner, E.J., and P.B. Carpenter. 2012. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:115–126. doi:10.1038/nrm3274.
- Weinberg, D.N., S. Papillon-Cavanagh, H. Chen, Y. Yue, X. Chen, K.N. Rajagopalan, C. Horth, J.T. McGuire, X. Xu, H. Nikbakht, A.E. Lemiesz, D.M. Marchione, M.R. Marunde, M.J. Meiners, M.A. Cheek, M.C. Keogh, E. Bareke, A. Djedid, A.S. Harutyunyan, N. Jabado, B.A. Garcia, H. Li, C.D. Allis, J. Majewski, and C. Lu. 2019. The histone mark H3K36me2 recruits DNMT3A and shapes the intergenic DNA methylation landscape. *Nature*. 573:281–286. doi:10.1038/s41586-019-1534-3.
- Wiechens, N., V. Singh, T. Gkikopoulos, P. Schofield, S. Rocha, and T. Owen-Hughes. 2016. The Chromatin Remodelling Enzymes SNF2H and SNF2L Position Nucleosomes adjacent to CTCF and Other Transcription Factors. *PLoS Genet.* 12:e1005940. doi:10.1371/journal.pgen.1005940.
- Wijchers, P.J., G. Geeven, M. Eyres, A.J. Bergsma, M. Janssen, M. Verstegen, Y. Zhu, Y. Schell, C. Vermeulen, E. De Wit, and W. De Laat. 2015. Characterization and dynamics of pericentromere-associated domains in mice. *Genome Res.* 25:958–969. doi:10.1101/gr.186643.114.
- Woodcock, C.L., and R.P. Ghosh. 2010. Chromatin Higher-order Structure and Dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000596. doi.org/10.1101/cshperspect.a000596.
- Wu, X., and Y. Zhang. 2017. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 18:517–534. doi:10.1038/nrg.2017.33.
- Xia, W., and W. Xie. 2020. Rebooting the Epigenomes during Mammalian Early Embryogenesis. *Stem Cell Reports.* 15:1158–1175. doi:10.1016/j.stemcr.2020.09.005.

- Xiao, A., H. Li, D. Shechter, S.H. Ahn, L.A. Fabrizio, H. Erdjument-Bromage, S. Ishibe-Murakami, B. Wang, P. Tempst, K. Hofmann, D.J. Patel, S.J. Elledge, and C.D. Allis. 2009. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*. 457:57–62. doi:10.1038/nature07668.
- Xu, Q., Y. Xiang, Q. Wang, L. Wang, J. Brind'Amour, A.B. Bogutz, Y. Zhang, B. Zhang, G. Yu, W. Xia, Z. Du, C. Huang, J. Ma, H. Zheng, Y. Li, C. Liu, C.L. Walker, E. Jonasch, L. Lefebvre, M. Wu, M.C. Lorincz, W. Li, L. Li, and W. Xie. 2019. SETD2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development. *Nat. Genet.* 51:844–856. doi:10.1038/s41588-019-0398-7.
- Yano, S., T. Ishiuchi, S. Abe, S.H. Namekawa, G. Huang, Y. Ogawa, and H. Sasaki. 2022. Histone H3K36me2 and H3K36me3 form a chromatin platform essential for DNMT3A-dependent DNA methylation in mouse oocytes. *Nat. Commun.* 13:4440. doi:10.1038/s41467-022-32141-2.
- Yuan, S., R. Natesan, F.J. Sanchez-Rivera, J. Li, N. V. Bhanu, T. Yamazoe, J.H. Lin, A.J. Merrell, Y. Sela, S.K. Thomas, Y. Jiang, J.B. Plesset, E.M. Miller, J. Shi, B.A. Garcia, S.W. Lowe, I.A. Asangani, and B.Z. Stanger. 2020. Global regulation of the histone mark H3K36ME2 underlies epithelial plasticity and metastatic progression. *Cancer Discov.* 10:854–871. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-1299.
- Yun, M., J. Wu, J.L. Workman, and B. Li. 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 21:564–578. doi:10.1038/cr.2011.42.
- Zhang, T., S. Cooper, and N. Brockdorff. 2015. The interplay of histone modifications – writers that read. *EMBO Rep.* 16:1467–1481. doi:10.15252/embr.201540945.
- Zhang, Y., H.H. Ng, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, A. Bird, and D. Reinberg. 1999. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.* 13:1924–1935. doi:10.1101/gad.13.15.1924.
- Zhou, Y., R. Santoro, and I. Grummt. 2002. The chromatin remodeling complex NoRC targets HDAC1 to the ribosomal gene promoter and represses RNA polymerase I transcription. *EMBO J.* 21:4632–4640. doi:10.1093/emboj/cdf460.

- Zhu, Y., G. Huang, S. Li, H. Xiong, R. Chen, L. Zuo, and H. Liu. 2022. CircSMARCA5: A key circular RNA in various human diseases. *Front. Genet.* 13:921306.
doi:10.3389/fgene.2022.921306.
- Zhuang, L., Y. Jang, Y.K. Park, J.E. Lee, S. Jain, E. Froimchuk, A. Broun, C. Liu, O. Gavrilova, and K. Ge. 2018. Depletion of Nsd2-mediated histone H3K36 methylation impairs adipose tissue development and function. *Nat. Commun.* 9:1796.
doi:10.1038/s41467-018-04127-6.