



宮崎大学学術情報リポジトリ

University of Miyazaki Academic Repository

高等真核生物が新たな環境変化に適応するために、多世代を通してエピジェネティック修飾による転写因子やクロマチン修飾酵素遺伝子などの5'-近傍上流のクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することで、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得するバイオ・システム

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-06-21 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中山, 建男, 中山, 雅美 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10458/6615

高等真核生物の環境変化への新たな適応能力の獲得機構 ~クロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コード説 (Chromatin conformation change code (4C) theory: 4C theory)* ~

サブタイトル：

高等真核生物が新しい環境変化に適応するために、多世代を通してエピジェネティック修飾による転写因子やクロマチン修飾酵素遺伝子などの 5'-近傍上流のクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することで、プログラム化されていない新規の細胞機能を獲得するバイオ・システム

中山建男、中山雅美

宮崎大学・医学部・フロンティア科学実験総合センター

脚注：*本総説は Ref. 116 の改訂版である。

要約：

本総説は多世代を通してクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することによって、プログラム化されていない新規の細胞機能を獲得する高等真核生物の環境適応能力に関するレビューである。最初に、具体的な例として、ニワトリの HDAC2(-/-) DT40 mutants で HDAC2 遺伝子の欠損に起因して劇的に蓄積した大量の IgM H-chain と L-chain が長期の連続培養期間に劇的に減少する多彩な方法のメカニズムを提示する。引き続いて、これらの具体例に基づいて、異常で不快で不利益な環境変化に自らを適応させるために、高等真核生物がプログラム化されていない新たな細胞機能を獲得する能力に関する一般的な仮説的概念を提示する。ニワトリの DT40 野生株では、HDAC2 はスーパーバイザーとして、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 と Ikaros, E2A などの転写因子の遺伝子発現を逆方向（促進的及び抑制的）に制御することを介して、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現を間接的に制御する。HDAC2 遺伝子の欠損に伴って、IgM H-chain と L-chain の mRNAs と蛋白質の劇的な蓄積が急速に誘導される。その後、これらの蓄積した mRNAs と蛋白質の量は、同一条件下での単純な長期の連続培養期間に、全ての HDAC2(-/-) individual clones でほぼ同じ変化パターンで劇的に減少する。一方、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 の遺伝子発現は、連続培養期間に、個々の HDAC2(-/-) individual clones で著しく異なるパターンで変化する。培養の後期ステージでは、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現に関して、調べた 6 個の HDAC2(-/-) individual clones は少なくとも OBF1-依存性、Pax5, Aiolos-依存性、Pax5, Aiolos, EBF1-依存性の 3 つの異なるタイプに分類分け出来る。個々の HDAC2(-/-) individual clones における Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 の遺伝子発現パターンの複雑な変化は、連続培養期間のこれら遺伝子の 5'-近傍上流クロマチン領域でのヒストン H3 の特定 Lys 残基のアセチル化及び脱アセチル化レベルの多種多様な変化に基づいた多様な不可逆的なクロマチン・コンフォメーション（構造）変化に起因している。これらの結果に基づいて、高等真核生物が、多世代を通して、エピジェネティック修飾によるクロマチン構造の可塑性の不可逆的創出を介して、プログラム化されていない新たな細胞機能を獲得するバイオ・システムを、クロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コード説 (chromatin conformation change (structure) code theory: 4C theory) と命名した。

高等真核生物の生命維持と細胞タイプの決定にとって最も基本的で重要な方法の 1 つと考えられる 4C theory の具体的な内容は次の通りである。1) 高等真核生物の体細胞は、その生涯で初めて新しい環境変化に遭遇した時、その変化に適応するかまたは克服するために、プログラム化されていない新規の細胞機能を獲得するための柔軟で順応的で多能的な能力を有している。2) 細胞のこの柔軟で順応的で多能的な能力は基本的にはクロマチン構造の柔軟性・順応性・多能性に基づいている。3) 体細胞は、多世代（多数の細胞分裂）を通して、特定の転写因子やクロマチン修飾酵素の遺伝子の 5'-近傍上流域のクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することによって、環境変化に適応または排除するためのプログラム化されていない新たな細胞機能を

獲得する能力を有す。4) クロマチン構造（緩いフォームから硬いフォームまたはその逆）の可塑性は、多世代を通じたエピジェネティック修飾によるクロマチン・コンフォメーション・チェンジに基づいて、連続的・不可逆的に創出される。5) 同じタイプの個々の細胞におけるクロマチン構造の可塑性の多様性は、環境変化への自発的で不均衡な対応によって引き起され、その後の多世代を通じた連続的・集中的・選択的な対応によって成し遂げられる。6) クロマチン構造の可塑性の不可逆的創出は、体細胞のそれまでの履歴と環境変化への連続的対応に主に依存する。7) クロマチン構造の可塑性の不可逆的創出は、子孫世代の細胞で起り、環境変化に最初に遭遇した細胞では起らない。8) クロマチン構造の可塑性の不可逆的創出は、合目的・必然的に起り、偶然または中立的に起るのではない。9) 環境変化は環境変化認識受容体/部位(environment change recognition receptor/site: ECRR/ECRS)によって認識される。10) クロマチン構造の可塑性はクロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コンプレックス装置(chromatin conformation change complex machinery: 4C machinery)によって直接的・不可逆的に創出される。11) 特定の遺伝子(群)の5'-近傍上流のクロマチン構造は、動的で変化可能な三次元構造（コンフォメーション）として、環境変化のシグナルを受け取る。12) 特定の遺伝子の5'-近傍上流のクロマチン構造（緩いフォームまたは硬いフォーム）は当該遺伝子の潜在的な発現能力のスイッチ（オンまたはオフ）を指令する。13) 特定の遺伝子の5'-近傍上流のクロマチン構造は、構造的側面からは「クロマチンの刻み目(notch of chromatin)」とみなすことができ、機能的側面からは「遺伝子発現のディレクター(director of gene expression)」とみなすことができる。14) 高等真核生物の複雑で多彩な細胞機能や多種多様な細胞タイプを決定する4C theoryにおけるコード数は、恐らく特異的な候補遺伝子数とこれら遺伝子それぞれのコード数（多分、2）の組合せに基づいて決まる。

序論：

細胞は生物の基本単位であり、遺伝情報を主に担う核酸（デオキシリボ核酸：DNA）、細胞機能を主に担う蛋白質、糖、脂質、別の核酸（リボ核酸：RNA）などの高分子物質や多種多様な低分子物質などを主要な構成成分として成り立っている。単一の細胞で成り立つ単細胞生物と多数の細胞で構成される多細胞生物に分かれる。単細胞生物には核を持たない原核（無核）細胞（大腸菌などの真正細菌、古細菌、シアノバクテリアなど）や核を持つ下等真核（有核）細胞（酵母、アメーバ、かびなど）があり、一個の細胞のみで一つの個体として生命を維持する。一方、多細胞生物には動物や植物などがあり、核を持つ多種多様な高等真核細胞が集合し、互いに機能を分担し協調して一つの個体として生命を維持する。さらに、ウイルスは生物かどうかと言う生命の定義についての議論が現在でも行われている。このような細胞の分類や生物と生命の定義に関する専門書や啓蒙書などは膨大な数があり、これらの成書を参照して欲しい。

原核細胞のDNAは基本的には一個の環状構造であり、裸の形で核様物質として細胞質に存在

する。下等及び高等真核細胞の DNA はいずれも数種のヒストンや他の多種多様な蛋白質と結合した複合体が複数の染色質（クロマチン）として細胞核の中に存在する。真核細胞のクロマチンは細胞分裂時に棒状構造の染色体（クロモソーム）になる。例えば、染色体数(2n)は酵母では 6 対の染色体で 12、ヒトでは 22 対の常染色体と 1 対の性染色体で 46 存在する。なお、本総説で研究対象とするニワトリの染色体数(2n)は 78 で、その核型は特異的でサイズが大きく異なるマクロ染色体と多数のマイクロ染色体で構成されている。性染色体は ZW 型でその組合せと性決定との関係は哺乳類とは逆で、ZZ がオス、ZW がメスである雌ヘテロ型である。染色質と染色体は同義語として用いられることが多い。なお、染色質と命名されたのは、細胞核の中に分散して塩基性色素で染まり易い物質として、最初に観察されたことに由来する。

原核生物、真核生物の細胞はいずれも細胞分裂時に複雑な過程（細胞周期）を経て、DNA の担っている遺伝情報を正確に次世代の細胞（娘細胞）へ伝達する。もちろん、原核生物、真核生物はいずれも細胞内で遺伝情報に基づいて直接及び間接的に産生される高分子物質、低分子物質そして細胞外から取り込んだ化学物質などの協働作業によって、ある一定期間（寿命）生命を維持する。さらに、原核生物、真核生物はいずれも生活環境の変化に対応するプログラム化されている多彩な能力を備えており、それぞれの適応能力の範囲内で生命を維持し生きて行くことができる。

生物（細胞）は細胞内外の環境変化にどのような方法で対応・適応し生きて行くのであろうか。生物（細胞）の環境適応能力に関しては幾つかの可能性があり、典型的な対応・適応方法としては次の 4 つが考えられる。1）極端に過酷な環境変化の場合には、細胞（原核細胞と下等真核細胞を含む）がすでに長期間かけて獲得している環境適応能力を超えているため、対応・適応できずに死滅する。極端に過酷な環境（例えば、極端な高温など）になった場合、細胞内化学反応の触媒作用を持つ酵素蛋白質などの立体（3次元）構造が壊れて活性を失い（これを失活と言う）、その結果、最終的に細胞は死滅する。もちろん、高温、高圧など過酷な環境下でも生存可能な単細胞生物（好熱細菌など）は多数存在する。2）かなり過酷な環境変化の場合には、細胞（原核細胞と下等真核細胞を含む）は遺伝情報を担う DNA 分子の塩基配列の変化（例えば、特定の DNA 断片の挿入、欠失、重複あるいは点突然変異など）によって、遺伝子産物である蛋白質などの一次構造（アミノ酸配列）が劇的あるいは微妙に変化しその生理機能（作用）が変化して、環境変化に適応する。この方法は生物進化の 1 つの要因の説明になる。3）温和な環境変化の場合には、細胞（高等真核細胞のみであるが）は遺伝情報を担う DNA 分子の塩基配列の変化を伴わず、クロマチン構造の可塑性が多世代に渡って不可逆的に変化し、遺伝子の発現パターンが多彩に変化することを介して、遺伝子産物である蛋白質などの種類が劇的あるいは微妙に変化することによって、環境変化に適応する。この方法は細胞の発生と分化の 1 つの要因の説明になる。4）極めて温和な環境変化の場合には、細胞（原核細胞と下等真核細胞を含

む) は、すでに進化の過程で長期間かけて獲得している環境適応能力がこの環境変化を超えているため、これらの環境適応能力を駆使して環境変化に即座に適応する。なお、生命の起源、生物の進化及び分化等に関しては膨大な数の専門書や啓蒙書などの成書があり、これらの成書を参照して欲しい。本総説では著者らのデータに基づいて、高等真核細胞のクロマチンの構造変化を介した環境適応能力の獲得方法(すなわち上記の3つ目の方法)にのみ焦点を絞って話を進める。

クロマチンの構造:

真核細胞のクロマチン・クロモソーム・ヌクレオソーム・ヒストンなどの構造と機能に関しては、ここ数十年間で膨大な研究の蓄積がある。最初に、本総説の主題に入る前に、真核細胞のクロマチン構造などについて、簡単な概説のみを記す[1-9]。クロマチンを構成する基本単位はヌクレオソームである。ヌクレオソームは塩基性蛋白質であるコアヒストンのサブタイプ H2A, H2B, H3, H4 の各2分子が集合したヒストン8量体と約200塩基対のDNAの複合体である。さらに、ヒストン8量体を約146塩基対のDNA鎖が約1.8回転巻き付いたヌクレオソームコアと巻き付いていないリンカーDNA(平均0~80塩基対の長さ)の複合体であり、直径が約10nm、厚さが約5nmの円盤型をしている。高等真核細胞では、リンカーヒストンH1(あるいはH5)がヒストン8量体とDNAが解離しないように外側に結合して、ヌクレオソーム構造を安定に保つ働きをしていると考えられている。このヌクレオソーム単位は、クロマチンを脱凝縮した後に電子顕微鏡で観察すると糸を通した数珠玉(ビーズ)状に見える。生殖細胞である精子などにはヒストンの代わりに同族のプロタミンが存在する。

クロマチンを構成する蛋白質としては、ヒストンの他に多種多様な非ヒストン蛋白質が存在する。長いDNA分子(ヒト核型の23対の染色体を1本に繋ぐと約1.6mの長さになる)は、コアヒストンの他にヒストンH1や非ヒストン蛋白質の助けを借りて規則的に折りたたまれ、より高次の規則正しいクロマチン構造として、狭い核(ヒトでは直径が約5 μ m)の中にパッケージング(収納)される。まず、約10nmの細い繊維状ヌクレオソームが並んで、6個のヌクレオソームで1回転する螺旋様の30nmクロマチン繊維(ソレノイド構造)になる。次に、この30nmクロマチン繊維は2万~10万塩基対から成るループ状ドメイン構造(平均サイズが約0.5 μ m)を形成する。さらに、このループ状構造は螺旋状に巻いて凝縮し、円筒状ソレノイド(直径が約0.8 μ m)を形成する。これは有糸分裂中期の姉妹染色分体に相当する。DNAがヌクレオソームを形成する段階は詳細に調べられて明白だが、それより高次の階層性の構築についてはいまだ不明な点が多い。

ヒストンは塩基性アミノ酸であるリシン(Lys)やアルギニン(Arg)残基に富んだ比較的分子量の小さい塩基性蛋白質である。原核細胞には存在せず真核細胞にのみ存在するため、この二種

類の細胞を区別する最有力蛋白質の1つである。さらに、ヒストンはクロマチンの構造を構成し維持するための最重要蛋白質であるため、次の2つの大きな特徴を持っている。1) そのアミノ酸配列は生物の進化過程で極めて安定的に保存されている。例えば、ヒストンH4のアミノ酸配列はウシとエンドウ豆では102個のアミノ酸残基の中で僅か2残基しか置換していない。ヒストンの中ではリンカー・ヒストンH1のアミノ酸配列は生物種間で保存性が比較的低い。さらに、ヒストンH1は下等真核細胞には存在せず高等真核細胞のみ存在するため、この2つを区別する最有力蛋白質の1つである。2) 各ヒストンサブタイプは細胞分裂に際して迅速かつ大量に必要なため、それぞれの遺伝子は多コピー存在する。酵母ではそれぞれ2コピー存在するのみであるが、生物種によっては、合計で数十～数千コピー存在する。多コピー存在する各ヒストンサブタイプの遺伝子の塩基配列は同一ではなく多少異なっている。その結果、生合成されたヒストンのアミノ酸配列は同じサブタイプでも僅かに異なっていることがあり、これをヒストン・バリエーションと言う。例えば、後述するニワトリのヒストンに関しては、H1, H2A, H2B, H3, H4それぞれの遺伝子は6, 10, 8, 11, 8コピー存在し、バリエーションとしては6, 3, 4, 2, 1種存在する。この事実はヒストン・バリエーションが上記のクロマチン構造維持機能と後で詳述するクロマチン構造変化を介した重要な細胞機能発現の制御機能などの他にも、バリエーション自体が遺伝子発現制御機能などを持っていることを示している。上述のように、クロマチン・クロモソーム・ヌクレオソーム・ヒストンなどの詳細な構造と機能に関しては膨大な数の成書があり、これらを参照されたい。

クロマチンの構造変化：

次に、正常な細胞機能発現に関わるクロマチン構造変化の重要性について概説する。1964年、アセチル基やメチル基によるヒストン分子の化学修飾がRNA合成(転写)の制御に深く関与するという事が初めて提唱されて以来[1]、クロマチン・トポロジー(構造)のモジュレーション(調節)は真核細胞の正常な細胞機能発現の制御にとって最も重要かつ基本的なイベント(方式)の1つであると考えられてきた。以来、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO化やADP-リボシル化などの化学的な翻訳後修飾によるクロマチン構造変化の調節は生命科学の様々な分野で継続して集中的に研究されている。これらのクロマチン構造のエピジェネティック(後成的)な翻訳後修飾(及びDNAの修飾)の中で、コアヒストンH2A, H2B, H3, H4の特定のLys残基のアセチル化とデアセチル(脱アセチル)化はクロマチン修飾酵素であるヒストンアセチル化酵素(HATs)とヒストン脱アセチル化酵素(HDACs)によって協調的に調節され、最も重要な制御方式の1つである[11-36]。従って、ここ数十年の間、アセチル化や脱アセチル化(他のエピジェネティックな化学修飾も含めて)に関する数え切れない研究が、より幅広い生命科学の研究分野(遺伝子発現、DNAの複製、修復、組み換え、発生、分化、記憶、多能性、臨床

医学、その他)で不断なく行われ、その成果が蓄積されている[37-48]。当然、周知のように、クロマチン構造変化がリンパ球の発生と分化にも深く関わっていることも多くの研究者によって報告されている[49-55]。また、Ikaros, PU.1, E2A, GATA-3, EBF, Pax5 などの転写因子がこのリンパ球の発生と分化に関与していることが明らかになっている[56-65]。さらに、IgM H-chain の遺伝子発現制御に USF, TFEB, Ig/EBP, NF-IL6, OCA-b などのプロモーター結合蛋白質や Ig/EBP, NF-IL6, YY-1, E2A, PU.1 などのイントロン・エンハンサー結合蛋白質が寄与していることも明らかにされている。

このようなクロマチン構造のエピジェネティックな化学的翻訳後修飾による細胞機能の発現制御についての膨大な研究を踏まえて、次のような第二の遺伝暗号とも称される仮説が提唱されている[21, 23, 25]。上述と一部重なる記述があるがその概略は次の通りである。コアヒストン H2A, H2B, H3, H4 の各 2 分子が会合した 8 量体に DNA が巻き付いて、クロマチン構造の基本構成単位であるヌクレオソームが形成される。ヒストンはこのような DNA を核内にパッケージングする第一義的な役割に加え、様々な因子の DNA へのアクセシビリティを調節することで、遺伝子発現制御においても重要な役割を果たす。ヒストンのメチル化やアセチル化などの様々な翻訳後修飾により、DNA や他の核蛋白質との相互作用が制御され、可逆的な遺伝子発現に影響を及ぼす。ヒストンのアミノ酸配列のどの部位の残基(主に Lys あるいは Arg)が化学修飾を受けるかによって、修飾されたクロモソーム近傍の遺伝子発現は活性化されるか抑制される。このようなヒストンの翻訳後修飾部位の組み合わせと遺伝子発現への影響をヒストン・コード仮説と言い、本仮説の詳細についても多くの成書があり、これらを参照されたい。

一方、遺伝暗号(コード: genetic code)とは、タンパク質(ペプチド)を構成する 20 種類のアミノ酸配列を決める核酸(DNA, mRNA)の塩基配列(4 種類のヌクレオチドの並び方:特に mRNA の塩基配列)のことであり、生体内で遺伝情報がタンパク質のアミノ酸配列へ翻訳(translation)される段階で、各アミノ酸に対応する 3 つの連続した塩基配列(トリプレット: triplet)をコドン(codon)と言う。DNA の二重らせん構造と共に、遺伝暗号は生命科学分野における最も基本的で重要な概念である。当然、この 2 つの概念に関しては、発見以来、膨大な数の専門書や啓蒙書がある。これらの成書や他の重要な多くの概念に関する上述の成書などを併せて紐解いて、生物(細胞)を構成する分子的基盤を理解し、神秘的でさえある精緻な生命現象の不可思議さ・美しさ・素晴らしさの拠って立つ科学的基盤を知って頂きたい。

ニワトリ DT40 細胞株におけるジーン・ターゲッティング法:

私共は、ニワトリ B リンパ球由来の細胞株であり、ホモロガス・リコンビネーション(相同組み換え)を高頻度に起す DT40 株を用い、ジーン・ターゲッティング法(ジーン・ノックアウト法、遺伝子破壊法)[66-68]を駆使して、ヒストン、ヒストン・シャペロン、HATs, HDACs, 転写因子

ファミリーの各メンバーの遺伝子の欠損変異株を系統的に多数作製した。得られた欠損変異株をそれぞれ解析して、各メンバー（蛋白質・酵素・因子）の機能を明らかにした。具体的な遺伝子破壊法や機能解析法などについては、本総説の文献として引用した私共のオリジナル論文を参照されたい。ここからは順次、得られた結果を詳細に記述する。

ニワトリ DT40 細胞株を用いたヒストン及びヒストン・シャペロンの機能解析：

上述したように、ニワトリのヒストン H1, H2A, H2B, H3, H4 それぞれの遺伝子は 6, 10, 8, 11, 8 コピー、バリエーションは 6, 3, 4, 2, 1 種存在する。このヒストン遺伝子の中、39 個は約 110 kb の 1 つのクラスターの中に局在している[9]。最初に、私共は、このニワトリ DT40 株を用いた遺伝子破壊法で、ヒストン及びヒストン・シャペロン遺伝子の欠損変異株を多数作製し、それぞれの機能を 2D-PAGE（二次元電気泳動法）など様々な実験手法で解析して、次のような結果を明らかにした[69-76]。

1) 特定のヒストン遺伝子が欠損しても、同じサブタイプの他の遺伝子の発現量が増加し、そのサブタイプのヒストン量を一定に保つ自己補償機能がある。2) 特定のコアヒストン・バリエーションが欠損すると、ある種の細胞内蛋白質の量が変化する。3) クラスターの約半分が欠損しても、生存には影響しないが幾つかの細胞内蛋白質の量が変化する。4) クラスターの 1 本のアレルが欠損しても、生存にも細胞内蛋白質の量にも影響しない。5) 5 コピーのヒストン H1 遺伝子が欠損しても、生存には影響しないが多種類の細胞内蛋白質の量が変化する。6) 6 コピーのヒストン H1 遺伝子のそれぞれが欠損すると、別々の細胞内蛋白質の量が変化する。7) 全ヒストン H1 遺伝子が欠損すると、変則的なヌクレオソームを形成する。8) 特定のヒストン・バリエーションがホモログス・リコンビネーションや DNA 損傷の修復に関与していることなどが示された。これらの結果は各ヒストン・バリエーションはクロマチン構造の構築の他に、遺伝子発現の制御などにも直接的に深く関与していることを示唆している。

同様に、遺伝子破壊法を用いて、クロマチンのアセンブリー（会合）に関与する 4 種類のヒストン・シャペロン(CAF-1, ASF1, HIRA, HAT1)遺伝子の欠損変異株を作製して、それぞれの機能を調べた。1) 細胞の生存に必須であること、2) 細胞分裂時や DNA 複製時にヌクレオソームやクロマチンの素早いアセンブリーに関与すること、3) 細胞周期を調節すること、4) DNA 損傷の回復やヒストン H3-H4 複合体の保持に関与することなどを明らかにした。これらヒストン・シャペロンの機能の詳細な結果に関しては、私共のオリジナル論文を参照されたい[75, 76]。

ニワトリ DT40 細胞株を用いた HATs と HDACs の各メンバーの機能解析：

クロマチン構造のエピジェネティックな翻訳後修飾は、上記のように多種多様であり、これらの化学修飾に関与する多種類のクロマチン修飾酵素が様々な生物種で多数存在し、それぞれ

多彩な機能を発揮する。コアヒストンの特定の Lys 残基のアセチル化と脱アセチル化を触媒する HATs と HDACs のメンバーも多数存在する。私共は DT40 株で遺伝子破壊法を用い、HAT ファミリーと HDAC ファミリー（いずれも更にサブファミリーに分類される）の各メンバーの遺伝子を欠損した変異株を系統的に作製し、各遺伝子の詳細な機能を種々の実験手法を用いて調べた[77-93]。これらの結果の要約は次の通りである。HAT ファミリーに関しては、1) GCN5 は多種多様な機能を持っており、細胞周期、アポトーシス、PI3K/Atk survival pathway, superoxide-generating system, 紫外線照射・抵抗性、Blimp-1 合成、プロテイン・キナーゼ合成、小胞体ストレス、IgM H-chain 合成などに、それぞれに係わる遺伝子の発現を制御することを介して関与している。2) PCAF は Bcl-6 や Pax5 などの転写因子の遺伝子発現や分泌型免疫グロブリン合成の制御に関与している。3) TIP60 は細胞の生存に必須である。4) HAT1 は上記のようにヒストン H3-H4 複合体を保持する機能を持つ。HDAC ファミリーに関しては、1) HDAC2 は IgM H-chain と L-chain の遺伝子の発現制御に深く関与しており、その詳細については後述する。2) HDAC3 は細胞の生存に必須であり、アポトーシスの進行に関与している。3) SIRT1/2 はストレス・トレランスに関与している。ニワトリの他の HAT 及び HDAC メンバーの機能は作製済の欠損変異株の解析が進んでいないため、まだ不明である。多くの生物種の多数のクロマチン修飾酵素の機能については膨大な数の研究があり、他の専門書などの成書を参照されたい。

ニワトリ DT40 細胞株での IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現制御：

上記のように、私共はクロマチンのエピジェネティック化学修飾の中で、最も重要なヒストンのアセチル化と脱アセチル化を触媒する HAT と HDAC ファミリーの各メンバーの機能を、ニワトリ DT40 細胞株で遺伝子破壊法を駆使して、それぞれの遺伝子の欠損変異株を系統的に作製し、様々な実験手法(2D-PAGE, RT-PCR, Northern blotting, Western blotting, FACS analysis, RNase protection assay など)を駆使して解析した。最初に、HDAC1 と HDAC2 の各欠損変異株（以後 HDAC1(-/-)と HDAC2(-/-)と記す）と DT40 野生株の全細胞内蛋白質を 2D-PAGE で比較・解析した[77]。HDAC1(-/-)と DT40 のメジャーな細胞内蛋白質の泳動パターンに大差がなかった。一方、HDAC2(-/-)と DT40 のメジャーな細胞内蛋白質の泳動パターンに大きな違いが認められた。HDAC2(-/-)では分子量の大きな1つの蛋白質スポットと分子量の小さな2つの蛋白質スポットが劇的に増加していた。変化したこれらの蛋白質のアミノ酸配列決定の結果から、分子量の大きい蛋白質は IgM H-chain、分子量の小さい2つの蛋白質は IgM L-chain であることが判明した。この結果は Western blotting でも確認できた。すでに他のグループにより、IgM H-chain mRNA（メッセンジャー RNA）は、まず pre-mRNA（前駆体 mRNA）として転写され、引き続いて、alternative splicing（選択的スプライシング）の過程を経て、secreted form（分泌型）と membrane-bound form（膜結合型：BCR）の2つの mature（成熟型）な IgM H-chain mRNAs に成ることは明らかにな

っていた。HDAC2(-/-)の全 RNAs を Northern blotting や RNase protection assay で調べた結果、HDAC2 は IgM H-chain 量を転写と選択的スプライシングの 2 つのステップで抑制的に制御していることを明らかにした。

次に、HAT と HDAC ファミリーの他のメンバーの IgM H-chain と L-chain 遺伝子発現への影響を調べた[84]。これら 2 つの遺伝子発現は GCN5(-/-)では僅かに減少し、PCAF(-/-)では僅かに増加していた。一方、HDAC3(-/-), HDAC4(-/-), HDAC7(-/-), HDAC4(-/-)/7(-/-), SIRT1(-/-), SIRT2(-/-), HAT1(-/-), MOZ(-/-), MORF(-/-), MOZ(-/-)/MORF(-/-), TIP60(-/-)などでは変化が認められなかった。これらのデータは、HDAC2 が IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現を主に制御していることを強く示している。

引き続き、HDAC2(-/-)の幾つかの性質を検討した[84]。HDAC2 欠損に伴って増加した IgM H-chain と L-chain は互いに結合した高分子複合体を形成して存在し、その量が分泌能力をはるかに超えるため、HDAC2(-/-)の小胞体に蓄積していた。また、コアヒストンの Lys (K)残基のアセチル化レベルを調べた。DT40 と比べて、HDAC2(-/-)では、K7/H2A は約 140%に増加し、K16/H2B は約 50%に減少し、K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 はそれぞれ約 290%, 285%, 185%, 240%, 165%に増加し、K5/H4 は約 170%に増加していた。

さらに、ヒストン、HAT、HDAC、転写因子の各メンバーの遺伝子発現量を DT40 と HDAC2(-/-)で調べた[84]。コアヒストンに関しては、H2A, H2B, H3, H4 の遺伝子発現は変化なく、HATs に関しては、PCAF の遺伝子発現は劇的に増加し、HDACs に関しては、HDAC4 と HDAC5 の遺伝子発現は増加し、HDAC7 の遺伝子発現は低下していた。転写因子に関しては、E2A の遺伝子発現は増加し、Pax5, EBF1, Aiolos, Ikaros の遺伝子発現は低下していた。これらのデータは、上述の HDAC2 以外の HAT と HDAC メンバーは IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現に深くは関わっていないというデータと併せて、転写因子 Pax5, EBF1, E2A, Aiolos, Ikaros などが、2 つの免疫グロブリン遺伝子の発現制御に重要であることを強く示唆している。

これらの結果に基づいて、各転写因子の IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現制御への関与を調べるために、各遺伝子の欠損変異株、Pax5(-), EBF1(-/-), E2A(-/-), Aiolos(-/-), Helios(-/-), Ikaros(-/-/+)などを作製した[84, 94-98]。上述のように、ニワトリの Pax5 遺伝子はモノソミーの Z sex chromosome に存在するので、one allele をノック・アウトしただけでホモ欠損変異株が作製でき、Ikaros 遺伝子はトリソミーの chromosome 2 に存在するので、two alleles をノック・アウトしてもヘテロ欠損変異株しか作製できなかった[99, 100]。Helios(-/-)では IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現に変化がなかった。Pax5(-), Aiolos(-/-), EBF1(-/-), Ikalos(-/-/+)では程度の差はあっても、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現は増加した(図-1E)。一方、E2A(-/-)では IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現は減少した。これらのデータは Pax5, Aiolos, EBF1, Ikaros は IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現を抑制すること、逆に、E2A はこの 2 つの遺伝子発現を促進することを示してい

る。また、私共は別の実験で OBF1 が免疫グロブリン遺伝子の発現を促進することも明らかにした[101]。さらに、HDAC2(-/-), Pax5(-), EBF1(-/-), E2A(-/-), Aiolos(-/-), Ikaros(-/-/+) 以外の私共が作製した HAT、HDAC、ヒストン、ヒストン・シャペロンそれぞれのファミリーの各メンバーの欠損変異株 (約 30 種) では IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質レベルに変化が認められなかった。

以上の結果から、DT40 野生株では、HDAC2 はスーパーバイザーとして、Pax5, Aiolos, EBF1, Ikaros の遺伝子発現の抑制と E2A, OBF1 の遺伝子発現の促進という逆方向の 2 つの制御機構を介して、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現を包括的に制御していることが明らかになった (図 1-W) [84]。

転写因子 E2A, Aiolos, Helios, EBF1, Pax5 の機能解析：

転写因子はほぼ全ての生物種で多種多様に存在し、それぞれ単独または協調して、様々な遺伝子の発現をポジティブまたはネガティブに制御し、生命活動を維持している。E2A, Aiolos, Helios, EBF1, Pax5 の機能を上記の各欠損変異株 E2A(-/-), Aiolos(-/-), Helios(-/-), EBF1(-/-), Pax5(-) を用いて調べて、次のような結果を得た[84, 94-98]。E2A は survivin, IAP2, caspase-8 の遺伝子発現を制御することを介して、BCR シグナリングが介在する immature B 細胞(DT40)のアポトーシスを微調節する。Aiolos 欠損はチトクローム c の遊離を促進することを介して、BCR シグナリングが介在する immature B 細胞のアポトーシスを加速する。Helios は protein kinase Cs の遺伝子発現を制御することを介して、immature B 細胞の機能を調節する。EBF1 は immature B 細胞で Blimp-1 遺伝子発現の強力な repressor として機能する。さらに、EBF1 は immature B 細胞で protein kinase C θ の遺伝子発現を GCN5 とは逆方向に制御する。Pax5 には A タイプと B タイプがあり、この 2 つは immature B 細胞で B cell development-related genes の遺伝子発現制御において異なる作用をする。

E2A, Aiolos, Helios, EBF1, Pax5 は DT40 株で他の遺伝子の発現にも関わっており、さらに他の細胞や生物種においても多くの遺伝子の発現制御に関与していることは当然である。もちろん、多種類存在する転写因子はあらゆる細胞や生物種で多種多様な遺伝子の発現を多彩に制御する機能を持っている。転写因子に関しては、膨大な数の研究が行われており、多くの成書があり、これらを参照されたい。

HDAC2(-/-) DT40 変異株での HDAC2 遺伝子の再発現実験の試み：

IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現制御における、HDAC2 の役割をさらに詳細に解析するために、再発現 (再構成) 実験を試みた。HDAC2(-/-) DT40 変異株に tetracycline- (tet-) repressive HDAC2 cDNA を導入して、内在性の(endogenous) HDAC2 の two alleles を欠失し、

tet-repressive HDAC2 cDNA を持つ HDAC2(-/-)tetHDAC2(+)変異株を作製した。この変異株においては、tetracycline 存在下で HDAC2 cDNA の転写は抑制されるため、HDAC2 酵素は存在しない。一方、tetracycline 非存在下では HDAC2 cDNA が転写されるため、HDAC2 酵素が存在する。したがって、この HDAC2(-/-)tetHDAC2(+)では、tetracycline 存在下では、HDAC2(-/-)と同様に、IgM H-chain と L-chain 遺伝子が発現し、tetracycline 非存在下では、DT40 と同様に、IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現が抑制されることが想定される。ところが、私共の予想に反して、HDAC2(-/-)tetHDAC2(+)において、野生株 DT40 及び tetracycline 非存在下で HDAC2 酵素が存在する場合と同様に、tetracycline 存在下で HDAC2 酵素が存在しない場合も、IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現は抑制されていた。すなわち、HDAC2 酵素の存在・非存在に関わらず、HDAC2(-/-)tetHDAC2(+)において、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現はほぼ認められなかった。

培養を繰り返した HDAC2(-/-) DT40 変異株での IgM H-chain と L-chain の蛋白質量の低下：

常法にしたがって、作製した種々の遺伝子の欠損 DT40 変異株は次の実験まで液体窒素（あるいは -80 °C）で保存した。ある実験に用いた DT40 変異株の一部は次の実験まで保存操作を繰り返した。培養を数回繰り返した後、HDAC2(-/-)の全細胞内蛋白質を 2D-PAGE で分析した。予想に反して、IgM H-chain と L-chain のスポットは DT40 野生株とほぼ同じレベルまで減少していた。この結果は、HDAC2(-/-)の全 RNAs を RT-PCR で分析して得られた IgM H-chain と L-chain のバンドが減少した結果とも一致した。一方、培養を繰り返していない別の HDAC2(-/-) clones の全蛋白質と全 RNAs を 2D-PAGE と RT-PCR で分析したところ、IgM H-chain と L-chain のスポットとバンドは減少しないことが確認できた。この結果は、HDAC2(-/-)を長期間培養すると IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現が低下することを示すと共に、上記の HDAC2(-/-)tetHDAC2(+)では、HDAC2 の有無に関わらず、IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現が抑制されるのは、この DT40 変異株の作製時に長期間培養したためであることを示唆する。

上記の私共の結果から、HDAC2 はスーパーバイザーとして、Pax5, EBF1, Aiolos, Ikaros, E2A, OBF1 などの遺伝子発現をポジティブまたはネガティブに調節することによって、IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現を制御することが明らかになった[84]。さらに、この結果は HDAC2(-/-)を長期間培養すると、何らかの重要な未知のメカニズムによって、蓄積した大量の IgM H-chain と L-chain が劇的に減少することも強く示唆している。

ここから、高等真核細胞が温和な環境変化に初めて遭遇した時に、多世代を通じてエピジェネティックな化学修飾によってクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することによって、この環境変化に適応するかまたは克服するために、プログラム化されていない新たな細胞機能

を獲得するバイオ・システムに関する本総説の主題に移る[102-111]。

HDAC2(-/-) DT40 変異株を長期間培養すると IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現(mRNA) レベルと蓄積した蛋白質量は多世代を通して劇的に減少する：

前述のように、HDAC2(-/-)の培養を数回繰り返すと、細胞内に蓄積した大量の IgM H-chain と L-chain 量は劇的に減少する。このデータは定性的ではあるが、極めて興味深い現象である。したがって、このデータの確認も兼ねて、長期連続培養期間に HDAC2(-/-)の諸性質が変化するかどうかを調べた。

最初に、HDAC2(-/-)の細胞内蛋白質レベルが長期培養期間に変化するかどうかを調べた。培養期間の初期 (~10 日目) (E; early)、中期 (~30 日目) (M; middle)、後期 (~60 日目) (L; later) ステージの HDAC2(-/-)から全蛋白質を単離し、コントロールの野生株 DT40 の全蛋白質と 2D-PAGE を用いて比較した (図-2) [102, 103]。初期ステージでは、前述の結果と同様に、IgM H-chain (分子量の大きなスポット) と L-chain (分子量の小さな 2 スポット) は劇的に増加していた。中期ステージでは、この 2 つの免疫グロブリンの蛋白質量はかなり減少していた。後期ステージでは、IgM H-chain と L-chain 量はさらに減少し、DT40 株とほぼ同じレベルであった。一方、長期培養期間を通して、他のほとんどのメジャーな細胞内蛋白質のレベルに変化は認められなかった。さらに、別の HDAC2(-/-) clones でも同様の結果が得られた。これらの結果は、HDAC2 欠損に伴って蛋白質量が増加すること及び HDAC2(-/-)の長期培養期間で減少することは、IgM H-chain と L-chain に特徴的な現象であることを示している。

次に、長期培養期間 (~56 日まで) の任意の数ステージの HDAC2(-/-)から単離した全細胞内蛋白質を IgM L-chain の特異抗体(IgM H-chain とも交叉反応する)を用いた Western blotting で分析した (図-3) [102, 103]。初期ステージでは、IgM H-chain (分子量の大きな 1 つのバンド) と L-chain (分子量の小さな 2 つのバンド) の量は DT40 株の量と比較べて劇的に増加していた。培養期間が長くなるに伴って、各ステージでの 2 つの蛋白質量は徐々に減少し、後期ステージ (~56 日目) では、DT40 株とほぼ同じレベルになった。この結果も別の HDAC2(-/-) clones でも確認できた。

さらに、初期と後期ステージでの HDAC2(-/-)を IgM H-chain の特異抗体を用いた免疫組織化学的手法で調べた。電子顕微鏡観察で、IgM H-chain (electron-dense materials として)は、初期ステージの小胞体のみで局在が認められ、後期ステージでは DT40 株と同様に認められなかった。また、免疫電子顕微鏡観察で、IgM H-chain (colloidal gold immune-labeling として)は、同様に初期ステージの小胞体のみで蓄積が認められ、蓄積した IgM H-chain は後期ステージでは、DT40 株とほぼ同じレベルまで減少していた (図-4) [102, 103]。

以上の結果は、IgM H-chain と L-chain は HDAC2(-/-)の培養の初期ステージでは劇的に蓄積

し、この蓄積した 2 つの免疫グロブリンは長期培養期間を通して漸次減少し、後期ステージでは DT40 株とほぼ同レベルになることを示している。さらに、蓄積した IgM H-chain と L-chain は可溶性で互いに結合した高分子複合体を形成して小胞体に存在することも示している。

次に、HDAC2(-/-)の長期培養期間における IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現パターンの変化を調べた。長期培養の初期 (~20 日目)、中期 (~40 日目)、後期 (~60 日目) ステージでの 3 つの HDAC2(-/-) clones と DT40 株から全 RNAs を単離した。IgM H-chain mRNA の完全型(whole form)、分泌型(secreted form)、膜結合型(membrane-bound form)と L-chain mRNA に特異的なプライマー(primers)を用いた RT-PCR で分析した (図-5) [102, 103]。明らかに、完全型と分泌型 IgM H-chain mRNA は初期ステージで増加し、中期を経て後期ステージで劇的に減少していた。膜結合型 IgM H-chain mRNA と L-chain mRNA の変化は僅かであった。

以上の結果は、HDAC2 欠損による IgM H-chain と L-chain 量の劇的な増加は、その遺伝子発現の促進に基づくこと、さらに、HDAC2(-/-)の連続培養期間に IgM H-chain と L-chain 量が減少するのは、これらの遺伝子発現が多世代を通して抑制されることに基づくことを示している。

HDAC2(-/-) DT40 変異株の長期培養期間のヒストン、HAT、HDAC、転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現パターンの変化：

引き続き、HDAC2(-/-)の長期培養期間におけるコアヒストン、HAT、HDAC、転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現パターンの変化を調べた[102, 103]。上記の実験と同じ培養初期、中期、後期ステージの HDAC2(-/-)と DT40 の全 RNAs を各メンバーに特異的なプライマーを用いた RT-PCR で分析した。その結果、コアヒストン H2A, H2B, H3, H4 の遺伝子発現は、HDAC2(-/-)の長期培養期間を通して変化が認められなかった (図-5)。HATs と HDACs に関しては次の通りであった (図-6A)。PCAF の遺伝子発現は初期から後期ステージまで劇的に増加した。HDAC7 の遺伝子発現は初期ステージで幾らか減少し、その後は後期ステージまで変化しなかった。HDAC9 (以前の HDAC5) の遺伝子発現は初期から中期ステージまでは劇的に増加し、後期ステージでは幾らか減少した。転写因子に関しては次の通りであった (図-6B)。E2A の遺伝子発現は初期ステージで幾らか増加し、その後、中期と後期ステージではほぼ変化しなかった。EBF1 の遺伝子発現は初期ステージでほぼ完全に消失し、その後、中期と後期ステージでは全く変化しなかった。Aiolos の遺伝子発現は初期ステージで少し減少し、その後も、中期から後期ステージまで僅かに減少した。極めて興味深いことに、Pax5 の遺伝子発現は初期ステージでかなり減少し、その後は、中期を経て後期ステージまで明らかに増加した。一方、分析した他のメンバーの遺伝子発現パターンに大きな変化は認められなかった。

以上の結果は、HDAC2 欠損に伴って、HAT, HDAC、転写因子ファミリーの数種の特定メンバーの遺伝子発現は変化すること、さらに、これらの遺伝子発現は、HDAC2(-/-)の長期連続培

養期間の多世代を通して、増加したり、減少したり、変化しなかったりと極めて複雑であることを示している。

HDAC2(-/-) DT40 変異株の長期培養期間のコアヒストンの Lys 残基のバルクのアセチル化レベルの変化：

HDAC2(-/-)の長期培養期間のコアヒストン H2A, H2B, H3, H4 の多数の Lys(K)残基のバルク(bulk)のアセチル化レベルの変化を、培養の初期 (~20 日目)、中期 (~40 日目)、後期 (~60 日目) ステージにおける 3 つの HDAC2(-/-) clones と DT40 から全 RNAs を単離し、多数のアセチル化とメチル化 Lys 残基の特異抗体(~18 種)を用いた immuno-blotting で比較した (図-7) [102, 103]。H2A に関しては、K7/H2A のアセチル化レベルは HDAC2(-/-)の長期培養期間に僅かに変化した。H2B に関しては、K16/H2B のアセチル化レベルは初期ステージで明らかに減少し、その後、後期ステージまで変化しなかった。H3 に関しては、K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルは初期ステージから中期を経て後期ステージまで劇的に増加した。H4 に関しては、K5/H4 のアセチル化レベルは初期ステージで増加し、その後、後期ステージまで変化しなかった。一方、分析した他の Lys 残基のアセチル化とメチル化レベルには大きな変化は認められなかった。これらの結果は、脱アセチル化活性を持つ HDAC2 の欠損にも関わらず、変化した Lys 残基の中で、K16/H2B 以外はアセチル化レベルが予想に反して増加したことを示しており、その理由は極めて興味深い但未だ不明である。

ニワトリ Pax5 遺伝子の~4.9 kb 5'-近傍上流断片(proximal ~4.9 kb 5'-upstream fragment)のクローニング：

上述のように、HDAC2 は、Pax5, EBF1, Aiolos, Ikaros, E2A, OBF1 などの遺伝子発現をポジティブ又はネガティブに調節することを介して、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現を間接的に一括して制御する。さらに、上記及び後記するように、Pax5(-)でこの 2 つの免疫グロブリン遺伝子の発現が劇的に増大することは、これらの転写因子の中で、Pax5 が IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現制御に最も重要な役割を担っていることを示している。従って、Pax5 遺伝子の発現制御機構を明らかにすることは極めて重要であり、そのためには 5'-近傍上流域の塩基配列やクロマチン構造に関する情報は必須である。しかし、私共が本研究を開始した時に、ニワトリの EBF1, Aiolos, Ikaros, E2A, OBF1 遺伝子の 5'-上流域の塩基配列は決定済であったが、Pax5 遺伝子の 5'-上流域の塩基配列の情報は明らかでなかったため、まず Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流域断片のクローニングを行った。

常法に従って、最初に、ニワトリの染色体 DNA ライブラリー(genomic DNA library)をスクリーニングして、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流域断片のクローニングを数回試みたが、いずれも成

功しなかった。ライブラリーからのクローニングの不成功とそれまで Pax5 遺伝子の 5'-上流域の塩基配列が未決定だった理由としては、他の chromosomes に存在する Pax5 ホモログの 5'-上流域の塩基配列は決定済だったのに、Pax5 遺伝子はモノソミーの Z sex chromosome に存在し、コピー数が少ないためと考えられる。次に、サザン・ブロッティング、コロニー・ハイブリダイゼーション、サブクローニング(Southern blotting, colony hybridization, sub-cloning)などを用いた独自の染色体ウォーキング(歩行)法(gene walking techniques)を駆使して、DT40 染色体 DNA (DT40 genomic DNA) から、Pax5 遺伝子の~4.9 kb 5'-近傍上流域断片(proximal ~4.9 kb 5'-upstream fragment)を直接クローニングすることに成功した。その塩基配列を決定し、Pax5 5'-近傍上流域断片が 4950 bp 5'-upstream fragment と 241 bp open reading frame を含むことを明らかにした(GenBank accession number: LC060666)。

次に、この Pax5 proximal ~4.9 kb 5'-upstream fragment の 5'-欠失変異ベクターと 3'-欠失変異ベクター(5'-deletion and 3'-deletion mutant vectors)を多数作製し、DT40 と Hela 細胞でルシフェラーゼ・アッセイ(Dual-luciferase assay)を用いて、発現制御部位の有無を調べた。定性的データではあるが、少なくとも 1.6 kb 5'-近傍上流域までに Pax5 遺伝子の発現制御に関わる 2 つの部位が存在することが示唆された。

HDAC2(-/-) DT40 変異株の長期培養期間の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流クロマチン領域における K9/H3 のアセチル化レベルの変化：

一般的に、特定の遺伝子の 5'-近傍上流域のクロマチン構造(proximal 5'-upstream chromatin structure)は、その領域内に転写制御部位の存在・非存在に関わらず、当該遺伝子の発現に直接的かつ密接に関与する。また、上記のように、Pax5 遺伝子の少なくとも~1.6 kb 5'-近傍上流域のクロマチン構造は Pax5 遺伝子の発現制御に関与していることが示唆された。さらに、HDAC2(-/-)の培養の初期ステージで Pax5 遺伝子の発現は劇的に低下し、その後、後期ステージまで劇的に増加することを明らかにした。

Pax5 遺伝子の発現制御に関連して、HDAC2(-/-)の長期培養期間に、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流域のクロマチン構造が変化するかどうかを、アセチル化 K9/H3 の特異抗体と Pax5 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流域を短い断片に増幅できる多数のプライマーを用いて、クロマチン免疫沈殿法(chromatin immuno-precipitation assay: ChIP)で調べた[102, 103]。ChIP アッセイ法の詳細については後述するが、初期と後期ステージでの 3 つの HDAC2(-/-) individual clones のクロマチンを分析した(図-8)。HDAC2(-/-)では、Pax5 遺伝子の proximal ~2.0 kb 5'-upstream chromatin region の K9/H3 のアセチル化レベルは初期ステージで減少し、後期ステージで増加していた。このデータは HDAC2(-/-)の長期培養期間の Pax5 遺伝子の発現パターンの変化とほぼ一致した。

Pax5(-) DT40 変異株の長期培養期間の IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質レベルの変化：

上記のように、Pax5 は HDAC2 による IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現制御機構に関与する最も重要な転写因子である。Pax5(-)の長期培養期間において、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質レベルがどのように変化するかを調べた。最初に、培養の最初期(~4 日目)(F; first)、初期(~8 日目)、中期(~13 日目)、後期(~20 日目)の各ステージ (これらのステージ名は HDAC2(-/-)のケースより短い) での 3 つの Pax5(-) individual clones から全 RNAs を単離し、IgM H-chain と L-chain 遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT-PCR で分析した (図-9) [102, 104]。完全型(whole form)と分泌型(secreted form)の IgM H-chain mRNAs は最初期ステージで劇的に増大し、初期と中期ステージを通して減少し、後期ステージでは DT40 とほぼ同レベルまで減少した。膜結合型(membrane-bound form) IgM H-chain mRNA と IgM L-chain mRNA は最初期ステージでかなり増大し、その後、初期と中期ステージを通して僅かに減少し、後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルまで減少した。

次に、初期、中期と後期ステージでの Pax5(-)から全細胞内蛋白質を単離し、IgM H-chain と L-chain の特異抗体を用いた Western blotting で分析した (図-10) [102, 104]。IgM H-chain と L-chain (2 バンド)は初期ステージで劇的に増大し、中期を経て後期ステージでは DT40 とほぼ同レベルまで減少した。電子顕微鏡観察の結果、IgM H-chain (electron-dense materials として)は初期ステージの小胞体のみで局在し、後期ステージ及び DT40 株では認められなかった。同様に、免疫電子顕微鏡観察の結果、IgM H-chain (colloidal gold immune-labeling として)は、初期ステージの小胞体のみで蓄積し、後期ステージでは DT40 株とほぼ同レベルまで減少していた。これらの結果は 2D-PAGE でも確認できた。また、初期ステージの Pax5(-)の一部の形態は成熟型リンパ細胞様として観察され、後期ステージでは DT40 と同様の通常型形態に変化したように観察された。さらに、初期と後期ステージの Pax5(-)は、後述する HDAC2(-/-)とは異なって、DT40 と同じ様に分散した形態で存在していた (図-11) [102, 104]。

Pax5(-) DT40 変異株の長期培養期間の HAT, HDAC、転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現レベルの変化：

引き続き、Pax5(-)の長期培養期間の HAT、HDAC、転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現パターンの変化を調べた (図-12) [102, 104]。上記の実験と同じ培養の最初期、初期、中期、後期ステージの Pax5(-)と DT40 の全 RNAs を各メンバーに特異的なプライマーを用いた RT-PCR で分析した。HAT と HDAC の各メンバーに関しては(図-12A)、PCAF と HDAC9 の遺伝子発現は培養の最初期ステージから増大し始め、初期と中期ステージを経て、後期ステ

ージで劇的に増大した。一方、HDAC7 の遺伝子発現は最初期ステージで減少し、その後は漸次増加して、後期ステージで DT40 とほぼ同レベルまで増加した。転写因子の各メンバーに関しては(図-12B)、Aiolos と OBF1 の遺伝子発現は最初期ステージから減少し、初期と中期を経て、後期ステージで DT40 と同じように検出できないレベルまで減少した。Ikaros, E2A, Blimp-1 の遺伝子発現は最初期ステージで劇的に増大し、初期と中期ステージで漸次減少し、後期ステージで DT40 と同レベルまで減少した。EBF1 の遺伝子発現は最初期ステージで劇的に減少し検出できないレベルになり、その後は、初期、中期と後期ステージで変化しなかった。PU.1 の遺伝子発現は最初期ステージで劇的に減少し、初期と中期ステージを通して漸次増加し、後期ステージで DT40 より高いレベルまで増加していた。

以上の Pax5(-)の長期培養期間の IgM H-chain と L-chain や HAT, HDAC、転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現パターンの変化は、HDAC2(-/-)の長期培養期間のそれぞれの発現パターンの変化よりも明らかに早く起きていた。この結果は、種々の遺伝子発現制御の過程で、Pax5 や他の転写因子は、HDAC2 や他のクロマチン修飾酵素よりも下流で関与していることに基づくことを示している。さらに、HDAC2(-/-)と Pax5(-)では多数のクロマチン修飾酵素や転写因子の遺伝子発現パターンが異なっており、この 2 つの変異株の様々な性質や機能が明らかに異なることも示している。

ここからは、HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローン(individual clones)において、HDAC2 欠損に伴って劇的に増大した IgM H-chain と L-chain が、長期連続培養期間の多世代を通して、それぞれ異なる方法で劇的に減少する想定外の極めて興味深い話題に移る。

HDAC2(-/-) DT40 変異株の再度の作製：

上記の HDAC2(-/-)の長期培養期間（特に初期ステージ）における、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現や蛋白質レベル及びクロマチン修飾酵素や転写因子の遺伝子発現の変化などの実験データには、かなりの曖昧さ・不確かさが存在する。その最大の理由は、異なる期間培養した HDAC2(-/-)をそれぞれ種々のタイムコース実験に用いたため、各ステージ（特に初期ステージ）にばらつきがあって一定していないためである。従って、上記の極めて興味深い諸々の現象をさらに詳細に解析することにした。多種多様なタイムコース実験に用いる HDAC2(-/-)としては、培養期間の同じステージの大量の細胞数が必要であること、可能な限り早い初期ステージの細胞が必要であること、多くの独立したクローン(independent clones)が必要であることなどである。そこで、常法に従って、前回とは異なる 2 つのターゲティング・ベクターを用いた遺伝子破壊法を新たに実施した（図-13）[102, 105, 108, 109]。ニワトリ HDAC2 の genomic DNA は 16 エクソン(exons)(以前の論文では 14 エクソンと報告)で構成されていた。Southern blotting, Western blotting, RT-PCR などで調べた結果、28 個の独立した HDAC2(-/-) individual clones

が作製できたことを確認した。ここから後は、28個の individual clones から無作為に選んだ6個の HDAC2(-/-) individual clones (cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6)の様々な性質の長期培養期間の変化パターンの詳細な解析結果を記す。

HDAC2(-/-) DT40 individual clones の長期培養期間の IgM H-chain と L-chain の蛋白質量及び mRNA 量の変化：

最初に、上記の6個の HDAC2(-/-) individual clones の IgM H-chain と L-chain の蛋白質量が長期培養期間に変化するかどうかを大まかに検討した (図-13C) [102, 105, 108, 109]。培養の初期(E: ~3日目)、中期(M: ~29日目)、後期(L: ~53日目)ステージの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 と野生株 DT40(W)から全細胞内蛋白質を単離し、IgM L-chain の特異抗体(H-chain と交叉反応する)を用いた Western blotting で分析した (詳細は後述)。初期ステージの6つの HDAC2(-/-) individual clones で、IgM H-chain の蛋白質量は DT40 と比べて明らかに増大し、2種の L-chain (2つのバンド) の蛋白質量も DT40 と比べて増大した。培養を続けると、全ての individual clones で、IgM H-chain と L-chain の蛋白質量は中期を経て後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルまで減少した。

次に、HDAC2(-/-) individual clones で IgM H-chain と L-chain の mRNA 量が長期培養期間に変化するかどうかを大まかに検討した (図-13D) [102, 105, 108, 109]。培養の初期(~7日目)、中期(~33日目)、後期(~64日目)ステージの6つの HDAC2(-/-) individual clones と DT40 から全 RNAs を単離し、IgM H-chain 及び L-chain の特異的プライマーを用いた RT-PCR で分析した。完全型(whole form)と分泌型(secreted form)の IgM H-chain mRNA 量は初期ステージで増大し、中期を経て後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルまで減少した。膜結合型(membrane-bound form)の IgM H-chain mRNA 量は、clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 では、培養期間に明らかな変化はなく、clone cl.2-1 では、中期を経て後期ステージで約 50%まで減少した。6つの HDAC2(-/-) individual clones の IgM L-chain mRNA 量は、培養の全ステージを通して僅かに変化するかあるいは変化しなかった。

新たに作製した全ての HDAC2(-/-) clones で、長期培養期間の初期ステージで増加した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量及び mRNA 量が中期を経て後期ステージまで減少したという上記のデータは、最初に作製した HDAC2(-/-)の既述のデータと大筋で一致した。この結果を踏まえて、新たに作製した HDAC2(-/-) individual clones の長期培養期間における、IgM H-chain と L-chain の蛋白質量及び遺伝子発現レベルの他に、HAT, HDAC, 転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現やその他の様々な性質の変化パターンを順次詳細に解析した。

全ての HDAC2(-/-) DT40 individual clones で IgM H-chain と L-chain の蛋白質レベルは長期培

養期間にほぼ同じパターンで減少する：

最初に、長期培養期間に、HDAC2(-/-) individual clones で IgM H-chain と L-chain の蛋白質レベルが変化するかどうかを詳細に調べた(図-14) [102, 105, 108, 109]。培養の初期(~3日目)、中期(~29日目)、後期(~53日目)ステージの他、幾つかの中間ステージにおける6個のHDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 と野生株 DT40 から全細胞内蛋白質を単離した。IgM L-chain 特異抗体(H-chain と交叉反応する)と H-chain 特異抗体の2つを用いた Western blotting で順次分析した。上記のように、IgM H-chain は分子量の大きな1種類の蛋白質として存在するが、2つの特異抗体と反応するので、同じ IgM H-chain 蛋白質を別々の感度で検出できる。一方、IgM L-chain は分子量の小さい2種類の蛋白質として存在するので、その特異抗体で分子量の小さい接近した2バンドとして検出できる。

培養の初期ステージで、HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 全てにおいて、分子量の大きな IgM H-chain (2つのバンドで示した) の蛋白質レベルは、DT40 と比較して劇的に増大した。一方、全ての HDAC2(-/-) individual clones において、2種類の L-chain (2つのバンド) の蛋白質レベルは、DT40 と比較してかなり増大した。予想通りであるが極めて興味深いことは、培養を続けると、6つの HDAC2(-/-) individual clones 全てにおいて、増大した IgM H-chain と L-chain の蛋白質レベルは、中期を含めた中間の各ステージを通して漸次減少し、最終的に、後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルまで減少した。この結果は、HDAC2 欠損に伴って初期ステージで劇的に増大した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量は、6つの HDAC2(-/-) individual clones 全てにおいて、ほぼ同じ変化パターンで減少し、最終的には野生型 DT40 とほぼ同じレベルに落ち着くことを示している。

HDAC2(-/-) DT40 individual clones のクロマチン修飾酵素(HATs, HDACs)及び転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現レベルは長期培養期間に異なるパターンで変化する：

次に、長期培養期間に、6個の HDAC2(-/-) individual clones で HAT, HDAC 及び転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現が変化するかどうかを詳細に調べた(図-15)。培養の初期(~7日目)、中期(~33日目)、後期(~64日目)ステージの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 と野生株 DT40 から全 RNAs を単離した。HAT, HDAC 及び転写因子の各メンバーに特異的なプライマーを用いた RT-PCR で分析した [102, 105, 108, 109]。HATs と HDACs に関しては(図-15A)、長期培養期間、これら6つの HDAC2(-/-) individual clones で、PCAF, HDAC7, HDAC9 の各 mRNA レベルは劇的に変化した。他の多くのメンバーの mRNA レベルは変化しないか僅かに変化したのみであった。転写因子に関しては(図-15B)、長期培養期間、これら6つの HDAC2(-/-) individual clones の1つあるいは複数の clones で、Pax5, Aiolos, EBF1, E2A, PU.1, Blimp1, OBF1 の各 mRNA レベルは明らかに変化した。他の多

くのメンバーの mRNA レベルに明白な変化は認められなかった。

興味深いのは、変化した HAT, HDAC 及び転写因子の各メンバーの遺伝子発現パターンの違いに基づいて、これら 6 つの HDAC2(-/-) individual clones は 3 つの異なるタイプ、すなわち、clone cl.2-1 と clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5 と clone cl.2-6 に分類分けできることである。上記のように、clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5 は幾つかの性質が極めて類似しているため、以後は、6 つの HDAC2(-/-) individual clones の中で、clones cl.2-3, cl.2-5 を除いた 4 つの clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の種々の細胞の性質を更に詳細に調べた。

HDAC2(-/-) DT40 individual clones の形態の長期培養期間の変化：

まず、4 つの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の形態を電子顕微鏡で観察した (図-16:上図) [102, 105, 108, 109]。いずれの clones も長期培養期間の初期ステージでは幾らか歪な形(distorted form)をしており、後期ステージでは、野生株 DT40 と同様に滑らかな形(smooth form)をしていた。大量の IgM H-chain と L-chain の存在による濃い細胞質画分(dense cytoplasmic fractions)は初期ステージのみで観察され、後期ステージでは DT40 と同様に観察されなかった。さらに、HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 を IgM H-chain の特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った (図-16:下図)。蓄積した IgM H-chain (colloidal gold immune-labeling として)は初期ステージの小胞体のみが存在し、後期ステージでは蓄積した IgM H-chain のほとんどは、DT40 とほぼ同レベルまで減少していた。これらの結果は最初に作製した HDAC2(-/-)で得られた既述の結果とも合致した。

引き続き、培養の初期及び後期ステージの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と DT40 の形態を顕微鏡で観察した (図-17) [102, 105, 108, 109]。4 つ全ての HDAC2(-/-) clones は、初期ステージでは凝集した形態(aggregate form)で存在し、後期ステージでは DT40 や Pax5(-)と同様に 1 個ずつ分散した形態(dispersive form)で存在していた。

全ての HDAC2(-/-) DT40 individual clones で IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現レベルは長期培養期間にほぼ同じパターンで減少する：

上記のように、長期培養期間の初期、中期、後期ステージで調べて結果、IgM H-chain と L-chain の蛋白質と mRNA レベルの他、PCAF, HDAC7, HDAC9, Pax5, Aiolos, EBF1, E2A, PU.1, Blimp1, OBF1 などの mRNA レベルも 6 つ全ての HDAC2(-/-) individual clones で変化していた。そこで、変化したこれら IgM H-chain と L-chain 及びクロマチン修飾酵素と転写因子 (その他に Ikaros, XBP-1) の遺伝子発現の変化パターンを、培養の初期 (~7 日目)、中期 (~33 日目)、後期 (~64 日目) ステージの他、さらに短い間隔の幾つかの中間ステージの 4 つの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と野生株 DT40 から全 RNAs を単離し

て詳細に解析した。

最初に、IgM H-chain mRNA の完全型(whole form), 分泌型(secreted form), 膜結合型(membrane-bound form)と L-chain mRNA の特異的なプライマー(primers)を用いた RT-PCR で分析した (図-18) [102, 105, 108, 109]。完全型と分泌型 IgM H-chain mRNAs は初期ステージで劇的に増加し、中期ステージ及びその他の中間ステージを通して漸次減少し、最終的に後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルまで減少した。初期ステージで確かに増加した膜結合型 IgM H-chain mRNA は培養期間を通じて明らかに減少した。この減少の程度は、clone cl.2-1 では僅かに大きく、clones cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 では僅かに小さかった。4 つ全ての HDAC2(-/-) clones で、初期ステージで僅かに増加した IgM L-chain mRNA は培養期間を通じて緩やかに減少した。これらの結果は、全ての HDAC2(-/-) individual clones において、HDAC2 欠損に伴って劇的に増加した IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現レベルは、長期培養期間を通して全体的にほぼ同じパターンで減少し、最終的に、野生株 DT40 と同じレベルになることを示している。また、上述の IgM H-chain と L-chain の蛋白質レベルの減少パターンとも合致していることを示している。

HDAC2(-/-) DT40 individual clones で PCAF, HDAC7, HDAC9 の遺伝子発現レベルは長期培養期間にそれぞれ異なるパターンで変化する :

次に、PCAF, HDAC7, HDAC9 の特異的なプライマーを用いた RT-PCR で分析を行った (図-18) [102, 105, 108, 109]。長期培養期間に、4 つの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 全てで PCAF, HDAC7, HDAC9 の遺伝子発現パターンは次のように明らかに異なっていた。PCAF mRNA レベルは DT40 で極めて低いが、4 つ全ての HDAC2(-/-) individual clones で中間ステージ(~17-22 日目)まで劇的に増加した。その後、増加した PCAF mRNA レベルは clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 で変化しなかったが、clone cl.2-6 で劇的に減少した。なお、後期ステージの PCAF mRNA レベルは clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 では DT40 と比べて高く、clone cl.2-6 では DT40 とほぼ同じであった。HDAC7 mRNA レベルは DT40 で高いが、長期培養期間に、4 つ全ての HDAC2(-/-) individual clones でほぼ同じパターンで変化した。すなわち、HDAC7 mRNA レベルは初期ステージで明らかに減少し、逆に中間ステージ(~17-27 日目)まで明らかに増加し、さらにその後は変化しないかあるいは緩やかに減少した。全培養ステージを通して HDAC2(-/-)の HDAC7 mRNA レベルは DT40 に比べて低かった。HDAC9 mRNA レベルは DT40 で検出できないほど低いが、全ての HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 で中間ステージ(~17-22 日目)まで明らかに増加した。その後、増加した HDAC9 mRNA レベルは長期培養期間に徐々に減少した。最終的に後期ステージで、HDAC9 mRNA レベルは clone cl.2-1 では DT40 と比べて非常に高く、clones cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 では DT40 とほ

ば同じであった。

HDAC2(-/-) DT40 individual clones で **Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, Blimp1, Ikaros, E2A, PU.1** の遺伝子発現レベルはそれぞれ長期培養期間に劇的あるいは適度に異なるパターンで変化する：

上記のように、野生株 DT40 で Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, Ikaros, E2A, PU.1 などの遺伝子は十分あるいはかなり高いレベルで発現しているが、Blimp1 の遺伝子はほとんど発現していない。引き続き、これらの転写因子の特異的なプライマーを用いた RT-PCR で詳細に分析した。長期培養期間に、HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 で、これら各遺伝子の発現パターンは次のように複雑かつ多彩に変化することを明らかにした (図-18) [102, 105, 108, 109]。

Pax5 と Aiolos の mRNA レベルの長期培養期間の変化パターンは、同じ HDAC2(-/-) clone では極めて似ていたが、HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6の間ではかなり異なっていた。clone cl.2-1 では、Pax5 と Aiolos の mRNA レベルは初期ステージでほぼ完全に減少し、その後は後期ステージまで変化しないかあるいは極めて僅かに増加した。特筆すべきは、残りの clones cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 では、Pax5 と Aiolos の mRNA レベルは初期ステージでほぼ完全に減少したが、その後は減少したこれらの mRNA レベルは長期培養期間に劇的に増加した。なお、後期ステージの Pax5 と Aiolos の mRNA レベルは、clones cl.2-2, cl.2-4 では初期ステージのレベルの約 20-40 倍であり DT40 と比べて低く、clone cl.2-6 では初期ステージのレベルの約 80-120 倍であり DT40 とほぼ同じであった。

EBF1 mRNA レベルは、HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の初期ステージでほぼ完全に減少したが、その後、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 ではほぼ同じパターンで変化し、clone cl.2-6 では非常に異なるパターンで変化した。すなわち、初期ステージで減少した EBF1 mRNA レベルは、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 では後期ステージまで検出できないかあるいは DT40 の約 1%より低いままであった。一方、clone cl.2-6 では後期ステージで DT40 の約 60%まで劇的に増加した。

OBF1 mRNA レベルは、長期培養期間に、clones cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 ではほぼ同じパターンで変化し、clone cl.2-1 ではこの 3 clones とは明らかに異なるパターンで変化した。すなわち、clones cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 では、OBF1 mRNA レベルは初期ステージで DT40 の約 30-40%に減少し、その後は後期ステージで DT40 の約 60-100%まで緩やかに増加した。一方、clone cl.2-1 では、OBF1 mRNA レベルは長期培養期間に減少を続け、後期ステージでは DT40 の約 10%以下まで劇的に減少した。

Blimp1 mRNA レベルは、DT40 では極めて低いが、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の初期

ステージで劇的に増加した。その後は後期ステージの clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 では、増加した Blimp1 mRNA レベルの約 50%まで緩やかに減少し、clone cl.2-6 では DT40 と同じく検出できないレベルまで劇的に減少した。Ikaros mRNA レベルは、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 では初期ステージで DT40 の約 150-200%まで僅かに増加し、その後は後期ステージまで変化しなかった。clone cl.2-6 では長期培養期間に余り変化しなかった。E2A mRNA レベルは、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 で、初期ステージで DT40 の約 200-300%まで増加し、その後は後期ステージで DT40 の約 100-200%まで緩やかに減少した。PU.1 mRNA レベルは、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 で、初期ステージで DT40 の約 30-50%まで減少し、その後は後期ステージで、clone cl.2-1 で DT40 の約 150%まで増加し、clones cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 で DT40 の約 60%まで減少した。XBP-1 mRNA レベルは、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 で長期培養期間に変化しなかった。

HDAC2(-/-) DT40 individual clones の増殖速度はそれぞれ異なる：

細胞の諸性質の変化がほぼ安定した状態の長期培養期間の後期ステージにおいて基本的な性質である増殖速度を調べた (図-19) [102, 105, 108, 109]。HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-4 (多分、cl.2-2, cl.2-5 も) の増殖速度は、僅かではあるが確かに DT40 の増殖速度と異なり、clone cl.2-6 の増殖速度は DT40 の増殖速度とほぼ一致した。この結果は、後期ステージにおける IgM H-chain と L-chain はもちろん、HAT, HDAC, 転写因子ファミリーの多くのメンバーの遺伝子発現パターンが、clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4 ではそれぞれが DT40 とかなり異なり、clone cl.2-6 では DT40 と極めて類似していた前述の結果と概ね合致する。

HDAC2欠損による IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現の増加によって蓄積した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量は各 HDAC2(-/-) DT40 individual clones (クローン)において、長期培養期間の多世代を通して特定の転写因子の遺伝子発現が変化することに基づいて異なる方法で劇的に減少する：

上記のように、新たに作製した 28 個の独立した HDAC2(-/-)欠損変異株から無作為に選んだ 6 個の individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 を解析して得られた主な結果は次の通りである。1) 6つ全ての clones で、IgM H-chain と L-chain の蛋白質と遺伝子発現(mRNA) レベルは、培養の初期ステージで劇的に増加し、その後は長期培養期間を通してほぼ同じパターンで減少し、最終的に後期ステージで野生株 DT40 とほぼ同等レベルに達する。2) 6つ全ての clones で、転写因子やクロマチン修飾酵素(HATs, HDACs)ファミリーの種々のメンバーの遺伝子発現レベルは、長期培養期間にそれぞれ異なるパターンで変化する。3) clone cl.2-1 では、Pax5, Aiolos, EBF1 の遺伝子発現レベルは初期ステージでほぼ完全に減少し、その後は長期培養

期間に変化しないで検出できないままである。OBF1 の遺伝子発現レベルは後期ステージまで劇的に減少する。4) clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5 では、Pax5, Aiolos, EBF1 の遺伝子発現レベルは初期ステージでほぼ完全に減少し、その後は後期ステージまで、Pax5, Aiolos の遺伝子発現レベルは増加し、EBF1 の遺伝子発現レベルは変化しないままである。5) clone cl.2-6 では、Pax5, Aiolos, EBF1 の遺伝子発現レベルは初期ステージでほぼ完全に減少し、その後は後期ステージまで劇的に増加する。6) 初期ステージであっても、用いた HDAC2(-/-) clones は遺伝子破壊法で作製してから約 15-16 日後の細胞群であり、DT40 の倍加時間(doubling times)は約 12 時間であるため、約 30-32 世代の細胞群に相当し、作製(誕生)直後の欠損変異株の種々の細胞機能(性質)の変化はもっと劇的だったと想定される。7) 上記の結果から、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現パターンに関して、6 つの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 は 3 つのタイプに分類分けできる。すなわち、clone cl.2-1 は OBF1-依存タイプ、clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5 は Pax5, Aiolos-依存タイプ、clone cl.2-6 は Pax5, Aiolos, EBF1-依存タイプである。8) 以上をまとめると、HDAC2(-/-) individual clones は多世代を経る間に、それぞれ異なる方法で特定の転写因子の発現パターンを変化させ、この変化を介して IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現レベルを減少させ、その結果として蓄積した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量を減少させる能力を獲得することが明らかになった(図-20)[102, 105, 108, 109]。

HDAC2 欠損で増大した IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現レベルは、長期培養期間に HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 でほぼ同じパターンで劇的に減少する。一方、Pax5, Aiolos, Ikaros, EBF1, E2A, PU.1, Blimp1, XBP-1, OBF1 など特定の転写因子の遺伝子発現レベルは、長期培養期間に、これら 6 つの HDAC2(-/-) clones でそれぞれ固有のパターンで変化する。特に、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 の遺伝子発現の変化パターンは、HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 の 1 つあるいは複数で、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現の変化パターンと並行または逆並行である。さらに、前述したように、Pax5, Aiolos, EBF1 は DT40 細胞で IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現を抑制的に制御し、OBF1 は NIH3T3 細胞でこれら 2 つの遺伝子発現を促進的に制御する。このような事実から、上記の変化した多数の転写因子群の中で、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 は、個々の HDAC2(-/-) individual clones の長期培養期間での IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現レベルの減少に関与する最も有力な候補であると想定される。

したがって、個々の HDAC2(-/-) individual clones において長期培養期間の多世代を通して、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現レベルを劇的に減少させる異なる方法を明らかにするためには、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 の遺伝子発現を変化させる方法を解明することが最も重要である。以後、長期培養期間の多世代を通じて、HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4,

cl.2-6 において、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 及び PCAF の遺伝子発現を促進的及び抑制的に制御する詳細な方法について記述する。

Neighboring overlapping tiling chromatin immuno-precipitation (NotchIP) assay: 長期の連続培養期間の HDAC2(-/-) DT40 individual clones における、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, PCAF 遺伝子の隣接する 5'-近傍上流領域のクロマチン構造の変化を解析する新しい方法：

HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 が長期培養期間の多世代を通して、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, PCAF の遺伝子発現の異なる方法を、いかに個別に獲得するかを明らかにすることは極めて重要であり、独自の分析法を用いて調べた。前述のように、遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)のクロマチン構造は転写制御領域(配列)(プロモーター、オペレーター、リプレッサー、エンハンサーなど)の有無に関わらず、当該遺伝子の発現制御に直接的かつ密接に関与する。Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, PCAF 遺伝子の proximal ~2.0 kb 5'-upstream, distal 5'-upstream, open reading frame (coding: ORF) regions (5'-近傍上流、5'-遠隔上流、転写部位)のクロマチン領域の DNA 塩基配列に基づいてデザイン(設計)・作製したプライマーを用いて、chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay (クロマチン・免疫沈降法)を実施した。特に、proximal ~2.0 kb 5'-upstream region (notch of chromatin: クロマチンの刻み目/V字形の切れ目と名付けた)については、多数の分割した short segments (短いセグメント)に対応するプライマーは、クロマチン・免疫沈降法での polymerase chain reaction (PCR)で増幅される全ての DNA fragments (フラグメント: 断片)が、両隣のフラグメントと互いに一部重なり合うように設計した。したがって、遺伝子の proximal ~2.0 kb 5'-upstream region (5'-近傍上流領域)のクロマチン構造の変化を解析するこの新しい方法を neighboring overlapping tiling chromatin immuno-precipitation (NotchIP or Notch-IP) assay と名付けた。略語の NotchIP は notch of chromatin についての immuno-precipitation (IP)をも意味する [102, 106, 108, 110]。

長期培養期間の初期(~3 日目)、中期(~33 日目)、後期(~58 日目)ステージにおける HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と野生株 DT40 の Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, PCAF 遺伝子のクロマチン領域について NotchIP assay (アッセイ)を行った。上述のように、ヒストン H3 の Lys-9, Lys-14, Lys-18, Lys-23, Lys-27 残基のバルクのアセチル化レベル (bulk acetylation levels)が、長期培養期間に変化していたので、全ての NotchIP assay を通して、アセチル化された K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 に対する 5つの部位特異抗体を用いた。ただし、clone cl.2-2 の Pax5 遺伝子に関しては、本アッセイの最初の試みだったので、初期及び後期ステージの K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 の特異抗体のみを用いたデータである。

ヒストン H3 の N-末端部位の Lys 残基(K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3)のアセチ

ル化レベルが高いか低いかの程度に基づいて、ヒストン H3（または該当する Lys 残基、結果としてヌクレオソーム）の DNA との binding ability（結合能）、それに続くクロマチン構造の形状（フォーム）や遺伝子発現レベルなどの諸性質の程度を一応次のように仮定した。ただし、この結合にどの Lys 残基が真にあるいは主に寄与しているかは不明である。上記 5 つの Lys 残基の 1 つまたは幾つかの残基のアセチル化レベル(acetylation levels)が、hyper (high : 高い)、considerably hyper (かなり高い)、somewhat hyper (幾らか高い)、hypo (low or no : 低い)の場合、ヒストン H3 と DNA の binding ability（結合能）は no（無）、weak（弱い）、less（低い）、full（高い）レベルであるとみなす。この 4 つの結合能レベルはそれぞれ、クロマチン構造を loose (open : 緩い), considerably loose (かなり緩い), somewhat loose (幾らか緩い)、tight (closed : 硬い) forms に変化させる。クロマチン構造のこの 4 つの forms（フォーム：形状）は、最終的に、high（高い）、considerably high（かなり高い）、somewhat high（幾らか高い）、low (no)（低い）レベルの gene expression/transcription (mRNA)（遺伝子発現又は転写）を惹起する。

Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, PCAF 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化についての NotchIP assay による詳細な解析データは、既報のオリジナルやレビュー論文にすでに発表済である [102, 106, 108, 110]。従って、本稿では記述を簡潔にするため、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域における、主に K9/H3 と K27/H3 のアセチル化レベルに関する解析データのみを記した後、他のデータも併せて説明する。

長期連続培養期間の初期、中期、後期ステージにおける HDAC2(-/-) DT40 individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化 :

上記のように、各 HDAC2(-/-) individual clones における Pax5 遺伝子の発現は長期培養期間でそれぞれ異なるパターンで変化する。従って、長期培養期間の HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と DT40 の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた NotchIP assay で調べた (図-21) [102, 106, 108, 110]。5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のプライマーは、私共がクローニングした Pax5 遺伝子の proximal ~4.9 kb 5'-upstream region とデータベースから得られる ORF の塩基配列に基づいて設計した。5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -1923 ~ +30)に関しては、隣同士が重なり合う 12 個のセグメント(segments 1-12)を、5'-遠隔上流(distal 5'-upstream region: position -4390 ~ -4235)に関しては、1 個のセグメント(segment a)を、転写部位(ORF: +55 ~ +201, +223 ~ +391, +490 ~ +588)に関しては、3 個のセグメント(segments b, c, d)を、それぞ

れ増幅できるプライマーを用いた。転写部位のプライマーはデータベースに基づくため、セグメントの塩基番号は5'-近傍上流と5'-遠隔上流のセグメントの塩基番号とは連続していない。

Pax5/clone cl.2-1:

長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-1 と DT40 の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域の 5 つの N-末端 Lys 残基のアセチル化レベルの変化パターンを、5 つのアセチル化 K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-21-cl.2-1) [102, 106, 108, 110]。Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域(proximal and distal 5'-upstream chromatin regions: segments a and 1-12)の K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 で高いレベル(high or hyper-acetylation levels)である。驚くべきことに、HDAC2 欠損にも拘らず、K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-1 の初期ステージではほぼ完全に減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、3 つの転写部位のクロマチン領域(ORF: segments b-d)の K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 では非常に低い(hypo-acetylation levels)が、clone cl.2-1 では培養の全期間を通して、1 つのセグメント(segment c)でのごく僅かな変化を除いて、さらに減少する。

Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域(proximal and distal 5'-upstream chromatin regions: segments a and 1-12)の K27/H3 のアセチル化レベルは DT40 では高い(hyper-acetylation levels)。驚くべきことに、K9/H3 の変化パターンと非常に似て、K27/H3 のアセチル化レベルも、clone cl.2-1 の初期ステージではほぼ完全に減少し、その後は僅かに変化するセグメント-8 (segment 8: positions -958 ~ -679)を除いて、ほとんどの 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域 (segments a, 1-7, 9-12)で、中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、3 つの転写部位のクロマチン領域(ORF: segments b-d)の K27/H3 のアセチル化レベルは DT40 で非常に低い、clone cl.2-1 で長期培養の全期間を通して変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、以下のことを示す。DT40 では、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流 (proximal 5'-upstream region: positions -1923 ~ +30)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または 5 つの Lys 残基) は DNA との結合能をほとんど持たない(no binding ability)。特筆すべきは、clone cl.2-1 では長期培養期間の全ステージを通して、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域の主に K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 の低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (またはこれら 4 つの Lys 残基) は DNA と極めて強い結合能(full binding ability)を持つことである。

これらの結果は、Pax5 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造(約 10 個のヌクレオソームで構成される)は、DT40 では緩いフォーム(loose form)であり、clone cl.2-1 の長期培養期間の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後

は後期ステージまで変化しない状態であることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、Pax5 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-1 では培養の初期ステージで劇的に減少し、その後は長期培養期間を通して後期ステージまで変化しないことが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-1 における Pax5 遺伝子の発現の変化パターンに関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Pax5/clone cl. 2-2:

長期培養期間の初期と後期ステージの clone cl.2-2 と DT40 の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを、この 4 つのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と特定のプライマーを用いた NotchIP assay で調べた(前述のように、実際はこれが最初の実験である)(図-21-cl.2-2) [102, 106, 108, 110]。Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-2 の初期ステージでほぼ完全に減少する。極めて驚くべきは、減少した K9/H3 のアセチル化レベルは後期ステージで劇的に増加し DT40 とほぼ同じレベルになることである。一方、2つの ORF のクロマチン領域(segments b and d)の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-2 の初期ステージで DT40 よりさらに減少し、その後は後期ステージで増加し DT40 とほぼ同じレベルになる。残り 1つの ORF のクロマチン領域(segment c)ではごく僅かに変化する。

Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-2 の初期ステージでほぼ完全に減少する。驚くべきことに、減少したアセチル化レベルは、後期ステージで劇的に増加し DT40 とほぼ同じレベルになる。しかし、3つの ORF のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-2 でも全培養期間を通して変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3 の結果と併せて、以下のことを示す。clone cl.2-2 の長期培養期間の初期ステージでは、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 の低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または 4つの Lys 残基) は DNA と極めて強い結合能(full binding ability)を持つ。特筆すべきは、ヒストン H3 (あるいは 4つの Lys 残基) の DNA との結合能は、長期培養期間に減少して、後期ステージでは高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ほとんどなくなることである(no binding ability)。

これらの結果は、DT40 では緩いフォーム(loose form)である Pax5 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域のクロマチン構造は、clone cl.2-2 の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、特筆すべきことは、その後は長期培養期間を通して逆に変化して、後期ステージで緩いフォーム(loose form)になることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、DT40 で高いレベル(high level)である Pax5 遺伝子の発現は、clone cl.2-2 では長期培養の初期ステージで劇的に減少し、その後は長期培養期間を通して増加し、後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルにな

ることが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-2 での Pax5 遺伝子の発現の変化パターンに関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Pax5/clone cl.2-4:

さらに、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-4 と DT40 の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを、この 5つのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と特定のプライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-21-cl.2-4) [102, 106, 108, 110]。Pax5 遺伝子の 5'-遠隔上流(segment a)と 5'-近傍上流(segments 1-12)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 の初期ステージではほぼ完全に減少する。ある程度予想されるが極めて驚くべきことに、減少した K9/H3 のアセチル化レベルは中期を経て後期ステージまで劇的に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じになる。一方、長期培養期間に、clone cl.2-4 の K9/H3 のアセチル化レベルは、1つの ORF のクロマチン領域(segment b)では 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流とほぼ同じパターンで変化し、残り 2つの ORF のクロマチン領域(segments c and d)ではほとんど変化しない。

Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流(segments 1-12)のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 の初期ステージではほぼ完全に減少するが、5'-遠隔上流(segment a)のクロマチン領域では僅かに減少する。減少した K27/H3 のアセチル化レベルは中期を経て後期ステージまで劇的に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じレベルになる。しかし、3つの ORF(segments b-d)のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 では長期培養期間を通して後期ステージまで変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、以下のことを示す。clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージでは、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または 5つの Lys 残基) は DNA と極めて強い結合能(full binding ability)を持つ。特筆すべきは、これら 5つの Lys 残基 (またはヒストン H3) の DNA との結合能は、長期培養期間を通して減少し、最終的に後期ステージでは高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ほとんどなくなる(no binding ability)。

これらの結果は、DT40 では緩いフォーム(loose form)である Pax5 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域のクロマチン構造は、clone cl.2-4 の初期ステージでは硬いフォーム(tight form)に変化し、驚くべきことに、その後は長期培養期間の多世代を経て変化し、後期ステージでは緩いフォーム(loose form)になることを示す。このような clone cl.2-4 でのクロマチンの一連の生体内反応の結果から、Pax5 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-4 の培養の初期ステージで劇的に減少し、その後は長期培養期間を通して増加し、後期ステージでは DT40 とほぼ同じレベルになることが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-4 での Pax5

遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Pax5/clone cl.2-6:

最後に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-6 と DT40 の Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域(segments a and 1-12)の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを、この5つのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と特定のプライマーを用いた NotchIP assay で調べた(図-21-cl.2-6)[102, 106, 108, 110]。Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-6 の初期ステージでほぼ完全に減少する。ある程度予想されることであるが極めて驚くべきことに、減少した K9/H3 のアセチル化レベルは中期を経て後期ステージまで劇的に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じレベルになる。一方、clone cl.2-6 では、3つの ORF 領域(segments b-d)の K9/H3 のアセチル化レベルは、初期ステージで僅かに減少し、その後は中期を経て後期ステージまで増加し DT40 とほぼ同じレベルになる。

Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-6 の初期ステージでほぼ完全に減少する。その後、減少した K27/H3 のアセチル化レベルは中期を経て後期ステージまで劇的に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じレベルになる。しかし、clone cl.2-6 の3つの ORF のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは後期ステージまで変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、以下のことを示す。clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージでは、Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域の主に K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 の低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または4つの Lys 残基) は DNA との極めて強い結合能(full binding ability)を持つ。特筆すべきは、これら4つの Lys 残基 (あるいはヒストン H3) の DNA との結合能は長期培養期間に漸次減少し、後期ステージでは、高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ほとんどなくなることである(no binding ability)。

これらの結果は、DT40 では緩いフォーム(loose form)である Pax5 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域のクロマチン構造は、clone cl.2-6 の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、特筆すべきことに、その後は長期培養期間の多世代を経て変化し、後期ステージで緩いフォーム(loose form)になることを示す。このような clone cl.2-6 でのクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、DT40 で高いレベル(high level)である Pax5 遺伝子の発現は、clone cl.2-6 の長期培養の初期ステージで劇的に減少し、その後は長期培養期間を通して増加し、後期ステージで DT40 とほぼ同じレベルになることが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-6 での Pax5 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

長期連続培養期間の初期、中期、後期ステージにおける HDAC2(-/-) DT40 individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化：

前述のように、各 HDAC2(-/-) individual clones での Aiolos 遺伝子の発現は長期培養期間にそれぞれ異なるパターンで変化する。長期培養期間の HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と DT40 の Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた NotchIP assay で調べた (図-22) [102, 106, 108, 110]。5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位の各プライマーは、データベースの塩基配列を確認後、それに基づいて設計した。5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2250 ~ +145)に関しては、隣同士重なり合う 14 個のセグメント(segments 1-14)を、5'-遠隔上流(distal 5'-upstream region: positions -3524 ~ -3367, -2735 ~ -2528)に関しては、2 個のセグメント(segments a and b)を、転写部位(ORF: +212 ~ +361, +1265 ~ +1417)に関しては、2 個のセグメント(segments c and d)を増幅できるプライマーを合成した。

Aiolos/clone cl.2-1:

最初に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-1 と DT40 の Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを、これら 5 つのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-22-cl.2-1) [102, 106, 108, 110]。DT40 では、Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域(proximal and distal 5'-upstream chromatin regions: segments a, b and 1-14)と 2 つの ORF 部位のクロマチン領域(segments c and d)の全てにおいて、K9/H3 のアセチル化レベルは高い(hyper-acetylation levels)状態である。注目すべきは、これらの K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-1 の初期ステージで劇的に減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しないことである。

Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、ORF のクロマチン領域(proximal and distal 5'-upstream, ORF chromatin regions)の K27/H3 のアセチル化レベルは DT40 で高い(hyper-acetylation levels)状態である。一方、全体的に、これらの K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-1 の初期ステージで僅かに減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。DT40 では、Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2250 ~ +145)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または 5 つの Lys 残基) は DNA と極めて弱い結合能(no binding ability)しか持たない。しかし、clone cl.2-1 では、長期培養期間の全ステージで、K23/H3 を除い

て、K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 の低いかまたは幾らか高いアセチル化レベル(hypo- or somewhat hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または4つの Lys 残基) は DNA と極めて強いまたは低い結合能(full or less binding ability)を持つ。

これらの結果は、Aiolos 遺伝子の~2.3 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.3 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造(約11個のヌクレオソームで構成される)は、DT40では緩いフォーム(loose form)であり、clone cl.2-1の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は後期ステージまで変化しない状態であることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、Aiolos 遺伝子の発現はDT40では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-1では培養の初期ステージで劇的に減少し、その後は長期培養期間を通して後期ステージまで変化しないままであることが容易に推察される。このことはRT-PCRによるclone cl.2-1におけるAiolos 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Aiolos/clone cl.2-2:

Aiolos 遺伝子の5'-近傍上流、5'-遠隔上流(proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-14)と2つのORF部位(segments c and d)のクロマチン領域でのK9/H3のアセチル化レベルはDT40では高い(hyper-acetylation levels)状態である(図-22-cl.2-2)[102, 106, 108, 110]。注目すべきは、これらのK9/H3のアセチル化レベルは、clone cl.2-2の長期培養期間の初期ステージで明らかに減少し、全体的にその後は中期を経て後期ステージまで徐々に増加する。

Aiolos 遺伝子の5'-近傍上流、5'-遠隔上流、ORF部位のクロマチン領域でのK27/H3のアセチル化レベルは、clone cl.2-2の長期培養の初期ステージで確かに減少する。その後は全体的に中期を経て後期ステージまで僅かに増加するかまたは変化しない。

上記のK9/H3とK27/H3の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-2の初期、中期ステージでは、Aiolos 遺伝子の5'-近傍上流のクロマチン領域(proximal 5'-upstream chromatin region)で、主にK9/H3, K27/H3(多分K18/H3, K23/H3も)のDNAとの結合能は、その低いかあるいは幾らか高いアセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて低くなる。その後は後期ステージで、主にK9/H3(多分K27/H3も)のDNAとの結合能は、その高いかまたはかなり高いアセチル化レベル(hyper- or considerable hyper-acetylation levels)に基づいてほぼ完全に消失する。

これらの結果は、Aiolos 遺伝子の5'-近傍上流領域(proximal ~2.3 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、DT40での緩いフォーム(loose form)から、clone cl.2-2の初期と中期ステージでは硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は後期ステージで緩いかあるいはかなり緩いフォーム(loose or considerably loose form)になることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、Aiolos 遺伝子の発現はDT40では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-2では長期培養の初期ステージで劇的に減少し、その後は長期培養期間を通して後期ステージまで明

らかに増加することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-2 における Aiolos 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Aiolos/clone cl.2-4:

Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流のクロマチン領域(proximal and distal 5'-upstream chromatin regions: segments a, b and 1-14)と 1つの ORF のクロマチン領域(segment d)での K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 では高い(hyper-acetylation levels)状態にある (図-22-cl.2-4) [102, 106, 108, 110]。注目すべきは、これらの K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージで明らかに減少する。全体的に、その後は中期を経て後期ステージまで確かに増加する。しかし、残り 1つの ORF のクロマチン領域(segment c)ではほとんど変化しない。

Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 の長期培養の初期ステージでごく僅かに減少する。その後は全体的に、中期を経て後期ステージまで僅かに増加するかあるいは変化しない。しかし、2つの ORF 領域(segments c and d)での K27/H3 のアセチル化レベルは長期培養期間を通して変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-4 の初期、中期ステージでは、Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域(proximal 5'-upstream chromatin region)の、主に K9/H3 (多分 K18/H3, K27/H3 も) の DNA との結合能は、その低いかあるいは幾らか高いアセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて低くなる。その後は後期ステージで、主に K9/H3 (多分 K27/H3 も) の DNA との結合能は、その高いかあるいはかなり高いアセチル化レベル(hyper- or considerable hyper-acetylation levels)に基づいて、ほぼ完全に減少する。

これらの結果は、Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流領域(proximal ~2.3 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、DT40 での緩いフォーム(loose form)から、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期と中期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は後期ステージで緩いかあるいはかなり緩いフォーム(loose or considerably loose form)に変化することを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、Aiolos 遺伝子の発現は DT40 での高いレベル(high level)から、clone cl.2-4 では培養の初期ステージで明らかに減少し、その後は長期培養期間を通して後期ステージまで確かに増加することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-4 における Aiolos 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Aiolos/clone cl.2-6:

Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流(proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-14)と 2つの ORF 部位(segments c and d)のクロマチン領域での K9/H3 のアセチル化レベルは、DT40 で高いレベル(hyper-acetylation levels)である (図-22-cl.2-6) [102, 106, 108, 110]。注目すべきは、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージでは明らかに減少する。全体的に、その後は

中期を経て後期ステージまで漸次増加し、最終的に DT40 より明らかに高いレベルになる。

Aiolos 遺伝子の position -1230 より上流の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流(segments a, b and 1-6)のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-6 の初期ステージで変化しないままである。その後は中期を経て後期ステージまで漸次増加し、最終的に DT40 より高いレベルになる。一方、Aiolos 遺伝子の position -1232 より下流の 5'-近傍上流(segments 7-14)のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、全体的に、clone cl.2-6 の初期ステージで僅かに減少する。その後は中期を経て後期ステージまで急速に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じレベルになる。2つの ORF 部位のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、長期培養期間を通してほとんど変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージでは、Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域(proximal 5'-upstream chromatin region)における、主に K9/H3, K27/H3 の DNA との結合能は、低いかあるいは幾らか高いアセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて低くなる。その後、K9/H3, K27/H3 (多分 K14/H3, K18/H3 も) は DNA との結合能を徐々に失い、最終的に、中期から後期ステージにかけて、これらの結合能はその高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ほぼ完全に消失する(almost no binding ability)。clone cl.2-6 の中期と後期ステージでのアセチル化レベルが DT40 より高いため、2つのステージでの低い結合能(no binding ability)の程度は DT40 よりさらに低いと考えられる。

これらの結果は、DT40 での緩いフォーム(loose form)の Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流領域(proximal ~2.3 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は中期を経て後期ステージで緩いフォーム(loose form)に変化することを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、DT40 で高いレベル(high level)の Aiolos 遺伝子の発現は、clone cl.2-6 では長期培養の初期ステージで明らかに減少し、その後は長期培養期間を通して後期ステージまで確かに増加することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-6 における Aiolos 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

長期連続培養期間の初期、中期、後期ステージにおける HDAC2(-/-) DT40 individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化：

前述のように、HDAC2(-/-) individual clones での EBF1 遺伝子の発現は長期培養期間にそれぞれ異なるパターンで変化する。長期培養期間の HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と DT40 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3,

K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた NotchIP assay で調べた (図-23) [102, 106, 108, 110]。5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位の各プライマーは、データベースの塩基配列を確認し、それに基づいて設計した。5'-近傍上流 (proximal 5'-upstream region: positions -2031 ~ +200) に関しては、隣同士重なり合う 14 個のセグメント (segments 1-14) を、5'-遠隔上流 (distal 5'-upstream region: positions -3996 ~ -3770, -2888 ~ -2730) に関しては、2 個のセグメント (segments a and b) を、転写部位 (ORF: +179 ~ +291, +649 ~ +768, +787 ~ +900) に関しては、3 個のセグメント (segments c, d and e) を、それぞれ増幅できるプライマーを合成した。

EBF1/clone cl.2-1:

最初に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージにおける clone cl.2-1 と DT40 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位 (ORF) のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンをこれらのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-23-cl.2-1) [102, 106, 108, 110]。EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流 (proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-14) と 1 つの ORF 部位 (segment c) のクロマチン領域での K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 で高い (hyper-acetylation levels) 状態である。注目すべきは、全体的に、これらの K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-1 の初期ステージで劇的に減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、残り 2 つの ORF のクロマチン領域 (segments d and e) では、K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 で極めて低い (hypo-acetylation levels) が、clone cl.2-1 の初期ステージで僅かに減少し、その後は逆に中期を経て後期ステージまで僅かに増加する。

DT40 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流 (proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-14) と 1 つの ORF 部位 (segment c) のクロマチン領域では、K27/H3 のアセチル化レベルはかなり高いが、残り 2 つの ORF 部位 (segments d and e) のクロマチン領域では比較的低い。clone cl.2-1 の初期ステージでは、下流側の 5'-近傍上流 (segments 7-14: positions -1037 ~ +200) と ORF 部位 (segment c) のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは確かに減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、K27/H3 のアセチル化レベルは、残りの 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、ORF 部位のクロマチン領域では長期培養期間を通して余り変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。DT40 では、EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流 (proximal 5'-upstream region: positions -2031 ~ +200) のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の高いアセチル化レベル (hyper-acetylation levels) に基づいて、ヒストン H3 (または 5 つの Lys 残基) は DNA と極めて弱い結合能 (no binding ability) しか持たない。しかし、clone cl.2-1 では、長期培養期間の全ステージで、特に K9/H3, K18/H3, K27/H3 は、低いかあるいは幾らか高いアセチル化レベル (hypo- or somewhat hyper-acetylation

levels)に基づいて、ヒストン H3 (または 3 つの Lys 残基) は DNA との強い結合能(full binding ability)を持つ。

これらの結果は、EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造(約 10 個のヌクレオソームで構成される)は、DT40 では緩いフォーム(loose form)であり、clone cl.2-1 の長期培養期間の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は後期ステージまで変化しないことを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、EBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-1 では長期培養期間の初期ステージでほぼ完全に減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しないことが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-1 における EBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

EBF1/clone cl.2-2:

次に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-2 と DT40 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを、これらのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-23-cl.2-2) [102, 106, 108, 110]。EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流(proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-14)と 1 つの ORF 部位(segment c)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 では高いが、clone cl.2-2 の初期ステージで劇的に減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、残り 2 つの ORF(segments d and e)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-2 の初期ステージで僅かに減少し、その後は中期を経て後期ステージまで逆に僅かに増加する。

DT40 では、EBF1 遺伝子の position -762 より上流側の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流(proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-8)のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルはかなり低い。clone cl.2-2 の長期培養期間の初期ステージでは、2 つの 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream regions: segments 3 and 4: positions -1826 ~ -1363 and segments 7-14: positions -1037 ~ +200)と 1 つの ORF 部位(segment c: positions +179 ~ +291)のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、初期ステージで劇的に (あるいはほぼ完全に) 減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、残りの 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、ORF 部位のクロマチン領域では、K27/H3 のアセチル化レベルは長期培養期間を通して僅かに変化する。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-2 の長期培養期間の全ステージを通して、EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2031 ~ +200)のクロマチン領域で、主に K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 は、その低い (あるいは幾らか高い) アセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (または 4 の Lys 残基) は DNA との極めて高い (強い) 結合能

(full binding ability)を持つ。

これらの結果は、DT40 では緩いフォーム(loose form)の EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、clone cl.2-2 の長期培養期間の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しないことを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、EBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-2 では長期培養期間の初期ステージでほぼ完全に減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しないことが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-2 における EBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

EBF1/clone cl.2-4:

引き続き、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-4 と DT40 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-23-cl.2-4) [102, 106, 108, 110]。EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流と 5'-遠隔上流(proximal and distal 5'-upstream regions: segments a, b and 1-14)と 1つの ORF 部位(segment c)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 では高いが、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージで劇的(あるいはほぼ完全に)に減少する。その後は中期を経て後期ステージまで、2つの 5'-遠隔上流(segments a and b)のクロマチン領域では僅かに増加するが、5'-近傍上流と 1つの ORF 部位(segment c)のクロマチン領域では変化しない。一方、残り 2つの ORF 部位(segments d and e)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 では長期培養期間を通して変化しない。

EBF1 遺伝子の下流側の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream regions: segments 7-14)と 1つの ORF 部位(segment c)のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージで劇的に(あるいはかなり)減少し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しない。一方、残りの 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、ORF 部位のクロマチン領域では、K27/H3 のアセチル化レベルは長期培養期間に僅かに減少するかあるいは極めて僅かに変化する。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-4 の長期培養期間の全ステージを通して、EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2031 ~ +200)のクロマチン領域で、主に K9/H3, K27/H3 (多分 K14/H3, K18/H3 も)は、低い(あるいは幾らか高い)アセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基)は DNA との高い(強い)結合能(full binding ability)を持つ。

これらの結果は、DT40 では緩いフォーム(loose form)である EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流

領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しないことを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、EBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-4 では長期培養期間の初期ステージではほぼ完全に消失し、その後は中期を経て後期ステージまで変化しないことが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-4 における EBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

EBF1/clone cl.2-6:

最後に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-6 と DT40 の EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-23-cl.2-6) [102, 106, 108, 110]。EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流と 1つの 5'-遠隔上流(proximal and distal 5'-upstream regions: segments b and 1-14)と 1つの ORF 部位(segment c)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 では高いが、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージではほぼ完全 (あるいは劇的) に減少する。興味深いことに、減少したアセチル化レベルは、その後は中期を経て後期ステージまで劇的に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じレベルになる。一方、EBF1 遺伝子の 5'-遠隔上流の 1つのセグメント(segment a)と 2つの ORF 部位(segments d and e)のクロマチン領域の K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-6 では長期培養期間の全ステージを通して変化しない。

EBF1 遺伝子の下流側の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream regions: segments 8-14)と 1つの ORF 部位(segment c)のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージで劇的に減少する。その後は中期を経て後期ステージまで劇的に増加し、DT40 とほぼ同じレベルになる。一方、残りの 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、ORF 部位のクロマチン領域では、K27/H3 のアセチル化レベルは clone cl.2-6 の長期培養期間を通してほとんど変化しない。

K9/H3 と K27/H3 のこれら結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージでは、EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2031 ~ +200)のクロマチン領域では、主に K9/H3, K27/H3 (多分 K14/H3, K18/H3 も) は、低い (あるいは幾らか高い) アセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA との強い (高い) 結合能(full binding ability)を持つ。しかし、その後は、興味深いことに、中期と後期ステージを通して結合能を徐々に消失し、最終的に高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ほとんど結合能を失った状態になる。

これらの結果は、DT40 では緩いフォーム(loose form)である EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流

領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージで硬いフォーム(tight form)に変化し、その後は中期を経て後期ステージまで漸次逆方向に変化して、最終的に緩いフォーム(loose form)になることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、EBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-6 では長期培養期間の初期ステージではほぼ完全に消失し、その後は中期を経て後期ステージまで徐々に増加し、最終的に DT40 とほぼ同じレベルになることが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-6 における EBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既報の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

長期連続培養期間の初期、中期、後期ステージにおける HDAC2(-/-) DT40 individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化：

前述のように、各 HDAC2(-/-) individual clones での OBF1 遺伝子の発現は長期培養期間にそれぞれ異なるパターンで変化する。長期培養期間の HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 と DT40 で、OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流及び転写部位のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた NotchIP assay で調べた (図-24) [102, 106, 108, 110]。5'-近傍上流及び転写部位の各プライマーは、データベースの塩基配列を確認後、それに基づいて設計した。5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2138 ~ +164)に関しては、隣同士重なり合う 14 個のセグメント (segments 1-14) を、転写部位(ORF: positions +17 ~ +131, +776 ~ +937)に関しては、2 個のセグメント (segments a and b)を、それぞれ増幅できるプライマーを合成した。

OBF1/clone cl.2-1:

最初に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-1 と DT40 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンをこれらのアセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-24-cl.2-1) [102, 106, 108, 110]。OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流 (proximal 5'-upstream region: segments 1-14) と 2 つの ORF 部位 (segments a and b) のクロマチン領域での K9/H3 のアセチル化レベルは DT40 で高い (hyper-acetylation levels)。全体的に、この K9/H3 のアセチル化レベルは、clone cl.2-1 の長期培養期間の初期ステージでは明らかに減少する。注目すべきは、減少した K9/H3 のアセチル化レベルは、中期ステージでは検出できないレベルまでさらに減少し、その後は後期ステージまで変化しない。

OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流 (proximal 5'-upstream region) と 2 つの ORF 部位 (segments a and b) のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは DT40 ではかなり高い。clone cl.2-1 の長期培養

期間の初期ステージでは、この K27/H3 のアセチル化レベルは、positions -1493 ~ -1068 の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: segments 5 and 6)のクロマチン領域ではほとんど減少しないが、その他の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: segments 1-4 and 7-14)と 2 つの ORF 部位 (segments a and b)のクロマチン領域では僅かに減少する。この減少した K27/H3 のアセチル化レベルは中期でさらに減少し、その後は後期ステージまで変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。DT40 では、OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: positions -2138 ~ +164)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3(または 5つの Lys 残基)は DNA との極めて弱い結合能(no binding ability)しか持たない。一方、clone cl.2-1 の長期培養期間の初期ステージでは、特に K9/H3, K27/H3 (多分 K23/H3 も) のかなり高いアセチル化レベル(considerable hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3(またはこれらの Lys 残基)は DNA との弱い結合能(weak binding ability)を持つ。さらに、主に K9/H3, K27/H3 の弱い結合能は、中期ステージでは低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)に基づいて、強い結合能(full binding ability)まで劇的に増加し、その後は後期ステージまで変化しない。

これらの結果は、DT40 では、OBF1 遺伝子の ~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造 (約 10 個のヌクレオソームで構成される) は緩いフォーム(loose form)であることを示す。一方、clone cl.2-1 では、このクロマチン構造は長期培養期間の初期ステージでかなり緩いフォーム(considerably loose form)に変化し、その後は中期を経て後期ステージまで硬いフォーム(tight form)に変化することを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、OBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-1 では長期培養期間の初期ステージでは明らかに減少し、さらにその後は中期を経て後期ステージまで劇的に減少することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-1 における OBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する [102, 105, 106, 108-110]。

OBF1/clone cl.2-2:

次に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-2 と DT40 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-24-cl.2-2) [102, 106, 108, 110]。OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: segments 1-14)と 2 つの ORF 部位(segments a and b)のクロマチン領域での K9/H3 のアセチル化レベルは、DT40 では高いレベル(high level)であるが、全体的に、clone cl.2-2 の長期培養期間の初期ステージでは劇的に減少する。注目すべきは、減少した K9/H3 のアセチ

ル化レベルは中期ステージでは変化しないが、その後は後期ステージでは明らかに増加する。この増加したアセチル化レベルは全体的に DT40 より低い。

OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)と 2つの ORF 部位(segments a and b)のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、DT40 ではかなり高いが、clone cl.2-2 の長期培養期間の初期ステージではかなり減少する。中期ステージではさらに減少し、その後は逆に後期ステージまで明らかに増加する。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。clone cl.2-2 の長期培養期間の初期ステージでは、OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)のクロマチン領域の K9/H3 と K27/H3 の低いかあるいは幾らか高いアセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は、明らかに DNA との強いかあるいは低い結合能(full or less binding ability)を持つ。中期ステージでは、K9/H3 の強い結合能(full binding ability)は変化せず、K27/H3 の低い結合能(less binding ability)は、その低いアセチル化レベルに基づいて、強い結合能(full binding ability)までさらに増加する。その後は後期ステージでは、K9/H3 と K27/H3 のこの強い結合能(full binding ability)は、高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、結合能がない状態(no binding ability)まで明らかに減少する。後期ステージの clone cl.2-2 での結合能は、アセチル化レベルが DT40 より低いために DT40 より高いと想定される。

これらの結果は、長期培養期間の初期と中期ステージでの clone cl.2-2 の OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、DT40 での緩いフォーム(loose form)から硬いかあるいは幾らか緩いフォーム(tight or slight loose form)に変化することを示す。さらに、クロマチン構造の硬いフォーム(tightened chromatin structure)は、後期ステージで緩いフォーム(loose form)に変化することを示す。後期ステージのその程度は DT40 より少し硬いと考えられる。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、OBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-2 では長期培養期間の初期ステージで明らかに減少し、その後は中期を経て後期ステージまで確かに増加することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-2 における OBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

OBF1/clone cl.2-4:

引き続き、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-4 と DT40 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-24-cl.2-4) [102, 106, 108, 110]。OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region: segments 1-14)と 2つの ORF 部位(segments a and b)のクロマチン領

域の K9/H3 のアセチル化レベルは、DT40 では高い(high level)が、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージでは劇的に減少する。注目すべきは、減少した K9/H3 のアセチル化レベルは中期ステージでは変化しないが、その後は後期ステージでは明らかに増加する。この増加したアセチル化レベルの程度は DT40 より低いと考えられる。

OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)と 2 つの ORF 部位(segments a and b)のクロマチン領域の K27/H3 のアセチル化レベルは DT40 ではかなり高いレベルであるが、clone cl.2-4 の長期培養期間の初期ステージでは僅かに減少し、全体的に、中期ステージでは変化せず、その後は後期ステージでは僅かに増加する。しかし、5'-近傍上流のクロマチン領域の幾つかのセグメントでは変化しない。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。長期培養期間の初期ステージの clone cl.2-4 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)のクロマチン領域では、特に K9/H3 (多分 K27/H3 も) のかなり高いかまたは幾らか高いアセチル化レベル(considerable or slight hyper-acetylation levels)に基づいて、K9/H3 (多分 K27/H3 も) (またはヒストン H3) と DNA の結合能は弱い (低い) 程度(week or less binding ability)まで僅かに増加する。この弱い (低い) 結合能(week or less binding ability)は中期ステージでは変化しないが、後期ステージでは高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、結合能がない程度(no binding ability)まで明らかに減少する。この後期ステージでの clone cl.2-4 の結合能の程度は、アセチル化レベルが DT40 より低いために、DT40 より高いと推察される。

これらの結果は、長期培養期間の初期と中期ステージでは、clone cl.2-4 の OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、DT40 での緩いフォーム(loose form)から、幾らか緩いフォーム(somewhat loose form)に変化することを示す。さらに、その後の後期ステージでは DT40 とほぼ同じ程度の緩いフォーム(loose form)になることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、OBF1 遺伝子の発現は DT40 で高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-4 では長期培養期間の初期、中期ステージでは確かに減少し、後期ステージでは逆に明らかに増加することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-4 における OBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する [102, 105, 106, 108-110]。

OBF1/clone cl.2-6:

最後に、長期培養期間の初期、中期、後期ステージの clone cl.2-6 と DT40 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流及び転写部位(ORF)のクロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルの変化パターンを各アセチル化 Lys 残基の特異抗体と上記プライマーを用いた NotchIP assay で調べた (図-24-cl.2-6) [102, 106, 108, 110]。OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流 (proximal 5'-upstream region: segments 1-14)と 2 つの ORF 部位(segments a and b)のクロマチン領域の K9/H3

のアセチル化レベルは、DT40 では高い(high level)が、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージでは明らかに減少する。減少した K9/H3 のアセチル化レベルは中期を経て後期ステージまで逆に漸次増加し、最終的に DT40 とほぼ同じになる。

OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)と 2つの ORF 部位(segments a and b)のクロマチン領域での K27/H3 のアセチル化レベルは、DT40 ではかなり高いレベルであるが、clone cl.2-6 の長期培養期間の初期ステージでは明らかに減少し、中期ステージでは変化しない。その後は明らかに漸次増加して、後期ステージでは DT40 とほぼ同じか僅かに高いレベルになる。

上記の K9/H3 と K27/H3 の結果は、K14/H3, K18/H3, K23/H3 の結果と併せて、次のことを示す。長期培養期間の初期ステージでの clone cl.2-6 の OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流(proximal 5'-upstream region)のクロマチン領域で、特に K9/H3 と K27/H3 (多分 K23/H3 も) の低いかあるいは幾らか高いアセチル化レベル(hypo- or slight hyper-acetylation levels)に基づいて、K9/H3 と K27/H3 (多分 K23/H3 も) (またはヒストン H3) は強いかあるいは低い DNA との結合能(full or less binding ability)を持つ。この強いか低い結合能は中期ステージでは僅かに減少し、その後は後期ステージではさらに高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)に基づいて、結合能がない程度(no binding ability)まで明らかに減少する。

これらの結果は、長期培養期間の初期ステージでは、clone cl.2-6 の OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流領域(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン構造は、DT40 での緩いフォーム(loose form)から、硬いフォーム(tight form)に変化することを示す。さらにその後、中期を経て後期ステージでは DT40 とほぼ同じ程度の緩いフォーム(loose form)になることを示す。このようなクロマチンでの一連の生体内反応の結果から、OBF1 遺伝子の発現は DT40 では高いレベル(high level)であるが、clone cl.2-6 では長期培養期間の初期ステージでは明らかに減少し、その後は中期を経て後期ステージでは確かに増加することが容易に推察される。このことは RT-PCR による clone cl.2-6 における OBF1 遺伝子の発現パターンの変化に関する既述の結果と合致する[102, 105, 106, 108-110]。

Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 に関して、上記した長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 ホモ変異株の 4つのクローン(cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)における、5'-近傍上流クロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベル、5'-近傍上流クロマチン構造のフォーム、遺伝子発現(mRNA)レベルの変化を模式的にまとめて示した (図-25) [102, 106, 108, 110]。

劇的に増加した大量の IgM H-chain と L-chain 蛋白質の一部は HDAC2(-/-) DT40 mutants の核周囲腔(peri-nuclear space)に局在する：

HDAC2 欠損によって劇的に増大した IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現に基づいて合成された大量のこれらの免疫グロブリン蛋白質は、DT40 株の細胞外への分泌能力をはるかに超える

ため、IgM H-chain と L-chain 蛋白質は互いに高分子複合体を形成して小胞体に蓄積される。しかし、その一部は、長期培養期間の初期から後期ステージを通して、核膜(nuclear envelope)へ輸送されて核周囲腔(peri-nuclear space)に留まる (図-26, 27) [102, 103, 105, 107-109, 111]。

DT40 野生株と長期培養期間の初期、中期、後期ステージにおける HDAC2(-/-) DT40 individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6 それぞれの諸性質の多様な変化のまとめ：

DT40:

DT40 野生株における IgM H-chain と L-chain の蛋白質量は、この2つの遺伝子の発現 (転写) と IgM H-chain pre-mRNA の選択的スプライシングの2つのステップでコントロールされる[77]。IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現は、Pax5, Aiolos, EBF1, Ikaros によって抑制的 (ネガティブ) に、E2A, OBF1 によって促進的 (ポジティブ) に制御される。HDAC2 は、スーパーバイザーとして、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 の遺伝子発現をポジティブに、Ikaros, E2A の遺伝子発現をネガティブに制御することを介して、IgM H-chain と L-chain 遺伝子の発現を包括的に制御する[84]。

この2つの免疫グロブリン遺伝子の発現を直接的に制御する Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 などの遺伝子発現制御の基盤となるのは、それぞれのクロマチン構造の変化である。DT40 の Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流(proximal ~2.0 kb 5'-upstream region)のクロマチン領域では、ヒストン H3 の N-末端部位の特定 Lys 残基(K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3) の1つまたは複数が高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)である。この高いアセチル化レベルに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) の DNA との結合能はほとんど無くなり(no binding ability)、5'-近傍上流領域のクロマチン構造は緩い形状 (フォーム) (loose form) を形成する。結果として、DT40 では、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の発現は高いレベル(high levels)である[77, 84, 102, 103, 105, 106, 108-110]。

このような HDAC2 の制御下にある Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 などによる抑制的・促進的な逆方向の多彩な制御メカニズムの包括的結果として、DT40 野生株では IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現は強く抑制され、その蛋白質量は極めて低いレベル(low levels)である。

clone cl.2-1:

clone cl.2-1 の長期培養期間に上記の諸性質は次のように変動する (図-28) [102, 103, 105, 106, 108-110]。Pax5, Aiolos, EBF1 に関しては次の通りである (図-28-Pax5, Aiolos, EBF1)。初期ステージでは、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流(proximal ~2.0 kb 5'-upstream regions)のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は極めて低いアセチル化レベル(no, low or hypo-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA と強い結合能(full binding ability)を持つ。したがって、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は硬いフォーム(tight form)になる。結

果として、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の発現は劇的に減少して極めて低いレベル(no or low levels)になる。Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の発現も含めて上記の諸性質は、長期培養期間を通して変化せず後期ステージでも初期ステージとほぼ同じである。

一方、OBF1 に関しては次の通りである (図-28-OBF1)。長期培養期間の初期ステージでは、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA と弱い結合能(weak binding ability)を持つ。したがって、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流クロマチン構造はかなり緩いフォーム(considerable loose form)になる。結果として、OBF1 遺伝子の発現は明らかに減少して、かなり高いレベル(considerable high level)になる。その後は長期培養期間に劇的に変化して、後期ステージでは、1つまたは複数の Lys 残基は極めて低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3(またはこれらの Lys 残基)は DNA と強い結合能(full binding ability)を持つ。したがって、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は硬いフォーム(tight form)になる。結果として、OBF1 遺伝子の発現は後期ステージでは劇的に減少して、極めて低いレベル(no or low level)になる。

このような clone cl.2-1 での多彩な生体反応の包括的制御機構の結果、長期培養期間の初期ステージでは、抑制的因子である Pax5, Aiolos, EBF1 などの遺伝子発現の劇的な減少によって、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現は劇的に増加し、それに伴って蛋白質量も劇的に増加する。その後は長期培養期間を通して、Pax5, Aiolos, EBF1 などの遺伝子発現は減少したままであるが、促進的因子である OBF1 の遺伝子発現が劇的に減少し、これに伴って、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質量は、OBF1-依存的に劇的に減少し、最終的に後期ステージでは DT40 とほぼ同じレベルになる。

clones cl.2-2 and cl.2-4:

clones cl.2-2 と cl.2-4 の長期培養期間に上記の諸性質は次のように変動する (図-29, 30)[102, 103, 105, 106, 108-110]。Pax5, Aiolos, EBF1 に関しては次の通りである (図-29-Pax5, Aiolos, EBF1 と図-30-Pax5, Aiolos, EBF1)。初期ステージでは、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は極めて低いアセチル化レベル(no, low or hypo-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA と強い結合能(full binding ability)を持つ。したがって、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は硬いフォーム(tight form)になる。結果として、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の発現は極めて低いレベル(no or low levels)になる。

その後は後期ステージまで、Pax5, Aiolos 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は高いアセチル化レベル

(hyper-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3（またはこれらの Lys 残基）は DNA と極めて弱い結合能(no binding ability)を持つ。したがって、Pax5, Aiolos 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は緩いフォーム(loose form)になる。結果として、Pax5, Aiolos 遺伝子の発現は明らかに高いレベル(high levels)になる。しかし、後期ステージまで、EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の 1 つまたは複数の Lys 残基は極めて低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)である。これに基づいて、ヒストン H3（またはこれらの Lys 残基）と DNA との結合能も強いままである(full binding ability)。したがって、EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は硬いフォーム(tight form)である。結果として、EBF1 遺伝子の発現は明らかに低いレベル(low level)のままである。

一方、OBF1 に関しては次の通りである（図-29-OBF1 と図 30-OBF1）。長期培養期間の初期ステージでは、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の 1 つまたは複数の Lys 残基は幾らか高いアセチル化レベル(slight hyper-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3（またはこれらの Lys 残基）は DNA と弱い結合能(less binding ability)を持つ。したがって、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は幾らか緩いフォーム(somewhat loose form)になる。結果として、OBF1 遺伝子の発現は少し減少して幾らか高いレベル(somewhat high level)になる。その後は後期ステージまで、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の 1 つまたは複数の Lys 残基は高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3（またはこれらの Lys 残基）は DNA と強い結合能(full binding ability)を持つ。したがって、EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は緩いフォーム(loose form)になる。結果として、OBF1 遺伝子の発現は少し増加して高いレベル(high level)になる。

このような clones cl.2-2 と cl.2-4（多分 cl-2-3, 2-5 も）での多彩な生体反応の包括的制御機構の結果、長期培養期間の初期ステージでは、抑制的な転写因子である Pax5, Aiolos, EBF1 などの遺伝子発現の劇的な減少によって、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現は劇的に増加し、それに伴ってこれら 2 つの蛋白質量も劇的に増加する。その後は長期培養期間を通して、EBF1 の遺伝子発現は減少したままであるが、Pax5, Aiolos の遺伝子発現は劇的に増加し、これに伴って、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質量は、Pax5, Aiolos-依存的に劇的に減少し、最終的に長期培養期間の後期ステージでは DT40 とほぼ同じレベルになる。

clone cl.2-6:

clone cl.2-6 の長期培養期間に上記の諸性質は次のように変動する（図-31）[102, 103, 105, 106, 108-110]。Pax5, Aiolos, EBF1 に関しては次の通りである（図-31-Pax5, Aiolos, EBF1）。長期培養期間の初期ステージでは、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の 1 つまたは複数の Lys 残基は極めて低いアセチル化レ

ベル(hypo-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA と強い結合能(full binding ability)を持つ。したがって、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は硬いフォーム(tight form)になる。結果として、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の発現は劇的に減少し、極めて低いレベル(no or low levels)になる。その後は後期ステージまで、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) と DNA の結合能はほとんど無くなる(no binding ability)。したがって、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は緩いフォーム(loose form)になる。結果として、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の発現は劇的に増加し、明らかに高いレベル(high levels)になる。

一方、OBF1 に関しては次の通りである (図-31-OBF1)。長期培養期間の初期ステージでは、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は極めて低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA と強い結合能(full binding ability)を持つ。したがって、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は硬いフォーム(tight form)になる。結果として、OBF1 遺伝子の発現は少し減少して、幾らか高いレベル(somewhat high level)になる。その後は後期ステージまで、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 の1つまたは複数の Lys 残基は高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)になる。これに基づいて、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) は DNA と極めて弱い結合能(no binding ability)を持つ。したがって、OBF1 遺伝子の~2.0 kb 5'-近傍上流のクロマチン構造は緩いフォーム(loose form)になる。結果として、OBF1 遺伝子の発現は明らかに増加し、高いレベル(high level)になる。

このような clone cl.2-6 での多彩な生体反応の包括的制御機構の結果、長期培養期間の初期ステージでは、抑制的な転写因子である Pax5, Aiolos, EBF1 などの遺伝子発現の劇的な減少によって、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現は劇的に増加し、それに伴ってこの2つの蛋白質質量も劇的に増加する。その後は長期培養期間を通して、Pax5, Aiolos, EBF1 の遺伝子発現が劇的に増加し、これに伴って、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質質量は、Pax5, Aiolos, EBF1-依存的に劇的に減少し、最終的に後期ステージでは DT40 とほぼ同じレベルになる。

長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローン(cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)における多種多様な性質の多彩な変化に関するまとめ：

DT40 野生株と長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の4つのクローン(cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)の Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 に関して、遺伝子の 5'-近傍上流クロマチン領域の K9/H3,

K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベルとクロマチン構造のフォーム及び遺伝子発現(mRNA)レベル、さらに IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現(mRNA)と蛋白質レベルなどの変化について、今までに得られた結果を再度模式的・包括的にまとめた(図-32)[102, 107, 108, 111]。

HDAC2(-/-) DT40 mutants の多様性 :

蓄積した大量の IgM H-chain と L-chain の蛋白質は、HDAC2(-/-) DT40 mutants 自身にとっては異常で不必要で苦痛な予期しない新たに変化した環境である。2 度目の作製で得られた 28 個の HDAC2(-/-) individual mutant clones から無作為に選んで調べた 6 個は、長期培養期間に IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現と蛋白質量を減少させる方法(機構)に関して、clone cl.2-1 は OBF1-依存性、clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5 は Pax5, Aiolos-依存性、clone cl.2-6 は Pax5, Aiolos, EBF1-依存性の 3 つの異なるタイプに分類分け出来る。残りの individual clones を解析すると、これら 3 つとは異なる別のタイプが存在する可能性は大である。このように、HDAC2(-/-) individual mutants は、ゲノムタイプが同一であっても、蓄積した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量を減少させるために、様々な異なる方法を持つ多くの細胞タイプに変化する多様性を持つ。

さらに、これら 3 つのタイプにおいてさえ、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, E2A の他に、Blimp1, PCAF, HDAC7, HDAC9 などの遺伝子発現が、長期培養期間に増加したり、減少したり、途中で逆転したりなどと劇的かつ複雑に変化する。他のクロマチン修飾酵素や転写因子の遺伝子発現も変化していることは容易に想定できる。細胞機能を正常に発揮するために重要な役割を担っているこれらの遺伝子発現の変化は、IgM H-chain と L-chain 量の減少の他にも、HDAC2(-/-) DT40 mutants の individual clones の様々な性質(機能)が大幅に変化していることを強く示唆する[102, 107, 108, 111]。

HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンは、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流域の異なるクロマチン構造の可塑性を、長期培養期間にエピジェネティック修飾で不可逆的に創出することを介して、蓄積した大量の IgM H-chain と L-chain の蛋白質量を減らすためのプログラム化されていない新規で多様な細胞機能を獲得する :

上述の結果などを踏まえて、大量に蓄積した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量を減らすために、長期培養期間を通して、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流の異なるクロマチン構造の可塑性をエピジェネティック修飾で不可逆的に創出することを介して、HDAC2(-/-) の各クローンは、プログラム化されていない新たな多様な細胞機能を獲得する仮説的な包括的方法(機構)は次の通りである(図-33)[102, 107, 108, 111]。

最初に、環境変化認識受容体/部位(environment change recognition receptor/site:

ECRR/ECRS)とクロマチン構造変換複合体装置(chromatin conformation (structure) change complex machinery: 4C machinery)の 2 つの重要な機能体の存在を仮定する (図-32, 33)。ECRR/ECRS は核周囲腔(peri-nuclear space)に蓄積した大量の IgM H-chains と L-chains を異常で不都合な環境変化(abnormal and unfavorable environment change)として認識する役割を担う。当然、ECRR/ECRS は IgM H-chain と L-chain 蛋白質の蓄積に関するシグナルのクロマチンへの伝達にも一部関与する可能性もある。一方、4C machinery は構成員として HATs と HDACs の特定メンバーや他の多くの因子を含む多様な複合体であり、上記 4 つの転写因子の遺伝子などの 5'-近傍上流のクロマチン構造の可塑性を直接的かつ不可逆的に創出する役割を担う。また、上記のシグナル伝達にも一部関与している可能性もある。ECRR/ECRS、4C machinery や他の多くの因子などが関与して、異常に蓄積した IgM H-chain と L-chain の蛋白質量を除去するための応答反応が下記のように連鎖的に起る。

HAT と HDAC ファミリーの多くのメンバーの遺伝子が高いレベルで発現している DT40 野生株では、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子それぞれに対する 4C machinery は HDAC 活性として HDAC2、HAT 活性として特定の HAT メンバー (例えば、GCN5) や他の多数の因子で構成されている。一方、遺伝子破壊法(gene targeting techniques)で作製直後の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでは、HDAC2 欠損に伴って、4C machinery の全体的な構造(bulk conformation)が劇的に変化して、既存の構成員であった特定の HAT メンバーも脱離するかまたはその活性が著しく低下する。上記過程とその後続く長期培養期間を通して、4C machinery は新たに HDACs の他の特定メンバー、HATs の特定メンバー (同じか異なるメンバー) や他の多数の因子を構成因子として含むようになり、多種多様な形状になる。

核周囲腔(peri-nuclear space)に大量に蓄積した IgM H-chains と L-chains は、核内膜(inner nuclear membrane) (多分、ヘテロ・クロマチンも結合している) に局在している ECRR/ECRS に結合する。ECRR/ECRS が IgM H-chain と L-chain の蛋白質の蓄積を異常で不必要(abnormal and unnecessary)な環境変化として認識した後、この環境変化のシグナルは、転写因子、クロマチン修飾酵素、他の関連因子や酵素などの多数の遺伝子 (多分、多くの異なるクロモソームに存在する) の 5'-近傍上流のクロマチン構造へゲノム・ワイド(genome-widely)に伝達される。最初のシグナル伝達に続いて、この異常な環境変化への自発的・不均衡な応答が、HDAC2(-/-) individual clones の Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 や他の遺伝子などの 5'-近傍上流のクロマチン領域へ、別々に連続して集中的に起る。これらの転写因子の遺伝子の 5'-近傍上流域のクロマチン構造変化の多様性は、多彩な 4C machinery の構成因子である HATs と HDACs の特定メンバーの共同作業によるヒストン H3 の N-末端部位の 5 つの特異的 Lys 残基の 1 つまたは複数の多様なアセチル化・脱アセチル化レベルに基本的に基づいている。このような K9/H3 と K27/H3 (多分 K14/H3, K18/H3, K23/H3 も) のアセチル基によるエピジェネティック修飾によって、Pax5,

Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン構造の可塑性は不可逆的に創出される。一般的に、これらの 1 つまたは複数の Lys 残基が高いアセチル化レベル(hyper-acetylation levels)である 5'-近傍上流のクロマチン構造は、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) と DNA との結合能がないこと(no binding ability)に基づいて、緩いフォーム(loose or open form)になる。一方、これらの 1 つまたは複数の Lys 残基が低いアセチル化レベル(hypo-acetylation levels)である 5'-近傍上流のクロマチン構造は、ヒストン H3 (またはこれらの Lys 残基) と DNA との強い結合能(full binding ability)に基づいて、硬いフォーム(tight or closed form)になる。しかし、4C machinery は上記の転写因子の遺伝子などの転写領域(読み取り枠)(open reading frame, coding region: ORF)のクロマチン構造の変化にはほとんど関与しない。

必要が生じた時に、転写因子複合体装置(transcription factor complex machinery: TFC machinery) (構成メンバーとして RNA ポリメラーゼ、適当な転写因子、HAT, HDAC の各メンバー、他の因子など) は、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子などの 5'-近傍上流のクロマチン構造の緩いフォーム(loose form) (潜在的に活性化状態になっている) 内のプロモーター部位(promoter elements or regions)上に結合することが出来、これらの転写因子などの遺伝子発現が開始される。

具体的な結果の 1 つは次の通りである。独立した各 HDAC2(-/-)クローン(individual clones) は、同じ条件下での単純な長期連続培養期間に、Pax5, Aiolos, EBF1 または OBF1 の遺伝子発現を異なる方法で促進的または抑制的に制御することを介して、増大した IgM H-chain, L-chain の遺伝子発現(結果的にこの 2 つの蛋白質レベルが減少する)をほぼ同じパターンで減らすために、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得する。このような異なる方法(機構)は、基本的には長期連続培養期間の特異的なエピジェネティック修飾(ここでは、アセチル化と脱アセチル化)による Pax5, Aiolos, EBF1 または OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流領域の異なるクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することに基づく。

特筆すべきは、解析した 6 つの HDAC2(-/-) individual clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 は、連続長期培養期間の後期ステージで、転写因子やクロマチン修飾酵素である Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1, Blimp1, PCAF, HDAC9 などの遺伝子発現に関して 3 つの異なる方法(機構)が存在することに基づいて、上記のように異なる細胞機能を持つ 3 つの細胞タイプに分類分け出来ることである。さらに、これら 6 クローンの 1 つまたは複数において、Pax5, Aiolos, EBF1, E2A, PU.1, Blimp1 などの遺伝子発現パターンの方向性は連続長期培養期間の初期から後期ステージを通して同じであるが、PCAF, HDAC7, HDAC9, Ikaros, OBF1 などの遺伝子発現パターンの方向性は単純な連続長期培養期間にも関わらず、途中で自発的かつ複雑に逆転する。当然、変化したこれらの転写因子とクロマチン修飾酵素は IgM H-chain and L-chain 遺伝子の他に種々の多くの遺伝子の発現制御にも深く関与している事から、これらの

HDAC2(-/-) individual mutant clones はそれぞれ異なる多彩な性質を有している事は容易に想定できる。また、他の HDAC2(-/-) individual clones を解析すると、さらに異なる細胞タイプが存在する可能性は大である。

これらの複雑な生体内化学反応の統括的な結果として、HDAC2(-/-) DT40 mutants の individual clones はそれぞれ、異常な環境変化に適応するためのみならず、本来は同じ細胞タイプ（更に樹立された細胞株）であるにも関わらず、多様な性質・機能を持つ多彩な類似の細胞タイプに分岐するための柔軟で順応性ある多能的な能力を獲得する。

このような長期連続培養期間の多世代を通して、HDAC2(-/-) DT40 mutants が、大量の蓄積した IgM H-chain and L-chain の蛋白質量を劇的に減少させる新たな機能を獲得する能力（すなわち、新規の環境適応能力）は、よく知られている小胞体ストレス応答/異常タンパク応答 (endoplasmic reticulum (ER) stress response/unfolded protein response) 等とは明らかに異なるバイオ・システムである。

クロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コード説(Chromatin conformation change code (4C) theory: 4C theory) ～高等真核生物における多世代を通してのエピジェネティック修飾による特定の転写因子とクロマチン修飾酵素遺伝子群のクロマチン構造の多様な可塑性の不可逆的創出を介したプログラム化されていない新規の細胞機能を獲得する仮説的な一般的方法（機構）～：

大量の蓄積した IgM H-chain と L-chain 蛋白質量の排除に関する上記の仮説的方法（機構）を、高等真核生物における多世代（多くの細胞分裂）を通してのエピジェネティック修飾による特定の転写因子とクロマチン修飾酵素遺伝子群のクロマチン構造の多種多様な可塑性の不可逆的創出を介した、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得する仮説的な一般的方法（機構）へ拡張した（図-34）。高等真核細胞は、生涯で初めて細胞内外の新しい環境変化に遭遇した時、多世代を通して徐々に、その環境変化に自らを適応させる能力または異常な環境変化の場合にはそれを排除する能力を獲得するようになる。この新しいバイオ・システムをクロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コード説 (chromatin conformation change code theory: 4C theory) と命名した[102, 107, 108, 111]。高等真核生物は 4C theory に基づいて、ECRR/ECRS、4C machinery や他の多数の因子などを駆使して、新しい環境変化に対する連鎖的応答反応を下記のように起し、新たな適応能力を獲得する。

新しい環境変化は、最初に核-細胞質関門(nucleus-cytoplasm barrier)である核膜(nuclear membrane)（多分、ヘテロ・クロマチンが結合する核内膜(inner nuclear membrane)) 近辺に局在している ECRR/ECRS によって認識される。新しい環境変化を認識するこのステップで、中間センサーとして特定の別の分子が関与する可能性は大いにある。引き続いて、この環境変化

に関するシグナルは、多世代（多くの細胞分裂）を通して、核内のクロマチンへとゲノム・ワイド(genome-widely)に伝達される（図-35）。最初のシグナルを受け取った後、4C machinery は、エピジェネティック修飾によって、転写因子、クロマチン修飾酵素や他の関連因子と酵素などをコードする多くの遺伝子群のクロマチン構造を僅かに変化させる。新しい環境変化に関するシグナル伝達と自発的で不均衡な応答は、上記の因子や酵素遺伝子群の中の幾つかの特定メンバーの 5'-近傍上流の限定されたクロマチン構造に連続的・選択的に繰り返し集中する。最後に、この新たな環境変化に関する連続的なシグナル伝達を受けて、多様な 4C machinery は、アセチル基、メチル基、リン酸基、ユビキチン基、ADP-リボース基などによって、上記の特定遺伝子群の限定されたクロマチン構造領域のヒストンや DNA 分子の多種多様なエピジェネティック修飾を引き起す。

このような多種多様なエピジェネティック修飾の中で、コア・ヒストン H2A, H2B, H3, H4 の N-末端部位の幾つかの特異的 Lys 残基のアセチル化と脱アセチル化は最も主要な化学修飾の 1 つである。HATs と HDACs の特定メンバーや他の因子などで構成される 4C machinery は、上記の多種多様なエピジェネティック修飾の中のアセチル化と脱アセチル化に優先的に関与する。関与するコア・ヒストンの種類と Lys 残基の位置は多様である。例えば、上記の DT40 での IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現のケースでは、ヒストン H3 の Lys-9, Lys-14, Lys-18, Lys-23, Lys-27 残基が重要かつ優先的である。このようにして、特定の標的遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン構造領域で、ヒストン H3 のこれらの Lys 残基の 1 つまたは複数のエピジェネティック修飾は多世代を通して変化する。このアセチル化と脱アセチル化に関与する 4C machinery の多彩な機能の違いは、構成因子である HATs と HDACs のメンバーの複雑な組み合わせに主に依存する。一方、この多彩な 4C machinery は、該当する各遺伝子の転写領域(ORF)近辺のクロマチン構造の変化にはほとんど関与しない。

ヒストン H3 の N-末端部位の DNA との結合能に、どの Lys 残基が真にまたは主に関与しているかはまだ不明であるが、上記の特異的な Lys 残基の 1 つまたは複数のアセチル化レベルに基づいて仮に決めた定性的能力は次の通りである。すなわち、高いかまたは低いアセチル化レベル(hyper- (high) or hypo- (no or low) acetylation levels)は、それぞれ極めて弱いかまたは強い結合能(no or full binding ability)を引き起こすベースであり、その結果、クロマチン構造は緩いかまたは硬いフォーム(loose (open) or tight (closed) form)になる。このように、クロマチン構造の可塑性は、エピジェネティック修飾による連続的なコンフォメーション変化に基づいて、不可逆的に創出される。多世代を通して徐々に緩やかに、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得するためにクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出するバイオ・システムである 4C theory は、長い進化の過程で既に獲得済みのプログラム化されている通常の細胞機能を発現するためにクロマチンのコンフォメーション変化を直ちに即座に引き起す様々なバイオ・シス

テムとは明らかに異なる。

必要が生じた際に、転写因子複合体装置(TFC machinery)は、特定の標的遺伝子群 (target genes)の 5'-近傍上流のクロマチン構造の緩いフォーム(loose form) (潜在的に活性化状態である)内のプロモーター部位(promoter elements or regions)に結合することが出来、それによって、これら標的遺伝子群の発現が開始される。一方、この TFC machinery は、非標的遺伝子群 (un-target genes)の 5'-近傍上流のクロマチン構造の硬いフォーム(tight form) (潜在的にも不活性化状態である)内のプロモーター部位には結合出来ず、これら非標的遺伝子の発現を開始することが出来ない。

結果として、5'-近傍上流のクロマチン構造の緩いかまたは硬いフォームは、当該遺伝子の発現を高いかまたは極めて低いレベルになるように指令し、その最終産物であるタンパク質合成も高いかまたは極めて低いレベルに生じさせる。特筆すべきは、新しい環境変化とそのシグナルが同じタイプの細胞全てに共通であっても、クロマチン構造の可塑性の不可逆的創出方法は、個々の細胞間でそれぞれ異なる可能性が大きいことである。すなわち、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得するために、同じタイプの個々の細胞は、多数の特異的遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン構造を複雑かつ多様に変化させる能力のみならず、ある 1 つの遺伝子の同じ 5'-近傍上流のクロマチン構造を別々に様々なフォームに変化させる能力をも有している。このように、同じ環境変化にも関わらず、同一のゲノムタイプの個々の細胞間でも多世代を通して、多数の特異的な転写因子やクロマチン修飾酵素の遺伝子発現は多種多様に変化する。1 つの結果として、同じタイプの個々の細胞は、新しい環境変化に自らを適応させるために、同じかまたは異なるプログラム化されていない新しい細胞機能 (性質) を別々のバイオ・システムで新たに獲得する適応能力を有す。

包括的な結論・議論・展望：

高等真核生物は、その一生涯において異常で不快な予期しない不必要で不利益な環境変化あるいは有益な環境変化にさえ最初に遭遇した時に、これらの環境変化に対処し克服するかあるいは適応するために、特筆すべき能力を獲得する。すなわち、多世代 (または多数の細胞分裂) を通して、クロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することによって、プログラム化されていない新規の細胞機能を獲得するバイオ・システムである。

このプログラム化されていない新しい細胞機能を獲得するためのバイオ・システムの創出方法の基盤として、高等真核生物の体細胞は柔軟的・順応的・多能的な能力を持つ [102, 107, 108, 111]。これらの能力はいずれも基本的にはクロマチン構造の柔軟性・順応性・多能性に基づいている。細胞内外の環境変化に適応するために、個々の体細胞は、エピジェネティック修飾で多様なクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することを介して、同じかまたは異なるプログ

ラム化されていない新たな細胞機能を異なる方法（機構）で獲得する能力を有している。すなわち、特異的な転写因子やクロマチン修飾酵素の遺伝子群の 5'-近傍上流のクロマチン構造が、緩いフォームから硬いフォーム、逆に、硬いフォームから緩いフォームへと変換することを介して獲得する。5'-近傍上流のクロマチン構造の緩いフォームまたは硬いフォームは、当該遺伝子の発現に関して潜在的に活性状態または不活性状態である。もちろん、単に 5'-近傍上流域の塩基配列のみではほぼ全ての遺伝子が担っているゲノム機能発現に不活性（サイレント）な状態である。

個々の体細胞における多様なクロマチン構造の可塑性は、細胞が環境変化に最初に遭遇した時に、それに対する自発的・不均衡な応答によってまず惹起された後、不均衡な応答が多世代を通して連続的・集中的に起こることによって不可逆的に創出される。体細胞での多様なクロマチン構造の可塑性を創出する様々な方法（機構）は、当該細胞のそれまでの履歴に明らかに依存する。さらに、クロマチン構造の可塑性は、その創出が完了済か進行中であるかに関わらず、多くの世代（細胞分裂）を通して更なる構造変化を伴わないかあるいは伴って、子孫の世代に受け継がれる。特筆すべきは、長い進化の過程で獲得された通常の遺伝子発現や酵素反応などの可逆的な制御機構は、シグナルを受け取った細胞それ自体の中で起るが、クロマチン構造の可塑性の不可逆的な創出は子孫細胞で起り、環境変化のシグナルを最初に受け取った細胞では起らないことである（図-35）。多分、クロマチン構造の可塑性の不可逆的な創出は、偶然または中立的に起るのではなく、環境変化に適応するかそれを克服するという目的を持って必然的に起ると考えられる。

5'-近傍上流クロマチン領域は、緩いかまたは硬いフォーム(loose or tight form)として、それ自体の可塑性を不可逆的に創出することによって、当該遺伝子の潜在的転写能力のスイッチのオンまたはオフ(on or off)を指令する。したがって、5'-近傍上流クロマチン領域は、上記した構造的側面からの「クロマチンの刻み目(notch of chromatin)」と見なすことが出来ると共に、機能的側面からは「遺伝子発現のディレクター(director of gene expression)」と見なすことが出来る。当然、このクロマチンの刻み目（またはディレクター）は、プロモーター、オペレーター、エンハンサーなどの転写部位（要素）などの特異的塩基配列も含んでいる。注目すべきは、環境変化に関するシグナルの真の受け取り手は、緩いフォームと硬いフォームの間で自律的に変化し得る動的なクロマチン構造それ自体であり、静的で変化し得ないクロモソーム（またはクロマチン）ではないことである。換言すると、5'-近傍上流のクロマチン構造（刻み目またはディレクター）は、動的に変換可能な三次元のコンフォメーションとして自己変換能力(self-reforming ability)を有し、次の 2 つの基本的で重要な能力を持つ。すなわち、1) 細胞内外の環境変化のシグナルを受け取る能力と、2) そのシグナルへの応答による不可逆的なクロマチンのコンフォメーション変化を介して、当該遺伝子の潜在的転写活性のスイッチ（オンま

たはオフ)を指令する能力である。もちろん、ここで言う高等真核生物における the 4C theory に基づくクロマチンの自己変換能力 (self-reforming ability) とは、3次元クロマチン構造の可塑性を不可逆的に変換させる能力であり、DNA 構造 (塩基配列) それ自体を変化させる周知の抗体遺伝子の再編成 (rearrangement (recombination) of antibody genes) 能力やその他の体細胞での DNA 再構成 (somatic recombination) 能力等とは明らかに異なる。しかし、このアイデアをサポートする具体的データはまだ充分ではない。このような複雑な一連の生物的出来事の結果として、高等真核生物は、細胞内外の新しい環境変化に自らを順応させるためあるいはそれを克服するために、同じゲノム・タイプの体細胞から多彩な性質 (機能) を持つ多種多様な類似の細胞タイプを異なる方法で創出するための多能的・弾力的・柔軟性ある能力を獲得する。また、同じ細胞タイプに由来する隣接する細胞さえも、互いに細胞外環境とみなされる場合もあり得る。さらに、高等真核生物では多種多様なタイプの体細胞は互いに重要な生命維持機能を分担し協働して発現する。周知の一例を挙げれば、恒常性 (ホメオスタシス) 維持のために、脳の視床下部では CRH, GHRH, LHRH, TRH など、下垂体前葉では GH, LH, ACTH, FSH など、下垂体後葉では vasopressin, OT, ADH などが産生されて機能分担する。更に、膵臓のランゲルハンス島の A (α), B (β), D (δ) と PP の各細胞では、それぞれ glucagon, insulin, somatostatin, pancreatic polypeptide などが産生されて、恒常性が維持される。

最後に、前述したように、高等真核生物で細胞タイプの決定と生命維持にとって最も重要な基本的な方法 (機構) の 1 つである、エピジェネティック修飾によるクロマチン構造の不可逆的創出を介したプログラム化されていない新しい細胞機能を獲得するバイオ・システムをクロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コード説 (chromatin conformation change code theory: 4C theory) と命名した。ところで、前述の説明と一部重複するが、遺伝子発現を含むクロマチン (または DNA) の機能発現に関する genetic code, histone code, the 4C theory の 3 つのコード説が拠って立つ分子的基盤の概略は下記の通りである。まず、genetic code theory は遺伝子発現の翻訳段階 (translation) で mRNA 上の codon が水素結合によって塩基対 (base pair) を形成することを介して、アミノ酸を活性化したアミノアシル tRNA (aminoacyl-tRNA) を呼び寄せること (または aminoacyl-tRNA が codon を認識してアクセスすること) が基盤となる。次に、histone code theory は histone が種々の化学残基で翻訳後修飾され、これらの複数の組み合わせがマーク (指標) となり、それぞれが特異的な遺伝子発現制御をコードする情報として機能し、酵素等の多種多様な因子群を呼び寄せること (またはこれらの多様な因子群がこのマーク (指標) を認識してアクセスすること) が基盤となる。最後に、the 4C theory は 5'-近傍上流域クロマチン構造の可塑性がエピジェネティック修飾で不可逆的に形成されて、緩いフォーム (loose/open form) or 硬いフォーム (tight/closed form) になり、多彩なクロマチン機能発現に関与する多種多様な因子群を呼び寄せるか逆に拒否すること (またはこれらの多種多様な因子群が loose (open) or tight

(closed) form を認識してアクセスするか逆に認識できずにアクセスできないこと) が基盤となる。多分、4C theory において考え得るコード数 (高等真核細胞の複雑で多種多様な性質 (機能) を決定するコード数) は、候補遺伝子数とこれら遺伝子のコード数の組み合わせに基づいて概略決まる。最も有力な候補は、高等真核生物の多種多様な細胞の機能と特異性を獲得するのに必要な転写因子・クロマチン修飾酵素・関連因子や酵素などをコードする様々な特異遺伝子群である。また、各候補遺伝子のコード数は 2 である。その理由は、5'-近傍上流クロマチン領域は、緩いかまたは硬いフォームとして、当該遺伝子の発現のスイッチのオンまたはオフを指令するからである。したがって、4C theory は高等真核生物の体細胞の特質に関する既知の一般的概念を刷新することができ、さらにプログラム化されていない新しい細胞機能を獲得ための扉を開けることもできる。一方、長い進化の過程で獲得され、すでにプログラム化されている複雑で多種多様な細胞機能は細胞の発生と分化過程を通して秩序正しく系統的に発現される。もちろん、4C theory は高等真核生物の発生と分化過程 (及びいわゆるロバストネス) の説明の 1 つとしても適切である。何故なら、4C theory で想定される環境変化のシグナルの挙動は、上記の 2 つの基本的な生命現象における細胞-細胞、組織-組織、器官-器官などの相互作用 (コミュニケーション) で作動するプレイヤー (ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質など) の挙動とかなり似ているためである。

本総説の最終チェックの段階になって、長期培養及び長期飼育期間に生物の形質変化に関する幾つかの古典的で実証的な先行実験の報告がある事を次のような 2 次資料等によって気付いた。例えば、同一条件下での長期培養期間の約 5 万世代に渡る大腸菌の形質変化がゲノム情報変化 (突然変異) に基づいて生じたという実験的進化に関する報告がある [112]。更に、ゲノム情報変化かクロマチン構造変化のいずれに基づくかは不明であるが、年間気温の異なる 2 地域のキイロショウジョウバエの自然集団を約 1 年間同じ温度環境で飼育して、発育・生存率・寿命などを調べると、両集団の温度適応性に明らかな違いが認められた報告 [113]、高温や低温で飼育したショウジョウバエは約 120 世代でそれぞれの温度に耐える能力に違いがある一群の変種が生じたという報告 [114] などがある。もちろん、4C theory は、前記の環境変化に対応する 2 番目の方法であるゲノム情報変化 (突然変異) (genome information change, mutation) と類似した同一条件下での長期培養期間や飼育期間でのこれらの現象とは明らかに異なる。更に、4C theory は夏季と冬季におけるカンジキウサギの毛色の変化や雷鳥の羽色の変化などの周知の現象とも明らかに異なる。その理由は、このような色の変化に関与するゲノム情報は変化しないこれらの現象は他のほぼ全ての現象と同様に環境変化に適応するすでにプログラム化された機能であるからである。

HDAC2(-/-) DT40 mutants で劇的に蓄積した大量の IgM H-chains と L-chains の排除に関する上述の 4C theory において、解決すべき幾つかの問題点は以下の通りである [102, 107, 108,

111, 115-117]. 1) 何故、HDAC2 欠損にも関わらず、Pax5, Aiolos, EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域(~10 スクレオソームで構成される)のヒストン H3 の K9, K14, K18, K23, K27 残基の 1 つまたは複数のアセチル化レベルは、長期培養期間の初期ステージで減少するのか？ 2) 何故、これら 3 つの遺伝子の 5'-近傍上流クロマチン領域の上記の 1 つまたは複数の Lys 残基の減少したアセチル化レベルは、長期培養期間に増加するのか？ 3) 何故、OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域(~10 スクレオソームで構成される)の上記の 1 つまたは複数の Lys 残基のアセチル化レベルは、長期培養期間に減少するのか？ 4) Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流のクロマチン領域におけるヒストン H3 (あるいは上記の 5 つの Lys 残基) と DNA との結合に、5 つの Lys 残基のどれが主に関与するかを明らかにする必要がある。5) これら 4 つの遺伝子の 5'-近傍上流クロマチン領域の緩いフォームと硬いフォーム (上記の 1 つまたは複数の Lys 残基のアセチル化レベルに基づく) の間での機能的・立体構造的な違いをさらに詳細に説明する必要がある。6) 何故、同じ 1 つの転写因子の遺伝子の上記 Lys 残基のアセチル化レベルの変化パターンは、長期培養期間に個々の mutant clones 間で異なるのか？ 7) 何故、これら 4 つの転写因子の遺伝子の上記 Lys 残基のアセチル化レベルの変化パターンは、長期培養期間に同じ 1 つの mutant clone で異なるのか？ 8) TFC machinery (当該遺伝子の ORF を転写する) は既知の転写装置と同じであるのに、4C machinery (5'-近傍上流のクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出する) は既知のクロマチン修飾装置とどのように異なるのか？ 9) 4C theory を確実に証明するためには、環境変化を認識するファースト・プレイヤーである ECRR/ECRS とクロマチン構造の可塑性を直接的・不可逆的に創出するファイナル・プレイヤーである 4C machinery の存在を実証することが必須である。10) 4C theory を一般化する具体的方法としては、例えば、樹立細胞株の多世代間およびモデル生物 (線虫、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、マウス、ラットなど) の発生・分化過程における、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得する能力への温度・気圧・栄養源などの影響を明らかにすることが、非常に有効かつ重要である。その理由は、上述したように、分子レベルの機構には至っていないが、ショウジョウバエにおける先行実験が既に実施されている事などから判断して、これらの影響は多くの研究グループによって、多種多様な条件下で比較的簡単に研究できるからである。

謝辞：

電子顕微鏡観察及び免疫電子顕微鏡観察を行って頂いた菅沼龍夫博士と澤口朗博士に深謝します。本研究の一部をサポートして頂いた高見恭成博士と菊池秀彦博士に感謝します。さらに、本研究に先立つ私の研究に携わって頂いた全ての共同研究者に感謝します。本研究に先立つ私の研究は多くの科学研究費等の支援を受けて実施しました。

文献：

- [1] Kornberg, R. D.: Structure of chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 931-954, 1977.
- [2] Felsenfeld, G.: Chromatin. *Nature* 271, 115-121, 1978.
- [3] Isenberg, I.: Histones. *Annu. Rev. Biochem.* 48, 159-191, 1979.
- [4] van Holde, K. E.: Chromatin. New York: Springer-Verlag, 1989.
- [5] Wolffe, A. P.: Chromatin: Structure and Function, 2nd ed., Academic Press, San Diego, CA, 1995.
- [6] Ha, S. C., Lowenhaupt, K., Rich, A., Kim, Y. G. and Kim, K. K.: Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases. *Nature* 437, 1183-1186, 2005.
- [7] Robinson, D. J., Fairall, L., Huynh, V. A. and Rhodes, D.: EM measurements define the dimensions of the “30-nm” chromatin fiber: Evidence for a compact, interdigitated structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6506-6511, 2006.
- [8] Jeffrey, H. C.: Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *EMBO J.* 31, 1621-1623, 2012.
- [9] Takami, Y., Higashio, M., Fukuoka, T., Takechi, S. and Nakayama, T.: Organization of the chicken histone genes in a major gene cluster and generation of an almost complete set of the core histone protein sequences. *DNA Res.* 3, 95-99, 1996.
- [10] Allfrey, V., Faulker, R. M. and Mirsky, A. E.: Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 786-794, 1964.
- [11] Brownell, J. E., Zhou, J., Rannali, T., Kobayashi, R., Edmondson, D. G., Roth, S. Y. and Allis, C. D.: Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5 linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851, 1996.
- [12] Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y.: The transcriptional coactivators p300 and CPB are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959, 1996.
- [13] Taunton, J., Hassig, C. A. and Schreiber, S. L.: A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science* 272, 408-411, 1996.
- [14] Wolffe, A. P.: Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science* 272, 371-372, 1996.
- [15] Hassig, C. A. and Schreiber, S. L.: Nuclear histone acetylases and deacetylases and transcriptional regulation: HATs off to HDACs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1, 300-308, 1997.
- [16] Davie, J. R.: Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 173-178, 1998.
- [17] Luger, K. and Richmond, T. J.: The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 140-146, 1998.
- [18] Johnson, C. A. and Turner, B. M.: Histone deacetylases: complex transducers of nuclear signals.

Semin. Cell Dev. Biol. 10, 179-188, 1999.

[19] Brown, C. E., Lechner, T., Howe, L. and Workman, J. L.: The many HATs of transcription coactivators. Trends Biochem. Sci. 25, 15-19, 2000.

[20] Cheung, W. L., Briggs, S. D. and Allis, C. D.: Acetylation and chromosomal functions. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 326-333, 2000.

[21] Strahl, B. D. and Allis, C. D.: The language of covalent histone modifications. Nature 403, 41-45, 2000.

[22] Turner, B. M.: Histone acetylation and an epigenetic code. Bioessays 22, 836-845, 2000.

[23] Jenuwein, T. and Allis, C. D.: Translating the histone code. Science 293, 1074-1080, 2001.

[24] Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C. and Seigneurin-Berny, D.: Functional significance of histone deacetylase diversity. Curr. Opin. Genet. Dev. 11, 162-166, 2001.

[25] Roth, S. Y., Denu, J. M. and Allis, C. D.: Histone acetyltransferases. Annu. Rev. Biochem. 70, 81-120, 2001.

[26] Carrozza, M. J., Utley, R. T., Workman, J. L. and Cote, J.: The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. Trend. Genet. 19, 321-329, 2003.

[27] Yang, X. J. and Seto, E.: Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. Curr. Opin. Genet. Dev. 13, 143-153, 2003.

[28] Wang, S., Yan-Neale, Y., Zeremski, M. and Cohen, D.: Transcription regulation by histone deacetylases. Novartis Found Symp. 259, 238-245, 2004.

[29] Biel, M., Wascholowski, V. and Giannis, A.: Epigenetics - an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 44, 3186-3216, 2005.

[30] Margueron, R., Trojer, P. and Reinberg, D.: The key to development: interpreting the histone code? Curr. Opin. Genet. Dev. 15, 163-176, 2005.

[31] Kouzarides, T.: Chromatin modifications and their function. Cell 128, 693-705, 2007.

[32] Allis, C. D., Berger, S. L., Cote, J., Dent, S., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J. and Zhang, Y.: New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. Cell 131, 633-636, 2007.

[33] Lee, K. K. and Workman, J. L.: Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 284-295, 2007.

[34] Goldberg, A. D., Allis, C. D. and Bernstein, B. E.: Epigenetics: a landscape takes shape. Cell 128, 635-638, 2007.

[35] Shahbazian, M. D. and Grunstein, M.: Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. Annu. Rev. Biochem. 76, 75-100, 2007.

- [36] Berger, S. L.: The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407-412, 2007.
- [37] Suganuma, T. and Workman, J. L.: Crosstalk among histone modifications. *Cell* 135, 604-607, 2008.
- [38] Kohn, K. W., Aladjem, M. I., Weinstein, J. N. and Pommier, Y.: Chromatin challenges during DNA replication: A systems representation. *Mol. Biol. Cell* 19, 1-7, 2008.
- [39] Selvi, R. B. and Kundu, T. K.: Reversible acetylation of chromatin: implication in regulation of gene expression, disease and therapeutics. *Biotech. J.* 4, 375-390, 2009.
- [40] Javierre, B. M., Hemando, H. and Ballestar, E.: Environmental triggers and epigenetic deregulation in autoimmune disease. *Discov. Med.* 12, 535-545, 2011.
- [41] Bannister, A. J. and Kouzarides, T.: Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381-395, 2011.
- [42] Verrier, L., Vandromme, M. and Trouche, D.: Histone demethylases in chromatin cross-talks. *Biol. Cell* 103, 381-401, 2011.
- [43] Butler, J. S., Koutelou, E., Schibler, A. C. and Dent, S. Y.: Histone-modifying enzymes: regulators of developmental decisions and drivers of human disease. *Epigenomics* 4, 163-177, 2012.
- [44] Kooistra, S. M. and Helin, K.: Molecular mechanisms and potential functions of histone deacetylases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13, 297-311, 2012.
- [45] Graff, J. and Tsai, L.-H.: Histone acetylation: molecular mnemonics on the chromatin. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 97-111, 2013.
- [46] Chen, T. and Dent, S. Y. R.: Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat. Rev. Genet.* 15, 93-106, 2014.
- [47] Tee, W.-W. and Reinberg, D.: Chromatin futures and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs. *Development* 141, 2376-2390, 2014.
- [48] Morgan, M. A. and Shilatifard, A.: Chromatin signatures of cancer. *Genes and Dev.* 29, 238-249, 2015.
- [49] Staudt, L. M. and Lenardo, M. J.: Immunoglobulin gene transcription. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 373-398, 1991.
- [50] Peterson, M. L.: RNA processing and expression of immunoglobulin genes. In *Handbook of B and T Lymphocytes* (Snow, E. C. ed.) pp321-342, 1994, Academic press, San Diego.
- [51] Calame, K. L., Lin, K. I. and Tunyaplin, C.: Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 205-230, 2003.
- [52] Busslinger, M.: Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 55-79, 2004.

- [53] Su, I. H. and Tarakhovskiy, A.: Epigenetic control of B cell differentiation. *Semin. Immunol.* 17, 167-172, 2005.
- [54] Nutt, S. L. and Kee, B. L.: The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* 26, 715-725, 2007.
- [55] Ramirez, J., Lukin, K. and Hagman, J.: From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 177-184, 2010.
- [56] Funahashi, J., Okufuji, T., Ohuchi, H., Noji, S., Tanaka, H. and Nakamura, H.: Role of Pax-5 in the regulation of a mid-hindbrain organizer's activity. *Dev. Growth Differ.* 41, 59-72, 1999.
- [57] Stevens, S., Ong, J., Kim, U., Eckhardt, L. A. and Roeder, R. G.: Role of OCA-B in 3'-IgH enhancer function. *J. Immunol.* 164, 5306-5312, 2000.
- [58] Hannon, G. J.: RNA interference. *Nature* 418, 244-251, 2002.
- [59] Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G. and Calame, K.: Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* 19, 607-620, 2003.
- [60] Savitsky, D. and Calame, K.: B-1 B lymphocytes require Blimp-1 for immunoglobulin secretion. *J. Exp. Med.* 203, 2305-2314, 2006.
- [61] Nera, K.-P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskele, K., Buerstedde, J.-M. and Lassila, O.: Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* 24, 283-293, 2006.
- [62] Magari, M., Aya, T., Ikeda, M., Todo, K., Kanayama, N. and Ohmori, H.: Enhancement of antibody production from a chicken B cell line DT40 by reducing Pax5 expression. *J. Biosci. Bioeng.* 107, 206-209, 2009.
- [63] Toman, I., Loree, J., Klimowicz, A. C., Bahlis, N., Lai, R., Belch, A., Pilarski, L. and Reiman, T.: Expression and prognostic significance of Oct2 and Bob1 in multiple myeloma: implications for targeted therapeutics. *Leuk. Lymphoma.* 52, 659-667, 2011.
- [64] Fujita, T. and Fujii, H.: Species-specific 5'-genomic structure and multiple transcription start sites in the chicken Pax5 gene. *Gene* 477, 24-31, 2011.
- [65] John, L. B. and Ward, A. C.: The Ikaros gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Mol. Immunol.* 48, 1272-1278, 2011.
- [66] Baba, T. W., Giroir, B. P. and Humphries, E. H.: Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology* 144, 139-151, 1985.
- [67] Buerstedde, J.-M. and Takeda, S.: Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* 67, 179-188, 1991.
- [68] Takeda, S., Masteller, E. L., Thompson, C. B. and Buerstedde, J.-M.: RAG-2 expression is not

- essential for chicken immunoglobulin gene conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4023-4027, 1992.
- [69] Takami, Y., Takeda, S. and Nakayama, T.: Targeted disruption of an H3-IV/H3-V gene pair causes increased expression of the remaining H3 genes in the chicken DT40 cell line. *J. Mol. Biol.* 250, 420-433, 1995.
- [70] Seguchi, K., Takami, Y. and Nakayama, T.: Targeted disruption of O1H1 encoding a particular H1 histone variant causes changes in protein patterns in the DT40 chicken B cell line. *J. Mol. Biol.* 254, 869-880, 1995.
- [71] Takami, Y., Takeda, S. and Nakayama, T.: Targeted disruption of H2B-V encoding a particular H2B histone variant causes changes in protein patterns on two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis in the DT40 chicken B cell line. *J. Biol. Chem.* 270, 30664-30670, 1995.
- [72] Takami, Y., Takeda, S. and Nakayama, T.: An approximately half set of histone genes is enough for cell proliferation and a lack of several histone variants causes protein pattern changes in the DT40 chicken B cell line. *J. Mol. Biol.* 265, 394-408, 1997.
- [73] Takami, Y. and Nakayama, T.: One allele of the major histone gene cluster is enough for cell proliferation of the DT40 chicken B cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1354, 105-115, 1997.
- [74] Takami, Y. and Nakayama, T.: A single copy of linker H1 genes is enough for proliferation of the DT40 chicken B cell line, and linker H1 variants participate in regulation of gene expression. *Genes Cells* 2, 711-723, 1997.
- [75] Sanematsu, F., Takami, Y., Barman, H. K., Fukagawa, T., Ono, T., Shibahara, K. and Nakayama, T.: Asf1 is required for viability and chromatin assembly during DNA replication in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* 281, 13817-13827, 2006.
- [76] Takami, Y., Ono, T., Fukagawa, T., Shibahara, K. and Nakayama, T.: Essential role of CAF-1-mediated rapid nucleosome assembly for DNA replication and cell division in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 129-141, 2007.
- [77] Takami, Y., Kikuchi, H. and Nakayama, T.: Chicken histone deacetylase-2 controls the amount of the IgM H-chain at the steps of both transcription of its gene and alternative processing of its pre-mRNA in the DT40 cell line. *J. Biol. Chem.* 274, 23977-23990, 1999.
- [78] Takami, Y. and Nakayama, T.: N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *J. Biol. Chem.* 275, 16191-16201, 2000.
- [79] Nakayama, T. and Takami, Y.: Participation of histones and histone-modifying enzymes in cell functions through alterations in chromatin structure. *J. Biochem.* 129, 491-499, 2001.
- [80] Takechi, S., Adachi, M. and Nakayama, T.: Chicken HDAC2 down-regulates IgM light chain gene

promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 263-267, 2002.

[81] Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T.: GCN5: a supervisor in all-inclusive control of vertebrate cell cycle progression through transcription regulation of various cell cycle-related genes. *Gene* 347, 83-97, 2005.

[82] Kikuchi, H., Barman, H. K., Nakayama, M., Takami, Y. and Nakayama, T.: Participation of histones, histone modifying enzymes and histone chaperones in vertebrate cell functions. *Reviews and Protocols in DT40 Research*, Springer-Verlag, Berlin, pp225-243, 2006.

[83] Barman, H. K., Takami, Y., Ono, T., Nishijima, H., Sanematsu, F., Shibahara, K. and Nakayama, T.: Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1547-1557, 2006.

[84] Nakayama, M., Suzuki, H., Yamamoto-Nagamatsu, N., Barman, H. K., Kikuchi, H., Takami, Y., Toyonaga, K., Yamashita, K. and Nakayama, T.: HDAC2 controls IgM H and L-chain gene expressions via EBF1, Pax5, Ikaros, Aiolos and E2A gene expressions. *Genes Cells* 12, 359-373, 2007.

[85] Kikuchi, H. and Nakayama, T.: GCN5 and BCR signaling collaborate to induce pre-mature B cell apoptosis through depletion of ICAD and IAP2 and activation of caspase activities. *Gene* 419, 48-55, 2008.

[86] Barman, H. K., Takami, Y., Nishijima, H., Shibahara, K., Sanematsu, F. and Nakayama, T.: Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 containing complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 624-630, 2008.

[87] Kikuchi, H., Barman, H. K., Nakayama, M., Takami, Y. and Nakayama, T.: Studies on epigenetic control of B cell functions using the DT40 cell line. *Advances in Genetics Research* 2, Urbano K. V. (Ed.), Nova Science Publishers, Inc. NY, pp153-166, 2010.

[88] Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Takami, Y., Imajoh-Ohmi, S. and Nakayama, T.: GCN5 regulates the activation of PI3K/Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress via controlling gene expressions of Syk and Btk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 657-661, 2011.

[89] Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Kiwaki, N., Takami, Y. and Nakayama, T.: GCN5 regulates the superoxide-generating system in leukocytes via controlling gp91-phox gene expression. *J. Immunol.* 186, 3015-3022, 2011.

[90] Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Nishitoh, Y., Takami, Y. and Nakayama, T.: GCN5 protects vertebrate cells against UV-irradiation via controlling gene expression of DNA polymerase η . *J. Biol. Chem.* 287, 39842-39849, 2012.

[91] Kikuchi, H., Nakayama, M., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Nishitoh, H., Takami, Y. and

- Nakayama T.: GCN5 is essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. *J. Leukoc. Biol.* 95, 399-404, 2014.
- [92] Kikuchi, H., Nakayama, M., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Nishitoh, H., Takami, Y. and Nakayama T.: GCN5 is involved in regulation of immunoglobulin heavy chain gene expression in immature B cells. *Gene* 544, 19-24, 2014.
- [93] Escaffit, F., Vaute, O., Chevillard-Briet, M., Segui, B., Takami, Y., Nakayama, T. and Trouche, D.: Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Mol. Cell. Biol.* 27, 554-567, 2007.
- [94] Toyonaga, K., Kikuchi, H., Yamashita, K., Nakayama, M., Chijiwa, K. and Nakayama, T.: E2A participates in a fine control of pre-mature B cell apoptosis mediated by B cell receptor signaling via transcription regulations of survivin, IAP2 and caspase-8 genes. *FEBS J.* 276/5, 1418-1428, 2009.
- [95] Kikuchi, H., Yamashita, K., Nakayama, M., Toyonaga, K., Tsuneyoshi, I., Takasaki, M. and Nakayama, T.: Lacking of Aiolos accelerates pre-mature B cell apoptosis mediated by BCR signaling through elevation in cytochrome c release. *BBA-Molecular Cell Research* 1793, 1304-1314, 2009.
- [96] Kikuchi, H., Nakayama, M., Takami, Y., Kuribayashi, F. and Nakayama, T.: Possible involvement of Helios in controlling the immature B cell functions via transcriptional regulation of protein kinase Cs. *Results Immunol.* 1, 88-94, 2011.
- [97] Kikuchi, H., Nakayama, M., Takami, Y., Kuribayashi, F. and Nakayama, T.: EBF1 acts as a powerful repressor of Blimp-1 gene expression in immature B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 780-785, 2012.
- [98] Kikuchi, H., Nakayama, M., Kuribayashi, F., Imajoh-Ohmi, S., Nishitoh, H., Takami, Y. and Nakayama, T.: Protein kinase C θ gene expression is oppositely regulated by EBF1 and GCN5 in immature B cells. *FEBS Lett.* 588, 1739-1742, 2014.
- [99] Fukagawa, T., Mikami, Y., Nishihara, A., Regnier, V., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Sugata, N., Todokodo, K., Brown, W. and Ikemura, T.: CENP-P, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells. *EMBO J.* 20, 4603-4617, 2001.
- [100] Chang, H. and Delany, M.-E.: Karyotype stability of the DT40 chicken B cell line: macrochromosome variation and cytogenetic mosaicism. *Chromosome Res.* 12, 299-307, 2004.
- [101] Takechi, S., Adachi, M. and Nakayama, T.: Cloning and characterization of the chick Oct binding factor OBF-1. *Biochim. Biophysica Acta* 1577, 466-470, 2002.
- [102] Nakayama, T. and Nakayama, M.: Chromatin Conformation Change Code (4C) theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations. Nakayama, T. and Nakayama, M.

(Eds.), pp. 1-303, 2018. The revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph was published in 2015 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[103] Nakayama, M. and Nakayama, T.: Protein and mRNA levels of IgM H- and L-chains artificially and excessively accumulated in HDAC2-deficient DT40 mutants are dramatically reduced through various generations during continuous cultivation. pp. 1-34, 2018. The revised article (the original paper was uploaded in 2017 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10145170>) is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10170628>

The revised article is also the modified version of Chapter 2 of the revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph was published in 2015 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, M. and Nakayama, T.: Protein and mRNA levels of IgM H- and L-chains artificially accumulated in HDAC2-deficient DT40 mutants are dramatically reduced through various generations during continuous cultivations. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 11-44, 2018. The revised retirement commemorative monograph is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[104] Nakayama, M. and Nakayama, T.: Generation of Pax5-deficient DT40 mutant cells, Pax5(-), and protein and mRNA levels of IgM H- and L-chains artificially and excessively accumulated in Pax5(-) DT40 mutants are rapidly and dramatically reduced through various generations during continuous cultivation. pp. 1-28, 2018. The revised article (the original paper was uploaded in 2017 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10145176>) is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10170947>

The revised article is also the modified version of Chapter 3 of the revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph was published in 2015 and available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, M. and Nakayama, T.: Generation of Pax5-deficient DT40 mutants, Pax5(-), and protein and mRNA levels of IgM H- and L-chains artificially accumulated in Pax5(-) are rapidly and dramatically reduced through various generations during continuous cultivation. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible

Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 45-71, 2018. The revised retirement commemorative monograph is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[105] Nakayama, M. and Nakayama, T.: IgM H- and L-chains artificially and excessively accumulated in HDAC2(-/-) DT40 mutants are gradually and dramatically reduced in distinct ways in individual mutant clones through various generations during continuous cultivation. pp. 1-38, 2018. The revised article (the original paper was uploaded in 2017 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10145178>) is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10170948>

The revised article is also the modified version of Chapter 4 of the revised retirement commemorative monograph (the original retirement commemorative monograph was published in 2015 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, M. and Nakayama, T.: IgM H- and L-chains accumulated artificially and excessively in HDAC2(-/-) DT40 mutants are dramatically reduced in distinct ways in individual mutant clones through various generations during continuous cultivations. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 72-104, 2018. The revised retirement commemorative monograph is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[106] Nakayama, M. and Nakayama, T.: Fundamental and distinct ways for irreversible creation of chromatin structure plasticity of proximal 5'-upstream regions of Pax5, Aiolos, EBF1 and OBF1 genes with epigenetic modifications for gain of new cell function to exclude accumulated IgM H- and L-chains in individual clones of HDAC2(-/-) DT40 mutants through various generations during continuous cultivation. pp. 1-70, 2018. The revised article (the original paper was uploaded in 2017 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10145181>) is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10170993>

The revised article is also the modified version of Chapter 5 of the revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph was published in 2015 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, M. and Nakayama, T.: A fundamental way for irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications for gaining new cell function to exclude IgM H- and L-chains accumulated in HDAC2(-/-) DT40 mutants through various generations during continuous cultivation. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New

Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 105-167, 2018. The revised retirement commemorative monograph is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[107] Nakayama, T. and Nakayama, M.: Chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system for gaining un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations. pp. 1-43, 2018. The revised article is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10145263> is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10171004>

The revised article is also the modified version of Chapter 6 of the revised monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph was published in 2015 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, M. and Nakayama, T.: Chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system for gaining un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 168-202, 2018. The revised retirement commemorative monograph is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[108] Nakayama, T. and Nakayama, M.: An all-inclusive review: Chromatin conformation change code (4C) theory on a bio-system to gain un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations in higher eukaryotes. pp. 1-75, 2018. The revised article (the original paper was published in 2017 and is available from a following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10146006>) is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10171009>

The revised article is also the modified version of Chapter 7 of the revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph published in 2015 and is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, T. and Nakayama, M.: All-inclusive review and history on the chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system for gaining un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and

New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 203-260, 2018.

The revised retirement commemorative monograph is available from following URL:
<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[109] Nakayama, M. and Nakayama, T.: IgM H- and L-chains accumulated excessively in HDAC2(-/-) DT40 mutants are dramatically reduced in distinct ways in individual mutant clones through various generations during continuous cultivation. *Current Topics in Biochemical Research*. 18, 11-25, 2017.

The article is available from following website and URL:

http://www.researchtrends.net/tia/title_issue.asp?id=40&in=0&vn=18&type=3

and <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10168788>

[110] Nakayama, M. and Nakayama, T.: Irreversible creation of chromatin structure plasticity of proximal 5'-upstream regions of Pax5, Aiolos, EBF1 and OBF1 genes with epigenetic modifications to exclude IgM H- and L-chains accumulated in individual clones of HDAC2(-/-) DT40 mutants through various generations during continuous cultivation. *Current Topics in Biochemical Research*. 18, 33-56, 2017.

The article is available from following website and URL:

http://www.researchtrends.net/tia/title_issue.asp?id=40&in=0&vn=18&type=3

and <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10168794>

[111] Nakayama, T. and Nakayama, M.: Chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system to gain un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations. *Current Topics in Biochemical Research*. 18, 65-86, 2017. The article is available from following website and URL:

http://www.researchtrends.net/tia/title_issue.asp?id=40&in=0&vn=18&type=3

and <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10168800>

[112] Cooper, V. S. and Lenski, R. E.: The population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. *Nature*, 407, 736-739, 2000.

[113] 河西正興：キイロシヨウジヨウバエの温度感受性、昆虫、44, 530-536, 1976.

[114] Gribbin, J.: *In search of double helix: Quantum physics and life*, McGraw Hill (1985).

[115] Nakayama, T. and Nakayama, M.: A comprehensive review on the chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system for gaining un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations in higher eukaryotes. pp.1-76, 2019. The third article (the original and second articles published in 2017 and 2018 are available from following URLs:
<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10146006> and

<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10171009>) is available from following URL:

<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10174272>

The third article is also the modified version of Chapter 7 of the revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph published in 2015 is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows:

Nakayama, T. and Nakayama, M.: All-inclusive review and history on the chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system for gaining un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 203-260, 2018.

The second edition of the retirement commemorative monograph is available from following URL:

<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

[116] 中山建男、中山雅美: 高等真核生物の新しい環境変化への適応能力の獲得機構 ~クロマチン・コンフォメーション・チェンジ・コード説 (Chromatin conformation change code (4C) theory) ~: サブタイトル: 高等真核生物が新たな環境変化に適応するために、多世代を通してエピジェネティック修飾による転写因子やクロマチン修飾酵素遺伝子などの 5'-近傍上流のクロマチン構造の可塑性を不可逆的に創出することで、プログラム化されていない新しい細胞機能を獲得するバイオ・システム. pp. 1-77, 2019. The article is available from following URL: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10174562>

[117] Nakayama, T. and Nakayama, M.: A comprehensive and detailed review on the <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10174562> conformation change code (4C) theory: A theory on ways to gain un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through numerous generations in higher eukaryotes. In preparation. The article is the forth revised version of Chapter 7 of the revised retirement commemorative monograph (the original self-publishing retirement commemorative monograph published in 2015 is available from following URL:

<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10123995>) as follows: Nakayama, T. and Nakayama, M.:

All-inclusive review and history on the chromatin conformation change code (4C) theory: A bio-system for gaining un-programmed and new cell functions by means of irreversible creation of chromatin structure plasticity with epigenetic modifications through various generations. In: Chromatin Conformation Change Code (4C) Theory on Gain of Un-programmed and New Cell Functions by Means of Irreversible Creation of Chromatin Structure Plasticity with Epigenetic Modifications through Various

Generations, Nakayama, T. and Nakayama, M. (Eds.), pp. 203-260, 2018. This second edition of the retirement commemorative monograph is available from following URL:
<http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10169365>

The forth revised article (the original, second and third revised articles published in 2017, 2018 and 2019 are available from following URLs: <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10146006> and <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10171009> and <http://opac2.lib.miyazaki-u.ac.jp/webopac/TC10174272> may be published in 2020.

図の説明：

図-1. DT40 野生株及び HDAC2(-/-) DT40 変異株の長期培養期間の初期ステージでの全クローンと後期ステージでの各クローンにおける、Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 及びその他の遺伝子発現制御を介した、IgM H-chain と L-chain の遺伝子発現制御の方法。

(W) DT40 では、HDAC2 は Pax5, Aiolos, EBF1 と Ikaros, E2A の遺伝子発現を逆方向に制御することを介して IgM H-chain, L-chain の遺伝子発現を間接的に制御する。

(E) 培養の初期ステージの HDAC2(-/-)の全クローンでは、Pax5, Aiolos, EBF1 の遺伝子発現の劇的な減少に基づいて、IgM H-chain, L-chain の遺伝子発現は劇的に増加し、結果的に、これら 2 つの蛋白質量は劇的に増加する。

(L) 培養の後期ステージの HDAC2(-/-)の各クローン (2 回目の作製) では、Pax5, Aiolos, EBF1 あるいは OBF1 の遺伝子発現の異なる方法による劇的な増加あるいは減少に基づいて、蓄積した IgM H-chain, L-chain はほぼ同じ変化パターンで劇的に減少する。IgM H-chain, L-chain の遺伝子発現に関して、clone cl.2-1 は OBF1-依存性、clones cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5 は Pax5, Aiolos-依存性、clone cl.2-6 は Pax5, Aiolos, EBF1-依存性である。

Ref. 102 の Figs. 4-8, 4-9, 4-10 のセットで、Suppl. Fig. 6-S1 と Fig. 7-1 と同じ。さらに、Ref. 105 の Figs. 8, 9, 10 のセットで、Ref. 107 の Suppl. Fig. S1 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 1 及び Ref. 109 の Fig. 6 と同じ。Ref. 116 の図-1 と同じ。

図-2. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株における IgM H-chain, L-chain 蛋白質レベルの変化。DT40(W)及び培養の初期ステージ(E)と後期ステージ(L)の HDAC2(-/-) から単離した全蛋白質を二次元電気泳動法(2D-PAGE)で解析した。H と L はそれぞれ IgM H-chain と L-chain を示す。

Ref. 102 の Fig. 2-1 と Ref. 103 の Fig. 1 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 2 と同じ。Ref. 116 の図-2 と同じ。

図-3. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株における IgM H-chain, L-chain 蛋白質レベルの変化。DT40(W)及び長期培養期間の様々な時期の HDAC2(-/-) から単離した全蛋白質を、IgM L-chain 抗体(IgM H-chain と交叉反応する)を用いた Western blotting で解析した。IgM H-chain, L-chain 蛋白質量の相対レベルを下に示す。H と L はそれぞれ IgM H-chain と L-chain を示す。

Ref. 102 の Fig. 2-2 及び Ref. 103 の Fig. 2 と同じ。Ref. 116 の図-3 同。

図-4. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株における IgM H-chain 蛋白質レベルの変化。DT40(W)及び培養の初期ステージ(E)と後期ステージ(L)の HDAC2(-/-)を IgM H-chain 特異抗体を

用いた免疫電子顕微鏡で観察した。(A)は広い視野の多数の細胞の写真、(B)は(A)の矢印で示した一つの細胞の写真。蓄積した大量の IgM H-chain は培養の初期ステージの HDAC2(-/-)のみで観察された。

Ref. 102 の Fig. 2-3、Fig. 7-3 及び Ref. 103 の Fig. 4 と同じ。Ref. 116 の図-4 同じ。

図-5. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株における IgM H-chain, L-chain とコアヒストンの遺伝子発現の変化。

DT40(W)及び培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージでの 3 つの HDAC2(-/-)クローンから全 RNAs を単離し、RT-PCR を実施した。IgM H-chain の完全型(whole form)、分泌型(secreted form)、膜結合型(membrane-bound form) mRNAs と L-chain mRNA 及び各コアヒストン mRNAs に特異的なプライマー(primers)を用いた。

Ref. 102 の Fig. 2-4、Fig. 7-4 及び Ref. 103 の Fig. 5 と同じ。Ref. 116 の図-5 同じ。

図-6. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株における HDACs, HATs, 転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現の変化。

HDACs と HATs (A)及び転写因子(B)の各メンバーの mRNAs に特異的なプライマーと図-5 と同じ全 RNAs を用いて RT-PCR を実施した。

Ref. 102 の Fig. 2-5 及び Ref. 103 の Fig. 6 と同じ。Ref. 116 の図-6 同じ。

図-7. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株におけるヒストン H3 の Lys 残基のバルクのアセチル化及びメチル化レベルの変化。

DT40(W)及び培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージでの 3 つの HDAC2(-/-) クローンから全蛋白質を単離した。コアヒストン H2A, H2B, H3, H4 の種々の特異的な Lys 残基のバルクのアセチル化レベルを、それぞれのアセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いたイムノ・ブロッティング (immunoblotting)で調べた。K9/H3 のバルクのメチル化レベルはメチル化 K9/H3 特異抗体を用いて調べた。

Ref. 102 の Fig. 2-6 及び Ref. 103 の Fig. 7 と同じ。Ref. 116 の図-7 同じ。

図-8. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株における Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流クロマチン領域のヒストン H3 の Lys-9 残基のアセチル化レベルの変化。

DT40(W)及び培養の初期(E)と後期(L)ステージの 3 つの HDAC2(-/-) クローンで免疫沈降(ChIP)アッセイを実施した。アセチル化 K9/H3 特異抗体と Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流を幾つかの断片として PCR で増幅できる特異的なプライマーを用いた。

Ref. 102 の Fig. 2-7 及び Ref. 103 の Fig. 9 と同じ。Ref. 116 の図-8 と同じ。

図-9. 長期培養期間の Pax5(-) DT40 変異株での IgM H-chain, L-chain の遺伝子発現の変化。
DT40(W)及び培養の最初期(F)、初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージにおける 3 つの Pax5(-) クローンから全 RNAs を単離して RT-PCR を実施した。IgM H-chain の完全型(whole form), 分泌型(secreted form), 膜結合型(membrane-bound form) mRNAs 及び L-chain mRNA に特異的なプライマーを用いた。

Ref. 102 の Fig. 3-5、Fig. 7-7 と Ref. 104 の Fig. 6 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 7 と同じ。
Ref. 116 の図-9 と同じ。

図-10. 長期培養期間の Pax5(-) DT40 変異株での IgM H-chain, L-chain の蛋白質レベルの変化。
DT40(W)及び培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージにおける 3 つの Pax5(-) クローンから単離した全蛋白質を IgM L-chain 抗体(IgM H-chain とともに交叉反応する)を用いた Western blotting で解析した。IgM H-chain, L-chain 蛋白質量の相対レベルを下に示す。H と L はそれぞれ IgM H-chain と L-chain を示す。

Ref. 102 の Fig. 3-3、Fig. 7-5 と Ref. 104 の Fig. 3 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 5 と同じ。
Ref. 116 の図-10 と同じ。

図-11. 長期培養期間の Pax5(-) DT40 変異株の形態。
DT40(W)及び培養の初期(E)と後期(L)ステージにおける Pax5(-)を広い視野(左側写真)と異なる狭い視野(右側の 3 つの写真)で顕微鏡観察した。

Ref. 102 の Suppl. Fig. 3-S1、Fig. 7-6 と Ref. 104 の Fig. 5 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 6 と同じ。Ref. 116 の図-11 と同じ。

図-12. 長期培養期間の Pax5(-) DT40 変異株での HDACs, HATs と転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現の変化。
HDACs と HATs (A)及び転写因子(B)の各メンバーの mRNAs に特異的なプライマーと図-9 と同じ全 RNAs を用いて RT-PCR を実施した。

Ref. 102 の Fig. 3-6 及び Ref. 104 の Fig. 7 と同じ。Ref. 116 の図-12 と同じ。

図-13. ニワトリ HDAC2 遺伝子のゲノム構成、HDAC2(-/-) DT40 変異株の作製及び長期培養期間の HDAC2(-/-) 変異株の各クローンにおける IgM H-chain, L-chain の蛋白質レベルと mRNA レベルの変化。

(A) ニワトリ HDAC2 遺伝子のゲノム領域 (上)、標的領域の拡大図 (中) と 2 つの標的アレル (下 2 つ) の模式図。エクソン 1~16 の位置を縦棒で示す。薬剤耐性遺伝子を白抜きボックスで示す。プローブ HDAC2 を灰色ボックスで示す。BamH1 と EcoRV 断片をその長さと共に示す。

(B) 相同組換えのサザン分析(Southern blotting)。ゲノム DNA を DT40, 1 個のヘテロ変異株、6 個のホモ変異株から単離した。BamH1 と EcoRV 断片をプローブ HDAC2 で分析した。

(C) ウェスタン分析(Western blotting)。DT40 (W)と培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージの 6 つの HDAC2(-/-) clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6 から全蛋白質を単離した。IgM H-chain と L-chain の 2 つの特異抗体を用いて Western blotting を実施した。H と L はそれぞれ IgM H-chain と L-chain (2 つのバンド) を示す。

(D) RT-PCR。DT40 (W)と培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージの 6 つの HDAC2(-/-)クローンから全 RNAs を単離した。IgM H-chain の完全型(whole form), 分泌型(secreted form), 膜結合型(membrane-bound form) mRNAs 及び L-chain mRNA に特異的なプライマーを用いた。

Ref. 102 の Fig. 4-1、Fig. 7-8 と Ref. 105 の Fig. 1 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 8 及び Ref. 109 の Fig. 1 と同じ。Ref. 116 の図-13 と同じ。

図-14. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの IgM H-chain, L-chain の蛋白質レベルの変化。

DT40 (W)及び培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージを含む幾つかの時期における 6 つの HDAC2(-/-)クローン(clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6)から全蛋白質を単離した。IgM L-chain 抗体 (IgM H-chain と交叉反応する)と IgM H-chain 抗体の 2 つを用いて Western blotting で順次解析した。IgM H と L はそれぞれ IgM H-chain と L-chain を示す。

Ref. 102 の Fig. 4-2、Suppl. Fig. 6-S4、Fig. 7-9 及び Fig. 8-3 と同じ。さらに、Ref. 105 の Fig. 2 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 9 と Ref. 109 の Fig. 2 及び Ref. 111 の Fig. 2 と同じ。Ref. 116 の図-14 と同じ。

図-15. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの HDACs, HATs, 転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現の変化。

HDACs と HATs (A)及び転写因子(B)の各メンバーの mRNAs に特異的なプライマーと図-13D と同じ 6 つの HDAC2(-/-)クローン(clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-3, cl.2-4, cl.2-5, cl.2-6)の全 RNAs を用いて RT-PCR を実施した。

Ref. 102 の Fig. 4-3 と Ref. 105 の Fig. 3 及び Ref. 109 の Fig. 3 と同じ。Ref. 116 の図-15 と同じ。

図-16. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの IgM H-chain の蛋白質レベルの

変化。

DT40 及び培養の初期(E)と後期(L)ステージにおける HDAC2(-/-)の 4 つのクローン(clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)を電子顕微鏡(上図)と IgM H-chain の特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡(下図)で観察した。蓄積した IgM H-chain に基づく濃い細胞質画分は HDAC2(-/-)の 4 つのクローンの培養の初期ステージのみで認められた(上図の E)。IgM H-chain に基づくシグナルは HDAC2(-/-)の 4 つのクローンの培養の初期ステージのみで認められた(下図の E)。

Ref. 102 の Fig. 4-4、Fig. 7-11 と Ref. 105 の Fig. 4 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 11 と同じ。Ref. 116 の図-16 と同じ。

図-17. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンの形態変化。

DT40 及び培養の初期(E)と後期(L)ステージにおける HDAC2(-/-)の 4 つのクローン(clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)を顕微鏡で観察した。多数の異なる視野の写真の中の 2 つを示した。HDAC2(-/-)の凝集性のフォームは培養の初期ステージのみで認められ、後期ステージでは DT40 と同様に分散性のフォームに変化していた。

Ref. 102 の Fig. 4-5、Fig. 7-12 と Ref. 105 の Fig. 5 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 12 と同じ。Ref. 116 の図-17 と同じ。

図-18. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの IgM H-chain, L-chain 及び HATs, HDACs と転写因子ファミリーの各メンバーの遺伝子発現の変化。

DT40 (W)及び培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージを含む幾つかの時期における HDAC2(-/-)の 4 つのクローン(clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)から全 RNAs を単離した。IgM H-chain の完全型(whole form)、分泌型(secreted form)、膜結合型(membrane-bound form) mRNAs と L-chain mRNA 及び図-13D と図-15 で変化した HATs, HDACs と転写因子ファミリーの各メンバーの mRNAs に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を実施した。

Ref. 102 の Fig. 4-6、Fig. 6-S5、Fig. 7-10、Fig. 8-4 と Ref. 105 の Fig. 6 と Ref. 107 の Fig. Suppl. Fig. S5 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 10 と Ref. 109 の Fig. 4 及び Ref. 111 の Fig. 3 と同じ。Ref. 116 の図-18 と同じ。

図-19. HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンの増殖速度。

HDAC2(-/-)の 3 つのクローン(cl.2-1, cl.2-4, cl.2-6)と DT40 (WT)を培養し、表示した時期で細胞数を計測し増殖速度を決定した。

Ref. 102 の Fig. 4-7 と Ref. 105 の Fig. 7 及び Ref. 109 の Fig. 5 と同じ。Ref. 116 の図-19 と同じ。

図-20. HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンで蓄積した大量の IgM H-chains, L-chains を除去する方法に関するモデル。

Ref. 102 の Fig. 4-11 と Ref. 105 の Fig. 11 及び Ref. 109 の Fig. 7 と同じ。Ref. 116 の図-20 と同じ。

図-21. 長期連続培養期間における HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域でのヒストン H3 の特定 Lys 残基のアセチル化レベルの変化。

DT40(W)と連続培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージにおける HDAC2(-/-)の各クローン (clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)での Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化を NotchIP アッセイ法で調べた。Pax5 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、転写部位の DNA 塩基配列に基づいてデザインしたプライマーと各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた。ただし、clone cl.2-2 に関しては、初期(E)と後期(L)ステージのみでアセチル化 K9/H3, K14/H3, K18/H3, K27/H3 抗体のみを用いた。

Ref. 102 の Figs. 5-1 ~ 5-4 のセットで、Fig. 8-6 と同じ。さらに、Ref. 106 の Figs. 1 ~ 4 のセットで、Ref. 110 の Fig. 1 と同じ。Ref. 116 の図-21 と同じ。

図-22. 長期連続培養期間における HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域でのヒストン H3 の特定 Lys 残基のアセチル化レベルの変化。

DT40(W)と連続培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージにおける HDAC2(-/-)の各クローン (clones cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)での Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化を NotchIP アッセイ法で調べた。Aiolos 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、転写部位の DNA 塩基配列に基づいてデザインしたプライマーと各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた。

Ref. 102 の Figs. 5-5 ~ 5-8 のセットで、Fig. 8-7 と同じ。さらに、Ref. 106 の Figs. 5 ~ 8 のセットで、Ref. 110 の Fig. 2 と同じ。Ref. 116 の図-22 と同じ。

図-23. 長期連続培養期間における HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域でのヒストン H3 の特定 Lys 残基のアセチル化レベルの変化。

DT40(W)と連続培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージにおける HDAC2(-/-)の各クローン

(cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)での EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化を NotchIP アッセイ法で調べた。EBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、転写部位の DNA 塩基配列に基づいてデザインしたプライマーと各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた。

Ref. 102 の Figs. 5-9 ~ 5-12 のセットで、Fig. 8-8 と同じ。さらに、Ref. 106 の Figs. 9 ~ 12 のセットで、Ref. 110 の Fig. 3 と同じ。Ref. 116 の図-23 と同じ。

図-24. 長期連続培養期間における HDAC2(-/-) DT40 変異株の各クローンでの OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域でのヒストン H3 の特定 Lys 残基のアセチル化レベルの変化。

DT40(W)と連続培養の初期(E)、中期(M)と後期(L)ステージにおける HDAC2(-/-)の各クローン (cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)での OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流及び転写部位のクロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 残基のアセチル化レベルの変化を NotchIP アッセイ法で調べた。OBF1 遺伝子の 5'-近傍上流、5'-遠隔上流、転写部位の DNA 塩基配列に基づいてデザインしたプライマーと各アセチル化 Lys 残基の特異抗体を用いた。

Ref. 102 の Figs. 5-13 ~ 5-16 のセットで、Fig. 8-9 と同じ。さらに、Ref. 106 の Figs. 13 ~ 16 のセットで、Ref. 110 の Fig. 4 と同じ。Ref. 116 の図-24 と同じ。

図-25. Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 に関する、長期連続培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の 4 つのクローン(cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)における、5'-近傍上流クロマチン領域の K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベル(hyper- or hypo-acetylation levels)、クロマチン構造のフォーム(loose or tight form)、遺伝子発現(mRNA)レベル(high or low level)の変化のまとめ。

Ref. 102 の Fig. 5-21 と同じで、Suppl. Fig. 6-S10 と Fig. 7-16 の改変版。さらに、Ref. 106 の Fig. 21 と Ref. 107 の Suppl. Fig. S10 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 17 及び Ref. 110 の Fig. 5 と同じ。Ref. 116 の図-25 と同じ。

図-26. IgM H-chain は HDAC2(-/-) DT40 変異株の核周囲腔(peri-nuclear space)、小胞体(endoplasmic reticulum)、細胞表面(cell surface)に局在する。

HDAC2(-/-) をサポニン(saponin)で未処理(A)と処理(B-E)後、IgM H-chain の特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を実施した。矢印の P, E, S はそれぞれ、核周囲腔(peri-nuclear space)、小胞体(endoplasmic reticulum)、細胞表面(cell surface)に局在する IgM H-chain のポジティブ・シグナルを示す。

Ref. 102 の Fig. 6-1, Fig. 7-18, Fig. 8-11 と同じ。さらに、Ref. 107 の Fig. 1 と Refs. 108, 115 and 117

の Fig. 18 及び Ref. 111 の Fig. 8 と同じ。Ref. 116 の図-26 と同じ。

図-27. IgM H-chain は長期培養期間の初期(E)と後期(L)ステージの HDAC2(-/-) DT40 変異株の核周囲腔(peri-nuclear space)に局在する。

培養の初期(E)と後期(L)ステージの HDAC2(-/-)を IgM H-chain の特異抗体を用いた免疫電子顕微鏡で観察した。(A)は初期ステージの HDAC2(-/-)の 1つのクローンの写真、(B), (C)はそれぞれ(A)の矢印 b, c で示した部位の拡大版。(D), (G), (J)は後期ステージの HDAC2(-/-)の 3つのクローンの写真、(E), (F), (H), (I), (K)はそれぞれ(D), (G), (J)の矢印 e, f, h, i で示した部位の拡大版。蓄積した IgM H-chain は初期と後期ステージの全ての HDAC2(-/-)の核周囲腔(peri-nuclear space)に局在する。

Ref. 102 の Fig. 6-3、Fig. 7-19 と同じ。さらに、Ref. 107 の Fig. 3 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 19 と同じ。Ref. 116 の図-27 と同じ。

図-28. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の clone cl.2-1 における Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の各 5'-近傍上流クロマチン領域におけるヒストン H3 の 5つの特定の Lys 残基 (K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3 and K27/H3)のアセチル化レベルの変化。

Ref. 102 の Figs. 5-1, 5-5, 5-9, 5-13 のセットで、Fig. 6-S6 と Fig. 7-13 の改変版。さらに、Ref. 107 の Suppl. Fig. S6 及び Ref. 111 の Fig. 4 と同じ。Ref. 116 の図-28 と同じ。

図-29. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の clone cl.2-2 における Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の各 5'-近傍上流クロマチン領域におけるヒストン H3 の 5つの特定の Lys 残基 (K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3 and K27/H3)のアセチル化レベルの変化。

Ref. 102 の Figs. 5-2, 5-6, 5-10, 5-14 のセットで、Fig. 6-S7 と Fig. 7-14 の改変版。さらに、Ref. 107 の Suppl. Fig. S7 及び Ref. 111 の Fig. 5 と同じ。Ref. 116 の図-29 と同じ。

図-30. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の clone cl.2-4 における Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の各 5'-近傍上流クロマチン領域におけるヒストン H3 の 5つの特定の Lys 残基 (K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3 and K27/H3)のアセチル化レベルの変化。

Ref. 102 の Figs. 5-3, 5-7, 5-11, 5-15 のセットで、Fig. 6-S8 と Fig. 7-15 の改変版。さらに、Ref. 107 の Suppl. Fig. S8 及び Ref. 111 の Fig. 6 と同じ。Ref. 116 の図-30 と同じ。

図-31. 培養期間中の HDAC2(-/-) DT40 変異株の clone cl.2-6 における Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 遺伝子の各 5'-近傍上流クロマチン領域におけるヒストン H3 の 5つの特定の Lys 残基 (K9/H3,

K14/H3, K18/H3, K23/H3 and K27/H3)のアセチル化レベルの変化。

Ref. 102 の Figs. 5-4, 5-8, 5-12, 5-16 のセットで、Fig. 6-S9 と Fig. 7-16 の改変版。さらに、Ref. 107 の Suppl. Fig. S9 及び Ref. 111 の Fig. 7 と同じ。Ref. 116 の図-31 と同じ。

図-32. 長期培養期間の HDAC2(-/-) DT40 変異株の 4 つのクローン(cl.2-1, cl.2-2, cl.2-4, cl.2-6)における Pax5, Aiolos, EBF1, OBF1 に関する、5'-近傍上流クロマチン領域での K9/H3, K14/H3, K18/H3, K23/H3, K27/H3 のアセチル化レベル(hyper- or hypo-acetylation levels)、クロマチン構造のフォーム(loose or tight form)、遺伝子発現(mRNA)レベル(high or low level)の変化。

Ref. 102 の Figs. 6-5, 7-21, 8-10 と同じ。さらに、Ref. 107 の Fig. 5 及び Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 21 及び Ref. 111 と Fig. 10 と同じ。Ref. 116 の図-32 と同じ。

図-33. 核周囲腔(peri-nuclear space)での IgM H-chain の局在及び HDAC2(-/-) DT40 変異株における蓄積した IgM H-chain に関するシグナルのクロマチン構造への伝達機構のモデル。

左図) HDAC2(-/-)の IgM H-chain が蓄積している核周囲腔(peri-nuclear space)の一部分 (図 26-C の下部の矢印 P で示した) を反転して拡大した写真。

右図) 蓄積した IgM H-chain のクロマチン構造へのシグナル伝達機構のモデル。HDAC2(-/-)の核周囲腔(peri-nuclear space)で蓄積した IgM H-chain についてのシグナルは、個々の変異株クローンでクロマチン構造へ繰り返し伝達され、このシグナルに対する不均衡な応答と集中とが引き続いて起る。ECRR/ECRS: environment change recognition receptor/site (環境変化認識受容体/部位); 4C machinery: chromatin conformation (structure) change complex machinery (クロマチン構造変化複合体装置)。

Ref. 102 の Fig. 6-4, Fig. 7-20, Fig. 12 と同じ。さらに、Ref. 107 の Fig. 4 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 20 及び Ref. 111 の Fig. 9 と同じ。Ref. 116 の図-33 と同じ。

図-34. 多世代を通してのエピジェネティック修飾によるクロマチン構造の可塑性の不可逆的創出を介したプログラム化されていない新しい細胞機能獲得に関する chromatin conformation change code theory (4C theory)のモデル。

エピジェネティック修飾によるクロマチン構造の可塑性の不可逆的創出は、多世代を通して、特定の遺伝子の ORF(open reading frame)ではなくて、5'-近傍上流(proximal 5'-upstream chromatin region: notch of chromatin:クロマチンの刻み目)で起る。クロマチン構造の硬いかあるいは緩いフォーム(tight or loose form)は、ヒストン H3 の特定の Lys 残基の低いかあるいは高いアセチル化レベル(hypo- or hyper-acetylation levels)に基づいており、遺伝子発現 (転写) のスイッチ(off or on)を指令して転写産物 (mRNAs)の低いかあるいは高いレベルを引き起す。

Ref. 102 の Fig. 6-6, Fig. 7-23, Fig. 8-14 と Ref. 107 の Fig. 6 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 23 及び Ref. 111 と Fig. 11 と同じ。Ref. 116 の図-34 と同じ。

図-35. 子孫世代の細胞におけるエピジェネティック修飾による 5'-近傍上流領域のクロマチン構造の可塑性の不可逆的創出及び適当なシグナルを受け取った細胞における通常の遺伝子発現と酵素反応の可逆的制御。

上図) エピジェネティック修飾による特定の遺伝子の 5'-近傍上流領域のクロマチン構造の可塑性の不可逆的創出は多世代を通して子孫世代の細胞で緩やかに起り、環境変化のシグナルを最初に受け取った当該細胞では起らない。Ac, Ac/2, Ac/10 はそれぞれ、コアヒストン (例えば、ヒストン H3) の特定の Lys (K) 残基の高い、かなり高い、幾らか高いアセチル化レベル(hyper-, considerably hyper- and somewhat hyper-acetylation levels)を定性的に表す。

中間図と下図) 通常の遺伝子発現 (中間図: 転写調節領域における) と酵素反応 (下図) の制御は適当なシグナルを受け取った当該細胞で即効的・可逆的に起る。Ac と P はそれぞれ、アセチル化、リン酸化、その他の化学修飾を表す。

Ref. 102 の Fig. 6-7, Fig. 7-22, Fig. 8-13 と Ref. 107 の Fig. 7 と Refs. 108, 115 and 117 の Fig. 22 及び Ref. 111 の Fig. 12 と同じ。Ref. 116 の図-35 と同じ。