

長鎖ノンコーディング RNA 転写制御による  
哺乳類細胞の最終分化機構

山本 直樹



## 目次

略語集	3
要旨	5
緒言	8
第一章	
序論	17
結果	19
考察	41
第二章	
序論	45
結果	47
考察	61
総括	65
材料と方法	71
表	79
謝辞	81
引用文	83

## 略語集

shRNA	small hairpin RNA
pancRNA	promoter-associated noncoding RNA
lncRNA	long noncoding RNA
ATP	adenosine 5'-triphosphate
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
NGF	nerve growth factor
LIF	leukemia inhibitory factor
CRE	cAMP response element
HOX	homeobox
ORF	open reading frame
TSS	transcription start site
TIS	translational initiation site
Xic	X inactivation center
aBiP	annotated bidirectional promoter
pBiP	pancRNA-associated bidirectional promoter
Arhgap26	Rho GTPase activating protein 26
Cbp	CREB-binding protein
Cdk2	cyclin-dependent kinase 2
Cdk4	cyclin-dependent kinase 4
Creb1	cAMP response element binding protein 1
Creml	cAMP responsive element modulator
Dnmt1	DNA (cytosine-5-) -methyltransferase 1
Dnmt3a/b	DNA (cytosine-5-) -methyltransferase 3a/b
Ezh2	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
Gata2	GATA binding protein 2

Gfap	glial fibrillary acidic protein
HDAC	histone deacetylase
Hp1	heterochromatin protein 1
Icer	Inducible cAMP early repressor
JMJ	jumonji
MeCP2	methyl-CpG binding protein 2
Mll	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia
Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1
Oip5	opa interacting protein 5
Pcna	proliferating cell nuclear antigen
Pka	cAMP dependent protein kinase
Pp1	serine/threonine protein phosphatase
Pp2a	protein phosphatase 2A regulatory subunit
PRC2	polycomb repressive complex 2
Sphk1	sphingosine kinase 1
Stat3	signal transducer and activator of transcription 3
Tdg	thymine DNA glycosylase
TET	ten-eleven translocation
Hotair	HOX transcript antisense RNA
Hottip	HOXA distal transcript antisense RNA
Xist	X inactive specific transcript
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
ChIP	chromatin immunoprecipitation
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
FDR	false discovery rate

# 要旨

## 序論

多細胞生物は、同一のゲノム DNA を持ちながらさまざまに分化状態の異なる細胞によって構成される。個々の分化細胞の性質の違いは細胞状態特異的なエピゲノム制御によって規定されている。しかし、細胞状態特異的なエピゲノムを形成するために必要な配列特異的なエピジェネティック制御機構については殆ど解明されていない。哺乳類ゲノムの大部分は、長鎖ノンコーディング RNA (long noncoding RNA、lncRNA) と呼ばれるタンパク質に翻訳されない RNA の鋳型として機能しており、本研究では、この lncRNA がエピゲノム制御タンパク質と相互作用して配列特異的な制御を促す因子として機能することに着目した。特に、最終分化を促しうる cyclic adenosine monophosphate (cAMP) シグナルを伝達する転写因子が、両方向性遺伝子プロモーターを選択的に標的としていることに着目した。両方向性プロモーター領域から遺伝子と逆方向に生み出される lncRNA である promoter-associated noncoding RNA (pancrRNA) を介した配列特異的なエピジェネティック制御機構が cAMP シグナル下流で駆動することにより、細胞状態特異的なエピゲノム状態の形成に機能しているのではないかと仮説をたてた。仮説の検証のため、cAMP 依存的に不可逆的に細胞周期を停止するラット副腎髄質由来の褐色細胞腫である PC12 細胞分化系を活用した。

## 結果

### 第一章

ここでは、PC12 細胞の cAMP 依存性不可逆分化過程において、pancRNA と mRNA を生み出す両方向性プロモーター (pancRNA-associated bidirectional promoter、pBiP) が cAMP 依存性転写因子によって制御されているのか検証した。

directional RNA-seq 解析から、cAMP 依存的に不可逆分化した PC12 細胞では細胞周期関連遺伝子群が強く抑制されていること、数千の両方向性プロモーターが cAMP シグナル下流で直接的な正または負の転写制御の作用点となっていること、及び、両方向性プロモーターの 80%以上が pBiP であることを明らかにした。続いて、ゲノムワイドデータを元に、cAMP 依存性転写因子である Creb1 と Icer のクロマチン免疫沈降やノックダウン実験を行い、PC12 細胞分化過程で発現相関が高い pancRNA と mRNA を転写制御している pBiP において、Creb1 による正の転写制御と Icer による負の転写制御が確かに行われていることを明らかにした。

### 第二章

ここでは、第一章の解析から cAMP 依存性転写因子によって直接転写制御されていることが明らかになった、紡錘体形成に関わる遺伝子である *Nusap1* の pancRNA である *pancNusap1* が、配列特異的なエピジェネティック変化をもたらすことで、*Nusap1* の発現制御を介して不可逆的に PC12 細胞の細胞増殖を停止できるのか、検証した。

PC12 細胞の不可逆分化過程では *Nusap1* プロモーター領域でヒストン脱アセチル化が起き、*Nusap1* プロモーターの転写活性が不可逆的にかつ配列特異的に抑制されていた。そこで、*pancNusap1* のノックダウンや過剰発現実験を行ったところ、Icer による *pancNusap1* の発現抑制が、*Nusap1* プロモーターのヒストン脱アセチル化によるクローズドクロマチン

形成を引き起こすことで、*Nusap1* の転写をエピジェネティックに抑制することが明らかになった。さらに、この抑制機構が、PC12 細胞の cAMP 依存性不可逆分化において必須であることも明らかになった。

## 総括

哺乳類細胞においては、cAMP 依存的な分化シグナル経路下流で両方向性プロモーターが高度に標的化されており、転写因子による遺伝子発現パターン転換の起点になっていることが分かった。この時に lncRNA は大事な役割を果たしており、PC12 細胞の最終分化においては、遺伝子発現と共役して両方向性プロモーターから生み出されている pancRNA が配列特異的エピジェネティック制御を仲介することで、分化シグナルによる遺伝子発現パターンの固定化による細胞周期の不可逆的停止を引き起こし、最終分化を達成していることが考えられた。

## 緒言

祖先から情報を受け取り、自らの情報を織り込み、子孫へと受け継ぐ。この遺伝と呼ばれる現象は生命の定義の中核をなすものである。1953年、Watson と Crick はアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) という、たった4種類の DNA と呼ばれる核酸の組み合わせによって遺伝情報が担われうることを示す DNA 二重らせんモデルを提唱した。この驚くべき美しさをもった遺伝モデルによって、生命の普遍的な遺伝法則を分子レベルで理解することをめざす古典分子生物学の門が開かれた。古典分子生物学は華々しい成果をあげ、1960年代後半には DNA より RNA が転写され RNA がタンパク質に翻訳されるという生命に普遍的な遺伝暗号情報処理の流れの実証に至った。続く1970年代には試験管内 DNA 組み換え法 (Cohen et al., 1973) や DNA 配列決定法 (Maxam and Gilbert, 1977) などの遺伝子工学手法を用いることで個々の遺伝子機能の解明が可能になり、進化、発生、細胞機能を分子レベルで理解することを目指す、現代の分子生物学が生まれた。

多細胞生物は、さまざまに分化した、性質の違う細胞によって構成される。1950年代まで、これらの分化細胞の違いは、遺伝子が選択的に失われることから生まれているのではないかと考えられていた。しかし、除核したカエルの卵に分化細胞の核を移植しても正常なオタマジャクシが生まれることから、同一個体では殆どの細胞は同一のゲノム DNA を共有しており、分化細胞の違いは、ジェネティックな変化ではなく、ゲノムに結合して遺伝子発現状態を規定する因子が異なることによって生じていることが1960年に示されていた (Gurdon, 1960)。そのため、1970年代以降、DNA への結合能をもつ転写因子による細胞状態特異的な遺伝子転写制御機構に関する研究が盛んに行われた。一方、1960年代のカエル卵母細胞を用いた体細胞核移植実験では、発生段階が進んだ細胞核ほど、移植後の発生効率が落ちる現象が観察されていた (Gurdon, 1962)。このことは、転写因子による細胞状態特異的な遺伝子発現制御以外に、あたかも分化細胞の「記憶」が残っているかのように、転写因子による

遺伝子転写制御に抵抗して細胞状態特異的な遺伝子発現状態を維持する機構が核内に存在していることを示唆していた。DNA と相互作用するタンパク質についての知見が深まっていくにつれ、真核生物細胞においては、核内の DNA はタンパク質との複合体であるクロマチンとして存在しており、ヒストンに DNA が巻き付くことでヌクレオソームというクロマチンの基本単位を構成していることが明らかになった (Kornberg, 1974; Kornberg and Thonmas, 1974)。ヒストンは転写因子による遺伝子発現の活性化と拮抗して遺伝子発現を不活性化状態に保つものとして着目されていたが、1993 年には、ヌクレオソームの外側に伸びたヒストンの N 末端にあるリジンがアセチル化されると、DNA との電氣的な親和性が変化してクロマチン構造が緩み、転写因子が DNA 配列にアクセスしやすくなることが報告された (Lee et al., 1993)。そのため、細胞状態特異的な遺伝子発現状態はゲノム領域ごとにクロマチン構成物質の化学修飾が変化することで維持できる可能性が示唆された。1990 年代後半からは、このようなクロマチンによる遺伝子発現制御機構に関する学問領域は、古くは、古典的遺伝学=ジェネティクス (DNA 配列変化) では説明のできない生命現象に関する学問領域を広く指して使用されていた「エピジェネティクス」の一分野として、盛んに研究が行われるようになった。

エピジェネティクスというキーワードが一般に広く用いられるようになるとともに、ヒストンのアセチル化のように DNA 配列変化以外の遺伝情報として次世代に受け継がれうるクロマチン構成物質に施された化学修飾はエピジェネティック修飾と呼ばれるようになった。遺伝子転写制御に関わる主要なエピジェネティック修飾としては、ヒストン修飾と DNA のメチル化があげられる。ヒストンは H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類のサブユニットがそれぞれ 2 分子ずつ結合したヒストン 8 量体として存在している (Kornberg and Thonmas, 1974)。現在までに、ヒストンの N 末端はアセチル化の他にも、メチル化、リン酸化、SUMO 化などさまざまな化学修飾を受けており、さらに化学修飾をうけるアミノ酸の種類やそれらの N 末

端からの位置によってもクロマチン構造に与える影響が異なっていることが分かっている

(Bekker-Jensen and Mailand, 2011; Jenuwein and Allis, 2001; Tan et al., 2011)。例えば、活性化型クロマチン形成に寄与するヒストン H3 の 9 番目や 27 番目のリジンのアセチル化 (H3K9ac、H3K27ac) やヒストン H3 の 4 番目リジンのトリメチル化 (H3K4me3)、逆に不活性化型のクロマチン形成に寄与するヒストン H3 の 9 番目や 27 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3、H3K27me3) などがよく知られている。さらに、一つのヒストンが数種類のヒストン修飾の組み合わせをもつ場合もあり、ヒストン修飾による制御は非常に多様であることが分かっている (Marks et al., 2012; Rea et al., 2000)。ヒストン修飾がクロマチン構造に影響を与える機構には、前述したヒストンと DNA との電気的な親和性を変化させる機構以外にも、ヌクレオソームの外に伸びた N 末端がヒストン修飾認識ドメインを持つタンパク質との相互作用を介した機構も存在している。例えば、H3K9 のメチル化はヘテロクロマチンタンパク Hp1 によって認識され、Hp1 同士が凝集することで不活性化型クロマチンを形成する (Lachner et al., 2001)。もう一つの主要なエピジェネティック修飾である DNA メチル化は、DNA を構成するシトシンのピリミジン環 5 位の炭素原子にメチル基が付与される現象であり、主にゲノム上のシトシン・グアニン連続配列 (CpG 配列) において生じる。DNA メチル化に関する研究の歴史は比較的早く、1951 年にはメチル化シトシンがゲノム上に存在していることが報告されている (Wyatt, 1951)。DNA メチル化の遺伝子の転写制御への関与は、1985 年に遺伝子の 5' 端付近の CpG 配列の DNA メチル化が遺伝子の転写不活性化をもたらす事が報告され、初めて証明された (Keshet et al., 1985)。DNA メチル化による遺伝子転写抑制は、遺伝子発現制御領域にある転写因子結合配列周辺の DNA メチル化が転写因子結合を阻害すること (Comb and Goodman, 1990)、また、MeCP2 などの DNA メチル化配列特異的な結合能を示す転写抑制因子の結合により遺伝子発現制御領域に不活性化型クロマチンを構築されることによっても引き起こされる (Nan et al., 1997)。

DNA メチル化が次世代に伝わる仕組みはよく明らかにされており、維持型 DNA メチル化に関わる DNA メチル基転移酵素 Dnmt1 が CpG 配列の片側鎖のシトシンのみメチル化されたヘミメチル化シトシンを認識し、逆鎖の非メチル化シトシンにメチル化を付与するため、DNA メチル化情報は細胞分裂を経ても次世代に受け継がれることができる (Robert et al., 2003)。

2005 年以降、マイクロアレイや次世代シーケンサーを利用した画期的な技術が開発され、エピジェネティック修飾を網羅的に見ることが可能になったことで、エピジェネティクス研究は大きな発展を遂げた。その結果、確かに、細胞種によって各遺伝子領域のヒストンアセチル化状態や DNA メチル化状態が異なっており、エピゲノム、つまりエピジェネティック修飾が施されたゲノムの状態は細胞状態特異的に決まっていることが明らかになった

(Fig.G1-1、ENCODE Project Consortium, 2012; Guenther et al., 2007)。さらに、これら細胞状態特異的なエピゲノムは、哺乳類の発生過程においては分化能の制御に働く。例えば、マウス発生期脳において、胎生 11 日目の神経幹細胞は Leukemia inhibitory factor (LIF) 刺激に反応しないが、胎生 14 日目の神経幹細胞は LIF 刺激に反応してアストロサイトへ分化する。この神経幹細胞が持つ細胞外刺激に対する反応性の変化は、アストロサイトマーカーである *Gfap* の発現で追跡できるが、*Gfap* プロモーター上流の Stat3 結合配列

(TTCCGAGAA) が胎生 11 日の時点では DNA メチル化されており、LIF シグナル下流で活性化した Stat3 が結合できない。一方、胎生 14 日の時点では *Gfap* プロモーター上流の Stat3 結合配列が脱メチル化されており、Stat3 の結合を介した *Gfap* の転写活性化が起きる

(Nakashima et al., 1999)。しかし、分化細胞特異的なエピゲノム形成に必要な配列特異的なエピジェネティック制御機構については殆ど解明されていない。

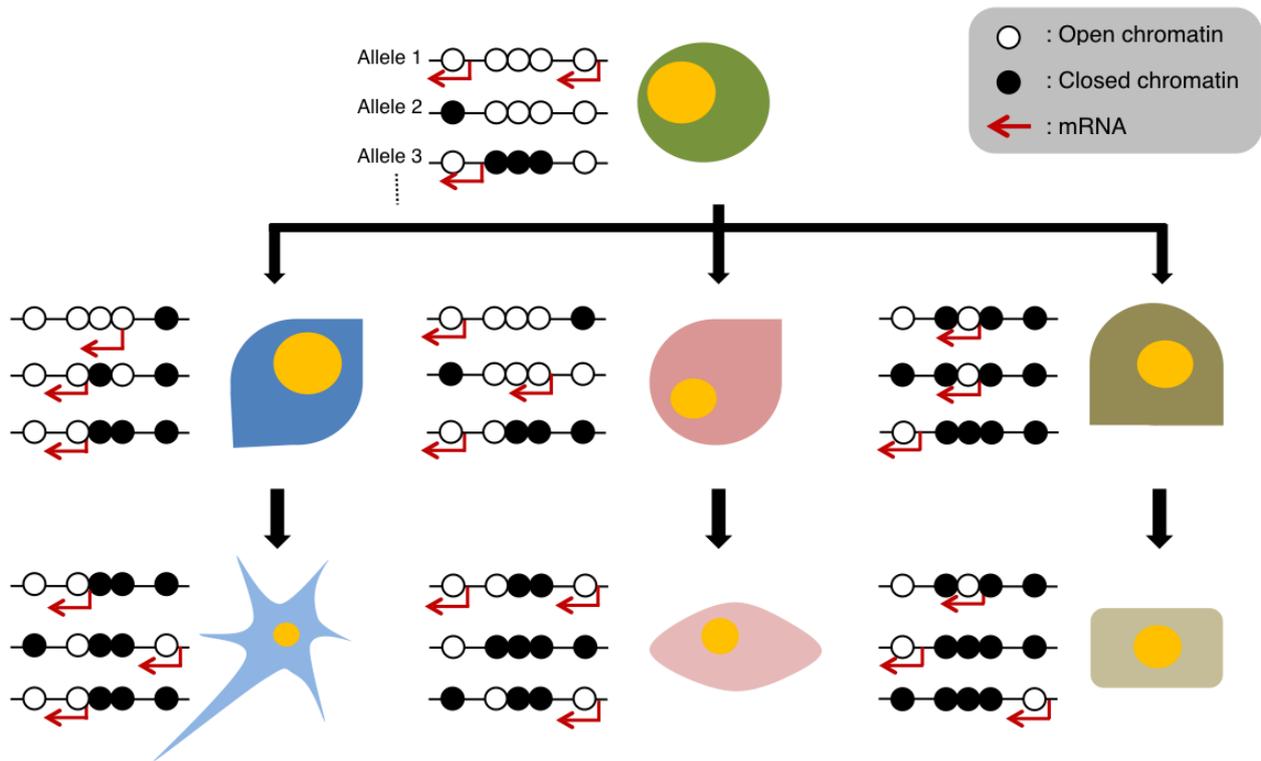


Fig.G1-1.細胞状態特異的な遺伝子発現とエピゲノム

哺乳類細胞の分化系譜と、それぞれの細胞状態における遺伝子発現パターンとエピゲノムを示した。

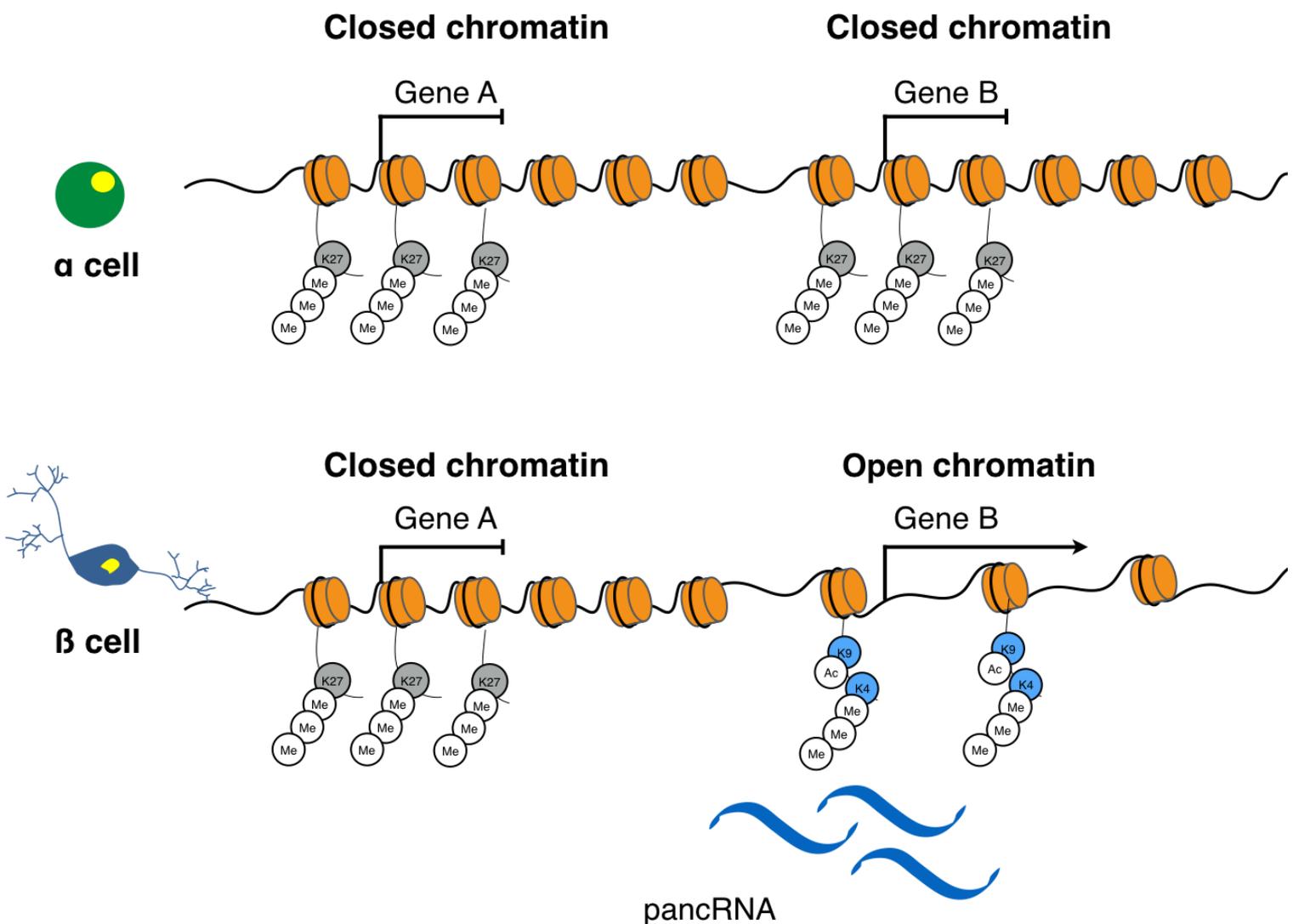
哺乳類の発生過程では、分化全能性を持った細胞は、分化系譜を辿るほどその細胞分化能の限られた専門性の高い細胞に分化していき、最後にはそれ以上分化できない最終分化細胞に至る。これらの細胞は、互いに同一のゲノムDNAを持つにも関わらず、細胞状態特異的な遺伝子発現パターンとエピゲノムをもつことで、異なった分化能や性質を付与されている。

次世代シーケンサーにより、細胞内で発現している RNA の網羅的解析が可能になったことで、哺乳類ゲノムの 95%以上を占める遺伝子外領域の大部分から、200 bp 以上の長鎖ノンコーディング RNA (long noncoding RNA、lncRNA) と呼ばれるタンパク質に翻訳されない RNA が転写されている、という驚くべき事実が明らかにされた (Carninci et al., 2005; Djebali et al., 2012)。それまでに知られていた機能的なノンコーディング RNA は ribosomal RNA、transfer RNA、small nuclear RNA などの全ての細胞の機能維持に必須なもの、micro RNA、small interfering RNA、Piwi-interacting RNA などの 30 塩基以下のノンコーディング RNA が殆どであり、膨大な機能未知の lncRNA 群の出現は RNA 新大陸の発見とも呼ばれ、新たな研究分野が拓かれた。当初これらの lncRNA は転写制御機構のエラーによる転写の“ノイズ”や副産物なのではないかと思われていたが、その後つぎつぎと機能性

lncRNA が同定され、lncRNA が生体内で果たす役割が明らかとなった。興味深いことに、これらの機能性 lncRNA の中には配列特異性をもったエピゲノム制御因子として働くものが含まれていたことから、細胞状態特異的なエピゲノム状態の形成に機能性 lncRNA を介したエピゲノム制御機構が関わっている可能性が示唆された。

1991 年に世界で初めて機能性 lncRNA として同定された *X inactive-specific transcript* (*Xist*) は哺乳類の X 染色体の不活性化に関わるエピゲノム制御因子として働く (Borsani et al., 1991)。哺乳類細胞では雌雄で X 染色体の数が異なり、オスの X 染色体は一本であるのに対し、メスでは二本存在するため片方の X 染色体が不活性化され X 染色体から発現する遺伝子発現量が過剰にならないように量的制御を受けている (Lyon, 1961; Wutz, 2011)。メス細胞において、*Xist* は片方の X 染色体の X inactivation center (Xic) と呼ばれる領域から転写され、ヒストン H3K27 メチル化転移酵素 Ezh2 を含む PRC2 複合体と結合して *Xist* を発現した X 染色体の Xic に PRC2 複合体をリクルートすることで抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 を X 染色体全体に広げ、片側の X 染色体のみヘテロクロマチン化を誘導する (Lee, 2012)。*Xist* のようにエピゲノム制御因子として働く機能性 lncRNA の他の例としては、ヒストン H3K4 メチル化転移酵素 Mll を含む複合体を HOX 領域に誘致し活性化する *Hottip* や (Wang et al., 2011)、PRC2 複合体を HOX 領域などゲノム上のさまざまな領域に誘致し抑制する *Hotair* が挙げられる (Gupta et al., 2010; Tsai et al., 2010)。また、*Sphk1* 遺伝子プロモーターから mRNA の転写方向と逆向きに転写され、*Sphk1* プロモーターの DNA 脱メチル化を誘導し *Sphk1* を活性化する *Khps1* という、5'キャップ構造と polyA tail をもち、1300 bp の長さをもつ lncRNA も同定されている (Imamura et al., 2004)。その後の網羅的解析から、*Khps1* のように mRNA のプロモーターから mRNA の転写方向と逆向きに転写されており、polyA tail をもつ 200 bp 以上の lncRNA は哺乳類のさまざまな組織において数千の遺伝子座から発現していることが明らかになった (Hamazaki et al., 2015; Hu et al.,

2014; Uesaka et al., 2014)。promoter-associated non-coding RNA (pancRNA) と名付けられたこれらの lncRNA 群の発現は、対となる近傍 mRNA の発現と正に相関しており、実際に *Khps1* 以外にも配列特異的なエピジェネティック制御を介して近傍遺伝子の転写活性化に関わっている pancRNA が同定されている (Fig.G1-2、Hamazaki et al., 2015; Tomikawa et al., 2011)。また、pancRNA は polyA tail をもつことから、少なくとも RNA polymerase 2 複合体によって転写されていると考えられるが、pancRNA の転写に関わる機構や、pancRNA の細胞内代謝速度については殆ど明らかになっていない。



**Fig.G1-2. pancRNAによる配列特異的エピジェネティック制御**

pancRNAの発現は配列特異的に遺伝子プロモーターのエピジェネティック修飾に影響を与える細胞間でpancRNAの発現が異なっていることで、遺伝子パターンとエピゲノム状態に変化が促される。

上記の *Hottip* や *Xist* によるエピジェネティック制御が一種類の RNA が複数遺伝子座の転写に影響を与えているのに対し、*pancRNA* によるエピジェネティック制御は単一遺伝子座にのみ影響する非常に配列特異性の高いものであるという特徴がある。この *pancRNA* の特徴である単一遺伝子座へのエピジェネティック制御は、他の lncRNA による複数遺伝子領域のエピジェネティック制御よりも繊細な細胞状態特異的エピゲノム制御を可能とするため、細胞状態特異的なエピゲノム状態の形成過程には *pancRNA* の発現変化によるエピジェネティック制御が深く関わっている可能性がある。

cAMP シグナル経路の活性化は哺乳類の神経前駆細胞の神経分化や、ES 細胞の内皮細胞への分化を促すことが知られている (Narazaki et al., 2008; Piper et al., 2000)。興味深いことに、cAMP シグナル下流で活性化される転写因子 *Creb1* は 2 つの mRNA が head-to-head に配置された両方向性プロモーター (annotated bidirectional promoter, aBiP, Fig.G1-3A) に結合する傾向がある (Impey et al., 2004)。ゲノム進化の過程で、aBiP が *Creb1* による転写制御のターゲットとなったと考えられ、*Creb1* が両方向プロモーターを選択的に転写制御する傾向があるのであれば、*pancRNA* と mRNA が head-to-head に配置された両方向性プロモーター (*pancRNA*-associated bidirectional promoter, pBiP, Fig.G1-3B) にも aBiP 同様に *Creb1* 等の cAMP 依存性転写因子が結合しやすく、pBiP が分化シグナルの応答の場として機能している可能性が考えられた。cAMP シグナル経路の下流で *Creb1* が細胞増殖、突起伸長、生存に関わる遺伝子を転写制御する機構については ラット副腎髄質由来の褐色細胞腫である PC12 細胞を用いて古くから研究が進められてきた (Lam et al., 2010; Vaudry et al., 2002)。PC12 細胞は Nerve growth factor (NGF) 刺激によって細胞周期を停止し、機能的な神経突起を伸ばして分化するが、その分化は可逆的であり、NGF を含まない増殖培養条件に戻してやると突起を縮小し、再び増殖を開始する (Greene and Tischler, 1976)。しかし、NGF に加えて cAMP シグナルを導入すると不可逆分化を引き起こし、増殖培養条

件に戻しても細胞増殖を再開できない (Heidemann et al., 1985)。以上より、この不可逆分化過程において、PC12 細胞の pBiP が細胞状態特異的なエピゲノム制御をうけて、細胞の分化記憶形成が起こっているのではないかと考えた。

以上を背景に、本研究では PC12 細胞を cAMP 依存的に不可逆分化させる系を用いて、cAMP シグナルが pancRNA を転写制御することで分化細胞状態特異的なエピゲノム形成を促し、最終分化に至る過程を明らかにしていくこととした。

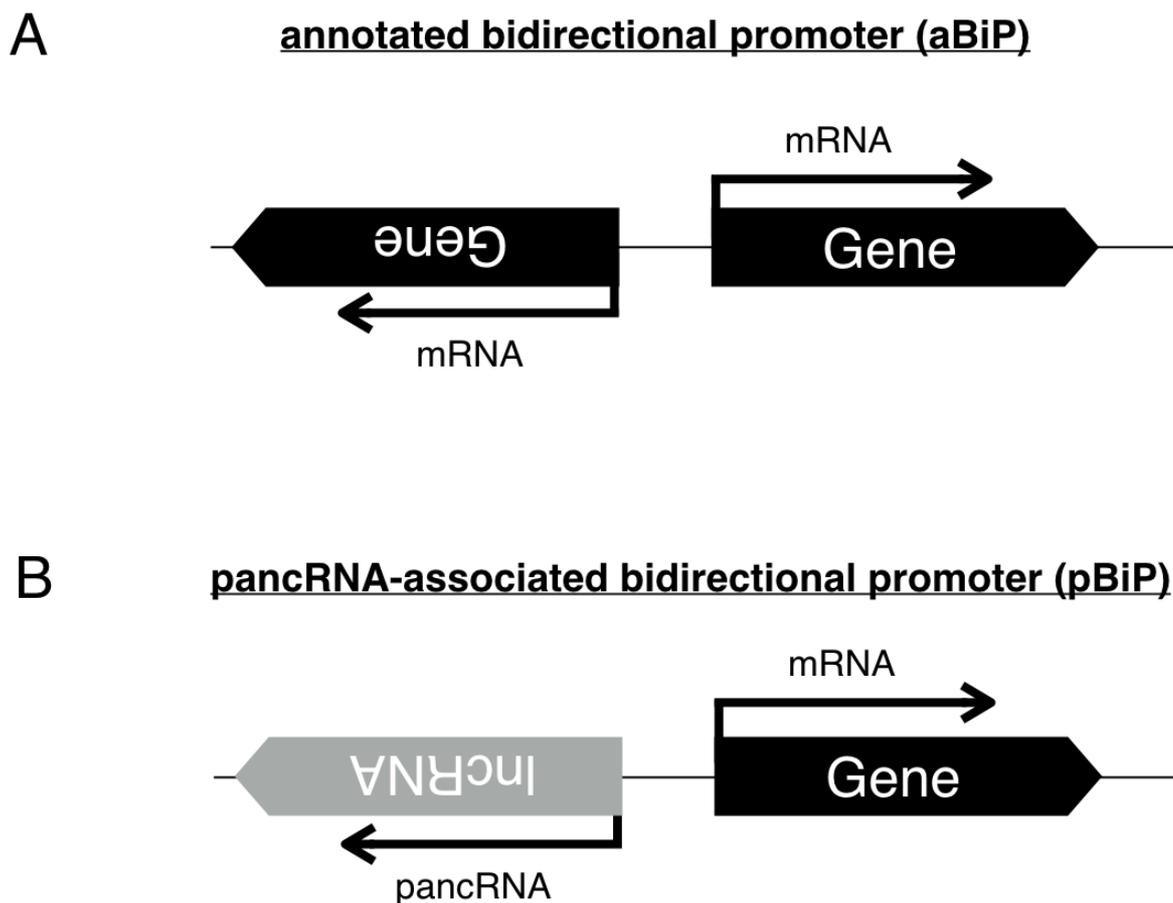


Fig.G1-3. 二種類の両方向性遺伝子プロモーター

(A) 2つのmRNAがhead-to-headに配置された両方向性プロモーター (B) pancRNAとmRNAがhead-to-headに配置された両方向性プロモーター

# 第一章

## 序論

cAMP は、細胞外環境に対応して活性化される膜貫通タンパク質 adenylyl cyclase によってエネルギー因子 ATP から合成される細胞内エネルギー伝達のセカンドメッセンジャーである。cAMP-dependent protein kinase A (Pka) 等の活性化を通じた cAMP 依存シグナル経路の活性化は、多種多彩な細胞の生理応答に関わっている (Cooper et al., 1995)。Pka は通常細胞質に局在しているが、Pka のリン酸化活性を抑制しているサブユニットに cAMP が結合することで、解放されて活性化型となり、核内移行して Creb1 の 133 番目のセリンをリン酸化する (Hagiwara et al., 1993)。リン酸化により転写活性が制御される転写因子として初めて報告された Creb1 とそのファミリータンパク質である activating transcription factor 1 (Atf1) や cAMP response element modulator (Crem) は Pka によるリン酸化をうけるドメインと cAMP response element (CRE) 配列への結合能をもつドメインを有しており、リン酸化をうけると CREB-binding protein (Cbp) やそのパラログである p300 と複合体を形成することで下流遺伝子の転写活性化を促す (Gonzalez and Montminy, 1989; Mayr and Montminy, 2001)。また、*Creb1* と *Crem* の遺伝子座からは、オルタナティブアイソフォームとして、DNA 結合ドメインを欠いており CRE への結合能がない *Creb* Δ-14 と、逆にリン酸化制御ドメインを欠いており CRE への結合能は保持しているが転写活性化能を持たない inducible cAMP response element repressor (*Icer*) がそれぞれ発現可能であり、共に cAMP シグナルの阻害に働く (Molina et al., 1993; Walker et al., 1996)。

PC12 細胞は、*Creb1* による細胞増殖、突起伸長、生存に関連する遺伝子の転写制御機構研究に用いられてきた (Lam et al., 2010; Vaudry et al., 2002)。その中で、2004 年、Impey らは adenylyl cyclase 活性化を促す forskolin 刺激により cAMP シグナル経路を活性化させた直後の PC12 細胞を用いて、転写因子の免疫沈降と網羅的シーケンシングを組み合わせた

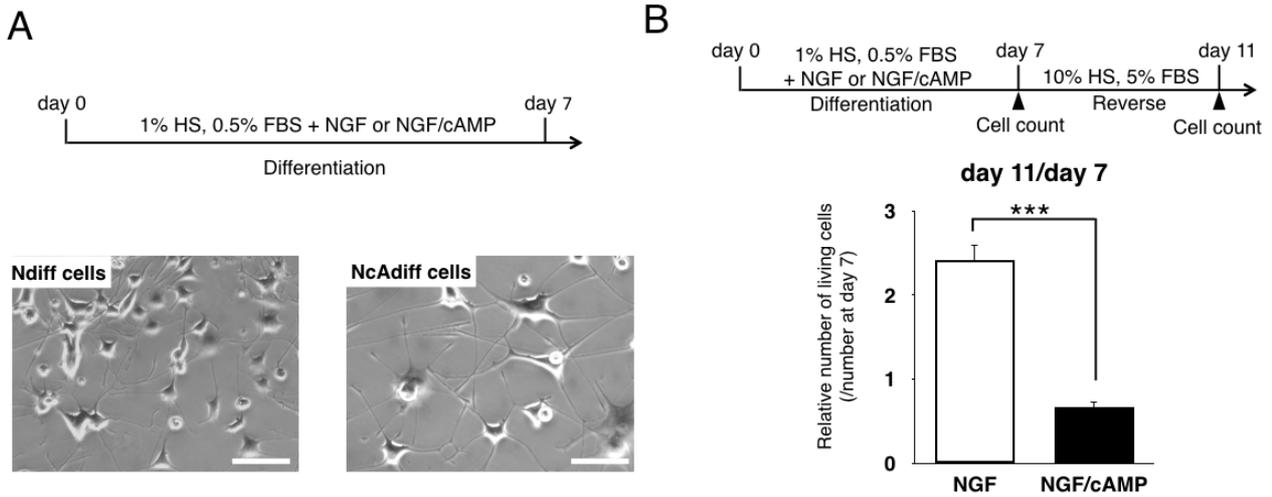
ChIP-seq によりリン酸化 Creb1 の結合ゲノム領域を網羅的に同定した。その結果、2つの mRNA が head-to-head の関係に配置された両方向性プロモーターである aBiP にリン酸化 Creb1 がよく結合する傾向があることが分かり、CRE 配列も高頻度に存在することを報告している (Impey et al., 2004)。

そこで本章では、pancRNA と mRNA が head-to-head の関係に配置された両方向性プロモーターである pBiP についても、Creb1 をはじめとする cAMP 依存性転写因子を介した転写制御の作用点になっているのではないかという仮説をたて、PC12 細胞の cAMP 依存性不可逆分化系について、網羅的な directional RNA-seq 解析を行うことにした。

## 結果

### NcAdiff 細胞は不可逆的に増殖を停止している

PC12 細胞を不可逆細胞分化モデルとして使用するにあたり、今までの報告を元に、cAMP 刺激が PC12 細胞に安定して不可逆分化を促すのか、確認実験を行った。NGF と cAMP を加えた低濃度血清含有培地（分化培地）で 7 日間培養された PC12 細胞（NcAdiff 細胞）は、NGF のみを加えた分化培地で 7 日間培養された PC12 細胞（Ndiff 細胞）と比較して神経突起の肥大と、細胞体サイズの上昇が見られた。NcAdiff 細胞におけるこれらの細胞形態上の特徴は、既報告と一致していた（Fig.1-1A）。NcAdiff 細胞と Ndiff 細胞の分化可逆性を評価するため、それぞれの分化培地を NGF や cAMP を含まない高血清含有培地（増殖培地）に置換し、4 日間培養後、細胞数の増加がみられるかどうかを調べた。その結果、Ndiff 細胞は増殖培地での培養後、細胞数の上昇がみられたのに対し、NcAdiff 細胞は増殖培地での培養後に細胞数の上昇はみられなかった（Fig.1-1B）。このことから、NcAdiff 細胞と Ndiff 細胞は増殖培地中の細胞増殖シグナルに対して確かに異なった反応を示すことが分かった。

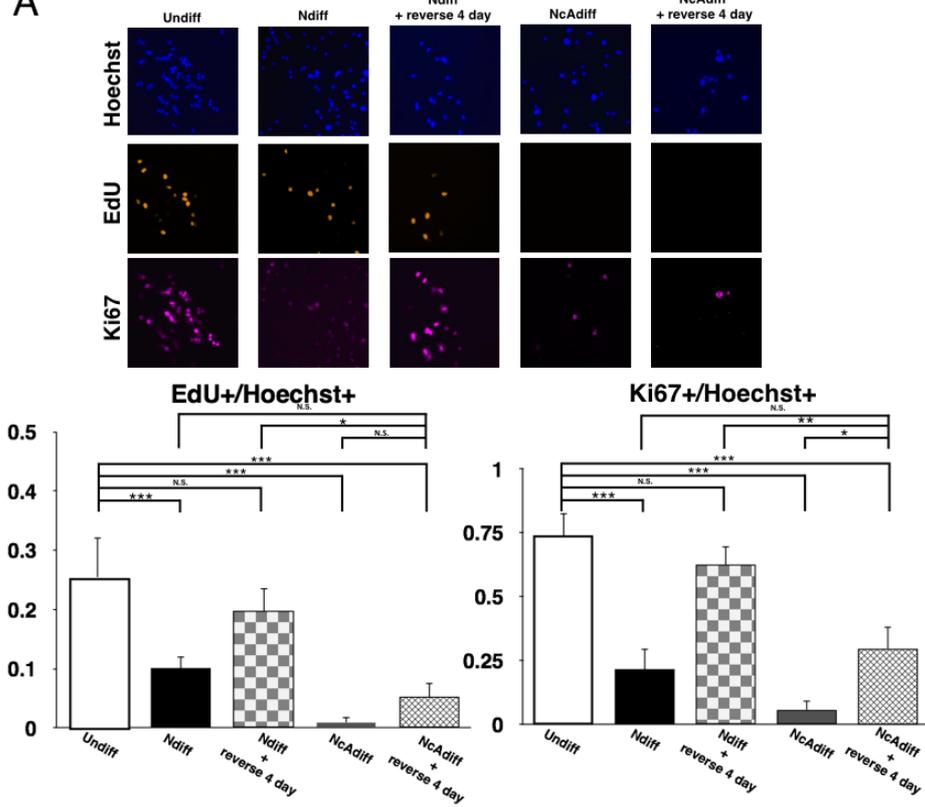


**Fig.1-1. PC12細胞に安定して不可逆分化を促す条件の検討**

(A) cAMP存在、非存在分化条件下で7日間分化させたPC12細胞の形態的特徴。(B) cAMP存在、非存在分化条件下で7日間分化させたPC12細胞の増殖培地に対する反応の違い。

次に、細胞増殖マーカーである Ki67 タンパク質と DNA 複製時に DNA に取り込まれうる EdU シグナルを免疫染色法によって検出し、未分化 PC12 細胞 (Undiff 細胞) と、Ndiff 細胞と NcAdiff 細胞それぞれの増殖培地への培地置換前後における細胞増殖状態を評価した (Fig.1-2A)。Ndiff 細胞では EdU 陽性細胞と Ki67 陽性細胞の割合が Undiff 細胞の 40%程度まで有意に減少し、その後増殖培地での培養によって、Undiff 細胞と変わらないレベルまで再び増加することがわかった。一方、Undiff 細胞から NcAdiff 細胞への分化後には EdU 陽性細胞と Ki67 陽性細胞の割合は数%まで劇的に減少し、その後増殖培地での培養によっても EdU 陽性細胞と Ki67 陽性細胞の割合は Undiff 細胞と比較して有意に低い状態を保っていた。続いて、増殖刺激により NcAdiff 細胞にアポトーシスが誘導されているのか、アポトーシスマーカーである active Caspase 3 を免疫染色法によって検討した (Fig.1-2B)。その結果、活性型カスパーゼのシグナルはいずれの細胞群においてほとんど検出されなかった。これらの結果は、NcAdiff 細胞が細胞増殖促進環境下においてもアポトーシスを起こすことなく細胞周期を停止した状態を維持するという、不可逆的な分化状態にあることを示している。そのため、NGF と cAMP を加えた分化培地での 7 日間の培養によって、PC12 細胞を、分化不可逆性が高い、安定した最終分化状態に移行させることができると結論した。

A



B

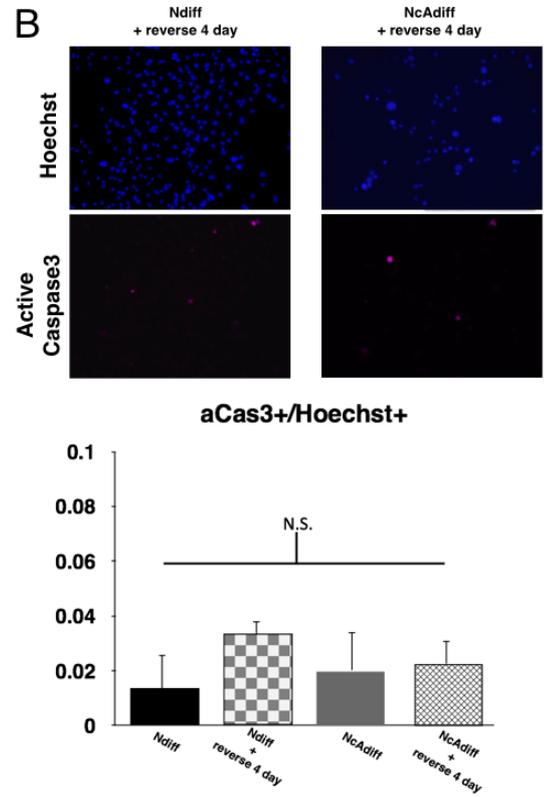


Fig.1-2. 不可逆分化を促す条件の検討

(A) それぞれの条件での細胞増殖マーカー陽性PC12細胞の割合。(B) それぞれの条件でのアポトーシスを起こしているPC12細胞の割合。

## 細胞状態特異的な RNA 発現プロファイルを反映した directional RNA-seq データの取得

PC12細胞の不可逆分化過程において pBiP として働く遺伝子プロモーターを同定するため、Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞を用いて、RNA の転写方向情報を保持したトランスクリプトーム解析 (directional RNA-seq) を行った。今回、個々の異なる条件下にて培養した細胞群毎に 4 つのレプリケートを作製し、まず、それらから得られたデータの品質を調べた。RNA-seq によって得られたリードのうち、クオリティーの低いものを除いたリード数は、Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞それぞれのサンプルから 1 億 4800 万リード以上、総計約 5 億 2000 万リードとなった。これらのリードを TopHat2 と Bowtie1 を用いてラットのゲノム (Rn5) にマップしたところ、ユニークマッピングされたリードの割合は平均 81.7%であった (Table.1-1)。これらの RNA-seq データについて、cDNA ライブラリ作製時の DNA 増幅にバイアスが生じていないか検討するため、ラット遺伝子領域にマッピングされたリードの遺伝子内の相対位置を解析した (Fig.1-3A)。今回の全ての RNA-seq データでは、遺伝子の 5'側から 3'側まで顕著なバイアスなくリードが貼り付いており、cDNA ライブラリ作製時に特定の領域への大きなバイアスは生じていないと考えられた。また、ラット Refseq 遺伝子のゲノム領域上にマップされたリードの 99%以上が Refseq 遺伝子と同じ方向にマップされており、確かに RNA の転写方向情報を保持した cDNA ライブラリの作製ができていると考えられた (Table.1-2)。また、全てのレプリケートにおける遺伝子発現状態を比較したところ、同一培養条件に由来する 4 つのレプリケート内では、いずれもピアソンの相関係数が  $R > 0.97$  という非常に高い値を示したため、再現性良くサンプル作製ができていることを確認できた (Fig.1-3B)。サンプル毎の遺伝子発現状態を元にした階層的クラスタリング解析においても、同じ細胞群由来のサンプルと、異なった細胞群由来サンプルが確かに同じクラスターに分類でき、異なる細胞群同士をはっきりと区別できた (Fig.1-3C)。以上より、今回取得し

た directional RNA-seq データの精度は高く、Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞それぞれの細胞群特異的な RNA 発現プロファイルを十分に反映した高品質 RNA-seq データが得られていることが示された。

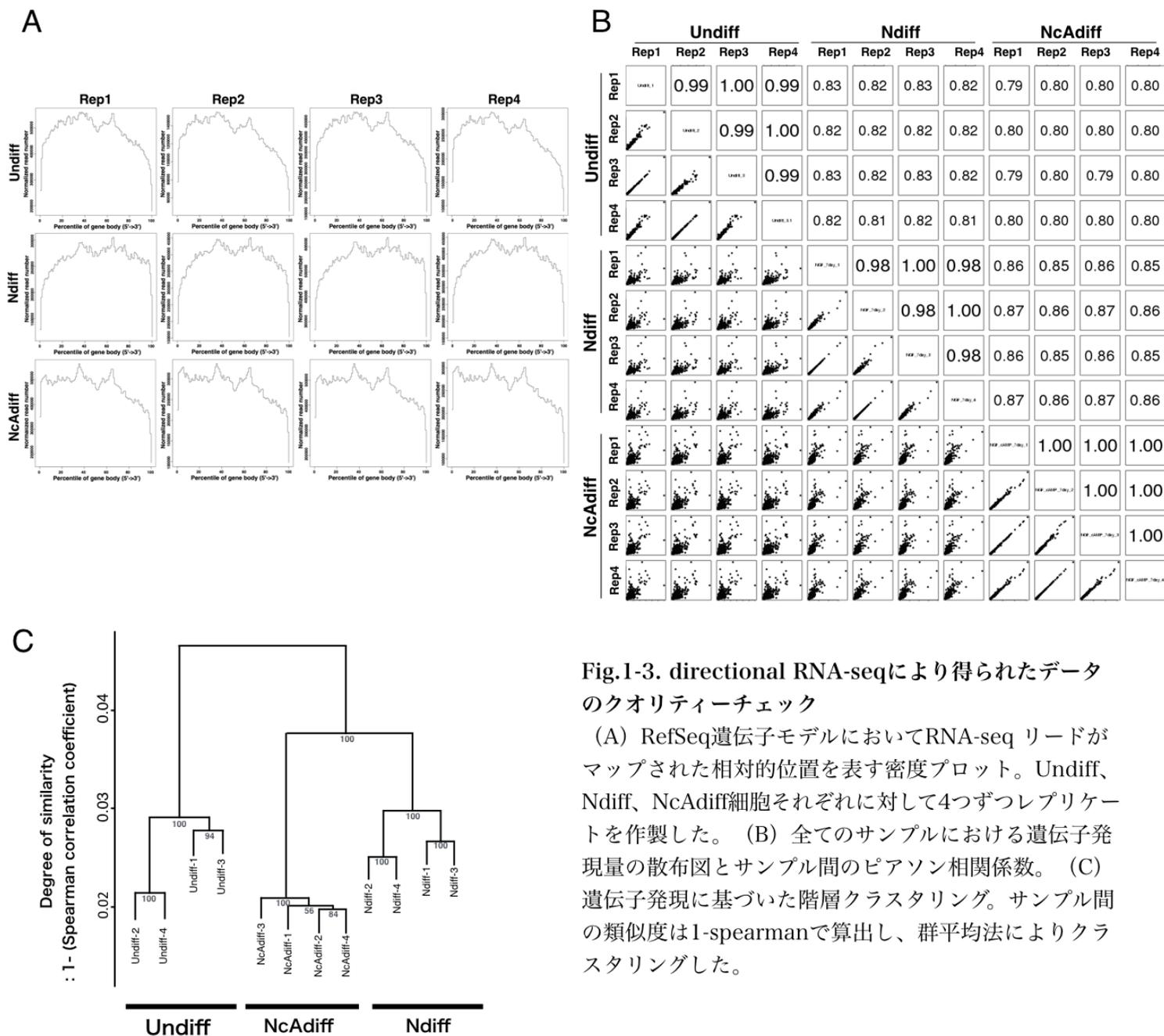


Fig.1-3. directional RNA-seqにより得られたデータのクオリティーチェック

(A) RefSeq遺伝子モデルにおいてRNA-seq リードがマップされた相対的位置を表す密度プロット。Undiff、Ndiff、NcAdiff細胞それぞれに対して4つずつレプリケートを作製した。(B) 全てのサンプルにおける遺伝子発現量の散布図とサンプル間のピアソン相関係数。(C) 遺伝子発現に基づいた階層クラスタリング。サンプル間の類似度は1-spearmanで算出し、群平均法によりクラスタリングした。

不可逆的に分化した PC12 細胞内において、細胞周期関連遺伝子群が強い転写抑制を受けている

上述の RNA-seq データを元に、Ndiff 細胞と NcAdiff 細胞の遺伝子発現状態を比較したところ、例えば、3,346 個の遺伝子が Ndiff 細胞で有意に高いレベル (FDR<0.05) で発現していた。これら Ndiff 細胞と NcAdiff 細胞間において発現差を示す遺伝子群にどのような生体内機能に関わる遺伝子が多く含まれているかを調べるため、Gene Ontology 解析を行った。その結果、NcAdiff 細胞では Ndiff 細胞と比較して、細胞周期促進関連遺伝子群 (特に G2/M 期促進関連遺伝子) が強く発現抑制されていることが示された (Fig.1-4A)。一方、例えば、G1/S 期促進関連遺伝子である *Cdk2*、*Cdk4*、*Pcna* の mRNA 発現レベルを RNA-seq データを元に算出したところ、*Cdk4*、*Pcna* 遺伝子については Undiff 細胞から Ndiff 細胞への分化するときに、NcAdiff 細胞と同程度に発現レベルが低下していた (Fig.1-4B)。これらの結果から、NcAdiff 細胞においては、G1/S 期促進関連遺伝子だけでなく G2/M 期促進関連遺伝子にも強い抑制をかけるメカニズムが機能することで、Ndiff 細胞との分化不可逆性の違いが生み出されていることが示唆された。

A

Term_ID	Description	Log10 <i>p</i> -value
GO:0007049	cell cycle	-25.8894
GO:0022402	cell cycle process	-24.9393
GO:0022403	cell cycle phase	-20.1135
GO:0000278	mitotic cell cycle	-18.7905
GO:0016071	mRNA metabolic process	-14.4012
GO:0000279	M phase	-13.9586
GO:0051276	chromosome organization	-12.0501
GO:0000087	mitotic M phase	-11.5735
GO:0006397	mRNA processing	-11.1752
GO:0006259	DNA metabolic process	-10.6271

B

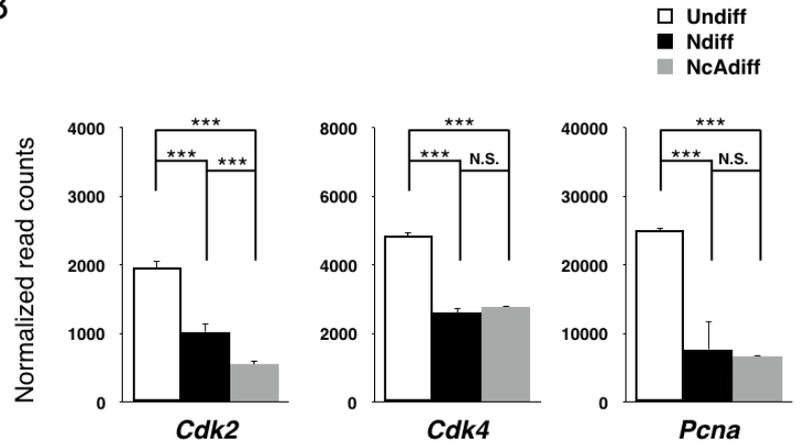


Fig.1-4. Ndiff細胞とNcAdiff細胞の遺伝子発現比較解析

(A) Ndiff細胞と比較してNcAdiff細胞で抑制されてる遺伝子群のGene ontology解析結果。特に多くの関連遺伝子が含まれていた、上位10の生体内機能を示した。黒字は細胞周期に関連する生体内機能。(B) RNA-seqデータより算出したそれぞれの分化状態におけるS期関連遺伝子の発現状態

## PC12 細胞分化過程において、数千の遺伝子プロモーターが pancRNA の転写活性化能を併せもつ両方向プロモーターとして機能している

次に、これらのデータを用い、PC12 細胞分化過程で mRNA と pancRNA を生み出す pBiP の同定を行った。pancRNA を発現しているゲノム領域を同定するためのソフトウェアツールの選定にあたり、設定した閾値以上のリードが存在するゲノム領域をコールする MACS2 と、リードの情報を元に転写産物のエクソン構造(転写構造)を予測する Cufflink と Trinity、の計 3 つを候補として選んだ。MACS2 についてはデフォルトの閾値設定 (cutoff  $P$ -value<0.05、MACS2p0.05) の他に、緩めの閾値設定 (cutoff  $P$ -value<0.95、MACS2p0.95) による検討も行った。条件検討として、Undiff 細胞の RNA-seq データを用いてそれぞれのツールによる pancRNA 転写構造の予測を行い、どのツール由来の pancRNA シグナルが実際に発現している pancRNA の転写構造に近いかを RT-PCR により確認した。その結果、MACS2p0.95 によって予測されたイントロンのない転写構造が、実際の pancRNA を正確に反映していることが分かった (Fig.1-5A,B)。過去に報告された 10 個以上の機能性 pancRNA には全てイントロンがない事から、MACS2p0.95 による pancRNA 転写構造予測モデルがより正確であることが考えられた (Hamazaki et al., 2015; Imamura et al., 2004; Tomikawa et al., 2011; Uesaka et al., 2014)。MACS2p0.95 の設定が、シグナル-ノイズ比を悪化させる事が懸念されたが、Undiff 細胞の RNA-seq データを用いて MACS2p0.05 と MACS2p0.95 で予測された pancRNA の数はそれぞれ 2,411 個と 2,457 個でほぼかわらず、それらの推定発現量の分布にも影響はなかった (Fig.1-5C)。このことから、MACS2p0.95 はデフォルトの閾値設定と比較しても特に誤検出が増えるわけではないと考えた。

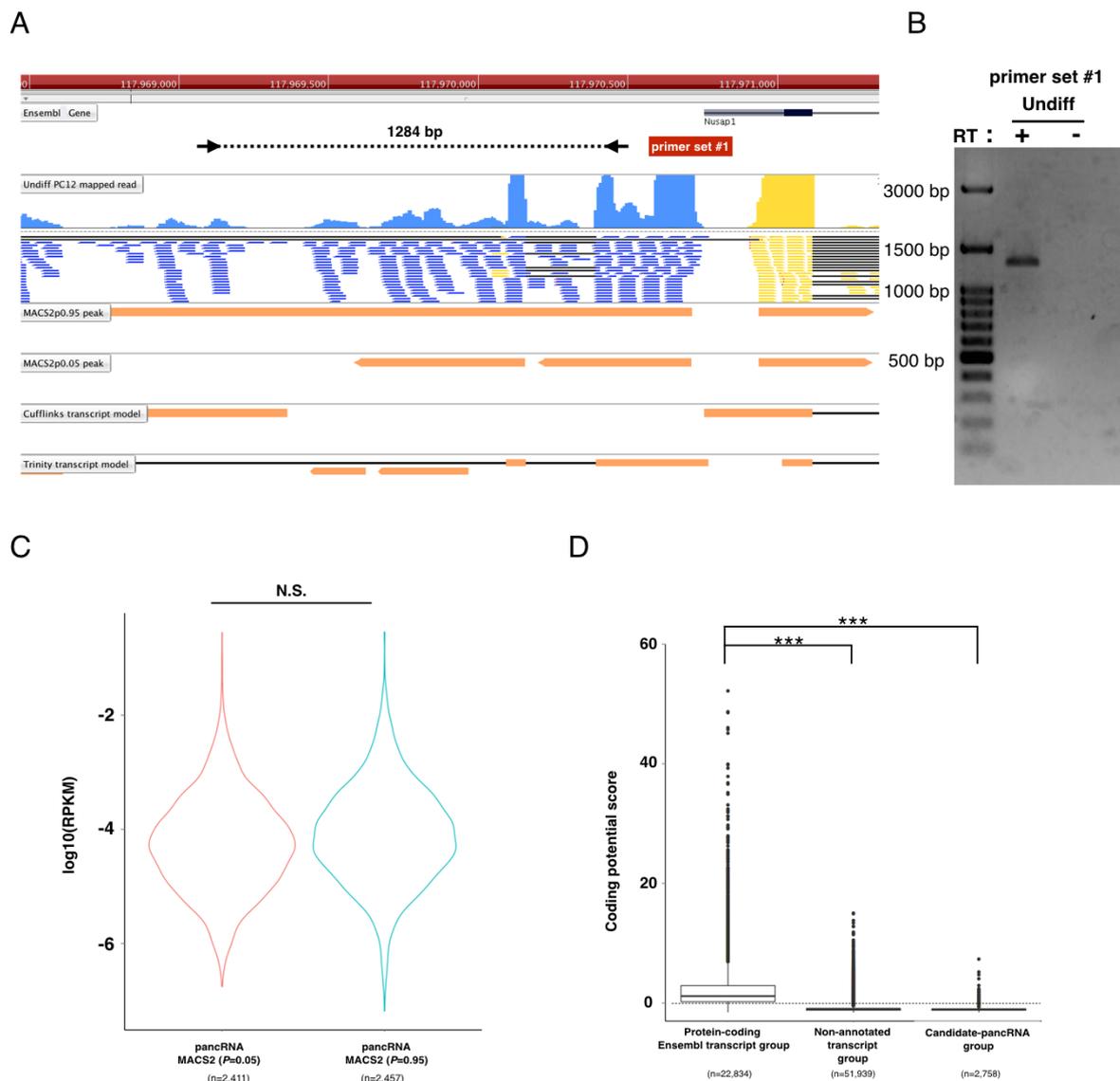


Fig.1-5. PC12細胞分化過程で発現しているpancRNAの同定

(A) *Nusap1*プロモーター領域におけるUndiff細胞のRNA-seqデータ。アンチセンス方向にマップされたリードは青、センス方向にマップされたリードは黄色で示した。それぞれのソフトウェアを用いて予測したRNA発現領域をオレンジ色で示した。また、予測領域の評価に用いたPCR primerの位置を矢印で示した。(B) RT-PCRの結果。cDNA合成時に逆転写酵素を加えたものをプラス、加えなかったものをマイナスで示した。(C) MACS2の条件ごとのpancRNAの発現量予測の違い。(D) CPCによって算出された各グループのcoding potential scoreの分布。

また、MACS2p0.95はCufflinksやTrinityと比較してもpancRNA転写構造予測モデルとしての精度が最も高かった。そこで、MACS2p0.95を用いてpancRNAの同定を行った結果、遺伝子領域外から、51,939個のnon-annotated RNAが転写されており、そのうち2,758個のnon-annotated RNAが遺伝子の転写開始点(TSS)の上流1 kbに位置し、遺伝子と逆方向に転写されるpancRNA候補として同定された。また、RNA配列から機能的なタンパク質が翻訳される可能性の高さを示す値であるcoding potential scoreをCPCアルゴリズムに

よって計算した結果、これらの同定された non-annotated RNA の 92.5%が、また、pancRNA 候補のなかでは 96.9%が負の coding potential score を示したことから、大多数が機能的なタンパク質として働く可能性は非常に低いと考えられた (Fig.1-5D)。以上より、今回同定した pancRNA 候補を含む non-annotated RNA の殆どが lncRNA であると考えられた。これらの pancRNA 候補の平均長は 1,928 bp であり、隣接する遺伝子の TSS と pancRNA の 5'端の距離は平均 167 bp であった。また、TSS の上流 1 kb 以内に他の遺伝子がアンチセンス方向に存在している遺伝子は 954 個存在していた。まとめると、PC12 細胞分化系では 3,235 個の両方向性遺伝子プロモーターが存在し、そのうち 477 個は 2 つの mRNA 発現のための aBiP であり、2,758 個が pancRNA と mRNA 発現のための pBiP に分類された。

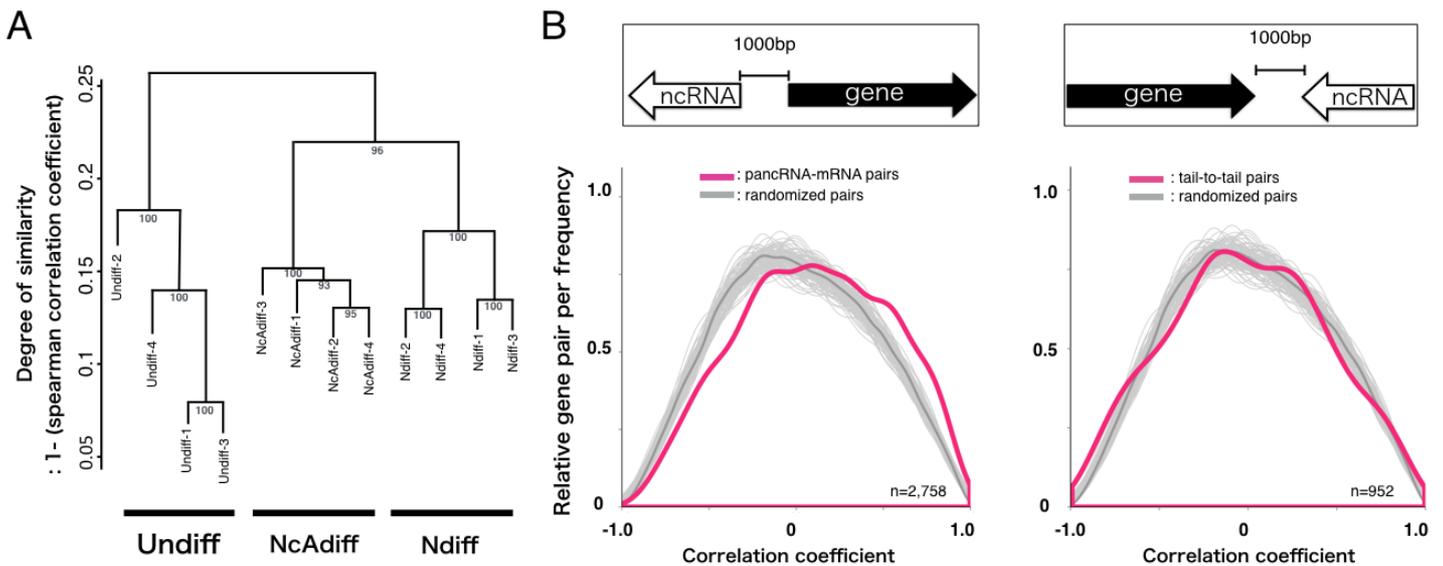


## PC12 分化過程において pBiP 領域は細胞状態特異的に制御されている

新規同定した pBiP が PC12 分化過程において細胞状態特異的に制御されているのかを調べるため、同定した pancRNA の発現を元に、階層的クラスタリング解析を行った。その結果、遺伝子発現レベルを元に解析した場合と同様に、同じ細胞群由来のサンプルと、異なった細胞群由来サンプルははっきりと区別され、細胞群ごとにそれぞれの細胞状態にしたがった pancRNA 発現プロファイルが再現性高く構成されている事がわかった (Fig.1-6A)。マウスやヒトにおいて、pancRNA の発現状態は、対になっている遺伝子の発現状態と正の相関関係を示すことが知られている (Hamazaki et al., 2015; Hu et al., 2014; Uesaka et al., 2014)。今回ラット PC12 細胞で同定された pancRNA と対になっている遺伝子

(pancRNA-mRNA ペア) の発現状態が、PC12 細胞分化過程においても同様に、正の相関関係にある傾向があるのかを解析した。そのために、まず pancRNA-mRNA ペアを含む 3 つグループからなる lncRNA と mRNA のペアを作成し、PC12 分化過程におけるそれぞれの lncRNA と mRNA ペアの相関係数を算出した。第一のグループは、mRNA の 5'端の上流 1 kb にオーバーラップするアンチセンス lncRNA と mRNA のペア、つまり pancRNA-mRNA ペアのグループとした。第二のグループは mRNA の 3'端から下流 1 kb にオーバーラップするアンチセンス lncRNA と mRNA のペアのグループとし、これを tail-to-tail ペアと名付けた。第三のグループはランダムに選んだ lncRNA と mRNA のペアのグループとし、これを randomized ペアと名付けた。randomized ペアは十分な試行数を重ねるため、2000 対の lncRNA と mRNA のペアについて相関係数を算出するという試行を 200 回行った後、それらの 200 回の平均の相関係数値をもって統計的な比較解析を行った。これらの 3 つのグループに含まれる RNA ペアの発現相関係数の分布を Bonferroni-corrected Mann-Whitney U test により比較したところ、tail-to-tail ペアと randomized ペアの相関係数の分布の比較では  $P$ -value が 0.9 以上となり、統計的有意差は得られなかった (Fig.1-6B 右図)。一方、

pancRNA-mRNA ペアと tail-to-tail ペアの比較では  $P$ -value が  $2.1 \times 10^{-9}$  未満、  
 pancRNA-mRNA ペアと randomized ペアの比較では  $P$ -value が  $2 \times 10^{-16}$  未満となりそれぞれの相関係数の分布は有意に異なっており、PC12 分化過程における pancRNA-mRNA ペアの発現動態は、正の相関をみせる傾向があることが分かった (Fig.1-6B 左図)。これらの階層的クラスタリング解析や pancRNA-mRNA ペアの発現相関比較解析から、PC12 分化過程において pancRNA-mRNA ペアを生み出す pBiP 領域は、細胞状態特異性を規定する RNA 発現プロファイルを構成する際のゲノム上の標的となっていることが示唆された。

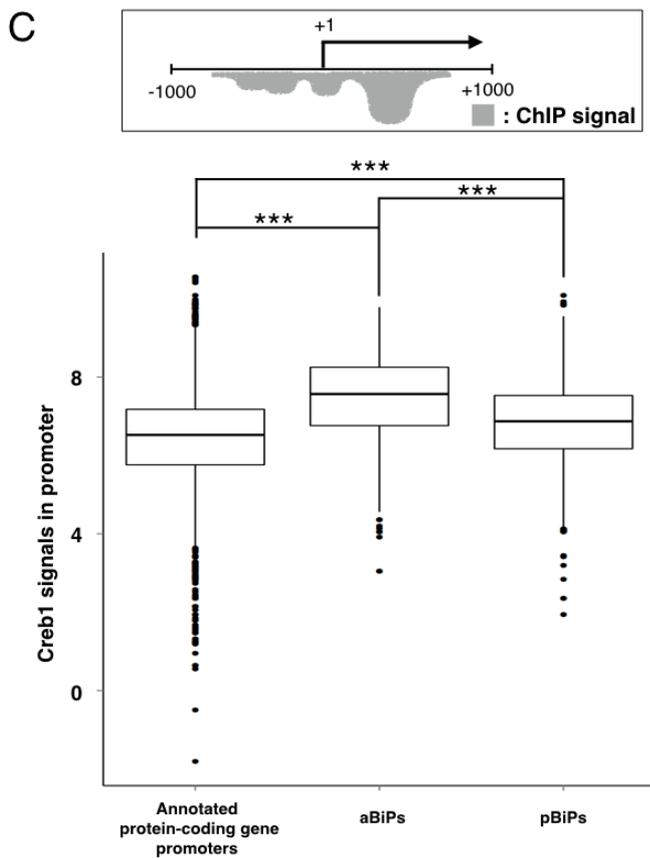
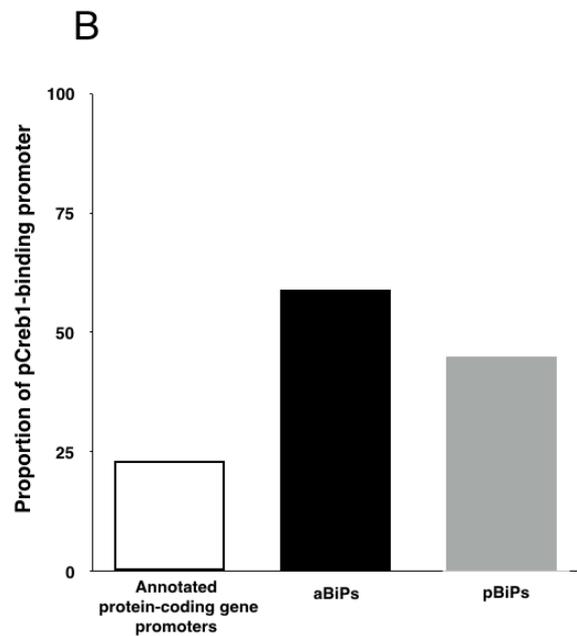
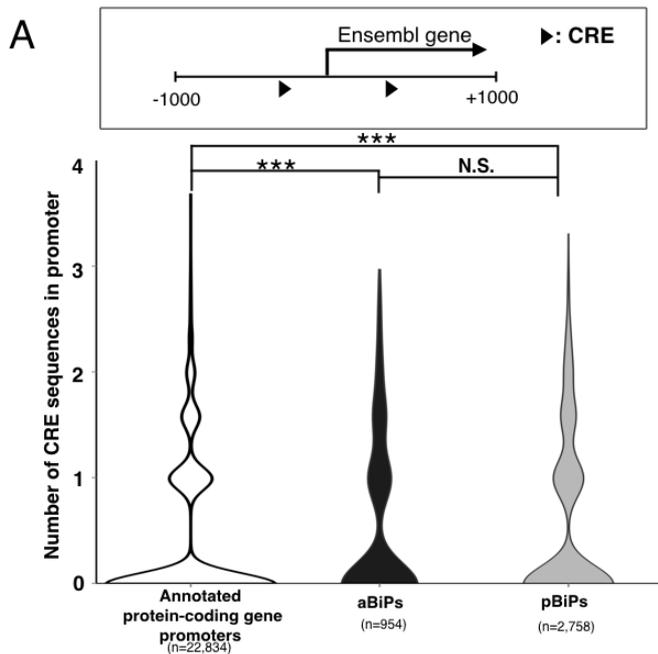


**Fig.1-6. pancRNAの発現状態と近傍のmRNA発現状態の関係**

(A) pancRNA発現に基づいた階層クラスタリング。サンプル間の類似度は1-spearmanで算出し、群平均法によりクラスタリングした。(B) PC12分化過程における各lncRNAとmRNAペアの発現から算出した相関係数の分布。薄い灰色は各試行におけるrandmized pairの相関係数の分布を示し、濃い灰色は各試行におけるrandmized pairの相関係数を平均した値の分布を示した。

## pBiP 領域は cAMP シグナルを感受しやすいゲノム構造をもつ

同定された pBiP が cAMP シグナル下流で選択的な転写制御を受ける際、cAMP 依存性転写因子による直接的な転写制御の対象となっている可能性を検証するため、全遺伝子、aBiP 由来遺伝子、pBiP 由来遺伝子それぞれの TSS 前後 1 kb の領域における CRE の出現頻度を比較した (Fig.1-7A)。その結果、全ての遺伝子の TSS 前後 1 kb の領域における CRE 出現頻度と比較した場合に、aBiP だけでなく、pBiP においても CRE 出現頻度が有意に高いことが分かった。一方で、aBiP と pBiP における CRE 出現頻度には統計的有意差がつかなかった。さらに、cAMP シグナル経路を forskolin で活性化した直後の PC12 細胞を用いたリン酸化 Creb1 の ChIP-seq データ (Impey et al., 2004) を再解析し、上記 3 つの遺伝子群の TSS 前後 1 kb の領域におけるリン酸化 Creb1 の結合シグナルの存在頻度を調べた。その結果、リン酸化 Creb1 結合シグナルが全遺伝子の TSS 前後 1 kb 領域の 23% で検出されたのに対し、aBiP の 59%、pBiP の 45% と、共に高い割合でリン酸化 Creb1 結合シグナルが検出された (Fig.1-7B)。同様に、公共に公開されている、7 日間 *in vitro* 培養後の胎生 16 日マウス脳皮質由来神経細胞を用いた Creb1 の ChIP-seq データを外挿し、ラット各遺伝子群の TSS 前後 1 kb の領域での Creb1 結合シグナルを比較した。この解析では Creb1 結合シグナルが見られたマウスゲノム上の座標を対応するラットゲノム上の座標に ucsc liftover tool を用いて変換した。その結果、pBiP、aBiP 上のいずれにも、全遺伝子の TSS 前後 1 kb の領域で検出された Creb1 結合シグナルと比較して有意に高い値の Creb1 結合シグナルが認められた (Fig.1-7C)。以上のゲノムワイドな解析結果から、aBiP だけでなく、pBiP も同様に細胞外からの cAMP シグナルを感受しやすいゲノム構造をとっていることが明らかになった。



**Fig.1-7. 両方向性プロモーターへのcAMPシグナル下流の転写因子の結合バイアス**

(A) 各遺伝子群のプロモーター領域に存在するCREの数の分布。(B) 各遺伝子群におけるプロモーター領域へのリン酸化Creb1結合割合。リン酸化Creb1結合データはPC12細胞にforskolin刺激した15分後のChIP-seqデータを使用した。(C) 各遺伝子群のプロモーター領域におけるCreb1結合シグナルの分布。Creb1結合シグナルは7日間in vitroで培養後の胎生16日マウス脳皮質由来神経細胞のCreb1のChIP-seqデータを用いて算出した。

## cAMP 依存的に不可逆分化する過程において cAMP 依存性転写抑制因子である *Icer* の発現が劇的に上昇する

次に、PC12 細胞分化過程において pBiP を発現制御している可能性のある cAMP 依存性転写因子の同定を試みた。cAMP シグナルの下流の転写因子をコードする遺伝子としては転写活性化に働く *Creb1* と *Crem* が知られている。また、*Crem* については、オルタナティブプロモーターから転写される、CRE 配列への結合能を有するが活性化ドメインを欠失したドミナントネガティブアイソフォームをコードする *Icer* も存在している (Fig.1-8A)。興味深いことに、cAMP 刺激を与えた PC12 細胞においては、リン酸化 *Creb1* が *Icer* のプロモーターに結合することで、*Icer* の転写が活性化されるというように、cAMP の効果については、ネガティブフィードバック構造の存在が幾つかの論文で報告されている (Borlikova and Endo, 2009; Chang et al., 2006)。これらの報告を考慮し、Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞における *Creb1*、*Crem*、*Icer* の転写状態を RNA-seq データを元に調べたところ、*Crem* の発現量はいずれの細胞群でも比較的低いままだったが、*Icer* の発現量については cAMP 刺激を受けた NcAdiff 細胞において劇的に上昇することが分かった (Fig.1-8B)。また、*Creb1* は Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞全てで高発現していたが、cAMP の有無による発現差異はみられなかった。このような遺伝子発現動態は、それぞれの遺伝子特異的なプライマーを用いた RT-qPCR によっても確認された (Fig.1-8C)。したがって、今回の PC12 細胞の不可逆分化系においては、まず *Creb1* のリン酸化によって下流の遺伝子の転写活性化がおき、その過程で *Icer* のプロモーターにもリン酸化 *Creb1* が結合することで、cAMP 依存性転写抑制因子である *Icer* の転写活性化が起きている、というモデルが支持された。以上より、リン酸化 *Creb1* と *Icer* の 2 つが、PC12 細胞の cAMP 依存性不可逆分化過程において pBiP に作用する重要なエフェクター分子であることが予想された。

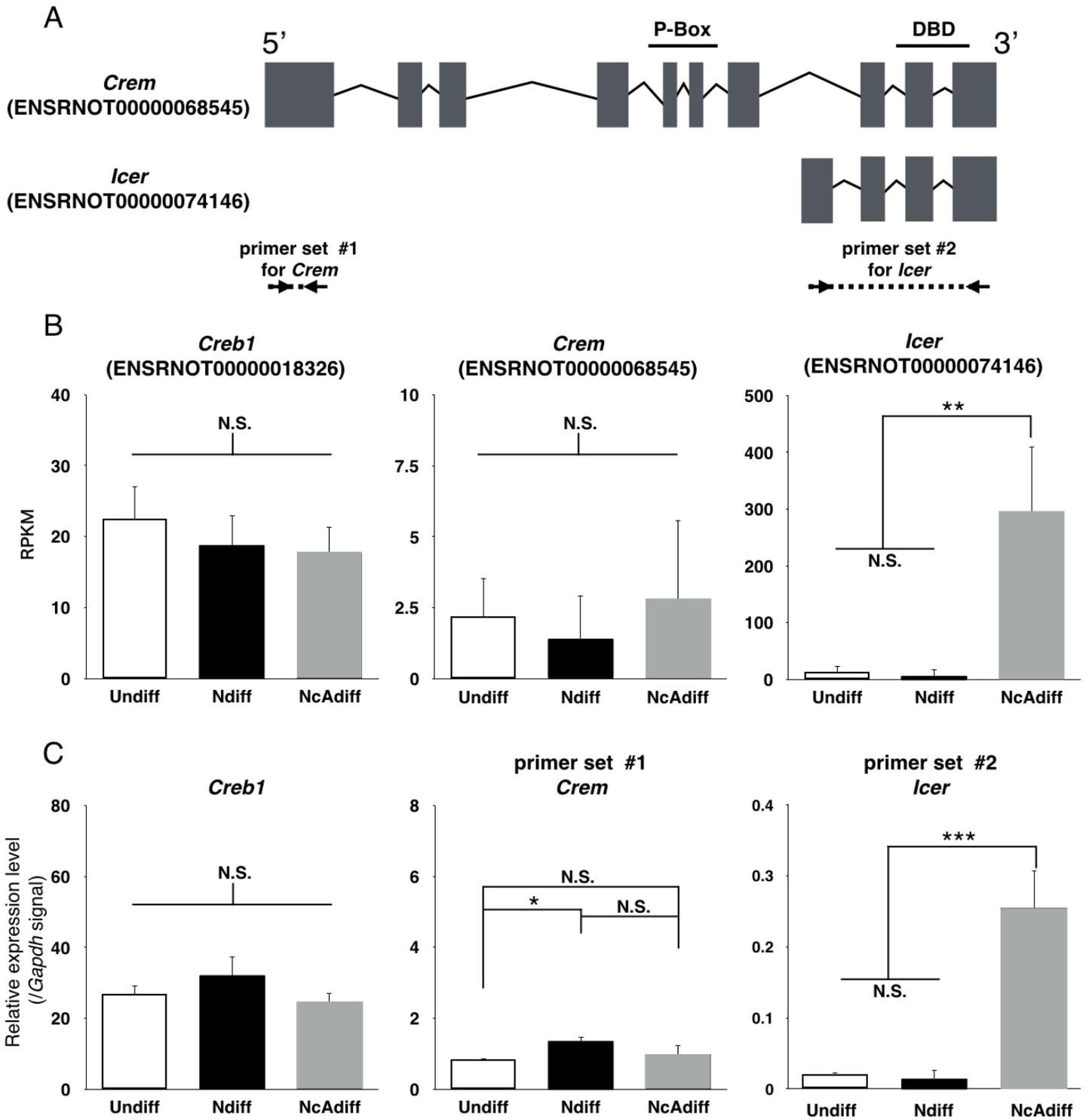


Fig.1-8. PC12細胞分化過程におけるcAMP依存的転写制御因子の発現状態

(A) *Crem*と*Icer*の遺伝子構造。リン酸化ドメイン (P-Box) と DNA結合ドメイン (DBD) の位置と、それぞれのRT-qPCRに用いたプライマーの位置を示した。(B) RNA-seqデータより算出した各細胞における*Creb1*、*Crem*、*Icer*の発現状態。(C) RT-qPCRによって定量した各細胞における*Creb1*、*Crem*、*Icer*の発現状態。

pBiP は cAMP シグナル下流の転写因子のノックダウンによって転写活性が変化する

pBiP が cAMP シグナル下流の転写因子の結合によって転写制御されているさまを調べるため、まず、PC12 細胞の分化過程において最も高い発現相関係数（ピアソンの相関係数  $R=0.995$ ）を示した *pancRNA*-mRNA ペアである、紡錘体形成関連遺伝子 *Nusap1* とその転写開始点上流 200 bp から 1.5 kb に渡って遺伝子と逆方向に転写される *pancRNA* のペア (*pancNusap1-Nusap1* ペア) の発現解析を行った (Fig.1-9 A)。cAMP シグナル下流の転写因子である *Creb1* と *Icer* のノックダウンにより影響をうけるかを調べるにあたり、NcAdiff 細胞において *Creb1* や *Icer* のノックダウン効率や特異性を RT-qPCR によって確認した (Fig1-9 B, C)。不可逆分化過程においては、*Icer* のノックダウンによって *pancNusap1* と *Nusap1* の発現レベルは共に有意に上昇したが、*Creb1* をノックダウンしても *pancNusap1* と *Nusap1* の発現状態に変化をもたらさなかった (Fig1-9D)。これは不可逆分化状態の PC12 細胞においては *Nusap1* プロモーターの転写活性が cAMP シグナル下流の転写抑制因子 *Icer* によって抑制されていることを示唆している。Fig.1-9 A に示したように、*Nusap1* の次にリストアップされている Rho GTPase の活性化に関わる *Arhgap26* 及び神経分化にも関わる *Gata2* という 2 つの遺伝子についても同様に、*Creb1* や *Icer* ノックダウンの影響を調べた。NcAdiff 細胞における *Icer* のノックダウンは *Arhgap26* の発現レベルを有意に上昇させ、*Creb1* のノックダウンは *Gata2* の発現レベルを有意に下降させることが分かった (Fig.1-9 E)。これらの結果は、PC12 細胞の不可逆分化過程において cAMP シグナル下流の転写因子である *Creb1* あるいは *Icer* が pBiP ごとに異なった様式によりその転写活性に影響を与えていることを示している。以上より、pBiP が cAMP 依存性転写因子により正または負の転写制御を確かに感受する領域であることが示された。

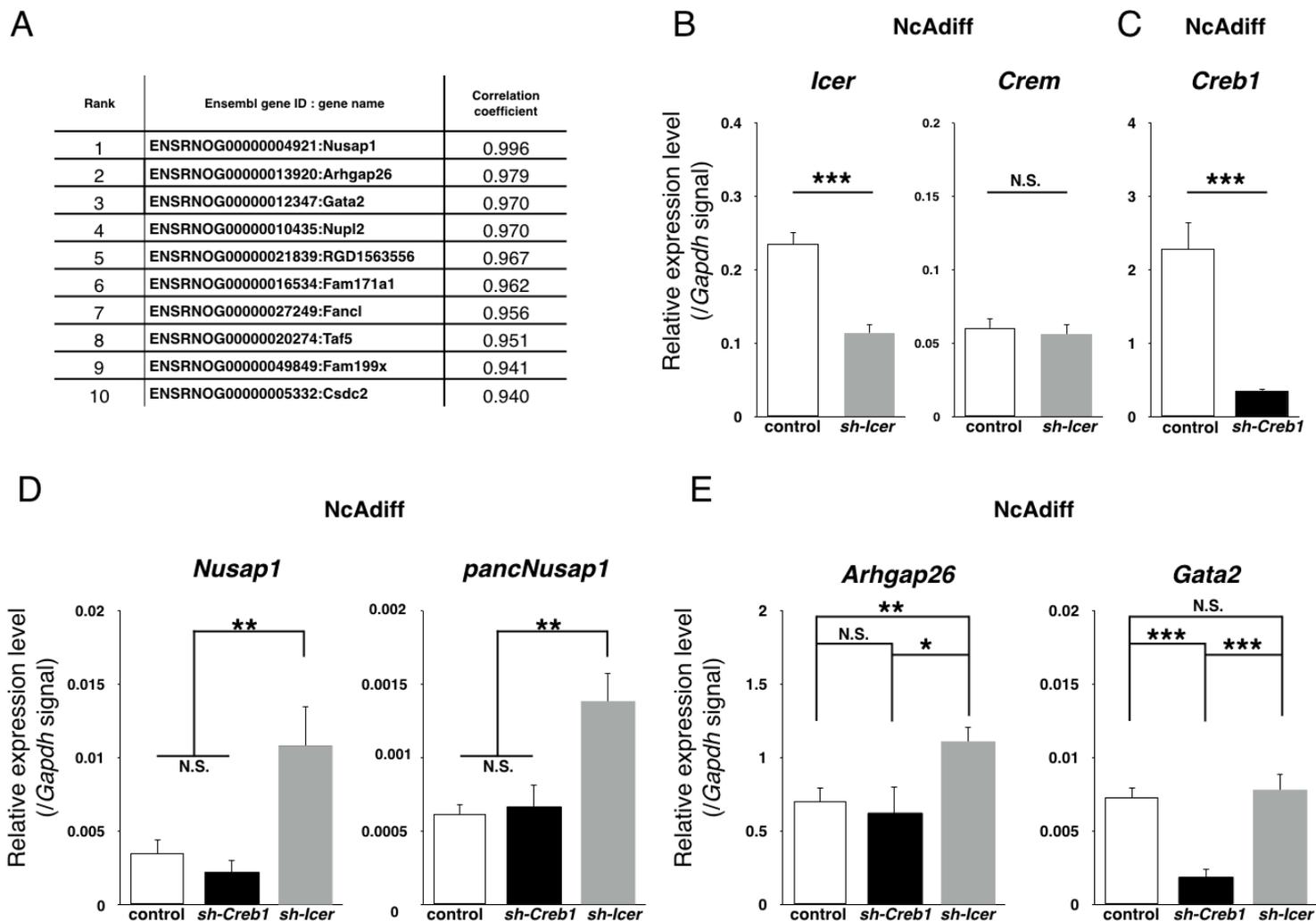


Fig.1-9. cAMP依存的転写制御因子ノックダウンがpBiPの転写活性に与える影響

(A) PC12の分化過程でpancRNAとの発現相関が高い上位10のmRNAのリスト。(B) NcAdiff細胞での*sh-Icer*の発現が*Icer*、*Crem*の発現状態に与える影響。(C) NcAdiff細胞での*sh-Creb1*の発現が*Creb1*の発現状態に与える影響。(D) NcAdiff細胞での*sh-Icer*、*sh-Creb1*の発現が*Nusap1*、*pancNusap1*の発現状態に与える影響。(E) NcAdiff細胞での*sh-Icer*、*sh-Creb1*の発現が*Arhgap26*、*Gata2*の発現状態に与える影響。

## 不可逆分化過程では pBiP である *Nusap1* プロモーターに cAMP 依存性転写抑制因子 Icer が直接的に作用する

ラット *Nusap1* プロモーター領域には CRE 配列と同様に Creb1 が結合能をもつ配列である CGCCA (Impey et al., 2004) と TGACG (Fink et al., 1988) が TSS 近傍を中心として上流と下流に対称に配置されており、それらの配列はヒトやマウスゲノム上の *Nusap1* プロモーターでも確認された (Fig.1-10A)。また、*Nusap1* プロモーター領域の塩基配列解析から、*pancNusap1* と *Nusap1* は共に 5'端付近に G を多く含む RNA 配列を持っており、機能的な pancRNA をもつプロモーターがもつ特徴の一つである GCskew と呼ばれるゲノム構造 (Ginno et al., 2013; Uesaka et al., 2014) を形成していた (Fig.1-10B)。cAMP 依存性不可逆分化過程において本当に *Nusap1* プロモーターが cAMP 依存性転写因子の結合による直接的な転写制御を受けているのかを調べるため、Undiff 細胞を NGF と cAMP を含んだ分化培地で培養後、3 時間、24 時間、72 時間と時系列をとって CHIP-qPCR を行い、*Nusap1* プロモーターへのリン酸化 Creb1 と Icer の結合動態を調べた (Fig.1-10C)。その結果、*Nusap1* プロモーターへのリン酸化 Creb1 の結合は、cAMP 刺激後 3 時間の時点ではみられたが、徐々に減少していき、72 時間後にはほぼ検出できなくなった。一方、*Nusap1* プロモーターへの Icer の結合は、cAMP 刺激後 3 時間でも見られていたが、刺激後 72 時間後たっても刺激後 3 時間後の 60%程度のレベルで維持されていた。さらに、Undiff 細胞を NGF のみを含む分化培地と、NGF と cAMP を含んだ分化培地で培養後、それぞれ時系列をとって *pancNusap1* と *Nusap1* の発現動態を RT-qPCR で調べた。その結果、NGF のみを含む分化培地で培養された場合と比較して、cAMP を加えた培地で培養すると、*pancNusap1* と *Nusap1* の発現はいずれも 72 時間後まで加速度的に減少していった (Fig.1-10D)。以上より、cAMP 依存性不可逆分化過程においては、*Nusap1* プロモーター上にてリン酸化 Creb1

と Icer の競合が起き、その後、Icer の継続的な発現が優位になることで、*pancNusap1-Nusap1* ペアの発現は高度に抑制されていくことが強く示唆された。

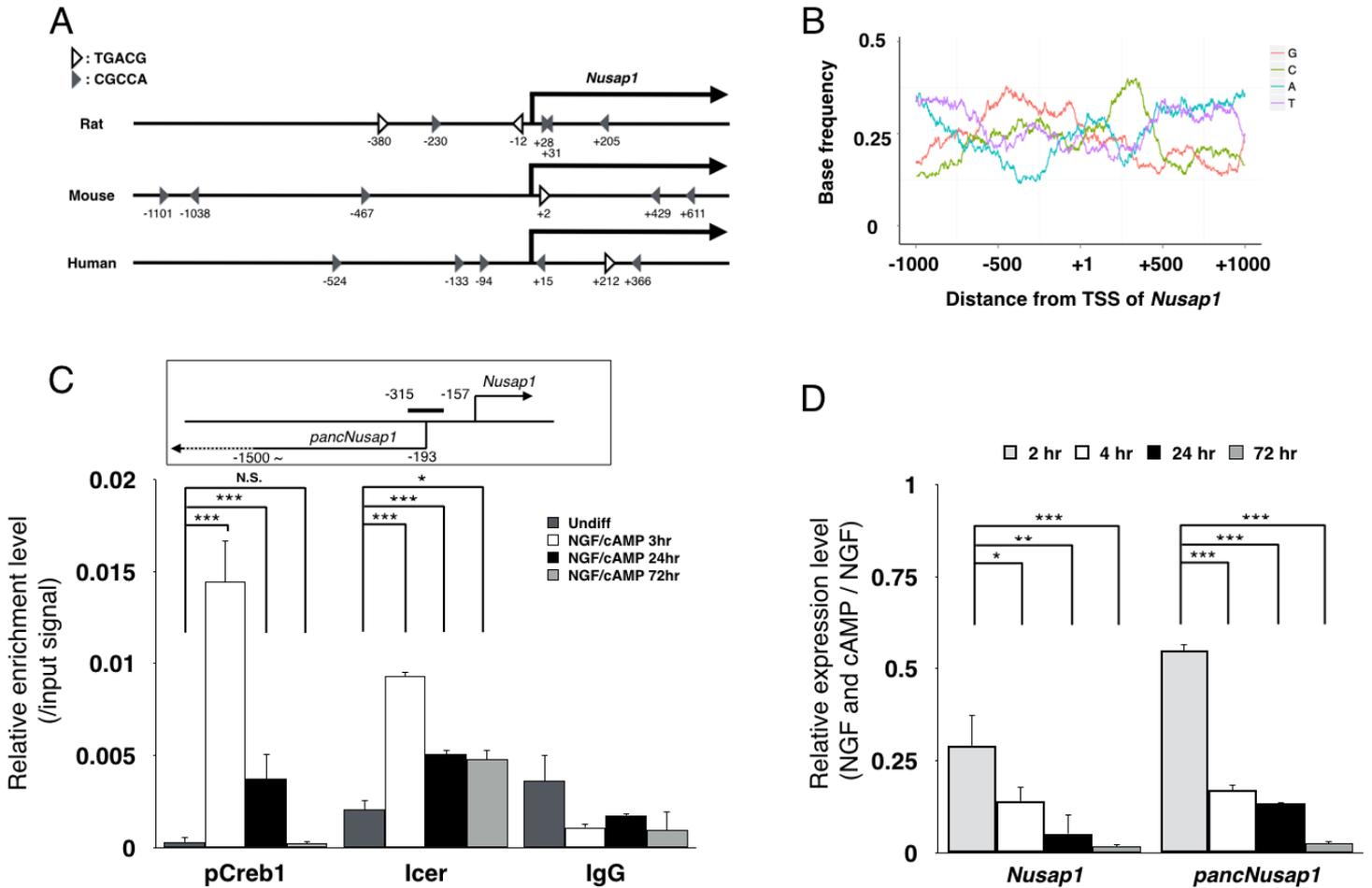


Fig.1-10. *Nusap1*プロモーターへのcAMP依存的転写因子の結合とその転写活性の関係

(A) ラット、マウス、ヒトの*Nusap1*プロモーターにおけるTGACG、CGCCA配列の位置。(B) *Nusap1*プロモーターのアンチセンス鎖における塩基頻度。一塩基毎に前後100 bpに含まれる塩基の割合を示した。(C) cAMP存在分化刺激後3、24、72時間後の*Nusap1*プロモーターにおけるのリン酸化Creb1とIcer結合レベル。ChIP-qPCRに使用したプライマーの位置をグラフの上に示した。(D) cAMP存在、非存在分化刺激後2、4、24、72時間後の*Nusap1*、*pancNusap1*の発現レベルの差。

## 考察

本章では、cAMP 依存的に不可逆分化した PC12 細胞では細胞周期関連遺伝子群が強く抑制されていること、数千の両方向性プロモーターが cAMP シグナル下流で直接的な正または負の転写制御の作用点となっていること、及び、両方向性プロモーターの 80%以上が pBiP であることを明らかにした。続いて、ゲノムワイドデータを元に、cAMP 依存性転写因子である Creb1 と Icer のクロマチン免疫沈降やノックダウン実験を行い、PC12 細胞分化過程で発現相関が高い pancRNA と mRNA を転写制御している pBiP において、Creb1 による正の転写制御と Icer による負の転写制御が確かに行われていることを明らかにした。

### PC12 細胞の不可逆分化過程における cAMP 依存的な G2/M 期関連遺伝子の抑制の細胞生物学的意義

不可逆分化した PC12 細胞では、可逆分化した PC12 細胞と比較して、細胞周期関連遺伝子、特に M 期の制御に関連する遺伝子が強い抑制を受けているという結果が得られたのは非常に興味深い (Fig.1-4A)。神経細胞は細胞周期が G0 期で停止していることから、これまでに神経分化と G1/S 期での細胞周期の進行阻害の関連性についてさまざまな報告がなされている (Galderisi et al., 2003; Lee et al., 1994)。例えば、マウス神経幹細胞からの神経分化は G1/S 期進行促進遺伝子である *Cdk2* と *Cdk4* のダブルノックアウトによって活性化されることが報告されている (Lim and Kaldis, 2012)。同様に、PC12 細胞を NGF 刺激すると機能的な神経突起の伸長が見られることが 1976 年に報告されて以来 (Greene and Tischler, 1976)、Ndiff 細胞は神経突起の伸長と G1/S 期進行阻害の関係性を調べるための貴重な *in vitro* 神経分化系として着目されてきた。実際、CDK2、PCNA、phosphorylated retinoblastoma 等の G1/S 期進行に関わるタンパク質の発現が Ndiff 細胞で低下することが報告されている (Dobashi et al., 2000; Yan and Ziff, 1995; 1997)。一方で、G2/M 期の

進行に関わる遺伝子の阻害も、生体における機能的な神経の分化過程で重要な役割を果たしている (Hayes et al., 1991; Okano et al., 1993)。例えば、マウス神経前駆細胞において、M 期進行促進遺伝子である doublecortin-like kinase をノックアウトすると神経分化が引き起こされる (Shu et al., 2006)。また、除核した成熟卵母細胞への体細胞核移植実験において、卵丘細胞や上皮細胞などの他の分化細胞の核を移植しても問題なく発生が進むのに対し (Wakayama and Yanagimachi, 1999; Wakayama et al., 1998)、成熟マウスの皮質神経細胞の核を移植した場合、殆どのクローン卵で始めの体細胞分裂時に異常な染色体の凝集と細胞周期停止がみられることも、神経細胞核において厳密な M 期の制御が行われている事を示している (Osada et al., 2002)。したがって、神経分化においては G1/S 期制御関連遺伝子と M 期制御関連遺伝子の制御の両方が重要であると考えられる。その観点から、不可逆分化した PC12 細胞では、可逆分化した PC12 細胞と比較して細胞周期関連遺伝子、特に M 期の制御に関連する遺伝子が強い抑制を受けているという結果が得られたのは非常に意義深い (Fig.1-4 A)。実際、可逆分化の過程においては G1/S 期進行促進遺伝子の発現低下がみられていることから (Fig.1-4B)、NGF 刺激に cAMP による刺激も加える事が G1/S 期だけでなく G2/M 期の進行阻害も惹起できることが示唆される。細胞周期制御が神経分化に果たす役割の解明に向けて、さらなる研究が必要であるが、PC12 細胞を神経の分化モデルと考えたとき、G1/S 期制御関連遺伝子の発現制御と関連して神経突起の伸長が起こり、M 期制御関連遺伝子の発現制御により、神経を確実な最終分化状態に固定されるのかもしれない。

### **cAMP 依存性転写因子の転写制御対象として両方向性プロモーター構造を形成する 利点**

本章では、aBiP だけでなく pBiP も、cAMP シグナルを感受しやすい両方向性プロモーターとして機能するためのゲノム構造を有していることを示した (Fig.1-7、1-9、1-10)。cAMP

依存性シグナル経路が関わる細胞の生理応答は、細胞増殖、神経突起伸長、脂質代謝の活性化、グルコースの産生、ホルモン応答、シナプス可塑性の制御など非常に多種多彩であるため、cAMP 依存性の転写因子は細胞ごとに異なった遺伝子群の転写制御を行う必要がある (Cooper et al., 1995; Mayr and Montminy, 2001)。cAMP 依存性転写因子である Creb1、Atf1、Crem などの Creb ファミリータンパク質は共通の DNA 結合ドメインを有しており、TGACGTCA、TGACG、CGCCA 配列を認識する (Fink et al., 1988; Impey et al., 2004)。これらの配列はいずれも DNA メチル化の対象となる CpG 配列を含んでおり、これらの配列に DNA メチル化が入った場合には cAMP 依存性転写因子が結合できなくなることが報告されている (Iguchi-Ariga and Schaffner, 1989; Mayr and Montminy, 2001; Zhang et al., 2005)。興味深いことに、ゲノム上には CpG アイランドと呼ばれる CG を多く含んだ領域が点在しており、aBiP や pBiP などの両方向性プロモーターの 90%以上は CpG アイランド型プロモーターであることがわかっている (Impey et al., 2004; Uesaka et al., 2014)。したがって、哺乳類の進化において、CpG アイランドが、cAMP 依存性転写因子結合を制御し易い場を提供し、並行して、一過的な cAMP 依存性転写因子結合がもたらした遺伝子発現への影響が、pancRNA によるエピゲノム制御を介して維持されることが有利に働くことが多いため、cAMP シグナルを感受しやすいゲノム構造が保存されるに至ったのではないだろうか。pancRNA が cAMP シグナルを感知し、プロモーターの制御レベルをどのように高次元化したかについては、第二章でさらに考察を加えることにする。

本章で得られた結果から、配列特異的エピゲノム制御因子である pancRNA と mRNA を生み出す両方向性プロモーターは cAMP シグナルによる直接的な転写制御を受けやすいゲノム構造を有していることが明らかになった。また、PC12 細胞の不可逆分化系を用いることで、さまざまな細胞分化を促進する細胞外シグナルと同様に、cAMP シグナルを起点とする最終

分化シグナルも、両方向プロモーターを作用点として細胞状態特異的なエピゲノム形成を実行している可能性が強く示唆された。

## 第二章

### 序論

個々の細胞のエピゲノムは細胞状態特異的に決まっており (ENCODE Project Consortium, 2012; Guenther et al., 2007) 、細胞状態特異的なエピゲノムがひとたび決まると、遺伝子発現パターンは固定され、細胞外シグナルに対する応答性が変化し、長期的に固定化される (Kim et al., 2010a; Nakashima et al., 1999) 。現在までに同定されているエピゲノム制御因子としては、ヒストンアセチル基転移酵素 Cbp/p300 や逆にヒストンの脱アセチル化を触媒する HDAC ファミリー (Gregoretta et al., 2004) 、ヒストン H3K27 メチル基転移酵素 Ezh2 (Pereira et al., 2010) やヒストン H3K27 脱メチル化酵素 JMJ ファミリー (Swigut and Wysocka, 2007) 、また *de novo* DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a/Dnmt3b (Okano et al., 1999) や能動的 DNA 脱メチル化に関わるメチル化シトシンのヒドロキシ化とそれに続くフォルミル化及びカルボキシル化を触媒する TET ファミリー (Ito et al., 2010; 2011) 、フォルミル化シトシンやカルボキシル化シトシンを選択的に除去する Tdg (He et al., 2011) などが知られている。これらのエピゲノム制御因子は他の転写因子等と複合体を形成して、配列特異性を高めているが、それでも結合 DNA 領域は数千~数万領域にわたっている。それに対して、細胞状態特異的なエピゲノム形成を行うためにこれらの酵素群を特定のゲノム領域にのみ作用させるような配列特異的エピジェネティック制御機構も存在し、極めて重要な機能を果たしていることが想定できる。しかし、細胞状態特異的なエピゲノム形成に寄与している、分化シグナル下流で駆動する配列特異的エピジェネティック制御機構には不明な点が多い。そのような配列特異的機構のそれぞれにタンパク質因子を用意することには無理が伴う一方で、機能性 lncRNA である pancRNA が配列特異的エピジェネティック制御因子として報告されており (Hamazaki et al., 2015; Imamura et al., 2004; Tomikawa et al.,

2011)、細胞状態特異的なエピゲノム形成過程において pancRNA の発現変化によるエピジェネティック制御が大きく関わっている可能性がある。

前章では配列特異的なエピジェネティック制御因子である pancRNA と mRNA を生み出す両方向性プロモーターが cAMP シグナルの下流で直接的な転写制御を受けやすいゲノム構造をもつことが示された。本章ではさらに解析をすすめ、前章で cAMP 依存性転写因子によって直接転写制御されていることが示された *pancNusap1* の発現パターン形成が、*Nusap1* プロモーター上に細胞状態特異的なエピジェネティック修飾パターンを促進し、PC12 細胞の不可逆分化に貢献しているのか、を検証した。

## 結果

### NcAdiff 細胞において、*Nusap1* プロモーターの転写活性が配列特異的にかつ不可逆的に抑制される

PC12 細胞の不可逆分化過程において、cAMP シグナルによる *pancRNA*-*mRNA* ペアの転写制御が分化細胞特異的なエピゲノム変化を引き起こしているのか調べるため、前章で cAMP シグナル制御下にあることが明らかになった *pancNusap1*-*Nusap1* ペアに着目した。まず、Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞、及び、Ndiff、NcAdiff 細胞それぞれを増殖培地でさらに 4 日間培養した細胞について、*Nusap1* と *pancNusap1* の発現状態を RT-qPCR により調べた (Fig.2-1A)。*pancNusap1* と *Nusap1* の発現動態は正に相関しており、共に Undiff 細胞で最も発現レベルが高く、NcAdiff 細胞では Ndiff 細胞と比較して発現レベルが有意に低下していた。興味深いことに、NcAdiff 細胞における *pancNusap1* と *Nusap1* の発現レベルは、増殖培地で 4 日間培養した後も抑制された状態を維持していたのに対し、Ndiff 細胞では、増殖培地で 4 日間培養すると *pancNusap1* と *Nusap1* の発現レベルが Undiff 細胞と同じ発現レベルまで回復した (Fig.2-1A)。また、*Nusap1* プロモーターの転写活性の変化は *Nusap1* プロモーター領域に特異的なものであり、*Nusap1* 領域近傍の遺伝子は *pancNusap1*-*Nusap1* ペアと似た発現動態を示さず、周囲の遺伝子発現状態はまた別の制御を受けていることが、RNA-seq データの解析から示唆された (Fig.2-1B)。

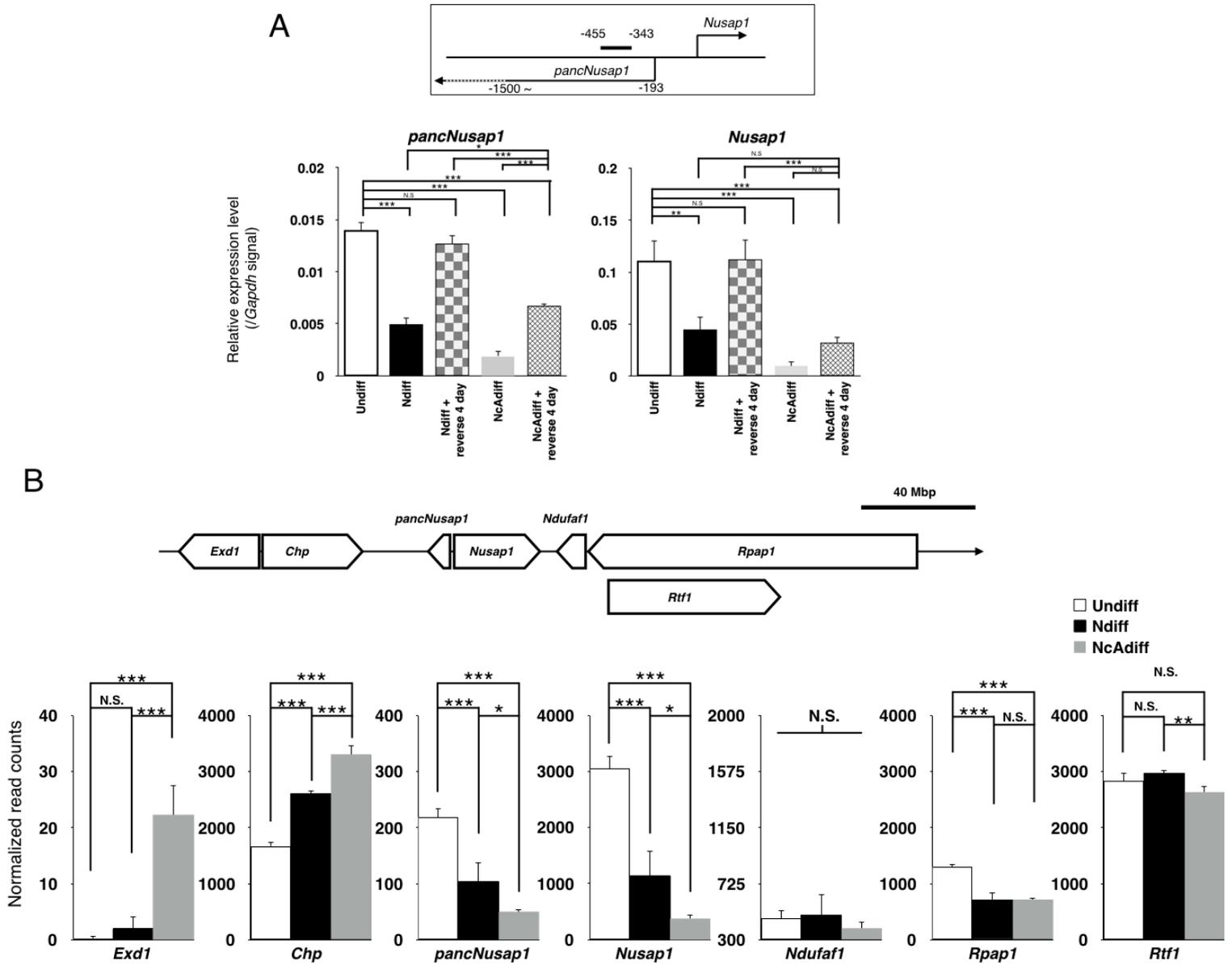


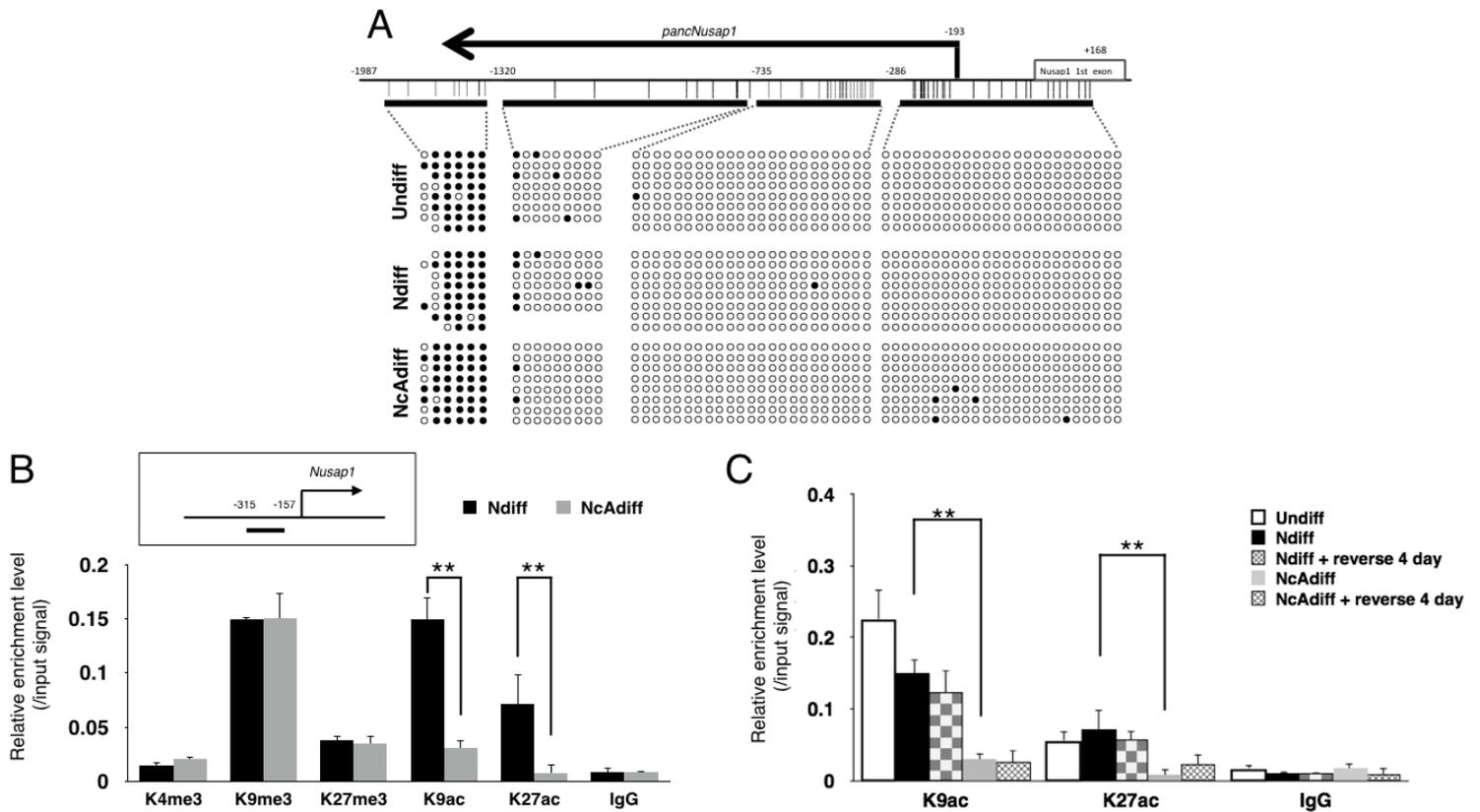
Fig.2-1. 不可逆分化刺激による *Nusap1* プロモーター領域特異的な転写活性の変化

(A) それぞれの細胞状態での *Nusap1* と *pancNusap1* の転写状態。RT-qPCR に使用したプライマーの位置をグラフの上を示した。(B) RNA-seq データより算出した各細胞における *Nusap1* 領域近傍遺伝子の発現状態。各近傍遺伝子のゲノム上の位置関係を上を示した。

## PC12 細胞の不可逆分化に伴い、ヒストンのアセチル化レベルが低下する

不可逆分化過程における *pancNusap1-Nusap1* ペアの配列特異的かつ不可逆的な転写抑制は、*Nusap1* プロモーターのエピジェネティックな転写抑制機構が作用した結果、*pancNusap1-Nusap1* ペアが転写活性化シグナルに反応できなくなったのではないかと考え、バイサルファイトシーケンシングや ChIP-qPCR により、PC12 細胞の分化前後における *Nusap1* プロモーターのエピジェネティック修飾パターンを調べた。*Nusap1* プロモーターの DNA メチル化状態には、Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞間で差が認められなかった (Fig.2-2A)。また、活性型ヒストン修飾の H3K4me3 や抑制型ヒストン修飾の H3K9me3、H3K27me3 などの *Nusap1* プロモーターにおけるヒストンメチル化シグナルレベルにも Ndiff 細胞と NcAdiff 細胞の間に違いがみられなかった (Fig.2-2B)。一方、活性型ヒストン修飾である H3K9ac や H3K27ac などのヒストンアセチル化レベルが Ndiff 細胞と比較して NcAdiff 細胞では 25%以下まで低下していることを突き止めた (Fig.2-2B)。さらに、*Nusap1* プロモーターにおけるヒストンアセチル化レベルは NcAdiff 細胞を再度増殖培地に戻して 4 日間培養した場合においても低い状態に保たれており、*pancNusap1-Nusap1* の発現が回復しないこととも一致していることが分かった (Fig.2-2C)。これらの結果と *pancRNA* が配列特異的なエピゲノム制御因子として働くという我々の過去の報告から

(Hamazaki et al., 2015; Imamura et al., 2004; Tomikawa et al., 2011)、cAMP シグナルによる *pancNusap1* の発現低下が、細胞周期関連遺伝子 *Nusap1* プロモーターのエピジェネティック制御によって抑制をかけられることにより、PC12 細胞の不可逆分化が達成されているという可能性が考えられた。

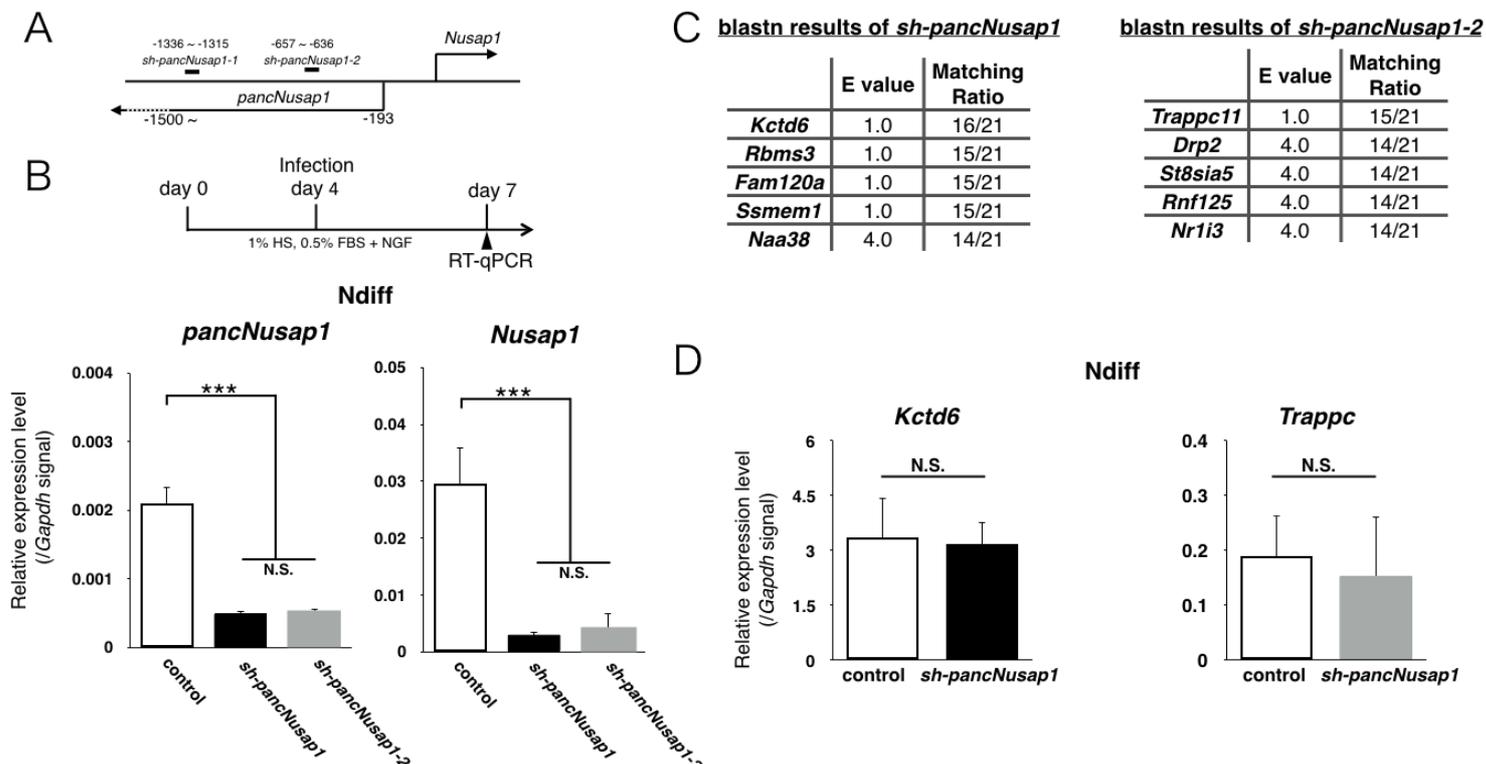


**Fig.2-2. Nusap1プロモーターのcAMP依存的なヒストンアセチル化状態の変化**

(A) Undiff、Ndiff、NcAdiff細胞における *Nusap1*プロモーターのDNAメチル化状態。上には *Nusap1*プロモーターの模式図と、バイサルファイトPCRで使用した4つのプライマーペアの位置を黒い横線、CpGの位置を縦の黒線で示した。また、下の白丸は黒丸はそれぞれシトシンとメチル化シトシンを表し、一回のシーケンシングにより得られたメチル化情報を横に並べて示した。(B) Ndiff、NcAdiff細胞における *Nusap1*プロモーターのヒストンメチル化、アセチル化シグナル。ChIP-qPCRに使用したプライマーの位置をグラフの上を示した。(C) それぞれの細胞状態における *Nusap1*プロモーターのヒストンアセチル化シグナル。

### ***pancNusap1* のノックダウンは *Nusap1* の発現低下を引き起こす**

PC12 細胞の不可逆分化過程において、*pancNusap1* の発現低下が *Nusap1* プロモーターと細胞の形質に及ぼす影響を評価するため、Ndiff 細胞において *pancNusap1* のノックダウンを行い、その影響を調べた。RT-qPCR により、*pancNusap1* を標的とした 2 つの shRNA (*sh-pancNusap1*、*sh-pancNusap1-2*、Fig.2-3A) の強制発現は共に、*Nusap1* 発現レベルの有意な低下を引き起こすことが分かった (Fig.2-3B)。*sh-pancNusap1*、*sh-pancNusap1-2* によるオフターゲット効果が無いことを確認するため、それぞれの配列からオフターゲット効果を及ぼす可能性が高い遺伝子をリストアップし、解析に供した (Fig.2-3C)。その結果、*sh-pancNusap1* や *sh-pancNusap1-2* それぞれの強制発現は、最もオフターゲット効果を及ぼす可能性があるとして予測された遺伝子の発現に影響を与えなかったことが、pancRNA ノックダウン細胞を用いた RT-qPCR により確認できた (Fig.2-3D)。したがって、*sh-pancNusap1*、*sh-pancNusap1-2* は *pancNusap1* の発現を特異的に減少させることにより、*Nusap1* の発現低下を引き起こしていることが考えられた。



**Fig.2-3. *pancNusap1*ノックダウンによる*Nusap1*発現状態への影響**

(A) *pancNusap1*ノックダウンに使用したshRNAのターゲット配列の位置 (B) 可逆分化過程における*pancNusap1*ノックダウンが*Nusap1*発現状態に与える影響。実験の流れをグラフ上に示した。(C) *pancNusap1*のノックダウンに使用したshRNAがオフターゲット効果を及ぼす影響が高い上位5つのmRNAリスト (D) *pancNusap1*ノックダウンのオフターゲット効果の検証

## ***pancNusap1* のノックダウンは *Nusap1* プロモーターのクロズドクロマチン化と、細胞周期の停止を引き起こす**

次に、*sh-pancNusap1* の発現による *pancNusap1* の減少が、*Nusap1* プロモーターのヒストンアセチル化レベルに与える影響を評価するため、ChIP-qPCR を行った。この実験では、*sh-pancNusap1* をドキシサイクリンによって条件的に発現誘導できる PC12 細胞を薬剤選択により作製し使用した。まず、ドキシサイクリンによる *sh-pancNusap1* の発現誘導によって、確かに *pancNusap1* と *Nusap1* の発現低下を引き起こし得ることを確認した (Fig.2-4A)。この細胞を用いて、Ndiff 細胞への分化過程において *sh-pancNusap1* を発現誘導しても、*Gapdh* プロモーターの H3K9ac と H3K27ac のシグナルレベルには変化が見られなかったのに対し、*Nusap1* プロモーターの H3K9ac と H3K27ac レベルについては *sh-pancNusap1* の発現により、cAMP がなくとも有意に低下することが分かった (Fig.2-4B、C)。次に、*pancNusap1* のノックダウンした Ndiff 細胞には細胞増殖能があるのかを調べた。その結果、増殖培地で四日間培養した後のコントロール群で見られた細胞数の増加は *pancNusap1* のノックダウンにより有意に抑制された (Fig.2-4D)。さらに *pancNusap1* がノックダウンされた Ndiff 細胞を増殖培地で四日間培養した後、細胞増殖マーカーである Ki67 タンパク質と DNA に取り込まれた EdU シグナルを免疫染色法によって検出した結果、*pancNusap1* のノックダウンにより Ki67 陽性細胞と EdU 陽性細胞がほぼみられなくなった (Fig.2-4E)。以上より、分化過程で *pancNusap1* をノックダウンされた Ndiff 細胞は、*Nusap1* の発現低下による *Nusap1* プロモーターの脱アセチル化と細胞周期の停止を引き起こすことが分かった。

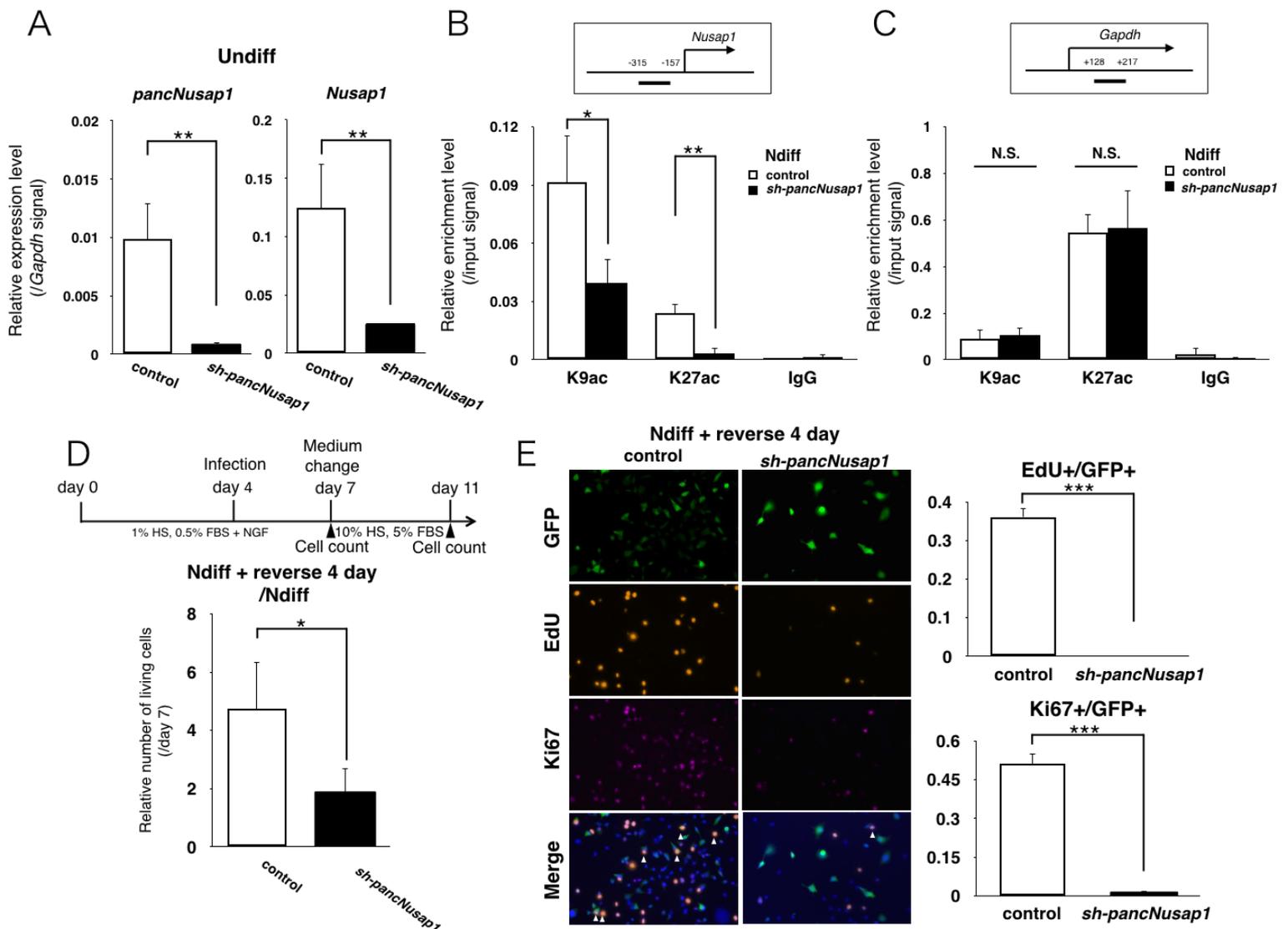


Fig.2-4. 可逆分化過程における *pancNusap1* ノックダウンが *Nusap1* プロモーターのヒストンアセチル化状態と細胞増殖能に与える影響

(A) Undiff細胞においてドキシサイクリンによって発現誘導された *sh-pancNusap1* が *pancNusap1* と *Nusap1* の発現状態に与える影響。(B) 可逆分化過程においてドキシサイクリンによって発現誘導された *sh-pancNusap1* が *Nusap1* プロモーターのヒストンアセチル化状態に与える影響。ChIP-qPCRに使用したプライマーの位置をグラフの上に示した。ドキシサイクリンは分化5日目に培地に加えた。(C) 可逆分化過程においてドキシサイクリンによって発現誘導された *sh-pancNusap1* が *Gapdh* プロモーターのヒストンアセチル化状態に与える影響。ChIP-qPCRに使用したプライマーの位置をグラフの上に示した。(D) 可逆分化過程における *pancNusap1* ノックダウンが増殖培地での培養後の細胞増殖に与える影響。実験の流れをグラフ上に示した。(E) 可逆分化過程における *pancNusap1* ノックダウンが増殖培地での培養後の細胞増殖マーカー陽性細胞の割合に与える影響。

### ***pancNusap1* の強制発現は *Nusap1* プロモーターの活性化を引き起こす**

さらに、PC12 細胞の不可逆分化過程において *pancNusap1* の発現制御が及ぼす影響を評価するため、今度は不可逆分化した NcAdiff 細胞を用いて *pancNusap1* の強制発現を行い、その影響を調べた。*pancNusap1* はマウス *Oip5* 遺伝子と相同な領域を含んでおり、*pancNusap1* が翻訳されてタンパク質として機能している可能性も考えられた (Fig.2-5A)。そのため、翻訳開始点 (TIS) 近傍の配列を除去し、明確な Open reading frame (ORF) を持たない *pancNusap1*  $\Delta$  TIS を強制発現実験に用いることとした。さらに、機能的な *pancRNA* は G-rich な配列を持つことが示唆されている事を考慮にいれ (Ginno et al., 2013; Uesaka et al., 2014)、*Nusap* の TSS から上流 500 bp までの領域が含まれるように、*pancNusap1*  $\Delta$  TIS を設計した (Fig.1-10B)。このように設計された *pancNusap1*  $\Delta$  TIS を、NcAdiff 細胞において強制発現させたところ、*Nusap1* の発現を劇的に活性化できたことから (Fig.2-5A、B)、*pancNusap1* は確かに lncRNA として *Nusap1* の転写活性化に機能していると考えられた。また、*pancRNA* が転写方向依存的に遺伝子活性化因子として機能しているという過去の報告から (Tomikawa et al., 2011)、同様の現象が *pancNusap1* においても確認できるのかを調べるため、*pancNusap1*  $\Delta$  TIS の逆鎖である *sense\_pancNusap1*  $\Delta$  TIS を NcAdiff 細胞において強制発現させ、その影響を調べた (Fig.2-5A)。予想通り、NcAdiff 細胞への *sense\_pancNusap1*  $\Delta$  TIS の強制発現では *Nusap1* の転写を活性化させることはできなかった (Fig.2-5B)。以上より、*pancNusap1* は転写方向依存的に *Nusap1* の転写活性化を引き起こす lncRNA であると考えられた。

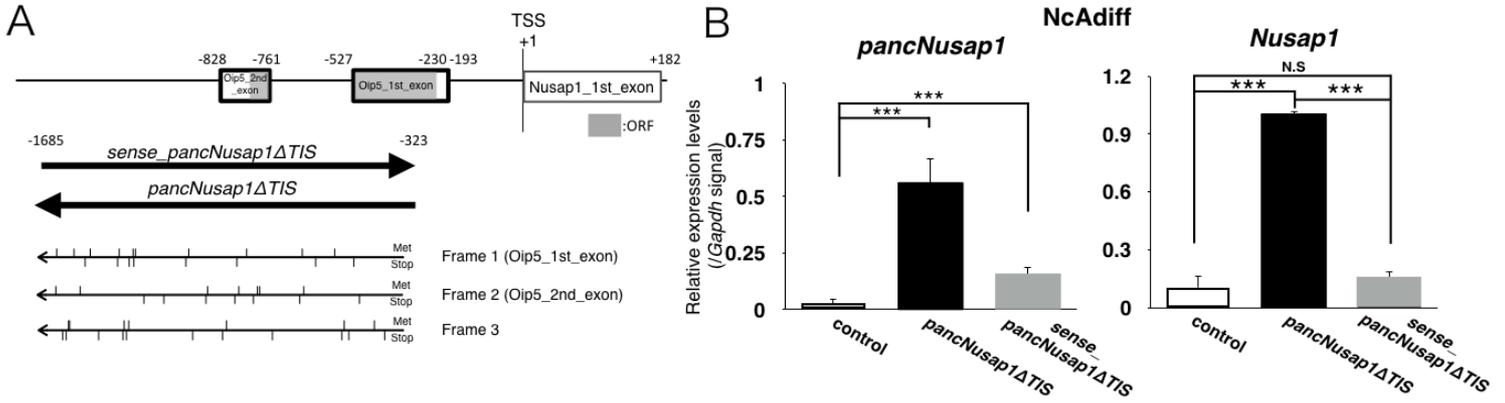


Fig.2-5. *pancNusap1*過剰発現による*Nusap1*発現状態への影響

(A) ラット *Nusap1* プロモーター領域と、マウス *Oip5* 遺伝子の相同領域の位置関係を上部に示した。ボックス内のグレーに塗られた部分は *Oip5* の Open reading frame の位置を示す。その下には *pancRNA* の強制発現に使用したゲノム領域と、そのゲノム領域における3つの Reading frame において翻訳開始点となるメチオニン (Met) と停止コドン (Stop) の位置をそれぞれ矢印の上下の縦線でしめた。(B) 不可逆分化過程における *pancNusap1* 過剰発現が *Nusap1* 発現状態に与える影響。ドキシサイクリンは分化5日目に培地に加えた。

## ***pancNusap1* の強制発現は *Nusap1* プロモーターのオープンクロマチン化と、細胞周期の促進を引き起こす**

NcAdiff 細胞における *pancNusap1 Δ TIS* や *sense\_pancNusap1 Δ TIS* の強制発現が *Nusap1* プロモーターのヒストンアセチル化状態に与える影響を調べたところ、*pancNusap1 Δ TIS* の強制発現によって *Nusap1* プロモーターの H3K9ac と H3K27ac シグナルの劇的な上昇が見られたが、*sense\_pancNusap1 Δ TIS* の強制発現ではその影響は見られなかった (Fig.2-6A)。したがって、*Nusap1* プロモーターの活性化はヒストンアセチル化を伴うことが分かった。次に、NcAdiff 細胞の分化不可逆性を解除できるのか、*pancNusap1 Δ TIS* 強制発現の影響を調べた。分化過程で *pancNusap1 Δ TIS* または *sense\_pancNusap1 Δ TIS* を強制発現させた NcAdiff 細胞について、増殖培地にて 4 日間培養後に細胞数の変化を調べた結果、*pancNusap1 Δ TIS* 強制発現細胞では細胞数の増加が見られたのに対し、*sense\_pancNusap1 Δ TIS* 強制発現細胞では細胞数の増加は見られなかった (Fig.2-6B)。さらに、*pancNusap1 Δ TIS* の強制発現によって NcAdiff 細胞の細胞周期を復活させることができるのか調べるため、増殖培地にて 4 日間培養した後に細胞内の Ki67 蛋白を免疫染色により検出する実験を行った。その結果、*pancNusap1 Δ TIS* の強制発現により Ki67 陽性細胞の数が有意に増加していることが分かった (Fig.2-6C)。以上より、不可逆分化過程において、*pancNusap1* を強制発現させた NcAdiff 細胞は、Ndiff 細胞と似たエピジェノタイプと表現型を示すようになることが明らかになった。

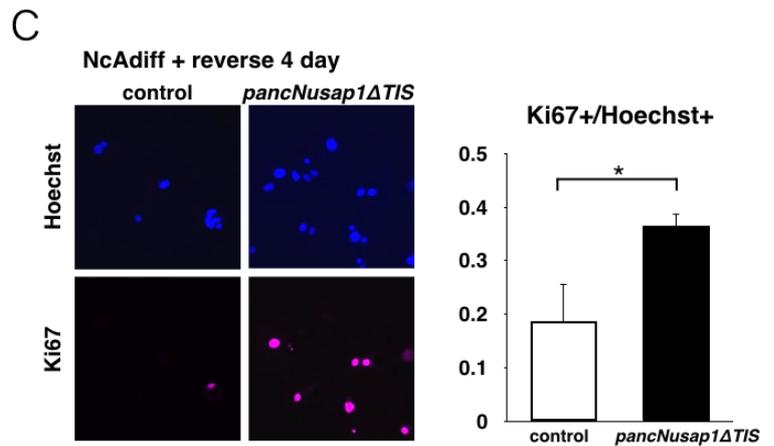
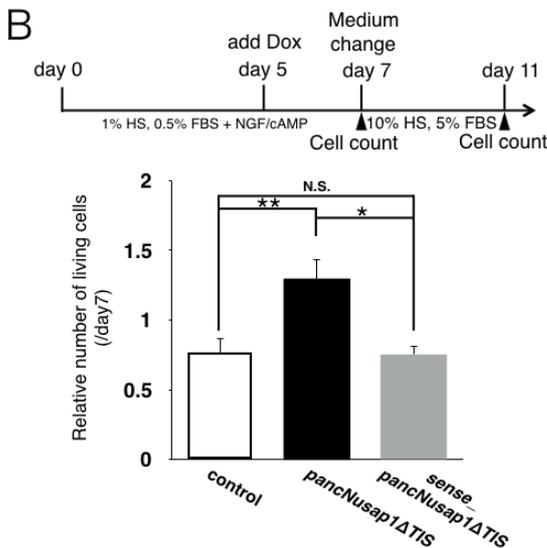
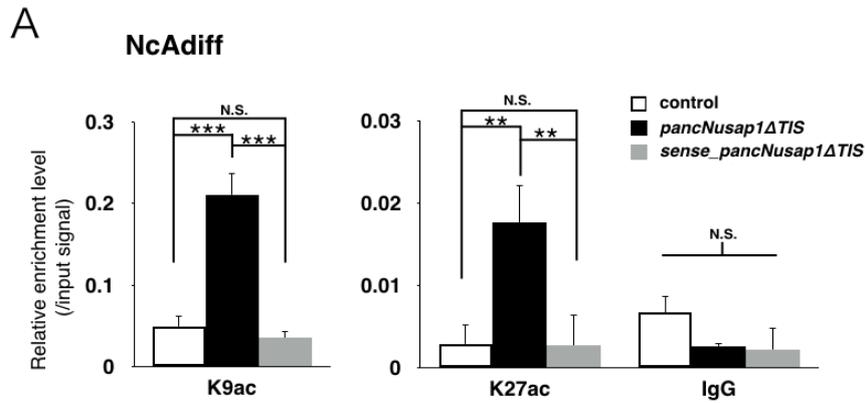


Fig.2-6. 不可逆分化過程における *pancNusap1* 過剰発現が *Nusap1* プロモーターのヒストンアセチル化状態と細胞増殖能に与える影響

(A) 不可逆分化過程における *pancNusap1* 過剰発現が *Nusap1* プロモーターのヒストンアセチル化状態に与える影響。ドキシサイクリンは分化5日目に培地に加えた。(B) 不可逆分化過程における *pancNusap1* 過剰発現が増殖培地での培養後の細胞増殖に与える影響。実験の流れをグラフ上に示した。(C) 不可逆分化過程における *pancNusap1* ノックダウンが増殖培地での培養後の細胞増殖マーカー陽性細胞の割合に与える影響。

## *pancNusap1* のノックダウンによる細胞周期の停止は *Nusap1* の過剰発現によりレスキューされる

最後に、*pancNusap1* による遺伝子活性化は、確かに単一遺伝子座においておこるのかを検証するため、*pancNusap1* をノックダウンした PC12 細胞に同時に *Nusap1* を強制発現することによって、細胞周期停止という表現型をレスキューできるのかを調べた。まず、*sh-pancNusap1* と *Nusap1* を同時に発現するレスキューコンストラクトが実際に細胞内で機能することを Undiff 細胞において確認した (Fig.2-7A)。免疫染色法によって Ki67 陽性細胞と EdU 陽性細胞を検出した結果、*sh-pancNusap1* 発現によって減少した Ki67 陽性細胞数と EdU 陽性細胞数は *Nusap1* の強制発現によって再び増加し、コントロールと有意差がつかなくなることが分かった (Fig.2-7B)。さらに、*pancNusap1* のノックダウンによって細胞増殖能が抑制された Ndiff 細胞も *Nusap1* の同時的強制発現によって細胞増殖能の向上がみられ、コントロールと有意差がつかなくなった (Fig.2-7C)。以上より、*pancNusap1* は配列特異的エピジェネティック制御に働くことにより *Nusap1* を転写活性化し、PC12 細胞の分化状態を規定する重要な役割を果たしている、と結論づけた。

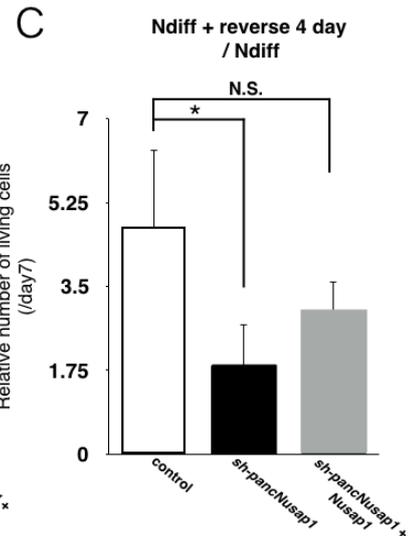
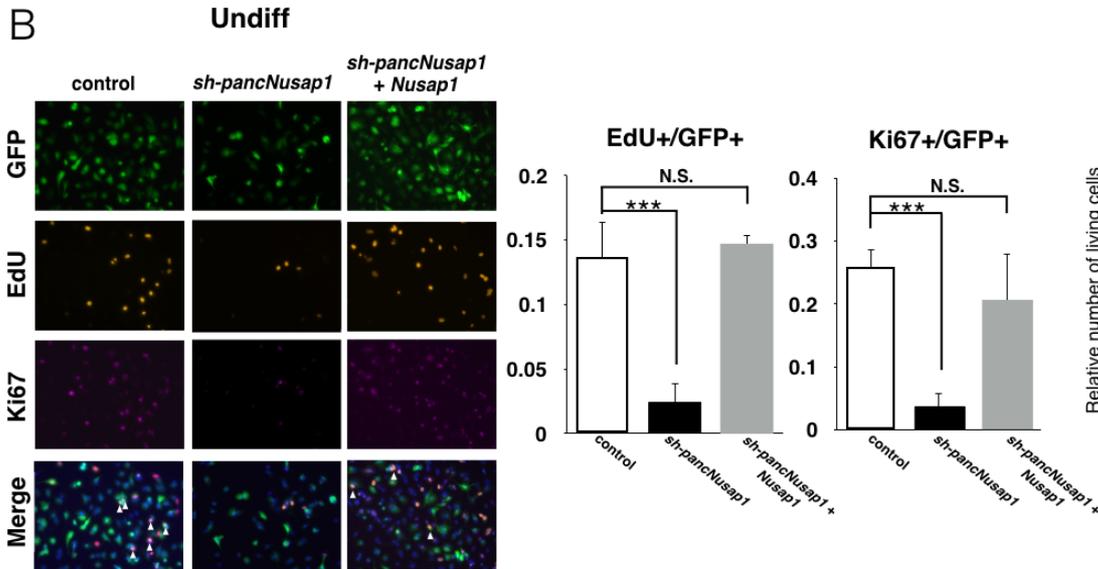
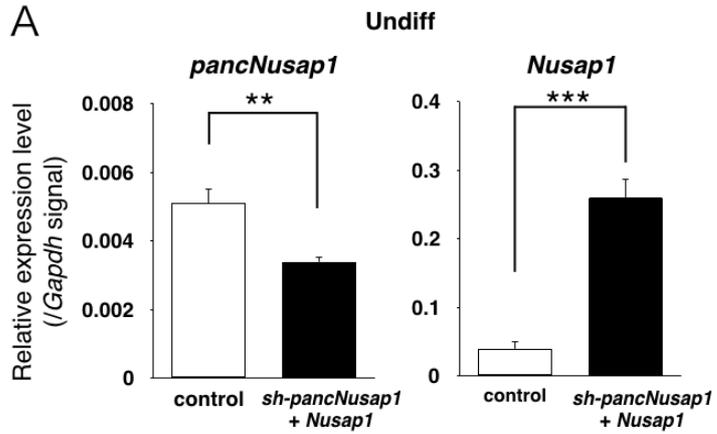


Fig.2-7. *Nusap1*過剰発現による *pancNusap1*ノックダウンのレスキュー

(A) *pancNusap1*ノックダウンと *Nusap1*過剰発現を同時に行うレスキューベクターをUndiff細胞へ遺伝子導入後の *Nusap1*と *pancNusap1*の発現状態。(B) Undiff細胞へのレスキューベクター導入が細胞増殖マーカー陽性細胞の割合に与える影響。(C) 可逆分化過程におけるレスキューベクター導入が増殖培地での培養後の細胞増殖に与える影響。レスキューベクターは分化4日目に導入された。

## 考察

本章では、*pancNusap1* の発現低下により *Nusap1* プロモーターのヒストン脱アセチル化が引き起こされ、そのような *Nusap1* のエピジェネティックな抑制による細胞増殖の不可逆的抑制が、PC12 細胞の cAMP 依存性不可逆分化において必須であることが明らかになった。

### PC12 細胞の cAMP 依存性不可逆分化に必須な *Nusap1* の発現抑制

*Nusap1* タンパク質は C 末端に微小管への結合能をもつドメインと N 末端に DNA 結合能をもつ SAP ドメインを有している。metaphase や anaphase においては、*Nusap1* がこの 2 つのドメインを介して微小管と染色体をつなぎ、安定化させており、このことは M 期の進行促進において必須である (Raemaekers et al., 2003; Ribbeck et al., 2007)。*Nusap1* は増殖が盛んな組織で高発現しており、その発現パターンやタンパク質構造は哺乳類全体でよく保存されている。培養細胞において、*Nusap1* のノックダウンは anaphase の進行を阻害し、細胞質分裂ができないために細胞増殖ができなくなる (Vanden Bosch et al., 2010)。さらに *Nusap1* をノックアウトしたマウス胚は細胞分裂不全により胎生致死となることから

(Vanden Bosch et al., 2010)、*Nusap1* は哺乳類の細胞周期制御に必須の分子であると考えられる。他の細胞周期制御因子と同様、*Nusap1* タンパク質はユビキチン経路による量的制御をうけており、増殖細胞では anaphase 促進タンパク質複合体である multisubunit E3 ubiquitin ligase によって分解される (Li et al., 2007)。しかし、終末分化細胞などの細胞周期が停止している細胞において *Nusap1* がどのように転写制御されているのかは知られていなかった。この章において、*pancNusap1* が転写抑制されることによる、ヒストン脱アセチル化を通じた *Nusap1* の転写抑制が、最終分化 PC12 細胞が有する不可逆的な細胞増殖抑制という表現型の発現に必須であることを示すことができたことにより、*Nusap1* のエピジェネティックな転写制御機構が重要な機能を果たしていることが明らかになった。PC12 細

胞においては、cAMP シグナルが *Nusap1* 発現制御の大事なトリガーとなっていたが、*Nusap1* はさまざまな細胞で発現していることから、他の多面的な転写因子による制御も受けていることが容易に想像される。そのため、本研究における *pancNusap1* の発見は、単なる転写制御因子の同定に留まらない、*Nusap1* 発現制御の普遍性と多様性にアプローチする上で重要な分子マーカーとしての役割も期待できる。

### 配列特異的エピジェネティック制御因子として翻訳非依存的に働く mRNA

*pancNusap1* はマウス *Oip5* 遺伝子の ORF を含む領域と相同な領域を含んでいたが、翻訳開始点 (TIS) 近傍の配列を除去し、ORF を持たない *pancNusap1*  $\Delta$  TIS を過剰発現させた実験より、*pancNusap1* は配列特異的なエピジェネティック制御を行う lncRNA として機能していることが明らかになった (Fig.2-5、2-6)。一方、これらの結果からは、*pancNusap1* がタンパク質に翻訳される mRNA として別の機能をもっている可能性は否定できない。しかし、マウスやヒトで遺伝子として登録されている *Oip5* は活発に増殖している細胞で発現が高いことは分かっているが、実際の生体内での機能についてはよくわかっていない

(Nakamura et al., 2007)。また、ラットゲノムにおける *pancNusap1* と *Nusap1* の関係同様、マウスやヒトのゲノムにおいて *Oip5* は *Nusap1* と head-to-head の関係で両方向性プロモーターを形成し、さらに、組織間でも *Oip5* と *Nusap1* の発現状態は非常に高い相関を示すことが報告されている (Okamura et al., 2015)。このことは、マウスやヒトにおいて *Oip5* はタンパク質に翻訳される mRNA として働く他、ラットの *pancNusap1* と同様に、翻訳されずにエピジェネティック制御因子として働く RNA としても機能している可能性を示唆している。*Oip5* と同様に、翻訳されずにエピジェネティック制御因子として機能する mRNA が想像以上に存在する可能性も考えられる。そのため、今後は、明確な ORF をもたない lncRNA だけでなく、mRNA として同定されているものが、翻訳非依存的な役割をもち、配

列特異的エピジェネティック制御を行う機能性 RNA として働いているのかを解析していくことが必要になると考えられる。

### ***pancNusap1* による *Nusap1* の転写活性化機構**

*pancRNA* による遺伝子活性化機構については未だわかっていないことも多いが、近年、2つのチームから、*pancRNA* の遺伝子活性化機構に関する論文が相次いで発表された (Boque-Sastre et al., 2015; Postepska-Igielska et al., 2015)。そのうち一報は、*pancRNA* が遺伝子プロモーター上で R-loop と呼ばれる相補的な DNA と RNA が二本鎖を形成し、余った一本鎖 DNA がループ状になった構造を形成し、余った一本鎖 DNA に転写因子が結合することで遺伝子が活性化されるというモデルを提唱している (Boque-Sastre et al., 2015)。もう一報は *pancRNA* とヒストンアセチル基転移酵素である Cbp/p300 複合体が相互作用し、残った配列と遺伝子プロモーター上のワトソンクリック型塩基対を形成する二本鎖 DNA の間にフーグスティーン型塩基対と呼ばれる特殊な塩基同士の水素結合が起きることで DNA:DNA:RNA 三本鎖構造を形成し、Cbp/p300 をプロモーター領域に誘致することで遺伝子が活性化されるというモデルを提唱している (Postepska-Igielska et al., 2015)。G を多く含む RNA と C を多く含む DNA が相補的に結合した二本鎖構造は熱力学的に安定であるため、R-loop は C を多く含む DNA が RNA の鋳型となって転写された場合に形成されやすい (Ratmeyer et al., 1994; Roberts and Crothers, 1992)。一方、片方の鎖がプリン塩基である G と A が連続したゲノム領域であれば、RNA は G と A が連続するか、C とウラシル (U) が連続していれば DNA:DNA:RNA 三本鎖構造は形成できる。実際、*pancNusap1* の転写開始点付近は G を多く含む RNA 配列であることから (Fig.1-10B)、*pancNusap1* はどちらの構造もとりうる可能性がある。*pancNusap1* による *Nusap1* の転写活性化の特徴として、遺伝子に対してアンチセンスの関係にある *pancRNA* のみが遺伝子活性化能をもち、一

方で、センス方向の RNA を発現させても遺伝子活性化能がみられないという転写方向依存性があることを考慮にいれると、*Nusap1* プロモーター上では G を多く含む *pancNusap1* と C を多く含む DNA による R-loop が形成されており、残りの配列が Cbp/p300 と相互作用することで *Nusap1* プロモーターにヒストンアセチル化を誘導している可能性が考えられる。今後は、詳細な分子機構の解明のため、構造生物学の見地も取り入れた研究が必須になってくると考えている。

本章で得られた結果から、PC12 不可逆分化過程では、*pancRNA* が不可逆分化に必須な、分化細胞特異的なエピゲノム形成に関わる配列特異的エピジェネティック制御因子として確かに働いていることが明らかになった。

## 総括

第一章では、cAMP 依存的に不可逆分化する PC12 細胞分化系を用いて、cAMP シグナルへの感受性の高いゲノム構造を有する数千の両方向プロモーターの 80%以上が、pancRNA と mRNA を生み出す pBiP であることを明らかにした。第二章では、第一章で発見した pancRNA である *pancNusap1* を代表例として解析し、cAMP 依存性転写因子による *pancNusap1* の直接的な発現抑制が、*Nusap1* プロモーターのヒストン脱アセチル化を引き起こし、それにより *Nusap1* が不可逆的に転写抑制された結果、PC12 細胞は細胞周期を停止し、最終分化を迎えることが明らかになった。第一章と第二章から得られた知見を考え合わせることで、cAMP シグナル活性化によってひとたび促された遺伝子発現パターン変化が、pancRNA による配列特異的エピジェネティック制御機構を介して固定化されるさまが浮かび上がってきた。即ち、数多存在する lncRNA の各々が、エピジェネティックな遺伝子活性化に機能することでエピゲノム形成を行っており、このことが短期的な細胞外環境変化を細胞内に記憶させるのに必須であることが、本研究から明らかになった。

### あらゆる細胞で普遍的な遺伝子発現制御因子として働く機能性 RNA

本研究では RNA-seq を用いたゲノムワイド解析と機能解析を組み合わせることで pancRNA を介した配列特異的なエピジェネティック制御機構が最終分化細胞の不可逆分化に必須な分化細胞特異的なエピゲノム形成に関わっていることが明らかになった。これまでに、pancRNA はマウスの受精後におきる大規模な胚性遺伝子活性化過程においても千以上の遺伝子プロモーターから発現しており (Hamazaki et al., 2015)、哺乳類の ES 細胞や脳、肝臓、心臓などからも数千の単位で発現していることが報告されてきた (Core et al., 2008; Seila et al., 2008; Uesaka et al., 2014)。したがって、本研究結果を考え合わせると、受精卵から最終分化した細胞に至るあらゆる細胞で、pancRNA と mRNA の発現状態は正の相

関を示していることとなり、pancRNA による遺伝子活性化機構は哺乳類のあらゆる組織において働き得る普遍的な遺伝子の転写活性化機構であることが示唆される。加えて、本研究では、ORF をもつ mRNA であっても、翻訳非依存的に遺伝子発現制御を行う機能性 RNA として働く可能性があることを示した。このことは細胞内で翻訳されずに機能しうる RNA が想像以上に多岐に渡って存在している意味している。また、micro RNA などの 30 bp 以下の短鎖ノンコーディング RNA による遺伝子発現抑制機構も同様にさまざまな組織で確認されている。このことから、機能性 RNA による正や負の遺伝子発現制御が組み合わさった巧妙なシステムが、生物のあらゆる組織において細胞運命を決定づける重要な役割を担っていると考えられる。

### 細胞状態特異的エピゲノムを形成することの生物学的意義

細胞ごとのエピジェネティック修飾を網羅的に見ることを可能にする大規模解析技術の革新的発展により、それぞれの細胞に細胞状態特異的なエピゲノムが存在することは今や揺るがない事実として認められている (ENCODE Project Consortium, 2012)。細胞状態特異的なエピゲノムが生体内で存在する生物学的な意義については、エピジェネティック修飾が転写制御に与える効果や、細胞ごとのエピゲノムプロファイルの傾向などからさまざまに推測されている。例えば、プロモーター領域の H3K4me3 と HeK27me3 のシグナルレベルは細胞内での遺伝子発現状態とそれぞれ正と負に相関しているが、遺伝子活性化に先んじて両方のシグナルが高い場合、このとき一時的に転写が止まっているが後に活性化されうる遺伝子を示していることが多く、細胞がもつ分化能を規定している可能性が示唆されている

(Marks et al., 2012; Mikkelsen et al., 2007)。また、ショウジョウバエの発生過程では、成体における組織間で発現変化している遺伝子とヒストン修飾の間には相関が見られるが、発生過程で一時的に発現制御されるような遺伝子にはヒストン修飾の変化がみられないこと

が報告されている (Pérez-Lluch et al., 2015)。同様の傾向はヒトにおいても観察されており、エピジェネティック制御は、一時的な遺伝子発現制御機構ではなく、安定的な遺伝子発現制御が求められる場合に駆動する遺伝子発現制御機構として働いていることが示唆されている。最終分化細胞である神経細胞における細胞増殖能の抑制は、安定的な遺伝子発現制御が求められる好例として挙げられる。脳内の神経が異常な細胞分裂を起こした場合、神経細胞死が誘導されることが知られており、パーキンソン病や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 及びパーキンソン病などの神経変性疾患患者の脳において、神経の異常な細胞分裂シグナルがみられる (Busser et al., 1998; Ranganathan and Bowser, 2010; Smith et al., 2003)。また、多核化した細胞は老化した神経細胞でよくみられる特徴であり、成体の最終分化細胞における正常な細胞周期の抑制の重要性を示している (Johmura et al., 2014; Takahashi et al., 2006)。しかし、実際に最終分化細胞における細胞周期の抑制に、エピゲノム制御が関わっているかどうかは明らかになっていなかった。本研究では、PC12 細胞を用いて、分化シグナル下流で駆動するエピゲノム制御機構によって、最終分化細胞における細胞増殖能の不可逆的抑制が達成できることを初めて明らかにした。このことから、細胞状態特異的エピゲノムは、分化の副産物として存在しているのではなく、状況に応じた細胞機能を保証するために形成され、そして機能する、という生物学的な意義の一つを確かに明らかにできたと考えている。

### 細胞状態特異的エピゲノム形成における多点的なエピジェネティック制御の必要性

驚くべきことに、第二章での検証の結果、*pancNusap1* の発現低下にともなう、*Nusap1* のエピジェネティックな抑制のみで、PC12 細胞でみられる不可逆的な細胞増殖停止現象の大部分を説明しうることが明らかになった。しかし、PC12 細胞の不可逆分化過程においては、細胞増殖能の消失以外にも神経突起や細胞体の肥大などの表現型がみられており、これ

らは *pancNusap1* の発現制御だけでは説明できていない。実際に、細胞状態特異的なエピゲノム形成において多点的なエピジェネティック制御が非常に重要である事は、幹細胞と同じ分化全能性をもたせた iPS 細胞の解析から明らかにされてきた。例えば、哺乳類表皮細胞に幹細胞で発現している 4 つの転写因子を導入することでリプログラミングされた iPS 細胞には、元の体細胞特異的な DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック修飾が消えずに残されているため、元の細胞である表皮細胞への分化経路を辿りやすい (Kim et al., 2010a)。第一章において、cAMP シグナルがいくつもの pBiP を直接的に転写制御していることを示したことにより、細胞状態特異的な遺伝子発現パターン転換とエピゲノム形成は、幾つもの領域での同時多発的な遺伝子発現制御機構の結果、生じていると考えられる。今後は、cAMP 依存性転写因子結合領域のエピジェネティック修飾パターンの傾向分析などから、cAMP シグナル下流で配列特異的なエピジェネティック制御因子である *pancRNA* を発現する遺伝子座がどのように選択され、発現制御されているのかを調べることで、多点的なエピジェネティック制御を介した、より精密な細胞状態特異的なエピゲノム形成を促すことができるのではないかと考えられる。

### 分化過程で *pancRNA* 転写制御機構を駆動させることの有利点

細胞は細胞外環境の影響による分化する一方で、多細胞生物では、同一環境下に複数の異なる性質をもった分化細胞が混在して存在している。そのため、細胞外環境からの影響に対する反応の閾値を細胞ごとに決定し、細胞外環境の影響下で分化状態を安定させるための機構が必須であると考えられる。つまり、細胞分化過程では大きく分けて、一時的な分化シグナルによって分化細胞特異的な遺伝子発現パターン転換を引き起こす機構と、分化細胞特異的な遺伝子発現パターン転換を維持する機構の 2 つの仕組みが協調的に働く必要があると考えられる。cAMP は、一時的な遺伝子発現パターン転換を促す分化シグナルの好例として挙

げられる。cAMP シグナル経路の活性化は哺乳類の発生において内皮細胞や神経細胞への分化の起点となるが、cAMP シグナル経路にはネガティブフィードバック機構が働いており、細胞内での cAMP シグナル経路の活性化は通常数時間しか持続しない (Mayr and Montminy, 2001)。具体的な cAMP シグナル経路で働くネガティブフィードバック機構としては、細胞質内で合成された cAMP が cyclic nucleotide phosphodiesterase によって加水分解されることや (Essayan, 2001)、Pka によってリン酸化された Creb1 が *Icer* の転写を活性化すること (Borlikova and Endo, 2009; Chang et al., 2006)、さらに Creb1 のリン酸化自体も数時間でセリン/スレオニン脱リン酸化酵素である Pp1 や Pp2a によって脱リン酸化されることなどが挙げられる (Hagiwara et al., 1992)。また、細胞質内の cAMP 濃度を高く維持し続けても、cAMP シグナルの活性化に必要な細胞質内の Pka の量が限られているため、新規 Pka タンパク合成過程が律速となり cAMP シグナル経路の活性化状態は低いレベルで安定する (Mayr and Montminy, 2001)。そのため、cAMP シグナルによってもたらされた遺伝子の発現パターンの変化を維持する機構は cAMP シグナル経路下流の転写制御と連動して働く必要がある。本研究では、cAMP シグナルによって選択的に転写制御されている pBiP において、cAMP が促した遺伝子発現パターンの変化が、同時的に cAMP が促した pancRNA 発現パターンの変化によるエピジェネティック変化を介して、固定されていることが明らかにしている。これは、cAMP シグナル経路下流の遺伝子への転写制御が、pBiP を選択的な対象とすることで、直接的に、遺伝子発現パターンの変化を維持する機構を駆動させていることを示しており、細胞分化過程における 2 つのステップを同時的に実行しているとかんがえられる (Fig.G2-1)。このように、細胞分化に必要な分化細胞特異的な遺伝子発現パターン転換と、その固定化が同時に可能であることは、特に cAMP シグナルのように、持続性のない分化シグナルによって細胞を安定的に分化させる際には、非常に有利に働くと思われる。

本研究によって、哺乳類細胞の最終分化過程において、分化シグナルによって駆動される lncRNA による配列特異的エピジェネティック制御機構が、細胞機能を保証する細胞状態特異的エピゲノムの形成に貢献していることが明らかになった。

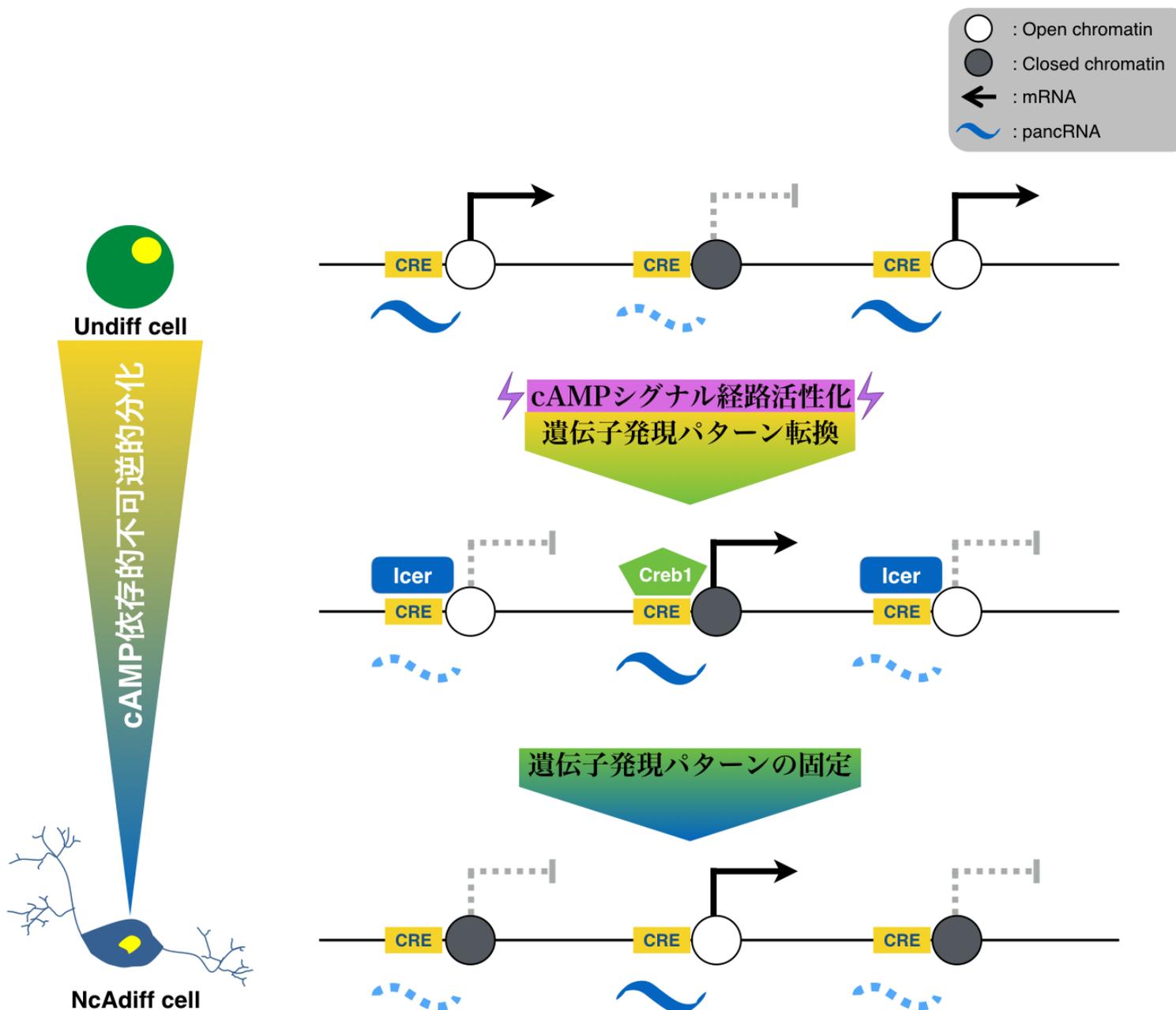


Fig.G2-1. PC12のcAMP依存的不可逆分化過程での遺伝子発現パターン転換とその固定化

PC12細胞の不可逆的の分化過程における2つのステップ。cAMP依存的の転写因子が両方向性プロモーターに結合し、遺伝子発現パターンを変化させる。同時にpancRNAの発現パターンも変化する。その後、pancRNAによる配列特異的のエピジェネティック制御を介して遺伝子発現パターンが固定される。

## 材料と方法

### PC12 細胞の培養と分化

未分化 PC12 細胞は増殖培地 (sodium pyruvate containing high-glucose DMEM (WAKO) 中に 10% house serum (HS, SAFC Biocsciences)、5% fetal bovine serum (FBS, Biowest)、100 units/ml penicillin (PhytoTechnology Laboratories)、100 µg/ml streptomycin (MP Biomedicals) を加えた培地) を使用して、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。PC12 細胞への分化誘導は、100 ng/ml NGF 2.5S (Millipore) もしくは 50 ng/ml NGF 2.5S と 200 µM dibutyryl cAMP (SIGMA) を加えた分化培地 (sodium pyruvate containing high-glucose DMEM (WAKO) 中に 1% house serum、0.5% fetal bovine serum、100 units/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を加えた培地) を使用し、コラーゲンコート (Nitta Gelatin) したディッシュ上に 8,000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で培養した。7 日間の分化誘導中、培地は 3 日目と 5 日目に交換した。ドキシサイクリンによる pancRNA の強制発現やノックダウン実験では 2 ng/ml doxycyclin (Nacalai Tesque) 存在下で細胞を培養した。

### 免疫細胞化学染色

PC12 細胞の免疫染色は以下の手順で行われた。

4% PFA を含んだ PBS 中に室温で 20 分間静置して固定した細胞を PBS で 2 回洗浄し、透過処理とブロッキング処理のために blocking buffer (0.1% Triton X-10, 3% FBS in PBS) 中に室温で 30 分静置した後、500 倍希釈した一次抗体を含む blocking buffer 中に室温で 2 時間静置した後、PBS で 3 回洗浄し、500 倍希釈した二次抗体と Hoechst33258 (Nacalai Tesque) を含む PBS 中に遮光し 4°C で 1 時間静置した後、PBS で 3 回以上洗浄し、Leica AF6000 蛍光顕微鏡により撮影した。一次抗体として chicken anti-GFP (AVES Labs)、mouse anti-Ki67 (BD Biosciences)、rabbit anti-active Caspase 3 (R&D Systems) を使

用した。二次抗体として CF647-conjugated anti-mouse IgG (Biotium)、CF647-conjugated anti-rabbit IgG

124 (Biotium)、FITC-conjugated anti-chick IgY (Biotium) を使用した。EdU アッセイは 10  $\mu$ M EdU (Life Technologies) 存在下で 4 時間細胞を培養した後、同様に細胞固定、ブロッキング、透過処理を行った後、Click-iT reaction buffer (Life Technologies) 中に遮光し室温で 30 分静置した後、PBS で二回 wash した後、遮光条件下で一次抗体、二次抗体反応を行った。

### RT-qPCR

RNA の定量のため、TRIzol (Life Technologies) により抽出した total RNA は DNase I で処理した後、oligo dT primer と SuperScriptIII First-Strand Synthesis System (Life Technologies) を用いて逆転写処理した。合成された cDNA は KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems) を用いて qPCR に使用した。使用したプライマーは Table.1-3 に記載した。

### ChIP-qPCR

1% formaldehyde 存在下の培地中で 5 分間ゆっくりと浸透させながら室温で固定された細胞を回収し、冷 PBS で二回洗浄後、冷やした resuspension solution (10% NaN<sub>3</sub>, 2% FBS in PBS) に懸濁し、細胞数を数えた後、2,000 g、4°C で 5 分間遠心し、100  $\mu$ l 当たり  $1 \times 10^6$  個の細胞が含まれるように lysis buffer (1% SDS、50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、10 mM EDTA [pH 8.0]、1% protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque)) に懸濁し、氷上で 10 分間静置した後、平均のサイズが 500bp 程度になるように密閉型超音波破碎装置 Picorupter (Diagenode) でクロマチンを切断した。切断されたクロマチン断片を含む上清を 13,000 g、

4°C で遠心後回収し、ChIP dilution buffer (1.1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、167 mM NaCl、0.11% sodium deoxycholate、1% protease inhibitor cocktail) にて 10 倍希釈し、-20°C で保存した。各種ヒストン修飾への抗体反応は  $5 \times 10^4$  個の細胞と 1  $\mu$ l の各種ヒストン修飾抗体 (anti-mouse-H3K4me3、anti-mouse-H3K9me3、anti-mouse-H3K27me、anti-mouse-H3K27ac、anti-mouse-H3K9ac (Cosmo Bio) ) と mouse-IgG (Santa Cruz) を用い、リン酸化 Creb1 と Icer への抗体反応は  $3 \times 10^6$  個の細胞と 4  $\mu$ g のそれぞれに対する抗体(anti-rabbit-pCreb1 (Ser133) (Cell Signaling Technology)、anti-rabbit-Crem (X-12) (Santa Cruz) ) と rabbit-IgG (Santa Cruz) を用いて 4°C で 12 時間以上ゆっくりと攪拌させて行った。それぞれの抗体-クロマチン複合体を含む溶液に 10  $\mu$ l の M-280 sheep anti-mouse IgG (Life Technologies) または 40  $\mu$ l の M-280 sheep anti-rabbit IgG (Life Technologies) を添加し、4°C で 4 時間ゆっくりと攪拌させて磁性ベーズと反応させた後、magnetic stand 上で冷 RIPA buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、1 mM EDTA [pH 8.0]、150 mM NaCl、0.1% sodium deoxycholate) で一度、冷 high-NaCl RIPA buffer (0.1% SDS、1% Triton X-100、50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、1 mM EDTA [pH 8.0]、300 mM NaCl、0.1% sodium deoxycholate) で一度、そして冷 TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]、1 mM EDTA [pH 8.0]) で二回洗浄後、200  $\mu$ l の ChIP elution buffer (0.5% SDS、10 mM Tris-HCl [pH 8.0]、5 mM EDTA [pH 8.0]、300 mM NaCl) を加え、65°C で 4 時間以上静置後、proteinase K を加えて 55°C で 1 時間、RNase A を加えて 37°C で 30 分間処理し、phenol/chloroform 抽出とエタノール沈殿を行って DNA を抽出した。その後の qPCR に使用したプライマーは Table.1-3 に記載した。

## バイサルファイトシーケンシング

バイサルファイト反応には MethylCode Kit (Life Technologies) を用いた。バイサルファイト変換後の DNA は AmpliTaq Gold 360 Master Mix (Life Technologies) もしくは LA Taq (TaKaRa) を用いて PCR 増幅し、pGEM-T easy vector (Promega) にクローニングし、シーケンシングを行い、DNA メチル化状態を解析した。PCR 増幅、シーケンシングに使用したプライマーは Table.1-4 に記載した。

## Directional RNA-seq ライブラリ作製

Directional RNA-seq ライブラリは以下の手順で作製された。

Directional RNA-seq ライブラリ作製に使用する RNA は Total RNA Pico Bioanalyzer chip (Agilent) によって RNA Integrity Number (RIN) を計測し、RIN 値が 9.6 以上のものを使用した。Undiff、Ndiff、NcAdiff 細胞試料はそれぞれ 2 つずつバイオリジカルレプリケートを用意し、それぞれの試料から精製した 15 µg の total RNA から Sera-mag Magnetic Oligo (dT) Beads (Thermo Scientific) によって二回することで polyA+ RNA を精製した。それぞれサンプルからとれた polyA+ RNA の rRNA 混入率が 2% 以下であることを Total RNA Pico Bioanalyzer chip を用いて確認した後、fragmentation buffer (Affymetrix) と 94°C で 2 分間断片化処理した後、Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter) によって精製し、5 U TAP (Epicenter) によって脱キャップ処理した後、PCI 抽出とエタノール沈殿により再度精製し、Antarctic phosphatase (NEB) を用いて 3' 端の脱リン酸化処理し、T4 polynucleotide kinase (NEB) によって 5' 端のリン酸化処理を行った後、RNeasy MinElute kit (Qiagen) を用いて精製し、T4 RNA ligase 2 truncated K277Q (NEB) を用いて NEBNext Multiplex 3' SR Adaptor と 4°C で一晩ライゲーションさせ、さらに T4 RNA ligase (Illumina) を用いて NEBNext Multiplex 5' SR Adaptor と 20°C で 1 時間ライゲーション

させた後、アダプター特異的な primer と SuperScriptIII First-Strand Synthesis System によって逆転写させた後、RNase H 処理を行い、余剰の RT プライマーを AMPure XP (Beckman Coulter) によって除いた後、KAPA Hifi HS polymerase (Kapa Biosystems) を用いて PCR 増幅した。PCR ではサンプルに対して NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (NEB) 付属の NEBNext Index 1, 8, 10, 11 primer を用いて 2 つのバイオロジカルレプリケートから 2 つずつのテクニカルレプリケート、計 4 つのレプリケートを作製した。PCR の条件は 98°C30 秒処理した後、98°C15 秒 62°C30 秒 72°C30 秒を 12 サイクル、その後 72°C5 分間とした。PCR 産物は AMPure XP を用いて二度精製され、Illumina HiSeq 2000 の 50-bp single-end sequencing を行った。

### トランスクリプトーム解析

PC12 の RNA-seq データは、まず FASTX tool kit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)) を用いて、信頼性の低い (phred score<20) リードと、リード 3'端の multiplex adapter tag 配列 (AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC) と、長さが 20 nt 以下になったリードを除いた後、random chromosome 配列を除いたラット Rn5 ゲノムに TopHat(v.2.0.8b、オプション: -g 1 --bowtie1) (Kim et al., 2013) を用いてマッピングした。cDNA ライブラリの品質評価には RSeQC を用いた (Wang et al., 2012)。RNA の発現領域の同定には、細胞毎に MACS2 (v.2.0.10b、オプション: --nomodel --broad -g 2.57e9 -p 0.95) を用い (Zhang et al., 2008)、異なる細胞間でコールされた複数のピークがオーバーラップした場合は BEDTools (Quinlan and Hall, 2010) の mergeBed 機能を用いてマージし、一つの大きなピークとし、300 nt 以下の長さのピークは除いた。公共のラット遺伝子データ (Rn5) の TSS が MACS によってコールされたピークとかぶっていた場合、そのピークが複数の遺

伝子にかぶっていた場合を除き、MACS2 ピークの 5'端の位置を adjusted TSS として以後の解析に使用した。また、イントロン領域を含む遺伝子領域と同じ向きでオーバーラップしていない MACS2 ピークを non-annotated transcript と定義した。mRNA と ncRNA の定量にはそれぞれ Ensembl protein-coding gene のそのエキソン領域と non-annotated transcript と定義された MACS2 ピーク領域にマップされたリード数を算出し、R パッケージ TCC を用いて iDEGES/edgeR 法によって正規化と differential expression 解析を行った (Sun et al., 2013)。Gene ontology 解析では DAVID をもちいて biological process に関わる enrichment analysis を行った。

#### 公共のデータを用いた CRE や Creb1 結合領域に関するデータ解析

ラット Rn5 ゲノムに存在する CRE 配列の位置は JASPAR database (Mathelier et al., 2014) に登録されている Creb1 結合配列 (ID=MA0018.2) と R パッケージ ChIPpeakAnno (オプション: min.score="90%") (Zhu et al., 2010) を用いて同定した。Creb1 binding score は 7 日間 in vitro で培養後の胎生 16 日マウス脳皮質由来神経細胞の Creb1 の ChIP-seq データ (Kim et al., 2010b) を Gene Expression Omnibus (acc. no. GSM530185) から取得し、マウス Mm9 ゲノム上の Creb1 結合シグナルデータをラット Rn5 ゲノム上の対応する領域に UCSC LiftOver tool (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/admin/exe>) を用いて変換した。同様に、forskolin 刺激後の 15 分の PC12 細胞のリン酸化 Creb1 ChIP-seq データ (Impey et al., 2004; Lesiak et al., 2013) は、ラット Rn3 のゲノム上のリン酸化 Creb1 結合シグナルデータをラット Rn5 ゲノム上の対応する領域に UCSC LiftOver tool に変換した。

## プラスミド作製

レンチウイルスベクター-pLLX と pLEMPRA は Dr. Z. Zhou と Dr.M. E. Greenberg から御厚意により譲渡していただいた (La Rocca et al., 2009)。

ノックダウン実験には、U6 プロモーターと ubiquitin-C プロモーター下流にそれぞれ shRNA 発現領域と EGFP もつ pLLX は使用した。アニーリング後の shRNA オリゴは pLLX の HpaI サイトと XhoI サイトの間に挿入された。

レスキュー実験には、U6 プロモーターと ubiquitin-C プロモーター下流にそれぞれ shRNA 発現領域と EGFP-IRES-遺伝子発現領域をもつ pLEMPRA を使用した。FLAG タグをつけた rat *Nusap1* は pLEMPRA の EcoRI サイトと AscI サイトの間に挿入された。

ドキシサイクリン依存的な *pancNusap1* の過剰発現やノックダウン実験には、ドキシサイクリン依存的な RNA polymerase II による下流遺伝子の転写誘導が可能であり Neomycin 耐性遺伝子の発現によって薬剤選択が可能なレンチウイルスベクター-pSLIK\_Neo を含む lentivirus-based pSLIK\_Neo vector system (Addgene) を用いた (Shin et al., 2006)。  
ゲノム領域の PCR によって得た *pancNusap1* Δ TIS 配列や sense\_ *pancNusap1* Δ TIS 配列は entry vector pEN\_TmiRc3 (Addgene) の SacII サイトと XbaI サイトの間に挿入された。  
アニーリング後の *sh-pancNusap1* オリゴは entry vector pEN\_TmiRc3 (Addgene) の HpaI サイトと XhoI サイトの間に挿入された。pEN\_TmiRc3 に挿入された配列は LR Clonase Enzyme Mix (Life Technologies) を用いて pSLIK\_Neo に組み替えられた。

コンストラクションに使用した shRNA オリゴやプライマー配列は Table.1-5 に記載した

## レンチウイルスの産生

レンチウイルスを産生のため、10 µg のレンチウイルスプラスミド pLLX、pLEMPRA、pSLIK と、3 µg の第三世代レンチウイルスパッケージングプラスミド pCAG-HIVgp と、3 µg のシュードタイピングプラスミド pCMV-VSV-G-RSV-Rev をプラスミド容量の三倍の PEI-MAX (Cosmo bio) と 500 µl の Opti-MEM (Gibco) を混和し、室温で 20 分静置後、全量を 10cm ディッシュで培養している HEK293T 細胞へのトランスフェクションに使用した。トランスフェクションして 12 時間後に 5ml の培地 (10%FBS in DMEM) に交換した後、ウイルス上清を 48 時間後に回収後、細胞をフィルターで除去し、4°C、6000 g で 12 時間以上遠心して沈殿したウイルスを PBS に溶かし、-80°C で保存した。

## 統計解析

本論文におけるエラーバーは全て S.E.M で示されている。特に記述のない場合、二群間比較には Student's t-test、三群間以上の比較には Tukey's multiple comparison test を用いた。各 Figure におけるサンプル間でのおおまかな統計的有意性をアスタリスクの数によって示した (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ 、N.S.=有意差無し)。

## 表

Table.1-1. 各段階におけるRNA-seqの有効リード数

	Raw reads	Trimmed raw reads	Uniquely mapped read	Percentage of mapped read
Undiff Rep1	90583845	80564104	65526787	81.3349665
Undiff Rep2	12751676	11347248	9403074	82.86655936
Undiff Rep3	76808277	68534984	55742025	81.33368062
Undiff Rep4	24408759	21785031	18106401	83.11395563
Ndiff Rep1	27497172	24565286	19735348	80.70623565
Ndiff Rep2	40683304	36183613	28964596	83.45935352
Ndiff Rep3	57324955	51312303	41166788	80.65942552
Ndiff Rep4	40360052	35988504	28803355	83.32161774
NcAdiff Rep1	40335416	36524334	30142490	80.3383604
NcAdiff Rep2	65059222	58754163	48439699	80.04893265
NcAdiff Rep3	40801965	36960373	30414487	80.22790947
NcAdiff Rep4	60470704	54640413	45043633	80.03487725

Table.1-2. RefSeq遺伝子領域上に遺伝子と同じ方向にマップされたリード数

	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4
Undiff	99.08	99.22	99.08	99.18
Ndiff	99.22	99.22	99.2	99.23
NcAdiff	99.35	99.29	99.42	99.29

Table.1-3. 各種qPCRに用いたプライマーリスト

qPCR <i>Nusap1</i> forward	CGTGTGGCTGTTTTCTGGG
qPCR <i>Nusap1</i> reverse	CATGGATGGTCTTGCGCTTC
qPCR <i>pancNusap1</i> forward	TTCTCCCCTCTCGGGTCTTC
qPCR <i>pancNusap1</i> reverse	AGCAACTCGCGCAATGAAAC
qPCR <i>Nusap1</i> forward (for overexpression)	AGCCTTGAAGCACACCTGA
qPCR <i>Gapdh</i> forward	TCCACCACCCTGTTGCTGTA
qPCR <i>Gapdh</i> reverse	ACCACAGTCCATGCCATCAC
qPCR <i>Crem</i> forward	CTGCTTGGCTGCTTTCTG
qPCR <i>Crem</i> reverse	GTCAGCTCTGATGCGGTTGT
qPCR <i>Icer</i> forward	CCCAACATGGCTGTAAGTGA
qPCR <i>Icer</i> reverse	GCACAGCCACACGATTTCAA
qPCR <i>Creb</i> forward	CTGAGGAGCTTGTACCACCG
qPCR <i>Creb</i> reverse	AATCTGTGGCTGGGCTTGAA
qPCR <i>Kctd6</i> forward	GCGGGGCATAGGGTTGTTTT
qPCR <i>Kctd6</i> reverse	TTAAACTAGGCGAGTGGCGG
qPCR <i>Trappc11</i> forward	GACTCTCCTGGCTCTTTCGG
qPCR <i>Trappc11</i> reverse	GTCACCTGGGAGCACTTTGA
qPCR <i>Argap26</i> forward	GCACCTACTCCCTTCCCCC
qPCR <i>Argap26</i> reverse	GTTCCAGTCTCCCTTGCTCC
qPCR <i>Gata2</i> forward	TAAGCAGCGAAGCAAGGCTC
qPCR <i>Gata2</i> reverse	TAAGGTGGTGGTTGTCGTCT
ChIP-qPCR <i>Gapdh</i> promoter forward	CCCCATCAGTCCTTACCA
ChIP-qPCR <i>Gapdh</i> promoter reverse	GACGCTGTACGGGTTTAGGG
ChIP-qPCR <i>Nusap1</i> promoter forward	GTCCAATGAAGGCACAGCAA
ChIP-qPCR <i>Nusap1</i> promoter reverse	CGCAATGAAACACCGCACAT
RT-PCR <i>pancNusap1</i> forward	TTCTCCCCTCTCGGGTCTTC
RT-PCR <i>pancNusap1</i> reverse	ACACTTGTGGCAGAAGCAGA

Table.1-4. バイサルファイトシーケンスに用いたプライマーリスト

Name	sequence	position from TSS
bisulfite <i>Nusap1</i> forward 1	GtTGTAITTTGAAGGAGTtAGtT	# -148 to -125
bisulfite <i>Nusap1</i> reverse 1	aCCACTACAaaACTaaaTCTC	# +286 to +266
bisulfite <i>Nusap1</i> forward 1-2	GAAGGtAtAGIAAAAtAGTTGGG	# +165 to +187
bisulfite <i>Nusap1</i> forward 2	GAGTGGGAIAItIAGGTGGTGGGA	# +317 to +339
bisulfite <i>Nusap1</i> reverse 2	aAAATACCTCCCACCAaATTCAT	# +736 to +713
bisulfite <i>Nusap1</i> forward 3	GATGAATtTGGTGGGAGGTAT	# +712 to +733
bisulfite <i>Nusap1</i> reverse 3	ACAaaCCACTCCTTCCTaaTCC	# +1321 to +1299
bisulfite <i>Nusap1</i> forward 4	GGTAGGGGTTGAGATAGGtT	# +1488 to +1508
bisulfite <i>Nusap1</i> reverse 4	CAaAaACCCTCTaCCTCCCT	# +1988 to +1968
CL-PCR M13F	GTAAAAACGACGGCCAG	-
CL-PCR M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	-
Sequence Sp6	CATAC GATTT AGGTG ACACT ATAG	-
Sequence T7	TAATACGACTCACTATAGGG	-

Table.1-5. プラスミド作製に用いたshRNAオリゴとプライマーリスト

<i>sh-pancNusap1</i> top	tGCCTGTTTCTATTGAAGTTGTtcaagagaACAACCTCAATAGAAACAGGCtttttggAAC
<i>sh-pancNusap1</i> bottom	tvGagttccaaaaaaGCCTGTTTCTATTGAAGTTGTtctcttgaAACAACCTCAATAGAAACAGGCa
<i>sh-pancNusap1-2</i> top	tGCTTCAAACACAGAACCTAGCtcaagagaGCTAGGTTCTGTGTTTGAAGCtttttggAAC
<i>sh-pancNusap1-2</i> bottom	tcgagttccaaaaaaGCTTCAAACACAGAACCTAGCtctcttgaAGCTAGGTTCTGTGTTTGAAGCa
<i>sh-Creb1</i> top	tGCCTGCAGACATTAACCATGAtcaagagaTCATGGTTAATGTCTGCAGGCtttttggAAC
<i>sh-Creb1</i> bottom	tvGagttccaaaaaaGCCTGCAGACATTAACCATGAtctcttgaATCATGGTTAATGTCTGCAGGCa
<i>sh-Icer</i> top	tCCAACATGGCTGTAACCTGGAtcaagagaTCCAGTTACAGCCATGTTGGtttttggAAC
<i>sh-Icer</i> bottom	tvGagttccaaaaaaCCAACATGGCTGTAACCTGGAtctcttgaATCCAGTTACAGCCATGTTGGa
<i>Nusap1_OE_F+MscI+flag</i>	tggccacaaccatggactacaaggacgatgacgataaacccgggaattccATGACCGTCCCCTCTGC
<i>Nusap1_OE_R+BlpI</i>	gctcagcCACACTGAGCTTCTGCCTCA
<i>pancNusap1ΔTIS-F+SacII</i>	gac ccgCGG GACTCTCAGGTGGTGAAGG
<i>pancNusap1ΔTIS-R+XbaI</i>	gac tctaga AATAAA ATCCAGCATGGTGAAGGCAA
<i>pancNusap1ΔTIS-F+XbaI</i>	gac tctaga AATAAA GACTCTCAGGTGGTGAAGG
<i>pancNusap1ΔTIS-R+SacII</i>	gac ccgCGG ATCCAGCATGGTGAAGGCAA

## 謝辞

女手ひとつながら、他の兄妹と共に私を力強く育て、いつも夢を応援してくれる母に感謝します。あなたが創るバイタリティーと明るさに満ちた空間は今までに幾度と無く私を救い、そして今も私の夢をしっかりと支えてくれています。ありがとうございます。

今村拓也先生

今村先生には学部4年生の頃より御指導いただき、研究者としての基礎を叩き込んで下さいました。最後まで学生である私と対等の立場で接していただき、どんな時もディスカッションを申し出ればすぐにじっくりと話を聞いていただけた環境は研究者を目指す僕にとってかけがえのない非常に恵まれたものでした。また、遠隔地から論文をまとめることができたのは、いつでも何度でも論文指導を根気強くしていただいた先生のお陰です。今村先生の御指導の元、学ばせて頂いたことは私の研究生活のみならず人間性の土台となっています。ここに感謝申し上げます。

中島欽一先生

博士課程二年から指導委託という形で研究室にやってきた初日に、中島先生が私に自分の生徒だと言って下さったのは今でも覚えています。中島先生の元で学んだ技術や知識がどれほど有益だったのは、論文のほぼ全てのデータが九州大学で出たものだという事実が明確に示しています。九州大学での日々は、ラボメンバーとの親密な関係から作られた空間のもと、自分が日々成長していくことを感じとれた、二年間とは思えない非常に濃密な時間でした。ここに感謝申し上げます。

## 阿形清和先生

学部三年生の時に、阿形先生の研究室に飛び込みで伺い、海外の研究室を訪問してみたいので紹介して欲しいという無茶な願いを快く受け入れてくださった時から、私の研究人生は始まりました。生物の観察から生まれた疑問を追求するのが生物学だという阿形先生の考え方は、私が研究に悩んだ時に立ち戻る原点となっています。京都大学での阿形先生の厳しくも包容力のある御指導の元、先生の人柄に惹かれて集まった魅力的な同期の学生達と切磋琢磨できたことは、私の大きな財産となっています。ここに感謝申し上げます。

## 引用文献

- Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2011) . The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaks. *FEBS Lett.* *585*, 2914–2919.
- Boque-Sastre, R., Soler, M., Oliveira-Mateos, C., Portela, A., Moutinho, C., Sayols, S., Villanueva, A., Esteller, M., and Guil, S. (2015) . Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *112*, 5785–5790.
- Borlikova, G., and Endo, S. (2009) . Inducible cAMP Early Repressor (ICER) and Brain Functions. *Mol. Neurobiol.* *40*, 73–86.
- Borsani, G., Tonlorenzi, R., Simmler, M.C., Dandolo, L., Arnaud, D., Capra, V., Grompe, M., Pizzuti, A., Muzny, D., Lawrence, C., et al. (1991) . Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. *Nature* *351*, 325–329.
- Busser, J., Geldmacher, D.S., and Herrup, K. (1998) . Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain. *The Journal of Neuroscience* *18*, 2801–2807.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., et al. (2005) . The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* *309*, 1559–1563.
- Chang, J.H., Vuppalanchi, D., van Niekerk, E., Trepel, J.B., Schanen, N.C., and Twiss, J.L. (2006) . PC12 cells regulate inducible cyclic AMP (cAMP) element repressor expression to differentially control cAMP response element-dependent transcription in response to nerve growth factor and cAMP. *J. Neurochem.* *99*, 1517–1530.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W., and Helling, R.B. (1973) . Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *70*, 3240–3244.
- Comb, M., and Goodman, H.M. (1990) . CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.* *18*, 3975–3982.

- Cooper, D.M., Mons, N., and Karpen, J.W. (1995) . Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* 374, 421–424.
- Core, L.J., Waterfall, J.J., and Lis, J.T. (2008) . Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322, 1845–1848.
- Djebali, S., Davis, C.A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., et al. (2012) . Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108.
- Dobashi, Y., Shoji, M., Kitagawa, M., Noguchi, T., and Kameya, T. (2000) . Simultaneous suppression of cdc2 and cdk2 activities induces neuronal differentiation of PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 12572–12580.
- ENCODE Project Consortium (2012) . An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489, 57–74.
- Essayan, D.M. (2001) . Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108, 671–680.
- Fink, J.S., Verhave, M., Kasper, S., Tsukada, T., Mandel, G., and Goodman, R.H. (1988) . The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 85, 6662–6666.
- Galderisi, U., Jori, F.P., and Giordano, A. (2003) . Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene* 22, 5208–5219.
- Ginno, P.A., Lim, Y.W., Lott, P.L., Korf, I., and Chédin, F. (2013) . GC skew at the 5′ and 3′ ends of human genes links R-loop formation to epigenetic regulation and transcription termination. *Genome Res.* 23, 1590–1600.
- Gonzalez, G.A., and Montminy, M.R. (1989) . Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* 59, 675–680.
- Greene, L.A., and Tischler, A.S. (1976) . Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 73, 2424–2428.

- Gregoretta, I.V., Lee, Y.-M., and Goodson, H.V. (2004) . Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J. Mol. Biol.* *338*, 17–31.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007) . A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* *130*, 77–88.
- Gupta, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Horlings, H.M., Wong, D.J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J.L., et al. (2010) . Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* *464*, 1071–1076.
- Gurdon, J.B. (1960) . The developmental capacity of nuclei taken from differentiating endoderm cells of *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol* *8*, 505–526.
- Gurdon, J.B. (1962) . The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* *10*, 622–640.
- Hagiwara, M., Alberts, A., Brindle, P., Meinkoth, J., Feramisco, J., Deng, T., Karin, M., Shenolikar, S., and Montminy, M. (1992) . Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* *70*, 105–113.
- Hagiwara, M., Brindle, P., Harootunian, A., Armstrong, R., Rivier, J., Vale, W., Tsien, R., and Montminy, M.R. (1993) . Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4852–4859.
- Hamazaki, N., Uesaka, M., Nakashima, K., Agata, K., and Imamura, T. (2015) . Gene activation-associated long noncoding RNAs function in mouse preimplantation development. *Development* *142*, 910–920.
- Hayes, T.E., Valtz, N.L., and McKay, R.D. (1991) . Downregulation of CDC2 upon terminal differentiation of neurons. *New Biol.* *3*, 259–269.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., Ding, J., Jia, Y., Chen, Z., Li, L., et al. (2011) . Tet-mediated formation of 5-carboxylecytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* *333*, 1303–1307.

- Heidemann, S.R., Joshi, H.C., Schechter, A., Fletcher, J.R., and Bothwell, M. (1985) . Synergistic effects of cyclic AMP and nerve growth factor on neurite outgrowth and microtubule stability of PC12 cells. *The Journal of Cell Biology* *100*, 916–927.
- Hu, H.Y., He, L., and Khaitovich, P. (2014) . Deep sequencing reveals a novel class of bidirectional promoters associated with neuronal genes. *BMC Genomics* *15*, 457.
- Iguchi-Ariga, S.M., and Schaffner, W. (1989) . CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes & Development* *3*, 612–619.
- Imamura, T., Yamamoto, S., Ohgane, J., Hattori, N., Tanaka, S., and Shiota, K. (2004) . Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *322*, 593–600.
- Impey, S., McCorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S., Boss, J.M., McWeeney, S., Dunn, J.J., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2004) . Defining the CREB regulon: a genome-wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* *119*, 1041–1054.
- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C., and Zhang, Y. (2010) . Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature* *466*, 1129–1133.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011) . Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* *333*, 1300–1303.
- Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001) . Translating the histone code. *Science* *293*, 1074–1080.
- Johmura, Y., Shimada, M., Misaki, T., Naiki-Ito, A., Miyoshi, H., Motoyama, N., Ohtani, N., Hara, E., Nakamura, M., Morita, A., et al. (2014) . Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Molecular Cell* *55*, 73–84.
- Keshet, I., Yisraeli, J., and Cedar, H. (1985) . Effect of regional DNA methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *82*, 2560–2564.

- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S.L. (2013) . TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* *14*, R36.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010a) . Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* *467*, 285–290.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al. (2010b) . Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* *465*, 182–187.
- Kornberg, R.D. (1974) . Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* *184*, 868–871.
- Kornberg, R.D., and Thonmas, J.O. (1974) . Chromatin Structure: Oligomers of the Histones. *Science* *184*, 865–868.
- La Rocca, R., Fulciniti, M., Lakshmikanth, T., Mesuraca, M., Ali, T.H., Mazzei, V., Amodio, N., Catalano, L., Rotoli, B., Ouerfelli, O., et al. (2009) . Early hematopoietic zinc finger protein prevents tumor cell recognition by natural killer cells. *J. Immunol.* *182*, 4529–4537.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001) . Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* *410*, 116–120.
- Lam, B.Y.H., Zhang, W., Ng, D.C.-H., Maruthappu, M., Roderick, H.L., and Chawla, S. (2010) . CREB-dependent Nur77 induction following depolarization in PC12 cells and neurons is modulated by MEF2 transcription factors. *J. Neurochem.* *112*, 1065–1073.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. (1993) . A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* *72*, 73–84.
- Lee, E.Y., Hu, N., Yuan, S.S., Cox, L.A., Bradley, A., Lee, W.H., and Herrup, K. (1994) . Dual roles of the retinoblastoma protein in cell cycle regulation and neuron differentiation. *Genes & Development* *8*, 2008–2021.
- Lee, J.T. (2012) . Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* *338*, 1435–1439.

- Lesiak, A., Pelz, C., Ando, H., Zhu, M., Davare, M., Lambert, T.J., Hansen, K.F., Obrietan, K., Appleyard, S.M., Impey, S., et al. (2013) . A genome-wide screen of CREB occupancy identifies the RhoA inhibitors Par6C and Rnd3 as regulators of BDNF-induced synaptogenesis. *PLoS ONE* 8, e64658.
- Li, L., Zhou, Y., Sun, L., Xing, G., Tian, C., Sun, J., Zhang, L., and He, F. (2007) . NuSAP is degraded by APC/C-Cdh1 and its overexpression results in mitotic arrest dependent of its microtubules' affinity. *Cell. Signal.* 19, 2046–2055.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2012) . Loss of Cdk2 and Cdk4 induces a switch from proliferation to differentiation in neural stem cells. *Stem Cells* 30, 1509–1520.
- LYON, M.F. (1961) . Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) . *Nature* 190, 372–373.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, A.F., Smith, A., et al. (2012) . The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149, 590–604.
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A.W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D.J., Buchman, S., Chen, C.-Y., Chou, A., Ienasescu, H., et al. (2014) . JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res.* 42, D142–D147.
- Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977) . A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 74, 560–564.
- Mayr, B., and Montminy, M. (2001) . Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 599–609.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., et al. (2007) . Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560.
- Molina, C.A., Foulkes, N.S., Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1993) . Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75, 875–886.

- Nakamura, Y., Tanaka, F., Nagahara, H., Ieta, K., Haraguchi, N., Mimori, K., Sasaki, A., Inoue, H., Yanaga, K., and Mori, M. (2007) . Opa interacting protein 5 (OIP5) is a novel cancer-testis specific gene in gastric cancer. *Ann. Surg. Oncol.* *14*, 885–892.
- Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999) . Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* *284*, 479–482.
- Nan, X., Campoy, F.J., and Bird, A. (1997) . MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* *88*, 471–481.
- Narazaki, G., Uosaki, H., Teranishi, M., Okita, K., Kim, B., Matsuoka, S., Yamanaka, S., and Yamashita, J.K. (2008) . Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* *118*, 498–506.
- Okamura, Y., Aoki, Y., Obayashi, T., Tadaka, S., Ito, S., Narise, T., and Kinoshita, K. (2015) . COXPRESdb in 2015: coexpression database for animal species by DNA-microarray and RNAseq-based expression data with multiple quality assessment systems. *Nucleic Acids Res.* *43*, D82–D86.
- Okano, H.J., Pfaff, D.W., and Gibbs, R.B. (1993) . RB and Cdc2 expression in brain: correlations with 3H-thymidine incorporation and neurogenesis. *The Journal of Neuroscience* *13*, 2930–2938.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999) . DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* *99*, 247–257.
- Osada, T., Kusakabe, H., Akutsu, H., Yagi, T., and Yanagimachi, R. (2002) . Adult murine neurons: their chromatin and chromosome changes and failure to support embryonic development as revealed by nuclear transfer. *Cytogenet. Genome Res.* *97*, 7–12.
- Pereira, J.D., Sansom, S.N., Smith, J., Dobenecker, M.-W., Tarakhovskiy, A., and Livesey, F.J. (2010) . Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 15957–15962.

Pérez-Lluch, S., Blanco, E., Tilgner, H., Curado, J., Ruiz-Romero, M., Corominas, M., and Guigó, R. (2015) . Absence of canonical marks of active chromatin in developmentally regulated genes. *Nat. Genet.* *47*, 1158–1167.

Piper, D.R., Mujtaba, T., Rao, M.S., and Lucero, M.T. (2000) . Immunocytochemical and physiological characterization of a population of cultured human neural precursors. *J. Neurophysiol.* *84*, 534–548.

Postepska-Igielska, A., Giwojna, A., Gasri-Plotnitsky, L., Schmitt, N., Dold, A., Ginsberg, D., and Grummt, I. (2015) . LncRNA Khps1 Regulates Expression of the Proto-oncogene SPHK1 via Triplex-Mediated Changes in Chromatin Structure. *Molecular Cell* *60*, 626–636.

Quinlan, A.R., and Hall, I.M. (2010) . BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* *26*, 841–842.

Raemaekers, T., Ribbeck, K., Beaudouin, J., Annaert, W., Van Camp, M., Stockmans, I., Smets, N., Bouillon, R., Ellenberg, J., and Carmeliet, G. (2003) . NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *The Journal of Cell Biology* *162*, 1017–1029.

Ranganathan, S., and Bowser, R. (2010) . p53 and Cell Cycle Proteins Participate in Spinal Motor Neuron Cell Death in ALS. *Open Pathol J* *4*, 11–22.

Ratmeyer, L., Vinayak, R., Zhong, Y.Y., Zon, G., and Wilson, W.D. (1994) . Sequence specific thermodynamic and structural properties for DNA:RNA duplexes. *Biochemistry* *33*, 5298–5304.

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., et al. (2000) . Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* *406*, 593–599.

Ribbeck, K., Raemaekers, T., Carmeliet, G., and Mattaj, I.W. (2007) . A role for NuSAP in linking microtubules to mitotic chromosomes. *Curr. Biol.* *17*, 230–236.

Robert, M.-F., Morin, S., Beaulieu, N., Gauthier, F., Chute, I.C., Barsalou, A., and MacLeod, A.R. (2003) . DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nature Genetics* *33*, 61–65.

Roberts, R.W., and Crothers, D.M. (1992) . Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science* 258, 1463–1466.

Seila, A.C., Calabrese, J.M., Levine, S.S., Yeo, G.W., Rahl, P.B., Flynn, R.A., Young, R.A., and Sharp, P.A. (2008) . Divergent transcription from active promoters. *Science* 322, 1849–1851.

Shin, K.-J., Wall, E.A., Zavzavadjian, J.R., Santat, L.A., Liu, J., Hwang, J.-I., Rebres, R., Roach, T., Seaman, W., Simon, M.I., et al. (2006) . A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 103, 13759–13764.

Shu, T., Tseng, H.-C., Sapir, T., Stern, P., Zhou, Y., Sanada, K., Fischer, A., Coquelle, F.M., Reiner, O., and Tsai, L.-H. (2006) . Doublecortin-like kinase controls neurogenesis by regulating mitotic spindles and M phase progression. *Neuron* 49, 25–39.

Smith, P.D., Crocker, S.J., Jackson-Lewis, V., Jordan-Sciutto, K.L., Hayley, S., Mount, M.P., O'Hare, M.J., Callaghan, S., Slack, R.S., Przedborski, S., et al. (2003) . Cyclin-dependent kinase 5 is a mediator of dopaminergic neuron loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 100, 13650–13655.

Sun, J., Nishiyama, T., Shimizu, K., and Kadota, K. (2013) . TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics* 14, 219.

Swigut, T., and Wysocka, J. (2007) . H3K27 demethylases, at long last. *Cell* 131, 29–32.

Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S.-I., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., and Hara, E. (2006) . Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biology* 8, 1291–1297.

Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., et al. (2011) . Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.

Tomikawa, J., Shimokawa, H., Uesaka, M., Yamamoto, N., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., and Imamura, T. (2011) . Single-stranded noncoding RNAs mediate local epigenetic

alterations at gene promoters in rat cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 286, 34788–34799.

Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010) . Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329, 689–693.

Uesaka, M., Nishimura, O., Go, Y., Nakashima, K., Agata, K., and Imamura, T. (2014) . Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. *BMC Genomics* 15, 35.

Vanden Bosch, A., Raemaekers, T., Denayer, S., Torrekens, S., Smets, N., Moermans, K., Dewerchin, M., Carmeliet, P., and Carmeliet, G. (2010) . NuSAP is essential for chromatin-induced spindle formation during early embryogenesis. *J. Cell. Sci.* 123, 3244–3255.

Vaudry, D., Stork, P.J.S., Lazarovici, P., and Eiden, L.E. (2002) . Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science* 296, 1648–1649.

Wakayama, T., and Yanagimachi, R. (1999) . Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nature Genetics* 22, 127–128.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998) . Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369–374.

Walker, W.H., Girardet, C., and Habener, J.F. (1996) . Alternative Exon Splicing Controls a Translational Switch from Activator to Repressor Isoforms of Transcription Factor CREB during Spermatogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 271, 20219–21050.

Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., et al. (2011) . A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 472, 120–124.

Wang, L., Wang, S., and Li, W. (2012) . RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28, 2184–2185.

Wutz, A. (2011) . Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nat. Rev. Genet.* 12, 542–553.

- Wyatt, G.R. (1951) . Recognition and estimation of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Biochem. J.* *48*, 581–584.
- Yan, G.Z., and Ziff, E.B. (1995) . NGF regulates the PC12 cell cycle machinery through specific inhibition of the Cdk kinases and induction of cyclin D1. *The Journal of Neuroscience* *15*, 6200–6212.
- Yan, G.Z., and Ziff, E.B. (1997) . Nerve growth factor induces transcription of the p21 WAF1/CIP1 and cyclin D1 genes in PC12 cells by activating the Sp1 transcription factor. *The Journal of Neuroscience* *17*, 6122–6132.
- Zhang, X., Odom, D.T., Koo, S.-H., Conkright, M.D., Canettieri, G., Best, J., Chen, H., Jenner, R., Herbolsheimer, E., Jacobsen, E., et al. (2005) . Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* *102*, 4459–4464.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008) . Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS) . *Genome Biol.* *9*, R137.
- Zhu, L.J., Gazin, C., Lawson, N.D., Pagès, H., Lin, S.M., Lapointe, D.S., and Green, M.R. (2010) . ChIPpeakAnno: a Bioconductor package to annotate ChIP-seq and ChIP-chip data. *BMC Bioinformatics* *11*, 237.