

平成 18 年度修士論文

マウス初期胚における hsp70 遺伝子の発現制御機構の解明

白倉 義之

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

資源生物制御学分野

指導教官 東京大学大学院助教授 青木不学

目次

要旨	3
緒言	5
材料と方法	8
結果	18
考察	22
謝辞	26
参考文献	27
図表	31

[要旨]

本研究は、2細胞期胚において一過的に発現する *hsp70* の発現調節機構を明らかにすることを目的としたものである。受精直後の胚は遺伝子発現を停止した状態にあるが、マウスでは胚ゲノムによる転写が 1 細胞期の後期から始まる事が知られている。そして、2細胞期の前期から後期の間に遺伝子発現パターンが劇的に変化する。*hsp70* はこの転写開始初期に発現し、発現の開始後、2細胞期後期には抑制されることから、受精後の最初の遺伝子発現を調節するメカニズムを研究する際の landmark となっている遺伝子である。体細胞では熱刺激などによるストレスを受け、誘導がかかり発現が上昇する事が知られているが、初期胚では 1 細胞期後期から 2 細胞期前期にかけてはストレスの有無とは関係なく発現している。しかしながら 2 細胞期後期になると発現が無くなり、熱刺激を加えても発現は起こらない。このことは、2細胞期中期、すなわち 2 細胞期 S 期に *hsp70* の発現調節に関して体細胞とは異なる初期胚特異的な変化が起こっていることを示唆しているが、そのメカニズムについては DNA 複製との関連も含めてこれまでほとんど明らかにされていない。近年、クロマチンを構成するヒストンの修飾が遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすことが明らかになってきた。そこで、本研究では、2細胞期胚での *hsp70* の発現調節機構を明らかにする目的で、その発現変化における DNA 複製とヒストン修飾の関与を調べた。

まず、体細胞と 2 細胞期胚における *hsp70* の発現を real-time PCR によって確認した。2細胞期前期の胚では高い発現が見られたが、後期において急激に発現量が低下していた。体細胞では、熱ショックにより著しい発現の上昇が見られたが、2細胞期前期および後期のいずれにおいても、熱ショックによる発

現誘導は見られなかった。また、DNA複製阻害剤である *aphidicolin* によって、2細胞後期でも発現が見られるようになったことから、DNA複製が2細胞期中の *hsp70* の発現抑制に関与していることが明らかになった。

次に転写因子 HSF-1 の細胞内局在を調べた。HSF-1 は *hsp70* の promoter に結合して *hsp70* の発現を上昇させる転写因子である。体細胞では細胞質と核に一様に局在しているが、熱による刺激で細胞質から核内に移行する事が分かっている。初期胚での局在を免疫染色法で調べたところ、2細胞期を通して常に核内に多く局在していることが確認された。この局在は、熱刺激を与える変化しなかった。さらに、DNA複製阻害による変化も見られなかった。したがって、2細胞期胚においては、HSF-1 の核内局在の変化は *hsp70* の転写の上昇や下降に関与していない事が示唆された。

最後に *hsp70* の制御領域におけるヒストン修飾の変化を2細胞期胚で調べた。一般にヒストン修飾の変化は、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) 法により調べられているが、そのためには、 10^6 程度の細胞数が必要である。しかし、マウスの胚は、一匹のマウスからわずか数十個しか得られないので、ChIP 法に必要な数の胚を用意することは現実的ではない。そこで本研究室で確立された手法である Plasmid-microinjection Chromatin Immunoprecipitation (以下 PM-ChIP) 法を実施した。この方法では、初期胚に解析したい配列を持った plasmid DNA をマイクロインジェクションし、核内でクロマチン構造をとった plasmid DNA に対して ChIP 法を行うものである。*hsp70* の制御領域を含んだ plasmid を構築し、これを用いて PM-ChIP を行った結果、2細胞S期を挟んで H3K4 の dimethylation (H3K4me2) レベルが低下することが分かった。さらに、この低下は、*aphidicolin* 処理で抑制されたことから、2細胞期における *hsp70* の発現調節に H3K4me2 が関与していることが示唆された。

緒言

受精直後の胚は遺伝子発現を停止した状態にある。胚ゲノム由来の転写が開始する時期は生物種によって異なるが、マウスでは1細胞期の後期である事が知られている (Aoki et al., 1997)。そして、2細胞期の前期から後期の間に遺伝子発現パターンが劇的に変化する (Flach et al., 1982)。*hsp70*はこの転写開始初期に発現することが明らかにされている数少ない遺伝子の一つであり、発現の開始後、2細胞期後期には抑制されることから、受精後の最初の遺伝子発現を調節するメカニズムを研究する際の landmark となっている遺伝子である (Bensaude, et al., 1983; Conover et al., 1991; Christians et al., 1995)。*hsp70*が初期胚で発現する生理学的意味についてはわかっていない。*hsp70*の初期胚での発現パターンは次のように報告されている。体細胞では熱刺激などによるストレスを受け、誘導がかかり発現が上昇する事が知られているが、初期胚では1細胞期後期から2細胞期前期にかけてはストレスの有無とは関係なく発現している。しかしながら2細胞期後期になると発現が無くなる (Christians et al., 1995)。このことは、2細胞期中期、すなわち2細胞期S期に*hsp70*の発現調節に関して体細胞とは異なる初期胚特異的な変化が起こっていることを示唆しているが、この変化とDNA複製との関連についてはこれまでほとんど明らかにされていない。

*hsp70*を含むheat shock protein遺伝子では、promoter部分に存在するheat shock element (HSE)に結合する転写因子HSF-1が発現の調節に重要な役割を果たしている。体細胞では細胞質に不活性型の単量体で存在している HSF-1が熱刺激により核内に移行し、活性化型の三量体となり*hsp70*の発現を上昇させる事が知られている (Sarge et al., 1993)。ところが初期胚では HSF-1の局在

と熱刺激による関係を調べた報告では 1 細胞期から胚盤胞期前まで熱刺激を問わず核内に局在している事が明らかとなった。つまり 2 細胞期 S 期前後での hsp70 の発現の変化には HSF-1 は関与していないことが示唆される (Christians et al., 1997)。

これまでに、マウス初期胚の 1 細胞期から 2 細胞期にかけて遺伝子の発現調節にクロマチンの構造変化が重要であるという報告がなされている。レポーター遺伝子を 1 細胞期に導入するとエンハンサーの存在がその発現に対して影響することは無いが、2 細胞期後期にはプロモーターに加えエンハンサーもあることで転写が上昇する。この変化は、それまで十分に緩んでいたクロマチンからの遺伝子発現が、抑制的なクロマチンへの構造変化が起こったことで、エンハンサーによる制御を受ける形に変化したためではないかと推論されている (Majumder et al., 1993; Majumder et al., 1997; Rastelli et al., 2001)。そして、このようなエンハンサー依存的な転写調節への変化は、DNA 複製阻害剤である aphidicolin により抑制されたことから (Majumder et al., 1993)、2 細胞期 S 期において抑制的なクロマチン構造への変化が DNA 複製依存的に起こっているのではないかと推論されている。

クロマチンの構造の変化を起こす要因の一つとしてヒストンに対する修飾があげられる。真核生物の DNA は、ヌクレオソームを基本単位とするクロマチン構造を形成し、これが折り畳まることで存在している。高度に折り畳みを繰り返しているがために、通常クロマチン構造は転写因子などの結合に対して抑制的に働くと考えられている。しかしクロマチンを構成しているヒストンタンパク質にメチル基、アセチル基などの修飾が入ることで、クロマチン構造が緩む、あるいは転写因子への結合サイトが新たに生じるなどの変化が起こり、それが DNA と転写因子の結合に影響を与えて最終的には遺伝子発現を活性化すると

考えられている。逆に緩んでいる部分に修飾が入ることで抑制的な構造を取り戻すというような調節もしており、ヒストン修飾は DNA の変化を伴わない遺伝情報として近年注目を浴びている。そこで本研究は 2 細胞期で起こっている *hsp70* の発現の変化にクロマチンの構造変化が関わっているとの仮説を立て、この時期における *hsp70* プロモーター領域のヒストン修飾を調べることで仮説の検証を試みた。

現在ヒストン修飾を解析するためによく利用されている手法にクロマチン免疫沈降法（以下 ChIP 法）が挙げられる（Luo et al., 1998; Braunstein, et al., 1996）。しかしながら ChIP 法を実施するには大量の細胞が必要となる（ 10^6 細胞）。1 匹のマウスからは数十個の卵を採取できるが、ChIP に必要な量の卵を集めることは現実的ではない。そこで本研究室で確立された手法である Plasmid microinjection-Chromatin Immunoprecipitation（以下 PM-ChIP）法を用いて解析を行うことにした。

PM-ChIP 法ではまず、解析したいゲノム領域の配列を含む plasmid DNA を構築し、初期胚の核にマイクロインジェクションして導入する。導入された plasmid DNA はヒストンと結合し、クロマチンと同じような修飾を受ける事が示唆されている（Zhang et al., 2002）。これにより 1 個の胚で数万から数十万コピーナーの plasmid DNA の解析が可能となり、数十個の胚を用いれば ChIP に必要な量を準備できる。

本研究では、まず heat shock によって誘導される *hsp70* mRNA の発現量と、HSF-1 の細胞内局在の変化を解析することで、初期胚と体細胞で発現調節機構が異なる可能性を示した。その上で体細胞と初期胚における *hsp70* プロモーター領域のヒストン修飾を解析して、この両者でヒストン修飾のパターンが異なることを明らかにした。

[材料と方法]

体外受精

BDF1 マウス 3 週齢の雌 (SLC, Shizuoka, Japan) に過排卵処理として 5IU の pregnant mare's serum gonadotropin (Teikokuzouki CO, LTD., Tokyo, Japan) を腹腔内投与し、その 48 時間後に 5IU の human chorionic gonadotropin (hCG; Teikokuzouki CO, LTD.) を腹腔内投与した。hCG 投与後、15-16 時間後に頸椎脱臼して屠殺した雌の卵管膨大部より採取した卵子を HTF medium (Quinn P and Begley AJ, 1984) に移し体外受精に用いた。体外受精に用いた精子は、ICR マウスリタイヤ (SLC) の精巣状態尾部から採取した精子を、HTF 中で 2~3 時間培養したもの用いて行った。媒精 3 時間後、受精卵は KSOM 培地 (Lawitts and Biggers, 1993) に移して培養を継続した。培養はすべて 5% CO₂、95% air, 37.5°C の条件下で行った。

細胞培養

NIH3T3 細胞は 10% FBS (SIGMA) を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, Invitrogen) で培養を行った。培養は全て、5% CO₂, 95% air で行った。

Heat Shock の条件

マウス胚は 43°C 1 時間、37°C 2 時間、NIH3T3 細胞は 43°C 2 時間、37°C 1 時間の Heat Shock 処理を行った。

クロマチン免疫沈降法（ChIP 法）

体細胞ならびに胚に関してクロマチン免疫沈降法を実施した。操作は Luo や Braunstein らの方法(Luo, et al.1998; Braunstein, et al., 1996)を基にした Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate biotechnology CO, LTD., NY, USA) を用いて行った。

ChIP にと PM-ChIP 関してはサンプル調整がそれぞれ体細胞と胚とで異なるが。免疫沈降の基本操作は同様であり、使用する試薬の量が異なるだけである。そこで免疫沈降の操作については体細胞実験時の使用量を記入し、括弧の中に PM-ChIP 法の量を記す

1. サンプル調整

・体細胞の固定と融解

体細胞の培地を吸い取り Phosphate Buffered Saline (PBS) 2ml にて 2 回 wash した。その後 Trypsin-EDTA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を 500 μ l 加え、37°Cで 5 分保温することで細胞を plate からはがした。これに 1ml の DMEM を加え、シリコナイズされたチューブ (Assist Co. Ltd., Tokyo, Japan) に移し 3000rpm 5 分室温で遠心した。上清をピペットで取り除き 1ml の DMEM を加え、10%formaldehyde/PBS を 100 μ l 添加し、37°C、10 分間固定した。15 分後 Phosphate Buffered Saline (PBS) (TaKaRa, Shiga, Japan) 1ml で細胞を wash した。これに lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.1, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin) を加えて氷上で 10 分間静置して、次にチューブごと SONIFIER250 (BRAWSON; USA) により超音波破碎を行った。OUTPUT 4, Duty 60 , 4 分間で破碎を行った。

- ・胚へのプラスミド DNA のインジェクションと融解

受精後 6 時間の受精卵にプラスミド DNA をマイクロインジェクションし、これを各種抗ヒストン抗体を用いて、ChIP に使用した。

マイクロインジェクションは Inverted microscope (ECLIPSE TE300, Nicon Corporation, Tokyo, Japan) と micromanipulator (Narishige Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、胚を 20mM HEPES を含む KSOM 培地に移して、borosilicate glass capillaries (GC100 Tf-10, Harvard Apparatus Ltd., Kent, UK) 中に入れられたプラスミド DNA を microinjector (IM300, Narishige Co., Ltd.) により N₂ の圧力で押し出し、1 細胞期の雄性前核（媒精後 6 時間）に約 5 pl 注入した。注入後の受精卵は KSOM 培地で再び培養した。

その後胚をプラスミド DNA を注入した試料として KSOM 培地に 10 % formaldehyde/PBS を 1/10 量添加し、37°C、15 分間固定した。15 分後 Phosphate Buffered Saline (PBS) (TaKaRa, Shiga, Japan) で受精卵を洗浄しシリコナイズチューブ中の lysis buffer 30 pl に溶かした後体細胞のサンプルと同様の超音波処理をして免疫沈降のサンプルとした。

- ・免疫沈降

超音波処理したサンプルに ChIP dilution buffer (0.01 % SDS, 1.1 % Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, 167 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin) を 1350 (胚は 170 µl) µl 加えて 10 倍希釈した。次に 20 µl (胚は 10 µl) の protein A agarose beads 懸濁液 (600 µg sonicated salmon sperm DNA, 1.5 mg BSA, 4.5 mg recombinant protein A agarose/1.5 ml buffer; 10 mM tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.05 % sodium azide) を加え、4 °C で 1 時間転倒攪拌した。この操作により、非特異的にレジンへ吸着するタンパク質を取り除いた。1000 rpm, 60 秒, 4°C

で遠心して上清を新しいチューブに移し、抗体 5 μ g を入れ、4°Cで 6 時間転倒攪拌した。この時、抗体を入れる前に 10%を input としてサンプリングし、4 °C で保存しておき後の実験のスタンダードとした。処理後 Input 以外の各サンプル に 50 μ l (胚は 20 μ l) の protein A agarose を加え、4 °Cで 1 時間転倒攪拌をし、ヒストンと結合している抗体をビーズに吸着させた。次に protein A agarose を、次に示す 4 段階かけて洗った。それぞれ、buffer を 1 ml (胚は 50 μ l) 添加後 4 °C で 3 分間 incubate した。(1) Low Salt buffer (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 150 mM NaCl)、(2) High Salt buffer (0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.1, 500 mM NaCl)、(3) LiCl buffer (0.25M LiCl, 1 % NP40, 1 % deoxycholate, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.1)、(4) TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) \times 2 回。Wash の後、125 μ l (胚は 50 μ l) Elution buffer (10 mM DTT, 1 % SDS, 0.1 M NaHCO₃) ,常温, 15 分で溶出した。遠心後上清を別のエッペンに移し取り、レジンに再び 125 μ l の Elution buffer を加えてもう一度くり返した。サンプル 100 μ l に対し 5 μ l の 5 M NaCl を加え、65 °C、4 時間 incubate して、タンパク質・DNA 複合体の脱架橋を行った。保存してあった input もこれ以降は同じ操作を施した。5 μ l (胚は 2 μ l) の 0.5 M EDTA, 10 μ l (胚は 4 μ l) の 1 M Tris-HCl, pH 6.5, 2.5 μ l (胚は 1 μ l) 6 mg/ml Proteinase K を加え、45 °Cで 1 時間 incubate して、タンパク質を分解した。その後 2.5 μ l (胚は 1 μ l) Glycogen を加えて、phenol-chloroform 法により DNA を抽出し 15 μ l の精製水に溶かし、リアルタイム PCR に用いた。

RNA 抽出

ISOGEN (Nippon Gene Co., Toyama, Japan) をエッペンチューブに 400 μ l 入れ、その中にサンプルを入れ、-80 °Cにて一時保存した。室温に戻し、それぞれのサンプルに external control としてウサギの α -globin mRNA (50 pg/ μ l) をそれぞれ 0.5 μ l ずつ添加した。このサンプルに 100 μ l のクロロホルムを加え、ボルテックスマキサーで 30 秒間激しく混合した。4°Cで 5 分間放置したのち、12,000 rpm、4 °Cで 15 分間遠心した。RNA の含まれる水層（上層）の 240 μ l を新しいエッペンチューブに移した。共沈剤の 20 μ g/ml Glycogen (Invitrogen Co., Faraday Avenue Carlsbad, CA, USA) を各チューブに 2 μ l を加えて攪拌した後、イソプロパノールをそれぞれのチューブに 400 μ l ずつ加え、1 分間激しく攪拌した。その後 4 °Cで 30 分間放置した後、15,000 rpm、4°Cで 15 分間遠心して RNA を沈殿させた。上清をチューブを反転させて除去し、70%のエタノールを 500 μ l 加え洗い、再び 15,000 rpm、4°Cで 5 分間遠心した。上清を反転して除去し引式乾燥機で 10 分間乾燥した後、DEPC 水 28.5 μ l を加え、55°Cにて 10 分間保温し溶解させた。

Reverse-Transcription (RT)

Total RNA 27 μ l に 2 μ l の 10mM dNTP (Invitrogen)、2 μ l の Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primer (Invitrogen) を加え、全量 31 μ l とした。この混合液を 70 °Cで 5 分間インキュベートして RNA の高次構造を破壊した。氷中に 1 分以上置き、10×Reaction Buffer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) 4 μ l、RNasin (Promega) 0.5 μ l、ReverseScriptIV (Wako) 0.5 μ l、DEPC 水 4

μ l を順に入れ、マイクロチップの先でよく混合した。42 °Cで 1 時間、51 °Cで 30 分間、95 °Cで 5 分間反応させたのち温度を 4 °Cに下げ、遠心して反応液をチューブの底に集めた。RNaseH (Takara) を 0.5 μ l (2 units) 加え、37 °Cで 40 分間インキュベートして DNA と結合している RNA を切断・除去した。RT 産物に、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム、2.5 倍量の 100 %エタノールを加え、ボルテックスミキサーにてしっかりと攪拌した。その後 30 分間、室温で放置した。12,000rpm、4 °C、15 分間遠心し、cDNA の沈殿を得た。チューブを反転させて上清を除いたところに、70 %エタノール 400 μ l を加えてチューブを洗い、再度 15,000rpm、4°C、5 分間遠心した。遠心後チューブを反転させて上清を除き、7 分間真空乾燥した。乾燥後、滅菌蒸留水に cDNA を溶かした。

Real-Time PCR による解析

PM-ChIP 法により得られた DNA と逆転写によって得られた cDNA に関して、Smart Cycler System (Cepheid, Sunnyvale, USA. and TaKaRa, Shiga, Japan) を用いたリアルタイム PCR 法により定量を行った。DNA サンプルに二本鎖 DNA 染色剤である 3×SYBR® Green I を 2.5 μ l (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA), 2.5 μ l の 10×buffer、0.3 μ l の 250 mM MgCl₂、1.25 μ l ずつの 10 μ l 各プライマー、0.75 μ l の 10 mM dNTPs、1.25 units の Ex Taq™R-PCR Version (TaKaRa) を加えて全量が 25 μ l になるように DDW を加え PCR 反応液を作製した。増幅した PCR 産物を確認のため 2 %のアガロースゲルを用いて TBE (tris-borate EDTA) 中で電気泳動しエチジウムプロマイドで染色した。リアルタイム PCR に用いた hsp70 promoter と hsp70 遺伝子コード領域及び α -globin mRNA に対する各プライマー配列並びに PCR 条件は下

に示す。

hsp70 promoter

Sense:5'-ATGAGGTCAGAGGCAGCACT-3'

Anti:5'- CCTGTGTGGAATGGACAAGA-3'

95°C、30秒 →(95°C、15秒 →60°C、15秒 →72°C、20秒→85°C、6秒 (optics on)) × 40

hsp70 mRNA

Sense:5'- TGCTGATCCAGGTGTACGAG-3'

Anti:5'- CGTTGGTGATGGTGATCTTG-3'

95°C、30秒 →(95°C、15秒 →60°C、15秒 →72°C、20秒→85°C、6秒 (optics on)) × 40

Rabbit α-globin mRNA

Sense:5'-GCAGCCACGGTGGCGAGTAT-3'

Anti:5'- GTGGGACAGGAGCTTGAAAT-3'

95°C、30秒 →(95°C、20秒 →58°C、30秒 →72°C、20秒→91°C、6秒 (optics on)) × 35

免疫染色法

胚は新鮮な 3.7 % paraformaldehyde (PFA) (WAKO, Osaka, Japan) ·PBS 中に移し、overnight で固定した。体細胞に関してはスライドガラス上で培養し、0.1 % BSA (Sigma chemical co. MO, USA) を含む PBS (BSA·PBS) で洗浄

後、PFA-PBS によって室温 15 分間にて固定した。両サンプルを 0.1% BSA-PBS で 10 分かけて洗浄し、0.5 % Triton X (Sigma chemical co.) を含む PBS で室温 15 分間インキュベートした。0.1% BSA-PBS で洗浄した後、0.1% BSA-PBS で 100 倍希釈した一次抗体を overnight で反応させた。一次抗体にはを抗 HSF-1 抗体(rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)を使用した。一次抗体処理したサンプルは、0.1 %PBS-BSA で 3 回 10 分間かけて洗浄した後、0.1 %BSA-PBS で 50 倍希釈した FITC-conjugated Anti-rabbit IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA)を室温で 45 分間反応させ、再び 0.1 %BSA-PBS で十分かけ 3 回洗浄した。洗浄後、propidium iodide (Sigma chemical co.) と Rnase (Dase-free; Roche, Basel, Switzerland) をそれぞれ 0.1 % PBS-BSA で 10 倍希釈した液の中で 30 分間処理した。処理後 0.1 % BSA-PBS で十分かけ 3 回洗浄した。このサンプルをスライドガラス上の VectaShield (Vecta Laboratories, CA, USA) に加えて標本を作製した。標本は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 : Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いて観察した。

阻害剤処理

体外受精後 14 時間の胚を Aphidicolin(Sigma chemical Co. MO, USA)を含む KSOM 培地中で処理することにより、DNA 合成を阻害した。対象として、阻害剤を含まない KSOM 培地で培養した胚を用いた。Aphidicolin (Sigma) は最終濃度を $100 \mu M$ として用いた。溶媒には dimethyl sulfoxide(DMSO)を用いて、最終濃度は 0.15% とした。

phsp-N1 plasmid DNA の作製

PM-ChIP に用いるために、hsp70 promoter をクローニングした plasmid を作成した。作成する元になった plasmid は N-末端融合蛍光タンパク質ベクターである pEGFP-N1-plasmid DNAs (Clontech BD Biosciences) を使用した。hsp70 プロモーター領域はマウスの尻尾から ChargeSwitch gDNA tissue kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) を用いてゲノム DNA を抽出し、PCR で増幅した。PCR に用いたプライマーは、

Sense:

5'-GGGGATTAATGGATCCGGACGACATGCCAGCTGAATGAGCTCCAGGAACATCCAAA-
3'

Anti sense:

5'- GGAAGCTTGTCTAGGTATCCATCGATTAGTAGCTGTCAGCGTCTGGTG-3'

PCR の反応条件は 95 °C、2 分 → (95 °C、30 秒 → 62 °C、30 秒 → 72 °C、45 秒) × 35 サイクルである。増幅した DNA を制限酵素 PshB I と HindIII (TaKaRa) で処理することにより、粘着末端を作った。同様の制限酵素処理を pEGFP-N1-plasmid DNAs (Clontech BD Biosciences) に対しても行った。増幅した PCR 産物を 2 %アガロースゲルで電気泳動し、約 640 b.p. の部分のバンドを切り出して Wizard^(R) SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., WI, USA) を用いて精製し、DNA Ligation kit Vir.2.1 (TaKaRa) を用いて pEGFP-N1-plasmid DNAs に組み込んだ。そのベクターを大腸菌 (Top 10) にトランسفォーメーションし、kanamycin+ の LB 寒天培地で約 18 時間培養して大腸菌のコロニーをランダムに選択した。hsp 70 プロモーター配列を増幅す

るときに用いたプライマーでダイレクト PCR を行いインサートを確認した後
BigDye™ Terminator v3.0 kit (Applied Biosystems) を用いたシークエンスを
行い、配列を確認した。

[結果]

phsp-N1 plasmid DNA のマイクロインジェクションによる蛍光の観察

pEGFP-N1 plasmid DNA (BD Biosciences, Clontech) の CMV promoter を heat shock protein 70 promoter で置き換えた phsp-N1 plasmid DNA を作成した。この phsp-N1 を受精後 6 時間の一細胞期胚にマイクロインジェクションし、hsp70 promoter 由来の転写が起こるかどうかを promoter の下流に存在する GFP の蛍光にて確認した。確認は受精後 30 時間である 2 細胞期で行った。この実験の概略と 2 細胞期における GFP 蛍光を Fig.1 に示す。蛍光が確認できることから、この hsp70 promoter が初期胚で機能することが分かった。PM-ChIP にはこの phsp-N1 plasmid DNA を用いた。

体細胞における熱刺激による hsp70 mRNA の発現応答

hsp70 は体細胞において熱刺激を受け発現が上昇することが知られている (Mirault et al., 1982)。この確認として NIH3T3 細胞に熱刺激を加え、発現誘導がなされているかを調べた。熱刺激は 43°C で 2 時間かけ、その後 1 時間 37°C にて培養し、hsp70 mRNA の発現を待った。これを熱刺激をかけていないサンプルと共に Real-time PCR にて解析した (Fig.2A)。その結果、熱刺激によって hsp70 の発現が誘導されることが確認された ($P < 0.05$, Student's t-test)。

初期胚における hsp70 mRNA の発現解析

受精後から 2 細胞期胚までの hsp70 遺伝子の発現を Real-time PCR 法によって調べた (Fig.2B)。hsp70 mRNA は、未受精卵ではほとんど検出されなかったが、2 細胞初期である媒精後 22 h では顕著な増加が見られた。その後 2 細

胞後期である 40 h で mRNA 量は著しく減少しており、この時期では hsp70 遺伝子の転写が起こらず、蓄積されていた mRNA も分解されていることが明らかとなった。この結果は 2 細胞期 G1 期まで転写が起こり、S 期以後は転写が抑制されるというこれまでの報告に一致するものであった (Christians et al 1995; Christians et al., 1997)。

2 細胞期 S 期における hsp70 遺伝子の発現抑制機構が実際に DNA 複製に依存しているかどうかを確かめるために、DNA 合成を阻害する Aphidicolin を作用させて、媒精後 40 h での hsp70 mRNA の発現量を調べた。その結果、阻害剤無しのサンプルに比べて発現が上昇していることが明らかとなった ($P<0.05$, Student's t-test)。この実験により、hsp70 promoter の転写は 2 細胞期 S 期までに抑制される事が分かった。

次に、初期胚での hsp70 の発現に関して熱刺激が影響するかどうかを確かめるために、初期胚に熱刺激を与え、hsp70 mRNA 量の変化を解析した (Fig. 2 C)。解析した時期は hsp70 mRNA の蓄積が一番多いと報告されている (Christians et al., 1995) 媒精後 22 h にサンプリングが出来るように、19 h から 20 h までの 1 時間、43°Cで熱刺激を与え、平常の培養温度に戻した後に 2 時間培養を行い、Real-time RT-PCR 用のサンプルを調整した。その結果、熱を加えることによる発現量の増加は見られず、初期胚では hsp70 の発現が熱に依存しないという過去の報告を裏付けるものとなった (Nakamura 2001)。以上の結果より、2 細胞期胚における hsp70 の発現調節機構は体細胞のそれとは異なる事が示唆された。

HSF-1 の局在

HSF-1 は hsp70 の発現を調節する転写因子であるが、通常は細胞質に不活性

型の単量体として存在する。しかしながら熱刺激を受けると、核内に移行して、活性化型三量体を形成し、hsp70 のプロモーター領域に存在する Heat shock element に結合することで hsp70 の発現を上昇させる(Sarge et al., 1993) 2 細胞期での hsp70 遺伝子の発現に関する HSF-1 の役割を調べるために、その細胞内局在を免疫染色法で調べた。また、体細胞に関しても熱刺激を加え、HSP-1 の局在変化を調べた。その結果、体細胞では熱刺激を加える前は核と細胞質にほぼ均等に局在していたが、熱刺激に応じて局在が変化し、核内の量が著しく増加した (Fig.3A)。一方、2 細胞期胚では、媒精後 18 h, 36 h のいずれにおいても、熱刺激を加える前にすでに核への高い局在が観察された。また、熱刺激を加えることによる核内での量の増加は認められなかった (Fig.3B)。また Aphidicolin 処理を行った胚に関しても局在の変化は見られなかった。以上より、初期胚においては、hsp70 の発現調節に HSF-1 の局在変化は影響を与えていない事が示唆された。

体細胞における phsp-N1 plasmid DNA の熱刺激に対する応答

Hps70 プロモーターをもつ plasmid DNA を体細胞にトランスフェクションし、これがゲノムと同様の発現調節を受けるのかどうかを確かめた。細胞内で plasmid DNA が適切な制御を受けているのではあれば、熱によって下流に存在する GFP の発現が上昇するはずである。卵では発現を上昇させることが出来ないため、NIH 3 T3 細胞にトランスフェクションし、これに熱刺激を加えることで GFP の蛍光が上昇するかどうかを確かめた。結果を Fig.5 に示す。

トランスフェクション後の細胞に対して 43°C の熱刺激を 2 時間与え、24 時間後に観察を行った。その結果、熱刺激により蛍光を発する細胞数と蛍光強度の両方が上昇していることが分かった。このことから phsp-N1 plasmid DNA は

ゲノム上の hsp70 promoter と同様に熱刺激による応答を示すことが分かった。

体細胞における hsp70 プロモーターのヒストン修飾

体細胞において、Heat shock の有無に関してヒストン修飾にどのような変化があるかを ChIP 法にて調べた。調べたヒストン修飾は、H3K4me2 と H4ac であり、これらは遺伝子発現の活性化に関与していることが明らかとなっているものである。その結果、この両者共に Heat shock によって修飾が上昇している事が明らかとなった (Fig.4) (H4ac 化に関して: Thomson et al., 2004 H3K4me2 化に関して: Smith et al., 2004)

初期胚における hsp70 プロモーターのヒストン修飾の解析

2 細胞期胚における hsp70 プロモーター領域のヒストン修飾を解析するため、PM-ChIP 法を実施した。

これまでの実験結果より、2 細胞期の S 期を挟んで hsp70 遺伝子の発現調節に変化が起こっていることが示唆されたため、媒精後 6 時間に胚の前核にプラスミド DNA をマイクロインジェクションした後、2 細胞 G1/S 期および G2 期に相当するそれぞれ媒精後 18 h および 36 h で PM-ChIP 法のサンプルを採取した。また、媒精後 14 h から Aphidicolin 処理を行って、2 細胞 S 期を経ていない 36 h のサンプルを調整した。体細胞で調べた H4Ac と H3K4me2 に関して解析を行ったところ、H4Ac はサンプル間で有意な変化を認められなかつたが、H3K4me2 に関しては媒精後 18 h から 36 h で有意に減少することが確認された ($P < 0.05$, Student's t-test)。Aphidicolin 処理を行うと 36 h においても 18 h と同様の水準を保っており、2 細胞期 S 期を経ることによって H3K4me2 の修飾レベルが低下することが分かつた。

[考察]

受精直後の胚は遺伝子発現を停止した状態にある。マウスの場合 1 細胞期 G2 期からの遺伝子発現を開始している。この時期に発現している遺伝子に hsp70 がある。本来熱による刺激を受け発現する事が知られているが、初期胚では hsp70 は 1 細胞期 G2 期から発現が開始され、2 細胞期中期まで発現し、2 細胞期中期以降は転写に対して抑制がかかり、発現が抑えられることが分かっている。Hsp70 の転写を制御しているものとして転写因子の HSF-1 が存在している。この HSF - 1 は体細胞の場合熱刺激を与えると、同調していない細胞にもかかわらず HSF-1 がすべて核に局在していることから、体細胞では HSF-1 の局在化に関しては細胞周期に影響を得ない事が分かる。一方で初期胚では 1 細胞期 S/G2 期に発現し始める hsp70 mRNA は 2 細胞期中期まで発現し、その後発現が抑制され熱刺激を受けても発現しないことが知られている (Christians et al., 1995)。2 細胞期の具体期にどの時期に抑制がかかるかを明らかにするために、媒精後 14 時間で Aphidicolin 処理をした。そうすると mRNA の検出が十分に下がる時期である 40h においても mRNA が残っている事が確認された (Fig.2B)。この結果から hsp70 の発現抑制状態は 2 細胞期 S 期に獲得される事が分かった。初期胚は体細胞の発現とは異なり、発現が細胞周期によって強く影響されている事が分かる。また HSF-1 の局在をみると体細胞とは異なり 2 細胞期 S 期をまたいでいる媒精後 18 h、36 h のいずれのサンプルに熱を加えても HSF-1 の局在の変化が起こらなかったことから、熱による影響を受けていないことが分かる (Fig.3)。また hsp70 の発現を保ち続けることの出来る Aphidicolin 処理をしたサンプルでも同様であった (Fig.3B)。

転写因子が影響していないことが示唆されたので、発現に影響を与えている

と考えられているヒストン修飾を解析するために PM-ChIP 法を初期胚にて実施を考えた。plasmid DNA をインジェクションしヒストン修飾を受けるという報告はあるが (Zhang et al., 2002)、この plasmid DNA は自分で hsp70 promoter を組み替えたものであるので、DNA がゲノム由来の調節を受けることを確認するため、発現を上昇させること出来る体細胞に導入し、熱刺激をかけた。仮に plasmid DNA がクロマチン構造をとっていなければ熱刺激により GFP の発現が上昇することではなく、発現量に差はないはずである。逆にクロマチン構造をとっていれば、HSF-1 やヒストン修飾による hsp70 promoter からの発現が上昇すると考えた。熱刺激の結果 GFP の発現している細胞数と蛍光の強度の両方が上昇したことから、導入した plasmid DNA はゲノム由来の発現が調整を受けていた事が予測された。(Fig.5)

plasmid DNA の体細胞での熱刺激による応答が確かめられたので、初期胚にインジェクションした DNA は内在性の promoter の動向を反映すると考えられたので PM-ChIP 法を実施した。受精後 6 時間の胚に 50 ng/ μ l の phsp-N1 plasmid をマイクロインジェクションし、核内でヒストン構造をとらせた。その後 2 細胞期 S 期前である 18 時間でサンプリングを行った。mRNA の蓄積を見るための 22 h と時間のずれがあるのは、ヒストン修飾が起こることによって mRNA が発現し、これが蓄積される機構と考えられる。つまり mRNA 蓄積の一番多い状態でヒストン修飾が、活性化を反映しているとは言えず、そのため 4 時間ほど前のサンプルを採取した。また 2 細胞期 S 期を過ぎた 36 h でもサンプリングを行ってヒストン解析した。ここでも mRNA 採取時の 40 h より 4 時間前にサンプリングを行った。また mRNA の発現が見られる 2 細胞期 S 期を経ることによる発現の減少に、ヒストン修飾に影響を与えていたかどうかを解析するため媒精後 14 h から Aphidicolin 処理をしたサンプルに関しても 36 h でサンプリングを行つ

た。(Fig.6)

結果 H4ac 化では差が無く ($P>0.05$, Student's t-test)、H3K4me2 では 18 h と 36 h では有意に差があり ($P<0.05$, Student's t-test) 36 h と aphi+ では差が有意ではなかった。 $(P>0.05$, Student's t-test) この結果を以下のように考えた。

18 h では活発に発現している hsp70 であるが、これは 2 細胞期 S 期を経た後には抑制される事が報告されている (Christians et al., 1995)。PM-ChIP の結果を見ると抑制される 2 細胞期 S 期を挟んで 18 h と 36 h で H3K4me2 が下がっている事が分かった。H3K4me2 は発現を活性化させるマーカーとして存在する事が知られているが、その存在自体が遺伝子の不活性化を防いでいるという報告がある (Zegerman et al., 2002)。その根拠は H3K4 に関して、K4 がメチル化されていないヒストン H3 にだけ高い結合活性を持ち、K4 がメチル化されたヒストン H3 では結合活性が大きく下がる NuRD (Nucleosome Remodeling and Deacetylase) 不活性化複合体の存在である。2 細胞期 S 期に引き起こされるクロマチンの構造変化はこの NuRD 複合体が引き起こしているのではないだろうかと予測した。その考えは H3K4me2 が残っていて hsp70 の遺伝子発現が残っている Aphidicolin 処理サンプルによって補強される

Aphidicolin 処理を行うと Fig.6B より 18 h と 36 h で H3K4me2 の修飾に差が無い事が分かっている。この胚を 40 h まで培養すると hsp70 の発現がある事が Fig.2B より分かっていることから、H3K4me2 が落ちることで初期胚における hsp70 の遺伝子発現の抑制が起こっているのではないかと考えられた。

H4ac 化に関しては時間経過に関しても、Aphidicolin 処理しても修飾に有意な差が見られなかった。これはゲノムが遺伝子発現に対し抑制的な機構を獲得するこの 2 細胞期 S 期前後で H4ac 化に変化が無い (Worrad et al., 1995) ことから、アセチル化の変化による、同一クロマチン内での DNA とヒストンの結合状態の

変化によって引き起こされることはなく、H3K4me2 の減少による、より高次な構造の変化によって、クロマチンの抑制機構の獲得し、この時 hsp70 も不活性化されているのではないかという示唆を得た

本研究は PM-ChIP 法にて初期胚の内在性のプロモーターのヒストン修飾の変化を①時間②細胞周期の二つの要素により解析した初めての報告となる。今後この PM-ChIP 法にて解析されるヒストン修飾の情報が増えることで、今まで数の制限を受けていた初期胚におけるヒストン修飾の変化に関する研究が進み、個体の初の発生における遺伝子発現変化を解明することで、生命の誕生という神秘が科学的よって解明されることの助けとなることを強く望む。

[謝辞]

本論文を終えるにあたり、研究及び論文の作製を終始親身に御助言、御指導いただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科 青木不学 助教授に心から深く感謝致します。また、研究の様々な局面において御助言を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科 永田昌男 教授に感謝致します。実験の進行におきまして多大なる技術的指導・専門的知識および様々な御助力を頂きました同大学大学院同分野の諸先輩方に心より感謝致します。また、日々の研究生活において、ともに苦しみ、励まし、喜びあった同期の大我正敏君、須永和子さん、堀恭徳君に心から感謝します。度重なる困難においても、私を信じ、励まし、そして共に楽しく充実した時間を歩んでくれた、同大学大学院同分野の後輩、先端生命科学専攻の同期、後輩に感謝します。また大学院への進学を許可し、支えてくれた私の両親に深く感謝いたします。

[参考文献]

- Aoki, F., Worrad, D. M. and Schultz, R. M. (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol* 181, 296-307.
- Bensaude O, Babinet C, Morange M, Jacob F. (1983) Heat shock proteins, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. *Nature*. 305(5932):331-3.
- Braunstein, M., Sobel, R. E., Allis, C. D., Turner, B. M. and Broach, J. R. (1996). Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol* 16, 4349-56.
- Christians, E., Campion, E., Thompson, E. M. and Renard, J. P. (1995). Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development* 121, 113-22.
- Christians, E., Michel, E., Adenot, P., Mezger, V., Rallu, M., Morange, M. and Renard, J. P. (1997). Evidence for the involvement of mouse heat shock factor 1 in the atypical expression of the HSP70.1 heat shock gene during mouse zygotic genome activation. *Mol Cell Biol* 17, 778-88.
- Conover, J. C., Temeles, G. L., Zimmermann, J. W., Burke, B. and Schultz, R. M. (1991). Stage-specific expression of a family of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryo. *Dev Biol* 144, 392-404.

Erbach, G. T., Lawitts, J. A., Papaioannou, V. E. and Biggers, J. D. (1994).

Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 50, 1027-33.

Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A. and Bolton, V. N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *Embo J* 1, 681-6.

Lawitts JA, Biggers JD.(1993). Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* 225:153-64

Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72(1):73-84.

Luo, R. X., Postigo, A. A. and Dean, D. C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463-73.

Majumder S, Miranda M, DePamphilis ML. (1993). Lysis of gene expression in mouse preimplantation embryos demonstrates that the primary role of enhancers is to relieve repression of promoters. *EMBO J.* 12(3):1131-40.

Majumder S, Zhao Z, Kaneko K, DePamphilis ML.(1997). Developmental acquisition of enhancer function requires a unique coactivator activity. *EMBO J.* 16(7):1721-31.

Mirault ME, Southgate R, Delwart E.(1982). Regulation of heat-shock genes: a DNA sequence upstream of Drosophila hsp70 genes is essential for their induction in monkey cells. *EMBO J.* 1(10):1279-85

Quinn P, Begley AJ.(1984). Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust J Biol Sci.*

37(3):147-52.

Rastelli, L., Robinson, K., Xu, Y. and Majumder, S. (2001). Reconstitution of enhancer function in paternal pronuclei of one-cell mouse embryos. *Mol Cell Biol* 21, 5531-40.

Sarge, K. D., Murphy, S. P. and Morimoto, R. I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 13, 1392-407.

Smith, S. T., Petruk, S., Sedkov, Y., Cho, E., Tillib, S., Canaani, E. and Mazo, A. (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol* 6, 162-7.

Thomson, S., Hollis, A., Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2004). Distinct stimulus-specific histone modifications at hsp70 chromatin targeted by the transcription factor heat shock factor-1. *Mol Cell* 15, 585-94.

Thorne AW, Kmiecik D, Mitchelson K, Sautiere P, Crane-Robinson C. 1990. Patterns of histone acetylation. *Eur J Biochem* 193(3):701-713.

Worrad, D. M. and Schultz, R. M. (1997). Regulation of gene expression in the preimplantation mouse embryo: temporal and spatial patterns of expression of the transcription factor Sp1. *Mol Reprod Dev* 46, 268-77.

Zegerman, P., Canas, B., Pappin, D. and Kouzarides, T. (2002). Histone H3 lysine 4 methylation disrupts binding of nucleosome remodeling and

deacetylase (NuRD) repressor complex. *J Biol Chem* 277, 11621-4.

Zeng F, Baldwin DA, Schultz RM. 2004. Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev Biol* 272(2):483-496.

Zhang, J., Xu, F., Hashimshony, T., Keshet, I. and Cedar, H. (2002). Establishment of transcriptional competence in early and late S phase. *Nature* 420, 198-202.

Fig.1

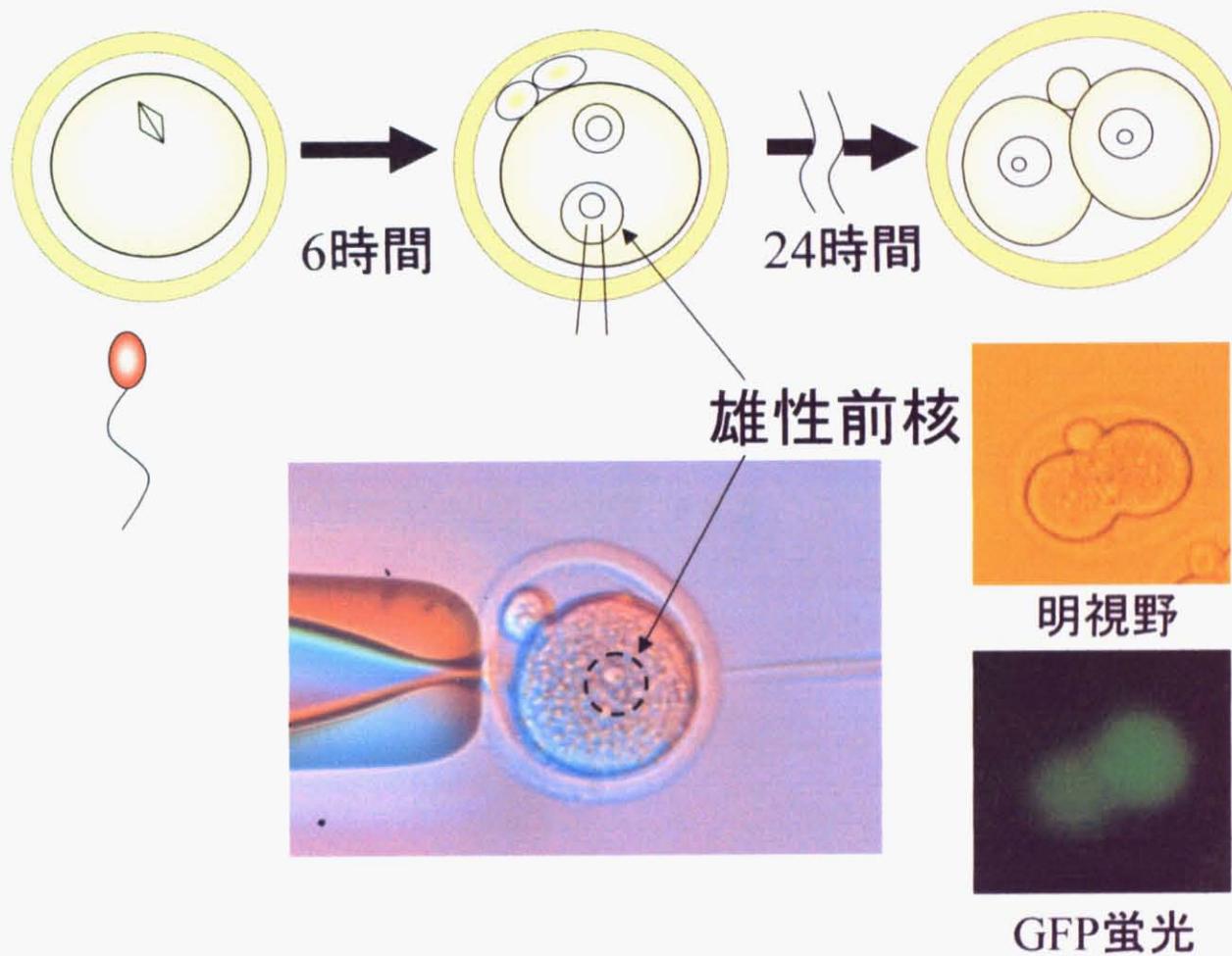
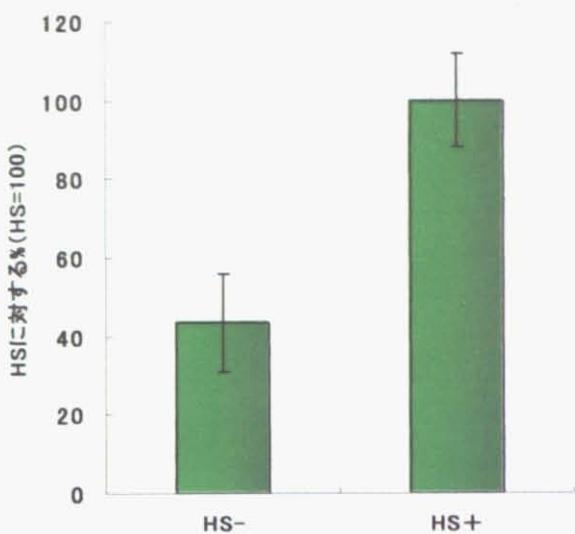


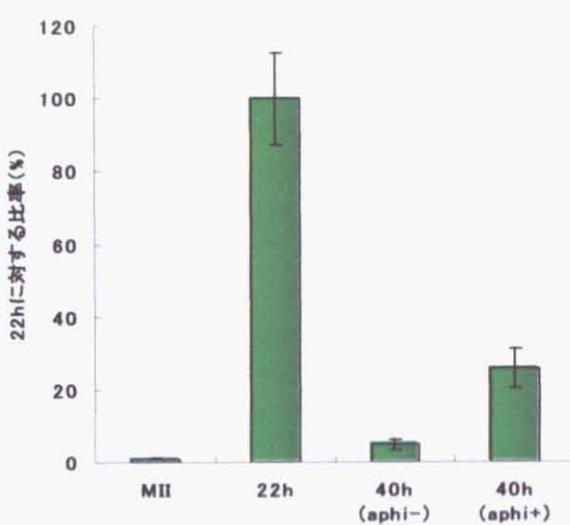
Fig.1

受精後マイクロインジェクションの概念図
受精後6時間の胚に形成される前核のうち精子由來の雄性前核にマイクロ
インジェクションを行う。写真左側のホールディングピペットで受精卵を押さえ、先の
細いインジェクション専用のピペットでDNAを導入する。

Fig.2 (A)



(B)



(C)

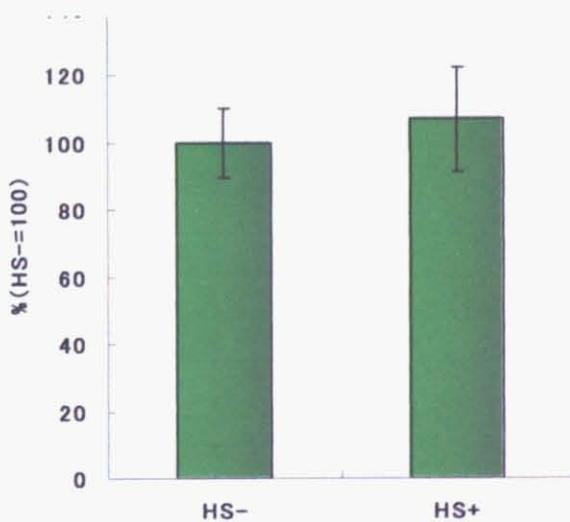


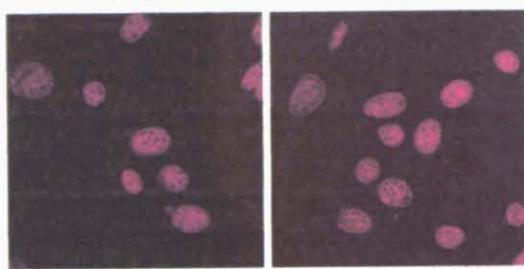
Fig.2 Hsp70の発現をReal-Time PCRにて検出した。各サンプルのBarは標準誤差を示す
(A)体細胞のHeat shock(HS)の有無に関する影響
(B)受精卵におけるhsp70 mRNA量の変化
(C)媒精後22hにおけるhsp70 mRNAに対するHSの影響

実験は一つのサンプルにつき3回行った。エラーバーは標準誤差を示す。

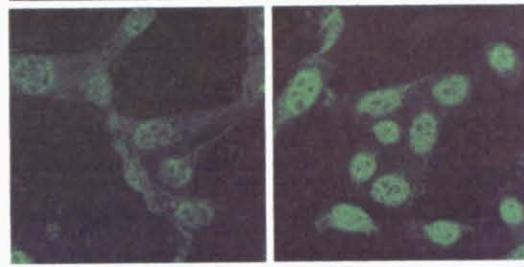
Fig.3(A)

HS - HS +

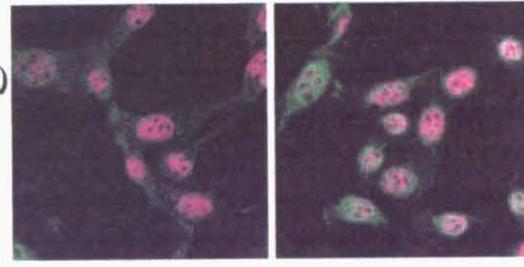
DNA



HSF-1



Merge



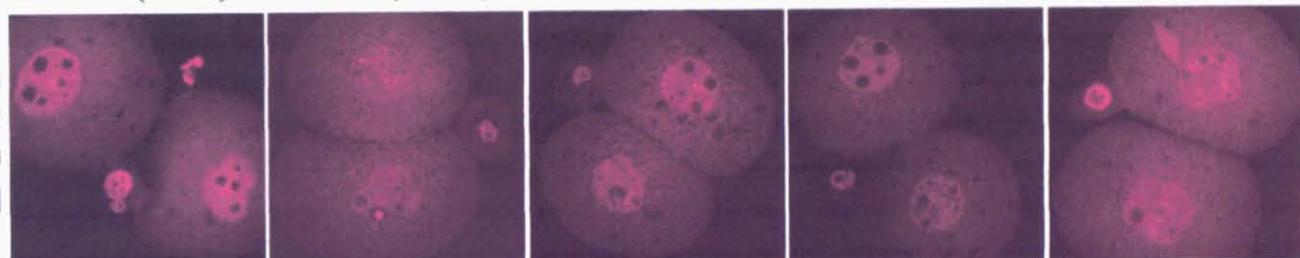
(A) 体細胞での免疫染色の様子

体細胞でのHSFの局在の変化を免疫染色で明らかにした。熱刺激43°C 2時間処理を行ったものと同じ時間37°Cで培養したものの両方を用いた。2次抗体はFITC-conjugated goat anti-rabbit IgG抗体を使用した。

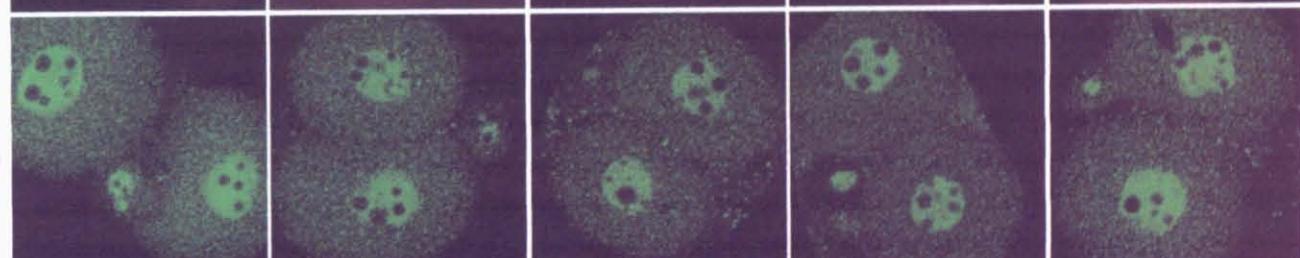
(B)

18 h(HS-) 18 h(HS+) 36 h(HS-) 36 h(HS+) 36 h(aphi+)

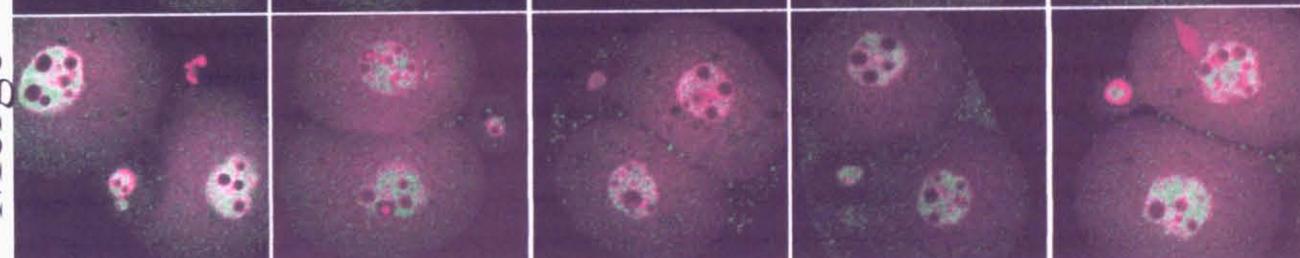
DNA



HSF-1



Merge

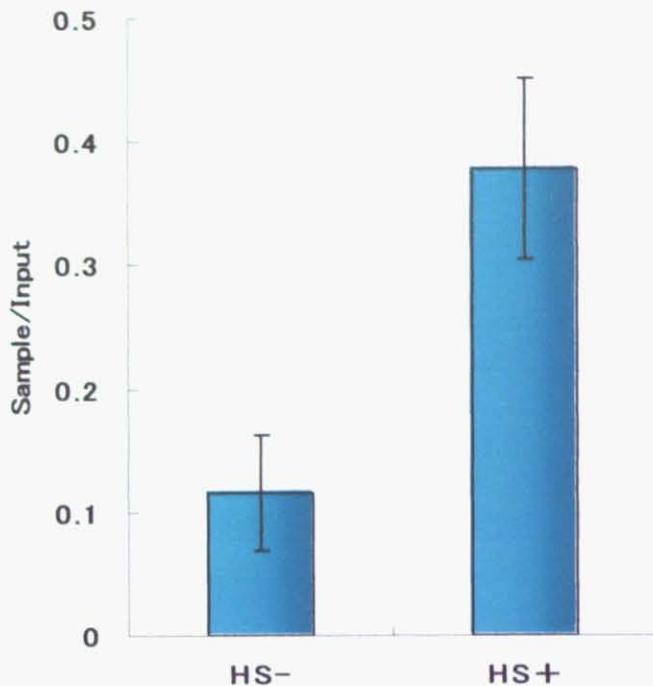


(B) 初期胚での免疫染色の様子

初期胚における熱刺激のHSF-1への局在への影響を調べるために、PM-ChIPを行った時間である媒精後18 時間と36 時間のサンプルを抗HSF-1抗体にて免疫染色を行った。2次抗体はFITC-conjugated goat anti-rabbit IgG抗体を使用した。

Fig.4

(A) 体細胞ChIP:H4ac化



(B) 体細胞ChIP:H3K4me2

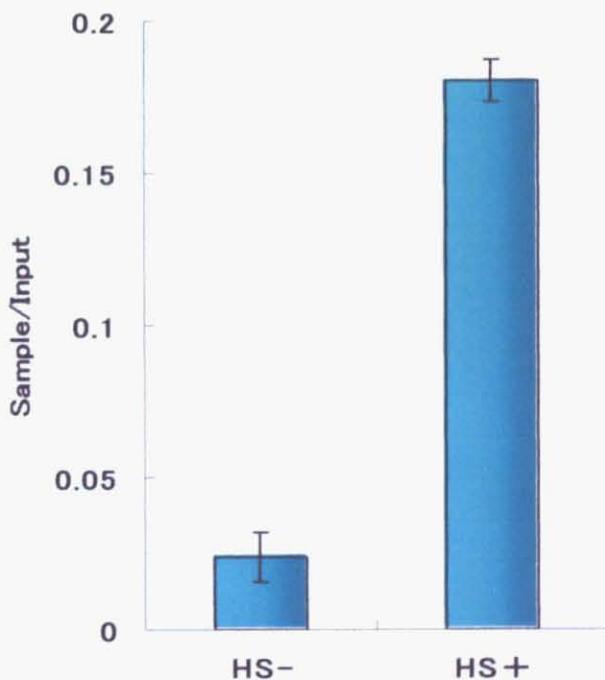
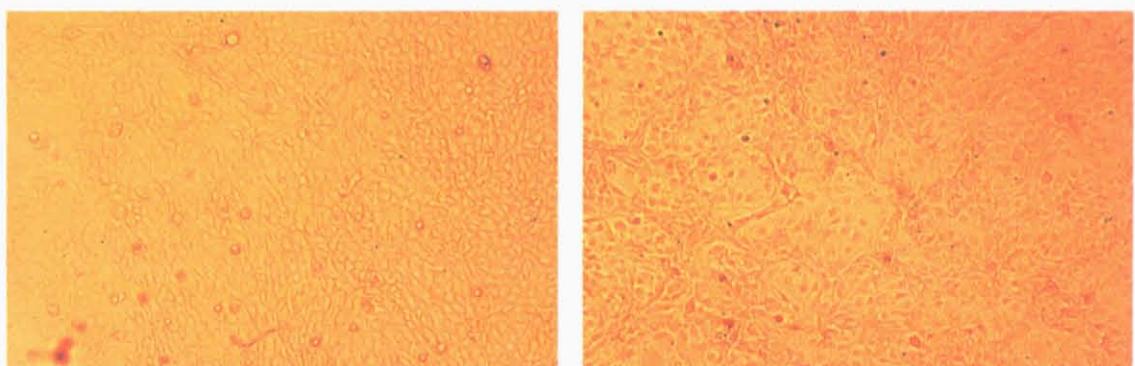


Fig.4 热刺激を与えた体細胞にてChIPを行った。導入した細胞数が異なるためにサンプルをInputを用いて補正した。Inputとはサンプルの10%をChIPを行わず、分注しておいたもので、導入した細胞数を反映したものである。

(A)ヒストンH4アセチル化(H4ac) (B)ヒストンH3 Lysine4 ジメチル化(H3K4dime)をしめしている。

Fig.5

明視野



GFP蛍光



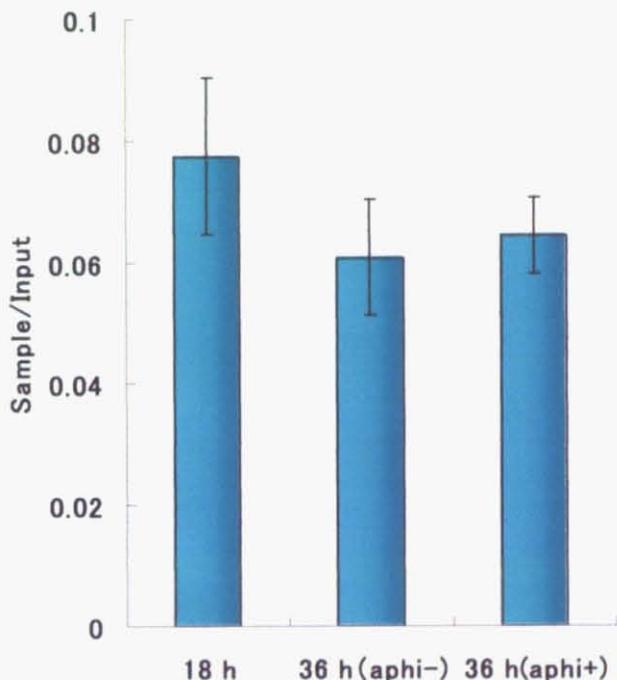
HS-

HS+

Fig.5:トランスフェクションしたphsp-N1 plasmid DNA由来のGFPの発現への熱刺激の影響。熱刺激後24時間で観察。HS-は熱刺激の行わなかったサンプルを示す。

Fig.6

(A) H4ac化の変化



(B) H3K4me2化の変化

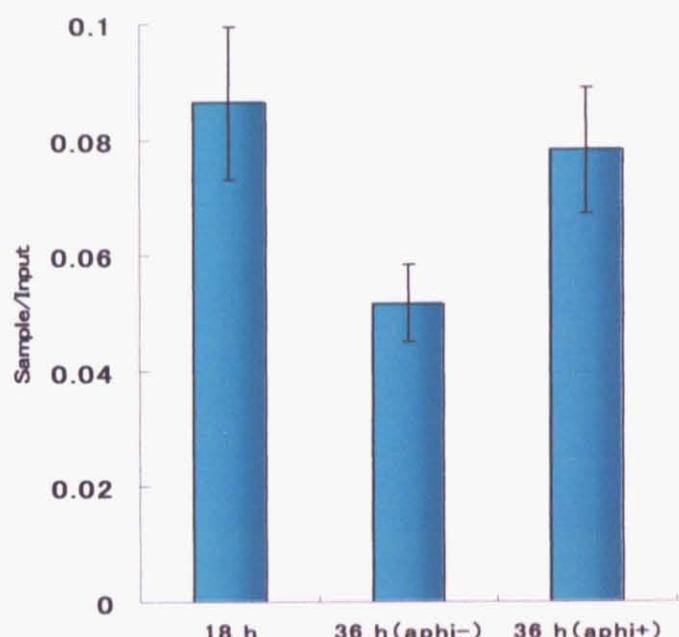


Fig.6: 初期胚におけるPM-ChIP法の実施

媒精後6時間の胚の雄性前核プラスミドDNAをマイクロインジェクションし、媒精後18時間と36時間のサンプルに関してChIP法実施した。aphiはDNA合成阻害剤であるAphidicolinをさす。また、インジェクションは導入時に用いる針のサイズによって導入されるDNA量に差が生じるため、Real-time PCRで解析した値を細胞数を反映する値Inputで補正した。実験は18 h, 36 h(aphi-)に関しては5回、36 h(aphi+)に関しては4回行った。エラーバーは標準誤差を示す。

(A)H4ac化の変化. 統計処理をした結果いずれの場合も有意な差が無かった($p > 0.05$ で検定)

(B)H3K4dimeの変化. 統計処理をした結果18時間と36時間では有意な差があった($p < 0.05$)

36時間(aphi-)と36時間(aphi+)との間には有意さは無かった($p > 0.05$)