

Epigenetic Changes of the Cyp11a1 Promoter Region in Granulosa Cells Undergoing  
Luteinization During Ovulation in Female Rats.

(顆粒膜細胞の黄体化に伴うCyp11a1 (P450scc) 遺伝子発現のエピジェネティクス制御)

岡田 真紀

山口大学大学院 情報解析医学系専攻 産婦人科学分野

2017年1月

# 目次

【要旨】	3
【研究の背景】	4
【目的】	5
【方法】	5
【結果】	9
【考察】	11
【結語】	14
【参考文献】	15



## 【要旨】

(目的) 卵巣の顆粒膜細胞では、LH サージ後の黄体化に伴い Cyp11a1 遺伝子発現が急速に増加する。このCyp11a1 遺伝子の発現変化にプロモーター領域のヒストン修飾や DNA メチル化を含むエピジェネティックな制御が関与するかを検討した。

(方法) 3 週齢雌ラットに eCG - hCG 投与による排卵誘発を行い、hCG 投与前 (0h) と投与後4時間、12時間の黄体化顆粒膜細胞を回収し、Cyp11a1 mRNA (RT-PCR) と Cyp11a1 プロモーター領域について、ヒストン修飾状態 (ChIP assay)、ヒストン修飾酵素 EZH2 結合 (ChIP assay)、DNAメチル化状態 (Bisulfite sequencing 法)、クロマチン構造 (CHART-PCR法)、転写因子C/EBP  $\beta$  結合 (ChIP assay)、および C/EBP  $\beta$  結合部位の転写活性 (ルシフェラーゼ解析) を解析した。

(結果) Cyp11a1 mRNA は hCG 投与後増加し、4時間でピークとなり、それ以降高値を維持した。hCG 投与後4時間と12時間では、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域のヒストン修飾は、転写活性に働くH3K4me3は増加し、転写抑制に働くH3K9me3とH3K27me3は低下した。H3K27me3 を誘導するヒストン修飾酵素である EZH2 のプロモーター領域への結合は低下した。DNA メチル化状態は、hCG 投与後で変化せず、低メチル化状態であった。クロマチン構造は hCG 投与後4時間と12時間で弛緩し、それに伴い C/EBP  $\beta$  の Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域への結合は増加した。さらに、ルシフェラーゼ解析によりC/EBP  $\beta$  結合配列は、転写活性に関与する発現制御領域であることが示された。

(結語) 顆粒膜細胞において LH サージ後の黄体化に伴い増加する Cyp11a1 mRNA の発現変化には、近位プロモーター領域のヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を介した転写調節が関与する。このクロマチン構造の変化に伴う転写因子の C/EBP  $\beta$  の結合が増加し転写を活性化していると考えられる。

## 【研究の背景】

排卵とそれに伴う黄体化は、妊娠に不可欠な現象である。排卵を惹起するLH サージが起こると、卵巣顆粒膜細胞内ではステロイド合成に関与する種々の遺伝子が急速に発現する。その中で、プロゲステロン合成に関与する Steroidogenic acute regulatory (STAR) 遺伝子と P450<sub>scc</sub> をコードする Cyp11a1 遺伝子は、LH サージ後の数時間で急激に発現が上昇する。一方、LH サージ前に高い発現を示すエストロゲン合成酵素のアロマターゼをコードする Cyp19a1 遺伝子の発現は、黄体化に伴い急速に減少する。これらの遺伝子の迅速な発現変化により、LH サージ後のエストロゲン合成からプロゲステロン合成へのシフトを効果的に行うことができる (1)。プロゲステロンは排卵に必須であり、プロゲステロン合成阻害剤を投与されたラットではその排卵数が減少し (2)、プロゲステロンレセプターのノックアウトマウスは卵胞破裂が阻害され、排卵が起こらないことが知られている (3)。すなわち、LH サージにより性ステロイド産生がエストロゲン合成からプロゲステロン合成にシフトするように遺伝子発現が調節されており、この結果排卵が起こる。しかしながら、これらステロイド合成酵素関連遺伝子の発現調節の分子メカニズムについては十分に解明されていない。

近年、DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックなメカニズムが遺伝子発現変化に関わっていることが明らかになってきている (4-6)。DNA メチル化は CpG 部位のシトシンに生じ、一般にクロマチン構造を変化させ、転写因子の結合を阻害することで遺伝子発現を抑制する。また、ヒストン修飾もクロマチン構造を変化させることでプロモーター領域への転写因子の結合に重要な役割を果たしている (7-10)。ヒストンのアセチル化 (AcH3、AcH4) やヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) は、クロマチン構造を弛緩させ、結合部位への転写因子の結合を増加させることで転写促進に作用する。一方、ヒストン H3 の 9 番目と 27 番のリジンのメチル化 (H3K9me3、H3K27me3) はクロマチン構造を凝集させることで転写抑制に働く。

我々は最近、ラット顆粒膜細胞が LH サージ後に黄体する過程において、ヒストン修飾を介したクロマチン構造の変化が、急激に発現増加する STAR 遺伝子や発現低下する



Cyp19a1 遺伝子の発現調節に関与することを報告している。すなわち、StAR 遺伝子プロモーター領域では、ヒストン H4 のアセチル化と H3K4me3 が増加、H3K9me3 と H3K27me3 が減少し、転写活性となるようなヒストン修飾へと変化することで、クロマチン構造が弛緩する一方、Cyp19a1 遺伝子プロモーター領域ではヒストン H3 とヒストン H4 のアセチル化と H3K4me3 が減少、H3K9me3 と H3K27me3 の増加し、転写抑制となるヒストン修飾へと変化することで、クロマチン構造が凝縮し、StAR 遺伝子、Cyp19a1 遺伝子ともに各々の転写因子の結合が変化し、遺伝子の発現が調節されていた (19)。

プロゲステロン合成経路の第一段階である P450scc は、StAR によりミトコンドリアの外膜から内膜に輸送されたコレステロールをプレグネノロンに変換する作用を持ち、その後のプロゲステロン合成に重要な役割を果たしている。その P450scc をコードする Cyp11a1 遺伝子は、StAR 遺伝子と同様に LH サージ後に急激に発現が増加するが、その発現調節についてはほとんど解明されていない。そこで我々は、LH サージ後の Cyp11a1 遺伝子発現調節に、StAR や Cyp19a1 遺伝子と同様にエピジェネティックな制御が関与しているのではないかと注目し、検討をおこなった。

## 【目的】

本研究では、LH サージ後に黄体化過程にある顆粒膜細胞において、Cyp11a1 のプロモーター領域における DNA メチル化やヒストン修飾変化といったエピジェネティックな制御が、Cyp11a1 遺伝子発現に関与しているかを検討した。

## 【方法】

### 1. 検体採取

3 週齢の雌 Sprague Dawley rat (Japan SLC, Hamamatsu, Japan) を用いて、equine chorionic gonadotropin (eCG) (Sigma, St. Louis, MO) を 15 単位皮下注射し、卵胞発育を促した。その 48 時間後に LH サージとして human chorionic gonadotropin (hCG) (Sigma) を 15 単位皮下注射して排卵刺激を行った。hCG 投与前 (0 時間)、投与後 4、8、

12 時間後の卵巣より黄体化顆粒膜細胞を回収し、後述の real-time RT-PCR、クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)、Bisulfite genomic sequencing 法、Western blotting 法、DNase I を用いた Chromatin accessibility assay by real-time PCR (CHART-PCR) 法での解析に供した。本研究は山口大学医学部の施設内動物実験倫理委員会の承認を得ている。

## 2. Real-time RT-PCR

黄体化顆粒膜細胞から total RNA の抽出を行い、これまでの報告通り RT 反応を行い、リアルタイム PCR を施行した (15, 19)。RT-PCR 機器は LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を、試薬には Premix-Ex-Taq (TaKaRa, Ohtsu, Japan) を用いた。Cyp11a1 と内因性コントロール遺伝子として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマーセットは表1に示す。

## 3. クロマチン免疫沈降法 (ChIP assay)

ChIP assay は Upstate 社の ChIP assay キット (Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) を用い、これまでの報告通り行った (12, 14, 16, 19)。まず、黄体化顆粒膜細胞をローテーションさせながら 1% のホルムアルデヒドで 10 分間インキュベーションした。この固定は 0.125 M のグリシンを添加することで反応を止めた。続いてソニケーションを行いクロマチン溶液の調整を行った。このうち 10% を INPUT DNA として保存した。クロマチン溶液に以下の抗体をそれぞれ添加し、4℃、一晩免疫沈降反応を行った。: normal rabbit IgG (Invitrogen)、H3K4me3 (Upstate Biotechnology)、H3K9me3 (Abcam, Cambridge, UK)、H3K27me3 (東京工業大学、木村宏先生より供与)、C/EBP  $\beta$ 、SP-1、SF-1、EZH2 (表2)。免疫沈降物 (IP) を Dynabeads Protein A (Invitrogen) に吸着させた後に溶出させることで回収した。続いて 65℃ 一晩インキュベーションすることで脱クロスリンクを行い、QIA quick PCR purification kit (QIAGEN, Inc, Valencia, CA, USA) を用いて DNA を回収した。Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域に 近位、遠位 領域 のプライ



マーと、Cyp11a1 遺伝子のプロモーター領域にプライマーを表1 に示すように設計し、PCR に供した。PCR 産物は、2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行いエチジウムブロマイドで染色した。ヒストン修飾レベルの相対的定量には、real-time PCR を用いた。IP/INPUT 比の計算には、以下の式を用いた： $IP / INPUT = 2^{-(Ct \text{ of INPUT DNA} - Ct \text{ of IP DNA})}$ 。

#### 4. Sodium Bisulfite genomic sequencing 法

Sodium bisulfite 処理は既に報告されている方法をもとに行った (6, 19)。Bisulfite 変換された DNA を表 1に示すプライマーセットを用いて PCR 増幅処理を行った。PCR のプログラムは 95°C (30秒)、60°C (30秒)、60°C (30秒)、72°C (1分) x 35 サイクル、95°C (10分)、72°C (7分) であった。PCR 増幅産物を pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI) を用いてクローニングした後、Big Dye Terminator V3.1 Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いてシーケンス反応を行い、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で解析した。得られたデータは QUMA を用いて解析した。

#### 5. Western blotting 法

Western blot 法は既に報告している方法をもとに行った (12, 19)。核分画抽出は stepwise lysis of cells (NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents; Pierce, Rockford, IL) を用いて行った。その後、C/EBP  $\beta$  抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、 $\beta$ -tubulin 抗体 (Sigma)、Histon H3 抗体 (Cell Signaling Technology Japan, K.K., Tokyo, Japan) を用いて Western blot 法を施行した。

#### 6. DNase I を用いた Chromatin accessibility assay by real-time PCR (CHART-PCR) 法

クロマチン構造を検討するために、既に確立された DNase I を用いた CHART-PCR (17, 18, 21) を行った。黄体化顆粒膜細胞と RLC-16 細胞から、DUALXtract (Dualsystem Biotech, Zurich, Switzerland) を用いて核分画を回収した。回収した核分画を DNase I (Roche) を用いて 37°C、2 分間インキュベーションを行って DNA の切断を行った後、0.5

M EDTA を用いて反応を中止させた。DNase I 処理 (DNase 処理群) と未処理 (コントロール群) の検体より DNA を精製し、得られた DNA 10 ng と、表 1 に示したプライマーセットを用いて real-time PCR に供した。ラットゲノム DNA を用いて作成したスタンダード曲線と、検体より得られた Ct 値 (threshold values) より、PCR 増幅された目的の領域における、各検体の相対的 DNA 量を計算した。そして DNase 処理群において、DNase I により分解されなかった (保護された) 目的の領域の DNA 量を、コントロール群の DNA 量で除し、相対的クロマチン保護率 (The relative percentage of chromatin protection) の値を計算した。この計算により、高い保護率であれば目的の領域のクロマチン構造が DNase I より保護されている (DNA が切断されにくい)、つまりクロマチン構造が凝縮していると考えられ、また、低い保護率であれば DNA が切断されやすい状態であり、つまりクロマチン構造がより弛緩していると考えることができる。この実験において、RLC-16 細胞は Cyp11a1 遺伝子を発現しておらず、そのプロモーター領域はクロマチン構造が凝縮していると考えられるため、不活性化クロマチン構造のコントロールとして用いた。

## 7. ルシフェラーゼ 解析

ルシフェラーゼ 解析は、以前報告している方法をもとに行った (12)。Cyp11a1 遺伝子の 5 末端領域 (-206 から +19 bp) と (-158 から +19 bp) の領域を Cyp11a1\_MinP と Cyp11a1\_ΔCEBPβ として作成し、表 1 のプライマーセットを用いて、ラットゲノム DNA より複製した。Cyp11a1\_MinP と Cyp11a1\_ΔCEBPβ を pGL3 基本ベクターに挿入し、得られた産物をそれぞれ、pGL3\_MinP と pGL3\_ΔCEBPβ と名付けた。レポーター解析を行うために、KGN 細胞 (ヒト卵巣顆粒膜細胞腫株: Nikon, Tokyo, Japan) を 24-well プレート ( $7 \times 10^4$  cells/well) で 24 時間培養し、レポーターベクター (pGL3\_MinP と pGL3\_ΔCEBPβ) を 170 ng とインターナルコントロールとして pRL-TK ベクターを 30 ng を Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に、0.5 mM dibutyryl-cAMP を添加および無添加で 24 時間処理した。ルシフェラーゼ活性を Dual-ルシフェラーゼ Reporter Assay System (Promega) を用いて測



定した。

## 8. 統計処理

統計学的有意差の検討は、まず一元配置分散分析を行い、その後 Tukey-Kramer 解析による多重比較検討を行った。2 群間の比較検討では t 検定を用いた。全ての検討は SPSS を用いて行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 【結果】

#### 1. Cyp11a1 mRNA 発現

Cyp11a1 mRNA 発現は hCG 投与後急速に増加し、4 時間でピークとなり、以後 12 時間まで有意に高値を維持していた (図1)。

#### 2. Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域におけるヒストン修飾の変化

Cyp11a1 プロモーター領域の近位領域 (-206 から -23 bp)、および遠位領域 (-1721 から -1598 bp) のヒストン修飾の変化を ChIP assay を用いて検討した (図2)。近位領域は、C/EBP $\beta$  (-198 から -188 bp)、SP-1 (-133 から -125 bp) や SF-1/LHR-1 (-66 から -61 bp) の転写因子の結合が予測される領域を有しており、Cyp11a1 遺伝子発現に重要な領域である。一方、遠位領域では転写因子結合配列検索ソフト (MAPPER2 database) における解析で、結合領域は全く検出されなかった。

ヒストンメチル化状態については、近位領域において転写促進に働く H3K4me3 が hCG 投与後 4 時間と 12 時間で有意に高値となったが、遠位領域においては有意な変化を認めなかった (図2、H3K4me3)。転写抑制に働く H3K9me3 は近位領域において 4 時間、12 時間で有意に低値となり、遠位領域では 12 時間で同様に低値となった (図2、H3K9me3)。同じく転写抑制に働く H3K27me3 も近位領域において 4 時間と 12 時間で有意に低値となったが、遠位領域においては有意な変化は認めなかった (図2、H3K27me3)。

### 3. Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域の EZH2 結合変化

ヒストン修飾は様々なヒストン修飾酵素により制御されている。ヒストン修飾酵素の一つである EZH2 は H3K27me3 を誘導し、遺伝子発現を抑制する (25, 26)。我々は最近、ラットの排卵後に、Star と Cyp19a1 のプロモーター領域に EZH2 のリクルートが変化することを報告している (14)。本研究では、Cyp11a1 遺伝子の近位プロモーター領域への EZH2 の結合は、0 時間に比較し、12 時間では有意に低下した。一方、遠位プロモーター領域では有意な変化は認めなかった。

### 4. Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域の DNA メチル化状態

Cyp11a1 遺伝子の近位プロモーター領域 (-403 から -73 bp) の5つの CpG 部位と、遠位プロモーター領域 (-1403 から -1071 bp) の3つの CpG 部位のメチル化状態を検討した。ヒストン修飾を解析した遠位領域 (-1730 bp から -1465 bp) は SINE や LTR といったリピート配列が存在するため PCR プライマーが設計できず、メチル化解析はできなかった。hCG 投与前 (0 時間) は近位プロモーター領域は低メチル化であるのに対し、遠位プロモーター領域は高メチル化状態であった (図4)。これら DNA メチル化状態は hCG 投与後 4、12 時間でも変化を認めなかった (図4)。

### 5. Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造の変化

Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造が変化しているかを検討するために、DNase I を用いた CHART-PCR を行った。近位領域において相対的クロマチン保護率 (relative percentage of chromatin protection) は、hCG 投与4、12 時間後で 0 時間と比べ有意に低下した (図5)。一方、遠位領域に有意な変化は認められなかった (図5)。これらの結果より、Cyp11a1 遺伝子プロモーターの近位領域においては、クロマチン構造が hCG 投与後に弛緩する方向に変化することが示唆された。

### 6. C/EBP $\beta$ の Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域への結合変化



hCG 刺激後、Cyp11a1 近位プロモーターのクロマチン構造が弛緩したことが示されたため (図5)、それに伴い、近位プロモーター領域への転写因子の結合が増加しているかを検討した。近位プロモーター領域は C/EBP $\beta$  の結合配列を有しているが、同部位が C/EBP $\beta$  の結合を介して転写活性に関与していることを示す報告は今まで認められなかった。そこで、同部位の C/EBP $\beta$  結合を ChIP assay を用いて検討した。C/EBP $\beta$  の Cyp11a1 近位プロモーター領域への結合は、hCG 投与前 (0 時間) と比較し、4、12時間後に有意に上昇した (図6A)。western blotting 法では、核内の C/EBP $\beta$  蛋白発現は、hCG 投与後 12 時間まで増加した (図6B)。

## 7. ルシフェラーゼ解析

C/EBP $\beta$  結合配列を含む領域 (-198 から -188 bp) が転写活性を有するかどうかを調べるために、KGN 細胞を用いて ルシフェラーゼ解析を行った。図6に示す通り、C/EBP $\beta$  結合配列を有するプロモーター領域を含むコンストラクト (-206 から +19 bp) に比べ、C/EBP $\beta$  結合配列を除いたコンストラクト (-158 から +19 bp) では、著明にルシフェラーゼ活性が低下した (図6C)。顆粒膜細胞では、LH サージ後の cAMP 刺激が、ERK1/2 シグナルを介して C/EBP $\beta$  を含む数々の転写因子を活性化することが知られているため、cAMP 刺激下での解析を行ったところ、C/EBP $\beta$  結合配列を有するコンストラクトのルシフェラーゼ活性は、cAMP 刺激下で有意に上昇した (図6C)。このことから、C/EBP $\beta$  結合配列は、Cyp11a1 発現制御に関わり、また cAMP 依存的な発現上昇にも関与していることが示唆される。

### 【考察】

本研究では、LH サージ後の排卵過程にある顆粒膜細胞では、黄体化に伴い Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾とクロマチン構造が変化することを示した。hCG 刺激による排卵誘発により、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域で、H3K4me3 発現が増加し、H3K9me3 や H3K27me3 発現が減少し、転写が活性されるヒストン修飾へ変化した。DNA

メチル化は、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域では低メチル化状態に保たれ、hCG 刺激では変化しなかった。これは、近位プロモーター領域が転写に重要な領域であることを示唆している。一般的に、正常組織での近位プロモーター領域の CpG 部位は低メチル化状態であることは周知されている (30, 31)。また、ステロイド産生細胞の近位プロモーター領域におけるクロマチン構造変化は、DNA メチル化よりもヒストン修飾で制御されており、DNA メチル化は、ヘテロクロマチン構造を形成することで遺伝子抑制に働くと考えられている (13)。本研究においても、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域は常に低メチル化状態であり、hCG 刺激後にヒストン修飾が変化し、クロマチン構造が弛緩することで C/EBP $\beta$  結合が増加し、転写が活性化されたと考えられた。すなわち、近位プロモーター領域のヒストン修飾変化によるクロマチン構造の変化が、黄体化顆粒膜細胞の Cyp11a1 遺伝子の急速な発現上昇に密接に関与している。この現象は、エストロゲン合成からプロゲステロン合成への急速なシフトに貢献しており、排卵とそれに続く黄体形成に重要な役割を果たしている (2, 3)。

本研究は、我々が以前報告した以下の 1) ~ 4) の StAR 遺伝子発現のエピジェネティック制御とも矛盾しない。1) DNA メチル化は、StAR 近位プロモーター領域では、hCG 刺激にかかわらず常に低メチル化状態であった。2) StAR 近位プロモーター領域では、hCG 刺激で H3K4me3 発現が増加し、H3K9me3 や H3K27me3 発現が減少した。3) hCG 刺激で StAR プロモーターの近位領域のクロマチン構造は弛緩する方向に変化し、C/EBP $\beta$  の結合が増加した。4) ヒストン修飾の変化とクロマチン構造の変化が、LH サージ後の黄体化する顆粒膜細胞における急速な StAR mRNA 発現の増加に関与している。赤毛ザル (28) やマウス (29) に関する研究では、排卵過程の黄体化する顆粒膜細胞において StAR 遺伝子プロモーター領域のヒストン H3 アセチル化が増加し、H3K9me3 が減少するといった報告がある。しかし、Cyp11a1 遺伝子に関してはヒストン修飾や DNA メチル化を検討した報告がなく、本研究は、Cyp11a1 遺伝子のエピジェネティクス制御を解析した初めての研究である。

我々は、時系列にそって、ヒストン修飾、クロマチン構造、C/EBP $\beta$  結合の変化を調べたが、C/EBP $\beta$  の結合は4、12時間で徐々に増加が見られ、4時間が最大となる Cyp11a1 mRNA



発現とは多少のずれが生じている。このことに関しては、C/EBP $\beta$  以外の転写因子が hCG 刺激後 4 時間での mRNA 発現に寄与しているのではないかと推測している。我々が行った未発表の ChIP assay データでは、Cyp11a1 プロモーター領域での SP-1 の結合は、hCG 刺激後 12 時間では上昇しなかったが、4 時間で有意に上昇した。しかしながら、その結合活性は C/EBP $\beta$  と比較すると低値であった。一方で、LRH-1 の Cyp11a1 プロモーターへの結合も見られたが、hCG 刺激による有意な結合変化は認めなかった。これらの結果より、4 時間における Cyp11a1 mRNA 発現上昇は、C/EBP $\beta$  と SP-1 の協調的な転写活性作用による可能性が考えられる。また、転写因子による発現制御にはコファクターとの転写複合体の形成も重要な因子であると報告されており (32、33)、4時間から12時間の発現変化に C/EBP $\beta$  とコファクターの転写複合体の形成が関与している可能性も考えられる。その他、ステロイド合成関連遺伝子は様々な転写因子による複雑な制御が報告されており (34-37)、抑制系の転写因子が、4時間から12時間にかけて遺伝子プロモーター上にリクルートされる可能性も考えられる。ラット Cyp11a1 遺伝子においては、転写因子による発現制御については未だ不明な点が多く、今後更なる研究が必要と考えられる。

Cyp11a1 プロモーター領域におけるヒストン修飾の変化は、近位プロモーター領域で生じており、遠位プロモーターではクロマチン構造変化は認められなかった。このような領域特異的なヒストン修飾の変化にはヒストン修飾酵素の誘導や遊離が関与している (14)。本研究では、H3K27me<sub>3</sub> を誘導する EZH2 の近位プロモーター領域への結合活性が hCG 刺激後に減少していたが、一方で遠位プロモーター領域では有意な変化は認めなかった。すなわち、EZH2 は排卵誘発後に近位プロモーター領域から遊離することで、H3K27me<sub>3</sub> を低下させ、それによりクロマチン構造が弛緩し、転写因子の結合が増加すると考えられる。この結果は、hCG 刺激後に StAR プロモーター領域における EZH2 の結合活性が低下したことを報告した我々の研究とも一致する (14)。本研究では、Cyp11a1 プロモーター領域での H3K4me や H3K9me 制御に関与するヒストン修飾酵素に関しては検討できていない。プロモーター領域特異的ヒストン修飾の機構を明らかにするためには、関連するヒストン修飾酵素のリクルートを含むさらなる研究が必要である。



Fanらは、排卵には ERK1/2 シグナルが必要であること (39)、さらに、排卵過程において ERK1/2 シグナル伝達経路の下流に C/EBP $\beta$  が存在することをノックアウトマウスモデルを用いて明らかにした (40)。C/EBP $\beta$  は、プロゲステロン産生において STAR と Cyp11a1 遺伝子発現に関与し、卵胞破裂とその後の黄体形成に中心的な役割を果たしている (19、40)。本研究は、C/EBP $\beta$  がラット Cyp11a1 の転写を活性化する重要な転写因子であることを示した最初の報告である。ヒトやマウスでは、-111bp から -24 bp のプロモーター領域は SF-1/LRH-1 や SP-1 の結合領域を含み、転写制御に重要である。一方、-1633bp から -1553 bp の遠位領域は、SF-1 結合領域を含んだ cAMP 結合配列を有し、cAMP 依存的な Cyp11a1 発現に関与する (41-46)。ラットでは、Cyp11a1 遺伝子近位プロモーター領域には、SP-1 および SF-1 に加えて C/EBP $\beta$  の結合部位が含まれる一方、遠位プロモーター領域では、転写因子結合部位検索ソフト (MAPPER2 database) ではヒトやマウスで見られるような転写因子結合部位は検出されなかった (22)。本研究では、Cyp11a1 近位プロモーター領域における C/EBP $\beta$  の結合活性は hCG 刺激後に増加することを示し、ルシフェラーゼ解析により、C/EBP $\beta$  結合部位は転写活性を有することを示した。これらの結果は、ラットにおける近位プロモーター領域の C/EBP $\beta$  結合部位が Cyp11a1 遺伝子の転写に重要であることを示唆している。近年、水谷らは、ヒトの Cyp11a1 遺伝子について -2k bp 上流領域に新たな C/EBP $\beta$  結合部位を報告している (47)。ラットの Cyp11a1 遺伝子の転写調節の詳細なメカニズムは、未だに不明な部分いため、本研究による Cyp11a1 遺伝子の新規調節領域の同定は、ラットにおける Cyp11a1 遺伝子転写制御についてのさらなる研究に役立つものと思われる。

#### 【結語】

本研究は、LH サージ後の黄体化する顆粒膜細胞において急速に増加する Cyp11a1 mRNA 発現に、Cyp11a1 プロモーター領域のヒストン修飾およびクロマチン構造の時間的空間的な変化が関与していることを *in vivo* で証明した。また本研究は、近位プロモーター領域の C/EBP $\beta$  結合部位が、Cyp11a1 遺伝子上の新規に発見された発現制御領域であることも

示した。ステロイド合成関連因子のエピジェネティックな制御機構の詳細な解明により、排卵障害、黄体機能不全や多嚢胞性卵巣症候群など卵巣機能不全の病態を理解するための有効な糸口になることが期待される。

#### 【参考文献】

1. **Wissing ML, Kristensen SG, Andersen CY, Mikkelsen AL, Høst T, Borup R, Grøndahl ML.** Identification of new ovulation-related genes in humans by comparing the transcriptome of granulosa cells before and after ovulation triggering in the same controlled ovarian stimulation cycle. *Hum Reprod.* 2014;29:997-1010.
2. **Tanaka N, Espey LL, Kawano T, Okamura H.** Comparison of inhibitory actions of flomethacin and epostane on ovulation in rats. *Am J Physiol.* 1991;260:E170-174.
3. **Lydon JP, DeMayo, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery Jr CA, Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW.** Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.* 1997;9:2266-2278.
4. **Asada H, Yamagata Y, Taketani T, Maytsuoka A, Tamura H, Hattori N, Ohgane J, Shiota K, Sugino N.** Potential link estrogen receptor- $\alpha$  gene hypomethylation and uterine fibroid formation. *Mol Hum Reprod.* 2008;14:539-545.
5. **Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, Nakai A, Sugino N.** Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS One.* 2013;8:e66632.
6. **Sato S, Maekawa R, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Sugino N.** Potential mechanisms of aberrant DNA hypomethylation on the x chromosome in uterine leiomyomas. *J Reprod Dev.* 2014;60:47-54.
7. **Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T.** DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell.* 2001;1:749-758.



8. **Namihira M, Nakashima K, Taga T.** Developmental stage dependent regulation of DNA methylation and chromatin modification in a immature astrocyte specific gene promoter. *FEBS Lett.* 2004;572:184-188.
9. **Bird A.** Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447:396-398.
10. **Laird PW.** Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet.* 2010;11:191-203.
11. **Dogan N, Wu W, Morrissey CS, Chen KB, Stonestrom A, Long M, Keller CA, Cheng Y, Jain D, Visel A, Pennacchio LA, Weiss MJ, Blobel GA, Hardison RC.** Occupancy by key transcription factors is a more accurate predictor of enhancer activity than histone modifications or chromatin accessibility. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:16.
12. **Tamura I, Sato S, Okada M, Tanabe M, Lee L, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N.** Importance of C/EBP $\beta$  binding and histone acetylation status in the promoter regions for induction of IGFBP-1, PRL, and Mn-SOD by cAMP in human endometrial stromal cells. *Endocrinology.* 2014;155:275-286.
13. **Li B, Carey M, Workman JL.** The role of chromatin during transcription. *Cell.* 2007; 128:707-719.
14. **Maekawa R, Lee L, Okada M, Asada H, Shinagawa M, Tamura I, Sato S, Tamura H, Sugino N.** Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing luteinization during ovulation. *J Ovarian Res.* 2016;9:15.
15. **Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, Taketani T, Tamura H, Sugino N.** Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:E291-299.
16. **Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Tamura H, Sugino N.** Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E1073-1082.

17. **Rao S, Procko E, Shannon MF.** Chromatin remodeling, measured by a novel real-time polymerase chain reaction assay, across the Proximal promoter region of the IL-2 gene. *J Immunol.* 2001;167:4494-4503.
18. **Cruickshank M, Fenwick E, Abraham LJ, Ulgiati D.** Quantitative differences in chromatin accessibility across regulatory regions can be directly compared in distinct cell-types. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367:349-355.
19. **Lee L, Asada H, Kizuka F, Tamura I, Maekawa R, Taketani T, Sato S, Yamagata Y, Tamura H, Sugino N.** Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology.* 2013;154:458-470.
20. **Miller WL.** Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology.* 2005;146:2544-2550.
21. **Sun F, Xie Q, Ma J, Yang S, Chen Q, Hong A.** Nuclear factor Y is required for basal activation and chromatin accessibility of fibroblast growth factor receptor 2 promoter in osteoblast-like cells. *J Biol Chem.* 2009;284:3136-3147.
22. **Marinescu VD, Kohane IS, Riva A.** The MAPPER database: a multi-genome catalog of putative transcription factor binding sites. *Nucleic Acids Res.* 2005;33 (Database Issue), D91-97.
23. **Shih MC, Chiu YN, Hu MC, Guo IC, Chung BC.** Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336:80-84.
24. **Duggavathi R, Volle DH, Matakı C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD, Schoonjans K.** Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Development.* 2008;22:1871-1876.
25. **Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y.** Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 2002; 298:1039-1043.
26. **Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, Pirrotta V.** Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell.* 2002;111:185-196.



27. **Tamura I, Taketani T, Lee L, Kizuka F, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Tamura H, Sugino N.** Differential effects of progesterone on COX-2 and Mn-SOD expressions are associated with histone acetylation status of the promoter region in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:E1073-1082.
28. **Christenson LK, Stouffer RL, Strauss JF 3rd.** Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *J Biol Chem.* 2001;276:27392-27399.
29. **Hiroi H, Christenson LK, Chang L, Sammel MD, Berger SL, Strauss JF 3rd.** Temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modifications at the steroidogenic acute regulatory protein (stAR) locus associated with stAR transcription. *Mol Endocrinol.* 2004;18:791-806.
30. **Johnson IT, Belshaw NJ.** Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol.* 2008;46:1346-1359.
31. **Martinez-Arguelles DB, Papadopoulos V.** Epigenetic regulation of the expression of genes involved in steroid hormone biosynthesis and action. *Steroids.* 2010;75:467-477.
32. **Holmqvist PH, Mannervik M.** Genomic occupancy of the transcriptional co-activators p300 and CBP. *Transcription.* 2013;4:18-23.
33. **Zhang YL, Xia Y, Yu C, Richards JS, Liu J, Fan HY.** CBP-CITED4 is required for luteinizing hormone-triggered target gene expression during ovulation. *Mol Hum Reprod.* 2014;20:850-860.
34. **Lavoie HA, King SR.** Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med.* 2009;234:880-907.
35. **Vanselow J, Spitschak M, Nimz M, Fürbass R.** DNA methylation is not involved in preovulatory down-regulation of CYP11A1, HSD3B1, and CYP19A1 in bovine follicles but may have a role in permanent silencing of CYP19A1 in large granulosa lutein cells. *Biol Reprod.* 2010;82:289-298.
36. **Liu Q, Merkler KA, Zhang X, McLean MP.** Prostaglandin F2alpha suppresses rat steroidogenic acute regulatory protein expression via induction of Yin Yang 1 protein and recruitment of histone deacetylase 1 protein. *Endocrinology.* 2007;148:5209-219.



37. **Stocco C, Kwintkiewicz J, Cai Z.** Identification of regulatory elements in the Cyp19 proximal promoter in rat luteal cells. *J Mol Endocrinol.* 2007;39:211-221.
38. **Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ, Zhao K.** Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet.* 2008;40:897-903.
39. **Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS.** MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science.* 2009;324:938-941.
40. **Fan HY, Liu Z, Shimada M, Johnson PF, Richards JS.** CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- $\alpha$  and  $-\beta$  are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol.* 2011;25:253-268.
41. **Guo IC, Chung BC.** Cell-type specificity of human CYP11A1 TATA box. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999;69:329-334.
42. **Chiang YF, Lin HT, Hu JW, Tai YC, Lin YC, Hu MC.** Differential regulation of the human CYP11A1 promoter in mouse brain and adrenals. *J Cell Physiol.* 2011; 226:1998-2005.
43. **Gizard F, Lavallee B, DeWitte F, Teissier E, Staels B, Hum DW.** The transcriptional regulating protein of 132 kDa (TReP-132) enhances P450<sub>scc</sub> gene transcription through interaction with steroidogenic factor-1 in human adrenal cells. *J Biol Chem.* 2002; 277:39144-39155.
44. **Sher N, Yivgi-Ohana N, Orly J.** Transcriptional regulation of the cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 gene (CYP11A1) revisited: binding of GATA, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating protein (AP)-1 proteins to a 遠位 novel cluster of cis-regulatory elements potentiates AP-2 and steroidogenic factor-1-dependent gene expression in the rodent placenta and ovary. *Mol Endocrinol.* 2007;21:948-962.
45. **Guo IC, Huang CY, Wang CK, Chung BC.** Activating protein-1 cooperates with steroidogenic factor-1 to regulate 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent human CYP11A1 transcription in vitro and in vivo. *Endocrinology.* 2007;148:1804-1812.
46. **Huang Y, Hu M, Hsu N, Wang CL, Chung B.** Action of hormone responsive sequence in 2.3 kb

promoter of CYP11A1. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;175:205-210.

47. Mizutani T, Ju Y, Imamichi Y, Osaki T, Yazawa T, Kawabe S, Ishikane S, Matsumura T, Kanno M, Kamiki Y, Kimura K, Minamino N, Miyamoto K. C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$ ) mediates progesterone production through transcriptional regulation in co-operation with SF-1 (steroidogenic factor-1). *Biochem J.* 2014;460:459-471.

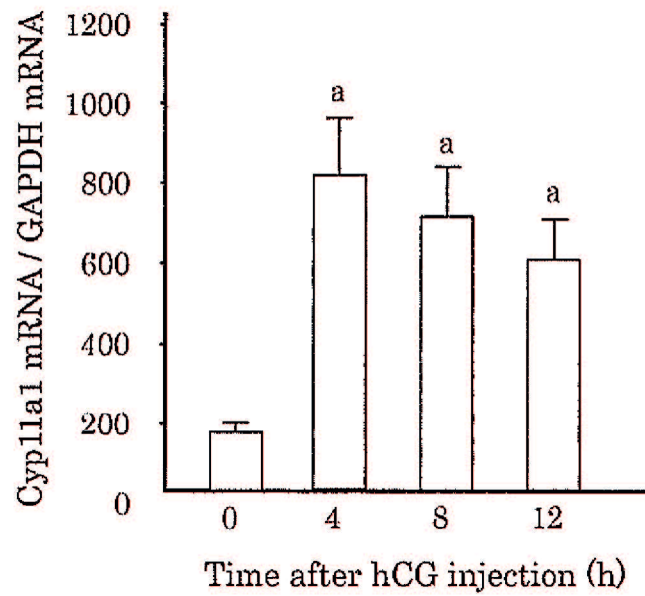


図1. 排卵過程にある黄体化顆粒膜細胞における Cyp11a1 mRNA 発現変化  
 3 週齢幼若雌ラットに eCG を 15 単位、その 48 時間後に hCG 15 単位を皮下投与し、  
 hCG 投与前 (0 時間)、4、8、12 時間後の卵巣から黄体化顆粒膜細胞を回収し、Cyp11a1  
 mRNA の発現変化を real-time RT-PCR 法で検討した。内部コントロール遺伝子として  
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いて補正した。値は mean ±  
 SEM (n=5)、a: P<0.05。

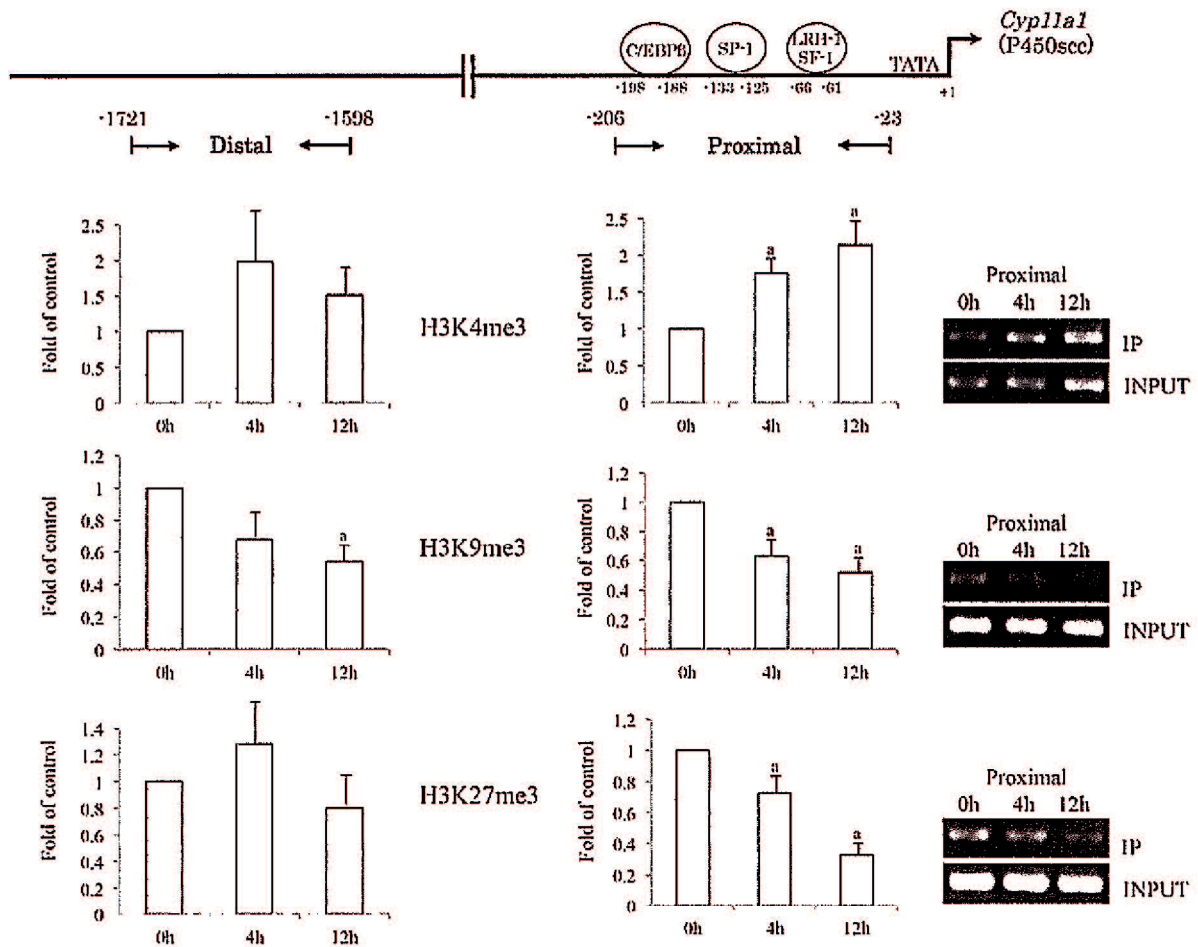


図2. 黄体化顆粒膜細胞における *Cyp11a1* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾の変化  
 ラット *Cyp11a1* 遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位と、ChIP assay で用いたプライマー領域 (近位: -206 bp から -23 bp、遠位: -1721 bp から -1598 bp) を示した。eCG 投与後のラットを用いて、hCG 投与前 (0 時間)、hCG 投与 4、12 時間後の卵巣から黄体化顆粒膜細胞を回収し、実験に用いた (各時間 3 匹のラットから細胞をまとめて回収した)。*Cyp11a1* 遺伝子プロモーター領域のヒストン修飾変化を ChIP assay で検討した。ヒストン修飾は、転写促進に作用するトリメチルヒストン H3K4 (H3K4me3) と、転写抑制へ作用するトリメチルヒストン H3K9 (H3K9me3)、トリメチルヒストン H3K27 (H3K27me3) について検討した。ネガティブコントロールとして Normal rabbit IgG を用いた。INPUT (IN) は、免疫沈降前の検体から精製した DNA を用いた PCR により得られたコントロールである。それぞれのヒストン修飾レベルは real-time PCR を用いて、IP/INPUT 比を計算した後、0 時間との比をとった (方法参照)。グラフの値は 0 時間 (コントロール) との比で表し、mean  $\pm$  SEM (n=3) で表示した。a:  $P < 0.05$  vs 0h。また、PCR 産物を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行いエチジウムブロマイドで染色した。



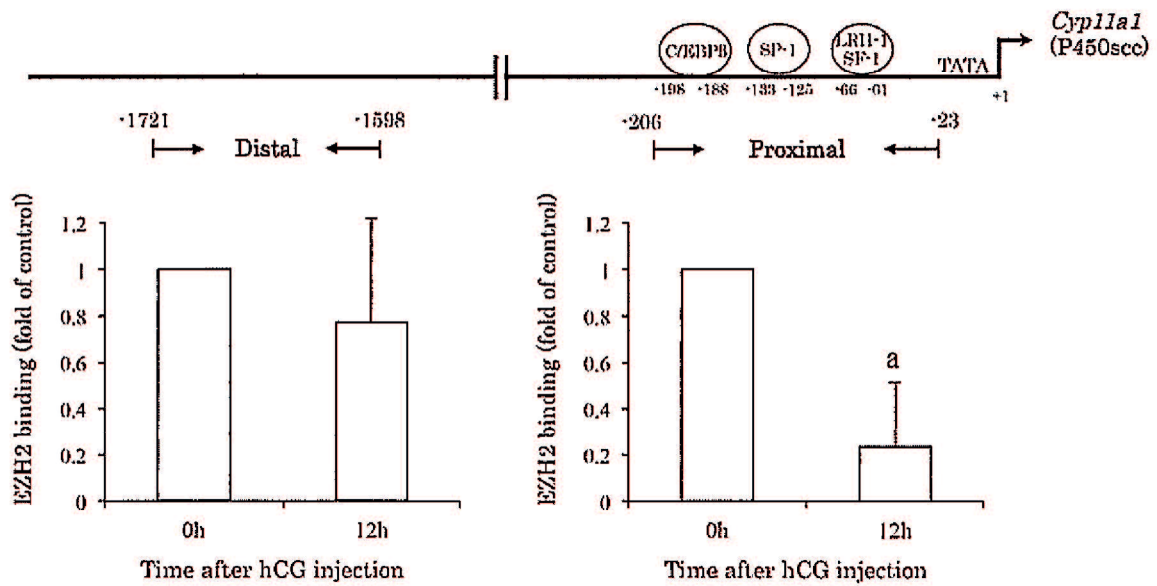


図3. 黄体化顆粒膜細胞における EZH2 の *Cyp11a1* 遺伝子近位プロモーター領域への結合変化

*Cyp11a1* 近位プロモーター領域の EZH2 の結合を ChIP assay にて解析した。hCG 投与前 (0 時間)、hCG 投与 4、12 時間後の黄体化顆粒膜細胞を用い、EZH2 の *Cyp11a1* 遺伝子近位プロモーター領域への結合を ChIP assay で検討した。IP/INPUT 比を計算した後、0 時間との比をとった (方法参照)。グラフの値は mean ± SEM (n=3) で表示した。a: P<0.05 vs 0h。

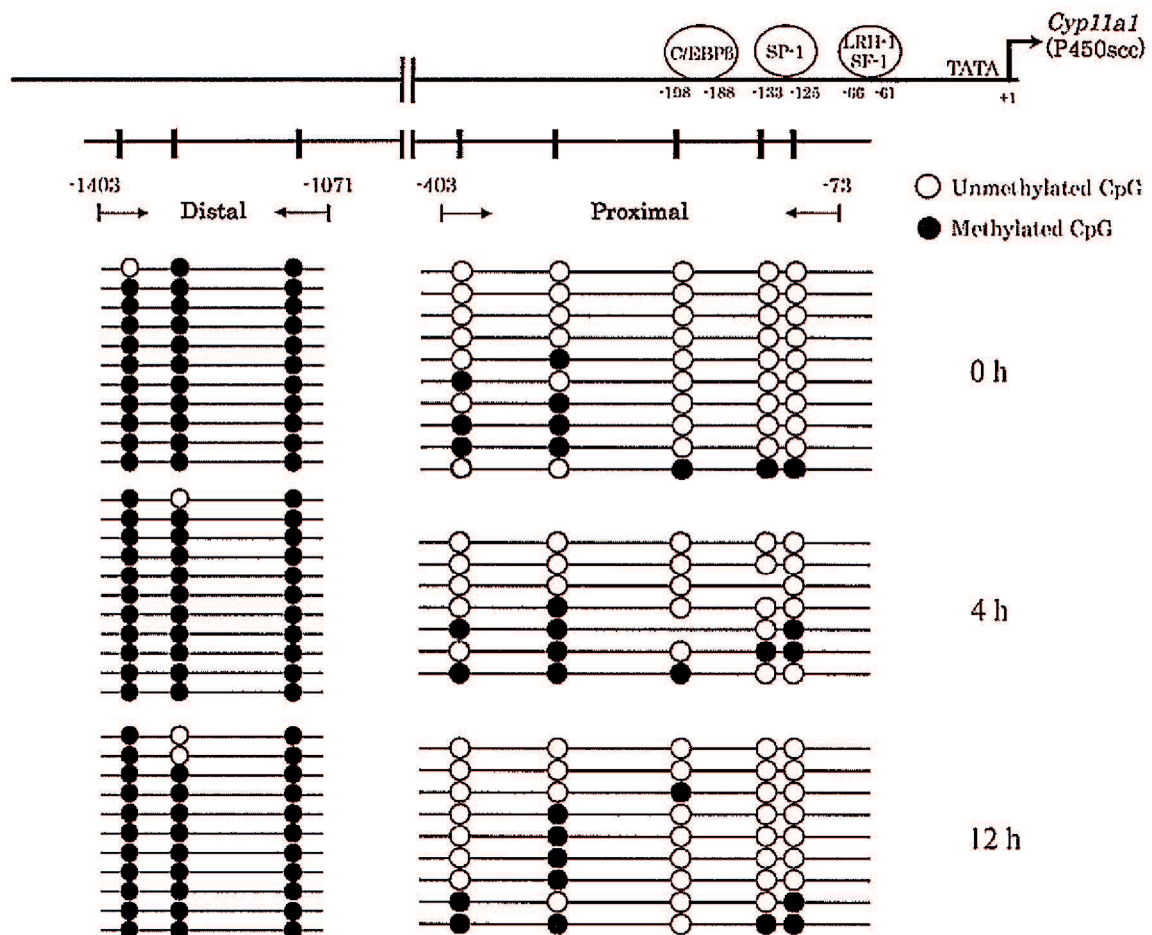


図4. 黄体化顆粒膜細胞における *Cyp11a1* プロモーター領域の DNA メチル化状態  
 上記図は、CpG 部位と転写因子結合部位を示している。短い縦棒はCpG 部位の位置を表している。eCG 投与後のラットを用いて、hCG 投与前 (0 時間)、hCG 投与 4、12 時間後の卵巣から黄体化顆粒膜細胞を回収し実験に用いた。近位プロモーター領域 (-403 から -73bp) と遠位プロモーター領域 (-1403 から -1071 bp) の CpG 部位の DNA メチル化状態を sodium bisulfite genomic sequencing 法を用いて検討した。白丸は脱メチル化 CpG、黒丸はメチル化 CpG を表している。

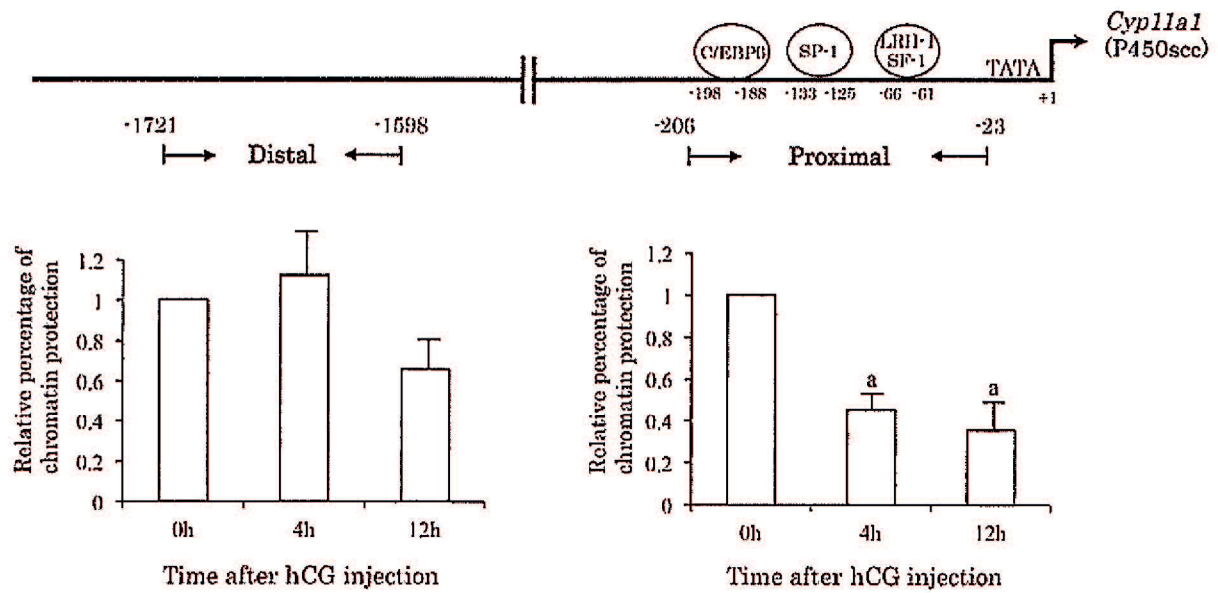


図5. 黄体化顆粒膜細胞における *Cyp11a1* 遺伝子プロモーター領域におけるクロマチン構造の変化

*Cyp11a1* 遺伝子プロモーター領域 (近位: -206 bp から -23 bp、遠位: -1721 bp から -1598 bp) のクロマチン構造変化を検討するため、DNase I を用いた CHART-PCR を施行した。eCG 投与後のラットを用いて、hCG 投与前 (0 時間)、hCG 投与 4、12 時間後の卵巣から黄体化顆粒膜細胞を回収した。核を分離回収し、DNase I を用いて DNA 切断処理を行った。DNA 切断の程度を相対的クロマチン保護率 (The relative percentage of chromatin protection) として計算した後、0 時間との比をとった (方法参照)。グラフの値は mean  $\pm$  SEM (n=3) で表示した。a:  $P < 0.05$  vs 0h。



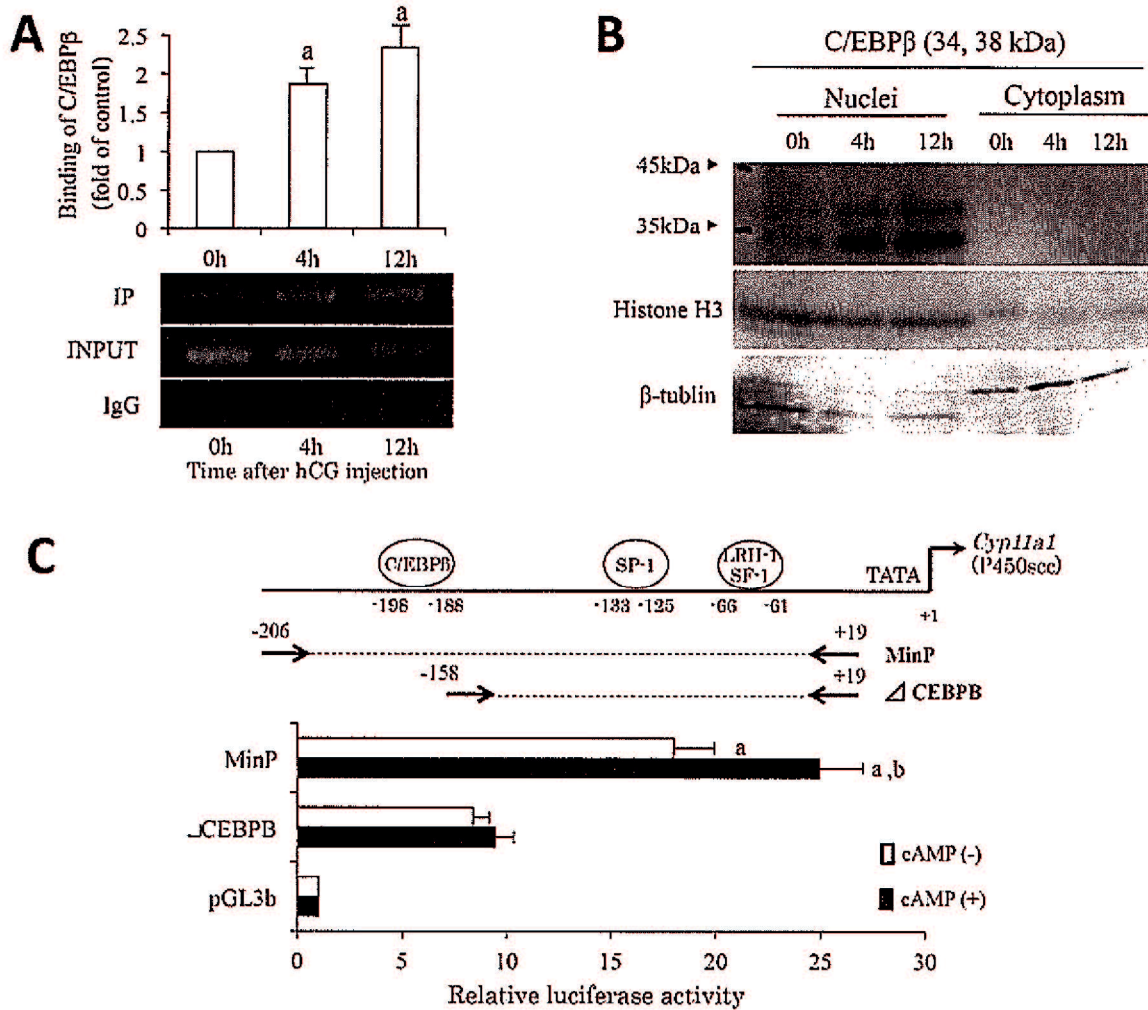


図6. 黄体化顆粒膜細胞における C/EBP $\beta$  の *Cyp11a1* 遺伝子近位プロモーター領域への結合変化

A: *Cyp11a1* 近位プロモーター領域の C/EBP $\beta$  の結合をChIP assay にて解析した。hCG 投与前 (0 時間)、hCG 投与 4、12 時間後の黄体化顆粒膜細胞を用い、C/EBP $\beta$  の *Cyp11a1* 遺伝子近位プロモーター領域への結合を ChIP assay で検討した。IP/INPUT 比を計算した後、0 時間との比をとった (方法参照)。グラフの値は mean  $\pm$  SEM (n=3) で表示した。a:  $P < 0.05$  vs 0h。また、PCR 産物を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動を行いエチジウムブロマイドで染色した。

B: hCG 投与後のラットを用いて、hCG 投与前 (0 時間)、hCG 投与 4、12 時間後の卵巣から黄体化顆粒膜細胞を回収した。細胞の核抽出物を用いて Western blotting 法を用いて検討した。内部コントロールとして Histone H3、 $\beta$ -tubulin を用いた。

C: ルシフェラーゼ解析。レポーター解析を行うために、KGN 細胞にレポーターベクター (pGL3\_MinP と pGL3\_ $\Delta$ CEBP $\beta$ ) とインナーコントロールとして pPL-TK ベクターをトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に 0.5mM cAMP 添加および無添加で 24 時間処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。グラフの値は mean  $\pm$  SEM (n=3) で表示した。a,  $P < 0.05$  vs  $\Delta$ CEBP $\beta$ ; b,  $P < 0.05$  vs cAMP (-)。



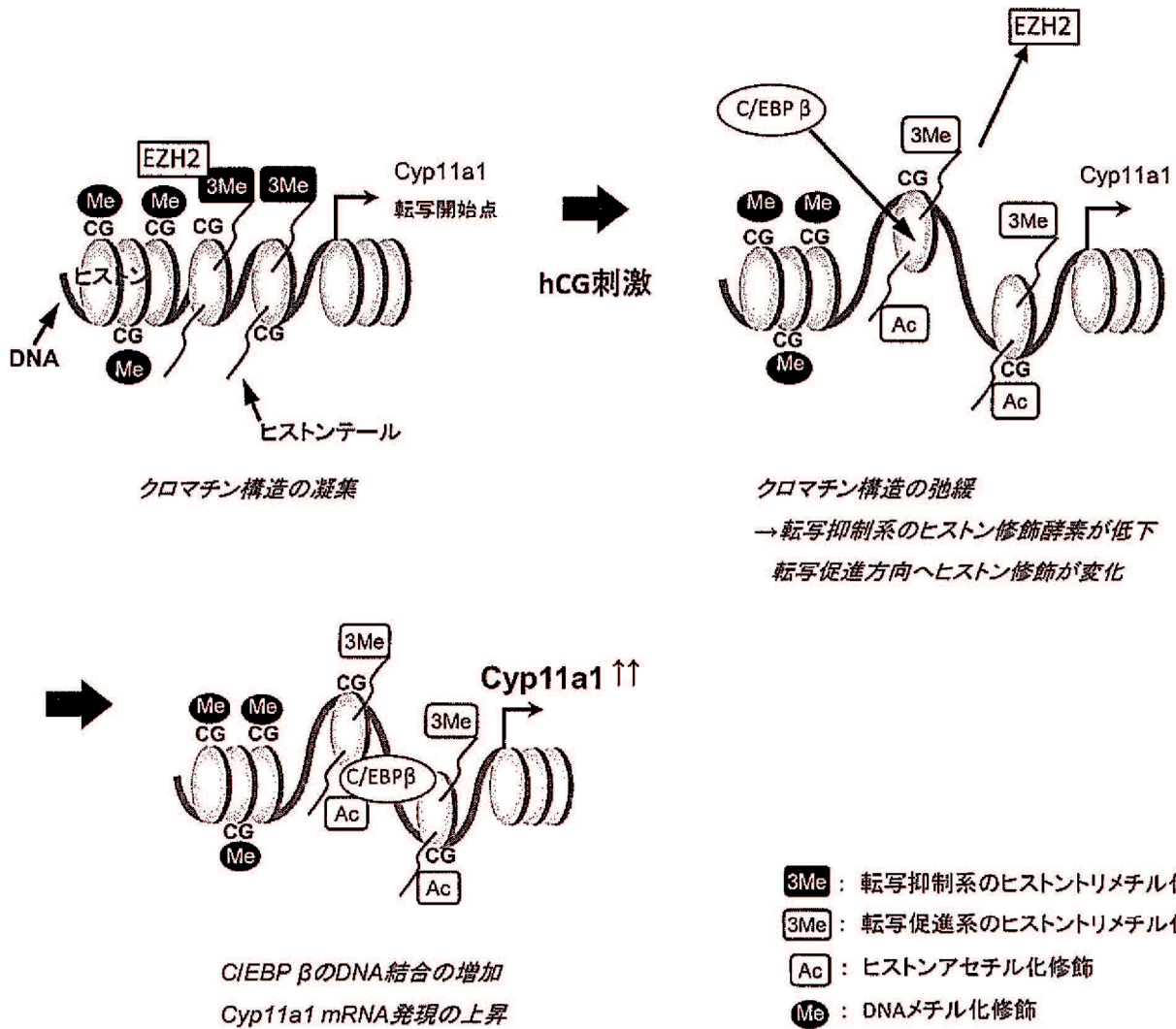


図7. ラット顆粒膜細胞における、hCG投与後のCyp11a1遺伝子発現変化のエピジェネティクス制御  
 Cyp11a1 遺伝子プロモーター領域において、hCG 刺激により転写抑制系のヒストン修飾酵素であるEZH2の誘導が低下し、転写促進となるヒストン修飾変化が起こり、クロマチン構造が弛緩する。そしてC/EBPβのDNA結合が増加し、Cyp11a1 mRNA発現が上昇する。

表1. 使用したプライマー

Genes	Primers	Amplified bp length
<b>RT-PCR</b>		
Cyp11a1	For: TCACATGCAGAATTTCCAGAAG Rev: AGGATGTAAGTACTGACTCCATGTTG	
GAPDH	For: CTCATGACCACAGTCCATGC Rev: TTCAGCTCTGGGATGACCTT	
<b>ChIP PCR</b>		
Cyp11a1 proximal	For: GCCGGTGTTCCTAACTT Rev: CAAACCTCCAGAGCCCACT	184
Cyp11a1 distal	For: TACTTGGGAGACTGGCAGAG Rev: GGGGTTGGGGATTTAGCTCA	124
<b>Bisulfite PCR</b>		
Cyp11a1 proximal	For: ATTGTAGAGTTATAAAGGGTTGGGGATT Rev: AAAAATAATAAAATATTAACCTCCCC	331
Cyp11a1 distal	For: ATAGATATTTGTTTTAAAGGGTGTGTTATTA Rev: ATCCAACCTAACATATTCTTTTTCAACTT	333
<b>Luciferase assay</b>		
Cyp11a1 Minimal primer	For: GAGCTCGCCGGTGTTCCTAACTT Rev: AAGCTTCCCACGACTGCCACTTTC	237
Cyp11a1 $\Delta$ /EBP $\beta$	For: GAGCTCAAAGTTCTTTCTCTGCGTTTGG Rev: AAGCTTCCCACGACTGCCACTTTC	189

Peptide/Protein Target	Name of Antibody	Manufacturer, Catalog Number, and/or Name of Individual Providing the Antibody	Species Raised in; Monoclonal or Polyclonal	Dilution Used
H3K4me3	Anti-H3K4me3 antibody	Upstate Biotechnology, 07-473	Rabbit; polyclonal	1:1000
H3K9me3	Anti-H3K9me3 antibody	Abcom, ab8898	Rabbit; polyclonal	1:1000
H3K27me3	Anti-H3K27me3 antibody	Gift from Dr Hiroshi Kimura (Tokyo Kogyo University, Tokyo, Japan)	Rabbit; monoclonal	1:200
C/EBP $\beta$	Anti-C/EBP $\beta$ antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-150X	Rabbit; polyclonal	1:1000
EZH2	Anti-EZH2 antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc, 5246	Rabbit; polyclonal	1:1000
$\beta$ -Tubulin	Anti-tubulin antibody	Sigma, T-4026	Mouse; polyclonal	1:1000
Histon H3	Anti-histon H3 antibody	Cell Signaling Tachnology Japan, 46205	Rabbit; polyclonal	1:1000