

添付5

論文	<b>Epigenetic regulatory elements associate with specific histone modifications to prevent silencing of telomeric genes</b>
雑誌	Nucleic Acids Research, 2014, Vol. 42, No. 1 193–204 (Published online 25 September 2013)
著者	Stefano Majocchi, Elena Artonovska and Nicolas Mermoud
機関	Laboratory of Molecular Biotechnology, Center for Biotechnology UNIL-EPFL, University of Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland
要旨	<p>真核細胞における導入遺伝子の発現の程度は組換え部位に起こる不利なクロマチン構造によって制限を受ける。エピジェネティック調節配列(epigenetic regulator)はこのような位置効果から導入遺伝子を保護するDNA配列である。本研究は、抑制的クロマチン環境のため遺伝子発現が低いあるいは一貫性に欠けると言われるテロメア領域に配置した異なる幾つかの調節配列の保護活性を評価した。結果概要は以下の通り;</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) 程度は様々であるが、Matrix attachment regions (<b>MARs</b>), ubiquitous chromatin opening element (<b>UCOE</b>) そして、ニワトリ <b>cHS4</b> インシュレーターはバリアエレメントとして働き、テロメア遠位に配置した導入遺伝子を遺伝子抑制から保護した(図2)。</li><li>2) また、<b>MARs</b> が抑制された遺伝子の再活性化頻度を高めることを経時的試験で明らかにした(図3c)。</li><li>3) さらに全ての<b>MARs</b>は他のエレメントと違い、発現レベルの亢進作用を示した(図2)。</li><li>4) <b>MARs</b> は、活発に発現している遺伝子に通常かかわるとされているH3とH4のアセチル化などのヒストンマーカの増加と関連しており、近傍のヌクレオソームにアセチル基を付加することにより抑制クロマチンの伝播を防いでいるようである(図4)。</li><li>5) 一方、<b>UCOE</b>は抑制クロマチンマーカの集積を阻止するように働いた(図4)。</li></ol> <p>本研究から、導入遺伝子発現を増強・安定化に使われる全てのエピジェネティック DNA エレメントは、その作用機序の基礎をなす特徴的なエピジェネティック的痕跡を示すという結論を得た。</p>

## 【分野背景・目的・方法】

### I. 分野背景

真核細胞の核内では、線状の染色体DNAはクロマチンを形成するためヒストンとその他のたんぱく質と結合している。DNAを小さく詰め込む他、クロマチンはDNAの転写、複製を調節する機構として機能している[1]。ヒストン修飾、ヒストン変異体、DNAメチル化など多くの因子は、クロマチン構造に影響を与えており、従ってDNAの転写、複製装置へのアクセスを調節している。

ヒストンテールは多くの修飾を受ける。H3、H4のアセチル化およびH3K4のジノトリメチル化は活発な転写に通常関わっており、そのため真正クロマチン修飾と呼ばれている。逆に、H3K9、H3K27そしてH4K20のトリメチル化は、通常不活性なゲノム領域に見出されるためヘテロクロマチン修飾と命名されている[1]。

テロメアは高度な反復配列の領域で、これにより線状の染色体の末端をDNA修復や組換えから保護している[2]。一般的に哺乳動物のテロメアは、ヒストンの特定のリジン残基の低アセチル化および過剰メチル化で特徴付けられる。例えば、H3K9me3とH4K20me3は構成的なヘテロクロマチンに普通に見出され、テロメアには非常に豊富に存在する[3]。H3K9me3に高い親和性をもつたんぱく質HP1はテロメアに多く存在しテロメアおよびサブテロメア領域の密な詰め込みに貢献している [4]。それにもかかわらず、H2BK5me1 とH3K4me3 のような活性化修飾がテロメアに豊富に存在するが[5]、おそらくこれはヒトとマウスのテロメアではRNA polymerase II により、盛んにTERRAと呼ばれる長い非コーディングRNAが転写されているという事象の反映と思われる[6]。それゆえ、テロメアのエピジェネティック景観に、ヘテロクロマチン的な特徴が多く見受けられるものの、テロメアクロマチンは過去に信じられたような典型的な構成的ヘテロクロマチン構造ではないと現在では考えられている[7]。

サブテロメアDNAは、CpG部位において高度にメチル化されており、マウス胚性幹細胞のDNAメチル基転移酵素の不活性化はテロメアの不安定化をもたらす[8]。同様に、H3K9とH4K20のトリメチル化にそれぞれ特異的に関与するSUV39HとSUV420といったメチル基転移酵素の欠如は、テロメアのヘテロクロマチン環境の喪失を招き、テロメアの構造的完全性を損なう[9,10]。

テロメアの長さも、エピジェネティック景観の維持に重要な因子である。短い反復配列はH3K9およびH4K20のトリメチル化などのヘテロクロマチンマーカの減少を引き起こし、またヒストンアセチル化の亢進を起こす[11]。

最近、H3K27me2/3とH3R2me1などのいくつかの新規の修飾がサブテロメア領域でみつけた[5]。テロメアの特異的なクロマチン環境は、テロメア近位の元々の遺伝子座にある内在性遺伝子あるいはテロメア領域に組み込まれた導入遺伝子のクロマチン仲介性抑制に至る。この現象は、テロメア位置効果(TPE; Telomere Position Effect)と名づけられ、下等から高等までの真核生物に認められる[12-15]。TPEがテロメアから染色体に沿って伝播するSirたんぱく質群の協同的働きに関係している酵母細胞[16]とは異なり哺乳動物のTPEの機構はまだ十分には解明されていない。しかし、アセチル化H3K9 とH3K56を基質とするSir2ファミリーのヒストン脱アセチル化酵素、SIRT6が関与することは知られている [17,18]。実際、SIRT6の欠失は、広範にあるヘテロクロマチン環境を壊し、TPEを無効にすることが示されている[19]。さらに、テロメアの遺伝子抑制は、ヒトサブテロメア領域のCpGアイランドに対するDNAメチル基転移酵素3bによるメチル化のようなヘテロクロマチンマーカの集積に関連している [20]。

安定的導入における導入遺伝子の宿主ゲノムへの自然組み込みでは、近くにある内在性の調節エレメントと挿入部位の遺伝子座におけるクロマチン構造の両方が導入遺伝子の発現に影響する[21]。しかしながら、位置効果のある程度克服出来る様々なエピジェネティック調節配列が真核細胞系で特定されている。そして、そのうちの幾つかは組換え遺伝子の発現や遺伝子治療モデルにおいて実用的に使われている[22]。

これらのエレメントのうち、**インシュレータ**あるいは**バリアエレメント**は、ゲノムを離散的なクロマチンドメインに区分化すると提唱されている[23]。インシュレータはプロモータとエンハンサーの間に入れるとエンハンサー阻活活性[24]あるいはバリア活性を示し、隣接する真正クロマチンドメインへの抑制的なヘテロクロマチン構造の伝播を防ぐものと考えられている[25]。従って、インシュレータは導入遺伝子

の発現安定性を賦与し[26]そして、このことから遺伝子治療用ベクターの安全性を増す手段として有望視されている[27]。多くのインシュレータが幾つかの種で同定されている。そのうち、最も研究されているのはchicken  $\beta$ -globin 5' hypersensitive site 4 (cHS4)であり、エンハンサー阻止とバリア活性を併せもったインシュレータである[28]。

**Matrix attachment regions(MARs)/Scaffold attachment regions(SAR)** は、様々な長さを持ったA+T rich DNA で、もともと核基質/核骨格というよく知られていない核内たんぱく質構造体に結合することから見つかった[29]。これらは真核細胞のクロマチンを50~200Kbのループ構造を形成により異なった調節ドメイン群に組織化すると考えられている。哺乳動物のゲノムには50000以上のMARsの存在が推定されている[30]。ATリッチ以外にMAR配列の類似性はほとんどないが、ひとつの種のMARが他の種でも機能することから進化的保存性を持つと思われる[31]。ニワトリリゾチームMARは導入遺伝子の維持と発現亢進を行うことが知られた最初のMARのひとつである[32,33]。ゲノム規模の試験の結果、新たにそしてより活性の高いヒトMAR 1-68、X-29 およびマウスMAR S4が発見された[30, 34]。MARを発現ベクターに組み込んだ時得られる安定発現細胞集団には3つの特徴がある: (i) 安定的発現細胞の数が増す; (ii) 長期培養において導入遺伝子発現が増強かつ安定化する; (iii) ポリクローン細胞集団における遺伝子発現の変動が小さくなる[33,35]。遺伝子発現の増強は、内在性エンハンサーとMAR配列の相互作用による、あるいは、活性型クロマチン構造が核基質との会合で創出されるという仮説が提唱されている。また、ATリッチコアが二重らせんを不安定化にし、プロモータの転写開始を促進するとも言われているが[31]、いかにしてMARが発現を増強するかの問いに対して十分には答えられてない。

**STabilizing Anti-Repressor (STAR)**は、クロマチン関連抑制効果に拮抗して高効率かつ安定発現を実現する遺伝子配列として提示された[36]。これらは、ヘテロクロマチン関連たんぱく質、例えばHP1、の伝播を阻止する遺伝子配列を持つ細胞のみが生き残れるという遺伝子スクリーニング系で見つけられた。STAR7と40はこれらファミリーのなかで最も活性の高い配列であった。種間保存性が高く(ヒトとマウス)、MARより小さいサイズの新規なDNA配列のファミリーを形成しており、高効率安定産生細胞を迅速樹立するためのハイストリンジェント選択系との組み合わせが可能である[22]。

**Ubiquitous chromatin opening elements (UCOEs)** は、ハウスキーピングたんぱく質のCpG含有プロモータから分離した調節エレメントである[37]。このようなプロモータ由来の調節エレメントはクロマチンの許容的構造(permissive configuration)を維持する“再構成機能”を持っているといわれる[38]。その結果、その配列近傍においての高く一貫した遺伝子発現を可能としている[37,39]。本来、UCOEは16kbにいたるほど比較的大きな配列であったが、活性を保持した新しい小さく合成UCOE配列が創出された[40,41]。現在よく使われているUCOEはHNRPA2B1-CBX3遺伝子座由来である [hnRNPA2/B1およびCBX3 (chromobox protein homologue 3)のプロモータを含む領域]。

本研究では、dual-reporterシステムを用い、導入遺伝子発現の保護活性およびテロメアに広範に存在するヘテロクロマチン環境に置かれた導入遺伝子の構造の修飾などエピジェネティック調節エレメントの性能を評価した。二つのレポータ遺伝子(蛍光たんぱく質)を、被験調節エレメントを挟んで各々テロメア側(テロメア近位)およびセントロメア側(テロメア遠位)に配置、被験調節エレメントの(i) バリア活性、(ii) 抗遺伝子抑制効果および(iii) 転写活性化能を比較した。その結果、MAR、UCOE およびニワトリcHS4は、テロメア遠位のレポータ遺伝子の発現細胞数の増加を促進する一方、テロメア近位の遺伝子は高度に抑制し、バリア効果が示唆された。MARの幾つかはさらに抗遺伝子抑制効果を示した。単クローン性細胞集団を用いたクロマチン免疫沈降法により、これら調節エレメントがクロマチン構造に関して異なる働きをすることが明らかとなった。MARの導入遺伝子発現に関するポジティブな結果は、MAR近傍におけるH3とH4双方の高度なアセチル化によるものと考えられ、一方、UCOEはヘテロクロマチンマーカであるH3K9me3、H4K20me3そしてH3K27me3の蓄積を阻害し、効果を発揮するものと考えられた。

総じて、MARとUCOEの強いクロマチンboundary効果とMARの抗遺伝子抑制効果は独特なクロマチン構造の集積から来るものと結論した。

## II. 目的・方法 (抄訳)

1. 目的: Dual reporter 系を用い、強い遺伝子抑制環境下のテロメア領域におけるエピジェネティック調節 DNA エLEMENTの活性比較を行った。

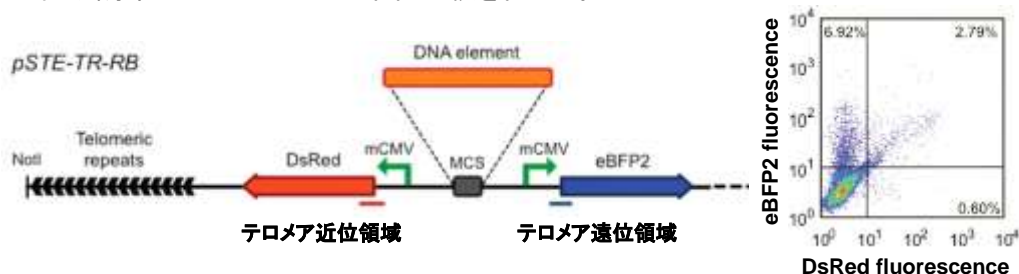


図1a 後成的制御因子の活性比較のためのDual reporterシステム 図1b DNA element(-)

### 2. 方法

- 1) 活性測定系は、テロメア反復配列、エピジェネティック調節 DNA エLEMENT(調節ELEMENTと略)の導入部位(MCS)を挟んでテロメア近位の mCMV+DsRed と遠位の mCMV+eBFP2 の各レポータ遺伝子を含むベクター(図 1a)を用いた組換え細胞系。
- 2) 被験物; 調節ELEMENT 4 系統 10 種類[長さ(kb)で表示]と対照群(詳細は表 1)。
  - (1) MAR1-68(3.6kb), MARX-29(3.5kb), MAR-S4(5.4kb,murine)[30,34], Core MAR X-29(1.4kb;活性コア配列のマルチマー), Core MAR1-68(0.8kb;コア配列に flanking region 付加)と Chicken Lysozyme MAR(cLysMAR, 3kb)を使用。
  - (2) STAR7(2.1kb), STAR40(1kb) [36]
  - (3) UCOE(1kb)[41]
  - (4) cHS4 (1.2kb; chicken  $\beta$  globin insulator) [42]
  - (5) 対照 1; 空の pSTE-TR-RB(結果は図 1b)
  - (6) 対照 2; 0.5-5.6kb の 5 種類の Utrophin 遺伝子断片を同じ長さの調節ELEMENTの対照とした(スペーサ対照)。
- 3) クロマチン免疫沈降法
  - (1) 抗体(製品コード)は以下の通り; AcH3(06-599)、AcH4(06-866)、H3K27me3(07-449) 以上 Millipore から購入、H3K4me3(ab8580)、H2BK5me1(ab12929)、H3R2me1(ab15584)、H3K9(ab8898)および H4K20me3(ab9053)は Abcam 社から購入
  - (2) HeLa 細胞は1%ホルムアルデヒドでクロスリンク後、プロテアーゼ阻害剤カクテル存在下で溶解。クロマチンを平均サイズ 400bp となるよう超音波処理。ChIP 用緩衝液で希釈。プロテイン A セファロースビーズ処理により得た pre-cleared chromatin を各抗体による免疫沈降(4C、overnight)に供した。プロテイン A ビーズで回収した免疫沈降クロマチンを洗浄、ビーズから溶出後、クロスリンクを解除、DNA を回収した。これを二つのレポータ遺伝子の Quantitative PCR 用試料とした。

Table 1. Epigenetic regulators and control elements used in this study

DNA elements	Element size (kb)	Plasmid full name	Short name
Empty vector	-	pSTE-TR-RB	0kb
0.5 kb Utrophin control fragment	0.5	pSTE-TR-RB-0.5 kb	0.5kb CTRL
1 kb Utrophin control fragment	1	pSTE-TR-RB-1 kb	1kb CTRL
2 kb Utrophin control fragment	2	pSTE-TR-RB-2 kb	2kb CTRL
3 kb Utrophin control fragment	3	pSTE-TR-RB-3 kb	3kb CTRL
5.6 kb Utrophin control fragment	5.6	pSTE-TR-RB-5.6 kb	5.6kb CTRL
Human MAR 1-68	3.6	pSTE-TR-RB-1-68	1-68
Human MAR X-29	3.5	pSTE-TR-RB-X-29	X-29
Murine MAR S4	5.4	pSTE-TR-RB-S4	S4
Chicken Lysozyme MAR	3	pSTE-TR-RB-Lys	c-Lys
Human MAR 1-68 Core + flanking region	1.4	pSTE-TR-RB-C1-68	Core 1-68
4X Core MAR X29	0.8	pSTE-TR-RB-CX29	Core X-29
Chicken beta-globin HS4 Insulator	1.2	pSTE-TR-RB-HS4	cHS4
UCOE from the HNRPA2B1-CBX3 locus	1	pSTE-TR-RB-UCOE	UCOE
STAR Element 7	2.1	pSTE-TR-RB-STAR7	STAR 7
STAR Element 40	1	pSTE-TR-RB-STAR40	STAR 40

## 【結果】

### I. 幾つかのエピジェネティック調節DNAエレメントが有意に導入遺伝子発現を促進した。

調節エレメントを置かない対照1の安定導入細胞群ではテロメア近位のDsRed1は抑制を受けたが、遠位のeBFP2は少数の細胞で発現が見られた(図1b)。このDual reporter系はクロマチン隔離と転写活性化という二つの異なる効果の評価できるように設計されている。酵母では、ヘテロクロマチンはテロメアからセントロメアに向かって伝播することが知られており、類似現象が高等真核生物でも起こると考えられている。それゆえ、強いインシュレータ活性が遠位のeBFP2のより高い発現を誘起し、一方、強力な転写活性化能はむしろ双方のレポータ遺伝子の転写を増加させることが期待される。実際、完全長MAR4種とcHS4はeBFP2発現をほぼ二倍まで増加させ、少し弱いUCOEでも発現細胞数の増加活性を示すなど調節エレメントのバリア活性(barrier activity)が示唆された。

さらにこの4種のMARは、STAR40と共にDsRed 陽性細胞の増加をもたらした。eBFP2陽性細胞の5%以上の出現頻度に対して、DsRed 陽性細胞の出現頻度は、統計的に有意な場合でも1%以下であった。MARとSTAR40はテロメア領域に配置された時、抗遺伝子抑制活性を発揮することが示唆された。尚、この導入遺伝子(DsRed)抑制がテロメア領域への組込みの結果起こったことを確認するため、テロメア反復配列を欠き被験対象調節エレメントを組込んだプラスミドを作成、テロメア以外の領域への組込みを行い、テロメア以外の場所にランダムに組込まれた発現細胞出現頻度が二つのレポータ遺伝子の間で差がないことを確認した。

総じて、これらの結果は、有意なバリア活性がMAR、UCOE および cHS4にあること、そして、転写活性化能がMAR および活性は低いSTAR40にあることを示唆した。興味あることにMARのコア配列主体の被験調節エレメント2種にはバリア活性がなく、活性発現には当該MARの他の部分配列がさらに必要であるという前回の結果(Nature Methods, 2007)と一致した[30]。

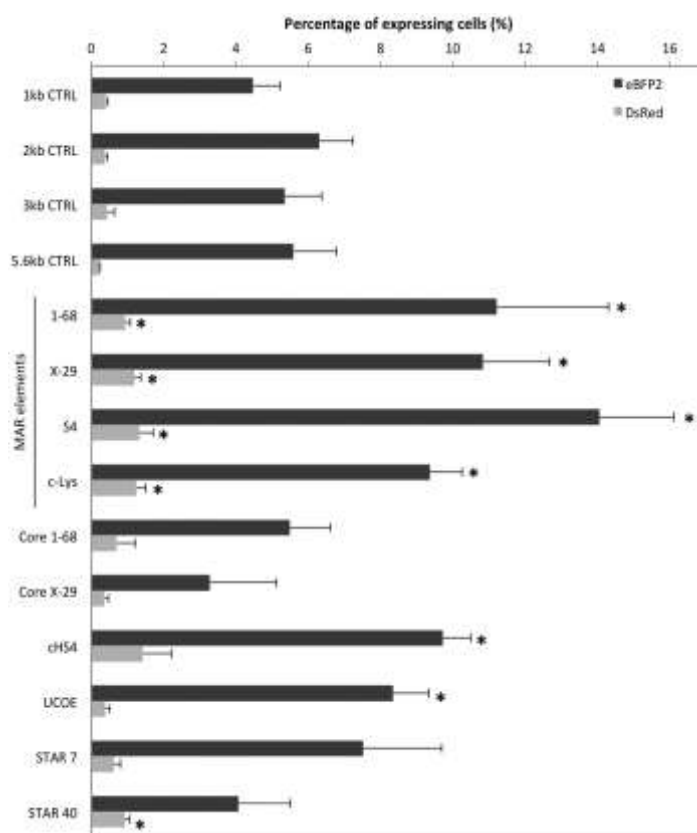
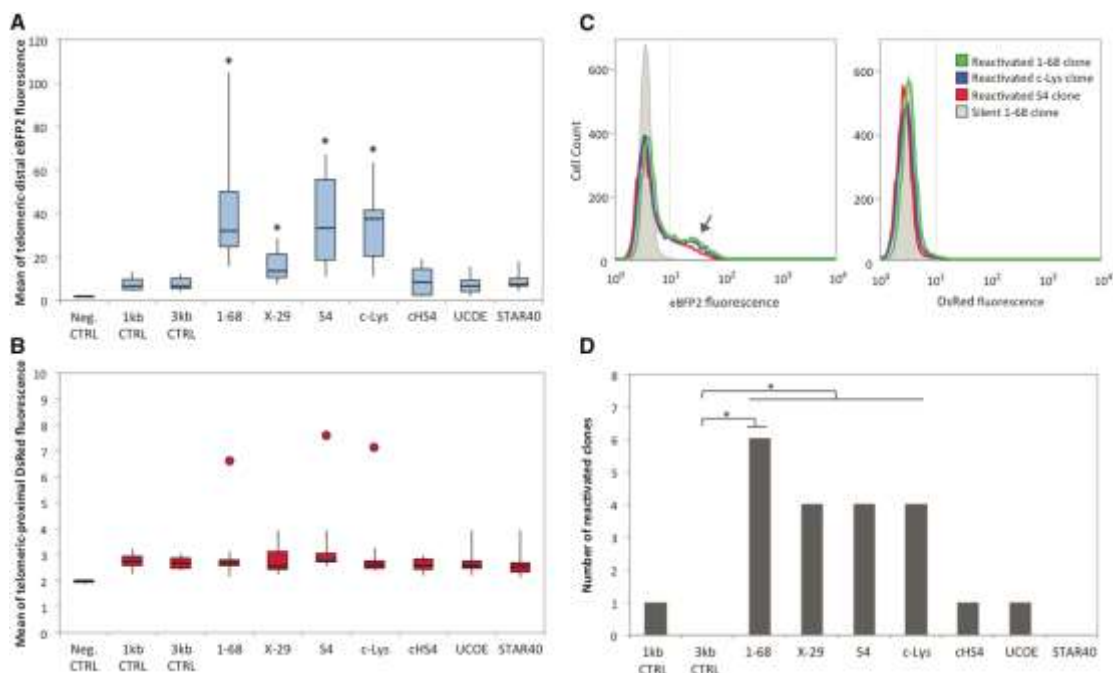


図2 導入遺伝子発現細胞の出現頻度

HeLa細胞に各種被験調節エレメントを含んだpSTE-TRRBベクターを導入し抗生物質選択培地で15日培養した。さらに抗生物質無しで2週間培養後、細胞をFACSで分析した。赤色あるいは青色蛍光たんぱく質を発現する細胞の%を測定した。平均値、標準偏差は3回の独立した試験結果から求めた。星印は同等長さの不活性DNAエレメントを組込んだ比較対象細胞群に比べ統計的に有意であることを表している(Student's t

## II. エピジェネティック調節 DNA エLEMENTは単クローン性細胞集団で固有の発現パターンを誘導



抗導入遺伝子抑制活性を示す各調節エレメントが誘起したポリクローナル細胞集団から単クローン性細胞のソーティングを行い選択圧力無しに増殖させた。非テロメア領域への組込み細胞を避けるため DsRed に関して均質で比較的弱い発現を示した株を確保した。各調節エレメント当り 12 クローンの eBFP2 と DsRed の平均発光量をフローサイトメトリーで測定した。1kbと3kbスペーサ対照は変動が少なく総じて両レポータ遺伝子の非常に僅かな発現を示した。ばらつきが大きいMAR由来クローンはeBFP2の蛍光発現の増加を示したが、他の調節エレメントには発現増強は認められなかった。一方、MAR 1-68、mouse MAR S4 そしてchicken lysozyme MAR 以外の調節エレメントはどれも有意なDsRedの発現増強活性を示さなかった(図3B)。これらのMAR配列は、テロメアのような強烈な遺伝子抑制状態の環境下でも転写アクチベータとして働く可能性がある。ポリクローナルな安定発現系から出発し、非発現細胞の単クローン性細胞集団を培養した。FACSにより非発現性を確認したいくつかのクローンのゲノムDNAのPCRの解析からレポータ遺伝子が欠落しておらず組み込まれていることを確認した。これは欠落ではなく強力な導入遺伝子抑制を示唆している。これらの遺伝子抑制を受けたクローンを選択圧力がない条件で二週間培養を継続したところ幾つかのクローンはeBFP2発現を回復した(Figure 3C)。調節エレメント毎に活性回復クローン数が細胞集団の1%以上陽性であること基準に陽性率を求めた。MAR 1-68 は24クローン中6クローンが選択培地を使わない2週間の培養で陽性を示し、唯一統計的に有意な再活性化能を示した(図3D)。完全長MAR4種はグループ全体としても有意な再活性化可能を示している。

## III. テロメアクロマチンの修飾における調節DNAエレメントの影響

1. 調節エレメントの作用機序を探るために、テロメア近位、遠位のレポータ遺伝子のプロモータ領域におけるエピジェネティック修飾を調べた。ヒストンの化学的修飾パターンは、活性化修飾(AcH3、AcH4、H3K4me3)、(H2BK5me1、H3R2me1)、抑制性修飾(H3K27me3、H3K9me3、

H4K20me3)について各調節エレメント導入細胞とそのスペーサ対照を用い、クロマチン免疫沈降法(ChIP)で解析した。

2. また、被験クローンの発現プロファイルはクロマチン調製の時に、導入遺伝子のmRNA濃度とよく一致することが示された(補遺図S2、S3)。

3. FISH分析は、有糸分裂中期細胞の染色体に対してテロメア反復配列およびpSTE-RBのプローブを用いた。それにより各クローンがテロメアサイトにひとつの挿入サイトを持つことを確認した(補遺図S4)。

4. ゲノム当りの導入遺伝子のコピー数の推定は、全細胞DNAの定量PCRで調べ、1コピー/ゲノムの結果を得た。各被験調節エレメントにつき求めた2クローンのChIP試験の結果は平均値を取り対照に対しての倍率で表した(図4)

- スペーサ対照のヒストンの修飾レベルの解析からテロメア近位のレポータ遺伝子プロモータでは(サブ)テロメア領域に見られるH3K9me3、H4K20me3、H2BK5me1そしてH3R2me1のヒストン修飾の存在が明らかとなった(補遺図S5)。
- クロマチンレベルではヒトMAR1-68、X-29そしてマウスMARS4がオープンクロマチン構造に関するマーカを増強していた(図4と補遺図S5)。
- MAR X-29では両レポータ遺伝子に活性クロマチンマーカ、AcH3、AcH4およびH3K4me3の増加を示した。さらに、テロメア近位でヘテロクロマチンマーカ、H3K9me3とH4K20me3を減少させた。
- MAR S4 は、主にテロメア近位で真正クロマチンマーカ、H3K4me3、AcH3およびAcH4の増加を起し、一方抑制性クロマチンマーカ3種全ての減少をもたらした。
- MAR 1-68 は、テロメア遠位で働き、抑

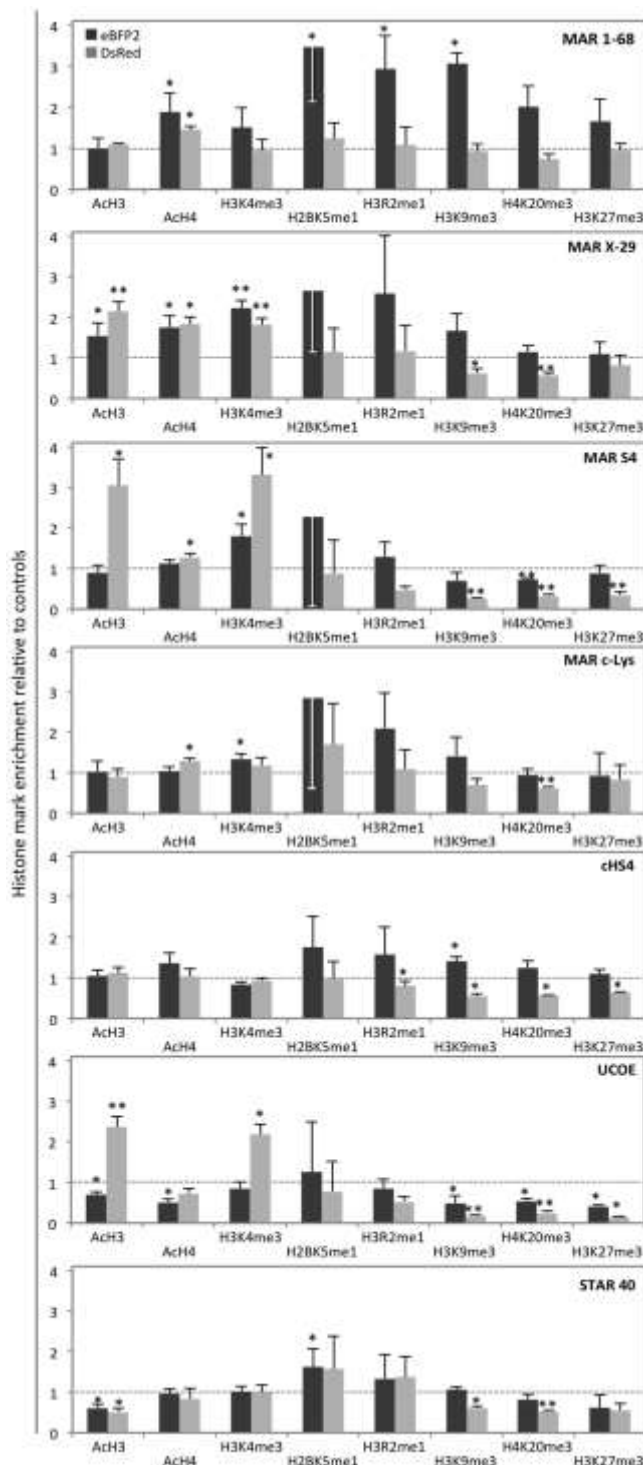


図4 調節エレメントのヒストン修飾に対する影響  
導入遺伝子領域におけるヒストン修飾の存在をChIPで評価した。以下の抗原に対する特異的抗体を用いた; AcH3、AcH4、H2BK5me1、H3R2me1、H3K4me3、H3K9me3、H4K20me3、H3K27me3、免疫沈降したDNAはqPCRで定量した。各調節エレメントについて2クローンを試験に供し、平均と標準偏差を3回の独立した試験から求め調節エレメントに相当する長さのスペーサ対照に対しての倍率を計算した(Studentのt-検定 \*P<0.05; \*\*P<0.01)。



番号: Selexis\_2013\_Sept\_Nuc. Acid Res.  
分野: MARs(エピジェネティック修飾、競合技術)

制状態から活性化を促す(図3、補遺図S3)。MAR 1-68存在下のeBFP2 の発現は、AcH4、H2BK5me1、H3R2me1、の真正クロマチンマーカの増加を伴う。尚、抑制性と言われるヘテロクロマチンマーカH3K9me3の増加もテロメア遠位でみられた。

- ニワトリリゾチームMARは、他のMARに比べ活性が弱く、活性および抑制性クロマチンマーカ間の差はごく僅かであった[30]。ただし、テロメア近位のAcH4 は有意に高い値を示した(図4)。
- UCOEではクロマチンレベルでの特に高い活性が示された。すなわち、H3K9me3 と H3K27me3 など抑制性のマーカの欠落に加えテロメア近位のDsRed遺伝子プロモータにおけるAcH3およびH3K4me3の顕著な増加が認められた(図4)。しかし、同じような修飾プロファイルをもつMARS4とは異なり、UCOEによるクロマチンレベルでのこの高い活性はテロメア近位のDsRedの発現を促すには必ずしも十分でなかった(図2と補遺図S2)。
- cHS4インシュレータについてはテロメア近位で抑制性クロマチンマーカの弱い誘導を示し、また真正クロマチンマーカに影響しないことは、この調節エレメントのバリア活性と一致している。
- STAR 40は、真正およびヘテロクロマチンマーカ、双方の減少をもたらす。これは導入遺伝子発現への本調節エレメントのそれほど強くない効果を反映したものであろう。

総じて、ChIPの結果は、被験調節エレメントが誘導する異なるエピジェネティック状況を反映したものであった。表2に示したが、MARは活性化ヒストンマーカを増やし、一方UCOEは抑止的修飾の低レベルに維持するように働く傾向が認められた。

Table 2. Histone modifications and other transcriptional activities associated with epigenetic regulators

DNA element	Boundary activity <sup>a</sup>	Transcriptional activation <sup>b</sup>	Reactivation <sup>c</sup>	Histone modifications <sup>d</sup>								
				Euchromatin		(Sub)telomeric		Heterochromatin				
				AcH3	AcH4	H3K4me3	H2BK5me1	H3R2me1	H3K9me3	H4K20me3	H3K27me3	
Human MAR 1-68	++	++	++	~	+	~	~	++	++	++	~	~
Human MAR X-29	++	+	+	++	+	+	~	~	~	~	~	~
Murine MAR S4	++	++	+	++	+	++	~	~	~	~	~	~
Chicken Lysozyme MAR	+	++	+	~	+	+	~	~	~	~	~	~
HS4 Insulator	++	-	-	~	~	~	~	~	~	~	~	~
1 kb UCOE Element	+	-	-	++	~	++	~	~	~	+	~	~
Star Element 40	-	-	-	~	~	~	~	~	~	~	~	~

- <sup>a</sup> バリア活性(“境界”活性)は、ポリクローン性細胞集団におけるeBFP2発現細胞数の亢進を比べた(図2)。対照に対する倍数をもとにクラス分け; ++は2倍以上, +は2倍以下だが有意な増加。-は陰性。
- <sup>b</sup> 細胞の発光強度の中央値を転写活性の強さの指標とした(図3A); ++は3倍以上, +は2倍以上。
- <sup>c</sup> 再活性化の頻度を、遺伝子抑制を受けたクローンを2W培養し、回復したクローン数に基づき表記(図 3D); ++ (20%以上), +(10%以上) or - (10%以下)
- <sup>d</sup> テロメア近位のDsRed(上段)とテロメア遠位のeBFP2(下段)におけるヒストン修飾の増加(+)と欠失(-)をChIPデータに基づき示した。スパーサ対照と比べ++は2倍以上、--は0.5倍以下、~変化無し。



## 【考察】

真核生物のゲノムは特徴あるクロマチドメインに機能的に区分され、遺伝子発現を初めとする異なる生物学的過程の調節に役立っていると考えられている。導入遺伝子のゲノムへの組込みは、組込み部位の特別な環境に起因する不安定な発現に終わるかもしれない。エピジェネティック調節配列は、この位置効果を最小限に抑え、より安定した導入遺伝子の発現をもたらす可能性がある[22]。本研究では、幾つかの調節エレメントの抗導入遺伝子抑制活性をテロメア領域に組み込むことで比較検討した。

MARがテロメア領域で遺伝子抑制を阻止することを示した。完全長のMARは、いずれもテロメア遠位レポータ遺伝子を発現する細胞の割合を増加させる一方、テロメア近位の遺伝子抑制に対しては、対照に比して有意ではあるが低いレベルの抵抗性しか示さなかった。これからMARはこのクラスの調節エレメントとして卓越したバリア活性を持つことが明らかとなった。さらに、MARは、遺伝子抑制を受けた細胞集団を高頻度で再活性化すること示した。最後に、MARは、発現蛍光たんぱく質定量とmRNA濃度測定でテロメア遠位の導入遺伝子の転写効率を高めることが明らかになり、転写アクティベータとして働くことが示唆された。これらの結論は、MARが、クロマチンの易転写性構造を取るための局所的な修飾を促進するという知見によりさらに支持された。特に、H4のアセチル化は4種のMAR全てのテロメア近位で起こっており、それに加えH3のアセチル化は二つの活性の高いMAR、X-29とS4で促進された。ヒト骨肉腫細胞株U2OS株の他のMARで報告されたように、アセチル化ヌクレオソームの存在はヒストンアセチル転移酵素の誘引に起因すると考えられる[44]。興味あることにヒストン脱アセチル化がヒト細胞におけるTPE (Telomere Position Effect)に向けた第一段階と報告されており、次に続く連続的なヒストンメチル化がテロメアのヘテロクロマチンの形成には必須である[19]。MARは隣接するヌクレオソームにアセチル基を付加することによって抑制性クロマチンの伝播にインスレーターあるいはバリア的調節エレメントとして拮抗して働くのであろう。さらにマウスMAR S4とヒトMAR X-29は通常活性プロモータに見出されるH3K4me3の蓄積を促進した[45]。この修飾は、二つのヘテロクロマチンマーカのH3K9me3とH4K20me3の生成をある程度阻害することが知られており[46]、これら二つのMARによって仲介される初期の強い遺伝子発現と関係していると考えられる[30,34]。本研究における幾つかのMARの導入遺伝子の発現の効果が限定的であったのは組込みサイトにおける新たなテロメアの形成時に1コピーのみの組込みが行われたからである。実際、MARによって誘導される導入遺伝子発現の亢進が一部にはその組み込みコピー数に起因しているとの報告がある[47,48]。このことは、MARS4とMARX-29と同時比較した時クロマチン修飾と導入遺伝子発現に関して、MAR1-68は以前の報告中安定発現系で試験したMARのなかで最強の活性を示したひとつであるにもかかわらず、これらMARと同等の結果を示したことをある程度説明している。MAR1-68含有クローンはeBFP2プロモータ領域のH3K9me3修飾の多さにも関わらず、高く安定な導入遺伝子の発現を示した。このように、MAR 1-68はプロモータ上のH3K9me3の修飾に拮抗して転写促進を示すのは、H3K9me3が特別なゲノム上の前後関係などでプロモータ活性化と関連するなどの理由によるものかもしれない[49-51]。さらに、本研究で、MAR 1-68はテロメア領域で導入遺伝子抑制を受けた細胞集団から高頻度に発現を再活性化する細胞群が現れることを示したが、これはMAR 1-68が長期間培養において安定した遺伝子発現能を細胞に付与することと関係した現象かもしれない[35]。総じて、これらの結果は、MARの安定かつ高い導入遺伝子の発現をもたらすというこれまでの報告を再確認するものであった[31]。

UCOEは、ハウスキーピング遺伝子のプロモータ領域に由来するCpGアイランド含有DNA配列である。本研究で用いたUCOEは比較的短い配列であるが大きなUCOE含有配列を持つほとんどの特徴を保持している[41]。テロメア領域において、UCOEはテロメア遠位のレポータ遺伝子発現細胞の

増加を誘導した。これはバリア効果による遺伝子抑制からの保護による。しかし、この調節エレメントは、高い転写率から得られであろう蛍光量の増加を誘導しなかった。興味あることに、UCOE近傍のクロマチン環境はヒストン修飾、特にヘテロクロマチンの抑制マーカは非常に少ないものであった。理由のひとつとして、UCOEは、ヌクレオソーム稀少領域を形成することが考えられる。これは、CpG領域はヌクレオソーム欠落領域[52]、あるいはHNRPA2B1-CBX3 UCOE 遺伝子座の内在性プロモータにはヌクレオソームが比較的稀[38]という二つの報告と一致している。UCOEが仲介するヘテロクロマチンマーカの脱落にもかかわらず、テロメア近位にあるDsREDの発現の欠如に関連して、UCOEではむしろ抵抗性を示し、MARでは促進したH4の過剰アセチル化などの真正クロマチン修飾が遺伝子発現にさらに必要とされると推論した。総じて実験デザインが異なるが、ここでの知見は、内在性HNRPA2B1-CBX3 UCOE 遺伝子座での発現がヒストンの活性化修飾(H3K4me3、H3 とH4のアセチル化)亢進と抑制性修飾の減少(H3K27me3)を伴うという従来報告と一致した。また、このような修飾パターンの欠如が抑制された遺伝子の再活性化がUCOEで起こらないことを説明している。

ニワトリβ-グロビン**HS4 エlement**は良く知られたインシュレータで、二つのコピーに挟まれた導入遺伝子の発現をTPEから保護する。本試験では1コピーのcHS4エレメントがテロメア遠位の遺伝子発現をTPEから保護するに十分であることを示した[53]。MARとともにcHS4エレメントは、この一貫した強力なバリア活性によりテロメア遠位のeBFP2発現細胞の出現頻度を最も高めた。MAR1-68と同様、本エレメントの場合も豊富なH3K9me3をeBFP2のプロモータ領域に認めた。これはcHS4に関するRincon-Aranoの報告と一致している[52]。非テロメア領域での活性に関する報告では、cHS4 のバリア活性は近傍のヒストンのアセチル化を伴うことを示唆した[54,55]。しかしながら、ここでは cHS4近傍のヒストンの高度なアセチル化は見出せなかった。おそらくここで構築した染色体構造の中で導入遺伝子を挟んで1コピーのみのcHS4が存在することを反映しているのであろう。異なるバリア活性に関するモデルが提唱されている。あるものはヒストンアセチル化酵素の誘引予測させるもの、一方ヘテロクロマチンの伝播をDNAループ機構など純粋に空間的な干渉により阻害するモデルなどがある[56]。ここでのデータはそれゆえcHS4インシュレータは挿入部位におけるクロマチン環境に応じて異なる働き方をしているという説を指示している。

**STARエレメント**は、ヘテロクロマチンたんぱく質1などのヘテロクロマチン関連たんぱく質 の集積を阻害すると提唱されている[36]。テロメアにおいて、STARはヘテロクロマチン構造の伝播を防ぐバリアとして働くことと予測される。しかしながら、本研究では全般的に弱くはっきりしない効果しか得られなかった。ポリクローナル細胞集団の試験では、二つのSTARエレメントは対照的な結果を示した。STAR7は、テロメア遠位、-近位のレポータ遺伝子の発現に関して効果を示さず、一方、STAR40は、テロメア近位のレポータ遺伝子(DsRed)発現細胞の出現頻度のみを上昇させた。ChIP試験では、STAR40がレポータ遺伝子のうちテロメア近位でのみH3K9me3とH4K20me3のヘテロクロマチンマーカを減少させることが明らかとなり、抗遺伝子抑制エレメントとしての役割を強く支持した。しかしながら、このSTAR40の抗遺伝子抑制活性は、TPEからの高度な保護と、またテロメア遺伝子座での高い転写効率をあげるには不十分であった。

10年以上にわたって、ヒストンの修飾は単独のクロマチンマーカではなく、それらの組み合わせが意味を持つ、いわゆる“**ヒストンコード**”を構成することが提唱されてきた[57]。これらの修飾パターンは多くの種のゲノムで観察されており、本研究においても様々な調節エレメントに誘起される特徴ある修飾パターンが観察された。総じて、1つオープンクロマチンのマーカの存在あるいは1つの抑制性ヒストンマーカの欠如が遺伝子発現レベルや遺伝子抑制への抵抗性を規定しているのではないことを示している。提唱されている“ヒストンコード”と一致して、ここでのデータはクロマチン修飾の複数の組み合わせが遺伝子発現の遷移を調節しており、そのような調節エレメントとヒストン修飾の理論的活用により予測可能な導入遺伝子の発現系の構築を達成できるもの考える。

## 【引用文献】

1. Li,B., Carey,M. and Workman,J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128, 707–719.
2. Sfeir,A. (2012) Telomeres at a glance. *J. Cell. Sci.*, 125, 4173–4178.
3. Schoeftner,S. and Blasco,M.A. (2009) A ‘higher order’ of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J.*, 28, 2323–2336.
4. Kwon,S.H. and Workman,J.L. (2011) The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. *BioEssays: News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, 33, 280–289.
5. Rosenfeld,J.A., Wang,Z., Schones,D.E., Zhao,K., DeSalle,R. and Zhang,M.Q. (2009) Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics*, 10, 143.
6. Azzalin,C.M., Reichenbach,P., Khoraiuli,L., Giulotto,E. and Lingner,J. (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science*, 318, 798–801.
7. Cao,F., Li,X., Hiew,S., Brady,H., Liu,Y. and Dou,Y. (2009) Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA*, 15, 1274–1281.
8. Gonzalo,S., Jaco,I., Fraga,M.F., Chen,T., Li,E., Esteller,M. and Blasco,M.A. (2006) DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, 8, 416–424.
9. Garcia-Cao,M., O’Sullivan,R., Peters,A.H., Jenuwein,T. and Blasco,M.A. (2004) Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat. Genet.*, 36, 94–99.
10. Gonzalo,S., Garcia-Cao,M., Fraga,M.F., Schotta,G., Peters,A.H., Cotter,S.E., Eguia,R., Dean,D.C., Esteller,M., Jenuwein,T. et al. (2005) Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat. Cell Biol.*, 7, 420–428.
11. Benetti,R., Garcia-Cao,M. and Blasco,M.A. (2007) Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat. Genet.*, 39, 243–250.
12. Gottschling,D.E., Aparicio,O.M., Billington,B.L. and Zakian,V.A. (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*, 63, 751–762.
13. Baur,J.A., Zou,Y., Shay,J.W. and Wright,W.E. (2001) Telomere position effect in human cells. *Science*, 292, 2075–2077.
14. Koering,C.E., Pollice,A., Zibella,M.P., Bauwens,S., Puisieux,A., Brunori,M., Brun,C., Martins,L., Sabatier,L., Pulitzer,J.F. et al. (2002) Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep.*, 3, 1055–1061.
15. Pedram,M., Sprung,C.N., Gao,Q., Lo,A.W., Reynolds,G.E. and Mumane,J.P. (2006) Telomere position effect and silencing of transgenes near telomeres in the mouse. *Mol. Cell Biol.*, 26, 1865–1878.
16. Hoppe,G.J., Tanny,J.C., Rudner,A.D., Gerber,S.A., Danaie,S., Gygi,S.P. and Moazed,D. (2002) Steps in assembly of silent chromatin in yeast: Sir3-independent binding of a Sir2/Sir4 complex to silencers and role for Sir2-dependent deacetylation. *Mol. Cell Biol.*, 22, 4167–4180.
17. Michishita,E., McCord,R.A., Barber,E., Kioi,M., Padilla-Nash,H., Damian,M., Cheung,P., Kusumoto,R., Kawahara,T.L., Barrett,J.C. et al. (2008) SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature*, 452, 492–496.
18. Michishita,E., McCord,R.A., Boxer,L.D., Barber,M.F., Hong,T., Gozani,O. and Chua,K.F. (2009) Cell cycle-dependent deacetylation of telomeric histone H3 lysine K56 by human SIRT6. *Cell Cycle*, 8, 2664–2666.
19. Tennen,R.I., Bua,D.J., Wright,W.E. and Chua,K.F. (2011) SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. *Nat. Commun.*, 2, 433.
20. Yehezkel,S., Segev,Y., Viegas-Pequignot,E., Skorecki,K. and Selig,S. (2008) Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions. *Hum. Mol. Genet.*, 17, 2776–2789.
21. Wilson,C., Bellen,H.J. and Gehring,W.J. (1990) Position effects on eukaryotic gene expression. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 6, 679–714.
22. Kwaks,T.H. and Otte,A.P. (2006) Employing epigenetics to augment the expression of therapeutic proteins in mammalian cells. *Trends Biotechnol.*, 24, 137–142.
23. Gaszner,M. and Felsenfeld,G. (2006) Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.*, 7, 703–713.
24. Kellum,R. and Schedl,P. (1992) A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay. *Mol. Cell Biol.*, 12, 2424–2431.
25. Sun,F.L. and Elgin,S.C. (1999) Putting boundaries on silence. *Cell*, 99, 459–462.
26. Pikaart,M.J., Recillas-Targa,F. and Felsenfeld,G. (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.*, 12, 2852–2862.
27. Persons,D.A. (2010) Lentiviral vector gene therapy: effective and safe? *Mol. Ther.*, 18, 861–862.
28. Recillas-Targa,F., Pikaart,M.J., Burgess-Beusse,B., Bell,A.C., Litt,M.D., West,A.G., Gaszner,M. and Felsenfeld,G. (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 99, 6883–6888.
29. Mirkovitch,J., Mirault,M.E. and Laemmli,U.K. (1984) Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39, 223–232.
30. Girod,P.A., Nguyen,D.Q., Calabrese,D., Puttini,S., Grandjean,M., Martinet,D., Regamey,A., Saugy,D., Beckmann,J.S., Bucher,P. et al. (2007) Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. *Nat. Methods*, 4, 747–753.
31. Harraghy,N., Gaussin,A. and Mermod,N. (2008) Sustained transgene expression using MAR elements. *Curr. Gene Ther.*, 8, 353–366.
32. Phi-Van,L., von Kries,J.P., Ostertag,W. and Stratling,W.H. (1990) The chicken lysozyme 50 matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol. Cell Biol.*, 10, 2302–2307.
33. Girod,P.A., Zahn-Zabal,M. and Mermod,N. (2005) Use of the chicken lysozyme 50 matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnol. Bioeng.*, 91, 1–11.
34. Harraghy,N., Regamey,A., Girod,P.A. and Mermod,N. (2011) Identification of a potent MAR element from the mouse genome and assessment of its activity in stable and transient transfections. *J. Biotechnol.*, 154, 11–20.
35. Galbete,J.L., Buceta,M. and Mermod,N. (2009) MAR elements regulate the probability of epigenetic switching between active and inactive gene expression. *Mol. Biosyst.*, 5, 143–150.

36. Kwaks,T.H., Barnett,P., Hemrika,W., Siersma,T., Sewalt,R.G., Satiijn,D.P., Brons,J.F., van Blokland,R., Kwakman,P., Kruckeberg,A.L. et al. (2003) Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, 21, 553–558.
37. Williams,S., Mustoe,T., Mulcahy,T., Griffiths,M., Simpson,D., Antoniou,M., Irvine,A., Mountain,A. and Crombie,R. (2005) CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnol.*, 5, 17.
38. Lindahl Allen,M. and Antoniou,M. (2007) Correlation of DNA methylation with histone modifications across the HNRPA2B1-CBX3 ubiquitously-acting chromatin open element (UCOE). *Epigenetics*, 2, 227–236.
39. Zhang,F., Frost,A.R., Blundell,M.P., Bales,O., Antoniou,M.N. and Thrasher,A.J. (2010) A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, 18, 1640–1649.
40. Antoniou,M.K., Crombie,R.K. and Williams,S.G. (2001) EU patent no. EP 2365076 A1.
41. Williams,S.G., Crombie,R.L., Lipinski,K.S. and Irvine,A.S. (2008) US patent no. US 2008/0222742 A1.
42. Chung,J.H., Whiteley,M. and Felsenfeld,G. (1993) A 50 element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell*, 74, 505–514.
43. Ramakers,C., Ruijter,J.M., Deprez,R.H. and Moorman,A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.*, 339, 62–66.
44. Martens,J.H., Verlaan,M., Kalkhoven,E., Dorsman,J.C. and Zantema,A. (2002) Scaffold/matrix attachment region elements interact with a p300-scaffold attachment factor A complex and are bound by acetylated nucleosomes. *Mol. Cell Biol.*, 22, 2598–2606.
45. Heintzman,N.D., Stuart,R.K., Hon,G., Fu,Y., Ching,C.W., Hawkins,R.D., Barrera,L.O., Van Calcar,S., Qu,C., Ching,K.A. et al. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.*, 39, 311–318.
46. Schotta,G., Lachner,M., Sarma,K., Ebert,A., Sengupta,R., Reuter,G., Reinberg,D. and Jenuwein,T. (2004) A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.*, 18, 1251–1262.
47. Kim,J.M., Kim,J.S., Park,D.H., Kang,H.S., Yoon,J., Baek,K. and Yoon,Y. (2004) Improved recombinant gene expression in CHO cells using matrix attachment regions. *J. Biotechnol.*, 107, 95–105.
48. Grandjean,M., Girod,P.A., Calabrese,D., Kostyrko,K., Wicht,M., Yerly,F., Mazza,C., Beckmann,J.S., Martinet,D. and Mermod,N. (2011) High-level transgene expression by homologous recombination-mediated gene transfer. *Nucleic Acids Res.*, 39, e104.
49. Yin,H., Sweeney,S., Raha,D., Snyder,M. and Lin,H. (2011) A high-resolution whole-genome map of key chromatin modifications in the adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.*, 7, e1002380.
50. Vakoc,C.R., Mandat,S.A., Olenchock,B.A. and Blobel,G.A. (2005) Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell*, 19, 381–391.
51. Wiencke,J.K., Zheng,S., Morrison,Z. and Yeh,R.F. (2008) Differentially expressed genes are marked by histone 3 lysine 9 trimethylation in human cancer cells. *Oncogene*, 27, 2412–2421.
52. Ramirez-Carrozzi,V.R., Braas,D., Bhatt,D.M., Cheng,C.S., Hong,C., Doty,K.R., Black,J.C., Hoffmann,A., Carey,M. and Smale,S.T. (2009) A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling. *Cell*, 138, 114–128.
53. Rincon-Arano,H., Furlan-Magari,M. and Recillas-Targa,F. (2007) Protection against telomeric position effects by the chicken cHS4 beta-globin insulator. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 14044–14049.
54. West,A.G., Huang,S., Gaszner,M., Litt,M.D. and Felsenfeld,G. (2004) Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol. Cell*, 16, 453–463.
55. Litt,M.D., Simpson,M., Recillas-Targa,F., Prioleau,M.N. and Felsenfeld,G. (2001) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.*, 20, 2224–2235.
56. West,A.G. and Fraser,P. (2005) Remote control of gene transcription. *Hum. Mol. Genet.*, 14 Spec No 1, R101–111.
57. Strahl,B.D. and Allis,C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 41–45.
58. Wang,Z., Zang,C., Rosenfeld,J.A., Schones,D.E., Barski,A., Cuddapah,S., Cui,K., Roh,T.Y., Peng,W., Zhang,M.Q. et al. (2008) Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat. Genet.*, 40, 897–903.
59. Otte,A.P., Kwaks,T.H., van Blokland,R.J., Sewalt,R.G., Verhees,J., Klaren,V.N., Siersma,T.K., Korse,H.W., Teunissen,N.C., Botschuijver,S. et al. (2007) Various expression-augmenting DNA elements benefit from STAR-Select, a novel high stringency selection system for protein expression. *Biotechnol. Prog.*, 23, 801–807.
60. Zahn-Zabal,M., Kobr,M., Girod,P.A., Imhof,M., Chatellard,P., de Jesus,M., Wurm,F. and Mermod,N. (2001) Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *J. Biotechnol.*, 87, 29–42.
61. Farr,C., Fantes,J., Goodfellow,P. and Cooke,H. (1991) Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88, 7006–7010.
62. Hanish,J.P., Yanowitz,J.L. and de Lange,T. (1994) Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 8861–8865.
63. Barnett,M.A., Buckle,V.J., Evans,E.P., Porter,A.C., Rout,D., Smith,A.G. and Brown,W.R. (1993) Telomere directed fragmentation of mammalian chromosomes. *Nucleic Acids Res.*, 21, 27–36.
64. Ferrari,S., Simmen,K.C., Dusserre,Y., Muller,K., Fourel,G., Gilson,E. and Mermod,N. (2004) Chromatin domain boundaries delimited by a histone-binding protein in yeast. *J. Biol. Chem.*, 279, 55520–55530.
65. Gronostajski,R.M. (2000) Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. *Gene*, 249, 31–45.
66. Alevizopoulos,A., Dusserre,Y., Tsai-Pflugfelder,M., von der Weid,T., Wahli,W. and Mermod,N. (1995) A proline-rich TGFbeta-responsive transcriptional activator interacts with histone H3. *Genes Dev.*, 9, 3051–3066.
67. Esnault,G., Majocchi,S., Martinet,D., Besuchet-Schmutz,N., Beckmann,J.S. and Mermod,N. (2009) Transcription factor CTF1 acts as a chromatin domain boundary that shields human telomeric genes from silencing. *Mol. Cell Biol.*, 29, 2409–2418.
68. Woo,Y.H. and Li,W.H. (2011) Gene clustering pattern, promoter architecture, and gene expression stability in eukaryotic genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108, 3306–3311.
69. Ebisuya,M., Yamamoto,T., Nakajima,M. and Nishida,E. (2008) Ripples from neighbouring transcription. *Nat. Cell Biol.*, 10, 1106–1113.
70. Wang,G.Z., Lercher,M.J. and Hurst,L.D. (2011) Transcriptional coupling of neighboring genes and gene expression noise: evidence that gene orientation and noncoding transcripts are modulators of noise. *Genome Biol. Evol.*, 3, 320–331.
71. Woo,Y.H. and Li,W.H. (2012) Evolutionary conservation of histone modifications in mammals. *Mol. Biol. Evol.*, 29, 1757–1767.