

StAR protein (steroidogenic acute regulatory protein) の転写調節機構の解析

廣井 久彦¹⁾, Jerome F Strauss III²⁾, 武谷 雄二¹⁾

1) 東京大学医学部産科婦人科学教室

2) Center for Research on Reproduction and Women's Health, University of Pennsylvania Medical Center

はじめに

StAR protein (steroidogenic acute regulatory protein) は、ステロイドホルモン合成の律速段階にあたるステップに関わる因子である [1]. StAR protein によりコレステロールのミトコンドリア外膜から内膜への移行が促進され、ミトコンドリア内膜に存在する P450scc によりコレステロールは pregnenolone に転換され、以後のステロイド合成が行われる (図 1). 細胞系を用いた実験で性腺刺激ホルモンや cAMP の添加により、StAR gene の転写は短時間に促進され、その結果ス

テロイドホルモンが産生されることが示されている. これまでの報告から以下に挙げる転写因子が StAR gene の転写に関わっていることが示されている. steroidogenic factor-1/Ad-4 binding protein (SF-1/Ad4BP) [2-6], CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) [5, 7-9], GATA-4 [8, 9], cAMP response element (CRE) -binding protein family (CREB) [10, 11]. StAR protein の転写開始点から 250 bp 上流までの領域 (StAR proximal promoter) は種を越えて保存されており、cAMP やホルモンに対する応答性に重要な領域であると考えられている.

ヒトの遺伝子はクロマチン構造を形成することにより折り畳まれ、核内に収められている. 近年になり、クロマチンは単なる構造体ではなく、ダイナミックな遺伝子発現や発生・分化に大きく関与する要素であることが分かってきた. クロマチンの基本構造は、ヒストン八量体の周りを DNA が 1.75 周巻くヌクレオソームである. ヒストン八量体はコアヒストン (ヒストン H2A, H2B, H3, H4) が各 2 分子ずつ集まったものである. コアヒストンの N 末端のヒストンテールは翻訳後修飾を受け、遺伝子発現の調節に関与すると考えられている [12, 13]. 翻訳後のヒストン修飾として、ADP-ribosylation, glycosylation, メチル化, リン酸化, アセチル化が挙げられるが、アセチル化についてもっとも研究が進んでいる. ヒストンのアセチル化は転写の活性化に関与していることが示されている. いくつかの転写共役因子はヒストンアセチル化能を有しており [14], 転写因子などの DNA 結合タンパクが遺伝子のプロモーター領域に結合すると、これらの共役因子を呼び込み、ヒストンのアセチル化が起こる. これにより、基礎転写装置が遺伝子にアクセスできるようになり、遺伝子の転写が開始されると考えられている.

遺伝子の転写調節機構の解析において、レポーターアッセイやゲルシフトアッセイなどの方法が一般に行われている. これらのアッセイ法は有用な方法であるが、必ずしもクロマチンの自然の状態を反映しているとは限ら

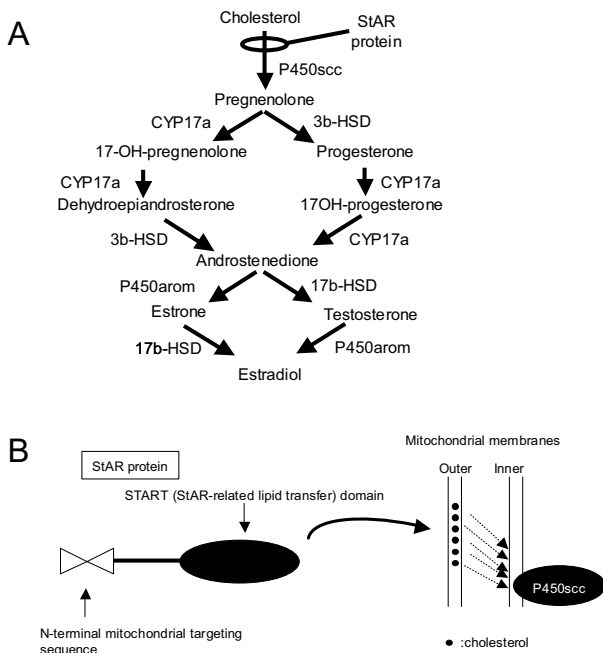


図 1 A. ステロイドホルモン合成の経路
B. StAR protein の構造と機能

連絡先: 廣井久彦, 東京大学医学部産科婦人科学教室,
〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1
TEL: 03-3815-5411
FAX: 03-3816-2017
E-mail: hhiro-tky@umin.ac.jp

ず、またプロモーター領域への転写因子や転写共役因子の結合の経時的変化を示すことはできない。近年、免疫沈降法を利用して、クロマチンの自然の状態を調べる実験法が確立され広く行われている (Chromatin Immunoprecipitation assay; ChIPアッセイ)。近年、われわれはChIPアッセイを用いて、StAR proximal promoterのヒストンアセチル化について検討した [15]。ChIPアッセイは遺伝子の転写におけるヒストン修飾、転写因子、転写共役因子の作用を自然のクロマチンの状態で解析することができる点がこれまでの転写因子関連の実験法と比べて画期的な方法である。

本稿では、われわれがChIPアッセイ法により、StAR geneのプロモーターと転写因子、ヒストン修飾の関連について検討したデータを示したいと思う。

方法

Mouse Leydig tumor由来の細胞株 (MA-10細胞) および過排卵処理したマウスの顆粒膜細胞を用いて、ChIPアッセイ、定量的RT-PCR、ウエスタンブロットを施行した。ChIPアッセイには転写因子 (GATA-4, SF-1/AD4BP, C/EBP β , CREB/CREM)、転写共役因子 (CBP)、ヒストン (アセチル化、メチル化) に対する抗体を用いた。ChIPアッセイ法の手順については略図を図2に示した [16]。ChIPアッセイ法により得られた検体は、それぞれの転写因子やヒストンが結合していたゲノムDNAの量を反映していると考え、StAR proximal promoter, StAR distal promoterあるいは

StAR gene内に特異的なPCR primerを設計し定量的RT-PCRを行った。

MA-10細胞株を用いたin vitroの系での検討

MA-10細胞の培養液中に8-Br-cAMPを添加後、15, 30, 60, 120, 240分後に細胞を回収し、ChIPアッセイ、定量的RT-PCR、ウエスタンブロットを施行した。8-Br-cAMP未添加の細胞を回収しコントロールとした。

MA-10細胞において、StAR mRNAは8-Br-cAMP添加により、添加後30分から有意に増加し、2時間後にピークとなった (図3 A中段)。Nascent RNAはStAR geneの第1イントロンに特異的なプライマーを設計し、逆転写反応を行い、第1イントロンと第1エキソン内に設計した特異的プライマーを用いて定量的RT-PCRを行ったもので、スプライシングを受ける前のRNAの量を定量している。すなわち、RNAの転写の量を反映していると考えられる。Nascent RNAは8-Br-cAMP添加後15分からmRNAの増加に先立ち、有意に増加している (図3 A上段)。このことから、StAR proteinのmRNAの増加は、転写の量が増えているためと考えられる。StAR proteinの特異的な抗体を用いたウエスタンブロットでは8-Br-cAMP添加後30分までは変化を認めないが、8-Br-cAMP添加後60分からタンパク量の増加が認められる (図3 A下段)。

1) GATA-4

GATA-4はGATA転写因子群 (GATA-1-6) に含ま

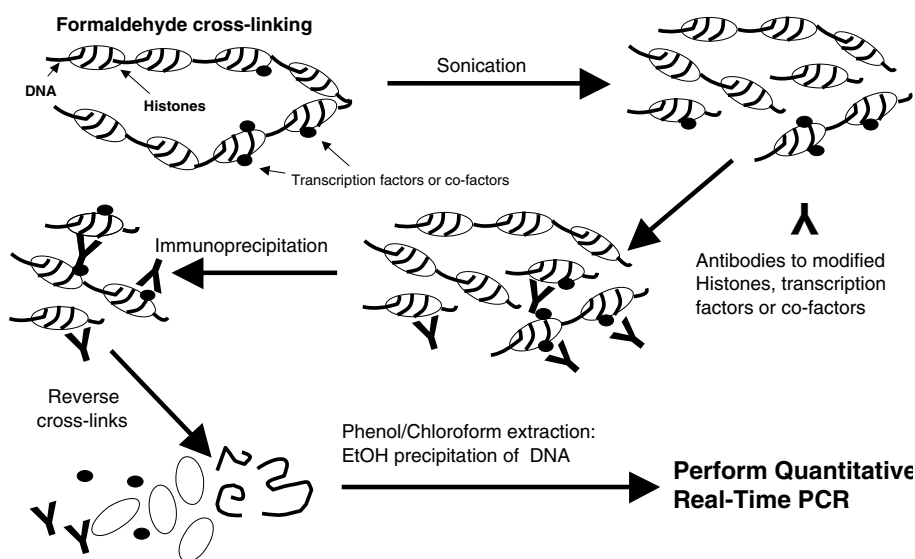


図2 Chromatin immunoprecipitation (ChIP) アッセイ法 (文献16より一部改変)

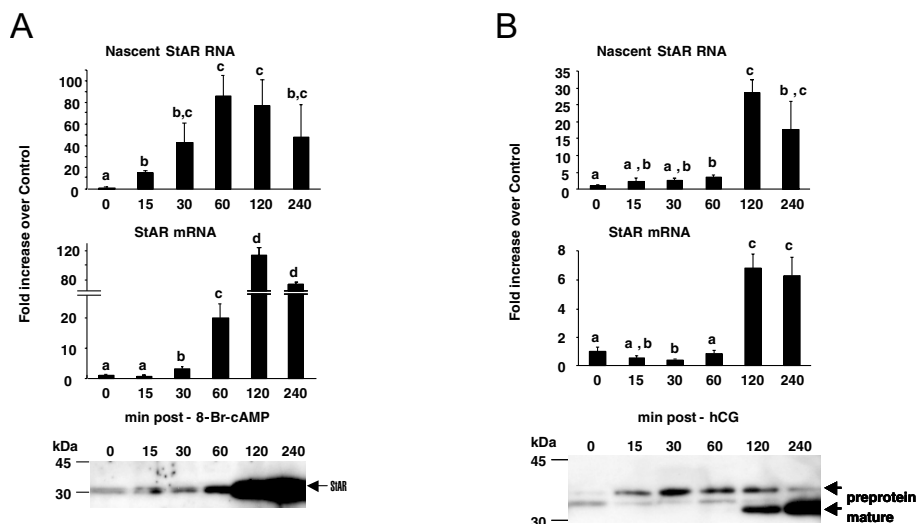


図3 A. マウスLeydig細胞由来の細胞株MA-10細胞におけるStAR proteinの発現, B. マウス顆粒膜細胞におけるStAR proteinの発現, a, b, c, d; それぞれのグラフにおいて違う文字は統計的に有意に異なることを示す ($p < 0.05$) (文献36より一部改変)

れる転写因子であり, Znフィンガーを2つ含む共通の構造をしている. GATA-4はステロイドホルモン合成細胞に発現していることが知られている [17]. これまでの報告から, StAR gene発現調節に関与していることが示されている [6, 8, 18].

GATA-4に対する抗体を用いたChIPアッセイでは, 8-Br-cAMP添加後15分, 30分で, StAR proximal promoterへの一過性の有意な結合活性の増加を認めた. また, StAR distal promoterにおいては有意な変化を認めなかった (図4). MA-10細胞の核抽出液を用いたウエスタンブロットでは, 8-Br-cAMP添加によるGATA-4のタンパクレベルの変化は認められなかった (図4右下). 近年, TremblayらはcAMP添加後のGATA-4のリン酸化がStAR geneの転写活性に関与していると報告している [9]. 今回, われわれが示したGATA-4のStAR proximal promoterへの一過性の結合活性の増加はGATA-4のリン酸化による可能性が考えられる.

2) SF-1/Ad4BP

SF-1/Ad4BPは核内受容体スーパーファミリーの一員であり, 性腺の発達やステロイドホルモン産生細胞の機能に重要であることが示されている [19]. SF-1/Ad4BPの特異的な結合領域はStAR promoterに認められ, StARの発現調節に関わっていることが示されている [2-6, 20].

SF-1/Ad4BPに対する抗体を用いたChIPアッセイでは, 8-Br-cAMP添加後15分で, StAR proximal promoterへの有意な結合活性の増加を認めた. また, StAR

distal promoterにおいては有意な変化を認めなかった (図4). ウエスタンブロットでは, 8-Br-cAMP添加によるSF-1/Ad4BPのタンパクレベルの変化は認められなかった (図4右下). SF-1/Ad4BPのStAR proximal promoterへの結合活性の増加は, 例えばリン酸化のような翻訳後修飾によることが考えられる [21, 22]. 他の可能性として, SF-1/Ad4BPへのリガンドの結合, 細胞質から核への移行, DAX-1のようなSF-1/Ad4BPのレプレッサーの現象などが考えられる [23-25].

3) CCAAT/enhancer binding proteins

CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) は塩基性ロイシンジッパーの構造をもつ転写因子であり, いろいろな細胞における分化や機能調節に関わることが知られており [26], C/EBP α とC/EBP β がステロイドホルモン産生細胞で発現していることが報告されている [27, 28]. また, ヒトとマウスのStAR geneのプロモーター領域にC/EBP結合領域があることも報告されている [5, 7, 8, 20]. StARのSF-1/Ad4BPによる転写活性化にC/EBP結合領域が必要との報告もあり, SF-1/Ad4BPとC/EBP β が結合してStAR geneの転写調節を行うと考えられる [5, 8].

今回のC/EBP β に対する抗体を用いたChIPアッセイではStAR proximal promoter, StAR distal promoterともに有意な増加を認めなかった (図4). 後述するように, マウス顆粒膜細胞を用いたChIPアッセイではStAR proximal promoterへの有意な結合活性を示しており, StAR proteinの転写において, 臓器特異性に関わる機能

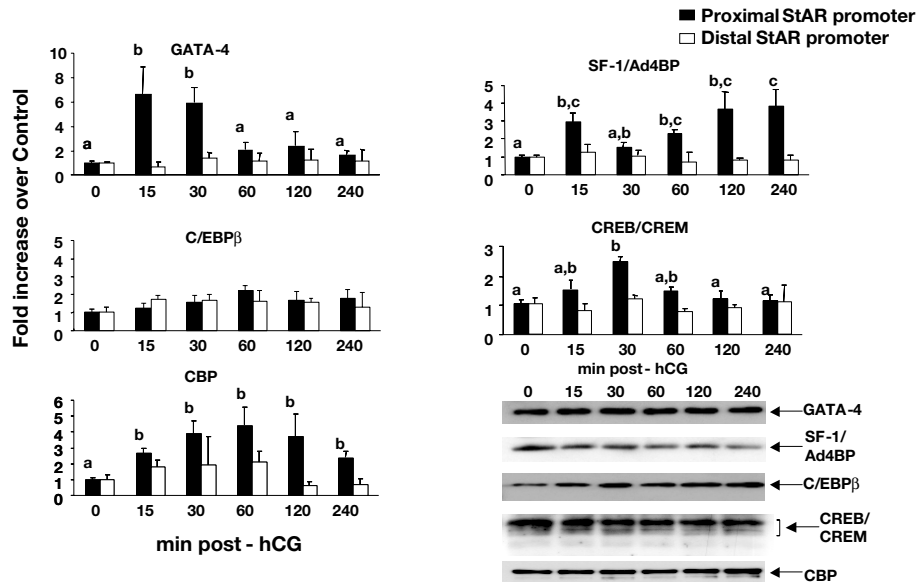


図4 マウスLeidig細胞由来の細胞株MA-10細胞を用いたChIPアッセイ（転写因子，転写共役因子）とウエスタンブロット，a, b, c；それぞれのグラフにおいて違う文字は統計的に有意に異なることを示す（ $p < 0.05$ ）（文献36より一部改変）

を担っていることが類推される。

4) CREB/CREM

細胞内cAMPが上昇したときに発現する一群の遺伝子のプロモーター領域には共通配列が存在することが見出され，この領域に結合するタンパクはcAMP responsive element binding protein (CREB) と名付けられた [29]. また，さらにこの領域に結合し，遺伝子発現を抑制するタンパクが見出され，CRE modulator (CREM) と名付けられた [30]. 近年，これらの転写因子がStAR geneの転写活性に関与していることが示された [13, 14].

今回のCREB/CREMに対する抗体を用いたChIPアッセイでは，8-Br-cAMP添加後30分でStAR proximal promoterへの結合活性の増加を認めた。また，StAR distal promoterにおいては有意な変化を認めなかった (図4)。ウエスタンブロットでは，8-Br-cAMP添加によるCREB/CREMのタンパクレベルの変化は認められなかった (図4右下)。

5) CREB-binding protein (CBP)

転写共役因子p300とCBPは，転写調節因子と基本転写装置を結びつけ，遺伝子の転写調節を行う重要な要素の1つである。また，ヒストンアセチル化能をもち，遺伝子発現の活性化に関与していると考えられている [31].

今回われわれは，ChIPアッセイの手法を用いて，CBPの8-Br-cAMP添加後15分で，StAR proximal promoterへの有意な結合活性が増加を示した。また，StAR distal promoterにおいては有意な変化を認めなかった (図4)。ウエスタンブロットでは，8-Br-cAMP添加によるCBPのタンパクレベルの変化は認められなかった (図4右下)。リン酸化などのCBPの翻訳後修飾やGATA-4, SF-1/Ad4BP, CREB/CREMとの結合によって，StAR proximal promoterへ結合活性が増加することが考えられる。

6) Histone modifications

先に述べたように，コアヒストンはアセチル化やリン酸化などの修飾を受け，遺伝子発現やクロマチン複製などの制御を行うと考えられている [32]. 今回，われわれはStARの発現調節を解明するために，ChIPアッセイにより，StAR gene promoterのヒストンH3のアセチル化とメチル化について検討した。アセチル化ヒストンH3に対する抗体を用いたChIPアッセイではStAR proximal promoterとの結合が8-Br-cAMP添加後15分から有意に増加し，8-Br-cAMP添加後240分まで維持された。一方，アセチル化ヒストンH4に対する抗体を用いたChIPアッセイでは有意な変化を認めなかった (図5)。今回の結果から，StAR geneの転写活性化に関してはアセチル化ヒストンH4ではなく，H3が重要であると考えられる。また，図5の結果から，GATA-4とSF-1/

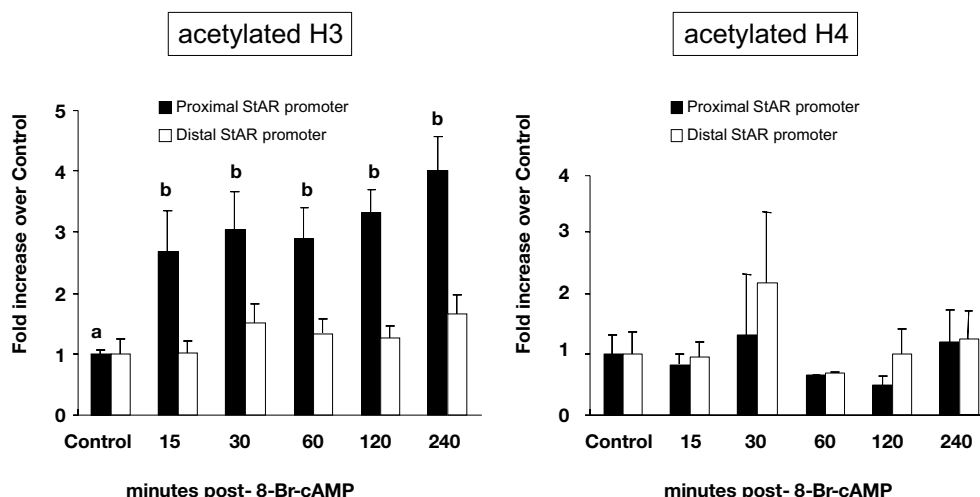


図5 マウスLeidig細胞由来の細胞株MA-10細胞を用いたChIPアッセイ（アセチル化ヒストン），a, b；それぞれのグラフにおいて違う文字は統計的に有意に異なることを示す（ $p < 0.05$ ）（文献36より一部改変）

Ad4BPおよびCBPの結合活性が15分後に上昇することから、StAR proximal promoterにまずこれらの転写因子が結合し、これらの転写因子がヒストンアセチル化能をもつCBPをStAR proximal promoterに呼び込み、CBPがヒストンH3をアセチル化し、転写が活性化されるという経路が考えられる。

ヒストンのアセチル化・脱アセチル化と異なり、ヒストンのメチル化は、メチル化の部位（どのリジン（K）がメチル化されるか：4番目（K4）、9番目（K9））、遺伝子においてのメチル化されるヒストンの位置（プロモーター領域か、転写される領域か）、メチル化の程度（モノ、ジ、トリメチル化）により、その作用が異なるとされる [33]。ジメチル化ヒストンH3（K4）およびトリメチル化ヒストンH3（K4）に対する抗体を用いたChIPアッセイでは、遺伝子の下流の領域で有意な増加が認められた（図6）。近年、ヒストンH3の4番目のリジン（K4）のジメチル化およびトリメチル化は活性化されている遺伝子に観察され、遺伝子の転写の開始よりは転写の伸長に関係しているとの報告があり [34, 35]、今回の結果はこのことを反映したものと考えられる。また、StAR proximal promoterで8-Br-cAMP添加後にヒストンH3（K4）のトリメチル化がおよそ40%減少するという結果を得たが、この意味するところについては未だ不明である。ジメチル化ヒストンH3（K9）に対する抗体を用いたChIPアッセイでは、プロモーター領域、遺伝子の下流の領域で有意な減少が認められた（図6）。ヒストンH3の9番目のリジン（K9）のジメチル化は遺伝子のサイレンシングと関連していると考えられている [32]。8-Br-cAMP添加後、ヒストンH3（K

9）のジメチル化が減少することはStAR遺伝子の転写を促進する要素の1つであると考えられる。

マウス顆粒膜細胞をもちいた*in vivo*の系での検討

次にわれわれは*in vivo*の系でも同様の調節機構によりStAR geneの発現調節が行われているかを確認するために、マウス顆粒膜細胞を用いて実験を行った。3週齢のマウスにPMSGを腹腔内投与し、44から48時間後にhCGを腹腔内投与し、15、30、60、120、240分後に卵巣を摘出し、実体顕微鏡下で30Gの注射針をもちいて顆粒膜細胞を得た。これらの細胞をChIPアッセイ、定量的RT-PCR、ウエスタンブロットを施行した。PMSG投与後、hCGを投与しなかったマウスから回収した検体をコントロール（0 min）とした。

マウス顆粒膜細胞では、StAR mRNAはhCG投与後120分で有意に増加した（図3 B中段）。MA-10細胞を用いた結果と同様に、mRNAの増加に先立ち、Nascent RNAの増加を認めた（hCG投与後60分、図3 B上段）。ウエスタンブロットではhCG投与後120分からタンパク量の増加が認められた（図3 B下段）

GATA-4、SF-1/Ad4BP、CBPに対する特異的抗体を用いたChIPアッセイではhCG投与後15分で増加を認めた。CREB/CREMではhCG投与2時間後で増加を認めた。C/EBP β のChIPアッセイではhCG投与1時間後で有意な増加を認めた。これらの実験ではStAR distal promoterにおいては有意な変化を認めなかった（図7）。これらの抗体を用いてウエスタンブロットでは、これらのタンパクの量の変化を認めなかった（図7右下）。

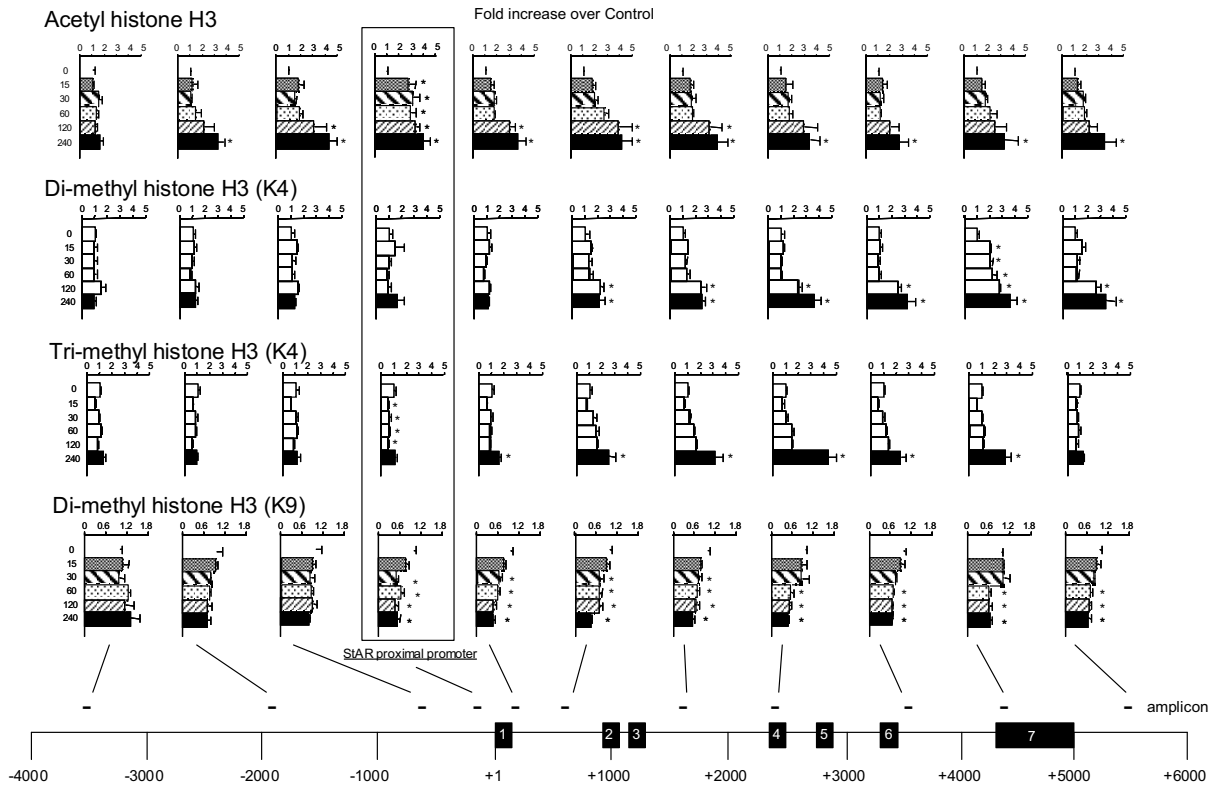


図6 マウスLeydig細胞由来の細胞株MA-10細胞を用いたChIPアッセイ (メチル化ヒストン), *,統計的に有意差あり (p<0.05) (文献36より一部改変)

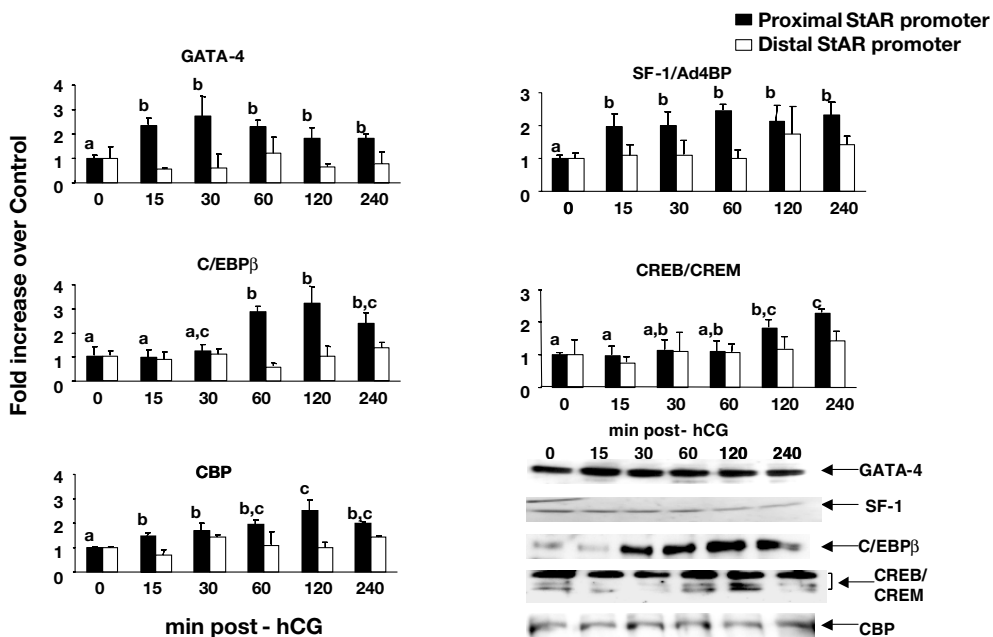


図7 マウス顆粒膜細胞を用いたChIPアッセイ (転写因子, 転写共役因子) とウエスタンブロット, a, b, c; それぞれのグラフにおいて違う文字は統計的に有意に異なることを示す (p<0.05) (文献36より一部改変)

マウス顆粒膜細胞においても, マウスLeydig細胞由来のMA-10細胞での結果と同様に, GATA-4, SF-1/Ad4BP, CBPのStAR proximal promoterに対する結合

がもっとも早く認められた. このことから, これらの転写因子, 転写共役因子は臓器に関わらずStAR proteinの転写に重要な因子であることが示唆される. また,

CREB/CREMとC/EBP β はこれらの細胞で違った結果を示している。これらはStAR proteinの転写において、臓器特異性に関わる機能を担っていることが類推される。

結 論

今回の検討により、StAR geneの転写はcAMPにより急速に促進され、その際に転写因子や転写共役因子はStAR geneのプロモーター領域に順次結合することが示された。これらのクロマチン上の転写因子・転写共役因子の連係した結合やヒストン修飾によりStAR geneの転写活性は制御されていると考えられる。

参考文献

- Christenson LK, Strauss JF III (2000) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1529, 175-187.
- Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Kallen CB, Strauss JF III (1997) Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. *Biochemistry* 36, 7249-7255.
- Sugawara T, Saito M, Fujimoto S (2000) Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Endocrinology* 141, 2895-2903.
- Rust W, Stedronsky K, Tillmann G, Morley S, Walther N, Ivell R (1998) The role of SF-1/Ad4BP in the control of the bovine gene for the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *J Mol Endocrinol* 21, 189-200.
- Reinhart AJ, Williams SC, Clark BJ, Stocco DM (1999) SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol Endocrinol* 13, 729-741.
- Wooton-Kee CR, Clark BJ (2000) Steroidogenic factor-1 influences protein-deoxyribonucleic acid interactions within the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-responsive regions of the murine steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 141, 1345-1355.
- Christenson LK, Johnson PF, McAllister JM, Strauss JF III (1999) CCAAT/enhancer-binding proteins regulate expression of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *J Biol Chem* 274, 26591-26598.
- Silverman E, Eimerl S, Orly J (1999) CCAAT enhancer-binding protein beta and GATA-4 binding regions within the promoter of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene are required for transcription in rat ovarian cells. *J Biol Chem* 274, 17987-17996.
- Tremblay JJ, Hamel F, Viger RS (2002) Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology* 143, 3935-3945.
- Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, Clark BJ, Lalli E, Sassone-Corsi P, Zeleznik AJ, Stocco DM (2002) Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol* 16, 184-199.
- Manna PR, Eubank DW, Lalli E, Sassone-Corsi P, Stocco DM (2003) Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 30, 381-397.
- Grunstein M (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349-352.
- Kadonaga JT (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* 92, 307-313.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996) Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
- Christenson LK, Stouffer RL, Strauss JF III (2001) Quantitative analysis of the hormone-induced hyperacetylation of histone H3 associated with the steroidogenic acute regulatory protein gene promoter. *J Biol Chem* 276, 27392-27399.
- Hiroi H, Christenson LK, Strauss JF III (2004) Regulation of transcription of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: temporal and spatial changes in transcription factor binding and histone modification. *Mol Cell Endocrinol* 215, 119-126.
- Molkentin JD (2000) The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275, 38949-38952.
- Tremblay JJ, Viger RS (2001) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142, 977-986.
- Hanley NA, Ikeda Y, Luo X, Parker KL (2000) Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for ovarian development and function. *Mol Cell Endocrinol* 163, 27-32.
- Christenson LK, Strauss JF III (2001) Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res* 32, 576-586.
- Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3, 521-526.
- Desclozeaux M, Krylova IN, Horn F, Fletterick RJ, Ingraham HA (2002) Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 22, 7193-7203.
- Lala DS, Syka PM, Lazarchik SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL, Heyman RA (1997) Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 4895-4900.
- Christenson LK, McAllister JM, Martin KO, Javitt NB, Osborne TF, Strauss JF III (1998) Oxysterol regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. Structural specificity and transcriptional and posttranscriptional

- actions. *J Biol Chem* 273, 30729-30735.
25. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P (1997) DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390, 311-315.
 26. Wilson HL, Roesler WJ (2002) CCAAT/enhancer binding proteins: do they possess intrinsic cAMP-inducible activity? *Mol Cell Endocrinol* 188, 15-20.
 27. Nalbant D, Williams SC, Stocco DM, Khan SA (1998) Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Endocrinology* 139, 272-279.
 28. Sirois J, Richards JS (1993) Transcriptional regulation of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Evidence for the role of a cis-acting C/EBP beta promoter element. *J Biol Chem* 268, 21931-21938.
 29. Montminy MR, Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328, 175-178.
 30. Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64, 739-749.
 31. Sterner DE, Berger SL (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.
 32. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
 33. Turner BM (2003) Memorable transcription. *Nat Cell Biol* 5, 390-393.
 34. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 419, 407-411.
 35. Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K (2003) Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity. *Mol Cell* 11, 709-719.
 36. Hiroi H, Christenson LK, Chang L, Sammel MD, Berger SL, Strauss JF III (2004) 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* 18, 791-806.