

核小体内の力学環境における
DNA アンツイスティング機構の解明

福手 淳平

目次

要旨	3
略語一覧	5
第1章 序論	6
1-1 力による DNA 二重らせん構造の変化	7
1-2 DNA アンツイスティングによる核内プロセスの制御	8
1-3 RNA ポリメラーゼを駆動力とした DNA アンツイスティング	11
1-4 DNA アンツイスティングに必要となる DNA の軸回転の拘束	13
1-5 核内構造体へのアンカリングによる DNA の軸回転拘束の可能性	14
1-6 核小体内の力学環境	14
1-7 本論文の目的	17
第2章 手法	18
2-1 Underwound DNA の蛍光標識および標的特異性の検証	19
2-1-1 Bio-psoralen に対する <i>in vitro</i> crosslinking assay	19
2-1-2 細胞培養	21
2-1-3 Bio-psoralen を用いた underwound DNA の蛍光標識	21
2-1-4 Bio-psoralen を用いた underwound DNA の回収	22
2-2 Underwound DNA および関連タンパク質の空間分布の解析	23
2-2-1 免疫蛍光染色および化学染色	23
2-2-2 リボソーム DNA に対する FISH	23
2-2-3 顕微鏡観察および画像解析	24
2-3 核小体内の力学環境への摂動およびその効果の確認	25
2-3-1 細胞に対する阻害剤処理	25
2-3-2 クロマチン免疫沈降	26
2-3-3 定量 PCR 解析	27

第3章 結果	28
3-1 Underwound DNA の蛍光標識における標的特異性の検証	29
3-1-1 <i>In vitro</i> において bio-psoralen は underwound DNA に結合する	29
3-1-2 細胞核内の bio-psoralen 結合 DNA を蛍光標識した	31
3-1-3 細胞核内において bio-psoralen は underwound DNA に結合する	38
3-2 細胞核内における DNA アンツイスティングの発生領域の同定	40
3-2-1 DNA アンツイスティングは RNA ポリメラーゼおよび トポイソメラーゼの近傍で生じる	40
3-2-2 トポイソメラーゼ阻害により underwound DNA は減少する	43
3-2-3 DNA アンツイスティングはリボソーム DNA において生じる	45
3-2-4 Underwound DNA は核小体コアを中心に分布する	47
3-3 核小体における DNA アンツイスティング機構の検証	50
3-3-1 核小体コアの RNA ポリメラーゼ I によるトルク発生が DNA アンツイスティングに寄与する	50
3-3-2 核小体シェルへのアンカリングによる DNA の軸回転拘束が DNA アンツイスティングに寄与する	54
第4章 考察	59
4-1 核小体内の力学環境における DNA アンツイスティング機構	60
4-2 G4 形成の DNA アンツイスティングへのフィードバックの可能性	62
4-3 核小体において DNA 軸回転拘束に寄与する力学的・生化学的因子	62
4-4 RNA ポリメラーゼ I および II の DNA アンツイスティングへの寄与	63
4-5 トポイソメラーゼによる under/over-wound DNA の解消	63
4-6 本研究で用いた手法の改善点	64
4-7 メカノバイオロジー分野への貢献	64
4-8 進化生物学分野への波及効果	65
文献	67
関連業績	79
謝辞	82

要旨

遺伝子の転写・複製などの核内プロセスは、DNA とタンパク質の相互作用の変化により制御される。これまで、*in vitro* 再構成系を用いた研究から、DNA 上の分子モーターが発生する力が、DNA 二重らせん構造の変化（伸び・ねじれ）を誘導し、DNA に対するタンパク質の結合に影響を及ぼすことが示されてきた。しかしながら、多種多様な生体分子が存在する細胞内において、DNA の二重らせん構造が変化する機構は未だ明らかでない。本論文では、核内構造体の1つである核小体に着目し、核小体内の力学環境においてDNA アンツイスティング（二重らせんのねじれ角の減少）が生じる機構を解明することを目的とした。

DNA アンツイスティングが生じるためには、トルクの発生に加え、DNA の軸回転拘束が必要となる。本研究では、核小体内において、RNA ポリメラーゼ I (RNAPI) によるトルクの発生、および、タンパク質集合体へのアンカリングによる軸回転拘束が連成することで、リボソーム DNA (rDNA) のアンツイスティングが生じるとの仮説を立て、*in situ* イメージングに基づき検証した。

まず、細胞内に存在する *underwound* DNA（二重らせんのねじれ角が小さいDNA）を *in situ* で蛍光標識し、その標的特異性を検証した。*Underwound* DNA に結合する低分子であるビオチン化ソラレンを細胞に取り込ませたのち、蛍光アビジンにより標識した。*Underwound* DNA を解消させる薬剤の処理に応じて、ビオチン化ソラレンが結合したDNAの存在量、および、蛍光イメージングにおける蛍光輝度が変化したことから、本手法の標識特異性が確かめられた。

次に、核小体内における rDNA のアンツイスティングを確認するため、*underwound* DNA とともに、rDNA に対する蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、格子構造化照明顕微鏡による超解像イメージングを実施した。その結果、rDNA においてDNA アンツイスティングが生じることが示された。核小体は、リボソームRNAの転写・修飾が行われるコアと、リボソームの合成が行われるシェルから構成される。コア-シェル構造の構成タンパク質との共染色を

行った結果、underwound DNA は核小体コアを中心に分布し、核小体シェルより外側では内側に比べて underwound DNA が少ないことが明らかとなった。これらの結果から、核小体コアにおけるトルクの発生と、核小体シェルにおける DNA の軸回転拘束が連成することで、核小体内において rDNA のアンツイスティングが生じる可能性が示唆された。

さらに、核小体内において rDNA がアンツイスティングする機構を検証した。核小体コアに局在する RNAPI の活性に対する摂動実験を行った結果、RNAPI によるトルクの発生が、核小体内における rDNA のアンツイスティングを導くことが示された。また、核小体内において rDNA の軸回転拘束を担う因子として、核小体シェルの構成分子である nucleophosmin (NPM) に着目した摂動実験、および、クロマチン免疫沈降実験を行った。その結果、NPM の集合体が rDNA 上のグアニン四重鎖 (G4) に結合することで、DNA の軸回転拘束を介して、rDNA のアンツイスティングを誘導することが示された。

以上の結果から、核小体コアの RNAPI によるトルクの発生、および、核小体シェルの NPM 集合体へのアンカリングによる DNA の軸回転拘束が連成することで、rDNA のアンツイスティングが生じることが明らかとなった。本研究は、個々の核内構造体において動的に変化する力学環境のもとで核内プロセスが制御される可能性を示唆しており、外部からのシグナルに応じた細胞分化などの運命選択機構を理解する一助となる。また、生物進化の過程においては、外部環境に適した遺伝子群が発現するように、DNA 二重らせん構造を力学的に制御する仕組みが獲得されてきたと考えられる。今後、進化の方向性を決定する因子として、DNA の塩基配列に加え、力の作用下の DNA 二重らせん構造の変化に着目したアプローチの提案が期待される。

略語一覧

5' ETS	5' external transcribed spacer
ActD	actinomycin D
Bio-psoralen	Psoralen-PEG3-Biotin
BLM	bleomycin
BSA	bovine serum albumin
bTMP	biotinylated trimethylpsoralen
ChIP	chromatin immunoprecipitation (クロマチン免疫沈降)
CPT	camptothecin
CTCF	CCCTC 結合因子
DFC	dense fibrillar component
ETO	etoposide
FBL	fibrillarin
FC	fibrillar center
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
G4	G-quadruplex
GC	granular component
IDR	intrinsically disordered region (天然変性領域)
Lattice-SIM	Lattice-pattern structured illumination microscopy (格子構造化照明顕微鏡)
NPM	nucleophosmin
PBS (-) / (+)	リン酸緩衝生理食塩水 (Ca ²⁺ , Mg ²⁺ 不含有/含有)
PFA	パラホルムアルデヒド
PQS	putative quadruplex-forming sequence (推定 G4 形成配列)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (定量 PCR)
rDNA	リボソーム DNA
RNAPI/II	RNA ポリメラーゼ I/II
RNAPIIS2P	セリン 2 リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II
SSC	塩化ナトリウム・クエン酸ナトリウム溶液
TopI/II	トポイソメラーゼ I/II
UBF	upstream binding factor

第 1 章 序論

1-1 力による DNA 二重らせん構造の変化

遺伝子の転写・複製などの核内プロセスは、様々な細胞活動の基盤である。例えば、細胞の分化は、分化状態特異的な遺伝子群が転写されることで進み、細胞の増殖は、細胞周期に従って DNA が複製されることで実現する [1]。核内プロセスの制御においては、タンパク質と DNA の間の相互作用が重要な役割を担う。代表的な例として、ヒストンと DNA の相互作用が挙げられる。真核細胞においては、DNA にヒストンが巻き付くことでヌクレオソームを形成しており、転写装置や複製装置が DNA に接近する際に立体障害として働く [2]。しかし、ヒストンの尾部がアセチル化などの化学修飾を受けると、ヒストンと DNA との間に働く静電相互作用が弱くなり、転写装置や複製装置が DNA に結合することが可能となる [3]。このように、DNA とタンパク質の相互作用の変化を介して、遺伝子の転写・複製などの核内プロセスが制御されている。

タンパク質と DNA の相互作用に影響を与える要素の 1 つとして、力による DNA 二重らせん構造の変化に着目した研究が行われてきた [4]–[6]。例えば、光ピンセットを用いて DNA に 10 pN 以上の引張力を作用させると、DNA 二重らせん構造に伸びが生じることで、ヒストンの結合が妨げられることが知られている [7]。さらに、ヘリカーゼや RNA/DNA ポリメラーゼなどの分子モーターが DNA に力を作用させることが知られており、例えば、RNA ポリメラーゼ (RNAP) は 15–25 pN の引張力を発生させる [8]–[10]。このことから、遺伝子転写において、RNAP は自らが発生させる引張力によりヒストンの結合を抑制することで、ヌクレオソームによる障壁を乗り越えながら移動していると推測される。以上のように、分子モーターが発生する力により DNA 二重らせん構造が変化することで、タンパク質との相互作用、ひいては核内プロセスが制御されると考えられている。

これまで、*in vitro* 一分子実験の発展により、分子モーターによる力の発生と、DNA 二重らせん構造の変化、そしてタンパク質の結合の関係が理解されてきた。

しかしながら、*in vitro* 実験系においては、数種類の DNA や分子モーターが整然と配置されている一方で、細胞内においては、種々の分子モーターがゲノム DNA 上の各所で力を発生しており、さらに、様々な DNA 結合タンパク質が DNA の並進・回転運動を局所的に拘束していると考えられる。このように、DNA に作用する力や、DNA を取り巻く拘束条件が複雑に絡みあう細胞内の力学環境において、DNA 二重らせんの構造が変化する機構は未だ明らかでない。

1-2 DNA アンツイスティングによる核内プロセスの制御

DNA に生じる「ねじれ」は、遺伝情報の読み出しに直結する重要な構造変化である。通常 DNA においては、1 塩基対あたりの回転角（ねじれ角）は約 34.3° である。DNA のらせん軸の周りに力のモーメント（トルク）が作用すると、ねじれ角が変化し、*underwound* DNA（ねじれ角が小さい DNA）または *overwound* DNA（ねじれ角が大きい DNA）が生じる [11]。本論文では、前者の構造変化を DNA アンツイスティング、後者の構造変化を DNA オーバーツイスティングと呼称する。後述するように、特に DNA アンツイスティングは核内プロセスの制御において中心的な役割を担っていることから、本論文では DNA アンツイスティングに着目する。

DNA アンツイスティングは、DNA 二本鎖の開裂を誘導することで、RNAP [12] や、転写因子 [13], [14] のプロモーター領域への結合を促進することが知られている（図 1 左）。例えば、*c-Myc* 遺伝子のプロモーター領域には、*far upstream element* と呼ばれる配列が存在し、DNA アンツイスティングにより開裂する [15], [16]。ここにアクティベーターおよびリプレッサーが結合することで、遺伝子転写の開始が制御されている。さらに、DNA アンツイスティングは、Cas9 などのヌクレアーゼの結合を促進することも知られており [17], [18]、ゲノム編集のオフターゲット効果の原因として注目されている [19]。

また、DNA アンツイスティングは、様々な非 B 型 DNA の形成に寄与するこ

とが知られている (図 1 中央)。例えば、DNA アンツイスティングを介した DNA 二重らせんの開裂がグアニン含有量の高い塩基配列で起きた場合、一本鎖 DNA 内の四つのグアニン分子がフーグスティーン型水素結合を介して G カルテットと呼ばれる平面構造をとる [20], [21]。そして、G カルテットが積み重なることで、代表的な非 B 型 DNA であるグアニン四重鎖 (G4) が形成される。この他にも、DNA アンツイスティングは、R-loop [22]、cruciform [23], [24]、Z-DNA [25], [26] など、様々な非 B 型 DNA の形成を促進することが知られている。非 B 型 DNA は、転写因子の結合の標的として、または、DNA/RNA ポリメラーゼの移動における障害物として働くことで、遺伝子転写や複製の制御に寄与すると考えられている [27]。

さらに、DNA アンツイスティングは、超らせんと呼ばれる高次構造の形成を誘導する [28] (図 1 右)。例えば、磁気ピンセットを用いて DNA アンツイスティングを誘導すると、超らせんが形成される [29]。超らせんを形成した領域は DNA の密度が局所的に高くなるため、DNA の蛍光試薬を添加すると、蛍光輝度の高い点として観察することができる。この輝点を蛍光顕微鏡により経時観察することで、超らせんの形成・移動・解消などのダイナミクスの理解が進められている [29], [30]。細胞核内においては、超らせんの形成は、エンハンサーとプロモーターの近接化 [31], [32] や、数 Mbp サイズのクロマチン構造単位であるトポロジカルドメインの発生 [33], [34] に寄与する可能性が示されている。これにより、生物の発生における組織特異的な遺伝子群の転写が制御されることが考えられている [35]。

以上のように、DNA アンツイスティングは、DNA とタンパク質の間の相互作用を変化させるだけでなく、非 B 型 DNA (～数十 bp) および超らせん (～数 Mbp) の形成を介して、ゲノム DNA の立体構造をマルチスケールに変化させることで、核内プロセスの制御に寄与している。

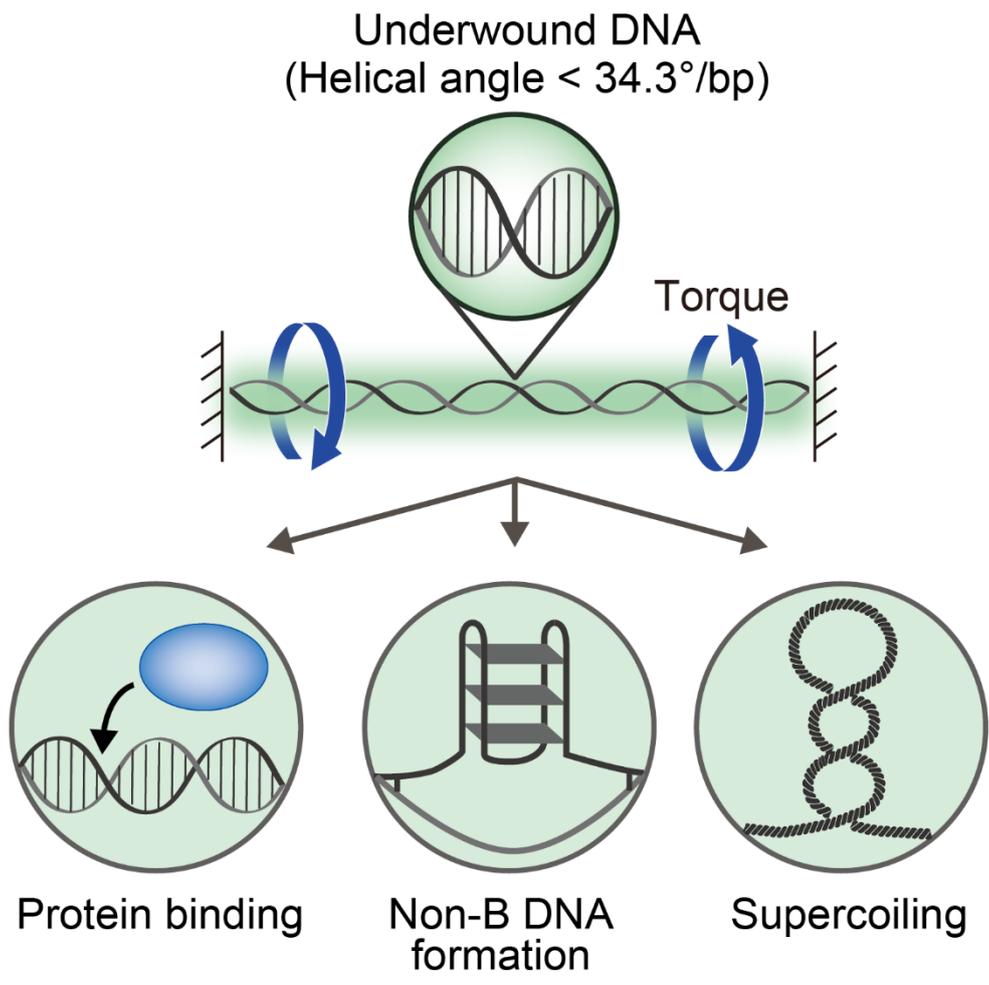


図1 DNA アンツイスティングによる核内プロセスの制御機構

1-3 RNA ポリメラーゼを駆動力とした DNA アンツイスティング

細胞内において DNA アンツイスティングが生じる機構の解明を目指し、数多くの研究が行われてきた。Liu と Wang [36]は、DNA アンツイスティングが RNAP を駆動力として生じるとするモデルを提唱した。遺伝子転写において、DNA のらせん軸を中心とした RNAP の回転が拘束されている状況（核膜に RNAP が結合している状況など）においては、RNAP は鋳型 DNA を読み取るために二重らせんをほどく。このとき RNAP によりトルクが発生するが、これだけでは DNA が回転するだけであり *underwound* DNA は生じない（図 2 上）。しかしながら、RNAP の後方において DNA の軸回転が拘束される箇所が存在する場合、RNAP との間で *underwound* DNA が発生する（図 2 下）。すなわち、DNA アンツイスティングは①RNAP によるトルクの発生と、②DNA の軸回転の拘束が連成することで生じる。また、RNAP の前方において DNA の軸回転が拘束されている場合、*overwound* DNA が発生する。このように、RNAP の後方と前方において、それぞれ DNA アンツイスティングと DNA オーバーツイスティングが生じると考えられている。

DNA アンツイスティングにおける RNAP の役割については、一分子実験および細胞実験により理解が進められている。光ピンセットを用いた測定の結果、RNAP は最大で 5-11 pN nm のトルクを発生させることで、DNA アンツイスティングを誘導することが示されている [37], [38]。細胞実験においては、*underwound* DNA に結合する低分子であるソラレンを用いたアプローチが行われてきた [39]-[48]。ソラレンは DNA 二本鎖の間に挿入され、UV 照射下で主にチミン基と共有結合を形成する [49]。ソラレン、および、その誘導体が DNA に結合する確率は DNA アンツイスティングにより上昇することが知られている [45], [46]。細胞にソラレンを添加した後、ソラレンが結合した DNA に対するシーケンス解析を行うことで、DNA アンツイスティングが生じているゲノム領域を明らかとすることができる。これにより、真核生物では転写開始地点より

上流約 10 kb にわたって DNA アンツイスティングが生じていることが示されており [39], [40]、さらに、RNAP の活性の阻害により *underwound* DNA が減少することが確かめられている [40]。以上の結果は、遺伝子転写により RNAP の後方において DNA アンツイスティングが生じることを意味しており、Liu と Wang のモデル [36] の妥当性を裏付けている。

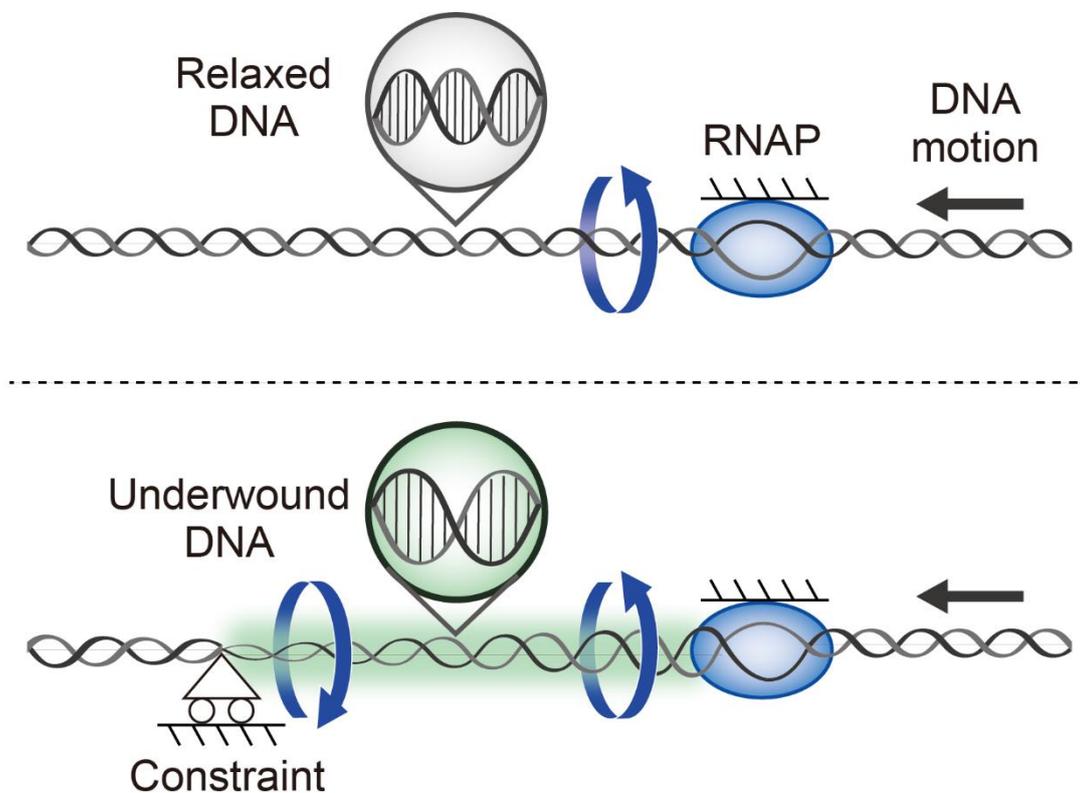


図2 Liu と Wang [36]によって提唱された DNA アンツイスティング機構のモデル。ここでは RNAP の回転と移動が拘束されている状況を想定している。遺伝子転写により DNA が右から左に移動するとき、RNAP の後方（図中では左側）にトルクが発生する。DNA の軸回転拘束が存在しない場合（上）では DNA 末端が回転するだけであり、DNA アンツイスティングは生じない。その一方で、RNAP の後方に DNA の軸回転拘束が存在する場合（下）では、DNA アンツイスティングが生じる。

1-4 DNA アンツイスティングに必要となる DNA の軸回転の拘束

DNA アンツイスティングの発生には、RNAP によるトルクの発生に加え、DNA の軸回転拘束が必要である。これまで、細胞内における DNA の軸回転拘束の仕組みとして、DNA のループ形成が注目されてきた。原核生物において、ラクトースオペロンのリプレッサーである LacI は、DNA 上の離れた 2 点と結合することでループを形成する。その LacI の結合箇所では、DNA の軸回転が拘束されることが知られている [50]–[54]。例えば、*in vitro* 再構成系においてラクトースオペロンに LacI を結合させた状態で RNAP による転写を誘導すると、RNAP の後方で DNA アンツイスティングが生じることが示されている [54]。さらに、ラクトース誘導体の存在下で LacI がラクトースオペロンに結合できない状態では、DNA アンツイスティングは生じないことも確かめられている [54]。LacI 以外にも、HU [53] や Fis [55] などの DNA 結合タンパク質が、ループ形成を介して DNA の軸回転拘束に寄与することが示されている。

真核生物では、リング状のタンパク質複合体であるコヒーシンが CCCTC 結合因子 (CTCF) と協同して働くことで DNA ループが形成される [56], [57]。手錠のように組み合わさった 2 個のコヒーシンが CTCF 結合 DNA と相互作用することで、DNA の軸回転拘束が生じると推測されている [34], [58]。しかしながら、ソラレン結合 DNA に対するシーケンス解析の結果、コヒーシンによる DNA ループ (> 1 Mb) の内部に、DNA アンツイスティングおよび DNA オーバーツイスティングの発生領域 (約 100 kb) が複数存在することが示されている [39]。したがって、真核生物においては、ループ形成以外にも DNA の軸回転を拘束する仕組みが存在し、DNA アンツイスティング発生領域の制御に寄与していると考えられるが、その詳細は未だ明らかでない。

1-5 核内構造体へのアンカリングによる DNA の軸回転拘束の可能性

細胞核内には、スーパーエンハンサーやカハール体、核スペckルなどの核内構造体が存在する [59]。それぞれの核内構造体には、遺伝子の転写、RNA 修飾、スプライシングなどの特定の機能に寄与する生体分子が集積している。多種多様な生体分子が混在している細胞核内において、核内構造体の形成により特定の生体分子が区画化されることで、連続かつ複雑な生化学反応が可能となると考えられている [59]。膜を有さない核内構造体が生体分子を区画化するメカニズムとして、液-液相分離を介した液滴の形成が注目されている [60]。配列特異的な転写因子、コアクティベーター、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) などは、天然変性領域 (IDR) と呼ばれる特定の構造を持たないドメインを有している [61], [62]。それらのタンパク質が IDR を介して、他のタンパク質や、RNA、DNA と多点的に相互作用することで、特定の生体分子が濃縮された液滴が形成され、核内構造体として機能することが知られている [61], [62]。

本論文では、ループ形成とは異なる DNA の軸回転拘束の仕組みとして、核内構造体へのアンカリングに着目した。核内構造体に DNA がアンカリングされると、巨大なタンパク質集合体の結合を介して表面積が増加することで、DNA の軸回転に対して大きな粘性抵抗が生じると予想される [63], [64]。これにより DNA の軸回転の速度が局所的に低下することで、RNAP を駆動力とした DNA アンツイスティングが生じる可能性が考えられる。

1-6 核小体内の力学環境

最も研究が進められている核内構造体の 1 つが、リボソーム合成機能を担う核小体である。核小体は、3 つの層からなるコア-シェル構造を有しており、fibrillar center (FC) と dense fibrillar component (DFC) からなるコアが、granular component (GC) からなるシェルに内包されている (図 3)。リボソームの合成においては、まず、FC/DFC の界面に存在する RNA ポリメラーゼ I

(RNAPI) によりリボソーム RNA (rRNA) が転写される [65]。続いて、DFC において rRNA は fibrillarin (FBL) などによるプロセッシングおよび化学修飾を受ける。最後に、GC において nucleophosmin (NPM) などの補助により rRNA はリボソームタンパク質と合体する [66],[67]。FBL は N 末端に、NPM は中央に IDR を有しており、それぞれを rRNA とともに *in vitro* で混合すると液滴を形成する [68]。さらに、FBL と NPM を混合すると、より疎水的な FBL が NPM に内包されたコア-シェル構造を形成することが確かめられている [68]。

液-液相分離に基づく核小体のコア-シェル構造は、リボソームの多段階の合成プロセスにおいて重要である。例えば、FC/DFC 界面において合成された rRNA は、5' external transcribed spacer (5' ETS) を介して FBL と結合することで優先的に DFC に運ばれ、プロセッシングおよび化学修飾を受ける [67]。その後、GC において rRNA がリボソームサブユニットに組み込まれると、NPM との相互作用を失い、核小体の外へ排出される [69]。このように、リボソーム合成の段階に応じて、各層のタンパク質と rRNA の相互作用が変化することで、核小体コアから核小体シェルへ、そして核小体外へと rRNA が運ばれる。

核小体内の力学環境においては、RNAPI による転写にともないトルクが発生するとともに、種々のタンパク質集合体の結合により、DNA の軸回転が拘束されていると推測される。したがって、核小体のリボソーム DNA (rDNA) においてアンツイスティングが生じている可能性が考えられる。しかしながら、これまで核小体内の DNA アンツイスティング機構に着目した研究は行われてこなかった。その原因の一つは、ソラレン結合 DNA に対するシーケンス解析では、タンデムリピートを含む rDNA を解析することが困難であることが挙げられる。また、細胞核内においてソラレン結合 DNA を蛍光標識することで DNA アンツイスティング発生領域を同定する試みも行われてきたが [34], [39], [47], [70]、蛍光標識の標的特異性は十分に検証されておらず、高解像度での観察は未だ成功していない。

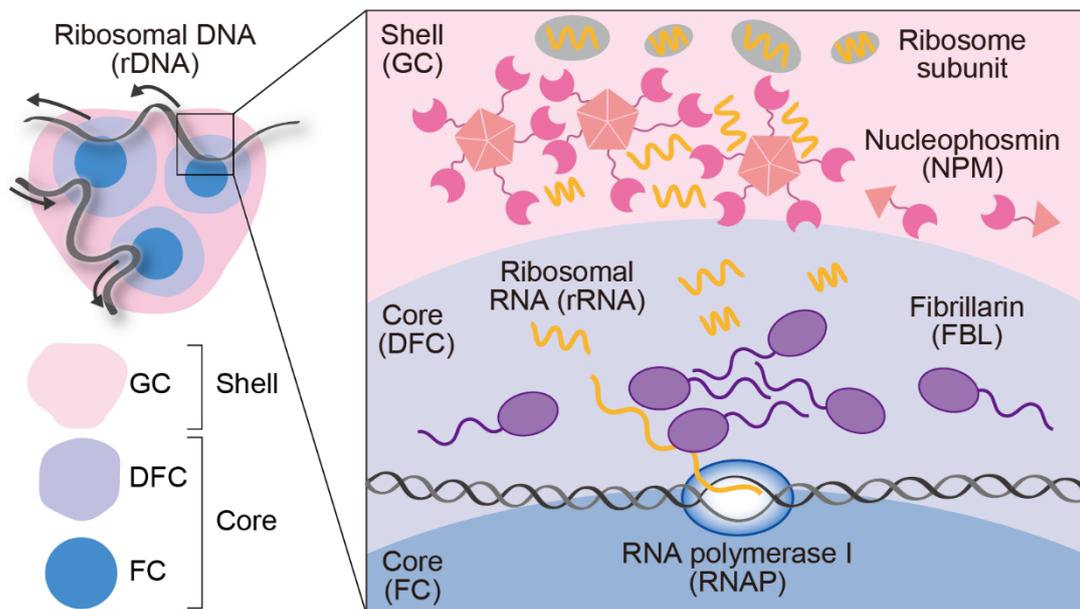


図3 核小体のコアーシェル構造およびリボソーム合成過程。核小体コアにおいて、リボソーム RNA の転写・修飾・プロセッシングが行われ、核小体シェルにおいて、リボソーム RNA はリボソームタンパク質と合体する。完成したリボソームサブユニットは核小体外へと排出される。

1-7 本論文の目的

本論文では、核小体内の力学環境においてDNAアンツイスティングが生じる機構を解明することを目的とした。特に、①RNAPIによるトルクの発生、および、②タンパク質集合体へのアンカリングによるDNAの軸回転拘束が連成することで、rDNAのアンツイスティングが生じるとの仮説を立て、*in situ*超解像イメージングに基づき検証した。

第2章 手法

2-1 Underwound DNA の蛍光標識および標的特異性の検証

2-1-1 Bio-psoralen に対する *in vitro* crosslinking assay

本研究では、underwound DNA の蛍光イメージングのため、ビオチン化ソラレンである Psoralen-PEG3-Biotin (bio-psoralen) を用いた [34], [39], [47], [70] (図 4 A)。Bio-psoralen の underwound DNA への結合を検証するため、*in vitro* crosslinking assay を行った [45]。Bio-psoralen は、DNA 二本鎖の間に挿入され、2本のポリヌクレオチド鎖に含まれるチミン基と共有結合を形成する (図 4 B)。したがって、bio-psoralen が結合した DNA においては、2本のポリヌクレオチド鎖が架橋される。本実験では、この性質を利用して、bio-psoralen が結合した DNA の量を測定する。以下に実験の手順を記す。

まず、プラスミド pBR322 (4.2 kb) に対してトポイソメラーゼ I (TopI) およびジャイレースを加え、37°Cで1時間反応させることで relaxed DNA (通常のねじれ角の DNA) および underwound DNA を作製した。その後、NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) を用いて DNA を精製した。Bio-psoralen (EZ-Link® Psoralen-PEG3-Biotin, Thermo Fisher Scientific) を最終濃度 200 μM で DNA に添加した後、氷上で 360 nm UV (3.6 kJ/m²) を 20 分間照射することで、2本のポリヌクレオチド鎖の架橋を誘導した。EcoRI (Toyobo) を 37°Cで1時間処理し、DNA を線状化した。サンプルの半分は静置し、残る半分のサンプルは 100°Cで5分間処理した後、直ちに氷水中で冷却した。1%アガロースゲルに熱処理・非熱処理 DNA を注入した後、Mupid®-exU (Mupid) を用いて、50 V (約 4 V/cm) の出力電圧で1時間電気泳動を行った。0.1 μg/mL エチジウムブロマイド溶液 (Nacalai Tesque) により 30 分間ゲルを染色した後、ImageQuant™ LAS500 (Cytiva) を用いて撮影した。画像処理ソフト Fiji [71]を用いて、4.2 kb の位置のバンド輝度を測定し、熱処理サンプルにおける輝度を非熱処理サンプルにおける輝度で除することで、bio-psoralen 結合 DNA の割合を算出した。

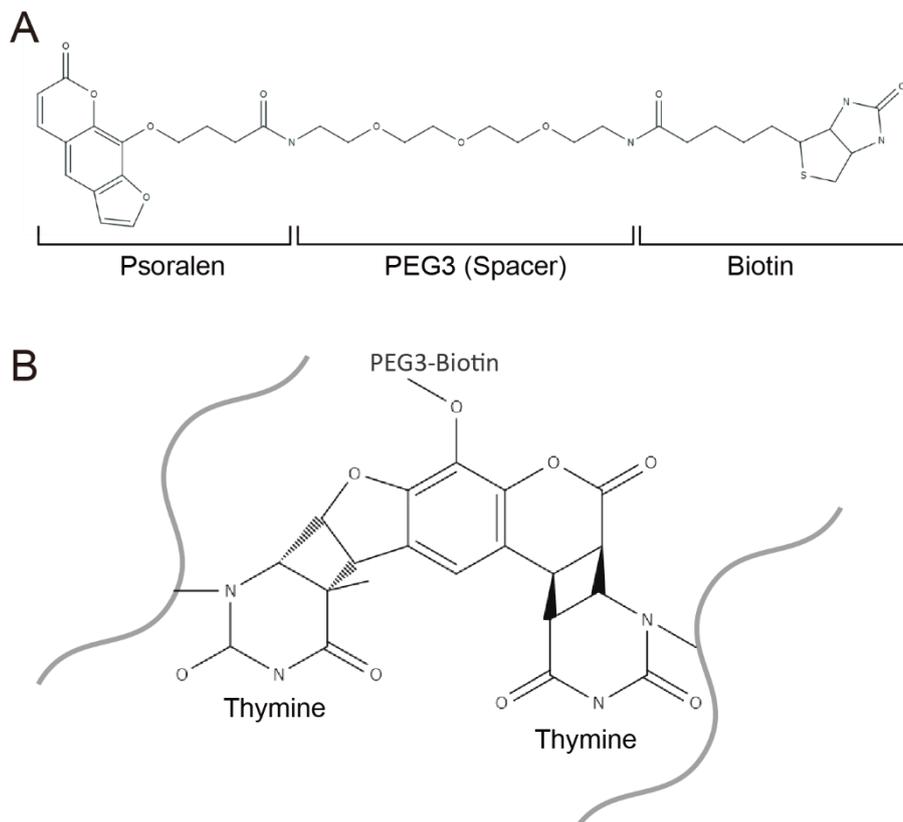


図4 Bio-psoralen の DNA に対する結合。(A) Bio-psoralen の化学構造。
 (B) Bio-psoralen とチミン基の間の共有結合。

2-1-2 細胞培養

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (RIKEN CELL BANK; 継代数 25-34) を実験に用いた。αMEM (Gibco) に、10% fetal bovine serum (Gibco) および 1% 抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (Nacalai Tesque) を添加した培地を用いて、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。蛍光染色 (第 2-1-3 項) では、1×10⁴ cells を Φ35 mm ガラスボトムディッシュ (Φ7 mm glass, MatTek) に播種し、ゲノム DNA の回収 (第 2-1-4 項) では、1×10⁶ cells を Φ100 mm プラスチックディッシュ (Thermo Fisher Scientific) に播種し、クロマチンの回収 (第 2-3-2 項) では、2.5×10⁶ cells を Φ150 mm プラスチックディッシュ (Corning) に播種した。それぞれ 16-24 時間培養した後、実験に供した。

2-1-3 Bio-psoralen を用いた underwound DNA の蛍光標識

Bio-psoralen を用いた underwound DNA の蛍光標識について、先行研究 [34], [39], [47], [70] の手法に修正を加えた以下の手順で行った。ディッシュからの細胞の剥離を防ぐために、ジギトニンおよび bio-psoralen の希釈液としてカルシウム・マグネシウム含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (+)) を使用した。PBS (+) については、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-); Gibco) にカルシウム・マグネシウム溶液 (Nacalai Tesque) を 1:100 で加えることで作製した。まず、50 μg/mL のジギトニン (Cayman Chemical) を 37°C で 1 分間処理し、細胞膜の透過処理を行った。PBS (+) で洗浄した後、最終濃度 20 μM の bio-psoralen を添加し、37°C で 20 分間静置した。氷上で 365 nm UV (3.6 kJ/m²) を 30 分間照射し、bio-psoralen と DNA の架橋を誘導した後、PBS (+) で洗浄した。4% パラホルムアルデヒド/PBS (-) (PFA; Nacalai Tesque) を加え 15 分間固定した。続いて、0.5% TritonX-100/PBS (-) (MP Biomedicals) を加え 30 分間脱膜処理を行った後、1% bovine serum albumin/PBS (-) (BSA; Sigma-Aldrich) を加え 30 分間ブロッキング処理を行った。そして、NeutrAvidin Protein, FITC conjugate (Thermo Fisher

Scientific)、または、NeutrAvidin Protein, DyLight™ 488/650 (Thermo Fisher Scientific) を、それぞれ最終濃度 25 µg/mL および 2.5 µg/mL で 1%BSA, 0.03% TritonX-100/PBS (-) に希釈した後、サンプルに添加し、遮光下にて 4°C で 12 時間以上静置した。RNA および DNA が分解されたサンプルを作製するため、細胞をメタノールで 5 分間固定し、0.5% Triton X-100/PBS (-) を加え、15 分間静置した後、1 mg/mL RNase A (ニッポンジーン) および 50 U/mL DNase I (Takara) を添加し、37°C で 1 時間静置した。ビオチン-アビジン相互作用を阻害したサンプルを作製するため、ブロッキング後に遊離アビジン (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories) を添加し、室温で 1 時間静置した。

2-1-4 Bio-psoralen を用いた underwound DNA の回収および定量

以下の手順に従って、細胞核から bio-psoralen 結合 DNA を回収した。第 2-1-3 項に記載した手順で bio-psoralen を DNA に架橋させた後、NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel) を用いてゲノム DNA を回収し、100 µL の Tris-EDTA buffer (pH 8.0) に溶解した。1 mg/mL RNase A (ニッポンジーン) を添加し、37°C で 1 時間処理することで RNA を分解した。Bioruptor® II (BM Equipment) を用いて、氷水中で High power にて 30 秒間の超音波破碎と 30 秒間の休止を 30 サイクル行い、DNA を断片化させた。断片化した DNA を 2×Binding buffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, 0.1% Tween 20) と混合した後、100 µL のアビジン磁気ビーズ (Magnosphere™ MS300/Streptavidin; JSR Life Sciences LLC) に添加した。遮光下で室温にて 1 時間回転させながらインキュベートし、その後 4°C で 12 時間以上回転させながらインキュベートした。1×Binding buffer を用いて磁気ビーズを洗浄し、非結合 DNA を除去した。Bio-psoralen 結合 DNA を磁気ビーズから解離させるために、Elution buffer (10 mM EDTA, 95%ホルムアルデヒド) を加え 95°C で 10 分間静置した。最後に、Qubit™ ssDNA Assay Kit (Invitrogen) および Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) を用いて一本鎖 DNA 量を測定した。

2-2 Underwound DNA および関連タンパク質の空間分布の解析

2-2-1 免疫蛍光染色および化学染色

DNA アンツイスティングの関連タンパク質の空間分布を解析するため、免疫蛍光染色を行った。第 2-1-3 項と同様の方法で固定、膜透過、ブロッキングを行った後、一次抗体を 1%BSA, 0.03% TritonX-100/PBS (-) で希釈して加え、4°Cで 12 時間以上インキュベートした。一次抗体として、Anti-RNA polymerase II CTD repeat YSPTSPS (phospho S2) (5095, Abcam; 1:500)、anti-topoisomerase I (85038, Abcam; 1:500)、anti-RPA194 monoclonal (48385, Santa Cruz Biotechnology; 1:100)、anti-fibrillarin monoclonal (2639, Cell Signaling Technology; 1:500)、anti-NPM 1 monoclonal (32-5200, Invitrogen; 1:500) を用いた。PBS (-) で洗浄した後、二次抗体を 1% BSA, 0.03% Triton X-100/PBS (-) にて希釈して加え、室温で1時間インキュベートした。二次抗体として、Goat Anti-Rabbit IgG H&L-Alexa Fluor[®] 568 (175471, Abcam; 1:500)、および、Goat Anti-Mouse IgG H&L-Alexa Fluor[®] 568 (175473, Abcam; 1:500) を用いた。

DNA の染色のため、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Invitrogen) を 1:500 の希釈倍率にて加え、二次抗体とともに室温で 1 時間インキュベートした。RNA の染色のため、StrandBrite[™] (AAT Bioquest) を 1:4000 の希釈倍率にて加え、30分間室温でインキュベートした。細胞の生死判定のため、最終濃度 1 μ M の SYTOX Orange[™] (Thermo Fisher Scientific) および最終濃度 20 μ g/mL の bisBenzimide H 33342 trihydrochloride (Hoechst33342; Sigma-Aldrich) を培地に加えた後、37°C, 5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベートした。

2-2-2 リボソーム DNA に対する FISH

Underwound DNA、核小体タンパク質、rDNA を同時に観察するため、Immuno-FISH [72]を行った。まず、bio-psoralen および核小体タンパク質 (FBL)

の蛍光染色を第 2-1-3 項および第 2-2-1 項に記載した手法で行った。ただし、4% PFA による固定時間は 15 分から 20 分間に変更した。その後、細胞を再度 4% PFA により 10 分間処理し、抗体をサンプルに固定した。0.05% TritonX-100/PBS (-) で 3 回洗浄した後、1 mg/mL RNase A を 37°C で 30 分間処理した。次に、0.1 N HCl を加え、室温で 2 分間変性処理を行った後、1% PFA で 5 分間再固定した。70% および 100% エタノールを 5 分間ずつ処理することでサンプルを脱水した後、5 分間風乾した。rDNA を標的とした Cy3 標識 FISH プローブ (Chromosome Science Laboratory; BAC クローン RP23-225M6 から作製) をサンプルに加え、40°C で 2 時間処理した。70°C で 5 分間熱変性処理を行った後、37°C で 12 時間以上インキュベートした。最後に、0.01% TritonX-100/2× SSC buffer (Nacalai Tesque) を用いて 3 回洗浄した。

2-2-3 顕微鏡観察および画像解析

倒立蛍光顕微鏡 (IX-83, EVIDENT) を用いて蛍光サンプルの撮影を行った。超解像イメージングにおいては、格子構造化照明顕微鏡 (Elyra7 with Lattice SIM; Zeiss) を用いた。40 倍または 60 倍の Plan-Apochromat 油浸対物レンズを用いて、スライス厚 0.2-0.4 μm の三次元スタック画像を取得した。

取得した蛍光画像をもとに、細胞核内の bio-psoralen の蛍光輝度を定量した。画像解析ソフトとして Fiji [71] を使用した。まず、細胞核の輪郭を得るため、DAPI 染色画像に対して Rolling Ball Algorithm に基づく背景の減算を行った後、ガウス関数を用いた畳み込みによるスムージングを行った。手動で設定した閾値を用いて二値化を行った後、粒子解析を行い細胞核の輪郭を取得した。続いて、bio-psoralen の蛍光画像に対して背景を減算した後、細胞核の輪郭の内部における蛍光輝度の平均値を取得した。

核小体における bio-psoralen および NPM (核小体シェルの構成タンパク質) に対する蛍光プロファイル解析を以下の手順に従って行った。まず、NPM 蛍光

画像に対して上記の方法で背景の減算を行った後、“Default”アルゴリズムにより設定した閾値を用いて二値化を行った。次に、3D Objects Counter [73]を用いて NPM シグナルの重心を同定し、これを核小体の重心とした。3D suite [74]を用いて核小体の重心の座標を得た後、重心から左右に引いた 100 ピクセルの直線上の NPM および bio-psoralen の蛍光プロファイルを取得した。NPM の蛍光輝度の極大点を Find Peak 機能にて同定した後、重心から極大点までの距離が 1 となるよう、NPM および bio-psoralen 蛍光プロファイルを正規化した。重心からの正規化距離 d について、 $(d \leq 0.5)$ の範囲を核小体の内側、 $(1.5 \leq d \leq 2.0)$ の範囲を核小体の外側として、それぞれの範囲における bio-psoralen の蛍光輝度の平均値を取得した。

2-3 核小体内の力学環境への摂動およびその効果の確認

2-3-1 細胞に対する阻害剤処理

Bio-psoralen の underwound DNA に対する標的特異性を検証するため、bleomycin (BLM; Cayman Chemical) を最終濃度 100 μM で培地に加え 37°C で 15 分間培養した。BLM は DNA 一本鎖および二本鎖の切断を誘導し、underwound DNA を relaxed DNA へと構造変化させることが知られている [39], [75]。細胞核内におけるトポイソメラーゼ I および II (TopI/II) の役割を検証するため、それぞれの活性阻害剤である camptothecin [76] (CPT; Cayman Chemical) および etoposide [77] (ETO; 東京化成) を、ともに最終濃度 10 μM で培地に添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。RNAPI による転写開始および転写伸長を阻害するため、CX-5461 [78], [79] (ChemScene LLC) および actinomycin D [79] (ActD; Nacalai Tesque) をそれぞれ最終濃度 3 μM および 50 nM で培地に加え、37°C で 15 分間培養した。NPM と G4 の相互作用を阻害するため、G4 選択的リガンドである TMPyP4 [80] (Abcam) を最終濃度 100 μM にて培地に加え、37°C で 15 分間培養した。

2-3-2 クロマチン免疫沈降

TMPyP4 処理/非処理条件下における NPM と G4 の相互作用を解析するために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。実験には Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Cell Signaling) を用いた。まず、以下の手順に従って、単離核からクロマチン断片を回収した。ホルムアルデヒドを最終濃度 1% にて培地に添加し、10 分間静置することでタンパク質と DNA を架橋させた。10X グリシンを 10 倍希釈で加え 5 分間静置し架橋反応を止めた後、氷冷した PBS (-) で洗浄した。スクレイパーを用いて細胞を剥離させ、Proteinase Inhibitor Cocktail を加えた PBS (-) に回収した。サンプルに 0.25 μ L の Micrococcal Nuclease (2000 gel units/ μ L) を加え、37°C で 20 分間処理することでクロマチンを断片化した。Bioruptor[®] II (BM Equipment) を用いて、氷水中で High power にて 30 秒間の超音波破碎と 30 秒間の休止を 3 サイクル行い、核膜を破碎した。

さらに、以下の手順に従って、NPM が結合したクロマチン断片から DNA を回収した。クロマチン断片を含むサンプルを 500 μ L にメスアップした後、10 μ L を別のチューブに移し、インプットサンプルとした。残りのサンプルに 10 μ g の Anti-NPM 1 monoclonal (32-5200, Invitrogen) を加えた。さらに、ポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして、Anti-Histone H3 monoclonal (4620, Cell Signaling) を 2 μ g、Normal rabbit IgG (2729, Cell Signaling) を 10 μ g 添加した。抗体を添加したサンプルを回転させながら 4°C で 12 時間以上インキュベートした。Protein G 結合磁気ビーズを用いて、抗体に結合したクロマチン断片を回収した後、1X ChIP Elution Buffer を加え、65°C で 30 分間インキュベートし、クロマチン断片を磁気ビーズから解離させた。その後、インプットを含むすべてのサンプルに対して、NaCl および Proteinase K を添加し、65°C で 2 時間インキュベートすることで脱クロスリンクを誘導した。最後に、スピンカラムを用いて DNA を精製した。

2-3-3 定量 PCR 解析

ChIPにより回収したDNAに対して定量PCR (qPCR) 解析を行った。まず、プライマーを設計するため、rDNAにおけるG4形成配列を推定した。G4 hunter web [81]にマウス rDNA 配列 [82] (GenBank: BK000964.3) を入力し、得られた結果から、遺伝子間領域における4つの推定G4形成配列 (PQS) を選択した。さらに、ネガティブコントロールとして非PQSを加えた計5配列に対して、プライマーを作製した (表1)。続いて、ChIP回収DNAおよびインプットDNAを鋳型として、TB Green Premix Ex Taq GC (Takara) および StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR 解析を行った。それぞれのサンプルについてパーセントインプット (%) を求め、TMPyP4 非処理サンプルに対する相対値を算出した。

Target region	Strand	Sequence (5'-3')
PQS-1	Forward	ACCAGTACTCCGGGCGACACTT
	Reverse	AAAAGAGTCCAGAGTGAGCCCGC
PQS-2	Forward	AGGAACATTTGCAGTCAGTCAGT
	Reverse	TCTGCCTCCGAAGTGCTGGGAT
PQS-3	Forward	TGGACTGACTGGCTGCCTTCCT
	Reverse	TGGTGCCCTCGTCTAGTGTGTC
PQS-4	Forward	TGGCCAAAGCAGACCGAGTTGC
	Reverse	TGACGGGGACAAGAGAGGGCTT
Non-PQS	Forward	AACGCTCCAGGCCTCTCAGGTT
	Reverse	ACGACACCATCTCCGAGACGCT

表1 rDNA上のPQSおよび非PQSを標的としたプライマー

第 3 章 結果

3-1 Underwound DNA の蛍光標識における標的特異性の検証

3-1-1 *In vitro* において bio-psoralen は underwound DNA に結合する

本研究では、underwound DNA の蛍光イメージングのために、ビオチンを付加したソラレンである Psoralen-PEG3-Biotin (bio-psoralen) を用いた。Bio-psoralen が underwound DNA に結合することを確認するため、*in vitro* crosslinking assay [45]を行った (図 5 A)。この実験では、bio-psoralen が DNA 内の 2 本のポリヌクレオチド鎖を架橋させる性質を利用して、bio-psoralen の DNA への結合量を検証する。まず、プラスミド pBR322 (約 4.2 kb) を TopI とジャイレースで処理することで、relaxed DNA と underwound DNA をそれぞれ作製した。次に、bio-psoralen を添加し、UV を照射することで bio-psoralen を介した 2 本のポリヌクレオチド鎖の架橋を誘導した。最後に、制限酵素処理によりプラスミド DNA を線状化し、サンプルの半分はそのままゲルに注入し、残る半分は 100°C で加熱した後ゲルに注入し、電気泳動を行った。Bio-psoralen と結合していない DNA は、熱により一本鎖に解離するため、約 3.0 kb の位置のバンドとして現れる一方で、bio-psoralen と結合した DNA は、二本鎖構造が保持されているため、約 4.2 kb の位置のバンドとして現れる (図 5 B)。Bio-psoralen が結合した DNA の割合を比較すると、underwound DNA が relaxed DNA に比べて高い値を示した (図 5 C)。この結果から、bio-psoralen が relaxed DNA に比べ underwound DNA に優先的に結合することが確かめられた。

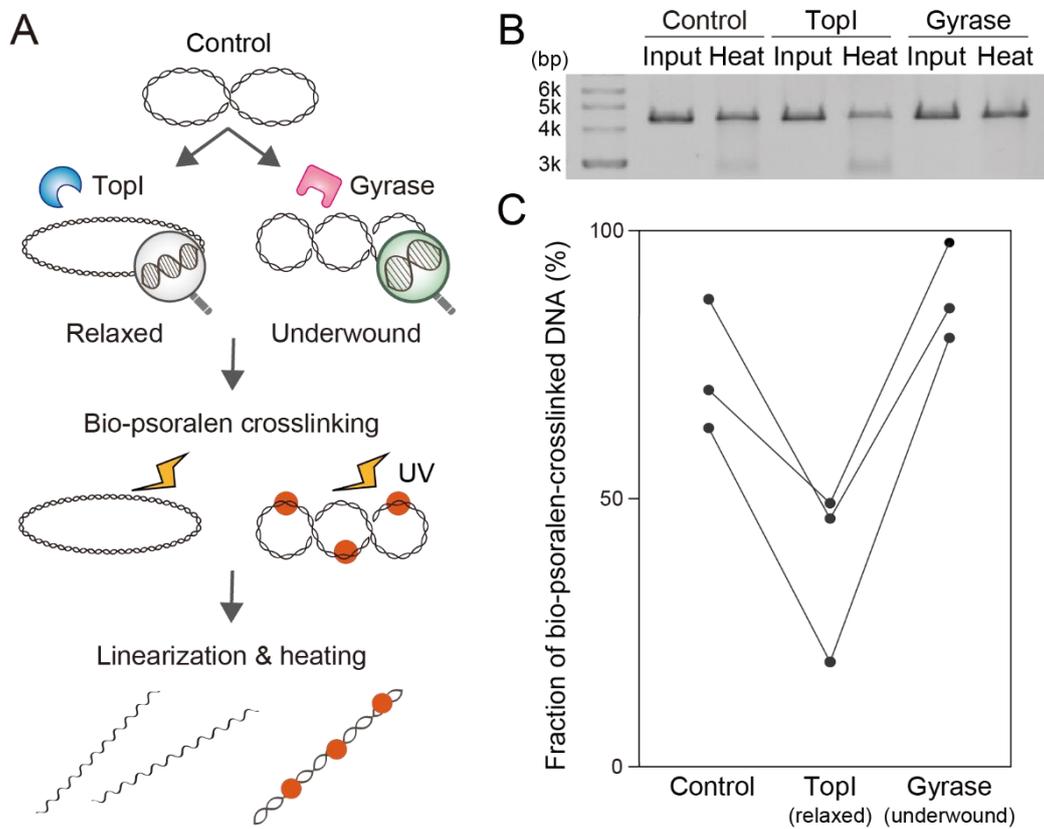


図5 *In vitro* crosslinking assay による bio-psoralen の underwound DNA への結合の検証。(A) *In vitro* crosslinking assay の実験手順。(B) 非熱処理 DNA (Input) および熱処理 DNA (Heat) に対するアガロースゲル電気泳動。約 4.2 kb の位置のバンドは二本鎖構造を保持している DNA を示している。Bio-psoralen 結合 DNA は 2 本のポリヌクレオチド鎖が架橋されているため、熱処理後においても二本鎖構造を保持している。その一方で、約 3.0 kb の位置のバンドは熱処理により一本鎖に解離した DNA を示している。(C) 各サンプルにおける bio-psoralen 結合 DNA の割合。Bio-psoralen 結合 DNA の割合については、熱処理 DNA のバンド輝度を非熱処理のバンド輝度で割ることで算出した。3 回の独立した実験を行った ($n=3$)。

3-1-2 細胞核内の bio-psoralen 結合 DNA を蛍光標識した

In vitro において underwound DNA に結合することが確かめられた bio-psoralen を用いて、細胞核内における underwound DNA の蛍光標識を試みた。蛍光標識の実験手法を図 6 A に示す。まず、界面活性剤であるジギトニンを用いて細胞膜の透過処理を行い、bio-psoralen の取り込みを促進した [47], [48]。次に、細胞を bio-psoralen で処理した後、UV を照射することで DNA に対する bio-psoralen の結合を誘導した。PFA による固定および TritonX-100 による膜透過処理を行った後、NeutrAvidin-FITC により bio-psoralen を蛍光標識した。それぞれの試薬の濃度・処理時間は先行研究を参照した [34], [39], [47], [48]。

蛍光標識の特異性を検証するため、ジギトニン処理、bio-psoralen 添加、UV 照射、NeutrAvidin Protein-FITC 処理の各ステップを省略して染色を行った (図 6 B 左 1 - 4 列)。しかしながら、ジギトニン処理、bio-psoralen 添加、UV 照射を省略したサンプルにおいても、染色ステップを全て経たサンプル (図 6 B 最右列) と同程度の蛍光シグナルが確認されたことから、非特異的シグナルが支配的であることが明らかとなった。また、ジギトニン処理によりほとんどの細胞がディッシュから剥離する問題も生じた。

これらの問題を解決するため、蛍光標識の各種条件の改良を図った (表 2)。まず、ジギトニン処理濃度を低くするとともに処理時間を短くすることで、bio-psoralen の取り込みが行われつつも細胞の剥離が抑えられるようにした。また、改良前においては、ジギトニンおよび bio-psoralen の希釈液として PBS (-) を用いていたが、改良後では、カルシウム・マグネシウム含有の PBS (+) を用いることで、細胞-細胞間および細胞-ディッシュ間の接着結合が保持されるようにした。次に、bio-psoralen の結合が十分でない可能性が考えられたため、UV 照射時間を延長した。最後に、NeutrAvidin-FITC に代わり、より蛍光輝度が高い NeutrAvidin Protein, DyLight™ 488 を用いるとともに、非特異的結合を抑えるため、処理濃度を 1/10 にした。

以上の改良を加えた手法により bio-psoralen の蛍光標識を行った結果、染色ステップを全て経たサンプル（図 6 C 最右列）では強い核内シグナルが見られた一方で、それ以外のサンプルでは微弱な蛍光シグナルしか検出されなかった（図 6 C 左 1 - 4 列）。この結果から、改良した手法により、bio-psoralen が蛍光標識されていることが示された。

Bio-psoralen の蛍光標識における標的特異性を検証するため、遊離アビジンの添加によりビオチン-アビジン相互作用を阻害したサンプル（図 7 A）、および、DNase I 処理により DNA を分解したサンプル（図 7 B）を作製した。これらのサンプルでは、コントロールに比べて細胞核の bio-psoralen シグナルが低下したことから、ビオチン-アビジン相互作用を介して bio-psoralen 結合 DNA が蛍光標識されていることが確かめられた。

また、bio-psoralen は underwound DNA だけでなく二次構造を形成した RNA にも結合することから [83]、本手法において bio-psoralen が核内 RNA に結合している可能性を検証した。RNA マーカーである StrandBrite™ との共染色を行った結果、bio-psoralen と StrandBrite™ シグナルとの間に顕著な共局在は観察されなかった（図 8 A）。さらに、RNase A 処理により RNA を分解した結果、StrandBrite™ のシグナルは有意に低下した一方で（図 8 B, C）、bio-psoralen の核内シグナルに有意な変化は見られなかった（図 8 B, D）。これらの結果から、細胞核内の bio-psoralen 結合 DNA が特異的に蛍光標識されていることが確かめられた。

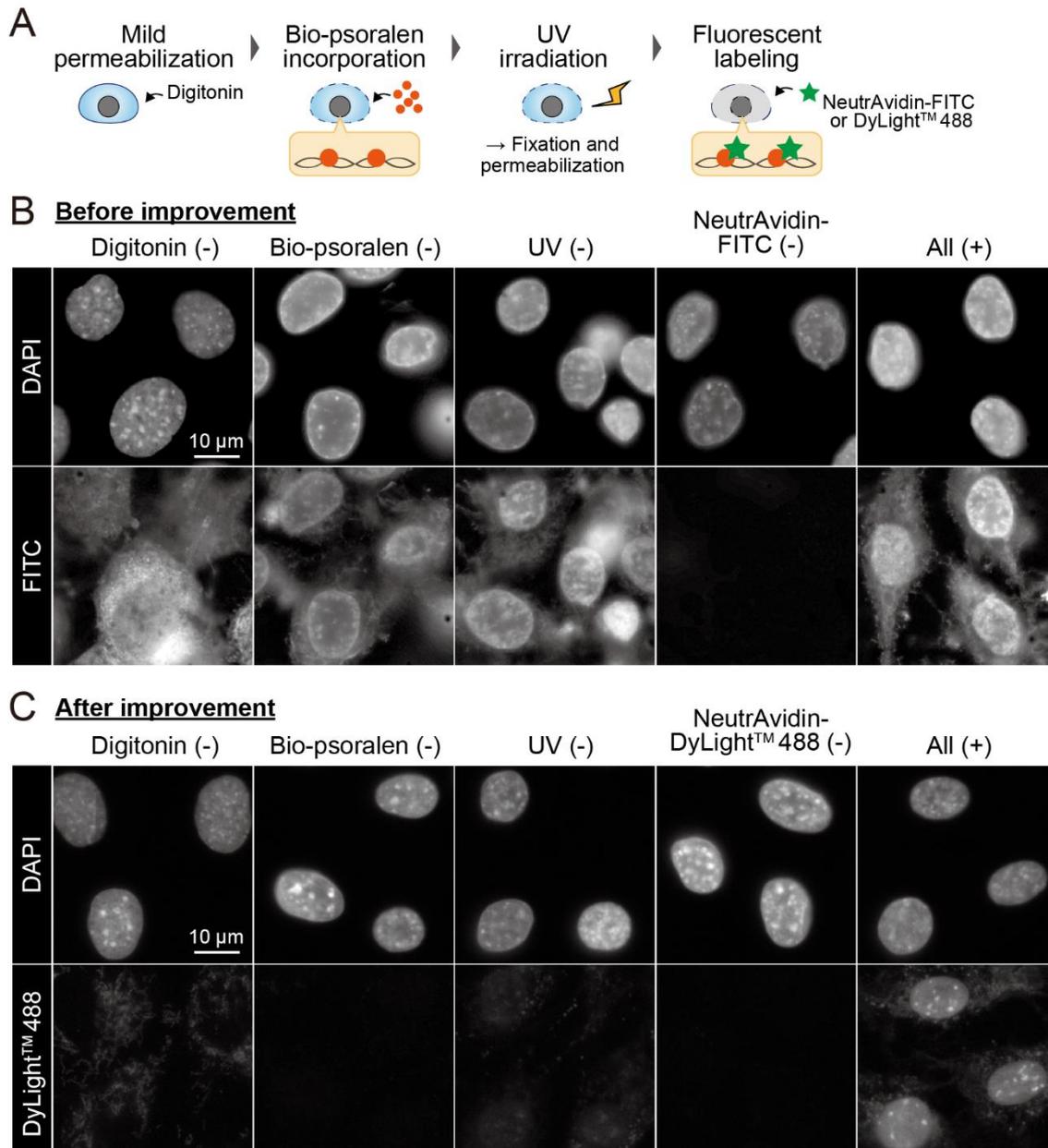


図6 Underwound DNAの蛍光標識における手法の妥当性の検証。(A) Bio-psoralenを用いた underwound DNA 蛍光標識の手法。(B) 改良前の手法による DAPI および NeutrAvidin-FITC の蛍光染色画像。ジギトニン処理、bio-psoralen 添加、UV 照射、NeutrAvidin-FITC 処理のいずれかの染色ステップを行わないサンプル（左から1-4列）と全ての染色ステップを行ったサンプル（最右列）を作製した。(C) 改良後の手法による DAPI および NeutrAvidin-DyLight™ 488 の蛍光染色画像。

Staining step	Before improvement	After improvement
Mild permeabilization	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ digitonin in PBS (-) 5 min	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ digitonin in PBS (+) 1 min
Bio-psoralen incorporation	20 μM bio-psoralen in PBS (-) 20 min	20 μM bio-psoralen in PBS (+) 20 min
UV irradiation	360 nm UV 12 min	360 nm UV 30 min
Fluorescent labeling	25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NeutrAvidin-FITC overnight	2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NeutrAvidin-DyLight TM 488 overnight

表2 Bio-psoralen を用いた underwound DNA の蛍光標識法の改良点。

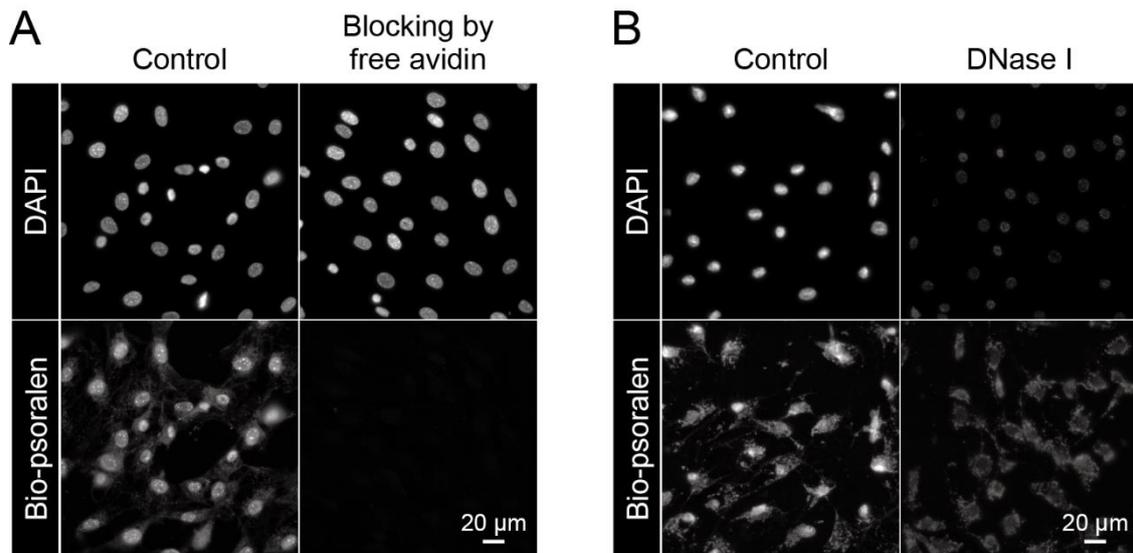
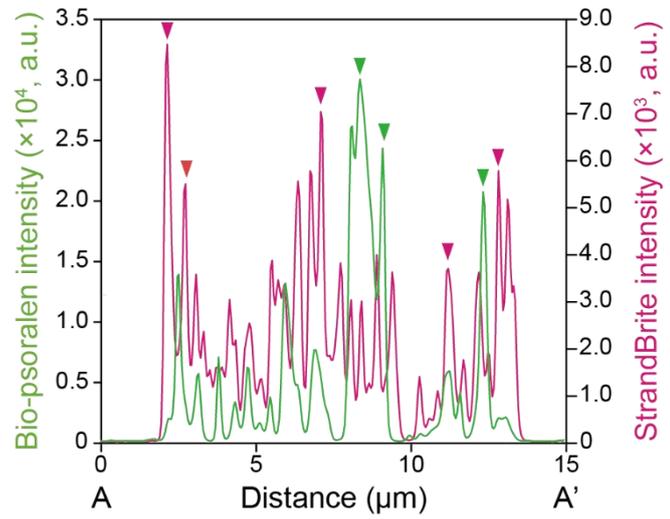
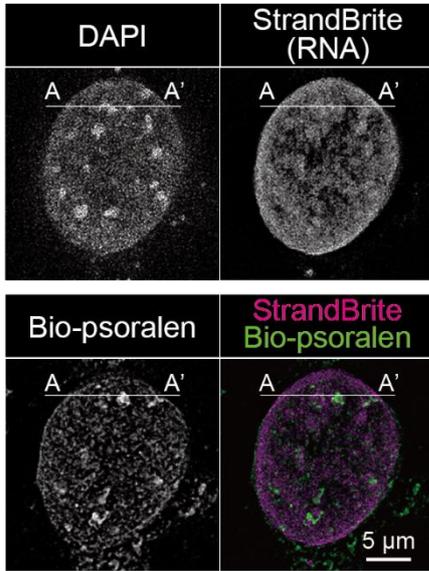
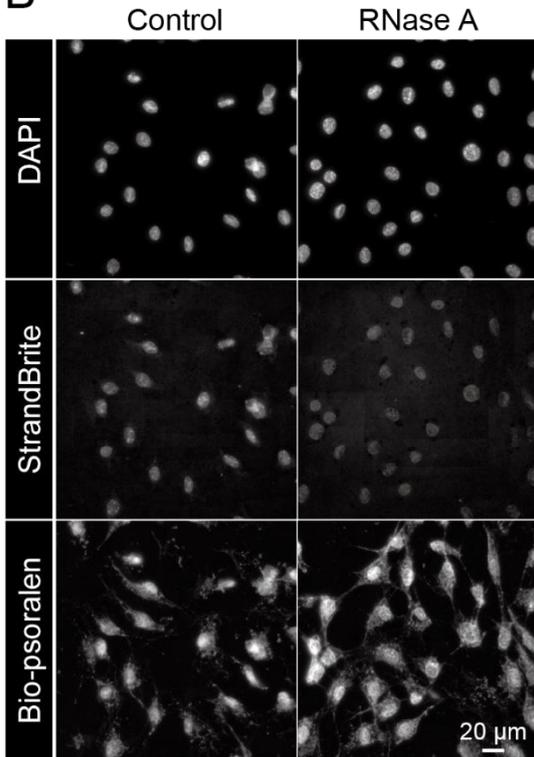


図7 Bio-psoralen を用いた underwound DNA の蛍光標識における標的特異性の検証。(A) DAPI および bio-psoralen の蛍光染色画像。コントロールのサンプル、および、遊離アビジン処理によりビオチン-アビジン相互作用を阻害したサンプルを作製した。(B) DNase I 非処理/処理サンプルに対する DAPI および bio-psoralen の蛍光染色画像。

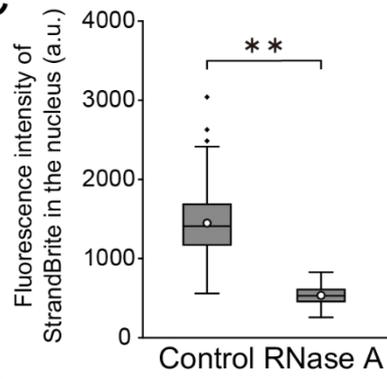
A



B



C



D

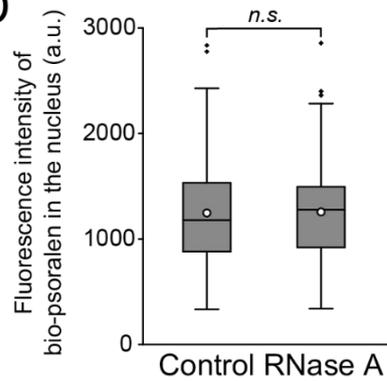


図8 細胞核内において bio-psoralen が RNA と結合する可能性の検証。(A) Bio-psoralen および StrandBrite™ (RNA 蛍光試薬) の蛍光染色画像。画像中の点線に沿った bio-psoralen および StrandBrite™ の蛍光プロファイルを示した。Bio-psoralen および StrandBrite™ の蛍光輝度のピークの位置を矢頭で示した。(B) RNase A 非処理/処理サンプルに対する DAPI, StrandBrite™, bio-psoralen の蛍光染色画像。(C) RNase A 非処理/処理サンプルの細胞核における StrandBrite™ の蛍光輝度 ($n = 150$ 細胞)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、マン・ホイットニーの U 検定を行った。 $P^{**} < 0.01$ ($P = 5.53 \times 10^{-47}$) . (D) RNase A 非処理/処理サンプルの細胞核における bio-psoralen の平均蛍光輝度 ($n = 150$ 細胞)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、マン・ホイットニーの U 検定を行った。 $n.s.$, not significant ($P = 0.38$) .

3-1-3 細胞核内において bio-psoralen は underwound DNA に結合する

続いて、細胞核内における bio-psoralen の underwound DNA への結合を検証した。DNA の一本鎖切断および二本鎖切断を導入する薬剤である bleomycin (BLM) は、underwound DNA の解消を誘導することが知られている [39], [75]。Naughton ら [39] は、ヒト細胞に対して biotinylated trimethylpsoralen (bTMP) を用いた蛍光イメージングを行い、BLM 処理による蛍光シグナルの減少を示すことでイメージングの特異性を確かめた。bTMP とは異なるソラレン誘導体である bio-psoralen を用いたイメージングにおいても標的特異性を示すか検証するため、Naughton らの手法に倣い、BLM 処理時の bio-psoralen 結合 DNA 量および bio-psoralen 蛍光輝度の変化を検証した。その結果、BLM 処理によって、bio-psoralen 結合 DNA 量 (図 9 A)、および、核内の bio-psoralen 蛍光輝度 (図 9 B, C) が有意に減少することが示された。これらの結果から、細胞核内において bio-psoralen が underwound DNA に結合していることが確かめられた。

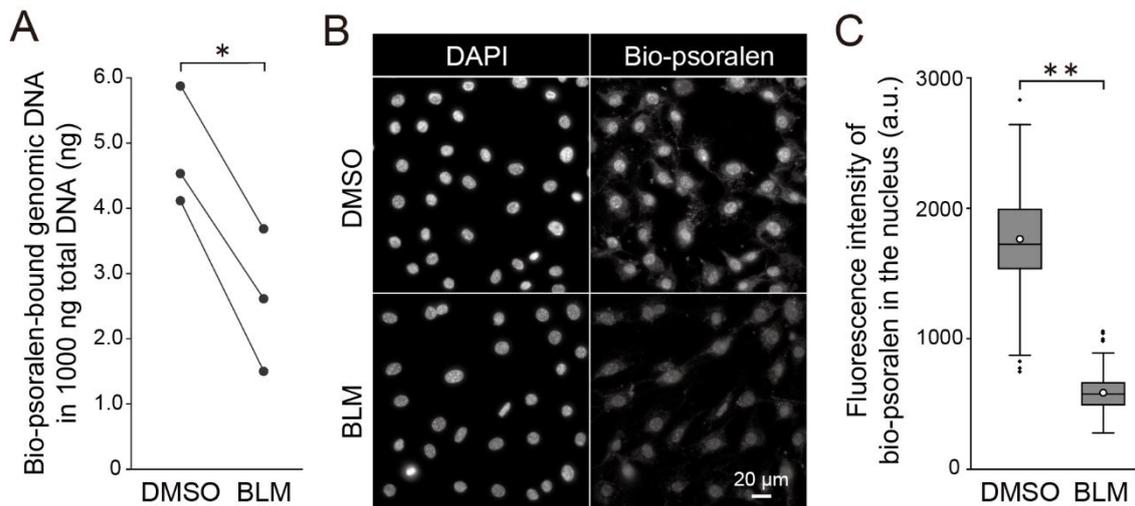


図9 細胞核内における bio-psoralen の underwound DNA への結合の検証。

(A) DMSO/BLM 処理細胞から回収した 1000 ng のゲノム DNA 中の bio-psoralen 結合 DNA 量。3 回の独立した実験を行った ($n = 3$)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、対応のある t 検定を行った。 $P^* < 0.05$ ($P = 0.0366$) (B) DMSO/BLM 処理サンプルに対する DAPI および bio-psoralen の蛍光染色画像。(C) DMSO/BLM 処理サンプルの細胞核における bio-psoralen の平均蛍光輝度 ($n = 150$ 細胞)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、マン・ホイットニーの U 検定を行った。 $P^{**} < 0.01$ ($P = 3.05 \times 10^{-50}$) .

3-2 細胞核内における DNA アンツイスティングの発生領域の同定

3-2-1 DNA アンツイスティングは RNA ポリメラーゼおよびトポイソメラーゼの近傍で生じる

細胞核内における DNA アンツイスティング発生領域を同定するため、underwound DNA の蛍光染色サンプルに対して、Lattice-SIM を用いた超解像イメージングを行った。その結果、bio-psoralen により標識された underwound DNA は、一般的な DNA 染色試薬である DAPI とは異なる分布を示すことが確かめられた (図 1 0)。これは、bio-psoralen と DAPI の結合様式の違いに起因すると考えられる。Bio-psoralen が DNA 二本鎖の間に挿入する形で結合するのに対して、DAPI は DNA の副溝に結合する。DAPI は、副溝の幅が狭い overwound DNA [84] と強く相互作用する可能性が示唆されており [85]、これにより bio-psoralen との分布の違いが生じたと考えられる。

核内タンパク質との共染色の結果、underwound DNA の一部が、転写伸長中の RNAPII であるセリン 2 リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II (RNAPIIS2P) の近傍に分布することが明らかとなった (図 1 1 A)。この結果は、転写伸長中に RNAPII の後方で DNA アンツイスティングが生じるという報告と一致する [39], [40]。さらに、細胞核内において underwound DNA が蓄積する領域が存在することを見出した (図 1 1 B 矢印)。これらの領域は、under/over-wound DNA を解消するタンパク質であるトポイソメラーゼ I (TopI) [86] と隣接して分布していた (図 1 1 B)。以上の結果から、DNA アンツイスティングの発生・解消に寄与する核内タンパク質である RNAPII および TopI の近傍に underwound DNA が存在することが明らかとなった。

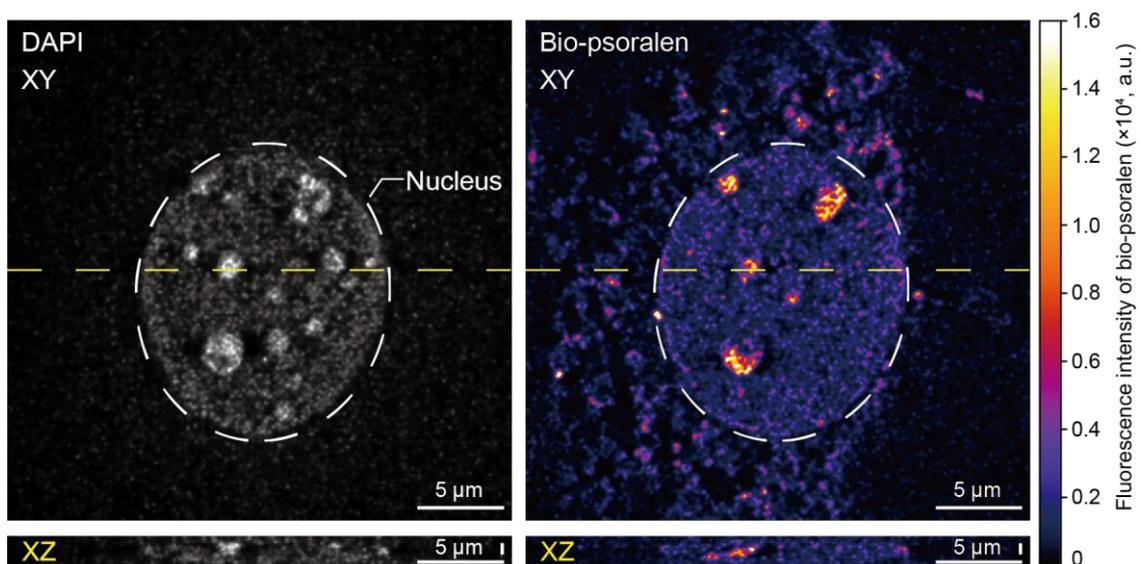


図 1 0 DAPI (左) および bio-psoralen (右) の蛍光染色画像。XY 平面 (上) および、中央の黄色の点線に沿った XZ 断面 (下) を示した。Bio-psoralen の蛍光染色画像についてはヒートマップで示した。

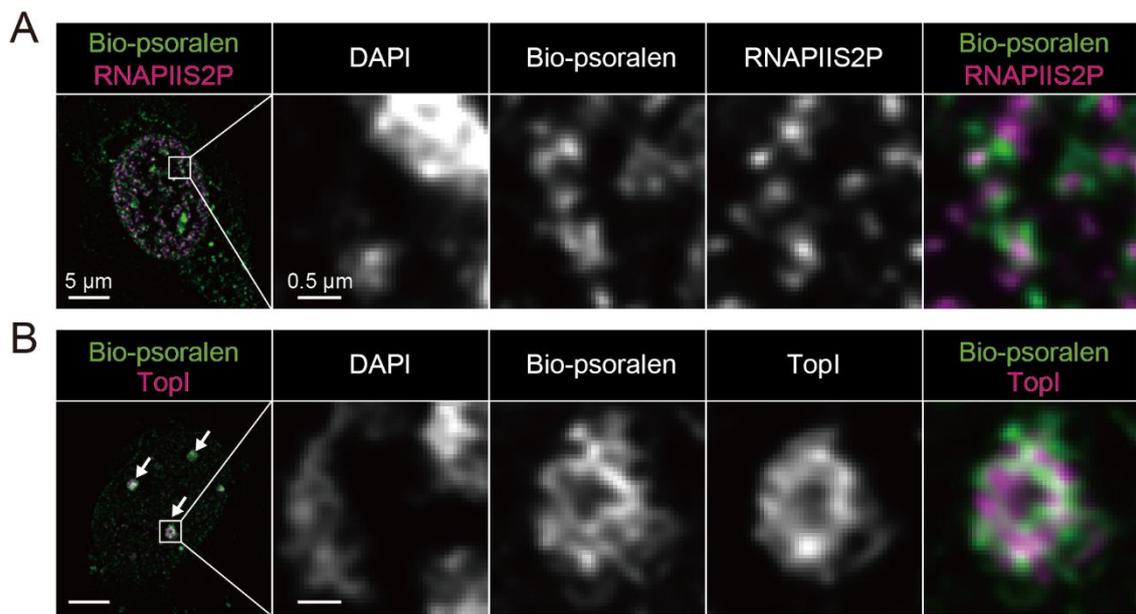


図 1 1 DNA アンツイステンゲの発生・解消に寄与する核内タンパク質と underwound DNA の核内分布。(A) DAPI, bio-psoralen, RNAPIIS2P の蛍光染色画像。(B) DAPI, bio-psoralen, TopI の蛍光染色画像。Bio-psoralen の蛍光輝度が高い核内領域を矢印で示した。

3-2-2 トポイソメラーゼ阻害により underwound DNA は減少する

DNA アンツイスティングの制御における TopI とトポイソメラーゼ II (TopII) の役割を検証するため、それぞれの活性阻害剤である camptothecin (CPT) と etoposide (ETO) を処理した後、underwound DNA の蛍光イメージングを行った (図 1 2 A)。トポイソメラーゼの阻害は underwound DNA を増加させると考えられるため [40]、阻害剤処理細胞では蛍光シグナルが高くなると予想していた。しかしながら、予想に反して、阻害剤処理細胞ではコントロールに比べて核内の bio-psoralen シグナルが低いことが明らかとなった (図 1 2 B)。この結果から、トポイソメラーゼ阻害により underwound DNA が減少する可能性が示唆された。先行研究においても、トポイソメラーゼ阻害により転写開始地点における bTMP 結合量が減少することが報告されている [39]。DNA 鎖の切断[87]や RNAP 活性の低下 [40], [88]などの TopI/II 阻害剤処理による副次的効果によって、underwound DNA が減少した可能性が考えられる。

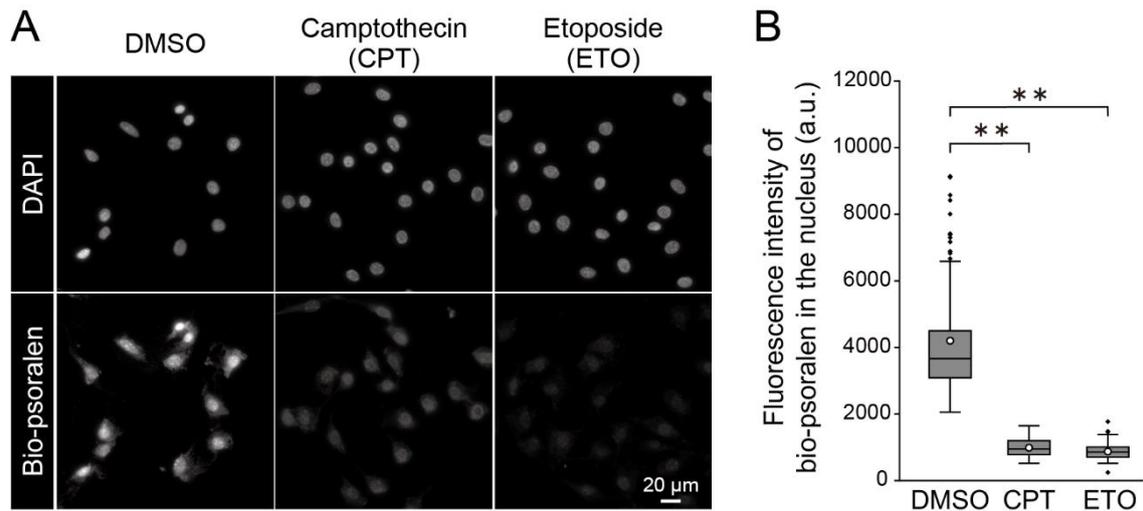


図 1.2 トポイソメラーゼ阻害が underwound DNA の存在量に与える影響。

(A) DMSO/CPT/ETO 処理細胞における DAPI および bio-psoralen の蛍光染色画像。(B) DMSO/CPT/ETO 処理細胞の細胞核内の bio-psoralen の平均蛍光輝度 ($n = 100$ 細胞)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、ステイール・ドゥワス検定を行った。 $P^{**} < 0.01$ (DMSO vs. CPT および DMSO vs. ETO とともに $P = 0.001$) .

3-2-3 DNA アンツイスティングはリボソーム DNA において生じる

第 3-2-1 項で示したように、underwound DNA が蓄積する領域が TopI に隣接して存在していた。TopI は核小体において顕著に存在することが知られているため [89]、DNA アンツイスティングが核小体の rDNA において生じている可能性が示唆された。この可能性を検証するため、underwound DNA の蛍光標識を行うとともに、rDNA を標的とした蛍光プローブを用いて (図 1 3 A)、DNA-FISH を行った。その結果、bio-psoralen のシグナルが rDNA のシグナルと一部重なることが明らかとなった (図 1 3 B)。このことから、rDNA において DNA アンツイスティングが生じることが示された。

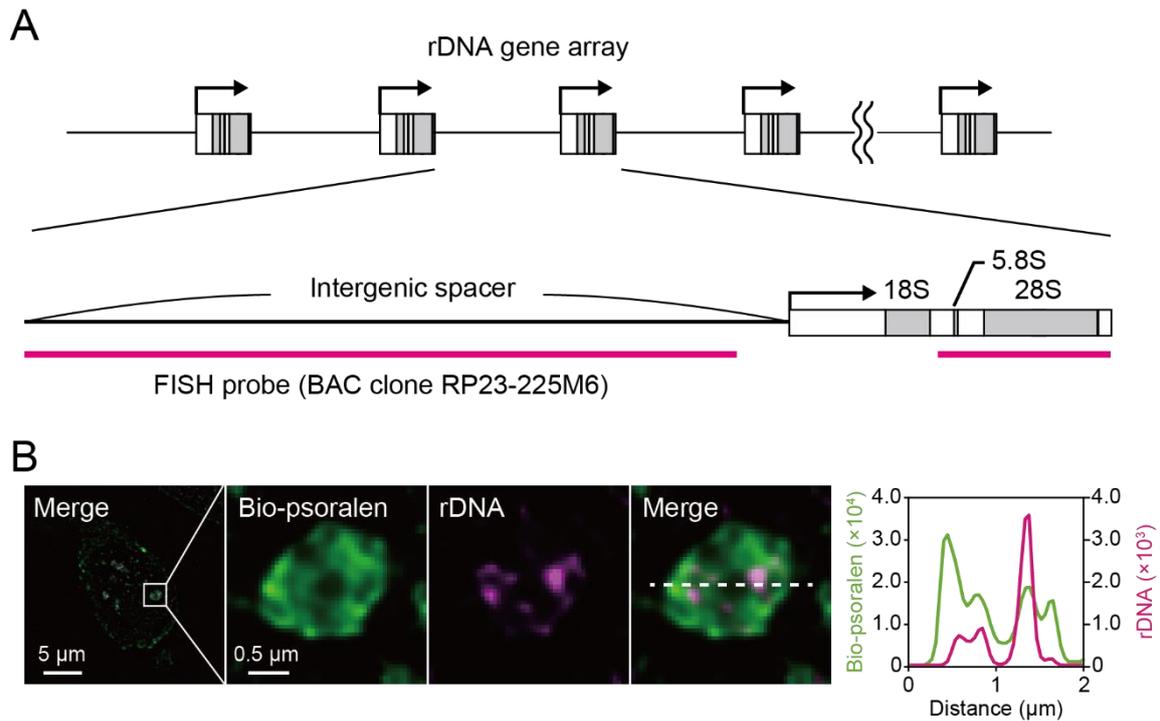


図 1 3 rDNA において DNA アンツィステイングが生じる可能性の検証。
 (A) FISH プロブの標的領域。(B) Bio-psoralen および rDNA の染色画像。Merge 画像に示す点線に沿った bio-psoralen および rDNA の蛍光プロフィールを右に示した。

3-2-4 Underwound DNA は核小体コアを中心に分布する

核小体内の力学環境における DNA アンツイスティングのメカニズムを探る足掛かりとして、核小体のコア-シェル構造における underwound DNA の分布を検証することを目指した。まず、underwound DNA の蛍光標識後においても、核小体のコア-シェル構造が保持されているのか確かめた。特に、bio-psoralen の取り込みを促進するために用いたジギトニンは、核内タンパク質の局在に影響を与える可能性が指摘されているため [90]、ジギトニン処理がコア-シェル構造に与える影響を検証した。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のジギトニンを 1 分間処理した細胞と、非処理細胞に対して、核小体コア構成タンパク質 (FBL) および核小体シェル構成タンパク質 (NPM) の免疫蛍光染色を行った (図 1 4 A)。その結果、核質においては、ジギトニン処理により FBL および NPM のシグナルが低下した一方で (図 1 4 B, C)、核小体においては、ジギトニン処理の有無にかかわらず、NPM が FBL を内包するコア-シェル構造が観察された。したがって、核質に存在するタンパク質画分の一部が流出している可能性はあるものの、核小体のコア-シェル構造は保持されていることが確かめられた。

同じジギトニン処理条件下で、RNAPI (FC マーカー)、FBL (DFC マーカー)、および、NPM (GC マーカー) と bio-psoralen を共染色した。その結果、underwound DNA は核小体のコア (FC と DFC) を中心に分布することが明らかとなった (図 1 5 A)。また、NPM および bio-psoralen の蛍光プロファイルを作成した結果、核小体シェルの内側に比べ、核小体シェルの外側では bio-psoralen の蛍光輝度が低いこと、すなわち underwound DNA の存在量が少ないことが明らかとなった (図 1 5 B, C)。核小体シェルを境として underwound DNA の存在量に有意な差が見られたことから、核小体シェルにおいて DNA の軸回転が拘束されている可能性が示唆された。

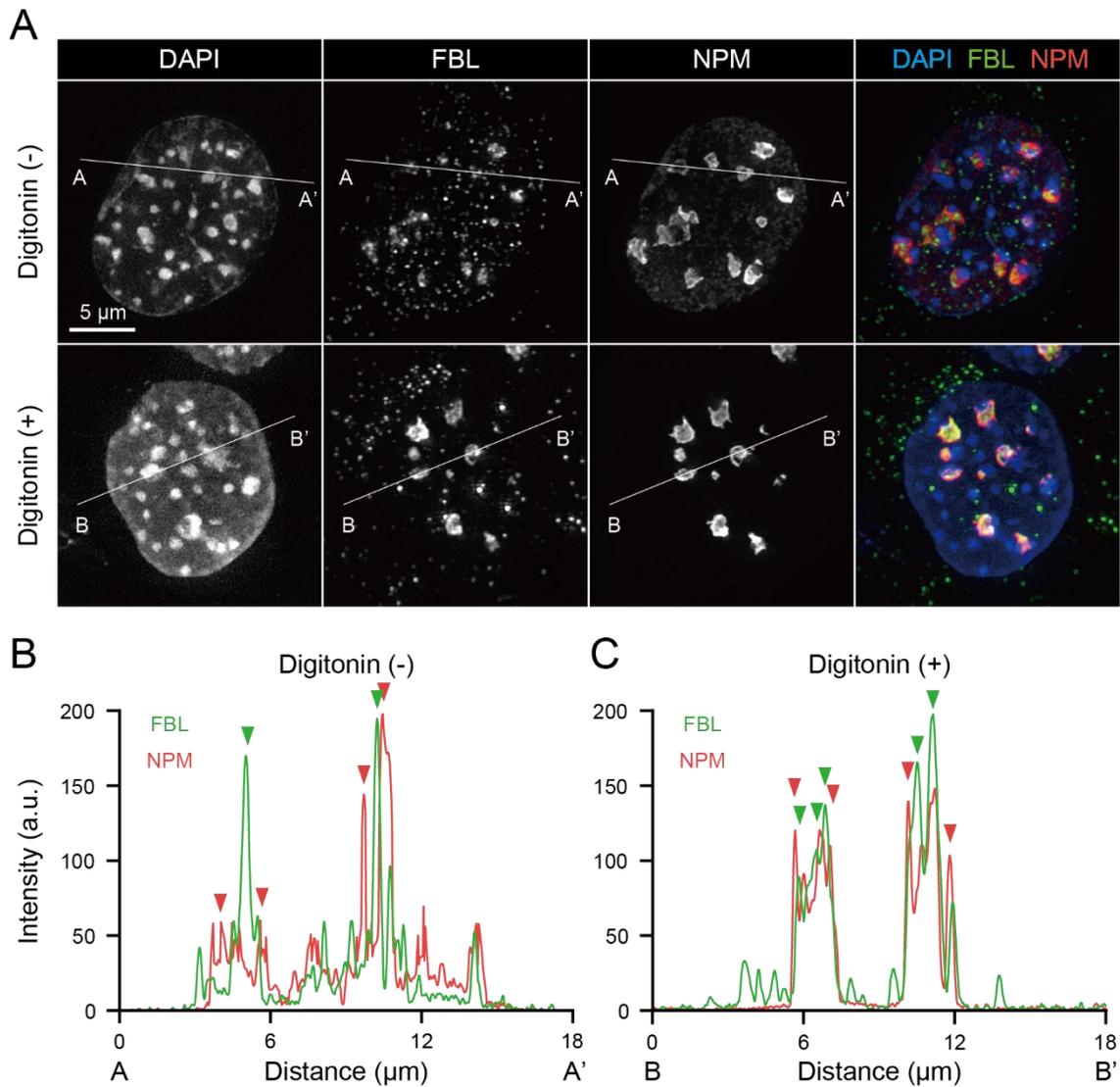


図 1 4 ジギトニン処理が核小体のコア-シェル構造に与える影響。(A) ジギトニン非処理細胞 (上) および処理細胞 (下) における DAPI, FBL, NPM の染色画像。(B) ジギトニン非処理細胞における FBL および NPM の蛍光プロファイル。FBL および NPM の蛍光輝度のピークを矢頭で示した。(C) ジギトニン処理細胞における FBL および NPM の蛍光プロファイル。FBL および NPM の蛍光輝度のピークを矢頭で示した。

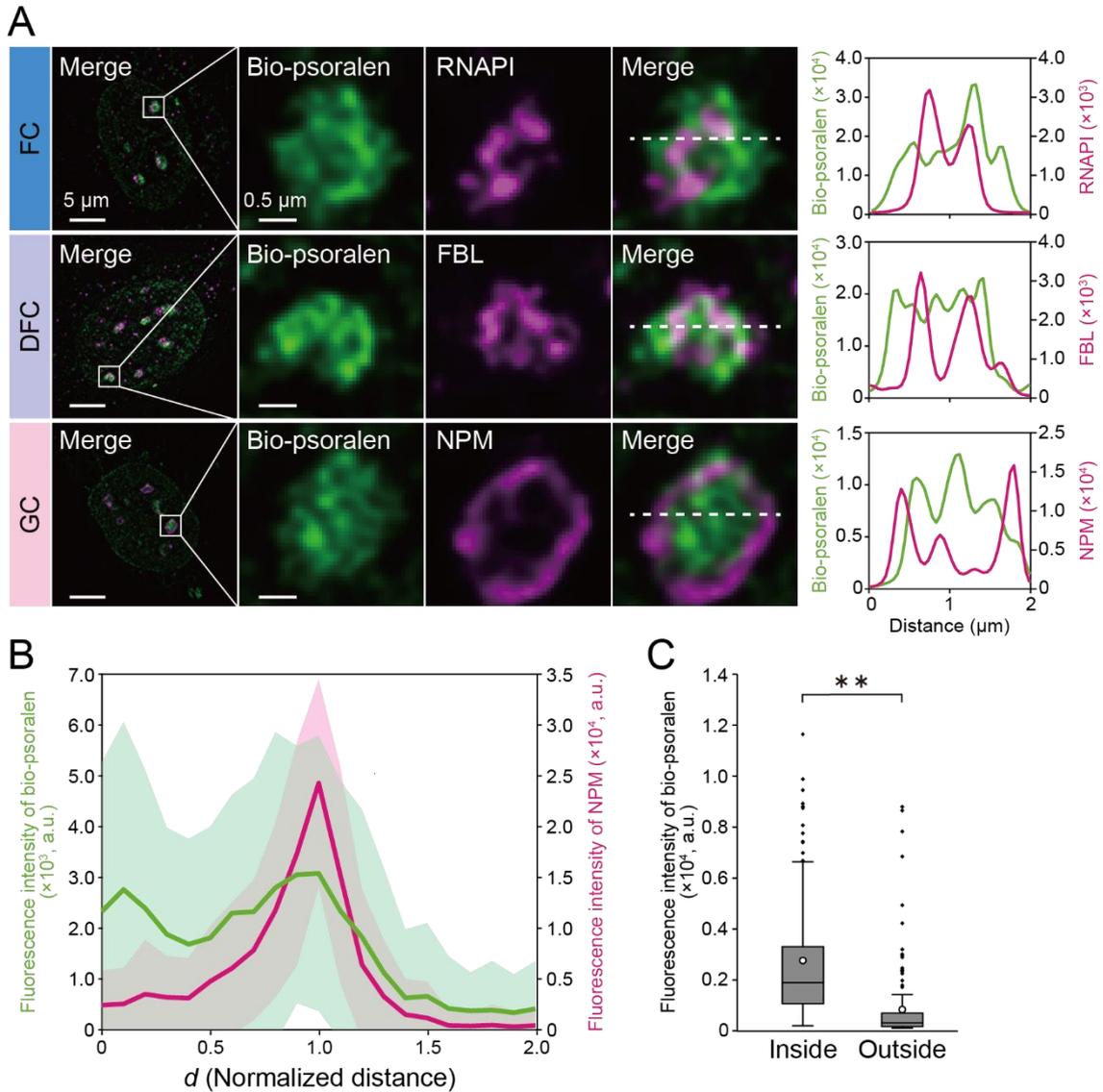


図15 核小体内におけるDNAアンツィスティングの発生領域。(A) Bio-psoralen および RNAPI (上段)、FBL (中段)、NPM (下段) の蛍光染色画像。(B) Bio-psoralen および NPM に対する蛍光プロファイル ($n = 68$ 核小体/11細胞)。(C) 核小体の内側 ($d \leq 0.5$) および外側 ($1.5 \leq d \leq 2.0$) における bio-psoralen の平均蛍光輝度 ($n = 68$ 核小体/11細胞)。2群間の平均値の差に対する統計検定として、マン・ホイットニーの U 検定を行った。 $P^{**} < 0.01$ ($P = 1.58 \times 10^{-25}$) .

3-3 核小体における DNA アンツイスティング機構の検証

3-3-1 核小体コアの RNA ポリメラーゼ I によるトルク発生が DNA アンツイスティングに寄与する

核小体コアを中心に DNA アンツイスティングが生じていたことから、核小体コアに存在する RNAPI によりトルクが発生する可能性が考えられた。この可能性を検証するため、RNAPI に対する阻害剤を処理した細胞に対して *underwound* DNA の蛍光イメージングを行った。CX-5461 および *actinomycin D* (ActD) を用いて、RNAPI の転写開始および転写伸長を阻害した。ただし、細胞死を避けるため、阻害剤の処理時間は 15 分間とした。細胞の生死判定を行った結果 (図 1 6 A)、ポジティブコントロール (最終濃度 30 μ M の CX-5461 を 24 時間処理したサンプル) では生存率が 10% 未満であったのに対して、最終濃度 3 μ M の CX-5461 および最終濃度 50 nM の ActD を 15 分間処理したサンプルでは生存率は 100% であり、細胞死が起きていないことが確かめられた (図 1 6 B)。

Underwound DNA に対する蛍光イメージングを行った結果、RNAPI の転写開始・伸長を阻害した細胞において、核小体内の *underwound* DNA が減少することが明らかとなった (図 1 7 A)。蛍光プロファイルの定量を行った結果からも (図 1 7 B-C)、阻害剤処理細胞では、核小体内における *bio-psoralen* の蛍光輝度が有意に低いことが確かめられた (図 1 7 D)。これらの結果から、核小体コアの RNAPI によるトルクの発生が、DNA アンツイスティングに寄与することが明らかとなった。

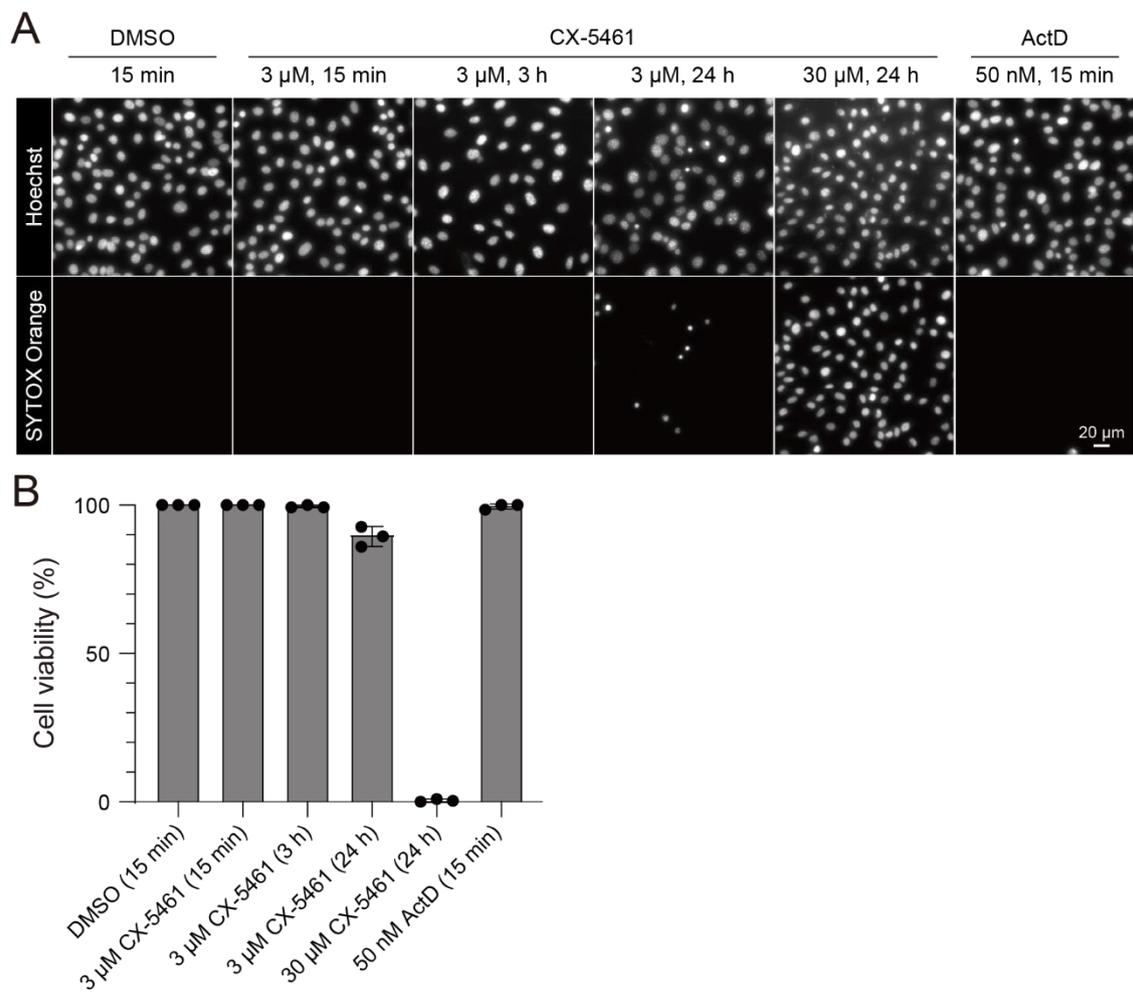


図 1 6 RNAPI 活性に対する阻害剤を処理した細胞に対する生死判定。
 (A) DMSO/CX-5461/ActD 処理細胞に対する Hoechst および SYTOXTM Orange 蛍光染色画像。Hoechst は生細胞と死細胞の両方を染色する一方で、SYTOXTM Orange は死細胞のみを染色する。(B) 生細胞の割合 ($n=3$ 染色画像)。各画像につき 45 個以上の細胞に対して計測を行った。エラーバーは標準偏差を示す。

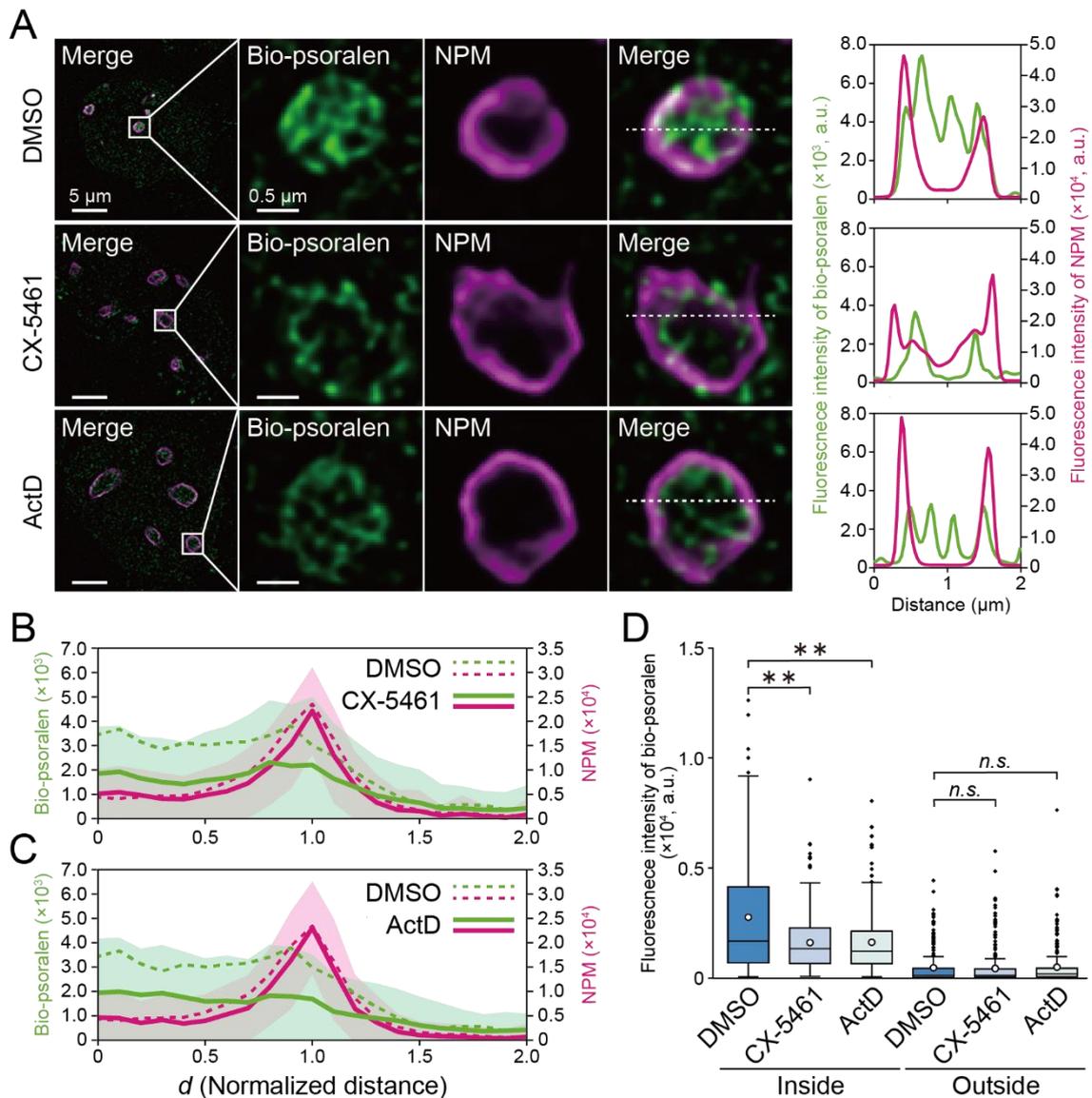


図 17 RNAPI 活性が核小体内における DNA アンツイスティングの発生に与える影響。(A) DMSO/CX-5461/ActD 処理細胞に対する bio-psoralen および NPM の蛍光染色画像。Merge 画像に示す点線に沿った bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイルを右に示した。(B) CX-5461 処理細胞における bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイル ($n = 135$ 核小体/19 細胞)。点線は DMSO 処理細胞 (コントロール) における bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイルの平均値を示す ($n = 89$ 核小体/13 細胞)。(次ページに続く)

(C) ActD 処理細胞の bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイル ($n = 120$ 核小体/17 細胞)。点線は DMSO 処理細胞 (コントロール) における bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイルの平均値を示す ($n = 89$ 核小体/13 細胞)。(D) 核小体の内側 ($d \leq 0.5$) および外側 ($1.5 \leq d \leq 2.0$) における bio-psoralen の平均蛍光輝度 (DMSO: $n = 89$ 核小体/13 細胞、CX5461: $n = 135$ 核小体/19 細胞、ActD: $n = 120$ 核小体/17 細胞)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、ステュードント・ドゥワズ検定を行った。 $P^{**} < 0.01$ ($P = 0.00118$ for DMSO vs. CX-5461, $P = 0.001$ for DMSO vs. ActD) , *n.s.*, not significant, ($P = 0.9$ for DMSO vs. CX-5461, $P = 0.353$ for DMSO vs. ActD) .

3-3-2 核小体シェルへのアンカリングによる DNA の軸回転拘束が DNA アンツイスティングに寄与する

前項では DNA アンツイスティングに必要な条件の 1 つである「トルクの発生」を RNAPI が担うことを明らかとした。続いて、もう 1 つの条件である「DNA の軸回転の拘束」が核小体において生じる仕組みを検証した。第 3-3-1 項で示したように、核小体シェルを境として *underwound* DNA の存在量に変化が見られたことから、核小体シェルにおいて DNA の軸回転が拘束されると予想した。さらに、核小体シェルの構成タンパク質である NPM は、rDNA に形成される G4 と相互作用することから [80]、NPM-G4 の相互作用を介した核小体シェルへのアンカリングが DNA の軸回転拘束を担う可能性が示唆された。

この可能性を検証するため、NPM-G4 の相互作用を阻害する G4 選択的リガンドである TMPyP4 を細胞に処理した [80]。細胞の生死判定の結果、TMPyP4 の処理後も細胞が生存していることが確かめられた (図 1 8)。TMPyP4 処理により NPM-G4 の相互作用が阻害されていることを確認するため、NPM 抗体を用いた ChIP および qPCR 解析を行った。その結果、TMPyP4 処理によって、推定 G4 形成配列に対する NPM の結合が妨げられることが示された (図 1 9)。

さらに、TMPyP4 処理細胞および非処理細胞に対して、NPM と bio-psoralen の蛍光染色を行った (図 2 0 A)。TMPyP4 処理細胞では NPM の蛍光輝度が低かったが、これは G4 に結合できなくなった NPM が核小体から流出し、核質に拡散したことに起因すると考えられる [80]。Bio-psoralen の蛍光輝度を比較すると、TMPyP4 処理によって核小体内における bio-psoralen シグナルが有意に減少することが明らかとなった (図 2 0 B, C)。この結果から、NPM-G4 の相互作用の阻害により、DNA が自由に軸回転できるようになったことで、*underwound* DNA が解消された可能性が示唆された。しかしながら、TMPyP4 処理により rDNA が核質に分散したことで、bio-psoralen の見かけ上の蛍光輝度が減少したに過ぎない可能性も考えられた。この可能性を検証するため、核小体タンパク質

(FBL) と rDNA に対する Immuno-FISH 染色を行った。その結果、TMPyP4 処理後も rDNA が核小体に存在することが確かめられたことから (図 2 1)、この可能性は排除された。これらの結果から、NPM-G4 相互作用を介した核小体シェルへのアンカリングが、DNA の軸回転を拘束することで、DNA アンツイスティングに寄与することが明らかとなった。

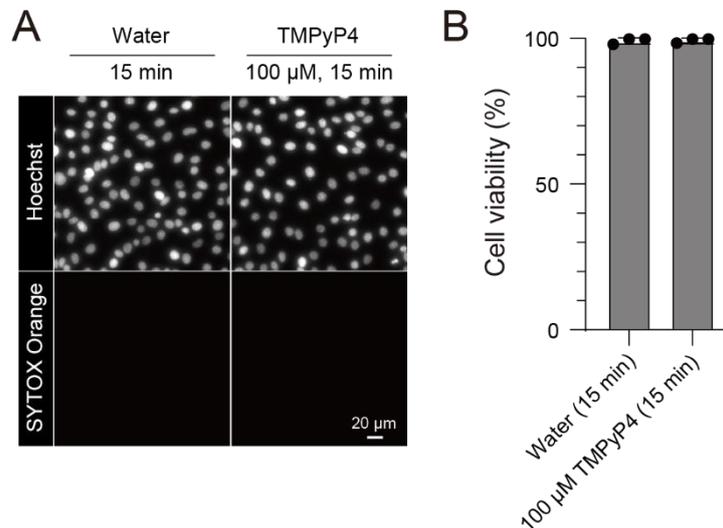


図 1 8 TMPyP4 非処理/処理細胞に対する生死判定。(A) TMPyP4 非処理/処理細胞に対する Hoechst および SYTOXTM Orange 蛍光染色画像。Hoechst は生細胞と死細胞の両方を染色する一方で、SYTOXTM Orange は死細胞のみを染色する。(B) 生細胞の割合 ($n = 3$ 染色画像)。各画像につき 45 個以上の細胞に対して計測を行った。エラーバーは標準偏差を示す。

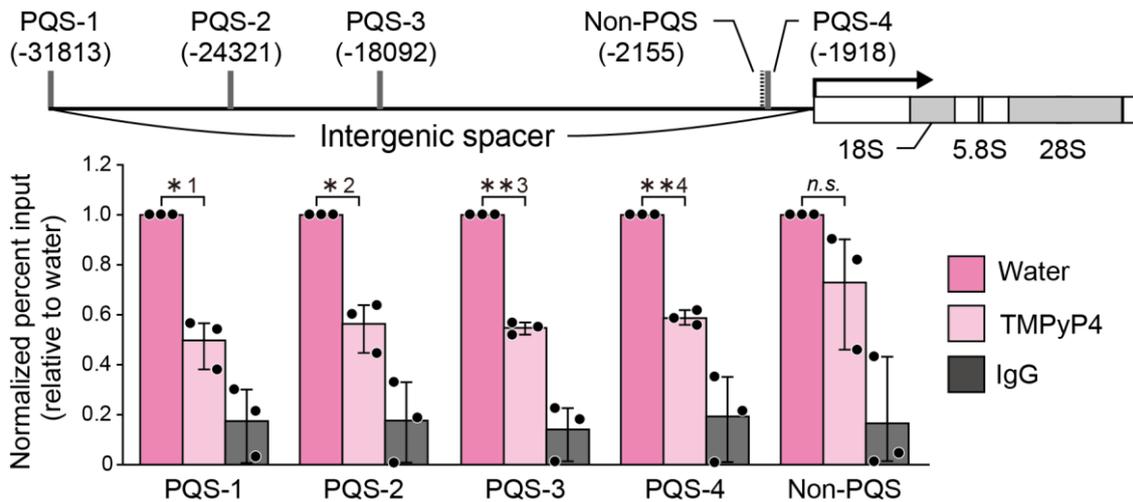


図 19 TMPyP4 非処理/処理細胞に対する ChIP および qPCR 解析の結果。qPCR 解析の標的とした 4 つの PQS と、1 つの非 PQS を上図に示した。それぞれの配列について、転写開始地点からの位置 (bp) を括弧中に記載した。各サンプルについてパーセントインプット (%) を求め、TMPyP4 非処理 (water) サンプルに対する相対値を示した。独立した実験を 3 回行った ($n = 3$)。各群の平均値に対する統計検定として、1 標本 t 検定を行った。 $P^{*1} < 0.05$ ($P = 0.0132$) , $P^{*2} < 0.05$ ($P = 0.0177$) , $P^{**3} < 0.01$ ($P = 0.000997$) , $P^{**4} < 0.05$ ($P = 0.00175$) , $n.s.$, not significant ($P = 0.185$) . エラーバーは標準偏差を示す。

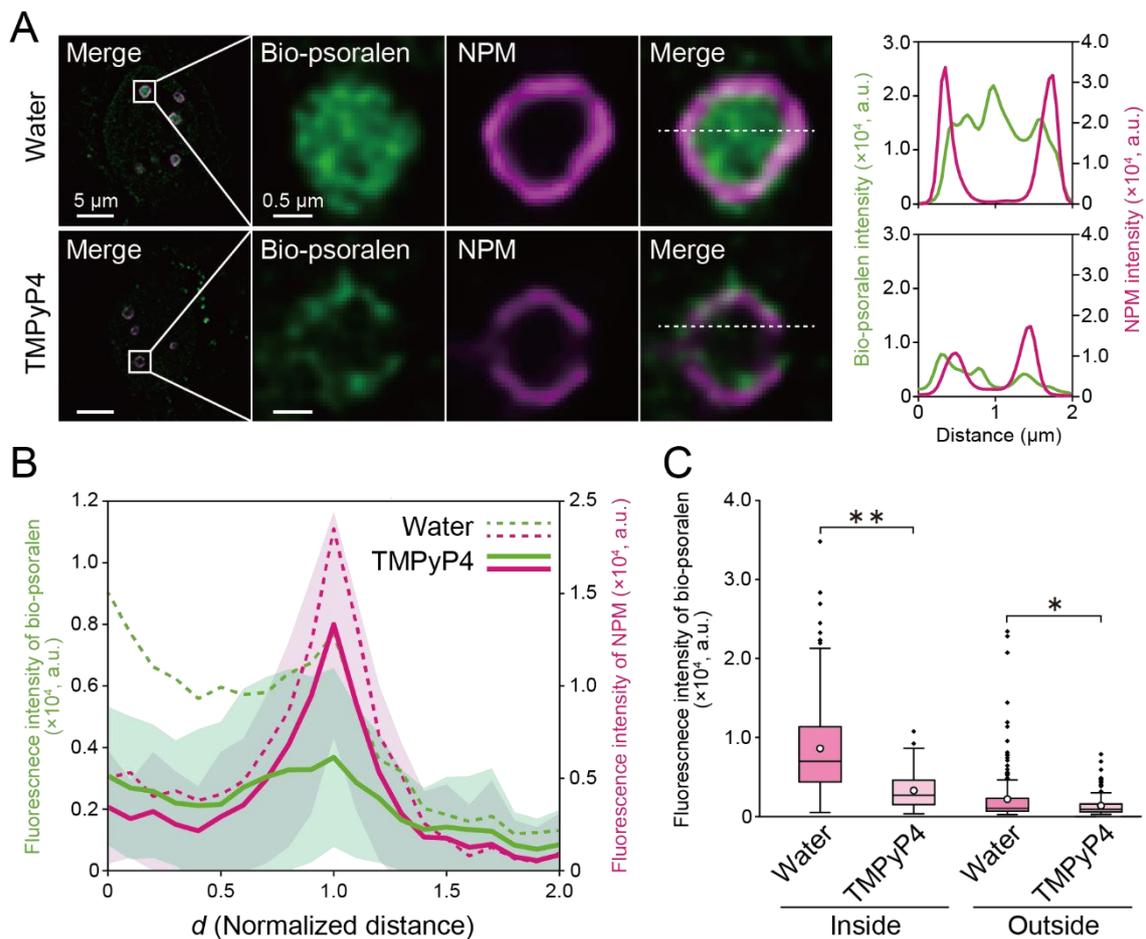


図 20 核小体シェルへのアンカリングが核小体内の DNA アンツイスティングに与える影響。(A) TMPyP4 非処理/処理細胞に対する bio-psoralen および NPM の蛍光染色画像。Merge 画像に示す点線に沿った bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイルを示した。(B) TMPyP4 処理細胞における bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイル ($n = 84$ 核小体/16 細胞)。点線は water 処理細胞 (コントロール) における bio-psoralen および NPM の蛍光プロファイルの平均値を示す ($n = 108$ 核小体/15 細胞)。(C) 核小体の内側 ($d \leq 0.5$) および外側 ($1.5 \leq d \leq 2.0$) における bio-psoralen の平均蛍光輝度 (TMPyP4: $n = 84$ 核小体/16 細胞, water: $n = 108$ 核小体/15 細胞)。2 群間の平均値の差に対する統計検定として、マン・ホイットニーの U 検定を行った。 $P^{**} < 0.01$ ($P = 3.35 \times 10^{-26}$), $P^* < 0.05$ ($P = 0.0148$).

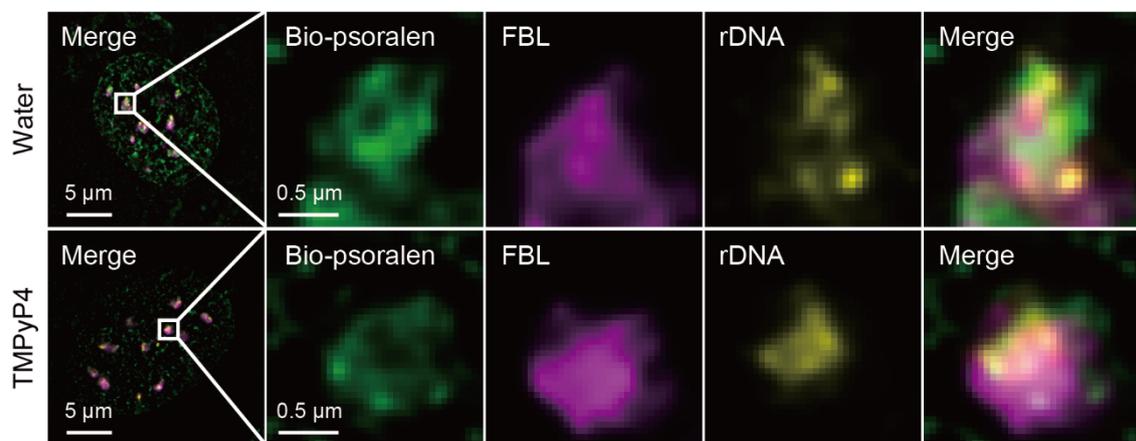


図 2 1 TMPyP4 非処理/処理細胞に対する bio-psoralen, FBL, rDNA の Immuno-FISH 染色画像。

第4章 考察

4-1 核小体内の力学環境における DNA アンツイスティング機構

本研究では、核小体内の力学環境における DNA アンツイスティング機構の解明を目指し、underwound DNA に対する *in situ* 蛍光イメージングを行った。その結果、①核小体コアの RNAP I によるトルクの発生と、②核小体シェルへのアンカリングによる DNA の軸回転の拘束が連成することで、rDNA のアンツイスティングが生じることを明らかとした (図 2 2)。DNA の軸回転拘束においては、核小体シェルの構成タンパク質である NPM が重要な役割を担うと考えられる。NPM は N 末端に五量体化ドメインを、中央に IDR を、そして C 末端に G4 結合ドメインを有する [68], [80], [91], [92]。核小体シェルにおいては、NPM 五量体が IDR を介して rRNA や RNA 修飾タンパク質と相互作用するとともに、NPM 五量体どうしで結合することで巨大な集合体を形成しており [91]、さらに、NPM 集合体は rDNA 上の G4 と結合している [80]。したがって、核小体シェルにおいて rDNA が軸回転するためには、NPM 集合体も DNA のらせん軸を中心として回転する必要があると考えられる。直径が数 μm に及ぶ巨大な NPM 集合体 [68] が回転するとき、周囲の流体との間には大きな粘性抵抗が生じると推測される [63], [64]。これにより、rDNA の軸回転の速度が局所的に低下することで、RNAPI を駆動力とした rDNA のアンツイスティングが生じると考えられる。

DNA 結合タンパク質による集合体の形成は、スーパーエンハンサー [93] などの、RNAPII による転写が行われる核内構造体においても広く見られる現象である。したがって、核内構造体へのアンカリングによる DNA の軸回転拘束は、核小体に特有のものではなく、DNA アンツイスティングの発生に寄与する普遍的なメカニズムであると考えられる。細胞核内の力学環境においては、ゲノム DNA が近傍の核内構造体にアンカリングされることで、局所的に DNA の軸回転拘束が生じ、DNA アンツイスティングの発生領域が制御されていると推測される。また、核内構造体の形成・分散は、タンパク質のリン酸化 [94], [95] や、リガンドの結合 [62] に応じて動的に制御されている。これにより、DNA の軸回

転拘束が変化することで、DNA アンツイスティングが時間的・空間的に制御されると考えられる。したがって、本研究は、個々の核内構造体において動的に変化する力学環境の下で核内プロセスが制御される可能性を示唆しており、外部からのシグナルに応じた細胞分化などの運命選択機構を理解する一助となる。

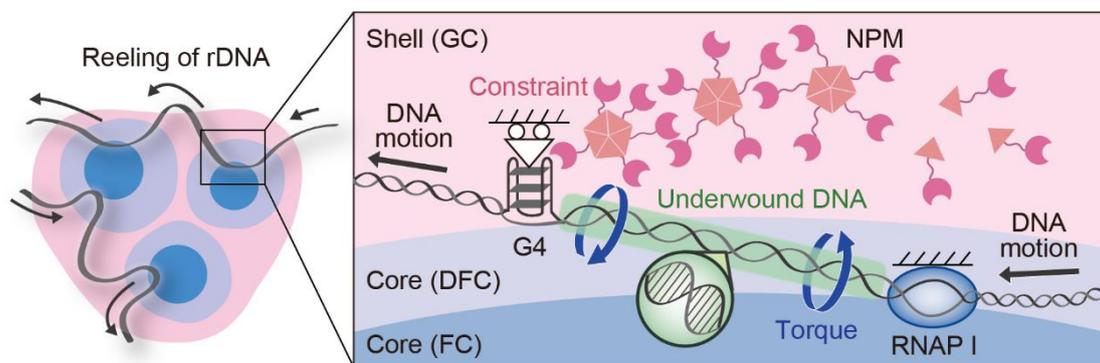


図2 2 核小体内の力学環境における DNA アンツイスティング機構。遺伝子転写において、rDNA は核小体コア (FC/DFC) に存在する RNAPI により巻き取られる (図中では右から左向き)。このとき RNAPI 後方の DNA にトルクが作用する (青矢印)。さらに、NPM-G4 相互作用を介した核小体シェル (GC) へのアンカリングにより DNA の軸回転が拘束される。以上により、RNAPI が存在する箇所と、DNA の軸回転が拘束される箇所の間で DNA アンツイスティングが生じる。

4-2 G4 形成の DNA アンツイスティングへのフィードバックの可能性

核小体シェルへのアンカリングを介した DNA の軸回転拘束においては、G4 が重要な役割を担うことが明らかとなった。G4 は、遺伝子のプロモーターに多く存在することから [96]、DNA アンツイスティングは rDNA のプロモーターを中心に生じていると考えられる。序論にて述べたように、G4 の形成は DNA アンツイスティングにより促進される [20]。したがって、DNA アンツイスティングにより G4 が形成されることで、DNA の軸回転拘束を介して、さらに DNA アンツイスティングが誘導される正のフィードバックが存在すると考えられる。G4 は rDNA 以外のゲノム領域にも広く存在する二次構造であり、例えばヒトゲノムには G4 形成配列が 30 万個以上存在すると推定されている [97], [98]。したがって、G4 形成によるフィードバックは、DNA アンツイスティングの制御において中心的な役割を担うと考えられる。

4-3 核小体において DNA 軸回転拘束に寄与する力学的・生化学的因子

NPM-G4 相互作用を介した核小体シェルへのアンカリング以外にも、DNA の軸回転拘束に寄与する因子が存在すると考えられる。例えば、転写因子の一種である upstream binding factor (UBF) は rRNA のコード領域に結合し、enhancesome と呼ばれる 140 塩基対ほどのループ構造を形成することが知られている [99]。LacI [53] などと同様に、UBF によるループ形成が DNA の軸回転拘束に寄与している可能性が考えられる。また、G4 の形成自体が DNA の軸回転を拘束する可能性が示唆されている。例えば、G4 が形成されることで DNA アンツイスティングの伝達が妨げられることが *in vitro* 実験により示されており [20]、DNA の局所的な剛性の増加が原因として考えられている。核小体シェルへのアンカリングに加え、これらの力学的・生化学的因子が DNA の軸回転拘束に寄与することで、DNA アンツイスティングの発生領域を決定していると考えられる。

4-4 RNA ポリメラーゼ I および II の DNA アンツイスティングへの寄与

本研究では、RNAPI が核小体における DNA アンツイスティングの駆動力であることを明らかとした。RNAPI は転写伸長を促進するサブユニットを有しており、RNAPII よりも転写速度が速いことが知られている [100]。さらに、転写伸長中に RNAP の後戻り (backtrack) が起きた際に、転写伸長を再開させるまでの時間も RNAPI の方が短いことが知られている [100]。これらの結果から、RNAPI は RNAPII よりも効率的にトルクを発生させる可能性が指摘されており [101]、核小体における underwound DNA の蓄積の一因となっていると考えられる。RNAP の種類以外にも、それぞれの遺伝子における転写活性も DNA アンツイスティングに影響を与えると考えられる。例えば、真核細胞の rDNA は 100 以上のタンデムリピートからなるが、そのうち 20-50%のみが転写活性を示すことが知られている [102]。このように、rDNA リピートの転写活性にばらつきがあることで、図 1 3 で示したような、rDNA に沿った underwound DNA の不均一な分布が生じると考えられる。

4-5 トポイソメラーゼによる under/over-wound DNA の解消

DNA アンツイスティングは RNAP のプロモーターへの結合を促進する一方で [15], [16]、過剰な DNA アンツイスティングは転写開始地点の下流で RNAP の異常な進行を誘導することが知られている [48]。細胞核内においては、under/over-wound DNA はトポイソメラーゼによって解消される [39]。本研究では、TopI が核小体において underwound DNA の近傍に分布することを明らかとした。さらに、超らせんを解消する TopII も、核小体に偏在することが知られている [103]。したがって、核小体において発生した under/over-wound DNA が TopI/II により積極的に解消されることで、rRNA の転写が実現していると考えられる。今後、DNA アンツイスティングの発生と、トポイソメラーゼによる解消がどのようにカップリングされているのかを明らかとする必要がある。

4-6 本研究で用いた手法の改善点

ここでは、ビオチン化ソラレンを用いた *underwound* DNA の蛍光イメージング法の改善点について述べる。第一に、本研究では、ビオチン化ソラレン (bio-psoralen) を細胞に取り込ませるために、ジギトニン処理したが、これにより DNA やタンパク質が細胞核から漏出する可能性がある [90]。実際に、ジギトニン処理細胞では、非処理細胞に比べて、核質における FBL および NPM のシグナルが低いことが確認された (図 1 4)。改善策の 1 つとして、膜透過性の高いソラレン誘導体の利用が考えられる。例えば、アルキン基およびアジド基を付与したソラレンはジギトニンによる膜透過処理がなくとも細胞に取り込まれることが示されており [104], [105]、クリック反応 [106] を介して蛍光アジドおよび蛍光アルキンにより標識できると考えられる。第二に、ソラレンを用いたアプローチでは、*overwound* DNA を検出することが困難である。したがって、核小体内の力学環境において DNA アンツイスティングだけでなく、DNA オーバーツイスティングも生じているのかは依然として不明である。改善策としては、GapR [107] などの *overwound* DNA に結合するタンパク質を利用することが考えられる。GapR を蛍光タンパク質と融合させた状態で発現させることで、細胞核内における DNA オーバーツイスティングの発生領域を観察することが可能となると考えられる。

4-7 メカノバイオロジー分野への貢献

メカノバイオロジー分野では、細胞に負荷された外力 (引張力・圧縮力など) により遺伝子転写が制御され、細胞運命が決定されるメカニズムの研究が行われてきた [108], [109]。これまでの研究から、イオンチャネルや細胞接着分子などのメカノセンサ分子の構造・活性の変化を介して力学刺激が伝達されることで、細胞運命を司る遺伝子群の転写が制御されることが明らかとなっている [110]。さらに、近年、ゲノム DNA 自体がメカノセンサ分子として働き、力の

下で構造を機能的に変化させることで、遺伝子転写が制御される可能性が示唆されている [111]。しかしながら、細胞核に負荷された外力が、どのようにして特定の遺伝子群における DNA の構造変化を誘導するのかは未だ明らかでない。本研究では、核小体シェルへのアンカリングによる DNA の軸回転拘束が DNA アンツイスティングに寄与することを示したが、同様のメカニズムにより外力作用下の DNA の構造変化が制御されている可能性が考えられる。すなわち、近傍の核内構造体へのアンカリングの有無が、外力作用下の DNA 二重らせん構造の変化に影響を及ぼし、ひいては遺伝子の力学応答性を決定しているのかもしれない。また、G4 などのアンカリングに必要な塩基配列が、力学応答性を示す遺伝子群にコードされている可能性も考えられる。これらの可能性を検証することで、メカノバイオロジー分野の中心課題の 1 つである、力の下で特定の遺伝子群が発現するメカニズムが紐解かれると期待される。

4-8 進化生物学分野への波及効果

生物は、ゲノム DNA の突然変異と自然選択を繰り返すことで、環境に適した形質を獲得してきた。このような進化の過程において、DNA の二重らせん構造を力学的に制御するメカニズムも、環境に応じて変化してきたと考えられる。例えば、温泉地帯や熱水噴出孔などの高温・高圧の環境下では、DNA 二重らせんは一本鎖に解離する [112]。しかし、それらの環境に生息する古細菌はリバースジャイレースを有しており [113]、DNA オーバーツイスティングを誘導することで一本鎖への解離を防いでいることが知られている [114]。このような、DNA 二重らせん構造の力学的制御メカニズムの進化について、さらに議論する。

生物進化と DNA アンツイスティングの関連を窺い知ることができる例として、ゲノム DNA 中の G4 形成頻度を生物種間で比較した研究がある [20]。Zhang らは、恒温動物のプロモーター領域における推定 G4 形成配列の頻度が、変温動物に比べ高いことを示した。変温動物から恒温動物への進化においては、代

謝関連タンパク質の発現量の増加により、体温の恒常性が確保されたと考えられている [115], [116]。恒温動物は、G4 形成を介した DNA アンツイスティングのフィードバック制御機構（第 4-2 節）を獲得することで、RNAP のプロモーターへの結合を促進し [12]、代謝関連遺伝子の効率的な転写を実現した可能性が考えられる。また、DNA アンツイスティングは DNA の切断と修復を促進することから [17]–[19]、突然変異の確率の上昇に寄与すると考えられる。DNA アンツイスティングは、突然変異の促進を介してゲノム多様性の拡大をもたらし、ひいては、新たな器官の獲得などの大進化を駆動するのかもしれない [117]。

G4 などのシス因子に加え、トポイソメラーゼなどのトランス因子も進化の過程で変化してきたと考えられる。例えば、大腸菌やシアノバクテリアなどの原核生物には、DNA アンツイスティングを誘導するトポイソメラーゼであるジャイレースが存在するのに対して、真核生物には基本的にジャイレースは存在しない [118]。しかしながら、真核生物の中でも例外的に、シロイヌナズナなどの高等植物のゲノム DNA にはジャイレースの相同遺伝子がコードされている [119]。高等植物は、シアノバクテリアなどの原核生物と細胞内共生を進める過程で、ジャイレース遺伝子を取り込んだと推測されている。ジャイレースの獲得を介して DNA アンツイスティングの能動的な誘導が可能となったことが、植物の環境への適応にどのように貢献したのかは興味深い問題である。

以上に示したように、DNA オーバーツイスティングまたは DNA アンツイスティングの制御機構の獲得を通じて、突然変異の速度や遺伝子転写の効率が変化することで、環境変化に応じた生物進化が駆動されてきた可能性が考えられる。また、DNA 二重らせんのねじれ以外にも、曲げ・伸びなどの構造変化を力学的に制御する機構が進化の過程で獲得された可能性も十分に考えられる。これまでの進化生物学研究では、DNA の塩基配列の変化によるタンパク質の機能・発現パターンの変化が注目されることが多かった。今後、生物進化の方向性を定める因子として、力の下での DNA 二重らせん構造の変化に着目する新たな研究アプローチの提案が期待される。

文献

- [1] B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, 6th ed. London, England: Garland Science, 2017.
- [2] V. A. Bondarenko *et al.*, “Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II,” *Mol. Cell*, vol. 24, no. 3, pp. 469–479, Nov. 2006.
- [3] A. Eberharter and P. B. Becker, “Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics,” *EMBO Rep.*, vol. 3, no. 3, pp. 224–229, Mar. 2002.
- [4] C. Bustamante, Z. Bryant, and S. B. Smith, “Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics,” *Nature*, vol. 421, no. 6921, pp. 423–427, Jan. 2003.
- [5] C. Lavelle, “Pack, unpack, bend, twist, pull, push: the physical side of gene expression,” *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 25, pp. 74–84, Apr. 2014.
- [6] D. Levens, L. Baranello, and F. Kouzine, “Controlling gene expression by DNA mechanics: emerging insights and challenges,” *Biophys. Rev.*, vol. 8, no. Suppl 1, pp. 23–32, Nov. 2016.
- [7] M. L. Bennink, S. H. Leuba, G. H. Leno, J. Zlatanova, B. G. de Grooth, and J. Greve, “Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers,” *Nat. Struct. Biol.*, vol. 8, no. 7, pp. 606–610, Jul. 2001.
- [8] H. Yin, M. D. Wang, K. Svoboda, R. Landick, S. M. Block, and J. Gelles, “Transcription against an applied force,” *Science*, vol. 270, no. 5242, pp. 1653–1657, Dec. 1995.
- [9] M. D. Wang, M. J. Schnitzer, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, “Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase,” *Science*, vol. 282, no. 5390, pp. 902–907, Oct. 1998.
- [10] E. A. Galburt *et al.*, “Backtracking determines the force sensitivity of RNAP II in a factor-dependent manner,” *Nature*, vol. 446, no. 7137, pp. 820–823, Apr.

2007.

- [11] R. K. Jha, D. Levens, and F. Kouzine, “Mechanical determinants of chromatin topology and gene expression,” *Nucleus*, vol. 13, no. 1, pp. 94–115, Dec. 2022.
- [12] A. Revyakin, R. H. Ebright, and T. R. Strick, “Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 14, pp. 4776–4780, Apr. 2004.
- [13] B. P. Leblanc, C. J. Benham, and D. J. Clark, “An initiation element in the yeast CUP1 promoter is recognized by RNA polymerase II in the absence of TATA box-binding protein if the DNA is negatively supercoiled,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 20, pp. 10745–10750, Sep. 2000.
- [14] H. Tabuchi, H. Handa, and S. Hirose, “Underwinding of DNA on binding of yeast TFIID to the TATA element,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 192, no. 3, pp. 1432–1438, May 1993.
- [15] F. Kouzine, J. Liu, S. Sanford, H.-J. Chung, and D. Levens, “The dynamic response of upstream DNA to transcription-generated torsional stress,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 11, no. 11, pp. 1092–1100, Nov. 2004.
- [16] F. Kouzine, S. Sanford, Z. Elisha-Feil, and D. Levens, “The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 15, no. 2, pp. 146–154, Feb. 2008.
- [17] Y. J. Shi *et al.*, “DNA topology regulates PAM-Cas9 interaction and DNA unwinding to enable near-PAMless cleavage by thermophilic Cas9,” *Mol. Cell*, vol. 82, no. 21, pp. 4160-4175.e6, Nov. 2022.
- [18] J. M. Fogg, A. K. Judge, E. Stricker, H. L. Chan, and L. Zechiedrich, “Supercoiling and looping promote DNA base accessibility and coordination among distant sites,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, p. 5683, Sep. 2021.
- [19] M. D. Newton *et al.*, “Negative DNA supercoiling induces genome-wide Cas9 off-target activity,” *Mol. Cell*, vol. 83, no. 19, pp. 3533-3545.e5, Oct. 2023.

- [20] C. Zhang, H. H. Liu, K. W. Zheng, Y. H. Hao, and Z. Tan, “DNA G-quadruplex formation in response to remote downstream transcription activity: long-range sensing and signal transducing in DNA double helix,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 14, pp. 7144–7152, Aug. 2013.
- [21] B. Lv, D. Li, H. Zhang, J. Y. Lee, and T. Li, “DNA gyrase-driven generation of a G-quadruplex from plasmid DNA,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 75, pp. 8317–8319, Sep. 2013.
- [22] R. Stolz, S. Sulthana, S. R. Hartono, M. Malig, C. J. Benham, and F. Chedin, “Interplay between DNA sequence and negative superhelicity drives R-loop structures,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 13, pp. 6260–6269, Mar. 2019.
- [23] E. A. Oussatcheva, J. Pavlicek, O. F. Sankey, R. R. Sinden, Y. L. Lyubchenko, and V. N. Potaman, “Influence of global DNA topology on cruciform formation in supercoiled DNA,” *J. Mol. Biol.*, vol. 338, no. 4, pp. 735–743, May 2004.
- [24] J. W. Pavlicek, E. A. Oussatcheva, R. R. Sinden, V. N. Potaman, O. F. Sankey, and Y. L. Lyubchenko, “Supercoiling-induced DNA bending,” *Biochemistry*, vol. 43, no. 33, pp. 10664–10668, Aug. 2004.
- [25] F. C. Oberstrass, L. E. Fernandes, P. Lebel, and Z. Bryant, “Torque spectroscopy of DNA: base-pair stability, boundary effects, backbending, and breathing dynamics,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 110, no. 17, p. 178103, Apr. 2013.
- [26] M. Lee, S. H. Kim, and S.-C. Hong, “Minute negative superhelicity is sufficient to induce the B-Z transition in the presence of low tension,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 11, pp. 4985–4990, Mar. 2010.
- [27] G. Wang and K. M. Vasquez, “Dynamic alternative DNA structures in biology and disease,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 24, no. 4, pp. 211–234, Apr. 2023.
- [28] A. Son, A.-Y. Kwon, A. Johner, S.-C. Hong, and N.-K. Lee, “Underwound DNA under tension: L-DNA vs. plectoneme,” *EPL*, vol. 105, no. 4, p. 48002, Mar. 2014.
- [29] M. T. J. van Loenhout, M. V. de Grunt, and C. Dekker, “Dynamics of DNA

- supercoils,” *Science*, vol. 338, no. 6103, pp. 94–97, Oct. 2012.
- [30] R. Janissen, R. Barth, M. Polinder, J. van der Torre, and C. Dekker, “Single-molecule visualization of twin-supercoiled domains generated during transcription,” *Nucleic Acids Res.*, p. gkad1181, Dec. 2023.
- [31] F. Benedetti, J. Dorier, and A. Stasiak, “Effects of supercoiling on enhancer-promoter contacts,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 16, pp. 10425–10432, Aug. 2014.
- [32] Y. Liu, V. Bondarenko, A. Ninfa, and V. M. Studitsky, “DNA supercoiling allows enhancer action over a large distance,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 26, pp. 14883–14888, Dec. 2001.
- [33] F. Benedetti, D. Racko, J. Dorier, Y. Burnier, and A. Stasiak, “Transcription-induced supercoiling explains formation of self-interacting chromatin domains in *S. pombe*,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 45, no. 17, pp. 9850–9859, Sep. 2017.
- [34] M. V. Neguembor *et al.*, “Transcription-mediated supercoiling regulates genome folding and loop formation,” *Mol. Cell*, vol. 81, no. 15, pp. 3065–3081.e12, Aug. 2021.
- [35] H. Zheng and W. Xie, “The role of 3D genome organization in development and cell differentiation,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 20, no. 9, pp. 535–550, Sep. 2019.
- [36] L. F. Liu and J. C. Wang, “Supercoiling of the DNA template during transcription,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 20, pp. 7024–7027, Oct. 1987.
- [37] J. Ma, L. Bai, and M. D. Wang, “Transcription under torsion,” *Science*, vol. 340, no. 6140, pp. 1580–1583, Jun. 2013.
- [38] Y. Harada, O. Ohara, A. Takatsuki, H. Itoh, N. Shimamoto, and K. Kinoshita Jr, “Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase,” *Nature*, vol. 409, no. 6816, pp. 113–115, Jan. 2001.
- [39] C. Naughton *et al.*, “Transcription forms and remodels supercoiling domains unfolding large-scale chromatin structures,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no.

- 3, pp. 387–395, Mar. 2013.
- [40] S. S. Teves and S. Henikoff, “Transcription-generated torsional stress destabilizes nucleosomes,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 88–94, Jan. 2014.
- [41] R. P. Ghosh *et al.*, “Satb1 integrates DNA binding site geometry and torsional stress to differentially target nucleosome-dense regions,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 3221, Jul. 2019.
- [42] A. Lal, A. Dhar, A. Trostel, F. Kouzine, A. S. N. Seshasayee, and S. Adhya, “Genome scale patterns of supercoiling in a bacterial chromosome,” *Nat. Commun.*, vol. 7, p. 11055, Mar. 2016.
- [43] B. J. Visser, S. Sharma, P. J. Chen, A. B. McMullin, M. L. Bates, and D. Bates, “Psoralen mapping reveals a bacterial genome supercoiling landscape dominated by transcription,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 50, no. 8, pp. 4436–4449, May 2022.
- [44] K. Krassovsky, R. P. Ghosh, and B. J. Meyer, “Genome-wide profiling reveals functional interplay of DNA sequence composition, transcriptional activity, and nucleosome positioning in driving DNA supercoiling and helix destabilization in *C. elegans*,” *Genome Res.*, vol. 31, no. 7, pp. 1187–1202, Jun. 2021.
- [45] I. Bermúdez, J. García-Martínez, J. E. Pérez-Ortín, and J. Roca, “A method for genome-wide analysis of DNA helical tension by means of psoralen-DNA photobinding,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 19, p. e182, Oct. 2010.
- [46] R. R. Sinden, J. O. Carlson, and D. E. Pettijohn, “Torsional tension in the DNA double helix measured with trimethylpsoralen in living *E. coli* cells: analogous measurements in insect and human cells,” *Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 773–783, Oct. 1980.
- [47] T. Tan *et al.*, “Negative supercoils regulate meiotic crossover patterns in budding yeast,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 50, no. 18, pp. 10418–10435, Oct. 2022.
- [48] A. Herrero-Ruiz *et al.*, “Topoisomerase II α represses transcription by enforcing promoter-proximal pausing,” *Cell Rep.*, vol. 35, no. 2, p. 108977, Apr. 2021.
- [49] J. E. Hearst, “Psoralen photochemistry and nucleic acid structure,” *J. Invest.*

- Dermatol.*, vol. 77, no. 1, pp. 39–44, Jul. 1981.
- [50] M. Joyeux and I. Junier, “Requirements for DNA-Bridging Proteins to Act as Topological Barriers of the Bacterial Genome,” *Biophys. J.*, vol. 119, no. 6, pp. 1215–1225, Sep. 2020.
- [51] F. Leng and R. McMacken, “Potent stimulation of transcription-coupled DNA supercoiling by sequence-specific DNA-binding proteins,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 14, pp. 9139–9144, Jul. 2002.
- [52] F. Leng, L. Amado, and R. McMacken, “Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 46, pp. 47564–47571, Nov. 2004.
- [53] F. Leng, B. Chen, and D. D. Dunlap, “Dividing a supercoiled DNA molecule into two independent topological domains,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 50, pp. 19973–19978, Dec. 2011.
- [54] Y. Xia *et al.*, “Transmission of dynamic supercoiling in linear and multi-way branched DNAs and its regulation revealed by a fluorescent G-quadruplex torsion sensor,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 14, pp. 7418–7424, Aug. 2018.
- [55] S. Dages, X. Zhi, and F. Leng, “Fis protein forms DNA topological barriers to confine transcription-coupled DNA supercoiling in *Escherichia coli*,” *FEBS Lett.*, vol. 594, no. 5, pp. 791–798, Mar. 2020.
- [56] B. Pradhan *et al.*, “The Smc5/6 complex is a DNA loop-extruding motor,” *Nature*, vol. 616, no. 7958, pp. 843–848, Apr. 2023.
- [57] I. F. Davidson and J.-M. Peters, “Genome folding through loop extrusion by SMC complexes,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 445–464, Jul. 2021.
- [58] D. Racko, F. Benedetti, J. Dorier, and A. Stasiak, “Transcription-induced supercoiling as the driving force of chromatin loop extrusion during formation of TADs in interphase chromosomes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. 4, pp. 1648–1660, Feb. 2018.
- [59] I. A. Sawyer, D. Sturgill, and M. Dundr, “Membraneless nuclear organelles and

- the search for phases within phases,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 10, no. 2, p. e1514, Mar. 2019.
- [60] K. Wagh, D. A. Garcia, and A. Upadhyaya, “Phase separation in transcription factor dynamics and chromatin organization,” *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 71, pp. 148–155, Dec. 2021.
- [61] W.-K. Cho *et al.*, “Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates,” *Science*, vol. 361, no. 6400, pp. 412–415, Jul. 2018.
- [62] A. Boija *et al.*, “Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains,” *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1842–1855.e16, Dec. 2018.
- [63] P. Thomen, U. Bockelmann, and F. Heslot, “Rotational drag on DNA: a single molecule experiment,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 88, no. 24, p. 248102, Jun. 2002.
- [64] P. Nelson, “Transport of torsional stress in DNA,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 25, pp. 14342–14347, Dec. 1999.
- [65] S. Ide, R. Imai, H. Ochi, and K. Maeshima, “Transcriptional suppression of ribosomal DNA with phase separation,” *Sci Adv*, vol. 6, no. 42, p. eabb5953, Oct. 2020.
- [66] T. W. Turowski, E. Petfalski, B. D. Goddard, S. L. French, A. Helwak, and D. Tollervy, “Nascent Transcript Folding Plays a Major Role in Determining RNA Polymerase Elongation Rates,” *Mol. Cell*, vol. 79, no. 3, pp. 488–503.e11, Aug. 2020.
- [67] Y. R. Wen *et al.*, “Nascent pre-rRNA sorting via phase separation drives the assembly of dense fibrillar components in the human nucleolus,” *Mol. Cell*, vol. 76, no. 5, pp. 767–783.e11, Dec. 2019.
- [68] M. Feric *et al.*, “Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments,” *Cell*, vol. 165, no. 7, pp. 1686–1697, Jun. 2016.
- [69] J. A. Riback *et al.*, “Composition-dependent thermodynamics of intracellular

- phase separation,” *Nature*, vol. 581, no. 7807, pp. 209–214, May 2020.
- [70] K. Matsumoto and S. Hirose, “Visualization of unconstrained negative supercoils of DNA on polytene chromosomes of *Drosophila*,” *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 17, pp. 3797–3805, Aug. 2004.
- [71] J. Schindelin *et al.*, “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676–682, Jun. 2012.
- [72] M. Kurihara *et al.*, “Genomic Profiling by ALaP-Seq Reveals Transcriptional Regulation by PML Bodies through DNMT3A Exclusion,” *Mol. Cell*, vol. 78, no. 3, pp. 493-505.e8, May 2020.
- [73] S. Bolte and F. P. Cordelières, “A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy,” *J. Microsc.*, vol. 224, no. Pt 3, pp. 213–232, Dec. 2006.
- [74] J. Ollion, J. Cochenec, F. Loll, C. Escudé, and T. Boudier, “TANGO: a generic tool for high-throughput 3D image analysis for studying nuclear organization,” *Bioinformatics*, vol. 29, no. 14, pp. 1840–1841, Jul. 2013.
- [75] B. Villeponteau and H. G. Martinson, “Gamma rays and bleomycin nick DNA and reverse the DNase I sensitivity of beta-globin gene chromatin in vivo,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 1917–1924, May 1987.
- [76] Y. Pommier, “Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 10, pp. 789–802, Oct. 2006.
- [77] E. L. Baldwin and N. Osheroff, “Etoposide, topoisomerase II and cancer,” *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, vol. 5, no. 4, pp. 363–372, Jul. 2005.
- [78] J. C. Mars *et al.*, “The chemotherapeutic agent CX-5461 irreversibly blocks RNA polymerase I initiation and promoter release to cause nucleolar disruption, DNA damage and cell inviability,” *NAR Cancer*, vol. 2, no. 4, p. zcaa032, Dec. 2020.
- [79] O. Bensaude, “Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?,” *Transcription*, vol. 2, no. 3, pp. 103–108, May 2011.

- [80] S. Chiarella *et al.*, “Nucleophosmin mutations alter its nucleolar localization by impairing G-quadruplex binding at ribosomal DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. 5, pp. 3228–3239, Mar. 2013.
- [81] V. Brázda *et al.*, “G4Hunter web application: a web server for G-quadruplex prediction,” *Bioinformatics*, vol. 35, no. 18, pp. 3493–3495, Sep. 2019.
- [82] P. Grozdanov, O. Georgiev, and L. Karagyozov, “Complete sequence of the 45-kb mouse ribosomal DNA repeat: analysis of the intergenic spacer,” *Genomics*, vol. 82, no. 6, pp. 637–643, Dec. 2003.
- [83] J. G. A. Aw *et al.*, “In vivo mapping of eukaryotic RNA interactomes reveals principles of higher-order organization and regulation,” *Mol. Cell*, vol. 62, no. 4, pp. 603–617, May 2016.
- [84] R. K. Suto *et al.*, “Crystal structures of nucleosome core particles in complex with minor groove DNA-binding ligands,” *J. Mol. Biol.*, vol. 326, no. 2, pp. 371–380, Feb. 2003.
- [85] A. K. Estandarte, S. Botchway, C. Lynch, M. Yusuf, and I. Robinson, “The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 31417, Aug. 2016.
- [86] Y. Pommier, Y. Sun, S.-Y. N. Huang, and J. L. Nitiss, “Roles of eukaryotic topoisomerases in transcription, replication and genomic stability,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 17, no. 11, pp. 703–721, Nov. 2016.
- [87] Y. Pommier, A. Nussenzweig, S. Takeda, and C. Austin, “Human topoisomerases and their roles in genome stability and organization,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 23, no. 6, pp. 407–427, Jun. 2022.
- [88] I. Collins, A. Weber, and D. Levens, “Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 21, no. 24, pp. 8437–8451, Dec. 2001.
- [89] A. Girstun, T. Ishikawa, B. Kowalska-Loth, A. Czuby, and K. Staron, “Subnuclear localization of human topoisomerase I,” *J. Cell. Biochem.*, vol. 118,

no. 2, pp. 407–419, Feb. 2017.

- [90] Y. Ogawa and N. Imamoto, “Methods to separate nuclear soluble fractions reflecting localizations in living cells,” *iScience*, vol. 24, no. 12, p. 103503, Dec. 2021.
- [91] D. M. Mitrea *et al.*, “Self-interaction of NPM1 modulates multiple mechanisms of liquid-liquid phase separation,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 842, Feb. 2018.
- [92] A. Gallo *et al.*, “Structure of nucleophosmin DNA-binding domain and analysis of its complex with a G-quadruplex sequence from the c-MYC promoter,” *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 32, pp. 26539–26548, Aug. 2012.
- [93] B. R. Sabari *et al.*, “Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control,” *Science*, vol. 361, no. 6400, Jul. 2018.
- [94] Y. Lu *et al.*, “Phase separation of TAZ compartmentalizes the transcription machinery to promote gene expression,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 22, no. 4, pp. 453–464, Apr. 2020.
- [95] H. Yamazaki, M. Takagi, H. Kosako, T. Hirano, and S. H. Yoshimura, “Cell cycle-specific phase separation regulated by protein charge blockiness,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 625–632, May 2022.
- [96] D. Varshney, J. Spiegel, K. Zyner, D. Tannahill, and S. Balasubramanian, “The regulation and functions of DNA and RNA G-quadruplexes,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 21, no. 8, pp. 459–474, Aug. 2020.
- [97] A. K. Todd, M. Johnston, and S. Neidle, “Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 2901–2907, May 2005.
- [98] J. L. Huppert and S. Balasubramanian, “Prevalence of quadruplexes in the human genome,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 9, pp. 2908–2916, May 2005.
- [99] V. Y. Stefanovsky, G. Pelletier, D. P. Bazett-Jones, C. Crane-Robinson, and T. Moss, “DNA looping in the RNA polymerase I enhancer is the result of non-cooperative in-phase bending by two UBF molecules,” *Nucleic Acids Res.*, vol.

- 29, no. 15, pp. 3241–3247, Aug. 2001.
- [100] A. Lisica *et al.*, “Mechanisms of backtrack recovery by RNA polymerases I and II,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 11, pp. 2946–2951, Mar. 2016.
- [101] R. Landick, T. Strick, and J. Wang, *RNA Polymerases as Molecular Motors: On the Road*. Royal Society of Chemistry, 2021.
- [102] J. Diesch *et al.*, “Changes in long-range rDNA-genomic interactions associate with altered RNA polymerase II gene programs during malignant transformation,” *Commun Biol*, vol. 2, p. 39, Jan. 2019.
- [103] K. Morotomi-Yano and K. Yano, “Nucleolar translocation of human DNA topoisomerase II by ATP depletion and its disruption by the RNA polymerase I inhibitor BMH-21,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, p. 21533, Nov. 2021.
- [104] B. J. Evison, M. L. Actis, and N. Fujii, “A clickable psoralen to directly quantify DNA interstrand crosslinking and repair,” *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 24, no. 5, pp. 1071–1078, Mar. 2016.
- [105] M. Zhang *et al.*, “Optimized photochemistry enables efficient analysis of dynamic RNA structuromes and interactomes in genetic and infectious diseases,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, p. 2344, Apr. 2021.
- [106] C. Y. Jao and A. Salic, “Exploring RNA transcription and turnover *in vivo* by using click chemistry,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 41, pp. 15779–15784, Oct. 2008.
- [107] M. S. Guo, R. Kawamura, M. L. Littlehale, J. F. Marko, and M. T. Laub, “High-resolution, genome-wide mapping of positive supercoiling in chromosomes,” *Elife*, vol. 10, p. e67236, Jul. 2021.
- [108] S.-J. Heo, B. D. Cosgrove, E. N. Dai, and R. L. Mauck, “Mechano-adaptation of the stem cell nucleus,” *Nucleus*, vol. 9, no. 1, pp. 9–19, Jan. 2018.
- [109] K. Maki *et al.*, “Hydrostatic pressure prevents chondrocyte differentiation through heterochromatin remodeling,” *J. Cell Sci.*, vol. 134, no. 2, Jan. 2021.

- [110] K. H. Vining and D. J. Mooney, “Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 12, pp. 728–742, Dec. 2017.
- [111] A. Tajik *et al.*, “Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin,” *Nat. Mater.*, vol. 15, no. 12, pp. 1287–1296, Dec. 2016.
- [112] H. Clausen-Schaumann, M. Rief, C. Tolksdorf, and H. E. Gaub, “Mechanical stability of single DNA molecules,” *Biophys. J.*, vol. 78, no. 4, pp. 1997–2007, Apr. 2000.
- [113] P. Lulchev and D. Klostermeier, “Reverse gyrase-recent advances and current mechanistic understanding of positive DNA supercoiling,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 13, pp. 8200–8213, Jul. 2014.
- [114] P. Bettotti, V. Visone, L. Lunelli, G. Perugino, M. Ciaramella, and A. Valenti, “Structure and properties of DNA molecules over the full range of biologically relevant supercoiling states,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, p. 6163, Apr. 2018.
- [115] G. C. Grigg, L. A. Beard, and M. L. Augée, “The evolution of endothermy and its diversity in mammals and birds,” *Physiol. Biochem. Zool.*, vol. 77, no. 6, pp. 982–997, Nov-Dec 2004.
- [116] I. Walter and F. Seebacher, “Endothermy in birds: underlying molecular mechanisms,” *J. Exp. Biol.*, vol. 212, no. Pt 15, pp. 2328–2336, Aug. 2009.
- [117] K. Fukushima *et al.*, “Genome of the pitcher plant *Cephalotus* reveals genetic changes associated with carnivory,” *Nat Ecol Evol*, vol. 1, no. 3, p. 59, Feb. 2017.
- [118] Y. Seol and K. C. Neuman, “The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology,” *Biophys. Rev.*, vol. 8, no. Suppl 1, pp. 101–111, Nov. 2016.
- [119] M. K. Wall, L. A. Mitchenall, and A. Maxwell, “*Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 20, pp. 7821–7826, May 2004.

関連業績

原著学術論文

- (1) Jumpei Fukute, Koichiro Maki, and Taiji Adachi
The nucleolar shell provides anchoring sites for DNA untwisting
Communications Biology, **7**, 83 (2024).
DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05750-w>

学術講演（国際学会）

- (1) ○Jumpei Fukute, Koichiro Maki, Taiji Adachi, “Exploring DNA underwinding mechanism in a nucleolus”, 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, oral presentation, Hokkaido, Japan, 2023.8.29-9.1.
- (2) ○Koichiro Maki, Jumpei Fukute, Taiji Adachi, “In situ imaging of single-stranded DNA in a cell nucleus”, 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, oral presentation, Hokkaido, Japan, 2023.8.29-9.1.
- (3) ○Jumpei Fukute, “Unveiling DNA twisting mechanisms by fluorescence imaging of underwound DNA in the cell nucleus”, The 28th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, oral presentation (S4-4), Shanghai (online), China, 2022.10.26-28.
- (4) ○Jumpei Fukute, Koichiro Maki, Taiji Adachi, “RNA polymerase II activities promoted by DNA twisting”, 9th World Congress of Biomechanics, oral presentation (O-01045), Taipei (online), Taiwan, 2022.7.10-14.
- (5) ○Koichiro Maki, Jumpei Fukute, Takashi Suetake, Taiji Adachi, “A novel fluorescent technique for single-stranded DNA in the cell nucleus: toward understanding biomechanical behaviors of genomic DNA”, 9th World Congress of Biomechanics, invited talk (O-22086), Taipei (online), Taiwan, 2022.7.10-14.
- (6) ○Jumpei Fukute, Koichiro Maki, Taiji Adachi, “Exploring mechanical effects of DNA twisting on RNA polymerase II activities”, The 11th Asian-Pacific Conference

on Biomechanics, oral presentation (AB-02) and poster presentation (PP2-12), Kyoto (online), Japan, 2021.12.2-4.

学術講演（国内学会）

- (1) ○福手淳平, “Mechanical regulation of DNA underwinding in a cell nucleolus”, CREST 多細胞第 5 回領域会議, ポスター発表 (24), 静岡, 2023.12.19-21.
- (2) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「細胞核内における DNA underwinding の力学的理解」, 第 61 回日本生物物理学会年会, 口頭発表 (1GE1430), 名古屋, 2023.11.14-16.
- (3) ○Jumpei Fukute, Koichiro Maki, Taiji Adachi, “Unveiling DNA untwisting mechanisms by in situ imaging”, 第 3 回医薬系研究交流サロン, ポスター発表 (45), 京都, 2023.9.27-29.
- (4) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「核小体における underwound DNA の力学的発生メカニズムの検証」, 日本機械学会第 35 回エンジニアリング講演会, 仙台, ポスター発表 (23-3), 2023.6.3-4.
- (5) ○福手淳平, 「Underwound DNA が発生する力学的メカニズムの解明」, CREST 多細胞第 4 回領域会議, 口頭発表 (A06) およびポスター発表 (06), 名古屋, 2023.1.11-13.
- (6) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「核内構造体における underwound DNA の空間分布の解析」, 日本機械学会第 33 回バイオフィロンティア講演会, 口頭発表 (2E09), 神戸, 2022.12.17-18.
- (7) ○Jumpei Fukute, “DNA underwinding mechanisms explored by in situ visualization of underwound DNA”, 大学院教育支援機構奨励研究員及びフェローシップ受給者によるポスター発表会・研究交流会, ポスター発表 (38), 京都, 2022.10.21, 27.
- (8) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「細胞核内における underwound DNA の蛍光イメージング」, 第 60 回日本生物物理学会年会, 口頭発表 (2SBA-4) およびポスター発表 (2Pos116), 函館, 2022.9.28-30.

- (9) ○牧功一郎, 福手淳平, 安達泰治, 「一本鎖 DNA は核小体周囲に凝集体を形成する」, 第 60 回日本生物物理学会年会, ポスター発表 (2Pos112) , 函館, 2022.9.28-30.
- (10) ○福手淳平, 「超らせんを介したエンハンサー・プロモーターの近接化のメカニズムの解明」, CREST 多細胞第 3 回領域会議, 口頭発表 (12) , オンライン開催, 2022.1.17-18.
- (11) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「トポイソメラーゼ阻害による遺伝子転写の活性化」, 日本機械学会第 33 回バイオエンジニアリング講演会, 口頭発表 (2S1-16) , オンライン開催, 2021.6.25-26.
- (12) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「DNA 超らせん形成が核内クロマチンのアクセシビリティに与える効果」, 日本機械学会第 31 回バイオフィロントニア講演会, 口頭発表 (1A20) , オンライン開催, 2020.12.12-13.
- (13) ○福手淳平, 牧功一郎, 安達泰治, 「ATP 枯渇条件における細胞核内 DNA のライブイメージング」, 第 43 回日本バイオレオロジー学会年会, 誌上発表, 江別 (誌上開催), 2020.2.3-5.

受賞

- (1) 日本生物物理学会学生発表賞, 第 61 回日本生物物理学会年会, 2023.11.16.
- (2) Best Young Scientist Poster Award, The 28th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, 2022.10.28.
- (3) Outstanding Abstract Award, The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2021.12.5.

謝辞

京都大学医生物学研究所の安達泰治先生には、研究テーマの立案からその遂行に至るまで多大なるご援助を賜りました。未熟な私に真摯に向き合ってください、独立した研究者として生き抜く上で必要な心構えをご教示いただきました。ここに謹んで感謝の意を申し上げます。同研究所の牧功一郎先生には、直接の指導教員として、熱心かつ丁寧なご指導を賜りました。日々の実験結果の中から新たな研究の可能性を見出し、自由なアイデアの下で発展させることの重要性と喜びをご教示いただきました。心より感謝申し上げます。また、本論文の執筆にあたり、京都大学大学院生命科学研究科の豊島文子先生、谷口雄一先生、吉村成弘先生には貴重なご助言を賜りました。ここに深く感謝を申し上げます。

京都大学大学院生命科学研究科の渡邊直樹先生には副指導教員として数多くのご助言を賜りました。ここに厚く御礼を申し上げます。京都大学 iCeMS 解析センターの石館文善先生ならびに藤原敬宏先生には超解像イメージングにおいて多大なるご援助を賜りました。深く感謝申し上げます。また、本研究は JST-CREST 多細胞領域のご支援の下で行われました。領域統括の松田道行先生には多大なお心遣いのご援助を賜りました。さらに、領域に参画されている皆様とは大変有意義な議論をさせていただきました。ここに格別なる感謝を表します。

本研究を遂行するにあたり、バイオメカニクス研究室の方々に大変お世話になりました。Okeyo Kennedy 先生、亀尾佳貴先生、金英寛先生には、数多くのご助言と激励のお言葉を頂きました。Kim Jeonghyun 先生ならびに須長純子氏には、実験の根本的な原理から細かな手技に至るまで親身にご教授頂きました。平良美智代氏ならびに森山友紀恵氏には、複雑な事務手続きを円滑に進めて頂きました。博士後期課程の同輩である横山優花氏は、切磋琢磨する仲間として大いに刺激を与えてくださいました。長谷川太一氏とは、ともに DNA のねじれの研究に携わる中で苦楽を分かち合いました。ここに謝意を表しきれなかった方々も含め、バイオメカニクス研究室の皆様には深くお礼を申し上げます。

最後に、いつも私を支え、温かく見守ってくれた家族に感謝の言葉を述べさせていただきます。本当にありがとうございました。

2024年2月 福手淳平

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Jumpei Fukute, Koichiro Maki, and Taiji Adachi

The nucleolar shell provides anchoring sites for DNA untwisting

Communications Biology, 7, 83 (2024).

DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05750-w>