

# 研究終了報告書

## 「DNA のクラスター形成による転写制御の物理」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：山本 哲也

### 1. 研究のねらい

真核生物のゲノムは、10k-1M bps 程度の長さのループを形成している。ゲノム DNA のループは、コヒーシンのループ押し運動によって形成されることが示唆されている (Fudenberg *et al.*, Cell Rep. 2016)。デグロン法を使ってコヒーシンを壊すと、スーパーエンハンサの標的遺伝子の転写量が小さくなることが実験的に示されている (Rao *et al.*, Cell, 2017)。スーパーエンハンサ間の接触頻度は他のペアと比べて高くなっているが、コヒーシンを壊すとさらに高くなる。この結果は、スーパーエンハンサが寄り集まって構造体を形成しており、コヒーシンはその構造を変化させることによって標的遺伝子の転写を制御することを示唆している。一方、スーパーエンハンサは、転写凝集体 (メディエータ、転写因子、RNA ポリメラーゼ II などが相分離して形成される凝集体) の表面に局在していることと、標的遺伝子は転写凝集体の近傍にあるが、20%程度しか共局在していないことも顕微鏡観察によって示されている (Sabari *et al.*, Science, 2018 & Cho *et al.*, Science, 2018)。この実験結果は、スーパーエンハンサの形成する構造の正体が転写凝集体であり、凝集体表面の DNA の運動が転写制御に重要な役割を果たすことを示唆している。本研究の目的は、ループ押し運動を考慮に入れて、高分子のダイナミクスの理論を拡張することによって DNA の運動を扱い、ソフトマターの自己組織化の物理を拡張して転写凝集体を扱うことによって、スーパーエンハンサの形成する構造の形成とコヒーシンによる標的遺伝子の転写制御の機構を理論的に明らかにすることである。この理論を実験的に検証するための共同研究もこのさきがけ研究の課題に含まれている。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

コヒーシンのループ押しによるスーパーエンハンサの標的遺伝子の転写制御機構を明らかにするために、(1) 転写凝集体表面の DNA の運動、(2) 転写凝集体の形成機構、(3) 転写凝集体の大きさの制御、(4) 転写凝集体表面の DNA のループ押しによる転写制御機構の解析を行った。転写凝集体は、転写装置 (転写因子、RNA 合成酵素 II (pol II)、メディエータなど) が液液相分離によって凝集したものである。一般的には、クロマチンは転写凝集体から排除されるが、転写装置はエンハンサに結合することから、エンハンサは転写凝集体と親和性があると考えられる。コヒーシンローダである NIPBL はエンハンサに局在化することから、ループ押出しの開始点が凝集体表面に束縛されていると考える。この束縛条件を考慮に入れて、ループ押しによる DNA の運動を解析し、ループ押し開始後一定時間がたった後に DNA が縮み始めることが理論的に明らかになった。この運動は、溶液中で自由拡散している DNA がループ押し開始直後に縮み始めることと対照的である。ループ押しによって DNA が引き込まれるために、転写凝集体表面での DNA の密度が高なり、面内圧

力が発生することも理論的に明らかにした。面内圧力は凝集体の実効的な表面張力を下げるため、転写凝集体のダイナミクスと定常状態での大きさに寄与する。スーパーエンハンサの標的遺伝子は転写凝集体付近で観察されるが、凝集体と共局在している標的遺伝子は20%程度にとどまることから、標的遺伝子が転写凝集体内の転写装置にアクセスする過程が転写ダイナミクスを制限していると考えられる。標的遺伝子のプロモータの転写凝集体へのアクセス率の解析を行い、ループ押し出しが活性な場合には、エンハンサーとプロモータ間の DNA を長くすると、アクセス率が大きくなるという結果を得た。この結果は、エンハンサープロモータ間の DNA を長くすると、この DNA 領域の緩和時間が長くなり、プロモータが転写凝集体表面近傍に滞在する時間が長くなるため、プロモータが転写凝集体に再びアクセスする確率が高くなることが原因となっている。核内構造体形成の基礎理論と類似系であるパラスペックルと核小体繊維状中心部の形成機構の理論を構築し、実験的検証をすることにも成功した。

## (2) 詳細

### (2-1) 転写凝集体表面の DNA の運動

DNA は高分子の一種であるが、高分子の硬さを表す量として Kuhn 長がある。Kuhn 長以上の長さの DNA は、熱運動によって様々な形状に変化する。取りうる形状の数が多い状態が安定になることから(熱力学第二法則)、高分子は(エントロピーが起源となる)バネのようにふるまう。このことから、高分子ダイナミクスを扱うために、 $N+1$  個のビーズがバネでつながれた構造体で高分子( $N$  はセグメントの数)を近似するバネビーズモデル(ラウスモデル)がしばしば用いられる(図 1)。

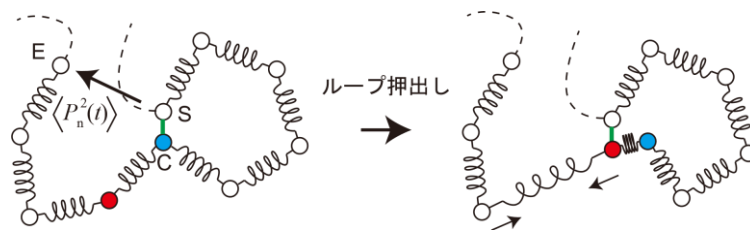


図1 ループ押し出しのモデル。

コヒーシンのループ押し出し運動は、アーム部(まだ押し出されていない DNA 領域)からループ部(すでに押し出されている DNA 領域)に一定レートでビーズを輸送する運動として考慮に入れることができる(図 1)。無限に長い染色体の中にある、ループ押し出し開始ビーズ  $S$ ( $0$  番目のビーズとする)と終了ビーズ  $E$ ( $N+1$  番目のビーズとする)の間の領域を考える。高分子の大きさを表す量として、末端間ベクトル  $\mathbf{P}(t) (= \mathbf{R}_N(t) - \mathbf{R}_0(t))$  の自乗平均  $\langle \mathbf{P}^2(t) \rangle$  がよく用いられる。そこで、溶液中を自由拡散している DNA(図 2a)と転写凝集体表面の DNA(図 2b)について、ループ押し出しによる領域末端間ベクトルの自乗平均  $\langle \mathbf{P}^2(t) \rangle$  の時間変化の解析を行った。デグロン法でコヒーシンを壊した後リカバーすると、スーパーエンハンサの部分からループが戻るという Rao らの実験結果(Rao et al., Cell, 2017)から、コヒーシンはエ

ンハンサからロードされると考えられる。転写凝集体には転写因子やメディエータが含まれているので、エンハンサが転写凝集体の表面に局在化しているため (Sabari et al., Science, 2018)、ビーズ S が凝集体表面に局在化していると仮定した。簡単にするために、コヒーシスが内包している DNA の両端のうち、片方のみが押し出される非対称なループ押し出しを考えた。

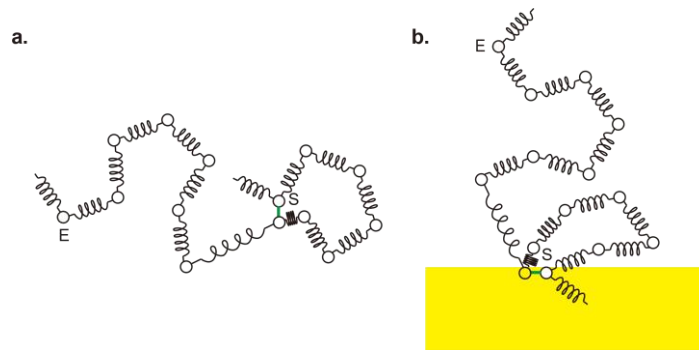


図 2 溶液中で自由拡散している DNA (a) とループ押し出し開始位置が凝集体 (黄色) に束縛されている DNA。

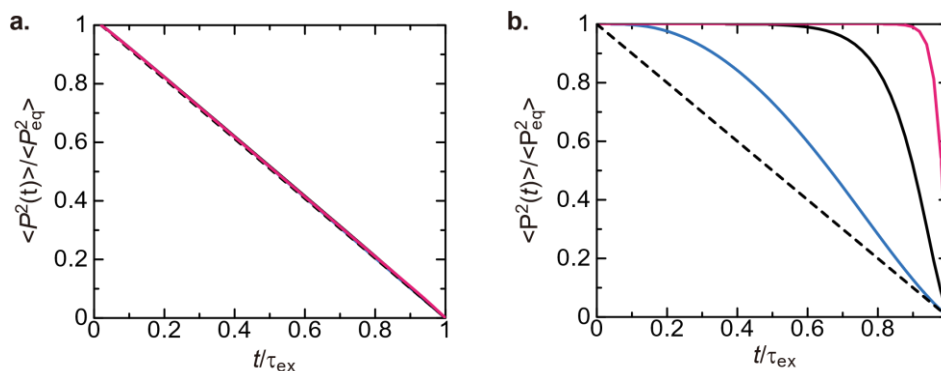


図 3 溶液中で自由拡散している DNA (a) と凝集体界面に束縛されている DNA (b) のループ押し出し領域 (ループ押し出し開始ビーズ S と終了ビーズ E の間の領域) の末端間ベクトルの自乗平均  $\langle P^2(t) \rangle$  を (コヒーシスがロードされてからの) 時間  $t$  の関数として表した ( $\langle P_{eq}^2 \rangle (= Nb^2/3)$  は平衡状態での値)。シアン、黒、マゼンタは、それぞれ、 $\tau_N/\tau_{ex} = 0.1, 1.0, 5.0$  としたときの結果である。 $\tau_N$  はループ押し出し領域の緩和時間であり、 $N$  の自乗に比例する。 $\tau_{ex}$  はコヒーシスがこの領域を押し出すのに必要な時間であり、 $N$  に比例する。 $N=50$  として数値計算を行った。

溶液中を自由に拡散している DNA については、領域末端間ベクトルの自乗平均が時間に (ほぼ) 比例して小さくなる (図 3a)。一方、ループ押し出し開始の末端が転写凝集体などの界面に束縛されている時には、ループ押し出しが開始した後、ある時間までは領域末端間ベクトルは変化しないが、それ以降は急に減少することが分かった (図 3b)。非対称なループ押し出しでは、ビーズ S がコヒーシスに内包したままになっている。ループ押し出しによって、アーム部 (まだ押し出されていない部分) のセグメントがループ部 (すでに押し出されている領

域)に輸送され、アーム部のバネが引き延ばされる(図 1)。溶液中で自由拡散している DNA は、ビーズ S が自由であるため、このビーズが変位することによってすぐにバネの引き延ばしを緩和することができる。一方、ビーズ S が凝集体表面に局在化している場合には、ビーズ E が凝集体の方向に変位しなければ、領域末端間ベクトルの自乗平均 $\langle P^2(t) \rangle$ が小さくならない。ループ押出しによって発生する張力がビーズ E まで到達するまで、その間にあるばねの数  $n$  の自乗に比例する時間が必要であるため、凝集体界面の DNA が縮み始めるまでのラグタイムがある。このラグタイムが溶液中で自由拡散している DNA と界面に束縛されている DNA の運動の違いの原因であることが明らかになった。本研究の結果は、欧州物理学学会が発行する *Europhysics Letters* 誌に掲載された(T. Yamamoto, T. Sakaue, & H. Schiessel, Loop extrusion drives very different dynamics for Rouse chains in bulk solutions and at interfaces, *Europhys. Lett.*, **127**, 38002, 2019)。

## (2-2) 転写凝集体の形成機構

アーキテクチャ RNA(arcRNA)と呼ばれる非コード RNA が(転写凝集体を含む)核内構造体の構造形成に重要な役割を果たす。核内構造体形成の基本原則を明らかにするために、高分子の相分離の標準的な理論である Flory-Huggins 理論を拡張して arcRNA の輸送方程式を導出し、(1つの)転写サイトで一定レートで arcRNA が生成されている時の、定常状態での arcRNA の体積分率(濃度に比例)を計算した(図 4a)。arcRNA の凝集は(arcRNA に結合する)RNA 結合タンパク質(RBP)の天然変性領域によるので、arcRNA が結合している場合にのみ arcRNA の間に引力相互作用が働くと仮定した。arcRNA の体積分率は、転写サイトからの距離の減少関数であり、相分離の不安定性のために、(平衡相分離の臨界点より十分温度が小さい時には)ある距離  $r=r_c$  でほぼ 0 にジャンプすることが分かった(図 4b)。体積分率がジャンプする距離  $r_c$  は、凝集体の半径に対応していると考えることができる。凝集体の半径  $r_c$  は、転写レートの 1/3 に比例する。相分離のために、凝集体の外側の arcRNA の体積分率は非常に小さくなり、それに伴い、凝集体界面から流れ出る arcRNA も小さくなる(つまり、生成された arcRNA のほとんどは凝集体内部で分解される)がこの結果の原因であると考えられる。本研究の結果は、英国王立化学学会が発行する *Soft Matter* 誌に掲載された(代表的な論文2)。

パラスペックルは、NEAT1\_2 の両末端領域がシェル部に、中央領域がコア部に局在化したコア-シェル構造を示す。パラスペックルのコア-シェル構造は、ABC トリブロック共重合体の形成するミセルと類似していることから、NEAT1\_2 と RBP の複合体を ABC トリブロック共重合体として扱い、転写による NEAT1\_2 の生成ダイナミクスを考慮に入れて、パラスペックル形成のモデルを構築した(代表的な論文2)。NEAT1\_2 が ABC トリブロック共重合体のようにふるまうのは、NEAT1\_2 の塩基配列の特徴によって、末端領域と中央領域に異なる RBP が結合することによると考えられる。この理論によって、1. (野生型のように)末端領域が長い時には、すべての末端領域がシェル部に局在化するが、片方の末端領域を短くするにつれて、コア部に局在化する末端領域の割合が高くなること、2. 末端領域が長い時には、転写レートを大きくしても構造が変わらないが、末端領域を短い時には、転写レートを大

きくするとコア部に局在化する末端領域の割合が高くなることを予言した。これらの予言は、共同研究者の山崎講師と廣瀬教授の実験によって(少なくとも定性的には)検証することができた。このソフトマター理論物理学と分子生物学実験の融合研究の結果は、欧州分子生物学機構が発行する EMBO Journal に採択された(代表的な論文2)。この研究の理論的側面の詳細をまとめた論文は、bioRxiv から閲覧することができる(T. Yamamoto, T. Yamazaki, and T. Hirose, Triblock copolymer model of spherical paraspeckles, bioRxiv, doi: 10.1101/2020.11.01.364190)。

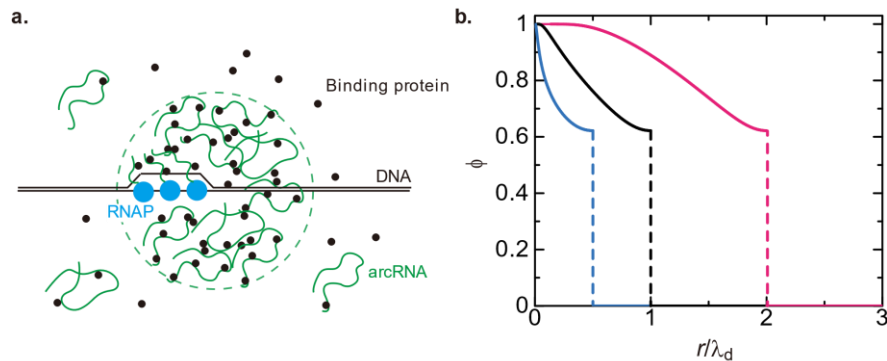


図4 核内構造体の形成機構のモデル。転写サイトから一定レートで arcRNA が生成される場合の体積分率の分布を、転写サイトからの距離として予言した。 $4\pi\lambda_p/\lambda_d=24.8$ (マゼンタ)、 $2.84$ (ブラック)、 $0.337$ (シアン)の場合の計算を行った。 $\lambda_p$  は arcRNA の生成レートと拡散係数で決まる長さスケールであり、 $\lambda_d$  は arcRNA の分解レートと拡散係数で決まる長さスケール(arcRNA が分解されるまでに拡散する距離)である。 $4\pi\lambda_p/\lambda_d$ は転写レートに比例する。また、arcRNA と RNA 結合タンパク質(RBP)の複合体の間の相互作用の大きさを表す相互作用パラメータ $\chi$ は 1.0、RBP の arcRNA への結合エネルギー $\varepsilon/(k_B T)$ は $-2.0$ 、arcRNA を構成するセグメント数  $N$  を 100 として計算を行った。

### (2-3) 転写凝集体の大きさの制御機構

スーパーエンハンサが転写凝集体表面に局在化しているため、デグロン法によってコヒーシオンを壊すと、スーパーエンハンサの間の接触頻度が高くなることは(Rao et al., Cell, 2017)、1. 同じ転写凝集体に局在化するスーパーエンハンサの数が増える、または、2. 転写凝集体が小さくなってスーパーエンハンサ間の距離が小さくなることを示唆している。コヒーシオンを壊したことによって、凝集体表面のスーパーエンハンサの数が増えたのではないかという仮説は、すでに Rao らの実験の論文で述べられている。本さきがけ研究では、コヒーシオンを壊したことによるスーパーエンハンサの接触頻度の変化の原因を明らかにするために、コヒーシオンのループ押出しが転写凝集体の大きさに与える影響を理論的に解析した。

#### 2-3.1 凝集体界面の DNA による制御

相分離によって形成される凝集体は、表面エネルギーを小さくするために、構成要素がある限り成長し続ける。相分離した系に少量の界面活性剤を加えると、界面活性剤は凝集



体表面に局在化して、表面エネルギーの原因である表面張力を小さくする。スーパーエンハンサーは転写凝集体表面に局在化しているので、転写凝集体近傍の DNA が界面活性剤の役割を果たしていると考えられる。界面活性剤が表面張力を減少させる原因は、界面活性剤が界面と平行な方向に発生する圧力(面内圧力)であるため、本研究では、転写凝集体界面の DNA が発生する面内圧力がループ押し出しのダイナミクスにどのように依存するか理論的に解析した。

低分子の界面活性剤では、界面活性剤の表面での熱運動による面内圧力と界面活性剤の間の斥力相互作用が面内圧力の原因となるが、DNA のような長い高分子が界面に吸着している場合には、斥力相互作用のみが面内圧力の原因となる。DNA の間の斥力相互作用が大きくなるためには、転写凝集体界面を DNA が密にパックしている必要がある。そこで、転写凝集体界面の DNA を高分子ブラシとして扱い、DNA の発生する面内圧力の解析を行った(図5a)。DNA の運動方程式は、高分子ブラシの自由エネルギー(アレクサンダーモデル)に Onsager の変分原理を適用することによって導出した。コヒーシスは凝集体にグラフトされている末端からロードされ、DNA を一定レートでループ押し出す。コヒーシスの平均ロード時間は $\tau_{on}$ として、寿命時間 $\tau_{ex}$ の間に  $N$  個の DNA セグメントを押し出した後、DNA からアンロードされる。このモデルでは、DNA(ブラシ)の高さ  $h$  が(2-1)の研究における、末端間ベクトルの自乗平均(の平方根)に対応する量となる。

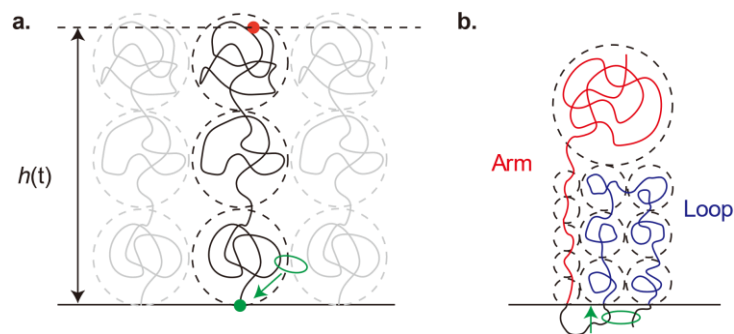


図5 凝集体表面の DNA の高分子ブラシモデル。凝集体表面にある DNA にコヒーシスがロードされて、一定レートでループ押し出しが起こる。

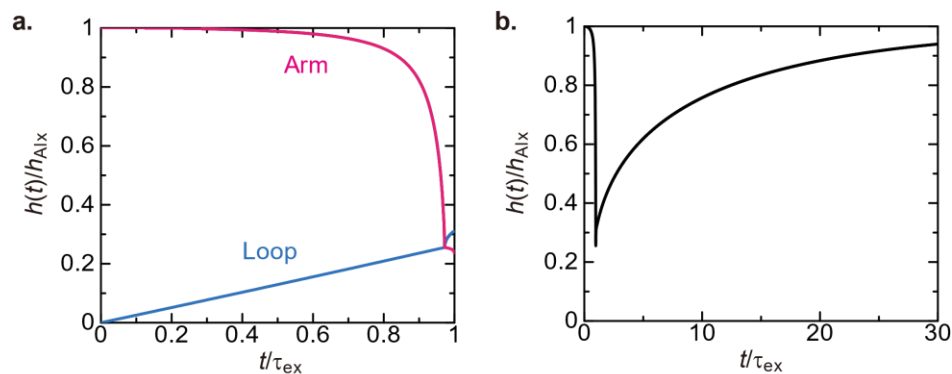


図6 凝集体表面の DNA の高さ  $h(t)$  を時間  $t$  の関数として表した。DNA の高さは平衡状態

の値  $h_{Alx}$ 、時間はループ押し出しにかかる時間  $\tau_{ex}$  で規格化している。ループ押し出しの間の短い時間スケールの時間発展を a に、長い時間スケールでの緩和過程での時間発展を b に示している。 $\tau_{ex}/\tau_N = 0.02$  として計算を行った ( $\tau_N$  は DNA の緩和時間である)。

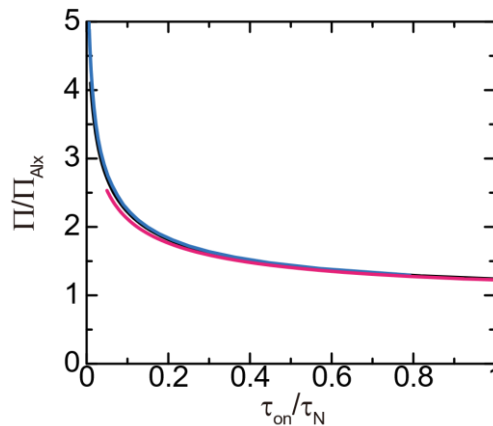


図7 DNA の発生する面内圧力  $\Pi$  の時間平均をコヒーシンの平均ロード時間  $\tau_{on}$  の関数として示した。面内圧力は平衡状態での値  $\Pi_{Alx}$ 、コヒーシンの平均ロード時間は DNA の緩和時間  $\tau_N$  で規格化している。シアン線、黒線、マゼンタ線は、それぞれ、 $\tau_{ex}/\tau_N = 0.005, 0.01, 0.05$  として計算した結果である。

ループ押し出しによって、DNA はすでに押し出された領域(ループ部)とまだ押し出されていない領域(アーム部)に分かれる。アーム部の高さは、(2-1)で求めた末端間ベクトルの自乗平均と同じように時間発展するために、本研究で用いた単純化は凝集体表面の運動の本質を組み入れているものと考えられる(図6a)。ループ部の高さは時間にほぼ比例して増加する。ループ押し出しが終わると DNA の高さは平衡状態に徐々に緩和していく(図6b)。平均ロード時間を短くすると、平衡状態に戻る前に次のループ押し出し過程が始まるために、DNA が収縮する。コヒーシンの平均ロード時間を短くすると、DNA の発生する面内圧力が大きくなる(図6b)。その原因は、コヒーシンの平均ロード時間を短くすると、凝集体表面付近の DNA の濃度が高くなり、DNA セグメントの間の反発力が大きくなることによる原因となっている。

相分離ダイナミクスの理論によると、凝集体の構成要素は、圧力の高い凝集体から圧力の低い凝集体に輸送される。凝集体内の圧力は、表面張力に比例し、凝集体の半径に反比例する(Laplace の法則)。界面活性剤が凝集体界面に局在化していないときには表面張力は定数であるので、大きい凝集体はより大きく、小さい凝集体はより小さくなるように時間発展が起こる(Ostwald 成長)。ループ押し出しによって DNA が発生する面内圧力によって表面張力が減少するので、凝集体の圧力が小さくなり、凝集体の成長を促進する。コヒーシンがあるときにスーパーエンハンサの間の接触頻度が低くなることは、ループ押し出しによって凝集体が成長することが原因であると考えられる。ただし、この議論では、凝集体の成長過程を考えており、それぞれの凝集体の表面の DNA が異なるループ押し出し活性を持っているという状況を考えている。本研究の結果は、英国王立化学会が発行する Soft Matter に掲

載された (T. Yamamoto & H. Schiessel, Dilution of contact frequency between superenhancers by loop extrusion at interfaces, *Soft Matter*, **15**, 7635–7643, 2019)。

### 2-3.2 凝集体界面の RNA による制御

最近の実験によって、eRNA の生成は転写凝集体を安定化するが、mRNA の転写バーストは転写凝集体を不安定化することを示唆されている (Henninger et al., *Cell*, 2020)。論文にはシミュレーションの結果も報告されているが、不安定化させるはずの mRNA が界面ではなく凝集体内部にあると仮定している点と、mRNA は負の電荷をもっている点と仮定しているが、RNA に重合される前の NTP の電荷は無視されている点が不十分である。しかし、実験の方は、(DNA ではなく) mRNA が転写凝集体の構造に寄与すると示唆している点で重要である。ループ押し出しは mRNA の転写レートを大きくすることによって間接的に転写凝集体の構造に寄与している可能性がある。核小体は、顆粒部 (GC) の中で複数の繊維状中心部 (FC) と呼ばれるマイクロ相が分散した構造を形成している (図 8a)。リボソーム RNA (rRNA) は FC の表面で転写され、高密度繊維状部 (DFC) と呼ばれる層を形成する (図 8b)。rRNA を転写する RNA 合成酵素 I (pol I) を阻害すると、FC が融合する (nucleolar cap と呼ばれる)。Pol I によって転写される rRNA が FC の界面で界面活性剤のように働き、FC の融合を抑制していることが考えられる。この状況は、mRNA が転写凝集体を不安定化することと (表面にある RNA が凝集体の大きさを制御している点で) 類似しているため、転写ダイナミクスによる凝集体の大きさを制御する共通の機構があると考えられる。また、核ストレス体の内部にも (融合しない) 安定なマイクロ相が複数分散しているが、これらのマイクロ相も類似の機構で安定化している可能性もある。

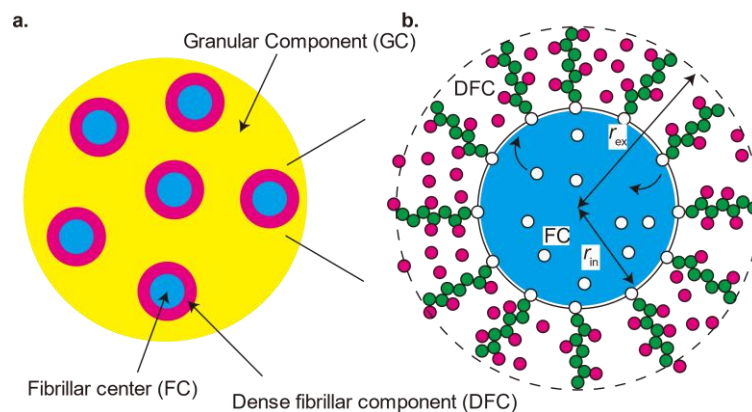


図8 核小体のモデル。核小体は、顆粒部 (GC、または、granular component) の中で複数の繊維状中心部 (FC、または、Fibrillar Center) と呼ばれるマイクロ相が分散した構造を形成している。FC と GC の間には、高密度繊維状部 (DFC、または、dense fibrillar component) の層がある。

本さきがけ研究では、核小体をモデルとして、転写による凝集体の大きさの制御の理論を構築した。DNA は FC の外部に局在化して、pol I は FC の内部に局在化していることから、



転写によって生成される nascent RNA は FC の表面に局在化している。FC の表面にある nascent RNA の表面密度は転写レートに比例し、nascent RNA の間の相互作用は、nascent RNA に結合する RNA 結合タンパク質(fibrillarin など)の結合度によって決まる。Nascent RNA の表面密度が十分大きい時には、転写レートを大きくするにつれて、nascent RNA の発生する面内圧力が大きくなる(図9)。2-3. 1の場合と同様に、mRNA によって発生する面内圧力は、凝集体成長の過渡状態(しかも、それぞれの凝集体での転写レートが異なる状況)では、nascent RNA は凝集体を大きくするように作用すると考えられる。しかし、定常状態の凝集体の半径は、転写レートを大きくするにつれて小さくなる(図10)。本研究で構築した理論は、山崎講師の行った実験で(少なくとも定性的には)検証されている。本研究結果をまとめた論文は、bioRxiv(プレプリントサーバ)で閲覧可能である(T. Yamamoto, T. Yamazaki, K. Ninomiya, and T. Hirose, bioRxiv, doi:10.1101/2021.09.09.459702)。

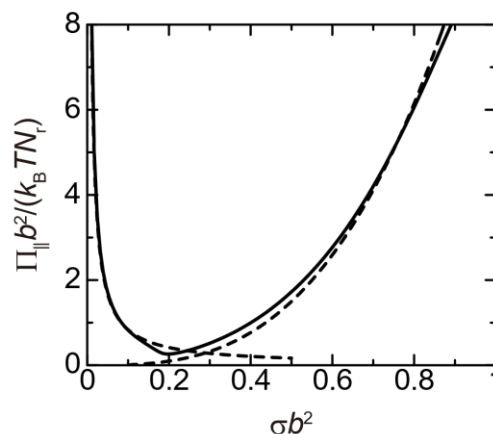


図9 凝集体表面の RNA が発生する面内圧力 $\Pi_{\parallel}$ を、RNA の表面密度 $\sigma$ の関数として表した。RNA の表面密度は転写レートに比例する量であり、凝集体表面の曲率は無視して計算を行った。破線は極限解を使った計算結果である。

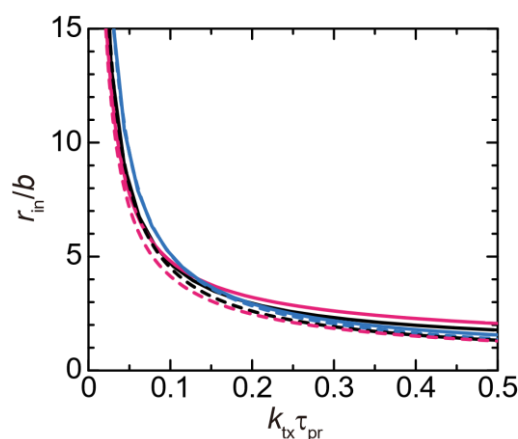


図10 凝集体半径  $r_{in}$  を転写レート  $k_{tx}$  とプロセシング時間  $\tau_{pr}$  の関数として示した。RNA 結合タンパク質(RBP)の RNA への結合エネルギーを  $-8.0k_B T$ 、RBP の間の相互作用パラメータを 4.5、RBP の化学ポテンシャルを  $-4.0k_B T$ 、凝集体の表面張力を  $k_B T/b^2$  として計算を行った。シアン線、黒線、マゼンタ線は、 $N_f = 1, 2, 3$  とした時の計算であり、破線は極限解を用いて得

た。

#### (2-4) 転写凝集体表面の DNA のループ押し出しによる転写制御機構

スーパーエンハンサの標的遺伝子は、転写凝集体近傍で観察されるが、転写凝集体と共局在している遺伝子は 20%程度である(Cho et al., Science, 2018)。転写装置(転写因子、pol II、メディエータなどの転写に必要な因子)は転写凝集体に局在化しているので、標的遺伝子が転写凝集体内の因子にアクセスする過程が転写ダイナミクスを制限していると考えられる。転写因子やメディエータはエンハンサに結合することから、エンハンサは転写凝集体に局在化していると考えられるが、一般的にクロマチンは転写凝集体から排除される傾向にある(Shin et al., Cell, 2018 & Hilbert et al., Nat. Comm., 2021)。(2-1)では、 $N+1$  個のビーズ( $N$  はセグメントの数)をバネ定数  $3k_B T/b^2$  のバネでつないだバネビーズモデルを用いた。直列した  $N$  本のバネ定数  $3k_B T/b^2$  のバネは、1 本の  $3k_B T/(Nb^2)$  のバネ定数のバネと等価である。高分子を 1 本のバネ定数  $3k_B T/(Nb^2)$  のバネで扱うモデルをダンベルモデルという。末端間ベクトルの自乗平均だけでなく、遺伝子の位置の分布を求めることができることが、ダンベルモデルを用いる利点である。本研究では、エンハンサとプロモータ間の DNA をダンベルモデルで表し、ループ押し出しを考慮に入れて DNA の運動を解析することによって、凝集体表面の DNA のループ押し出しによる転写制御機構の解析を行った。

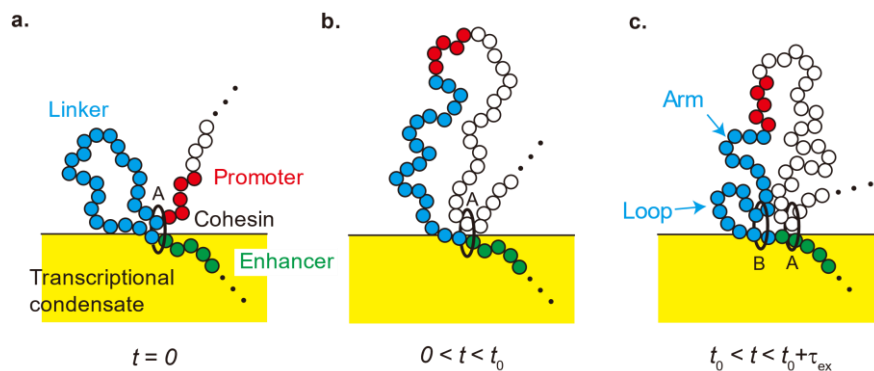


図11 凝集体表面の DNA のループ押し出しのモデル。

(2-1)の時と同様に、コヒーシンはエンハンサの部分から DNA にロードされると仮定する。その後、コヒーシンは DNA を押し出し、ループを形成する。プロモータがループ部に押し出される時間を  $t=0$  とする(図11a)。その後も、コヒーシンはループ押し出しをつづけるために、ループ自体は成長するが、エンハンサープロモータ間の DNA 領域は緩和する(この過程を緩和過程と呼ぶ、図11b 参照)。時間  $t=t_0$  に新しいコヒーシンがエンハンサからロードされ、ループ押し出しを開始する。この間に、エンハンサープロモータ間の DNA の一部がループ部に押し出されるので、プロモータが凝集体表面に引き込まれる(この過程をループ押し出し過程と呼ぶ、図11c 参照)。緩和過程では、エンハンサープロモータ間ベクトルの自乗平均が平衡状態の値に向かって緩和する(図12a)。一方、ループ押し出し過程では、ループ押し出しが始まってから( $t=t_0$ )ある程度時間がたってからプロモーターエンハンサ間の距離が縮み始める(図12b)。この結果は、(2-1)におけるビーズスプリングモデルを用いた解析

の結果と一致している。

スーパーエンハンサの標的遺伝子のプロモータの転写凝集体へのアクセス率 $\sigma$ の解析を行った(図13)。ループ押し出しが不活性な時には、エンハンサープロモータ間のセグメント数を大きくすると、アクセス率が低くなる。一方、ループ押し出しが活性な時には、(セグメント数が大きい領域では)セグメント数を大きくすると、アクセス率が高くなるという結果を得た。エンハンサープロモータ間の DNA 領域のセグメント数を大きくすると、この領域の緩和時間が長くなるため、プロモータが転写凝集体表面近傍に滞在する時間が長くなり、再び凝集体にアクセスする確率が高くなることがその原因であることが明らかになった。この研究結果をまとめた論文は、Oxford 大学出版が発行する Nucleic Acids Research に掲載された(代表的な論文 1)。

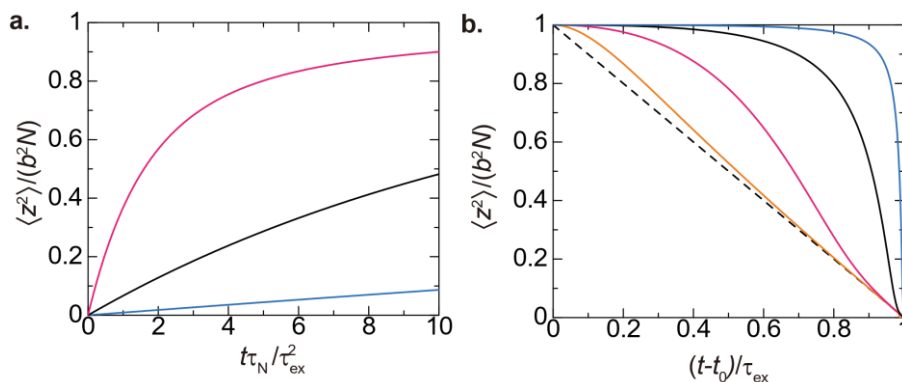


図12 緩和過程(図 11b)とループ押し出し過程(図 11c)におけるプロモーターエンハンサ間ベクトルの自乗平均 $\langle z^2 \rangle$ を時間の関数として表した。a では、 $\tau_{ex} / \tau_N = 0.1$ (シアン), 0.3(黒), 1.0(マゼンタ)として計算を行った。b では、 $\tau_{ex} / \tau_N = 0.01$ (シアン), 0.1(黒), 1.0(マゼンタ), 10.0(オレンジ)として計算を行った。ただし、 $\tau_{ex}$  はコヒーシスがプロモーターエンハンサ間の DNA 領域を押し出すのに必要な時間であり、 $t_N$  はこの DNA 領域の緩和時間である。

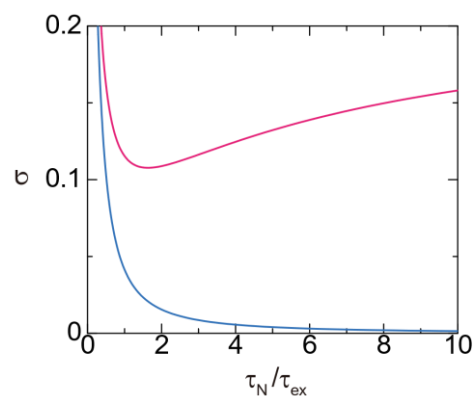


図13 遺伝子プロモータの転写凝集体へのアクセス率 $\sigma$ をエンハンサープロモータ間の DNA 領域のセグメント数の関数として表した。 $\tau_N$  はエンハンサープロモータ間 DNA 領域の緩和時間(セグメント数  $N$  の自乗に比例)あり、 $\tau_{ex}$  はコヒーシスがこの領域を押し出すのに必要な時間(セグメント数  $N$  に比例)である。シアン線がループ押し出しを止めた時の解析で、

マゼンタ線がループ押し出しがあるときの解析である。詳細は、代表的な論文 1 を参照。

### 3. 今後の展開

最近の人工細胞の研究では、自己複製に焦点を当てた基礎的な研究が多いが、多くの真核生物のように、環境に応じて遺伝子表現のパターンを変化する細胞を設計することが将来的に必要になると考えられる。環境に応じた遺伝子表現の活性－不活性の転移を長鎖 DNA の配列設計に組み込むためには、遺伝子制御の基本原則を理解する必要がある。本さがけ研究では、1. 真核生物の細胞が 10k-1Mbps の長さスケールでループを形成していることと、2. DNA ループ形成がスーパーエンハンサの標的遺伝子の活性に寄与していること、3. スーパーエンハンサが転写凝集体表面に局在化していることに注目して、DNA のループ形成がスーパーエンハンサの標的遺伝子の転写ダイナミクスに与える影響を理論的に明らかにした。本研究で明らかにした物理を確立するために、プロモーターエンハンサ間の DNA を長くすると、転写レベルが増加するという予言を実験的に検証する必要がある。

本研究は、コヒーシオンを壊すとスーパーエンハンサの標的遺伝子の転写量が減少するという Aiden グループの分化細胞の実験結果が動機となっている (Rao et al., Cell, 2017)。未分化細胞では、ポリコム抑制複合体 (PRC) が転写制御に重要な役割を果たす。PRC はプロモーターの CpG アイランドに結合するが、Hi-C 実験によって、PRC が局在化しているポリコム領域 (PAD) の間の相互作用頻度が高くなっていることが示されている (Rhodes et al., Cell, 2019)。PRC 間の多価相互作用によって polycomb body と呼ばれる凝集体を形成する。PAD 間相互作用は、polycomb body 形成に対応していると考えられる。1) コヒーシオンは PAD の間の相互作用を調整することによって、転写制御に寄与していること、2) 分化細胞と未分化細胞では、PAD 間相互作用とエンハンサ間相互作用の競合の仕方が違うことが最近の実験によって示されている (Rhodes et al., Cell, 2019)。PAD とエンハンサがどのように競合して遺伝子表現を制御するかということを実験的に示すことが次のステップとして重要であると考えている。

### 4. 自己評価

本さがけ研究によって、転写凝集体の形成とループ押し出しによる転写制御機構を理解するための基礎理論を構築するという当初目標を達成することができた。しかし、共同研究にて転写凝集体の理論を実験的に検証する目標は未達となった。その代わりに、パラスペックルや核小体などの類似の核内構造体の形成機構の理論の実験的検証は達成することができた。

スーパーエンハンサと転写凝集体による転写制御機構の理論構築は、世界的にもまだ取り組まれていない課題であり、世界にさがけて物理の問題として取り組み、成果を残せたことは非常に大きい。さがけ研究を推進する間に、核内構造体の形成にはアーキテクチャ RNA が必須であるということを実験的に示すことを廣瀬教授 (阪大)・山崎講師 (阪大) にご教授いただき、転写などの RNA ダイナミクスが核内構造体の形成に寄与することが新しい研究の糸口になることに気づくことができたのは、彼らとこの共同研究を可能にしてくれたさがけのおかげである。廣瀬教授と山崎講師の実験を基礎として、パラスペックルと核小体の形成機構の理論化に成功したこと、さらに、その理論を実験的に検証できたことは非常に大きい。さらに、スキルアップの観点からは、分子生物学の実

験研究者との融合研究を成功させたことは大きな前進である。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 7件

1. T. Yamamoto, T. Sakaue, and H. Schiessel, Slow chromatin dynamics enhances promoter accessibility to transcriptional condensates. *Nucleic Acids Research*. 2021, 49, 5017–5027.

スーパーエンハンサは、転写装置(転写因子、メディエータ、RNA 合成酵素 II など)が相分離によって形成する転写凝集体の表面に局在化している。本研究では、コヒーシによるループ押し出し過程を考慮に入れて、スーパーエンハンサの標的遺伝子のプロモータとエンハンサの間の DNA の運動の解析を行い、標的遺伝子の凝集体内の転写装置へのアクセス率を予言した。ループ押し出しが活性の時には、プロモーターエンハンサ間の DNA を長くすると、標的遺伝子の凝集体内の転写装置へのアクセス率が高くなることを理論的に明らかにした。

2. T. Yamazaki, T. Yamamoto, H. Yoshino, S. Souquere, S. Nakagawa, G. Pierron, and T. Hirose, Paraspeckles are constructed as block copolymer micelles. *EMBO J.*, 2021, 40, e107270

NEAT1\_2 は、パラスペックルを形成するのに必須なアーキテクチャ RNA である。パラスペックルは、NEAT1\_2 の両末端領域がシェル部に局在化しており、中央領域がコア部に局在化するコア-シェル構造を形成する。この構造は、ABC ブロック共重合体の形成する高分子ミセルと類似している。本研究では、転写による NEAT1\_2 の生成を考慮に入れて、ABC ブロック共重合体ミセルの理論を拡張し、パラスペックルのモデルを構築した。NEAT1\_2 の末端領域が長い時には、転写レートを大きくしても構造は変化しないが、末端領域が短い時には、転写領域を大きくすると、シェル部に末端領域が減少し、コア部に局在化することを理論的に予言した。この予言は、CRISPR/Cas9 によって末端領域を短くし、NEAT1\_2 の転写量を増加する実験によって検証され、パラスペックルはブロック共重合体ミセルと類似した機構で形成していることが明らかになった。

3. T. Yamamoto, T. Yamazaki, and T. Hirose, Phase separation driven by production of architectural RNA transcripts, *Soft Matter*, 16, 4692–4698 (2020).

転写凝集体などの核内構造体は、アーキテクチャ RNA と呼ばれる構造形成に必須な RNA と RNA 結合タンパク質の複合体によって形成される。本研究では、RNA 結合タンパク質の RNA への結合過程、転写による RNA の生成、酵素による RNA の分解を考慮に入れて高分子溶液の相分離を予言する Flory-Huggins の理論を拡張し、核内構造体形成の基礎理論を構築した。その結果、相分離の不安定性により、転写サイトからのある距離で RNA の体積分率がジャンプすることが分かった。局所平衡条件より、ジャンプする前と後の値は、(同じ温度で)平衡状態で相分離が起こった時の二つの共存相の RNA 体積分離と一致することを明らかにした。



(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. プレスリリース「物理であばいた細胞内の秘密 RNA による核内構造体形成の新たなしくみを発見—細胞内の相分離、ミセル化が鍵？」 2021年4月23日  
<https://www.sci.osaka-u.ac.jp/ja/topics/9234/>
2. Tetsuya Yamamoto, Tomohiro Yamazaki, and Tetsuro Hirose, Phase separation driven by the production dynamics of architectural RNA transcripts, 第43回日本分子生物学会, 2020年12月2日-4日, オンライン, 2P-0065.
3. Tetsuya Yamamoto and Helmut Schiessel, Loop extrusion of chromatin at surfaces modulates the growth dynamics of transcriptional condensates. 第58回日本生物物理学会年会, 2020年9月16日-18日, オンライン, 20182F.
4. Tetsuya Yamamoto, Transcription dynamics of DNA at interfaces. 第57回日本生物物理学会年会, 2019年9月24日, 宮崎, 1SEA-7(招待講演).