

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヒト生細胞内における核内ボディ複合体形成のダイナミクス
Title(English)	
著者(和文)	今田貴士
Author(English)	Takashi Imada
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11895号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木村 宏,岩崎 博史,田口 英樹,藤田 尚信,中戸川 仁
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11895号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

ヒト生細胞内における 核内ボディ複合体形成のダイナミクス

2021 年 3 月

東京工業大学 生命理工学院 生命理工学コース

木村研究室

博士後期課程三年

今田貴士

審査教員

木村宏 教授（主査）

田口英樹 教授（副査）

岩崎博史 教授

中戸川仁 准教授

藤田尚信 准教授

2021 年 3 月 1 日（月）提出

目次

論文概要	3
要旨集要旨	4-5
英文要旨 (ABSTRACT)	6
第一章 研究背景と研究目的	7-14
第二章 実験方法と試薬調製	15-42
使用した試薬や器具	
試薬調製	
実験方法	
第三章 PC と CB と HLB の相互作用	43-68
実験 1 PC の生細胞観察	
実験 2 PC と CB または HLB の生細胞観察	
実験 3 PC と CB と HLB の生細胞観察	
実験 4 免疫染色による PC と CB と HLB の相互作用(共焦点と超解像顕微鏡)	
実験 5 CB と HLB が PC の Ser5 リン酸化に与える影響	
実験 6 蛍光タグの融合方向が NB 同士の相互作用に与える影響	
小括	
第四章 PC と CB と HLB の相互依存性と物性	69-82
実験 7 CB の破壊が PC と HLB に与える影響	
実験 8 コイリンの過剰発現が CB と PC、HLB に与える影響	
実験 9 Pol II の分解が CB と HLB に与える影響	
実験 10 PC と CB と HLB の物性	
小括	
第五章 CB の機能	83-88
実験 11 CB の破壊が遺伝子発現に与える影響	
実験 12 核小体局在コイリン変異体が PC に与える影響	
第六章 考察	89-93
引用文献	94-107
付録	108
eAPRIN 修了番号	
博士課程における研究発表	
謝辞	109

論文概要

細胞核には、液-液相分離により、特定のタンパク質やRNAを含む核内ボディと呼ばれる液滴が多数存在するが、それらの形成機構や液滴間の相互作用についてはよくわかっていない。本研究は、RNAポリメラーゼIIが濃縮する液滴（PC）、snRNA遺伝子近傍に存在するカハールボディ（CB）、ヒストン遺伝子発現制御に関与するヒストンローカスボディ（HLB）の三者の形成機構と関係性を明らかにすることを目的として行った。ヒト培養細胞を用いた生細胞観察により、S期初期にPCはCBとHLBの近傍に出現することを明らかにした。CBの破壊は、核内ボディ同士の相互作用に影響したが、PCのリン酸化状態などには影響しなかった。また、PC-HLB複合体とCBの相互作用によりPC-CB-HLB三者複合体の形成が高頻度でみられた。これらの結果から、PCがCBやHLBと協働して、snRNA遺伝子やヒストン遺伝子の転写に機能していると考えられた。

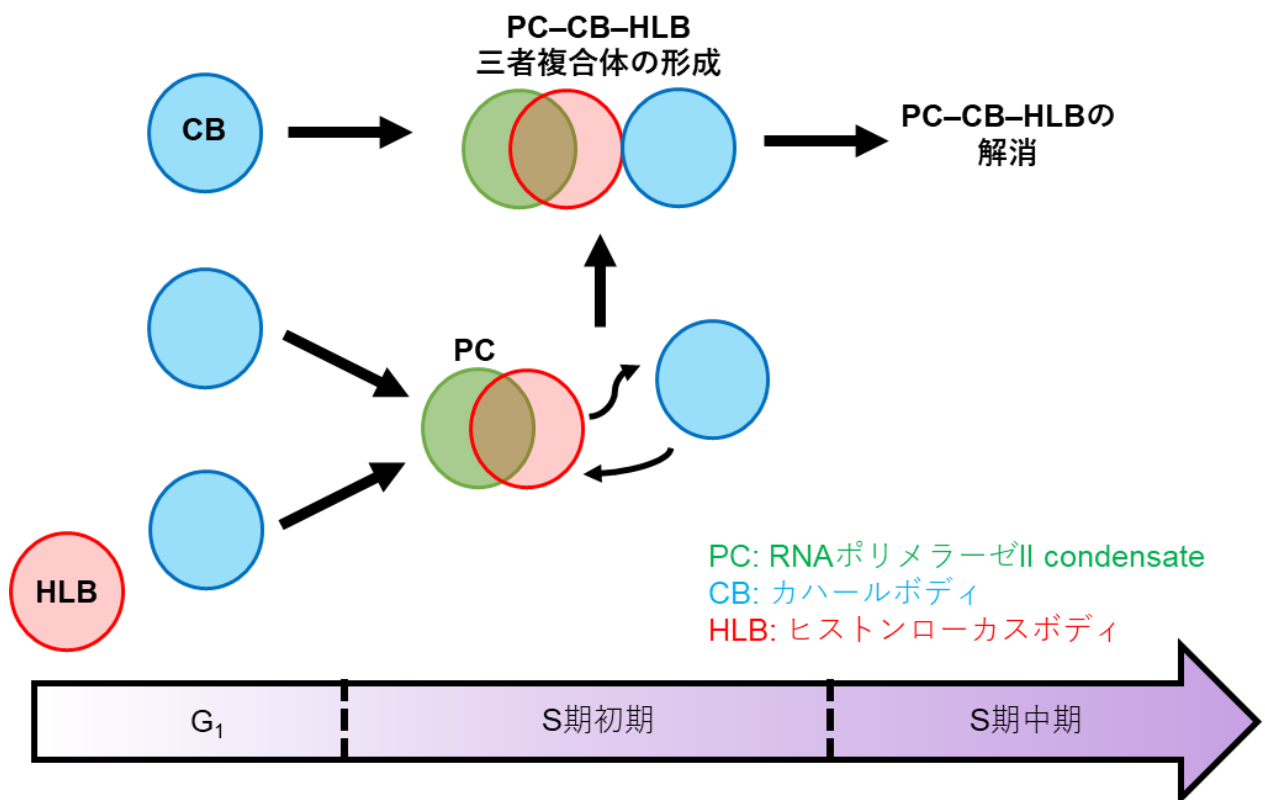


図1 本研究結果の概要図

PCはS期初期にCBとHLBの近くに形成される。また、PC、CB、HLBは三者複合体（PC-CB-HLB）を形成し、この複合体はS期中期には解消する。

要旨集要旨

ヒト細胞の核内では、液-液相分離と呼ばれる物理現象により、タンパク質や核酸が「核内ボディ」と呼ばれる液滴を多数形成する。核内ボディは、酵素反応などの生物学的反応が、いつ（細胞周期）・どこで（場所）・どの程度（反応速度・量）生じるのかを制御すると考えられている。RNA ポリメラーゼ II (Pol II) は転写を行うタンパク質複合体であり、12 種類のサブユニットタンパク質から構成される。Pol II の最大サブユニットである RPB1 の C 末端ドメイン (C-terminal domain、以下 CTD) は 7 個のアミノ酸 (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) の繰り返しであり、ヒトでは 52 回連続した配列により構成される。CTD の Ser 残基 (Ser2, Ser5, Ser7) のリン酸化は Pol II の転写進行や Pol II の液滴形成 (Pol II condensate、以下 PC) を制御する。PC は、別の核内ボディであるカハールボディ (以下 CB) やヒストンローカスボディ (以下 HLB) と共局在することが報告されている。CB や HLB は、snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の転写調節に関与しており、これらの遺伝子近傍に観察される。CB の破壊は、ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写量の低下を引き起こす。HLB はヒストン遺伝子の転写に必須であり、HLB を破壊した細胞は G₁/S 期で細胞周期が停止し、細胞死が引き起こされる。これまでに核内ボディそのものの性質や機能に関しては研究が行われてきたが、核内ボディの形成機構や核内ボディ間の相互作用については不明点が多い。そこで本研究は、3 つの核内ボディ (PC、CB、HLB) の形成機構と関係性の解明を目的として行った。

本研究では、PC を生細胞で観察するために、ヒト大腸がん細胞である HCT116 細胞で、EGFP を RPB1 遺伝子上流にノックインした細胞 (以下 KI 細胞) を用いた。免疫染色により、PC は Ser5 と Ser7 がリン酸化された CTD を有する Pol II を含むことが分かった。これらのリン酸化状態の Pol II は、ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子を転写することが報告されており、PC がこれらの遺伝子の転写に関与している可能性が示唆された。次に、mCherry を融合させた PCNA タンパク質を発現させた KI 細胞を用いて PC の形成時期を調べたところ、S 期初期に PC の数が増加することが分かった。また、SNAP タグ融合コイリン (CB のマーカータンパク質) や Halo タグ融合 NPAT (HLB のマーカータンパク質) を発現させた細胞の観察により、S 期初期に形成された PC-CB 複合体や PC-HLB 複合体が S 期中期終了までに解消することも分かった。ヒストン遺伝子は S 期に転写が活性化することを踏まえると、この観察結果は、PC-HLB 複合体がヒストン遺伝子の転写に関与している可能性を示唆した。さらに、PC が CB や HLB と同時に相互作用し、PC-CB-HLB 三者複合体を形成するかどうかを生細胞観察により調べた結果、PC-CB-HLB の形成が確認された。PC-CB-HLB が形成される頻度は、CB 付近に PC-HLB が出現する場合 (53%) と、CB と PC-HLB が近接する場合 (32%) が高く、残り (15%) は

CB-HLB 複合体の近傍に PC が形成される場合であった。

異なる核内ボディ間の相互依存性を調べるために、遺伝子破壊系とタンパク質分解系を用いて解析した。まず、コイリン遺伝子を破壊したノックアウト細胞（以下 K0 細胞）を作製し、CB の破壊が PC や HLB に与える影響を調べた。CB の破壊は、PC の数やリン酸化状態、出現タイミングには影響しなかったが、核内ボディ同士の相互作用に影響した。コイリン K0 細胞では、KI 細胞に比べて PC と HLB の共局在割合が上昇し、PC と SMN が濃縮する液滴の相互作用の割合は低下した。SMN はスプライシングを行う snRNP の合成に関与し、CB 中にも濃縮されるタンパク質である。次に、Pol II の分解を誘導するトリプトリドを細胞に添加して Pol II と PC の分解を誘導し、CB や HLB に与える影響を調べた。その結果、PC を除去しても、CB や HLB の数および相互作用に影響しないことが分かった。

最後に、PC、CB、HLB の物性を調べた。核内ボディは液体のような性質から固体のような性質まで、幅広い物理的性質を示すことが知られている。1, 6-ヘキサンジオールを用いて物性を調べたところ、PC が液体に近い物性である一方で、CB や HLB は固体に近い物性であることが分かった。

本研究の研究結果とこれまでの報告を総合すると、PC が CB や HLB と協働して、snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の S 期特異的な転写活性化に機能している可能性が示された。比較的安定な CB や HLB の近傍に、よりダイナミックな PC が形成されと考えられる。本研究では、実際にヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写が起きているかどうかは調べていない。よって、dCas13 や MS2 システムを活用し、ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の新生鎖 RNA を可視化し、PC が CB や HLB と相互作用することで転写が活性化されているかどうかを調べるのが、今後の課題である。

ABSTRACT

Eukaryotic nuclei are highly organized structures consisting of chromatin, nuclear lamina, nucleoli, and nuclear bodies (NBs) which have been shown as phase-separated liquid droplets containing specific proteins and RNAs. RNA Polymerase II (Pol II), the main player of transcription, forms phase separated condensates, or NBs (which I hereafter refer to “Pol II condensates”, or “PCs”). Cajal bodies (CBs) and histone locus bodies (HLBs) are also NBs regulating transcription of histone genes and/or small nuclear RNA (snRNA) genes. Although the liquid droplet nature of NBs has been studied, how different NBs associate with each other in living cells remains largely unknown. I aimed to figure out how the three NBs (PCs, CBs, and HLBs) formed and interacted with each other in living human cells.

Using live cell imaging, I found that PCs nucleated near both CBs and HLBs at the entry of S phase in HCT116 cells. In addition, I observed that PC–CB complexes and PC–HLB complexes dissolved by the end of middle S phase. PCs contained Pol II with Ser5 and Ser7 phosphorylated C-terminal domain. These Pol II phosphorylation forms are known to transcribe histone genes and/or snRNA genes. Coilin-knockout increased the co-localization rate between PCs and HLBs, but did not affect PCs in terms of the number per nucleus, nucleation timing, and the phosphorylation status of Pol II. I found that PCs associated with CBs and HLBs to form three heterotopic NB complexes, PC–CB–HLB complexes. PC–CB–HLB complexes frequently assembled via PC-HLB nucleation near a CB. I finally compared physical properties of the three NBs using 1,6-hexanediol, revealing that PCs were solid-like NBs compared to CBs and HLBs.

This study suggests that PCs played a key role in transcription of histone genes and snRNA genes in coordinate with CBs and HLBs.

第一章 研究背景と研究目的

研究背景

液-液相分離と核内ボディ

液相中で、その液相の溶媒とは異なる分子が自発的に集合し、膜のない液滴を形成する現象は、液-液相分離と呼ばれている[Uversky, 2017; Alberti, 2017; Perry, 2019]。ヒト細胞核内では、タンパク質や RNA が液-液相分離によって核内ボディ (Nuclear body、以下 NB) と呼ばれる液滴を形成する[Morimoto and Boerkoel, 2013; Sleeman and Trinkle-Mulcahy, 2014; Staněk and Fox, 2017; Ning et al, 2020]。主な NB の例としては、RNA Polymerase II condensate (以下 PC)、カハールボディ (Cajal body、以下 CB)、ヒストンローカスボディ (histone locus body、以下 HLB)、クラストソーム、Cleavage body、核スペckル、核内ストレス顆粒、OPT ドメイン、パラスペckル、Perinuclear compartment、PML ボディ、ポリコームボディなど挙げられる[Spector, 2006]。本研究の研究対象は PC、CB、HLB の 3 つであるため、これら 3 つの NB についてのみ記述する。なお、Nuclear body と似た言葉で、Cellular body と Cytoplasmic body があるが、Cytoplasmic body は細胞質に形成する非膜性の液滴構造を指し、Cellular body は Nuclear body と Cytoplasmic body の両方を意味する単語である。また、NB は年々研究が進み、既存の NB の新しい機能や新しい NB が報告されている。例えば、NB に関するデータベースが公開された (<http://lps.biocuckoo.cn/>) [Ning et al, 2020]。

RNA ポリメラーゼ II

RNA ポリメラーゼ II の構造と機能、リン酸化修飾

RNA ポリメラーゼ II (以下 Pol II) は、転写を行うタンパク質複合体であり、12 個のサブユニットから構成される[Osman and Cramer, 2020; Schier and Taatjes, 2020]。最大のサイズを示す RPB1 サブユニット (217 kDa) は、C 末端に非構造領域である C 末端ドメイン (C-terminal domain、以下 CTD) を有する。CTD の一次配列は Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser の 7 アミノ酸残基からなるリピート配列が 52 回繰り返した配列であり、Tyr1、Ser2、Thr4、Ser5、Ser7 はリン酸化修飾を受ける[Zaborowska et al, 2016; Harlen and Churchman, 2017; Yurko and Manley, 2018; Chen et al, 2018]。酵母とヒト培養細胞を用いた質量分析により、CTD の 1 リピート当たりのリン酸化部位は 1 残基の場合が多く、CTD 全体ではほとんどリン酸化されていない (酵母では CTD 全体でリン酸化されうる部位は 125 残基あるが、リン酸化されているのは 10 残基、ヒト培養細胞では 260 残基あるが、リン酸化されているのは 20 残基) ことが報告されている[Schüller et al, 2016; Suh et al, 2016; Corden, 2016]。

タンパク質をコードする遺伝子の転写では、特に Ser2 と Ser5 のリン酸化 (以下、S2P、S5P と表記) が転写進行を制御している。転写開始時点では Ser5 がリン酸化されており、転

写が進むにつれて、Ser5 のリン酸化レベルは減少し、一方で、Ser2 のリン酸化レベルは上昇する[Harlen and Churchman, 2017; Hsin and Manley, 2012]。だが、例外も報告されており、例えばヒストン遺伝子の場合、転写進行時の Pol II CTD は Ser5 がリン酸化されており[Medlin et al, 2005]、低分子 RNA (small RNA、以下 snRNA) 遺伝子の場合、転写進行時の Pol II CTD は Ser5 と Ser7 がリン酸化されている[Egloff et al, 2007; Egloff et al, 2012]。

Pol II の液-液相分離と転写ファクトリー

Pol II は RPB1 の CTD を介した液-液相分離により液滴を形成する[Boehning et al, 2018; Lu et al, 2018]。Boehning らは精製 RPB1 を用いて、非リン酸化状態の CTD が液滴を形成し、その液滴には精製した Pol II が局在することを示した[Boehning et al, 2018]。さらに、Ser5 のリン酸化酵素である CDK7 と ATP の添加により、RPB1 の液滴は解消することも示した。Lu らは Ser2 のリン酸化酵素である P-TEFb 複合体の構成要素の 1 つである cyclin T1 を精製し、cyclin T1 が液-液相分離により液滴を形成することを示した[Lu et al, 2018]。さらに、cyclin T1 の液滴は、液滴を形成していない RPB1 を取り込み、RPB1 の液滴形成を促進することと、この RPB1 の液滴形成は CDK7 による CTD のリン酸化で促進されることを示した。Boehning と Lu の実験結果は、CDK7 による CTD のリン酸化 (S5P レベルの増加) が液滴形成を促進するか、阻害するかで反対の結果である。このような反対の結果が得られた原因の可能性として、使用しているバッファの違いや CDK7 と ATP の使用量の違いなどが挙げられる。S5P レベルが異なる CTD では、異なる液-液相分離を示す可能性がある。また、非リン酸化状態の CTD を含む PC はメディエーター (Mediator) などの転写因子と一緒に液滴を形成する一方で、S2P や S5P を有する CTD を含む PC はスプライシング因子と一緒に液滴を形成する[Guo et al, 2019]。Guo らの結果は、Pol II の液滴は、そのリン酸化状態によって機能が変化することを示している。

Pol II の液-液相分離の議論の中でよく取り上げられるのが、「転写ファクトリー (transcription factory) 仮説」である[Buckley and Lis, 2014]。転写ファクトリー仮説は、Pol II が遺伝子上に移動して転写を行うのではなく、Pol II が一か所に集まり、その場所に遺伝子が集まることで転写が始まるという仮説である。この仮説は、1993 年にオックスフォード大学の Peter R. Cook らによって、共焦点顕微鏡を用いた BrUTP 染色の画像に基づいて提唱された[Jackson et al, 1993]。転写ファクトリーの大きさは、光学限界以下の大きさ (約 100 nm) であり、転写ファクトリー 1 個に含まれる Pol II の数は 8 分子だと考えられている[Iborra et al, 1996; Hieda et al, 2005; Cisse et al, 2013]。一方で、本研究で注目している PC は、共焦点顕微鏡で観察できる大きさで、その大きさは直径~700 nm である。従って、本研究で注目している PC は、その大きさの観点から、転写ファクトリーでない。

Pol II によるヒストン遺伝子と snRNA 遺伝子の転写

ヒストン遺伝子には様々なバリエーションがあるが、一般的には 4 つのコアヒストン (H2A、H2B、H3、H4) と 1 つのリンカーヒストン (H1) が古典的なヒストン (canonical histone) として知られている。古典的ヒストン遺伝子は Pol II によって転写され、その転写は S 期特異的に起こる[Osley, 1991; Heintz, 1991; Marzluff et al, 2008; Günesdogan, 2014]。ヒストンタンパク質の大量合成は、DNA 複製におけるヌクレオソーム形成に必須であり[Marzluff et al, 2008]、ショウジョウバエ S2 細胞を用いた実験では、ヒストン H1 遺伝子の転写は S 期全体にわたって起きている一方で、コアヒストンの転写は S 期初期特異的であることが示された[Guglielmi et al, 2013]。ヒストン mRNA は、mRNA の中で唯一ポリアダニレーションが起きない mRNA で、その翻訳には 3'末端が FLASH (FLICE-associated huge protein)、Lsm11 (U7 snRNA-associated Sm-like protein LSm11、U7 snRNP の構成タンパク質の 1 つ)、SLBP (Stem-Loop Binding Protein) などで構成される HCC (histone cleavage complex) によって切断されることが必要である[Marzluff and Koreski, 2017]。

snRNA には様々な種類があり、snRNA 遺伝子は Pol II または Pol III によって転写される。snRNA 遺伝子の内、U1、U2、U4、U4atac、U5、U7、U11、U12 は Pol II によって転写され、U6 と U6atac は Pol III によって転写される[Guirio and Murphy, 2017]。snRNA の転写は G₁ 期に始まり、S 期にさらに促進される[Faresse et al, 2012]。また、snRNA は、ヒストン mRNA と同様にポリアダニル化されず、snRNA のポリアダニル化は snRNA の分解を誘導する[Egloff et al, 2008; Schmid and Jensen, 2014; Guirio and Murphy, 2017; Kargapolova et al, 2017]。

Pol II と CTD の重要性と生物学的意義

Pol II は転写を行う主体となるタンパク質複合体であり、生命にとって重要かつ必須の分子であるが、CTD の重要性については不明点も多い。CTD は様々な転写因子修飾酵素 (リン酸化酵素、脱リン酸化酵素など) が結合し、集積する「足場」としての役割があると考えられてきた[Harlen and Churchman, 2017]。では、足場を小さくする、つまり、CTD の長さを削っていくと、細胞にどのように影響するのだろうか？CTD の長さを人工的に削ると、細胞の増殖速度が低下し、最終的には細胞死が誘導される[Corden, 2013]。例えば出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*、ヘプタリピートの数は 27 個) では、CTD 中のヘプタリピートの数を 9 以下にすると、培養温度の上昇や低下に対する感受性増加と増殖速度の低下、細胞死が生じる。一方で、ヘプタリピートの数が 11 個あれば、野生型と同様に増殖する[Nonet et al, 1987; Allison et al, 1988; West and Corden, 1995]。分裂酵母では (*Schizosaccharomyces pombe*、ヘプタリピートの数は 29 個)、16 個のヘプタリピートが正常な増殖に十分であり、8 個まで削ると細胞死が生じる[Schneider et al, 2010]。マウス培養細胞 (ヘプタリピートの数は 52 個)

では、CTD のヘプタリピートを 25 個以下にした場合、細胞死が誘導され[Bartolomei et al, 1998]、マウス個体では、非コンセンサス配列を有する 13 リピートを削った場合、発生に異常が出る[Litingtung et al, 1999]。ヒト培養細胞（ヘプタリピートの数は 52 個）では、28 個以下にした場合、細胞死が誘導される[Meininghaus et al, 2000]。

また、CTD の長さや液-液相分離の起きやすさは相関している[Boehning et al, 2018; Cho et al, 2018]。例えばハエの系では、CTD の長さを長くすると Pol II が凝集し、胎生致死が誘導される[Lu et al, 2019]。これらの結果から、CTD は転写に関する様々なタンパク質が集積する足場であり、転写進行やスプライシングを制御するとともに、液-液相分離による液滴形成も制御しており、生物学的重要性は高いと考えられている。

カハールボディ(Cajal body)

CB の機能

CB は、1903 年にスペインの神経科学者 Santiago Ramon y Cajal が発見した核内構造体であり、当時は核小体の近くに位置する構造体として報告された[Ramon y Cajal, Santiago, 1903]。CB の機能や意義に関しては不明点も多いが、現在までに以下のような機能が分かっている。

- 1) 3 次元ゲノム構造の形成（ゲノムオーガナイゼーション）を介した snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の転写制御[Wang et al, 2016; Sayer et al, 2016; Sayer et al, 2017]
- 2) snRNA の 2'-O-メチル化やシュードウリジン化[Darzacq et al, 2002; Carmo-Fonseca, 2002; Kiss et al, 2002; Meier, 2017]
- 3) スプライシング複合体（small nuclear ribonucleoprotein、以下 snRNP）の形成[Staněk and Neugebauer, 2004; Staněk and Neugebauer, 2006; Staněk, 2016]
- 4) テロメラーゼの生合成[Venteicher et al, 2009; Venteicher and Artandi, 2009; Chen et al, 2015; Vogan et al, 2016; Bizarro et al, 2019; Bergstrand, 2020; Chartrand and Sfeir, 2020; Qin and Autexier, 2020]
- 5) DNA 損傷修復[Dellaire and Bazett-Jones, 2007; Henriksson and Farnebo, 2015; Coucoravas, 2016; Bergstrand, 2019; Bergstrand, 2020]

上記のように、CB は様々な生物学的機能に関連しており、少なくとも 40 種類以上のタンパク質（例えば、マーカータンパク質であるコイリン、snRNP の合成に関与する SMN、テロメア合成に関与する TCAB1 など）や 20 種類上の RNA（例えば、snRNA、small nucleolar RNA; snoRNA、small Cajal body specific RNA; scaRNA、telomerase RNA）を含んでいる[Machyna et al, 2013]。古典的には CB は snRNP 合成の「場」であると考えられてきたが、最近ではゲノムオーガナイゼーションを介した CB による転写制御も注目されている[Wang et al, 2016; Sayer et al, 2016; Sayer et al, 2017]。

CB は他の NB と相互作用することが知られており、特に核小体と隣接することが昔から知られているため、CB と核小体の機能的な関係性について研究されてきた[Trinkle-Mulcahy and Sleeman, 2016]。CB と核小体の機能的な関連については、コイリンがリボソーム RNA (rRNA) と結合すること[Broome and Hebert, 2013]、コイリンは RNase 活性を有し、rRNA を分解しうること[Broome and Hebert, 2012]、RNA ポリメラーゼ I の転写制御を抑制すること[Gilder et al, 2011]が報告されている。特定のコイリン変異体 (S489D) は核小体に集積し[Carrero et al, 2011]、コイリン (S489D) 変異体は RNase 活性が低下することも知られている[Broome et al, 2013]。これらの結果から、コイリンは rRNA の転写や転写後修飾に関与していると考えられている。核小体に加えて、CB は、PC や HLB、PML ボディとの相互作用も報告されているが、CB とこれらの NB の相互作用の生物学的意義や分子メカニズムに関しては、不明点が多い[Grande et al, 1996; Sun et al, 2005; Liu et al, 2006; Xin and Pombo, 2006]。

CB と転写

CB の転写への関与は、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた実験から、Joseph G. Gall (1928-, Carnegie Institution, Yale University) によって 1990 年代に後半に提唱された。アフリカツメガエルの卵母細胞は、直径が最大で 400 μm と比較的大きな細胞で、哺乳類細胞ではその小ささがゆえに観察が難しい核内構造体の観察が容易であるという利点がある。Gall らは、Pol I、Pol II、Pol III 全てのサブユニットタンパク質の存在が CB 中に観察されたことから、CB が RNA Polymerase の組み立ての場であると提案した[Gall et al, 1990]。

Xin らは、CB 中に含まれる Pol II に注目し、免疫染色と電子顕微鏡による観察を行った[Xin and Pombo, 2006]。その結果、CB 中には非リン酸化 CTD と S5P CTD の 2 種類の Pol II が含まれており、S2P CTD の Pol II は含まれていないことを示した。さらに、BrUTP を用いて、CB 中では転写が起きていないことを報告した。また、CB は snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子などの特定の遺伝子座の近くに存在する傾向にあることが、Immuno-DNA FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) と Immuno-RNA FISH を用いて報告されており、CB はこれらの遺伝子の転写制御に関与していると考えられてきた[Smith et al, 1995; Frey and Matera, 1995; Gao et al, 1997; Jacobs et al, 1999; James Faresse et al, 2012; Shopland et al, 2001; Nizami et al, 2010; Salzler et al, 2013]。さらに最近になって、CB がヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写を制御するメカニズムとして、ゲノムオーガナイゼーションが提案された[Wang et al, 2016]。

CB の重要性と生物学的意義

CB の重要性は個体と培養細胞の両方において報告されている。マウスでは、CB のマー

カータンパク質であるコイリンをノックアウトすると生殖能力が低下し、準胎生致死が起こる[Walker et al, 2009]。ゼブラフィッシュでは、コイリンのノックダウンは snRNP の合成量低下による胎生致死を引き起こす[Strzelecka et al, 2010]。これらのことから、CB は特に発生や生殖において重要な役割を担っていると推測されている。

ヒト培養細胞では、増殖速度の速いがん細胞や、転写が活発に行われている神経細胞や胚で CB は観察されるが、終末分化細胞では観察されないため、CB は特定のストレスや周辺環境に関連していると考えられている[Sawyer et al, 2016]。コイリン遺伝子をノックアウトしたヒト培養細胞では増殖速度の低下とスプライシングの正確性が低下することが報告されており、培養細胞レベルでは、CB は増殖速度に影響すると考えられている[Lemm et al, 2006; Whittom et al, 2008; Wang et al, 2016]。理論的にも、CB がタンパク質や RNA を一か所を集めることで、snRNP 合成速度が増加することが示されている[Klingauf et al, 2006]。

ヒストンローカスボディ(Histone locus body)

HLB の機能と生物学的意義

HLB は、ヒストン遺伝子の転写開始とヒストン mRNA の転写後修飾に関与する NB で、ヒト、マウス、ショウジョウバエで存在する[Ma et al, 2000; Zhao et al, 2000; Barcaroli et al, 2006; Liu et al, 2006; Yang et al, 2009; Cola et al, 2011]。HLB は CB の近傍に観察されるが[Liu et al, 2006; Bongiorno-Borbone, 2008; Sawyer et al, 2016]、細胞周期や細胞の種類に応じて完全に共局在する場合もある[Bongiorno-Borbone, 2008]。HLB のマーカートンパク質には、NPAT (Nuclear protein of the ataxia telangiectasia mutated locus)、FLASH、Lsm11 の 3 種類がある。本研究に最も関係があるのは NPAT であるため、NPAT についてのみ記述する。NPAT は 1996 年に初めて報告されたタンパク質であり[Imai et al, 1996]、NPAT の発現量は G₁ 期から S 期にかけてピークに達する[Zhao et al, 2000]。また、NPAT の過剰発現は S 期への進入を促進する[Zhao et al, 1998]。マウスにおいて、NPAT 遺伝子座への配列挿入による NPAT 遺伝子の破壊は、8 細胞期での胎生致死を起こし[Di Fruscio et al, 1997]、ヒト培養細胞の NPAT のノックダウンは細胞死を引き起こす[Ye et al, 2003]。NPAT は Cyclin E/CDK2 によってリン酸化されるが、NPAT の Cyclin E/CDK2 リン酸化部位 (S775、S779、S1100、T1270、T1350) をアラニンに置換した変異体は、HEK293T 細胞において、トランスジェニック H2B プロモーターからのルシフェラーゼの発現量を低下させる[Ma et al, 2000]。これらの実験結果から、NPAT が濃縮する HLB はヒストン遺伝子の転写調節を担っており、生命に必須の NB であると考えられている。

研究目的

これまでに、NB そのものの機能や性質については研究が行われてきたが、NB の形成機構や、NB 同士の相互作用については、未知の部分が多い。そこで本研究では、転写という生物学的機能に関与しているという点で共通点がある PC、CB、HLB の 3 つの NB が、1) 三者複合体（PC-CB-HLB）を形成するのか、2) PC-CB-HLB が形成されるとしたら、どのような順序で形成されるのか、の 2 点の解明を目的として、研究を行った（表 1 と図 2）。なお、PC と CB、PC と HLB、CB と HLB 同士が、核内で相互作用することは免疫染色を用いて既に報告されている[Lamond and Carmo-Fonseca, 1993; Schul et al, 1998; Xie and Pombo, 2006; Alm-Kristiansen et al, 2008; Nizami et al, 2010; Guglielmi et al, 2013]。しかし、PC、CB、HLB の三者が同時に相互作用するかどうかは、報告されていなかった。

名前	マーカー	機能	局在
RNA ポリメラーゼII condensate (PC)	Rpb1	転写	未報告
カハールボディ (CB)	コイリン	転写制御 (ヒストン, sn/snoRNA)	ヒストン遺伝子座 sn/snoRNA遺伝子座
ヒストンローカスボディ (HLB)	NPAT	転写制御 (ヒストン)	ヒストン遺伝子座

表 1 PC、CB、HLB の概要

PC、CB、HLB は転写という生物学的機能に関して共通している。

核内ボディそのものの機能や性質については研究されてきたが、核内ボディ同士の相互作用に関しては未知の部分が多い。



1. PCはCBやHLBと重なることが報告されているが、PC-CB-HLBの三者複合体は形成されるのか？
2. 三者複合体はどのように形成されるのか？



PCがCBやHLBと協働して、ヒストン遺伝子やsnRNA遺伝子の転写を制御しているメカニズムの解明が期待される。

図 2 本研究の目的

PC、CB、HLB の相互作用の生物学的意義を解明するために、生細胞内でのこれら 3 つの NB の空間的・時間的な相互作用パターンの解析を本研究の目的とした。

第二章 実験方法と試薬調製

試薬

アガロース（核酸用、02468-66、ナカライテスク）
アンピシリン（02739-32、ナカライテスク）
イソプロパノール（29113-95、ナカライテスク）
エタノール（14713-53、ナカライテスク）
カナマイシン（119-00703、富士フイルム和光純薬）
クリスタルバイオレット粉末（031-04852、富士フイルム和光純薬工業）
クロロホルム（08402-55、ナカライテスク）
グリシン（077-00735、富士フイルム和光純薬）
ジチオスレイトール（049-08972、富士フイルム和光純薬）
スペクチノマイシン（22189-32-8、東京化学工業）
ゼラチン（190-15805、富士フイルム和光純薬）
ドデシル硫酸ナトリウム（191-07145、富士フイルム和光純薬）
トリス（204-07885、富士フイルム和光純薬）
トリプシン（35554-64、ナカライテスク）
ハイグロマイシン B ゴールド（ant-hg-1、InvivoGen）
パラホルムアルデヒド（16%、15170-S、Electron Microscopy Sciences）
ピューロマイニンシン（ant-pr-1、InvivoGen）
フィシンビーズ（44881、Thermo Fisher Scientific）
プラスグロウ II（08246-44、ナカライテスク）
プレキャストアクリルアミドゲル（SuperSep Ace 5–20%、198-15041、富士フイルム和光純薬）
ブロッキング試薬（ウェスタンブロッティング用、Blocking One、03953-95、ナカライテスク）
ブロッキング試薬（免疫染色用、Blocking One-P、05999-84、ナカライテスク）
ブロモフェノールブルー（029-02912、富士フイルム和光）
メタノール（21915-35、ナカライテスク）
塩化ナトリウム（31320-05、ナカライテスク）
塩酸（18321-05、ナカライテスク）
仔牛血清（10270-106、Gibco、Thermo Fisher Scientific）
酢酸（00212-85、ナカライテスク）
酢酸ナトリウム（192-01075、富士フイルム和光純薬）
水酸化ナトリウム（31511-05、ナカライテスク）

精製寒天末 (01162-15、ナカライテスク)
炭酸水素ナトリウム (31213-15、ナカライテスク)
分子量マーカー (Pre-stained Protein Markers Broad Range for SDS-PAGE、02525-35、ナカライテスク)
Agilent High Sensitivity DNA キット (5067-4626、Agilent Technologies)
Agilent RNA6000 ピコキット (5067-1513、Agilent Technologies)
BbsI-HF (20 U/μL、New England BioLab)
Can Get Signal Solution I と II (NKB-101、東洋紡)
CELLBANKER 1 plus (CB021、タカラバイオ)
DMEM High Glucose (08458-16、ナカライテスク)
D-PBS (-) (048-29805、富士フイルム和光純薬工業)
EDTA (0.5 M、347-07481、同仁堂)
FluoroBrite DMEM Media (A1896701、Thermo Fisher Scientific)
GelRed (41003、コスモバイオ)
G418 二硫酸塩溶液 (09380-44、ナカライテスク)
ImmunoStar LD (290-69904、富士フイルム和光純薬)
L-グルタミン酸・ペニシリン・ストレプトマイシン安定化溶液 (G6784-100ML、Sigma Aldrich)
L-システイン (10313-42、富士フイルム和光純薬)
LB ブイヨン (1.10285.0500、Merck)
Lipofectamine 3000 (L3000015、Thermo Fisher Scientific)
Nuclease-Free Water (129114、QIAGEN)
PBS タブレット (培養細胞用、T900、タカラバイオ)
PiggyBac トランスポゾンベクター (PB533A-2、フナコシ)
Protein A カラム (rProtein A Sepharose Fast Flow、17127901、cytiva)
Protein A IgG Binding Buffer (21001、Thermo Fisher Scientific)
RQ1 RNase-Free DNase (RNA 精製用、1 U/μL、M6101、Promega)
RNaseOUT (RNA 精製用、40 U/μL、10777019、Thermo Fisher Scientific)
SPRI ビーズ (AMPure XP、A63880、BECKMAN COULTER)
Stop Solution (RNA 精製用、M6101、Promega)
TE 飽和フェノール (26829-54、ナカライテスク)
Triton X-100 (28228-35、ナカライテスク)
TRIzol (10296010、Thermo Fisher Scientific)
Tween-20 (167-11515、富士フイルム和光純薬)

2×Ligation Mix (319-05961、ニッポン・ジーン)

10×Reaction Buffer (RNA 精製用、M6101、Promega)

細胞

HCT116 細胞 (ヒト大腸がん細胞、CCL-247、American Type Culture Collection、公益財団法人東京都医学総合研究所の佐伯泰研究室から譲渡していただいた)

EGFP-RPB1 ノックイン細胞 (KI 細胞、佐伯研究室で独自に樹立し、譲渡していただいた)

機械・器具

ウェスタンブロッティング用フィルター (アドバンテッククロマト濾紙 No.590、ADVANTEC)

セルカウンター (EVE、NanoEntek)

セルスクレーパー (83.1830、Sarstedt)

セルストレイナー (ポアサイズ 40 µm、352340、Corning)

プレーティング・ビーズ (Bac'n' Roll Beads、314-06251、ニッポン・ジーン)

クライオチューブ (430659、Corning)

リザーバー (4870、Corning)

抗体精製用スピнкаラム (74-3800、Harvard Apparatus)

ろ過滅菌用フィルター (0.20 µm、DISMIC-25AS、25AS020AS、39121120、ADVANTEC)

0.2-mL PCR チューブ (TWI0201、Bio-Rad)

1.5-mL タンパク質低吸着チューブ (0030108116、Eppendorf)

1.5-mL チューブ (131-5155C、WATSON)

2-mL タンパク質低吸着チューブ (0030108132、Eppendorf)

2-mL チューブ (LT-0200、BIO-BIK)

8 連 0.2-mL PCR チューブ (MicroAmp 8-Tube Strip、N8010580 と MicroAmp 8-Cap Strip、N8010535、共に applied biosystems)

15-mL チューブ (188271-013、Greiner Bio-one)

50-mL チューブ (227261、Greiner Bio-one)

50-mL チューブ (自立型、210261、Greiner Bio-one)

6 ウェルプラスチックプレート (3516、Corning)

12 ウェルプラスチックプレート (3513、Corning)

96 ウェルプラスチックプレート (3595、Corning)

10-cm プラスチックディッシュ (細胞培養用、664160-013、Greiner Bio-one)

15-cm プラスチックディッシュ (細胞培養用、639160、Greiner Bio-one)

10-cm プラスチックディッシュ (LB プレート用、SH90-15、旭硝子)

ibidi コート処理済み 96 ウェルプレート (μ -Plate 96 Well Black、89626、ibidi)

ibidi コート処理済み 35-mm ディッシュ (μ -Dish 35 mm high、81156、ibidi)

30-mL シリンジ (SS-30LZ、テルモシリンジ)

1-mL プラスチックピペット (4975、Corning)

5-mL プラスチックピペット (4487、Corning)

10-mL プラスチックピペット (4488、Corning)

25-mL プラスチックピペット (4489、Corning)

Amicon Ultra-0.5 30K (UFC503024、Merck)

Amicon Ultra-15 50K (UFC905024、Merck)

Amicon Ultra-15 10K (UFC901024、Merck)

PD MiniTrap G-25 カラム (28-9180-07、Cytiva)

PVDF メンブレン (FluoroTrans W PVDF Transfer Membranes、Pall)

インキュベーター (ユニバーサル CO2 インキュベーターF3110、Thermo Electron)

サーマルサイクラー (T100 Thermal Cycler、Bio-Rad)

サーマルサイクラー (nexus GSX1、Eppendorf)

パワーサプライ (SDS-PAGE 用、BioRad PowerPac BASIC、Bio-Rad)

パワーサプライ (ウェスタンブロッティング転写用、BioRad PowerPac Universal、Bio-Rad)

フローサイトメーター (SH800S、ソニー)

共焦点レーザー顕微鏡システム

- 倒立顕微鏡 (Ti-E、ニコン)
- プラン・アポ VC100 倍対物油浸レンズ (NA 1.4)
- 油浸オイル (Type F、MXA22168、ニコン)
- スピニングディスク (CSU-W1、横河電機)
- EM-CCD カメラ (iXon3 DU888 X-8465、Andor)
- LU-N4 レーザーユニット (ニコン)
- 顕微鏡操作ソフトウェア (NIS-Elements、ニコン)

磁器スタンド (MABI-Mag200 Magnetic stand for 8-strip PCR tube、MABI0812、MCA)

超純水製造装置 (Q-POD、Millipore)

電気泳動装置 (Mupid-2plus、AD110、M-2P、タカラバイオ)

Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システム (Agilent Technologies)

Nanodrop 1000 (Thermo Fischer Scientific)

PureLink Nucleic Acid Purification Rack (K210013、Thermo Fisher Scientific)

UV イルミネーター (Invitrogen S37102 Safe imager 2.0 Blue Light Transilluminator、Invitrogen)

キット

In-Fusion HD Cloning Kit (639635、タカラバイオ)

Mini Plus Plasmid DNA Extraction System (GF2002、VIOGENE)

SMARTer Stranded Total RNA Sample Prep Kit - HI Mammalian (634873、Z4873N、タカラバイオ)

PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit (R026A、タカラバイオ)

PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (K210005、Thermo Fisher Scientific)

QIAquick Gel Extraction Kit (28704、QIAGEN)

QIAquick PCR Purification Kit (28106、QIAGEN)

プロテインアッセイ BCA キット (297-73101、富士フイルム和光純薬)

アンピシリン水溶液

● アンピシリン 1 g (50 mg/mL)

● 超純水 20 mL

フィルター (ポアサイズ 0.20 μ m) でろ過し、1 mL ずつ 1.5-mL チューブに分注して -20°C で保存した。使用時は、1,000 倍希釈 (50 μ g/mL) で使用した。

カナマイシン水溶液

● カナマイシン 0.4 g (終濃度 : 20 mg/mL)

● 超純水 20 mL

フィルター (ポアサイズ 0.20 μ m) でろ過し、1 mL ずつ 1.5-mL チューブに分注して -20°C で保存した。使用時は、1,000 倍希釈 (20 μ g/mL) で使用した。

クリスタルバイオレット染色用固定液

● 16%パラホルムアルデヒド 10 mL (終濃度 : 4%)

● D-PBS (–) 30 mL

クリスタルバイオレット染色用染色液

● クリスタルバイオレット粉末 0.1 g (終濃度 : 0.05%)

● 16%パラホルムアルデヒド 12.5 mL (終濃度 : 1%)

● メタノール 2 mL (終濃度 : 1%)

● D-PBS (-) 185.5 mL

室温で保存した。

スペクチノマイシン水溶液

● スペクチノマイシン 1 g (終濃度 : 100 mg/mL)

● 超純水 10 mL

フィルター (ポアサイズ 0.20 μm) でろ過し、1 mL ずつ 1.5-mL チューブに分注して -20°C で保存した。使用時は、1,000 倍希釈 (100 $\mu\text{g/mL}$) で使用した。

プラスグロウ II

● プラスグロウ II 40 g (1 袋分)

● 超純水 1 L にメスアップ

オートクレーブで滅菌し、室温で保存した。

核酸電気泳動用アガロースゲル

● アガロース 4 g (終濃度 : 0.8%)

● 超純水 500 mL

調製後、電子レンジで温め、アガロースを溶かした。室温で保存した。

転写バッファー

● トリス 12 g (終濃度 100 mM)

● グリシン 14.4 g (終濃度 200 mM)

● メタノール 50 mL (終濃度 5%)

● 超純水 1 L までメスアップした

免疫染色用固定液(用時調製)

● 1 M HEPES pH7.4 0.5 mL (終濃度 : 250 mM)

● 16%パラホルムアルデヒド 0.5 mL (終濃度 : 4%)

● 10% Triton X-100 20 μL (終濃度 : 0.1%)

● 超純水 0.98 mL (合計 : 2 mL)

免疫染色用透過液

- Triton X-100 10 mL (終濃度 : 1%)
- 超純水 90 mL (合計 100 mL)

室温で保存した。

DMEM

- DMEM High Glucose 500 mL
- 仔牛血清 50 mL
- L-グルタミン酸・ペニシリン・ストレプトマイシン安定化溶液 5.5 mL

4°C で保存した。

FluoroBrite

- FluoroBrite DMEM Media 500 mL
- 仔牛血清 50 mL
- L-グルタミン酸・ペニシリン・ストレプトマイシン安定化溶液 5.5 mL

4°C で保存した。

LB プレート

- LB ブイヨン 12.5 g
- 精製寒天末 7.5 g
- 超純水 500 mL にメスアップした

オートクレーブで滅菌し、必要に応じて抗生物質を加えた後、プラスチックディッシュに播種し、4°C で保存した。

SDS-PAGE サンプルバッファー

- 1 M Tris-HCl pH 6.8 12.5 mL (終濃度 : 62.5 mM)
- ドデシル硫酸ナトリウム 4 mL (終濃度 : 2%)
- グリセロール 20 mL (終濃度 : 10%)
- 超純水 63.5 mL (合計 100 mL)

室温で保存した。使用時に、1%ブロモフェノールブルーを終濃度 0.05%、1 M ジチオスレイトールを終濃度 100 mM で加えた。

TBS-T

- 1 M Tris-HCl pH 8.0 50 mL (終濃度 100 mM)
- Tween-20 5 mL (終濃度 0.1%)
- 5 M 塩化ナトリウム水溶液 50 mL (終濃度 150 mM)
- 超純水 4,795 mL (合計 5 L)

1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液

- 炭酸水素ナトリウム 2.1 g (終濃度 : 1 M)
- 超純水 25 mL にメスアップした。

4°C で保存した。

2 × Laemmli バッファー

- 1 M Tris-HCl pH 6.8 25 mL (終濃度 : 125 mM)
- ドデシル硫酸ナトリウム 8 mL (終濃度 : 4%)
- グリセロール 40 mL (終濃度 : 20%)
- 超純水 127 mL (合計 200 mL)

室温で保存した。

3 M 酢酸ナトリウム水溶液

- 酢酸ナトリウム 123 g (終濃度 : 3 M)
- 超純水 500 mL にメスアップした。

室温で保存した。

5 M 塩化ナトリウム水溶液

- 塩化ナトリウム 14.6 g
- 超純水 50 mL にメスアップ
- 室温で保存した。

10 × アニールングバッファー

- 1 M Tris-HCl pH 8.0 5 mL (終濃度 100 mM)
- 5 M 塩化ナトリウム水溶液 5 mL (終濃度 500 mM)
- 0.5 M EDTA 1 mL (終濃度 10 mM)
- 超純水 39 mL (合計 50 mL)

室温で保存した。

10xSDS-PAGE 泳動バッファー

- トリス 30.2 g
- グリシン 188 g
- ドデシル硫酸ナトリウム 10 g
- 超純水 1 L にメスアップした。

室温で保存し、使用時に超純水で 10 倍に希釈した。

50×TAE

- トリス 242 g
- 酢酸 57.1 mL
- 0.5 M EDTA 100 mL
- 超純水 1 L にメスアップした。

室温で保存し、使用時に超純水で 50 倍に希釈した。

細胞培養用 PBS (ー)

- PBS タブレット 5 錠
- 超純水 500 mL にメスアップ

オートクレーブで滅菌し、室温で保存した。

切断バッファー

- 0.1 M クエン酸ナトリウム水溶液 pH 6.0 50 mL
- L-システイン 220 mg (終濃度：36 mM)
- 0.5 M EDTA 500 μ L (終濃度：5 mM)

システインが分解されやすいので、必ず用時調製した。

	名前	クローン	メーカー	製品番号	免疫染色時の濃度	ウェスタンブロットティング時の濃度	保存温度
一次抗体	Mouse anti-coilin	Pdelta	Santa Cruz Biotechnology	sc-56298	0.2 ug/mL	未使用	4℃
	Mouse anti-coilin	F-7	Santa Cruz Biotechnology	sc-55594	未使用	1 µg/mL	4℃
	Rabbit anti-coilin	N.D.	Proteintech	10967-1-AP	20,000x	未使用	マイナス20℃
	Mouse anti-fibrillarin	B-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-166001	0.3 µg/mL	未使用	4℃
	Mouse anti-SMN	2B1	Santa Cruz Biotechnology	sc-32313	0.2 µg/mL	未使用	4℃
	Mouse anti-NPAT	27	Santa Cruz Biotechnology	sc-136007	0.2 µg/mL	未使用	4℃
	Mouse anti-beta actin	AC-15	Santa Cruz Biotechnology	sc-69879	未使用	150 ng/mL (2時間、室温) 70 ng/mL (一晚、4℃)	4℃
	Mouse anti-Rpb1 unphosphorylated CTD	C13B9	Lab made	N.D.	1 µg/mL	1 µg/mL	4℃
	Mouse anti-Rpb1 S2P CTD	Pc26	Lab made	N.D.	1 µg/mL	未使用	4℃
	Mouse anti-Rpb1 S5P CTD	Pa57	Lab made	N.D.	1 µg/mL	未使用	4℃
	Rat anti-Rpb1 S7P CTD	4E12	Active Motif	61087	1 µg/mL	未使用	マイナス20℃
	Rat anti-Rpb1 T4P CTD	6D7	Active Motif	61961	1 µg/mL	未使用	マイナス20℃
	Mouse anti-GFP	GF200	Nacalai Tesque	04363-24	未使用	2 µg/mL	4℃
	Donkey anti-rabbit IgG		Jackson ImmunoResearch	711-005-152	1 µg/mL	未使用	4℃
二次抗体	Goat anti-rabbit IgG		Jackson ImmunoResearch	111-005-144	1 µg/mL	未使用	4℃
	Goat anti-mouse IgG, Fc fragment specific		Jackson ImmunoResearch	115-005-071	1 µg/mL	未使用	4℃
	HRP-conjugated goat anti-mouse IgG		Jackson ImmunoResearch	115-035-003	未使用	80 ng/mL	4℃
	Donley anti-rat IgG		Jackson ImmunoResearch	712-005-153	1 µg/mL	未使用	4℃
	Donkey anti-mouse IgG		Jackson ImmunoResearch	715-005-150	1 µg/mL	未使用	4℃
	名前		メーカー	製品番号	保存時の濃度 (溶媒)	使用時の濃度	保存温度
蛍光試薬	Alexa Fluor 488 5-SDP ester		Thermo Fisher Scientific	A30052	20 mg/mL (DMSO)	300 µg/mL	マイナス20℃
	Cy3 Mono-Reactive Dye Pack		Cytiva	PA23001	10 mg/mL (DMSO)	400 µg/mL	マイナス20℃
	Cy5 NHS Ester Mono-reactive		Cytiva	PA15101	10 mg/mL (DMSO)	150 µg/mL	マイナス20℃
	Hoechst 33342		Thermo Fisher Scientific	C10329	100 µg/mL (MilliQ水)	1 µg/mL	マイナス20℃
	SNAP–Cell 430		New England BioLabs	S9109	1 mM (DMSO)	Coilin-SNAP: 1 nM	マイナス20℃
	SNAP–Cell TMR–Star		New England BioLabs	S9105	600 µM (DMSO)	SNAP-Coilin: 600 nM Coilin-SNAP: 6 nM	マイナス20℃
	SNAP–Cell 647–SiR		New England BioLabs	S9102	600 µM (DMSO)	SNAP-Coilin: 600 nM Coilin-SNAP: 60 nM	マイナス20℃
	Janelia Fluor 549 HaloTag		Promega	GA1111	200 µM (DMSO)	10 nM	マイナス20℃
	Janelia Fluor 646 HaloTag		Promega	GA1121	200 µM (DMSO)	20 nM	マイナス20℃

表2 本研究で使用した抗体と蛍光試薬の一覧

1. 細胞培養

1-1. 細胞培養: 培養液は DMEM High Glucose (10% 仔牛血清、2 mM L-グルタミン酸、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む) を使用した (以下、DMEM はこれらの添加物を含む培養液を意味する)。生細胞観察時は、FluoroBrite DMEM Medium (10% 仔牛血清、2 mM L-グルタミン酸、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む) を使用した (以下、FluoroBrite はこれらの添加物を含む培養液を意味する)。細胞はインキュベーター内で培養した (5% CO₂、37°C)。抗生物質を用いて細胞を選択する時は、ピューロマイシンシンの場合は 2 µg/mL で 2 日間、G418 (ネオマイシン) の場合は 500 µg/mL で 1 週間培養した。

1-2. 細胞ストックの作製: 10-cm プラスチックディッシュに 70–100%コンフルエントで細胞を培養した。培地をアスピレーターで除き、室温のトリプシンを 1 mL 加え、インキュベーター内で 3 分間反応させた。10-cm プラスチックピペットで、37°C に温めた DMEM 9 mL を加え、全量を 15-mL チューブに回収した。1200×g、室温、2 分間遠心後、上清をアスピレーターで除き、ペレットをタッピングでほぐした。CELLBANKER 1plus を 2 mL 加え、ピペッティングで混和し、1 mL ずつクライオチューブに加えた。その後、-70°C で保存した。

1-3. 細胞の継代: 10-cm プラスチックディッシュに 70–100%コンフルエントで細胞を培養した。培地をアスピレーターで除き、室温のトリプシンを 1 mL 加え、インキュベーター内で 3 分間反応させた。10-cm プラスチックピペットで、37°C に温めた DMEM 9 mL を加え、そこから 3 mL を新しい 10-cm プラスチックディッシュに移した。DMEM 7 mL を加えて合計を 10 mL にし、インキュベーター内で培養した。

1-4. 細胞ストックの解凍: 細胞のストックを -70°C から取り出し、37°C の湯浴で解凍した。解凍後、全量 (1 mL) を、15-mL チューブに入れた 37°C の DMEM 9 mL に加え、1200×g、室温、2 分間遠心した。遠心後、上清をアスピレーターで除き、細胞ペレットをタッピングでほぐし、10-cm プラスチックピペット DMEM 10 mL を加えピペッティングで混和し、全量を 10-cm プラスチックディッシュに移した。その後、インキュベーター内で培養した。

2. シングルセルクローニング: トランスフェクションした細胞を 10-cm プラスチックディッシュで培養し、アスピレーターで培地を除き、室温のトリプシン 1 mL を加えた。インキュベーター内で 3 分間反応させ、DMEM 9 mL を加えて全量を 15-mL チューブに回収し、1200×g、室温、2 分間遠心後、上清をアスピレーターで除いた。DMEM 10 mL を加えてピペ

ッティングで細胞ペレットを混和した。セルストレイナー（ポアサイズ 40 μm ）で細胞をろ過した後、細胞数を計測し、1,000 細胞/20 mL に希釈して、15-cm プラスチックディッシュに播種した。インキュベーター内で 1 週間培養後、クリーンベンチ内で、顕微鏡で観察しながら、P20 ピペットマンでコロニーをピックアップし、培養液 300 μL /ウェルを加えた ibidi 96 ウェルプレートに移した。3 日から 5 日に 1 回の頻度で培地を交換しながら、インキュベーター内で培養した。以下ノックアウトの場合とプラスミドの発現の場合に分けて記述する。

2-1. ノックアウトの場合: 80%コンフルエンスになった時に、8 連ピペットマンを用いてトリプシンを 100 μL /ウェルで加えインキュベーター内で 3 分間反応させた。8 連ピペットマンを用いて DMEM を 200 μL /ウェルで加え、ピペッティングして細胞を懸濁し、150 μL /ウェルで 96 ウェルプラスチックプレートに移した（ibidi プレートとプラスチックプレートにそれぞれ同じクローンが 150 μL /ウェルである状態）。この時、両方のプレートの間でウェルを対応させた。その後、ibidi プレートには 150 μL /ウェルで、プラスチックプレートには 350 μL /ウェルで、DMEM を加え、インキュベーター内で培養した。ibidi プレートの細胞を 80%コンフルエンスまで培養後、抗コイリン抗体で免疫染色を行い、1 ウェルずつ共焦点顕微鏡で観察し、ノックアウトの成功の可否を判定した。その後、プラスチックプレートの細胞から、ノックアウトできていないクローンが入っているウェルの培地を除き、ノックアウトできているクローンのみを培養した。80%コンフルエンスまで培養後、12 ウェルプレートに移し、さらに培養後、6 ウェルプレートに移し培養した。その後、10-cm プラスチックディッシュに移し、セルストックの作製やウェスタンブロッティングなどを行った。

2-2. プラスミドの発現の場合: ibidi プレートとプラスチックプレートに細胞を播種するまでのステップはノックアウトの場合と同様に行った。ibidi プレートの細胞を 80%コンフルエンスまで培養後、蛍光リガンドを加えて培養し、培地を FluoroBrite に交換後、1 ウェルずつ共焦点顕微鏡で観察し、発現が成功している細胞を判定した。その後、プラスチックプレートから、発現が起きていないクローンが入っているウェルの培地を除き、発現が成功したクローンのみを培養した。80%コンフルエンスまで培養後、12 ウェルプレートに移し、さらに培養後、6 ウェルプレートに移し培養した。その後、10-cm プラスチックディッシュに移し、セルストックの作製やウェスタンブロッティングなどを行った。

3. 免疫染色: HCT116 細胞は 50%コンフルエント（細胞密度）以上の時、ディッシュに平たく伸展した状態で接着する。コンフルエンス（細胞密度）が低いと、細胞同士が重なり、顕微鏡観察が困難になる。コンフルエンスが高すぎると（100%）、細胞分裂が遅くなった

り、核が圧縮されて小さくなったりするため、観察結果に影響する。平たく伸展した状態、かつ、細胞分裂できる程度の隙間がある状態で観察を行うのがベストである。以上の条件を考慮し、本研究では HCT116 細胞を 0.8×10^6 細胞/2 mL で ibidi 35-mm ディッシュ、または 1.0×10^5 細胞/300 μ L で ibidi 8 ウェルプレートに播種し、24–48 時間培養後、細胞を固定した。HCT116 細胞はプラスチックへの張り付きが比較的悪いため、免疫染色時には ibidi ディッシュを使用した。ガラスボトムディッシュをゼラチンでコートした場合も、ibidi と同様の接着効果が見られた。細胞の固定方法を記述する。培地をアスピレーターで除き、細胞をはがさないように免疫染色用固定液をゆっくり加えた。室温で 20 分静置し、アスピレーターで固定液を除き、D-PBS (-) で 3 回洗浄した（ここで 4°C 保存可能）。次に透過処理のために、免疫染色用透過液を加え、室温で 20 分静置した。アスピレーターで透過液を除き、Blocking One-P を加え、室温で 20 分静置しブロッキング処理を行い、アスピレーターで除いた。10% Blocking One-P/D-PBS (-) に希釈した一次抗体を加え、遮光して室温で 2 時間静置した。D-PBS (-) で 3 回洗浄後、10% Blocking One-P/D-PBS (-) に希釈した二次抗体と 0.1 μ g/mL Hoechst 33342 を加え、遮光して室温で 2 時間静置した。D-PBS (-) で 3 回洗浄し、共焦点顕微鏡で撮影した（4°C で保存可能。保存期間は最大で 1 週間）。

4. 生細胞観察: 免疫染色と同じ条件で細胞を播種し、培養した。生細胞観察は、培地を FluoroBrite に交換し、37°C、5% CO₂ 条件下で実施した。ステージヒーター（Tokai Hit）は、TOP HEATER 45.5°C、LENS HEATER 37.0°C、BATH HEATER 42.5°C、STAGE HEATER 39.5°C、CO₂ 5.0% に設定した。

5. 画像解析: NIS-Element で取得した画像ファイル（ND2 ファイル）をフリーソフトウェア Icy [Chaumont et al, 2012] (<http://icy.bioimageanalysis.org/>) を使用して、TIFF 形式に変換した。輝度閾値：30%パーセンタイル、サイズ閾値：10–150 ピクセルの設定で PC、CB、HLB を検出した。検出結果は、全て目で見て確認し、適切に検出できていない場合は、パラメーターを変更した。論文中の画像は、注釈がない限り MIP 画像で示されているが、画像解析は、MIP 画像ではなく、3D スタック画像を用いた。検出した NB の中心同士の距離が 390 nm（1 ピクセル = 130 nm）以下の場合、共局在として判定した。Icy により取得したデータの計算や管理には Microsoft Excel を使用した。

6. ウェスタンブロッティング: 細胞を 10-cm プラスチックディッシュに 70–100%コンフルエンスで培養後、アスピレーターで培地を除き、室温のトリプシン 1 mL を加え、インキュベーター内で 3 分間反応させた。DMEM 9 mL を加え、全量を 15-mL チューブに移し、1200 $\times$ g、

室温、2 分間遠心した。アスピレーターで上清を除き、室温の PBS (-) 10 mL を加え、ピペッティングで混和し、細胞を洗浄した。1200×g、室温、2 分間遠心し、アスピレーターで上清を除き、室温の PBS (-) 10 mL を加え、ピペッティングで混和した。ここで、細胞数を計測した。計測後、細胞を 1200×g、室温、2 分間遠心し、アスピレーターで上清を除き、 1×10^7 細胞/mL になるように Laemmli バッファーを加え、ピペットマンでピペッティングして、全量を 2-mL タンパク質低吸着チューブに回収した。95°C で 10 分間加熱し、最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌した。サンプル (total protein) は -20°C で保存した。SDS-PAGE を行う当日に、total protein サンプルを室温で解凍し、以下の組成でゲルにアプライするためのサンプルを調製した。

- Total protein コイリンの場合は 75 μg、RBP1 の場合は 135 μg
- 1%ブロモフェノールブルー 1.5 μL（終濃度：0.05%）
- 1 M ジチオスレイ トール 3 μL（終濃度：100 mM）
- Laemmli バッファー 30 uL にメスアップした。

95°C で 10 分間加熱し、室温まで冷ました後、プレキャストアクリルアミドゲルに分子量マーカー 6 μ L とサンプル 20 μ L をアプライした。20 mA/ゲル、150V、120 分電気泳動した。電気泳動終了後、ゲルを転写バッファーに浸し 15 分間振とうした。その間に、8 cm×9 cm に切った PVDF メンブレンをメタノールに浸して 3 分間振とうし、活性化した。メンブレンを転写バッファーに浸し、10 分間振とうした。フィルターを 2 枚重ねてブロッキング装置にセットし、ローラーで余分なバッファーと気泡を除いた。フィルターの上にメンブレンを載せ、メンブレンの上にゲルを載せた。この時、メンブレンとアクリルアミドゲルが接触した瞬間からゲルをずらさないように注意した。さらに、フィルターを 2 枚重ねて載せ、ローラーで余分なバッファーと気泡を除いた。そして、200 mA で 90 分間転写した。転写終了後、メンブレンを Blocking One に浸し、20 分間振とうした（ブロッキング）。ブロッキング後、自分が検出したいタンパク質の分子量付近のメンブレンをはさみで切り取り、Can Get Signal Solution I に希釈した一次抗体溶液 1 mL をメンブレンに加え、セロハンで挟んで室温で 2 時間静置した（各一次抗体の希釈倍率に関しては表 2 を参照）。一次抗体反応終了後、メンブレンを TBS-T に浸し、15 分間振とうした（洗浄）。この洗浄作業を、TBS-T を変えながら 3 回行った。メンブレンの洗浄後、Can Get Signal Solution II に 10,000 倍希釈した HRP-conjugated anti-mouse IgG をメンブレンに加え、セロハンで挟んで室温で 2 時間静置した。二次抗体反応終了後、メンブレンを TBS-T に浸し、15 分間振とうした（洗浄）。この洗浄作業を、TBS-T を変えながら 3 回行った。ImmunoStar LD の Solution A と Solution B を 500 μ L ずつ混合した working solution 1 mL をメンブレンに加え、セロハンで挟んで working solution をメンブレン上に均一に渡らせ、発光を検出した。

7. Fab の調製: Fab の調製手順は以下の論文に従った[Hayashi-Takanaka et al, 2011; Stasevich et al, 2014; Sato et al, 2019]。IgG 抗体 4 mg を Amicon Ultra-15 50K に加え、さらに用事調製した切断バッファー 11 mL を加えた。5,000×g、4°C、20 分で遠心し、フロースルーをデカントで捨て、切断バッファー 10 mL を加えた。5,000×g、4°C、20 分で遠心し、フロースルーをデカントで捨て、ピペットマン (P1000 または P200) でカラムに残った溶液を吸い、カラムの膜を 3 回洗って、全量を 2-mL タンパク質低吸着チューブに回収した。切断バッファーで全量を 500 μ L にメスアップした (サンプル 1)。次にフィシンビーズのバッファー交換を行った。4°C で保存されたフィシンビーズの容器を転倒混和して、ビーズ 500 μ L を 1.5-mL タンパク質低吸着チューブに移した (2.0-mL の低吸着チューブだと、丸底なのでビーズが回収しにくい。また、チップの先をはさみで切って、広口のチップにした方が取りやすい)。5,000×g、4°C、1 分遠心し、上清をピペットマンで除いた。切断バッファー 1 mL を加え転倒混和した (ビーズの洗浄)。この洗浄操作を合計で 3 回行い、上清をピペットマンで除いた後に、サンプル 1 を全量加えた。ローテーターにセットし、37°C で一晩遠心しながら、反応させた (サンプル 2)。サンプル 2 全量をスピнкаラムに移し、15 秒間スピンドアウンした。フロースルー (ここで回収したフロースルーに Fc と Fab が含まれている) を 2-mL タンパク質低吸着チューブに移した (サンプル 3)。カラムに残ったフィシンビーズに Protein A IgG Binding Buffer (以下 BB) 500 μ L を加え、15 秒間スピンドアウンした。フロースルーをサンプル 3 に加えた (ビーズの洗浄)。このビーズの洗浄を合計で 3 回行い、Fc と Fab を回収した。5-mL サイズの Protein A カラムを 4°C から取り出した。ビーカーをカラムの下にセットし、カラムの上下のキャップを外した。カラムの上側に赤い接続パーツを付けた。30-mL シリンジに BB 25 mL を取り、接続パーツを介してカラムに接続した。この時、空気が入らないように注意した。BB 25 mL をゆっくりと注入し、カラム内のバッファーを BB に置換した。5-mL シリンジに 26G の使い捨ての針を取り付け、サンプル 3 を全量吸い取った。針をシリンジからとって、空気を抜いた後、接続パーツを介してシリンジとカラムをつなぎ、サンプル 3 全量をカラムに注入した。シリンジをカラムから外し、針を再びつけて、BB を 500 μ L 吸い、シリンジの壁を洗った。針をシリンジからとって、空気を抜いた後、接続パーツを介してシリンジとカラムを再びつなぎ、BB 全量をカラムに注入した。Fc をカラムに吸着させるために室温で 1 時間静置した。30-mL シリンジで 25 mL の BB を吸い取り、接続パーツを介してシリンジとカラムをつないだ。カラムの下に新しい自立型 50-mL チューブをセットし、BB 全量をカラムに注入して、フロースルーを 50-mL チューブに回収した (このフロースルーに目的の Fab が含まれていた。サンプル 4)。Elution buffer 25 mL を同様に注入し、フロースルーを 50-mL チューブに回収した (ここで回収したフロースルーに Fc が含まれていた)。PBS 25 mL を同様に注入し、フロースルーは捨てた。超純水 25 mL を同様に注入し、フロ

ースルーは捨てた。20%エタノール 25 mL を同様に注入し、フロースルーは捨てた。カラムは再使用のために、4°C で保存した。サンプル 4 を Amicon Ultra-15 10K に加え、5,000×g、4°C、20 分遠心した。フロースルーをデカントで捨て、サンプル 4 がまだ残っている場合は、Amicon Ultra-15 10K に加え、5,000×g、4°C、20 分遠心し、フロースルーを捨てた。PBS を最大限まで加え、5,000×g、4°C、20 分遠心した。ピペットマン (P1000) でピペッティングして、カラムのメッシュ部分に吸着した Fab を洗いこみ、全量を 1.5-mL タンパク質低吸着チューブに回収した。Fab の濃度は Nanodrop 1000 で測定した (280 nm の吸光度 1 ユニットを 0.7 mg/mL として計算した。吸光度係数は 70,000 mol⁻¹cm⁻¹、分子量は 50 kDa で計算した)。Fab は 4°C で保存した。

8. 抗体 (IgG と Fab) の蛍光試薬修飾: 抗体の蛍光試薬修飾手順は以下の論文に従った [Hayashi-Takanaka et al, 2011; Stasevich et al, 2014; Sato et al, 2019]。まず、1.5-mL タンパク質低吸着チューブに IgG または Fab を 100 µg 加え、D-PBS (-) で 90 µL にメスアップした。1 M 炭酸水素ナトリウム (pH 8.3) 10 µL を加えた。さらに、蛍光試薬 (20 mg/mL Alexa Fluoro 488 1.5 µL または 10 mg/mL Cy3 4 µL または 10 mg/mL Cy5 1.5 µL) を加え、最大速度のボルテックスで 10 秒間攪拌した。アルミホイルで包んで遮光し、ローテーターにセットして室温で 1 時間攪拌しながら反応させた。攪拌後、PD MiniTrap G-25 カラムを PureLink Nucleic Acid Purification Rack にセットし、その下に 50-mL チューブをセットした。カラムの下蓋を外し、その後、上の蓋を外した。D-PBS (-) 1mL を溢れないようにカラムに加え、合計で 9 mL 加えた (カラムの中が乾かないようにすることが重要)。蛍光試薬と反応させた抗体全量をカラムに加え、さらに D-PBS (-) 500 µL を加えた (ここで出てくるフロースルーには未反応の蛍光試薬が含まれており、不要のため捨てた)。さらに D-PBS (-) 500 µL を加え、フロースルーを 1.5-mL タンパク質低吸着チューブに回収した (このフロースルーに蛍光標識された抗体が含まれていた)。回収したフロースルー全量を Amicon Ultra-0.5 30K に加え、12,000 rpm、5 分間、4°C で遠心した。遠心後、フロースルーを捨て、D-PBS (-) 500 µL を加え、12,000 rpm、10 分間、4°C で遠心した。遠心後、フィルターユニットを逆さまにして新しいアミコンウルトラチューブにセットし、12,000 rpm、3 分間、4°C で遠心した。遠心後、全量を 1.5-mL タンパク質低吸着チューブに加え、抗体濃度と蛍光標識濃度を Nanodrop 1000 で測定した。サンプルは 4°C で保存した。

9. Complementary DNA (cDNA) のクローニング

9-1. RNA の抽出: 10-cm ディッシュに播種して培養した HCT116 細胞 (細胞密度 80–100%) の培地を除き、PBS (-) 10 mL で 1 回洗浄した。冷蔵庫から取り出し、室温に戻した TRIzol

を 1 mL 加え、セルスクレーパーで細胞をかき集め、P1000 で全量を 1.5-mL チューブに移した（ここで -20°C で保存可能）。クロロホルム 200 μL を加え、転倒混和を 10 回行い室温で 3 分間静置した。12,000 $\times g$ 、 4°C 、15 分で遠心し、P200 で上清のみを慎重に新しい 1.5-mL チューブに移した。イソプロパノール 500 μL を加え、転倒混和を 10 回行い室温で 5 分間静置した。12,000 $\times g$ 、 4°C 、10 分で遠心し、デカントで上清を除いた（沈澱が RNA）。室温の 75% エタノールを 1 mL 加え転倒混和して洗浄し、12,000 $\times g$ 、 4°C 、5 分で遠心した。デカントで上清を除き、チューブを逆さまに立てて、5 分間風乾した。Nuclease-Free Water を 100 μL 加え、ボルテックスで溶かした。RNA の濃度は Nanodrop 1000 を用いて測定した。サンプルは -20°C で保存した。

9-2. RNA の精製：以下の組成でサンプルを 1.5-mL チューブに調製した。

- 抽出した RNA 10 μg
- 10 $\times$ Reaction Buffer 10 μL
- RQ1 RNase-Free DNase 10 μL
- RNaseOUT 5 μL
- Nuclease-Free Water 100 μL にメスアップした

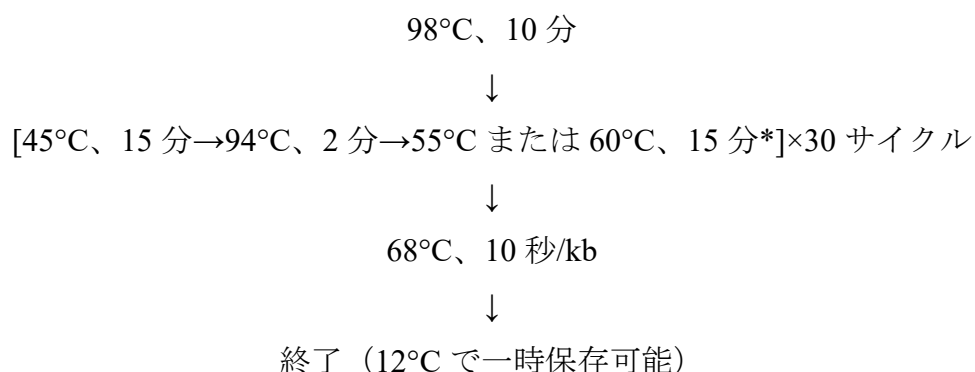
37°C で 30 分間反応させ、DNase と RNase を不活性化した。Stop Solution 10 μL を加え、反応を止めた。次にフェノール/クロロホルム抽出を行った。室温の TE 飽和フェノールを 110 μL 加え、転倒混和を 10 回行い、10,000 $\times g$ 、 16°C 、2 分で遠心した。P200 で上清のみを慎重に新しい 1.5-mL チューブに移した。TE 飽和フェノール/クロロホルムを 110 μL 加え、転倒混和を 10 回行い、10,000 $\times g$ 、 16°C 、2 分で遠心した。P200 で上清のみを慎重に新しい 1.5-mL チューブに移した。クロロホルム 220 μL を加え、転倒混和を 10 回行い、10,000 $\times g$ 、 16°C 、2 分で遠心した。P200 で上清のみを慎重に新しい 1.5-mL チューブに移した。次にエタノール沈澱を行った。サンプルに 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 10 μL を加え、ボルテックスで混和した。 -20°C のエタノール 300 μL を加え、転倒混和を 10 回行い、18,000 $\times g$ 、 4°C 、30 分で遠心した。デカントで上清を除き、 -20°C の 70%エタノール 1 mL を加え、転倒混和してペレットを洗浄後、18,000 $\times g$ 、 4°C 、5 分で遠心した。デカントで上清を除き、チューブを逆さまに立てて、5 分間風乾した。Nuclease-Free Water を 30 μL 加え、ボルテックスで溶かした。RNA の濃度は Nanodrop 1000 を用いて測定した。サンプルは -20°C で保存した。

9-3. cDNA の合成：cDNA の合成には PrimeScript II High Fidelity One Step RT-PCR Kit を使用した。以下の組成で反応液を 0.2-mL PCR チューブに調製し、サンプルをサーマルサイクラーにセットした。プライマーは Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer->

[blast/index.cgi](#)) で設計した。

● 2×One Step High Fidelity Buffer	12.5 μL
● PrimeScript II RT Enzyme Mix	0.5 μL
● PrimeSTAR GXL for 1 step RT-PCR	2.0 μL
● Forward Primer (10 μM)	1.0 μL
● Reverse Primer (10 μM)	1.0 μL
● 精製した鋳型 RNA	1 μg
● Nuclease-Free Water	25 μL にメスアップ

以下のサイクルで反応させた。



*プライマーの T_m 値の平均値が 55°C を超える場合は 60°C に設定し、プライマーの T_m 値の平均値が 55°C 以下の場合は、55°C に設定した。

アガロースゲル電気泳動でバンドを確認後、目的のサイズ以外のバンドが見られた場合はアガロースゲル抽出を行った。目的のサイズのバンドのみが見られた場合は、そのままプラスミドの作製(In-Fusion 反応のためのクローニングエンハンサー処理やライゲーションなど)に使用した。

9-4. cDNA のベクターへの挿入とプラスミドの精製: 合成した cDNA は、蛍光タグ (SNAP-tag または HaloTag) を挿入した PiggyBac トランスポゾンベクターに、In-Fusion HD Cloning Kit を用いて挿入し、ヒートショック法で大腸菌 DH5α に導入した。LB プレート上のシングルコロニーを用いてミニプレップでプラスミド DNA を抽出・精製した。DNA 配列はシーケンスにより確認した。

10. アガロースゲル電気泳動: DNA のサイズの確認時は、1 ウェル当たり 50–100 ng でサンプルをアプライした。アガロースゲル抽出の場合は、最大で 30 μL アプライし、可能な限りの DNA 量をアプライするようにした。事前に作製したアガロースゲルを電子レンジ温めてゲル作製トレイ (Mupid-2plus 付属品) に流し込み、室温で 1 時間静置して、電気泳動用の

ゲルを作製した。作製したゲルを電気泳動装置にセットし、ゲルが浸る程度に TAE を加えた。100 V、室温で 30–60 分泳動した。

11. アガロースゲル抽出: アガロースゲル抽出には QIAquick Gel Extraction Kit を使用した。電気泳動後、アガロースゲルを TAE で 10,000 倍に希釈した GelRed に浸し、室温で 30 分から 1 時間振とうした。その後、UV イルミネーターにゲルを載せ、DNA を含む部分のゲルを切り出し、2-mL チューブに移した (約 300 mg)。Buffer QG 900 μ L を加え、50°C で 10 分間温めた。最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌後、室温のイソプロパノール 900 μ L を加え、最大速度のボルテックスで 30 秒間攪拌した。2-mL コレクションチューブに QIAquick スピニングカラムをセットし、カラムにサンプル 700 μ L を加え、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。遠心後、フローズルーを捨て、カラムにサンプル 700 μ L を加え、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。遠心後、フローズルーを捨て、カラムに残りのサンプル全量を加え、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。遠心後、フローズルーを捨て、Buffer QG 500 μ L を加え、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。遠心後、フローズルーを捨て、エタノールを加えた Buffer PE 750 μ L を加え、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。遠心後、フローズルーを捨て、余分なバッファを除くために、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。遠心後、カラムを新しい 1.5-mL チューブにセットし、Buffer EB 50 μ L をカラムの中心に加え、室温で 1 分間静置した。静置後、13,000 rpm、16°C、1 分間遠心した。DNA 濃度は Nanodrop 1000 で測定し、-20°C で保存した。

12. ノックアウト

12-1. プラスミド: ノックアウトには Cas9 ニッカーゼを用いた。使用したプラスミドは pX335 と pKN7 である。それぞれのプラスミドに gRNA をコードする DNA のクローニングサイト (BbsI) がある。

12-2. 配列設計: sgRNA の標的配列は、CHOPCHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>) と CRISPR gRNA Design tool (<https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input>) を使用した。コイリン遺伝子 (*COIL*) のノックアウト標的配列は以下の通り。5'-TGCCTCAGGTGCGCGGCGCAGGG-3' (Right)、5'-TCCGCGCGCGAGAGCCGCCCCC-3' (Left)。下線は PAM 配列を示す。

12-3. プラスミド構築: sgRNA をコードする DNA のベクターへの挿入方法を記述する。10 μ M のセンス鎖オリゴヌクレオチドとアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをそれぞれ 5 μ L、超純水 8 μ L、10×アニーリングバッファ 2 μ L を PCR チューブに加え、タッピング、スピン

ダウンをした後、95°C で 5 分間加熱した。その後、0.1°C/sec で温度を 16°C まで下げ、アニーリングさせた。アニーリング産物 (20 µL) を 1.5-mL チューブに移し、超純水 320 µL、3 M 酢酸ナトリウム 40 µL、エタノール 800 µL を加え、ボルテックスで攪拌し、-20°C で 30 分間静置した。静置後、13,000 rpm、0°C、20 分間で遠心し、デカントにより上清を除いた。氷冷 70%エタノールを 750 µL 加え、転倒混和した後、13,000 rpm、0°C、5 分間で遠心し、デカントにより上清を除いた。上清除去後、チューブを逆さまに立てて 10 分間風乾し、Nuclease-Free Water 30 µL を加えた。sgRNA をコードする DNA 断片を挿入するベクター (pKN7 と pX335) 2 µg を BbsI-HF で切断し、アガロースゲル抽出を行った。その後、BbsI で切断したベクターと sgRNA をコードする DNA 断片をライゲーションした。ライゲーションは、BbsI で切断したベクター 25 ng (pKN7 は 5154 bp、pX335 は 8434 bp)、sgRNA をコードする DNA 断片 1 ng (ベクターが pKN7 の場合) または 0.6 ng (ベクターが pX335 の場合)、2×Ligation Mix を 5 µL 混ぜ、超純水で 10 µL にメスアップし、16°C で 5 分間反応させた。ライゲーション産物を用いて、大腸菌 DH5α を形質転換し、ミニプレップで DNA を取得し、シーケンスで配列を確認した。

12-4. トランスフェクション: 6 ウェルプラスチックプレートをゼラチンでコートし、細胞を 0.8×10^6 細胞/2 mL/ウェルで加えた。24–48 時間培養後、pKN7 と pX335 を 10 µg ずつ、Lipofectamine 3000 を使用して細胞に加えた。リポフェクションのために、以下の組成でリポフェクション溶液 A と B を別々に調製した。

- リポフェクション溶液 A
 - Lipofectamine 3000 Reagent 3.8 µL
 - Opti-MEM 125 µL
- リポフェクション溶液 B
 - P3000 Reagent 5.0 µL
 - pKN7 1.3 µL
 - pX335 1.2 µL
 - Opti-MEM 125 µL

そして、ボルテックスで混和し、スピンドウンした後、室温で 15 分間静置した。静置後、溶液 A と B を混合し、全量を細胞に加えた。

13. In-Fusion 反応

13-1. ゲル抽出していない場合: 以下の組成で混合した。

- PCR 産物 5.0 µL

- Cloning Enhancer 2.0 μL (合計 7.0 μL)

サーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムで Cloning Enhancer 処理した。

37°C、15 分

↓

80°C、15 分

↓

終了

次に、Cloning Enhancer 産物を用いて、In-Fusion 反応を行った。

Cloning Enhancer 産物	サイズに関係なく 2 μL
直線化したプラスミドベクター	100 ng (サイズが 10 kb より小さい場合)
5×In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μL
超純水	10 μL にメスアップした

50°C、15 分

↓

終了

13-2. ゲル抽出した場合: 以下の組成で In-Fusion 反応を行った。

- 精製した DNA 断片 50 ng (サイズが 0.5 kb より小さい場合) または
100 ng (サイズが 0.5 kb 以上 1 kb 以下の場合)
- 直線化したプラスミドベクター 100 ng (サイズが 10 kb より小さい場合)
- 5×In-Fusion HD Enzyme Premix 2 μL
- 超純水 10 μL にメスアップ

50°C、15 分

↓

終了

In-Fusion 産物 2 μL をコンピテントセル大腸菌 DH5 α に加え、ヒートショック法で形質転換した。

14. 大腸菌の形質転換: 大腸菌株は *E.coli* DH5 α を使用した。コンピテントセルは作製後、-80°C で保存した (コンピテンシーは 1×10^8 コロニーフォーメーションユニット以上)。DNA 1.0–5.0 μL を氷上で解凍したコンピテントセル 50 μL に加え、タッピングして混和後、スピンドアウンして、氷上で 15 分間静置した。その後、42°C の湯浴に 30 秒間浸し、氷上で 2 分間静置した。その後、37°C で温めたプラスグロウ II を 200 μL 加えピペティングで混和

し、全量を LB プレート（必要に応じて抗生物質を混ぜた。アンピシリン 50 µg/mL、カナマイシン 20 µg/mL、スペクチノマイシン 100 µg/mL）に播種した。播種後、プレーティング・ビーズを用いて均一に塗布した。37°C で 24–48 時間培養し、4°C で保存した。

15. プラスミド DNA 抽出(ミニプレップ): ミニプレップには、Mini Plus Plasmid DNA Extraction System を使用した。精製前日に、抗生物質（アンピシリン 50 µg/mL またはカナマイシン 20 µg/mL、スペクチノマイシン 100 µg/mL）を加えたプラスグロウ II 3 mL に大腸菌のコロニーを懸濁し、12–20 時間、37°C、180 rpm で培養した。培養後、大腸菌培養液 1.5 mL を 2-mL チューブに移し、13,000 rpm、室温、1 分間遠心した。上清をデカントで除き、さらに大腸菌培養液 1.5 mL を加え、13,000 rpm、室温、1 分間遠心した。上清をデカントで除き、RNase A を加えた MX1 バッファー 200 µL を加え、最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌した。大腸菌ペレットが完全に攪拌されたのを確認後、MX2 バッファー 250 µL を加え、穏やかに 10 回転倒混和し、室温で 5 分間静置した。MX3 バッファー 350 µL を加え、穏やかに 10 回転倒混和し、白い沈殿が生じたことを確認後、13,000 rpm、室温、6 分間遠心した。Mini Plus カラムをコレクションチューブにセットし、遠心後の上清全量をカラムに移した。9,000 rpm、室温、1 分間遠心後、フロースルーをデカントで除き、WN バッファー 500 µL を加え、9,000 rpm、室温、1 分間遠心した。遠心後、フロースルーを除き、WS バッファー 500 µL を加え、9,000 rpm、室温、1 分間遠心した。遠心後、フロースルーを除き、余分なバッファーを除くために、13,000 rpm、室温、3 分間遠心した。遠心後、カラムを新しい 1.5-mL チューブに移し、溶出バッファー 50 µL をカラムの中心に加え、室温で 2 分間静置した。13,000 rpm、室温、3 分間遠心し、カラムを捨てた。DNA 濃度は Nanodrop 1000 で測定し、サンプルは–20°C で保存した。

16. DNA シークエンス: シークエンスは、以下の組成でテンプレート DNA とプライマーを混合し、東京工業大学オープンファシリティセンター バイオ部門に提出した。組成は以下の通り。

- プラスミド DNA 300 ng
- プライマー (10 µM) 3.2 µL
- 超純水 10 µL にメスアップ

17. プラスミド DNA 抽出(ミディプレップ): 培養細胞にトランスフェクションするためのプラスミド DNA は、PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit を用いて、精製した。精製前日に、抗生物質（アンピシリン 50 µg/mL またはカナマイシン 20 µg/mL、スペクチノマイシン 100 µg/mL）

を加えたプラスグロウ II（ハイコピーナンバープラスミドの場合 30 mL、ローコピーナンバープラスミドの場合 100 mL）に大腸菌のコロニーを懸濁し、12–20 時間、37°C、180 rpm で培養した。培養液を 4,000×g、室温、10 分間遠心し、上清をデカントで除いた。RNase A を加えた懸濁バッファー（R3）4 mL を大腸菌ペレットに加え、最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌した。ペレットが完全に懸濁されたことを確認後、溶解バッファー（L7）4 mL を加え、ゆっくり 10 回転倒混和し、室温で 5 分間静置した。静置後、沈殿バッファー（N3）4 mL を加え、ゆっくり 10 回転倒混和し、白い沈殿が生じたことを確認後 12,000×g、室温、10 分間遠心した。遠心中に HiPure ミディカラムを PureLink Nucleic Acid Purification Rack にセットし、その下に自立型 50-mL チューブをセットした。カラムに平衡化バッファー（EQ1）2 mL を加え、平衡化した。沈殿バッファーを加え遠心したサンプルの上清全量をデカントでカラムに加え、静置した。カラムから液が出きった後に洗浄バッファー（W8）10 mL を加え、静置した。カラムから液が出きった後に、さらに洗浄バッファー（W8）10 mL を加え、静置した。カラムから液が出きった後に、カラムの下に新しい 15-mL チューブをセットし、溶出バッファー（E4）5 mL を加え、フロースルーを回収した（このフロースルーに DNA が含まれている）。回収したフロースルーに室温のイソプロパノール 3.5 mL を加え、最大速度のボルテックスで 30 秒間攪拌し、12,000×g、4°C、30 分間遠心した。遠心後、上清をデカントで除き、ペレットを壊さないように氷冷 70%エタノール 3 mL を加え、ペレットを洗浄した。12,000×g、4°C、5 分間遠心後、上清をデカントで除き、キムワイプの上にチューブを逆さまに立てて 10 分間風乾した。風乾後、TE バッファー 100 µL を加え、DNA 濃度を Nanodrop 1000 で測定し、–20°C で保存した。

18. FACS(fluorescence-activated cell sorting)：細胞は、70–100%コンフルエンスで 10-cm ディッシュに培養後、トリプシン処理を行い 15-mL チューブに回収し、使用した。なお、フェノールレッドによる蛍光シグナル検出の障害を抑えるために、ソート時の培地は FluoroBrite を使用した。ソート時は、蛍光を発しない野生型 HCT116 細胞をネガティブコントロールとして使用し、野生型 HCT116 細胞ソート時の蛍光ヒストグラムの山（最頻値）の輝度が 1×10^3 になるように検出感度を調整した。目的の細胞は 10 万から 100 万細胞回収した。ソート後の細胞は、15-mL チューブに加えた DMEM に回収されるように設定した。細胞回収後、毒性を示すシース液を除くために、細胞を 1,200×g、室温、2 分間遠心し、細胞ペレットを取得した。上清をアスピレーターで除き、37°C に温めた DMEM 10 mL を加えて、ピペッティングによりペレットを DMEM に懸濁し、35-mm の ibidi ディッシュに播種し、インキュベーターで培養した。

19. クリスタルバイオレット染色: 細胞を 0.8×10^6 細胞/ウェルで 6 ウェルプラスチックプレートに播種し、24–48 時間、培養した。薬剤などで処理後、培地をアスピレーターで除き、クリスタルバイオレット染色用固定液を 2 mL/ウェルで加え、室温で 30 分間静置した。固定液をアスピレーターで除き、染色液を加え、穏やかに浸透しながら、5 分間、室温で染色した。アスピレーターで染色液を除き、プラスチックバケツに入れた超純水 2 L に染色したプレートを入れて、穏やかに浸透し、余分な染色液を除いた。プラスチックウェルをキムワイプの上に逆さまに置いて、室温で 24 時間風乾した。画像はスマートフォンで撮影した (Galaxy S10 plus)。サンプルは 1 ヶ月以上、室温で保存可能。

20. RNA シークエンシング (RNA-Seq): cDNA ライブラリ調製には、SMARTer Stranded Total RNA Sample Prep Kit - HI Mammalian を使用した。RNase の混入を防ぐために、操作は全てグローブとマスクを着用して行った。Total RNA の抽出と精製は、Complementary DNA (cDNA) のクローニングの項の RNA の抽出と RNA の精製と同様に行った。Total RNA の純度を確認するために、Agilent RNA6000 ピコキットと Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システムを用いて、RIN (RNA Integrity Number) 値を測定した。測定時には、キットを 4°C から取り出して室温に戻した。電極を洗浄するために、電極クリーナーチップに Nuclease-Free Water 350 μ L を加えた。Nuclease-Free Water を均一にチップ内にいきわたらせた後、バイオアナライザにセットし、5 分間静置した。その後、チップを取り出し、バイオアナライザの蓋を開けて 30 秒間風乾し、蓋を閉じた。精製した total RNA の濃度が 200–5000 pg/ μ L になるように Nuclease-Free Water を加え、1.5-mL チューブに 10 μ L 移した。70°C で 2 分間加熱し、氷上で 5 分間急冷した。その後、チップに注入するまで、氷上で保存した。次に、ラダ 10 μ L を 70°C で 2 分間加熱し、氷上で 5 分間急冷した。Nuclease-Free Water 90 μ L を加え、最大速度のボルテックスで 30 秒間攪拌し、0.2-mL チューブに 4 μ L ずつ分注した。使用しないラダは次回の実験のために、-80°C で保存した。続いて、Gel を最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌し、550 μ L をスピニングフィルターに加え、1,500 $\times$ g、室温、10 分間遠心し、ろ過した。ろ過した Gel を 1.5-mL チューブに 65 μ L ずつ分注した。使用しない Gel は 4°C で保存した (保存期間は 1 か月)。分注した Gel 65 μ L に Dye 1 μ L を加え、最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌した。13,000 $\times$ g、室温、10 分間遠心し、使用するまで遮光した (Gel-Dye Mix)。チップ調製スタンドを組み立て、底面プレートの位置を C に合わせた。クリップのストッパーの位置を上段にセットし、シリンジのプランジャーを 1 mL の位置まで引き上げた。Gel-Dye Mix 9 μ L をラボチップの白抜き G のウェルに加え、チップ調製スタンドにセットし、ふたを閉めた。プランジャーをクリップの位置まで押して、クリップに引っ掛け、30 秒間静置した。クリップのストッパーを外して 5 秒間静置し、プランジャーを元の位置 (1 mL の

位置)までゆっくりと引き上げた。ラボチップを取り出し、光にかざしてゲルが補充されたことを確認し、Gel-Dye Mix 9 μL をラボチップの G のウェル (2 か所) に加えた。Condition Solution 9 μL をラボチップの CS のウェルに加えた。マーカーを 5 μL ずつウェル 1-11 とラダウェルに加えた。調製したラダ 1 μL をラダウェルに加え、加熱して氷冷しておいた total RNA サンプル 1 μL を、サンプルごとにウェル 1-11 のいずれかのウェルに加えた (最大で 11 種類の total RNA を測定可能)。専用ミキサーにラボチップをセットし、Pico の目盛りにつまみを合わせて 1 分間攪拌した。攪拌したラボチップをバイオアナライザにセットし、Eukaryote total RNA Pico プログラムを選択して、解析を開始した。rRNA を除くために、以下の操作を行った。初めに、氷上で、以下の組成で 0.2-mL チューブにサンプルを調製した。

- Total RNA 1 μg
- 10 $\times$ Total RNA Hyb Buffer 1 μL
- Nuclease-Free Water 10 μL にメスアップ

サンプルをサーマルサイクラーにセットし、95 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分間加熱した。その後、0.1 $^{\circ}\text{C}$ /秒で 25 $^{\circ}\text{C}$ まで温度を下げた。キット付属の RNase H 2 μL 、RNase Inhibitor 1 μL 、10 $\times$ RNase H Buffer 1.4 μL を加え、タッピングして混ぜ、スピンドウンした。サーマルサイクラーにセットし、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間反応させた。キット付属の DNase I 4 μL を加え、サーマルサイクラーにセットし、37 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間反応させた。4 $^{\circ}\text{C}$ から取り出して室温に戻した SPRI ビーズ 33 μL を加え、ピペッティングで混和し、室温で 8 分間静置した。磁器スタンドにサンプルをセットし、5 分間静置してビーズがチューブの底に集積したのを確認後、ピペットマンで上清を除いた。サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、用時調製した室温の 80%エタノール 200 μL を、ビーズを崩さないように静かに加えて 30 秒間静置した。サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、ピペットマンで上清を除いた。サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、再び、用時調製した室温の 80%エタノール 200 μL を、ビーズを崩さないように静かに加えて 30 秒間静置した。サンプルを磁器スタンドにセットしたままピペットマンで上清を除き、1 分間スピンドウンした。サンプルを磁器スタンドにセットし、上清をピペットマンで除いてチューブの蓋を開け、サランラップをかぶせて 5 分間室温で静置し、風乾した。Nuclease-Free Water 15 μL を加え、ピペッティングでビーズと水を混和し、磁器スタンドにセットした。5 分間静置し、上清が透明になったのを確認後、上清 13.5 μL をピペットマンで新しい 0.2-mL チューブに移した (サンプル 1)。次に cDNA を合成した。サンプル 1 (13.5 μL) に 10 $\times$ Total RNA First-Strand Buffer 2 μL を加え、タッピングとスピンドウンを行い、94 $^{\circ}\text{C}$ に加温しておいたサーマルサイクラーにセットした。94 $^{\circ}\text{C}$ で 3 分間加温し、サンプルをすぐに氷上に移し、2 分間静置した (サンプル 2)。氷上で、以下の組成でマスターミックスを調製し、マスターミックス 4.5 μL をサンプル 2 に加えた。

- SMARTer Stranded Oligonucleotide (12 μ M) 0.5 μ L
- RNase Inhibitor 2 μ L
- PrimeScript Reverse Transcriptase (200 U/ μ L) 2 μ L

ピペッティングで混和し、スピンドウンした。42°C に加温しておいたサーマルサイクラーにセットし、42°C で 60 分間加温した。その後、70°C で 10 分間加温し、反応を止めた。加温後、サンプルを氷上に移した（サンプル 3）。合成した cDNA を精製するために以下の操作を行った。4°C から取り出して室温に戻した SPRI ビーズ 20 μ L をサンプル 3 に加え、最大速度のボルテックスで 5 秒間混和した。室温で 8 分間静置し、スピンドウンした。サンプルを磁器スタンドにセットし、5 分間静置した。上清が透明になったのを確認後、サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、ピペットマンで上清を除いた。サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、用時調製した室温の 80%エタノール 200 μ L を、ビーズを崩さないように静かに加えて 30 秒間静置した。上清をピペットマンで除き、サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、再び、用時調製した室温の 80%エタノール 200 μ L を、ビーズを崩さないように静かに加えて 30 秒間静置した。サンプルを磁器スタンドにセットしたままピペットマンで上清を除き、1 分間スピンドウンした。サンプルを磁器スタンドにセットし、上清をピペットマンで除いてチューブの蓋を開け、サランラップをかぶせて 5 分間室温で静置し、風乾した（サンプル 4）。続いて、RNA-Seq 用に精製した cDNA の増幅を行った。インデックスごとに、以下の組成でマスターミックスを調製し、サンプル 4 に 50 μ L 加えた。

- 2×SeqAmp PCR Buffer 25 μ L
- Forward PCR Primer HT (12.5 μ M) 1 μ L
- Reverse PCR Primer HT (12.5 μ M) 1 μ L
- SeqAmp DNA Polymerase 1 μ L
- Nuclease-Free Water 22 μ L

タッピングとスピンドウンを行い、サーマルサイクラーにセットし、以下のプログラムで PCR を行った（サンプル 5）。

94°C、1 分
↓
[98°C、15 秒→55°C、15 秒→68°C、1 分]×12 サイクル
↓
終了（12°C で一時保存可能）

PCR で増幅した cDNA ライブラリを精製するために、以下の操作を行った。4°C から取り出

して室温に戻した SPRI ビーズ 20 μ L をサンプル 5 に加え、最大速度のボルテックスで 5 秒間混和した。室温で 8 分間静置し、スピンドウンした。サンプルを磁器スタンドにセットし、5 分間静置した。上清が透明になったのを確認後、サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、ピペットマンで上清を除いた。サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、用時調製した室温の 80%エタノール 200 μ L を、ビーズを崩さないように静かに加えて 30 秒間静置した。上清をピペットマンで除き、サンプルを磁器スタンドにセットしたまま、再び、用時調製した室温の 80%エタノール 200 μ L を、ビーズを崩さないように静かに加えて 30 秒間静置した。サンプルを磁器スタンドにセットしたままピペットマンで上清を除き、1 分間スピンドウンした。サンプルを磁器スタンドにセットし、上清をピペットマンで除いてチューブの蓋を開け、サランラップをかぶせて 5 分間室温で静置し、風乾した。Stranded Elution Buffer 20 μ L を加え、室温で 2 分間静置し、ピペッティングで 10 回以上混和した。サンプルを磁器スタンドにセットし、1 分間静置して、上清が透明になったのを確認後、上清を新しい 0.2-mL チューブに移した（この上清に目的の cDNA ライブラリが含まれていた）。cDNA ライブラリのサイズ分布を確認するために、High Sensitivity DNA キットと Agilent 2100 バイオアナライザ電気泳動システムを使用した。バイオアナライザの電極の洗浄は、Agilent RNA6000 ピコキットと同様に行った。cDNA ライブラリの濃度を TE バッファーで 5–500 pg/ μ L に調製し、10 μ L を新しい核酸低吸着チューブに移した。未開封の Gel 1 バイアルに Dye 15 μ L を加え、最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌した（Gel-Dye Mix）。Gel-Dye Mix 全量をスピンフィルターに加え、2,240 $\times$ g、室温、10 分間遠心し、ろ過した。ろ過した Gel-Dye Mix を最大速度のボルテックスで 1 分間攪拌し、スピンドウンして、遮光した。実験に使わない Gel-Dye Mix は 4°C で保存した（保存期限は調製から 6 週間）。チップ調製スタンドを組み立て、底面プレートの位置を C に合わせた。クリップのストッパーの位置を下段にセットし、シリンジのプランジャーを 1 mL の位置まで引き上げた。Gel-Dye Mix 9 μ L をラボチップの白抜き G のウェルに加え、チップ調製スタンドにセットし、ふたを閉めた。プランジャーをクリップの位置まで押して、クリップに引っ掛け、60 秒間静置した。クリップのストッパーを外して 5 秒間静置し、プランジャーを元の位置（1 mL の位置）までゆっくりと引き上げた。ラボチップを取り出し、光にかざしてゲルが補充されたことを確認し、Gel-Dye Mix 9 μ L をラボチップの G のウェル（3 か所）に加えた。マーカーを 5 μ L ずつウェル 1–11 とラダウェルに加えた。調製したラダ 1 μ L をラダウェルに加え、濃度を調整した cDNA ライブラリ 1 μ L を、サンプルごとにウェル 1–11 のいずれかのウェルに加えた（最大で 11 種類の cDNA ライブラリを測定可能）。専用ミキサーにラボチップをセットし、2400/min の目盛りにつまみを合わせて 1 分間攪拌した。攪拌したラボチップをバイオアナライザにセットし、High Sensitivity DNA プログラムを選択して、解析を開始した。RNA-Seq は九州大学の

大川研究室に実施していただいた。データ解析には、RaNA-Seq (<https://ranaseq.eu/>) と Gene Ontology (<http://geneontology.org/docs/introduction-to-go-resource/>) を使用した。

第三章 PC と CB と HLB の相互作用

実験 1 PC の生細胞観察

実験目的と実験方法

PC の定義を明確にするために大きさや数などを定量し、さらに、PC がいつ形成されるのかを明らかにすることを目的とした。緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を RPB1 遺伝子の 5'側上流にノックインした HCT116 細胞 (以下 KI 細胞) を作製し、PC を観察した。HCT116 細胞は染色体数が正常に近い数 (pseudo diploid) を示すとされており (参考ウェブサイト 1)、EGFP のノックインは全ての RPB1 遺伝子に対して行われた (homozygous knock-in)。PC のリン酸化状態は、免疫染色により調べた。細胞周期の進行具合は、細胞周期マーカーである PCNA に赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合させたタンパク質 (mCherry-PCNA) を発現させて測定した [Kleppa et al, 2012]。画像解析や顕微鏡の設定に関しては、特に注釈がない限り第二章を参照 (以下同様)。

実験結果

本研究で使用したセルラインの関係図を図 3 に示す。

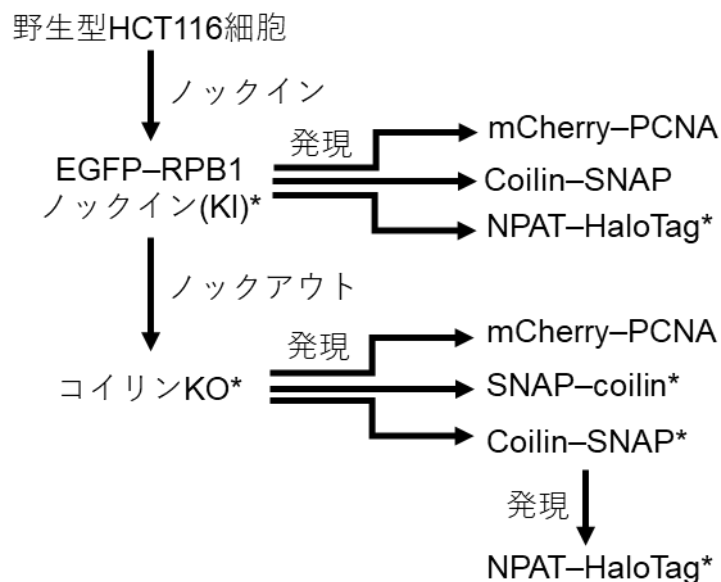


図 3 本研究で使用した主なセルラインの関係図

野生型 HCT116 細胞に TALEN を用いて EGFP を RPB1 遺伝子にノックインし、全ての RPB1 タンパク質を可視化した。Cas9 ニッカーゼを用いて、KI 細胞のコイリン遺伝子をノックアウトし、コイリン KO 細胞を樹立した。mCherry-PCNA、coilin-SNAP、NPAT-HaloTag は PiggyBac システムを用いて細胞に導入し、安定発現株を樹立した。アスタリスク (*) はシングルセルクローニングにより、セルライン化したことを意味する。

EGFP が RPB1 遺伝子に正しくノックインされているかどうかを確認するために、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、EGFP を融合させたことによる RPB1 のサイズの増加と（図 4 左）、抗 GFP 抗体の結合を検出できた（図 4 右）。

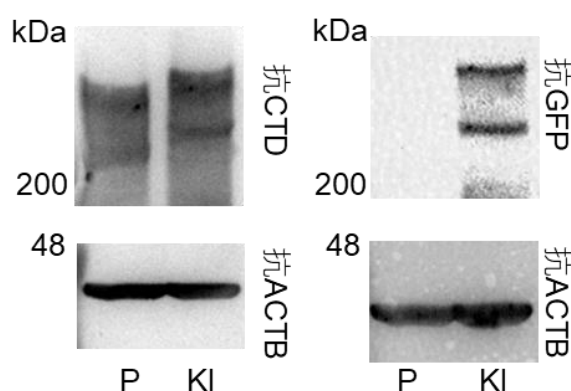
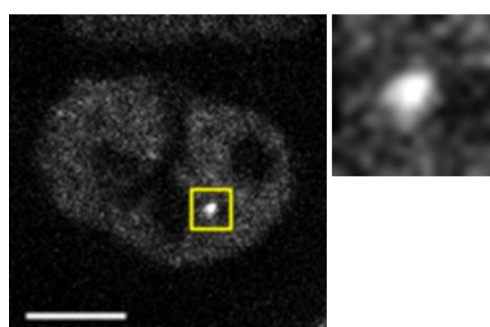


図 4 KI 細胞のウェスタンブロッティング画像

抗 RPB1 CTD 抗体、抗 GFP 抗体、抗 β アクチン (ACTB) 抗体を用いたウェスタンブロッティングの画像。P: 野生型 HCT116 細胞、KI: KI 細胞。使用したアクリルアミドゲルは 5–20% 濃度のグラディエントゲル。

次に、PC のサイズを測定した（図 5、 $n=50$ 細胞）。野生型 HCT116 細胞と KI 細胞の間で結果に大きな差は見られなかった。PC の数は、KI 細胞では 5.4 ± 2.2 個/細胞（平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=100$ 細胞）、野生型 HCT116 細胞では 8.9 ± 3.7 個/細胞（平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=100$ 細胞）だった（表 3）。PC の数が、野生型 HCT116 細胞に比べて KI 細胞で減少した理由は、野生型 HCT116 細胞の免疫染色では可視化された小さな PC が、EGFP が示す核質のバックグラウンドが原因で、KI 細胞では観察されなかった可能性が挙げられる。



	野生型	KI
数 (個/核)	8.9 ± 3.7	5.4 ± 2.2
最大フェレット直径 (μm)	0.61	0.66
周長 (μm)	2.04	2.27
面積 (μm^2)	0.26	0.32
球形度	0.88	0.88
真円度	0.42	0.48

図 5 生細胞中の PC とその形態に関するパラメーター

（左）KI 細胞中の EGFP-RPB1 の共焦点顕微鏡画像。1 セクションの画像を示している。PC は黄色の枠でハイライトと拡大されている。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ 。（右）PC の形態に関するパラメーターの測定結果。数 (個/核) は 100 個、それ以外のパラメーターは 50 個の細胞を計測し、その平均値 $\pm$ 標準偏差または平均値を示している。

PC に含まれる CTD のリン酸化状態を免疫染色により調べたところ、EGFP-RPB1 が形成する PC は、非リン酸化、S5P、S7P の CTD を含む一方で、S2P と T4P の CTD は含まなかった（図 6A）。この結果は、野生型 HCT116 細胞の結果と同様であった（図 6B）。

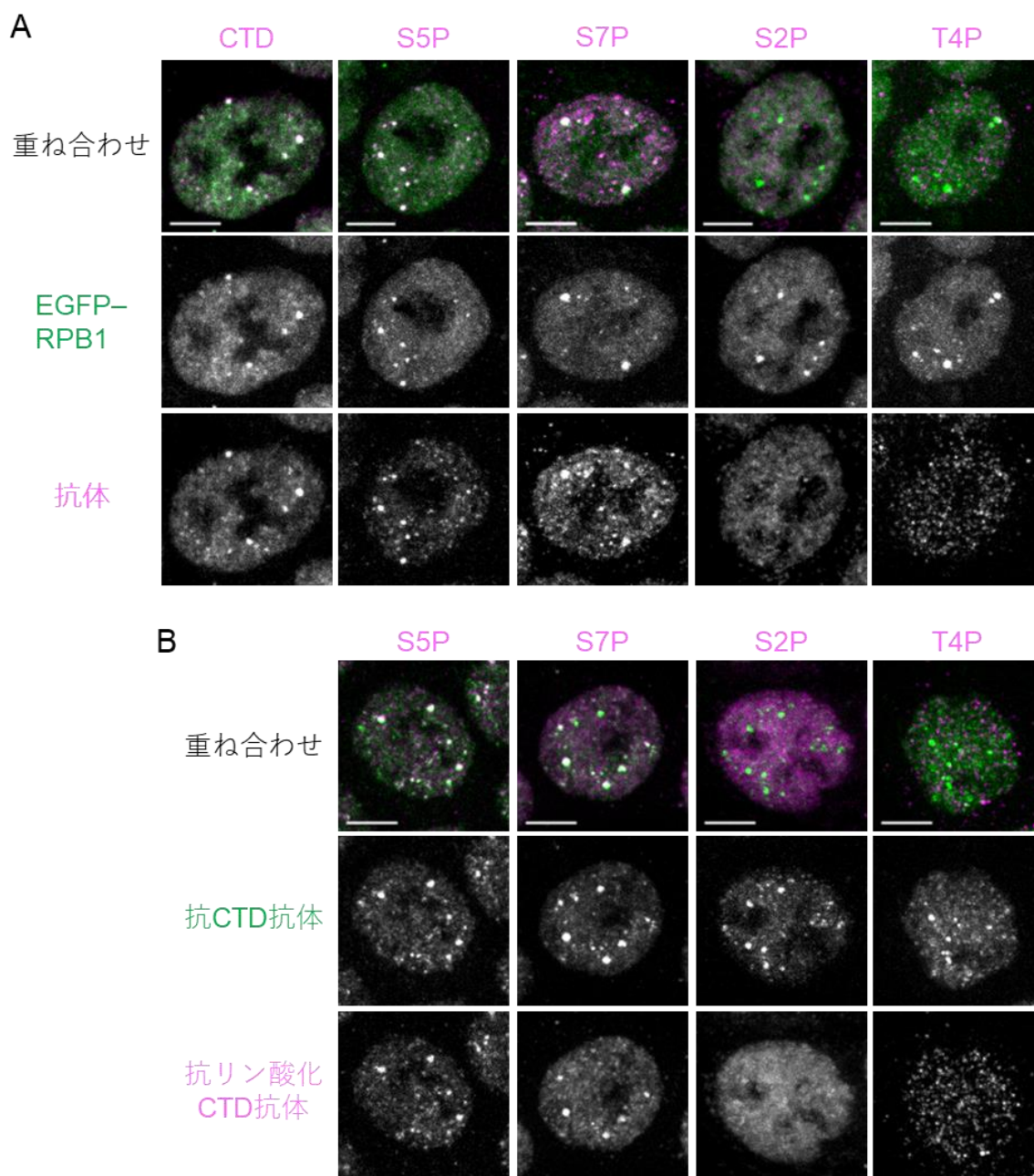


図 6 PC のリン酸化状態

(A) KI 細胞の免疫染色画像。EGFP-RPB1（中段）は緑、抗体（下段、左から抗 CTD、抗 S5P CTD、抗 S7P CTD、抗 S2P CTD、抗 T4P CTD）はマゼンタで示した。(B) 野生型 HCT116 細胞の免疫染色画像。抗 CTD 抗体（中段）は緑、抗リン酸化 CTD 抗体（下段、左から抗 S5P CTD、抗 S7P CTD、抗 S2P CTD、抗 T4P CTD）はマゼンタで示した。全ての画像は Z 軸方向の Max-Intensity-Projection（以下 MIP）画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 31 枚から 54 枚。スケールバーは 5 μm 。

セルライン	PC	CB	HLB	SMNの輝点	TCAB1の輝点
野生型HCT116細胞	8.9 ± 3.7	2.8 ± 1.2	3.5 ± 1.3	3.3 ± 1.9	3.4 ± 1.3
KI細胞	5.4 ± 2.2	2.8 ± 1.3	3.3 ± 1.1	2.6 ± 1.3	2.6 ± 0.9
コイリンKO細胞	5.4 ± 2.1 (クローン1) 5.3 ± 1.9 (クローン2)	未計測	3.1 ± 1.0 (クローン1)	4.6 ± 3.2 (クローン1)	未計測
SNAP-coilinを発現させた コイリンKO細胞	5.0 ± 1.8	2.8 ± 1.9	3.3 ± 1.0	未計測	未計測
coilin-SNAPを発現させた コイリンKO細胞	4.6 ± 1.7	3.6 ± 1.4	2.8 ± 1.1	未計測	未計測
coilin-SNAPとNPAT-HaloTagを 発現させたコイリンKO細胞	未計測	未計測	2.9 ± 0.9	未計測	未計測
SNAP-coilin(S489D)を発現させた コイリンKO細胞	3.8 ± 1.2	未計測	未計測	未計測	未計測
coilin(S489D)-SNAPを発現させた コイリンKO細胞	4.9 ± 1.7	未計測	未計測	未計測	未計測

表 3 セルラインごとの NB の数の測定結果

平均値 ± 標準偏差で示した。計測した細胞の数は全て 100 個。

PC が細胞周期においていつ出現するのかを明らかにするために、mCherry-PCNA を発現させた KI 細胞を生細胞観察した (図 7)。その結果、PC は、G₁ 期から M 期前半まで存在し、S 期初期に数が増える傾向にあることが分かった。

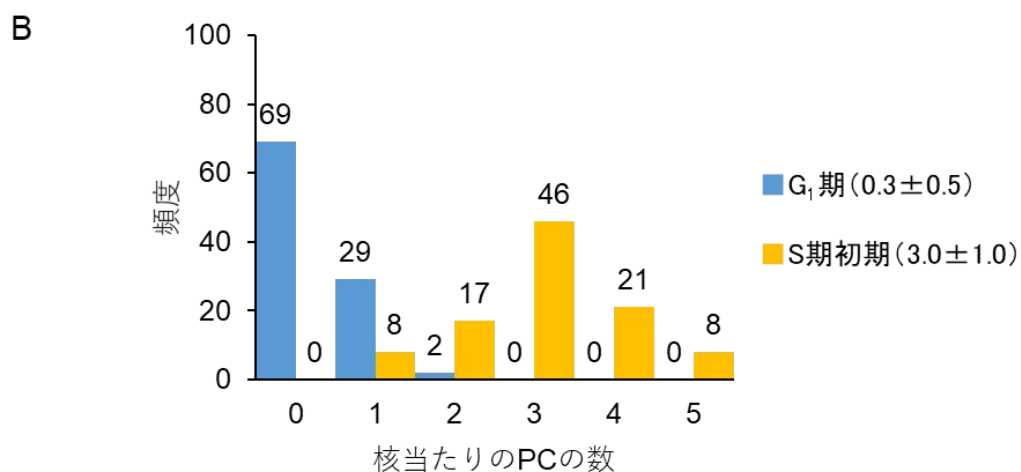
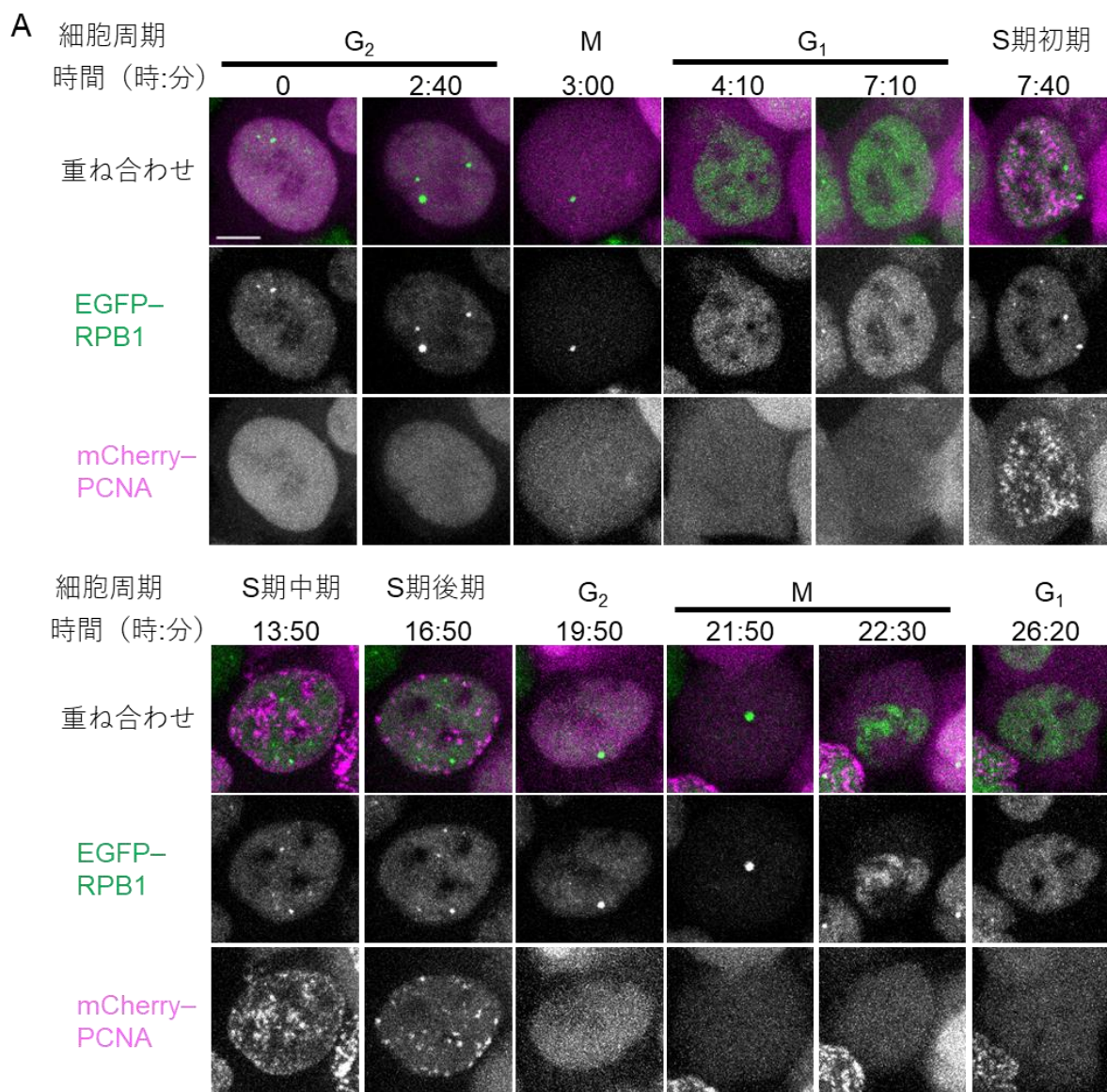


図 7 細胞周期に依存した PC の数の変動

(A) mCherry-PCNA を発現させた KI 細胞を生細胞観察した時のタイムラプス画像。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は $0.8\ \mu\text{m}$ 。MIP に使用した画像数は全て 15 枚。スケールバーは $5\ \mu\text{m}$ 。(B) G_1 期と S 期初期の PC の数の比較。タイムラプス画像を解析し、数を算出した。右側には平均値 $\pm$ 標準偏差を示した。計測した細胞の数は 100 個。

実験 2 PC と CB または HLB の生細胞観察

実験目的と実験方法

PC と CB または PC と HLB を生細胞内で同時に可視化し、これら 2 種類の NB 同士がどのように相互作用するのかを明らかにすることを目的とした。PC と CB の観察には、コイリンの C 末端に SNAP-tag を融合した *coilin*-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞を使用した (図 3)。また、PC と HLB の観察には、NPAT タンパク質の C 末端に HaloTag を融合させた NPAT-HaloTag を発現させた KI 細胞を使用した (図 3)。

実験結果

まず、コイリン KO 細胞に *coilin*-SNAP を発現させた細胞の生細胞観察の結果を図 8 に示す。生細胞観察から、PC は *coilin*-SNAP で可視化された CB の近くに出現することが確認された。ただし、CB から離れた場所に形成される PC も観察された。

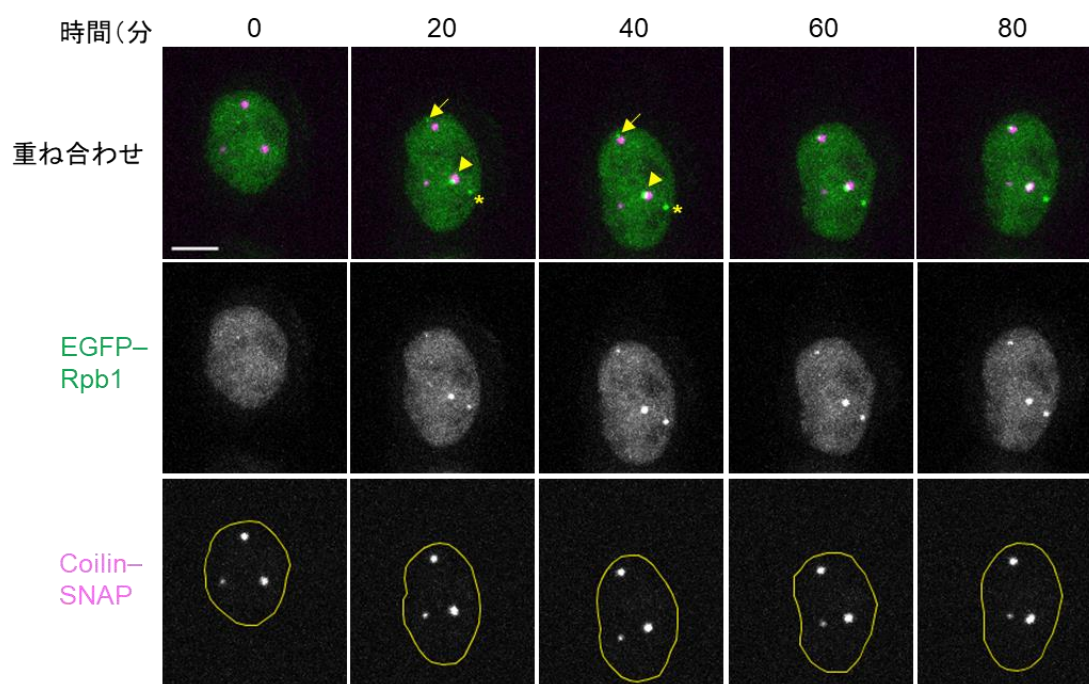


図 8 PC と CB の生細胞内での相互作用

Coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞の共焦点顕微鏡を用いた生細胞観察のタイムラプス画像。EGFP-RPB1 (緑) と SNAP-Cell 647-SiR でラベルした *coilin*-SNAP (マゼンタ) の画像。矢印は CB の近くに出現した PC を示す。アスタリスクは CB から離れた場所に出現した PC を示す。矢頭は CB と相互作用した後に大きくなった PC を示す。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.9 μm 。MIP に使用した画像数は全て 17 枚。スケールバーは 5 μm 。

次に、KI 細胞に NPAT-HaloTag を発現させた細胞の生細胞観察の結果を図 9 に示す。生細胞観察から、PC は NPAT-HaloTag で可視化された HLB の近くに出現することが確認された。ただし、HLB の出現と同時に PC が出現するパターンや、HLB から離れた場所に PC が出現するパターンも観察された。

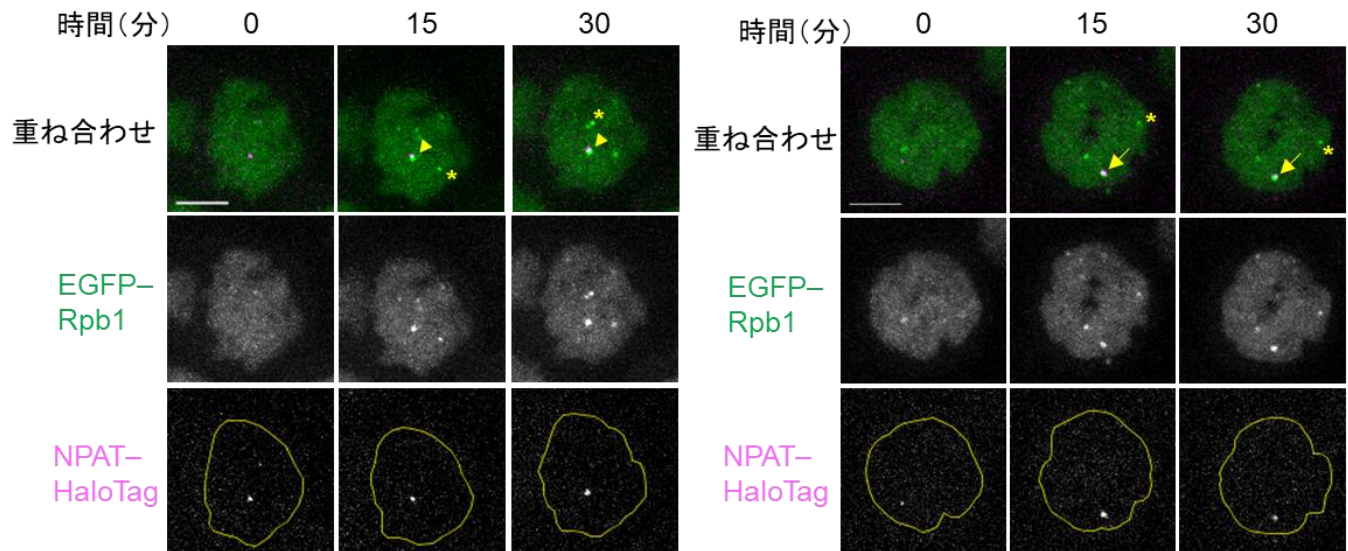


図 9 PC と HLB の生細胞内での相互作用

NPAT-HaloTag を発現させた KI 細胞の共焦点顕微鏡を用いた生細胞観察のタイムラプス画像。EGFP-RPB1（緑）と Janelia Fluor 646 HaloTag リガンドでラベルした NPAT-HaloTag（マゼンタ）の画像。矢印は HLB の近くに出現した PC を示す。アスタリスクは HLB から離れた場所に出現した PC を示す。矢頭は HLB と同時に出現した PC を示す。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.9 μm 。MIP に使用した画像数は全て 17 枚。黄色の線は核の輪郭を示す。スケールバーは 5 μm 。

PC の出現パターンを表 4 にまとめた。この結果から、PC は CB から離れた場所に出現しやすい傾向である一方で、PC は HLB と相互作用した状態で出現しやすい傾向にあることが分かった。

Coilin-SNAPを発現させた コイリンKO細胞 (n = PC 232個/75細胞)	CBから離れた場所に出現したPC		
	CBの近くに出現したPC	CBとは相互作用しなかったPC	CBと相互作用したPC
	38%	59%	3%
NPAT-HaloTagを発現させたKI細胞 (n = PC 226個/75細胞)	HLBの近くに出現したPC	HLBと同時に出現したPC	HLBから離れた場所に出現したPC
	51%	25%	24%

表 4 PC と CB または HLB の生細胞内での相互作用の解析結果

次に PC と CB の二者複合体（以下、PC-CB）と、PC と HLB の二者複合体（以下、PC-HLB）がいつまで維持されるのかを調べた（図 10）。PC-CB と PC-HLB の両方とも、S 期初期の間に解消する傾向にあり、遅くとも S 期中期が終了するまでに解消する傾向にあった。なお、細胞周期の時間は、KI 細胞に mCherry-PCNA を発現させた細胞を生細胞観察して測定した。

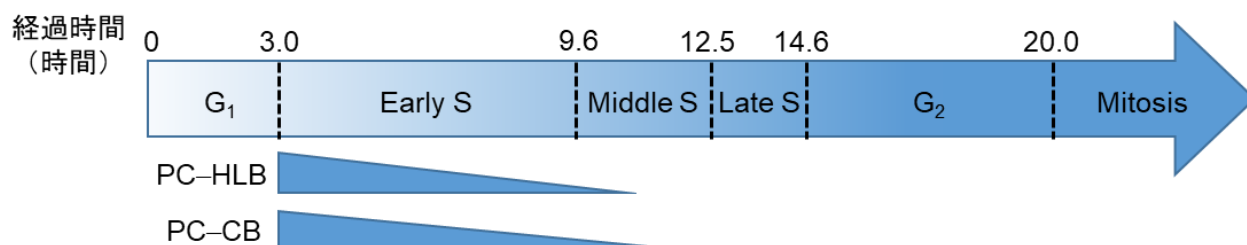


図 10 PC-CB と PC-HLB の維持時間

細胞周期の進行は mCherry-PCNA を発現させた KI 細胞の生細胞観察により定量した。PC-CB の維持時間は、coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞の生細胞観察により定量した。PC-HLB の維持時間は、NPAT-HaloTag を発現させた KI 細胞の生細胞観察により定量した。

PC-CB と PC-HLB の消失パターンを表 5 に示す。PC-CB と PC-HLB の両方において、それぞれの NB が分離して二者複合体が解消するパターンよりも、片方の NB が消失する、または、二者複合体が同時に消失するパターンの頻度が高かった。

		PC-CB	PC-HLB
NB複合体の数 (細胞数)		29 (22)	32 (22)
複合体形成から 解消するまでの時間	~6.6時間 (S期初期)	90%	76%
	~9.5時間 (S期中期)	10%	24%
NB複合体の 解消パターン	PCのみが消失	38%	46%
	PCとCBまたはHLBの両方が消失	34%	42%
	CBまたはHLBのみが消失	21%	12%
	PC-CBまたはPC-HLBが分離	7%	0%

表 5 PC-CB と PC-HLB の維持時間とその解消パターン

細胞周期の進行は mCherry-PCNA を発現させた KI 細胞の生細胞観察により定量した。PC-CB の維持時間は、coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞の生細胞観察により定量した。PC-HLB の維持時間は、NPAT-HaloTag を発現させた KI 細胞の生細胞観察により定量した。

実験3 PCとCB、HLBの生細胞観察

実験目的と実験方法

PCとCB、HLBの三種類のNBを生細胞内で同時に可視化し、これら三種類のNBがどのように相互作用するのかを明らかにすることを目的とした。コイリンKO細胞にcoilin-SNAPとNPAT-HaloTagを同時に発現させた細胞(図3)を、生細胞観察した。

実験結果

コイリンKO細胞にcoilin-SNAPとNPAT-HaloTagを同時に発現させた細胞を40時間生細胞観察した(図11から13)。その結果、PCとCB、HLBの三者複合体(PC-CB-HLB)の形成が観察された。NB複合体の中で、最も形成頻度が高かったのは、PC-HLBだった(図11)。

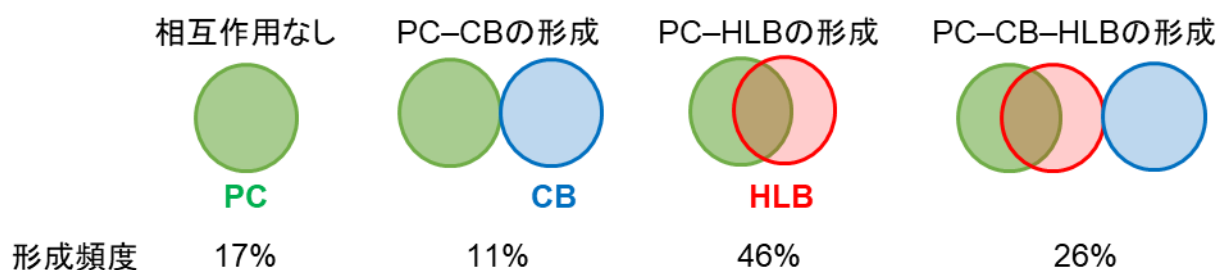


図11 生細胞内でのPCの長時間観察結果

コイリンKO細胞にcoilin-SNAPとNPAT-HaloTagを同時に発現させた細胞を40時間生細胞観察し、PCが出現してから、どのような相互作用のパターンを示すかを解析した。n=PC 382個/100細胞。

次に、PC-CB-HLBの形成経路を調べた。その結果、3パターンの形成経路が観察された(図12と図13)。

経路A) CBの近くにPC-HLBが出現して、PC-CB-HLBが形成される経路。PC-CB-HLBは、この経路によって形成される頻度が高かった(53%)。

経路B) 既に形成されたPC-HLBが既に形成されたCBと相互作用して、PC-CB-HLBが形成される経路(32%)。

経路C) 既に形成されたCB-HLB二者複合体の近くにPCが出現する経路(15%)。

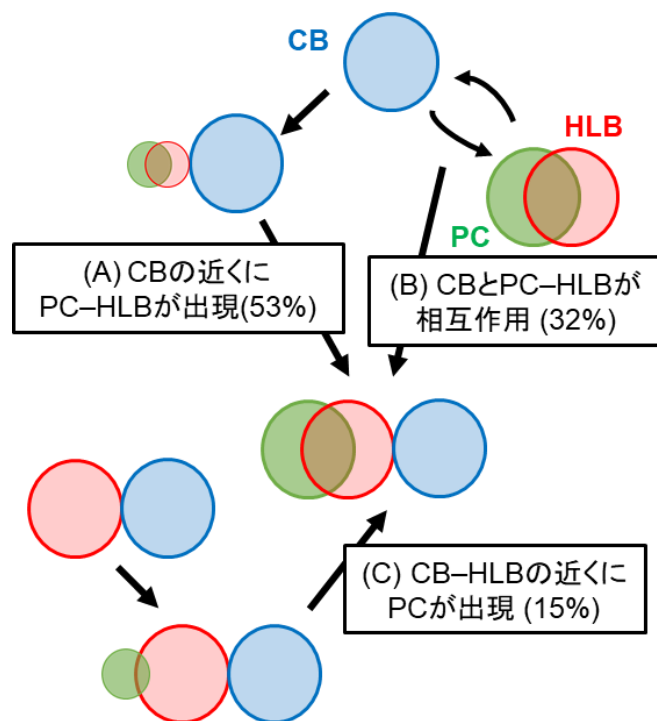


図 12 PC-CB-HLB 三者複合体の形成経路

コイリン KO 細胞に coilin-SNAP と NPAT-HaloTag を同時に発現させた細胞を 40 時間生細胞観察した。PC-CB-HLB が形成された場合、どのような経路で形成されたのかを動画を逆再生することで解析した。n = PC-CB-HLB 142 個/100 細胞。

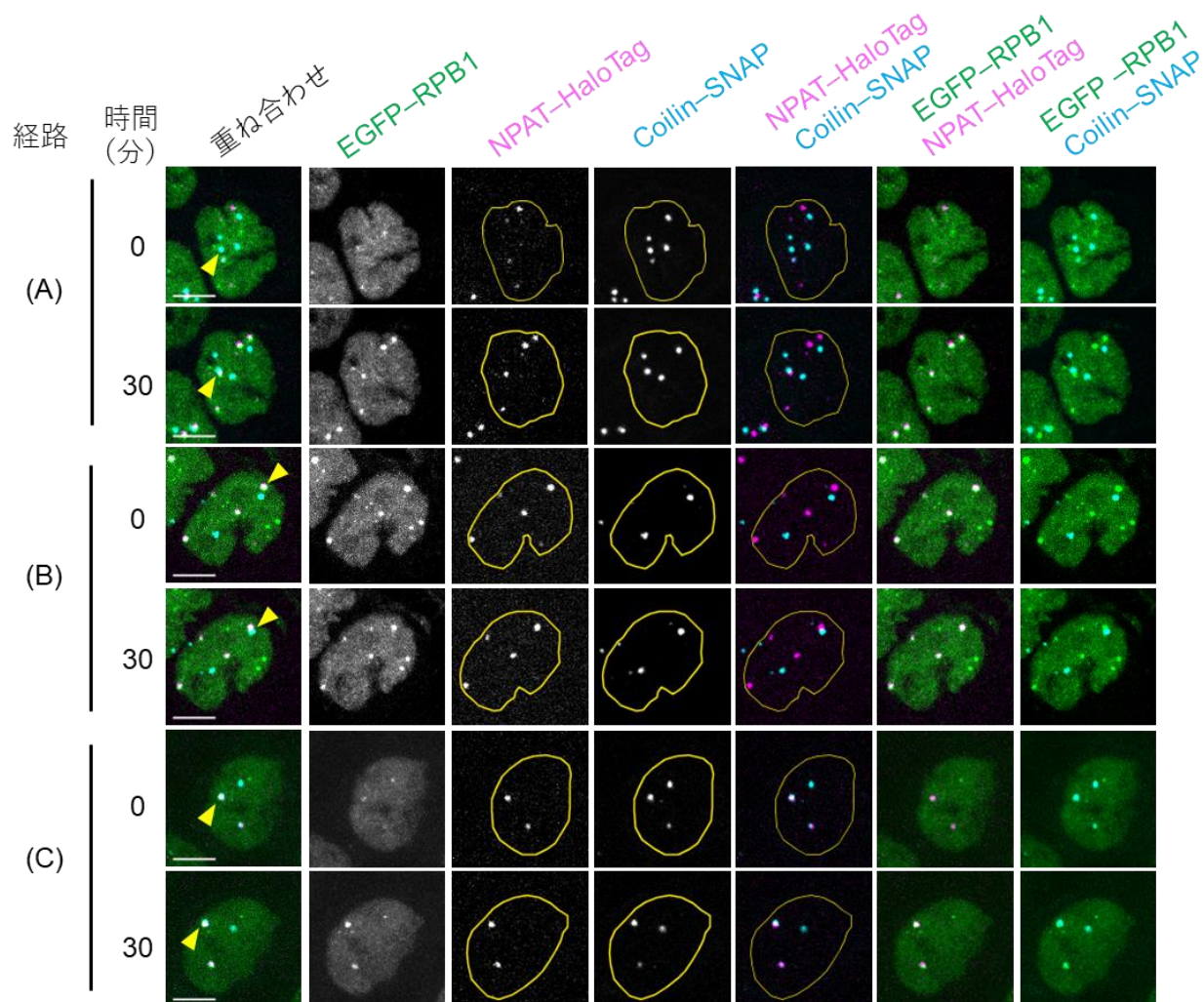


図 13 PC-CB-HLB 三者複合体形成のタイムラプス画像

経路 A) CB の近くに PC-HLB が出現して、PC-CB-HLB が形成される経路。PC-CB-HLB は、この経路によって形成される頻度が高かった (53%)。経路 B) 既に形成された PC-HLB が既に形成された CB と相互作用して、PC-CB-HLB が形成される経路 (32%)。経路 C) 既に形成された CB-HLB 二者複合体の近くに PC が出現する経路 (15%)。黄色の矢頭は PC-CB-HLB の三者複合体を示し、黄色の線は核の輪郭を示す。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.75 μm。MIP に使用した画像数は全て 13 枚。スケールバーは 5 μm。

実験 4 免疫染色による PC と CB と HLB の相互作用(共焦点と超解像顕微鏡)

実験目的と実験方法

実験 3 において、PC と CB、HLB が生細胞内で三者複合体を形成することが分かった。しかし、生細胞観察の結果は、蛍光タンパク質を融合させたことによるアーティファクトである可能性もある。そこで、三重免疫染色により、生細胞観察の結果は蛍光タンパク質によるアーティファクトでないことを示すために実験を行った。野生型 HCT116 細胞を、蛍光色素で修飾したマウス抗 CTD 抗体 Fab (C13B9)、ラビット抗コイリン抗体、マウス抗 NPAT 抗体 (27) を用いて、三重免疫染色を行った。観察には、共焦点顕微鏡と超解像顕微鏡を使用した。超解像顕微鏡システムはオリンパス社の IXplore SpinSR を使用した。対物レンズは油浸 60 倍レンズ (NA=1.40) を使用した。

実験結果

生細胞観察の結果と同様に、野生型 HCT116 細胞を免疫染色した場合も、PC-CB-HLB の形成を確認できた。3 つの NB の相互作用の有無をベン図で示す (図 14)。実際の免疫染色の画像を図 15 に示す。

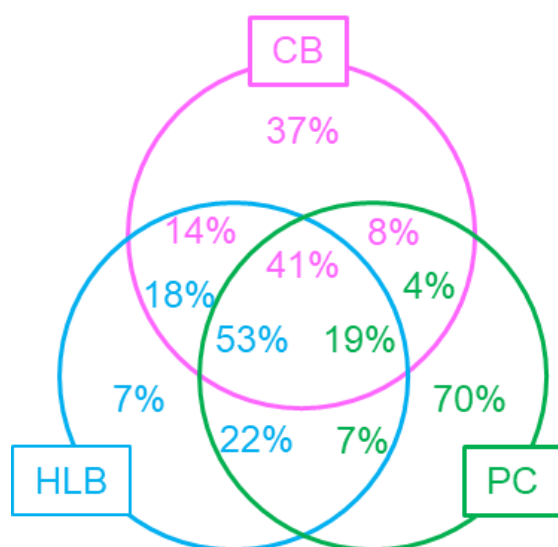


図 14 内在性の RPB1 CTD(PC)、コイリン(CB)、NPAT(HLB)の相互作用

野生型 HCT116 細胞を蛍光色素で修飾したマウス抗 CTD 抗体 Fab (C13B9)、ラビット抗コイリン抗体、マウス抗 NPAT 抗体 (27) で三重免疫染色し、各 NB 同士の重なりを定量化した。n = 100 細胞

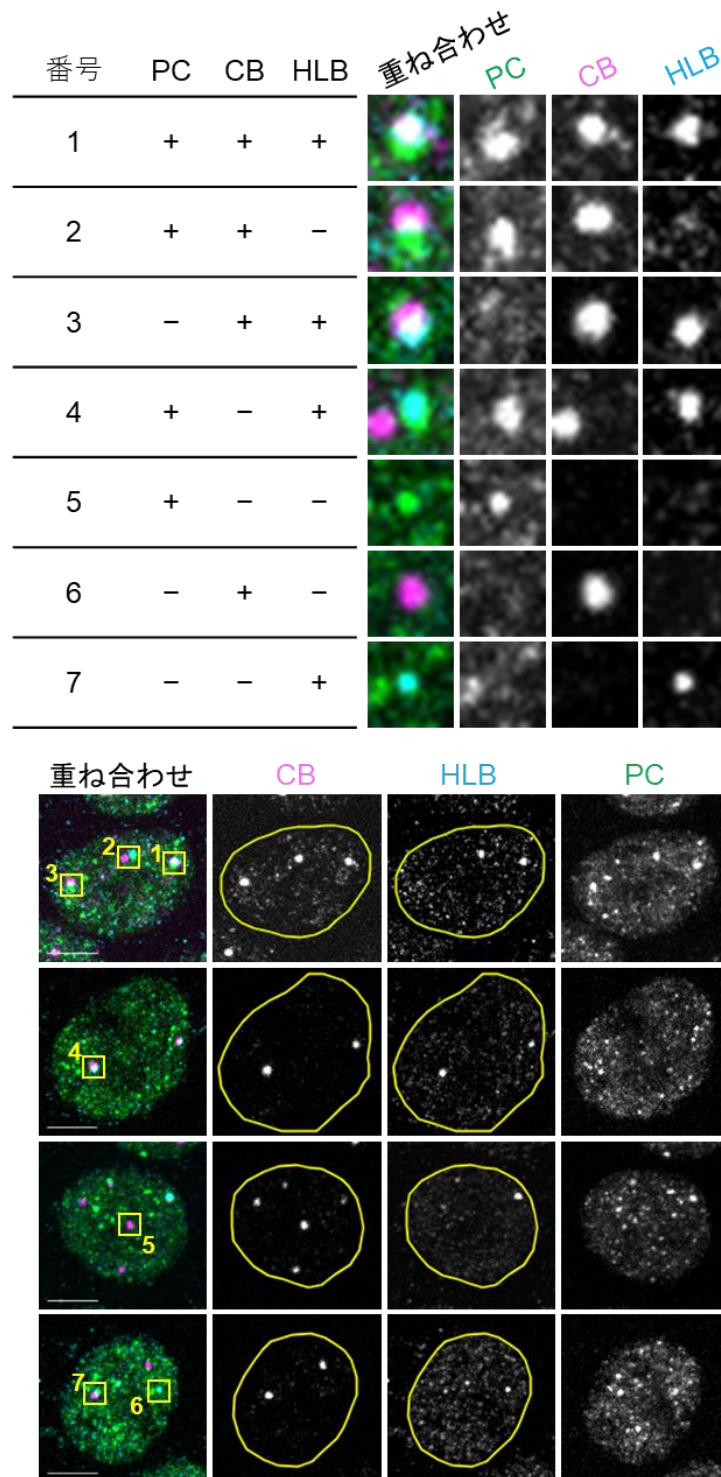


図 15 内在性の RPB1 CTD(PC)、コイリン(CB)、NPAT(HLB)の相互作用(免疫染色)

免疫染色画像。野生型 HCT116 細胞を蛍光色素で修飾したマウス抗 CTD 抗体 Fab (C13B9、緑)、ラビット抗コイリン抗体 (マゼンタ)、マウス抗 NPAT 抗体 (27、シアン) で三重免疫染色した。上の拡大図は下の画像の黄色で囲まれた部分を拡大している。全ての画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 48 から 54 枚。黄色の線は核の輪郭を示す。スケールバーは 5 μm 。

免疫染色により、NB 同士の相互作用には「共局在」、「隣接」、「相互作用なし」の 3 種類存在することが分かった（図 16、第二章 5. 画像解析も参照）。相互作用の種類毎の割合に関しては後述する（図 22 と 27、30、31）。

NB 同士が本当に共局在しているのか、解像度が低いために隣接しているにもかかわらず共局在しているように見えるだけなのかを調べるために、共焦点顕微鏡よりも解像度が高いと言われている超解像顕微鏡を用いて観察を行った（図 17）。その結果、PC は HLB と共局在している一方で、CB とは隣接している様子が観察された。今後、より細胞数を増やして相互作用割合を定量し、統計的にデータを解析する必要があるものの、NB 同士の相互作用様式に共局在と隣接の 2 種類が存在する可能性は高いように思われた。

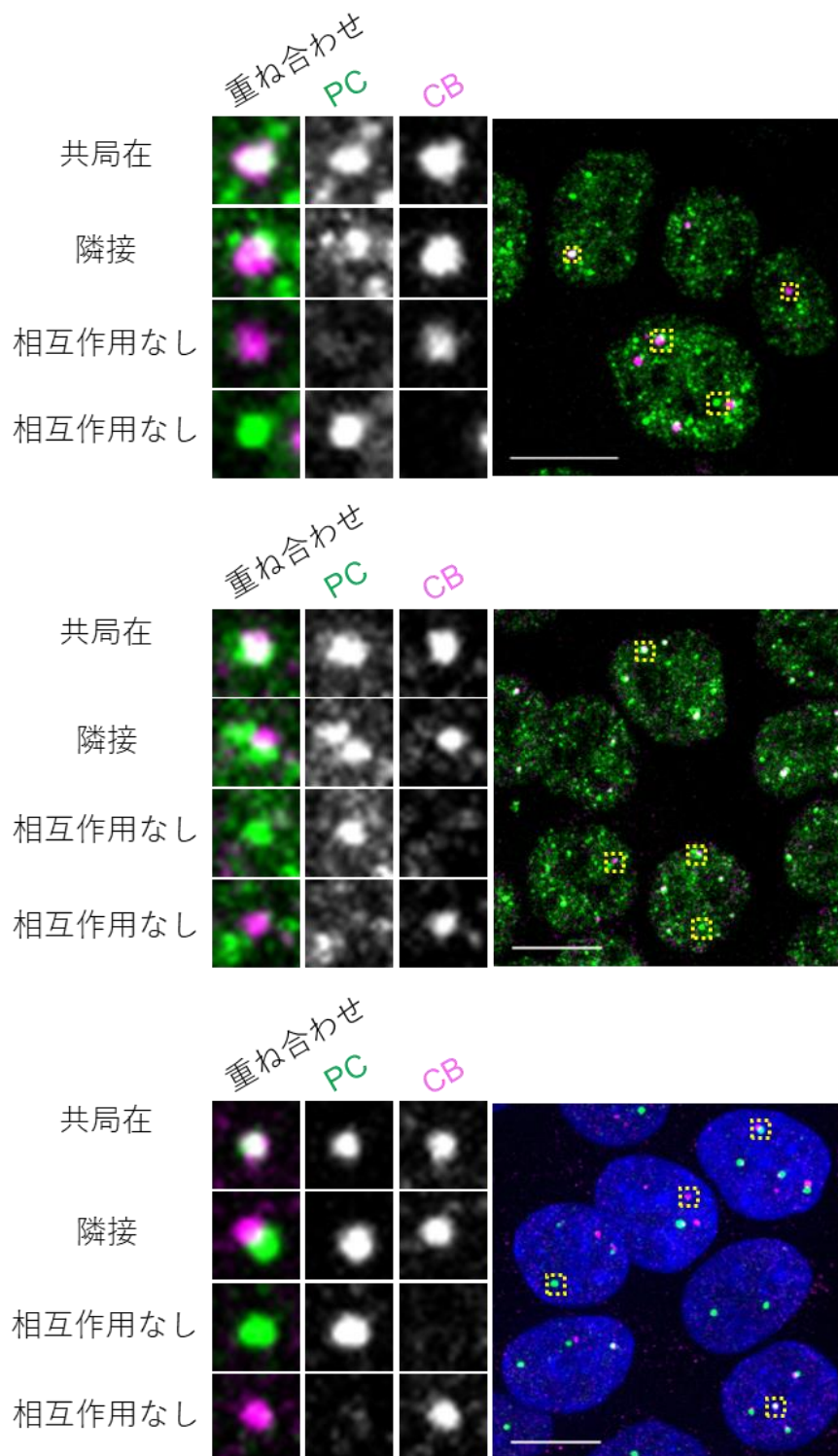
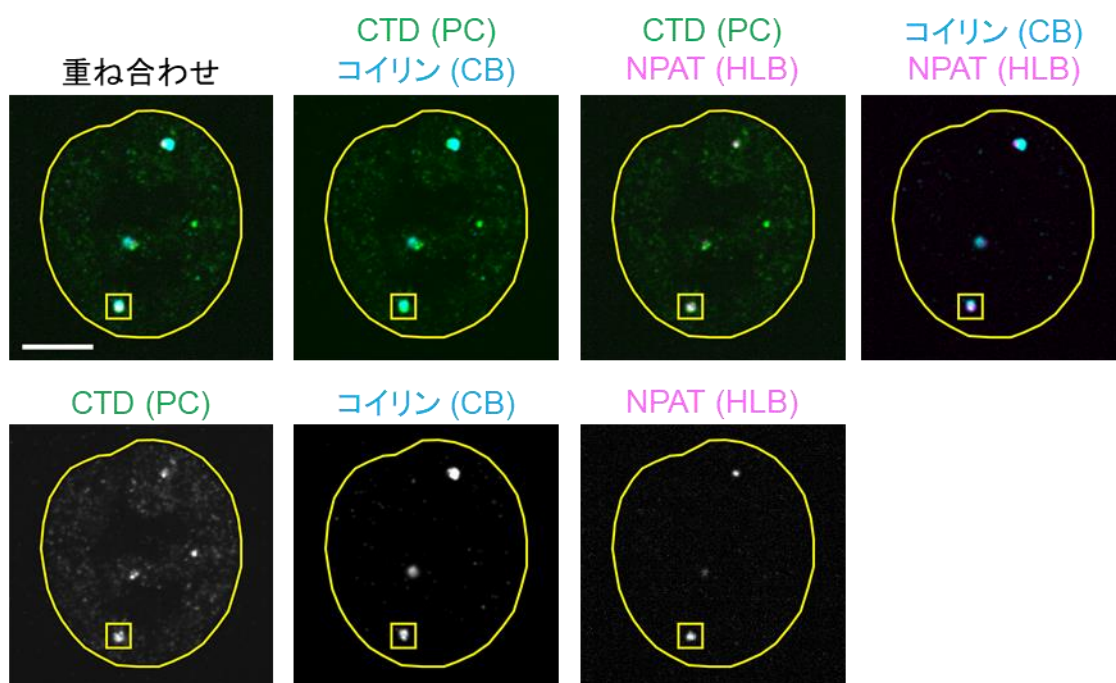


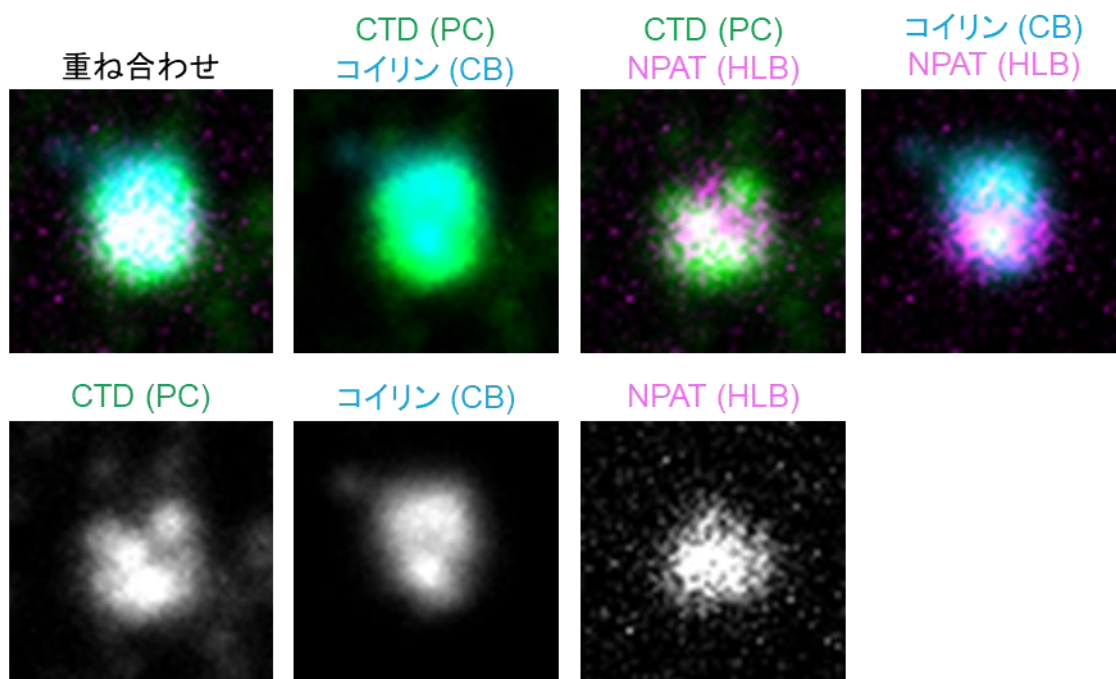
図 16 NB の「共局在」、「隣接」、「相互作用なし」の状態を示す免疫染色画像

野生型 HCT116 細胞の免疫染色画像。染色条件は図 14 と同様。左の拡大図は右の画像の黄色で囲まれた部分を拡大している。全ての画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は $0.3 \mu\text{m}$ 。MIP に使用した画像数は 48 から 54 枚。黄色の線は核の輪郭を示す。スケールバーは $10 \mu\text{m}$

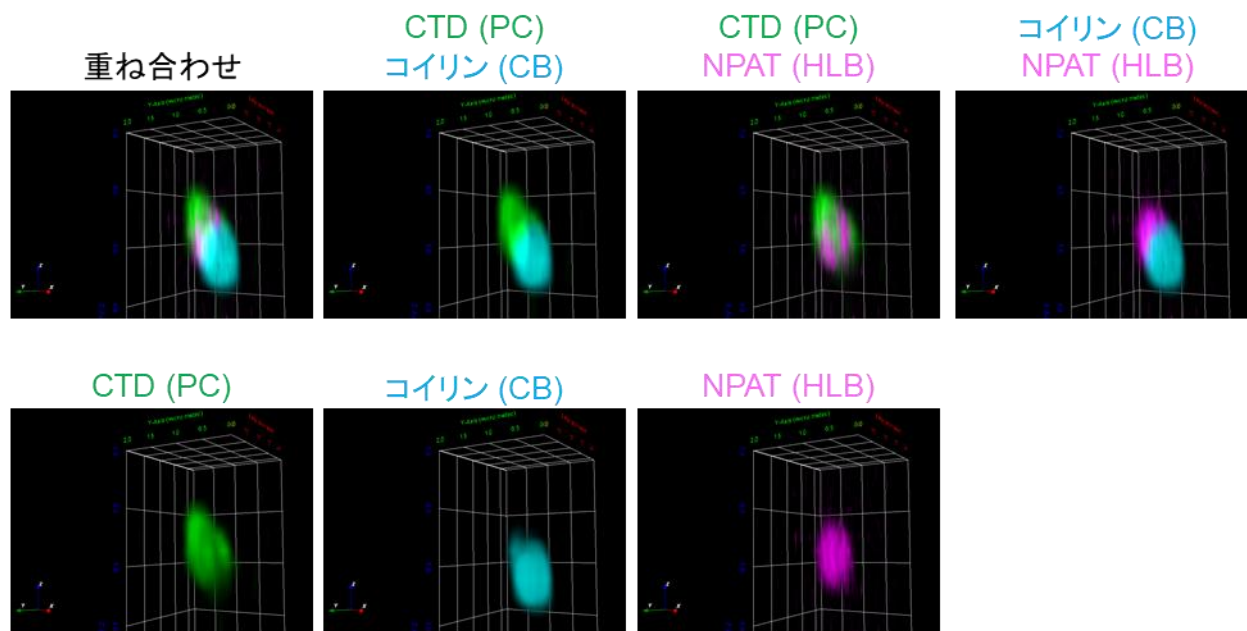
A



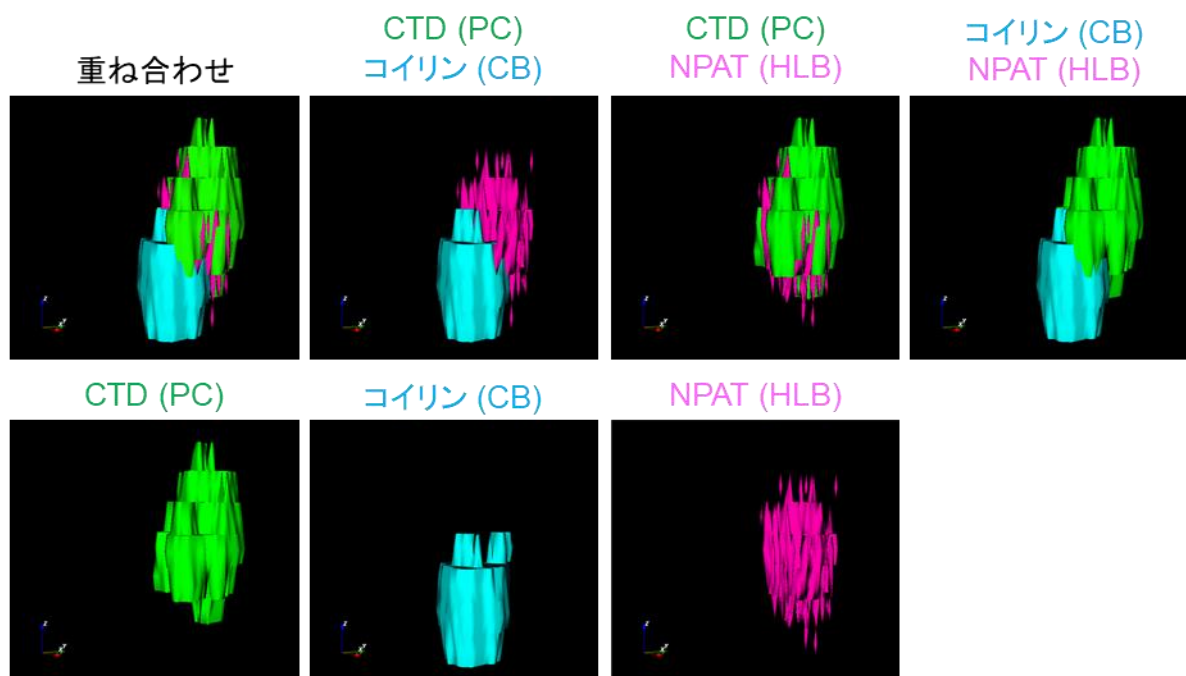
B



C



D



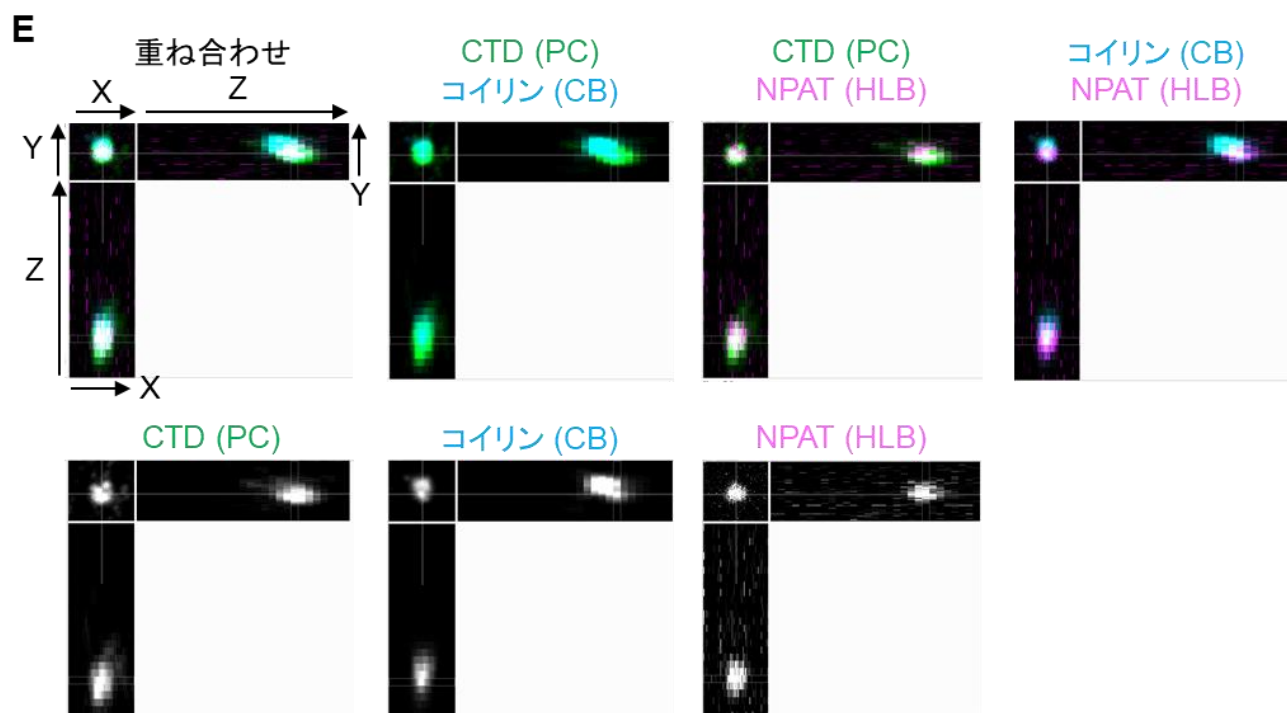


図 17 超解像顕微鏡を用いた PC、CB、HLB の観察結果

野生型 HCT116 細胞の免疫染色画像。染色条件は図 15 と同様。ただし、コイリン (CB) はシアン、NPAT (HLB) はマゼンタで示している。(A) 核の画像。黄色の枠線は Hoechst 33342 で染色した時の核の輪郭を表す。MIP 表示ではなく、1 スライス画像である。スケールバーは 5 μm 。(B) A の画像の黄色の枠線で囲まれた部分の拡大図。MIP 表示ではなく、1 スライスの画像である。(C) B の画像の 3D 表示。(D) C の画像において、閾値を設定し二値化した画像。見やすくするために C とは角度を変えている。(E) C の画像の XY、XZ、YZ 表示。撮影には油浸 60 倍対物レンズを使用し、Z 方向のステップサイズは 0.25 μm に設定した。

実験 5 CB と HLB が PC の Ser5 リン酸化レベルに与える影響

実験目的と実験方法

CB 中には、Pol II CTD の Ser5 のリン酸化酵素である CDK7 が集積することが報告されている[Jordan et al, 1997]。そこで、CB の近くに存在する PC は、CB から離れている PC よりも、CTD の S5P レベルが増加しているかどうかを調べることを目的として、実験を行った。野生型 HCT116 細胞を、抗 CTD S5P 抗体と抗コイリン抗体を用いて二重免疫染色した。画像解析により、PC の S5P レベルが、CB との相互作用の有無によって変化するかどうかを調べた。リン酸化レベルは以下の計算式で計算した。

$$\text{リン酸化レベル比} = \frac{\text{1細胞中の CB と接している S5P 輝点の輝度の平均値}}{\text{1細胞中の CB と接していない S5P 輝点の輝度の平均値}}$$

実験結果

CB と接している Ser5 リン酸化輝点（S5P、アスタリスク）と CB と接していない Ser5 リン酸化輝点（S5P、矢頭）の免疫染色の写真を以下に示す（図 18）。

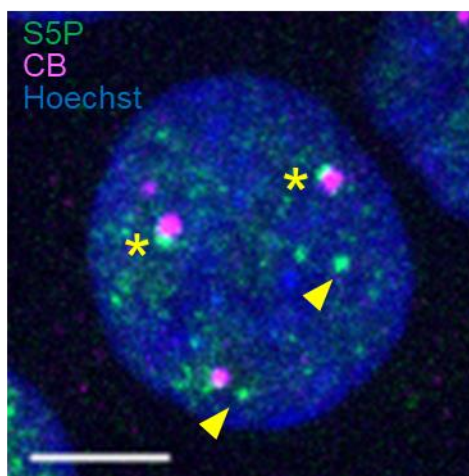


図 18 Pol II S5P 輝点と CB の相互作用

免疫染色画像。野生型 HCT116 細胞を Hoechst 33342、蛍光色素で修飾したマウス抗 CTD S5P 抗体 Fab (Pa57)、マウス抗コイリン抗体で二重免疫染色した。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。黄色のアスタリスクは CB と接している Ser5 リン酸化輝点を示し、黄色の矢頭は CB と接していない Ser5 リン酸化輝点を示す。Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 47 枚。スケールバーは 5 μm 。

画像解析によりリン酸化レベルを定量、比較したところ、CB は Ser5 リン酸化輝点の輝度に影響しないことが分かった (図 19 上)。また、同様の解析を Ser5 リン酸化輝点と HLB に関しても行ったところ、HLB も Ser5 リン酸化輝点の輝度に影響しないことが分かった (図 19 下)。

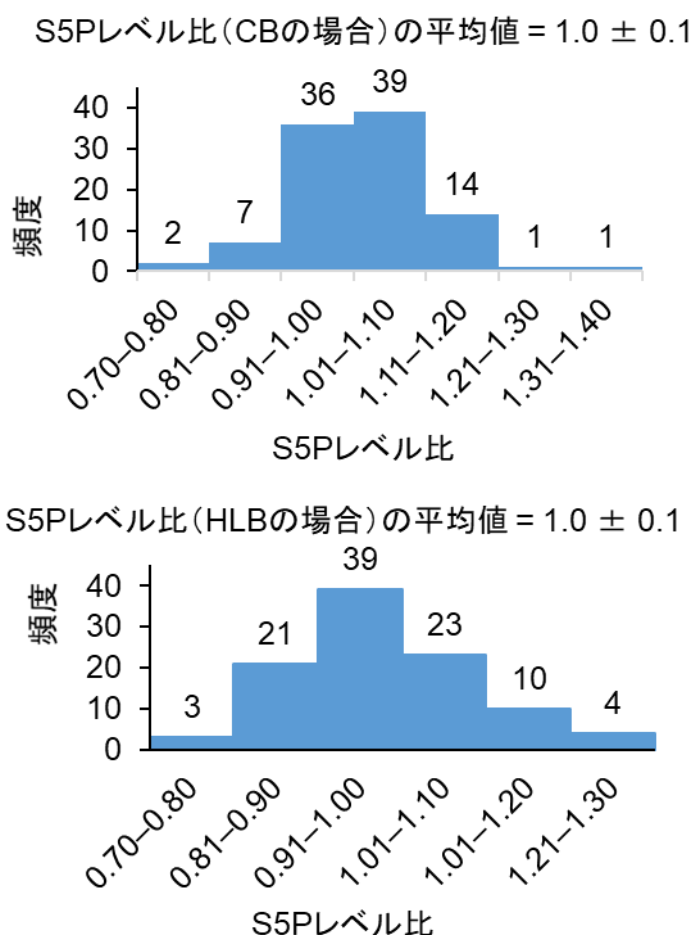


図 19 Pol II CTD Ser5 のリン酸化レベル比

(上) CB と相互作用している場合としていない場合で Pol II CTD S5P の輝度値を比較したヒストグラム。平均値 $\pm$ 標準偏差。n=100 細胞 (下) HLB と相互作用している場合としていない場合で Pol II CTD S5P の輝度値を比較したヒストグラム。平均値 $\pm$ 標準偏差。n=100 細胞

実験 6 蛍光タグの融合方向が NB 同士の相互作用に与える影響

実験目的と実験方法

蛍光タグの種類は液-液相分離に影響する[Uebel and Phillips, 2019]。特に、CB に関しては、コイリンの N 末端にタグを付けた場合と、C 末端にタグを付けた場合で、CB の数やコイリンの核内分布に差が生じる[Shpargel et al, 2003]。そこで、コイリンに付加するタグの方向性が CB と他の NB との相互作用に与える影響を調べるために、実験を行った。コイリンの N 末端または C 末端に SNAP-tag を付けた SNAP-coilin または coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞を使用した (図 3)。

実験結果

まず、シングルセルクローニングを行い樹立したセルラインのコイリンタンパク質の発現量をウェスタンブロッティングで比較した (図 20)。その結果、SNAP-coilin、coilin-SNAP 両方のセルラインにおいて、野生型 HCT116 細胞および KI 細胞の内在性のコイリンタンパク質と同等の発現量を示した。

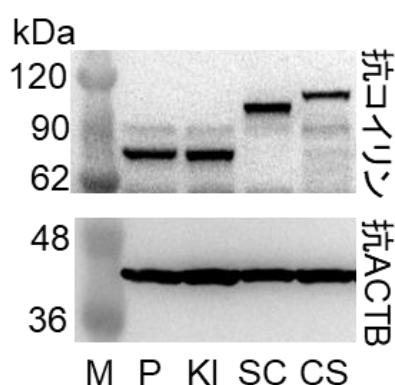


図 20 SNAP-coilin と coilin-SNAP の発現量の確認

マウス抗コイリン抗体 (F-7) とマウス抗 β アクチン (ACTB) 抗体を用いたウェスタンブロッティングの画像。M : マーカー、P : 野生型 HCT116 細胞、KI : KI 細胞、SC : SNAP-coilin を発現させたコイリン KO 細胞クローン、CS : Coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞クローン。

次に免疫染色により、タグの融合方向が CB の形成と他の NB との相互作用に与える影響を調べた。その結果、SNAP-coilin と coilin-SNAP の間で CB の形や数に顕著な変化は見られなかった (図 21 と表 3)。一方で、CB と PC または HLB との相互作用に関しては、SNAP-coilin と coilin-SNAP の間で大きな変化が観察された (図 22)。具体的には、coilin-SNAP により形成された CB は、野生型 HCT116 細胞や KI 細胞内の内在性のコイリンにより形成さ

れる CB と、PC や HLB との相互作用に関して、類似の相互作用割合を示した一方で、SNAP-coilin により形成された CB は、PC や HLB との相互作用割合が上昇した。

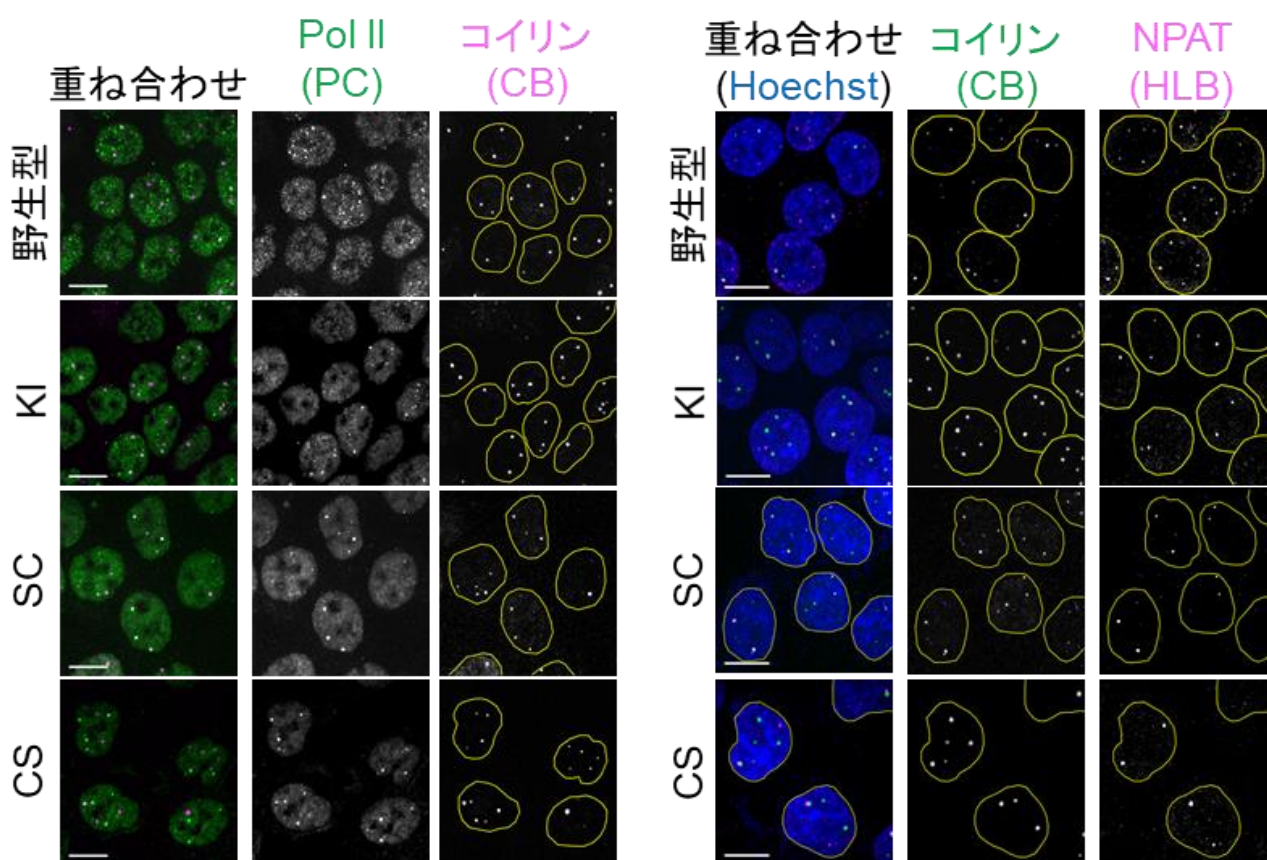


図 21 SNAP-coilin または coilin-SNAP が形成する CB

免疫染色画像。野生型：野生型 HCT116 細胞、KI：KI 細胞、SC：SNAP-coilin を発現させたコイリン KO 細胞、CS：Coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞。(左) 野生型 HCT116 細胞では、Alexa Fluoro 488 で修飾したマウス抗 CTD 抗体 Fab (C13B9) を緑、ラビット抗コイリン抗体をマゼンタで示した。KI 細胞では、EGFP-RPB1 を緑、ラビット抗コイリン抗体をマゼンタで示した。SNAP-coilin を発現させたコイリン KO 細胞と Coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞では、EGFP-RPB1 を緑、SNAP-Cell 647-SiR で可視化したコイリンをマゼンタで示した。(右) 野生型 HCT116 細胞では、Hoechst 33342 を青、ラビット抗コイリン抗体を緑、マウス抗 NPAT 抗体 (27) をマゼンタで示した。KI 細胞では、ラビット抗コイリン抗体を緑、マウス抗 NPAT 抗体 (27) をマゼンタで示した。SNAP-coilin を発現させたコイリン KO 細胞と coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞では、SNAP-Cell 647-SiR で可視化したコイリンを緑、マウス抗 NPAT 抗体 (27) をマゼンタで示した。全ての画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 24 から 66 枚。黄色の線は核の輪郭を示す。スケールバーは 10 μm 。

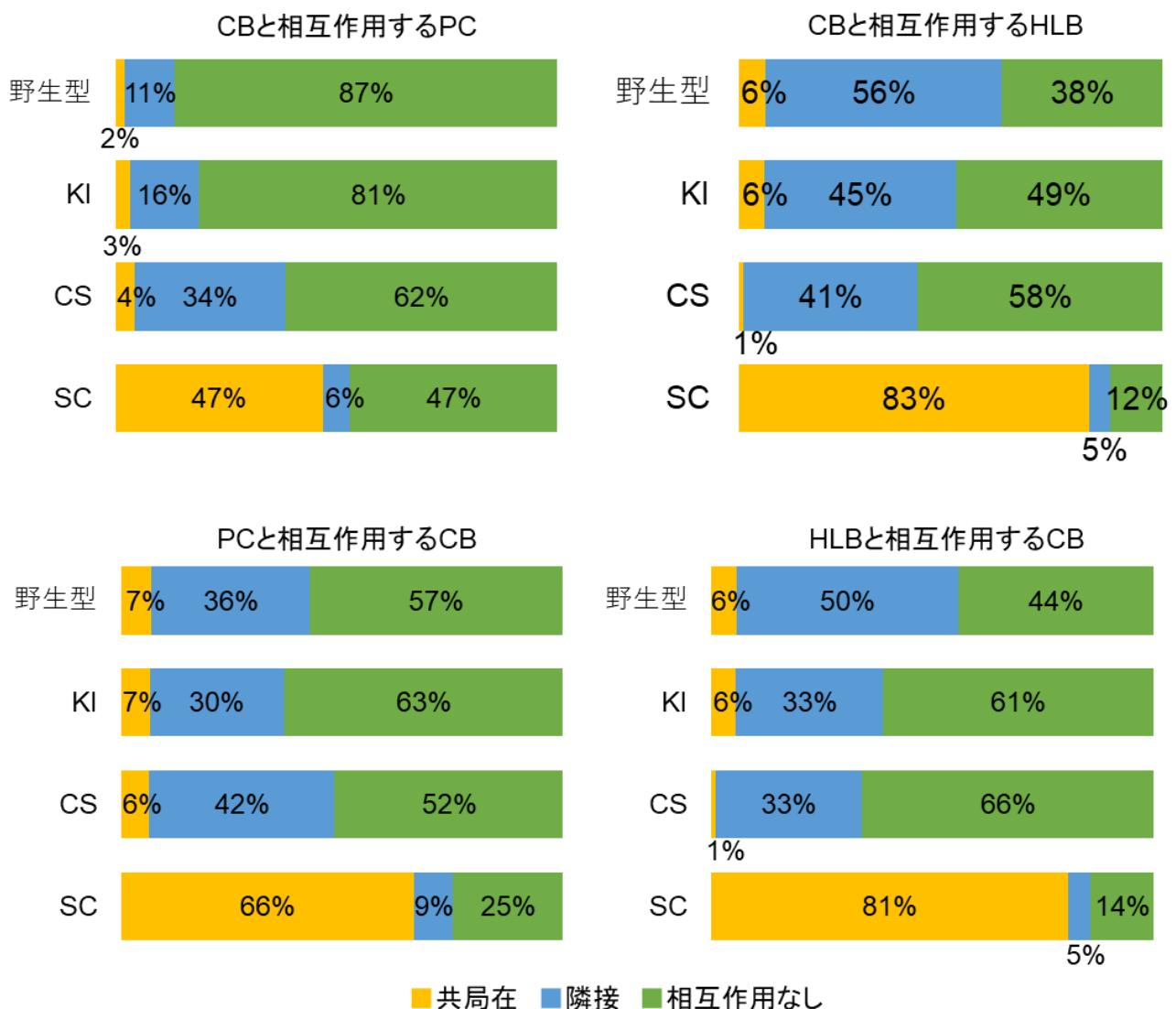


図 22 タグの方向性が NB 同士の相互作用に与える影響

免疫染色の 3D 画像を解析した結果。野生型：野生型 HCT116 細胞、KI：KI 細胞、SC：SNAP-coilin を発現させたコイリン KO 細胞、CS：Coilin-SNAP を発現させたコイリン KO 細胞。

「HLB と相互作用する CB」は、HLB と共局在または隣接、相互作用しない CB の割合を示す。「CB と相互作用する PC または HLB」は、CB と共局在、隣接、または相互作用しない PC または HLB の割合を示す。「PC または HLB と相互作用する CB」は、PC または HLB と共局在または隣接、相互作用しない CB の割合を示す。

小括

実験 1 から、PC は非リン酸化 CTD と S5P CTD、S7P CTD を含み、S 期初期に数が増えることが分かった。S5P CTD を有する Pol II はヒストン遺伝子と snRNA 遺伝子を転写し[Medlin et al, 2005]、S7P CTD を有する Pol II は snRNA 遺伝子を転写する[Egloff et al, 2007; Egloff et al, 2012]。従って、PC はヒストン遺伝子と snRNA 遺伝子を転写している可能性がある。また、snRNA やヒストン遺伝子は S 期に転写が活性化するため[Faresse et al, 2012; Wang et al, 2016; Marzluff and Koreski, 2017]、PC の数が S 期初期に増えるという今回の観察結果は、PC が snRNA やヒストン遺伝子を転写している可能性を支持した。実験 2 から、PC が CB と HLB の近くに出現し、PC-CB と PC-HLB は、S 期中期終了までに解消することが分かった。PC-HLB の解消が PC による転写の終了を意味すると仮定すると、S 期終了時にヒストン遺伝子の転写が低下することと整合性がある。今後は、PC、CB、HLB の動態と転写を同時に観察することが望まれる。

実験 3 から、本研究の最大の目的であった「PC-CB-HLB の形成」が生細胞内で証明され、また、「PC-CB-HLB の形成経路」も明らかになった。PC-CB-HLB の形成経路の観察結果から、PC は HLB を介して、CB と相互作用している頻度が高いことが分かり、HLB は PC と CB の相互作用を仲介している可能性が示唆された。さらに、実験 4 から、PC-CB-HLB の形成は、蛍光タンパク質タグによる影響ではないことを確認できた。生細胞観察の結果と同様に、PC は CB よりも HLB と相互作用しやすい（共局在しやすい）ことも示された。一方で、PC の見え方は、野生型 HCT116 細胞を免疫染色した場合と KI 細胞を固定した場合で、大きく異なった。その差は細胞 1 個当たりの PC の数の差としても表れている。野生型 HCT116 細胞を免疫染色した場合は、比較的小さい PC も観察できた一方で、KI 細胞では、核質のバックグラウンドが強いため、小さい PC は観察できなかった。実験 5 は、CB と HLB の両方とも、PC の Ser5 リン酸化レベルに影響しないことを示した。この結果は、CDK による Pol II のリン酸化に、CB や HLB が関係ないことを示唆している。

実験 6 では、コイリンの N 末端に SNAP-tag を付けた場合、C 末端に付けた場合と比べて、CB と他の NB の相互作用割合が上昇することが分かった。NB 同士の相互作用制御機構は未知の部分が多いが、コイリンの N 末端が CB と他の NB の相互作用を制御している可能性と、CB と他の NB との相互作用を調べるときは、コイリンの C 末端に蛍光タグを付けたほうが良いことが示された。蛍光タンパク質の融合が、標的タンパク質に与える影響については、古くから議論されてきた[参考ウェブサイト 2 と 3]。コイリンに関しても、N 末端と C 末端で核内分布や CB の数に差が生じることが指摘されており、N 末端にタグを付けたコイリンの方が、より内在性のコイリンに近い核内分布や数を示すことが報告されている[Shpargel et al, 2003]。ただし、Shpargel らの論文では、比較のために発現させた coilin-GFP

と GFP-coilin の発現量がセルライン間で同等かどうか示されていないため、融合タンパク質の発現量の違いが CB の数の差や核内分布の差を生み出した可能性も否定できない。

N 末端にタグを付けた場合、なぜ CB と他の NB との相互作用割合が上昇するのか、詳細なメカニズムは不明である。コイリンの N 末端はコイリン同士が相互作用するために必要な自己相互作用ドメイン (self-interaction domain) であるため[Hebert and Matera, 2000]、コイリンの N 末端は他の NB との相互作用も制御している可能性が考えられた。

最近になって、融合させるタグの種類によって、液-液相分離により生じた液滴の挙動が変化することが報告された[Uebel et al, 2019]。Uebel らは、線虫の PGL-1 遺伝子の 3'末端に GFP、mKate2 または mTagBFP2 のいずれかをノックインし、PGL-1 タンパク質 (P 顆粒のマーカータンパク質) の C 末端が異なるタグと融合した線虫を作成した。通常の培養条件下では、これら 3 つのタグに関して、P 顆粒の形や動きに違いは見られなかったが、相分離阻害剤を加えた場合、PGL-1-GFP では P 顆粒が消えた一方で、PGL-1-mKate2 と PGL-1-mTagBFP2 では P 顆粒は残ったままであった。また、ヒートショックや α アマニチン添加による転写阻害を行った場合でも、PGL-1-GFP では P 顆粒が消えた一方で、PGL-1-mKate2 と PGL-1-mTagBFP2 では P 顆粒は残ったままであった。CB においても、コイリンに付加するタグの方向が CB の数に影響することが知られており[Shpargel et al, 2003]、今回の実験から、タグの方向は他の NB との相互作用にも影響することが明らかになった (実験 6)。今後は、タグの付加によるタンパク質レベルでの構造の変化が、NB の構造や相互作用に影響する原理の解明が望まれる。

第四章 PC、CB、HLB の相互依存性と物性

実験 7 CB の破壊が PC と HLB に与える影響

実験目的と実験手法

CB の有無が PC のリン酸化状態や出現タイミング、数、PC と HLB の相互作用に与える影響を調べることを目的とした。Cas9 ニッカーゼにより、KI 細胞のコイリン遺伝子をノックアウトした細胞を作製し（コイリン KO 細胞）、実験に使用した（図 3）。

実験結果

コイリン KO 細胞のウェスタンブロッティングと免疫染色の結果を図 23 に示す。ウェスタンブロッティングと免疫染色は、コイリン遺伝子のノックアウトが成功したことを示した。

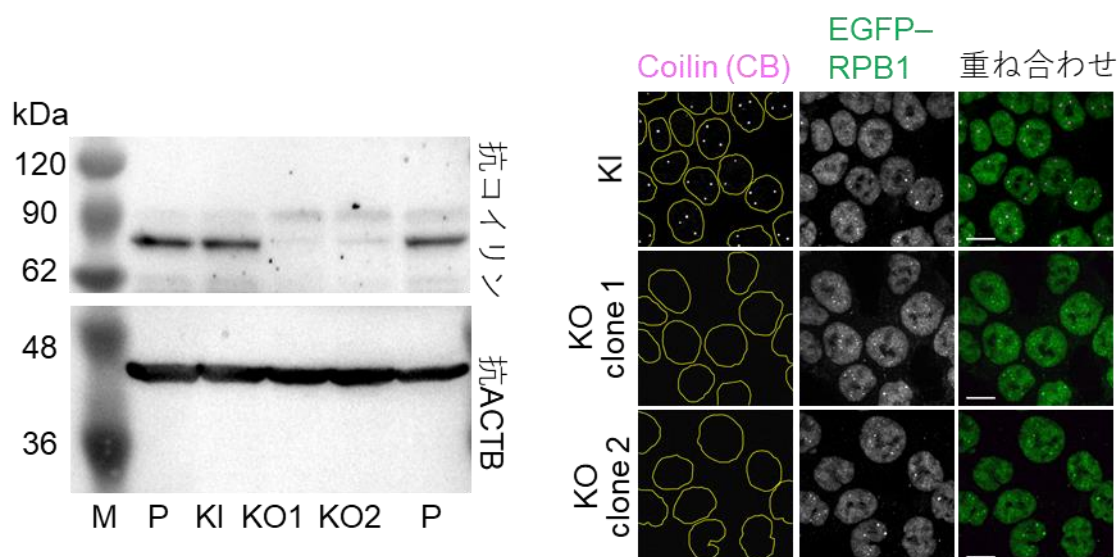


図 23 コイリン KO 細胞のウェスタンブロッティング画像と免疫染色画像

（左）抗コイリン抗体（F-7）、抗 β アクチン（ACTB）抗体を用いたウェスタンブロッティングの画像。M: マーカー、P: 野生型 HCT116 細胞、KI: KI 細胞、KO1: コイリン KO 細胞クローン 1、KO2: コイリン KO 細胞クローン 2。使用したアクリルアミドゲルは 5–20%濃度のグラディエントゲル。（右）抗コイリン抗体（Pdelta）を用いた免疫染色画像。KI: KI 細胞、KO1: コイリン KO 細胞クローン 1、KO2: コイリン KO 細胞クローン 2。EGFP-RPB1 は緑、コイリンはマゼンタで示した。黄色の線は核の輪郭を示す。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は $0.3 \mu\text{m}$ 。MIP に使用した画像数は 47 から 57 枚。スケールバーは $10 \mu\text{m}$ 。

次に免疫染色により、コイリン KO 細胞中の PC のリン酸化状態を調べたところ、野生型 HCT116 細胞や KI 細胞と同様に、コイリン KO 細胞中の PC も非リン酸化、S5P、S7P 状態

の CTD を含む一方で、S2P と T4P 状態の CTD は含まなかった (図 24)。これは、コイリン遺伝子のノックアウトによる CB の破壊は、PC のリン酸化状態に影響しないことを示している。また、PC や HLB の数にも、大きな変化はなかった (KI 細胞 : 5.4 ± 2.2 個/細胞、コイリン KO 細胞クローン 1 : 5.4 ± 2.1 個/細胞、コイリン KO 細胞クローン 2 : 5.3 ± 1.9 個/細胞、表 3)。

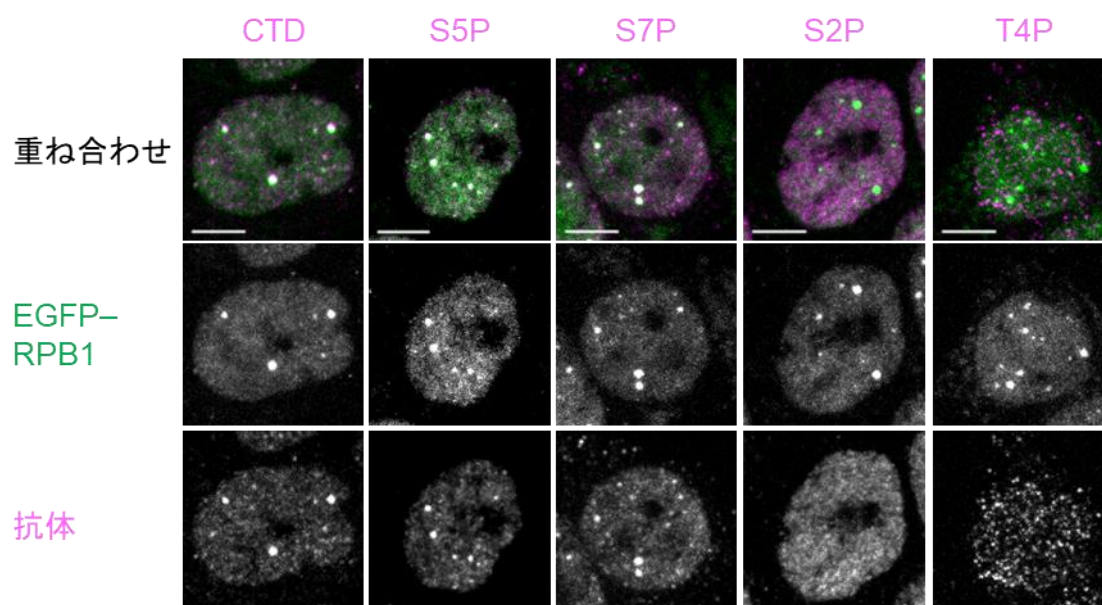


図 24 コイリン KO 細胞中の PC のリン酸化状態

使用した細胞はコイリン KO 細胞クローン 1。EGFP-RPB1 (中段) は緑色、抗体 (下段、左から非リン酸化 CTD、S5P CTD、S7P CTD、S2P CTD、T4P CTD) はマゼンタで示した。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は $0.3 \mu\text{m}$ 。MIP に使用した画像数は 29 から 62 枚。スケールバーは $5 \mu\text{m}$ 。

CB の破壊が PC の出現タイミングに与える影響を調べるために、コイリン KO 細胞に mCherry-PCNA を発現させ、生細胞観察を行った (図 25)。その結果、コイリン KO 細胞でも KI 細胞に mCherry-PCNA を発現させた場合と同様に PC は S 期初期に数が増加し、CB の破壊は PC の出現タイミングに影響しないことが分かった。

さらに、免疫染色と画像解析により、コイリン KO 細胞中の NB 同士の相互作用を調べた (図 26 と 27)。その結果、コイリンのノックアウトにより、PC と HLB の共局在の割合は増加する一方で、PC と SMN の輝点の相互作用の割合 (共局在と隣接の割合の合計) は減少した。

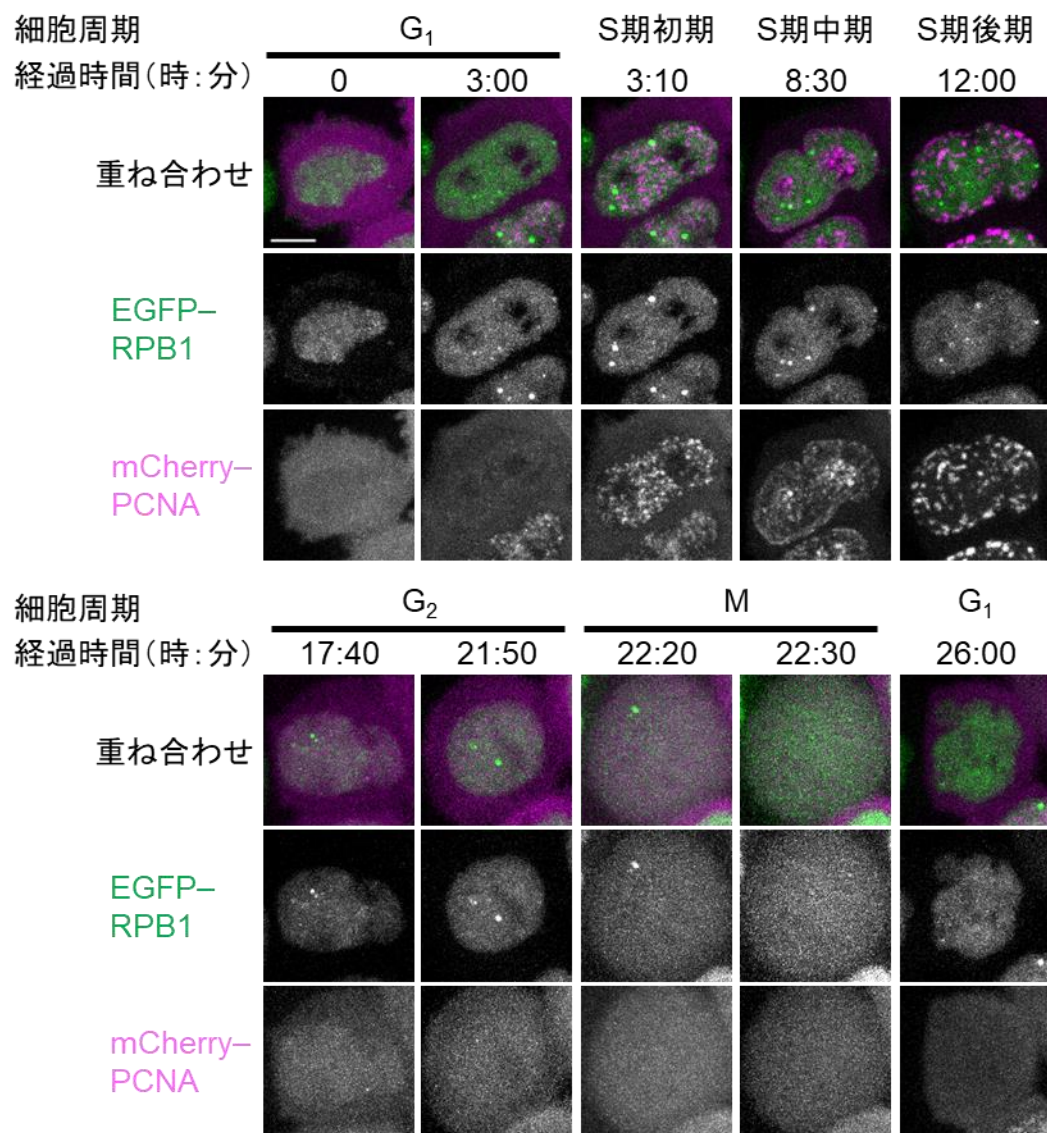
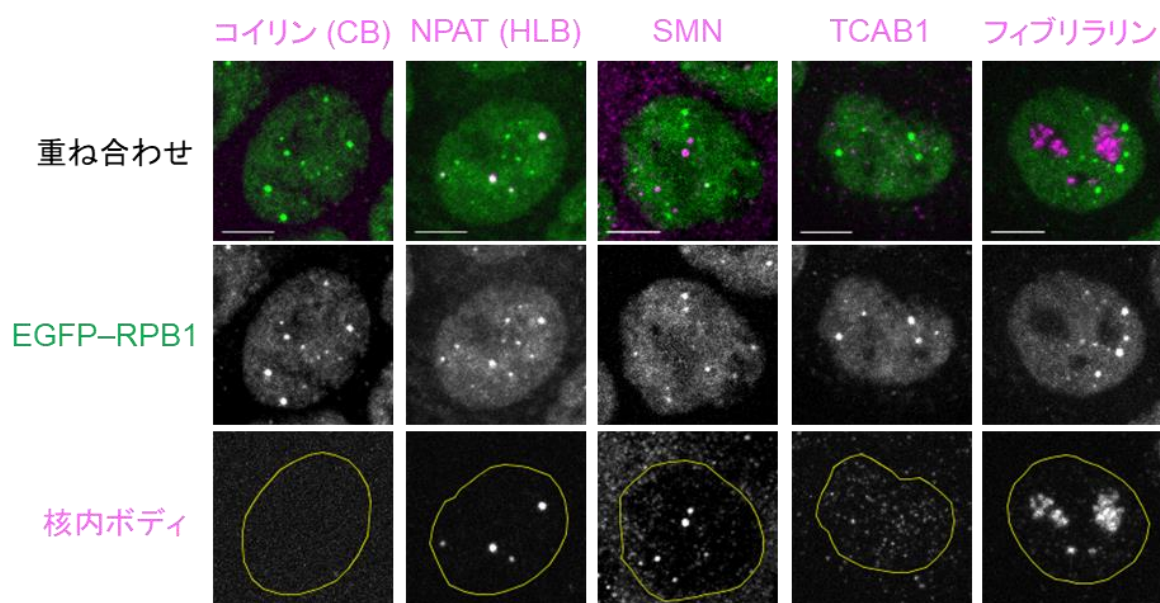


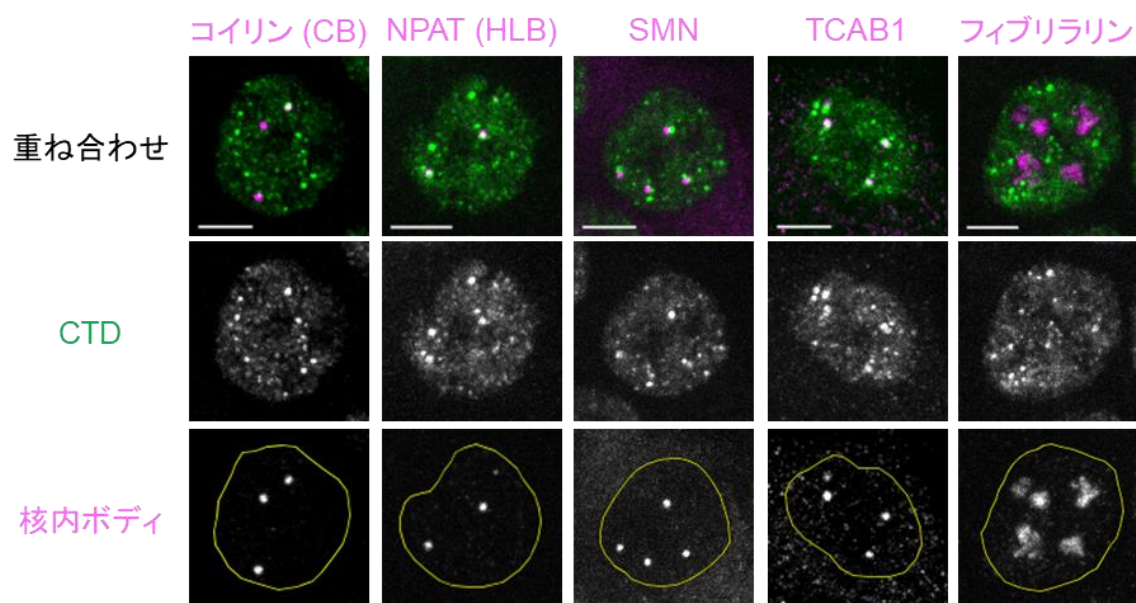
図 25 コイリンノックアウトが PC の出現タイミングに与える影響

コイリン KO 細胞に mCherry-PCNA を発現させ、共焦点顕微鏡で生細胞観察を行った。EGFP-RPB1 は緑色、mCherry-PCNA はマゼンタで示した。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.75 μm 。MIP に使用した画像数は全て 15 枚。スケールバーは 5 μm 。

コイリンKO細胞



野生型HCt116細胞



KI細胞

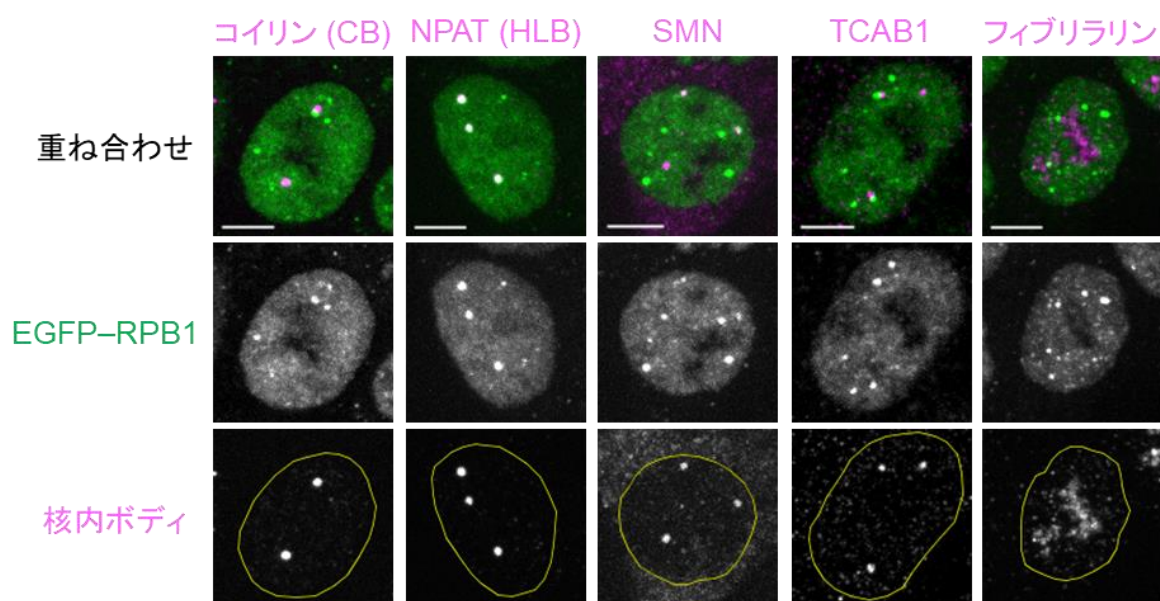


図 26 コイリン KO 細胞中の PC と他の NB の相互作用

免疫染色画像。(上) コイリン KO 細胞。(中) 野生型 HCT116 細胞。(下) KI 細胞。抗コイリン抗体 (Pdelta) または抗 SMN 抗体、抗 TCAB1 抗体、抗フィブリン抗体、抗 NPAT 抗体で免疫染色した時の画像を示す。EGFP-RPB1 (コイリン KO 細胞と KI 細胞) と抗 CTD 抗体のシグナル (野生型 HCT116 細胞) は緑色、抗コイリン抗体 (Pdelta)、抗 SMN 抗体、抗 TCAB1 抗体、抗フィブリン抗体、または抗 NPAT 抗体のシグナルはマゼンタで示した。黄色の線は核の輪郭を示す。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 29 から 62 枚。スケールバーは 5 μm 。

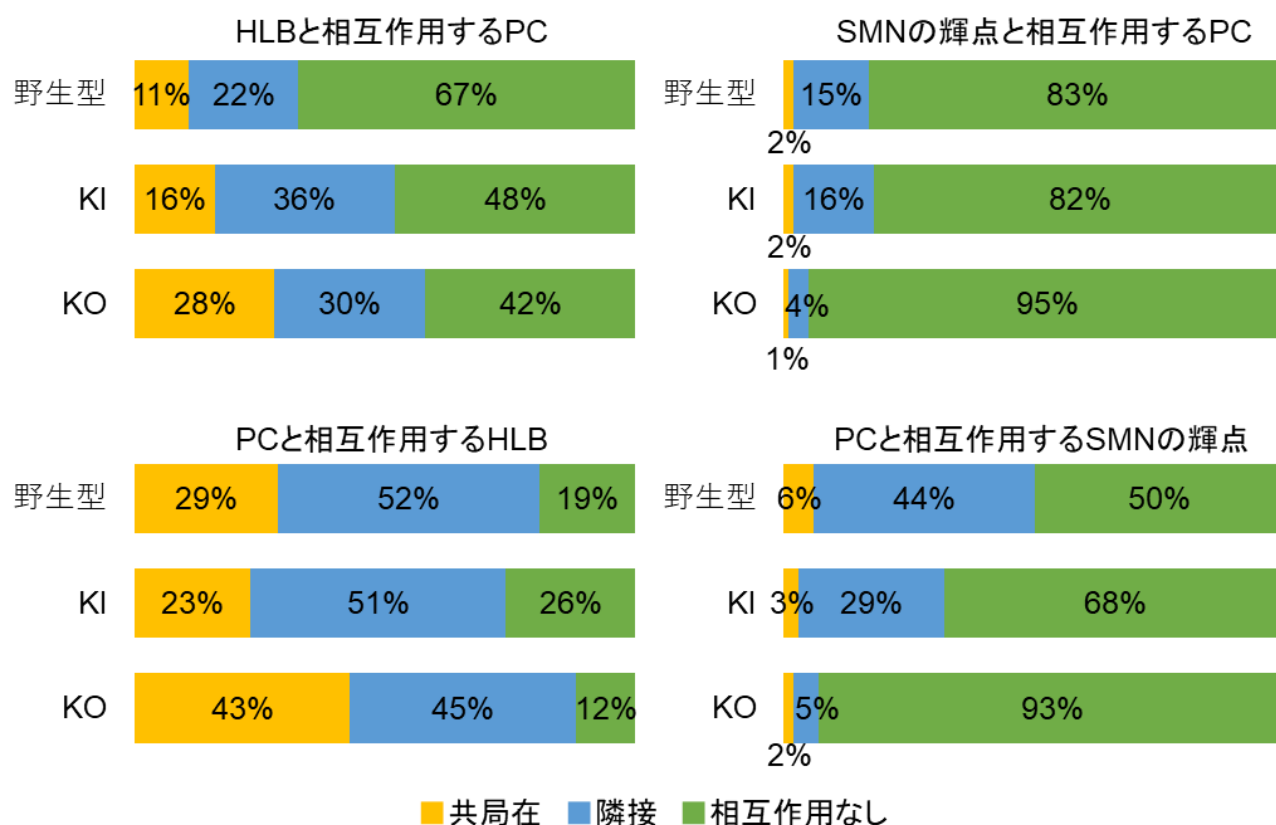


図 27 コイリンノックアウトが NB 同士の相互作用に与える影響

野生型: 野生型 HCT116 細胞、KI: KI 細胞、KO: コイリン KO 細胞クローン 1。「HLB または SMN の輝点と相互作用する PC」は HLB または SMN の輝点と、共局在または隣接、相互作用しない PC の割合を示す。「PC と相互作用する HLB または SMN の輝点」は PC と共局在または隣接、相互作用しない HLB または SMN の輝点との割合を示す。

実験 8 コイリンの過剰発現が CB と PC、HLB に与える影響

実験目的と実験手法

実験 7 では、コイリンのノックアウトによる CB の消失が、PC と HLB、PC と SMN の相互作用に影響することを示した。本実験では、その逆の状態であるコイリンの過剰発現が、NB 同士の相互作用に与える影響の評価を目的とした。KI 細胞に PiggyBac システムを用いて coilin-SNAP を安定発現させ、内在性のコイリンと外来性のタグ付きのコイリンの両方を発現している細胞を作製した（図 3）。この細胞を免疫染色し、CB の数や大きさ、NB 同士の相互作用を評価した。

実験結果

Coilin-SNAP を過剰発現している KI 細胞では KI 細胞に比べて、CB の数に著しい増減は観察されなかったが、直径や面積は大きくなる傾向にあった（表 6、図 28）。CB 中に局在する SMN も、大きさが増加する傾向にあった（図 28）。さらに、CB の大きさが大きくなったことにより、CB の中に HLB が位置する状態（飲み込み状態、engulfment）も観察された（図 29）。NB 同士の相互作用割合を定量したところ、coilin-SNAP の過剰発現により、PC と CB は共局在の割合が減少する一方で、隣接する割合が上昇する傾向にあることが分かった（図 30）。同様の結果は、PC と SMN の輝点に関しても観察された。しかし、coilin-SNAP を過剰発現は、PC と HLB の相互作用および CB と HLB の相互作用には影響しなかった（図 30）。

	Coilin-SNAPを過剰発現KI細胞	KI細胞
核1個当たりのCB数	3.6 ± 1.5	3.1 ± 1.1
最大フェレット直径 (μm)	1.2 ± 0.34	0.73 ± 0.15
円周 (μm)	4.1 ± 1.3	2.4 ± 0.53
面積 (μm ²)	1.1 ± 0.60	0.40 ± 0.14
球形度	0.89 ± 0.080	0.92 ± 0.077
真円度	0.62 ± 0.12	0.55 ± 0.12

表 6 コイリンの過剰発現により形成された CB の数と大きさ
両方とも n = 35 細胞、平均値 ± 標準偏差

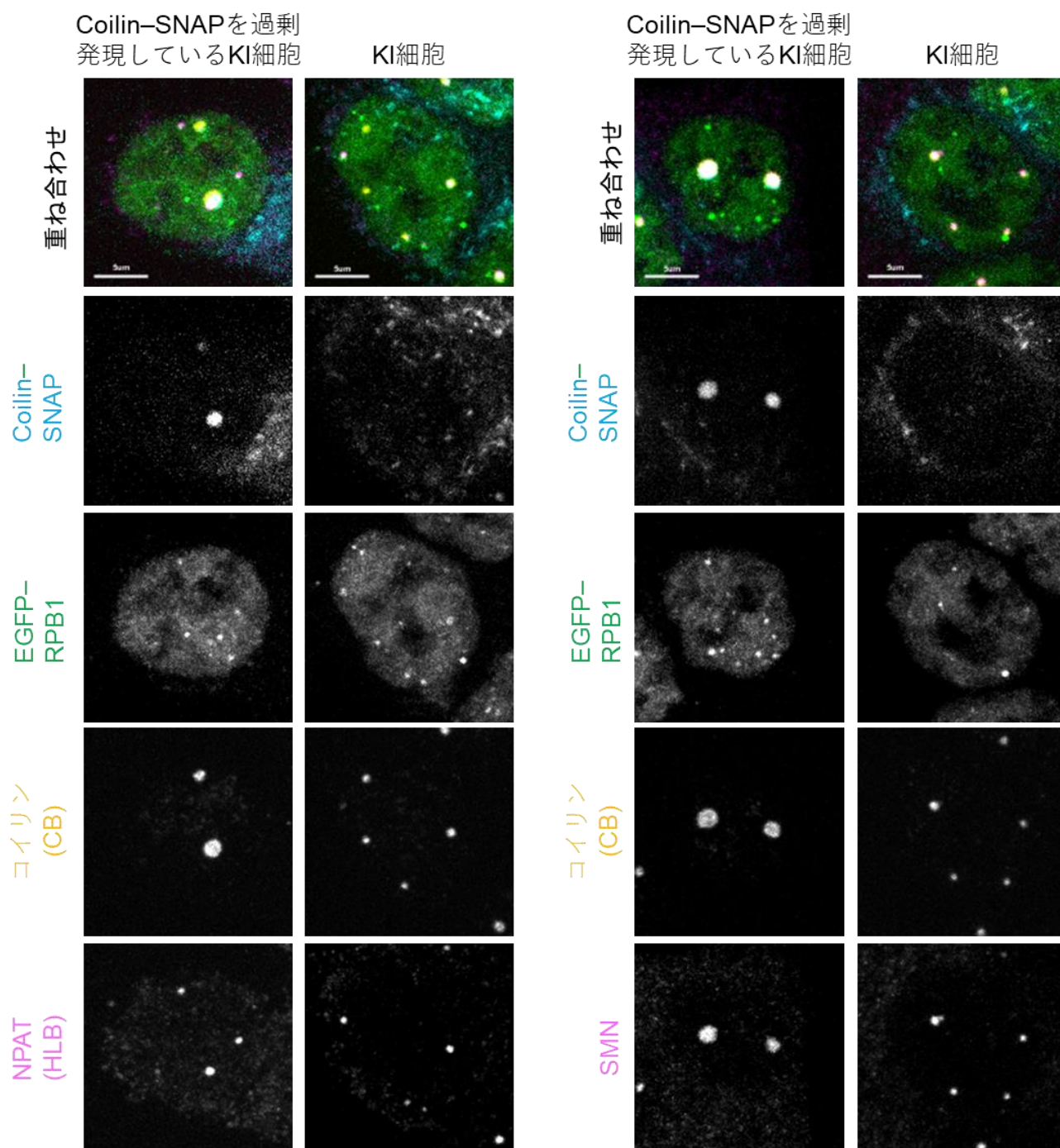


図 28 コイリンを過剰発現した細胞の免疫染色

KI細胞と coilin-SNAP を過剰発現している KI細胞の免疫染色の画像。Coilin-SNAP は SNAP-Cell 430 で検出した（シアンで示した）。EGFP-RPB1 は緑色、抗コイリン抗体（ウサギ抗体）は黄色、抗 NPAT 抗体（27）または抗 SMN 抗体（2B1）はマゼンタで示した。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 27 から 31 枚。スケールバーは 5 μm 。

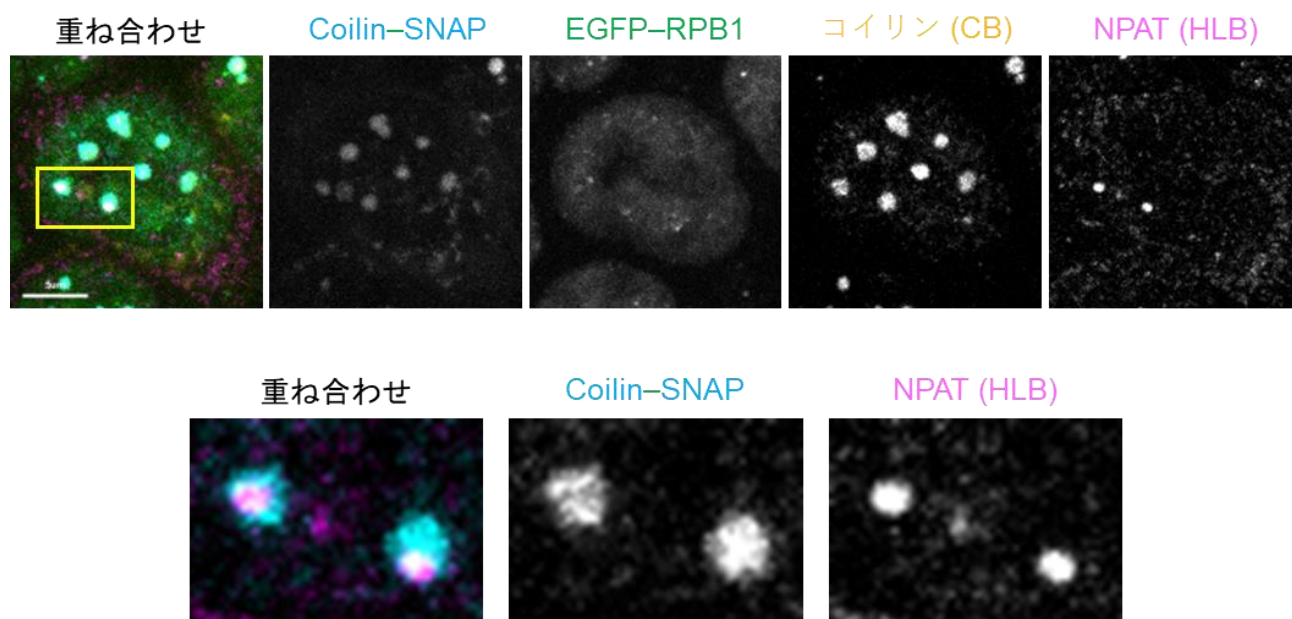


図 29 HLB を内包している CB の画像

(上) Coilin-SNAP を過剰発現している KI 細胞の免疫染色の画像。Coilin-SNAP は SNAP-Cell 430 で検出した (シアンで示した)。EGFP-RPB1 は緑色、抗コイリン抗体 (ウサギ抗体) は黄色、抗 NPAT 抗体 (27) または抗 SMN 抗体 (2B1) はマゼンタで示した。(下) 上の画像の黄色で囲った部分の拡大図。CB と HLB が隣接するのではなく、CB の中に HLB が位置している状態 (飲み込み状態、*engulfment*) が示されている。全ての画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は $0.3\ \mu\text{m}$ 。MIP に使用した画像数は 27 から 31 枚。スケールバーは $5\ \mu\text{m}$ 。

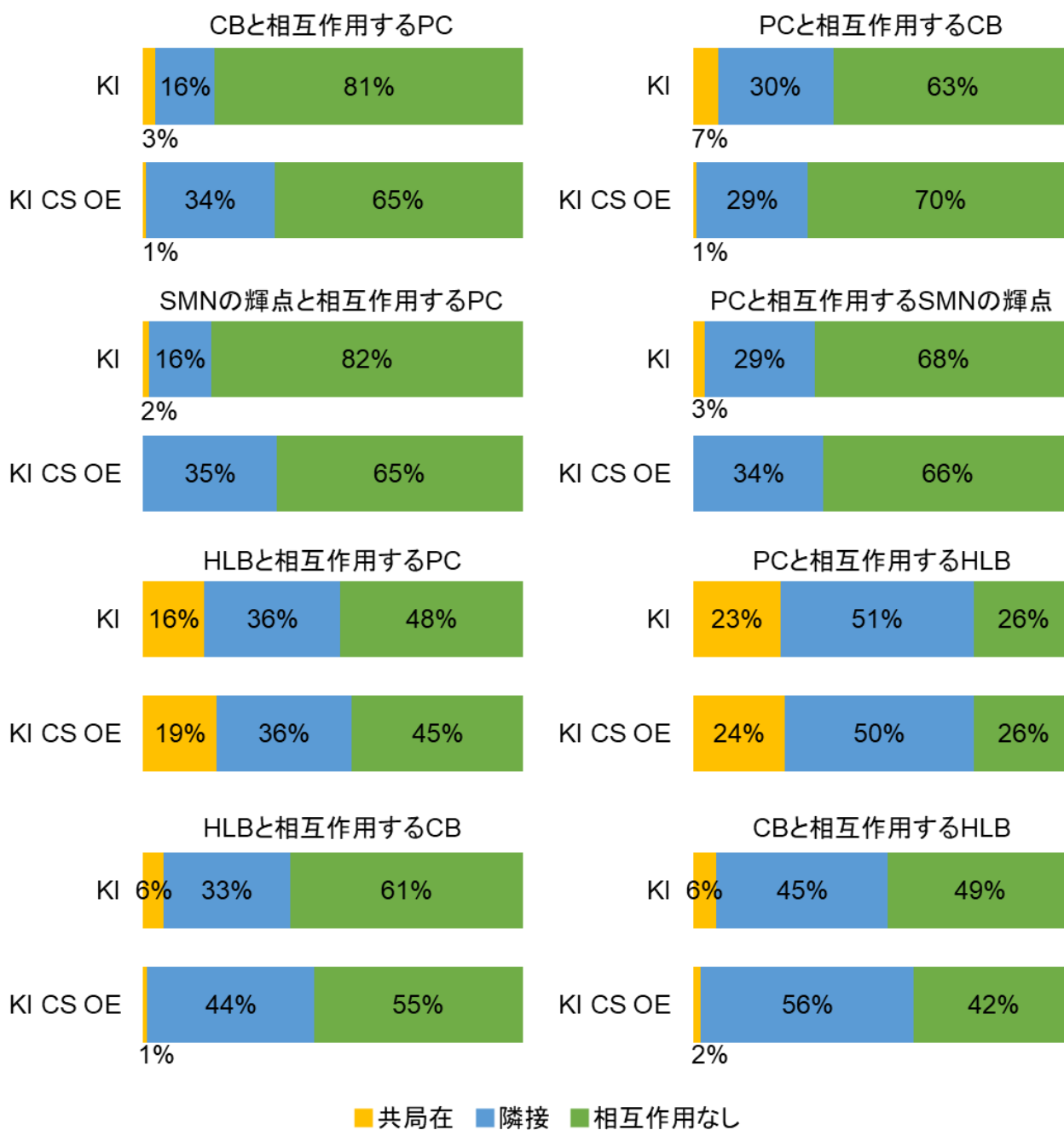


図 30 コイリンを過剰発現した細胞中の NB 同士の相互作用
 KI 細胞のデータは図 22 と図 27 から再掲 (n = 100 細胞)。KI CS OE は coilin-SNAP を過剰発現している KI 細胞を意味する。KI CS OE のデータは n = 35 細胞。「HLB または SMN の輝点、CB と相互作用する PC」は HLB または SMN の輝点、CB と共局在または隣接、相互作用しない PC の割合を示す。「PC と相互作用する CB または HLB、SMN の輝点」は PC と共局在または隣接、相互作用しない CB または HLB、SMN の輝点の割合を示す。

実験 9 Pol II の分解が CB と HLB に与える影響

実験目的と実験方法

実験 7 で、CB の消失が PC に与える影響を評価できたので、本実験では、Pol II の分解が CB と HLB に与える影響の評価を目的とした。野生型 HCT116 細胞を、低分子化合物トリプトリドを含む培地で培養し (5 μ M、2 時間)、免疫染色を行った。トリプトリドは、RPB1 のユビキチン化を介して、RPB1 の分解を誘導する[Wang et al, 2011]。

実験結果

5 μ M のトリプトリドを含む培地で HCT116 細胞を 2 時間培養した場合、トリプトリドの溶媒である DMSO を含む培地で培養した場合に比べて、抗 CTD 抗体 (C13B9) のシグナルの減少が観察された (図 31 上)。これは、トリプトリドによって、Pol II (RPB1) を分解できていることを示している。トリプトリド処理により PC が分解された一方で、CB や HLB は分解されなかった (図 31 上)。また、CB と HLB の数 (DMSO 処理の場合、CB は 3.4 個/細胞、HLB は 2.2 個/細胞。1,6-HD 処理の場合、CB は 3.3 個/細胞、HLB は 2.3 個/細胞。n = 30 細胞) や相互作用割合も変化しなかった (図 31 下)。

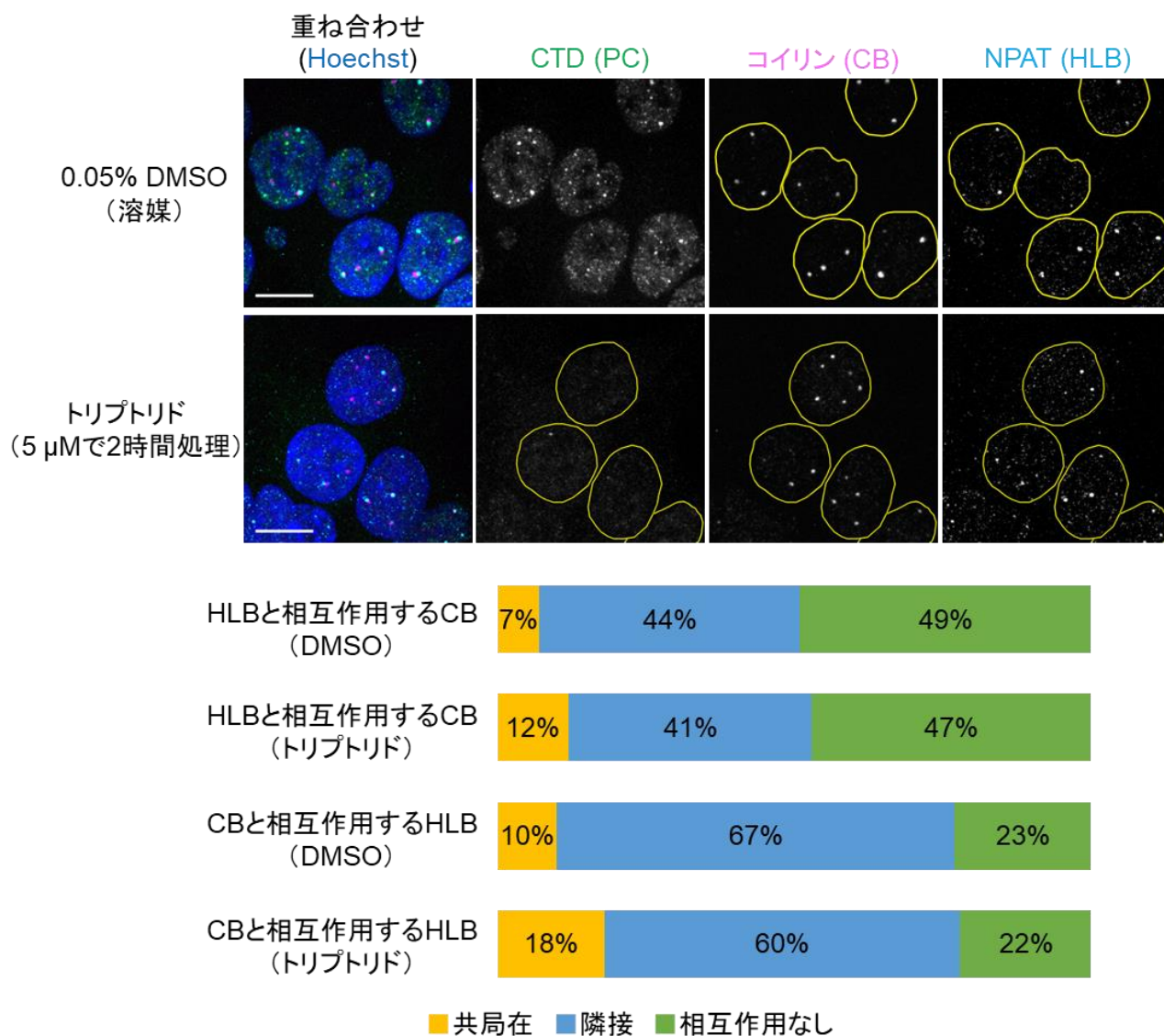


図 31 Pol II の分解が CB と HLB に与える影響

(上) 野生型 HCT116 細胞を DMSO またはトリプトリドで処理し、Hoechst 33342 (青)、抗 CTD 抗体 Fab (緑)、ラビット抗コイリン抗体 (マゼンタ)、マウス抗 NPAT 抗体 (シアン) で多重免疫染色した画像。画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されている。Z 方向のステップ幅は 0.3 μ m。MIP に使用した画像数は 41 から 50 枚。黄色の線は核の輪郭を示す。スケールバーは 10 μ m。(下) 野生型 HCT116 細胞を DMSO またはトリプトリドで処理した時の、CB と HLB の相互作用の割合。「HLB と相互作用する CB」は、HLB と共局在または隣接、相互作用しない CB の割合を示す。「CB と相互作用する HLB」は、CB と共局在または隣接、相互作用しない HLB の割合を示す。n = 30 細胞

実験 10 PC と CB と HLB の 1,6-ヘキサンジオールを用いた物性評価

実験目的と実験方法

NB は、液体に近い性質から固体に近い性質まで、幅広い物理的性質を示す[Boeynaems et al, 2018]。本実験では、液-液相分離阻害剤である 1,6-ヘキサンジオール（以下 1,6-HD）を用いて、PC、CB、HLB の物性の違いを調べることを目的とした。Coilin-SNAP を発現しているコイリン KO 細胞と、NPAT-HaloTag を発現している KI 細胞を 4% 1,6-HD を含む培地に培地交換し、1 分以内に共焦点顕微鏡で生細胞観察を行った。

実験結果

1,6-HD は PC を破壊した一方で、CB と HLB は破壊しなかった（図 32）。また、1,6-HD は野生型 HCT116 細胞に対して極めて高い細胞毒性を示した（図 33）。

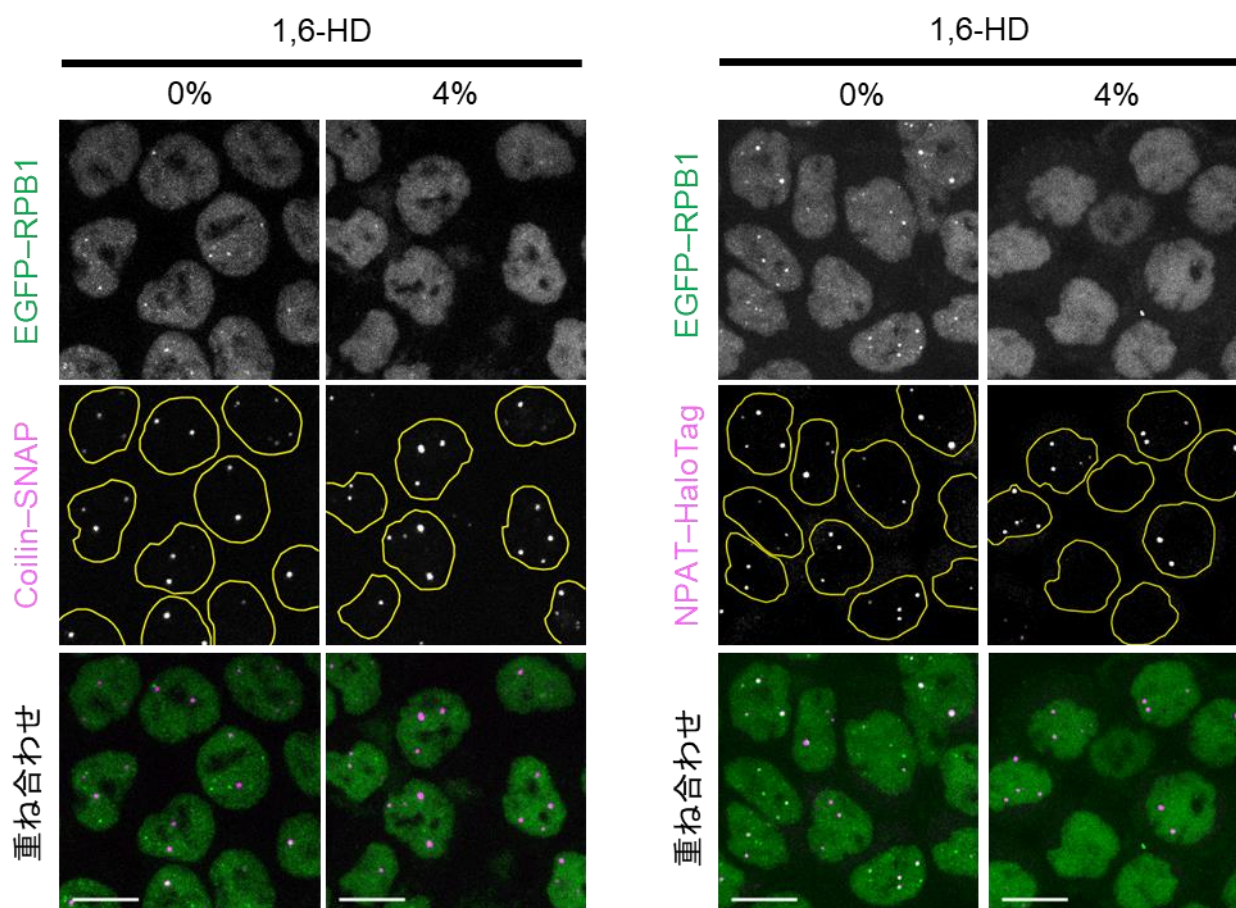


図 32 1,6-HD は PC のみを破壊した。

Coilin-SNAP を発現しているコイリン KO 細胞（左）または NPAT-HaloTag を発現している KI 細胞（右）を 1,6-HD で処理した時の生細胞観察画像。EGFP-RPB1 は緑色、SNAP-Cell 647-SiR で可視化した coilin-SNAP または Janelia Fluor 646 HaloTag リガンドで可視化した NPAT-HaloTag はマゼンタで示した。全ての画像は Z 軸方向の 11 枚の画像の MIP 画像で示した。Z 方向のステップ幅は 0.9 μm 。黄色の線は核の輪郭を示す。スケールバーは 10 μm 。

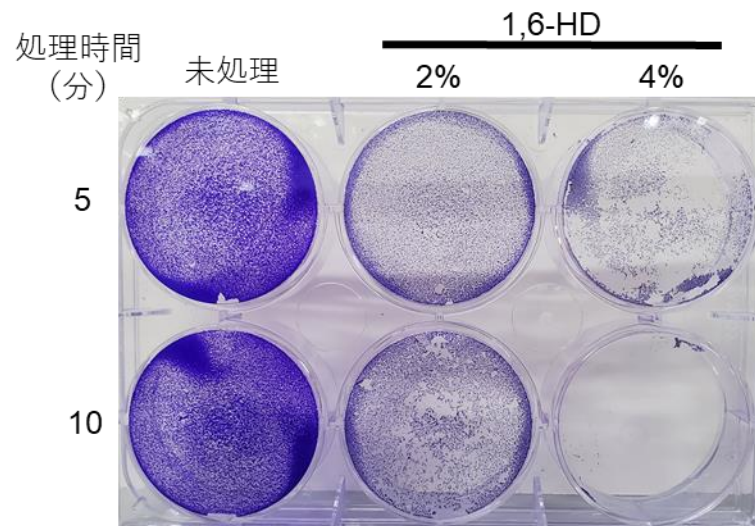


図 33 1,6-HD は HCT116 細胞に対して強い毒性を示した。
野生型 HCT116 細胞を 1,6-HD で処理した場合のクリスタルバイオレット染色の画像。

小括

コイリン遺伝子のノックアウトによる CB の破壊は、PC そのもの（リン酸化状態、数、出現タイミング）や他の NB の数には影響しなかった一方で、NB 同士の相互作用には影響した（実験 7）。PC と SMN の液滴の相互作用が減少したという今回の実験結果は、コイリンタンパク質が、Pol II と SMN の相互作用を仲介している可能性を示している。また、PC と HLB の相互作用が上昇したという今回の実験結果は、CB が PC と他の NB の相互作用を調節している可能性を示している。コイリンの過剰発現の結果（実験 8）もこれらの可能性を支持している。

実験 9 から、トリプトリドによる Pol II の分解は、CB と HLB の数と相互作用には影響しないことが分かった。この結果は、CB と HLB の形成や CB と HLB 間の相互作用は、PC に依存しない可能性を示している。

1,6-HD は液体に近い物性を示す NB を破壊するため[Kroschwald et al, 2017]、実験 10 の結果は、PC が液体に近い物性である一方で、CB と HLB は固体に近い物性であることを示唆している。また、1,6-HD は、電気的な分子間相互作用（ π - π 相互作用、カチオン- π 相互作用、静電氣的相互作用）を阻害する[Alberti et al, 2019]。ゆえに、PC を形成している分子間相互作用が、これらの電気的な相互作用である一方で、CB と HLB は別の分子間相互作用によって形成されている可能性が示唆された。

第五章 CB の機能

実験 11 CB の破壊が遺伝子発現に与える影響

実験目的と実験方法

CB の破壊が、遺伝子発現に与える影響の評価を目的とした。RNA-Seq により、セルライン間（野生型 HCT116 細胞と KI 細胞、コイリン KO 細胞の 3 種類）で遺伝子発現量を定量・比較した。なお、この RNA-Seq では、snRNA は検出されない仕様になっていた。

実験結果

野生型 HCT116 細胞（replication $n = 2$ ）と KI 細胞（replication $n = 1$ ）の間で優位に差が検出された遺伝子をバックグラウンドとして設定し、KI 細胞（replication $n = 1$ ）とコイリン KO 細胞（replication $n = 2$ ）の間で優位に差が検出された遺伝子から、バックグラウンドとして検出された遺伝子を除いた。その結果、54 種類の遺伝子が検出された（表 7）。p 値の計算には、DESeq2 を使用し、有意差の閾値は 0.05 とした。

これらの遺伝子が関与する機能を Gene Ontology で解析した（表 8）その結果、DNA のシチジンのデアミネーション、転写抑制、ウイルス防御に関する遺伝子の転写が、コイリンのノックアウトの影響を受けていることが分かった。一方で、ヒストン遺伝子の転写に関して、優位な変化は観察されなかった。また、コイリン遺伝子の転写に関しても、優位な変化は観察されなかった。

ABCF1	APOBEC3F	CYP4F12	IL18	MYO1E	SCN3A
AC010970.1	APOBEC3G	DKK1	INPP4B	MYOF	SEMA3A
AC011462.1	ARFGAP3	EMP1	KRT13	NR2F1	SNTB1
ACSL5	ARHGAP29	ENDOD1	KRT16P6	NR5A2	SRGAP1
ADGRG6	BMP4	EPS8	LEMD1	PALLD	STK39
AHR	CAPN6	FAM212B	LRP1B	RERG	STXBP6
APOBEC3B	CCNB1	FGF9	MAML2	RPL13AP5	TBC1D8
APOBEC3C	CEMIP	HEPH	MKNK2	RPP21	TMEM2
APOBEC3D	CENPA	IGFBP3	MPV17L	S100A10	VSNL1

表 7 コイリン遺伝子の KO により、発現に影響があった遺伝子 54 種類

cytidine deamination
cytidine to uridine editing
defense response to virus
DNA cytosine deamination
DNA demethylation
negative regulation of single stranded viral RNA replication via double stranded DNA intermediate
negative regulation of transposition

表 8 発現に影響があった遺伝子 54 種類の Gene Ontology 解析の結果

実験 12 核小体局在コイリン変異体が PC に与える影響

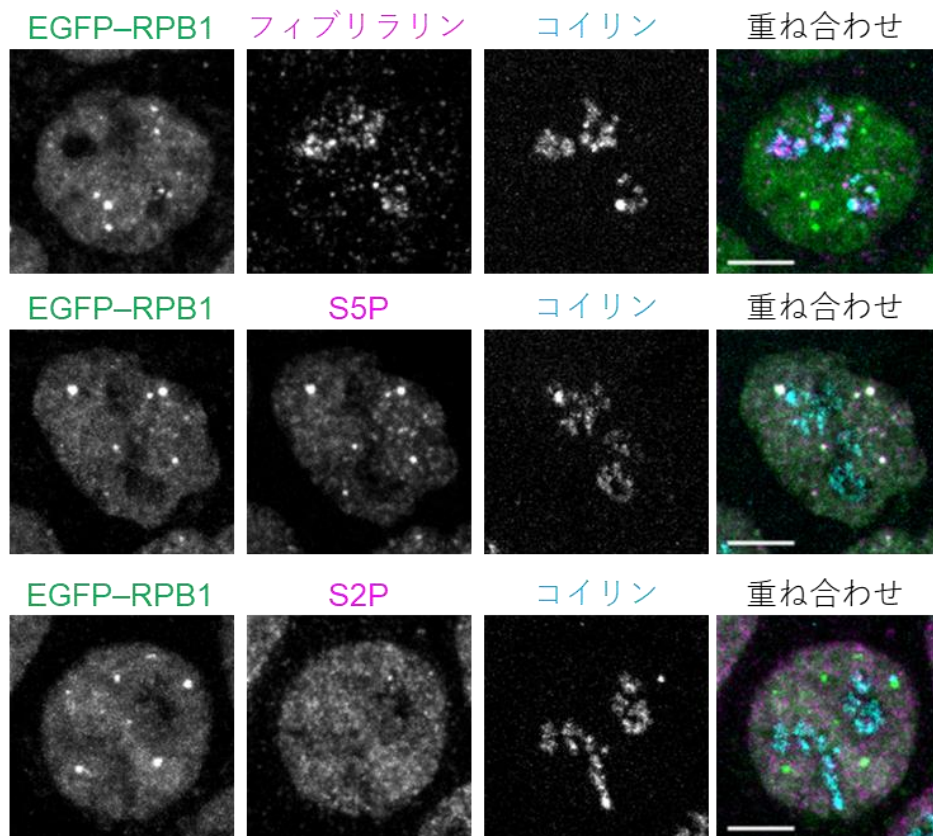
実験目的と実験方法

核小体に局在し、細胞の増殖速度を低下させることが知られているコイリン変異体 (S489D) が、PC に与える影響の評価を目的とした。コイリン KO 細胞に SNAP-coilin (S489D) または coilin-SNAP (S489D) を安定発現させたセルラインを樹立し (図 3)、共焦点顕微鏡で観察した。

実験結果

SNAP-coilin (S489D) と coilin-SNAP (S489D) の両方が、核小体への蓄積を示した (図 34)。Coilin-SNAP (S489D) を発現させた場合、細胞一つ当たりの PC の数は 4.9 ± 1.7 (平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=100$ 細胞) で、KI 細胞 (5.4 ± 2.2 、平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=100$ 細胞) と同等の値だった。しかし、SNAP-coilin (S489D) を発現させた場合は、 3.8 ± 1.2 (平均値 $\pm$ 標準偏差、 $n=100$ 細胞) で、KI 細胞や coilin-SNAP (S489D) を発現させた場合と比べて、PC の数は減少傾向にあった (表 3)。PC のリン酸化状態を調べたところ、SNAP-coilin (S489D) を発現させた場合と coilin-SNAP (S489D) を発現させた場合の両方とも、PC は非リン酸化 CTD と S5P CTD を含む一方で、S2P CTD は含んでいなかった (図 34)。この結果は、野生型 HCT116 細胞や KI 細胞と同様であり、SNAP-coilin (S489D) と coilin-SNAP (S489D) の発現は、PC のリン酸化状態には影響しないことが分かった。

Coilin(S489D)-SNAP



SNAP-coilin(S489D)

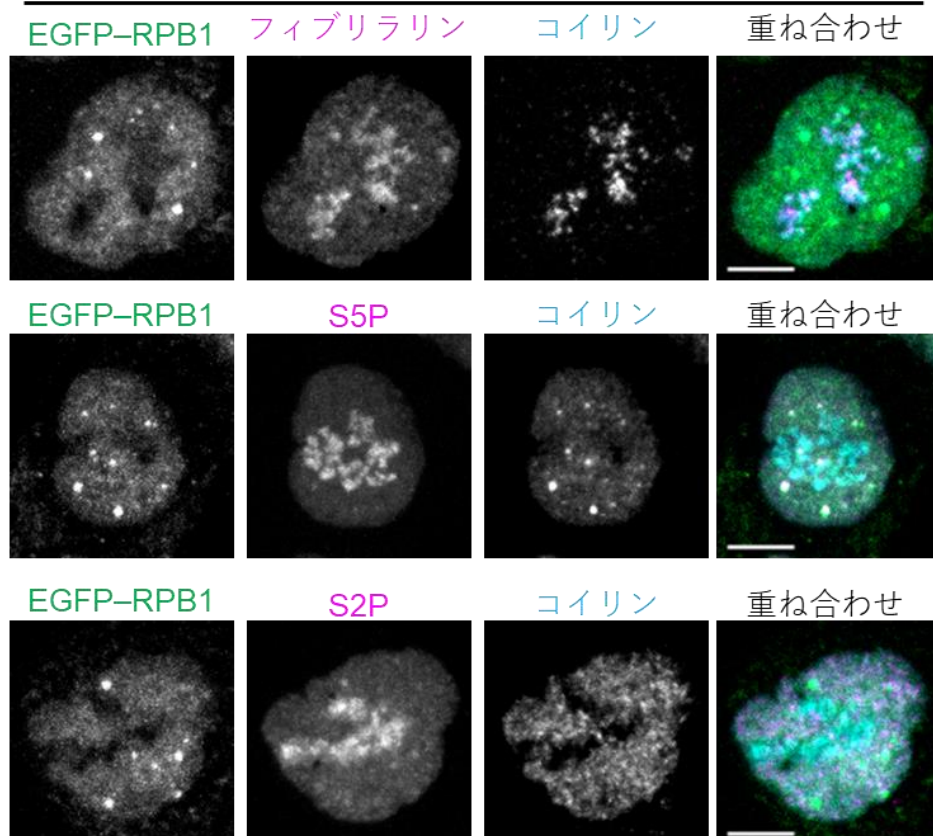


図 34 コイリン S489D の核内局在と PC のリン酸化に与える影響

(左) コイリン KO 細胞に coilin(S489D)-SNAP を発現させた細胞を抗フィブリラリン抗体、抗 CTD S5P 抗体または抗 CTD S5P 抗体 (マゼンタ) で免疫染色した画像。EGFP-RPB1 は緑色、coilin(S489D)-SNAP は SNAP-Cell TMR-Star (シアン) で示した。(右) コイリン KO 細胞に SNAP-coilin(S489D)を発現させた細胞を抗フィブリラリン抗体、抗 CTD S5P 抗体または抗 CTD S5P 抗体 (マゼンタ) で免疫染色した画像。EGFP-RPB1 は緑色、SNAP-coilin(S489D)は SNAP-Cell TMR-Star (シアン) で示した。全ての画像は Z 軸方向の MIP 画像で表示されており、Z 方向のステップ幅は 0.3 μm 。MIP に使用した画像数は 19 から 47 枚。スケールバーは 5 μm 。

小括

RNA-Seq の結果から、コイリン遺伝子のノックアウトがシチジンデアミナーゼとウイルス防御、転写に影響する可能性が示唆された（実験 11）。シチジンデアミナーゼの CB への局在は報告されているが[Hu et al, 2014]、CB がシチジンデアミナーゼの遺伝子発現制御に関与している可能性はまだ報告されていないため、今後のより詳細な研究が望まれる。一方で、今回の RNA-Seq では理論上検出されるはずのコイリン遺伝子の発現変化は有意には検出されなかった。この結果は、ライブラリ調製に問題がある可能性やデータ解析の方法に問題がある可能性を示唆しており、実験条件の最適化が今後の課題である。また、今回の実験では、replication 数が $n = 1$ または 2 だったので、今後は replication 数を $n = 3$ にそろえる必要がある。

これまでの報告通り本研究（実験 12）でも、コイリン変異体 S489D は核小体に局在したが[Carrero et al, 2011]、PC のリン酸化状態には影響しなかった。これは、コイリンノックアウトの結果（実験 7）と同様に、コイリンまたは CB が PC のリン酸化に関係ない可能性を示唆している。また、SNAP-tag を N 末端につけた変異体 SNAP-coilin(S489D)を発現させた場合、PC の数が減少傾向にあった。コイリンタンパク質が核小体に集積した時に、どのようなメカニズムで PC の数に影響しているのかは不明だが、コイリンが核小体に集積した時に、コイリンタンパク質の N 末端が、PC の数に影響している可能性が考えられた。

第六章 考察

PC、CB、HLB の協働による、snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の転写制御

本研究では、PC が S 期初期に CB と HLB の近くに出現し、PC-CB 二者複合体、PC-HLB 二者複合体、PC-CB-HLB 三者複合体が形成されることを生細胞観察により示した（実験 2 と 3）。これらの NB 複合体は、S 期中期の終了までに解消した（実験 2）。また、PC は非リン酸化 CTD、S5P CTD、S7P CTD を含んでいることが分かった（実験 1）。S5P CTD を有する Pol II はヒストン遺伝子と snRNA 遺伝子を転写し[Medlin et al, 2005]、S7P CTD を有する Pol II は snRNA 遺伝子を転写する[Egloff et al, 2007; Egloff et al, 2012]。CB は snRNA 遺伝子とヒストン遺伝子に近傍に、HLB はヒストン遺伝子の近傍に形成される[Frey and Matera, 2001; Shopland et al, 2001; Marzluff, 2002; Nizami et al, 2010, *CSH Symp. Quant. Biol.*; Nizami et al, 2010, *CSH Perspect. Biol.*; Wang et al, 2016; Duronio and Marzluff, 2017]。CB は、他の細胞周期に比べて S 期に *Hist2* と相互作用する頻度が高い[Shopland et al, 2001]。HLB は S 期になるとサイズが大きくなり、G₁ 期には *HIST1* の近傍にしか観察されないが、S 期になると *HIST2* の近くに形成されるようになる可能性が示されている[Romeo and Schümperli, 2016; Duronio and Marzluff, 2017]。snRNA 遺伝子とヒストン遺伝子の両方とも、S 期に転写が活性化される[Faresse et al, 2012; Wang et al, 2016; Marzluff and Koreski, 2017]。今回の研究から、1,6-HD を用いた実験から、CB と HLB は比較的安定な構造である一方で、PC はよりダイナミックな構造であることも分かった（実験 10）。以上のことを踏まえると、PC は CB と HLB と協働して、S 期特異的な snRNA 遺伝子とヒストン遺伝子の転写に寄与している可能性が考えられた。

CB は snRNA 遺伝子とヒストン遺伝子に近傍に形成され、HLB はヒストン遺伝子の近傍に形成されることを踏まえると[Frey and Matera, 2001; Shopland et al, 2001; Marzluff, 2002; Nizami et al, 2010, *CSH Symp. Quant. Biol.*; Nizami et al, 2010, *CSH Perspect. Biol.*; Wang et al, 2016; Duronio and Marzluff, 2017]、PC-CB、PC-HLB、PC-CB-HLB の機能的な違いとしては、転写する遺伝子座の違いが考えられる。具体的には、PC-CB-HLB は第 1 番染色体上の sn/snoRNA 遺伝子 (*RNU1*、*RNU11*、*SNORA72*) とヒストン遺伝子 (*HIST2*、*H3F3A*) の転写に、PC-CB は第 17 番染色体上の sn/snoRNA 遺伝子 (*RNU2*、*SNORD3A*) の転写に、PC-HLB は第 6 番染色体上のヒストン遺伝子 (*HIST1*) の転写に、それぞれ寄与している可能性が考えられた(図 35)。なお、CB は *HIST1* よりも *HIST2* と相互作用しやすく、HLB はその逆で、*HIST2* よりも *HIST1* と相互作用しやすい[Wang et al, 2016]。

PC と CB と HLB の相互作用の分子メカニズム

PC と CB、PC と HLB、CB と HLB がそれぞれ互いに隣接または共局在することは免疫染色から報告されてきたが[Lamond and Carmo-Fonseca, 1993; Schul et al, 1998; Xie and Pombo, 2006; Alm-Kristiansen et al, 2008; Nizami et al, 2010; Guglielmi et al, 2013]、それぞれの NB の構成タンパク質同士の相互作用や結合は報告されていない。CB と HLB に関しては、ハエの系で、HLB にもコイリンが含まれる場合があるため、CB と HLB が隣接するのは、コイリンに依存している可能性が提案された。しかし、哺乳類においては、HLB の中には必ずしもコイリンが含まれていないため[Bongiorno-Borbone, 2008]、コイリンが CB と HLB の相互作用を仲介しているかどうかは不明である。

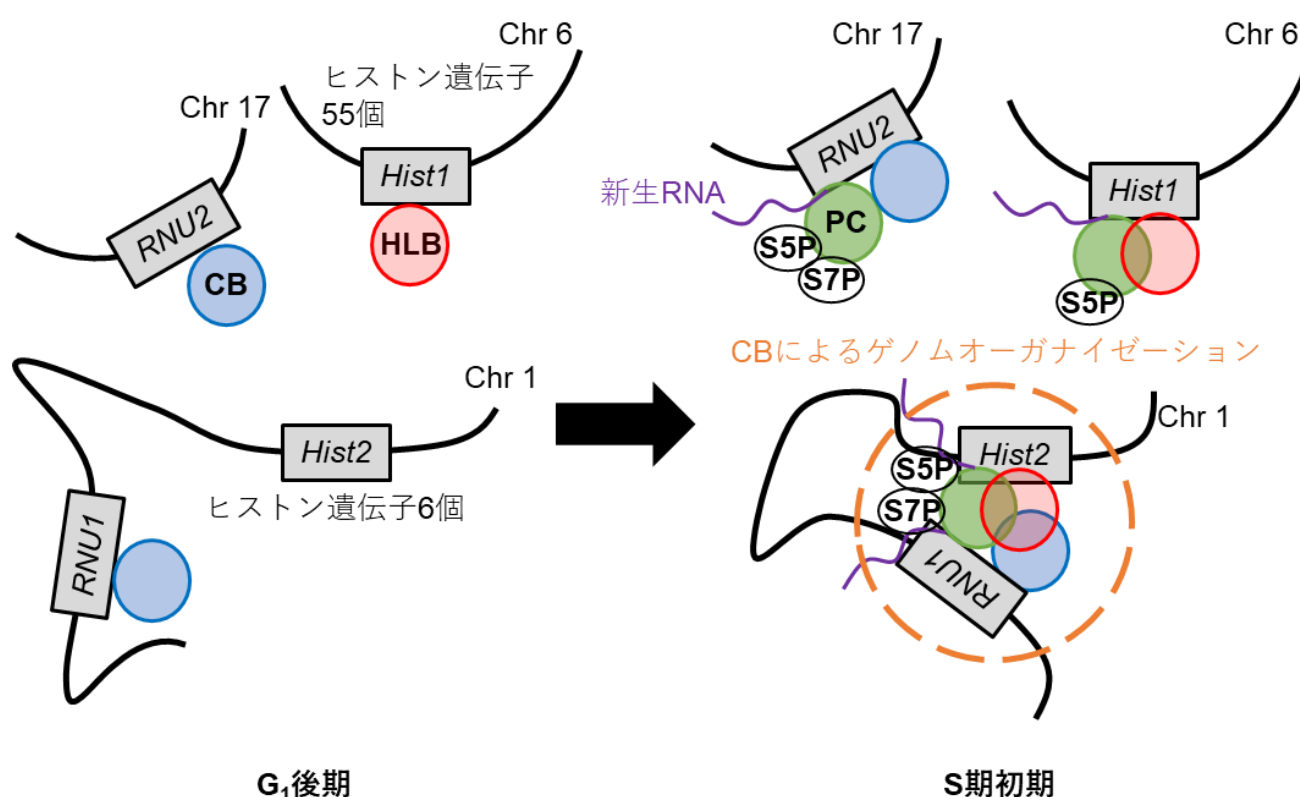


図 35 本研究から推測される PC、CB、HLB による転写調節モデル

G₁ 期には、PC も形成されておらず、HLB は *Hist1* とのみ相互作用している。CB は sn/snoRNA 遺伝子 (*RNU1* と *RNU2*) 近傍に形成される。S 期初期になると、HLB は *Hist2* の近くにも形成される。さらに、PC は CB と HLB の近くに形成され、ヒストン遺伝子や sn/snoRNA 遺伝子を転写するようになる。CB が第一番染色体のゲノムオーガナイゼーションにも関与し、sn/snoRNA 遺伝子 (*RNU1*、*RNU11*、*SNORA72*) とヒストン遺伝子 (*HIST2*、*H3F3A*) を一か所に集めることにより、これらの遺伝子の転写効率を上げている。

最近になって、タンパク質同士の相互作用ではなく、表面張力が NB 同士の相互作用を制御している可能性が提案された[Bergeron-Sandoval et al, 2016; Feric et al, 2016; Sawyer et al, 2016; Shin and Brangwynne, 2017]。液-液相分離による液滴の形成には、表面張力の調節が必要であることが報告されており、NB 同士の相対表面張力の変化によって、NB 同士の相互作用様式（共局在、隣接、相互作用なし）が変化することが理論的にも、実験的にも示されている[Feric et al, 2016; Shin and Brangwynne, 2017]。タンパク質の中には、Biological surfactant と呼ばれる表面張力を調節する両親媒性タンパク質（例えば Ki67）の存在が報告されている[Cuylen et al, 2016; Feric et al, 2016]。PC、CB、HLB に含まれるタンパク質にも、表面張力を調節する両親媒性タンパク質が存在する可能性がある。

CB のサブポピュレーション

通常、核内には 0-10 個の CB が観察されるが、それらの CB は均一な集団ではなく、一つ一つが異なった組成で構成されており、また、局在する場所（あるいはクロマチンと相互作用しているか、核内で自由な状態であるか）によって異なる運動を示すことが報告されている[Platani et al, 2000; Platani et al, 2002]。Platani らは、CB が分裂する様子を生細胞観察で捉え、分裂前の親 CB はフィブリラリンを含んでいる一方で、分裂後の 2 つの娘 CB の内、1 つの娘 CB のみがフィブリラリンを含むことを報告した[Platani et al, 2000]。この結果は、CB は不均等に分裂することを示しており、少なくとも分裂直後は、CB には組成の異なるサブポピュレーションが存在することを意味している。さらに、Platani らは、生細胞観察により CB の動きを解析し、CB にはクロマチンと相互している状態の束縛された動きと核質内を自由に動き回る状態の 2 つの状態が主に存在することを示した[Platani et al, 2002]。加えて、17%の CB は異常拡散を示したことを報告しており、動きに注目した場合、CB には少なくとも 3 種類のサブポピュレーションがあることを示している。

本研究でも、PC、CB、HLB の中で相互作用の有無にサブポピュレーションがあること（例えば、CB とは相互作用しているが HLB とは相互作用していない PC がある、CB と HLB の両方と相互作用している PC など）が示された（実験 2-4）。このようなサブポピュレーションの比率を制御する因子やメカニズムは未知の部分が多いため、今後の解明が望まれる。

今後の発展的な研究

RNA の可視化

本研究では、残念ながら PC、CB、HLB の相互作用の生物学的意義を明らかにできなかった。これら 3 つの NB は snRNA 遺伝子とヒストン遺伝子の転写制御に関与している可能性が高いので、snRNA やヒストン mRNA と PC、CB、HLB を同時に可視化する Immuno-RNA

FISH の実施が望まれる。しかし、現状では、5 色の撮影、特に生細胞観察は技術的に難しい。例えば、青波長（405 nm や 430 nm）は細胞毒性が強く、また、近赤外である Cy7 は輝度が著しく低い。従来の顕微鏡よりも高感度に蛍光を検出できる多色イメージングシステムが望まれる。

NB 同士の相互作用メカニズムの解析

これまでに、PC と CB、PC と HLB、CB と HLB の相互作用を担っているタンパク質は報告されていない。これら NB 同士の相互作用によって生ずる機能をより詳細に解析するためには、NB 同士の相互作用を制御しているタンパク質、そして、そのドメインを特定する必要がある。細胞内での、任意のタンパク質とそのタンパク質と相互作用するタンパク質を網羅的に調べる手法として、TurboID などの proximity labeling という方法が開発されている [Branon et al, 2018; Cho et al, 2020]。RBP1、コイリン、NPAT を標的とした proximity labeling により、PC、CB、HLB 間の相互作用を担っているタンパク質を特定できる可能性がある。

タンパク質同士の相互作用に加えて、表面張力などの他の要因が NB 同士の相互作用を制御している可能性が報告されている [Bergeron-Sandoval et al, 2016; Feric et al, 2016; Shin and Brangwynne, 2017]。タンパク質間相互作用ではなく、表面張力が NB 同士の相互作用を制御していると仮定すると、実験 6 の結果から、コイリンの N 末端が CB の表面張力を制御している可能性が考えられる。野生型コイリン、N 末端にタグを融合させたコイリン、N 末端を削ったコイリンの 3 つを大腸菌または哺乳類培養細胞に発現させて精製し、疎水性加工したプレートと親水性加工したプレートに滴下し、液滴の仰角を測定することで、間接的にこれらのタンパク質が形成する液滴の表面張力を測定できる。細胞内での構造－表面張力相関を計測することは難しいが、精製タンパク質レベルでなら測定できる。タンパク質の構造と表面張力の関係性、表面張力と NB 同士の相互作用の関係性、そして、それら NB 同士の相互作用と遺伝子転写や分化など生物学的機能の関係性の 3 つの階層での関係性を解明し、これらの関係性を体系的に理解することが今後望まれる。

超解像顕微鏡を用いたより詳細な解析

本研究では、スピンドディスクを搭載した共焦点レーザー顕微鏡（CSU-W1、横河電機）を用いて観察を行ったが、構造化照明を用いた超解像顕微鏡（Structural Illumination Microscopy、SIM、例えばニコンの N-SIM S）や光学変倍を用いた超解像顕微鏡（例えば、オリンパスの IXplore SpinSR、<https://www.olympus-lifescience.com/ja/microscopes/inverted/ixplore-spinstr/>）を活用し、より詳細な構造（例えば NB 同士は混ざっているのか、隣り合っているだけなのか）を観察することが望まれる。しかし、一般的にこれらの超解像顕微鏡では共焦点顕微鏡に比

べ、強いレーザー光を必要とするため蛍光タンパク質の退色が激しく、かつ、複数の画像を取得しソフトウェアを用いて超解像画像を作製する場合があるため、生細胞観察には不向きである。

上記の問題を解決する有望な方法は、蛍光輝度が高く、退色しにくい蛍光タグの使用である。例えば、mGreenLantern は EGFP の 6 倍明るく、Venus よりも退色しにくい[Campbell et al, 2020]。また、GFP nanobody [Rothbauer et al, 2006; Ries et al, 2012]や SunTag [Tanenbaum et al, 2014]など、抗体ベースのシグナル増強手段の使用も有効である可能性が高い。

参考文献

- Alberti, S.** (2017) Phase Separation in Biology. *Curr. Biol.*, **27**, R1097–1102. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.08.069>
- Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T.** (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, **176**, 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>
- Allison, L. A., Wong, J. K., Fitzpatrick, V. D., Moyle, M., and Ingles, C. J.** (1988). The C-Terminal Domain of the Largest Subunit of RNA Polymerase II of *Saccharomyces Cerevisiae*, *Drosophila Melanogaster*, and Mammals: A Conserved Structure with an Essential Function. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 321–329. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.1.321>
- Alm-Kristiansen, A. H., Sæther, T., Matre, V., Gilfillan, S., Dahle, Ø., and Gabrielsen, O. S.** (2008). FLASH Acts as a Co-Activator of the Transcription Factor c-Myb and Localizes to Active RNA Polymerase II Foci. *Oncogene*, **27**, 4644–4656. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.105>
- Barcaroli, D., Dinsdale, D., Neale, M. H., Bongiorno-Borbone, L., Ranalli, M., Munarriz, E., Sayan, A. E., McWilliam, J. M., Smith, T. M., Fava, E., Knight, R. A., Melino, G., and Laurenzi, V. D.** (2006). FLASH Is an Essential Component of Cajal Bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 14802–14807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604225103>
- Bartolomei, M. S., Halden, N. F., Cullen, C. R., and Corden, J. L.** (1998). Genetic Analysis of the Repetitive Carboxyl-Terminal Domain of the Largest Subunit of Mouse RNA Polymerase II. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 330–339. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.1.330>
- Bergeron-Sandoval, L., Safaei, N., and Michnick, S. W.** (2016). Mechanisms and Consequences of Macromolecular Phase Separation. *Cell*, **165**, 1067–1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.026>
- Bergstrand, S., O'Brien, E. M., and Farnebo, M.** (2019). The Cajal Body Protein WRAP53 β Prepares the Scene for Repair of DNA Double-Strand Breaks by Regulating Local Ubiquitination. *Front. Mol. Biosci.*, **6**, 51. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00051>
- Bergstrand, S., Böhm, S., Malmgren, H., Norberg, A., Sundin, M., Nordgren, A., and Farnebo, M.** (2020). Biallelic Mutations in WRAP53 Result in Dysfunctional Telomeres, Cajal Bodies and DNA Repair, Thereby Causing Hoyeraal–Hreidarsson Syndrome. *Cell Death Dis.*, **11**, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2421-4>
- Bizarro, J., Bhardwaj, A., Smith, S., and Meier, U. T.** (2019). Nopp140-Mediated

Concentration of Telomerase in Cajal Bodies Regulates Telomere Length. *Mol. Biol. Cell*, **30**, 3136–50. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-08-0429>

Boehning, M., Dugast-Darzacq, C., Rankovic, M., Hansen, A. S., Yu, T., Marie-Nelly, H., McSwiggen, D. T., Kokic, G., Dailey, G. M., Cramer, P., Darzacq, X., and Zweckstetter, M. (2018). RNA Polymerase II Clustering through Carboxy-Terminal Domain Phase Separation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 833–840. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0112-y>

Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N. L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Bosch, L. V. D., Tompa, P., and Fuxreiter, M. (2018). Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.*, **28**, 420–435. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.004>

Bongiorno-Borbone, L., Cola, A. D., Vernole, P., Finos, L., Barcaroli, D., Knight, R. A., Melino, G., and Laurenzi, V. D. (2008). FLASH and NPAT Positive but Not Coilin Positive Cajal Bodies Correlate with Cell Ploidy. *Cell Cycle*, **7**, 2357–2367. <https://doi.org/10.4161/cc.6344>

Branon, T. C., Bosch, J. A., Sanchez, A. D., Udeshi, N. D., Svinkina, T., Carr, S. A., Jessica L. F., Perrimon, N., and Ting, A. Y. (2018). Efficient Proximity Labeling in Living Cells and Organisms with TurboID. *Nat. Biotech.*, **36**, 880–887. <https://doi.org/10.1038/nbt.4201>

Broome, H. J., and Hebert, M. D. (2012). In Vitro RNase and Nucleic Acid Binding Activities Implicate Coilin in U SnRNA Processing. *PLOS ONE*, **7**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036300>

Broome, H. J., and Hebert, M. D. (2013). Coilin Displays Differential Affinity for Specific RNAs In Vivo and Is Linked to Telomerase RNA Biogenesis. *J. Mol. Biol.*, **425**, 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.12.014>

Broome, H. J., Carrero, Z. I., Douglas, H. E., and Hebert, M. D. (2013). Phosphorylation Regulates Coilin Activity and RNA Association. *Biol. Open*, **2**, 407–415. <https://doi.org/10.1242/bio.20133863>

Buckley, M. S., and Lis, J. T. (2014). Imaging RNA Polymerase II Transcription Sites in Living Cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **25**, 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.01.002>

Campbell, B. C., Nabel, E. M., Murdock, M. H., Lao-Peregrin, C., Tsoulfas, P., Blackmore, M. G., Lee, F. S., Liston, C., Morishita, H., and Petsko, G. A. (2020). mGreenLantern: A Bright Monomeric Fluorescent Protein with Rapid Expression and Cell Filling Properties

- for Neuronal Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 30710–30721. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000942117>
- Carrero, Z. I., Velma, V., Douglas, H. E., and Hebert, M. D.** (2011). Coilin Phosphomutants Disrupt Cajal Body Formation, Reduce Cell Proliferation and Produce a Distinct Coilin Degradation Product. *PLOS ONE*, **6**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025743>
- Carmo-Fonseca, M.** (2002). New Clues to the Function of the Cajal Body. *EMBO Reports*, **3**, 726–727. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf154>
- Chartrand, P. and Sfeir, A.** (2020). A Single-Molecule View of Telomerase Regulation at Telomeres. *Mol. Cell. Oncol.*, **7**, 1818537. <https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1818537>
- Chaumont, F., Dallongeville, S., Chenouard, N., Hervé, N., Pop, S., Provoost, T., Meas-Yedid, V., Pankajakshan, P., Lecomte, T., Montagner, Y. L., Lagache, T., Dufour, A., and Olivo-Marin, J.** (2012). Icy: An Open Bioimage Informatics Platform for Extended Reproducible Research. *Nat. Methods*, **9**, 690–696. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2075>
- Chen, Y., Deng, Z., Jiang, S., Hu, Q., Liu, H., Songyang, Z., Ma, W., Chen, S., and Zhao, Y.** (2015). Human Cells Lacking Coilin and Cajal Bodies Are Proficient in Telomerase Assembly, Trafficking and Telomere Maintenance. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 385–395. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1277>
- Chen, F. X., Smith, E. R., and Shilatifard, A.** (2018). Born to Run: Control of Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 464–478. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0010-5>
- Cho, K. F., Branon, T. C., Udeshi, N. D., Myers, S. A., Carr, S. A., and Ting, A. Y.** (2020). Proximity Labeling in Mammalian Cells with TurboID and Split-TurboID. *Nat Protoc.*, **15**, 3971–3999. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0>
- Cisse, I. I., Izeddin, I., Causse, S. Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M., and Darzacq, X.** (2013). Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science* **341**, 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.1239053>
- Cola, A. D., Bongiorno-Borbone, L., Bianchi, E., Barcaroli, D., Carletti, E., Knight, R. A., Ilio, C. D., Melino, G., Sette, C. and Laurenzi, V. D.** (2012). FLASH Is Essential during Early Embryogenesis and Cooperates with P73 to Regulate Histone Gene Transcription. *Oncogene* **31**, 573–582. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.274>
- Corden, J. L.** (2013). The RNA Polymerase II C-Terminal Domain: Tethering Transcription to

- Transcript and Template. *Chem. Rev.* **113**, 8423–8455. <https://doi.org/10.1021/cr400158h>
- Corden, J. L.** (2016). Pol II CTD Code Light. *Mol. Cell* **61**, 183–184. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.005>.
- Coucoravas, C., Dhanjal, S., Henriksson, S., Böhm, S., and Farnebo, M.** (2017). Phosphorylation of the Cajal Body Protein WRAP53 β by ATM Promotes Its Involvement in the DNA Damage Response. *RNA Biol.* **14**, 804–813. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1243647>
- Dellaire, G., and Bazett-Jones, D. P.** (2007). Beyond Repair Foci: Subnuclear Domains and the Cellular Response to DNA Damage. *Cell Cycle* **6**, 1864–1872. <https://doi.org/10.4161/cc.6.15.4560>
- Di Fruscio, M., Weiher, H., Vanderhyden, B.C., Imai, T., Shiomi, T., Hori, T.A., Jaenisch, R., and Gray, D.A.** (1997). Proviral inactivation of the Npat gene of Mpv 20 mice results in early embryonic arrest. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4080–4086. <https://mcb.asm.org/content/17/7/4080>
- Darzacq, X., Jádý, B. E., Verheggen, C., Kiss, A. M., Bertrand, E., and Kiss, T.** (2002). Cajal Body-Specific Small Nuclear RNAs: A Novel Class of 2'-O-Methylation and Pseudouridylation Guide RNAs. *EMBO J.*, **21**, 2746–2756. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2746>
- Egloff, S., O'Reilly, D., Chapman, R. D., Taylor, A., Tanzhaus, K., Pitts, L., Eick, D., and Murphy, S.** (2007). Serine-7 of the RNA Polymerase II CTD Is Specifically Required for SnRNA Gene Expression. *Science*, **318**, 1777–1779. <https://doi.org/10.1126/science.1145989>
- Egloff, S., O'Reilly, D., and Murphy, S.** (2008). Expression of Human SnRNA Genes from Beginning to End. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 590–594. <https://doi.org/10.1042/BST0360590>
- Egloff, S., Zaborowska, J., Laitem, C., Kiss, T., and Murphy, S.** (2012). Ser7 Phosphorylation of the CTD Recruits the RPAP2 Ser5 Phosphatase to SnRNA Genes. *Mol. Cell*, **45**, 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.006>
- Faresse, N. J., Canella, D., Praz, V., Michaud, J., Romascano, D., and Hernandez, N.** (2012). Genomic Study of RNA Polymerase II and III SNAPc-Bound Promoters Reveals a Gene Transcribed by Both Enzymes and a Broad Use of Common Activators. *PLOS Genet.*, **8**, e1003028. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003028>
- Feric, M., Vaidya, N., Harmon, T. S., Mitrea, D. M., Zhu, L., Richardson, T. M., Kriwacki,**

- R. W., Pappu, R. V., Brangwynne, C. P. (2016).** Coexisting Liquid Phases Underlie Nucleolar Subcompartments. *Cell*, **165**, 1686–1697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.047>
- Frey, M. R. and Matera, A. G. (1995).** Coiled bodies contain U7 small nuclear RNA and associate with specific DNA sequences in interphase human cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 5915–5919. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5915>
- Gall, J. G., Bellini, M., Wu, Z., and Murphy, C. (1999).** Assembly of the Nuclear Transcription and Processing Machinery: Cajal Bodies (Coiled Bodies) and Transcriptosomes. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 4385–4402. <https://dx.doi.org/10.1091%2Fmbc.10.12.4385>
- Gao, L., Frey, M. R. and Matera, A. G. (1997).** Human genes encoding U3 snRNA associate with coiled bodies in interphase cells and are clustered on chromosome 17p11.2 in a complex inverted repeat structure. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4740–4747. <https://doi.org/10.1093/nar/25.23.4740>
- Gilder, A. S., Do, P. M., Carrero, Z. I., Cosman, A. M., Broome, H. J., Velma, V., Martinez, L. A. and Hebert, M. D. (2011).** Coilin Participates in the Suppression of RNA Polymerase I in Response to Cisplatin-Induced DNA Damage. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 1070–1079. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-08-0731>
- Guglielmi, B., Rochelle, N. R., and Tjian, R. (2013).** Gene-Specific Transcriptional Mechanisms at the Histone Gene Cluster Revealed by Single-Cell Imaging. *Mol. Cell*, **51**, 480–492. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.molcel.2013.08.009>
- Guirao, J., and Murphy, S. (2017).** Regulation of Expression of Human RNA Polymerase II-Transcribed SnRNA Genes. *Open Biol.*, **7**, 170073. <https://doi.org/10.1098/rsob.170073>
- Günesdogan, U., Jäckle, H., and Herzig, A. (2014).** Histone Supply Regulates S Phase Timing and Cell Cycle Progression. *ELife*, **3**, e02443. <https://doi.org/10.7554/eLife.02443>
- Guo, Y. E., Manteiga, J. C., Henninger, J. E., Sabari, B. R., Agnese, A. D., Hannett, N. M., Spille, J., Afeyan, L. K., Zamudio, A. V., Shrinivas, K., Abraham, B. J., Boija, A., Decker, T., Rimel, J. K., Fant, C. B., Lee, T. I., Cisse, I. I., Sharp, P. A., Taatjes, D. J., and Young, R. A. (2019).** Pol II Phosphorylation Regulates a Switch between Transcriptional and Splicing Condensates *Nature*, **572**, 543–548. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1464-0>
- Grande, M. A., Kraan, I., Steensel, B., Schul, W., Thé, H., Voort, Hans T. M., Jong, L., and Driel, R. (1996).** PML-Containing Nuclear Bodies: Their Spatial Distribution in Relation to

- Other Nuclear Components. *J. Cell. Biochem.*, **63**, 280–291.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19961201\)63:3<280::AID-JCB3>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19961201)63:3<280::AID-JCB3>3.0.CO;2-T)
- Harlen, K. M., and Churchman, L. S.** (2017). The Code and beyond: Transcription ReguLation by the RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.10>
- Hayashi-Takanaka, Y., Yamagata, K., Wakayama, T., Stasevich, T. J., Kainuma, T., Tsurimoto, T., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kurumizaka, H., Nozaki, N., and Kimura, H.** (2011). Tracking Epigenetic Histone Modifications in Single Cells Using Fab-Based Live Endogenous Modification Labeling. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 6475–6488.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr343>
- Hebert, M. D., and Matera, A. G.** (2000). Self-Association of Coilin Reveals a Common Theme in Nuclear Body Localization. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4159–4171.
<https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4159>
- Henriksson, S., and Farnebo, M.** (2015). On the Road with WRAP53β: Guardian of Cajal Bodies and Genome Integrity. *Front. Genet.*, **6**, 91.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00091>
- Hieda, M., Winstanley, H., Maini, P., Iborra, F. J., and Cook, P. R.** (2005). Different Populations of RNA Polymerase II in Living Mammalian Cells. *Chromosome Res.*, **13**, 135–144. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-7720-1>
- Hsin, J., and Manley, J. L.** (2012). The RNA Polymerase II CTD Coordinates Transcription and RNA Processing. *Genes Dev.*, **26**, 2119–2137.
<https://doi.org/10.1101/gad.200303.112>
- Hyman, A. A., Weber, C. A., and Jülicher, F.** (2014). Liquid-Liquid Phase Separation in Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 39–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013325>
- Heintz, N.** (1991) The ReguLation of Histone Gene Expression during the Cell Cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, **1088**, 327–339. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(91\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0167-4781(91)90122-3)
- Iborra, F. J., Pombo, A., Jackson, D. A., and Cook, P. R.** (1996) Active RNA Polymerases Are Localized within Discrete Transcription “factories” in Human Nuclei. *Journal of Cell Science*, **109**, 1427–1436. <https://jcs.biologists.org/content/109/6/1427.long>
- Imai, T., Yamauchi, M., Seki, N., Sugawara, T., Saito, T., Matsuda, Y., Ito, H., Nagase, T., Nomura, N., and Hori, T.** (1996). Identification and characterization of a new gene physically linked to the ATM gene. *Genome Res.*, **6**, 439–447.

<https://genome.cshlp.org/content/6/5/439.fuLI.pdf+html>

- Jackson, D. A., Hassan, A. B., Errington, R. J., and Cook, P. R.** (1993). Visualization of Focal Sites of Transcription within Human Nuclei. *EMBO J.*, **12**, 1059–1065. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05747.x>
- Jacobs, E. Y., Frey, M. R., Wu, W., Ingledue, T. C., Gebuhr, T. C., Gao, L., Marzluff, W. F., and Matera, A. G.** (1999). Coiled bodies preferentially associate with U4, U11, and U12 small nuclear RNA genes in interphase HeLa Cells but Not with U6 and U7 Genes. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 1653–1663. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.5.1653>
- Jordan, P., Cunha, C., and Carmo-Fonseca, M.** (1997). The Cdk7-Cyclin H-MAT1 Complex Associated with TFIIH Is Localized in Coiled Bodies. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1207–1217. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.7.1207>
- Kargapolova, Y., Levin, M., Lackner, K., and Danckwardt, S.** (2017). SCLIP—an Integrated Platform to Study RNA–Protein Interactomes in Biomedical Research: Identification of CSTF2tau in Alternative Processing of Small Nuclear RNAs. *Nucleic Acids Res.* **45**, 6074–6086. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx152>
- Kiss, A. M., Jády, B. E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E., and Kiss, T.** (2002). A Cajal Body - specific Pseudouridylation Guide RNA Is Composed of Two Box H/ACA SnoRNA - like Domains. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4643–4649. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf592>
- Kleppa, L., Mari, P., Larsen, E., Lien, G. F., Godon, C., Theil, A. F., Nesse, G. J., Wiksen, H., Vermeulen, W., Giglia-Mari, G., and Klungland, A.** (2012). Kinetics of Endogenous Mouse FEN1 in Base Excision Repair. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9044–9059. <https://doi.org/10.1093/nar/gks673>
- Kroschwald, S., Maharana, S., and Simon, A.** (2017). Hexanediol: A Chemical Probe to Investigate the Material Properties of Membrane-Less Compartments. *Matters*, **3**, e201702000010. <https://doi.org/10.19185/matters.201702000010>
- Lamond, A. I., and Carmo-Fonseca, M.** (1993). The Coiled Body. *Trends Cell Biol.*, **3**, 198–203. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(93\)90214-L](https://doi.org/10.1016/0962-8924(93)90214-L)
- Lemm, I., Girard, C., Kuhn, A. N., Watkins, N. J., Schneider, M., Bordonné, R., and Lührmann, R.** (2006). Ongoing U SnRNP Biogenesis Is Required for the Integrity of Cajal Bodies. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3221–3231. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0247>
- Liu, J., Murphy, C., Buszczak, M., Clatterbuck, S., Goodman, R., and Gall, J. G.** (2006). The *Drosophila Melanogaster* Cajal Body. *J. Cell Biol.*, **172**, 875–884.

<https://doi.org/10.1083/jcb.200511038>

- Litington, Y., Lawler, A. M., Sebald, S. M., Lee, E., Gearhart, J. D., Westphal, H., and Corden, J. L.** (1999) Growth Retardation and Neonatal Lethality in Mice with a Homozygous Deletion in the C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 100–105. <https://doi.org/10.1007/s004380050946>
- Lu, F., Portz, B., and Gilmour, D.S.** (2019). The C-Terminal Domain of RNA Polymerase II Is a Multivalent Targeting Sequence That Supports Drosophila Development with Only Consensus Heptads. *Mol. Cell*, **73**, 1232–1242.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.008>
- Lu, H., Yu, D., Hansen, A. S., Ganguly, S., Liu, R., Heckert, A., Darzacq, X., and Zhou, Q.** (2018). Phase-Separation Mechanism for C-Terminal Hyperphosphorylation of RNA Polymerase II. *Nature*, **558**, 318–323. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0174-3>
- Ma, T., Van Tine, B. A., Wei, Y., Garrett, M. D., Nelson, D., Adams, P. D., Wang, J., Qin, J., Chow, L. T., and Harper, J. W.** (2000). Cell Cycle–Regulated Phosphorylation of P220NPAT by Cyclin E/Cdk2 in Cajal Bodies Promotes Histone Gene Transcription. *Genes Dev.*, **14**, 2298–2313. <https://doi.org/10.1101/gad.829500>
- Machyna, M., Heyn, P., and Neugebauer, K. M.** (2013). Cajal Bodies: Where Form Meets Function. *WIREs RNA*, **4**, 17–34. <https://doi.org/10.1002/wrna.1139>
- Marzluff, W. F., Wagner, E. J., Duronio, R. J.** (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: Life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.*, **9**, 843–854. <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnrq2438>
- Marzluff, W. F., and Koreski, K. P.** (2017). Birth and Death of Histone MRNAs. *Trends in Genetics*, **33**, 745–759. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.014>
- Medlin, J., Scurry, A., Taylor, A., Zhang, F., Peterlin, B. M., and Murphy, S.** (2005). P-TEFb Is Not an Essential Elongation Factor for the Intronless Human U2 SnRNA and Histone H2b Genes. *EMBO J.*, **24**, 4154–4165. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600876>
- Meier, U. T.** (2017). RNA Modification in Cajal Bodies. *RNA Biol.*, **14**, 693–700. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1249091>
- Meininghaus, M., Chapman, R. D., Horndasch, M., and Eick, D.** (2000). Conditional Expression of RNA Polymerase II in Mammalian Cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription. *J. Biol. Chem.*, **275**, 24375–24382. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001883200>
- Morimoto, M., and Boerkoel, C. F.** (2013). The Role of Nuclear Bodies in Gene Expression

- and Disease. *Biology*, **2**, 976–1033. <https://doi.org/10.3390/biology2030976>
- Ning, W., Guo, Y., Lin, S., Mei, B., Wu, Y., Jiang, P., Tan, X., Zhang, W., Chen, G., Peng, D., Chul., and Xue, Y.** (2020). DrLLPS: A Data Resource of Liquid–Liquid Phase Separation in Eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **48**, D288–295. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1027>
- Nizami, Z. F., Deryusheva, S., and Gall, J. G.** (2010). Cajal Bodies and Histone Locus Bodies in Drosophila and Xenopus. *CSH Symp. Quant. Biol.*, sqb.2009.75.005. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.005>
- Nizami, Z., Deryusheva, S. and Gall, J. G.** (2010). The Cajal body and histone locus body. *CSH Perspect. Biol.*, **2**, a000653. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/2/7/a000653.short>
- Nonet, M., Sweetser, D., and Young, R. A.** (1987). Functional Redundancy and Structural Polymorphism in the Large Subunit of RNA Polymerase II. *Cell*, **50**, 909–915. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90517-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90517-4)
- Osley, M. A.** (1991). The ReguLation of Histone Synthesis in the Cell Cycle. *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 827–861. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.004143>
- Osman, S., and Cramer, P.** (2020). Structural Biology of RNA Polymerase II Transcription: 20 Years On. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **36**, 1–34. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-042020-021954>
- Perry, S. L.** (2019). Phase Separation: Bridging Polymer Physics and Biology. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **39**, 86–97. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.01.007>
- Platani, M., Goldberg, I., Swedlow, J. R. and Lamond, A. I.** (2000). In vivo analysis of Cajal body movement, separation and joining in live human cells. *J. Cell. Biol.*, **151**, 15611574. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1561>
- Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A. I., and Swedlow, J. R.** (2002). Cajal Body Dynamics and Association with Chromatin Are ATP-Dependent. *Nat. Cell Biol.*, **4**, 502–508. <https://doi.org/10.1038/ncb809>
- Qin, J., and Autexier, C.** Regulation of Human Telomerase RNA Biogenesis and Localization. *RNA Biol.*, **0**, 1–11. <https://doi.org/10.1080/15476286.2020.1809196>
- Ramon y Cajal, Santiago.** (1903). Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmaticoy sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab. Lab. Invest. Biol.*, **2**, 129–221
- Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H., and Ewers, H.** (2012). A Simple, Versatile

- Method for GFP-Based Super-Resolution Microscopy via Nanobodies. *Nat. Methods*, **9**, 582–584. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1991>
- Romeo, V., and Schümperli, D.** (2016). Cycling in the Nucleus: Regulation of RNA 3' Processing and Nuclear Organization of Replication-Dependent Histone Genes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **40**, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.015>
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M. C., and Leonhardt, H.** (2006). Targeting and Tracing Antigens in Live Cells with Fluorescent Nanobodies. *Nat. Methods*, **3**, 887–889. <https://doi.org/10.1038/nmeth953>
- Sanjana, N.E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., and Zhang, F.** (2012). A Transcription Activator-Like Effector (TALE) Toolbox for Genome Engineering. *Nat. Protoc.*, **7**, 171–192. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.431>
- Salzler, H. R., Tatomer, D. C., Malek, P. Y., McDaniel, S L., Orlando, A. N., Marzluff, W. F., and Duronio, R. J.** (2013). A sequence in the Drosophila H3-H4 promoter triggers histone locus body assembly and biosynthesis of replication-coupled histone mRNAs. *Dev. Cell*, **24**, 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.02.014>
- Sato, Y., Hilbert, L., Oda, H., Wan, Y., Heddlestone, J. M., Chew, T., Zaburdaev, V., Keller, P., Lionnet, T., Vastenhouw, N., and Kimura, H.** (2019). Histone H3K27 Acetylation Precedes Active Transcription during Zebrafish Zygotic Genome Activation as Revealed by Live-Cell Analysis. *Development*, **146**, <https://doi.org/10.1242/dev.179127>
- Sawyer, I. A., Hager, G. L., and Dundr, M.** (2017). Specific Genomic Cues Regulate Cajal Body Assembly. *RNA Biol.*, **14**, 791–803. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1243648>.
- Sawyer, I. A., Sturgill, D., Sung, M., Hager, G. L., and Dundr, M.** (2016). Cajal Body Function in Genome Organization and Transcriptome Diversity. *BioEssays*, **38**, 1197–1208. <https://dx.doi.org/10.1002%2Fbies.201600144>
- Schier, A. C., and Taatjes, D. J.** (2020). Structure and Mechanism of the RNA Polymerase II Transcription Machinery. *Genes Dev.*, **34**, 465–488. <https://doi.org/10.1101/gad.335679.119>
- Schneider, S., Pei, Y., Shuman, S., and Schwer, B.** (2010). Separable Functions of the Fission Yeast Spt5 Carboxyl-Terminal Domain (CTD) in Capping Enzyme Binding and Transcription Elongation Overlap with Those of the RNA Polymerase II CTD. *Mol. Cell. Biol.*, **30**, 2353–2364. <https://doi.org/10.1128/MCB.00116-10>

- Schmid, M., and Jensen, T. H.** (2014). SnapShot: Nuclear RNAPII Transcript Modification. *Cell*, **157**, 1244-1244.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.003>
- Schul, W., Driel, R., and Jong, L.** (1998). Coiled Bodies and U2 SnRNA Genes Adjacent to Coiled Bodies Are Enriched in Factors Required for SnRNA Transcription. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1025–1036. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.5.1025>
- Schüller, R., Forné, I., Straub, T., Schreieck, A., Texier, Y., Shah, N., Decker, T., Cramer, P., Imhof, A., and Eick, D.** (2016) Heptad-Specific Phosphorylation of RNA Polymerase II CTD. *Mol. Cell*, **61**, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.003>
- Shopland, L. S., Byron, M., Stein, J. L., Lian, J. B., Stein, G. S., and Lawrence, J. B.** (2001). Replication-dependent histone gene expression is related to cajal body (CB) association but does not require sustained CB contact. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 565–576. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.3.565>
- Shpargel, K. B., Ospina, J. K., Tucker, K. E., Matera, A. G., and Hebert, M. D.** (2003). Control of Cajal Body Number Is Mediated by the Coilin C-Terminus. *J. Cell Sci.*, **116**, 303–312. <https://doi.org/10.1242/jcs.00211>
- Sleeman, J. E, and Trinkle-Mulcahy, L.** (2014). Nuclear Bodies: New Insights into Assembly/Dynamics and Disease Relevance. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **28**, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.004>
- Smith, K. P., Carter, K. C., Johnson, C. V. and Lawrence, J. B.** (1995). U2 and U1 snRNA gene loci associate with coiled bodies. *J. Cell. Biochem.*, **59**, 473–485. <https://doi.org/10.1002/jcb.240590408>
- Spector, D. L.** (2006) SnapShot: Cellular Bodies. *Cell*, **127**, 1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.026>
- Staněk, D., and Neugebauer, K. M.** (2004). Detection of SnRNP Assembly Intermediates in Cajal Bodies by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *J. Cell Biol.*, **166**, 1015–1025. <https://doi.org/10.1083/jcb.200405160>
- Staněk, D., and Neugebauer, K. M.** (2006). The Cajal Body: A Meeting Place for Spliceosomal SnRNPs in the Nuclear Maze. *Chromosoma*, **115**, 343–354. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0056-6>
- Staněk, D.** (2016). Cajal Bodies and SnRNPs - Friends with Benefits. *RNA Biol.*, **14**, 671–679. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1231359>
- Staněk, D., and Fox, A. H.** (2017). Nuclear Bodies: News Insights into Structure and Function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **46**, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.05.001>

- Stasevich, T. J., Hayashi-Takanaka, Y., Sato, Y., Maehara, K., Ohkawa, Y., Sakata-Sogawa, K., and Kimura, H. (2014).** Regulation of RNA Polymerase II Activation by Histone Acetylation in Single Living Cells. *Nature*, **516**, 272–275. <https://doi.org/10.1038/nature13714>
- Strzelecka, M., Trowitzsch, S., Weber, G., Lührmann, R., Oates, A. C., and Neugebauer, K. M. (2010).** Coilin-Dependent SnRNP Assembly Is Essential for Zebrafish Embryogenesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 403–409. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1783>
- Suh, H., Ficarro, S. B., Kang, U., Chun, Y., Marto, J. A., and Buratowski, S. (2016).** Direct Analysis of Phosphorylation Sites on the RPB1 C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Mol. Cell*, **61**, 297–304. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.12.021>.
- Sun, J., Xu, H., Subramony, S. H. and Hebert, M. D. (2005).** Interactions between Coilin and PIASy Partially Link Cajal Bodies to PML Bodies. *J. Cell Sci.*, **118**, 4995–5003. <https://doi.org/10.1242/jcs.02613>
- Tanenbaum, M. E., Gilbert, L. A., Qi, L. S., Weissman, J. S., and Vale, R. D. (2014).** A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell*, **159**, 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>
- Trinkle-Mulcahy, L., and Sleeman, J. E. (2016).** The Cajal Body and the Nucleolus: ‘In a Relationship’ or ‘It’s Complicated’? *RNA Biol.*, **14**, 739–751. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236169>
- Uebel, C. J., and Phillips, C. M. (2019).** Phase-Separated Protein Dynamics Are Affected by Fluorescent Tag Choice. *MicroPublication Biol.*, **8**. <https://www.micropublication.org/journals/biology/micropub-biology-000143/>
- Uversky, V. N. (2017).** Intrinsically Disordered Proteins in Overcrowded Milieu: Membrane-Less Organelles, Phase Separation, and Intrinsic Disorder. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **44**, 18–30. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.10.015>
- Venteicher, A. S., Abreu, E. B., Meng, Z., McCann, K. E., Terns, R. M., Veenstra, T. D., Terns, M. P., and Artandi, S. E. (2009).** A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*, **323**, 644–648. <https://doi.org/10.1126/science.1165357>
- Venteicher, Andrew S., and Artandi, S. E. (2009).** TCAB1: Driving Telomerase to Cajal Bodies. *Cell Cycle*, **8**, 1329–1331. <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/cc.8.9.8288>
- Vogan, J. M., Zhang, X., Youmans, D. T., Regalado S. G., Johnson, J. Z., Hockemeyer,**

- D., and Collins, K.** (2016). Minimized Human Telomerase Maintains Telomeres and Resolves Endogenous Roles of H/ACA Proteins, TCAB1, and Cajal Bodies. *ELife*, **5**, e18221. <https://doi.org/10.7554/eLife.18221>
- Walker, M. P., Tian, L., and Matera, A. G.** (2009) Reduced Viability, Fertility and Fecundity in Mice Lacking the Cajal Body Marker Protein, Coilin. *PLOS ONE*, **4**, e6171. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006171>
- Wang, Y., Lu, J., He, L., and Yu, Q.** (2011). Triptolide (TPL) Inhibits Global Transcription by Inducing Proteasome-Dependent Degradation of RNA Polymerase II (Pol II). *PLOS ONE*, **6**, e23993. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023993>
- West, M. L. and Corden, J. L.** (1995). Construction and Analysis of Yeast RNA Polymerase II Ctd Deletion and Substitution Mutations. *Genetics*, **140**, 1223–1233 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1206689/>
- Whittom, A. A., Xu, H., and Hebert, M. D.** (2008). Coilin Levels and Modifications Influence Artificial Reporter Splicing. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 1256–1271. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7587-3>
- Xie, S. Q., and Pombo, A.** (2006). Distribution of Different Phosphorylated Forms of RNA Polymerase II in Relation to Cajal and PML Bodies in Human Cells: An ultrastructural Study. *Histochem. Cell Biol.*, **125**, (2006) 21–31. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0064-2>
- Yang, X., Burch, B. D., Yan, Y., Marzluff, W. F., and Dominski, Z.** (2009). FLASH, a Proapoptotic Protein Involved in Activation of Caspase-8, Is Essential for 3' End Processing of Histone Pre-mRNAs. *Mol. Cell*, **36**, 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.016>
- Ye, X., Wei, Y., Nalepa, G., and Harper, J. W.** (2003). The Cyclin E/Cdk2 Substrate P220NPAT Is Required for S-Phase Entry, Histone Gene Expression, and Cajal Body Maintenance in Human Somatic Cells. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8586–8600. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.23.8586-8600.2003>
- Yurko, N. M., and Manley, J. L.** (2018). The RNA Polymerase II CTD 'Orphan' Residues: Emerging Insights into the Functions of Tyr-1, Thr-4, and Ser-7. *Transcription*, **9**, 30–40. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1338176>
- Zaborowska, J., Egloff, S., and Murphy, S.** (2016). The Pol II CTD: New Twists in the Tail. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 771–777. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3285>
- Zhao, J., Dynlacht, B., Imai, T., Hori, T., and Harlow, E.** (1998). Expression of NPAT, a

Novel Substrate of Cyclin E–CDK2, Promotes S-Phase Entry. *Genes Dev.*, **12**, 456–461.
<https://dx.doi.org/10.1101%2Fgad.12.4.456>

Zhao, J., Kennedy, B. K., Lawrence, B. D., Barbie, D. A., Matera, A. G., Fletcher, J. A., and Harlow, E. (2000). NPAT Links Cyclin E–Cdk2 to the Regulation of Replication-Dependent Histone Gene Transcription. *Genes Dev.*, **14**, 2283–2297.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC316937/>

参考ウェブサイト

1. <https://www.atcc.org/products/all/CCL-247.aspx#characteristics>, 2021 年 1 月 4 日閲覧
2. <https://blog.addgene.org/gfp-fusion-proteins-making-the-right-connection>, 2021 年 1 月 3 日閲覧
3. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpconsiderations.html>, 2021 年 1 月 3 日閲覧

付録

APRIN e-Learning「JST コース(1)生命医科学系」

修了証番号：JB0000558764

所属機関：国立大学法人東京工業大学

姓：今田

名：貴士

修了日：2019 年 6 月 14 日

博士課程における研究発表状況

1. 今田 貴士、相馬（海保） 愛、佐藤 優子、佐伯 泰、志見 剛、木村 宏、液液相分離を介した転写とスプリング調節の可能性、第 139 回日本薬学会、2019 年 3 月 21 日、千葉、口頭発表
2. 今田 貴士、相馬（海保） 愛、志見 剛、佐伯 泰、木村 宏、ヒト生細胞内における核内ボディ複合体形成のダイナミクス、第 38 回染色体ワークショップ・第 19 回核ダイナミクス研究会、2021 年 1 月 18 日・19 日、オンライン、口頭発表
3. **Takashi Imada, Koji Moriya, Masahiko Uchiyama, Naoto Inukai, Mitsuhiro Hitotsuyanagi, Akiko Masuda, Takehiro Suzuki, Shotaro Ayukawa, Yo-Ichi Tagawa, Naoshi Dohmae, Michinori Kohara, Masayuki Yamamura, and Daisuke Kiga.** (2018). A Highly Bioactive Lys-Deficient IFN Leads to a Site-Specific Di-PEGylated IFN with Equivalent Bioactivity to That of Unmodified IFN- α 2b. *ACS Synth Biol.*, **7**, 2537-2546. doi: <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00188>
4. **Takashi Imada, Takeshi Shimi, Ai Kaiho, Yasushi Saeki, and Hiroshi Kimura** (2020) RNA polymerase II condensate formation and association with Cajal and histone locus bodies in living human cells. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.25.424380>
5. **Takashi Imada, Takeshi Shimi, Ai Kaiho, Yasushi Saeki, and Hiroshi Kimura** (Accepted, February, 2021) RNA polymerase II condensate formation and association with Cajal and histone locus bodies in living human cells. *Genes to Cells*, doi: <https://doi.org/10.1111/gtc.12840>

謝辞

博士課程の3年間における研究は東京工業大学・科学技術創成研究院の木村宏研究室で行われたものです。修士2年の時に何のつながりもなかった私に、丁寧に研究室を案内してくださり、受け入れてくださった木村先生には感謝しかありません。あまり方向性を縛らずに、私が興味のあることに専念できる環境を提供してくださったことにも感謝しています。木村研究室での経験は私の今後の人生をより豊かなものにしてくれるだろうと確信しています。また、木村研究室のスタッフの方々（志見先生、佐藤先生、半田先生（現：オックスフォード大学研究員）、小田先生、Marinela 博士）にも日々の研究をサポートしていただきました。スタッフの方々に加えて、木村研究室と一緒に研究をした学生（中尾君や大井君、Yang 君、後藤君、内野君など）にも感謝しています。

本研究で使用した野生型 HCT116 細胞と EGFP-RPB1 ノックイン細胞 (KI 細胞) は東京都医学総合研究所蛋白質代謝プロジェクト佐伯泰研究室で相馬（海保）愛さん（現：星薬科大学特任助教）によって樹立され、譲渡していただいたものです。佐伯先生と相馬（海保）さんにも感謝いたします。また、RNA-Seq の実施に関しては、九州大学生体防御医学研究所の大川恭行研究室に実施していただきました。感謝申し上げます。

博士課程の3年間に渡って私の研究の評価し、助言をくださった審査員の先生方（田口先生、中戸川先生、岩崎先生、藤田先生）にも大変お世話になりました。

博士課程の3年間は、民間の給付型奨学金であるドクター21（公益財団法人吉田育英会）と東京工業大学独自の給付型奨学金であるつばめ奨学金に経済的に支えていただきました。特に吉田育英会には私に対して多額の投資をしてくださったと感じており、創設者吉田忠雄の言葉である「善の巡環」を実行できるような人間になりたいと考えています。

最後に、博士課程の3年間を支えてくれた父母・姉妹と、博士課程後半の1年半を支えてくれた妻に感謝します。