

液-液相分離を介した転写制御

川崎 洸司¹, 深谷 雄志^{1,2}

近年、多様な生命現象がタンパク質の液-液相分離とそれに伴う局在変化を介して動的に制御されることが報告されている。配列特異的な転写因子やコアクティベーターなどのエンハンサー結合因子に加えて、転写伸長因子、スプライシング因子、核内RNA結合タンパク質、RNA polymerase IIなど多くのタンパク質が天然変性領域を介して相分離を誘導し、生化学的な反応を促進する液滴を形成することが明らかとなってきた。こうした液滴は多段階的な転写反応を進行させるための反応区画として機能するだけでなく、タンパク質のリン酸化などの翻訳後修飾やRNA分子などを介した活性調節の場としても重要な役割を果たす。本稿では、多様な核内因子の持つ液-液相分離活性と転写制御の関連性について最新の知見を紹介する。

1. はじめに

生物は遺伝子発現の強度やタイミングを巧みに調節することで、発生や分化などの高次な生命現象を緻密に制御している。ワトソンとクリックによる二重らせんモデルの提唱以来¹⁾、細胞がどのようにDNAにコードされた情報を読み取るのかという謎は、生命科学における中心的な問いである。DNAを鋳型としてRNAを合成する「転写」は遺伝子発現の第一段階であり、生物が備える根源的な仕組みである。しかし一方で、転写の基本的な分子機構には依然として数多くの重要な未解決問題が存在する。真核生物において、転写活性は主にエンハンサーと呼ばれるゲノム

中の調節領域を介して制御されている²⁾。最新の網羅的なゲノム解析から、ヒトゲノム中には90万以上ものエンハンサー領域が存在すると見積もられている³⁾。重要なことに、エンハンサーは標的遺伝子の上流・下流を問わず、数十～数百kbも離れた遠位から標的遺伝子の転写活性を制御できるという特筆すべき性質を持つ。しかし、エンハンサーがどのように遠く離れた位置に存在する標的遺伝子と特異的に相互作用し、転写を誘導するのかという基本的な作用機序は依然として未解明である。また、近年の定量的なライブイメージング解析から、個々の細胞における転写活性は数分から数時間単位でON・OFFを繰り返しながら不連続状に揺らいでいることが報告されている⁴⁻⁶⁾。こうした不連続な転写反応は「転写バースト」と呼ばれ、細菌から高等真核生物にまで共通にみられる^{4,7-9)}。しかし、転写バーストが引き起こされる仕組みについても、十分に理解されていない。

興味深いことに近年、多様な生命現象がタンパク質の液-液相分離とそれに伴う局在変化を介して動的に制御されることが相次いで報告されている¹⁰⁻¹³⁾。転写制御に関しても、現在までに多くの核内因子が相分離活性を示すことが実験的に示されている。一般的に液-液相分離の誘導には、タンパク質内部の天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) と呼ばれる柔軟で特定の立体構造をとりにくい領域が重要な役割を担うことが示されている¹⁴⁻¹⁶⁾。多くの配列特異的な転写因子やコアクティベーターなどのエンハンサー結合因子に加えて、RNA polymerase II (Pol II) 自身もIDRを介して相分離を誘導し、局所的に濃縮された液滴

¹ 東京大学定量生命科学研究センター生命動態研究センター遺伝子発現ダイナミクス研究分野 (〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1 生命科学総合研究棟A404)

² 東京大学大学院総合文化研究科 (〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1 生命科学総合研究棟A404)

Liquid-liquid phase separation in transcriptional control

Koji Kawasaki¹ and Takashi Fukaya^{1,2} (¹Laboratory of Transcription Dynamics, Research Center for Biological Visualization, Institute for Quantitative Biosciences, The University of Tokyo, Life Sciences Research Building A404, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, ²Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Life Sciences Research Building A404, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940494

© 2022 公益社団法人日本生化学会

を核内に形成することが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。そして、このように形成された液滴が、転写を促進する微小環境として働くという新たなモデルが最近大きな注目を集めている。相分離を介した転写制御モデルは、エンハンサーの作用機序や転写動態の制御機構を理解する上で重要な手がかりになる可能性を秘めている。しかし現時点では、転写装置の相分離活性が生体内においてどれほど遺伝子発現に寄与しているのかといった機能的な側面からの理解は十分ではないことから、現在提唱されているモデルについて、今後実験的に注意深く検証していく必要がある。

本稿では、最近報告された転写装置が示す液-液相分離現象を、因子の機能ごとに大別して紹介する。後半では、RNAを介した相分離活性の制御や、形成された液滴がどのように遺伝子発現に影響を及ぼすのかについて、転写活性化の「ハブ」という新たな観点から説明する。最後に、転写因子の相分離活性とtopologically associating domain (TAD)などの立体的なゲノム構造との関連性について、最新の知見を紹介する。

2. 転写と液-液相分離

1) 転写因子

転写活性の強さやタイミングは、ゲノム中のエンハンサーと呼ばれる調節領域によって緻密に制御される。試験管内で再構成された転写反応系とは異なり^{20, 21)}、細胞内ではPol IIや基本転写因子のみでは転写反応を高レベルに誘導することはできない。配列特異的にDNAに結合する転写因子がエンハンサー上に呼び込まれることで、標的遺伝子からの転写活性が大きく促進される。興味深いことに、超解像度顕微鏡を用いて転写因子を直接可視化すると、それらは必ずしも核内に均一に存在しているわけではなく、局所的に濃縮されたクラスターを形成するようすが頻繁にみられる²²⁻²⁹⁾。特に、転写因子を介してエンハンサー上に形成される数十から数百nmスケールの相分離を介して形成される液滴はtranscription hubやtranscriptional condensateと呼ばれ³⁰⁻³⁴⁾、近年大きな注目を集めている(図1A)。転写因子の多くはIDRを有しており^{35, 36)}、IDRどうしの多価性のタンパク質間相互作用を介した相分離が液滴の形成を促進すると考えられている。ある転写因子が形成する液滴は、複数の異なるタンパク質と同時に相互作用することで、他の転写因子やコアクティベーターなどを含んだ反応区画を形成することが示唆されている。またFRAP解析などから、液滴内部ではその構成因子が動的に移動・拡散することも示されている^{12, 37-39)}。実際に試験管内において、Myc, Nanog, Sox2, RARα, GATA2やエストロゲン受容体といったさまざまな転写因子が液-液相分離を起こし、タンパク質が局所的に濃縮された液滴を形成する²⁴⁾。ヒトの四肢形成を制御する転写因子であるHoxD13も同様に、アラニンの連続したリピート配列によって構成されるIDRをN末端側に含んでおり、試験管内において相分離活性を示

す²⁸⁾。人為的にアラニンのリピート配列を伸長させると、IDRを介した多価性相互作用が異常亢進し、結果として液滴を形成する活性が異常に高まる。四肢形成異常がみられる患者では、HoxD13のアラニンリピートの伸長が頻繁にみられることを考えると、液滴形成効率の変化が疾患発症の原因となる可能性が考えられる^{28, 40, 41)}。

重要なことに、単独のリコンビナントタンパク質として精製された転写因子の挙動は、必ずしも細胞内の転写調節機能を十分に反映していない可能性もある。たとえば、パイオニア転写因子で、多能性幹細胞の誘導に必要な山中因子の一つとしても知られるOct4の精製タンパク質は単独では試験管内で液滴を形成しないが、Mediatorと呼ばれるコアクティベーターのサブユニットであるMed1と混合した場合において、2種類のタンパク質が共局在する液滴を形成する²⁴⁾。酵母の転写因子GCN4の液滴形成も同様に、MediatorサブユニットであるMed15の存在によって大きく促進される²⁴⁾。加えて、DNAが反応系に存在することで、転写因子の液滴形成がさらに促進されることも報告されている。Oct4とMed1の混合系では、Oct4結合部位を含むDNAを試験管内に加えることで、液滴形成能が非線形的に急激に上昇する³¹⁾。Oct4と同様に、パイオニア転写因子であるKlf4を用いた実験系においても、結合配列を含むDNAによってKlf4の液滴形成が大きく促進される⁴²⁾。これらの現象は、転写因子がDNA中の結合配列を足場として局所的にタンパク質を濃縮させ、IDRを介したタンパク質間相互作用を促進し、相分離活性を上昇させていることを強く示唆している(図1B)。転写因子以外にも、ヘテロクロマチンタンパク質HP1の相分離活性がDNAを介して制御されることが示されている⁴³⁾。DNA結合タンパク質と同様に、RNA結合タンパク質の液滴形成が基質となるRNA分子の存在によって大きく促進されることも相次いで報告されている^{44, 45)}。このように核酸を足場にして相分離を誘導する活性は、細胞内のさまざまな場面でみられる。試験管内における結果と同様に、マウスES細胞においてもOct4はMed1と共局在しながら核内に顆粒状の液滴を形成する。Oct4-Med1の液滴は、特にスーパーエンハンサーと呼ばれる巨大なエンハンサー領域で顕著に形成されており、標的遺伝子からの高レベルでのRNA産生を誘導している²⁴⁾。重要なことに、Oct4のIDRに変異を導入すると、試験管内だけでなく細胞内においてもMed1と共局在する活性が失われ、標的遺伝子の転写を誘導する能力も大きく低下する。これらの結果は、転写因子はIDRを介して転写活性化に働く液滴をエンハンサー上に作り出し、標的遺伝子を制御しているという考えと一致している。興味深いことに、活性化に働く転写因子だけでなく、転写リプレッサーやポリコーン群タンパク質などの抑制因子も、試験管内や細胞内において相分離を介した液滴を形成することが報告されている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。特に転写リプレッサーの液滴は、標的遺伝子近傍から転写活性化因子群を排除する抑制的な核内区画として機能することが示唆されている⁴⁸⁾。

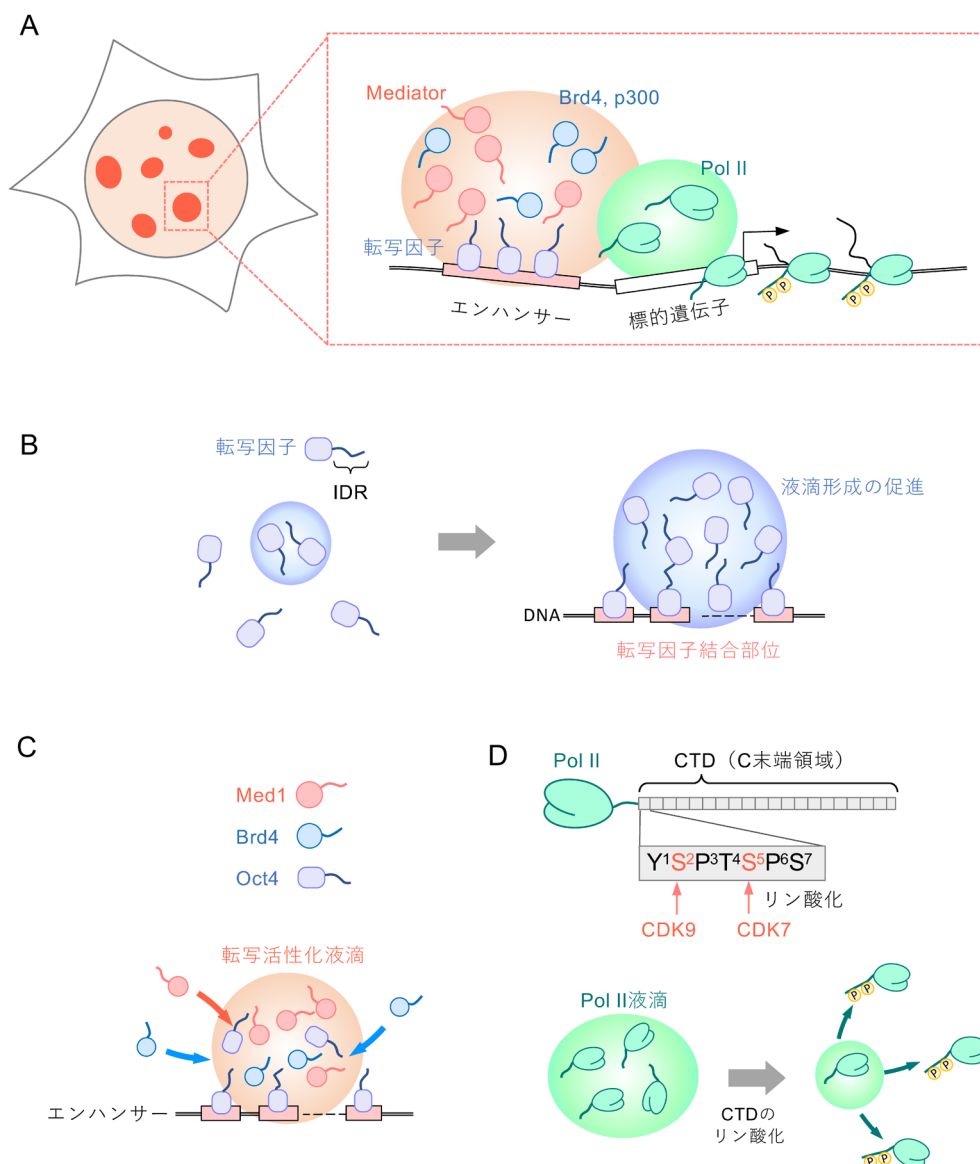


図1 転写装置の相分離液滴

(A)核内では転写装置の多くは不均一なクラスター状に分布する。こうした濃縮区画には転写因子・コアクティベーターなどの転写活性化因子やPol IIが局所的に集合している(右)。(B)転写因子の液滴形成は、結合配列を含むDNAの存在によって大きく促進される。(C) Med1やBrd4は、自身のIDRを介して相分離を誘導し液滴を形成することができる。これらは、転写因子など異なるタンパク質分子を含むことで、転写活性化のハブとして機能すると考えられる。(D) Pol II CTDはY¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷の七つのアミノ酸残基の繰り返しからなるIDRを有する。脱リン酸化型のCTDは液滴を形成するが、セリン残基のリン酸化によって液滴を離脱する。

このように、転写の活性化因子や抑制因子が互いに物性の異なる相互排他的な液滴を形成し、それぞれの反応を区画化することで、生体内における転写活性が巧みに制御されている可能性が考えられる。次節では、転写活性化において重要な役割を担うMediatorなどのコアクティベーターと相分離の関連性について議論する。

2) コアクティベーター

配列特異的な転写因子は、MediatorやBrd4, p300/CBPといったコアクティベーターをエンハンサー上に呼び込むことで、標的遺伝子の転写活性を上昇させる。Mediatorは20種類以上のサブユニットから構成されるタンパク質複合体

であり、遺伝子のコアプロモーター近傍への転写開始前複合体の形成を促進する⁴⁹⁾。これまでMediatorは、エンハンサー上に結合した転写因子と、遺伝子のコアプロモーター上における転写開始前複合体との間を橋渡することで安定的なループ構造を形成し、エンハンサーからの転写活性化シグナルを標的遺伝子へと伝達していると考えられてきた⁵⁰⁻⁵²⁾。興味深いことに超解像顕微鏡を用いたライブイメージング解析から、MediatorサブユニットであるMed19がマウスES細胞においてPol IIとともに核内で液滴状のクラスターを形成することが報告された¹⁷⁾。Med19が形成するクラスターは転写活性化領域と共局在しているが、JQ1などの転写阻害剤の存在下において消失することから、転

写活性と Mediator による液滴の形成は密接に共役していることが示唆された。また 1,6-ヘキサジオールなどの相分離阻害剤で細胞を処理した場合においても、核内における Mediator のクラスターは消失することから、転写因子と同様に相分離を介してその局在が制御されていることが示唆されている。同様に、Mediator の主要サブユニットである Med1 は試験管内において自身の持つ IDR を介して液滴の形成を誘導する⁵³⁾。細胞内では、Med1 はスーパーエンハンサー領域に特に高いレベルで濃縮されており、標的遺伝子からの新生 RNA 合成の場として機能するようすが観察されている⁵³⁾。Mediator 以外の主要なコアクティベーターである Brd4 も、核内において Med1 と同一のスーパーエンハンサー領域に高レベルで濃縮されることが報告されている⁵³⁾。Brd4 は転写伸長促進因子である P-TEFb を介して Pol II の活性を促進する機能を持つ^{54, 55)}。これらのことを踏まえると、Mediator と Brd4 が共局在するハブは、標的遺伝子への Pol II の呼び込みと伸長反応の両方を同時に促進する反応区画として働く可能性が考えられる。Brd4 の精製タンパク質もまた試験管内において IDR を介して液滴を形成し、Med1 など他の異なる因子と共局在することができる⁵³⁾。前節で紹介した Oct4 の相分離活性を踏まえると、転写因子がエンハンサーへと配列特異的に結合することで相分離を誘導する足場が形成され、さらにそこへ Mediator や Brd4 などのコアクティベーターが引き込まれることで、転写活性化に働く液滴が生み出されるというモデルが考えられる (図 1C)。加えて、Brd4 と相互作用する P-TEFb も細胞内において転写伸長の促進に働く液滴を形成することが報告されている^{56, 57)}。相分離活性を介して、エンハンサー上に転写因子の結合部位数以上の数のタンパク質群が動的に呼び込まれ、転写開始から伸長段階までを高効率に促進している新たな可能性が考えられる³⁰⁾。

また最近、エンハンサー領域から転写される非コード RNA である enhancer RNA (eRNA) が、エンハンサー上におけるハブの形成を促進するという興味深い実験結果が報告された。eRNA 中のアデニン塩基がメチル化 (m6A 修飾) されると、リーダータンパク質である YTHDC1 がエンハンサー上に呼び込まれる。YTHDC1 は IDR を有しており、m6A 修飾を持つ eRNA との相互作用を介して相分離を誘導し、Brd4 を液滴へと呼び込む活性を示す⁵⁸⁾。このように液滴の形成やその局在様式は、転写因子だけではなく近傍のゲノム領域に存在する RNA などの影響を強く受ける可能性がある。Brd4 や Mediator 以外にも、ヒストンアセチル基転移酵素である p300/CBP と呼ばれるコアクティベーターも自身の IDR を介して液滴を形成し、転写の活性化に働くことが示唆されている^{59, 60)}。p300/CBP は RNA 結合活性を有しており、eRNA などとの相互作用によってアセチルトランスフェラーゼ活性が上昇することも報告されている⁶¹⁾。さらに、p300/CBP によって導入された H3K27Ac などのヒストン修飾は、Brd4 のプロモドメインによって直接認識される足場として働くことで、液滴への

Brd4 の呼び込みをよりいっそう促進している可能性がある。以上のように、エンハンサー上における転写活性化の反応区画の形成は、転写因子やコアクティベーター間における協調的作用によって高度に制御されているものと考えられる。

3) RNA ポリメラーゼ II

Pol II は DNA を鋳型とした mRNA の合成を直接担う必須のタンパク質である⁶²⁻⁶⁴⁾。Pol II 自身の活性制御においても、液-液相分離が重要な役割を果たすという新たな実験結果が報告されつつある。

重要なことに Pol II は核内において均一ではなく、クラスターを形成しながら不均一に存在していることが 30 年近く前から知られている^{65, 66)}。Pol II 以外の Pol I や Pol III についても同様に、核内でクラスターを形成する性質が共通に観察されている^{67, 68)}。超解像顕微鏡を用いて Pol II クラスターの形成動態を解析すると、新生 mRNA の転写量と Pol II の局所濃度との間には明瞭な正の相関関係がみられる^{69, 70)}。このことから、特定の遺伝子座からの転写量調節において、Pol II クラスターの形成が重要な役割を担う可能性が示唆される。液-液相分離を示す多くのタンパク質と同様に、Pol II の最大サブユニットである Rpb1 はその C 末端領域 (C-terminal domain: CTD) に、Y¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷ の七つのアミノ酸残基の繰り返しからなる IDR を有する (図 1D)。この 7 アミノ酸のコンセンサス配列の数は、ヒトでは 52 回、ショウジョウバエでは 43 回、出芽酵母では 26 回というように生物種によって異なる。精製された CTD は試験管内において、FET ファミリータンパク質である FUS, EWF, TAF15 のハイドロゲルや、cyclin T1 の形成する液滴に取り込まれ、共濃縮されるという重要な性質を示す^{56, 71)}。さらに、CTD は試験管内や細胞内において Med1 が形成する液滴とも共局在することができる¹⁸⁾。ヒトや酵母の精製 CTD は単独でも試験管内で液滴を形成するが¹⁹⁾、その活性はコンセンサス配列のリピート数の変化に伴って大きく変化する。細胞内で CTD のリピート数の異なる Rpb1 を発現させると、試験管内で強い液滴形成能を示す Rpb1 は、液滴形成能の弱い低リピート型の変異体に比べて、核内における Pol II クラスターの形成をより高いレベルで引き起こしていた。重要なことに、Pol II クラスター近傍のゲノム領域では転写バーストが効率的に引き起こされるようすが観察されている^{69, 70)}。また、出芽酵母において CTD のリピート数を短くすると、転写バーストの頻度や大きさが低下することが報告されている⁷²⁾。以上の知見を合わせると、Pol II は CTD のリピート配列依存的にクラスターを形成し、その局所濃度を上昇させることで、転写バーストの誘導を促進している可能性が考えられる。すなわちエンハンサー上に形成された転写因子やコアクティベーターの液滴は、局所的に濃縮された Pol II のリソースを消費することで、標的遺伝子への Pol II の呼び込み、および転写伸長反応を促進しているという新たな作用

機序が示唆される。

Pol IIが遺伝子のコアプロモーター領域に呼び込まれると、CTDを構成するY¹S²P³T⁴S⁵P⁶S⁷の2番目(Ser2)および5番目のセリン残基(Ser5)が、CDK9やCDK7のキナーゼ活性によりリン酸化される(図1D)。まず初めにCDK7を介したSer5のリン酸化によって転写開始が促進され、その後CDK9を介したSer2のリン酸化により転写伸長反応が促進される⁷³⁾。興味深いことに、リン酸化されたCTDはFUSのハイドロゲルやMed1の液滴内から離脱する^{18, 19, 71)}。この結果を踏まえると、リン酸化前の転写反応にまだ参加していないPol IIが核内において積極的にクラスターを形成し、その局所的な濃度上昇に寄与していることが示唆される。エンハンサーがこのリソースを利用してPol IIを標的遺伝子へと呼び込み、CTDのリン酸化が起これば、Pol IIはクラスターを離脱して転写伸長反応へと突入すると考えられる^{18, 19)}。転写伸長中の新生RNAに作用するスプライシング因子もまた、核内において局所的に濃縮された液滴を形成する¹⁸⁾。特筆すべきことに、こうしたスプライシング因子の液滴は、Mediatorが形成する液滴とは融合せずに隣接して存在している。このとき、CTDがリン酸化されていない転写開始前のPol IIはMediatorの液滴に取り込まれるのに対し、リン酸化され転写伸長段階にあるPol IIは隣接するスプライシング因子の液滴へと移行する。すなわち、転写が開始段階から伸長段階へと進むにつれ、Pol IIが新生RNAプロセシングのための液滴と共局在することで、効率的な遺伝子発現に寄与していると考えられる。

3. RNAを介した転写制御

前述のとおり、エンハンサー領域から産生されるeRNAがm6A修飾を介して液滴の形成を促進することが報告されている⁵⁸⁾。その他にも、新たに産生されたRNA分子が近傍のゲノム領域におけるMed1の相分離活性に大きな影響を及ぼすことが、マウスES細胞を用いたレポーター解析から示唆されている⁷⁴⁾。エンハンサーや標的遺伝子本体から転写が起これば直後、新生RNAがそのゲノム領域に低濃度で存在する条件では、転写開始部位近傍におけるMed1の液滴形成が促進され、さらに転写活性が上昇するという正のフィードバックが起こる。一方で、ある一定のレベルまで転写活性が上昇し、局所的な新生RNAの濃度が閾値を超えると、逆にMed1による液滴の形成に対して阻害的に作用し、結果として転写が負に制御される。現時点で、新生RNAを介した転写抑制作用の分子基盤は明らかとなっていないが、負の電荷を持つRNA分子の局所的な集合がMed1の液滴を消失させる要因として働く可能性が示唆されている。負のフィードバック効果は、産生されるRNA分子の長さに大きく依存して変化する。

また最近、RNAを介した液滴の形成制御に、核内に局在するRNA結合タンパク質が重要な役割を担うことが報

告された⁷⁵⁾。マウスES細胞のクロマチン画分に含まれるRNA結合タンパク質のうち、パラスペックルの構成タンパク質であるPSPC1 (paraspeckle component 1) は、RNA結合ドメインに加えてIDRを有しており、試験管内において液滴を形成する活性を示す。そこへ精製したPol IIのCTDや、基本転写因子であるTBP (TATA binding protein)を加えると、PSPC1液滴内にそれらが同時に取り込まれる。興味深いことに、PSPC1とCTD/TBPによる液滴形成は、低濃度のRNA存在下において促進される一方で、高濃度のRNA存在下では顕著に阻害される(図2A)。細胞内では、PSPC1は遺伝子の転写開始点近傍に主に結合している。これらの結果を踏まえると、新生RNAの局所的濃度が低い段階では、PSPC1が液滴の形成を介してPol IIやTBPなどの基本転写因子を積極的に呼び込み、転写を促進していると考えられる。一方で、転写反応が進行し新生RNAの局所濃度が上昇すると、PSPC1の液滴形成は阻害され、それと同時に転写開始点近傍へのPol IIやTBPの積極的な濃縮作用が失われる。以上のような仕組みを介して、RNAを介した正と負の遺伝子発現フィードバック機構が、転写反応の進行に伴って段階的に働く可能性が考えられる(図2B)。

前述のとおり、新生RNAの局所的濃度が低い転写初期の段階では、PSPC1の液滴形成は促進され、Pol IIやTBPなどの因子を転写開始点近傍に呼び込む反応を補助している。PSPC1の他にも、RNA分子がタンパク質の液-液相分離を促進する例は数多く報告されている^{45, 76, 77)}。以前から液-液相分離活性を示すことが知られている代表的なタンパク質であるhnRNPA1やFUSは、IDRに加えてRNA結合ドメインを有しており、RNAに結合することで相分離が促進される^{45, 76, 78, 79)}。こうした背景を踏まえると、核内に局在するRNAの存在様式が個体発生・細胞分化過程に応じて変化することで、ある特定のタンパク質群を含んだ液滴の形成が動的に制御されている可能性が考えられる。実際に、RNAを介してゲノム上における液滴形成が制御される機構の一つとして、ショウジョウバエ性染色体における遺伝子発現量補償に必須の非コードRNAである*roX2* (long non-coding RNA on X2) について紹介する^{80, 81)}。ショウジョウバエではXXが雌、XYが雄であるが、哺乳類とは異なり雄のX染色体からの転写量を倍にすることで、雌雄間の染色体数に起因する発現量の差を補っていると考えられている⁸²⁻⁸⁴⁾。X染色体全体に及ぶ発現量補償を可能とするのは、雄特異的に発現するMSL (male-specific lethal) と呼ばれる複合体であり、*roX2* RNAはその構成因子の一つである⁸⁵⁻⁸⁷⁾。MSL複合体はヒストンアセチル化活性を有しており、雄のX染色体全域にわたってヒストンH4の16番目のリシン残基にアセチル化修飾(H4K16ac)を導入する⁸⁸⁻⁹⁰⁾。MSL複合体の構成タンパク質であるMSL2はC末端側にIDRを有している。この領域は試験管内において、MSL2の結合基質である*roX2* RNA存在下でのみ、液滴を形成することができる⁹¹⁾。興味深いことに、ショウ

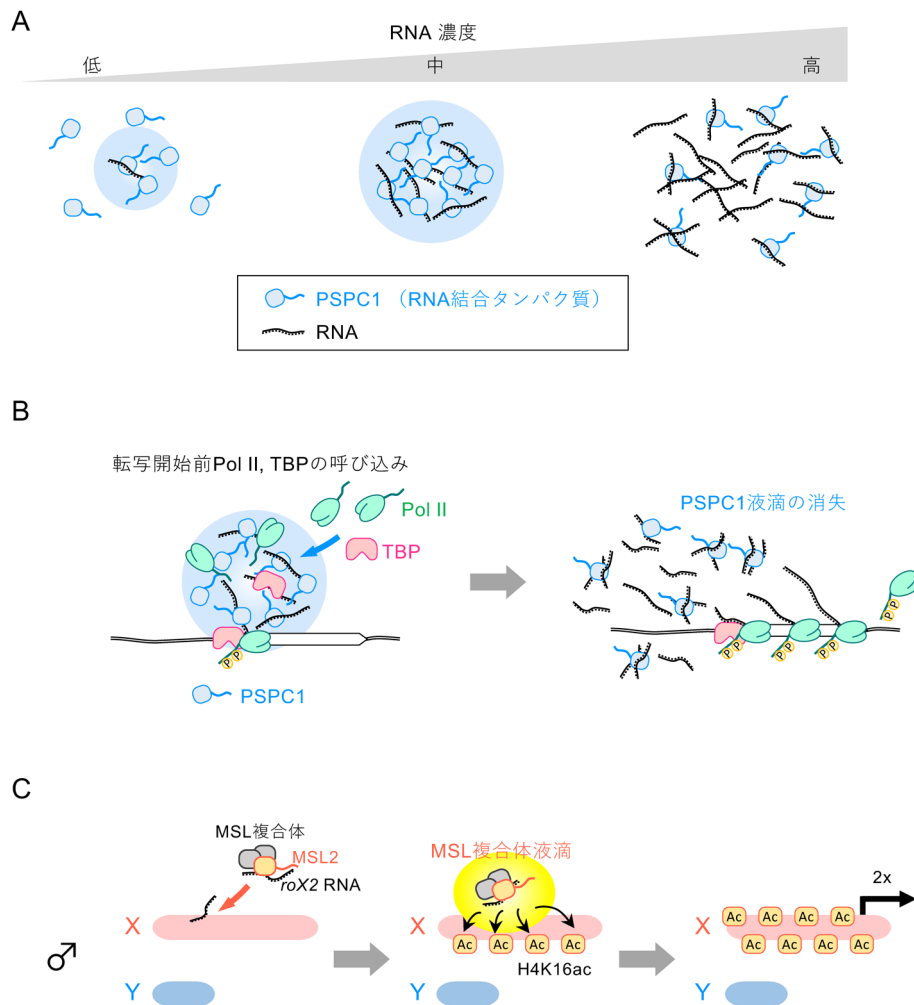


図2 RNA分子と液-液相分離を介した転写制御

(A) 試験管内でPSPC1はRNA濃度依存的に液滴を形成する。(B) 低濃度RNA存在下ではPSPC1の相分離が促進され、転写開始点近傍へPol IIやTBPなどの呼び込みを助ける(左)。転写が活発になり局所的なRNA濃度が上昇するとPSPC1の液滴は消失し、転写活性が低下する。(C) ショウジョウバエ雄のX染色体では、MSL2とroX2 RNAの形成する液滴によってMSL複合体による転写活性化が促進される。

ショウジョウバエ由来のroX2とMSL2をマウスES細胞で異所的に発現させると、それらは核内に液滴を形成しながら、roX2 RNA産生領域近傍に位置する遺伝子の転写活性を上昇させた。このことから、X染色体から転写されたroX2 RNAが足場として機能することで、MSL2の相分離が誘導され、近傍の遺伝子領域に転写活性化のための因子群が呼び込まれるという新たなモデルが提唱された(図2C)。実際に、MSL2のC末端側にあるIDRを特異的に欠失させた変異体ショウジョウバエでは、roX2 RNAへの結合活性は保持されているものの、X染色体からの発現量を十分に補償することができず、結果として雄は致死となる。このように、MSL2のIDRを介した相分離活性は、X染色体全域にわたるMSL複合体の呼び込みに重要な役割を果たしていることが示唆された。こうした研究から得られた知見をもとに、将来的にRNAを足場とした液滴形成を人為的に操作する技術が開発されれば、さまざまなゲノム機能を自在に制御するためのツールとして応用できる可能性がある。

4. 相分離液滴を介した転写活性化サイクル

これまで紹介してきた核内因子の相分離研究から浮かび上がってきた新たな転写制御モデルについてあらためて整理してみたい(図3)。まず、エンハンサー領域に配列特異的な転写因子が呼び込まれる(①)。DNAを足場として局所的に濃縮された転写因子はMediatorやBrd4, p300/CBPなどのコアクティベーターを含んだ液滴を形成し、それが転写活性化のハブとして機能する(②)。一部のコアクティベーターは、エンハンサーから転写されたeRNAのm6A修飾とそれを認識するリーダタンパク質を介してエンハンサー上へと濃縮される。また、標的遺伝子の周囲に存在する低濃度のRNAは、PSPC1などのクロマチン画分に存在するRNA結合タンパク質を呼び込むことで、転写開始を促進する液滴の形成を助ける。エンハンサー上に形成される液滴と、RNA結合タンパク質が形成する液滴は、互いに融合することで補完的に機能しているのか、あるいは相互排他的に働くのかについては現時点で不明である。これ

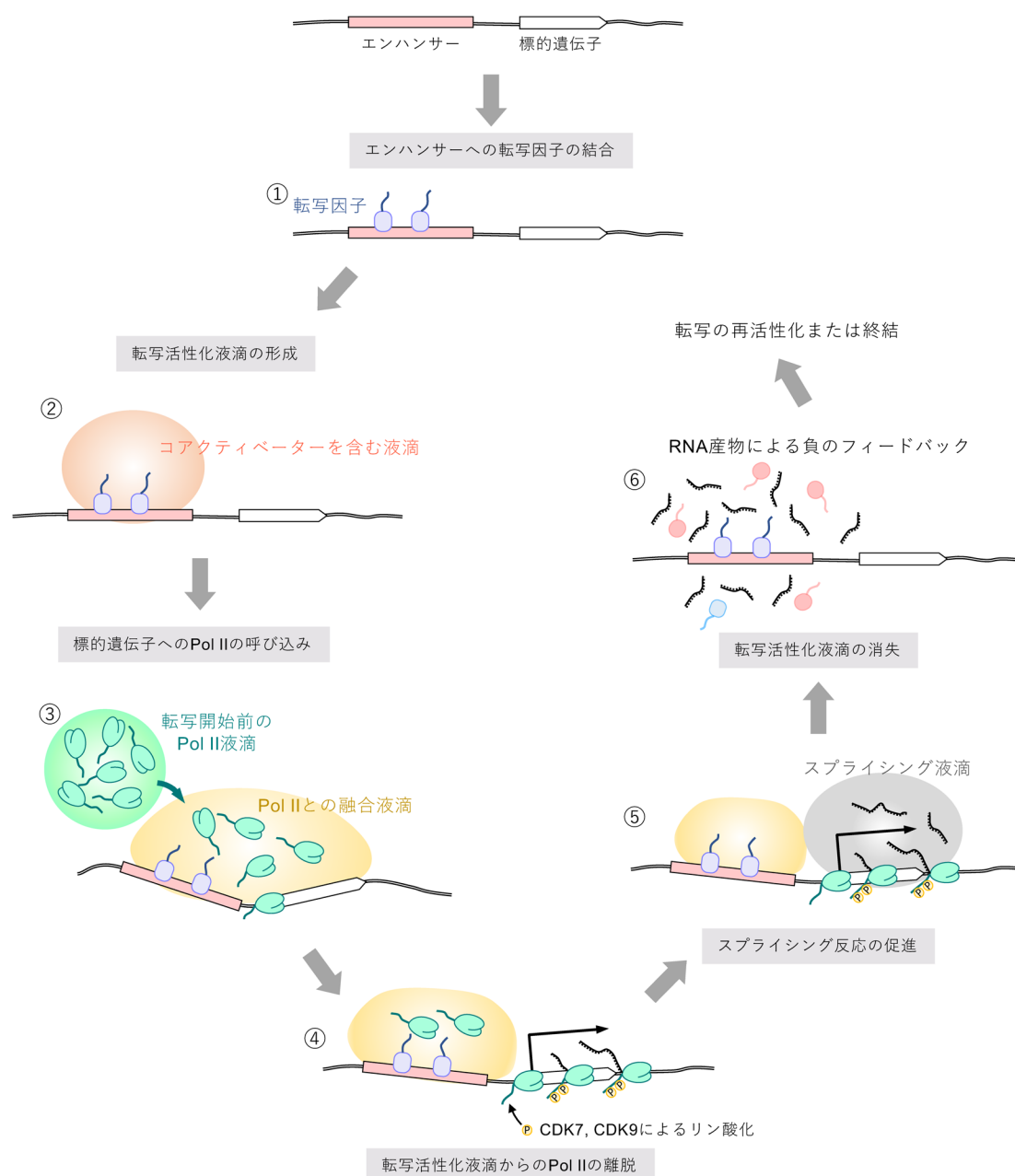


図3 液-液相分離を介した転写活性化モデル
段階的な転写装置の相分離を介した遺伝子発現制御モデル（詳細は本文参照）。

らの液滴は共通して、CTDを介してPol IIを取り込む活性を持つことから、転写開始前の脱リン酸化型Pol IIを特定のゲノム領域に濃縮し、標的遺伝子のコアプロモーター領域への呼び込みを促進していると考えられる(③)。CDK7やCDK9によってCTDがリン酸化されると、Pol IIは液滴から離脱するとともに、伸長反応を開始する(④)。転写伸長中のPol IIはスプライシング因子の濃縮された別の液滴へと移行することで、転写反応と共役した新生RNAの効率的なプロセッシングが行われる(⑤)。転写反応が持続し、新生RNAがある一定の局所濃度にまで達すると、近傍のゲノム領域における負電荷の急激な上昇などを介して液滴の形成が阻害され、その結果転写活性が低下することが示唆されている(⑥)。こうした負のフィードバック機構が、

転写バーストにみられるような間欠的で不連続な転写活性を生じさせる原因として働く可能性も考えられる。ただし、以上のモデルは現時点での個別の研究結果をつなぎ合わせたものであり、単純化された仮説としての理解である点に注意する必要がある。今後の研究によって、より詳細な作用機序を明らかにしていくことが必要である。

5. ゲノム構造の変化とエンハンサー作用動態

1) 高次ゲノム構造と液-液相分離

転写制御に働く液滴は、標的遺伝子の活性だけではなく、周囲の立体的なゲノム構造にまで大きな影響を及ぼすことが明らかとなってきた。Hi-C解析などの網羅的解析

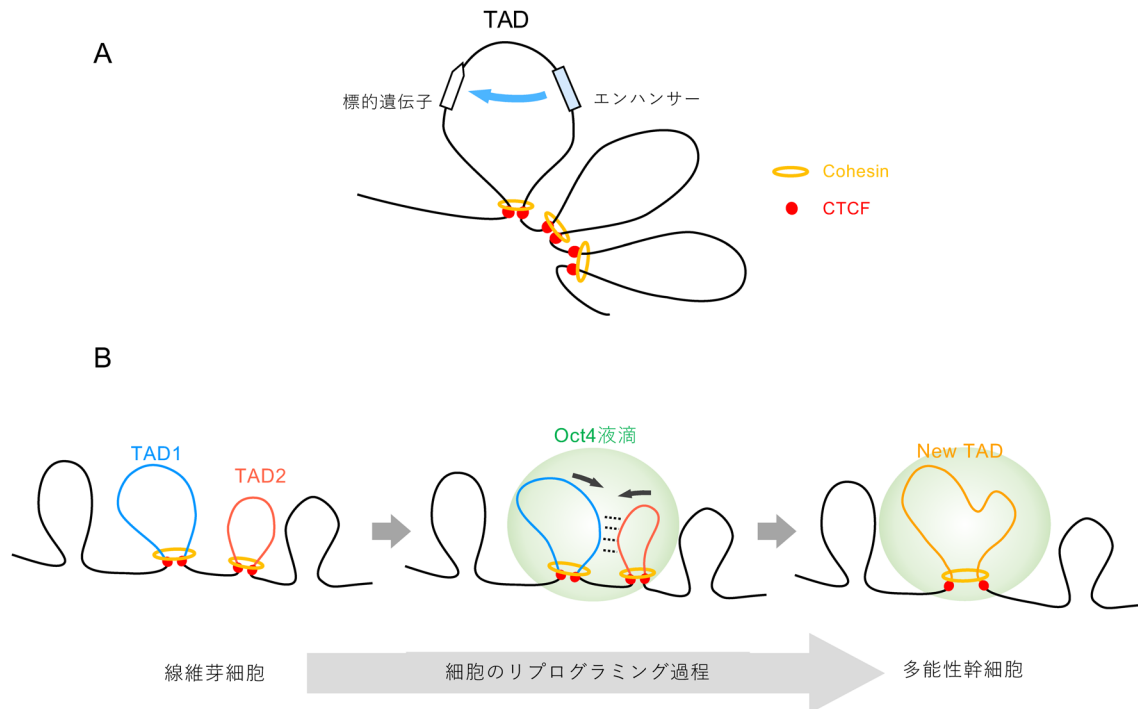


図4 高次ゲノム構造の変化と液-液相分離

(A) コヒーシン (cohesin) や CTCF によって形成される TAD は、エンハンサー・プロモーター相互作用の特異性を制御している。(B) 細胞のリプログラミング過程では Oct4 の形成する液滴により、既存の二つの TAD から新しい単一の TAD への再編成が促進される。

手法の発展に伴い、ゲノムの折りたたまれ方や、その立体的な構造変化が制御される仕組みについて飛躍的な理解がもたらされつつある。なかでもゲノム内で頻繁に相互作用し合う数 kb～1 Mb 程度の領域は TAD と呼ばれる。TAD は相互作用するエンハンサーと標的遺伝子との物理的な近接度を調節することで、特異的な転写制御を可能にする構造的基盤として働くと考えられている (図 4A)^{92, 93)}。発生や細胞分化の過程において TAD が再編成されると、相互作用するエンハンサーとプロモーターの組み合わせが変化し、組織特異的な遺伝子発現プログラムへと切り替えられる⁹⁴⁾。ヒトやマウスなどの哺乳細胞では、CTCF と呼ばれる Zn-finger 型の DNA 結合タンパク質や、コヒーシン (cohesin) と呼ばれるリング型のタンパク質複合体が、TAD の形成において中心的な役割を果たす^{92, 95)}。ごく最近の研究によって、これらの因子に加えて、転写因子が生み出す液滴が TAD の形成に大きな影響を与えることが示された。前節で紹介したように、パイオニア転写因子として働く Oct4 は核内において液滴を形成する活性を持つ^{24, 31)}。またよく知られているように、Oct4 は多能性幹細胞の誘導に必要な山中因子の一つでもある⁹⁶⁾。マウス胎仔線維芽細胞から多能性幹細胞へのリプログラミング過程において Hi-C 解析を行うと、一度構築された複数の TAD が大きな単一の TAD へと再編成されるようすが観察された。このとき Oct4 を可視化すると、自身が形成する液滴内部に複数の異なる TAD を取り込むことで、それらが互いに近接する中間状態を作り出しているようすが観察された。つま

り Oct4 の液滴が複数の TAD どうしを融合し、新たな単一の TAD へと再編成するための足場として機能する新たな可能性が示唆された (図 4B)⁹⁷⁾。試験管内や細胞内でみられる Oct4 の相分離活性は、TAD の再編成活性、およびリプログラミング効率と関連することも実験的に示されている。以上を踏まえると、Oct4 などの転写因子が形成する液滴は、転写活性だけではなく立体的なゲノム構造やその核内配置を動的に変化させる足場として、細胞運命の決定に働いていると考えられる。細胞分化やリプログラミングの過程以外にも、出芽酵母では熱応答性の転写因子である Hsf 1 が、熱ストレス存在下において Mediator とともに液滴を形成し、立体的なゲノム構造の再編成を促進することが報告されている⁹⁸⁾。熱応答時には異なる染色体間どうしの相互作用が高頻度で起こることを踏まえると⁹⁹⁾、Hsf 1 の形成する液滴が、通常の生育環境では物理的に離れたゲノム領域どうしを物理的に近接させるためのハブとして機能することが考えられる。

2) DNA の力学的張力を生み出す液-液相分離

よりミクロなスケールで、生物物理学的な視点に立ったエンハンサーの作用機構と相分離の関連性についても、近年興味深い報告がなされている。転写因子が形成する液滴はそれ自身が DNA を手繰り寄せる物理的な張力を生じさせる可能性が示された¹⁰⁰⁾。パイオニア転写因子の一つである FoxA1 (Forkhead box protein A1) の精製タンパク質と DNA を混合したところ、ガラス基盤に緊留した DNA 表

面にFoxA1が濃縮され、液滴が形成された。光ピンセットを用いた計測と理論的解析から、FoxA1液滴が外部のDNAを引き込んでさらに成長しようとする過程において、DNAを手繰り寄せる方向に張力が生じている可能性が示されている。こうした物理的な力は、生体内ではエンハンサーとプロモーター領域のようにゲノム中に離れて存在するDNAどうしを物理的に近接させる効果があると考えられることができる。現時点では、生細胞内でどの程度こうした張力が転写制御やTADに寄与しているのかは不明である。しかし、DNA上における転写因子の物性変化がエンハンサーの長距離作用や立体的なゲノム構造の変化を促進するという可能性は大変興味深い。液相や固相界面の分子挙動の解析は物理・ソフトマター分野で大きく進んでいることから、今後こうした新たな視点を取り入れながらゲノムの働きを理解していくことがよりいっそう重要になっていくと考えられる^{101, 102)}。

6. おわりに

本稿では、液-液相分離を介した分子集合と転写制御の関連について最新の知見を紹介してきた。転写活性化のハブは、一群の転写装置を液滴内部に呼び込むことで、転写開始から伸長段階までを高効率に促進することに大きく寄与していると考えられる。一方で、液滴内部で実際にどのように標的遺伝子の転写動態が経時的に制御されているのかといった機能的側面からの理解については、全容の理解からは依然として遠い。今回紹介した報告も含め、現時点で得られている知見は主にスーパーエンハンサーと呼ばれる特殊なゲノム領域をモデルとした観察事例に偏っており^{17, 24, 53)}、ハブの形成が典型的なエンハンサー領域でも共通して起こっているのかといった一般性については、今後さらに検証を重ねていく必要がある。また、転写因子の相分離活性はその転写活性化能と相関しているものの、相分離が起こること自体が転写活性化の直接的な原因なのか、あるいはその結果にすぎないのかという因果関係についても、依然として議論の余地が残されている¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。

生体分子の相分離は、ともに濃縮されるパートナー分子を互いに選択しながら、特異的な機能を持った反応区画を形成するという重要な性質を示す。こうした液滴形成の特異性は、試験管内ではしばしばタンパク質のIDRだけで再現される^{18, 28, 53)}。最近のCRISPRライブラリーを用いた大規模スクリーニングと網羅的なインタラクトーム解析を組み合わせた研究から、転写因子ごとに相互作用するコアクティベーターの組み合わせが明確に異なっているようすが示されている¹⁰⁶⁾。転写因子のIDRは特定の立体構造をとらず、安定的な分子複合体を作らなかったとしても、そこには細胞内に存在する膨大な種類の分子をふるいにかけ、適切なタンパク質とのみ相互作用するための情報が書き込まれている。さらにIDRの持つこうした情報は、リン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾によって書き換えられ、結果

として相分離活性とその特異性に大きな影響を与えていると考えられる^{18, 19, 107)}。しかし、こうした生体分子の相分離液滴の物性を決定している分子基盤の多くが未解明の状態であることから、今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Watson, J.D. & Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
- 2) Banerji, J., Rusconi, S., & Schaffner, W. (1981) Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. *Cell*, **27**, 299-308.
- 3) The ENCODE Project Consortium, Moore, J.E., Purcaro, M.J., Pratt, H.E., Epstein, C.B., Shores, N., Adrian, J., Kawli, T., Davis, C.A., Dobin, A., et al. (2020) Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature*, **583**, 699-710.
- 4) Golding, I., Paulsson, J., Zawilski, S.M., & Cox, E.C. (2005) Real-time kinetics of gene activity in individual bacteria. *Cell*, **123**, 1025-1036.
- 5) Raj, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., Vargas, D.Y., & Tyagi, S. (2006) Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol.*, **4**, e309.
- 6) Chubb, J.R., Trcek, T., Shenoy, S.M., & Singer, R.H. (2006) Transcriptional pulsing of a developmental gene. *Curr. Biol.*, **16**, 1018-1025.
- 7) Larson, D.R., Zenklusen, D., Wu, B., Chao, J.A., & Singer, R.H. (2011) Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *Science*, **332**, 475-478.
- 8) Yunger, S., Rosenfeld, L., Garini, Y., & Shav-Tal, Y. (2010) Single-allele analysis of transcription kinetics in living mammalian cells. *Nat. Methods*, **7**, 631-633.
- 9) Fukaya, T., Lim, B., & Levine, M. (2016) Enhancer control of transcriptional bursting. *Cell*, **166**, 358-368.
- 10) Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., & Rosen, M.K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285-298.
- 11) Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N.L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., et al. (2018) Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends Cell Biol.*, **28**, 420-435.
- 12) McSwiggen, D.T., Mir, M., Darzacq, X., & Tjian, R. (2019) Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes Dev.*, **33**, 1619-1634.
- 13) Yoshizawa, T., Nozawa, R.S., Jia, T.Z., Saio, T., & Mori, E. (2020) Biological phase separation: cell biology meets biophysics. *Biophys. Rev.*, **12**, 519-539.
- 14) Forman-Kay, J.D. & Mittag, T. (2013) From sequence and forces to structure, function, and evolution of intrinsically disordered proteins. *Structure*, **21**, 1492-1499.
- 15) Brangwynne, C.P., Tompa, P., & Pappu, R.V. (2015) Polymer physics of intracellular phase transitions. *Nat. Phys.*, **11**, 899-904.
- 16) Borchers, W., Bremer, A., Borgia, M.B., & Mittag, T. (2021) How do intrinsically disordered protein regions encode a driving force for liquid-liquid phase separation? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **67**, 41-50.
- 17) Cho, W.K., Spille, J.H., Hecht, M., Lee, C., Li, C., Grube, V., & Cisse, I.I. (2018) Mediator and RNA polymerase II clusters

- associate in transcription-dependent condensates. *Science*, **361**, 412–415.
- 18) Guo, Y.E., Manteiga, J.C., Henninger, J.E., Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Hannett, N.M., Spille, J.H., Afeyan, L.K., Zamudio, A.V., Shrinivas, K., et al. (2019) Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature*, **572**, 543–548.
 - 19) 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., et al. (2018) RNA polymerase II clustering through carboxy-terminal domain phase separation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 833–840.
 - 20) Hahn, S. (1993) Transcription. Efficiency in activation. *Nature*, **363**, 672–673.
 - 21) Lee, T.I. & Young, R.A. (2000) Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.*, **34**, 77–137.
 - 22) Liu, Z., Legant, W.R., Chen, B.C., Li, L., Grimm, J.B., Lavis, L.D., Betzig, E., & Tjian, R. (2014) 3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells. *eLife*, **3**, e04236.
 - 23) Tsai, A., Muthusamy, A.K., Alves, M.R., Lavis, L.D., Singer, R.H., Stern, D.L., & Crocker, J. (2017) Nuclear microenvironments modulate transcription from low-affinity enhancers. *eLife*, **6**, e28975.
 - 24) Boija, A., Klein, I.A., Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Coffey, E.L., Zamudio, A.V., Li, C.H., Shrinivas, K., Manteiga, J.C., Hannett, N.M., et al. (2018) Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains. *Cell*, **175**, 1842–1855.e1816.
 - 25) Mir, M., Stadler, M.R., Ortiz, S.A., Hannon, C.E., Harrison, M.M., Darzacq, X., & Eisen, M.B. (2018) Dynamic multifactor hubs interact transiently with sites of active transcription in *Drosophila* embryos. *eLife*, **7**, e40497.
 - 26) Cai, D., Feliciano, D., Dong, P., Flores, E., Gruebele, M., Porat-Shliom, N., Sukenik, S., Liu, Z., & Lippincott-Schwartz, J. (2019) Phase separation of YAP reorganizes genome topology for long-term YAP target gene expression. *Nat. Cell Biol.*, **21**, 1578–1589.
 - 27) Nair, S.J., Yang, L., Meluzzi, D., Oh, S., Yang, F., Friedman, M.J., Wang, S., Suter, T., Alshareedah, I., Gamliel, A., et al. (2019) Phase separation of ligand-activated enhancers licenses cooperative chromosomal enhancer assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 193–203.
 - 28) Basu, S., Mackowiak, S.D., Niskanen, H., Knezevic, D., Asimi, V., Grosswendt, S., Geertsema, H., Ali, S., Jerkovic, I., Ewers, H., et al. (2020) Unblending of transcriptional condensates in human repeat expansion disease. *Cell*, **181**, 1062–1079.e1030.
 - 29) Ma, L., Gao, Z., Wu, J., Zhong, B., Xie, Y., Huang, W., & Lin, Y. (2021) Co-condensation between transcription factor and coactivator p300 modulates transcriptional bursting kinetics. *Mol. Cell*, **81**, 1682–1697.e1687.
 - 30) Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R.A., Chakraborty, A.K., & Sharp, P.A. (2017) A phase separation model for transcriptional control. *Cell*, **169**, 13–23.
 - 31) Shrinivas, K., Sabari, B.R., Coffey, E.L., Klein, I.A., Boija, A., Zamudio, A.V., Schuijers, J., Hannett, N.M., Sharp, P.A., Young, R.A., et al. (2019) Enhancer features that drive formation of transcriptional condensates. *Mol. Cell*, **75**, 549–561.e547.
 - 32) Wei, M.T., Chang, Y.C., Shimobayashi, S.F., Shin, Y., Strom, A.R., & Brangwynne, C.P. (2020) Nucleated transcriptional condensates amplify gene expression. *Nat. Cell Biol.*, **22**, 1187–1196.
 - 33) Sharp, P.A., Chakraborty, A.K., Henninger, J.E., & Young, R.A. (2022) RNA in formation and regulation of transcriptional condensates. *RNA*, **28**, 52–57.
 - 34) Furlong, E.E.M. & Levine, M. (2018) Developmental enhancers and chromosome topology. *Science*, **361**, 1341–1345.
 - 35) Liu, J., Perumal, N.B., Oldfield, C.J., Su, E.W., Uversky, V.N., & Dunker, A.K. (2006) Intrinsic disorder in transcription factors. *Biochemistry*, **45**, 6873–6888.
 - 36) Staby, L., O'Shea, C., Willemoes, M., Theisen, F., Kragelund, B.B., & Skriver, K. (2017) Eukaryotic transcription factors: paradigms of protein intrinsic disorder. *Biochem. J.*, **474**, 2509–2532.
 - 37) Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Julicher, F., & Hyman, A.A. (2009) Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. *Science*, **324**, 1729–1732.
 - 38) Taylor, N.O., Wei, M.T., Stone, H.A., & Brangwynne, C.P. (2019) Quantifying dynamics in phase-separated condensates using fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys. J.*, **117**, 1285–1300.
 - 39) Soranno, A. (2019) The trap in the FRAP: a cautionary tale about transport measurements in biomolecular condensates. *Biophys. J.*, **117**, 2041–2042.
 - 40) Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J., & Olsen, B.R. (1996) Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science*, **272**, 548–551.
 - 41) Bruneau, S., Johnson, K.R., Yamamoto, M., Kuroiwa, A., & Duboule, D. (2001) The mouse Hoxd13(spdx) mutation, a polyalanine expansion similar to human type II synpolydactyly (SPD), disrupts the function but not the expression of other Hoxd genes. *Dev. Biol.*, **237**, 345–353.
 - 42) Morin, J.A., Wittmann, S., Choubey, S., Klosin, A., Golfier, S., Hyman, A.A., Julicher, F., & Grill, S.W. (2022) Sequence-dependent surface condensation of a pioneer transcription factor on DNA. *Nat. Phys.*, **18**, 271–276.
 - 43) Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L., Agard, D.A., Redding, S., & Narlikar, G.J. (2017) Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*, **547**, 236–240.
 - 44) Li, P., Banjade, S., Cheng, H.C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J.V., King, D.S., Banani, S.F., et al. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, **483**, 336–340.
 - 45) Molliex, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A.P., Kim, H.J., Mittag, T., & Taylor, J.P. (2015) Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, **163**, 123–133.
 - 46) Plys, A.J., Davis, C.P., Kim, J., Rizki, G., Keenen, M.M., Marr, S.K., & Kingston, R.E. (2019) Phase separation of Polycomb-repressive complex 1 is governed by a charged disordered region of CBX2. *Genes Dev.*, **33**, 799–813.
 - 47) Guo, Y., Zhao, S., & Wang, G.G. (2021) Polycomb gene silencing mechanisms: PRC2 chromatin targeting, H3K27me3 'Readout', and phase separation-based compaction. *Trends Genet.*, **37**, 547–565.
 - 48) Treen, N., Shimobayashi, S.F., Eeftens, J., Brangwynne, C.P., & Levine, M. (2021) Properties of repression condensates in living *Ciona* embryos. *Nat. Commun.*, **12**, 1561.
 - 49) Soutourina, J. (2018) Transcription regulation by the Mediator complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 262–274.

- 50) Black, J.C., Choi, J.E., Lombardo, S.R., & Carey, M. (2006) A mechanism for coordinating chromatin modification and pre-initiation complex assembly. *Mol. Cell*, **23**, 809–818.
- 51) Esnault, C., Ghavi-Helm, Y., Brun, S., Soutourina, J., Van Berkum, N., Boschiero, C., Holstege, F., & Werner, M. (2008) Mediator-dependent recruitment of TFIID modules in preinitiation complex. *Mol. Cell*, **31**, 337–346.
- 52) Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D.A., van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010) Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, **467**, 430–435.
- 53) Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., et al. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science*, **361**, eaar3958.
- 54) Jang, M.K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H.S., Brady, J.N., & Ozato, K. (2005) The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol. Cell*, **19**, 523–534.
- 55) Jonkers, I. & Lis, J.T. (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 167–177.
- 56) Lu, H., Yu, D., Hansen, A.S., Ganguly, S., Liu, R., Heckert, A., Darzacq, X., & Zhou, Q. (2018) Phase-separation mechanism for C-terminal hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *Nature*, **558**, 318–323.
- 57) Guo, C., Che, Z., Yue, J., Xie, P., Hao, S., Xie, W., Luo, Z., & Lin, C. (2020) ENL initiates multivalent phase separation of the super elongation complex (SEC) in controlling rapid transcriptional activation. *Sci. Adv.*, **6**, eaay4858.
- 58) Lee, J.H., Wang, R., Xiong, F., Krakowiak, J., Liao, Z., Nguyen, P.T., Moroz-Omori, E.V., Shao, J., Zhu, X., Bolt, M.J., et al. (2021) Enhancer RNA m6A methylation facilitates transcriptional condensate formation and gene activation. *Mol. Cell*, **81**, 3368–3385.e3369.
- 59) Ortega, E., Rengachari, S., Ibrahim, Z., Hoghoughi, N., Gaucher, J., Holehouse, A.S., Khochbin, S., & Panne, D. (2018) Transcription factor dimerization activates the p300 acetyltransferase. *Nature*, **562**, 538–544.
- 60) Zhang, Y., Brown, K., Yu, Y., Ibrahim, Z., Zandian, M., Xuan, H., Ingersoll, S., Lee, T., Ebmeier, C.C., Liu, J., et al. (2021) Nuclear condensates of p300 formed through the structured catalytic core can act as a storage pool of p300 with reduced HAT activity. *Nat. Commun.*, **12**, 4618.
- 61) Bose, D.A., Donahue, G., Reinberg, D., Shiekhata, R., Bonasio, R., & Berger, S.L. (2017) RNA Binding to CBP stimulates histone acetylation and transcription. *Cell*, **168**, 135–149. e122.
- 62) Roeder, R.G. & Rutter, W.J. (1969) Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature*, **224**, 234–237.
- 63) Keding, C., Gnizdowski, M., Mandel, J.L. Jr., Gissinger, F., & Chambon, P. (1970) Alpha-amanitin: a specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **38**, 165–171.
- 64) Lindell, T.J., Weinberg, F., Morris, P.W., Roeder, R.G., & Rutter, W.J. (1970) Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science*, **170**, 447–449.
- 65) Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., & Cook, P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.*, **12**, 1059–1065.
- 66) Wansink, D.G., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R., & de Jong, L. (1993) Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.*, **122**, 283–293.
- 67) Martin, S. & Pombo, A. (2003) Transcription factories: quantitative studies of nanostructures in the mammalian nucleus. *Chromosome Res.*, **11**, 461–470.
- 68) Sutherland, H. & Bickmore, W.A. (2009) Transcription factories: gene expression in unions? *Nat. Rev. Genet.*, **10**, 457–466.
- 69) Cisse, I.I., Izeddin, I., Causse, S.Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M., & Darzacq, X. (2013) Real-time dynamics of RNA polymerase II clustering in live human cells. *Science*, **341**, 664–667.
- 70) Cho, W.K., Jayanth, N., English, B.P., Inoue, T., Andrews, J.O., Conway, W., Grimm, J.B., Spille, J.H., Lavis, L.D., Lionnet, T., et al. (2016) RNA Polymerase II cluster dynamics predict mRNA output in living cells. *eLife*, **5**, e13617.
- 71) Kwon, I., Kato, M., Xiang, S., Wu, L., Theodoropoulos, P., Mirzaei, H., Han, T., Xie, S., Corden, J.L., & McKnight, S.L. (2013) Phosphorylation-regulated binding of RNA polymerase II to fibrous polymers of low-complexity domains. *Cell*, **155**, 1049–1060.
- 72) Quintero-Cadena, P., Lenstra, T.L., & Sternberg, P.W. (2020) RNA Pol II length and disorder enable cooperative scaling of transcriptional bursting. *Mol. Cell*, **79**, 207–220.e208.
- 73) Harlen, K.M. & 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.
- 74) Henninger, J.E., Oksuz, O., Shrinivas, K., Sagi, I., LeRoy, G., Zheng, M.M., Andrews, J.O., Zamudio, A.V., Lazaris, C., Hannett, N.M., et al. (2021) RNA-mediated feedback control of transcriptional condensates. *Cell*, **184**, 207–225.e224.
- 75) Shao, W., Bi, X., Pan, Y., Gao, B., Wu, J., Yin, Y., Liu, Z., Peng, M., Zhang, W., Jiang, X., et al. (2022) Phase separation of RNA-binding protein promotes polymerase binding and transcription. *Nat. Chem. Biol.*, **18**, 70–80.
- 76) Shin, Y. & Brangwynne, C.P. (2017) Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, **357**, eaaf4382.
- 77) Roden, C. & Gladfelter, A.S. (2021) RNA contributions to the form and function of biomolecular condensates. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 183–195.
- 78) Kato, M., Han, T.W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L.C., Mirzaei, H., Goldsmith, E.J., Longgood, J., Pei, J., et al. (2012) Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, **149**, 753–767.
- 79) Murthy, A.C., Dignon, G.L., Kan, Y., Zerze, G.H., Parekh, S.H., Mittal, J., & Fawzi, N.L. (2019) Molecular interactions underlying liquid-liquid phase separation of the FUS low-complexity domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **26**, 637–648.
- 80) Meller, V.H., Wu, K.H., Roman, G., Kuroda, M.I., & Davis, R.L. (1997) roX1 RNA paints the X chromosome of male Drosophila and is regulated by the dosage compensation system. *Cell*, **88**, 445–457.
- 81) Amrein, H. & Axel, R. (1997) Genes expressed in neurons of adult male Drosophila. *Cell*, **88**, 459–469.
- 82) Mukherjee, A.S. & Beermann, W. (1965) Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of Drosophila melanogaster and the problem of dosage compensation. *Nature*, **207**, 785–786.

- 83) Baker, B.S., Gorman, M., & Marin, I. (1994) Dosage compensation in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.*, **28**, 491–521.
- 84) Samata, M. & Akhtar, A. (2018) Dosage compensation of the X chromosome: a complex epigenetic assignment involving chromatin regulators and long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 323–350.
- 85) Palmer, M.J., Richman, R., Richter, L., & Kuroda, M.I. (1994) Sex-specific regulation of the male-specific lethal-1 dosage compensation gene in *Drosophila*. *Genes Dev.*, **8**, 698–706.
- 86) Larschan, E., Bishop, E.P., Kharchenko, P.V., Core, L.J., Lis, J.T., Park, P.J., & Kuroda, M.I. (2011) X chromosome dosage compensation via enhanced transcriptional elongation in *Drosophila*. *Nature*, **471**, 115–118.
- 87) Conrad, T., Cavalli, F.M., Vaquerizas, J.M., Luscombe, N.M., & Akhtar, A. (2012) *Drosophila* dosage compensation involves enhanced Pol II recruitment to male X-linked promoters. *Science*, **337**, 742–746.
- 88) Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Pannuti, A., & Lucchesi, J.C. (1997) mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*. *EMBO J.*, **16**, 2054–2060.
- 89) Smith, E.R., Pannuti, A., Gu, W., Steurnagel, A., Cook, R.G., Allis, C.D., & Lucchesi, J.C. (2000) The *Drosophila* MSL complex acetylates histone H4 at lysine 16, a chromatin modification linked to dosage compensation. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 312–318.
- 90) Gelbart, M.E., Larschan, E., Peng, S., Park, P.J., & Kuroda, M.I. (2009) *Drosophila* MSL complex globally acetylates H4K16 on the male X chromosome for dosage compensation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 825–832.
- 91) Valsecchi, C.I.K., Basilicata, M.F., Georgiev, P., Gaub, A., Seyffarth, J., Kulkarni, T., Panhale, A., Semplicio, G., Manjunath, V., Holz, H., et al. (2021) RNA nucleation by MSL2 induces selective X chromosome compartmentalization. *Nature*, **589**, 137–142.
- 92) Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., & Ren, B. (2012) Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, **485**, 376–380.
- 93) Nora, E.P., Lajoie, B.R., Schulz, E.G., Giorgetti, L., Okamoto, I., Servant, N., Piolot, T., van Berkum, N.L., Meisig, J., Sedat, J., et al. (2012) Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. *Nature*, **485**, 381–385.
- 94) Kragestein, B.K., Spielmann, M., Paliou, C., Heinrich, V., Schöpflin, R., Esposito, A., Annunziatella, C., Bianco, S., Chiariello, A.M., Jerković, I., et al. (2018) Dynamic 3D chromatin architecture contributes to enhancer specificity and limb morphogenesis. *Nat. Genet.*, **50**, 1463–1473.
- 95) Sanborn, A.L., Rao, S.S., Huang, S.C., Durand, N.C., Huntley, M.H., Jewett, A.I., Bochkov, I.D., Chinnappan, D., Cutkosky, A., Li, J., et al. (2015) Chromatin extrusion explains key features of loop and domain formation in wild-type and engineered genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E6456–E6465.
- 96) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663–676.
- 97) Wang, J., Yu, H., Ma, Q., Zeng, P., Wu, D., Hou, Y., Liu, X., Jia, L., Sun, J., Chen, Y., et al. (2021) Phase separation of OCT4 controls TAD reorganization to promote cell fate transitions. *Cell Stem Cell*, **28**, 1868–1883.e1811.
- 98) Chowdhary, S., Kainth, A.S., Paracha, S., Gross, D.S., & Pincus, D. (2021) Inducible transcriptional condensates drive 3D genome reorganization in the heat shock response. *bioRxiv*.
- 99) Chowdhary, S., Kainth, A.S., Pincus, D., & Gross, D.S. (2019) Heat Shock Factor 1 Drives Intergenic Association of Its Target Gene Loci upon Heat Shock. *Cell Rep.*, **26**, 18–28.e15.
- 100) Quail, T., Golfier, S., Elsner, M., Ishihara, K., Murugesan, V., Renger, R., Julicher, F., & Brugués, J. (2021) Force generation by protein–DNA co-condensation. *Nat. Phys.*, **17**, 1007–1012.
- 101) Choi, J.M., Holehouse, A.S., & Pappu, R.V. (2020) Physical principles underlying the complex biology of intracellular phase transitions. *Annu. Rev. Biophys.*, **49**, 107–133.
- 102) Shimobayashi, S.F., Ronceray, P., Sanders, D.W., Haataja, M.P., & Brangwynne, C.P. (2021) Nucleation landscape of biomolecular condensates. *Nature*, **599**, 503–506.
- 103) Rippe, K. & Papantonis, A. (2021) RNA polymerase II transcription compartments: from multivalent chromatin binding to liquid droplet formation? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 645–646.
- 104) Trojanowski, J., Frank, L., Rademacher, A., Mücke, N., Grigaitis, P., & Rippe, K. (2022) Transcription activation is enhanced by multivalent interactions independent of phase separation. *Mol. Cell*, **82**, 1878–1893.e10.
- 105) Karr, J.P., Ferrie, J.J., Tjian, R., & Darzacq, X. (2022) The transcription factor activity gradient (TAG) model: contemplating a contact-independent mechanism for enhancer-promoter communication. *Genes Dev.*, **36**, 7–16.
- 106) Alerasool, N., Leng, H., Lin, Z.Y., Gingras, A.C., & Taipale, M. (2022) Identification and functional characterization of transcriptional activators in human cells. *Mol. Cell*, **82**, 677–695.e677.
- 107) Gibson, B.A., Doolittle, L.K., Schneider, M.W.G., Jensen, L.E., Gamarra, N., Henry, L., Gerlich, D.W., Redding, S., & Rosen, M.K. (2019) Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell*, **179**, 470–484.e421.

著者寸描

●川崎 洸司 (かわさき こうじ)

東京大学定量生命科学研究所遺伝子発現ダイナミクス研究分野
日本学術振興会特別研究員-PD. 博士 (理学)。

■略歴 2015年早稲田大学先進理工学部電気・情報生命工学科卒業。20年同大学院先進理工学研究科博士課程修了。20～22年東京大学定量生命科学研究所特任研究員。22年より現職。

■研究テーマと抱負 数分から24時間周期まで様々な時間スケールで観察される転写ダイナミクスに興味があります。

■ウェブサイト <https://researchmap.jp/koji-kawasaki>

■趣味 散歩, ギター, 飲酒。

●深谷 雄志 (ふかや たかし)

東京大学定量生命科学研究所遺伝子発現ダイナミクス研究分野
准教授. 博士 (生命科学)。

■略歴 2014年東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程修了。14～15年UC Berkleyにて博士研究員。15～18年Princeton Universityにて博士研究員。18年より東京大学定量生命科学研究所講師。21年より現職。

■研究テーマと抱負 転写制御の素過程を、時空間動態の観点から定量的に理解していくことを目指しています。

■ウェブサイト <https://sites.google.com/view/fukayalab>

■趣味 ベランダ園芸。