

学位論文（博士）

Analysis of HSF1 condensates formed by liquid-
liquid phase separation on the HSE array
derived from *HSP72* promoter.

(熱ショック遺伝子 *HSP72* のプロモーター由来の HSE
アレイ上で液-液相分離する HSF1 凝縮体の解析)

氏名 岡田 真理子

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 医化学講座

令和 5 年 4 月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	4
4. 方法	5-10
(1) 対象	5
(2) 方法	5-10
(3) 統計解析	10
5. 結果	11-14
6. 考察	14-16
7. 結語	16
8. 謝辞	16
9. 参考文献	16-22
10. 図	23-36

1. 要旨

細胞は熱ストレスなどのタンパク質毒性ストレスにさらされると、熱ショックタンパク質群 (HSPs) を誘導することで適応する。この適応機構は熱ショック応答と呼ばれ、熱ショック転写因子 HSF1 によって主に転写レベルで制御される。活性化された HSF1 は *HSP* 遺伝子プロモーターに存在する熱ショック応答配列 (HSE) に結合し、メディエーターを含む転写開始前複合体を集積させることで転写を促進する。一般に、転写因子及びその調節因子は液-液相分離によってプロモーター上に凝縮体を形成すると考えられている。しかし、*HSP* 遺伝子プロモーター上でも同様かどうかについては、凝縮体が微小であるために十分な解析ができていない。本研究では、ヒト *HSP72* プロモーター由来の HSE を多数連結したレポーター遺伝子をマウス細胞に導入した。この HSE レポーター遺伝子を持つ細胞に蛍光タンパク質 mEGFP を融合した HSF1 を発現させることで、熱ストレス条件下で HSF1 凝縮体を可視化することに成功した。この人工的な HSF1 凝縮体は部分的に液体様の性質を持つ、すなわち液-液相分離により形成されていた。また、大腸菌から精製したタンパク質を用いた実験から、HSF1 の天然変性領域 (IDR) が相分離に寄与することも分かった。さらにこの実験系を用いて、HSF1 凝縮体の形成が転写調節因子によって制御されるかを調べた。特に、熱ショック応答を促進するメディエーターの一つである MED12 に着目して解析したところ、MED12 の IDR は HSF1 凝縮体を集積すること、そして MED12 の発現抑制は HSF1 の凝縮体形成を著しく抑制することが明らかとなった。本研究は、*HSP72* プロモーター上の HSF1 凝縮体を解析する実験系を提示するとともに、それが転写調節因子によって制御されることを示唆する。

2. 研究の背景

熱ショック応答は、細胞が高温などに由来するタンパク質毒性ストレスに適応し、タンパク質代謝の恒常性を維持するための機構である[1,2,3]。この反応は主に nGAAn(n は様々な塩基)配列を含む HSE に結合する熱ショック転写因子群(HSFs)により制御されている[4,5]。通常、HSF1 は不活性な単量体として存在するが、ストレスに応答して核内へと移行した HSF1 は活性化状態である三量体となって HSE に結合し、様々な *HSP* 遺伝子やそれ以外のストレス応答遺伝子、更には特定のノンコーディング RNA の転写の活性化を行うことが知られている[6,7,8,9]。熱ショック条件下における *HSP72* 遺伝子の転写制御機構は、誘導性の遺伝子発現のモデルとして研究されてきた[10,11]。DNA に結合した HSF1 は、BRG1、p300、TIP60、GCN5、MLL1 などのクロマチン再構成複合体やヒストン修飾タンパク質、RNA ポリメラーゼ II といった様々なタンパク質を招集し、急速に転写を活性化させる [12-25]。しかしながら、DNA に結合した HSF1 がこれらのタンパク質を短時間で招集する機構には不明な点が多く残されていた[26,27]。

近年、転写因子とその調節因子が、それらのタンパク質の中でも特定の構造をとらない天然変性領域を介して液-液相分離し、転写凝縮体を形成することで、転写を促進することが

示唆されてきた[28,29]。RNA ポリメラーゼ II とメディエーター複合体が形成する凝縮体は、エンハンサー、特にスーパーエンハンサーと呼ばれる特定の遺伝子上流に位置する配列に結合した複数の転写因子群とともに凝縮体を形成することが先行研究により明らかとなった(図 1)[30-33]。ここで形成された凝縮体は、特定の転写関連タンパク質の濃縮や放出を行う可能性が示唆されている。熱ショック条件下において、HSF1 は核内ストレス顆粒と呼ばれる複数の巨大な凝縮体を形成する[34-37]。核内ストレス顆粒はヒト 9 番染色体の、HSE とは異なる反復配列である *satellite III* 上で形成され、この *satellite III* 由来のノンコーディング RNA の転写誘導に関係する[38,39]。この核内ストレス顆粒は、HSF1 の液-液相分離により形成されており、*HSP* 遺伝子群の転写を抑制する機能があることが報告された[40]。HSF1 は *HSP* 遺伝子上でも凝縮体を形成することが予想されたが、これまでの研究ではそのような HSF1 の凝縮体はヒト細胞内で確認されなかった。よって、仮に形成されていたとしても、*HSP* プロモーター上の HSF1 の性質は核内ストレス顆粒のものとは異なることが示唆されている[41,42]。また、超解像度顕微鏡を用いた実験により、*HSP90*、*HSP70*、*HSP40* 遺伝子上において、HSF1 の集積が確認されたが、この HSF1 の性質には未解明の点が多く残されている[43]。よって、*HSP* 遺伝子上の HSF1 の凝縮体の性質を解析し、熱ショック誘導性の転写活性化が HSF1 の液-液相分離により促進されているかを調べる必要がある。しかしながら、ヒトの *HSP* 遺伝子のプロモーター内の HSE の数は少数であるため、一般的な顕微鏡でこれらの配列上に形成された微小な HSF1 の凝縮体を検出したうえで解析することは困難である。ヒトの *HSP72* 遺伝子(*HSPA1A*)プロモーターには、HSE を 6 つ含む遠位 HSE(distal HSE: dHSE)と、HSE を 9 つ含む近位 HSE(proximal HSE: pHSE)が存在する[44,45]。これとは対照的に、ショウジョウバエの唾腺細胞の多染色体では *HSP70* 遺伝子上で HSF1 が観察可能な集合体を形成することが知られている[46]。そこで、本研究では *HSP* 遺伝子上の HSF1 を可視化するための細胞を樹立し、その細胞を用いて HSF1 凝縮体の解析を進めた。更に、この細胞を用いて、転写の調節因子が HSF1 凝縮体形成に影響を与えるかどうかを調べた。特に、コアメディエーターと一過性に相互作用し、RNA ポリメラーゼ II とはコアメディエーターとの相互作用にあたって競合する、メディエーターキナーゼモジュール(MKM)の構成要素である MED12 に着目した[46,47]。MED12 は先行研究により *HSP* 遺伝子群を含む様々な遺伝子の転写活性化に寄与することが報告されていることから、HSF1 の性質に影響を与えている可能性がある (図 2) [24,48]。

3. 目的

本研究では、HSF1^{+/+}HSE64-HSP70pro-Luc MEF を用いて *HSP72* プロモーター上での HSF1 の性質を明らかにするものである。加えて、買い先により判明した HSF1 の性質に対し、HSF1 と相互作用して転写に影響する可能性があるタンパク質である MED12 がどのような影響を与えているかを解析することも本研究の目的である。

4. 方法

(1) 対象

HSF1⁺マウス胚線維芽細胞(MEF)は本研究室で維持されている細胞株(clone #4)を使用した。

(2) 方法

プラスミドとアデノウイルスの作製

マウス細胞にヒトの HSE を持つレポーター遺伝子を導入するためのプラスミドを作成した。ヒト *HSP72* プロモーター由来の pHSE を伸長したのち、両者を対合させ、更に SalI と XhoI で切断した。この DNA 断片を pShuttle-CMV(Stratagene)の SalI と XhoI site に挿入した。nGAAn を含むこの DNA 断片に KpnI と HindIII 処理を行い、ルシフェラーゼレポーターを持つプラスミドである pGL3-Basic(Promega)に挿入し、pGL3-HSE1 vector を作成した。加えて、SalI と XhoI 処理によって切断した HSE 断片を、XhoI で切断した pGL3-HSE1 vector に挿入し、pGL3-HSE2 vector を作成した。この 2 つの pHSE を含むプラスミドを再度 SalI と XhoI によって切断し、再度 pGL3-HSE2 vector の SalI と XhoI に挿入し、pGL3-HSE4 vector を作成した。この工程を 4 回反復し、合計 64 個の HSE を含む pGL3-HSE64 を作成した。ヒトの *HSP72* プロモーター(-230 から+13)を PCR によって伸長し、pGL3-HSE64 vector の HindIII site に挿入し、pGL3-HSE64-hHSP70pro-Luc vector を作成した。

ヒトの HSF1 を可視化するため、緑色蛍光タンパク質の一種である mEGFP を発現するためのプラスミドを作成した[49]。pEGFP-C1(Clontec, CA, USA)を鋳型として、KOD One PCR Master Mix(TOYOBO、大阪、日本)を用いて PCR を行い、その際に A206K となる点変異を導入したうえで、pET21a(Novagen, WI, USA)の NdeI と EcoRI site に挿入し、pET21a-mEGFP-MCS vector を作成した。N 末端に mEGFP が融合したタンパク質を大腸菌で発現させるため、hHSF1 の全長および hHSF1 の IDR(221-529 アミノ酸)を、pShuttle-CMV-hHSF1 HA を鋳型として伸長し[23]、pET21a-mEGFP-MCS vector の EcoRI と XhoI site に挿入し、pET21a-mEGFP-hHSF1 および pET21a-mEGFP-hHSF1 IDR を作成した。

生細胞内で mEGFP-hHSF1 を発現するためのアデノウイルスを作成した。KpnI と EcoRI site を持つ mEGFP の DNA と、EcoRI と XhoI site を持つ hHSF1-HA を、それぞれ pET21a-mEGFP-MCS と pShuttle-CMV-hHSF1 HA を鋳型として伸長し、pSuttle CMV vector の KpnI と XhoI site に挿入した。AdEasy アデノウイルスシステム(Agilent Technologies)を利用してアデノウイルスを作成した。pAd-mEGFP-hHSF1 R71G も同様の方法で作成した[50]。

生細胞内で赤色蛍光タンパク質 mCherry が融合したタンパク質を発現させるためのアデ

ノウイルスを作成するため[51]、pmCherry-C1(Addgene、MA、USA)を鋳型として mCherry 配列を PCR によって増幅し、pET21a の NdeI と SalI site あるいは NdeI と EcoRI site に挿入し、pET21a-mCherry を作成した。HeLa 細胞由来の RNA から Primescript II Reverse Transcriptase(Takara、滋賀、日本)を用いて逆転写し、得られた cDNA を鋳型として PCR によってヒトの MED1(948-1574 アミノ酸)、MED12(1724-2177 アミノ酸)、MED15(1-615 アミノ酸)の天然変性領域の DNA 配列を伸長した。hMED12 IDR は、pET21a-mCherry の Hind III と XhoI site に挿入し、pET21a-mCherry-hMED12 IDR を作成した。更にこのプラスミドを鋳型として、N 末端に SV40 由来の核移行シグナル(NLS)が融合した mCherry-hMED12 IDR を PCR によって合成し、pShuttle-CMV の KpnI と XhoI site に導入し、pShuttle-CMV-NLS-mCherry-hMED12 IDR を作成した。pShuttle-CMV-NLS-mCherry-hMED1 IDR は、pET21a-mCherry に hMED1 IDR を EcoRI と XhoI site で挿入し、pET21a-mCherry-hMED1 IDR を作成したのち、このプラスミドを鋳型として、NLS-Cherry-hMED1 IDR を伸長し、pShuttle CMV へと挿入することで、pShuttle-CMV-NLS-mCherry-hMED1 IDR を作成した。pShuttle-CMV-NLS-mCherry-hMED15 IDR は hMED1 IDR と同様の方法で作成した。

マウスの MED12 の発現抑制を行うための短鎖ヘアピン RNA を転写させるためのアデノウイルスを作成した。MED12 に対する標的配列を含んだ DNA 配列を対合させ、pCR2.1-h6 vector の BamHI と XhoI site に挿入した。このプラスミドに XhoI と HindIII 処理を行い、pShuttle-CMV に挿入した[24]。上記の AdEasy アデノウイルスシステムを利用してアデノウイルスを作成した。

HSF1⁺HSE64-HSP70pro-Luc MEF の樹立

HSF1⁺ MEF (clone #4)に 4.0 µg の pGL3-HSE64-HSP70pro-Luc と 0.4 µg の pLoxPuro を、Amaya MEF2 Nucleofector Kit (Lonza) を用いて導入し、1.0 µg/ml の puromycin を添加した DMEM 培地でプラスミドがゲノム DNA へと導入された細胞の選択を行った[15]。その後、ゲノム内に HSE64-HSP70pro-Luc が導入された細胞株を用いてルシフェラーゼ活性の定量を行った。

更に、ゲノム内に統合されたこのレポーター遺伝子数の絶対定量を行った。細胞に導入した pGL3-HSE64-HSP70pro-Luc と、マウス細胞内でのコピー数が 2 である *IL2* 遺伝子内のイントロン配列の DNA をそれぞれ 500 bp 分 PCR によって伸長し、pcDNA3.1(+)へと導入したプラスミドを作成した。それらのプラスミドを段階希釈して検量線を作成し、HSF1⁺HSE64 MEF(clone 1, 2, 3)から抽出した 100 µg のゲノム DNA の HSE64-HSP70pro-Luc 遺伝子と *IL2* 遺伝子のコピー数をリアルタイム qPCR により定量した。この時、定量には StepOnePlus(Applied Biosystems)を、蛍光色素として Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)を使用した。*IL2* 遺伝子のコピー数から一細胞当たりの HSE64-HSP70pro-Luc 遺伝子のコピー数を算出した。

アデノウイルス(Ad)感染処理と薬剤処理

緑色蛍光タンパク質 mEGFP が融合したヒト HSF1(mEGFP-hHSF1)を、HSF1⁺ HSE64-hHSP70pro-Luc MEF(clone 1)で過剰発現させるため、 2×10^7 pfu/ml の Ad-mEGFP-hHSF1 及び Ad-mEGFP-hHSF1 R71G を、ウシ胎児血清(FBS)を添加しない無血清 DMEM 培地に添加して 2 時間のウイルス処理を行い、ウイルス除去後 46 時間後に細胞に熱処理を行った。液-液相分離を阻害する実験では、熱処理後の細胞を生理食塩水(PBS)で一度洗浄したのち、0、2.5、5、7.5%の 1,6-Hexanediol(1,6-Hex)/PBS 処理を室温で 1 分間行った。その後、PSB で 3 回細胞を洗浄し、4% パラホルムアルデヒド/PBS で 10 分間、室温で固定を行った。hHSF1 とともに mCherry が融合した IDR を共発現するため、Ad-NLS-mCherry-hMED1 IDR、Ad-NLS-mCherry-hMED12 IDR あるいは Ad-NLS-mCherry-hMED15 IDR を Ad-mEGFP-hHSF1 とともに無血清 DMEM 培地に添加して 2 時間のウイルス処理を行い、ウイルス除去後 46 時間後に細胞に熱処理を行った。MED12 を発現抑制したうえで hHSF1 を過剰発現させるために、 4×10^7 pfu/ml の Ad-sh-mMED12 KD1 を無血清 DMEM 培地内で 2 時間感染させ、ウイルス除去後に 22 時間の培養を行った。その後、Ad-mEGFP-hHSF1 を無血清 DMEM 培地内で 2 時間感染させ、ウイルス除去後に 46 時間の培養を行った。実験の対照群として、マウスの MED12 の scramble RNA(SCR)を発現させるため、 4×10^7 pfu/ml の Ad-sh-SCR を無血清 DMEM 培地内で 2 時間感染させ、ウイルス除去後に 22 時間の培養を行い、Ad-mEGFP-hHSF1 を無血清 DMEM 培地内で 2 時間感染させ、ウイルス除去後に 46 時間の培養を行った。

mRNA の抽出及び定量

細胞内の全 RNA を、TRIzol(Ambion)を用いて抽出した。抽出した RNA は PrimeScript II Reverse Transcriptase と oligo dT primer を用いて、mRNA のみ逆転写を行い、cDNA を合成した。合成された cDNA を段階希釈して検量線を作成し、luciferase mRNA および β -actin mRNA の RT-qPCR を行った。定量には StepOnePlus(Applied Biosystems)を、蛍光色素として Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)を使用した。 β -actin は内在性のコントロールとして使用した。

ウェスタンブロッティング(WB)

hHSF1 と mMED12 の発現量を確認するため、HSF1⁺ HSE64-hHSP70pro-Luc MEF からタンパク質を抽出した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤(1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin) を添加した NP-40 Lysis Buffer(150 mM NaCl, 1.0% Nonidet P-40, 50 mM Tris (pH 8.0)) に溶解させ、氷上で 10 分間静置したのち、4 °C、16,000 g で 10 分間遠心分離を行った。上清のみを回収し、上清のタンパク質濃度を Bradford 法により測定した。タンパク質サンプルに SDS

buffer と終濃度 100 mM DTT を添加し、95 °C で熱変性を行った。変性後のサンプルを 8 % または 6 % のアクリルアミドゲルに載せ、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離したのち、タンク内でアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜へとタンパク質を転写した。転写後の膜を 5 % スキムミルク/PBS で 30 分間、室温でブロッキングし、MED12、HSF1、 β -actin に対する抗体を 2 % スキムミルク/PBS で 1/1000 希釈した一次抗体液を 4 °C で一晩以上反応させた[15]。この膜を PBS で三回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼが融合した、一次抗体に対する二次抗体を 2 % スキムミルク/PBS で希釈し、室温で 1 時間反応させた。この膜を 0.1 % Tween-20 を添加した PBS で三回洗浄したのち、ECL detection reagents(GE Healthcare)を膜にかけ、抗体が結合した部位で生じた発光を X 線フィルム(Super RX、Fujifilm)で検出した。 β -actin は内在性のコントロールとして使用した。

免疫蛍光染色(IF)

HSF1⁺ HSE64-hHSP70pro-Luc MEF をカバーガラス(Matsunami、C015001)上にまき、24 時間培養したのち、アデノウイルス感染を行った。42 °C の熱処理を行った細胞を、PBS で 2 回洗浄し、4 % パラホルムアルデヒド/PBS で 10 分間、室温で固定を行った。その後、細胞を再度 PBS で洗浄し、0.2 % TritonX-100/PBS で 10 分間、室温で細胞膜の溶解を行った。この反応は 2% スキムミルク/PBS を室温で 30 分間反応させることで停止させた。PBS で細胞を洗浄後、MED1、MED12、MED15、RNA ポリメラーゼ II の CTD に対する抗体を 2% スキムミルク/PBS で希釈した一次抗体液を細胞上に滴下し、室温で 1 時間反応させた。PBS で一次抗体液を除去後、Alexa Fluor 568 が融合した、一次抗体に対する二次抗体を 2 % スキムミルク/PBS で希釈した二次抗体液を細胞上に滴下し、室温で 1 時間反応させた。PBS で二次抗体を除去後、DAPI(4', 6-diamino-2-phenylindole)を含む封入材である VECTASHIELD mounting medium(Vector Laboratories)を滴下し、細胞を封入した。Alexa Fluor 568、mEGFP、DAPI の蛍光画像を、LSM510META 共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)を用いて取得した。この時、対物レンズは 63 倍の油浸レンズを使用し、1.5 倍に拡大した画像を、512×512 pixel(1pixel=0.19 μ m)で 6 視野から 12 視野分取得した。0.5 μ m ごとに z 軸方向に移動した画像を撮影し、得られた 11 枚分の画像を、画像解析ソフトウェア Fiji(<https://fiji.sc>)を用いて 1 枚の画像にまとめた(z-stack 画像)。論文に掲載された画像に挿入されたスケールバーはいずれも 5 μ m を示している。

HSF1 凝集物の蛍光強度及び面積の定量方法

Fiji の Maximum Intensity Projection というプログラムを用いて z-stack 画像を作成した。DAPI の蛍光強度傘画像内の細胞核の位置を定義し、核の hHSF1 の蛍光強度を定量した。続いて、Max Entropy というアルゴリズムを用いて hHSF1 の蛍光強度の閾値を設定し、閾値以上の領域を定量するための二極化画像を取得した。Analyze Particle というプロ

グラムを用いて二極化した画像の中に存在する凝縮体(size, $>0.3 \mu\text{m}^2$ 、circularity, >0.2)を集計し、蛍光強度と面積を集計した。

FRAP

HSF1⁺ HSE64-hHSP70pro-Luc MEF(clone 1)をガラス底 35mm dish(MatTek、P35G-1.5)上で培養し、24時間培養したのち、アデノウイルスを感染させた。42°Cの熱処理を行った細胞を、PBSで洗浄し、フェノールレッドを含まないDMEM培地(Sigma-Aldrich)に交換した。LSM5 Pascal 倒立共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)を用いて細胞内の凝縮体に488nm、強度100%のレーザー照射を10回行い、レーザー照射前に5枚、レーザー照射による消光後に40枚分、1枚につき1.09秒の速度で画像を取得した。この時、対物レンズは63倍の油浸レンズを使用し、2.0倍に拡大した、目的の細胞およびその周辺の領域を撮影した。レーザー照射部位(直径約 $2.5 \mu\text{m}$)のmEGFP-hHSF1の蛍光強度をFijiを用いて定量し、撮影開始時点における凝縮体の蛍光強度を1として、レーザー照射後の蛍光強度を相対的な値に換算した。論文に掲載された画像に挿入されたスケールバーは $5 \mu\text{m}$ を示している。

タンパク質の精製

Escherichia coli (DE3)に pET21a-mEGFP-hHSF1、pET21a-mEGFP-hHSF1 IDR、pET21a-mCherry-hMED12 IDR、pET21a-mEGFP および pET21a-mCherry をそれぞれ導入し、形質転換を行った。His タグが C 末端側に融合した mEGFP-hHSF1、mEGFP-hHSF1 IDR、mCherry-hMED12、mEGFP および mCherry を、0.4 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside を添加した LB 培地の中でそれぞれ 20°C で 16 時間(mEGFP-hHSF1)、16°C で 16 時間(mEGFP-hHSF1 IDR と mCherry-hMED12 IDR)、37°C で 3 時間(mEGFP と mCherry)の浸透培養を行い、タンパク質の発現を誘導した。500 ml の LB 培地で培養した *Escherichia coli*(DE3)の菌体を遠心分離させ、10 ml の Lysis Buffer(150 mM Tris-HCl(pH 7.5)、500 mM NaCl、20 mM Imidazole)で懸濁し、フレンチプレス(FA-073、SLM-AMINCO、Urbana、IL、USA)で 20,000 psi の圧力を 2 回かけることで菌体を破壊した。4°C、17,500g で 20 分間遠心分離を行った。上清のみを回収し、Ni-agarose beads(GE Healthcare)と 4°C で 1 時間反応させた。反応後の Ni-agarose beads を 10 ml の Lysis Buffer(150 mM Tris-HCl(pH 7.5)、500 mM NaCl、20 mM Imidazole)で 3 回洗浄したのち、1 ml の Elution Buffer(150 mM Tris-HCl (pH 7.5)、500 mM NaCl、500 mM Imidazole)を添加し、氷上で His タグ融合タンパク質を溶出した。溶出したタンパク質を透析膜に入れ、1 L の Dialysis Buffer(150 mM Tris-HCl (pH 7.5)、125 mM NaCl (mCherry-hMED12 IDR 以外) あるいは 500 mM (mCherry-hMED12 IDR)、10% glycerol、1 mM DTT)で 2 回、4°C で攪拌しながら透析を行った。透析後のタンパク質を Amicon Ultra centrifugal filter(Amicon Ultra-4、10 kDa、Millipore)によって濃縮し、20 μl ずつ分注したものを-80°C で保管した。

濃縮物形成実験

精製タンパク質を、3.2 μl の Dialysis Buffer と 4.3 μl の MES Buffer(20 mM MES-KOH(pH 5.0)、125 mM NaCl、10% glycerol、1 mM DTT)、7.5 μl の 20% PEG8000 を含む Dialysis Buffer を添加して溶液を混合し、精製タンパク質と 10% PEG8000 を含む pH 7.0 のタンパク質溶液を調製した。pH を変える実験では、Dialysis Buffer と MES Buffer の比率を変更し、NaCl 濃度を変える実験では、20% PEG8000 を含む Dialysis Buffer の NaCl 濃度を変更した。1,6-Hex を添加する実験では、予め終濃度 5-10% の 1,6-Hex を添加した MES Buffer を使用した。調整後の溶液から 5 μl をスライドガラス状に滴下し、カバーガラスを載せ、mEGFP-hHSF1 の蛍光画像を LSM510META 共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。この時、対物レンズは 63 倍の油浸レンズを使用し、2.0 倍に拡大した画像を、512 \times 512 pixel(1pixel=0.14 μm)で 10 視野分取得した。Fiji の Max Entropy というアルゴリズムを用いて hHSF1 の蛍光強度の閾値を設定し、閾値以上の領域を定量するための二極化画像を取得した。Analyze Particle というプログラムを用いて二極化した画像の中に存在する droplet(size,>0.07 μm^2)を集計した。また、mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR が mEGFP-hHSF1 IDR の液滴にどの程度取り込まれるかを定量する実験においては、mEGFP-hHSF1 IDR と mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR を混和した 7.5 μl のタンパク質溶液と、7.5 μl の 20% PEG8000 を含む Dialysis Buffer を添加して溶液を混合し、精製タンパク質と 10% PEG8000 を含む pH 7.0 のタンパク質溶液を調製した。調整後の溶液から 5 μl をスライドガラス状に滴下し、カバーガラスを載せ、mEGFP-hHSF1 IDR と mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR の蛍光画像を LSM5 Pascal 共焦点レーザー顕微鏡を用いて LSM510META と同様の手順で画像を取得した。Fiji の Max Entropy というアルゴリズムを用いて hHSF1 の蛍光強度の閾値を設定し、閾値以上の領域を定量するための二極化画像を取得した。Analyze Particle というプログラムを用いて二極化した画像の中に存在する droplet(size,>0.15 μm^2)を集計した。さらに、mEGFP-hHSF1 IDR の液滴と認識された領域の位置情報を記録し、mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR のチャンネルにおける蛍光強度を定量した。視野全体の mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR の蛍光強度を定量し、その値と mEGFP-hHSF1 IDR の液滴と認識された領域の mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR の蛍光強度を比較し、Partition ratio を算出した。論文に掲載された画像に挿入されたスケールバーはいずれも 5 μm を示している。

(3) 統計解析

得られたデータは平均値 \pm 標準偏差で示した。統計解析は JMP Pro 16(SAS Institute Inc.,Cary, NC, USA)を用いて行った。二群間の比較では Student の t 検定、多重比較では One-way ANOVA あるいは Two-way ANOVA ののちに Tukey-Kramer 検定を行った。

5. 結果

(1) 人工的な HSE レポーターアレイは熱ショック条件下で HSF1 凝縮体の形成を促進するヒト細胞で形成されるような核内ストレス顆粒を除外し、ショウジョウバエのように *HSP72* プロモーター上で HSF1 を観察可能にするため、*satellite III* 配列を持たないマウス細胞の内在性の HSF1 を欠損させたマウス線維芽細胞(HSF1⁻MEF)を樹立し、そのうえで *HSP72* プロモーターに由来する多価の HSE を持つレポーターアレイをゲノム DNA に導入した細胞を作成した(図 3A)。Luciferase(Luc)活性が高い 3 つのクローンからゲノム DNA を抽出し、ゲノム内に何本のレポーターアレイが統合されたのかを絶対定量 RT-qPCR 法で確認した(図 3B)。

これらのクローンに mEGFP-hHSF1 を発現させた結果、導入されたレポーターアレイ数が比較的多い clone 1 の核内で、HSF1 が活性化状態となる熱ショック後に凝縮体の形成が確認された(図 3C)。DNA への結合活性を欠失した R71G 変異体を clone 1 に発現させたところ[52]、このような凝縮体の形成は確認されなかったことから、HSF1 は HSE と結合することで凝縮体を形成することが示唆された(図 3D)。

この mEGFP-hHSF1 の凝縮体の形成と熱ショックの持続時間との関係性を明らかにするため、それぞれの時点における mEGFP-hHSF1 の凝縮体の蛍光強度、大きさ並びに凝縮体を形成した細胞の割合を調べた(図 3E)。その結果、凝縮体の形成は熱ショック開始から 15 分の時点から生じており、凝縮体の蛍光強度及び大きさは、熱ショックが 30 分から 45 分持続したときにピークに達することが判明した(図 3F)。また、凝縮体を形成した細胞の割合は、熱ショック開始から 60 分の時点でおおよそ 40%に達することが判明した(図 3G)。なお、熱ショックを受けていない細胞と、核内の蛍光強度を比較すると、熱ショック開始から 60 分の時点の細胞核では mEGFP-hHSF1 の蛍光強度が増大していた(補足図 1)。また、熱ショックが終了すると、凝縮体を形成した細胞の割合は減少した(補足図 2)。

続いて、HSF1 の凝縮体の形成と、HSF1 による *HSP* 遺伝子の転写活性化に相関関係があるのかを検証するため、転写装置である RNA Polymerase II(Pol II)がこの凝縮体と共局在するのかを免疫蛍光染色法により確認した(図 3H)。その結果、Pol II は熱ショックの有無にかかわらず核内で凝縮体を形成しているが、熱ショック下で mEGFP-hHSF1 の凝縮体と接触する Pol II の凝縮体の存在が確認された[53]。また、熱ショック開始から 0、30 分、60 分の細胞を回収し、レポーターアレイ由来の Luc mRNA の定量を行った結果、熱ショックの時間に応じて転写量が増加したことから(図 3I)、HSF1 の凝縮体の形成は HSF1 による熱ショック誘導性の遺伝子の転写活性化に関与している可能性が示唆された。

(2) HSE レポーターアレイ上で HSF1 は液—液相分離することで凝縮体を形成する

レポーターアレイ上の mEGFP-hHSF1 の凝縮体の形成が液—液相分離に由来するものかを確認するため、2 種類の方法で検証を行った。まずは、mEGFP-hHSF1 の凝縮体に流動性があるのかを確認するため、この凝縮体にレーザー照射を行って内部の mEGFP を退

色させ、蛍光を維持している外部の mEGFP-hHSF1 分子との入れ替わりを確認することで凝縮体の流動性を確認した(図 4A)。その結果、mEGFP-hHSF1 の凝縮体の実験開始時点の蛍光強度を 1、レーザー照射直後を 0 としたときに、蛍光強度が約 40%回復したことから、mEGFP-hHSF1 の凝縮体に部分的ながらも流動性があることが示唆された(図 4B)。続いて、弱い疎水性相互作用を阻害することで液—液相分離を阻害することが知られている 1,6-Hex 処理を行った際に[54]、すでに形成されている mEGFP-hHSF1 の凝縮体が拡散するかを確認した(図 4C)。その結果、5%や7.5%といった高濃度の 1,6-Hex 処理を行うと、mEGFP-hHSF1 の凝縮体の蛍光強度及び大きさは著しく減少した(図 4D)。また、2.5%という低濃度の処理であっても、この凝縮体を形成している細胞の割合が減少した(図 4E)。これらの結果から、HSE 上に存在する mEGFP-hHSF1 の凝縮体は、液—液相分離によって形成されていることが示唆された。

(3) 試験管内における HSF1 IDR の液滴形成時の性質

HSF1 の凝縮体の性質を試験管レベルで解析するため、大腸菌を用いて mEGFP-hHSF1 を精製した(図 5A)。一般的に、相分離は特定の構造をとらない天然変性領域(IDR)同士が多価の弱い相互作用により生じることが知られている[28]。HSF1 の三量体化ドメインと DNA 結合ドメインも HSF1 の相分離を促進することが報告されている[43]。そこで、hHSF1 の IDR のみを持つタンパク質(mEGFP-hHSF1 IDR)、そして HSF1 を持たない単独の mEGFP も同時に精製した(図 5B)。これらの HSF1 と mEGFP に 10% PEG8000 を添加して droplet を形成させたところ、mEGFP 単独では分子が拡散したままであったが、mEGFP-hHSF1 および mEGFP-hHSF1 IDR は PEG8000 の存在下で液滴に似た濃縮物を形成した(図 5C)。この結果から、hHSF1 は IDR だけで相分離する可能性が示唆された。続いて、この濃縮物が液—液分離によって形成されたものかを解析するため、1,6-Hex の存在下で同様の濃縮物が形成されるかを確認した(図 5D)。その結果、mEGFP-hHSF1 は 1,6-Hex の影響を受けなかった一方、mEGFP-hHSF1 IDR は 1,6-Hex の濃度依存的にこの濃縮物の形成が阻害された。この結果から、hHSF1 IDR に由来する droplet は液体に近い性質を持つ液滴であるが、hHSF1 全長からなる濃縮物は固体に近い性質を持つことが示唆された。そこで、液—液相分離をすることが示唆され、先行研究により細胞内で様々な転写関連因子と相互作用することが知られている IDR の更なる解析を行った(図 5E)。濃縮物の形成に環境中の pH と NaCl がどのように影響するかを解析した結果、この液滴は環境中の pH が低いほど形成されやすく、pH が高いほど形成されにくいことが判明した。また、NaCl 濃度が高い環境では、液滴の形成が阻害されることも示唆された。これらの結果から、hHSF1 IDR の相分離は、pH と NaCl のどちらにも影響を受けやすいことが示唆された。

(4) MED12 は HSE レポーターアレイ上の HSF1 凝縮物形成を促進する

本研究で樹立した細胞株を用いて、HSE 上における HSF1 の凝縮体の形成が転写関連因

子、特にメディエーター複合体の構成要素である MED12 の影響を受けるのかを解析した。まずは、メディエーター複合体が HSF1 凝縮体と共局在することを、mEGFP-hHSF1 を発現した細胞を用いて、MED12(Kinase module)、MED1(Middle module)、MED15(Tail module)の抗体を使用した免疫蛍光染色法で確認した(図 6A)。その結果、いずれのメディエーター構成要素もそれぞれ凝縮体を形成しているが、これらは熱ショック後に形成された mEGFP-hHSF1 の凝縮体との共局在が観察された。mEGFP-hHSF1 の凝縮体が形成されなかった細胞では MED12 の凝縮体の形成は確認されなかったため(図 6B)、HSE 上に形成された mEGFP-hHSF1 の凝縮体は、MED1 および MED15 を含むコアメディエーターと MED12 を含むキナーゼモジュールの両方と相互作用するための場を形成していることが示唆された。

続いて、HSF1 とこれらメディエーター構成タンパク質との共局在が、HSF1 との相分離に由来するものかを検証した。MED12 はアミノ酸配列から IDR の可能性が高い領域が C 末端に存在する[55]。MED1 および MED15 は特定の転写因子とともに相分離することが報告されている[33]。そこで、これらのタンパク質の IDR(補足図 3A、B、C)が HSE 上の mEGFP-hHSF1 の凝縮体と共局在するかを確認した(図 6C)。それぞれの IDR に mCherry を融合したものを発現させることで可視化した結果、発現する IDR により mEGFP-hHSF1 の凝縮体と共局在する割合が異なることが判明した。mCherry-hMED12 IDR では約 42%、mCherry-hMED15 IDR では約 75%の共局在が確認されたのに対し、mCherry-hMED1 IDR は mEGFP-hHSF1 の凝縮体との共局在が確認されなかったことから、MED12 と MED15 が HSF1 とそれぞれの IDR を介して招集される可能性が示唆された。

MED12 が HSF1 の凝縮体形成に与える影響を解析するため、まずは試験管レベルでの MED12 の IDR が hHSF1 の IDR との相分離を確認した。最初に、大腸菌を用いて精製した mCherry-hMED12 IDR に相分離能があることを確認した(補足図 4A、B)。続いて mCherry および mCherry-hMED12 IDR を mEGFP-hHSF1 IDR と混和し、液滴を形成させた。その結果、mCherry-hMED12 IDR と混和した際には、mEGFP-hHSF1 IDR の液滴内の mCherry-hMED12 IDR の蛍光強度は液滴外よりも高くなる傾向にあった。mCherry を mEGFP-hHSF1 IDR と混和した際には、mEGFP-hHSF1 IDR の内外で蛍光強度の差はみられなかったことから、MED12 IDR は mEGFP-hHSF1 IDR の液滴に選択的に濃縮されたことが示唆された(図 7A、補足図 4C)。この結果から、直接的に MED12 IDR が HSF1 の凝縮体の形成を制御する可能性が示唆された。

続いて、細胞内においても MED12 が HSF1 の凝縮体の形成の制御に関与するのかを調べるため、MED12 の発現抑制を行った細胞での mEGFP-hHSF1 の凝縮体の形成状態を確認した(図 7B)。この実験においては、発現抑制を行わない対照群の細胞と発現抑制を行った細胞の核内の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度がいずれも同じ水準となるような細胞を選択し、解析を行った(補足図 5)。その結果、凝縮体の形成率に有意な差はみられなかったものの、MED12 の発現を抑制した細胞の核内で形成された mEGFP-hHSF1 の凝縮体の蛍光強

度及び大きさはいずれも顕著に減少した(図 7C、D)。最後に、HSF1 の凝縮体の形成が抑制される、MED12 の発現抑制を行った細胞に熱ショックを与えた時の Luc mRNA の定量を行った結果、対照群の細胞と比較して熱ショック下の転写量が有意に低かった(図 7E)。

この結果から、MED12 は熱ショック下における HSE 上での HSF1 の凝縮体の形成と転写の活性化を促進することが示唆された(図 8)。

6. 考察

Pol II による遺伝子の転写は、DNA に結合した転写因子を足場として濃縮される多数の因子により制御されている。近年の研究により、Pol II や転写活性化因子、転写因子は、それらの IDR を介して液-液相分離し、局所的にそれらの分子が濃縮された領域を形成することが、スーパーエンハンサー上で確認されている[29]。熱ショック下において、活性化状態となった HSF1 は急速に HSP 遺伝子群のプロモーターを占有し、これらの遺伝子の転写活性化を行う[13,56,57,58]。また、超解像度顕微鏡を用いた実験により、HSF1 凝縮体が HSP90、HSP70、HSP40 遺伝子上で形成されている可能性が示唆されたが、この凝縮体の具体的な性質には不明な点が多く残されていた[43]。そこで、本研究では、HSP72 遺伝子群のプロモーター配列由来の HSE を多数持つマウス細胞を樹立し、この細胞に mEGFP-hHSF1 を発現させることで通常の共焦点顕微鏡でも HSF1 凝縮体を観察できるようにした(図 3、補足図 2)。この細胞を利用した解析により、HSE 上の HSF1 凝縮体は流動性を持ち、液体に近い性質と固体に近い性質の両方を併せ持つことが示唆された(図 4)。加えて、Pol II とメディエーターは HSF1 凝縮体の内部で濃縮され、これらのタンパク質を含む HSF1 の凝縮体の形成がレポーター遺伝子の急速な転写活性化を引き起こすことが示唆された(図 3、図 6、図 7)。一般的に、相分離により形成された、転写関連タンパク質からなる凝縮体は特定のタンパク質の濃度を維持することが知られている[59]。本研究で使用した HSE アレイは HSE だけでなく HSP72 プロモーター(-230 から+13)も含んでいる。そのため、本研究で得られた観察結果から、HSE レポーターアレイ上に形成された HSF1 凝縮体は、ショウジョウバエの唾液腺の核内で形成される巨大な HSF 凝縮体に近く、HSP70 プロモーター上の HSF1 凝縮体のモデルとして機能していることが示唆された[45]。ただし、この HSE アレイを持つ細胞に形成された HSF1 凝縮体には、核内ストレス顆粒の構成タンパク質も濃縮されている可能性も残されている。

本研究ではさらに、大腸菌から精製した mEGFP-hHSF1 の性質を試験管レベルで解析しており、HSF1 自体は固体の性質であることを示した(図 5C、D)。固体に近い性質のタンパク質としては ENL と CDK9 が知られているが、これらは AFF4 を添加することで流動性を持つことが報告されている[60]。また、NELF も試験管内においては非常に流動性が低い液滴を形成するが、リン酸化を受けると流動性が上がることが報告されている[61]。細胞内では HSF1 も液-液相分離することを考慮すると、ほかのタンパク質の存在や HSF1 に対する翻訳後修飾が HSF1 の流動性を上げていると考えられる。一般的に IDR は相分離に必

要であり、転写因子の統合的な機能を担うことが知られている[62]。そのため、本研究では転写制御領域と転写活性化領域を含む HSF1 の IDR に着目した。mEGFP-hHSF1 IDR はそれ自身で液体様の性質を示した(図 5C、D)。重要なこととして、既に報告された p53 と同じく[63]、この相分離は低 pH 環境下で促進されることが示唆された。pH と NaCl の変化により相分離効率が変動しやすいということは、IDR 内部の電荷をもつアミノ酸、特に、HSF1 の IDR に多く含まれる、負の電荷をもつグルタミン酸とアスパラギン酸や、HSF1 の活性化時にリン酸化を受けるセリンやスレオニンが液—液相分離に重要であることを示唆している[40,43]。

メディエーター複合体は、物理的に転写因子と転写開始複合体同士を連結するタンパク質である。メディエーター複合体の多くの構成タンパク質が IDR を有している[48]。MED12 を含む MKM は、RNA ポリメラーゼ II とコアメディエーターとの相互作用を阻害することでメディエーターの機能を抑制することが知られている[46,47]。MKM とコアメディエーター同士の相互作用は転写中に一過性に生じるため、MKM は転写を阻害するか、将来転写活性な領域となる遺伝子座を確立するために機能しているようである[48]。MKM に存在する CDK8 と CDK19 は MED12 により制御されているが、これらは RNA ポリメラーゼ II やメディエーター、STAT1 や SREBP といった転写因子をリン酸化することで、遺伝子の転写活性化を行う[64-66]。MED12 は HSF1 と相互作用しやすいメディエータータンパク質であり、HSF1 の S326 のリン酸化を促進することで哺乳類細胞の熱ショック応答反応を促進する[24]。本研究により、MED12 は、コアメディエーターの MED1 や MED15 と同様に HSF1 凝縮体と共局在することが判明した(図 6A)。この結果から、コアメディエーターだけでなく MKM も HSF1 凝縮体により濃縮されることが示唆された。更に、MED12 の発現抑制を行うと、HSF1 凝縮体の大きさが著しく縮小することが判明した(図 7)。これらの観察結果から、MED12 は HSF1 の集積を強く促進していることが示唆された。MED1 が *HSP70* プロモーター上に存在し、MED12 を発現抑制するとその占有率が減少するという先行研究の結果から、MED12 による影響は他のメディエータータンパク質の相分離にも及んでいると予想される。

MED12 の IDR(1724-2177a.a)は多くのグルタミンを含んでいる。ポリグルタミンは多価の弱い相互作用を引き起こすことが知られている[59,67]。MED12 の IDR 単独では HSF1 の凝縮体によって高密度には濃縮されない一方で、内在性の MED12 は HSF1 凝縮体により高度に濃縮される。これは、MED12 がもつ HSF1 との相互作用ドメイン(1401-1821a.a)が IDR とともに HSF1 との共局在に働くことで HSF1 と MED12 の相分離を促進していると推測される[24]。また、MED12 の翻訳後修飾やエンハンサーRNA により HSF1 と MED12 の相分離が制御されることも考えられる[48,68]。一方で、出芽酵母の MED12 には哺乳類の MED12 のようなポリグルタミン配列は保存されていない[55]。また、出芽酵母の熱ショック応答時には MKM は *HSP70* 遺伝子の転写に影響しないため、出芽酵母では HSF1 凝縮体の形成は熱ショック応答に重要ではないと予想される[69,70]。

熱ショック条件下において、HSF1は様々な種類の生物の、様々な組織の細胞内で、相分離に由来する多様な大きさの凝縮体を形成する。ヒト細胞において、HSF1は *HSP* プロモーター上では極小の凝縮体を、*satellite III* 上では巨大な複数の核内ストレス顆粒を形成する[34-37,40,43]。これに類似するものとしては、線虫の HSF-1 が核内で形成する凝縮体や[71]、ショウジョウバエに *HSP* プロモーター上で形成される目視可能な大きさの HSF の凝縮体が挙げられる[45]。出芽酵母においては、*HSP* 遺伝子同士は通常接触しないが、巨大な HSF1 凝縮体形成によりこれらが融合したような構造をとることが報告されている[72,73]。本研究で使用した、ヒトの *HSP72* プロモーターを模した HSE アレイ上に形成されたと推測される HSF1 凝縮体は、熱ショック条件下で形成される極小の HSF1 凝縮体の性質を解析するために有用なモデルとなっている。

7. 結語

HSF1 は、人工的に構築したヒト *HSP72* プロモーター上で液体様の性質を持つ凝縮体を形成した。また、この凝縮体への mEGFP-hHSF1 の集積にはメディエーター構成タンパク質である MED12 が関与していることも示唆された。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、医化学講座教授の中井 彰先生、准教授の藤本 充章先生、講師の瀧井 良祐先生、卒業生の Pratibha Srivastava さん、大学院生の Akanksha Pandey さんに感謝申し上げます。また、共焦点顕微鏡の使用に関して技術的な支援をしてくださった元理工学研究科准教授の有働 公一先生に感謝いたします。

本学位論文の主要部分は、Mariko Okada, Mitsuaki Fujimoto, Pratibha Srivastava, Akanksha Pandey, Ryosuke Takii, and Akira Nakai (2023) The Mediator subunit MED12 promotes formation of HSF1 condensates on heat shock response element arrays in heat-shocked cells. *FEBS Lett.*,10.1002.1873-3468.14617 に原著論文として発表したものです。

9. 参考文献

- (1) Lindquist S (1986) The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* **55**, 1151-91.
- (2) Morimoto RI (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* **22**, 1427-38.
- (3) Jayaraj GG, Hipp MS, Hartl FU (2020) Functional Modules of the Proteostasis Network. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **12**, a033951.
- (4) Lis J, Wu C (1993) Protein traffic on the heat shock promoter: parking, stalling, and trucking along. *Cell* **74**, 1-4.
- (5) Morimoto RI. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk

- between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**, 3788-96.
- (6) Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 545-55.
 - (7) Biamonti G, Vourc'h C (2010) Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000695.
 - (8) Nakai A (ed) (2016) Heat Shock Factor, Tokyo Japan, *Springer*
 - (9) Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ (2018) Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 4-19.
 - (10) Weake VM, Workman JL (2010) Inducible gene expression: diverse regulatory mechanisms. *Nat Rev Genet* **11**, 426-37.
 - (11) Jonkers I, Lis JT (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 167-77.
 - (12) Sullivan EK, Weirich CS, Guyon JR, Sif S, Kingston RE (2001) Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Mol Cell Biol* **21**, 5826-37.
 - (13) Takii R, Fujimoto M, Tan K, Takaki E, Hayashida N, Nakato R, Shirahige K, Nakai A (2015) ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. *Mol Cell Biol* **35** 11-25.
 - (14) Xu L, Ma X, Bagattin A, Mueller E (2016) The transcriptional coactivator PGC1 α protects against hyperthermic stress via cooperation with the heat shock factor HSF1. *Cell Death Dis* **7**, e2102.
 - (15) Takii R, Fujimoto M, Matsumoto M, Srivastava P, Katiyar A, Nakayama KI, Nakai A (2019) The pericentromeric protein shugoshin 2 cooperates with HSF1 in heat shock response and RNA Pol II recruitment. *EMBO J* **38**, e102566.
 - (16) Tan K, Fujimoto M, Takii R, Takaki E, Hayashida N, Nakai A. (2015) Mitochondrial SSBP1 protects cells from proteotoxic stresses by potentiating stress-induced HSF1 transcriptional activity. *Nat Commun* **6**, 6580.
 - (17) Xu D, Zalmas LP, La Thangue NB (2008) A transcription cofactor required for the heat-shock response. *EMBO Rep* **9**, 662-9.
 - (18) Zelin E, Zhang Y, Toogun OA, Zhong S, Freeman BC (2012) The p23 molecular chaperone and GCN5 acetylase jointly modulate protein-DNA dynamics and open chromatin status. *Mol Cell* **48**, 459-70.
 - (19) Hong S, Kim SH, Heo MA, Choi YH, Park MJ, Yoo MA, Kim HD, Kang HS, Cheong J (2004) Coactivator ASC-2 mediates heat shock factor 1-mediated transactivation dependent on heat shock. *FEBS Lett* **559**, 165-70.
 - (20) Chen Y, Chen J, Yu J, Yang G, Temple E, Harbinski F, Gao H, Wilson C, Pagliarini R, Zhou

- W (2014) Identification of mixed lineage leukemia 1 (MLL1) protein as a coactivator of heat shock factor 1 (HSF1) protein in response to heat shock protein 90 (HSP90) inhibition. *J Biol Chem* **289**, 18914-27.
- (21) In S, Kim YI, Lee JE, Kim J (2019) RNF20/40-mediated eEF1B δ L monoubiquitylation stimulates transcription of heat shock-responsive genes. *Nucleic Acids Res* **47**, 2840-2855.
- (22) Fujimoto M, Takii R, Matsumoto M, Okada M, Nakayama KI, Nakato R, Fujiki K, Shirahige K, Nakai A (2022) HSF1 phosphorylation establishes an active chromatin state via the TRRAP-TIP60 complex and promotes tumorigenesis. *Nat Commun* **13**, 4355.
- (23) Fujimoto M, Takii R, Katiyar A, Srivastava P, Nakai A (2018) Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Promotes the Human Heat Shock Response by Facilitating Heat Shock Transcription Factor 1 Binding to DNA. *Mol Cell Biol* **38**, e00051-18.
- (24) Srivastava P, Takii R, Okada M, Fujimoto M, Nakai A (2021) MED12 interacts with the heat-shock transcription factor HSF1 and recruits CDK8 to promote the heat-shock response in mammalian cells. *FEBS Lett* **595**, 1933-1948.
- (25) Anandhakumar J, Moustafa YW, Chowdhary S, Kainth AS, Gross DS (2016) Evidence for Multiple Mediator Complexes in Yeast Independently Recruited by Activated Heat Shock Factor. *Mol Cell Biol* **36**, 1943-60.
- (26) Miozzo F, Sabéran-Djoneidi D, Mezger V (2015) HSFs, Stress Sensors and Sculptors of Transcription Compartments and Epigenetic Landscapes. *J Mol Biol* **427**, 3793-816.
- (27) Kainth AS, Meduri R, Pandit V, Rubio LS, Gross DS (2020) Shugoshin 2-a new guardian for heat shock transcription. *EMBO J* **39**, e104077.
- (28) Hnisz D, Shrinivas K, Young RA, Chakraborty AK, Sharp PA (2017) A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **169**, 13-23.
- (29) Cramer P (2019) Organization and regulation of gene transcription. *Nature* **57**, 45-54.
- (30) Chong S, Dugast-Darzacq C, Liu Z, Dong P, Dailey GM, Cattoglio C, Heckert A, Banala S, Lavis L, Darzacq X, Tjian R (2018) Imaging dynamic and selective low-complexity domain interactions that control gene transcription. *Science* **36**, eaar2555.
- (31) Sabari BR, Dall'Agnese A, Bojja A, Klein IA, Coffey EL, Shrinivas K, Abraham BJ, Hannett NM, Zamudio AV, Manteiga JC, Li CH, Guo YE, Day DS, Schuijers J, Vasile E, Malik S, Hnisz D, Lee TI, Cisse II, Roeder RG, Sharp PA, Chakraborty AK, Young RA (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* **36**, eaar3958.
- (32) Cho WK, Spille JH, Hecht M, Lee C, Li C, Grube V, Cisse II (2018) Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* **361**, 412-415.
- (33) Bojja A, Klein IA, Sabari BR, Dall'Agnese A, Coffey EL, Zamudio AV, Li CH, Shrinivas K,

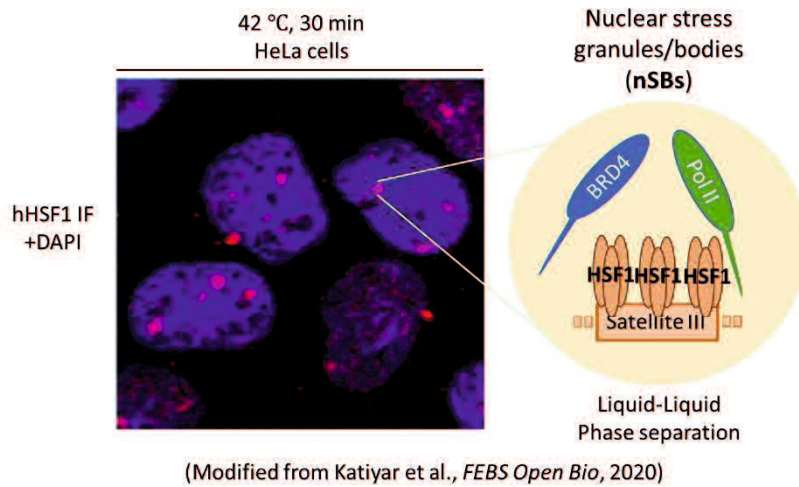
- Manteiga JC, Hannett NM, Abraham BJ, Afeyan LK, Guo YE, Rimel JK, Fant CB, Schuijers J, Lee TI, Taatjes DJ, Young RA (2018) Transcription Factors Activate Genes through the Phase-Separation Capacity of Their Activation Domains. *Cell* **175**, 1842-1855.e16.
- (34) Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993) Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* **13**, 1392-407.
- (35) Cotto J, Fox S, Morimoto R (1997) HSF1 granules: a novel stress-induced nuclear compartment of human cells. *J Cell Sci* **110**, 2925-34.
- (36) Jolly C, Morimoto R, Robert-Nicoud M, Vourc'h C (1997) HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J Cell Sci* **110**, 2935-41.
- (37) Eymery A, Souchier C, Vourc'h C, Jolly C (2010) Heat shock factor 1 binds to and transcribes satellite II and III sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Exp Cell Res* **316**, 1845-55.
- (38) Jolly C, Konecny L, Grady DL, Kutsikova YA, Cotto JJ, Morimoto RI, Vourc'h C (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* **156**, 775-81.
- (39) Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, Khochbin S, Vourc'h C (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* **164**, 25-33.
- (40) Gaglia G, Rashid R, Yapp C, Joshi GN, Li CG, Lindquist SL, Sarosiek KA, Whitesell L, Sorger PK, Santagata S (2020) HSF1 phase transition mediates stress adaptation and cell fate decisions. *Nat Cell Biol* **22**, 151-158.
- (41) Col E, Hoghoughi N, Dufour S, Penin J, Koskas S, Faure V, Ouzounova M, Hernandez-Vargash H, Reynoird N, Daujat S, Folco E, Vigneron M, Schneider R, Verdel A, Khochbin S, Herceg Z, Caron C, Vourc'h C (2017) Bromodomain factors of BET family are new essential actors of pericentric heterochromatin transcriptional activation in response to heat shock. *Sci Rep* **7**, 5418.
- (42) Ninomiya K, Iwakiri J, Aly MK, Sakaguchi Y, Adachi S, Natsume T, Terai G, Asai K, Suzuki T, Hirose T (2021) m⁶A modification of HSATIII lncRNAs regulates temperature-dependent splicing. *EMBO J* **40**, e107976.
- (43) Zhang H, Shao S, Zeng Y, Wang X, Qin Y, Ren Q, Xiang S, Wang Y, Xiao J, Sun Y (2022) Reversible phase separation of HSF1 is required for an acute transcriptional response during heat shock. *Nat Cell Biol* **24**, 340-352.
- (44) Fujimoto M, Takii R, Hayashida N, Nakai A (2015) Analysis of the heat shock factor complex in mammalian HSP70 promoter. *Methods Mol Biol* **1292**, 53-65.
- (45) Yao J, Munson KM, Webb WW, Lis JT (2006) Dynamics of heat shock factor association

- with native gene loci in living cells. *Nature* **442**, 1050-3.
- (46) Knuesel MT, Meyer KD, Bernecky C, Taatjes DJ (2009) The human CDK8 subcomplex is a molecular switch that controls Mediator coactivator function. *Genes Dev* **23**, 439-51.
- (47) El Khattabi L, Zhao H, Kalchschmidt J, Young N, Jung S, Van Blerkom P, Kieffer-Kwon P, Kieffer-Kwon KR, Park S, Wang X, Krebs J, Tripathi S, Sakabe N, Sobreira DR, Huang SC, Rao SSP, Pruett N, Chauss D, Sadler E, Lopez A, Nóbrega MA, Aiden EL, Asturias FJ, Casellas R (2019) A Pliable Mediator Acts as a Functional Rather Than an Architectural Bridge between Promoters and Enhancers. *Cell* **178**, 1145-1158.e20.
- (48) Richter WF, Nayak S, Iwasa J, Taatjes DJ (2022) The Mediator complex as a master regulator of transcription by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* **23**, 732-749.
- (49) Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-6.
- (50) Fujimoto M, Takaki E, Takii R, Tan K, Prakasam R, Hayashida N, Iemura S, Natsume T, Nakai A (2012) RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol Cell* **48**, 182-94.
- (51) Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-72.
- (52) Fujimoto M, Takaki E, Hayashi T, Kitaura Y, Tanaka Y, Inouye S, Nakai A (2005) Active HSF1 significantly suppresses polyglutamine aggregate formation in cellular and mouse models. *J Biol Chem* **280**, 34908-16.
- (53) Henninger JE, Oksuz O, Shrinivas K, Sagi I, LeRoy G, Zheng MM, Andrews JO, Zamudio AV, Lazaris C, Hannett NM, Lee TI, Sharp PA, Cissé II, Chakraborty AK, Young RA (2021) RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell* **184**, 207-225.e24.
- (54) Sonja K, Shovamayee M, Alberti S (2017) Hexanediol: a chemical probe to investigate the material properties of membrane-less compartments. *Matters* **3**, e201702000010.
- (55) Fant CB, Taatjes DJ (2019) Regulatory functions of the Mediator kinases CDK8 and CDK19. *Transcription* **10**, 76-90.
- (56) Guertin MJ, Lis JT (2010) Chromatin landscape dictates HSF binding to target DNA elements. *PLoS Genet* **6**, e1001114.
- (57) Vihervaara A, Sergelius C, Vasara J, Blom MA, Elsing AN, Roos-Mattjus P, Sistonen L (2013) Transcriptional response to stress in the dynamic chromatin environment of cycling and mitotic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, E3388-97.
- (58) Mahat DB, Salamanca HH, Duarte FM, Danko CG, Lis JT (2016) Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. *Mol Cell* **62**, 63-78.

- (59) Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 285-298.
- (60) 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.
- (61) Rawat P, Boehning M, Hummel B, Aprile-Garcia F, Pandit AS, Eisenhardt N, Khavaran A, Niskanen E, Vos SM, Palvimo JJ, Pichler A, Cramer P, Sawarkar R (2021) Stress-induced nuclear condensation of NELF drives transcriptional downregulation. *Mol Cell* **81**, 1013-1026.e11.
- (62) Ferrie JJ, Karr JP, Tjian R, Darzacq X (2022) "Structure"-function relationships in eukaryotic transcription factors: The role of intrinsically disordered regions in gene regulation. *Mol Cell* **82**, 3970-3984.
- (63) Kamagata K, Kanbayashi S, Honda M, Itoh Y, Takahashi H, Kameda T, Nagatsugi F, Takahashi S (2020) Liquid-like droplet formation by tumor suppressor p53 induced by multivalent electrostatic interactions between two disordered domains. *Sci Rep* **10**, 580.
- (64) Zhao X, Feng D, Wang Q, Abdulla A, Xie XJ, Zhou J, Sun Y, Yang ES, Liu LP, Vaitheesvaran B, Bridges L, Kurland IJ, Strich R, Ni JQ, Wang C, Ericsson J, Pessin JE, Ji JY & Yang F (2012) Regulation of lipogenesis by cyclin-dependent kinase 8-mediated control of SREBP-1. *J Clin Invest* **122**, 2417-2427.
- (65) Bancerek J, Poss ZC, Steinparzer I, Sedlyarov V, Pfaffenwimmer T, Mikulic I, Dölken L, Strobl B, Müller M, Taatjes DJ et al. (2013) CDK8 kinase phosphorylates transcription factor STAT1 to selectively regulate the interferon response. *Immunity* **38**, 250–262.
- (66) Poss ZC, Ebmeier CC, Odell AT, Tangpeerachaikul A, Lee T, Pelish HE, Shair MD, Dowell RD, Old WM & Taatjes DJ (2016) Identification of Mediator Kinase Substrates in Human Cells using Cortistatin A and Quantitative Phosphoproteomics. *Cell Rep* **15**, 436-450.
- (67) Bergeron-Sandoval LP, Safaee N, Michnick SW (2016) Mechanisms and Consequences of Macromolecular Phase Separation. *Cell* **165**, 1067-1079.
- (68) Lai F, Orom UA, Cesaroni M, Beringer M, Taatjes DJ, Blobel GA, Shiekhattar R (2013) Activating RNAs associate with Mediator to enhance chromatin architecture and transcription. *Nature* **494**, 497-501.
- (69) Kim S, Gross DS (2013) Mediator recruitment to heat shock genes requires dual Hsf1 activation domains and mediator tail subunits Med15 and Med16. *J Biol Chem* **288**, 12197-213.
- (70) Anandhakumar J, Moustafa YW, Chowdhary S, Kainth AS, Gross DS (2016) Evidence for Multiple Mediator Complexes in Yeast Independently Recruited by Activated Heat Shock Factor. *Mol Cell Biol* **36**, 1943-60.

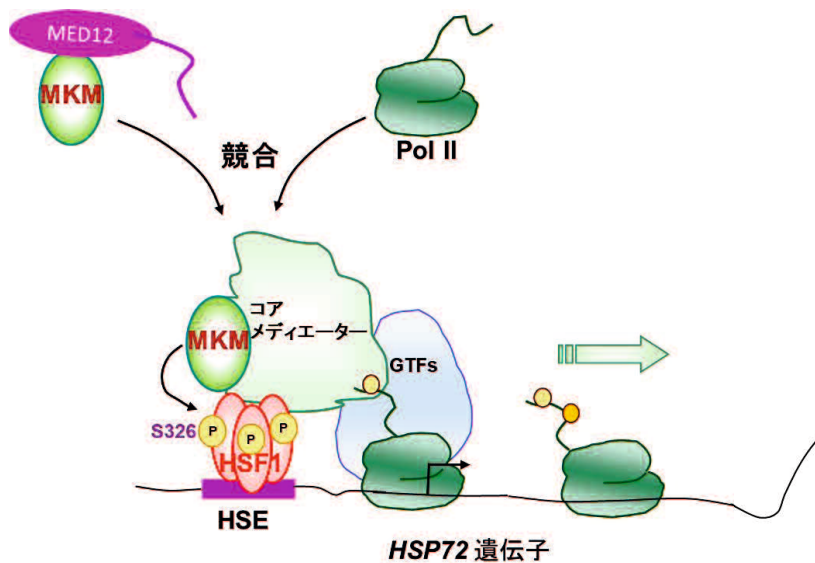
- (71) Morton EA, Lamitina T (2013) *Caenorhabditis elegans* HSF-1 is an essential nuclear protein that forms stress granule-like structures following heat shock. *Aging Cell* **12**, 112-20.
- (72) Kainth AS, Chowdhary S, Pincus D, Gross DS (2021) Primordial super-enhancers: heat shock-induced chromatin organization in yeast. *Trends Cell Biol* **31**, 801-813.
- (73) Chowdhary S, Kainth AS, Paracha S, Gross DS, Pincus D (2022) Inducible transcriptional condensates drive 3D genome reorganization in the heat shock response. *Mol Cell* **82**, 4386-4399.e7.

図 1



熱ショック条件下で核内に移行し、活性化状態となった HSF1 が *satellite III* 遺伝子上に結合した状態で液-液相分離することによって形成された、核内ストレス顆粒(左)。この核内ストレス顆粒には様々な転写調節因子が集積している(右)。

図 2

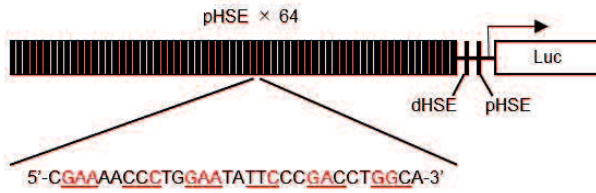


(Modified from Pratibha et al., *FEBS Letters*, 2021)

MED12 を含む MKM と RNA ポリメラーゼ II が *HSP72* 遺伝子上でコアメディエーターと相互作用するときの模式図。MED12 を含む MKM はコアメディエーターと一過的にしか相互作用せず、コアメディエーターと相互作用する際には遊離の RNA ポリメラーゼ II と競合することが知られている。

図 3

A



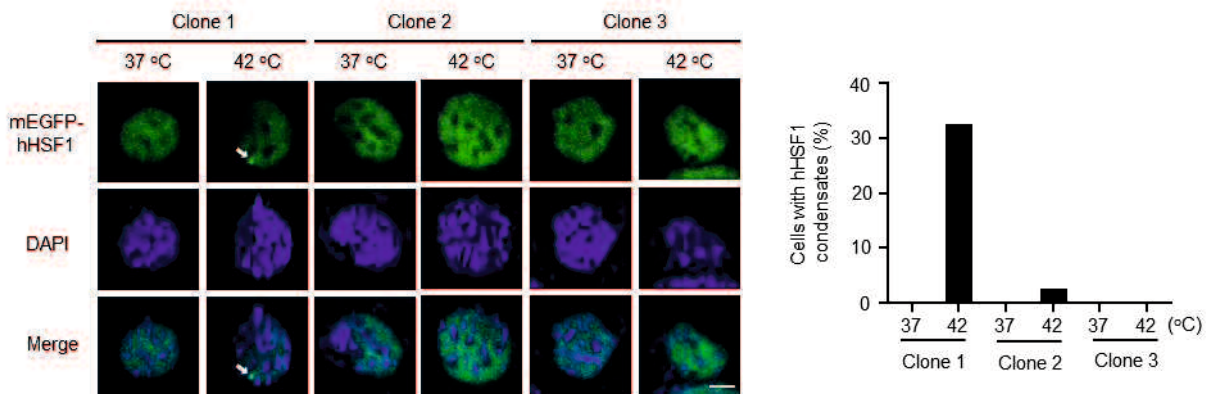
B

Cell line	Copy no. of HSE array	No. of HSE
clone 1	36	2376
clone 2	3	198
clone 3	1	66

(A) ヒト HSE 反復配列を持つレポーター遺伝子の模式図。ヒト *HSP72* 遺伝子のプロモーター配列から、pHSE を 64 回繰り返した配列(約 2,300 bp)と、pHSE と dHSE を 1 個ずつ持つ DNA を Luciferase 遺伝子の upstream に挿入した、pGL3-Basic vector(pGL3-HSE64-HSP70pro-Luc)を示した。pHSE の配列には下線で、保存されている GAA 配列は赤字で示した。

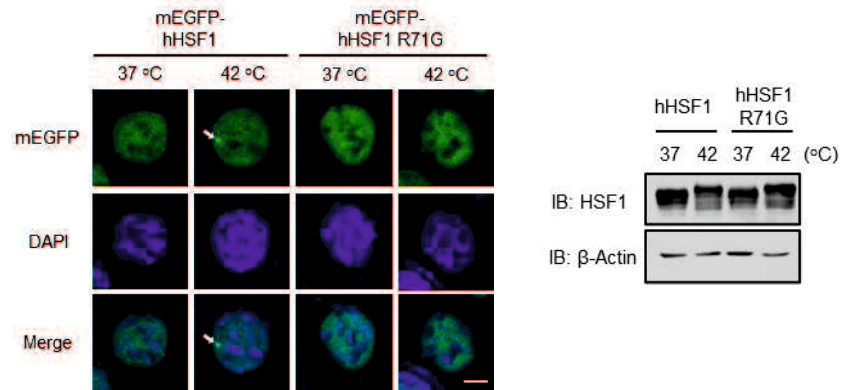
(B) RT-qPCR により定量した、clone 1, 2, 3 のゲノム DNA に統合されたレポーター遺伝子数を示した。

C



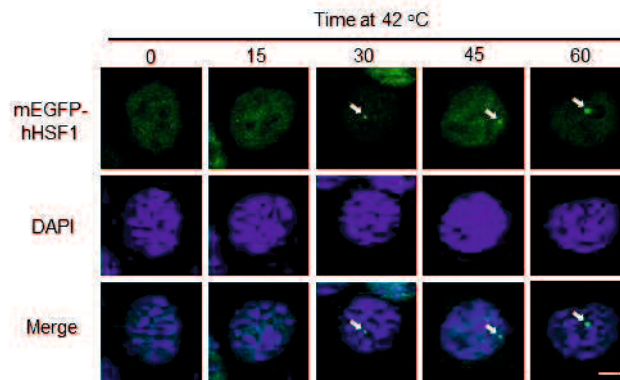
(C) mEGFP-hHSF1 を発現した clone 1, 2, 3 の核内に形成された凝縮体を観察した。核内で形成された凝縮体を矢印で示した(左)。37°C および 42°C、60 分の条件下でのそれぞれの clone での 40 細胞中の凝縮体形成細胞の割合を確認した (右)。

D

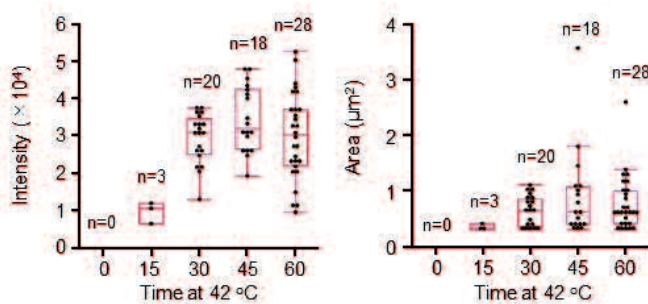


(D) HSE に結合できない R71G 変異体を発現させた細胞における凝縮体の形成が起こらないことを確認した。比較対象として野生型 HSF1 を発現した細胞を用いた(左)。WB により、野生型 HSF1 と R71G 変異体で HSF1 の発現量に差がないことを確認した(右)。

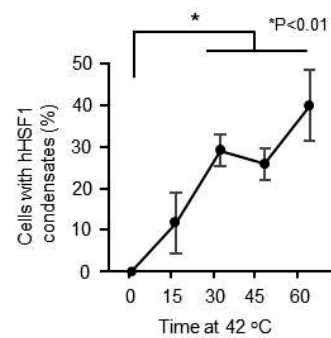
E



F



G



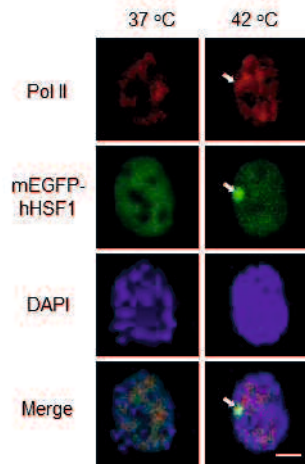
(E) 42°C の熱ショック時間の変化に応じた HSF1 凝縮体の観察を行った。

(F) (E)で撮影した凝縮体の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度(左)および凝縮体の大きさ(右)を定量した。箱ひげ図の上部に定量した凝縮体の個数を示した。

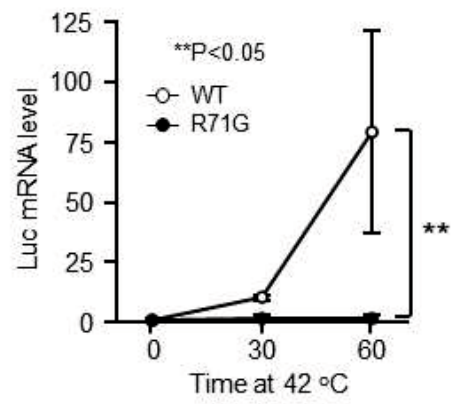
(G) それぞれの条件下における 40 細胞中の凝縮体形成細胞の割合を算出した(n=3)。

*P<0.01.

H



I



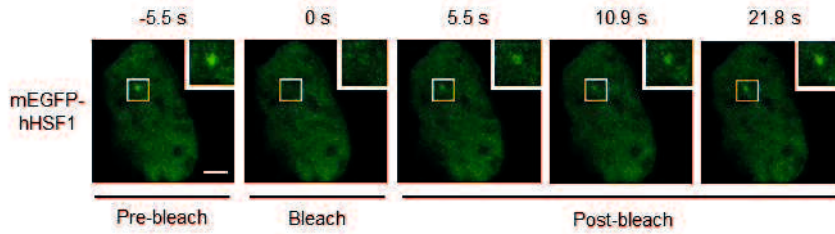
(H) HSF1 凝縮体と RNA ポリメラーゼ II の凝縮体のそれぞれの局在を免疫染色により確認した。

(I) 熱ショック下におけるレポーター遺伝子 Luc mRNA の転写量を確認した(n=3)。

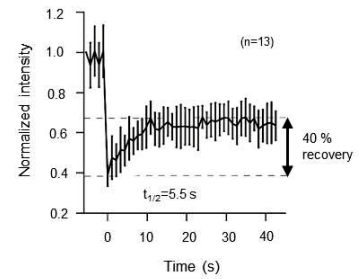
**P<0.05.

図 4

A



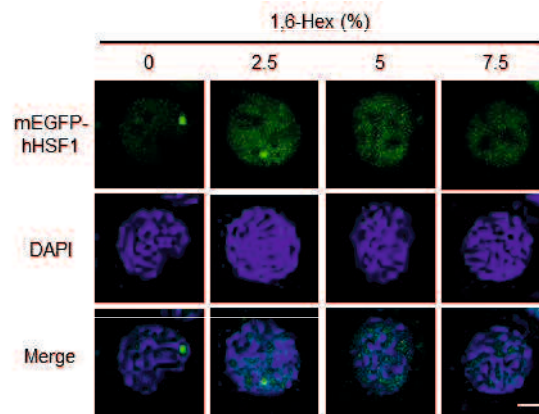
B



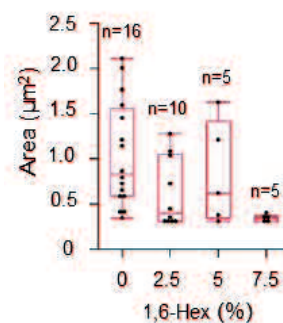
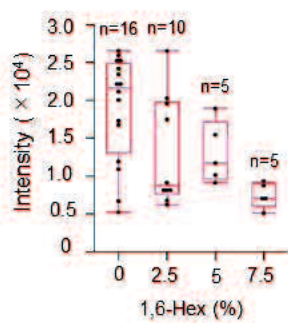
(A) 熱ショック条件下で形成された HSF1 の凝縮体をレーザー光で消光させ、凝縮体の蛍光強度を追跡した。

(B) 撮影開始時点のそれぞれの凝縮体の蛍光強度を 1 として、(A)で定量した 13 細胞内の凝縮体の蛍光強度の経時的变化を示した。

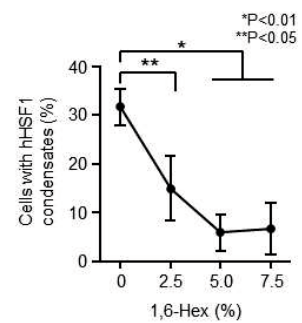
C



D



E



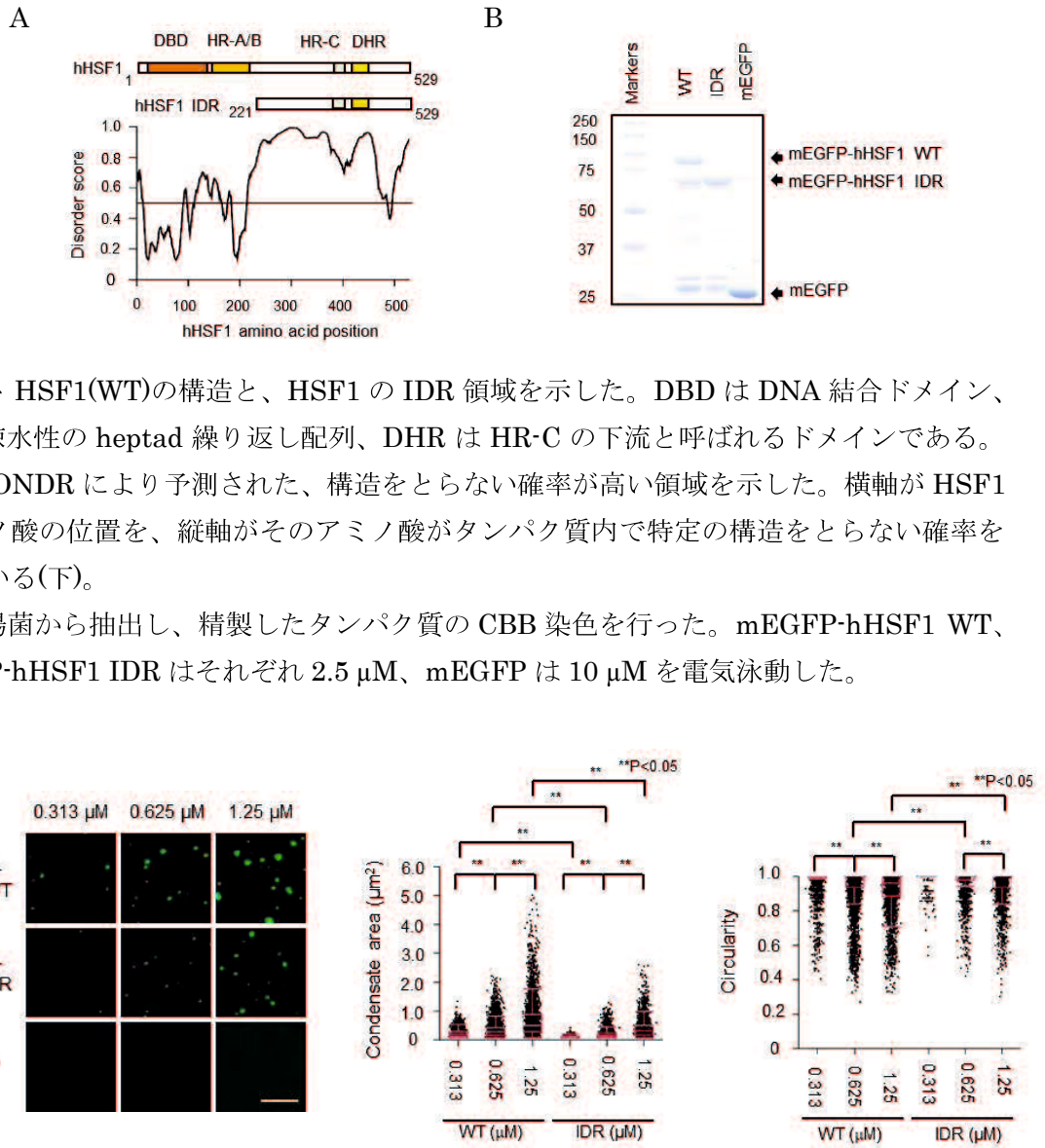
(C) 熱ショック後の細胞に 1,6-Hex 処理を 1 分間行い、HSF1 凝縮体の観察を行った

(D) (C)で撮影した凝縮体の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度(左)および凝縮体の大きさ(右)を定量した。箱ひげ図の上部に定量した凝縮体の個数を示した。

(E) それぞれの条件下における 40 細胞中の凝縮体形成細胞の割合を算出した(n=3)。

*P<0.01, **P<0.05.

図 5

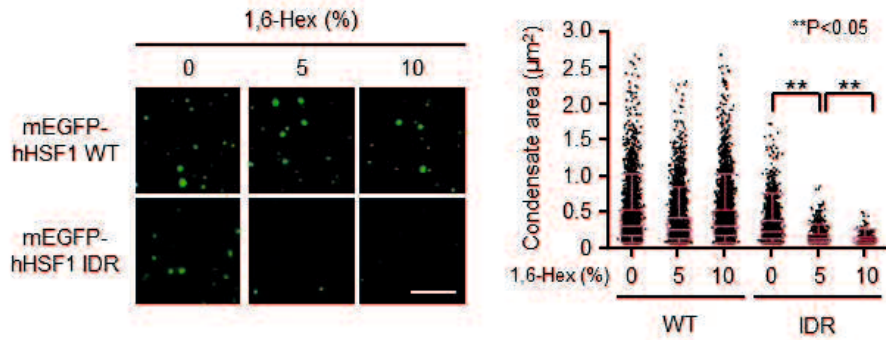


(A) ヒト HSF1(WT)の構造と、HSF1 の IDR 領域を示した。DBD は DNA 結合ドメイン、HR は疎水性の heptad 繰り返し配列、DHR は HR-C の下流と呼ばれるドメインである。(上)。PONDR により予測された、構造をとらない確率が高い領域を示した。横軸が HSF1 のアミノ酸の位置を、縦軸がそのアミノ酸がタンパク質内で特定の構造をとらない確率を示している(下)。

(B) 大腸菌から抽出し、精製したタンパク質の CBB 染色を行った。mEGFP-hHSF1 WT、mEGFP-hHSF1 IDR はそれぞれ 2.5 μM 、mEGFP は 10 μM を電気泳動した。

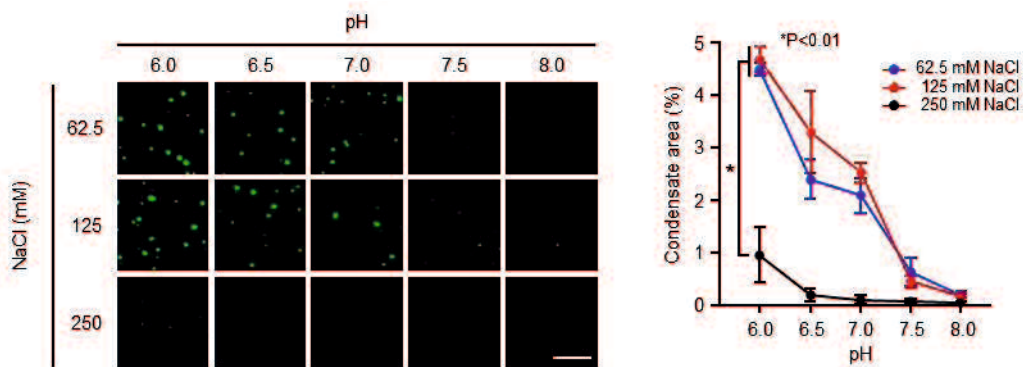
(C) 精製した mEGFP 融合タンパク質に終濃度 10 %の PEG8000 を含む Buffer を添加し、液滴の形成の有無を観察した(左)。mEGFP-hHSF1 WT と mEGFP-hHSF1 IDR が形成した濃縮物の大きさ(中央)、円形度(右)を定量した(n=3)。P**<0.05。

D



(D) 1,6-Hex を添加した状態で $0.625 \mu\text{M}$ のタンパク質濃度で液滴形成実験を行った(左)。形成された濃縮物の大きさを定量し、1,6-Hex の濃度による濃縮物の大きさの変化を比較した($n=3$)(右)。** $P<0.05$ 。

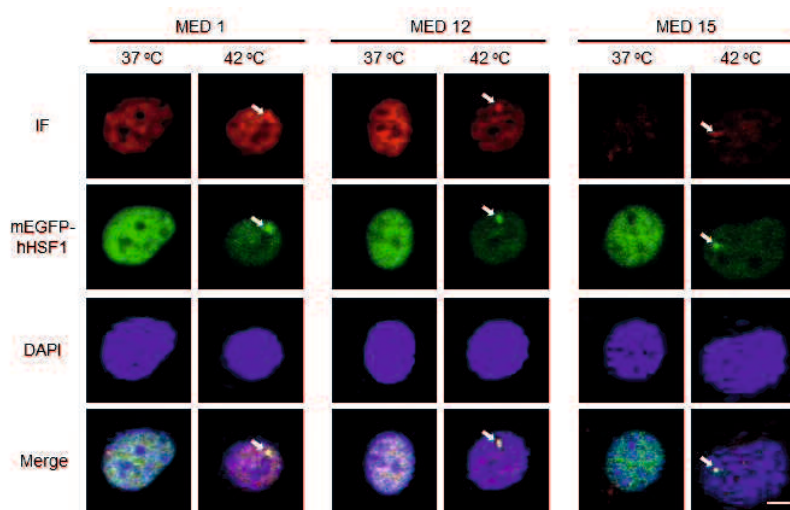
E



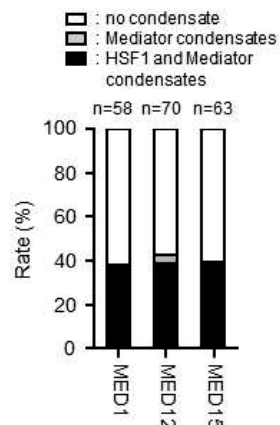
(E) $0.625 \mu\text{M}$ の mEGFP-hHSF1 IDR を用いて、環境中の pH と NaCl を変化した条件で液滴形成実験を行った(左)。形成された液滴の面積を定量し、撮影した視野全体のうちで液滴が占める割合を算出した($n=3$)(右)。

図 6

A



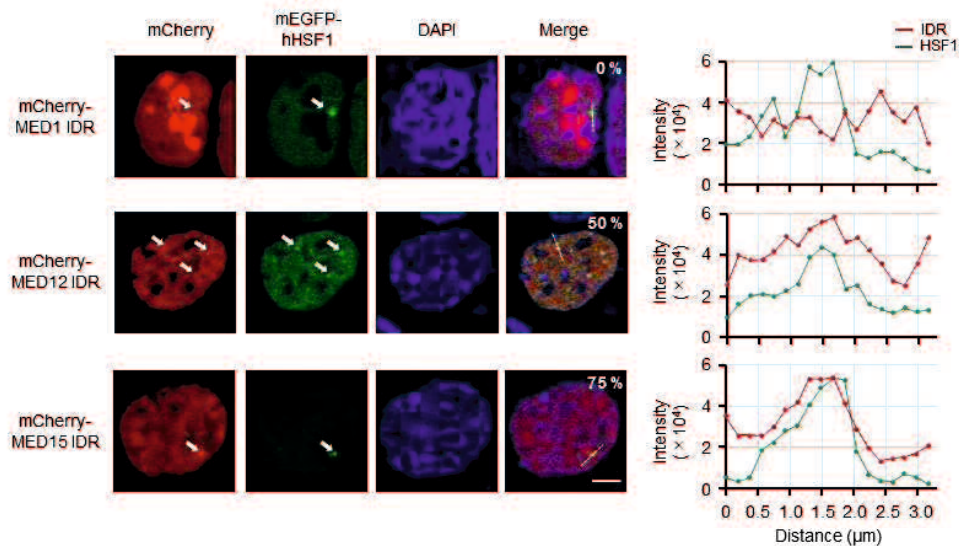
B



(A) mEGFP-hHSF1 を発現した細胞に熱ショックを与えたのち、MED1、MED12、MED15 に対する免疫染色を行った。IF 画像と mEGFP-hHSF1 画像の中で凝縮体を矢印で示した。

(B) 熱ショック下において形成された HSF1 の凝縮体と MED1、MED12、MED15 の共局在率を算出した。グラフ上部の数値はそれぞれの細胞数を示している。

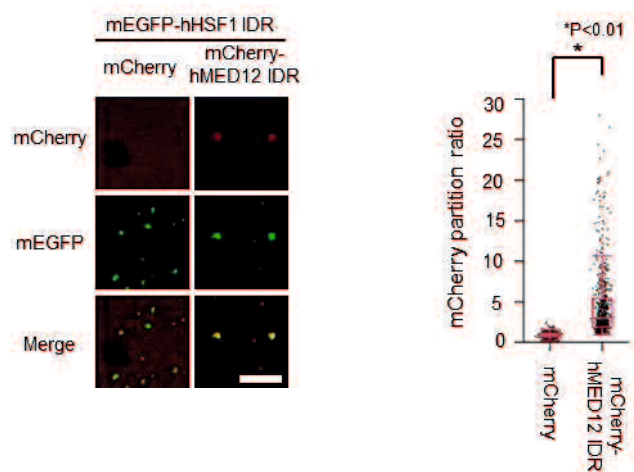
C



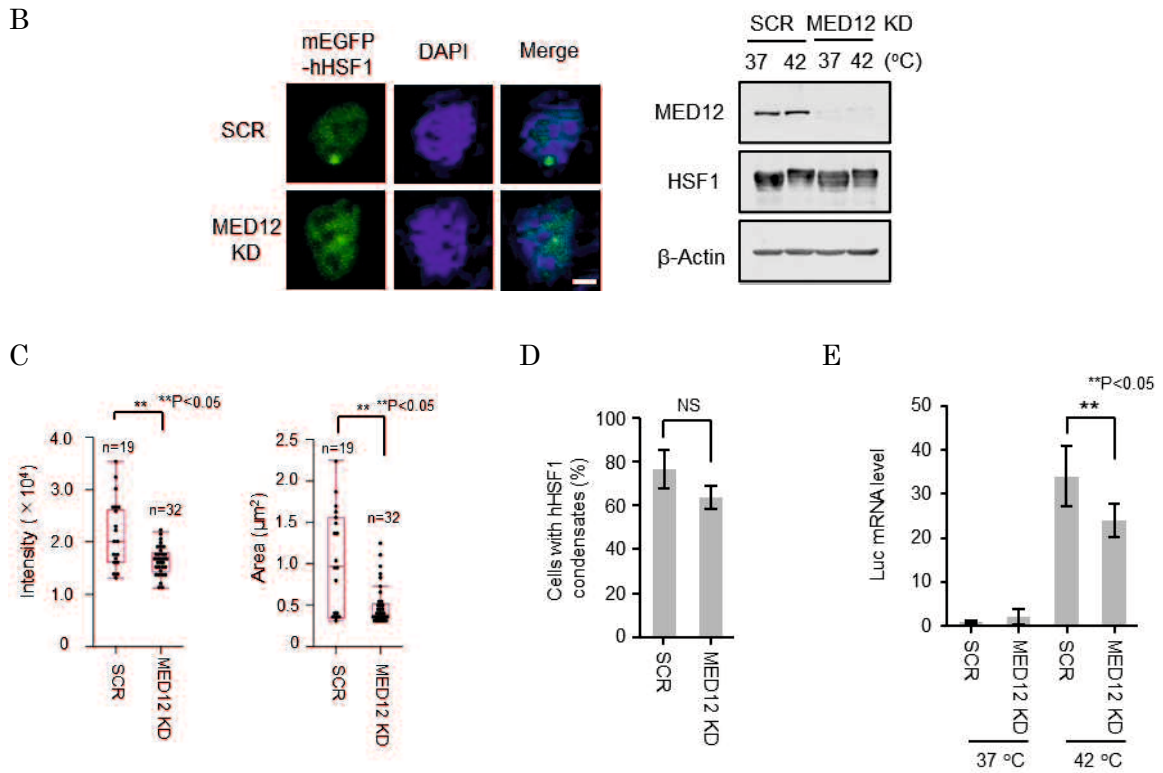
(C) mCherry が融合した hMED1、hMED12、hMED15 の IDR を mEGFP-hHSF1 とともに発現させ、熱ショック下で形成された HSF1 凝縮体上でそれらの IDR の共局在を確認した。Merge 画像の右上に HSF1 の凝縮体とそれぞれの IDR の共局在率を示した(左)。画像上に示した凝縮物内のうち、Merge 画像で白線を引いた位置の IDR(赤線)と mEGFP-hHSF1(青線)の蛍光強度を定量した(右)。

図 7

A



(A) 精製した mCherry 融合タンパク質に終濃度 10% の PEG8000 を含む Buffer を添加し、液滴の形成の有無を観察した(左)。mEGFP-hHSF1 IDR の液滴内部の mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR の蛍光強度と、液滴外の mCherry あるいは mCherry-hMED12 IDR の蛍光強度を比較し、液滴内への mCherry 融合タンパク質の濃縮度を定量した(右)。 $P^{**} < 0.05$.



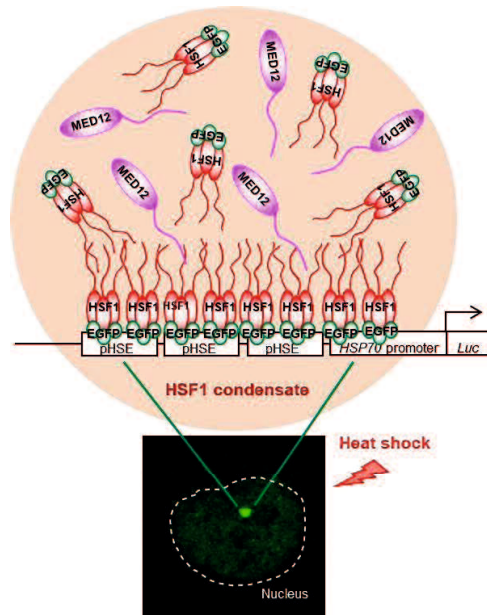
(B) 内在性 MED12 の発現抑制を行い、熱ショック後の細胞内に形成される HSF1 凝縮体を観察した(左)。WB により、MED12 の発現抑制と、対照群(SCR)と発現抑制細胞(MED12 KD)での mEGFP-hHSF1 の発現量に差がないことを確認した(右)。

(C) 蛍光強度が近い細胞(補足図 3 を参照)で形成された凝縮体の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度(左)と大きさ(右)をそれぞれの条件で比較した。箱ひげ図の上部の数値は定量した凝縮体の個数を示している。**P<0.05.

(D) (B)で定量を行った細胞での凝縮体を形成する割合を算出した(n=3)。n.s: 有意差なし。

(E) 内在性 MED12 の発現抑制を行った細胞と、対照群の細胞の Luc mRNA 量を比較した(n=4)。**P<0.05.

図 8



HSF1は *HSP72*由来のレポーター遺伝子を多数保有する細胞の核内で液-液相分離することが判明した。更に、この現象は HSF1 の IDR により引き起こされている可能性が示唆された。液-液相分離由来の HSF1 凝縮体が形成された際には、この凝縮体に複数のメディエーター構成タンパク質が集積することが示唆され、特に MED12 と MED15 の IDR が HSF1 への集積に寄与していることが示唆された。最後に、HSF1 凝縮体の形成は MED12 によって促進されていたことが本研究により示唆された。

補足図 1

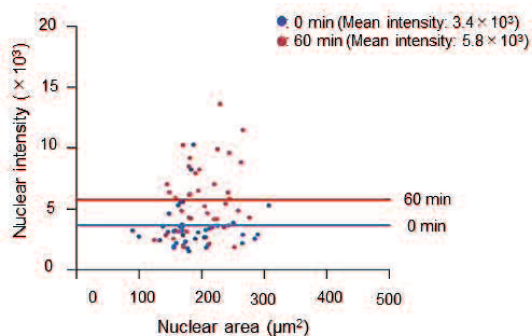
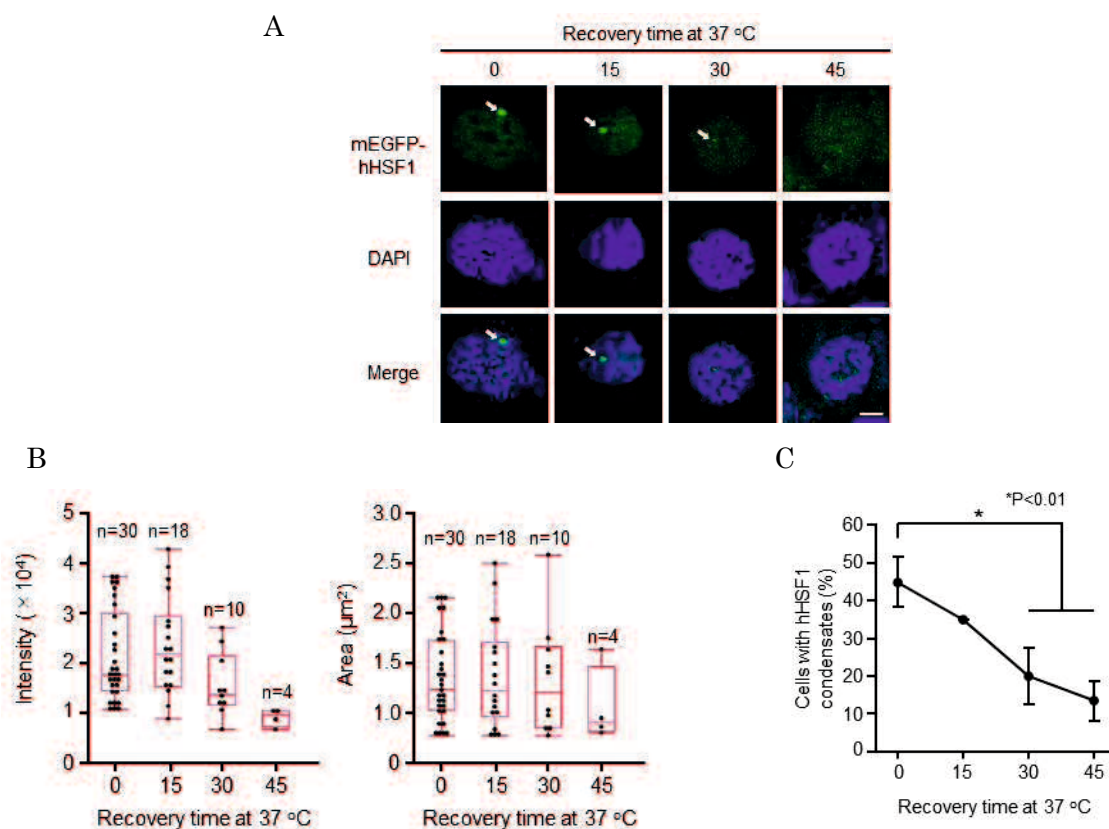


図 3E-G における、熱ショック前(37°C、青点)と熱ショック後(42°C、60min、赤点)の 40 細胞の核内の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度を定量した。青線、赤線はそれぞれの条件での蛍光強度の平均値を示している。

補足図 2



(A) 42°C の熱ショックを与えた後、37°C の環境下に置かれた細胞内の HSF1 凝縮体の観察を行った。

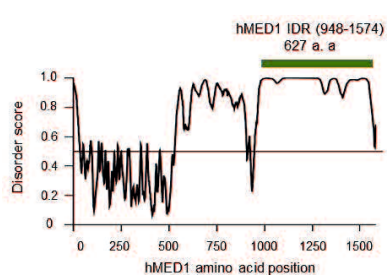
(B) (A) で撮影した凝縮体の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度(左)および凝縮体の大きさ(右)を定量した。箱ひげ図の上部に定量した凝縮体の個数を示した。

(C) それぞれの条件下における 40 細胞中の凝縮体形成細胞の割合を算出した(n=3)。

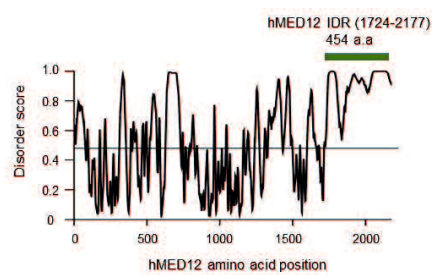
*P<0.01.

補足図 3

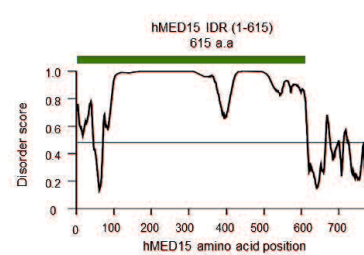
A



B



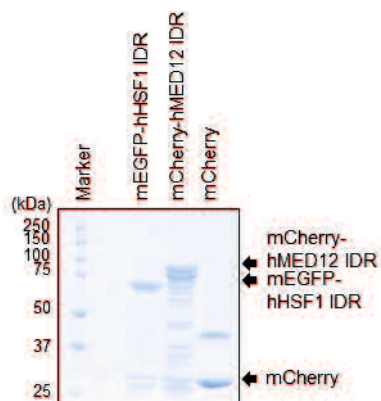
C



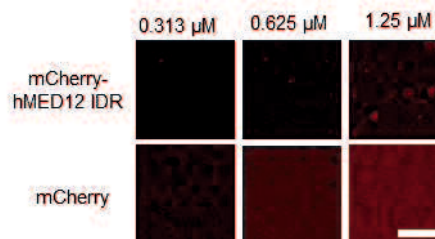
天然変性領域予測プログラム PONDR を用いて、MED1(A)、MED12(B)、MED15(C)のアミノ酸配列内で IDR である可能性が高い領域を予測した。図 4C ではここで推測された領域を IDR として使用した。

補足図 4

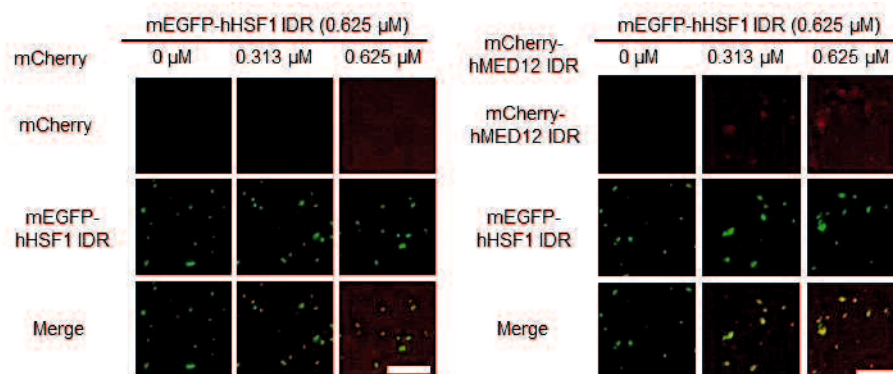
A



B



C



(A) 大腸菌から抽出し、精製したタンパク質の CBB 染色を行った。mEGFP-hHSF1 IDR、mCherry-hMED12 IDR はそれぞれ 2.5 μM 、mCherry は 10 μM を電気泳動した。

(B) 精製した mCherry 融合タンパク質に終濃度 10 % の PEG8000 を含む Buffer を添加し、液滴の形成の有無を観察した。

(C) 精製した mCherry 融合タンパク質と mEGFP-hHSF1 IDR を混和し、終濃度 10 % の PEG8000 を含む Buffer を添加し、形成された液滴を観察した。

補足図 5

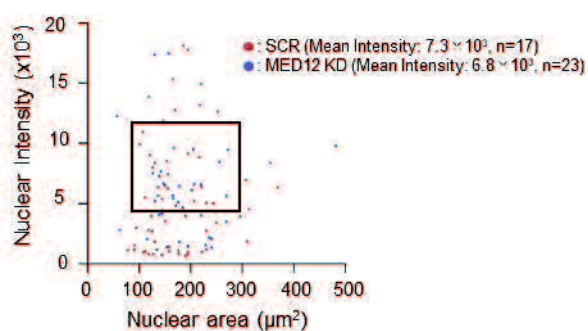


図 7A で撮影した細胞の核内の mEGFP-hHSF1 の蛍光強度を調べた。この中でも核の面積が 100-300 μm^2 、核内の蛍光強度が 4500-12000 の範囲に収まる細胞で図 5B、C の解析を行った。