

DNA トポイソメラーゼ II $\alpha$ の C 末端領域による  
細胞核内局在と酵素活性の制御機構の解明

2021

岡山理科大学大学院

理学研究科

材質理学専攻

安田 和史

## 目次

1. 序論	1
1-1. DNA の立体障害	
1-2. DNA topoisomerase II	
1-3. Topo II $\alpha$ と $\beta$	
1-4. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD と核内局在	
1-5. 本研究の目的	
2. 材料と方法	9
2-1. HEK293 細胞の継代培養	
2-2. タンパク質発現用プラスミド DNA の作製	
2-2-1. EGFP タグを C 末端に融合させた Topo II $\alpha$ の変異体	
2-2-1-a. pFLAG-top2a_1192-1289-EGFP と pFLAG-top2a_1290-1527-EGFP	
2-2-1-b. pFLAG-top2a_ $\Delta$ 1192-1289-EGFP	
2-2-2. N 末端側に FLAG タグを付加した Topo II $\alpha$ の欠失変異体	
2-2-3. EGFP タグを C 末端に融合させた Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体	
2-2-4. N 末端側に FLAG タグを付加した Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体	
2-3. トランスフェクション用プラスミド DNA の精製	
2-4. HEK293 細胞へのトランスフェクション	
2-5. 顕微鏡観察	
2-6. HEK293 細胞由来の total RNA の調製	
2-7. Topo II assay に使用する DNA の調製	
2-8. 組換えタンパク質の精製	
2-9. Relaxation assay	
2-10. Catenation assay	
2-11. DNA-binding assay	
2-12. Decatenation assay	

3. 結果	22
3-1. Topo II $\alpha$ の核小体局在に関わる領域の同定	
3-2. Topo II $\alpha$ の核小体局在における RNA の関与	
3-3. Topo II assay に使用する HEK293 細胞由来の total RNA	
3-4. Topo II assay に使用する pUC18 DNA	
3-5. Topo II assay に使用する Topo II $\alpha$ の精製	
3-6. 精製した Topo II $\alpha$ の弛緩反応に基づく酵素活性	
3-7. HEK293 細胞由来の total RNA の Topo II $\alpha$ の酵素活性への影響	
3-8. 合成ポリリボヌクレオチドの Topo II $\alpha$ の酵素活性への影響	
3-9. Topo II $\alpha$ の超らせん型 DNA への結合量に及ぼす RNA の影響	
3-10. Catenation 反応における CTD の役割	
3-11. Topo II $\alpha$ の CTD に対する直鎖型 DNA の結合能	
3-12. Decatenation 反応における CTD の役割	
3-13. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の細胞内局在	
3-14. Topo II assay に使用する Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の精製	
3-15. 精製した Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の弛緩反応に基づく酵素活性	
3-16. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の酵素活性に及ぼす RNA の影響	
3-17. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体による Catenation 反応	
3-18. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の Decatenation 反応における CTD の機能	
4. 討論	49
4-1. Topo II $\alpha$ の細胞核内局在	
4-2. Topo II $\alpha$ の酵素活性制御機構	
4-3. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の保存性	
4-4. Topo II $\alpha$ の制御機構の重要性	
5. 結論	56
6. 謝辞	57

7. 引用文献	58
8. 業績一覽	65
9. 補足資料	67

## 略号一覧

ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
BPB	bromophenol blue
CBB	coomassie brilliant blue
CTD	C-terminal domain
CTR	C-terminal region
CRD	C-terminal regulatory domain
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DIC	differential interference contrast
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
dNTPs	deoxynucleotide triphosphate
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FBS	fetal bovine serum
HEK293	human embryonic kidney cells 293
H1.0	Histone H1.0
kDNA	kinetoplast DNA
LSM	confocal laser scanning microscopy
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic Acid

NLS . . . . . nuclear localization signal  
NP-40 . . . . . Nonidet P-40  
PBS . . . . . phosphate-buffered saline  
PCR . . . . . polymerase chain reaction  
PEG . . . . . polyethylene glycol 8000  
PEI . . . . . Polyethyleneimine  
PIC . . . . . protease inhibitor cocktail  
SDS . . . . . sodium dodecyl sulfate  
SDS-PAGE . . . . . sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis  
TBE . . . . . tris-borate-EDTA buffer  
Tris . . . . . tris (hydroxymethyl) aminomethane  
Tx-100 . . . . . Triton X-100  
WT . . . . . wild type

## 1. 序論

### 1-1. DNA の立体障害

真核生物の DNA はヒストンタンパク質を介してヌクレオソーム構造をとり、さらに折り畳まれたクロマチン構造を形成して細胞核内に収納されている。細胞核の中を大雑把に分けると、クロマチン領域とクロマチン間領域に分けることができる。クロマチン間領域は核マトリクスともよばれ、多くのタンパク質や RNA で構成されており、転写や複製などの反応の場になっていると考えられている (Fig. 1) (Tsutsui et al., 2005)。

転写反応では、RNA ポリメラーゼが 2 本鎖 DNA の片鎖から RNA を合成する。この反応過程で RNA ポリメラーゼは 2 本鎖 DNA を開裂させるため、進行方向に正の超らせん構造が生じる (Fig. 2A)。反対に、進行する RNA ポリメラーゼの後方では、2 本鎖 DNA が緩むため、負の超らせん構造が生じる。同様に、DNA 複製時には DNA ポリメラーゼや DNA ヘリカーゼを含むレプリソームの作用によって 2 本鎖 DNA が開裂し、進行方向に正の超らせん構造が生じる (Fig. 2B)。このように、転写や複製に伴って超らせん構造が生じるが、過度な蓄積は反応の進行を妨げる立体障害になり得る。

細胞が分裂する時には、複製されたゲノム DNA が凝縮し、娘細胞へと均等に分配される (Fig. 2C)。しかしながら、複製された後の DNA には絡まりが生じており、この絡まりは細胞分裂の完了を妨げるだけでなく、娘細胞への不均等なゲノム DNA 分配による染色体数異常細胞や染色体構造異常細胞 (欠失や重複) を引き起こす原因にもなる。

### 1-2. DNA topoisomerase II

DNA の超らせん構造や絡まりなどのトポロジカルな立体構造を解消する酵素として、DNA topoisomerase (Topo) が原核生物から真核生物にいたるまで存在している (Gellert et al., 1976 ; Baldi et al., 1980)。Topo には反応様式が異なる I 型 (Topo I) と II 型 (Topo II) が存在する。Topo I が二本鎖 DNA の片方の鎖を切断するのに対し、Topo II は二本鎖 DNA の両方の鎖を切断する。

Topo II はホモ二量体を形成して働く酵素であり、酵素の反応は次のように進行する

(Fig. 3)。まず、G-セグメント (Gate-segment) とよばれる二本鎖 DNA に DNA ゲートを通じて結合する。N 末端の ATPase ドメインに ATP が結合すると同時に、T-セグメント (Transfer-segment) とよばれる別の二本鎖 DNA を取り込み、G-セグメントを切断する。切断された G-セグメントの間に T-セグメントを通過させた後、G-セグメントを再結合し、Topo II が解離する。この一連の反応によって、DNA のトポロジカルな立体障害が解消される。

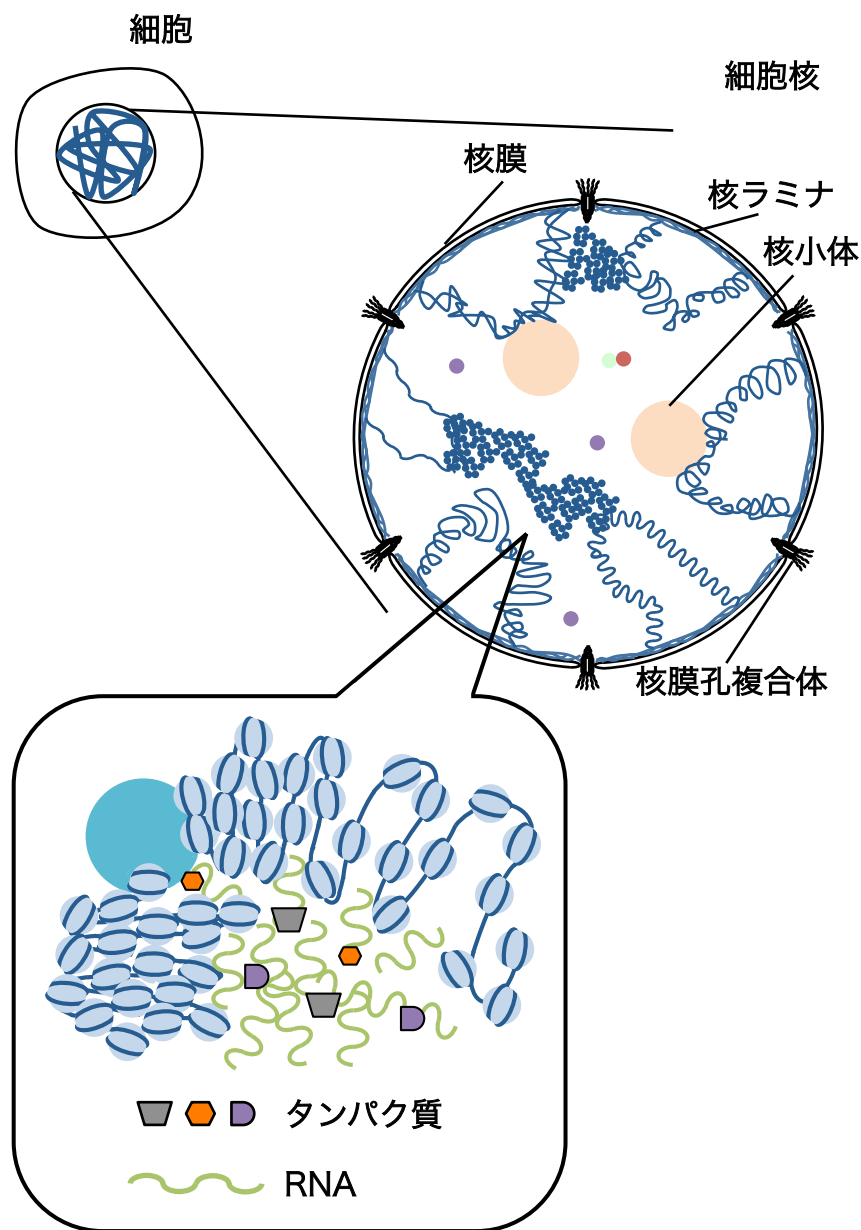


Figure 1. 真核細胞の核内構造



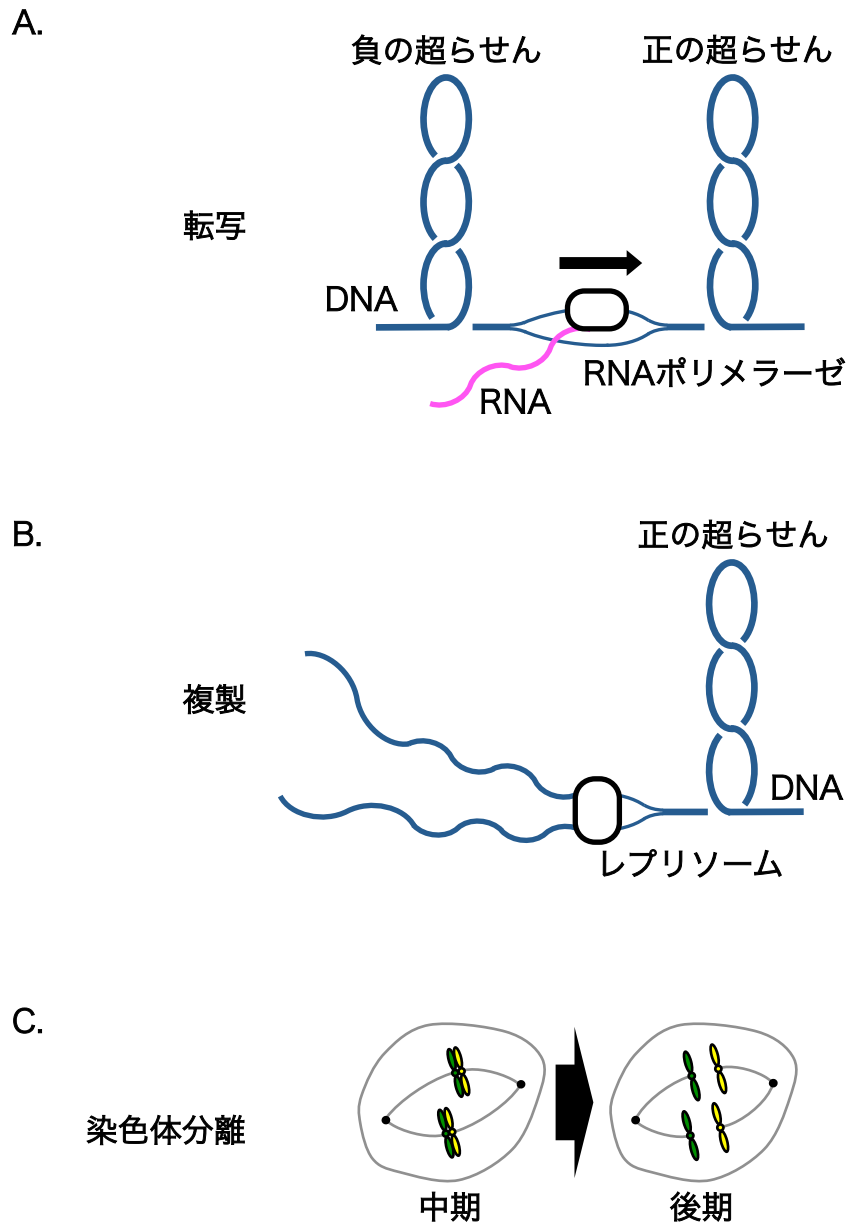


Figure 2. DNAに生じる立体障害

A. 転写反応時には、正の超らせんと負の超らせんが出現する。

B. 複製時には正の超らせんが出現する。

C. 細胞分裂時の染色体分離ではDNAの絡まりをほどく必要がある。

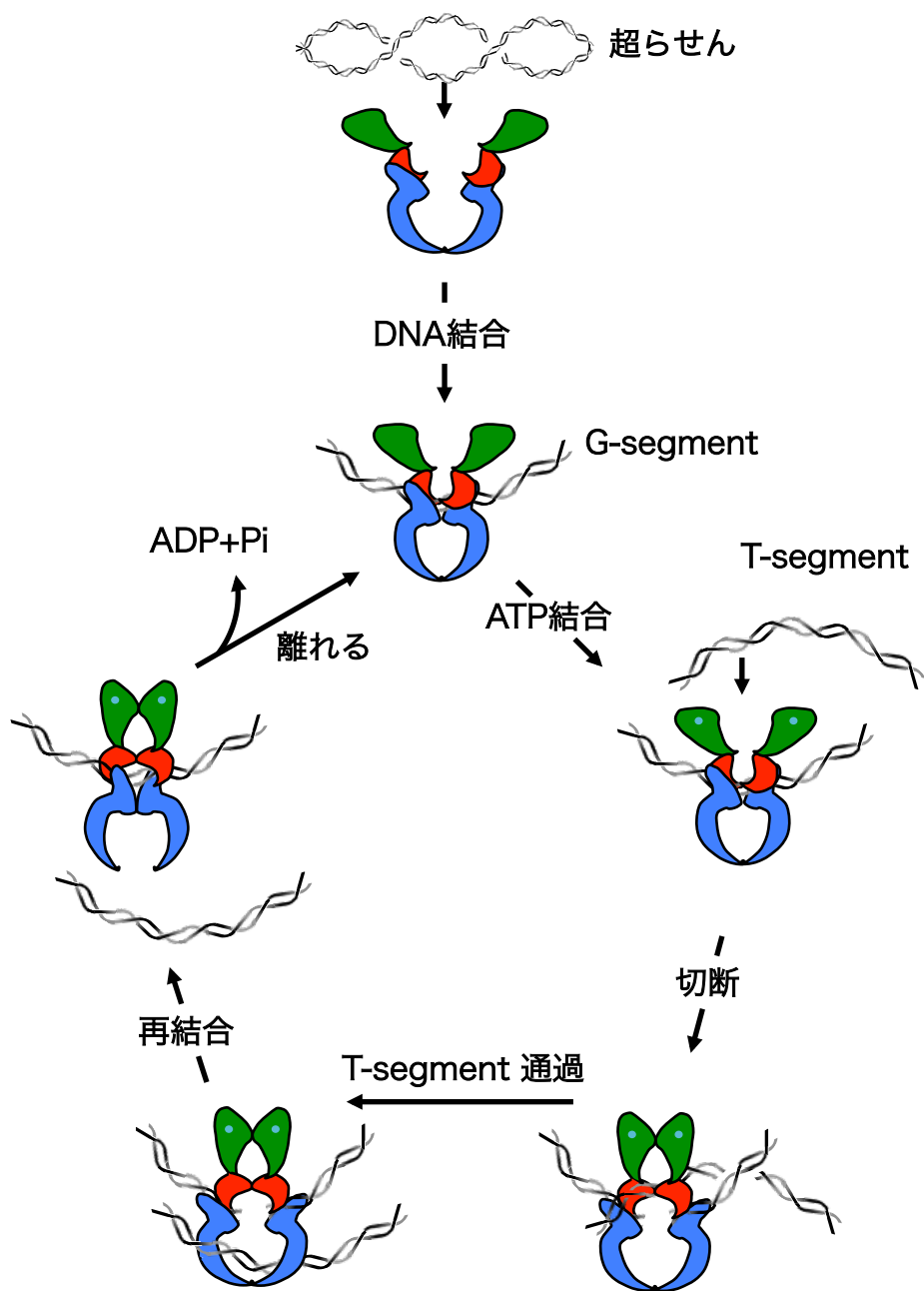


Figure 3. Topo IIの反応様式

Seol et al. (2013) を参考にして作図した。緑はNゲート、赤はDNAゲート、青はCゲート、水色はATPを示している。NゲートはATPase domain、DNAゲートとCゲートはDNA Binding/cleavage core domain内に存在する。

### 1-3. Topo II $\alpha$ と $\beta$

脊椎動物の Topo II には進化の過程で遺伝子重複によって生じたと考えられている  $\alpha$  と  $\beta$  の2つの酵素がアイソザイムとして存在している (Sng et al., 1999)。 $\alpha$  と  $\beta$  のドメイン構造は共通しており、N 末端側から ATPase domain、DNA binding/cleavage core domain、C-terminal domain (CTD) で構成されている (Fig. 4)。

$\alpha$  は細胞分裂時の染色体分離過程で生じる染色体の絡まりを解消する酵素である (Earnshaw et al., 1985 ; Carpenter & Porter, 2004 ; Lane et al., 2013)。発現量は細胞周期の S 期後半から増加し、分裂期の前期でピークに達し、分裂期が終了すると減少することが知られている (Woessner et al., 1991 ; Kimura et al., 1994 ; Lee & Berger, 2019)。したがって、脊椎動物における DNA の複製や染色体の分離では、 $\alpha$  が重要な役割を担っていると考えられている。ICRF-187 は Topo II 阻害剤の一つであり、ATPase 活性を阻害することで、Topo II の DNA からの解離を妨げる。したがって、ICRF-187 で処理した細胞では、 $\alpha$  はそのほとんどが核質に局在するようになる。ICRF-187 を利用して、細胞周期の各過程における  $\alpha$  の細胞内局在を観察した研究から、G<sub>1</sub> 期から M 期にかけて、核質に局在する  $\alpha$  の量が増加することが示されている (Agostinho et al., 2004)。このことから、間期の細胞核内では、活性化した  $\alpha$  は主に核質に存在すると考えられる。また Agostinho らは、RNA とタンパク質で構成される核内ドメインである核小体と核スペckルに、活性化されていない  $\alpha$  が局在することを示している (Agostinho et al., 2004)。このことは、活性化した  $\alpha$  と活性の抑制された  $\alpha$  の棲み分けが、間期細胞核の中で起きていることを示唆している。

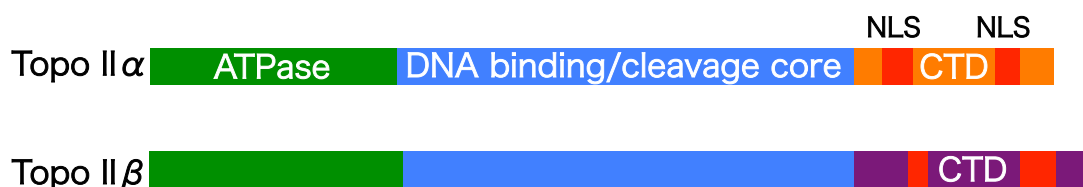


Figure 4. Rat の Topo II $\alpha$  と  $\beta$  のドメイン構造  
NLS : nuclear localization signal  
CTD : C-terminal domain

$\beta$ は、 $\alpha$ とは異なり、細胞分裂には必要ではないが、神経細胞の分化や脳の発達に必要である (Yang et al., 2000 ; Lyu & Wang, 2003)。発現量は、分裂して増殖中の細胞では細胞周期を通して変動は見られないが (Woessner et al., 1991 ; Kimura et al., 1994) 、神経細胞の分化後期段階で発現量が増加し、神経細胞への分化が終了すると低下することが知られている (Tsutsui et al., 2001 ; 筒井 公子 2004 ; Lyu et al., 2006)。 $\beta$ は、神経細胞の終末分化過程において、一群の遺伝子の発現に関わっている (Tiwari et al., 2012)。

#### 1-4. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD と核内局在

緑色蛍光タンパク質タグを使った live imaging 解析から、 $\alpha$  と  $\beta$  はともに間期細胞内の核質と核小体に局在しており、さらに核質と核小体の間を絶えずダイナミックにシャトリングしていることが明らかにされた (Fig. 5) (Christensen et al., 2002)。このことから、 $\alpha$  と  $\beta$  の間期細胞核内動態は少なからず共通していることが考えられる。

ヒトの  $\alpha$  と  $\beta$  の C-terminal region (CTR、CTD と同義) を交換した変異体の細胞核内局在について報告がある (Linka et al., 2007)。間期の細胞内では、それぞれの

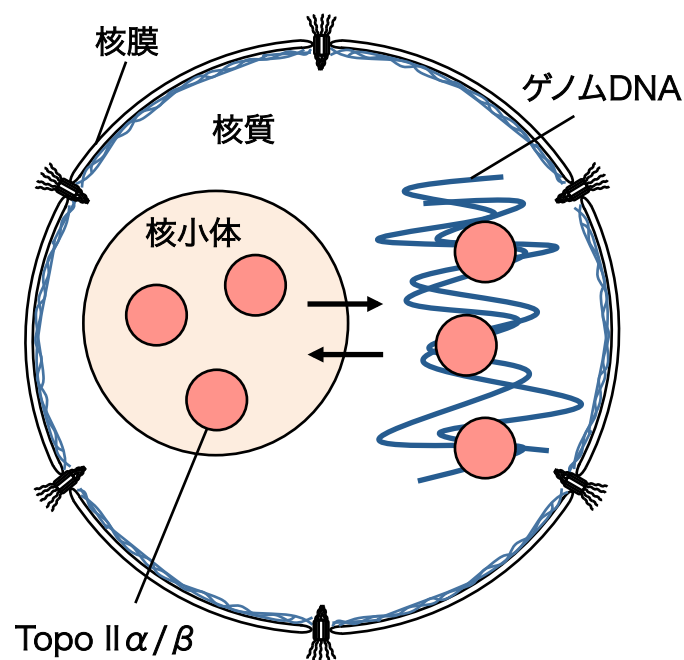


Figure 5. Topo II $\alpha$  と  $\beta$  の間期細胞の核内動態

CTD を交換しても局在に大きな変化は認められず、核質と核小体への局在が観察された。また、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTR のみを発現させた場合でも、核質と核小体への局在が観察された。一方、分裂期の細胞では  $\alpha$  の CTR を持つ交換変異体、あるいは  $\alpha$  の CTR のみが分裂期染色体上に局在し、 $\beta$  の CTR を持つ交換変異体や、 $\beta$  の CTR のみでは局在しなかった。このことは、細胞内における  $\alpha$  と  $\beta$  の機能の違いに、それぞれの CTR を介した局在性の違いが反映されていることを示唆している。

試験管内での Topo II の酵素反応は、CTD を欠いても進行する (Meczes et al., 2008 ; Adachi et al., 1997)。しかしながら、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD には nuclear localization signal (NLS) が存在するため、核内での酵素反応には CTD が必要不可欠である (Fig. 4) (Sengupta et al., 2003)。また、 $\beta$  には C-terminal regulatory domain (CRD) とよばれる領域が CTD に存在することが報告されており、RNA との相互作用による核小体への局在と酵素活性の抑制に関わっていることが示されている (Onoda et al., 2014)。したがって、Topo II の CTD は、細胞核内の局在のみならず、酵素活性の調節にも関わる重要な領域であることが考えられる。

#### 1-5. 本研究の目的

$\alpha$  は染色体分離に必須な酵素であるため、酵素活性が低下すると有糸分裂が正常に行われぬ。反対に過剰な酵素活性は、必要以上の染色体のほぐれや、転座の原因となる (Fig. 6) (Deweese & Osheroff, 2009)。したがって、 $\alpha$  の酵素活性は細胞内で厳密に制御されていると考えられる。

$\alpha$  は、間期細胞核内の核質と核小体の間をシャトリングしており、活性のある酵素は核質に、活性の抑制された酵素の一部は核小体に局在することが示唆されていることから、 $\alpha$  の間期細胞核内における酵素活性と局在の間に関係があることが考えられた。また、分裂期染色体への局在や、間期細胞核の核小体への局在には  $\alpha$  の CTD が関わっていることから、酵素活性の制御に CTD が重要な役割を果たしていることが考えられる。

そこで本研究では、CTD に焦点をあて、 $\alpha$  の間期細胞内の核内局在と酵素活性制御のメカニズムを解明することを目的として解析を行った。

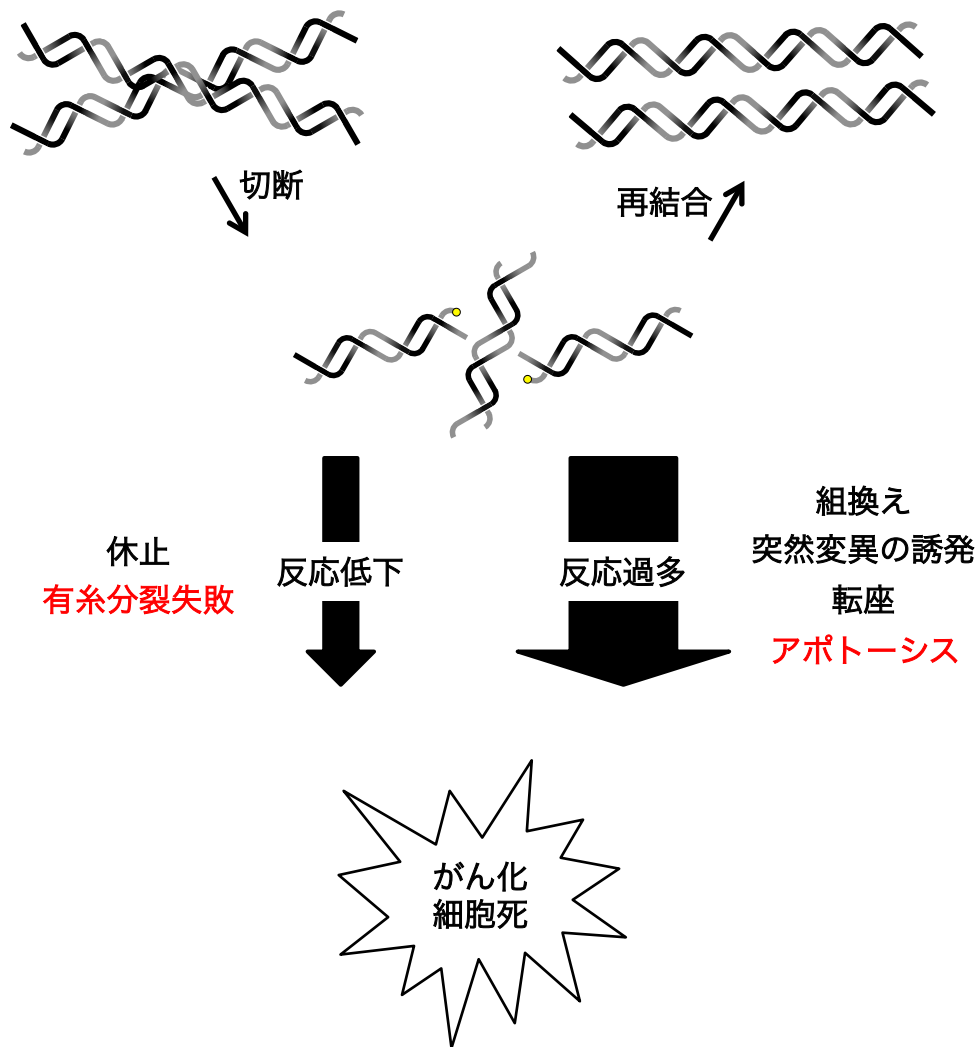


Figure 6. Topo II $\alpha$ の反応低下や反応過多で起こる細胞への悪影響

## 2. 材料と方法

### 2-1. HEK293 細胞の継代培養

HEK293 細胞を 10 mL の培地 [DMEM (日水製薬株式会社)、10% FBS、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kanamycin (SIGMA-Aldrich)] 中で 37°C、5%  $\text{CO}_2$  条件下で 100 mm dish (IWAKI) 内の細胞密度が 80~90%になるまで培養した。培養後、10 mL の PBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 7.4) で細胞表面を洗浄した。1 mL の 0.02% EDTA を加えて 1 分間ほど静置した後、10 mL の培地を加え、細胞を懸濁した。細胞懸濁液を 160 $\times$  g で 5 分間遠心し、上清を除去した。5 mL の培地で細胞を再懸濁し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。10 mL の培地が入った 100 mm dish に  $1.0 \times 10^6$  cells 分の細胞を加え、継代培養を行った。

### 2-2. タンパク質発現用プラスミド DNA の作製

#### 2-2-1. EGFP タグを C 末端に融合させた Topo II $\alpha$ の変異体

KOD -plus- Ver. 2 (TOYOBO) とプライマー (Table S1) を用いて Topo II $\alpha$  の特定の領域を増幅した。鋳型には、pFLAG-CMV-m (Supplementary Fig. S1A) に Topo II $\alpha$  の WT がクローニングされた pFLAG-top2a (Supplementary Fig. S2) を用いた。ベクターには、pFLAG-cm2-EGFP (Supplementary Fig. S1B) と pFLAG-top2a\_1-1191-EGFP (Supplementary Fig. S3) を用いた。

#### 2-2-1-a. pFLAG-top2a\_1192-1289-EGFP と pFLAG-top2a\_1290-1527-EGFP

1192-1289 領域と 1290-1527 領域を PCR でそれぞれ増幅した。PCR の反応液 (1 $\times$  Buffer for KOD -Plus- Ver. 2、0.2 mM dNTPs、1.5 mM  $\text{MgSO}_4$ 、0.3  $\mu\text{M}$  Sense primer、0.3  $\mu\text{M}$  Antisense primer、20 pg/ $\mu\text{L}$  鋳型 DNA、0.02 U/ $\mu\text{L}$  KOD -Plus-) を次のプログラムで反応させた。1192-1289 領域は、94°C 2 分 $\rightarrow$  [(98°C 10 秒 $\rightarrow$ 68°C 30 秒)  $\times$ 35] で、1290-1527 領域は、94°C 2 分 $\rightarrow$  [(98°C 10 秒 $\rightarrow$ 68°C 60 秒)  $\times$ 35] で行った。1192-1289 領域には、a1192F と a1289R-ExT を、1290-1527 領域には、a1290F と a1527R-ExT をそれぞれ用いた (Table S1)。増幅した DNA 断片を *Sma*I

(New England Biolabs) で切断した。pFLAG-cm2-EGFP を *Sma*I で切断し、rApid Alkaline phosphatase (Roche) で脱リン酸化した後、*Sma*I で切断した 1192-1289 と 1290-1527 の DNA 断片それぞれと混合し、Ligation を行った。Ligation には Ligation Mix (TaKaRa) を用いた。Ligation 反応溶液で大腸菌 JM109 株 (NIPPON GENE) の形質転換を行った。挿入方向を確認するために、GoTaq® Green Master Mix (Promega) とプライマー (Table S2) を用いたコロニーダイレクト PCR を行った。PCR の反応溶液 (1× GoTaq® Green Master Mix、1 μM Sense primer、1 μM Antisense primer) に、シングルコロニーをチップで懸濁した後、次のプログラムで反応した。1192-1289 は、95°C 2 分→【(95°C 30 秒→55°C 60 秒→72°C 45 秒)×30】→72°C 7 分で、1290-1527 は、95°C 2 分→【(95°C 30 秒→55°C 60 秒→72°C 60 秒)×30】→72°C 7 分でそれぞれ反応した。1192-1289 の選別には、a1192F と EGFP-R を (Supplementary Fig. S4A)、1290-1527 の選別には、a1355F と EGFP-R をそれぞれ用いた (Supplementary Fig. S4B)。アガロースゲル電気泳動で DNA 断片の増幅を確認し、コロニーを選別した。選別したコロニーから Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) でプラスミド DNA を精製した後、*Bam*HI と *Eco*RI (ともに New England Biolabs) で切断した (Supplementary Fig. S4)。アガロースゲル電気泳動で DNA 断片が複数挿入されていないことを確認した。塩基配列は、BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems) を用いて解析した。得られたデータは、4Peaks (Nucleobytes) と Genetyx (GENETYX) で確認した。

#### 2-2-1-b. pFLAG-top2a\_Δ1192-1289-EGFP

pFLAG-top2a\_1290-1527-EGFP を *Sma*I で切断し、アガロースゲル電気泳動を行った。DNA の染色は、25 mL の 1× TBE (50 mM Tris、48.5 mM Boric Acid、2 mM EDTA・2Na) に対して 1 μL の SYBR Green I (Lonza) を加えたアガロースゲルを用いて先染めした。泳動後にブラックライトで DNA を可視化し、1290-1527 の DNA 断片をゲルごと切り出した。切り出したゲルから Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて DNA を精製した。pFLAG-top2a\_1-1191-EGFP を *Sma*I



で切断し、脱リン酸化処理した後、精製した 1290-1527 の DNA 断片と混合し、Ligation を行った。Ligation 反応溶液で大腸菌を形質転換した。挿入方向を確認するために GoTaq® Green Master Mix とプライマー (Table S2) を用いてコロニーダイレクト PCR を行った。PCR は、95°C 2 分→【(95°C 30 秒→55°C 60 秒→72°C 60 秒) ×30】→72°C 7 分のプログラムで行った。プライマーは、a1355F と EGFP-R を用いた (Supplementary Fig. S5)。プラスミド DNA を精製した後、*Bgl*II (TOYOBO) で切断し (Supplementary Fig. S5)、DNA 断片が複数挿入されていないことを確認した。塩基配列は 2-2-1 項と同じように解析した。

#### 2-2-2. N 末端側に FLAG タグを付加した Topo II $\alpha$ の欠失変異体

鋳型に pFLAG-top2a (Supplementary Fig. S2) と、ベクターに pFLAG-top2a\_1-1191 (Supplementary Fig. S6) を用いたことを除いて、2-2-1 項と同じように作製した。

1192-1289 領域と 1290-1527 領域を PCR で増幅した。PCR は、次のプログラムで行った。1192-1289 領域は、94°C 2 分→【(98°C 10 秒→68°C 30 秒) ×35】で、1290-1527 領域は、94°C 2 分→【(98°C 10 秒→64°C 60 秒) ×35】で反応した。1192-1289 領域には a1192F と a1289R-exT を、1290-1527 領域には a1290F と a1527R-exT をそれぞれ用いた (Table S1)。増幅した DNA 断片を *Sma*I で切断した。pFLAG-top2a\_1-1191 を *Sma*I で切断し、脱リン酸化処理した後、*Sma*I で切断した 1192-1289 と 1290-1527 の DNA 断片それぞれと混合し、Ligation を行った。Ligation 反応溶液で大腸菌を形質転換した。挿入方向を確認するために GoTaq® Green Master Mix とプライマー (Table S2) を用いたコロニーダイレクト PCR を行った。PCR は次のプログラムで行った。1192-1289 は、95°C 2 分→【(95°C 30 秒→55°C 60 秒→72°C 35 秒) ×30】→72°C 7 分で、1290-1527 は、95°C 2 分→【(95°C 30 秒→55°C 60 秒→72°C 60 秒) ×30】→72°C 7 分でそれぞれ行った。1192-1289 の選別には a1192F と C-CMV-24 を、1290-1527 の選別には a1355F と C-CMV-24 のプライマーをそれぞれ用いた。プラスミド DNA を精製した後、*Bgl*II で切断し、DNA 断片が複数挿入されていないことを確認した。塩基配列は 2-2-1 項と同じように解析し

た。

### 2-2-3. EGFP タグを C 末端に融合させた Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体

鑄型に pFLAG-top2a (Supplementary Fig. S2) と pFLAG-top2b (Supplementary Fig. S7)、ベクターに pFLAG-top2a\_1-1191-EGFP (Supplementary Fig. S3) と pFLAG-top2b\_1-1199-EGFP (Supplementary Fig. S8) を用いたことを除いて、2-2-1 項と同じように作製した。

$\alpha$  の 1192-1527 領域、および  $\beta$  の 1201-1614 領域と 1251-1614 領域を PCR で増幅した。PCR は次のプログラムで行った。 $\alpha$  の 1192-1527 領域は 94°C 2 分 → [(98°C 10 秒 → 65.6°C 30 秒 → 68°C 70 秒) × 35]、 $\beta$  の 1201-1614 領域は 94°C 2 分 → [(98°C 10 秒 → 52.5°C 30 秒 → 68°C 85 秒) × 35]、 $\beta$  の 1251-1614 領域は 94°C 2 分 → [(98°C 10 秒 → 53.2°C 30 秒 → 68°C 70 秒) × 35] で行った。 $\alpha$  の 1192-1527 領域には a1192F と a1527R-ExT を、 $\beta$  の 1201-1614 領域には b1201F と b1614R-ExT を、 $\beta$  の 1251-1614 領域には b1251F と b1614R-ExT のプライマーをそれぞれ用いた。増幅したそれぞれの DNA 断片を *Sma*I で切断した。 $\alpha$  の 1290-1527 の DNA 断片は、pFLAG-top2a\_1290-1527-EGFP を *Sma*I で切断した後、ゲル精製を行って調製した。pFLAG-top2a\_1-1191-EGFP と pFLAG-top2b\_1-1199-EGFP を *Sma*I で切断し、脱リン酸化処理した後、*Sma*I で切断した  $\beta$  の 1201-1614 と 1251-1614、 $\alpha$  の 1192-1527 と 1290-1527 の DNA 断片それぞれと混合し、Ligation を行った。Ligation 反応溶液で大腸菌を形質転換した。挿入方向を確認するために GoTaq® Green Master Mix とプライマー (Table S2) を用いてコロニーダイレクト PCR を行った。PCR は次のプログラムで行った。 $\beta$  の 1201-1614 は 95°C 2 分 → [(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 37 秒) × 25] → 72°C 7 分で、1251-1614 は 95°C 2 分 → [(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 40 秒) × 25] → 72°C 7 分で行った。 $\alpha$  の 1192-1527 は 95°C 2 分 → [(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 46 秒) × 25] → 72°C 7 分で、1290-1527 は 95°C 2 分 → [(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 46 秒) × 25] → 72°C 7 分で行った。 $\beta$  の 1201-1614 には b1450F と EGFP-R を、1251-1614 には b1450F と EGFP-R のプライマーをそれぞれ用いた。 $\alpha$  の 1192-1527 には a1355F

と EGFP-R を、1290-1527 には a1355F と EGFP-R のプライマーをそれぞれ用いた。DNA 断片が複数挿入されていないか調べるために、プラスミド DNA を精製した後、制限酵素で切断した。 $\beta$  の 1201-1614 と 1251-1614 には *Bgl*II を用いた。 $\alpha$  の 1192-1527 と 1290-1527 には *Eco*RI を用いた。塩基配列は 2-2-1 項と同じように解析した。

#### 2-2-4. N 末端側に FLAG タグを付加した Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体

鋳型に pFLAG-top2a ( Supplementary Fig. S2 ) と pFLAG-top2b ( Supplementary Fig. S7 ) を、ベクターに pFLAG-top2a\_1-1191 ( Supplementary Fig. S6 ) と pFLAG-top2b\_1-1199 ( Supplementary Fig. S9 ) を用いたことを除いて、2-2-3 項と同じように作製した。

$\alpha$  の 1192-1527 領域と  $\beta$  の 1201-1614 領域を PCR で増幅した。PCR は、次のプログラムで行った。 $\alpha$  の 1192-1527 領域は 94°C 2 分 → 【(98°C 10 秒 → 60.6°C 30 秒 → 68°C 70 秒) × 35】で、 $\beta$  の 1201-1614 領域は 94°C 2 分 → 【(98°C 10 秒 → 52.5°C 30 秒 → 68°C 85 秒) × 35】で行った。 $\alpha$  の 1192-1527 領域には a1192F と a1527R-exT を、 $\beta$  の 1201-1614 領域には b1201F と b1614R-exT のプライマーをそれぞれ用いた。増幅した  $\alpha$  の 1192-1527 と  $\beta$  の 1201-1614 の DNA 断片を *Sma*I で切断した。 $\alpha$  の 1290-1257 と  $\beta$  の 1251-1614 の DNA 断片は、それぞれ pFLAG-top2a\_Δ1192-1289 と pFLAG-top2b\_Δ1201-1250 を *Sma*I で切断した後、ゲル精製を行って得た。pFLAG-top2a\_1-1191 と pFLAG-top2b\_1-1199 を *Sma*I で切断し、脱リン酸化処理した後、*Sma*I で切断した  $\beta$  の 1201-1614 と 1251-1614、 $\alpha$  の 1192-1527 と 1290-1527、それぞれと混合し、Ligation を行った。Ligation 反応溶液で大腸菌を形質転換した。挿入方向を確認するために GoTaq® Green Master Mix とプライマー ( Table S2 ) を用いてコロニーダイレクト PCR を行った。PCR は次のプログラムで行った。 $\beta$  の 1201-1614 は 95°C 2 分 → 【(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 40 秒) × 25】 → 72°C 7 分、1251-1614 は 95°C 2 分 → 【(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 40 秒) × 25】 → 72°C 7 分で行った。 $\alpha$  の 1192-1527 は 95°C 2 分 → 【(95°C 30 秒 → 55°C 60 秒 → 72°C 43 秒) × 25】 → 72°C 7 分で、1290-1527 は 95°C 2 分 →

【(95°C 30 秒→55°C 60 秒→72°C 42 秒) ×25】 →72°C 7 分で行った。βの 1201-1614 には b1450F と C-CMV-24 を、1251-1614 には b1450F と C-CMV-24 のプライマーをそれぞれ用いた。αの 1192-1527 には a1355F と C-CMV-24 を、1290-1527 には a1355F と C-CMV-24 のプライマーをそれぞれ用いた。挿入された DNA 断片の数を調べるために、プラスミド DNA を精製した後、制限酵素で切断した。βの 1201-1614 と 1251-1614 には *Bgl*Ⅰ を、αの 1192-1527 と 1290-1527 には *Eco*Ⅰ を用いた。塩基配列は 2-2-1 項と同じように解析した。

### 2-3. トランスフェクション用プラスミド DNA の精製

100 µg/mL の Ampicillin (SIGMA-Aldrich) を含む 25 mL の LB 液体培地で一昼夜培養した後、PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) を用いて精製した。

### 2-4. HEK293 細胞へのトランスフェクション

蛍光観察には、35 mm Glass Bottom dish (MATSUNAMI) に培養した細胞を用いた。細胞は、2 mL の培地に HEK293 細胞を  $2.0 \times 10^5$  cells 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> で約 24 時間培養した。無血清培地の OPTi-MEM® (gibco) を 97 µL 入れたチューブに FuGENE6 (Promega) を 3 µL 加え、混合した。1.0 µg 程度のプラスミド DNA を加えて混合した後、室温で 15 分間静置した。混合液を細胞が剥がれないように培地に滴下し、ゆっくりと混和した。37°C、5% CO<sub>2</sub> で約 24 時間培養した後、顕微鏡観察を行った。

タンパク質精製には、6 well plate (BMBio) に培養した細胞を用いた。細胞は、2 mL の培地に HEK293 細胞を  $4.5 \times 10^5$  cells 加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> で約 24 時間培養した。無血清培地の OPTi-MEM® を 100 µL 入れたチューブに 3.0 µg 程度のプラスミド DNA を加え、混合した。2 mg/mL PEI を 7.8 µL 加えて混合した後、室温で 15 分間静置した。混合液を細胞が剥がれないように滴下し、ゆっくりと混和した。約 4 時間後に培地交換を行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> で約 48 時間培養した。

## 2-5. 顕微鏡観察

細胞核内の蛍光像の観察には LSM (OLYMPUS の FV3000) を用いた。40 倍の対物レンズを使用した。

核膜の透過性処理と RNA の分解を行った細胞と、Topo II $\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体の観察には、蛍光顕微鏡 (ZEISS の Axiovert 135 TV) と CCD カメラ (WRAYMER の FLOYD) を用いた。40 倍の対物レンズを使用した。蛍光顕微鏡と CCD カメラの接続には 0.35 倍のアダプターを使用した。観察する際、培地の温度が低下しないように、パネル型のガラスヒーターで保温した。

HEK293 細胞の核膜の透過性処理と RNA の分解は次の手順で行った。Digitonin 溶液 [20 mM HEPS-KOH、pH 7.3、110 mM KOAc、5 mM MgCl<sub>2</sub>、2 mM DTT (ナカライテスク)、50 ng/ $\mu$ L Digitonin (Promega)] と、Digitonin 溶液から Digitonin のみを除いた Digitonin -溶液、RNase A 溶液 [50 mM HEPS-NaOH、pH 7.4、120 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.4  $\mu$ g/ $\mu$ L RNase A (SIGMA-Aldrich)] と、RNase A 溶液から RNase A のみを除いた RNase A -溶液をそれぞれ調製し、37°C に温めてから使用した。培地を除去して Digitonin -溶液で細胞表面を洗浄した後、Digitonin 溶液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 5 分間静置した。Digitonin 溶液を除去し、RNase A 溶液または RNase A -溶液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 20 分間静置した。

## 2-6. HEK293 細胞由来の total RNA の調製

HEK293 細胞由来の total RNA は、細胞密度が 80~90% になるまで培養した 100 mm dish から TRIZOL® Reagent (Invitrogen) を用いて精製した。アスピレーターを用いて培地を取り除き、37°C で温めておいた PBS で洗浄した後、6 mL の TRIZOL Reagent を加え、ピペティングで細胞を懸濁した。細胞懸濁液を 15 mL の遠心チューブに移した後、室温で 5 分間静置した。6 本の 2 mL tube に約 1 mL ずつ分注し、500  $\mu$ L のクロロホルムを加えて 15 秒間激しく振り混ぜた後、室温で 2~3 分間静置した。冷却遠心機 (4°C) を用いて 12,200 $\times$  g で 15 分間遠心し、水層を 1.5 mL チューブに移した。水層と等量のクロロホルムを加え、30 秒間振り混ぜた後、19,800 $\times$  g で

1 分間遠心した。水層を 1.5 mL チューブに移し、500  $\mu$ L のイソプロピルアルコールを加え、室温で 10 分間静置した。22,700 $\times$  g で 10 分間遠心した。上清を取り除き、1 mL の 75%エタノールを加え、冷却遠心機を用いて 22,700 $\times$  g で 5 分間遠心した。上清を取り除きペレットを室温で 5~10 分間風乾した。ペレットに DEPC 処理水 (NIPPON GENE) を加え、57.5 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した。NanoVue Plus (GE Healthcare) と Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer (Invitrogen) を用いて純度と濃度を測定し、DNA LoBind 1.5 mL tube (Eppendorf) に分注した後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer による測定には Qubit<sup>®</sup> RNA HS Assay Kit (Invitrogen) を用いた。

DNase I (SIGMA-Aldrich) による DNA の除去は次のように行った。10  $\mu$ L の反応溶液 (7.5  $\mu$ g RNA、1 $\times$  DNase I Reaction Buffer、1 unit DNase I) を調製し、室温で 15 分間反応した。反応後、50 mM EDTA を 1  $\mu$ L 加え、70 $^{\circ}$ C で 10 分間反応した後すぐに氷上に移し、10 分間静置した。等量のクロロホルムを加えて 30 秒間振り混ぜた後、冷却遠心機を用いて 19,800 $\times$  g で 1 分間遠心した。水層を 1.5 mL チューブに移した。水層の 1/10 量の 3M NaOAc (pH 5.2) を加えて混和し、さらに水層の 2.5 倍量の 100%エタノールを加えて転倒混和した後、-80 $^{\circ}$ C で 20 分間静置した。22,700 $\times$  g で 10 分間遠心した後、上清を除去し、100%エタノールの 1.5~2 倍量の 70%エタノールを加え、22,700 $\times$  g で 5 分間遠心した。上清を除去し、室温で約 10 分間風乾した後、DEPC 処理水を加えて溶解した。Qubit<sup>®</sup> 2.0 Fluorometer と Qubit<sup>®</sup> RNA HS Assay Kit で定量して分注した後、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

RNA の電気泳動は次のように行った。1 $\times$  MOPS Buffer [20 mM MOPS (ナカラ イテスク)、pH 7.0、5 mM CH<sub>3</sub>COONa $\cdot$ 3H<sub>2</sub>O、1 mM EDTA $\cdot$ 2Na] に HEK293 total RNA、0.04 mM formaldehyde、0.25 mM formamide を加え、33% Sucrose、0.83 mM EDTA、0.2% BPB になるように loading dye を混合した。65 $^{\circ}$ C で 20 分間反応した後すぐに氷上に移し、5 分間静置した。RNA の電気泳動には 1  $\mu$ L の Gel Red (Biotium) を加えた 25 mL のホルムアルデヒド変性アガロースゲル [1.2% agarose S (NIPPON GENE)、1 $\times$  MOPS Buffer、1.8 M formaldehyde] と、1 $\times$  MOPS Buffer を使用した。ゲルの撮影は FAS-V (NIPPON Genetics) で行った。

DNase I によって DNA が分解除去されているか、次の手順で確認した。HEK 293 total RNA を含む溶液が 10  $\mu$ L になるように 16  $\mu$ g の RNase A を加え、55°C で 30 分間反応した。反応後、2  $\mu$ L の Stop solution [4% SDS、20% Sucrose、0.5 mM EDTA、0.13% BPB、2.38  $\mu$ g Proteinase K (Roche)] を加え、さらに 55°C で 1 時間反応した。電気泳動は、25 mL の 1 $\times$  TBE に対して Gel Red を 1  $\mu$ L 加えた 1.2% のアガロースゲルと 1 $\times$  TBE と、25 mL の 1 $\times$  MOPS Buffer に対して Gel Red を 1  $\mu$ L 加えたホルムアルデヒド変性 1.2% アガロースゲルと 1 $\times$  MOPS Buffer の両方を用いて行った。

## 2-7. Topo II assay に使用する DNA の調製

超らせん型の pUC18 は、PureLink® HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit を用いて精製した。精製した pUC18 は、Gel Red を加えた 0.7% アガロースゲルと 1 $\times$  TBE を使って電気泳動した。

直鎖型の pUC18 は、次の手順で調製した。*Sma*I で pUC18 を切断した後、SDS/PK 溶液 (0.67% SDS、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L proteinase K) を加え、55°C で 1 時間反応した。その後、等量のフェノール : クロロホルム : イソアミルアルコール [(25 : 24 : 1) (ナカライテスク)] を加え、30 秒間振り混ぜた。冷却遠心機 (4°C) を用いて 19,800 $\times$  g で 1 分間遠心した。水層を 1.5 mL チューブに移し、等量のクロロホルムを加え、30 秒間振り混ぜた。19,800 $\times$  g で 1 分間遠心した後、水層を 1.5 mL チューブに移し、等量のクロロホルムを加え、30 秒間振り混ぜた。19,800 $\times$  g で 1 分間遠心し、水層を 1.5 mL チューブに移した。水層の 1/10 量の 3M NaOAc (pH 5.2) を加えて混和し、さらに水層の 2.5 倍量の 100% エタノールを加えて転倒混和した後、-80°C で 20 分間静置した。22,700 $\times$  g で 10 分間遠心した後、上清を除去し、100% エタノールの 1.5~2 倍量の 70% エタノールを加えて 22,700 $\times$  g で 5 分間遠心した。上清を除去した後、室温で約 10 分間風乾し、TE Buffer で溶解した。得られた DNA は、Gel Red を加えた 0.7% のアガロースゲルと 1 $\times$  TBE を使って電気泳動した。

## 2-8. 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質の精製は Onoda らの方法に従って行った (Onoda et al., 2014)。まず、磁性ビーズ [DynaBeads® Protein G (Invitrogen)] に抗体を結合させた。1.5 mL 丸底チューブに 80  $\mu$ L のビーズ溶液を加え、マグネティックスタンドを用いて保存溶液を除去した。800  $\mu$ L の PBS 洗浄液 [PBS、0.1% Tx-100 (SIGMA-Aldrich)] でビーズを 2 回洗浄した後、200  $\mu$ L の PBS 洗浄液で懸濁した。40  $\mu$ g の FLAG M2 抗体 (SIGMA-Aldrich) を加え、Rotary mixer (BIO CRAFT) で攪拌しながら 4°C で 1 時間反応した。800  $\mu$ L の PBS 洗浄液でビーズを 2 回洗浄した後、80  $\mu$ L の Extraction buffer [50 mM HEPES-NaOH、pH 7.4、1 mM EDTA、500 mM NaCl、0.1% NP-40 (片山化学工業株式会社)、1 $\times$  PIC (Roche)、1 mM DTT] で懸濁し、使用するまで氷上に静置した。次に、発現プラスミドをトランスフェクションした細胞から、細胞抽出液を調製した。培地を取り除いて、2 mL の PBS で 2 回細胞の表面を洗った後、プレートを生氷上に移し、250  $\mu$ L の Extraction buffer を加えた。ラバーポリスマンで細胞をかき集め、1.5 mL tube に全量移し入れた。再び 250  $\mu$ L の Extraction buffer を加えて残った細胞を回収した。氷上で 10 分おきにチューブを 5 回転倒混和しながら、30 分間静置した。冷却遠心機 (4°C) を用いて 22,700 $\times$  g で 10 分間遠心して、可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を抗体が結合したビーズに加えた後、Rotary mixer で攪拌しながら、4°C で約 2 時間反応した。非結合画分を除去した後、800  $\mu$ L の Extraction buffer で 3 回洗浄した。ビーズからタンパク質を溶出する場合には、洗浄後のビーズに 80  $\mu$ L の Peptide solution [150 ng/ $\mu$ L 3 $\times$  FLAG peptide (SIGMA-Aldrich)、50 mM Tris-HCl、pH 8.0、120 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EDTA、1 $\times$  PIC、1 mM DTT] を加えた。5 分おきにタッピングで混和しながら氷上で 30 分間の静置した後、溶出画分を回収した。得られたタンパク質溶液は分注して液体窒素で急速凍結した後、-80°C で保存した。ビーズにタンパク質を結合させたまま使用する場合には、洗浄後のビーズに Beads storage buffer (50 mM Tris-HCl、pH 8.0、120 mM KCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EDTA、50% Glycerol、1 $\times$  PIC、1 mM DTT) を加えて懸濁した後、分注して-80°C で保存した。精製したタンパク質の量と純度は、SDS-PAGE



で評価した。量を振った BSA (Thermo Scientific Pierce) と並べて泳動した後、CBB Stain one (ナカライテスク) で染色した。Image J (Rasband, W.S. 1997-2018) を用いたバンドデンシトメトリーによってタンパク質を定量した。

## 2-9. Relaxation assay

Relaxation assay は、Onoda らの方法に従って行った (Onoda et al., 2014)。10 ng の超らせん型 pUC18 を含む Topo II 反応液 [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 300 ng BSA (TaKaRa), 0.5 mM ATP, 1 mM DTT] に 10 μL になるように酵素を加え、30°C で 30 分間反応した。2 μL の Stop solution を加えた後、55°C で 1 時間反応した。電気泳動には 1% SeaKen GTG agarose gel [SeaKen GTG agarose (Lonza)] と 1× TBE を用いた。DNA は、Gel Red で後染めして検出した。

HEK293 細胞由来の total RNA を加えた酵素反応では、反応の後、1 μL の SDS/RNase A solution (8% SDS, 6.4 μg RNase A) をまず添加して、55°C で 20 分間反応した。その後、1 μL の PK Solution (33% Sucrose, 0.83 mM EDTA, 0.2% BPB, 1.98 μg Proteinase K) を加えて、さらに 55°C で 1 時間反応した。

rA<sub>30</sub> または rG<sub>30</sub> を加えた酵素反応では、反応の後、2 μL の Stop solution を加えて 55°C で 1 時間反応した。

## 2-10. Catenation assay

Catenation assay は、Kawano らの方法に従って行った (Kawano et al., 2016)。H1.0 (New England Biolabs) を用いた酵素反応では、50 ng 超らせん型 pUC18 と H1.0 を含む 10 μL の Topo II 反応液を調製し、30°C で 30 分間反応した。10、20、40 ng の H1.0 を用いた。反応の後、2 μL の Stop solution を加え、55°C で 1 時間反応した。1% SeaKen GTG agarose gel と 1× TBE を用いた電気泳動で、ウェルに溜まる Catenane を検出した。DNA は、Gel Red で後染めした。

PEG (SIGMA-Aldrich) を用いた酵素反応では、50 ng 超らせん型 pUC18 と PEG

を含む 10  $\mu$ L の Topo II 反応液を調製し、30°C で 30 分間反応した。PEG は、1、5、10% になるように加えた。DNA は 25 mL の 1 $\times$  TBE に対して 1  $\mu$ L の Gel Red を含む 1% SeaKen GTG agarose gel と 1 $\times$  TBE で電気泳動を行い、先染めで検出した。

#### 2-11. DNA-binding assay

DNA-binding assay は、Onoda らの方法に従って行った (Onoda et al., 2014) 。100 fmol の FLAG-Topo II $\alpha$  が結合したビーズと 5 ng の超らせん型 pUC18 を、ATP を含まない 10  $\mu$ L の Topo II 反応液中で混合し、30°C で 30 分間反応した。HEK293 細胞由来の total RNA は、5、50、500 ng 加えた。反応の後、マグネティックスタンドを用いて上清 (非結合画分) とビーズ (結合画分) に分けた。ビーズは 10  $\mu$ L の DNA を含まない Topo II 反応液で懸濁した。各画分に 1  $\mu$ L の SDS/RNase A solution を添加し、55°C で 20 分間反応した後、1  $\mu$ L の PK Solution を加えて、さらに 55°C で 1 時間反応した。1% SeaKen GTG agarose gel と 1 $\times$  TBE を用いた電気泳動を行った後、DNA を Gel Red による後染めで検出した。DNA バンドの定量には Image J を用いた。非結合画分に検出された超らせん型の DNA バンドを定量し、結合率は 100% - (非結合画分/基質)  $\times$ 100 で算出した。

直鎖型の pUC18 との結合反応は次のように行った。ATP を含まない 10  $\mu$ L の Topo II 反応液中で 2 ng の直鎖型 pUC18 と 30°C で 30 分間反応した。上清とビーズに分けた後、DNA を含まない Topo II 反応液でビーズを懸濁した。それぞれに 2  $\mu$ L の Stop solution を加えた後、55°C で 1 時間反応した。1% SeaKen GTG agarose gel と 1 $\times$  TBE を用いた電気泳動を行った後、DNA を Gel Red による後染めで検出した。Image J を用いて各画分の直鎖型 DNA バンドを定量し、結合率は (結合画分/基質)  $\times$ 100 で算出した。

#### 2-12. Decatenation assay

kDNA を用いた Decatenation assay では 100 ng kDNA (Inspiralis) を含む 10  $\mu$ L の Topo II 反応液を調製し、30°C で 30 分間反応した。反応後、2  $\mu$ L の Stop solution

を加え、55°Cで1時間反応した。DNAはGel Redを含む1% SeaKen GTG agarose gelと1×TBEで電気泳動を行い、先染めで検出した。

### 3. 結果

#### 3-1. Topo II $\alpha$ の核小体局在に関わる領域の同定

$\alpha$  の核小体局在に関わる領域を同定するにあたり、CTD (1192-1527) に着目した様々な変異体の間期細胞核内における核内局在を観察した (Fig. 7)。本研究では、Kawano らに準じて CTD を定義した (Kawano et al., 2016)。まず、WT を発現させた細胞を観察した。DIC 像から、細胞質、核質、核小体を明瞭に区別できる (Fig. 8)。EGFP 像では、核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 8)。次に、CTD を発現させた細胞を観察した。DIC 像から、細胞質、核質、核小体を明瞭に区別できる (Fig. 8)。EGFP 像では、WT と同じように核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 8)。これらの結果から、本実験においても、WT と同じように CTD のみでも間期細胞核内の核質と核小体に局在することが示された。

$\alpha$  の CTD に核小体局在に関わる領域が存在することが示唆されたため、CTD を分割した変異体 (Fig. 7) の局在観察を行って、その同定を試みた。1192-1289 の EGFP

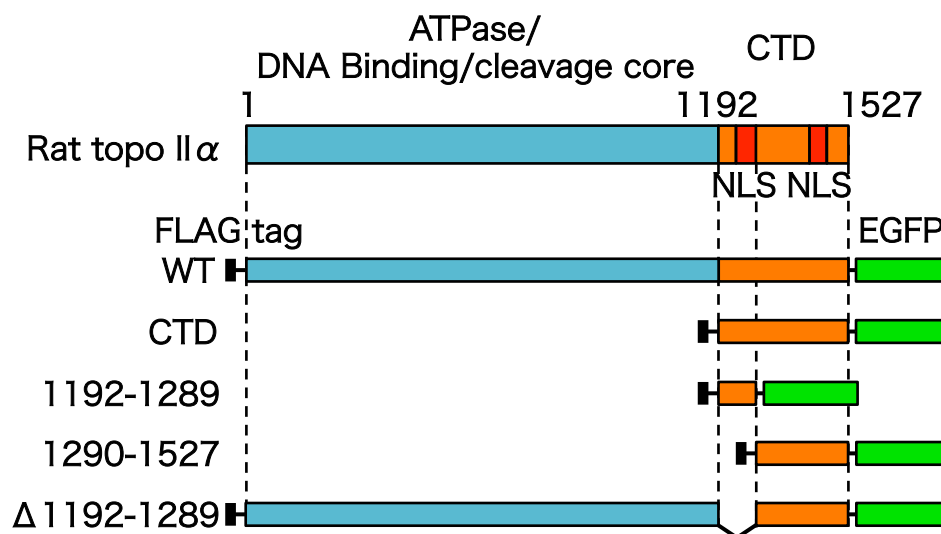


Figure 7. C末端側にEGFPタグを付加したTopo II $\alpha$ 変異体  
NLS : nuclear localization signal

像では核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 8)。一方、1290-1527 の EGFP 像では、核全体に蛍光シグナルが認められたが、核小体に明瞭な蛍光シグナルが認められなかった (Fig. 8)。これらの結果から、 $\alpha$  の 1192-1289 領域のみで間期細胞核内の核小体に局在することが示された。

さらに、WT から 1192-1289 領域を欠いた  $\Delta$ 1192-1289 の細胞核内局在を観察した。 $\Delta$ 1192-1289 の EGFP 像では、核質に蛍光シグナルは認められたが、核小体には

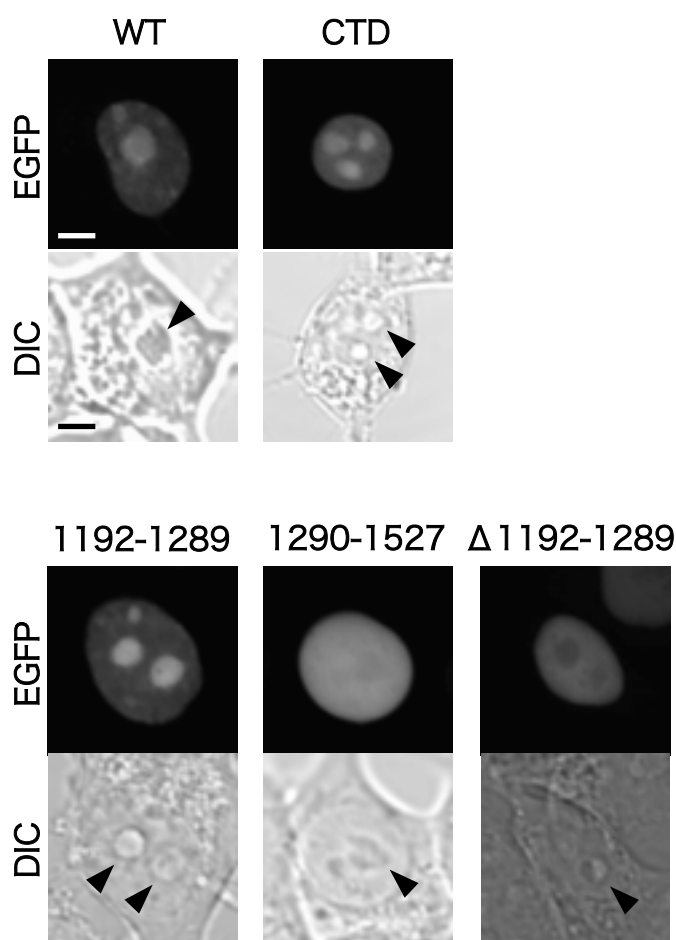


Figure 8. Topo II $\alpha$ 変異体の細胞核内局在の観察

C末端側にEGFPタグを付加したTopo II $\alpha$ の各種変異体を一過的に発現させたHEK293細胞の画像を示している。画像は共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて撮影した(40倍の対物レンズ、3倍のデジタルズーム)。EGFPは蛍光像を、DICは微分干渉像を示している。矢じりは核小体を示している。スケールバーは5  $\mu$ mを示している。

蛍光シグナルがほとんど認められなかった (Fig. 8)。以上の結果から、 $\alpha$  の核小体局在に 1192-1289 領域が関わっていることが明らかになった。

### 3-2. Topo II $\alpha$ の核小体局在における RNA の関与

核小体には RNA が豊富に含まれている。アイソザイムである  $\beta$  の核小体局在には、RNA との相互作用が関わっていることが報告されている (Onoda et al., 2014)。したがって、 $\alpha$  の核小体局在にも RNA が関与しているのではないかと考えた。そこで、Onoda らと同様に Digitonin で核膜の透過性処理を行った後、RNA を分解し、 $\alpha$  の核小体局在に変化が認められるか観察した。

まず、無処理の細胞を観察した (Fig. 9A)。明視野像から、細胞質、核質、核小体が明瞭に区別できる。WT の EGFP 像では、核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが観察された。1192-1289 でも同じような蛍光シグナルの局在パターンが観察された。次に、Digitonin で核膜の透過性処理を行った細胞を観察した。明視野像では核が膨張し、丸くなったが、それ以外の変化は認められなかった。WT の EGFP 像では、核質の蛍光シグナルの強度が部分的に低下したが、核小体の蛍光シグナルの強度は変化しなかった。1192-1289 の EGFP 像では、核膜の周辺に点在する蛍光シグナルが観察されるようになったが、核小体の蛍光シグナルの強度は変化しなかった。さらに、RNase A で RNA を分解除去した細胞を観察した。明視野像では核小体の縮小が認められた。WT と 1192-1289 の EGFP 像では、ともに核小体の蛍光シグナルの消失が観察された。核膜の透過性処理と、さらに RNA を分解除去した際、核小体に強い蛍光シグナルが認められる細胞の割合を調べた (Fig. 9B)。核膜の透過性処理のみでは、WT は 67.8%、1192-1289 は 74.5%であった。RNA を分解除去すると、WT は 7.1%、1192-1289 は 19.9%にまでそれぞれ低下した。これらの結果から、 $\alpha$  の核小体局在に RNA が関わっていると考えられる。また、 $\alpha$  の 1192-1289 が RNA と直接的、または間接的に相互作用している可能性が示唆された。

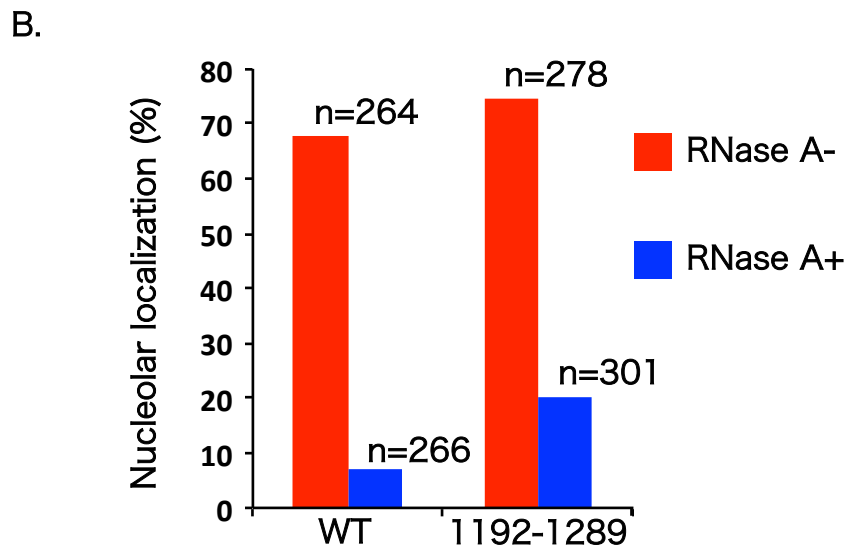
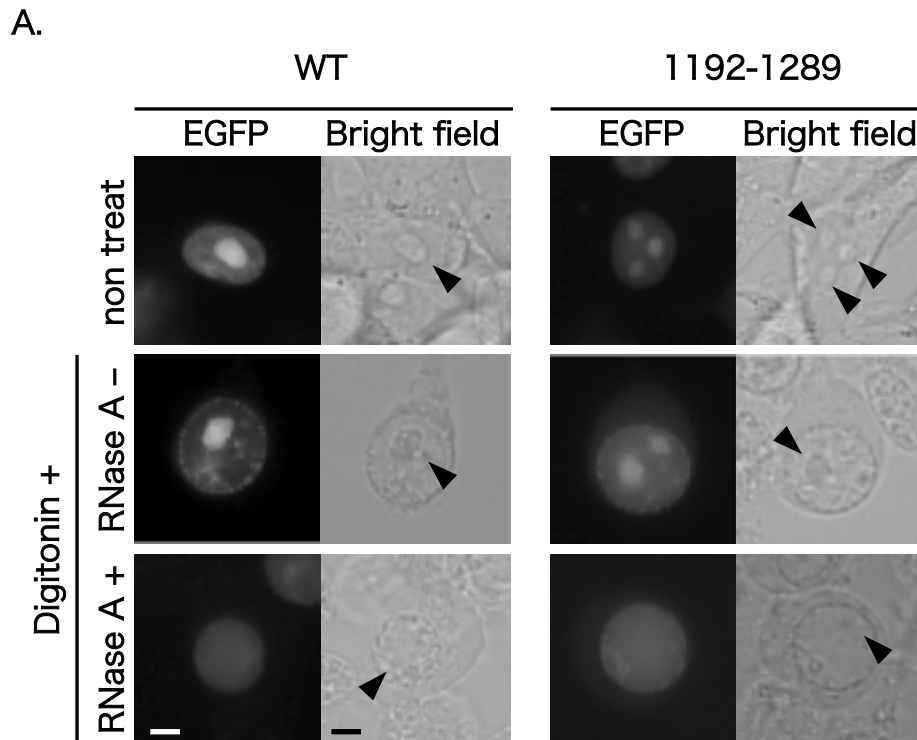


Figure 9. 核膜の透過性処理とRNA分解による核小体局在の変化  
 A. C末端側にEGFPタグを付加したTopo II $\alpha$ の各種変異体を一過的に発現させたHEK293細胞の画像を示す。画像は蛍光顕微鏡で観察し、CCDカメラを用いて撮影した（40倍の対物レンズ、0.35倍の接続アダプター）。EGFPは蛍光像を、Bright fieldは明視野像を示している。矢じりは核小体を示している。スケールバーは5  $\mu$ mを示している。

B. 核小体への局在が認められた細胞の割合を示す。

### 3-3. Topo II assay に使用する HEK293 細胞由来の total RNA

HEK293 細胞から精製した RNA の純度や、含まれる分子種を電気泳動で分析した (Supplementary Fig. S10)。まず、精製した RNA をホルムアルデヒド変性アガロースゲルで電気泳動した。未成熟な rRNA、28S rRNA、18S rRNA のバンドが認められた (Supplementary Fig. S10A)。DNase I 処理による RNA のバンドパターンに変化は認められなかった。次に、DNase I によってゲノム DNA が分解除去されているか調べるために、アガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルの中央あたりにみられるスメアーは RNase A 処理で消失したため、RNA だと考えられる (Supplementary Fig. S10B)。DNase I 処理したサンプルには、アガロースゲル上部のスメアーが認められなかったことから、ゲノム DNA が除去された RNA を得ることができた。

### 3-4. Topo II assay に使用する pUC18 DNA

精製した超らせん型の pUC18 (2686 bp) をアガロースゲル電気泳動で分析した。DNA マーカーの 2027 bp 付近に超らせん型 (I 型) が、4361 bp 付近に開環状 DNA (II 型) が認められた (Supplementary Fig. S11A)。I 型に対して II 型の割合が十分に低いことから、酵素反応に使用できる DNA が得られた。

直鎖型 (III 型) の pUC18 をアガロースゲル電気泳動で分析すると、DNA マーカーの 2322 bp 付近に単一のバンドが認められた (Supplementary Fig. S11B)。DNA 結合反応に使用できる DNA が得られた。

### 3-5. Topo II assay に使用する Topo II $\alpha$ の精製

精製したタンパク質の SDS-PAGE を行い、純度を分析した (Supplementary Fig. S12)。N 末端側に FLAG タグを付加した WT は約 174.8 kDa、 $\Delta$ CTD は約 141.7 kDa、1-1289 は約 148.9 kDa、 $\Delta$ 1192-1289 は約 164 kDa である (Fig. 10A)。FLAG ペプチドで溶出した各タンパク質のバンドは、推定される分子量付近の分子量マーカーの位置に認められた。また、それぞれ単一のバンドであったため、純度の高いタンパク質が得られた (Supplementary Fig. S12A)。同じように、磁性ビーズ上に固定化したタ



ンパク質も単一のバンドであったので、純度の高いタンパク質が得られたと考える (Supplementary Fig. S12B)。分子量マーカーの 60 kDa と 50 kDa の間のバンドは抗 FLAG 抗体の Heavy chain である。N 末端側に FLAG タグ、C 末端側に EGFP タグを持つ CTD は約 66.5 kDa、1192-1289 は約 40.6 kDa で、FLAG タグと EGFP タグのみの FLAG-EGFP は約 29.3 kDa である (Fig. 10B)。推定される分子量付近の分子量マーカーの位置に単一のバンドが認められたので、純度の高いタンパク質が得られた (Supplementary Fig. S13)。分子量マーカーの 25 kDa と 22 kDa の間のバンドは抗 FLAG 抗体の Light chain である。

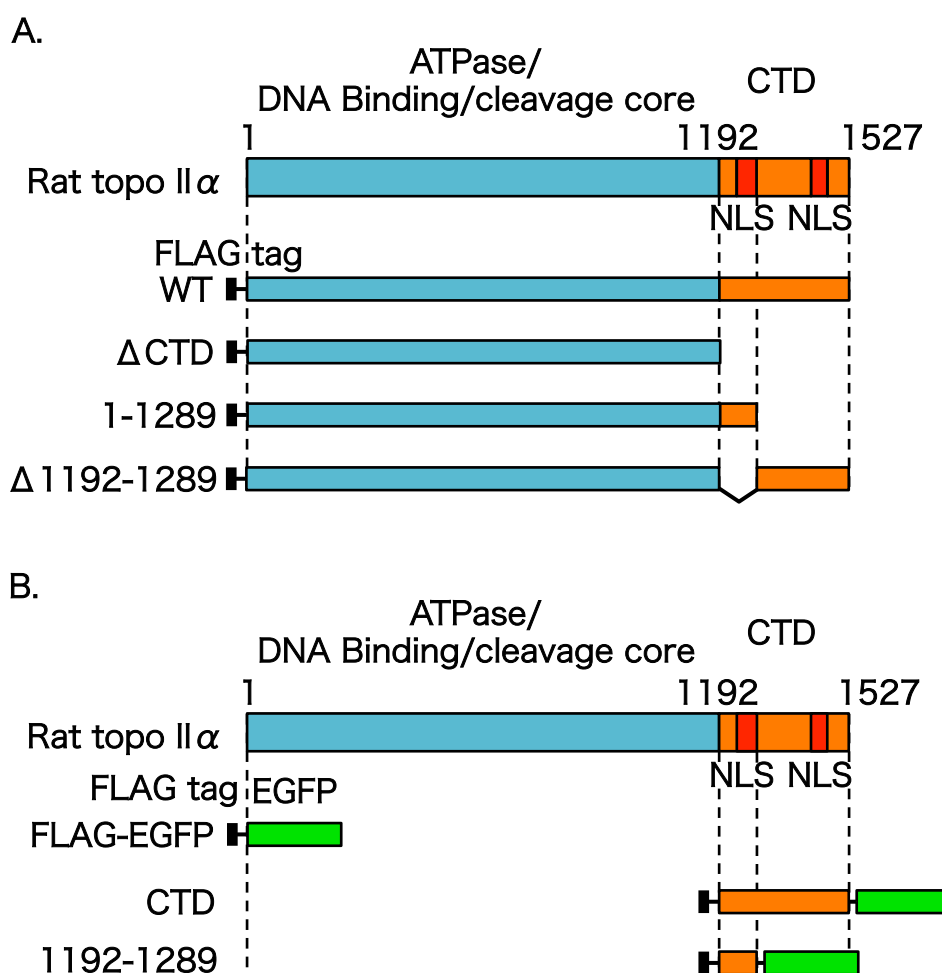


Figure 10. Topo II assayに使用したTopo II $\alpha$ の変異体

NLS : nuclear localization signal

A. FLAG-Topo II $\alpha$ の変異体を示す。

B. FLAG-Topo II $\alpha$ -EGFPの変異体を示す。

### 3-6. 精製した Topo II $\alpha$ の弛緩反応に基づく酵素活性

精製した FLAG-Topo II $\alpha$  の様々な変異体の試験管内酵素活性を、超らせん型 DNA の弛緩の程度を指標とした Relaxation assay で解析した。WT では、酵素量が十分に多いため、超らせん型 DNA のほとんどが弛緩した (Fig. 11)。酵素量を 2 倍希釈系列で減少させると、弛緩した DNA が減少して超らせん型 DNA が増加し、7.5 fmol 以下で超らせん型 DNA が有意に認められるようになった。 $\Delta$ CTD や 1-1289、 $\Delta$ 1192-1289 でも同じようなバンドパターンの変化が観察された。 $\Delta$ CTD では 30 fmol 以下から超らせん型 DNA のバンドが出現し始め、7.5 fmol ではっきりと超らせん型 DNA が認められた。1-1289 では 3.8 fmol 以下で超らせん型 DNA が有意に認められるようになった。 $\Delta$ 1192-1289 では 15 fmol 以下で超らせん型 DNA のバンドが認められ始め、7.5 fmol ではっきりと超らせん型 DNA が認められた。これらの結果は、今回精製した酵素に十分な活性があることを示す。また、弛緩反応に基づく酵素活性に極端に大きな差は認められなかった。

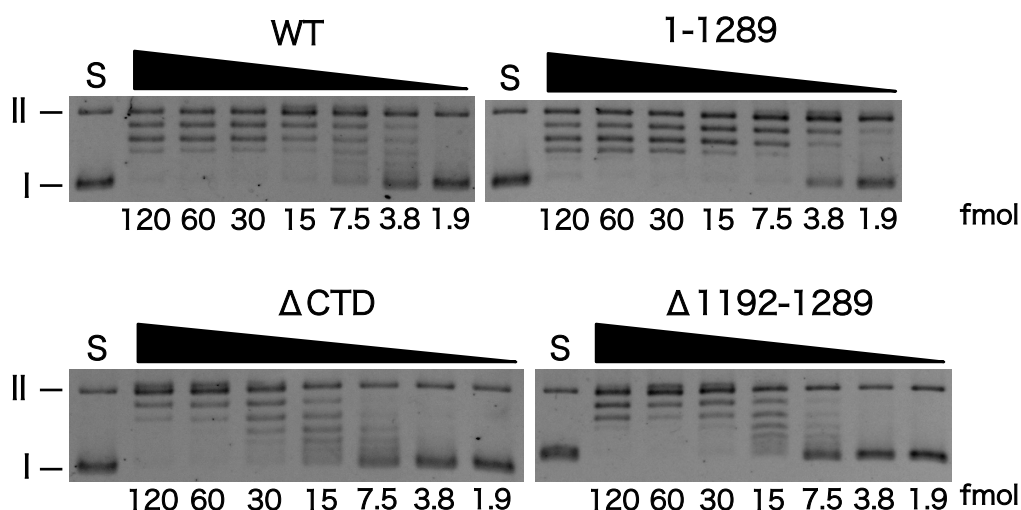


Figure 11. Topo II $\alpha$  変異体を使った Relaxation assay

Topo II $\alpha$  変異体の超らせん型 DNA の弛緩パターンの変化をアガロースゲルを用いて解析した。I は超らせん型 DNA、II は開環状 DNA を示している。S は基質である pUC18 を示している。反応させた酵素は 120 fmol からの 2 倍希釈列を使用した。

### 3-7. HEK293 細胞由来の total RNA の Topo II $\alpha$ の酵素活性への影響

間期細胞核内において、核小体に局在する $\alpha$ の酵素活性が抑制されていることが示されている (Agostinho et al., 2004)。3-2 項の結果から、RNA が $\alpha$ の核小体局在に関わることが示されたことから、酵素活性の抑制に RNA が関わっている可能性が考えられた。そこで、RNA 存在下で Relaxation assay を行い、RNA が酵素活性に及ぼす影響について解析した。

Fig. 11 から、WT と全ての変異体において、60 fmol 以上の時に超らせん型 DNA が認められず、弛緩した DNA のパターンがほとんど変化しないことから、60 fmol の酵素を用いることにした。WT では、RNA 非存在下では弛緩した DNA が観察され、超らせん型 DNA は認められなかった (Fig. 12)。反応溶液に HEK293 細胞由来の total RNA の量を変えて加えていくと、100 ng で超らせん型 DNA が出現し始め、1000 ng で超らせん型 DNA が有意に認められるようになった。この結果から、WT の酵素活性が RNA

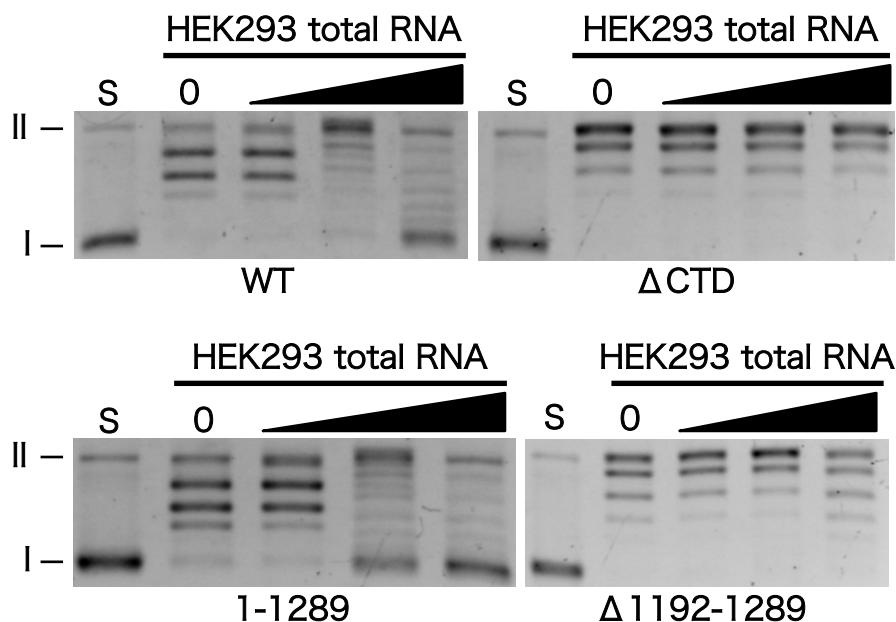


Figure 12. Topo II $\alpha$  変異体の酵素活性に対する RNA の影響

HEK293細胞由来のtotal RNAによるTopo II $\alpha$  変異体の超らせん型DNAの弛緩パターンの変化をアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は60 fmol使用した。HEK293細胞由来のtotal RNAは10、100、1000 ng加えた。

によって抑制されることが明らかになった。

驚くべきことに  $\Delta$ CTD では、100 ng 以上の RNA を加えても超らせん型 DNA は認められなかった (Fig. 12)。この結果は、CTD が RNA による酵素活性の抑制に関わっていることを示している。3-2 項の結果から、CTD 内の 1192-1289 領域と RNA との相互作用が示唆された。そこで、1192-1289 領域が RNA による酵素活性の抑制に関わっているかどうか調べた。1-1289 では、100 ng 以上の RNA を加えた際に超らせん型 DNA がはっきりと認められた。一方、 $\Delta$ 1192-1289 では RNA を加えても超らせん型 DNA は認められなかった。これらの結果から、RNA による  $\alpha$  の酵素活性の抑制に 1192-1289 領域が深く関わっていることが明らかになった。

### 3-8. 合成ポリリボヌクレオチドの Topo II $\alpha$ の酵素活性への影響

ヒトの  $\alpha$  の酵素活性がグアニンのみのホモリボポリマーで抑制されることが報告されている (Park et al., 2008)。3-7 項と同じように、このホモリボポリマーによる酵素活性の抑制に、CTD の 1192-1289 領域が関わっているかどうか解析した。本実験では、G が 30 個並んだ  $rG_{30}$  と A が 30 個並んだ  $rA_{30}$  の 2 種類を使用した。

WT では  $rG_{30}$  を増加させるにしたがって弛緩途中のバンドが現れ始めた。500 fmol 加えたところで超らせん型 DNA のバンドが現れ始め、800 fmol 以上では超らせん型 DNA のみがかっきりと観察された (Fig. 13A)。この結果は  $rG_{30}$  でも  $\alpha$  の酵素活性が抑制されたことを意味する。 $\Delta$ CTD では  $rG_{30}$  を 400 fmol 加えたところで弛緩された DNA のバンドパターンに変化が認められ始めた。さらに 600 fmol を加えたところで超らせん型 DNA が現れ始め、1000 fmol 以上では超らせん型 DNA がはっきりと認められた。この結果は、 $\Delta$ CTD が WT に比べて  $rG_{30}$  の影響を受けにくいことを示唆している。1-1289 では  $rG_{30}$  を 400 fmol 加えたところで超らせん型 DNA が認められ始め、さらに 600 fmol 以上では超らせん型 DNA がはっきりと観察された。 $\Delta$ 1192-1289 では  $rG_{30}$  を 400 fmol 加えたところで弛緩された DNA のバンドパターンに変化が認められ始め、さらに 500 fmol 加えたところで超らせん型 DNA が現れ始めた。700 fmol

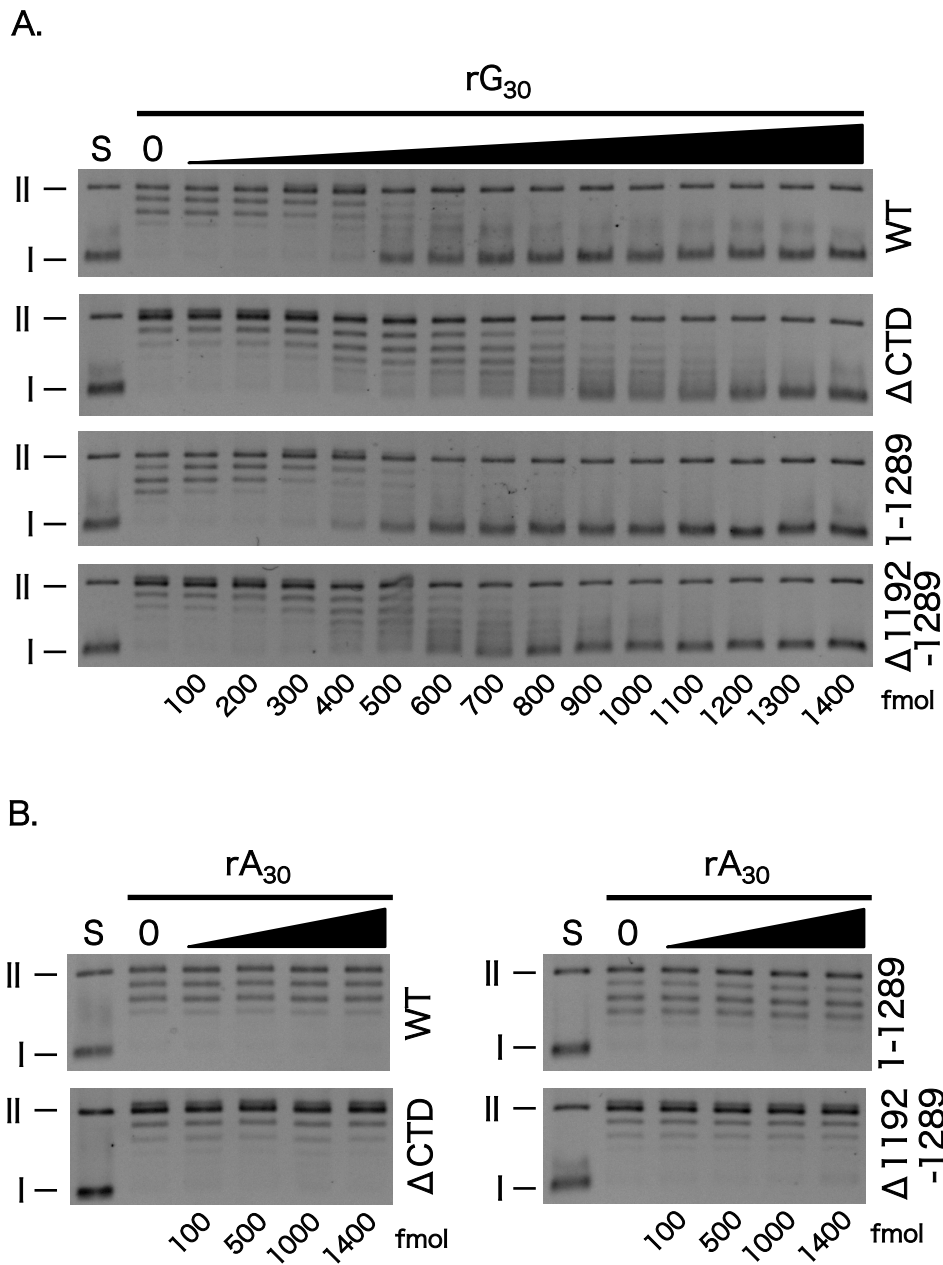


Figure 13. Topo II $\alpha$  変異体の酵素活性に対するrG<sub>30</sub>とrA<sub>30</sub>の影響  
 rG<sub>30</sub>またはrA<sub>30</sub>によるTopo II $\alpha$ の超らせん型DNAの弛緩パターンの変化をアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は60 fmol使用した。  
 A. rG<sub>30</sub>を用いた超らせん型DNAの弛緩パターンの変化を示す。rG<sub>30</sub>は100から1400 fmolを100 fmol刻みで加えた。  
 B. rA<sub>30</sub>を用いた超らせん型DNAの弛緩パターンの変化を示す。rA<sub>30</sub>は100、500、1000、1400 fmol加えた。

以上ではっきりと超らせん型 DNA が観察されるようになった。以上の結果は、WT と同じように全ての変異体の酵素活性が程度に差はあるものの  $rG_{30}$  により抑制されることを示している。1-1289 は WT とほぼ同程度に抑制され、 $\Delta$ CTD や  $\Delta$ 1192-1289 は WT よりも抑制されにくい。これらの抑制効果の傾向は、3-7 項の HEK293 細胞由来の total RNA による抑制効果と似ていた。 $rA_{30}$  の酵素活性への影響を解析したところ、WT と全ての変異体の酵素活性は  $rA_{30}$  の量を増加させても抑制されなかった (Fig. 13B)。今回得られた WT の結果は Park らの結果と矛盾しない (Park et al., 2008)。

### 3-9. Topo II $\alpha$ の超らせん型 DNA への結合量に及ぼす RNA の影響

$\alpha$  の酵素活性が RNA 存在下でどのように抑制されるのか明らかにするために、酵素反応の第一ステップである DNA 結合に対する RNA の影響について解析した。

WT では、RNA 非存在下で加えた超らせん型 DNA が結合画分に全て認められた (Fig. 14A)。RNA を加えると、RNA の量が増加するにしたがって結合画分の超らせん型 DNA が減少し、非結合画分に超らせん型 DNA が認められるようになった。結合した超らせん型 DNA の割合を定量してグラフ化すると、RNA の量に依存して減少していることが分かった。また、RNA を 500 ng 加えたところではほぼ 0% になった (Fig. 14B)。WT と同じように、1-1289 では、RNA 非存在下で加えた超らせん型 DNA が結合画分に全て認められた (Fig. 14A)。RNA を加えると、RNA の量に依存して非結合画分に超らせん型 DNA が認められるようになった。結合した超らせん型 DNA の割合を定量してグラフ化すると、WT と同様に加えた RNA の量が増加するにしたがって減少していることが分かった (Fig. 14B)。これらの結果から、WT と 1-1289 は RNA 存在下で DNA との結合が阻害されることが明らかになった。

$\Delta$ CTD では、RNA 非存在下で加えた超らせん型 DNA が非結合画分と結合画分の両方に認められた (Fig. 14A)。WT や 1-1289 とは異なり、RNA を加えても、結合画分の超らせん型 DNA のバンドの顕著な減少は認められなかった。結合した超らせん型 DNA の割合を定量してグラフ化すると、加える RNA の量を増やしても顕著な減少が認められないことが分かった。(Fig. 14B)。

以上の結果から、 $\alpha$  の 1192-1289 領域に RNA が作用することで、超らせん型 DNA の結合を抑制していることが考えられた。

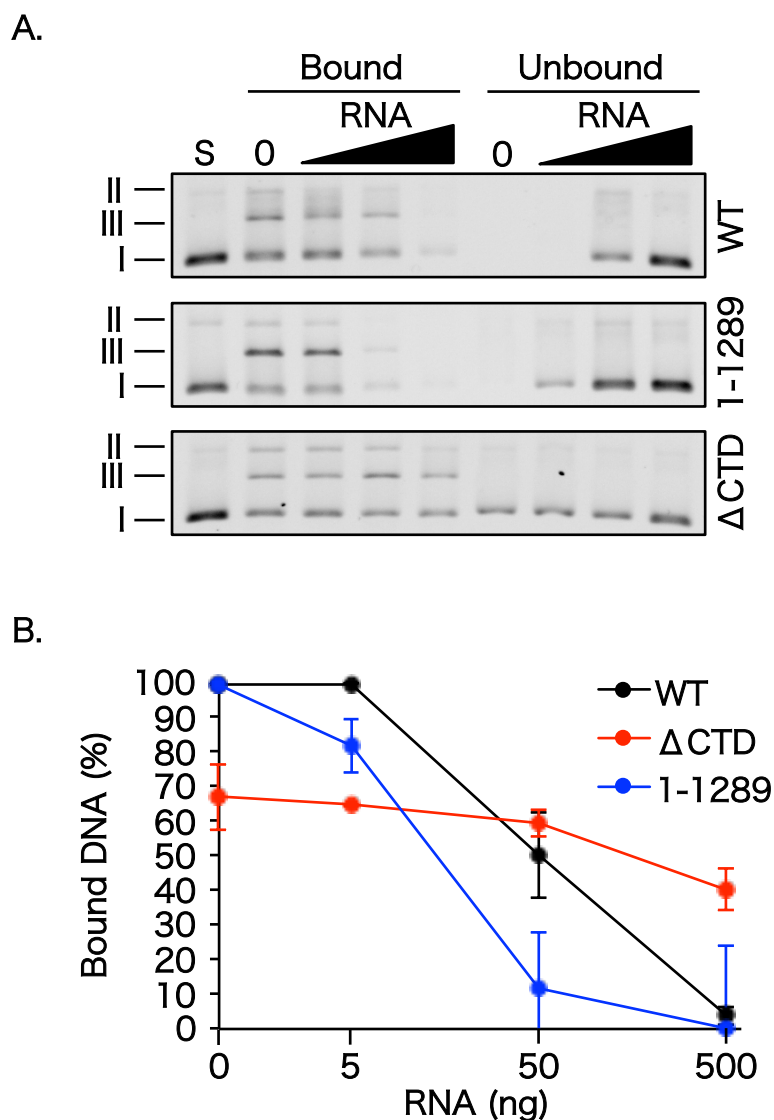


Figure 14. RNAによる超らせん型DNAの結合量の変化  
A. 結合画分と非結合画分に含まれるDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNA、IIIは直鎖型DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は100 fmol使用した。RNAとしてHEK293細胞由来のtotal RNAを5、50、500 ng加えた。  
B. 非結合画分の超らせん型DNA量をImage Jで定量し、結合画分に含まれるDNAの割合を算出した。実験は3回行い、平均と標準偏差をグラフで表した。

### 3-10. Catenation 反応における CTD の役割

$\alpha$  の CTD が有する直鎖型 DNA に対する結合能が、効率的な Catenane 形成に関わっていることが報告されている (Kawano et al., 2016)。そこで、 $\alpha$  の CTD 欠質変異体の Catenane 形成効率を比較し、CTD 内に Catenane 形成に関わる領域が存在するか検証した。

H1.0 を用いた Catenation 反応では、超らせん型 DNA が H1.0 により凝集し、DNA 同士が物理的に接近する (Fig. 15A)。そこに  $\alpha$  が近接してとどまることによって Catenane が形成される (Kawano et al., 2016)。WT では、H1.0 の量に依存して Catenane の形成が認められた。一方、 $\Delta$ CTD では、Catenane の形成が認められなかった (Fig. 16A)。この結果は Kawano らの報告と相違ない (Kawano et al., 2016)。1-1289 では H1.0 の量を増やしていくと、WT と同じように Catenane の形成が認められた (Fig. 16A)。 $\Delta$ 1192-1289 では、H1.0 の量を増やしていくと、わずかながら Catenane の形成が認められたが、WT や 1-1289 と比べると顕著な差が認められた。これらの結果から、CTD の 1192-1289 領域が Catenane 形成に関わる主たるドメインであることが分かった。

H1.0 による Catenation assay では、凝集した DNA に酵素が近接してとどまることによって、効率的な Catenane 形成が起こる。PEG は高分子クラウディング効果を持つため、擬似的に DNA の凝集と、凝集した DNA への酵素の近接を再現できる。そこで、1192-1289 領域による効率的な Catenane の形成が、凝集した DNA に近接してとどまることによるものか解析するために、PEG 存在下で Catenation assay を行った (Fig. 15B)。WT では、PEG の濃度を増加させていくと、Catenane の形成が認められた (Fig. 16B)。 $\Delta$ CTD や 1-1289、 $\Delta$ 1192-1289 でも同じように、PEG の濃度に依存して Catenane の形成が認められた。

以上の結果から、 $\alpha$  の効率的な Catenane の形成に、1192-1289 領域が関わっていることが明らかになった。また、1192-1289 の領域に DNA 結合能が存在することが示唆された。



### 3-11. Topo II $\alpha$ の CTD に対する直鎖型 DNA の結合能

$\alpha$  の 1192-1289 領域が DNA 結合能を有しているかどうか、DNA-binding assay で調べた。FLAG タグと EGFP タグのみの FLAG-EGFP では、結合画分に認められる DNA のバンドはほんのわずかだった (Fig. 17A)。DNA のバンドを定量すると、結合した DNA の割合は 3.4%で、非特異的な DNA の結合はないことが示された (Fig. 17B)。

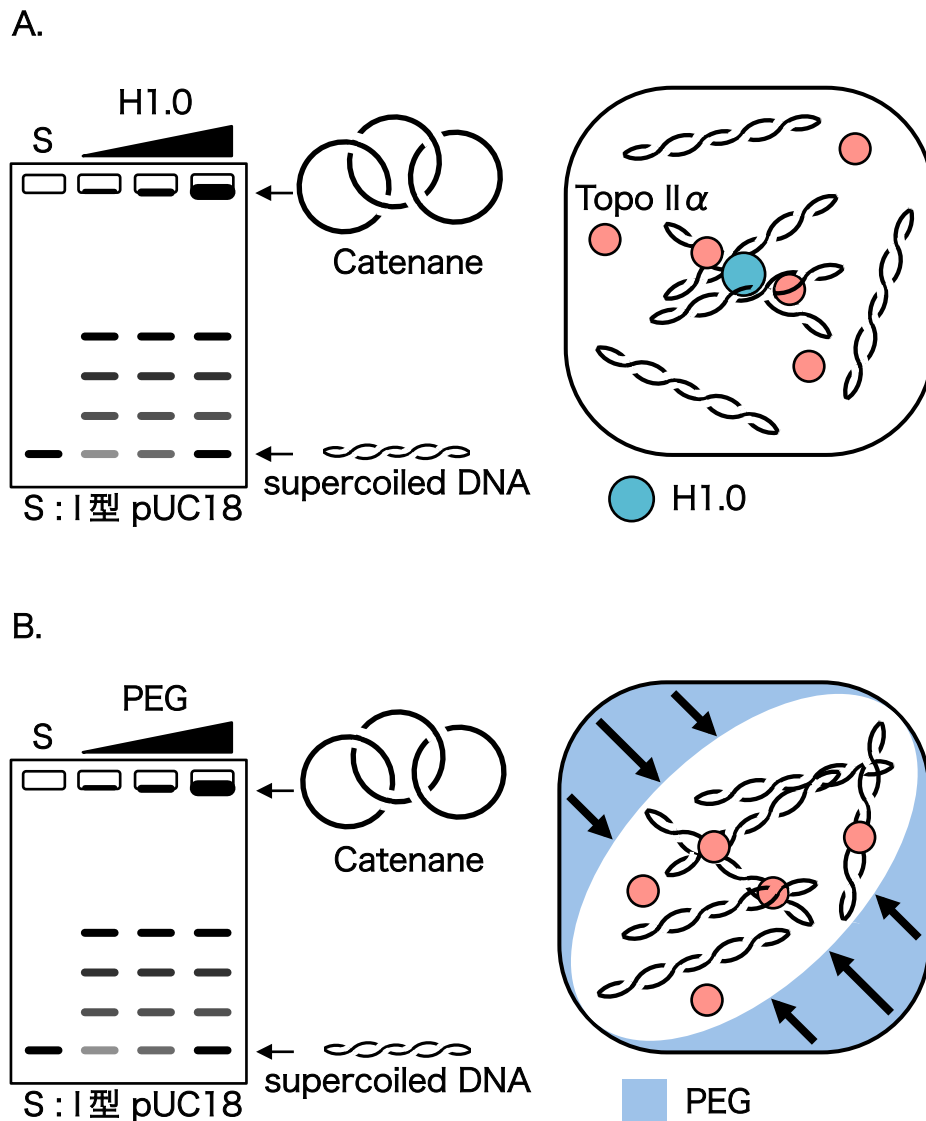


Figure 15. Catenation assayの原理と凝集因子の作用  
H1.0 (A.) とPEG (B.) を用いた Catenation assay  
の原理の概要を図示した。

CTD では結合画分に有意に DNA のバンドが認められ、結合した DNA の割合は 71.8% だった (Fig. 17)。1192-1289 でも、結合画分に有意に DNA のバンドが認められ、結合した DNA の割合は 86.4% だった (Fig. 17)。これらの結果から、1192-1289 領域が直鎖型 DNA に対する結合能を有していることが明らかになった。

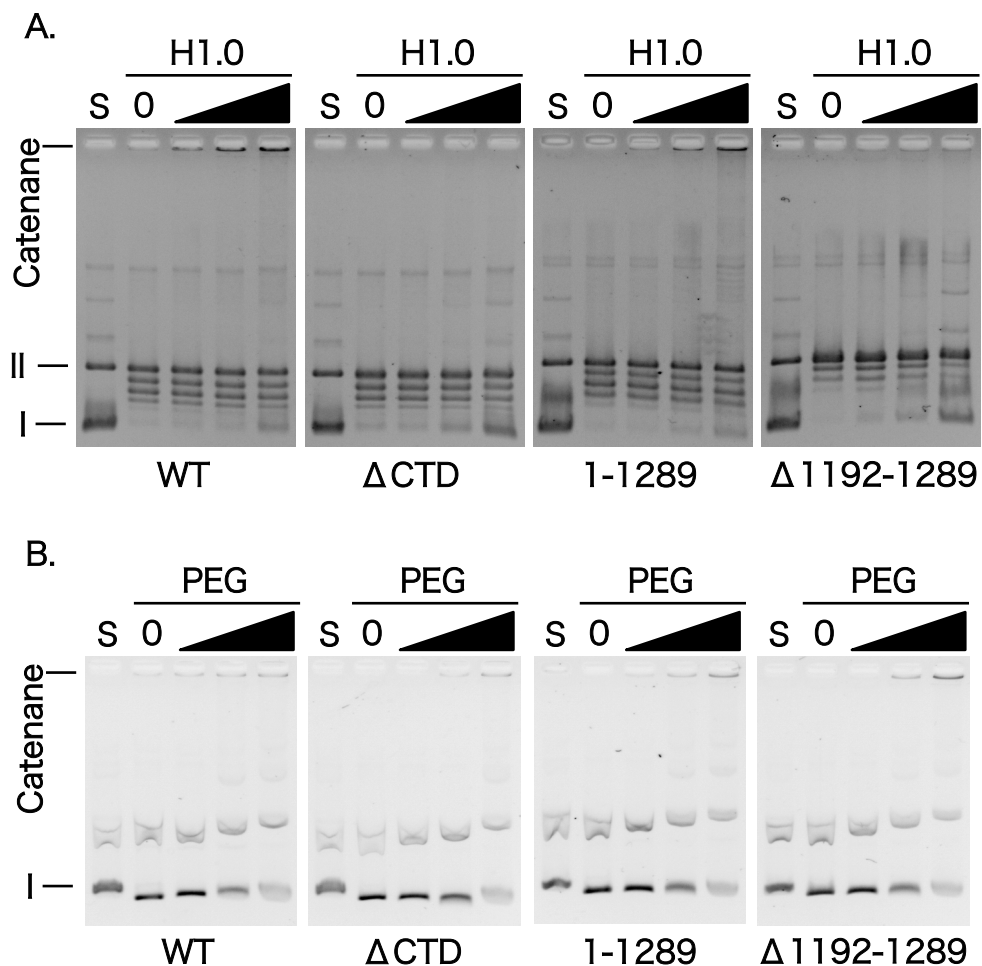


Figure 16. Topo II $\alpha$  変異体を使ったCatenation assay

A. H1.0を用いたCatenation assayの結果を示す。酵素反応後のDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は100 fmol使用した。H1.0は10、20、40 ng加えた。DNAの染色は後染めで行った。

B. PEGを用いたCatenation assayの結果を示す。酵素反応後のDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は100 fmol使用した。PEGは終濃度が1、5、10%になるように加えた。DNAの染色は先染めで行った。

### 3-12. Decatenation 反応における CTD の役割

ヒトの  $\alpha$  の CTD を欠失させると、Decatenation 反応の効率が WT に比べて約 2 倍程度低下することが示されている (Dickey & Osheroff, 2009)。これは  $\alpha$  の CTD が効率的な Decatenation 反応に関わっていることを示唆している。そこで  $\alpha$  の各種 CTD 欠質変異体の Decatenation 反応の効率を比較した。基質となる kDNA は、trypanosome *Crithidia fasciculata* のミトコンドリア DNA で、maxi circle に複数の

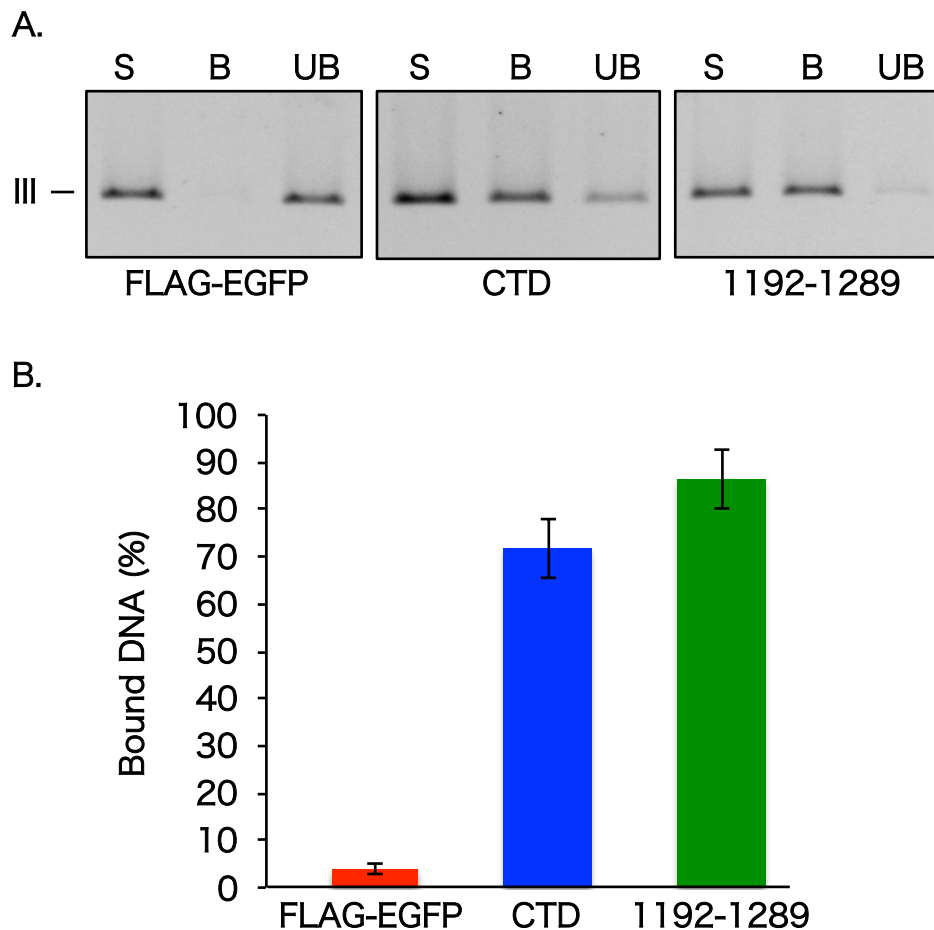


Figure 17. Topo II  $\alpha$  の CTD への直鎖型 DNA の結合

A. 結合画分と非結合画分に含まれる DNA をアガロースゲルを用いて解析した。III は直鎖型 DNA を示している。S は基質である直鎖型 pUC18 を示している。酵素は 100 fmol 使用した。B は結合画分、UB は非結合画分を示している。

B. 結合画分の直鎖型 DNA 量を Image J で定量し、結合画分に含まれる DNA の割合を算出した。実験は 3 回行い、平均と標準偏差をグラフで表した。

mini circle DNA が連なった構造をとっている。この DNA は巨大分子なので電気泳動を行ってもウェル内に留まるが、 $\alpha$  の触媒反応によって mini circle が遊離する (Fig. 18)。開環状と閉環状の mini circle があるため、Gel Red を含むアガロースゲル電気泳動では 2 本のバンドが検出される。

WT では、酵素量が十分に存在するため、ウェル内の Catenane が減少し、mini circle が認められた (Fig. 19)。 $\Delta$ CTD では mini circle は観察されるものの、WT よりも著しく反応の効率が低下した。これらの結果は、ヒトの結果と矛盾しない (Dickey & Osheroff, 2009)。1-1289 は、WT よりも強い Decatenation 活性を示した。 $\Delta$ 1192-1289 は、WT よりもやや低い Decatenation 活性を示した。以上の結果をまとめると、Decatenation 活性の強さ (反応効率) は、1-1289 >> WT >  $\Delta$ 1192-1289 >>  $\Delta$ CTD の順であった。したがって、CTD 内に kDNA を基質とした Decatenation 反応に影響する領域が存在することが示唆された。

### 3-13. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の細胞内局在

$\alpha$  と  $\beta$  の核小体局在に関わる領域は CTD に存在する (Fig. 8) (Onoda et al., 2014)。 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD を交換した場合に、それぞれの細胞内局在に影響するか、C 末端側に

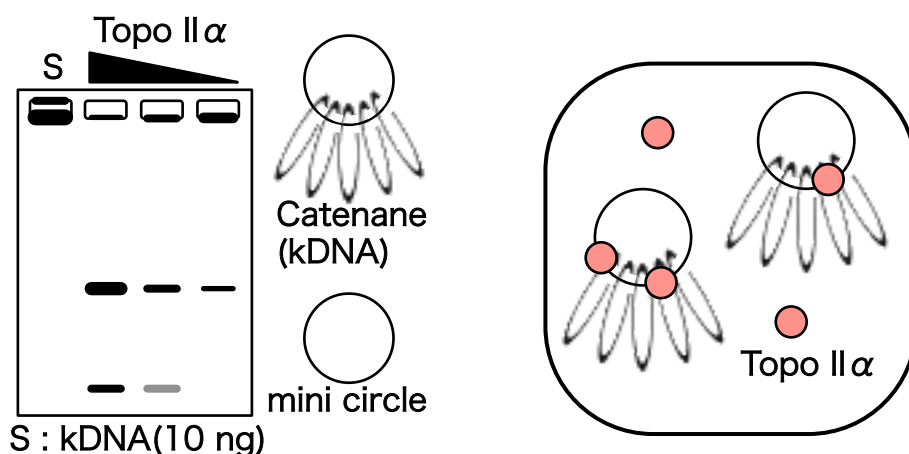


Figure 18. Decatenation assayの原理

kDNAは複数のmini circleが連環し、巨大分子を構築している。Topo II $\alpha$ が作用すると、mini circleが脱連環する。

EGFP を融合させた CTD 交換変異体の細胞内局在を観察した (Fig. 20)。

$\alpha$  の WT では、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 21)。 $\alpha/\beta$ CTD の EGFP 像では、核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 21)。この結果は、 $\alpha$  の CTD を  $\beta$  の CTD に置き換えても核小体に局在することを示している。 $\alpha/\beta$ 1251-1614 の EGFP 像では、核質に蛍光シグナルが認められたが、核小体にはっきりとした蛍光シグナルは観察されなかった。この結果は、 $\alpha/\beta$ CTD の核小体局在に  $\beta$  の CRD が影響したことを示している。

$\beta$  の WT の EGFP 像を観察すると、核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強

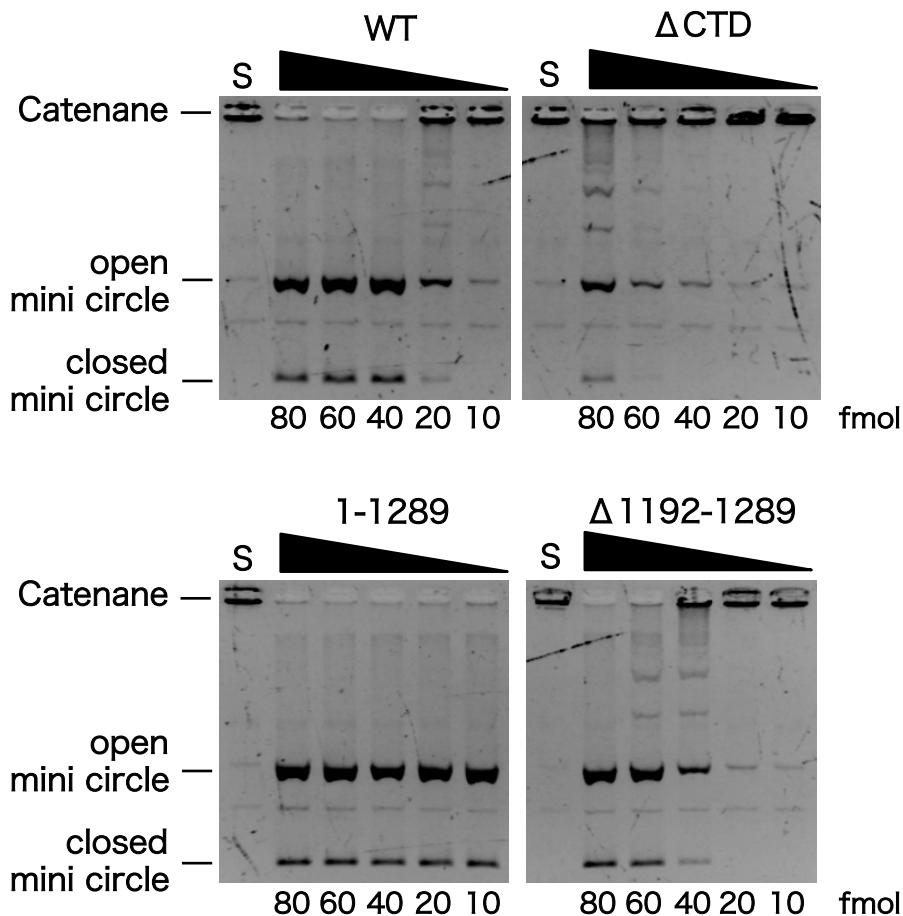


Figure 19. Topo II $\alpha$ 変異体を使ったDecatenation assay

酵素反応後のDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Sは基質であるkDNAを示している。酵素は80、60、40、20、10 fmolを使用した。

い蛍光シグナルが認められた (Fig. 21)。この結果は Onoda らの結果と相違ない (Onoda et al., 2014)。 $\beta/\alpha$ CTD の EGFP 像では、核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 21)。この結果は、 $\beta$  の CTD を  $\alpha$  の CTD に置き換えても核小体に局在することを示している。 $\beta/\alpha$ 1290-1527 の EGFP 像では、核全体に蛍光シグナルが認められ、核小体に強い蛍光シグナルが認められた (Fig. 21)。この結果は、 $\beta/\alpha$ CTD の核小体局在に  $\alpha$ 1192-1289 以外の領域が影響していることを示している。

### 3-14. Topo II assay に使用する Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の精製

精製した  $\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体 (Fig. 22) を SDS-PAGE で解析した (Supplementary Fig. S14)。 $\beta$  の WT は約 185.5 kDa、 $\Delta$ CTD は約 138.2 kDa、

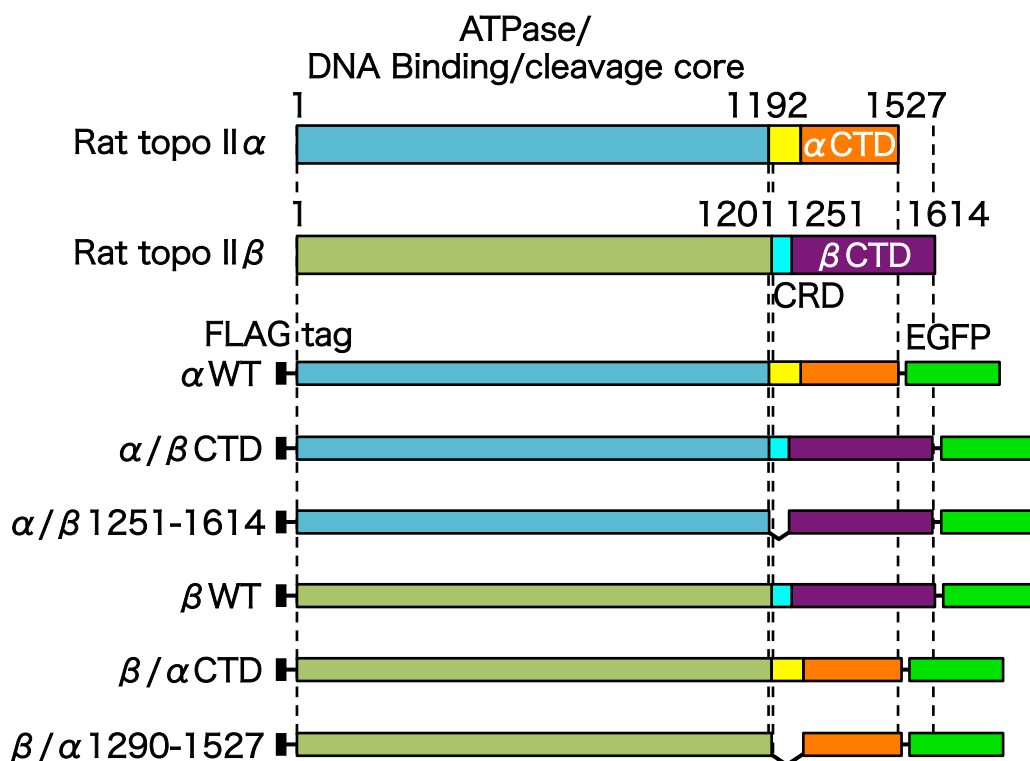


Figure 20. C末端側にEGFPタグを付加したTopo II  $\alpha$  と  $\beta$  のCTD交換変異体  
CRD : C-terminal regulatory domain

$\alpha/\beta$ CTD は約 183.5 kDa、 $\beta/\alpha$ CTD は約 174.8 kDa、 $\alpha/\beta$  1251-1614 は約 177.9 kDa、 $\beta/\alpha$  1290-1527 は約 163.9 kDa である。それぞれ推定される分子量付近の分子量マーカーの位置に単一のバンドが認められたため、純度の高いタンパク質が得られた (Supplementary Fig. S14)。

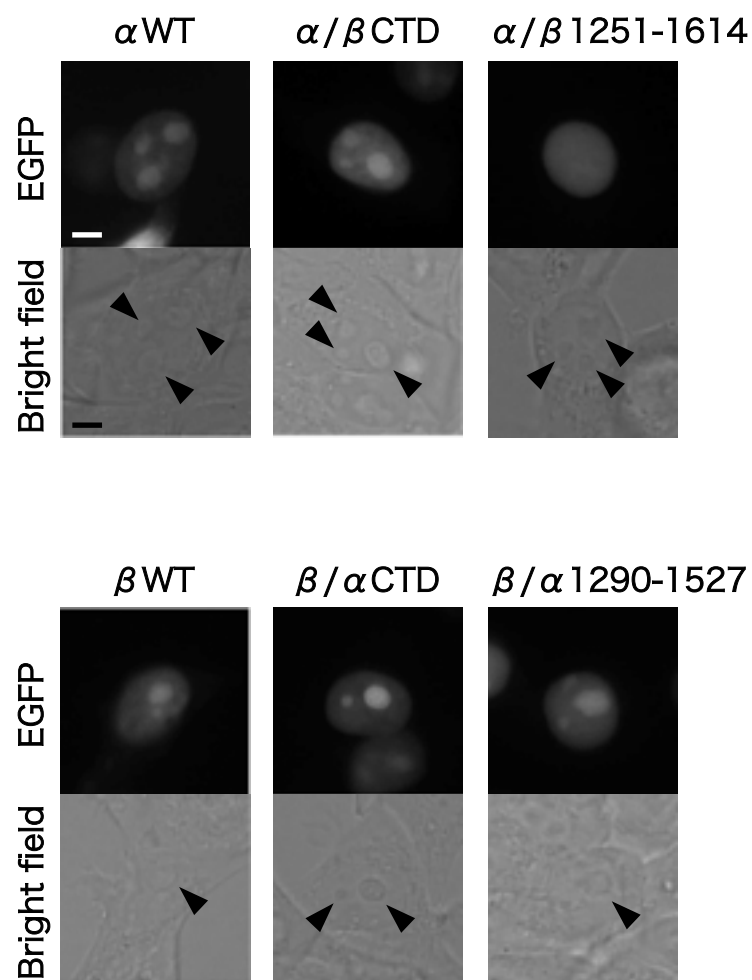


Figure 21. Topo II  $\alpha$  と  $\beta$  のCTD交換変異体の細胞核内局在の観察

C末端側にEGFPタグを付加したTopo II  $\alpha$  と  $\beta$  のCTD交換変異体を一過的に発現させたHEK293細胞の画像を示している。画像は蛍光顕微鏡で観察し、CCDカメラを用いて撮影した (40倍の対物レンズ、0.35倍の接続アダプター)。EGFPは蛍光像を、Bright fieldは明視野像を示している。矢じりは核小体を示している。スケールバーは5  $\mu$ mを示している。

### 3-15. 精製した Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の弛緩反応に基づく酵素活性

精製した酵素の活性を超らせん型 DNA の弛緩の程度を指標とした Relaxation assay で解析した。 $\alpha/\beta$ CTD では酵素量が十分に多いため、超らせん型 DNA が消失し、弛緩した DNA のみが認められた (Fig. 23)。酵素量を 2 倍希釈系列で減少させると、弛緩した DNA のバンドが減少して超らせん型 DNA が現れ、15 fmol 以下では超らせん型 DNA が顕著に認められた。同様に  $\beta$  の WT と  $\Delta$ CTD、全ての CTD 交換変異体の酵素活性を調べた。 $\alpha/\beta$  1251-1614 では 7.5 fmol 以下で超らせん型 DNA が認められた。 $\beta$  の WT では 3.8 fmol 以下で、 $\Delta$ CTD では 1.9 fmol 以下で超らせん型 DNA が認められた。 $\beta/\alpha$ CTD では 3.8 fmol 以下で、 $\beta/\alpha$  1290-1527 では 7.5 fmol 以下で超らせん型 DNA が認められた。これらの結果は、精製した  $\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体が十分な酵素活性を有することを示している。また、酵素活性に極端に大きな差は認められなかった。

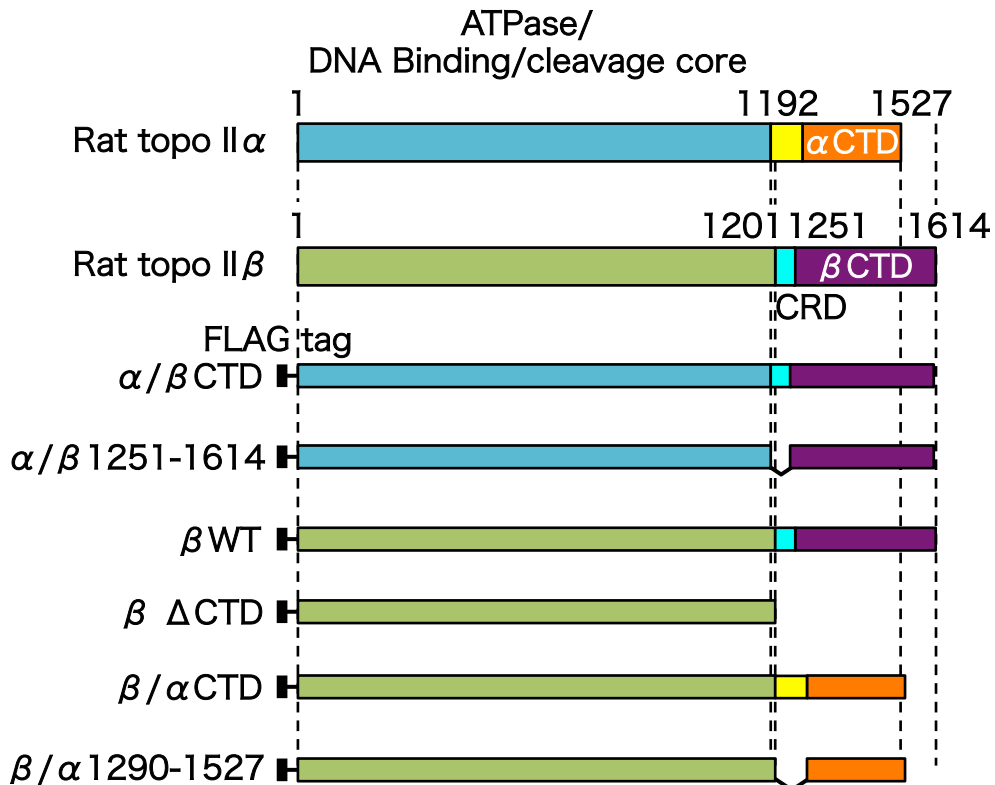


Figure 22. Topo II assayに使用したTopo II $\alpha$  と  $\beta$  のCTD交換変異体  
CRD : C-terminal regulatory domain



### 3-16. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体の酵素活性に及ぼす RNA の影響

$\alpha$  と  $\beta$  の CTD には RNA による酵素活性の抑制に関わる領域がそれぞれ存在する (Fig. 12) (Onoda et al., 2014)。これらの領域が CTD 交換変異体でも機能するか、RNA 存在下での Relaxation assay で解析した。

$\alpha/\beta$ CTD は RNA 非存在下では超らせん型 DNA のバンドが認められなかった (Fig. 24)。RNA を加えると、100 ng で超らせん型 DNA が認められ始め、1000 ng でははっきりと認められた。一方、 $\alpha/\beta$ 1251-1614 では 100 ng 以上の RNA を加えても超らせん型 DNA は認められなかった (Fig. 24)。したがって、 $\alpha/\beta$ CTD の RNA による酵素活性の抑制には、 $\beta$  の CRD が影響することが示された。

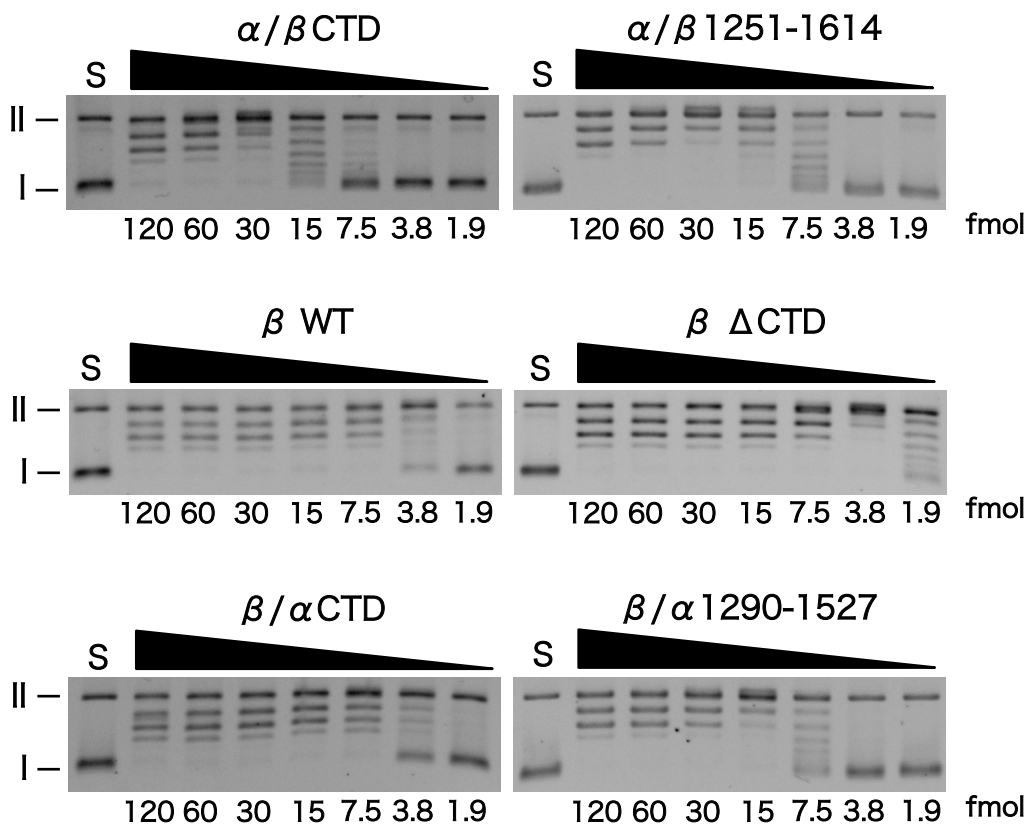


Figure 23. Topo II $\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体の Relaxation assay

Topo II $\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体の超らせん型 DNA の弛緩パターンの変化をアガロースゲルを用いて解析した。I は超らせん型 DNA、II は開環状 DNA を示している。S は基質である pUC18 を示している。酵素は 120 fmol からの 2 倍希釈列を使用した。

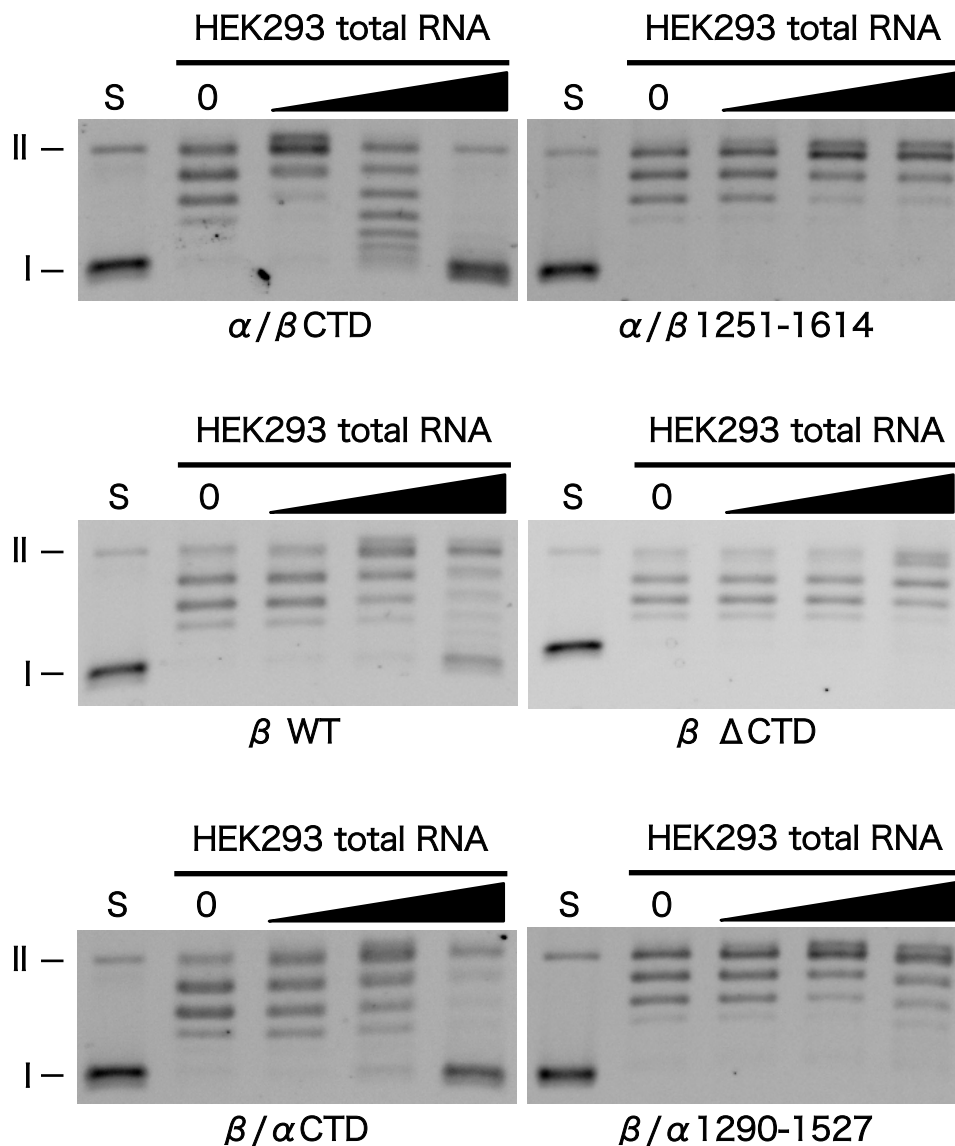


Figure 24. Topo II $\alpha$ と $\beta$ のCTD交換変異体の酵素活性に対するRNAの影響

HEK293細胞由来のtotal RNAによるTopo II $\alpha$ と $\beta$ のCTD交換変異体の超らせん型DNAの弛緩パターンの変化をアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。RNAは10、100、1000 ng加えた。 $\alpha/\beta$ CTDと $\alpha/\beta$ 1251-1614は60 fmol、 $\beta$ のWTと $\Delta$ CTD、 $\beta/\alpha$ CTD、 $\beta/\alpha$ 1290-1527は30 fmol使用した。

$\beta$  の WT では RNA を 100 ng 加えたところで弛緩した DNA のバンドパターンが変化し、1000 ng では超らせん型 DNA が観察された (Fig. 24)。 $\beta$  の  $\Delta$ CTD では 100 ng 以上の RNA を加えても超らせん型 DNA は認められなかった (Fig. 24)。これらの結果は、Onoda らの結果と同様であった (Onoda et al., 2014)。 $\beta/\alpha$ CTD では 100 ng 以上の RNA で超らせん型 DNA が認められた (Fig. 24)。一方、 $\beta/\alpha$ 1290-1527 では RNA を加えても超らせん型 DNA は認められなかった。したがって、 $\beta/\alpha$ CTD の RNA による酵素活性の抑制に、 $\alpha$  の 1192-1289 領域が影響することが示された。

以上の結果から、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD の RNA による酵素活性の抑制機構は、アイソザイム間で保存されていることが分かった。

### 3-17. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の CTD 交換変異体による Catenation 反応

$\alpha$  と  $\beta$  の CTD が有する DNA 結合能が効率的な Catenation の形成に関わっていることが報告されている (Kawano et al., 2016 ; Kawano et al., 2020)。CTD 交換変異体においてもそれぞれの CTD が Catenation 反応に寄与するか解析した。

$\alpha/\beta$ CTD では、H1.0 の量を増やしていくと、Catenane の形成が認められた。一方、 $\alpha/\beta$ 1251-1614 では、Catenane 形成の効率が低下した。 $\beta/\alpha$ CTD と  $\beta/\alpha$ 1290-1527 でも H1.0 の量を増やしていくと、ウェル内に留まる Catenane の形成が認められた (Fig. 25A)。

$\alpha/\beta$ CTD では、PEG の濃度を増加させていくと、Catenane の形成が認められた (Fig. 25B)。 $\alpha/\beta$ 1251-1614 や  $\beta/\alpha$ CTD、 $\beta/\alpha$ 1290-1527 でも同様に PEG の濃度を増加させていくと、Catenane の形成が認められた。

以上の結果から、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD を交換しても Catenane が形成されることが分かった。

### 3-18. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の Decatenation 反応における CTD の機能

Decatenation 反応における  $\alpha$  の酵素活性は、CTD を欠くことにより著しく低下する (Fig. 19) (Dickey & Osheroff, 2009)。一方、 $\beta$  では CTD を欠いても活性の低

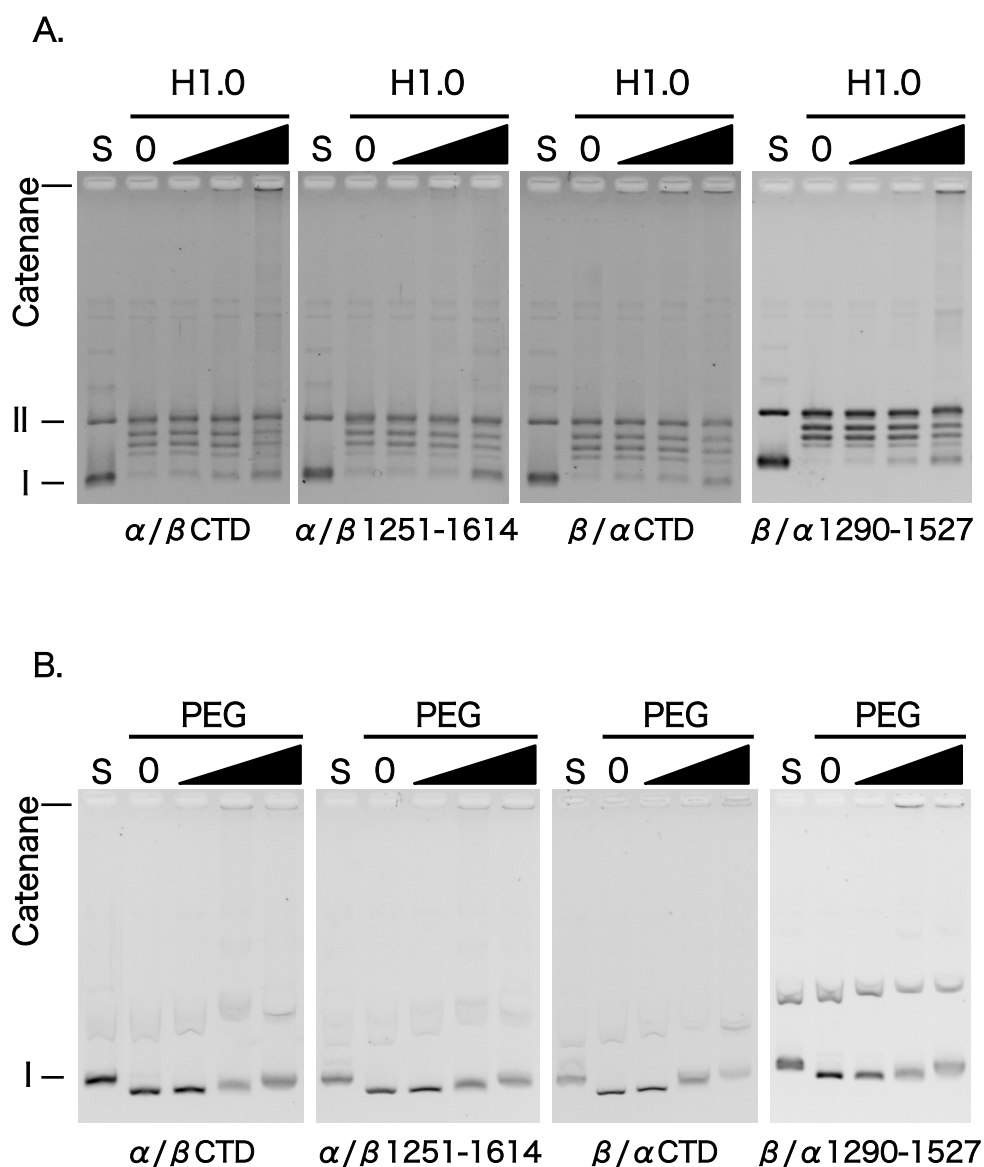


Figure 25. Topo II  $\alpha$  と  $\beta$  のCTD交換変異体のCatenation assay  
 A. H1.0を用いたCatenation assayの結果を示す。酵素反応後のDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は100 fmol使用した。H1.0は10、20、40 ng加えた。DNAの染色は後染めで行った。  
 B. PEGを用いたCatenation assayの結果を示す。酵素反応後のDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Iは超らせん型DNAを示している。Sは基質であるpUC18を示している。酵素は100 fmol使用した。PEGは終濃度が1、5、10%になるように加えた。DNAの染色は先染めで行った。

下は認められない (Kawano et al., 2020)。これらのことは、Decatenation 反応における CTD の役割が  $\alpha$  と  $\beta$  で異なっており、 $\alpha$  では CTD がこの反応に必要であり、 $\beta$  では CTD が必要とされていないことを示唆している。そこで、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体の Decatenation 反応に対するそれぞれの CTD の影響について解析した。

$\alpha$  の WT は 20 fmol 以下で、 $\Delta$ CTD は 60 fmol 以下でほぼ mini circle が認められなくなった (Fig. 19)。 $\alpha/\beta$ CTD では、mini circle は 12.5 fmol 以下でほとんど認められなくなった (Fig. 26)。これらの結果は、 $\alpha/\beta$ CTD が  $\alpha$  の  $\Delta$ CTD に比べて Decatenation 反応を促進したことを示している。同様に、 $\alpha/\beta$ 1251-1614 も  $\alpha$  の  $\Delta$ CTD に比べて Decatenation 反応を促進した。

$\beta/\alpha$ CTD には十分な Decatenation 活性が認められた (Fig. 26)。 $\beta/\alpha$ 1290-1527 でも、ウェル内の Catenane の減少と、mini circle が認められたが、 $\beta/\alpha$ CTD より活性は低かった。

以上の結果から、 $\alpha$  の効率的な Decatenation 反応には CTD が必要で、 $\beta$  の CTD でも相補されることが明らかになった。また、 $\beta$  の Decatenation 反応に  $\alpha$  の CTD が限定的ではあるが影響することが分かった。

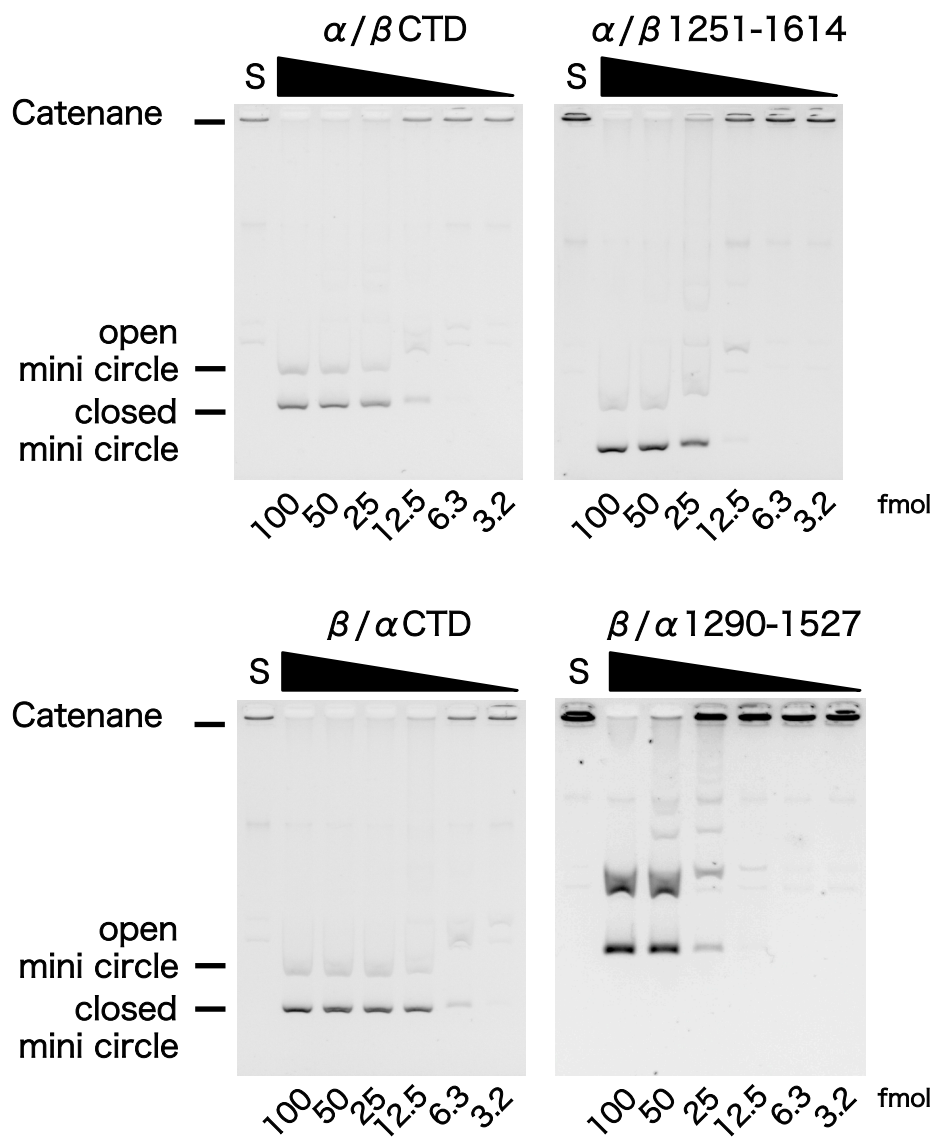


Figure 26. Topo II  $\alpha$ と $\beta$ のCTD交換変異体のDecatenation assay  
 酵素反応後のDNAをアガロースゲルを用いて解析した。Sは基質であるkDNAを示している。酵素は100 fmolからの2倍希釈列を使用した。

## 4. 討論

### 4-1. Topo II $\alpha$ の細胞核内局在

これまでに  $\alpha$  が間期細胞核内の核質と核小体をダイナミックに移動していることが報告されている (Christensen et al., 2002)。しかしながら、核小体局在のメカニズムは分かっていなかった。本研究の結果から、 $\alpha$  の 1192-1289 領域と RNA が核小体局在に関わることが明らかになった (Fig. 8、9)。

$\alpha$  の CTD に RNA が結合することから、 $\alpha$  は 1192-1289 領域を介して RNA に繫留されることによって間期細胞核内の核小体に局在すると考えられる (Fig. 27A、27B) (Yasuda et al., in press)。核小体タンパク質が核小体に局在するための条件が、短い合成ペプチドを使った局在解析から示されている (Martin et al., 2015)。その条件として、NLS に近接する連続したアルギニンが 4 個以上含まれること、等電点が 12.6 以上であること、正に帯電していることが挙げられている。さらに、核小体の pH が酸性に傾いていること、アルギニンと RNA が結合することも示されている。 $\alpha$  の 1192-1289 領域には 9 個のアルギニンが含まれている。この領域内の 1255-1264 領域にアルギニンが 4 つ密集している。核小体局在要件としての等電点を GENETYX を用いて予測すると、1255-1264 領域の等電点は 12.51 となった。 $\alpha$  の 1255-1264 領域にはアルギニン以外のアミノ酸が含まれているため、12.6 よりも低くなったと考えられる。1192-1289 領域には塩基性アミノ酸のアルギニン以外にリジンも多く含まれている。そのため、1192-1289 領域との RNA 結合が核小体局在に関与していると考えられる。 $\alpha$  は核質と核小体を移動していることから、1192-1289 領域への RNA の結合とシャトリングに関係性があると考えられる。

### 4-2. Topo II $\alpha$ の酵素活性制御機構

$\alpha$  の酵素活性が一部のホモリボポリマー存在下で抑制されることや (Park et al., 2008)、 $\alpha$  の CTD が試験管内での効率的な Catenane の形成に関わっていることは報告されているが (Kawano et al., 2016)、RNA による酵素活性の抑制に関わる領域や

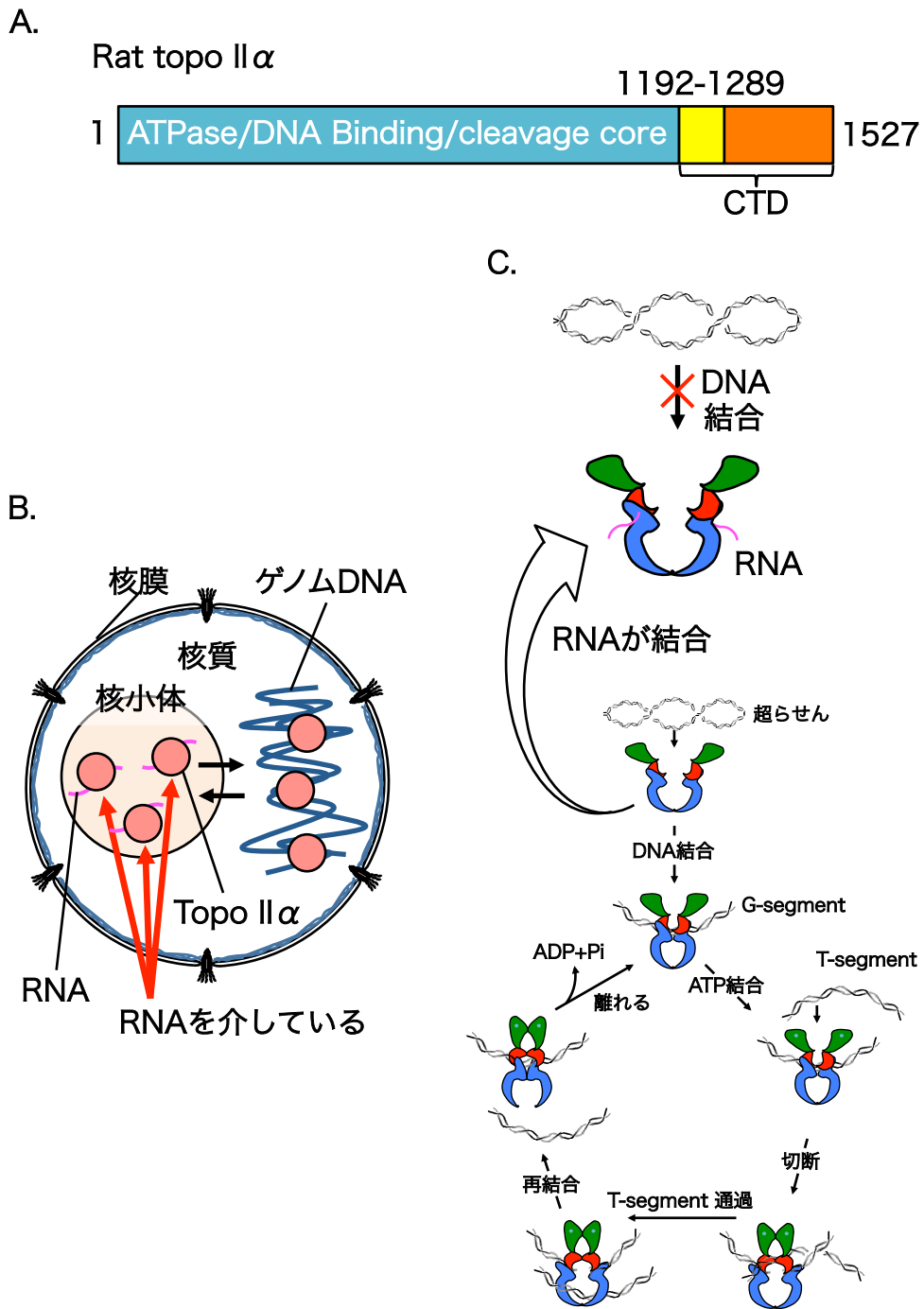


Figure 27. Topo II $\alpha$ の核小体局在と酵素活性制御におけるRNAの役割

A. Topo II $\alpha$ の各ドメイン構造を示し、CTDにある1192-1289領域がRNAやDNAと相互作用する。

B. Topo II $\alpha$ は1192-1289領域とRNAを介することによって核小体に局在する。

C. Topo II $\alpha$ は1192-1289領域がRNAとの結合によってDNA結合を抑制し、酵素活性が抑制される。



DNA との相互作用領域の同定には至っていない。本研究では、 $\alpha$  の欠質変異体による試験管内酵素反応により、RNA による酵素活性の抑制や DNA との相互作用に関わる領域を同定した (Fig. 12、14)。

HEK293 細胞由来の total RNA を加えた Relaxation assay と DNA-binding assay の結果において、1-1289 の酵素活性は抑制され、DNA の結合量は減少した (Fig. 12、14)。 $\alpha$  の CTD が RNA 結合能を有していることや (Yasuda et al., in press)、1192-1289 領域に DNA 結合活性があることから (Fig. 17)、1192-1289 領域が RNA との結合によって  $\alpha$  の DNA 結合を抑制し、酵素活性の調節に寄与していると考えられる (Fig. 27A、27C)。

rG<sub>30</sub> を用いた結果では、WT と 1-1289 が  $\Delta$ CTD と  $\Delta$ 1192-1289 よりも rG<sub>30</sub> に対する感受性が高かった。 $\alpha$  が局在している核小体には G に富む DNA または RNA による G カルテット構造 (G4 構造) が存在している (Laguerre et al., 2016)。さらに、この G4 構造は転写、複製、翻訳、テロメアの構造形成に重要であると考えられている (Rhodes & Lipps, 2015)。HEK293 細胞由来の total RNA と rG<sub>30</sub> で酵素活性の抑制が認められたことから、RNA による G4 構造が  $\alpha$  の酵素活性制御メカニズムに関与していると考えられる。しかし、今回用いた rG<sub>30</sub> が G4 構造を形成するかは不明であるため、 $\alpha$  の酵素活性は G4 構造ではなく G に富んだ RNA によって制御されている可能性も考えられる。さらに、細胞核内には様々なタンパク質が存在しており、 $\alpha$  は核質と核小体に局在するため、核内に存在する G に富んだ RNA や特定配列の RNA、小さい RNA などや、RNA を介してタンパク質との複合体を形成することで酵素活性を制御している可能性が示唆される。

Catenation assay の結果から、 $\alpha$  の 1192-1289 領域が効率的な Catenane 形成に重要であることが示された。クライオ電子顕微鏡を使った構造解析から、ヒトの  $\alpha$  の CTD の N 末端部分のごく一部ではあるが、G-segment を保持する様子が示された (Broeck et al., preprint)。構造の示されたヒトの CTD の一部分と相同な配列が部分的に 1192-1289 領域に含まれることから、おそらく、1192-1289 による G-segment の保持が、凝集した DNA への酵素の近接に寄与し、効率的な Catenane の形成が起こ

るのではないかと考えられた。

Decatenation assay の結果から、 $\alpha$  の CTD が Decatenation 反応にも関わっていることが示された。1-1289 では WT の 25% の酵素量でも十分な mini circle が検出され、 $\Delta$ 1192-1289 は WT とあまり変わらなかった。この結果から、Decatenation 反応には  $\alpha$  の CTD 全体が関わっていることが示唆された。欠質変異体ごとにそれぞれ異なる酵素活性が観察されたが、CTD による Decatenation 反応の調節機構の解明にはさらなる解析が必要である。

#### 4-3. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の保存性

ラットの  $\alpha$  と  $\beta$  のアミノ酸配列の相同性を比較すると、CTD を除いた領域では 79.4% と高い値を示したが、CTD では 27% と低い値を示した (Fig. 28A)。ウェブツール (Protein DisOrder prediction System) を使って、それぞれのアミノ酸配列からタンパク質の立体構造を予測すると、相同性の高い領域では立体構造をとることが示された (Fig. 28B)。一方、相同性の低い CTD は、 $\alpha$  と  $\beta$  ともに Disorder probability が 0.5 を越えており、特定の立体構造をとらないことが示された。 $\beta$  の CRD と  $\alpha$  の 1192-1289 領域のアミノ酸配列を比較すると、1192-1289 領域内の N 末端側に  $\beta$  の Phi-K motif と、1192-1289 領域内の C 末端側に K-stretch に対応する配列が認められた (Fig. 28C) (Onoda et al., 2014)。これらの共通性に加えて、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD には塩基性アミノ酸のクラスターがいくつか存在する。タンパク質の天然変性領域は、核酸やタンパク質と相互作用することにより、機能を持った立体構造を形成することが知られているため、 $\alpha$  と  $\beta$  の CTD も RNA との静電的な相互作用によって、特定の立体構造を取り、核小体での酵素活性に寄与しているのではないかと考えられる。

間期細胞核内における  $\alpha$  と  $\beta$  の局在は、それぞれの CTD を交換しても大きな変化は認められず、WT と同じように核小体への局在が観察された。この結果は、ヒトの酵素を使った報告と同じである (Linka et al., 2007)。 $\beta$  の CRD を欠いた CTD の交換変異体である  $\alpha/\beta$  1251-1614 は核小体に局在しなかったが、これは  $\beta$  の CRD が  $\alpha$  の CTD との交換変異体でも機能していることを裏付けている。一方、予想に反し

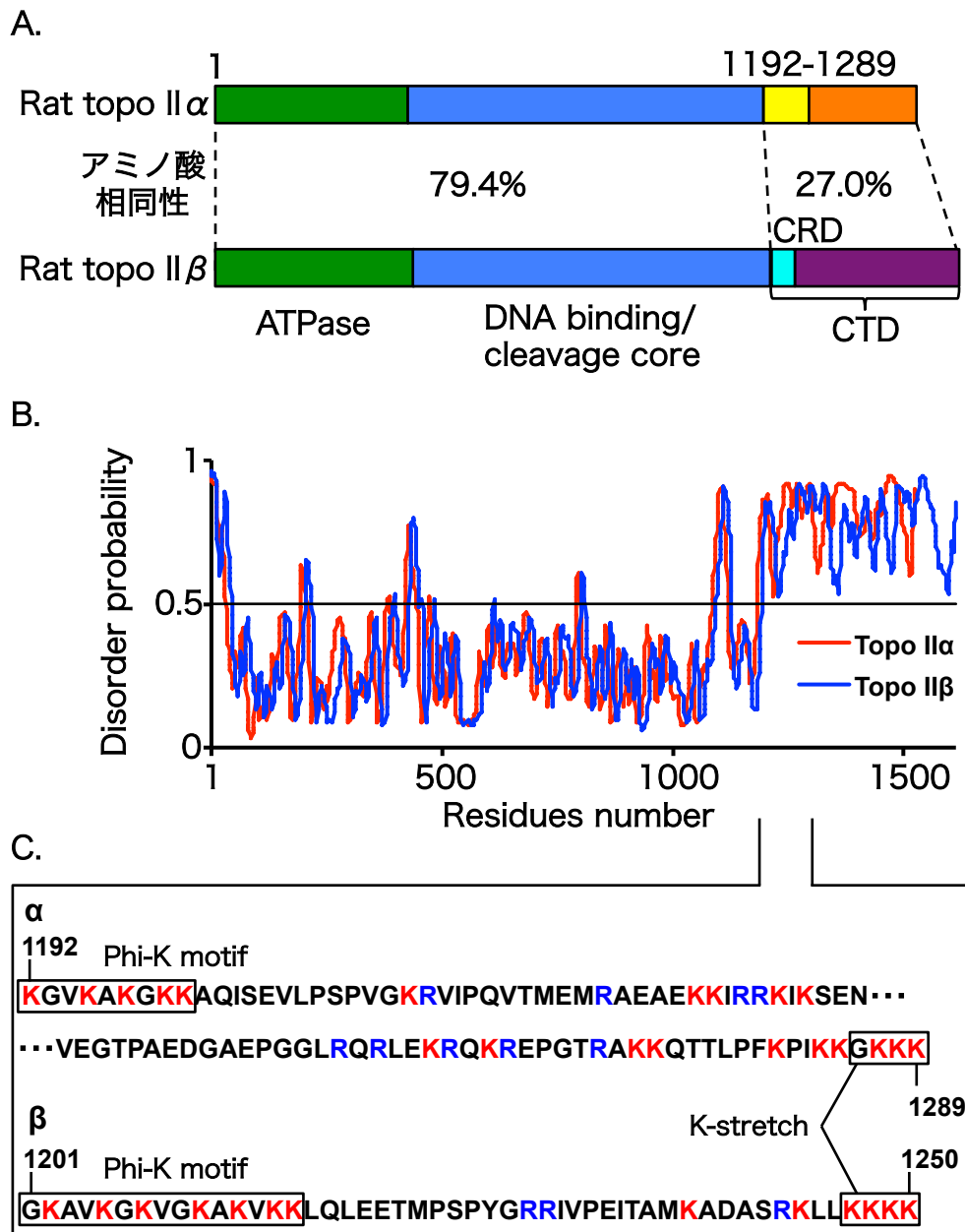


Figure 28. Topo II $\alpha$ と $\beta$ のCTDの相同性

A. Topo II $\alpha$ と $\beta$ のN末端側(ATPase domainとDNA binding/cleavage core domain)とCTDのアミノ酸相同性を示す。

CRD : C-terminal regulatory domain

A. Topo II $\alpha$ と $\beta$ の立体構造をそれぞれのアミノ酸配列からProtein Disorder prediction System (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>)を用いて予測した。0.5は閾値を示している。

B. Topo II $\alpha$ の1192-1289とTopo II $\beta$ のCRDのアミノ酸配列を並べて比較した。塩基性アミノ酸のリシンとアルギニンをそれぞれ赤と青でハイライトしている。

て、 $\beta/\alpha$ 1290-1527 は核小体に局在した。 $\alpha$ の 1290-1527 のみでは核小体に局在しないため、 $\beta/\alpha$ 1290-1527 の核小体局在に別の要因が関わっているのかもしれない。

$\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体の酵素活性は、WT と同じように抑制された。この RNA による酵素活性の抑制には、 $\alpha$ の 1192-1289 と  $\beta$ の CRD がそれぞれ CTD 交換変異体でも機能していることが考えられ、実際にこれらの領域を欠失させた  $\alpha/\beta$ 1251-1614 と  $\beta/\alpha$ 1290-1527 の酵素活性は RNA によって抑制されなかった (Fig. 24)。CTD 交換変異体でも  $\alpha$ の 1192-1289 と  $\beta$ の CRD が機能することから、CTD を介した RNA による酵素活性の制御機構が  $\alpha$  と  $\beta$  で保存されていると考えられる。

$\alpha$  と  $\beta$  の CTD 交換変異体は、WT と同じように Catenane を形成した。 $\alpha$ と  $\beta$ の CTD が持つ直鎖型の DNA に対する結合能が、効率的な Catenane 形成に関わるが (Kawano et al., 2016 ; Kawano et al., 2020)、CTD 交換変異体でもこの DNA 結合能が機能したことが考えられた。 $\alpha/\beta$ 1251-1614 では、Catenane の形成が若干認められたが、 $\beta$  の 1251-1614 に DNA 結合に関わる領域が含まれているためであることが考えられた (Kawano et al., 2020 ; Onoda et al., 2014)。 $\alpha$ の 1192-1289 に直鎖型 DNA への結合能があることから (Fig. 17)、 $\beta/\alpha$ 1290-1527 では、Catenane の形成効率が低下することが期待されたが、WT と同じように Catenane が形成された。 $\alpha$  の  $\Delta$ 1192-1289 や  $\beta$  の  $\Delta$ CTD で形成される Catenane の量は、WT に対してごくわずかであることから、 $\beta/\alpha$ 1290-1527 の Catenane 形成には別の要因が関わっているのかもしれない。

Decatenation 反応において、 $\alpha$ と  $\beta$ の CTD 交換変異体は、それぞれの WT と同等の酵素活性を示した (Yasuda et al., in press)。CTD を欠いた  $\alpha$ の Decatenation 反応の効率は著しく低下するが、 $\alpha/\beta$ CTD では  $\beta$  の CTD が  $\alpha$ の CTD の機能を相補することができたため、Decatenation 反応の効率が維持されたと考えられる。

#### 4-4. Topo II $\alpha$ の制御機構の重要性

細胞分裂時の染色体分離はゲノム DNA の正常な継承に重要な反応であるため、この

反応が正常に行われなければ染色体数の異常、欠失などが原因の染色体不安定性が起こり、がんの発生にもつながる (Roschke & Kirsch, 2010 ; Hanahan & Weinberg, 2011 ; Al-Sohaily et al., 2012 ; Abbas et al., 2013)。

小細胞肺癌患者の組織サンプルを免疫組織化学的に解析すると、 $\alpha$  の発現量が増加しているとの報告がある (Dingemans et al., 1999)。その他にも、悪性細胞における  $\alpha$  の発現量の増加や、乳がん細胞の  $G_0$  期と  $G_1$  期に  $\alpha$  の発現量の増加が認められている (Villman et al., 2002)。また、がん細胞では  $\alpha$  の遺伝子のコピー数の増加が認められることから、 $\alpha$  がゲノム不安定性による細胞のがん化に重要な役割をしている可能性が示されている (Chen et al., 2015)。

本研究では、1192-1289 領域と RNA が  $\alpha$  の核小体局在と酵素活性に関わっていることを明らかにした。細胞核内局在に関わる RNA や、相互作用タンパク質、さらに CTD の立体構造を解明することで、 $\alpha$  が関与する病気やがんの治療や、これらの原因究明に繋がると考える。

## 5. 結論

Topo II $\alpha$  の間期細胞核内の核小体への局在には CTD の N 末端側の 1192-1289 領域と RNA が関係している。Topo II $\alpha$  の酵素活性は 1192-1289 領域に RNA が結合し、DNA 結合が抑制されることで、酵素反応が低下することから、RNA 結合による DNA 結合の制御によって酵素反応は制御されている。従って、Topo II $\alpha$  が核小体に局在している時は酵素活性が抑制された状態で保存されていると考えられる。超らせん型 DNA と H1.0 を用いた Catenation assay の結果より、染色体の凝縮に関する Catenation 形成には 1192-1289 領域が重要であることが示された。kDNA を用いた Decatenation assay の結果より、染色体の分離に関する Decatenation 反応には CTD が重要であることが示された。脊椎動物の Topo II にはアイソザイムである  $\alpha$  と  $\beta$  があり、核小体局在、Catenane 形成、Decatenation 反応に対する機能は CTD 間で保存されている。さらに、RNA による酵素活性の制御は DNA binding/cleavage core domain 側の CTD の領域で保存されている。

Topo II $\alpha$  は抗がん剤の標的として知られている。Topo II $\alpha$  の反応低下や過剰反応などによる染色体への影響は細胞死やアポトーシス、細胞のがん化に繋がる。そのため、Topo II $\alpha$  の制御機構の解明は今後の医療に対する新たなアプローチ方法となる。

## 6. 謝辞

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始適切なる御指導、御校閲を賜りました池田正五教授に多大なる感謝の意を表します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始適切なる御指導、御校閲を賜りました河野真二先生に多大なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、ご助力いただきました片岡健教授に深く感謝致します。

本論文の作成ならびに予備審査委員会では、多くのご助言を頂きました岡山理科大学南善子教授、中村元直教授、神吉けい太准教授、岡山大学 寺東宏明教授に深く感謝致します。

また、本研究を行うにあたって数多くの御助言、御協力を賜りました同研究室の先輩方、そして、公私にわたって激励、および協力し合って楽しい実験生活を送らせていただいた同輩、後輩諸君の皆様に深く感謝いたします。

最後に、このような勉学の機会を与えて下さり、かつ現在に至るまで多大な援助、そして理解を頂いた両親に心より感謝し、御礼申し上げます。

## 7. 引用文献

Abbas T, Keaton MA, Dutta A. (2013) Genomic instability in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5 (3) :a012914.

Adachi N, Miyaike M, Kato S, Kanamaru R, Koyama H, Kikuchi A. (1997) Cellular distribution of mammalian DNA topoisomerase II is determined by its catalytically dispensable C-terminal domain. *Nucleic Acids Res*, 25 (15) :3135-42.

Agostinho M, Rino J, Braga J, Ferreira F, Steffensen S, Ferreira J. (2004) Human topoisomerase II $\alpha$ : targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell*, 15 (5) :2388-400.

Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. (2012) Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 (9) :1423-31.

Baldi MI, Benedetti P, Mattoccia E, Tocchini-Valentini GP. (1980) In vitro catenation and decatenation of DNA and a novel eucaryotic ATP-dependent topoisomerase. *Cell*, 20 (2) :461-7.

Broeck AV, Lotz C, Drillien R, Bedez C, Lamour V. (2020) Structural basis for the allosteric regulation of Human Topoisomerase 2 $\alpha$ . Preprint at bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.08.23.263558>



Carpenter AJ, Porter AC. (2004) Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. *Mol Biol Cell*, 15 (12) :5700-11.

Chen T, Sun Y, Ji P, Kopetz S, Zhang W. (2015) Topoisomerase IIalpha in chromosome instability and personalized cancer therapy. *Oncogene*, 34 (31) :4019-31.

Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C. (2002) Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol*, 157 (1) :31-44.

Deweese JE, Osheroff N. (2009) The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res*, 37 (3) :738-48.

Dickey JS, Osheroff N. (2009) Impact of the C-terminal domain of topoisomerase IIalpha on the DNA cleavage activity of the human enzyme. *Biochemistry*, 44 (34) :11546-54.

Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE, Giaccone G. (1999) Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 5 (8) :2048-58.

Earnshaw WC, Halligan B, Cooke CA, Heck MM, Liu LF. (1985) Topoisomerase II is a structural component of mitotic chromosome scaffolds. *J Cell Biol*, 100 (5) :1706-15.

Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 73 (11) :3872-6.

Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. Cell, 144 (5) :646-74.

Kawano S, Kato Y, Okada N, Sano K, Tsutsui K, Tsutsui KM, Ikeda S. (2016) DNA-binding activity of rat DNA topoisomerase II  $\alpha$  C-terminal domain contributes to efficient DNA catenation in vitro. J Biochem, 159 (3) :363-9.

Kawano S, Fujimoto K, Yasuda K, Ikeda S. (2020) DNA binding activity of the proximal C-terminal domain of rat DNA topoisomerase II $\beta$  is involved in ICRF-193-induced closed-clamp formation. PLoS One, 15 (9) :e0239466.

Kimura K, Saijo M, Ui M, Enomoto T. (1994) Growth state- and cell cycle-dependent fluctuation in the expression of two forms of DNA topoisomerase II and possible specific modification of the higher molecular weight form in the M phase. J Biol Chem, 269 (2) :1173-6.

Laguerre A, Wong JM, Monchaud D. (2016) Direct visualization of both DNA and RNA quadruplexes in human cells via an uncommon spectroscopic method. Sci Rep, 6:32141.

Lane AB, Giménez-Abián JF, Clarke DJ. (2013) A novel chromatin tether domain controls topoisomerase II $\alpha$  dynamics and mitotic chromosome formation. J Cell Biol, 203 (3) :471-86.

Lee JH, Berger JM. (2019) Cell Cycle-Dependent Control and Roles of DNA Topoisomerase II. *Genes (Basel)* , 10 (11) :859.

Linka RM, Porter AC, Volkov A, Mielke C, Boege F, Christensen MO. (2007) C-terminal regions of topoisomerase IIalpha and IIbeta determine isoform-specific functioning of the enzymes in vivo. *Nucleic Acids Res*, 35 (11) :3810-22.

Lyu YL, Wang JC. (2003) Aberrant lamination in the cerebral cortex of mouse embryos lacking DNA topoisomerase IIbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (12) :7123-8.

Lyu YL, Lin CP, Azarova AM, Cai L, Wang JC, Liu LF. (2006) Role of topoisomerase IIbeta in the expression of developmentally regulated genes. *Mol Cell Biol*, 26 (21) :7929-41.

Martin RM, Ter-Avetisyan G, Herce HD, Ludwig AK, Lättig-Tünnemann G, Cardoso MC. (2015) Principles of protein targeting to the nucleolus. *Nucleus*, 6 (4) :314-25.

Meczes EL, Gilroy KL, West KL, Austin CA. (2008) The impact of the human DNA topoisomerase II C-terminal domain on activity. *PLoS One*, 3 (3) :e1754.

Onoda A, Hosoya O, Sano K, Kiyama K, Kimura H, Kawano S, Furuta R, Miyaji M, Tsutsui K, Tsutsui KM. (2014) Nuclear dynamics of topoisomerase IIbeta reflects its catalytic activity that is regulated by binding of RNA to the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res*, 42 (14) :9005-20.

Park SW, Parrott AM, Fritz DT, Park Y, Mathews MB, Lee CG. (2008) Regulation of the catalytic function of topoisomerase II alpha through association with RNA. *Nucleic Acids Res*, 36 (19) :6080-90.

Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

Rhodes D, Lipps HJ. (2015) G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res*, 43 (18) :8627-37.

Roschke AV, Kirsch IR. (2010) Targeting karyotypic complexity and chromosomal instability of cancer cells. *Curr Drug Targets*, 11 (10) :1341-50.

Sengupta T, Mukherjee M, Mandal C, Das A, Majumder HK. (2003) Functional dissection of the C-terminal domain of type II DNA topoisomerase from the kinetoplastid hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Res*, 31 (18) :5305-16.

Seol Y, Gentry AC, Osheroff N, Neuman KC. (2013) Chiral discrimination and writhe-dependent relaxation mechanism of human topoisomerase II $\alpha$ . *J Biol Chem*, 288 (19) :13695-703.

Sng JH, Heaton VJ, Bell M, Maini P, Austin CA, Fisher LM. (1999) Molecular cloning and characterization of the human topoisomerase IIalpha and IIbeta genes: evidence for isoform evolution through gene duplication. *Biochim Biophys Acta*, 1444 (3) :395-406.

Tiwari VK, Burger L, Nikolettou V, Deogracias R, Thakurela S, Wirbelauer C, Kaut J, Terranova R, Hoerner L, Mielke C, Boege F, Murr R, Peters AH, Barde YA, Schübeler D. (2012) Target genes of Topoisomerase II $\beta$  regulate neuronal survival and are defined by their chromatin state. Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (16) :E934-43.

Tsutsui K, Tsutsui K, Sano K, Kikuchi A, Tokunaga A. (2001) Involvement of DNA topoisomerase II $\beta$  in neuronal differentiation. J Biol Chem, 276 (8) :5769-78.

Tsutsui KM, Sano K, Tsutsui K. (2005) Dynamic view of the nuclear matrix. Acta Med Okayama, 59 (4) :113-20.

Villman K, Ståhl E, Liljegren G, Tidefelt U, Karlsson MG. (2002) Topoisomerase II- $\alpha$  expression in different cell cycle phases in fresh human breast carcinomas. Mod Pathol, 15 (5) :486-91.

Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH. (1991) Proliferation- and Cell Cycle-dependent Differences in Expression of the 170 Kilodalton and 180 Kilodalton Forms of Topoisomerase II in NIH-3T3 Cells. Cell Growth Differ, 2 (4) :209-14.

Yang X, Li W, Prescott ED, Burden SJ, Wang JC. (2000) DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development. Science, 287 (5450) :131-4.

Yasuda K, Kato Y, Ikeda S, Kawano S. (2021) Regulation of catalytic activity and nucleolar localization of rat DNA topoisomerase II $\alpha$  through its C-terminal domain. In press at Genes Genet Syst. <https://doi.org/10.1266/ggs.20-00038>

筒井公子 (2004) II 型 DNA トポイソメラーゼと神経細胞分化. 岡山医学会雑誌, 116,103-107.

## 8. 業績一覧

発表論文：査読有り

1. Yasuda K, Kato Y, Ikeda S, Kawano S. (2021) Regulation of catalytic activity and nucleolar localization of rat DNA topoisomerase II  $\alpha$  through its C-terminal domain. in press at Genes & Genetic Systems. <https://doi.org/10.1266/ggs.20-00038>
2. Kawano S, Fujimoto K, Yasuda K, Ikeda S. (2020) DNA binding activity of the proximal C-terminal domain of rat DNA topoisomerase II  $\beta$  is involved in ICRF-193-induced closed-clamp formation. PLoS ONE 15 (9) : e0239466.

学会発表：

〈国際学会〉

1. Kazushi Y., Shogo I., and Shinji K. The C-terminal domain of rat DNA topoisomerase II  $\alpha$  is involved in the regulation of catalytic activity and nucleolar localization. CELL BIO Virtual 2020, The American Society for Cell Biology, December 14, 2020

〈国内学会〉

1. 安田和史、加藤佑梨、池田正五、河野真二：DNA トポイソメラーゼ II  $\alpha$  の RNA による酵素活性制御および細胞核内局在に影響する領域の同定、日本遺伝学会 第 90 回大会、2018 年 9 月（奈良）
2. 安田和史、池田正五、河野真二：DNA トポイソメラーゼ II  $\alpha$  の核小体局在と酵素活性制御機構の解析、日本農芸化学会 中四国支部 第 54 回講演会、2019 年 6 月（岡山）
3. 安田和史、池田正五、河野真二：DNA トポイソメラーゼ II  $\alpha$  の間期核小体局在メカニズムの解析、日本遺伝学会 第 91 回大会、2019 年 9 月（福井）

4. 安田和史、池田正五、河野真二 : DNA トポイソメラーゼ II $\alpha$  の C 末端領域を介した核小体局在と酵素活性制御機構の解析、日本遺伝学会 第 92 回大会、2020 年 9 月 (熊本)



## 9. 補足資料

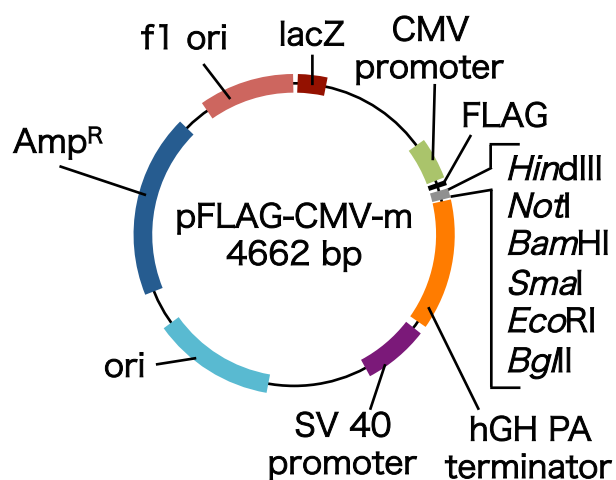
Table S1. 変異体作製に用いたプライマー

Vector	target	Primer		Sequence	Restriction Site
pFLAG-cm2-EGFP	Topo II $\alpha$ 1192-1289	Sense	a1192F	TCCCCCGGGAAGGGGGTGAAAGCGAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	a1289R-ExT	TCCCCCGGGTTTCTTTTTCCCTTTTTTGAT	<i>Sma</i> I
	Topo II $\alpha$ 1290-1527	Sense	a1290F	TCCCCCGGGAACCCTTGGTCTGATTCTGAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	a1527R-ExT	CCGCCCCGGTAAGAAGAGGTCGTCATCCGA	<i>Sma</i> I
pFLAG-top2a_1-1191	Topo II $\alpha$ 1192-1289	Sense	a1192F	TCCCCCGGGAAGGGGGTGAAAGCGAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	a1289R-exT	TCCCCCGGGTTATTTCTTTTTCCCTTTTTTGAT	<i>Sma</i> I
	Topo II $\alpha$ 1290-1527	Sense	a1290F	TCCCCCGGGAACCCTTGGTCTGATTCTGAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	a1527R-exT	CCGCCCCGGTTAGAAGAGGTCGTCATCCGA	<i>Sma</i> I
pFLAG-top2a_1-1191-EGFP	Topo II $\beta$ 1201-1614	Sense	b1201F	TCCCCCGGGAAGCAGTGAAAGGCAAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	b1614R-ExT	GTGCTCCCCGGGTAAATTAACATTGC	<i>Sma</i> I
	Topo II $\beta$ 1251-1614	Sense	b1251F	GAAGCCCGGGGATCCTGATACTACAGTTG	<i>Sma</i> I
		Antisense	b1614R-ExT	GTGCTCCCCGGGTAAATTAACATTGC	<i>Sma</i> I
pFLAG-top2b_1-1199-EGFP	Topo II $\alpha$ 1192-1527	Sense	a1192F	TCCCCCGGGAAGGGGGTGAAAGCGAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	a1527R-ExT	CCGCCCCGGTAAGAAGAGGTCGTCATCCGA	<i>Sma</i> I
pFLAG-top2a_1-1191	Topo II $\beta$ 1201-1614	Sense	b1201F	TCCCCCGGGAAGCAGTGAAAGGCAAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	b1614R-exT	GTGCTCCCCGGGTTAATTAACATTGC	<i>Sma</i> I
pFLAG-top2b_1-1199	Topo II $\alpha$ 1192-1527	Sense	a1192F	TCCCCCGGGAAGGGGGTGAAAGCGAA	<i>Sma</i> I
		Antisense	a1527R-exT	CCGCCCCGGTTAGAAGAGGTCGTCATCCGA	<i>Sma</i> I

Table S2. 変異体作製時のコロニーダイレクトPCRに用いたプライマー

mutant	Primer		Sequence
pFLAG-top2a_1192-1289-EGFP	Sense	a1192F	TCCCCCGGAAGGGGTGAAAGCGAA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2a_1290-1527-EGFP	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2a_Δ1192-1289-EGFP	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2a_1-1289	Sense	a1192F	TCCCCCGGAAGGGGTGAAAGCGAA
	Antisense	C-CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
pFLAG-top2a_Δ1192-1289	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	C-CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
pFLAG-top2a/bctd-EGFP	Sense	b1450F	TTTGACAGTAATGAAGAAGACACCA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2a/b1251-1614-EGFP	Sense	b1450F	TTTGACAGTAATGAAGAAGACACCA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2b/actd-EGFP	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2b/a1290-1527-EGFP	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	EGFP-R	GACTTCAGGGTCAGCTTGC
pFLAG-top2a/bctd	Sense	b1450F	TTTGACAGTAATGAAGAAGACACCA
	Antisense	C-CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
pFLAG-top2a/b1251-1614	Sense	b1450F	TTTGACAGTAATGAAGAAGACACCA
	Antisense	C-CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
pFLAG-top2b/actd	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	C-CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC
pFLAG-top2b/a1290-1527	Sense	a1355F	TCCCCCGGAAGACCAAATGCCCAAAA
	Antisense	C-CMV-24	TATTAGGACAAGGCTGGTGGGCAC

A.



B.

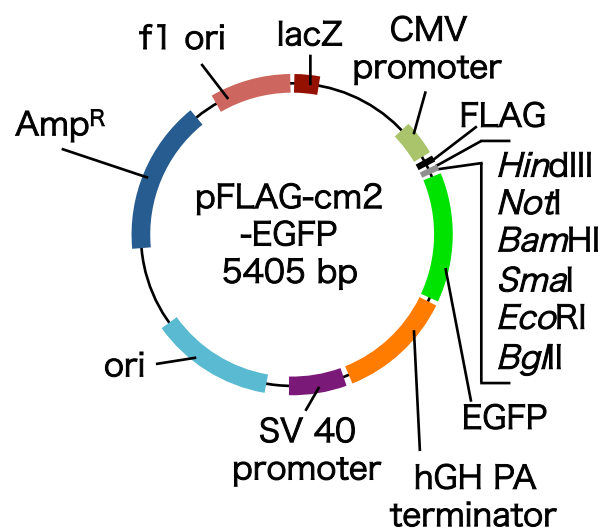


Figure S1. 変異体作製に用いたプラスミド

A. 岡山大学の筒井教授から分けていただいたpFLAG-CMV-mの構造を示す (Onoda et al., 2014)。

B. 岡山大学の筒井教授から分けていただいたpFLAG-cm2-EGFPの構造を示す (Onoda et al., 2014)。

pFLAG-CMV-m

```

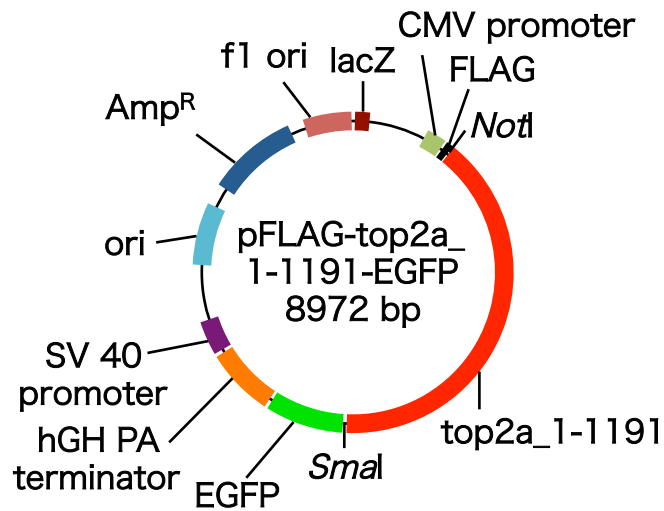
841 CGCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC
901 TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT
                                         FLAG tag
961 TAGCGGCCGC ATGGAGTTGT CACCGCTGCA GCCTGTAAAT GAAAATATGC TACTCAACAA
    top2a
1021 AAAGAAGAAT GAAGATGGCA AGAAAAGACT GTCCGTTGAA AGAATCTATC AGAAAAAAC
1081 ACAACTGGAA CATATACTGC TCCGCCAGA TACCTACATC GGCTCTGTGG AGTTAGTGAC
1141 CCAGCAAATG TGGGTTTACG ATGAAGATGT TGGTATTAAC TACAGGGAAG TCACTTTTGT
1201 TCCTGGTTTG TATAAAATCT TTGATGAAAT TCTAGTTAAT GCTGCTGATA ACAAACAAAG
1261 GGACCCAAAA ATGTCTTGCA TTAGAGTCAC AATTGATGCA GAAAATAATT TAATTAGTAT
1321 ATGGAATAAT GGAAAAGGAA TTCCTGTTGT TGAACACAAA GTGGAGAAAA TGTATGTCCC
      .
      .
      .
5041 AATGCCCCCA AAAAATACTA AAAAAGCACT GAAGCCACAG AAGAGCTCCA CATCAGTTGA
5101 TCTTGAAAGT GATGGGAAAG ACAGTGTGCC AGCTTCTCCA GCGCCTTCTG CTGCTGACGT
5161 CCCAGCTGAG ACTGAACCCT CCAAGCCGTC CTCCAACAG ACAGTGGGAG TGAAGAGGAC
5221 AATAACCAAA GGTCAGTCTT TAACCTCCAC TGCTGGCACC AAAAAGAGAG CTGTACCAAA
5281 GGAGACCAAG TCAGATTCAG CCTTGAATGC TCATGTCTCC AAAAAGCCTG CTCCTGCCAA
5341 AGCCAAGAAC AGTCGCAAGA GGAAGCCATC TTCTTCTGAC AGCTCGGACT CTGAGTTTGA
5401 GAAGGCGATT TCTAAAGGTG CCACAAGCAA GAAACCCAAG GGAGAGGAGC GGGATTTCCA
5461 TGTGGACTTA GATGACTCTG TGGCTCCTCG AGCAAAATCC GGACGAGCAA GGAAGCCGAT
5521 TAAGTACCTG GAGGAGTCGG ATGACGACCT CTTCTAAACC GGAATTCAT CGATAGATCT
5581 GATGGGTGGC ATCCCTGTGA CCCCTCCCA GTGCCTCTCC TGGCCCTGGA AGTTGCCACT
pFLAG-CMV-m

```

Figure S2. 変異体作製に用いたpFLAG-top2aの塩基配列の一部を示す。

茶色の枠はpFLAG-CMV-mを示している。赤色の枠はtop2aの塩基配列の一部を示している。黒色の線の部分はFLAG tagを示している。

A.



B.

**pFLAG-cm2-EGFP**

```

841 CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC
901 TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT
                                     FLAG tag
961 TAGCGGCCGC ATGGAGTTGT CACCGCTGCA GCCTGTAAAT GAAAATATGC TACTCAACAA
top2a_1-1191
1021 AAAGAAGAAT GAAGATGGCA AGAAAAGACT GTCCGTTGAA AGAATCTATC AGAAAAAACC
1081 ACAACTGGAA CATATACTGC TCCGCCAGA TACCTACATC GGCTCTGTGG AGTTAGTGAC
      .
      .
      .
4321 GGAGTCTGGA CCGACCTTCA ACTACCTTCT TGATATGCCC CTGTGGTATC TAACCAAGGA
4381 GAAGAAGGAC GAGCTGTGCA AGCAAAGGGA CGAGAAGGAA CAAGAGCTCA ACACGTTAAA
4441 GAAAAGACT CCATCGGATT TGTGGAAGGA AGACCTGGCT GCTTTTGTGG AAGAACTGGA
4501 GGTGTTGAA GCCAAGGAAA AACAGGATGA ACAAGTAGGA CTTCCCGGGA ATTCTCGAGT
4561 AGATCTGCCG GTCGCCACCA TGGTGAGCAA GGGCGAGGAG CTGTTACCGG GGTGTTGCC
pFLAG-cm2-EGFP
  
```

Figure S3. 変異体作製に用いたpFLAG-top2a\_1-1191-EGFP  
 A. 変異体作製に用いたpFLAG-top2a\_1-1191-EGFPの構造を示す。  
 B. pFLAG-top2a\_1-1191-EGFPのtop2a\_1-1191の一部と前後の塩基配列を示す。茶色の枠はpFLAG-cm2-EGFPを示している。赤色の枠はtop2a\_1-1191の塩基配列の一部を示している。黒色の線の部分はFLAG tagを示している。

A.

```

TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT 960
TAGCGGCCGC GGGATCCCG GGAAGGGGT GAAAGCGAAG GGAAGAAAG CGCAGATATC 1020
                BamHI SmaI a1192F
TGAAGTCCTG CCTTCTCCTG TGGGAAAAG GGTTCATCCG CAGGTGACTA TGGAGATGAG 1080
AGCTGAGGCA GAGAAGAAAA TCAGGAGGAA AATTAAGAGC GAGAATGTTG AGGGCACCCC 1140
TGCTGAGGAT GGTGCCGAGC CAGGAGCCT CCGCAGAGA CTAGAGAAGA GGCAGAAGAG 1200
AGAGCCAGGT ACCAGGGCAA AGAAGCAAAC TACATTGCCA TTTAAGCCTA TCAAAAAGG 1260
GAAAAAGAAA CCCGGGAATT CTCGAGTAGA TCTGCCGTC GCCACCATGG TGAGCAAGGG 1320
                SmaI EcoRI
CGAGGAGCTG TTCACCGGG TGGTGCCAT CCTGGTCGAG CTGGACGGCG ACGTAAACGG 1380
CCACAAGTTC AGCGTGCCG GCGAGGGCGA GGGCGATGCC ACCTACGGCA AGCTGACCCT 1440
                                                EGFP-R

```

B.

```

TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT 960
TAGCGGCCGC GGGATCCCG GGAACCCTTG GTCTGATTCT GAATCAGATA TGAGCAGTAA 1020
                BamHI SmaI
CGAAAGTAAT TTTGATGTCC CTCCACGAGA GAAAGAGCCA AGAATTGCTG CAACAAAAGC 1080
CAAATTCACG GCGGATTTAG ACTCTGATGA CGATTCTCA GGCTTGATG AGAAGGATGA 1140
GGATGAAGAT TTCTCCCAT TAGATGATAC TCCACCTAAG ACCAAAATGC CCCCAAAAA 1200
                                                a1355F
.
.
.
CACTGTGGCT CCTCGAGCAA AATCCGGACG AGCAAGGAAG CCGATTAAGT ACCTGGAGGA 1680
GTCGGATGAC GACCTTTCT TACCCGGAA TTCGAGTA GATCTGCCG TCGCCACCAT 1740
                SmaI EcoRI
GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC TGTTACCGG GGTGGTGCC ATCCTGGTCG AGCTGGACGG 1800
CGACGTAAC GGCCACAAGT TCAGCGTGTC CGGCGAGGGC GAGGGCGATG CCACCTACGG 1860
CAAGCTGACC CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG CCCGTGCCCT GGCCACCCCT 1920
EGFP-R

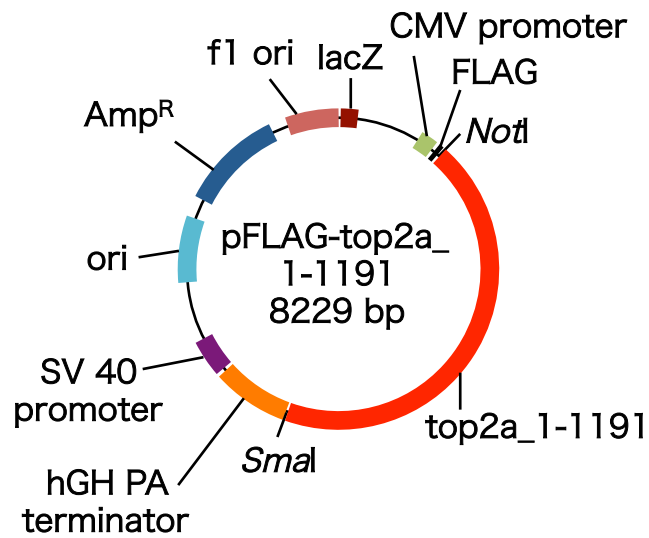
```

Figure S4. pFLAG-top2a\_1192-1289-EGFPとpFLAG-top2a\_1290-1527-EGFPの塩基配列

制限酵素切断部位とプライマーの位置を示している。赤色の枠は*Bam*HI、黒色の枠は*Sma*I、青色の枠は*Eco*RIによる切断部位を示している。桃色の矢印はプライマーの位置と向きを示している。  
A. pFLAG-top2a\_1192-1289-EGFPのtop2a\_1192-1289と前後の塩基配列を示す。  
B. pFLAG-top2a\_1290-1527-EGFPのtop2a\_1290-1527の一部と前後の塩基配列を示す。



A.



B.

**pFLAG-CMV-m**

```

841 CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC
901 TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT
                                FLAG tag
961 TAGCGGCCGC ATGGAGTTGT CACCGCTGCA GCCTGTAAAT GAAAATATGC TACTCAACAA
top2a_1-1191
1021 AAAGAAGAAT GAAGATGGCA AGAAAAGACT GTCCGTTGAA AGAATCTATC AGAAAAAAGC
1081 ACAACTGGAA CATATACTGC TCCGCCAGA TACCTACATC GGCTCTGTGG AGTTAGTGAC
      .
      .
      .
4321 GGAGTCTGGA CCGACCTTCA ACTACCTTCT TGATATGCCC CTGTGGTATC TAACCAAGGA
4381 GAAGAAGGAC GAGCTGTGCA AGCAAAGGGA CGAGAAGGAA CAAGAGCTCA ACACGTTAAA
4441 GAAAAGACT CCATCGGATT TGTGGAAGGA AGACCTGGCT GCTTTTGTGG AAGAACTGGA
4501 GTTTGTGAA GCCAAGGAAA AACAGGATGA ACAAGTAGGA CTTCCCGGA ATTCATCGAT
4561 AGATCTGATG GGTGGCATCC CTGTGACCCC TCCCAGTGC CTCTCCTGGC CCTGGAAGTT

```

**pFLAG-CMV-m**

Figure S6. 変異体作製に用いたpFLAG-top2a\_1-1191  
A. 変異体作製に用いたpFLAG-top2a\_1-1191の構造を示す。  
B. pFLAG-top2a\_1-1191のtop2a\_1-1191の一部と前後の塩基配列を示す。茶色の枠はpFLAG-CMV-mを示している。赤色の枠はtop2a\_1-1191の塩基配列の一部を示している。黒色の線の部分はFLAG tagを示している。



**pFLAG-CMV-m**

841 CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC

901 TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT  
**FLAG tag**

961 TAGCGGCCGC GCTGCCATGG CCAAGTCCAG CCTCGCGGGC GTTGACGGGG CGCTGACCTG  
**top2b**

1021 GGTGAACAAT GCTGCAAAAA AGGAAGAGTT GGAGACAGCG AACAAAAATG ATTCTTCCAA

1081 GAAGTTGTCT GTTGAGAGAG TGTACCAGAA GAAGACCCAA CTGGAGCATA TTCTCCTCG

1141 TCCTGATACA TACATTGGAT CAGTGAACC ACTGACACAG TTAATGTGGG TGTATGACGA

1201 AGATGTAGGC ATGAACTGCA GAGAGGTTAC CTTTGTCCG GGCTTATACA AGATCTTTGA

1261 TGAAATTTTG GTCAATGCTG CTGACAACAA GCAGAGGGAT AAGAACATGA CCTGTATTAA

1321 GGTTTCTATT GATCCTGAAT CTAATATTAT AAGCATTTGG AATAATGGAA AAGGCATTCC  
 .  
 .  
 .

5341 AGAAGACACC ACATCTGTTT TTGCACCATC ATTTGGTCTG AAGCAAACAG ATAAAGTCC

5401 AAGTCAAACA GTCGCTGCTA AAAAGGGTAA AGCACCTTCA GATGCAGCAG CCCCTAAGGC

5461 CAAGAGAGCC CCTAGACAGA GGAAGGTAGT AGAGCCTGCA AACTCCGACT CGGATTCTGA

5521 ACTCGGCAAC ATTCCAAAGA AGACGGCCGC ACCGAAAGGT AAAGGCCGAG GGGCAAAGAA

5581 AAGGAAAGCA TCAGGCTCAG AAAATGAAGG TGATTATAAC CCTGGCAGGA AACCATCTAA

5641 AACAGCCAGC AAGAAACCGA AGAAAACGTC TTTTGATCAG GATTCAGATG TAGACATCTT

5701 CCCTTCAGAC TTCACTTCTG AACCACTGC TCTCCACGG ACTGGTCGGG CTAGGAAAGA

5761 AGTAAAATAT TTTGCAGAGT CTGATGAAGA AGAAGACGTT GATTTTGCAA TGTTTAATTA

5821 AGTGCCCGGG AATTCATCGA TAGATCTGAT GGGTGGCATC CCTGTGACCC CTCCCCAGTG

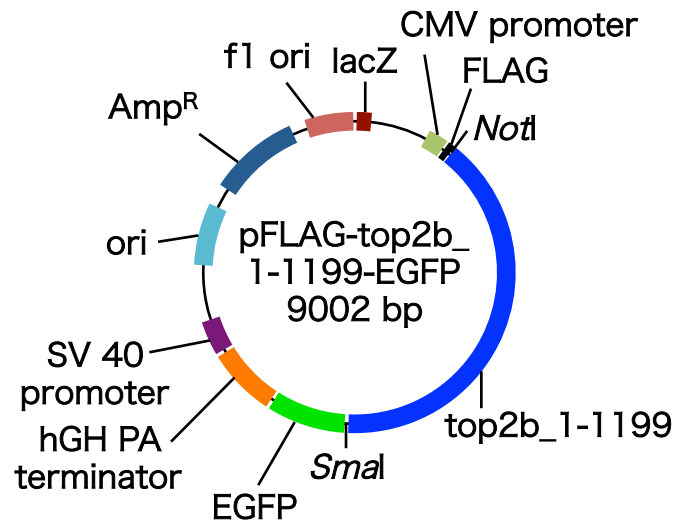
5881 CCTCTCCTGG CCCTGGAAGT TGCCACTCCA GTGCCACCA GCCTTGTCTT AATAAAATTA

**pFLAG-CMV-m**

Figure S7. 変異体作製に用いたpFLAG-top2bの塩基配列の一部を示す。

茶色の枠はpFLAG-CMV-mを示している。青色の枠はtop2bの塩基配列の一部を示している。黒色の線の部分はFLAG tagを示している。

A.



B.

**pFLAG-cm2-EGFP**

```

CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC 900
TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT 960
TAGCGGCCGC GCTGCCATGG CCAAGTCCAG CCTCGCGGGC GTTGACGGGG CGCTGACCTG 1020
top2b_1-1199
GGTGAACAAT GCTGCAAAA AGGAAGAGTT GGAGACAGCG AACAAAAATG ATTCTTCCAA 1080
GAAGTTGTCT GTTGAGAGAG TGTACCAGAA GAAGACCCAA CTGGAGCATA TTCTCCTCG 1140
.
.
AAATATGTCT CTATGGTCTC TTAATAAAGA AAAAGTTGAA GAACTCATT AAGAGAGAGA 4440
TACAAAAGGA CGAGAGGTTA ATGATCTCAA AAGGAAATCT CCCTCAGATC TTTGAAAAGA 4500
AGATTTAGCA GCATTTGTTG AAGAATTGGA TAAAGTGGAA GCACAAGAAC GAGAAGACAT 4560
TCTGGCAGGG ATGCCCGGGA ATTCTCGAGT AGATCTGCCG GTCGCCACCA TGGTGAGCAA 4620
GGGCGAGGAG CTGTTACCG GGGTGGTGCC CATCCTGGTC GAGCTGGACG GCGACGTAAA 4680

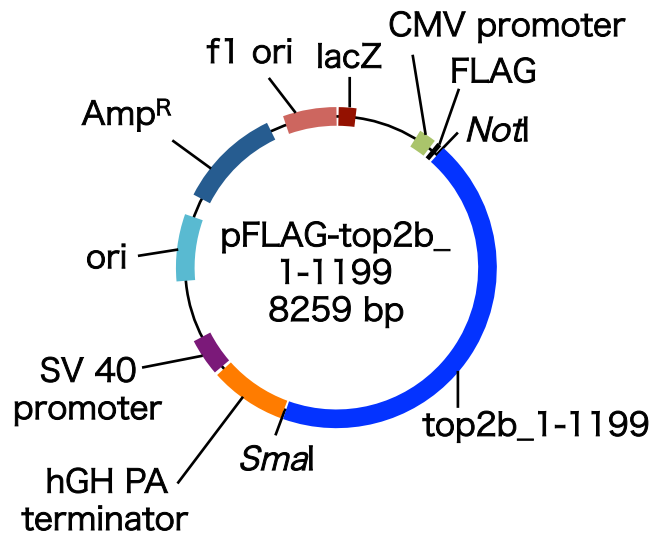
```

**pFLAG-cm2-EGFP**

Figure S8. 変異体作製に用いたpFLAG-top2b\_1-1199-EGFP  
A. 変異体作製に用いたpFLAG-top2b\_1-1199-EGFPの構造を示す。

B. pFLAG-top2b\_1-1199-EGFPのtop2b\_1-1199の一部と前後の塩基配列を示す。茶色の枠はpFLAG-cm2-EGFPを示している。青色の枠はtop2b\_1-1199の塩基配列の一部を示している。黒色の線の部分はFLAG tagを示している。

A.



B.

**pFLAG-CMV-m**

```

841 CGCCCCGTTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA TAAGCAGAGC
901 TCGTTTAGTG AACCGTCAGA ATTGATCTAC CATGGACTAC AAAGACGATG ACGACAAGCT
                                FLAG tag
961 TAGCGGCCGC GCTGCCATGG CCAAGTCCAG CCTCGCGGGC GTTGACGGGG CGCTGACCTG
top2b_1-1199
1021 GGTGAACAAT GCTGCAAAAA AGGAAGAGTT GGAGACAGCG AACAAAAATG ATTCTTCCAA
1081 GAAGTTGTCT GTTGAGAGAG TGTACCAGAA GAAGACCCAA CTGGAGCATA TTCTCCTTCG
      .
      .
4381 AAATATGTCT CTATGGTCTC TTAATAAAGA AAAAGTTGAA GAACTCATT AAGAGAGAGA
4441 TACAAAAGGA CGAGAGGTTA ATGATCTCAA AAGGAAATCT CCCTCAGATC TTTGAAAAGA
4501 AGATTTAGCA GCATTTGTTG AAGAATTGGA TAAAGTGAA GCACAAGAAC GAGAAGACAT
4561 TCTGGCAGGG ATGCCCGGGA ATTCATCGAT AGATCTGATG GGTGGCATCC CTGTGACCCC
4621 TCCCCAGTGC CTCTCCTGGC CCTGGAAGTT GCCACTCCAG TGCCCACCAG CCTTGTCTTA
pFLAG-CMV-m
  
```

Figure S9. 変異体作製に用いたpFLAG-top2b\_1-1199

A. 変異体作製に用いたpFLAG-top2b\_1-1199の構造を示す。  
 B. pFLAG-top2b\_1-1199のtop2b\_1-1199の一部と前後の塩基配列を示す。茶色の枠はpFLAG-CMV-mを示している。青色の枠はtop2b\_1-1199の塩基配列の一部を示している。黒色の線の部分はFLAG tagを示している。

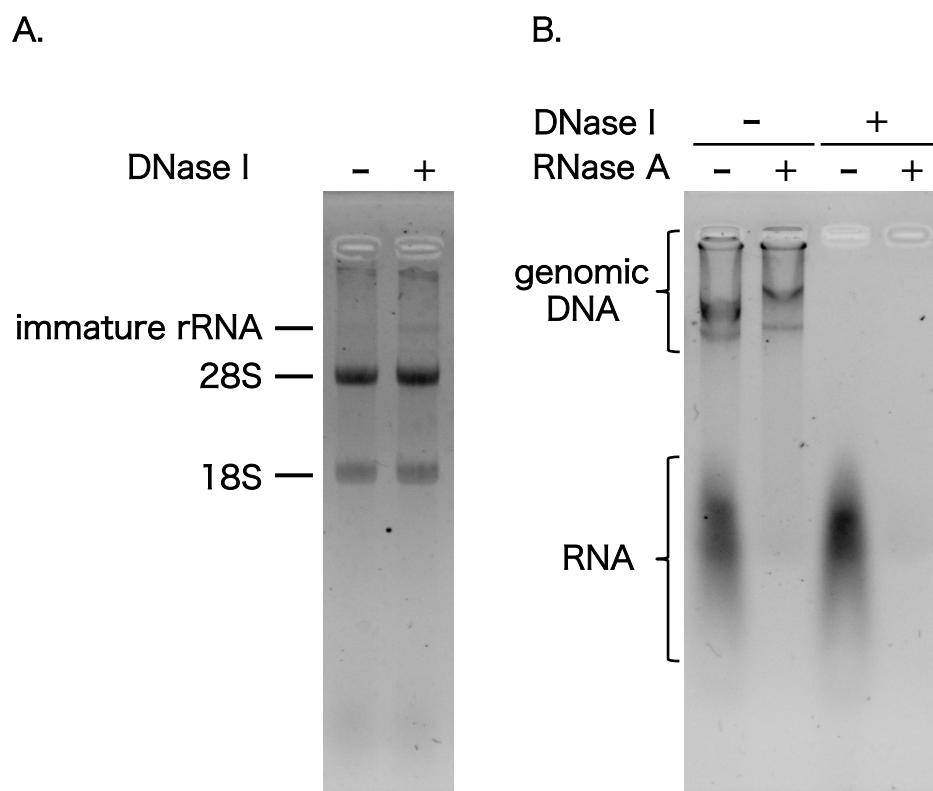


Figure S10. 精製したHEK293細胞由来のtotal RNAのアガロースゲル電気泳動

A. ホルムアルデヒドで変性させたHEK293細胞由来のtotal RNAをホルムアルデヒド変性ゲルで電気泳動した泳動像を示す。HEK293細胞由来のtotal RNAはDNase Iで未処理のものと処理済みのものを示している。

B. HEK293細胞由来のtotal RNAを未変性のアガロースゲルで電気泳動した泳動像を示す。DNase IとRNase Aで処理を行ったHEK293細胞由来のtotal RNAを示している。

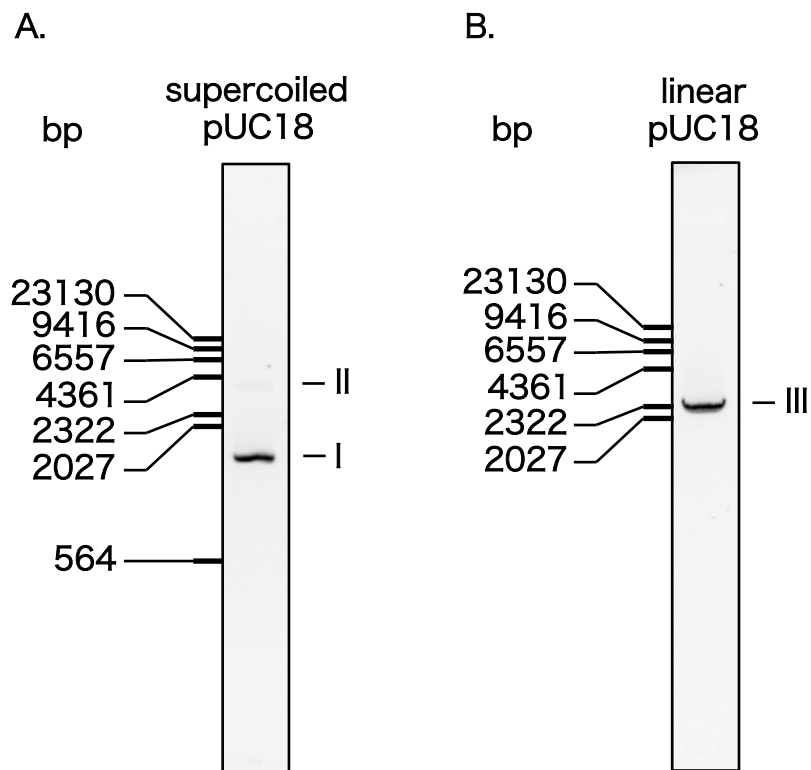


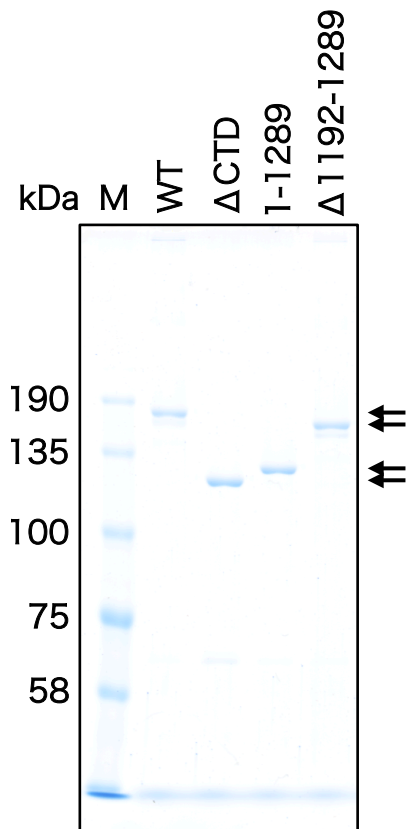
Figure S11. Topo II assayに使用したpUC18のアガロースゲル電気泳動

左側のバーはDNAマーカ―を表しており、数字は塩基数を示している。

A. 超らせん型pUC18の泳動像を示す。Iは超らせん型DNA、IIは開環状DNAを示している。

B. 直鎖型pUC18の泳動像を示す。IIIは直鎖型DNAを示している。

A.



B.

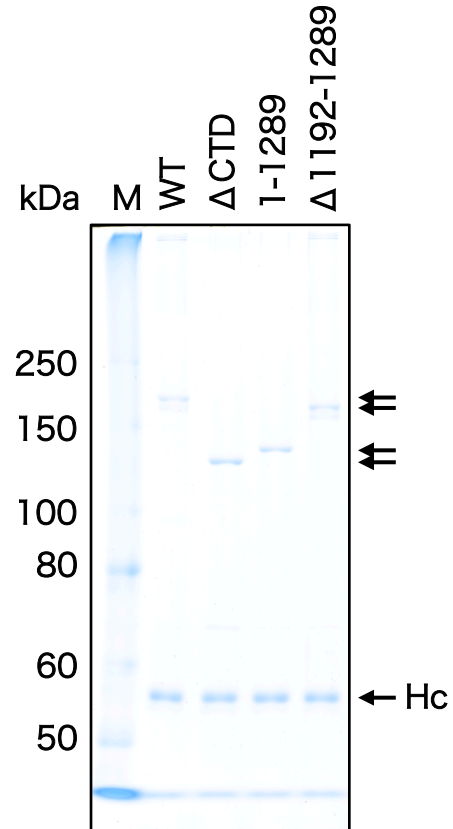


Figure S12. 精製したTopo II $\alpha$  変異体のSDS-PAGEを用いた解析

Mは分子量マーカを示している。左側の数字は分子量を示している。矢印は上から、WT、 $\Delta$ 1192-1289、1-1289、 $\Delta$ CTDのバンドの位置を示している。

A. 3 $\times$  FLAGペプチドを用いて溶出したFLAG-Topo II $\alpha$  変異体をSDS-PAGEで分析した。

B. 磁性ビーズ上に固定化した状態のon Beads FLAG-Topo II $\alpha$  変異体をSDS-PAGEで分析した。HcはHeavy chainを示している。

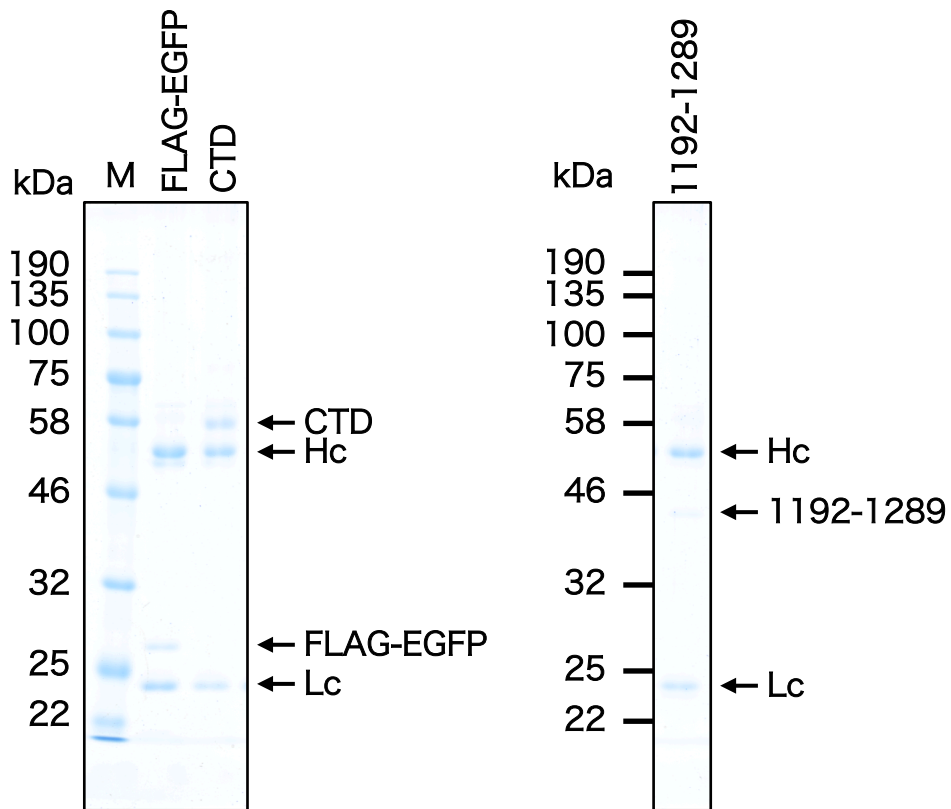


Figure S13. 精製したTopo II $\alpha$  変異体のSDS-PAGEを用いた解析  
 磁性ビーズ上に固定化した状態のon Beads FLAG-Topo II $\alpha$ -EGFP 変異体をSDS-PAGEで解析した。Mは分子量マーカを示している。左側の数字は分子量を示している。HcはHeavy chain、LcはLight chainを示している。

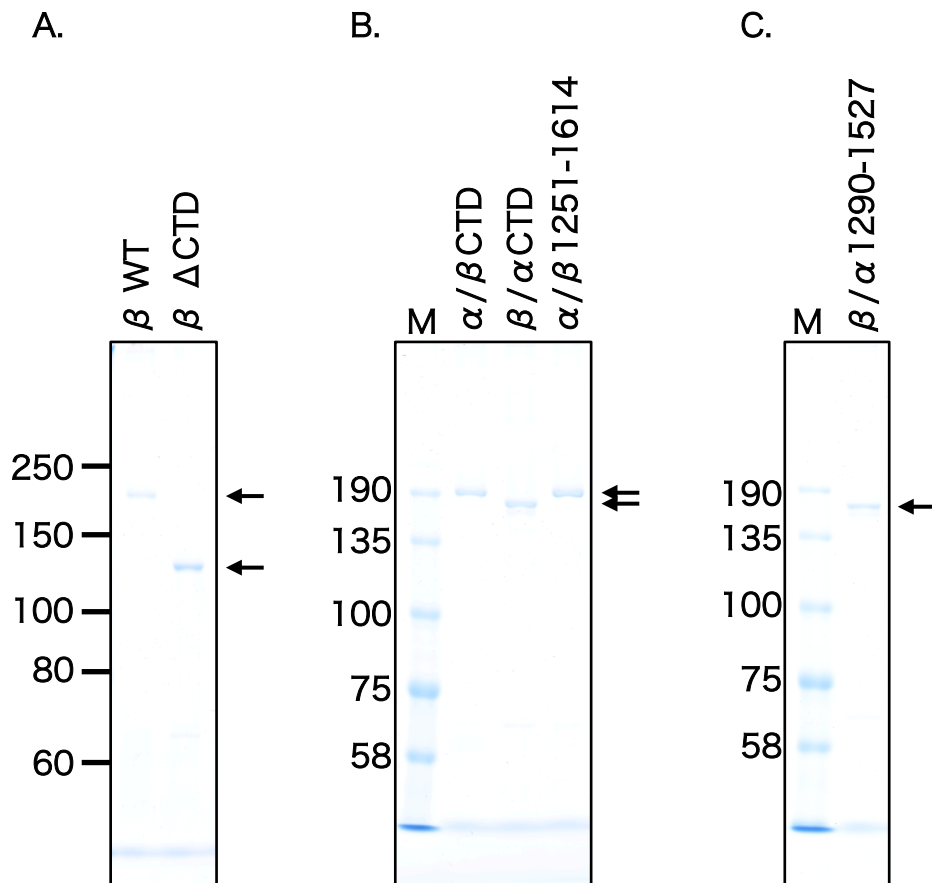


Figure S14. 精製したTopo II  $\alpha/\beta$  CTD交換変異体のSDS-PAGEを用いた解析

3x FLAGペプチドを用いて溶出したTopo II  $\alpha/\beta$  CTD交換変異体をSDS-PAGEで解析した。Mは分子量マーカを示している。左側の数字は分子量を示している。

A. FLAG-Topo II  $\beta$ のWTと $\Delta$ CTDをSDS-PAGEで分析した。上の矢印は $\beta$ のWT、下の矢印は $\beta$ の $\Delta$ CTDを示している。

B. FLAG-Topo II  $\alpha/\beta$ CTD、FLAG-Topo II  $\beta/\alpha$ CTD、FLAG-Topo II  $\alpha/\beta$ 1251-1614をSDS-PAGEで分析した。上の矢印は $\alpha/\beta$ CTDまたは $\alpha/\beta$ 1251-1614、下の矢印は $\beta/\alpha$ CTDを示している。

C. FLAG-Topo II  $\beta/\alpha$ CTDをSDS-PAGEで分析した。矢印は $\beta/\alpha$ CTDを示している。