



Title	独立した非膜性オルガネラとしてのパラスペックル形成の分子メカニズムに関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高桑, 央
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第15685号
Issue Date	2023-12-25
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91348">http://hdl.handle.net/2115/91348</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 :
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	TAKAKUWA_Hiro_review.pdf (審査の要旨)



[Instructions for use](#)

## 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高桑 央

主査 教授 野 田 展 生  
審査担当者 副査 教授 福 原 崇 介  
副査 准教授 野 田 航 介

### 学位論文題名

独立した非膜性オルガネラとしてのパラスペックル形成の分子メカニズムに関する研究  
(Study on the molecular mechanism for the paraspeckle formation as distinct membraneless organelles)

真核細胞の細胞核内には膜構造を持たない顆粒状の非膜オルガネラ (MLO) が多数存在しており、それが RNA やタンパク質の相分離により形成されることが明らかとなってきた。パラスペックル (PS) および核スペックル (NS) はそのような MLO の一種であり、PS は NS の近傍に形成される。PS の構築は NEAT1 長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) が担っており、5' 側と 3' 側を表面 (シェル) に、中央領域を中心 (コア) に局在するように折りたたまれることで、PS は特徴的なコア-シェル構造を持つ。PS と NS の関係のように、MLO が互いに独立した構造体として存在する分子機構は不明であることから、高桑博士課程学生 (以下、申請者) はその解明を研究の目的とした。

申請者は、NEAT1 の 5' 側と 3' 側を大きく欠失した mini-NEAT1 変異細胞株において、mini-PS はコア-シェル構造を保持するにも関わらず、NS の内部に包含されるという予想外な表現型を見出した。そして SFPQ が PS の NS からの分離に働いていること、いくつかのドメインがその機能に重要であることを明らかにした。さらにスプライソソーム構成因子である SF1 を含む U2 snRNP の構成タンパク質が mini-NEAT1 RNA に結合すること、それが mini-PS の NS への取り込みに働くことを突き止めた。以上の結果から、SF1 のように PS の NS への取り込みを誘導可能な因子および SFPQ のように PS の NS からの分離を誘導可能な因子が存在することが明らかとなった。SFPQ は NEAT1 lncRNA へのスプライシング因子の結合を阻害することで、NS から独立した PS の形成を促進すると推察されるが、SFPQ の分子機能の詳細解明は今後の課題である。

質疑応答では、主査の野田展生教授より、パラスペックルが核スペックル内に取り込まれた場合にどのような不都合が生じるのかについて質問されたのに対し、パラスペックルは転写に関わっているとは考えられているものの細胞種間で違いが大きく、今回用いた HAP1 細胞ではターゲット遺伝子が不明であり、さらにクローン間の遺伝子発現の差が大きく、影響を調べることができていないと回答した。次にパラスペックル以外の MLO についてもミセル構造のものが存在するかどうか聞かれ、これまで報告はないこと、ただしサイズが小さいために検出されていない可能性がありうることを回答した。さらにパラスペックルが核スペックルに隣接するメカニズムについて聞かれたのに対し、明確にはわかっていないが、NEAT1 5' 側領域への U2 snRNP の結合が担っている可能性があるかと回答した。続いて副査の野田航介准教授より、mini-PS の場合、mini-NEAT の 5' 側がシェルに、3' 側がコアに向けて直線状の構造をとると模式図に書かれており、その前提で話を進めているが、本当にそのような状態と言えるのかと質問されたのに対し、5' 側がシェル、3' 側がコアにいるのは実験的に確認できているが、完全な直線状構造ではなく、局所的な二

次構造や、部分的に戻るような構造を取っているだろうと回答した。次に mini-NEAT の 5' 側がシェルに、3' 側がコアにいることはどのような実験手法で確認できるのかと質問されたのに対し、5' 側と 3' 側を異なる蛍光プローブで標識し、超解像顕微鏡で各蛍光の局在を観察することで確認ができること、同様に電子顕微鏡を用いても確認できることを回答した。次に、核の中には何種類の MLO が知られているのかと質問されたのに対し、特定の転写の際に相分離で出来る微小液滴は無数に存在しているが、MLO として定義できる大きいものは十数個と考えられると回答した。さらに、mini-PS が他の MLO に取り込まれる可能性について質問されたのに対し、カハール体など数種の MLO については共染色で取り込みがないことを確認済みであること、電子顕微鏡の微細構造の特徴から mini-PS を取り込んでいるのは核スペckルであることが強く示唆されることを回答した。続いて副査の福原崇介教授より、lncRNA の部分欠損変異を導入した HAP1 細胞を多数作成しているが、それを効率的に行う手法があるのかと質問されたのに対し、1つ1つ泥くさく作成していること、24 クローンを取ると 2、3 個は当たりのクローンがとれる感覚であること、ノンコーディングのためフレームシフトを気にする必要がない点が利点であることを回答した。次に、SFPQ、HNRNPF、BRG1 はどれか1つを mini-NEAT に繫留するだけで mini-PS を核スペckル内から取り出せるが、1つを繫留したときに他の2つが相互作用して一緒に機能するのか、あるいは3つは重複した機能をもっているのかと質問されたのに対し、これら3因子の間で相互作用は報告されていないこと、一方で SFPQ と HNRNPF の二者は協力して機能している可能性があること、ノックアウトやノックダウン実験はパラスペckルの形成自体に障害が出るものがあり解析が難しいことを回答した。最後に、本来分離して存在しているパラスペckルが核スペckルに取り込まれることを促進する因子をわざわざ探索するモチベーションは何であるのかと質問されたのに対し、MLO の局在を決定する分子機構を明らかにしたかったためと回答した。

この論文は、異なる MLO が互いに独立した構造体として存在できるメカニズムを明らかにしたという点において高く評価され、いまだ謎に包まれた MLO の形成機構や生理機能に迫る研究が今後進展していくことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。