



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
Description	配架番号 : 2814
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15685号
Issue Date	2023-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91348
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAKUWA_Hiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 高桑 央

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)

【背景と目的】 真核生物の細胞核内には、膜構造を持たない顆粒状の非膜オルガネラ (Membraneless organelles; MLO) が多数存在している。近年 MLO が、その構成因子である RNA やタンパク質の相分離と呼ばれる物理現象によって形成されることが明らかになった。一群の MLO は RNA をその必須の骨格として形成されていることが明らかとなっており、その代表的なものとして NEAT1 長鎖ノンコーディング RNA (Long noncoding RNA; lncRNA) によって形成される核内構造体パラスペックル (Paraspeckle; PS) があげられる。PS は、スプライシング因子の集積する別の MLO である核スペックル (Nuclear speckle; NS) の近傍に形成される。また、種々の RNA 結合タンパク質 (RNA binding protein; RBP) や特定の RNA を繫留する分子スポンジとして機能し、遺伝子発現制御に重要な働きをすることが知られている。PS には 60 種類以上のタンパク質が集積し、その中でも SFPQ や NONO, FUS, RBM14, SWI/SNF 複合体のタンパク質因子は PS の形成に必要不可欠である。PS は、コア-シェル構造を持つ MLO であることが知られており、NEAT1 lncRNA は 5' 側と 3' 側が構造体のシェル (表面) に、中央領域がコア (中心) に局在するように折りたたまれた状態で PS の内部に配置される。23 kb にも及ぶ NEAT1 lncRNA のどの RNA 領域が PS の機能や性状を規定しているのかを探索するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて NEAT1 の様々な領域を欠失した変異細胞株を多数樹立し、パラスペックルの表現型の解析が行われた。その結果、NEAT1 の特定の RNA 領域は、パラスペックルのアセンブリーやコア-シェル構造形成に必要不可欠であることが明らかとなった。

MLO は周囲の細胞内空間との明確な「仕切り」がないにもかかわらず、互いに独立した構造体として混じり合わずに共存している。PS は NS の近傍に形成されるが、2 つの MLO が独立した構造体として存在するための分子メカニズムは未だ不明である。そこで本研究では、PS と NS をモデルとして、別々の MLO 同士が分離して存在するための分子機構を明らかにすることを試みた。

【方法と結果】 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、PS が通常近接する独立した MLO である NS の内部に包含されるという予想外な表現型を示した。この結果は、NEAT1 の特定の RNA 領域が、PS を独立した MLO として存在させるために必要であることを示している。より詳細な表現型の解析を行うため、超解像度顕微鏡を用いた解析を行なった。その結果、mini-NEAT1 変異株でのパラスペックル (mini-PS) は NS の内部に取り込まれているものの、完全には混じり合わずに、そのコア-シェル構造は保持されていた。次に、PS が NS から独立して存在するために必要なタンパク質因子の探索を行った。lncRNA

の多くは RBP とリボ核タンパク質 (RNP) 複合体を形成することで機能することから、mini-NEAT1 変異株において欠失している RNA 領域に結合する RBP が重要な役割を果たしている可能性を考えた。RNA-FISH 法を用いて、野生株 (Wild type; WT) の PS と比較して、mini-PS への局在量が大きく減弱している RBP を探索した。その結果、SFPQ タンパク質の mini-PS への局在量が顕著に減弱していた。次に、MS2 システムにより SFPQ を mini-NEAT1 RNA 上に人為的に繫留することで、mini-PS の NS からの分離欠損を機能相補することが可能であるのかを解析した。その結果、SFPQ を mini-PS のシェル領域に繫留することによって、WT と同様に、mini-PS が NS から分離した。一方で、このような機能相補は mini-PS のコア 領域に SFPQ を繫留した場合は、観察されなかった。さらに、SFPQ のどのドメインが PS の NS からの分離機能に重要であるのかを明らかにするために、SFPQ のドメイン欠失変異体を用いて同様の解析を行った。その結果、SFPQ の Coiled-coil (CC) ドメインや NOPS ドメインといったダイマーやオリゴマー形成に重要なドメインだけではなく、プリオン様ドメイン (Prion like domain ; PLD) も重要であることが示唆された。

mini-PS は、NS に特異的に取り込まれることから、特定の因子が mini-PS の NS への取り込みを誘導する可能性を考えた。mini-NEAT1 RNA 上の mini-PS の NS への取り込みに必要な領域を探索し、その領域に結合する RBP を Mass spectrometry (MS) 解析により網羅的に同定した。その結果、SF1 のような U2 snRNP の構成タンパク質が mini-NEAT1 RNA のサブドメインに結合していることが明らかとなった。次に SF1 が、通常 NS とは独立して存在している、WT の PS の NS への取り込みを誘導する機能があるのかどうかを検証した。MS2 システムを用いて、WT の NEAT1 RNA 上に SF1 を人為的に繫留した結果、SF1 の PS シェル領域への繫留により、PS の NS 内部への取り込みを観察できた。一方で、PS のコア領域へ繫留した場合には、PS は NS とは独立して存在していた。

【考察】 本研究において、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を同定した。NEAT1 lncRNA は mRNA と同様に、RNA polymerase II によって転写される。一般的に、スプライシングされた mRNA は NS に局在し、細胞質に輸送され、翻訳される。対照的に、NEAT1 lncRNA はスプライシングされずに核内に保持される。SF1 はスプライソソームを構成する因子であることから、SFPQ は NEAT1 lncRNA 上へのスプライシング因子の結合を阻害することにより、独立した MLO としての PS 形成を促進していることが推察された。PS と NS が独立して存在するためには、シェルに局在する SFPQ が重要な役割を果たしていることを見出したが、SFPQ が直接的に機能するのか、あるいは SFPQ と相互作用する因子を介して機能するのかは未だ明らかになっていない。また、今回同定した因子以外にも同様のプロセスに関与する因子が存在している可能性が考えられる。したがって、より詳細な分子メカニズムの解明が今後の課題である。

【結論】 PS は、NEAT1 lncRNA 上に SFPQ をリクルートし、PS のシェル領域に配置する機構を通じて NS と独立した MLO として存在している。一方で、SF1 は PS の NS への取り込みを誘導可能であることを見出した。本研究は、PS のシェルに局在するタンパク質が PS とその他の MLO との独立性を制御していることを強く示唆しており、MLO のシェル領域に局在する因子の重要性を理解する上で基盤知見となることが期待できる。