HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Raman Spectroscopy for Spatial Heterogeneity in Membrane-less Organelles
Author(s)	Tian, Ya
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(情報科学)
Dissertation Number	甲第16698号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16698
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98672
Type	doctoral thesis
File Information	Tian_Ya_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士 (情報科学)　氏名　田　雅

審査担当者　主　査　教　授　雲林院 宏
副　査　准教授　平井 健二
副　査　教　授　平田 拓
副　査　教　授　田中 嘉人

学位論文題名

Raman Spectroscopy for Spatial Heterogeneity in Membrane-less Organelles
（ラマン分光法を用いた非膜オルガネラの空間的不均一性解析）

Tian Ya 氏の博士論文は、細胞内には膜をもたないオルガネラ (Membrane-less organelles, MLOs) 内の拡散ダイナミクス空間不均一性の解析に焦点を当てている。MLOs は液液相分離 (LLPS) によって形成される。MLOs は、ストレス応答や RNA 代謝など多様な細胞機能を担い、周囲との間で分子を迅速に交換する特性をもつ。その形成や動的挙動の異常は、神経変性疾患などの発症と密接に関係しており、MLOs 内での分子拡散ダイナミクスの理解は、新たな治療戦略の鍵を握る可能性がある。代表的な神経変性疾患である筋萎縮性側索硬化症 (ALS) や前頭側頭型認知症 (FTD) は、C9ORF72 遺伝のイントロン領域における GGGGCC 配列の異常反復伸長と関係している。この伸長配列は、通常の ATG 開始コドンを介さずに翻訳され、アルギニンに富む有害なジペプチド (PR や GR など) を生じる。これらのジペプチドは LLPS を介して MLOs 内に蓄積し、分子拡散挙動を変化させ、結果として細胞機能障害を引き起こす。しかし、こうした LLPS 由来液滴内での拡散ダイナミクスや空間的不均一性の詳細は十分に解明されていなかった。

本論文第 1 章では、これら MLOs の細胞生物学的背景、これまでの研究背景、MLOs に関連する疾患に関してまとめている。

本論文の第 2 章では、正電荷をもつアルギニンリッチなジペプチド (PR)20(プロリン–アルギニンが 20 回繰り返されたもの) と、負電荷をもつポリ A RNA を混合して形成される液滴を蛍光退色回復法 (FRAP) とラマン分光法によって解析した。比較として、同じ数のプロリンとアルギニンを含むが、電荷分布が不均一な人工設計ペプチド (P4R4)5(4 つのプロリン +4 つのアルギニンの繰り返し) も用いた。FRAP 解析の結果、(P4R4)5/ポリ A RNA 液滴は (PR)20/ポリ A RNA 液滴よりも流動性が低く、これはアルギニンの偏在によって結合エネルギーが高まるためであることが示唆された。また、ラマン分光法により液滴内部の RNA 濃度勾配を可視化でき、FRAP データとの対応関係が確認された。これらの結果は、アルギニンリッチペプチドが液滴内部で階層的構造形成に関与することを示しており、ラマン分光法が LLPS 液滴の拡散ダイナミクス解明に有効であることを明らかにした。

本論文第 3 章では、異なる電荷特性をもつジペプチド ((PR)20 および (GR)20) とポリ A RNA の複合体について、ラマン分光法および FRAP 解析を用いて拡散挙動を詳細に検討した。両者は同じ繰り返し構造と総電荷を有するが、電荷分布の違いにより LLPS 液滴の動態が異なることが明らかとなった。ラマンスペクトルから、(GR)20/ポリ A RNA 液滴のほうが RNA 密度が高く、内部に

RNA 濃度勾配をもつことが確認された。一方、ペプチドと RNA の比率は液滴全体でほぼ一定であり、安定な複合体形成と階層構造の存在が示唆された。FRAP 解析では、RNA や異なる電荷をもつ小分子蛍光色素の拡散を比較したところ、液滴中心部では境界部よりも拡散が遅いことが判明し、ラマン分光で観察された RNA 濃度勾配と一致した。特に負電荷をもつフルオレセインでは、(PR)20 液滴と (GR)20 液滴の中心–境界での蛍光回復時間比に顕著な差が見られ、(GR)20 とのより強い相互作用が示唆された。

これを要するに、本研究では、LLPS 由来液滴内部には空間的不均一性が存在し、拡散挙動は分子の電荷分布に依存して変化することを明らかにした。特にアルギニンリッチジペプチドは RNA との相互作用を通じて液滴の内部構造と動態を制御しており、これが神経変性疾患におけるタンパク質凝集の分子基盤の一端をなす可能性があることが本研究により示唆された。これは、ラマン分光法と蛍光退色回復法 (FRAP) の統合的解析により、MLOs 内部の分子拡散メカニズムの理解を大きく前進させ、神経変性疾患の新たな治療標的として LLPS を捉えるための重要な知見を提供するものであり、著者は、北海道大学博士 (情報科学) の学位を授与される資格があると認める。