

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ヒト生細胞内における核内ボディ複合体形成のダイナミクス
Title(English)	
著者(和文)	今田貴士
Author(English)	Takashi Imada
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11895号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木村 宏,岩崎 博史,田口 英樹,藤田 尚信,中戸川 仁
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11895号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：	生命理工学	系
Department of, Graduate major in	生命理工学	コース
学生氏名：	今田 貴士	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	木村 宏	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：		
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

ヒト細胞の核内では、液-液相分離と呼ばれる物理現象により、タンパク質や核酸が「核内ボディ」と呼ばれる液滴を多数形成する。核内ボディは、酵素反応などの生物学的反応が、いつ (細胞周期)・どこで (場所)・どの程度 (反応速度) 生じるのかを制御する。

Po1 II は転写を行うタンパク質複合体で、12 種類のサブユニットタンパク質から構成される。最大のサイズを示す RPB1 サブユニットの C 末端ドメイン (C-terminal domain、以下 CTD) のリン酸化状態は、Po1 II の転写進行や Po1 II の液滴形成 (Po1 II condensate、以下 PC) を制御する。CTD は 7 個のアミノ酸のリピート (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) が 52 回連続した配列により構成される。

PC は、別の核内ボディであるカハールボディ (以下 CB) やヒストンローカスボディ (以下 HLB) と共局在することが報告されている。CB や HLB は、snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の転写調節に関与しており、snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の近傍に観察される。CB の破壊は、ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写量の低下を引き起こす。HLB はヒストン遺伝子の転写に必須であり、HLB を破壊した細胞は G1/S 期で細胞周期が停止し、細胞死を引き起こす。

これまでに核内ボディそのものの性質や機能に関しては研究が行われてきたが、核内ボディの形成機構や核内ボディ間の相互作用については不明点が多い。そこで本研究は、3 つの核内ボディ (PC、CB、HLB) の形成機構と関係性の解明を目的とした。

本研究では初めに、PC を生細胞で観察するために、ヒト大腸がん細胞である HCT116 細胞で、EGFP を RPB1 遺伝子上流にノックインした細胞 (以下 KI 細胞) を作製した。免疫染色により、PC は Ser5 と Ser7 がリン酸化された CTD を有する Po1 II を含むことが分かった。これらのリン酸化状態の Po1 II は、ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子を転写することが報告されており、PC がこれらの遺伝子の転写に関与している可能性が示唆された。なお、PC は Ser2 や Thr4 がリン酸化された CTD を有する Po1 II は含んでいなかった。

本研究では次に、PC は S 期初期に CB と HLB の近傍に出現し、PC-CB 複合体と PC-HLB 複合体を形成することを生細胞観察により発見した。加えて、PC-CB 複合体と PC-HLB 複合体は、S 期中期までに解消することも分かった。観察には、KI 細胞で CB のマーカータンパク質であるコイリンの遺伝子をノックアウトした細胞 (以下 KO 細胞) に

蛍光タグを融合させたコイリンを発現させた細胞と、KI 細胞に蛍光タグを融合させた NPAT (HLB のマーカータンパク質) を発現させた細胞を使用した。細胞周期の進行は、蛍光タグを融合させた PCNA タンパク質を発現させて測定した。ヒストン遺伝子は S 期特異的に転写が活性化することを踏まえると、PC-HLB 複合体が S 期初期に形成し、S 期中期までに解消するという観察結果は、PC-HLB 複合体がヒストン遺伝子の転写に関与している可能性を示唆する。

次にコイリン遺伝子のノックアウトによる CB の破壊が、PC や HLB に与える影響を、KO 細胞を用いて調べた。CB の破壊は、PC の数やリン酸化状態、出現タイミングには影響しなかったが、核内ボディ同士の相互作用に影響した。KO 細胞では、KI 細胞に比べて PC と HLB の共局在割合は上昇したが、PC と SMN が濃縮する液滴の相互作用の割合は低下した。なお、SMN は CB 中に観察されるタンパク質であり、スプライシングを行う snRNP の合成に関与している。CB の破壊が PC に与える影響を評価できたので、低分子化合物であるトリプトリドと野生型の HCT116 細胞を用いて、Pol II や PC の分解が、CB や HLB に与える影響を調べた。その結果、核質の Pol II および PC の分解は、CB や HLB の数と相互作用には影響しないことが分かった。

続いて、PC が CB や HLB と同時に相互作用し、PC-CB-HLB 三者複合体を形成するかどうかを生細胞観察により調べた。PC が CB や HLB と相互作用することや、CB が HLB と相互作用することは報告されていたが、これら 3 種類の核内ボディが同時に相互作用し、三者複合体を形成するかどうかは不明であった。KO 細胞に蛍光タグを融合させたコイリンと NPAT を過剰発現させて観察したところ、PC-CB-HLB 三者複合体の形成が確認された。PC-CB-HLB は、PC-HLB 二者複合体と CB の相互作用により形成する頻度が高かった。

最後に、PC、CB、HLB の物性を調べた。核内ボディは液体のような性質から固体のような性質まで、幅広い物理的性質を示すことが知られている。1,6-ヘキサジオールと野生型の HCT116 細胞を用いて物性を調べたところ、PC が液体に近い物性である一方で、CB や HLB は固体に近い物性であることが分かった。

本研究の研究結果とこれまでの報告を総合すると、PC が CB や HLB と協働して、snRNA 遺伝子やヒストン遺伝子の S 期特異的な転写活性化に機能している可能性が示された。本研究では、実際にヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の転写が起きているかどうかは調べていない。よって、dCas13 や MS2 システムを活用し、ヒストン遺伝子や snRNA 遺伝子の新生鎖 RNA を可視化し、PC が CB や HLB と相互作用することで転写が活性化されているかどうかを調べるのが、今後の課題である。(1986 文字)

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：	生命理工学	系
Department of, Graduate major in	生命理工学	コース
学生氏名：	今田 貴士	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	木村 宏	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：		
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Eukaryotic nuclei are highly organized structures consisting of chromatin, nuclear lamina, nucleoli, and nuclear bodies (NBs) which have been shown as phase-separated liquid droplets containing specific proteins and RNAs. RNA Polymerase II (Pol II), the main player of transcription, forms phase separated condensates, or NBs (which I hereafter refer to “Pol II condensates”, or “PCs”). Cajal bodies (CBs) and histone locus bodies (HLBs) are also NBs regulating transcription of histone genes and/or small nuclear RNA (snRNA) genes. Although the liquid droplet nature of NBs has been studied, how different NBs associate with each other in living cells remains largely unknown. I aimed to figure out how the three NBs (PCs, CBs, and HLBs) formed and interacted with each other in living human cells.

Using live cell imaging, I found that PCs nucleated near both CBs and HLBs at the entry of S phase in human HCT116 cells. In addition, I observed that PC–CB complexes and PC–HLB complexes dissolved by the end of middle S phase. PCs contained Pol II with Ser5 and Ser7 phosphorylated C-terminal domain. These Pol II phosphorylation forms are known to transcribe histone genes and/or snRNA genes. Coilin-knockout increased the co-localization rate between PCs and HLBs, but did not affect PCs in terms of the number per nucleus, nucleation timing, and the phosphorylation status of Pol II. I found that PCs associated with CBs and HLBs to form three heterotopic NB complexes, PC–CB–HLB complexes. PC–CB–HLB complexes frequently assembled via PC–HLB nucleation near a preformed CB. I finally compared physical properties of the three NBs using 1,6-hexanediol, revealing that PCs were liquid-like NBs, while CBs and HLBs were solid-like.

This study suggests that PCs played a key role in transcription of histone genes and snRNA genes in coordinate with CBs and HLBs. (300 words)

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).