



Title	核小体タンパク質Nucleophosminによる液-液相分離を介した核小体形成に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	谷, 愛海
Citation	北海道大学. 博士(理学) 甲第15399号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89916
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	TANI_Itsumi_summary.pdf



[Instructions for use](#)

学位論文の要約

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 谷 愛海

学位論文題名

核小体タンパク質 Nucleophosmin による液-液相分離を介した核小体形成に関する研究

核小体は、細胞の核内に存在し、タンパク質合成、細胞増殖に必須であるリボソーム生合成の場である。多くの癌細胞において核小体形成異常が観察されることから、核小体は癌細胞診における重要な評価基準となっている。さらに近年、癌のみにとどまらず、パーキンソン病、心疾患、骨髄異形成症候群などの様々な疾患において核小体の関与が示唆されており、核小体は様々な疾患に対する治療標的として近年注目されている。核小体は液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation; LLPS) の原理によって形成されることが明らかになっており、タンパク質 - RNA の電荷相互作用、カチオン- π 相互作用などにより誘導される。しかしながら、核小体は歴史的に視覚化された最初の細胞内構造体の1つであるにもかかわらず、その形成過程を支配する要因は不明なままである。核小体を標的とした治療法の開発のためにも、核小体の形成機構を理解することが求められている。

核小体タンパク質 Nucleophosmin (NPM)は、核小体に局在し、様々な細胞内イベントに関与するタンパク質である。NPM のノックダウンは核小体構造を崩壊させることが明らかとなっており、NPM は核小体形成において必須のタンパク質であることが知られている。また、NPM は、核小体に局在する様々なタンパク質と phase separation を誘導することが報告されている。これまでに当研究室では、Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D の過剰発現によって、NPM の Ser4 と Thr199 の過剰なリン酸化が誘導され、核小体形成異常が生じることを明らかにしている。また、NPM と複合体を形成するタンパク質としていくつかのリボソームタンパク質 (Ribosomal protein; RP) が報告されている。しかしながら、NPM が自身のリン酸化や他のタンパク質との相互作用を介して、どのように核小体形成を制御しているか、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、NPM による核小体形成機構を解明するため、(1) NPM のリン酸化が核小体形成に及ぼす影響、(2) NPM とリボソームタンパク質 uL30 との相互作用が核小体形成に及ぼす影響について、細胞内と *in vitro* の両方の観点から解析を行い、NPM による核小体形成機構解明を実施した。

本学位論文は、全4章により構成されている。第1章では総括的な序論として、本研究の背景および目的を述べている。核小体や液-液相分離などについて概説した。

第2章では、NPMのリン酸化による核小体形成の調節機構の解明について述べている。まず、PPM1D過剰発現細胞において、細胞が成熟した核小体のほかにNPMを含む小さな輝点を有することを見出した。この輝点をNucleophosmin Containing Small spots (NCS-spots)と命名した。そしてNCS-spotsはPPM1Dの脱リン酸化活性依存的に形成されることを明らかとした。NPMのSer4, Thr199のリン酸化がPPM1D活性依存的に誘導されることから、NPMの各残基のリン酸化が、NCS-spots形成に及ぼす影響を解析した。その結果、Ser4のリン酸化により1細胞当たりのNCS-spotsの数が増加し、Thr199のリン酸化によって1細胞当たりのNCS-spotsの数が減少することが明らかとなった。次に、細胞内での現象をより理解するため、NPM WTと各残基のリン酸化ミメティック体を大腸菌発現系により精製した。SEC-MALSを用いた多量体状態の解析により、NPMのリン酸化によって10量体や10量体以上の高次多量体を形成する割合が増加し、特にSer4のリン酸化によってその効果が増加することが明らかとなった。次に、精製したNPMと真核生物であるyeast RNAを用いてphase separationを実施したところ、Ser4のリン酸化によってphase separation活性が減少し、Thr199のリン酸化によってphase separation活性が増加することが示された。このことはSer4のリン酸化によって、NPMとRNAの相互作用が弱まり、Thr199のリン酸化によって強くなることを示唆している。さらに、NPMとRNA混合時の二次構造解析により、NPM WT、リン酸化ミメティック体間で、NPM側、RNA側ともに大きな構造変化がないことが明らかとなり、phase separation活性の変化はタンパク質やRNAの構造変化によるものではないことが示された。また、NPM Ser4, Thr199のリン酸化は核小体消失時に起き、その時期にはATP濃度が高まることから、液滴に対するATPの効果を解析した。各NPMリン酸化ミメティック体により形成された液滴にATPを添加すると液滴形成が解消され、ATPは核小体からの核小体タンパク質の離散に重要な役割を果たしていることが示唆された。

第3章では、NPMと他のタンパク質の相互作用による核小体形成について述べている。NPMは自身との相互作用だけでなく、他のタンパク質との相互作用を介しても核小体形成を制御していることが示されている。そこで、NPMと複合体を形成するリボソームタンパク質uL30に着目し、解析を行った。本研究では、RNA非存在下においてuL30とNPMが*in vitro*で液滴を形成することを初めて明らかとした。この際液滴の形成は、低濃度のuL30では誘導されないことが示された。また、この系にRNAを添加すると、液滴が凝集する様子が観察された。さらに、NPMリン酸化ミメティック体とuL30の混合実験より、WTと同様にNPMリン酸化ミメティック体でも液滴の形成が観察されたが、リン酸化ミメティック体では液滴のサイズが小さく、WTよりもphase separation活性が低いことが明らかとなった。細胞内でuL30をノックダウンすると、NPMの発現量は変化しないものの、核小体の数が減少することが示された。この結果は*in vitro*の結果と一致しており、uL30の量の変化によってLLPS及び核小体形成が影響を受けたことが示唆された。以上のことは、NPMとuL30による液滴形成はRNA量の低い核小体形成初期における核発生に重要であり、NPMのリン酸化によって核発生が制御されていることを示している。さらに、RNA含量の少ない核小体形成初期において、タンパク質-タンパク質相互作用が重要なファクターであることを示しており、核小体形成研究におけるタンパク質間相互作用の解析の重要性を説いている。

第 4 章では本研究の結語を述べている。以上の結果をもとに、NPM のリン酸化による核小体形成制御モデルを提案した。まず、正常時には核小体は細胞周期依存的に分解・再形成される。核小体分解時には NPM が順々にリン酸化される。また核小体分解時の高い ATP の濃度は、リン酸化 NPM の phase separation 活性低下を誘導し、またリン酸化 NPM と他のタンパク質との phase separation が抑制され、NPM が核小体から放出し、核小体が分解される。核小体再形成時には、RNA に依存しないタンパク質-タンパク質相互作用を介して核発生を行い、核小体が再形成される。PPM1D 過剰発現時には、細胞周期に関係なく NPM のリン酸化が誘導される。Ser4 のリン酸化が亢進することにより、NPM と RNA の相互作用が弱まり、NPM が核小体から解離する。その際に NPM が高次多量体の形成を介して NCS-spots 形成を促進し、これが核小体形成異常につながっていると考えられる。