



# HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	谷, 愛海
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15399号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89913">https://hdl.handle.net/2115/89913</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	TANI_Itsumi_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（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- $\pi$ 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。その1つである uL18 はノックダウンによって核小体構造を大きく崩壊させること、また、uL18 のペプチドが NPM とともに phase separation を誘導することが報告されている。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、NPM、リボソームタンパク質、Ser/Thr ホスファターゼ PPM1D 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 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 のリン酸化は PPM1D が CDC25C を脱リン酸化する経路により誘導される。そこで、NPM

の各残基のリン酸化が、NPM 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 NCS-spots の割合が増加し、Thr199 のリン酸化によって NCS-spots の割合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 5 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 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。以上より、NPM のリン酸化が、多量体形成や phase separation 活性を制御することで核小体形成を調節していることを見出した。

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 phase separation を誘導し、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、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。核小体形成初期においては rRNA の量が非常に少ないことから、RNA に依存しない、タンパク質-タンパク質相互作用による核小体形成の発生が重要である。以上より、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重要性を説いている。

以上の結果から、第 4 章ではまとめとして、本研究における NPM による核小体形成のメカニズムを提案する (図 1)。PPM1D 過剰発現時には、NPM が異常なリン酸化を受ける。特に Ser4 のリン酸化によって RNA が NPM との相互作用が弱まり、核小体から NPM が解離する。この際 NPM が高次多量体を形成し、NCS-spots として観察される。また、ATP は核小体消失時に効率的に核小体タンパク質を核小体から離散させる際に重要な役割を果たす。そして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。これらの

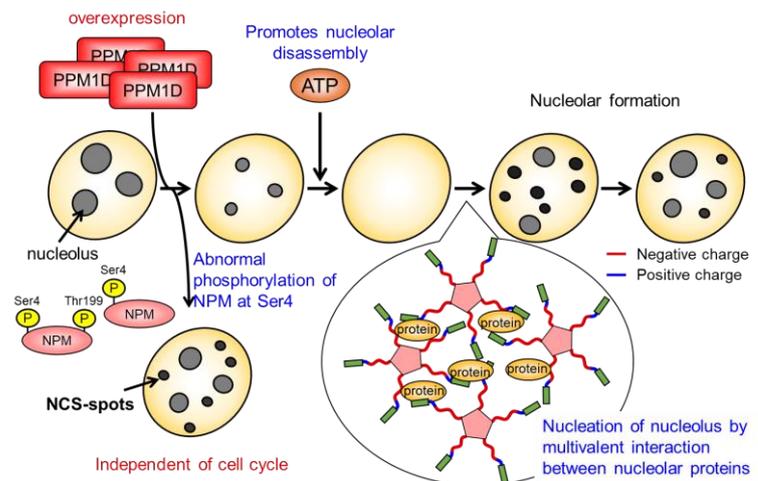


図 1 NPM による核小体形成のモデル

結果は核小体を治療標的とした癌治療法の開発や核小体形成のメカニズムの解明に貢献することが期待される。