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［全文の要約］
Author(s)	谷, 愛海
Description	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。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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	https://hdl.handle.net/2115/89916
Type	doctoral thesis
File Information	TANI_Itsumi_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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。