

## 研究題目 翻訳後修飾による液-液相分離制御機構の解明

### 研究組織

研究代表者：吉村成弘（京都大学大学院生命科学研究科）

共同研究者：小迫英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

### 【1】研究の概要

#### [1-1] 本研究の目的・概要

リン酸化やメチル化に代表される「タンパク質翻訳後修飾」は、タンパク質の機能・動態制御や細胞内シグナル伝達で重要な役割を果たしている。ヒトプロテオーム中では、10,000以上のタンパク質の40,000箇所以上の残基が520種類以上のキナーゼによりリン酸化され、約150種のフォスファターゼにより脱リン酸化される。この膨大で複雑なリン酸化/脱リン酸化によるタンパク質の機能・相互作用制御の全貌を解明することは、細胞機能およびその破綻による機能低下・喪失のメカニズムを知る上で必要不可欠である。

吉村と小迫は、タンデムマスタグ標識による比較定量質量分析法を用いて、分裂期移行に伴うリン酸化が立体構造を取らないタンパク質領域（Intrinsically-disordered region, IDR）に生じる（全リン酸化の6~7割）こと、分裂期移行に伴う過リン酸化がIDRの電荷の偏り（電荷ブロック）を増加・減少させることで液-液相分離を亢進・抑制することを報告した。そこで、本研究提案では、この知見と技術を他の核小体タンパク質や細胞内非膜型オルガネラにおける翻訳後修飾（メチル化、アセチル化）に応用し、翻訳後修飾が電荷ブロック効果を介して液-液相分離を制御する仕組みを分子レベルで解明することを目的とする。

#### [1-2] 研究の方法・経過

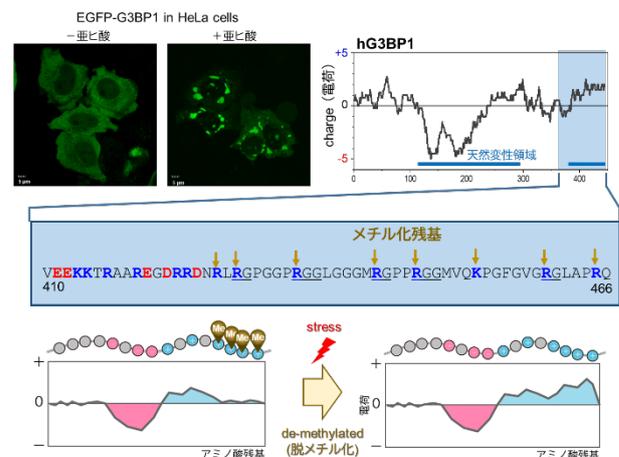
分裂期リン酸化に関しては、これまでのタンデムマスタグ質量分析法を用いることで、細胞分裂前中期の網羅的リン酸化プロテオミクスを行う。また、ストレスを受けた細胞の細胞質に形成される細胞内非膜型オルガネラである

“ストレス顆粒”に関しては、その主要構成タンパク質であるG3BP1の脱メチル化が示唆されている。ここでは、免疫沈降-質量分析技術を用いて、ストレスに応答する脱メチル化部位を同定し、電荷ブロックとの関係性を解明する。

### 【2】研究成果

#### [2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

EGFPを融合させたG3BP1を安定に発現するHeLa細胞株を樹立し、亜ヒ酸を培地に添加することで、ストレス顆粒が形成されることを確認した。この細胞株のライセートに対して、抗GFPナノボディを用いた免疫沈降-質量分析を行い（小迫が担当）、G3BP1のC末端領域に8箇所のメチル化部位を同定することに成功した（図）。また、亜ヒ酸の添加により、8箇所の



図：EGFP-G3BP1安定発現株に亜ヒ酸を添加した際の蛍光顕微鏡像（左上）。G3BP1の電荷プロット（右上）。天然変性領域も示した。免疫沈降-質量分析により、C末端部に8箇所のメチル化残基を同定し、亜ヒ酸の添加により脱メチル化が進行することを示した。電荷ブロック駆動型液-液相分離に基づいた作業仮説（下段）。

うちの 6 箇所ではメチル化の減少（脱メチル化）が進行していることを見出した。

同定されたメチル化残基（アルギニンとリジン残基）をアラニンに置換した変異体を作成し、HeLa 細胞で発現させると、亜ヒ酸に応答したストレス顆粒の形成が大幅に減少した。この結果は、G3BP1 の C 末端 IDR の脱メチル化がストレス顆粒形成に重要な役割を果たしていることを示す。

また、核小体タンパク質である Nopp140 の分裂期リン酸化と核小体崩壊との関係を解明するために、EGFP を融合させた Nopp140 を安定に発現する HeLa 細胞株を樹立した。分裂期に同調した細胞と非同調細胞を準備し、抗 GFP ナノボディを用いて免疫沈降-質量分析を行い（小迫が担当）、分裂期リン酸化部位の同定および比較定量を試みたが、3 箇所のリン酸化部位しか同定することができなかった。

そこで、タンデムマスタグ標識質量分析を用いて、分裂期同調と非同調細胞の間でリン酸化ペプチドの比較定量解析を網羅的に行い（小迫が担当）、Nopp140 のデータを抽出すると、16 箇所のリン酸化部位を同定し、そのうちの 11 箇所では分裂期移行に伴いリン酸化が有意に亢進することを明らかにすることができた。このことは、リン酸化プロテオミクスにおいては、免疫沈降法よりも、タンデムマスタグを用いた網羅的解析のほうが実験手法的に有効であることを示すものである。

## [2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

電荷ブロック駆動型液-液相分離およびリン酸化による制御機構は、本研究チームが世界に先駆けて報告した生命現象の新たな基盤原理である。今後、より多くの生命現象における役割や、より詳細なメカニズムの解明には、リン酸化、メチル化、アセチル化等の翻訳後修飾の「部位」の情報だけでなく、量的情報が必要不可欠である。今後は、細胞内での修飾状態を正確に反映した質量分析技術の確立や応用を目指して研究を進めたい。

## 【3】 主な発表論文等

### [3-1] 論文発表

H. Yamazaki, M. Takagi, H. Kosako, T. Hirano and S.H. Yoshimura. Cell cycle-specific phase separation regulated by protein charge blockiness. *Nat. Cell Biol.* 24: 625-632, 2022.

### [3-2] 学会発表

1. 吉村成弘. 翻訳後修飾による液-液相分離制御機構の解明. 徳島大学先端酵素学研究所成果報告会, 徳島, 3月10日, 2023年
2. 吉村成弘. リン酸化による細胞内液-液相分離制御機構. 定量生物学の会第10回年会, 広島, 12月15日, 2022年
3. 吉村成弘. 翻訳後修飾による液-液相分離制御機構の解明. 第45回日本分子生物学会年会, 幕張, 12月2日, 2022年
4. 吉村成弘. 翻訳後修飾による液-液相分離制御機構. 日本プロテオーム学会2022年大会, 相模原, 8月8日, 2022年
5. 吉村成弘. 翻訳後修飾による液-液相分離制御機構の解明. LLPS研究会, オンライン, 6月25日, 2022年

### [3-3] 成果資料等

なし

## 【4】 今後の課題等

今後の課題、その他等

質量分析技術を用いた翻訳後修飾の比較定量解析法の確立が望まれる。