

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 (TMT) 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) ことを示し、2020年に論文として報告した。さらに、その中でもリン酸化部位が多かった核小体タンパク質 (Ki-67 と NPM1) に着目し、分裂期移行に伴う過リン酸化 (CDK1/CyclinB 等による) 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・抑制することを世界で初めて見出し、論文として報告した。特定残基におけるリン酸化ではなく「電荷ブロック」の変化が重要であること、また、この相分離能の変化が、非膜型オルガネラである核小体および染色体辺縁部の形成・崩壊と密接に関係するという成果は、従来の「立体構造特異的」作用機序とは全く異なる、「電荷ブロック効果」によるリン酸化制御メカニズムを提示するものである。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。18-plex ラベル試薬を用いることで、i) 非同調細胞、ii) 前中期細胞、iii) 後期細胞の3種の細胞間における比較定量を行い、分裂期を通したリン酸化の変化を定量化した。また、G3BP1 の脱メチル化により形成が開始されると考えられている stress granule や P-body の解析では、免疫沈降-質量分析技術や BioID 法を用いて、その組成変化を解析した。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

P-body や stress granule は、様々な刺激（特にストレス）により細胞質に形成される RNA を含む非膜オルガネラである。stress granule の形成には G3BP1 タンパク質の脱メチル化が重要であることが示されている。当研究室ではこれまでに、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) などのレトロウイルスの感染・増殖を抑制する宿主因子 ZCCHC3 の機能解析をおこなってきた。その中で、HIV 感染細胞で、ZCCHC3 がウイルス RNA を非膜オルガネラに閉じ込める機能があることを示唆する結果を得ていた。そこで、ZCCHC3 に TurboID を融合させたタンパク質を安定に発現する細胞株を作成し、小迫と共同で BioID 法による近接タンパク質の同定を試みた。ビオチンラベル後に、P-body マーカータンパク質の1つである LSM14A とビオチンシグナルとの共局

在を蛍光顕微鏡で確認し、この細胞のライセートをアビジンで濃縮後に質量分析で解析した。その結果、多くの P-body 構成タンパク質が同定された。enrichment 解析をおこなったところ、おおよそ、200 倍の enrichment がみられた。これらの結果および他の実験結果から、ZCCHC3 が HIV の RNA を認識して P-body に閉じ込めることでウイルスの感染・増殖を阻害していることが明らかになった。この成果を iScience 誌に共著論文として発表した。

また、分裂期のリン酸化に関しては、過リン酸化により染色体周辺に非膜オルガネラを形成する Ki-67 タンパク質のノックアウト細胞株を作成し、分裂期におけるリン酸化の網羅的解析をおこなった。野生株とノックアウト株のそれぞれで、非同調、分裂前期、分裂後期の 3 種の細胞を調整し、18-plex の TMT 試薬でラベルした後に、リン酸化質量分析をおこなった。結果は現在解析中である。

[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」の情報だけではなく、量的情報が必要不可欠である。今後は、細胞内の様々な非膜オルガネラを対象に、翻訳後修飾とその形成・機能との関係性を解明したい。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

B. Yi, Y.L. Tanaka, D. Cornish, H. Kosako, E.P. Butlertanaka, P. Sengupta, J. Lippincott-Schwartz, J.F. Hultquist, A. Saito, and S.H. Yoshimura (2024) “Host ZCCHC3 blocks HIV-1 infection and production through a dual mechanism” *iScience* 27(3):109107.

[3-2]学会発表

1. 吉村成弘. 新規抗 HIV-1 宿主因子 ZCCHC3 はウイルス産生ならびに感染性を低下させる. 感染症キャンプ, 宮崎, 1月26日, 2024年
2. 吉村成弘. 翻訳後修飾による細胞内非膜オルガネラの構造機能制御機構. 第6回 ExCELLS シンポジウム, 岡崎, 1月22日, 2024年

3. 吉村成弘. Antiretroviral host factor sequesters viral RNA and protein in biological condensate. 日本免疫学会学術講演会, 幕張, 1月17日, 2024年
4. 山崎啓也, 高木昌俊, 小迫英尊, 平野達也, 吉村成弘. 細胞分裂期におけるタンパク質リン酸化の電荷ブロック制御による液-液相分離メカニズムの解明. 日本放射線影響学会, 東京, 11月7日, 2023年
5. 山崎啓也, 高木昌俊, 小迫英尊, 平野達也, 吉村成弘. 細胞分裂期におけるタンパク質リン酸化の電荷ブロック制御による液-液相分離メカニズムの解明. 第69回日本生化学会大会, 福岡, 10月4日, 2023年
6. 吉村成弘. 電荷ブロック駆動型液-液相分離とリン酸化による制御機構の解明. 第33回 DOJIN フォーラム 相分離メガネで見る非膜オルガネラのダイナミクス, 熊本, 10月27日, 2023年
7. S.H. Yoshimura. How do proteins shape, work and interact in a cell? Amgen Scholars Program Asia Symposium, シンガポール, 8月4日, 2023年
8. Y. Yiming, 吉村成弘. ライブセル高速原子間力顕微鏡による細胞表層骨格の可視化とメカノセンシング機構の解明. 日本機械学会 第35回バイオエンジニアリング講演会, 仙台, 6月4日, 2023年
9. 吉村成弘. 相分離がもたらす医療・創薬の展開. 千里ライフサイエンスセミナー, 豊中, 5月26日, 2023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。