

## 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。

2023年度の共同研究により、分裂期におけるタンパク質のリン酸化・脱リン酸化サイクルに、Ki67が形成する染色体辺縁部が深く関与していること、また、それが細胞周期制御（特にG0期への移行）に重要な役割を果たしていることを示す結果が得られた。そこで本研究課題では、分裂期における大規模なリン酸化脱リン酸化サイクルと、細胞増殖との関係性を明らかにすることを目的として、以下のリン酸化プロテオミクス解析をおこなう。

#### [1-2] 研究の方法・経過

これまでにおこなったTMT標識による比較定量質量分析法では、間期と分裂前中期との比較定量を中心に行い、間期から分裂期移行に伴うリン酸化・脱リン酸化部位を網羅的に同定した。本研究では、この手法を分裂後期へと拡大し、間期、分裂前中期、分裂後期へと至る一連の過程の中でのリン酸化の比較定量を試みた。非同調細胞にくわえ、チミジンで同調後にnocodazoleで分裂前中期にarrestした細胞、さらにnocodazoleをwash outした後に、blebbistatin処理により分裂後期の細胞を調製した。この3種の細胞集団を、野生型細胞とKi-67ノックアウト細胞から調製し、18-plexのTMTpro標識を用いることで、リン酸化ペプチドを比較定量解析した。Ki67ノックアウト細胞は、HCT116, HeLa, MCF7等で作成済みである。

### 【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果  
比較定量リン酸化プロテオミクスを用いて、分裂期移行に伴うKi-67のリン酸化状態の変化を解析した結果、非構造のリピードドメインを中心に77の残基でリン酸化の亢進が見られた。

これらの部位の詳細な解析とリコンビナントタンパク質を用いた実験により、以下のことを明らかにした。i) リン酸化により負の電荷ブロックが増強され、正と負の電荷ブロックが交互に並ぶブロックポリマーの性質が強くなる。ii) 電荷ブロックの増強により、リピートドメインの液-液相分離(LLPS) 能が上昇する。iii) 電荷ブロックの強さや数と LLPS 能とは強い正の相関がある。また、Ki-67 ノックアウト細胞を用いた実験では、リン酸化による電荷ブロック形成を模倣した変異体は、PCL の形成を補完することができた。このことは、分裂期リン酸化により Ki-67 の LLPS 能が上昇し、PCL の形成を駆動していることを示す。

次に、細胞増殖制御における PCL の役割を解明するために、PCL 層に含まれるタンパク質に着目した。Protein phosphatase 1 gamma (PP1 $\gamma$ ) は、細胞分裂後期～終期におけるタンパク質の脱リン酸化で主要な役割を果たすタンパク質のひとつであり、PCL に局在する。Ki-67 ノックアウト (KO) 細胞では、PP1 $\gamma$  は分裂期を通して主に細胞質に局在する。細胞周期を同調した細胞を用いて、間期、分裂前中期、分裂後期の 3 種の比較定量リン酸化プロテオミクス (18-plex TMT-mass) を行ったところ、親株、KO 株ともに分裂期前期にプロテオームワイドにリン酸化が見られた。一方、親株で分裂期後期にプロテオームワイドに起こる脱リン酸化が KO 株では抑制され、高いリン酸化状態が維持されていた。これらの結果は、Ki-67 の発現により形成される PCL が PP1 $\gamma$  を取り込み、染色体タンパク質の脱リン酸化を促進することを示唆する。分裂期後期における脱リン酸化は、細胞質分裂、核膜孔複合体再形成、複製前複合体の染色体上へのローディングに重要であり、分裂期から G1/S へと至るサイクルに影響を及ぼしていることが推測される。

## [2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本研究では、Ki-67 が増殖マーカーとして機能するメカニズムの解明につながる大きな成果が得られた。Ki-67 が M~G1 期で細胞周期を制御しているという知見はこれまでにない新しいものであり、プロテオームワイドなリン酸化の変化のより詳細な解析が待たれる。

## 【3】主な発表論文等

### [3-1] 論文発表

1. T. Koyama, N. Iso, Y. Norizoe, T. Sakaue, and \*S.H. Yoshimura (2024) “Charge block-driven liquid-liquid phase separation - mechanism and biological roles.” *J. Cell Sci.* 137(11): jcs261394. (review)
2. H. Shimamura, H. Yamazaki, and \*S.H. Yoshimura (2024) “Charge block-driven liquid-liquid phase separation: A mechanism of how phosphorylation regulates phase behavior of disordered proteins” *Biophys. Physicobiol.*, 21(2), e210012. (review)

### [3-2] 学会発表 (口頭発表のみ)

1. 吉村成弘, 山崎啓也, 小迫英尊, リン酸化による液-液相分離の制御機構 第 15 回日本生物物理学会中国四国支部大会 特別講演 (2024/5/25, 徳島)
2. 山崎啓也, 高木昌俊, 小迫英尊, 平野達也, 吉村成弘 電荷ブロック駆動型液-液相分離の翻訳後修飾による制御機構の解明 第 76 回日本細胞生物学会大会 シンポジウム 招待講演 (2024/7/18, つくば)
3. 吉村成弘, 小迫英尊 増殖マーカータンパク質 Ki-67 は液-液相分離により細胞周期を制御する 第 83 回日本癌学会学術総会 特別企画シンポジウム 招待講演 (2024/9/20, 福岡)
4. 吉村成弘 分裂期にはなぜ多くのタンパク質がリン酸化されるのか 染色体学会 第 75 回年会 特別講演 (2024/10/26, 横浜)
5. 齊藤暁, 吉村成弘 Zinc Finger モチーフを介した condensate 形成機構とウイルス様粒子作成への応用 第 47 回分子生物学会年会 公募シンポジウム (2024/11/29, 福岡)

### [3-3] 成果資料等 特になし

## 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

PCL 層に局在するタンパク質群を BioID で同定するとともに、RNA を RNAseq で同定する。