

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06569

研究課題名(和文)核内凝集体の除去機構-核内凝集体はウイルスと同一機構によって核外へと運ばれるか？

研究課題名(英文)Removal Mechanism of Nuclear Aggregates - Are nuclear aggregates transported out of the nucleus by the same mechanism as viruses?

研究代表者

新海 陽一 (Shinkai, Yoichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：00758378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は不必要なタンパク質凝集体を除去することによって正常な細胞機能を維持している。線虫*C. elegans*の神経細胞核内にタンパク質凝集体を蓄積させたところ、核膜が大きく変形し、タンパク質凝集体が核外へと排出されることを見出した。そこで、近接依存性標識法により核内凝集体と相互作用する分子群を網羅的に同定し、核膜孔複合体の構成分子とよく似たFGリピートタンパク質が多く含まれることを明らかにした。FGリピートタンパク質の液液相分離の役割は、核内外輸送の選択的バリアとして知られるが、それ以外の機能はわかっていなかった。タンパク質凝集体の除去過程において、FGリピートタンパク質の機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患の原因メカニズムの一つとして液-液相分離の破綻が注目されている。本研究では、FGリピートタンパク質の液-液相分離の細胞機能やその破綻の影響を明らかにしてきた。今後、本研究がさらに進展することによって、神経変性疾患の発症メカニズムやバイオミメティクスによる治療法の発見などが期待できる。

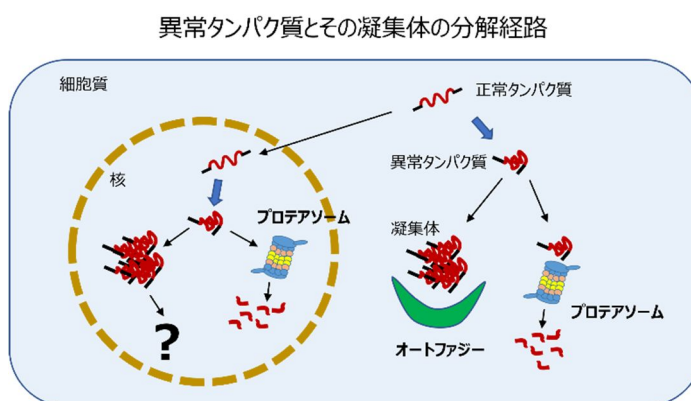
研究成果の概要(英文)：Cells maintain their cellular functions by removing unnecessary protein aggregates. We found that the nuclear membrane was greatly deformed and the protein aggregates were ejected from the nucleus, when protein aggregates were accumulated in the nucleus of *C. elegans* neurons. Using proximity-dependent labeling, we comprehensively identified a group of molecules that interact with nuclear aggregates and found FG repeat proteins that closely resemble the constituent molecules of the nuclear membrane pore complexes. The liquid-liquid phase separation role of FG repeat protein is known as a selective barrier for nuclear transport, but its other functions were not known. The function of FG repeat protein in the removal process of protein aggregates was clarified by our study.

研究分野：分子生物学

キーワード：線虫*C. elegans* 神経変性疾患 液-液相分離 FGリピートタンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸配列にグルタミンが 36 残基以上連続するドメインを持つタンパク質 (PolyQ) を原因とする神経変性疾患では、神経細胞核内に 1 マイクロメートル近い凝集体が蓄積する。この PolyQ タンパク質凝集体は細胞毒性を有することから、生物にとってこの異常凝集タンパク質の核内蓄積から細胞を守るメカニズムが必要である。ヌクレオファジーが、核内凝集体の除去に働いているという仮説が提唱されてきたが、神経細胞の核内凝集体除去におけるヌクレオファジーの分子機構は未解明の部分が多く残されている。これ以前の研究から、線虫 *C. elegans* の神経細胞核内にタンパク質凝集体を蓄積させたところ、タンパク質凝集体が核から出芽し核膜ごとくびり取られることによって、核外へと排出されることを私たちは見出していた。



### 2. 研究の目的

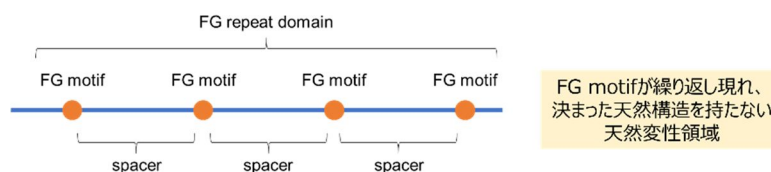
細胞は不必要なタンパク質凝集体を除去することによって正常な細胞機能を維持している。しかし、核膜孔を通過できないほど大きなタンパク質凝集体が、核内に蓄積した場合、細胞はどのようにしてその核内凝集体を除去するのだろうか？我々の見出した核内に蓄積したポリグルタミン凝集体が除去される過程がどのような機構によって制御されているのかを明らかにすることを目的として研究を進めた。

### 3. 研究の方法

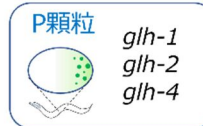
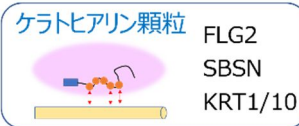
近接依存性標識法 TurboID を使用して、ポリグルタミン凝集体の周囲に存在しビオチン化標識されたタンパク質を回収し、LC-MS/MS によって網羅的な同定を行った。同定された分子群については、ポリグルタミン凝集体との共局在解析を実施し、候補分子の絞り込みを行った。その後、ノックアウト株を作製し、個々の機能解析を進めた。

### 4. 研究成果

近接依存性標識法から同定された分子群には、天然変性タンパク質の一つである『フェニルアラニン(F)-グリシン(G)配列が繰り返し出現するタンパク質 (FG リピードタンパク質)』が含まれていることを明らかにすることができた。FG リピードタンパク質は液-液相分離することが報告されており、その役割は核膜孔複合体における核内外輸送の選択的バリアであることが知られている。ところが、FG リピード配列を持つ天然変性領域には従来明確な定義がなく、核膜孔タンパク質以外に FG リピードドメインを有するタンパク質がどれだけ存在するのかさえも明らかにされてこなかった。近年、液-液相分離に重要なアミノ酸が明らかにされてきており、タンパク質の一次配



列からその役割を類推できる可能性が考えられ、その類推から神経核内の



核膜孔タンパク質以外にも、FG-richなタンパク質が数多く存在する。

凝集体除去メカニズムの理解へつなげることができると考えた。そこで、私たちは、核膜孔の FG-Nup における FG モチーフの出現頻度を参照し、UniProtKB/Swiss-Prot データベースに登録された全タンパク質から FG リピータンパク質を網羅的に探索し、563552 個のタンパク質配列から 2863 個の FG リピータンパク質を同定した。これらの FG リピータンパク質の機能を端的に表すと、ホモティピックな相互作用あるいは透過選択性の制御と言える。

現在、私たちは、これらの解析から同定された特定の FG リピータンパク質について解析を進め、飢餓誘導によって液-液相分離を促進することや、そのノックアウト株がオートファジーフラックスに異常を持つことを明らかにした。今後の解析から、神経細胞核内に蓄積したタンパク質凝集体の除去メカニズムの解明が期待される。また、ヒトにおいて FG リピードドメインを持つタンパク質は 100 種を超え、広範で機能的に重要な FG リピータンパク質群が織り成す細胞制御メカニズムの存在を示唆している。今後、FG リピータンパク質間のクロストークや新たな非膜オルガネラに着眼することで液液相分離と関連した新たな機能が解き明かされ、「FG リピートスーパーファミリー」として新しい学問分野を切り開いていけると期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Dong Yige, Yang Yue, Arai Tatsuya, Okada Rio, Shinkai Yoichi, Doi Motomichi, Aoyama Kouki, Sekiguchi Hiroshi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 29
2. 論文標題 Dynamic motions of ice-binding proteins in living <i>Caenorhabditis elegans</i> using diffracted X-ray blinking and tracking	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101224 ~ 101224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kuramochi Masahiro, Zhu Shumiao, Takanashi Chiaki, Yang Yue, Arai Tatsuya, Shinkai Yoichi, Doi Motomichi, Mio Kazuhiro, Tsuda Sakae, Sasaki Yuji C.	4. 巻 628
2. 論文標題 A mutation to a fish ice-binding protein synthesized in transgenic <i>Caenorhabditis elegans</i> modulates its cold tolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 98 ~ 103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.073	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akahoshi Yuto, Sugai Hiroka, Mimura Masahiro, Shinkai Yoichi, Kurita Ryoji, Shiraki Kentaro, Tomita Shunsuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Phase-Separation Propensity of Non-ionic Amino Acids in Peptide-Based Complex Coacervation Systems	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomacromolecules	6. 最初と最後の頁 704 ~ 713
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biomac.2c01148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ozawa Kazuki, Shinkai Yoichi, Kako Koichiro, Fukamizu Akiyoshi, Doi Motomichi	4. 巻 770
2. 論文標題 The molecular and neural regulation of ultraviolet light phototaxis and its food-associated learning behavioral plasticity in <i>C. elegans</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136384 ~ 136384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2021.136384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nanaura Hitoki、(+11 authors)、Shinkai Yoichi、(+20 authors)、Mori Eiichiro	4. 巻 12
2. 論文標題 C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-25560-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mimura Masahiro、Tomita Shunsuke、Sugai Hiroka、Shinkai Yoichi、Ishihara Sayaka、Kurita Ryoji	4. 巻 9
2. 論文標題 Uncharged Components of Single-Stranded DNA Modulate Liquid-Liquid Phase Separation With Cationic Linker Histone H1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.710729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinkai Yoichi、Kuramochi Masahiro、Miyafusa Takamitsu	4. 巻 9
2. 論文標題 New Family Members of FG Repeat Proteins and Their Unexplored Roles During Phase Separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.708702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mimura Masahiro、Tomita Shunsuke、Shinkai Yoichi、Hosokai Takuya、Kumeta Hiroyuki、Saio Tomohide、Shiraki Kentaro、Kurita Ryoji	4. 巻 143
2. 論文標題 Quadruplex Folding Promotes the Condensation of Linker Histones and DNAs via Liquid-Liquid Phase Separation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 9849 ~ 9857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c03447	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wang Xuan, Shinkai Yoichi, Doi Motomichi	4. 巻 552
2. 論文標題 Retrogradely transmitted $\alpha$ -synuclein is taken up by the endophilin-independent endocytosis in the <i>C. elegans</i> neural circuit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 176 ~ 182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 新海陽一
2. 発表標題 核膜孔以外に存在するFG repeatタンパク質の知られざる機能
3. 学会等名 第5回LLPS研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山迪代、三村真大、新木和孝、井上明俊、倉持昌弘、戸井基道、草田裕之、富田峻介、新海陽一
2. 発表標題 細胞内液-液相分離の攪乱とその生体応答
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新海陽一
2. 発表標題 C9orf72異常反復配列由来ジペプチドリピートによる運動ニューロン障害の分子メカニズム
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 宮岡 佑一郎、新海陽一、戸井基道、技術情報協会、他57名	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 605
3. 書名 ゲノム編集の最新技術と医薬品・遺伝子治療・農業・水畜産物・有用物質生産への活用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	戸井 基道  (Doi Motomichi)  (50344213)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 部門長   (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------