

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06525

研究課題名（和文）種によって異なる低複雑性配列から液-液相分離の分子機構を読み解く

研究課題名（英文）Deciphering the molecular mechanism of liquid-liquid phase separation from low-complexity sequences that vary by species

研究代表者

大橋 祐美子 (Ohhashi, Yumiko)

東京工業大学・科学技術創成研究院・特任講師

研究者番号：10422669

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Sup35蛋白質のN末端領域(Sup35NM)は酵母の種によって配列が異なる。これらのタンパク質を混合し、細胞内液滴の環境に近い、複数の蛋白質が混在する系を試験管内で構築し、相分離液滴からのアミロイド形成を抑制するメカニズムの解明を目指す研究を行った。4種のSup35NMはそれぞれ液滴内で共存できる事が分かり、また、液滴内に共存する事によってアミロイド形成が遅延する事が明らかとなった。酵母細胞内では、Sup35と類似したアミノ酸組成を持つタンパク質が液滴に共局在している事が分かり、細胞内でも同様の仕組みでアミロイド形成が抑制されている事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の異常凝集体であるアミロイドは、様々な重篤な疾患に関与しており、その多くは治療法が確立していない。そのため多方面から勢力的に研究が行われているが、どのようにして体内でアミロイドが形成されるのか、つまりアミロイド病発症のメカニズムは未解明である。相分離液滴からのアミロイド形成は近年発見された新たなアミロイド病発症モデルであり、その詳細な解析とアミロイド形成抑制機構の解明は今後の創薬や治療法開発の上で重要な知見となると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We researched to elucidate how amyloid formation from phase-separated droplets is suppressed. The N-terminal region of the Sup35 protein (Sup35NM) has a different sequence depending on the yeast species. By mixing these proteins, we constructed an in vitro system where multiple proteins coexist, mimicking the environment of intracellular conditions. It was found that the four types of Sup35NM can coexist within the droplets and that their coexistence within the droplets delays amyloid formation. A protein with an amino acid composition similar to Sup35 colocalizes in the droplets within yeast cells, suggesting that amyloid formation is suppressed by a similar mechanism within the cells.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：液-液相分離 アミロイド 天然変性蛋白質

1. 研究開始当初の背景

液-液相分離によって形成される細胞内液滴の役割は多岐に及び、生命維持に欠かせないものである事が近年分かってきた。液-液相分離に主体的に関与するタンパク質の多くは低複雑性配列と呼ばれる、少数のアミノ酸から構成される単純な配列を持っており、その構成アミノ酸から、液滴形成に重要なアミノ酸間の相互作用も明らかになりつつある。しかし相互作用に重要なアミノ酸だけを繋げたモデル蛋白質では天然のタンパク質の相分離を再現する事が難しく、まだ多くの不明点が残されている。

細胞内液滴はその形成・解離によって化学反応や蛋白質複合体形成のON/OFFが制御され、また特定の分子の保護・分解も同様に制御されていることから、相分離液滴の理解が今後の創薬の重要なターゲットとなると考えられる。本研究ではアミノ酸配列は異なるがアミノ酸組成の類似した4種の低複雑性配列を持つタンパク質を用い、液滴形成でのアミノ酸配列の寄与をより詳細に解析する事を目的とする。

2. 研究の目的

Saccharomyces cerevisiae(SC)由来の翻訳終結因子Sup35はアミロイド形成及び細胞内液滴形成に関与するタンパク質として知られており、Sup35のN末端天然変性領域(Sup35NM)がアミロイド形成、液滴形成に重要な領域である。そのSup35NMは酵母の種によって大きく配列が異なるが、アミノ酸組成は保存されている。本研究ではSC-Sup35NMに加え、2種の出芽酵母*Kluyveromyces lactis*(KL), *Candida albicans*(CA)と1種の分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*(SP)由来のSup35NMを用い、液-液相分離やアミロイド形成を詳細に調べる事を目的とする。

3. 研究の方法

試験管内実験では、タンパク質は液滴を形成する事で溶液が白濁する。それを利用し、液滴形成は濁度で定量化した。濁度強度と液滴量との相関性は顕微鏡観察で確認を行い、良い相関を示したため濁度強度をこの研究での主な液滴形成の指標として用いた。アミロイド形成は、アミロイドに特異的に結合する蛍光色素チオフラビン T を用い、蛍光プレートリーダーで経時測定を行った。また、チオフラビン T の蛍光を蛍光顕微鏡で観察し、線維状の構造の確認を行った。また、異種の Sup35NM の液滴やアミロイドでの共存を確認するため、それぞれの Sup35NM の C 末端にシステインを導入し、そこに蛍光ラベルを入れ、蛍光顕微鏡での液滴観察及び線維観察を行った。

Sup35 は、酵母細胞内で、炭素源枯渇ストレス下で液滴を形成する事が既に報告されている。この研究での共局在の観察では、全長の Sup35 と候補タンパク質に蛍光タンパク質ラベルを入れて共発現し、炭素源枯渇条件下で培養して Sup35 の液滴を形成させ、候補蛋白質の局在を調べる方法で行った。

4. 研究成果

KL-Sup35NM 及び CA-Sup35NM の液-液相分離についてはまだ報告はなかったため、まずはこれらの液滴形成能を確認するため濁度測定を行った。2種とも濁度上昇が見られ、顕微鏡下で球状の液滴の形成が確認できた。これらの Sup35NM はアミノ酸配列では異なるが、液滴形成能を保存している事が分かった。

Sup35NM の液滴形成における温度感受性は出芽酵母由来の3種ではほぼ一致し、高温では液滴を作らず、温度を下げていくと、ある温度範囲で急激に液滴量が上昇するという挙動が見られた。一方、分裂酵母由来の SP-Sup35NM は、液滴形成には低温が適している事は共通していたが、温度変化に対し、なだらかで単調な濁度変化が見られ、液滴形成条件が広温度範囲に及んでいる事が予想された。これまでの研究で温度感受性にはチロシン側鎖同士の分子内・分子間相互作用が重要である事を発見しており、この結果は SP-Sup35NM が他の Sup35NM と比較してチロシン残基の数が少ないという事実と一致する結果であった。しかし、細胞内液滴は細胞内の環境によって緻密にコントロールされており、SP-Sup35NM も酵母細胞内では炭素源枯渇ストレスによって液滴形成が誘導される以前は細胞質に拡散した状態である。ここから、SP 酵母細胞内での

液滴形成は Sup35 が主導している訳ではなく、他のタンパク質が主導し、SP-Sup35 は既にできた液滴に取り込まれる形で濃縮されるという仮説が考えられる。

また、出芽酵母由来の 3 種の Sup35NM は、液滴形成後、数時間で自発的にアミロイド線維を形成する事が分かった。そこで 4 種の Sup35NM を等量ずつ混合し、液滴形成、アミロイド形成に及ぼす影響を調べた。濁度測定では混合によって濁度強度は高くなり、混合による濃度増加分、液滴の量が増加した。この時の液滴は組み合わせに関わらず、液滴内に異種 Sup35NM が共存していた。さらに液滴形成後のアミロイド形成は単独時と比較して遅くなっている事が分かった。この結果から、アミノ酸組成の類似した他のタンパク質が細胞内でのアミロイド形成抑制に関与している事が示唆された。

そこで、Sup35NM の配列の特徴であるグルタミン、アスパラギンに富んだ配列を持つタンパク質の細胞内液滴での共局在を調べたところ、いくつかのタンパク質において共局在が確認できた。今後はこれらのタンパク質の相分離及びアミロイド形成における役割を *in vitro* の実験で調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuyama, M., Nishinami, S., Maruyama, Y., Ozawa, T., Tomita, S., Ohhashi, Y., Kasuya, M., Gen, M., Chatani, E., Shiraki, K., Hibara, A	4. 巻 95(26)
2. 論文標題 Detection of Fibril Nucleation in Micrometer-Sized Protein Condensates and Suppression of Sup35NM Fibril Nucleation by Liquid-Liquid Phase Separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ANALYTICAL CHEMISTRY	6. 最初と最後の頁 9855-9862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.3c00766	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 Eri Chatani, Keisuke Yuzu, Yumiko Ohhashi, Yuji Goto	4. 巻 22(9)
2. 論文標題 Current Understanding of the Structure, Stability and Dynamic Properties of Amyloid Fibrils	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094349	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 Shida T., Kamatari Y.O., Yoda T., Yamaguchi Y., Feig M., Ohhashi Y., Sugita Y., Kuwata K. and Tanaka M.	4. 巻 16(7)
2. 論文標題 Short disordered protein segment regulates cross-species transmission of a yeast prion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 756-765
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-020-0516-y	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yumiko Ohhashi
2. 発表標題 A local structure of the intrinsically disordered region of Sup35 governs the temperature sensitivity of liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yumiko Ohhashi
2. 発表標題 Local structure of an intrinsically disordered region of Sup35 causes temperature sensitivity of liquid-liquid phase separation.
3. 学会等名 Satellite seminar of Proteostasis & Disease SYMPOSIUM 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yumiko Ohhashi, Suguru Nishinami, Kentaro Shiraki, Eri Chatani
2. 発表標題 Local conformation of intrinsically disordered region of Sup35 produces temperature sensitivity of liquid-liquid phase separation.
3. 学会等名 Proteostasis & Disease SYMPOSIUM 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋祐美子、西奈美卓、白木賢太郎、茶谷絵理
2. 発表標題 Liquid-Liquid Phase Separation and Amyloid Formation of Sup35 from Three Different Yeast Species
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋祐美子、西奈美卓、白木賢太郎、茶谷絵理
2. 発表標題 天然変性領域の局所構造がSup35の液-液相分離の環境応答性を決定する
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋祐美子、西奈美卓、白木賢太郎、茶谷絵理
2. 発表標題 Sup35の液-液相分離におけるプリオンドメインの役割
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumiko Ohhashi, Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Molecular basis for diversification of amyloid conformation
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋祐美子、西奈美卓、白木賢太郎、茶谷絵理
2. 発表標題 Sup35の液-液相分離におけるプリオンドメインの役割
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 西奈美卓、大橋祐美子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 395
3. 書名 現代科学・増刊46「相分離生物学の全貌」	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------