

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15755

研究課題名（和文）細胞内相分離の誘導制御系開発による相分離形成過程の超解像1分子動態解析

研究課題名（英文）Super-resolution single-molecule dynamics analysis of phase separation formation by the development of a drug-inducible system for intracellular phase separation

研究代表者

伊藤 由馬 (Ito, Yuma)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：70803245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、生体機能に重要な相分離の機構を調べるための、薬剤添加により細胞内相分離を人工的に誘導する系を確立し、液滴内の分子動態を生細胞1分子イメージングで計測することを可能にした。本手法により、液滴形成における細胞内環境の影響、液滴内外での分子拡散や交換、相分離に寄与するアミノ酸組成等が、多様な相分離タンパク質の天然変性領域について1分子レベルの精密な定量情報として得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の相分離は遺伝子発現やタンパク質分解などの広範な生体機能を制御しており、がんや神経変性疾患などにも関与している。本研究で開発した相分離誘導系は、液滴形成における特徴的な動態を顕在化し、その基盤となる物理的な性質や分子生物学的な機構を定量的かつ高精細に計測できるものである。さらに生化学等の研究手法にも広く適用できると考えられ、相分離が関与する広範な生命科学研究へ貢献すると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have established an artificial system to induce intracellular droplet formation by adding drugs to investigate the phase separation mechanism essential for biological functions. This method enables us to measure molecular dynamics in droplets using single-molecule imaging in living cells. We obtained the characteristic dynamics in droplet formation as precise quantitative information at the single-molecule level for the intrinsically disordered regions of various phase-separated proteins. This method quantified the effect of the intracellular environment, molecular diffusion and exchange inside and outside the droplet, and the amino acid composition that contributes to phase separation. This study provides a tool to investigate the physical and biological properties of phase separation, which could contribute widely to life science research.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測 生細胞イメージング 相分離

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生物における液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation) は、疎水性や電荷等の液性の違いによって細胞内環境が分離し、特定の生体分子の凝集や隔離を促進することで、特異的な生化学的反応の場を提供している。その形成には、単純なアミノ酸配列からなり構造を持たない天然変性領域 (Intrinsically disordered region, IDR) が重要であり、RNA 等の足場を介して複数の IDR が集合することで、特定の機能を持った相分離構造が形成される (図 1a)。近年、精製タンパク質の *in vitro* 液滴形成実験等によって、核小体 (Feric M et al. Cell 2016)、ストレス顆粒 (Jain S et al. Cell 2016)、転写エンハンサー (Sabari BR et al. Science 2018) 等に特徴的な IDR の同定が進んでおり、その生物学的な機能の解明に加え、相分離形成の動態やその物理的特性における定量的理解の重要性が高まっている。

研究代表者はこれまで生細胞 1 分子イメージングの研究に携わり、1 分子計測に特化した観察法 (Ito Y et al. Anal Sci, 2014) や、1 分子輝点追跡の新たな解析法 (Ito Y et al. Sci Rep, 2017) を開発してきた。生細胞 1 分子イメージングは、生体分子の挙動を直接細胞内で追跡することで、拡散係数、結合解離定数、分子の個数、ナノメートル精度の局在など多種の分子動態情報を高精細に定量できる。さらに蛍光明滅を用いた 1 分子局在化超解像 (PALM/STORM) 法と 1 分子イメージングとを同時に生細胞でリアルタイム観察できる顕微鏡法の開発により、微細な細胞内構造のナノメートル精度での可視化と 1 分子動態とを同時に捉えることができたようになった。これら生細胞 1 分子解析は、相分離の形成過程を定量する上で先端的な手段である。

これまで主流であった *in vitro* 実験では、タンパク質添加や溶液交換により相分離状態の制御が可能であるが、細胞内での制御は極めて困難であった。細胞内の相分離は、複雑な細胞環境が関わっており、その定量解析には形成過程の制御が必須である。最近、光活性化で相分離を制御する系 (Bracha D et al. Cell 2018) が開発されたが、光制御と同時に蛍光観察する系が必要なため、蛍光イメージングを生かした多様な定量情報の取得には適しておらず、幅広い相分離タンパク質への適用にも至っていない。従って、簡便に細胞内で相分離形成を制御できる系の確立と、それを用いて相分離形成を特徴づける多様で高精細な定量情報の解析が急務であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、生きた細胞内で相分離の形成を制御する系を確立し、その形成過程を 1 分子レベルで定量解析することを目的とした。特に、細胞核内の遺伝子発現に関わるタンパク質に注目し、核質の相分離に伴う個々の分子動態を、独自開発した 1 分子解析法を用いることで高精細に定量化した。本研究で開発する細胞内相分離の制御系とその動態の詳細な定量情報は、相分離メカニズムに直接関わる物性情報であり、物理学と生物学の両面において重要な知見になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 薬剤添加による細胞内相分離制御系の確立

生細胞内で人工的に相分離を形成させる系には、Rapamycin 添加で 2 量体を形成する FKBP と FRB を利用する。相分離を担う IDR に FKBP および蛍光タンパク質を融合し、IDR が集合する足場として、タンデムにつなげた FRB に別色蛍光タンパク質を融合した発現プラスミドを作製し、HeLa 細胞等の培養細胞で同時発現させて、Rapamycin 添加により相分離を誘導して相分離過程を蛍光観察する。相分離制御系を構築後、IDR および足場に融合した蛍光タンパク質をタグタンパク質 (Halo-tag, SNAP/CLIP-tag, TMP-tag) に置き換え、高輝度蛍光色素 (Janelia Fluor 549/646) を用いた 1 分子イメージングにより相分離形成を詳細に観察・解析する (図 1b)。

(2) 相分離形成の 1 分子動態定量解析

1 分子イメージングで得た軌跡・局在情報から、相分離前後に特有の分子動態を高精細に解析する。特に相分離形成における拡散係数、拘束性や指向性等の拡散タイプ、拡散の状態および状態間遷移の速度や割合といった多種多量の定量情報から相分離特有の分子動態を抽出する。また、対数スケールに

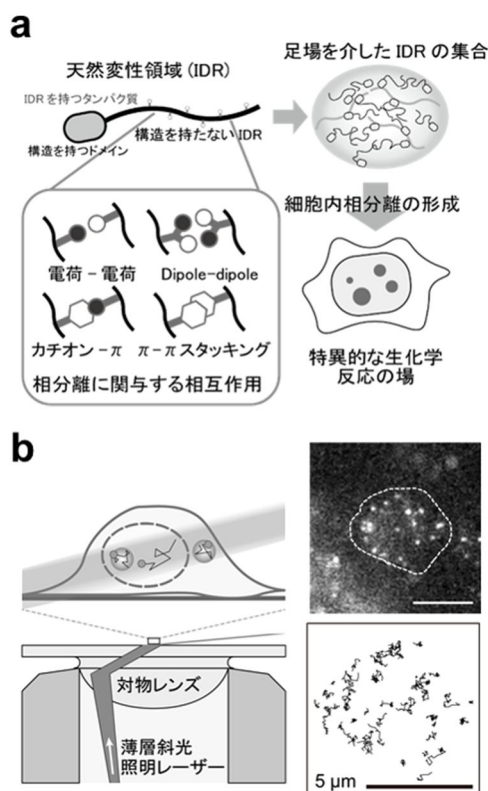


図 1. IDR による相分離形成メカニズム(a)と薄層斜光照明法を用いた生細胞内 1 分子イメージング定量解析(b)。

した平均二乗変位 (Mean Square Displacement, MSD) から液相の粘性・弾性に関わるパラメータを得る。さらに、人工的なアミノ酸配列を用いて相分離形成能に関与する分子基盤を探索し、特定の細胞機能を模倣した人工的な相分離形成を試みる。1 分子動態・局在の定量情報を解析し、相分離特有の分子動態の変化とアミノ酸組成との関係を調べる。

4. 研究成果

(1) FUS タンパク質の N 末端天然変性領域 (IDR) に FKBP と mEGFP を融合したタンパク質と、FRB の繰り返しと mCherry からなる足場タンパク質を作製した。これらを U2OS 細胞内で発現させて蛍光観察したところ、どちらも均一に分布しており、

AP21967 を添加した 15 分後には、IDR および足場タンパク質が含まれるマイクロメートルサイズの液滴が核内および細胞質に確認された (図 2 上)。IDR を除いた FKBP や、単量体の FRB を用いた不完全な系では、液滴が形成されなかったことから、IDR に特異的な相分離が誘導できることが確認できた。蛍光タイムラプスイメージングにより、形成過程を詳細に観察したところ、細胞質液滴は頻繁に融合が観察された一方 (図 2 中)、核内液滴は融合せず大きくなった (図 2 下)。また、これらの液滴は相分離の阻害剤であるヘキサンジオールで同様に可逆的に分散した。これらにより細胞内環境による液滴形成への影響が示唆された。さらに異なるタンパク質由来の 6 種類の IDR で同様の液滴形成の誘導に成功したことにより、様々な IDR に広く使用できることが確認できた。

(2) FRAP 法を用いて液滴内部の流動性や、液滴外部との IDR 交換を定量する計測・解析系を構築した。液滴全体の蛍光退色後、約 1 分で 50% の強度まで回復した。一方液滴の半分を退色させると、その部分の強度が 50% 回復するまでに 1.3 秒しかかからなかった。これらの結果は、液滴内部の分子は高い移動度がある一方で、外部とは緩やかに交換する性質を示しており、生化学反応や複合体形成に優れた環境であることが示唆された。

(3) 液滴内の 1 分子イメージングを行うために、IDR と足場の蛍光タンパク質を SNAP タグと mAzamiGreen にそれぞれ変更し、液滴形成および 1 分子観察条件の検討を行った。液滴誘導前の IDR 分子は、細胞核内全体に広く分布し、均質で速い単純拡散の動態を示した。薬剤添加による液滴形成を誘導したところ、足場の液滴蛍光と重なる位置に局在する 1 分子輝点が観察されたことから、液滴内で拡散する IDR 1 分子の観察に成功したと判断した (図 3 上)。液滴内の 1 分子動態を定量するための画像処理および軌跡解析を確立し、相分離動態に関わる動態指標を精密に計測した。個々の軌跡が存在する場所における足場タンパク質の蛍光強度と 1 分子動態の比較により、液滴内において特徴的な遅い拡散動態成分の増加が検出できた (図 3 下)。またこれらの解析法開発により、微細な転写領域内における転写関連タンパク質の 1 分子動態定量 (Uchino S, Ito Y et al. J Cell Biol, 2022) や、核小体内における粘性係数の推定 (Matsumori H et al. Life Sci Alliance, 2022) にもつながった。

(4) IDR 構成アミノ酸の相分離能への寄与を調べるために、TAF15 の IDR における変異体解析を行った。遺伝子全合成により IDR 内の 33 アミノ酸をランダムに置換したところ、同 family タンパク質と同様のアミノ酸組成において液滴形成能を維持した。これにより特定のアミノ酸組成がその順序に関わらず、液滴形成において重要であることが示唆された。以上のように、本研究で構築した細胞内相分離の誘導系は、多くの IDR 液滴の動態定量や機能解析に有用であり、今後生化学等の相分離研究への応用も期待できる。

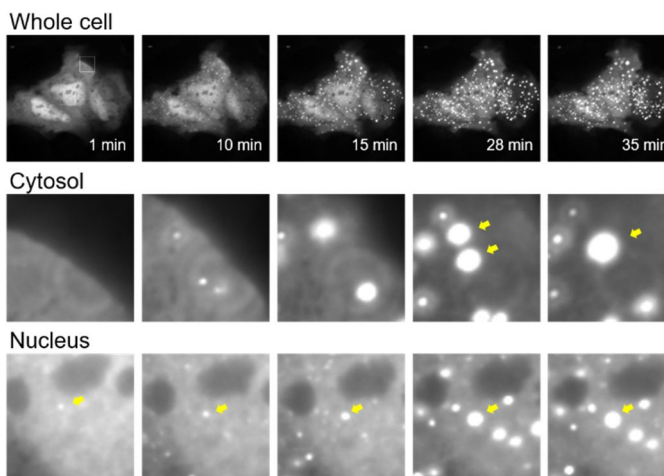


図 2. 細胞内相分離誘導のタイムラプス観察
IDR と足場タンパク質を発現させた U2OS 細胞に AP21967 を添加し、その直後からの IDR 蛍光像。細胞内環境の違いにより異なる形成過程が見られた (中段、下段)。

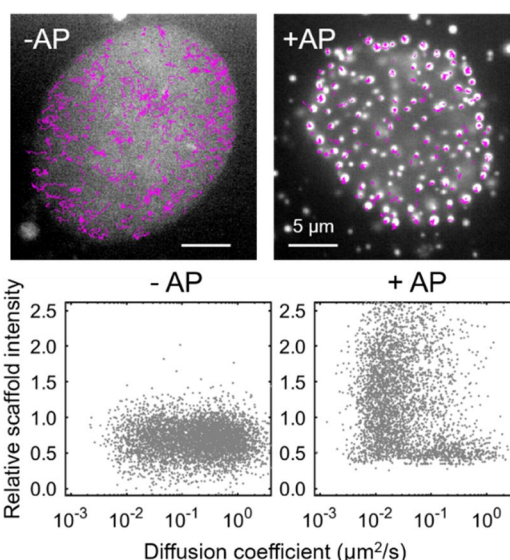


図 3. 液滴内 IDR の 1 分子軌跡と動態解析
U2OS 細胞核内の足場タンパク質蛍光像 (白) および IDR の軌跡 (マゼンタ)。相分離誘導後に足場液滴内に局在する低拡散状態の IDR が検出された (右下)。

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Liu Yang, Zhao Ning, Kanemaki Masato T., Yamamoto Yotaro, Sadamura Yoshifusa, Ito Yuma, Tokunaga Makio, Stasevich Timothy J., Kimura Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Visualizing looping of two endogenous genomic loci using synthetic zinc finger proteins with anti FLAG and anti HA frankenbodies in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 905 ~ 926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12893	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 該当する

1. 著者名 Uchino Satoshi, Ito Yuma, Sato Yuko, Handa Tetsuya, Ohkawa Yasuyuki, Tokunaga Makio, Kimura Hiroshi	4. 巻 221
2. 論文標題 Live imaging of transcription sites using an elongating RNA polymerase II-specific probe	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202104134	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 Matsumori Haruka, Watanabe Kenji, Tachiwana Hiroaki, Fujita Tomoko, Ito Yuma, Tokunaga Makio, Sakata-Sogawa Kumiko, Osakada Hiroko, Haraguchi Tokuko, Awazu Akinori, Ochiai Hiroshi, Sakata Yuka, Ochiai Koji, Toki Tsutomu, Ito Etsuro, Goldberg Ilya G, Tokunaga Kazuaki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko	4. 巻 5
2. 論文標題 Ribosomal protein L5 facilitates rDNA-bundled condensate and nucleolar assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101045	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 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Xiang Zhou, Yuma Ito, Makio Tokunaga
2. 発表標題 A simulation study to evaluate improvement of three-dimensional localization precision of single molecule images using adaptive optics
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuma Ito
2. 発表標題 Live-cell single-molecule imaging of the dynamic interaction between RNA polymerase II and chromatin nanostructures
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuma Ito, Makio Tokunaga
2. 発表標題 Simultaneous single molecule imaging of RNA polymerase II dynamics and chromatin nanostructures in living cells
3. 学会等名 66th Biophysical Society Annual Meeting
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masanori Hirose, Yuma Ito, Makio Tokunaga
2. 発表標題 Single-molecule analysis of state-specific histone mobility in chromatin subcompartments with different epigenetic modifications
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuma Ito, Supanut Sirisukhodom, Makio Tokunaga
2. 発表標題 Single-molecule imaging analysis of RNA-dependent dynamics of phase-separated nucleolar protens in living cells
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuma Ito, Makio Tokunaga
2. 発表標題 Single-molecule super-resolution analysis for nano-scale interaction between RNA polymerase II and chromatin
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanori Nakano, Yuma Ito, Makio Tokunaga
2. 発表標題 Structural changes in heterochromatin involved in cell cycle using single-molecule and super-resolution imaging
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito Y, Tokunaga M
2. 発表標題 Visualizing and quantifying single-molecule dynamics in living cells
3. 学会等名 The 9th Tokyo Tech International Symposium on Life Science and Technology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ito Y, Tokunaga M
2. 発表標題 Nano-scale localization analysis of histone variants in living cells using single-molecule super-resolution imaging
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ito Y, Tokunaga M
2. 発表標題 Quantification of dynamics and kinetics using single-molecule and super-resolution imaging in living cells
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sirisukhodom S, Ito Y, Saitoh N, Tokunaga M
2. 発表標題 Multicolor single-molecule imaging analysis of the nucleolar proteins
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakano M, Ito Y, Maeda T, Obuse C, Tokunaga M
2. 発表標題 Dynamics of Heterochromatin protein 1 inside and outside chromocenter domain in living cells using single-molecule imaging
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zhou X, Ito Y, Tokunaga M
2. 発表標題 Light field simulation of single-molecule imaging for aberration correction using adaptive optics
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------