

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21468

研究課題名(和文) 液液相分離内のタンパク質の構造および分子間相互作用のラベルフリー直接計測

研究課題名(英文) Label-free direct measurement of protein conformation and intermolecular interactions in liquid-liquid phase separations

研究代表者

中林 孝和 (Nakabayashi, Takakazu)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30311195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：LLPSは生体高分子が高濃度で存在する液滴が生じる現象であり、様々な生理反応に関係することが指摘されている。しかし、液滴を単一液滴の状態ではラベルフリー測定する適切な手法がなく、LLPSと生理現象との関係の詳細は不明であった。本研究では、ラベルフリーで分子の情報を得るラマン顕微鏡および紫外共鳴ラマン散乱が、LLPS研究の有力な手法になることを提案することができた。単一液滴内の生体高分子の濃度を高精度に定量できることを示し、周囲の環境変化に伴う濃度変化を検出することができた。また、紫外共鳴ラマン散乱から芳香族アミノ酸残基のラマンバンドを選択的に検出し、LLPSに伴うタンパク質の状態変化を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LLPSは神経変性疾患の発症と関係することが指摘されており、LLPSによって生じた液滴から発症を誘起するタンパク質の凝集物へ変化することが示されている。本研究では、液滴から凝集物への変化について、どのような濃度変化、構造変化を経て、タンパク質の凝集物が生成するのかをラベルフリーで検討できる手法を提案する。液滴は生体高分子間の弱い分子間相互作用によって生成しているために、蛍光分子でラベル化すると分子間相互作用が変化してしまい、液滴を適切に評価できなかった。本研究ではラベルフリーかつ単一液滴の状態では化学情報が得られる有力な手法となり、凝集物変化の詳細を明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：LLPS is a phenomenon in which droplets with high concentrations of biological macromolecules are generated, and it has been pointed out that LLPS is related to various physiological reactions. However, the details of the relationship between LLPS and physiological phenomena have remained unclear due to the lack of an appropriate method for label-free measurement of droplets in a single droplet state. In this study, we succeeded in proposing that Raman microscopy and UV resonant Raman scattering, which provide label-free molecular information, can be powerful methods for LLPS studies. We showed that the concentration of biomolecules in a single droplet can be precisely quantified, and changes in concentration due to changes in the surrounding environment can be detected. In addition, we selectively detected the Raman bands of aromatic amino acid residues from UV resonant Raman scattering and investigated the state changes of proteins associated with LLPS.

研究分野：生物物理化学

キーワード：液液相分離 濃度 定量 ラマンイメージング 紫外共鳴ラマン散乱 タンパク質 水 核酸 神経変性疾患

1. 研究開始当初の背景

本研究では、細胞内における液液相分離"Liquid-Liquid Phase Separation (LLPS)"を調べる新規手法を提案する。近年、生物学の分野において LLPS が注目を集めている[1]。生物学における LLPS は、細胞内において特定のタンパク質や核酸の濃度が非常に濃い状態(液滴)と薄い状態の二相の液体状態が生じる現象である。様々な生理現象に対する LLPS の寄与が報告されており[2]、LLPS が筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患の発症とも関係することが指摘されている。神経変性疾患の発症にはタンパク質の凝集が関係するとされているが、はじめに発症に関係するタンパク質の液滴が生じ、本来であればその液滴は消滅するが、何らかの要因によって液滴からタンパク質の凝集体(線維)が生じ、疾病を誘起する機構が提案されている(Fig. 1) [3]。

しかし、LLPS の詳細は殆どわかっていない。LLPS の研究では、LLPS を生じるタンパク質を蛍光タンパク質などで蛍光ラベル化し、その蛍光を観測する。しかし、蛍光ラベルによる方法では、ラベル化されたタンパク質しか観測できないこと、タンパク質の構造情報や分子間相互作用を得ることが難しいなどの欠点がある。また、液滴は生体分子間の弱い分子間相互作用の総和によって生じており、蛍光分子を付加することで、その性質が大きく変化する可能性がある。蛍光法では液滴外の情報も得ることができない。

上記の問題はラマン分光法を用いて解決できる。振動分光法であるラマン分光法は、試料内にあるすべての分子をラベルフリーで観測し、個々の分子分布の可視化も行うことができる。さらに、アミノ酸残基の吸収波長である紫外光を励起光とすることで[4]、カチオン- π 相互作用などの LLPS の形成に寄与する分子間相互作用を直接検出できる可能性がある。LLPS の分子間相互作用の検出は、今まではアミノ酸残基を変化させて推定した方法が主に行われていた。タンパク質のラマンバンドを解析することによって、直接的な情報を得ることができる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、ラマン分光の長所を活かした LLPS のラベルフリー測定手法を提案する。以下を行う：(1) タンパク質の液滴形成法の確立とタンパク質のラマン測定による液滴・ゲル・凝集体の各状態の構造解析とその場判別、(2) 液滴内の成分同定と濃度定量、時間変化、LLPS 外の成分同定、(3) 紫外ラマンシステムを製作し、紫外励起を用いた芳香族アミノ酸残基の選択的観測による分子間相互作用の検討。最終的には、今回提案するラマン分光を用いた解析が、LLPS を調べる汎用的なプロトコルになり得ることを提案したい。現在、顕微ラマン分光を用いた細胞のその場解析を進めており、迅速に本研究を行うことができると考えている。

3. 研究の方法

可視域の顕微ラマン測定は自作の共焦点ラマン顕微鏡を用いた。倒立型の配置であり、励起波長は 532 nm である。画像はステージスキャン方式で得ている。緩衝溶液中にて作成した液滴試料をディッシュに入れ、顕微測定を行っている。紫外共鳴ラマン散乱測定は、イントラキャビティの紫外 Ar⁺イオンレーザー (INNOVA、コヒーレント) を励起光源とした自作のラマン測定システムを用いた。励起波長は 229 nm である。紫外測定では顕微配置ではなく、回転セルにタンパク質溶液を入れ、バルク状態で測定を行っている。

4. 研究成果

(1) FUS LC タンパク質の液滴内濃度定量：本研究では初めに、タンパク質液滴のモデルとして良く用いられている筋萎縮性側索硬化症(ALS) 関連タンパク質 FUS (Fused in Sarcoma) の low-complexity ドメイン (FUS LC) の液滴を測定対象とした。FUS LC 液滴の作成方法は複数の報告例があるが、我々は pH 11 の強アルカリの水溶液中で数 mM に濃縮した FUS LC について、中性のバッファーで急速に 100 μ M 程度まで希釈することで、再現性の高い液滴作成を行うことに成功した(Fig. 2a)。この液滴を用いてラマンイメージング観測と濃度定量を行った[5]。

Fig. 2b に作成した FUS LC の液滴の内側と外側のラマンスペクトルを

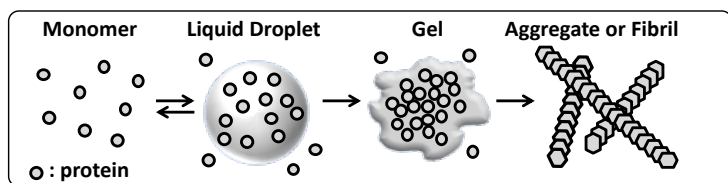


Fig. 1. タンパク質の単量体から凝集体への変化の概念図 [3]。

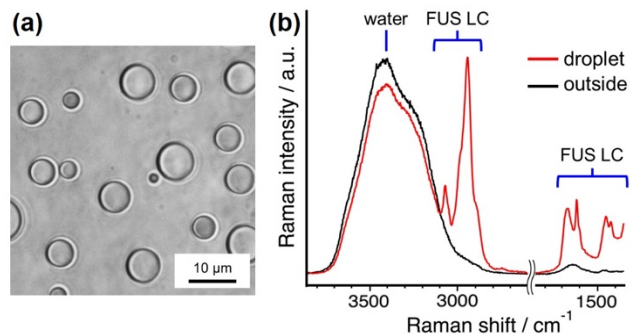


Fig. 2. FUS LC 液滴の明視野像 (a)と液滴内外のラマンスペクトル (b) [5]。

示す。3400 cm^{-1} を中心とするブロードなラマンバンドは水の O-H 伸縮振動バンドに対応し、2940 cm^{-1} のバンドは FUS LC の C-H 伸縮振動バンドになる。液滴内のスペクトルには FUS LC と水に由来する振動バンドが観測されたのに対し、液滴外では水のバンドのみ観測された。この結果は、タンパク質は液滴内に局在し、液滴の外側はほぼ水しか存在しないことを示している。Fig. 3 は C-H および O-H 伸縮振動バンド強度で得られたラマン画像である。ラベルフリーで単一液滴の画像化ができることがわかる。また、液滴内はタンパク質が高濃度で存在するために水の密度が低下し、O-H 伸縮振動バンド強度が減少する。この減少を用いて O-H 伸縮振動バンドからも単一液滴の画像化ができる。

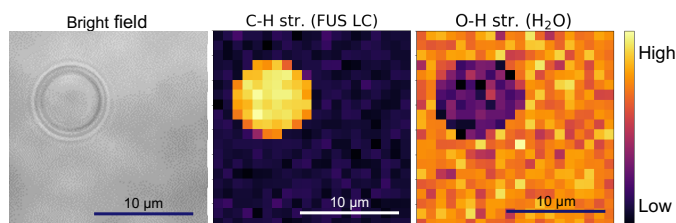


Fig. 3. FUS LC 液滴の明視野像 (左) と C-H 伸縮 (中) と O-H 伸縮振動バンドのラマン画像[5]。

ラマンイメージングの測定は、通常の蛍光測定と同様に絶対強度を測っているために、定量には強度標準が必要となる。我々は液滴外の水の O-H 伸縮振動バンドを強度標準として、液滴内のタンパク質の濃度定量が行えることを提案し[6]、本アイデアを FUS LC の濃度定量に用いることとした。液滴外の水中の水分子の濃度は常に一定であり、液滴外の水のラマンバンドが画像化の強度標準として用いることができる。水の O-H 伸縮振動バンドで規格化した FUS LC の C-H 伸縮振動バンド強度について、FUS LC 濃度との検量線を作り、液滴外の水のバンドで規格化した液滴内の C-H 伸縮振動バンド強度から FUS LC 濃度決定を行うことに成功した。

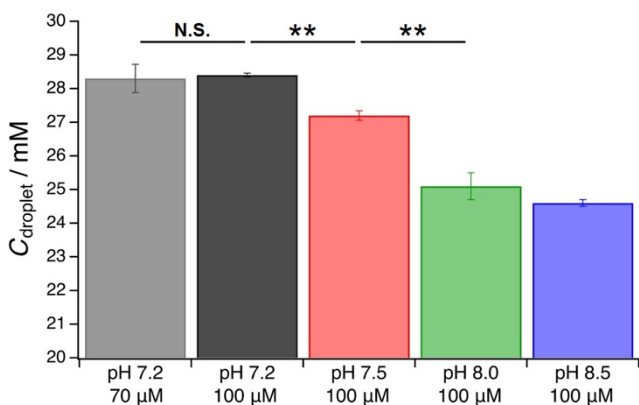


Fig. 4. 液滴内の FUS LC 濃度の液滴作成時 (100 μM と 70 μM) および緩衝溶液の pH 依存性[5]。

この手法を用いて、様々な条件での液滴内の FUS LC 濃度を検討した (Fig. 4)。初期濃度を 70 μM から 100 μM に変えても、生成する液滴内の濃度は一定であった。液滴内の FUS LC 濃度は初期濃度に依存しないことがわかった。しかし、緩衝溶液の pH を 7.2 から 8.5 へ変化させると、pH の上昇に伴い液滴内の FUS LC 濃度が減少した。液滴内の FUS LC の濃度が周囲の環境に依存することがわかった。塩濃度の変化および両親媒性分子の添加の効果も測定し、液滴内の FUS LC の濃度は周囲の環境に依存し、液滴形成に不利な環境になるほど、液滴内の FUS LC 濃度が減少することを定量的に示すことができた。これらの結果は、一般的な 2 成分系の相図で説明することができ、理論計算との対応が可能である。

単一液滴内のタンパク質の濃度および周囲の環境変化に伴う濃度変化について、単一液滴の状態定量的に示すことができた。このような手法は他には無いと考えられ、細胞内での展開を含め、多くの応用が期待できる。

(2) ペプチド/RNA 二成分系での液滴内濃度定量：ポリペプチドと RNA からなる液滴についても我々の方法で濃度定量を行った。K⁺存在下でグアニン四重鎖構造を取る G4 RNA と配列の多くがアルギニンとグリシンで構成される RGG ペプチドを混合することで液滴が生じることが報告されている[7]。そこで本実験では、G4 RNA と RGG ペプチドからなる液滴を作成し、液滴内の濃度定量を行った。導入した RNA とペプチドの混合比や周囲温度などを変化させ、液滴内部での RNA とペプチドの分子構造・混合比の変化について検討した[8]。

10 から 30 μM の RNA とペプチドを混合し、90 分静置することで RNA/ペプチド混合液滴の作成に成功した。顕微鏡下で液滴内外のラマンスペクトルを比較すると、RNA とペプチドに由来するラマンバンドが液滴内で明瞭に観測され、液滴外は水のみしか観測されなかった。RNA とペプチドがともに液滴内で濃縮されていることがわかる。液滴外の水の O-H 伸縮振動バンド強度でスペクトルを規格化し、濃度定量を行った。濃度定量に用いるラマンバンドは、RNA は 1580 cm^{-1} のグアニン環由来のバンド、ペプチドは 1670 cm^{-1} のアミド I バンドを用いた。水のバンドで規格化した濃度既知の純品のスペクトルのバンド強度から、液滴内の RNA とペプチドの濃度決定を行った。10 μM で混合した場合、RNA/ペプチド混合液滴内の RNA とペプチドの濃度は、それぞれ約 300 と 450 mg/mL であった。各成分については、先の FUS LC 液滴内の FUS LC 濃度 (350 mg/mL) と同程度である。次に、液滴作成時の RNA とペプチドの混合比を変化させ、液滴内の濃度比が変化するか検討した。RNA とペプチドが 10 μM と 30 μM 、または 30 μM と 10 μM と混合比を変化させても、ラマン強度に大きな変化はなく、液滴内での濃度はどちらもほぼ変わらないことがわかった。液滴内での混合比は、液滴作成時の混合比を変化さ

せても一定に保たれることがわかった。この結果は、液滴を形成する分子間相互作用が、RNAの負電荷とペプチドの正電荷の間の引力（クーロン力）が主な駆動力となっていることを示唆している。温度に対しても、液滴内での混合比は一定であり、クーロン力の強度が温度に大きく依存しないことと矛盾しない。また、スペクトルの形状から RNA の構造の検討を行い、液滴内では RNA は 4 重らせん構造を形成していることを確認できた。RNA の紫外共鳴ラマン測定を行うことで、液滴内の構造変化の詳細を検討することを予定している。

以上より、顕微ラマン分光法を用いた液滴内での濃度定量手法を RNA/ペプチド混合液滴に応用し、液滴内での各成分の濃度定量を無標識で行うことができた。条件を変化させた際の液滴内の濃度・構造変化を検討できることを示すことができた。

(3) 紫外共鳴ラマン散乱を用いたタンパク質構造変化：紫外共鳴ラマン散乱を用いることで、共鳴する芳香族アミノ酸残基のラマンバンドを選択的に検出することができる。本研究では、マシヤドジョセフ病関連タンパク質 *ataxin-3* (ATX-3) および FUS LC の液滴の紫外共鳴ラマンスペクトルの測定に成功することができた。しかし、本実験での信号雑音比では、液滴化に伴う波数シフトとバンド幅の変化は観測されず、カチオン- π 相互作用などの相互作用によるシフト変化は検出されなかった。紫外共鳴ラマン強度については、絶対強度を測定しているために、強度標準が無ければ議論することができない。そこで、培地に硫酸ナトリウムを添加し、硫酸ナトリウムを強度標準とした濃度測定プロトコルを新たに確立した。

強度標準のある状態で、液滴形成に伴うタンパク質の紫外共鳴ラマン強度の変化を検討した。ATX-3 について、芳香族アミノ酸であるトリプトファンとチロシンの一部の共鳴ラマンバンドで液滴形成に伴う強度増加が観測された。共鳴するトリプトファンとチロシンの吸収バンドの液滴化に伴う微小変化を観測していると考えられる。Ataxin-3 の分散状態から凝集化に伴う変化についても、芳香族アミノ酸のラマンバンド間の相対強度が変化し、凝集化に伴う芳香族アミノ酸周囲の環境変化を検出していると考えられ、現在検討している。

<引用文献>

- [1] S. Alberti, A. Gladfelter, T. Mittag, *Cell* 176 (2019) 419.
- [2] Y. Shin, C. P. Brangwynne, *Science* 357 (2017) eaaf4382.
- [3] 中林孝和, 横澤公平, 黒井邦巧, *化学工業* 71 (2020) 216.
- [4] N. Fujimaki, K. Nishiya, T. Miura, T. Nakabayashi, *Chem. Phys.* 479 (2016) 5.
- [5] K. Yokosawa, S. Kajimoto, D. Shibata, K. Kuroi, T. Konno, T. Nakabayashi, *J. Phys. Chem. Lett.* 13 (2022) 5692.
- [6] K. Murakami, S. Kajimoto, D. Shibata, K. Kuroi, F. Fujii, T. Nakabayashi, *Chem. Sci.* 12 (2021) 7411.
- [7] M. Tsuruta, et al., *Chem. Commun.* 58 (2022) 12931.
- [8] K. Yokosawa, M. Tsuruta, S. Kajimoto, N. Sugimoto, D. Miyoshi, T. Nakabayashi, submitted.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yokosawa Kohei, Kajimoto Shinji, Shibata Daiki, Kuroi Kunisato, Konno Tomohiro, Nakabayashi Takakazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Concentration Quantification of the Low-Complexity Domain of Fused in Sarcoma inside a Single Droplet and Effects of Solution Parameters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 5692 ~ 5697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c00962	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 中林 孝和、梶本 真司、黒井 邦巧	4. 巻 94
2. 論文標題 ラマン顕微鏡によるラベルフリーなタンパク質液滴定量法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 444 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940444	査読の有無 無
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 中林 孝和、梶本 真司	4. 巻 100
2. 論文標題 ラマンイメージングを用いた細胞内の水・夾雑環境の理解	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 367 ~ 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34565/seibutsukogaku.100.7_367	査読の有無 無
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18件（うち招待講演 12件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 単一液滴内のラベルフリー濃度測定からみた液液相分離と分子夾雑環境
3. 学会等名 第二回相分離生物物理学研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 分子夾雜環境の一つとしての液液相分離：ラマン顕微鏡によるラベルフリー濃度測定
3. 学会等名 日本化学会コロイド先端技術講座2022ソフトマターの「液液」相分離（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 ラマンイメージングを用いた細胞内の水計測とその場定量への応用
3. 学会等名 電子情報通信学会2023年総合大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takakazu Nakabayashi
2. 発表標題 Investigation of chemical properties of a single protein droplet formed by liquid-liquid phase separation
3. 学会等名 15h International Symposium on Nanomedicine（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takakazu Nakabayashi
2. 発表標題 Water in a living cell probed by a Raman microscopy
3. 学会等名 EMLG/JMLG 2022 Annual Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 細胞・タンパク質のラベルフリーイメージングでわかったこと・これからの課題
3. 学会等名 第31回日本バイオイメーjing学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takakazu Nakabayashi
2. 発表標題 Dynamics and structural changes associated with liquid-liquid phase separation in neurodegenerative disease-related proteins
3. 学会等名 The 7th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 水のラマンイメージングからみた細胞内環境・細胞内温度・液-液相分離
3. 学会等名 日本分光学会関西支部 2022年度第1回講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 ラマンイメージングを用いた液液相分離・分子夾雑環境の定量
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 ラマン分光を用いた水素結合性液体および細胞内にある水の状態解析
3. 学会等名 理研シンポジウム 「量子ビームで創る新しい生命科学：X線からテラヘルツまで」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 顕微ラマン分光によるラベルフリー細胞生物研
3. 学会等名 第35回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中林孝和
2. 発表標題 細胞内の水の測定から細胞内夾雑環境・液-液相分離を探る
3. 学会等名 第30回日本バイオイメーjing学会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横澤 公平, 柴田 大輝, 梶本 真司, 中林 孝和
2. 発表標題 Label-free quantification for a single droplet using Raman spectroscopy: Application to ALS associated protein FUS LC
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 横澤 公平, 柴田 大輝, 梶本 真司, 中林 孝和
2. 発表標題 ラマンイメージングを用いたALS関連タンパク質FUS LCの液-液相分離の定量解析
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横澤 公平, 柴田 大輝, 梶本 真司, 中林 孝和
2. 発表標題 Label-free observation of protein concentration change in a droplet formed by liquid-liquid phase separation using Raman spectroscopy
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 横澤 公平, 柴田 大輝, 梶本 真司, 中林 孝和
2. 発表標題 ラマンイメージングを用いたALS関連タンパク質FUS LCの単一液滴内での濃度変化の定量
3. 学会等名 2021年度生物物理学会北海道支部-東北支部合同例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上一輝, 梶本 真司, 柴田 大輝, 黒井 邦巧, 中林 孝和
2. 発表標題 Liquid-liquid phase separation of disease-associated protein and its quantification using Raman spectroscopy
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 横澤 公平、柴田 大輝、梶本 真司、黒井 邦巧、中林 孝和
2. 発表標題 顕微ラマン分光法を用いたALS関連タンパク質FUS LC単一液滴のラベルフリー濃度定量
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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
連携研究者	梶本 真司 (Kajimoto Shinji) (80463769)	東北大学・薬学部・准教授 (11301)	
連携研究者	田原 進也 (Tahara Shinya) (00783060)	東北大学・薬学部・助教 (11301)	

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