

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15238

研究課題名（和文）蛍光寿命・異方性顕微分光による相分離液滴中のタンパク質周辺環境のラベルフリー解析

研究課題名（英文）Label-free analyses of the surrounding environment around proteins in droplets formed via liquid-liquid phase separation using fluorescence lifetime and anisotropy microscopy

研究代表者

田原 進也（Tahara, Shinya）

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：00783060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：神経変性疾患原因タンパク質が液-液相分離を起こすと、凝集が促進される。本研究では相分離により生成した液滴中のタンパク質の凝集に伴う構造変化や液滴の物性変化を検討した。自家蛍光寿命・異方性顕微鏡を構築し、マシャドジョセフ病原因タンパク質ataxin-3や筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質FUS LCの液滴をラベルフリー測定した。得られた結果から液滴内におけるataxin-3の凝集に伴う逐次的な構造変化が明らかとなった。またFUS LCの液滴内部の粘度が時間とともに増大することを示し、液滴からゲルや凝集体への相転移を定量的に追跡できる可能性を提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自家蛍光・異方性顕微鏡を開発し、液-液相分離により生成した液滴内のタンパク質の構造や状態を観測することに成功した。従来法と異なり、本手法はラベルフリーかつ液滴のままの状態ですべてタンパク質凝集や液滴の物性変化を定量的に評価できる。

Ataxin-3は通常の溶液中で線維化するが、液滴内では異なる構造の凝集体が形成された。このことはataxin-3の毒性がLLPSによって変化する可能性を示唆しており、マシャドジョセフ病の治療法開発に極めて重要な知見となる。また液滴内の粘度に基づき、ゲル化や凝集を観測することにも成功した。このことは疾患の進行を定量的に判断する指標にもなると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Liquid-liquid phase separation promotes the aggregation of neurodegeneration-related proteins. In this study, we investigated changes in the protein structure and the droplet properties in the course of the aggregation of ataxin-3 and FUS LC after the phase separation. These proteins are the causative proteins of Machado-Joseph disease and amyotrophic lateral sclerosis. Ataxin-3 possesses three tryptophan residues. Their fluorescence lifetimes changed on distinct timescales with the incubation, indicating that ataxin-3 undergoes multistep structural changes in the droplets in the course of the aggregation. The fluorescence anisotropy decay of FUS LC in the droplets became slower with the incubation. This result indicates that the anisotropy measurements enable quantitative analyses of the phase transition of the protein droplets such as the gelation and the aggregation based on the viscosity changes.

研究分野：生物物理化学

キーワード：液-液相分離 自家蛍光 蛍光異方性 神経変性疾患 ポリQ病 凝集

## 1. 研究開始当初の背景

液-液相分離(LLPS)は細胞内や緩衝液中に高濃度のタンパク質や核酸を含むマイクロメートルオーダーの液滴が生じる現象である(図1)。液滴の生成は、生体内反応の制御に強く関与することが知られている一方、タンパク質の凝集を促進し、神経変性疾患などを発症する原因と考えられている(S. Maharana, *et al. Science*, **2018**, 360, 918)。タンパク質液滴の物性を明らかにすることで、タンパク質の凝集促進機構の解明に繋がり、各種生理現象の解明のみではなく、神経変性疾患などの予防や治療に大きく貢献できる。

マシャドジョセフ病はタンパク質 ataxin-3 の凝集が原因で引き起こされる神経変性疾患である。マシャドジョセフ病は運動失調を伴う疾患であり、日本でも症例が多数報告されているが、根本的な治療法は確立していない。本来、Ataxin-3 は脱ユビキチン化酵素であり、N末端側にジョセフィンドメイン(JD)を持つ(図2)。JDのC末端側に複数のユビキチン結合モチーフが繋がっており、最もC末端側にはグルタミンが多数連結したポリグルタミン鎖(polyQ)が連結している(図2)。Ataxin-3 の polyQ は通常 35 残基以下であるが、マシャドジョセフ病患者の場合、polyQ の長さが異常に伸長(>40 残基程度)している。このような伸長した polyQ を持つ ataxin-3 は容易に凝集を引き起こし、病原性を獲得する。我々の研究室では最近、ataxin-3 が LLPS による液滴を生じることを初めて示し(K. Murakami, *et al. Chem. Sci.* **2021**, 21, 7411-7418.)、液滴中の ataxin-3 の濃度が液滴外部よりも約 200 倍高いことが明らかになった。多くのタンパク質で LLPS が凝集体形成を引き起こすことから、液滴内の ataxin-3 の挙動を明らかにすることは、マシャドジョセフ病の治療法開発に重要であると考えられる。

また液滴を形成する代表的なタンパク質として筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因タンパク質 Fused in sarcoma (FUS)があげられる。FUS は遺伝子発現制御などの役割を持つタンパク質として知られるが、変異などの理由で凝集体を形成し、ALS の原因となることが知られている。

従来、液滴内のタンパク質の研究には、液滴形成タンパク質と蛍光タンパク質の融合タンパク質や、側鎖を蛍光色素で修飾したタンパク質が用いられてきた。しかしタンパク質液滴は、タンパク質間の弱い分子間相互作用によって形成され、蛍光タンパク質の融合や側鎖修飾は液滴内部のタンパク質の物性に無視できない影響を与える。この理由から、液滴内部のタンパク質の物性を真に理解するためには、ラベルフリーの観測が求められる。核磁気共鳴分光法を用いて液滴内部のタンパク質構造が調べられているが、液滴のままで測定することができない。ラマン顕微鏡を用いて液滴内部のタンパク質の凝集に伴う二次構造変化が最近報告された(S. O. Shuster, *et al. J. Biol. Chem.* **2022**, 298, 101528.)。タンパク質の二次構造変化はラマンスペクトルの Amide I バンドの振動数変化に基づいて観測できるが、構造変化次第では鈍感な場合もある。実際、我々の研究室ではラマン顕微鏡用い、液滴内部における ataxin-3 の Amide I バンドを観測したが、構造変化を検出することはできなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 液滴内部のタンパク質の状態や構造変化を蛍光標識等無しに検出する手法を開発し、(2) 液滴形成によるタンパク質凝集促進の機構を解明することである。具体的には後述する自家蛍光寿命顕微鏡を構築し、液滴内の ataxin-3 が凝集する過程における立体構造や液

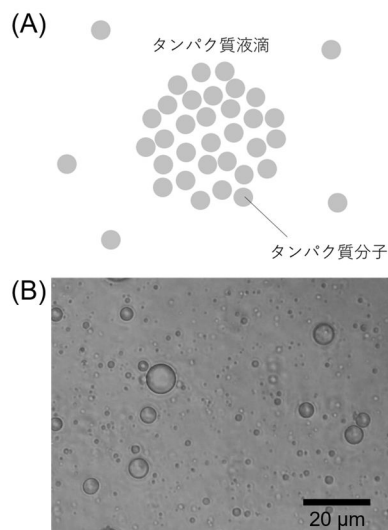


図1. (a)タンパク質液滴。液滴内部のタンパク質濃度は、外部に比べて非常に高い。(b) 実際のタンパク質液滴の写真。円形の構造体がタンパク質液滴。

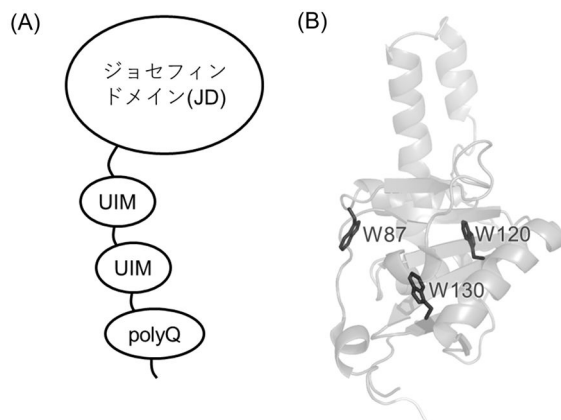


図2. (a)Ataxin-3 の構造。ジョセフィンドメイン(JD)にユビキチン結合モチーフ(UIM)、グルタミンを多数含む配列(polyQ)が連結。(b)JD の構造(PDBID: 1YZB)とトリプトファン(W87, W120, W130)の配置。

滴内の環境の変化を調べる。得られた結果から ataxin-3 や筋萎縮性側索硬化症原因タンパク質 FUS の液滴内における凝集の分子機構を明らかにする。また自家蛍光寿命顕微鏡を蛍光異方性測定ができるよう改変し、液滴内の粘度変化を追跡する。これにより FUS のゲル化や凝集に伴う粘度の変化を追跡する。

### 3. 研究の方法

本研究では自家蛍光寿命イメージング装置を構築し、液滴の物性や液滴内タンパク質の構造を調べた。タンパク質はトリプトファンやチロシンといった芳香族アミノ酸を持ち、紫外光を照射すると、これらのアミノ酸が蛍光を放出する。自家蛍光を用いれば、蛍光標識は不要となる。さらにこれらの蛍光寿命は周辺の親水性などといった溶媒環境を鋭敏に反映することから、タンパク質の構造変化の情報を与える。したがって本手法を用いれば、液滴内部のタンパク質の構造変化をラベルフリーで観測することが可能となる。

本手法により ataxin-3 の液滴内における構造変化を研究した。Ataxin-3 の polyQ の長さがそれぞれ 28 および 64 残基である Q28, Q64 を研究対象とした。Q28, Q64 の液滴を作製するため、これらの溶液(200  $\mu$ M)に等量のポリエチレングリコール溶液を終濃度 10% w/w となるように加えた。液滴の懸濁液をガラスボトムディッシュに載せ、開発した顕微鏡により自家蛍光寿命測定を行った。凝集過程におけるタンパク質の構造変化を観測するため、液滴試料を 23  $^{\circ}$ C でインキュベートした。

続いて FUS の天然変性領域である FUS LC の液滴のゲル化や凝集過程を追跡するため、自家蛍光異方性減衰の測定を行った。自家蛍光寿命顕微鏡の励起光と自家蛍光の偏光を偏光子により制御することで、自家蛍光異方性減衰の測定を行えるよう拡張した。pH 12 の 1 mM FUS LC 溶液を pH7 のバッファで 10 倍希釈することで、液滴を作製した。この試料の自家蛍光異方性減衰を測定した。凝集過程における FUS LC 周辺の環境変化を調べるため、液滴試料を 23  $^{\circ}$ C でインキュベートした。

### 4. 研究成果

#### 【紫外励起自家蛍光寿命イメージング装置】

図 3 には開発した紫外励起自家蛍光寿命イメージング装置の概略図を示す。励起光源には波長 299 nm、パルス幅 0.6 ns の LED 光源を用いた。偏光子を用いて光源を水平偏光とし、顕微鏡に導入した。本装置では紫外光の反射率を増強した反射型対物レンズを用いた。透過型の対物レンズは紫外光の透過率が低く、さらにはレンズや内部の接着剤が強い蛍光を放出してしまう。また広視野観測を行うため、顕微鏡の直前にレンズを設置した。試料の蛍光はマジックアングルに傾けた偏光子を通過し、単一光子計数カメラに結像させた。これにより試料の蛍光イメージ・試料の各位置における蛍光減衰曲線・蛍光寿命イメージを取得した。

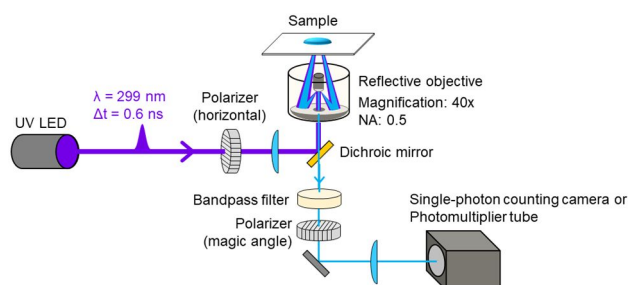


図 3. 紫外励起自家蛍光寿命イメージング装置。

図 4 には Q28 の明視野画像(図 4A)と自家蛍光画像(図 4B)を示す。液滴形成直後(0 h)には円形の構造体が複数観測され、強い自家蛍光を示した。本測定では 299 nm の励起波長を用いており、トリプトファンが選択的に励起される。したがって観測された蛍光は Q28 のトリプトファンに由来する。観測結果はこの構造体内部にはタンパク質が高濃度で存在することを意味する。3 h 後には非円形の構造体が現れ、48 h 経過すると凝集体となった。これらの構造体も自家蛍光を示したことから、液滴内のタンパク質が徐々に凝集体に変化することが明らかとなった。

図 4 には Q28 の明視野画像(図 4A)と自家蛍光画像(図 4B)を示す。液滴形成直後(0 h)には円形の構造体が複数観測され、強い自家蛍光を示した。本測定では 299 nm の励起波長を用いており、トリプトファンが選択的に励起される。したがって観測された蛍光は Q28 のトリプトファンに由来する。観測結果はこの構造体内部にはタンパク質が高濃度で存在することを意味する。3 h 後には非円形の構造体が現れ、48 h 経過すると凝集体となった。これらの構造体も自家蛍光を示したことから、液滴内のタンパク質が徐々に凝集体に変化することが明らかとなった。

続いて液滴内部の自家蛍光寿命の解析を行った。開発した顕微鏡では試料の各座標における

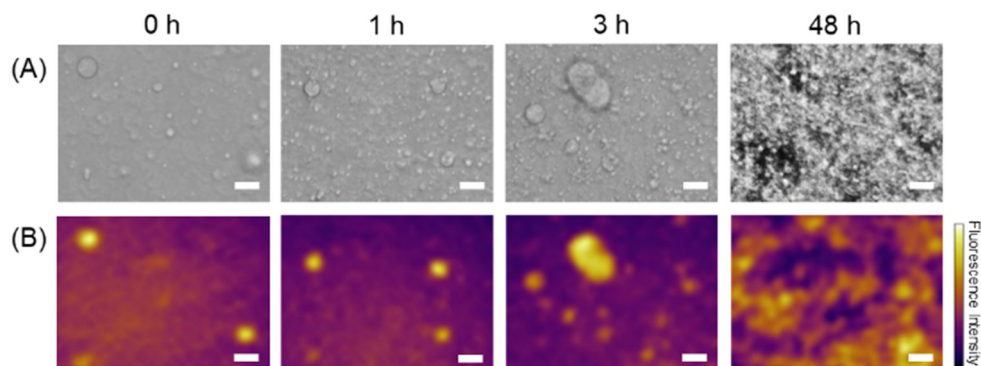


図 4. Q28 の液滴や凝集体の(A)明視野および(B)自家蛍光画像。

蛍光減衰曲線を取得することができる。蛍光減衰曲線を 3 項の指数関数から成る関数によりフィッティングした。蛍光減衰曲線の平均寿命を座標ごとにプロットしたところ、液滴内部の蛍光寿命はほぼ一様であった。このことは液滴内のタンパク質の構造や周辺環境が均一であることを意味する。したがって以降では試料の全点の蛍光減衰曲線の平均を解析に用いた。

図 5A に Q28 液滴の各インキュベート時間後の蛍光寿命をプロットした。Q28 の通常の溶液および通常の溶液をインキュベートすることにより生成した凝集体の蛍光寿命もプロットした。液滴を形成すると蛍光寿命が長くなった。このことは液滴内部と水溶液の溶媒環境の違いを反映していると考えられる。インキュベートとともに蛍光寿命が長くなり、48 時間後には蛍光寿命が一定となり、凝集体の蛍光寿命と同程度となった。このことは液滴内部の Q28 の凝集に伴い、構造や周辺環境が変化したことを示唆する。タンパク質の構造と環境変化をより詳細に明らかにするため、蛍光スペクトルを測定した。図 5B には蛍光スペクトルのピーク波長をプロットした。凝集に伴い、蛍光スペクトルのピーク波長が長くなった。このことはトリプトファンが徐々に親水的な環境へと変化していることを意味する。

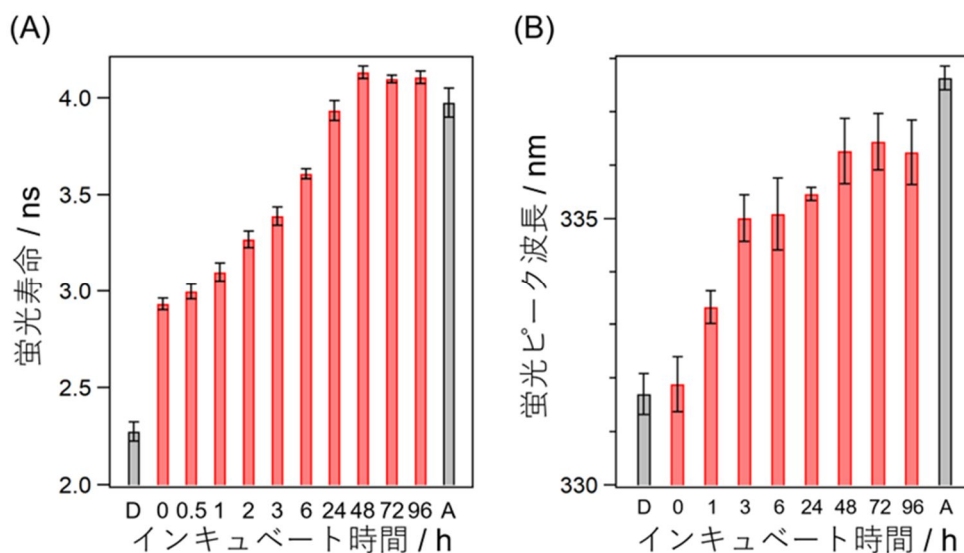


図 5. Q28 の(A)自家蛍光寿命および(B)自家蛍光スペクトルのピーク波長。横軸は D: 通常の溶液中、A: 通常の溶液から生成した凝集体、数字: 液滴のインキュベート時間。

凝集に伴う各トリプトファン周辺の環境変化を解析するため、Q28 がもつ 3 つのトリプトファンのうち、2 つをフェニルアラニンに置換した 3 変異体(W87F/W120F, W87F/W130F, W120F/W130F 変異体)を調製し、LLPS を誘起し、自家蛍光寿命およびスペクトルを測定した。得られた結果から(1) LLPS を起こすと、Trp87 の周辺環境が疎水的になり、(2) その後数時間以内に疎水性以外の周辺環境変化が起こる。(3) 凝集が進行するに従い、Trp120 および Trp130 の

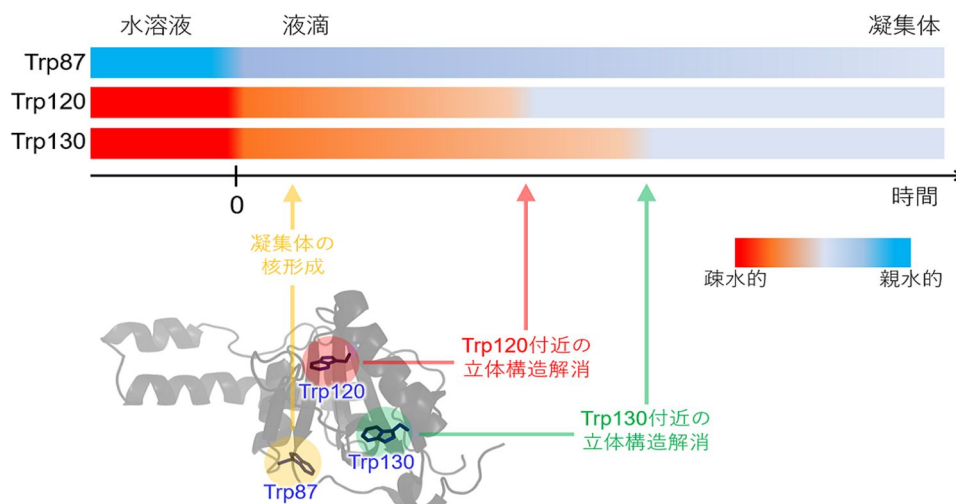


図 6. Ataxin-3 の立体構造とトリプトファンの配置および観測された周辺環境の時間変化。

周辺がそれぞれ異なる時間スケールで徐々に親水的になることが明らかとなった。

得られた変異体の結果から、液滴内では Q28 が図 6 のような立体構造変化を起こしていることが示唆された。Trp87 はタンパク質表面に存在している。LLPS によって Trp87 周辺が疎水的

になったことは、Q28 の液滴内部にタンパク質が高濃度に濃縮されていることを反映している。その後 Trp87 の周辺環境が数時間以内に变化した。通常の水溶液中において ataxin-3 は線維化を起こし、Trp87 を含む  $\alpha$ -ヘリックス周辺が線維化の発端となるコア構造を形成することが知られている。したがって観測された数時間以内の変化は、液滴内で凝集体のコアが形成されていることを反映していると考えた。Trp120 や Trp130 はタンパク質内部に埋もれている。凝集に伴い、Trp120 や Trp130 の親水性が徐々に増大した。このことは Q28 の立体構造が崩壊することを意味している。Trp120 と Trp130 の親水性増大の時間スケールが互いに異なることから、液滴内における Q28 のアンフォールディングが多段階的に起こることが明らかとなった。

本研究ではさらに polyQ の長さが 64 残基である Q64 の、液滴内における構造変化を観測した。まず Q28, Q64 液滴の明視野観察を行ったが、凝集体形成にかかる時間スケールはほとんど同じであった。図 7A, B にはそれぞれ自家蛍光寿命およびスペクトルのピーク波長の時間変化を示した。Q28 と Q64 を比較すると、アンフォールディングの時間スケールに大きな変化は見られなかった。前述の通り、通常の水溶液中では polyQ の長さが 40 残基程度を超えると、ataxin-3 の凝集が強く促進される。このことから LLPS は ataxin-3 の凝集の分子機構を変化させることが示唆された。polyQ が伸長した ataxin-3 が液滴を形成することで、線維以外の凝集体が形成され、毒性を低減する可能性があると考えられている。今後は LLPS によって生成した ataxin-3 の凝集体の細胞毒性を評価することで、ataxin-3 の LLPS の生理的役割を考察する。

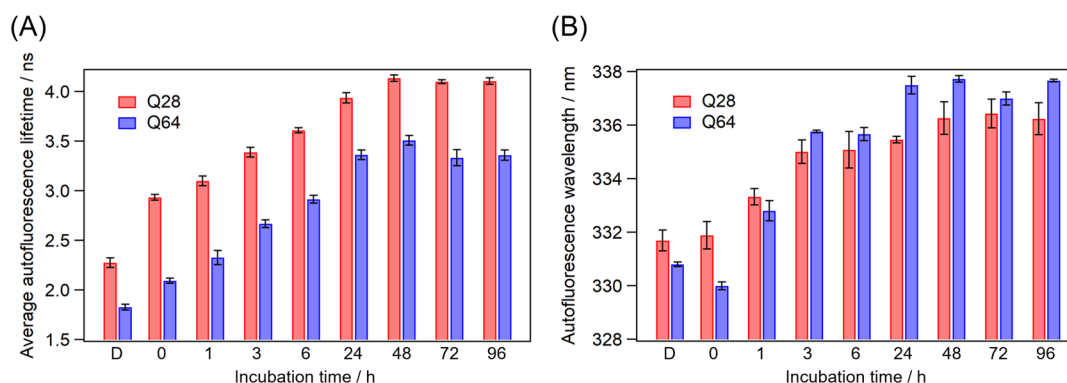


図 7. Q28, Q64 液滴の(A)自家蛍光寿命および(B)スペクトルのピーク波長の時間変化。

我々はさらに FUS LC 液滴の自家蛍光測定を行った。チロシンを効率的に励起するため、励起波長を 275 nm とした。FUS LC はトリプトファンを持たないため、チロシンの蛍光が選択的に観測される。FUS LC の液滴はインキュベートしても蛍光減衰曲線の変化を示さなかった。FUS LC にはチロシンが 27 残基含まれている。このため各残基の周辺環境変化が平均化され、蛍光減衰曲線が見かけ上変化を示さなかったものと考えられる。続いて自家系九尾の異方性減衰曲線を測定した。得られた異方性減衰曲線とそのインキュベートによる変化を図 8 に示した。通常の水溶液中では異方性は観測されなかった。液滴形成直後の FUS LC は -0.3 ps から 0.3 ps の時刻において異方性を示した。異方性減衰は本装置の時間分解能である 0.6 ps 以内に起こった。液滴をインキュベートすると、この振幅が徐々に大きくなった。このことは励起直後の異方性が時間とともに大きくなることを意味しており、液滴内部のタンパク質溶液の粘度が LLPS およびインキュベートに伴って徐々に増大したことを意味する。このことは粘度を定量的な指標とすることで、液滴のゲル化や凝集を観測できる可能性を示している。

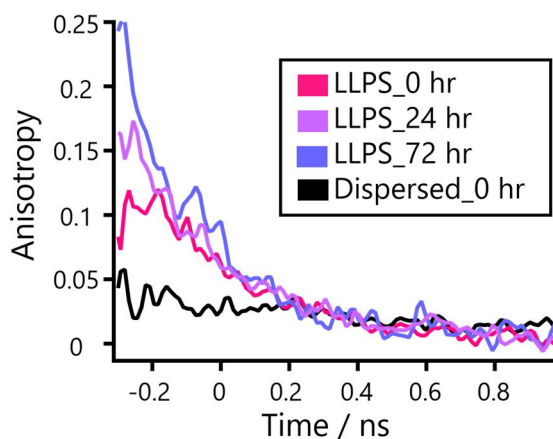


図 8. FUS LC の異方性減衰曲線。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Matsuura Uchu, Tahara Shinya, Kajimoto Shinji, Nakabayashi Takakazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Label-free autofluorescence lifetime reveals the structural dynamics of ataxin-3 inside droplets formed via liquid-liquid phase separation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-33268-y	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田原進也
2. 発表標題 先端的分光法によるタンパク質の病原性発現機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会東北支部 第9回物理・分析若手研究者セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuura Uchu, Tahara Shinya, Kajimoto Shinji, Nakabayashi Takakazu
2. 発表標題 Direct observation of unfolding dynamics of the amyloidosis-related protein in droplets formed via liquid-liquid phase separation by autofluorescence measurement
3. 学会等名 第16回分子科学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Matsuura Uchu, Tahara Shinya, Kajimoto Shinji, Nakabayashi Takakazu
2. 発表標題 PolyQ chain length dependence of liquid-liquid phase separation and aggregation dynamics of a neurodegeneration-related protein ataxin-3
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaichi Nagai, Shinya Tahara, Uchu Matsuura, Mizuki Sugimoto, Eita Sasaki, Shinji Kajimoto, Kenjiro Hanaoka, Takakazu Nakabayashi
2. 発表標題 Quantitative analysis of time-dependent dynamics of FUS LC droplets formed by LLPS using fluorescence lifetime
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦宇宙、田原進也、梶本真司、中林孝和
2. 発表標題 自家蛍光測定による液滴内の病原性蛋白質の変性ダイナミクスの観測
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永井海地、田原進也、松浦宇宙、杉本瑞樹、佐々木栄太、梶本真司、花岡健二郎、中林孝和
2. 発表標題 蛍光寿命測定による液-液相分離に伴う粘性変化の追跡
3. 学会等名 第61回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2022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
---------	---------