

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06577

研究課題名(和文) 一分子分光による相分離した液滴中タンパク質の構造揺らぎ追跡

研究課題名(英文) Tracking of protein conformational fluctuations in droplets of liquid-liquid phase separation by using single-molecule fluorescence spectroscopy

研究代表者

小井川 浩之(Oikawa, Hiroyuki)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：40536778

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)：タンパク質や核酸を含む溶液は条件次第で相分離し、濃い相は液滴となる。相分離を起こすタンパク質LAF1-RGGドメイン(LAF1-RGG)を蛍光色素で二重標識し、一分子蛍光測定を行うことで、液滴中のタンパク質の構造変化をとらえることを目指した。高時間分解能一分子FRET測定を行った所、希薄溶液ではLAF1-RGGは収縮状態を保持していた。さらに、LAF1-RGG変異体に対する測定によって、液滴形成にはカチオン- と疎水相互作用が主要な役割を担うことがわかった。液滴中での一分子FRET測定を行うための装置は新規に開発した。しかし、液滴中でのLAF1-RGGの構造変化をとらえるまでには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

液-液相分離に関する既存の研究の多くは、液滴を顕微鏡で観察、次に液滴に含まれるタンパク質と核酸の種類を調べ、最後に液滴内部で起こっている反応を類推するというトップダウンアプローチであった。しかし、このアプローチでは、液滴形成のメカニズムの詳細を理解することは難しかった。本研究成果の学術的な意義は、液滴を作るタンパク質の運動を一分子レベルで追跡するボトムアップアプローチによって、液滴形成のメカニズムに迫ることができたことである。加えて、本研究の成果である新開発の一分子蛍光測定装置は様々な試料と条件にも応用可能である。実際、分子混雑環境下でのタンパク質一分子の構造変化を確かめることができた。

研究成果の概要(英文)：Concentrated solutions of proteins and nucleic acids often show liquid-liquid phase separation, where the condensed phase forms droplets. We utilized RGG domain of LAF1(LAF1-RGG) as a model of protein, whose solution easily shows phase separation. By single-molecule measurements for double-fluorescent-labeled LAF1-RGG molecules, we aimed to observe structural changes of the protein molecules in droplets. The results of single-molecule FRET measurements with a high time-resolution exhibited LAF1-RGG maintained a compact state in diluted solution. Furthermore, measurements for the mutants of LAF1-RGG revealed that cation- and hydrophobic interactions play major roles in droplet formations. We developed the device for single-molecule FRET measurements in droplets. However, it was not possible to detect the structural changes of LAF1-RGG in droplets.

研究分野：生物物理

キーワード：液-液相分離 タンパク質 一分子蛍光測定 FRET LAF1-RGGドメイン 蛍光一分子分光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

液-液相分離は、溶液が均質に交じり合わず、二相に分離する現象である。水と油のように複数の物質による相分離だけでなく、タンパク質や核酸を含む濃厚溶液では、条件を整えるとタンパク質や核酸の濃度が濃い相と薄い相に分離することが知られている。しかも、不思議なことに相分離した液体を攪拌しても濃い相と薄い相は均一に混じりあわず、濃い相は液滴となって分散する。細胞質と核内にもこれと同じような液滴があり、それらは外部ストレスへの応答、転写、翻訳、シグナル伝達などの過程に関わることが分かっている。このような液滴は膜のないオルガネラと呼ばれることもある。

例えば転写過程の例を考えると、転写因子は低濃度では活性が低いが、濃度が増加すると静電相互作用によって集まり、相分離して液滴を形成する。液滴内部では、転写因子に加えて DNA も高濃度になり、活性上昇すると考えられる。このように液-液相分離によって、細胞内の様々な過程が制御されている可能性が多く報告され注目されていた。

これまでの研究では、最初に細胞内の過程に注目し、次に各過程での液滴形成を光学顕微鏡で観察、さらに液滴にどのようなタンパク質と核酸が含まれているのかを調べ、最後に液滴内部で起こっている分子レベルでの反応を類推する、という順番で行われてきた。つまりトップダウン的なアプローチが主流であった。しかし、このトップダウンアプローチでは、液滴形成がなぜ起こるのかという物理的メカニズム理解することは難しく、分子レベルでの反応の理解も間接的なものにとどまっていた。

2. 研究の目的

本研究は、液滴中の分子の運動を一分子蛍光分光法を用いてとらえ、液滴形成のメカニズムや、液滴中のタンパク質の構造状態、タンパク質と核酸の相互作用を分子レベルで理解することを目的とした。

一分子蛍光分光法は分子集団の構造分布の取得と一分子の構造変化追跡が可能な強力な手法である。特に、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)効率測定は、タンパク質や核酸などの生体高分子の構造変化追跡に有用である。なぜなら、二種類の蛍光色素でラベルした生体高分子の FRET 効率から色素間の距離の情報が得られるからである。

しかし、一分子 FRET 測定の既存の実験手法では、構造変化追跡の時間分解能は数ミリ秒であり、得られる分子構造の情報も限定的であった。これまでに私達は一分子 FRET 測定において 10 マイクロ秒以下の時間分解能を可能にする手法を開発している。この高時間分解能測定法を液滴中の分子にも適用することで、他の手法では不可能な液滴中の生体高分子の運動を一分子 FRET 効率時系列として取得することを目指した。

さらに本研究では、高感度検出器を組み込んだ独自の共焦点レーザー走査顕微鏡を開発し、液滴中のタンパク質一分子を効率よく測定することも目指した。

3. 研究の方法

本研究では、液-液相分離を起こすモデルタンパク質分子として LAF1-RGG ドメインを用いた。

線虫の卵細胞には P 顆粒(生殖顆粒)と呼ばれる構造物がある。P 顆粒は卵割が進む前に片側に集まる性質があり、徐々に融合して大きくなる。つまり膜のないオルガネラである。P 顆粒に存在する RNA ヘリカーゼであるタンパク質 LAF1 は、濃厚溶液を用いた *in vitro* 実験において、塩濃度が低い時に LAF1 だけでも液-液相分離を起こすことが知られている。LAF1 の N 末端 170 残基は天然変性領域であり、この領域はアルギニン(R)とグリシン(G)の繰り返し配列を多く含むため、RGG ドメインとよばれる。RGG ドメイン部分だけのタンパク質溶液でも、液-液相分離を起こす。また、LAF1-RGG ドメインが P 顆粒の形成に必須の要素であることも分かっている。そこで、この RGG ドメインを蛍光標識し、一分子蛍光測定を行うことで、液滴中の RGG ドメインの構造変化をとらえた。また構造変化の塩濃度依存性や RGG ドメイン自身の濃度依存性をしらべた。具体的には以下のことに取り組んだ。

(1) LAF1-RGG ドメインの二重蛍光ラベル化

既に先行研究に倣い、私達は LAF1-RGG ドメインの大腸菌による発現系は構築し、タンパク質の発現精製には成功していた。本研究では、二重蛍光標識のために、RGG ドメインの C 末端にシステイン残基を導入した変異体を作製した。この RGG ドメイン変異体の N 末端アミンとシステインのチオール基にそれぞれ FRET のドナーとアクセプターとなる蛍光色素をラベル、精製し、測定用の試料を得た。RGG ドメインのアミノ酸配列は、カチオン- 相互作用に重要なチロシンが多く含む。また、疎水性アミノ酸を多く含む領域も存在している。そこで、全チロシンをセリンに置換した YtoS 変異体と疎水性の高い部分を欠失させた変異体の二種類を作製、二重蛍光標識した。

(2) 共焦点蛍光顕微鏡の自作と液滴中の一分子検出可能な顕微分光装置の開発

共焦点レーザー走査顕微鏡を自作した。一分子蛍光検出が可能でなければならぬため、光検出器には、単一光子検出可能なアバランシェダイオード (SPAD) をドナー蛍光用とアクセプター蛍光用に 2 台組み込んだ。可動ミラーによってレーザー光スポットを走査し画像取得ができるようにした。さらに、二色のレーザー光を交互に照射することができるようにして、ALEX (Alternating-laser excitation) 一分子 FRET 測定を可能にし、自作の光子計数相関プログラムによって、蛍光相関分光測定も可能にした。

(3) 二重蛍光標識 LAF1-RGG ドメインの一分子 FRET 測定と、液滴中での蛍光顕微分光

液滴が実際にできてきている条件で測定を行う前に、液滴ができない希薄溶液中での、RGG ドメインの一分子 FRET 測定を様々な条件で行った。この測定には、以前開発した実績のある高時間分解能一分子 FRET 測定装置を用いた。さらに前述した二種の変異体に対しても同様の測定を行った。これらの結果を比較することで、LAF1-RGG ドメインの一分子レベルでの構造変化と液滴形成能の関係を調べた。

高時間分解一分子 FRET 測定装置では、液滴中と液滴外を判別して測定することができない。そこで液滴を形成している蛍光標識なしの RGG ドメイン濃厚溶液に、微量の蛍光標識 RGG ドメインを加え、(2) で開発した装置を用いて、液滴内外での FRET 効率の違いを調べた。

4. 研究成果

高時間分解能一分子 FRET 測定によって、LAF1-RGG ドメインは希薄な溶液中においても収縮した状態を保持していることを示唆する結果を得た。

LAF1-RGG ドメインの濃厚溶液に対する顕微鏡観察によって YtoS 変異体では液滴形成が見られず、疎水性領域欠失変異体では液滴形成能が低いことが確かめられた。一方、希薄溶液の一分子 FRET 測定を行うと、両方の変異体とも比較的収縮した状態であることがわかった。これらの結果は、分子が収縮しやすい性質だけでは、液滴形成に十分ではないことを示している。おそらく液滴形成に重要だと考えられる分子間の相互作用において、カチオン-

相互作用と部分的な疎水相互作用が主要な役割を担うのではないかと考えている。以上の結果は、液-液相分離の分子機構の理解に重要な示唆を与えてくれる成果である。

上記の測定と並行して開発してきた液滴中での一分子 FRET 測定を行うための装置も完成させることができた。この装置を使って LAF1-RGG の液滴中での挙動を調べるため、特に液滴を作りやすい RNA 存在下での測定を試みた。この測定を試みる過程で、残念ながら私達が作製した二重蛍光標識した LAF1-RGG ドメイン試料には不純物として相当量のドナー蛍光色素が含まれていることがわかった。このため、液滴中での一分子 LAF1-RGG の FRET 効率変化をとらえることができなかった。今後、二重蛍光標識の方法を改良することで、不純物の量を減らすことが必要である。

この新開発した一分子 FRET 測定装置は様々な試料の測定にも応用可能である。とくに ALEX 一分子 FRET 測定は強力な測定法である。LAF1-RGG と同様に天然変性領域を持つタンパク質であるシチジンリプレッサーの DNA 結合ドメイン (CytR-DBD) に対して ALEX 一分子 FRET 測定を行った。この測定によって CytR-DBD が高塩濃度環境下や、分子混雑環境下で、収縮し折り畳まれた構造を持つことが一分子レベルで確かめられ、この結果は論文として報告することができた。

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 2件）

1. 著者名 Kamagata Kiyoto, Iwaki Nanako, Hazra Milan Kumar, Kanbayashi Saori, Banerjee Trishit, Chiba Rika, Sakomoto Seiji, Gaudon Virginie, Castaing Bertrand, Takahashi Hiroto, Kimura Michiko, Oikawa Hiroyuki, Takahashi Satoshi, Levy Yaakov	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular principles of recruitment and dynamics of guest proteins in liquid droplets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-98955-0	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 該当する

1. 著者名 Tomita Takeshi, Kato Masayoshi, Mishima Taishi, Matsunaga Yuta, Sanjo Hideki, Ito Ken-ichi, Minagawa Kentaro, Matsui Toshimitsu, Oikawa Hiroyuki, Takahashi Satoshi, Takao Toshifumi, Iwai Noriki, Mino Takashi, Takeuchi Osamu, Maru Yoshiro, Hiratsuka Sachie	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23969-1	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 Rajendran Divya, Mitra Shrutarshi, Oikawa Hiroyuki, Madhurima Kulkarni, Sekhar Ashok, Takahashi Satoshi, Naganathan Athi N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Quantification of Entropic Excluded Volume Effects Driving Crowding-Induced Collapse and Folding of a Disordered Protein	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3112～3120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcllett.2c00316	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11件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田かなな, 木村美智子, 高橋泰人, 高橋 聡, 小井川浩之
2. 発表標題 Single molecule fluorescence investigations on the structure transitions of LAF-1 RGG upon the RNA binding and the droplet formation
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 鈴木怜和, 小井川浩之, 高橋聡
2. 発表標題 Structural characterization of RNA upon the binding with SARS-CoV-2 N protein by single molecule fluorescence measurements
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 岩城奈那子, 上林さおり, Trishit Banerjee, 千葉梨佳, 木村美智子, 小井川浩之, 高橋聡, 鎌形清人
2. 発表標題 Characterization of molecular uptake and single-molecule dynamics in liquid droplets of p53
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 Shrutarshi Mitra, Hiroyuki Oikawa, Athi N. Naganathan, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Single-molecule study of conformational dynamics of Intrinsically disordered E. coli Cytidine Repressor DNA Binding domain
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 木村美智子, 中野沙耶, 高橋泰人, 小井川浩之, 高橋聡
2. 発表標題 Conformational properties of the intrinsically-disordered RGG domain of LAF-1 detected by single-molecule fluorescence spectroscopy
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 木村美智子, 中野沙耶, 高橋泰人, 小井川浩之, 高橋聡
2. 発表標題 天然変性タンパク質 LAF-1RGG ドメインの一分子蛍光分光測定による構造特性評価
3. 学会等名 分子科学会オンライン討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Senmaru, Hiroyuki Oikawa, Mitsuhiro Sugawa, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Microsecond-resolved observation of F1-ATPase conformational changes by single molecular fluorescence spectroscopy
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Supawich Kamonprasertsuk, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Dynamics of the helix-coil transition of alanine-based polypeptides detected by nanosecond region fluorescence correlation spectroscopy
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Supawich Kamonprasertsuk, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Dynamics of the helix-coil transition of alanine-based polypeptides detected by nanosecond region fluorescence correlation spectroscopy
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村美智子, 小井川浩之, 高橋聡
2. 発表標題 一分子測定によって明らかにする液液相分離のメカニズム
3. 学会等名 日本生物物理学会 東北支部会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Supawich Kamonprasertsuk, Hiroyuki Oikawa, Satoshi Takahashi
2. 発表標題 Dynamics of the Helix-Coil Transition of Alanine-based Polypeptides Detected by Nanosecond Region Fluorescence Correlation Spectroscopy
3. 学会等名 Indo-Japan mini-workshop, Frontiers in Molecular Spectroscopy: From Fundamentals to Applications in Chemistry and Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋聡, 小井川浩之	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 5
3. 書名 相分離生物学の全貌 (現代化学増刊46), 第 部, 76節	

〔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
研究協力者	高橋 聡 (Takahashi Satoshi) (30283641)	東北大学・多元物質科学研究所・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	木村 美智子 (Kimura Michiko)		
研究協力者	藤田 かな (Fujita Kanna)		

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			
インド	インド工科大学マドラス校			
イスラエル	ワイツマン科学研究所			
フランス	フランス国立科学研究センター			