

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06591

研究課題名(和文)液-液相分離における液体状タンパク質の動態計測

研究課題名(英文)Diffusion measurement on proteins in liquid-liquid phase separation samples

研究代表者

山本 条太郎 (Yamamoto, Johtaro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：20585088

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)：偏光蛍光相関分光測定(Pol-FCS)と動的光散乱(DLS)を同時測定する装置を開発し、液-液相分離(LLPS)状態にあるタンパク質の動態を明らかにすることを目的とした。実際にPol-FCSとDLSを同時測定可能な装置の開発に成功したが、Pol-FCS測定に適した濃度で蛍光標識タンパク質を含むLLPS状態の試料の調整が困難であった。そこで、LLPSと同様に高密度で高分子が存在する高分子混雑状態の溶液や生細胞内の混雑状態を定量評価した。この結果、蛍光タンパク質の並進拡散と回転拡散動態の比較によって、蛍光タンパク質周辺のナノ環境の混雑具合を定量評価できることを実証することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光プローブ分子の並進拡散と回転拡散を同時測定して比較することで、高分子混雑(MMC)状態にある溶液、生細胞の核・細胞質、ゲルの混雑状態を定量評価する手法を実証した。特に細胞内でのMMCについては、細胞内の実験結果と溶液内の実験結果の齟齬の原因とも言われ、近年注目されている現象である。これまでPol-FCSのように並進拡散と回転拡散を全く同一地点かつ同時に測定可能で、かつ生きた細胞を生かしたまま、部位選択的に測定可能な手法は存在していなかった。本研究成果は、今後のMMCや液-液相分離の研究の発展に大きく寄与可能であると期待している。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to clarify molecular dynamics of proteins in liquid-liquid phase separation (LLPS) state by developing a system which simultaneously provides a polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy (Pol-FCS) measurement and a dynamic light scattering (DLS) measurement.

The measurement system was successfully developed and demonstrated, however, preparation of samples in LLPS state with a concentration of fluorescent probe proteins suitable for FCS measurement was difficult. Next, I tried to quantitatively evaluate crowding state in macromolecular crowding (MMC) samples like LLPS samples, in which macromolecules are highly condensed, using the developed measurement system. As a result, a quantitative evaluation of MMC state by comparing translational diffusion and rotational diffusion was successfully demonstrated.

研究分野：生物物理学

キーワード：動態計測 蛍光相関分光法 動的光散乱 並進拡散 回転拡散

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、タンパク質やその他の生体分子が集まって液体あるいはゲル状の液滴を形成する液-液相分離 (liquid-liquid phase separation, LLPS) に注目が集まっている。液-液相分離自体は目新しい現象ではないが、細胞内でも LLPS が起き、重要な役割を担っていることが分かったのはつい最近のことである。

2009 年にマックスプランク研究所のハイマンらによって、水と油が分離するのと同様に、ある種のタンパク質やペプチドも、混じり合っているよりも 2 相に分離した方が安定である場合に液滴を作って分離し、また液滴同士が接触することで融合することが発見された。LLPS はこれまで機構が良く分かっていなかったタンパク質の局在や、膜の無い細胞内小器官 (核小体、中心体) の形成、可逆性のタンパク質凝集体などを良く説明可能であり、相分離生物学という新しい学問領域にもなっている。

これほどまでに注目されているにも関わらず、LLPS 研究の現状は、細胞内における LLPS の探索・発見が主であり、細胞内液滴・タンパク質液滴自体の動態に関しては未だ研究が進んでいない。この問題は主に、液中に浮遊する微小な液滴中で分子動態を計測することの困難さにあると考えられる。この計測は偏光蛍光相関分光法を用いた並進拡散と回転拡散の測定によって実現可能であると着想し、本研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光分子の並進および回転拡散動態の計測法である偏光蛍光相関分光法 (Polarization-dependent Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) と、並進拡散と協同拡散 (ゲルとして一定範囲で強調する拡散運動) を計測可能である動的な光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) を同時に実現する装置を開発する。また、その装置を用いて LLPS によって生じた液滴中のタンパク質の各種拡散動態を同時に解析し、液体・あるいはゲルとしてのタンパク質動態を明らかにすることを当初の目的とした。但し、研究の進捗に伴って、PoI-FCS 測定に適した LLPS 試料の調整が困難であることが分かったため、LLPS と類似して高分子が高密度に存在する高分子混雑 (MMC) 試料を対象とした。MMC 試料の評価では、周囲の高分子に阻害されて遅くなる並進拡散と、周囲の高分子に阻害されにくい回転拡散を PoI-FCS によって同時測定することで、両者の比較から周囲の混雑状態を評価する手法を実証することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 偏光蛍光相関分光法と動的な光散乱を同時に実現する装置の開発

偏光蛍光相関分光法 (Polarization-dependent Fluorescence Correlation spectroscopy, PoI-FCS) と動的な光散乱法 (Dynamic Light Scattering) を同時に実現する装置の開発のため、過去に開発した PoI-FCS 装置を改造し、DLS 測定も同時に測定可能な装置とする。

#### (2) 液-液相分離試料の測定実証

FCS での測定に適した濃度 (10 ~ 100 nM 程度) の蛍光標識タンパク質を含む液-液相分離 (LLPS) 試料を調整し、(1) で開発した装置を用いて、LLPS 試料中の蛍光分子の動態測定を行うことによって、液体様のタンパク質の動態を明らかにすることを目指した。

#### (3) 高分子ゲルにおけるメッシュ構造のサイズ評価

蛍光プローブ分子の並進拡散と回転拡散動態を比較することによって、蛍光プローブ分子周囲のナノ環境の広がりを実証する手法の妥当性を評価するため、メッシュサイズの異なる複数のゲル中に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 溶液を含ませ、その並進拡散と回転拡散動態を比較する。

#### (4) 高分子クラウディング溶液の混雑度評価

ポリエチレングリコール (PEG) 等の細胞内高分子クラウディング (細胞内 MMC) を模擬するために用いられるクラウディング溶液や低分子溶液の PoI-FCS 測定を行い、同装置による MMC 評価の優位性を実証する。

#### (5) 生細胞中の混雑度評価

細胞内に発現させた GFP の PoI-FCS 測定を実施し、並進拡散と回転拡散動態の比較を行うことで、いくつかの異なる条件で細胞内 MMC の評価を行うことで、細胞株や細胞周期による細胞内 MMC の違いを検証する。

### 4. 研究成果

(1) 偏光蛍光相関分光法と動的光散乱を同時に実現する装置の開発

偏光蛍光相関分光法 (PoI-FCS) と動的光散乱法 (DLS) を同時に実現する装置を開発することに成功した (図 1)。同装置では、散乱光の検出器 1 台と、励起光と並行偏光の蛍光のための検出器 2 台、直交偏光の蛍光のための検出器 2 台の計 5 台の光検出器からの信号それぞれについて、自己相関関数解析および相互相関関数解析を行うことで PoI-FCS 測定と DLS 測定を同時に実現する。

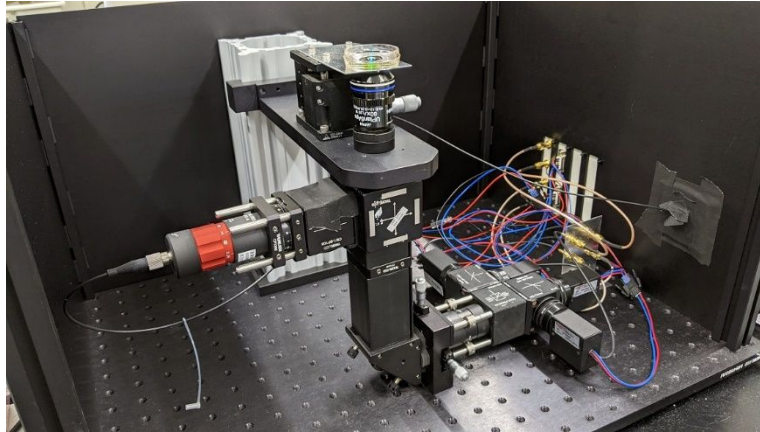


図 1 開発した装置。

(2) 液-液相分離試料の測定実証

FCS での測定に適した濃度 (10 ~ 100 nM 程度) の蛍光標識タンパク質と蛍光標識していないタンパク質を混合し、液-液相分離する試料の調整を試みたが困難であった。また、蛍光標識していないタンパク質のみで作成した液-液相分離試料からの散乱光を十分な感度で検出することも困難であった。このことから、以降では LLPS と同様に高分子が高密度に存在する環境である高分子クラウディング試料の評価を行うこととした。

(3) 高分子ゲルにおけるメッシュ構造のサイズ評価

高分子ゲルを緑色蛍光タンパク質 (GFP) 溶液に浸し、高分子ゲル内の GFP について PoI-FCS 測定を行った。GFP の並進拡散はゲルのメッシュサイズが小さくなるにしたがって遅くなるが、回転拡散についてはメッシュサイズが小さくても、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の回転拡散の速さから殆ど変化しないことが分かった。このことから、並進拡散と回転拡散の比較によって蛍光プローブ分子周辺の空間の広がり (混雑度) を評価できる可能性を実証した。

(4) 高分子クラウディング溶液の混雑度評価

細胞内の高分子クラウディング (MMC) 状態を模擬するために度々用いられるポリエチレングリコール 6000 (PEG6000)、フィコール、ウシ血清アルブミン (BSA) の PBS 溶液と、スクロースやグリセロール等の低分子によって粘度を変化させた PBS 溶液において、GFP の並進拡散と回転拡散の速さを比較した。低分子溶液については、粘度が増加するにしたがって、並進・回転拡散両者の速さは比例したのに対し、MMC 溶液においては、溶液の粘度の増加に伴って、回転拡散よりも並進拡散の方がより遅くなることを見出した。PoI-FCS では、これらの変化を定量的に評価可能であることから、細胞内の混雑環境をより正確に再現する MMC 溶液の作成や、混雑環境をデザインすることを実現可能となり、MMC 研究の進展に大きく寄与できると期待している。また、PEG6000 においては、濃度の増加に伴って起きる PEG の顆粒状からネットワーク状への変化を PoI-FCS で明確に検出可能であることを示した。このことから、ナノ環境の予期しない構造変化についても検出可能となる可能性があり、細胞内 MMC に限らず、ナノ構造・材料評価への応用においても有効であると期待できる。

(5) 生細胞中の混雑度評価

細胞内に発現させた GFP の PoI-FCS 測定を実施し、並進拡散と回転拡散動態の比較を行った。本研究で開発した装置は顕微鏡撮像機能を持たないため、細胞内の特定の一点を狙って PoI-FCS 測定することは困難である。そこで、細胞内測定については過去に開発した顕微鏡に接続して PoI-FCS 測定のみが可能 (DLS 測定はできない) な装置を用いて実験を行った。この結果、細胞株によって混雑度合いが異なること、細胞骨格を破壊すると細胞株間の混雑度の相違が小さくなること、細胞周期によって混雑度合いが異なる可能性があることを見出した。これらの発見は、細胞内 MMC 状態の混雑度の変化によってタンパク質の相互作用や機能を制御するような新たな機構の検証など、新しい視点での生物学研究に応用可能であると期待している。

以上の成果について、研究機関中に英語原著論文 2 報、邦文誌 1 報、学会発表 5 件 (うち招待講

演 3 件) で成果発信を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Johtaro, Matsui Akito, Gan Fusako, Oura Makoto, Ando Riku, Matsuda Takahiro, Gong Jian Ping, Kinjo Masataka	4. 巻 11
2. 論文標題 Quantitative evaluation of macromolecular crowding environment based on translational and rotational diffusion using polarization dependent fluorescence correlation spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-89987-7	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 Yamamoto Johtaro, Sasaki Akira	4. 巻 11
2. 論文標題 Measurement of the Concentration and the Brightness for Samples Containing Multiple Molecules with Different Brightness Using Fluorescence Correlation Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 5840 ~ 5840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app11135840	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 山本条太郎、金城政孝	4. 巻 53
2. 論文標題 回転および並進拡散測定による細胞内混雑状態の解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 385 ~ 389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本条太郎
2. 発表標題 光ファイバ接続型蛍光相関分光装置の研究開発
3. 学会等名 第29回 日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本奈太郎
2. 発表標題 蛍光ゆらぎ解析による微環境解析
3. 学会等名 日本分子イメージング学会 第14回学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本奈太郎, 顔総子, 松井亮人, 桃崎哲, 金城政孝
2. 発表標題 偏光蛍光相関分光法による細胞内微環境の解明と細胞内情報伝達機構へ与える影響
3. 学会等名 第16回バイオオプティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 J. Yamamoto, A. Matsui, M. Kinjo
2. 発表標題 New evaluation technique for micro-environment using translational and rotational diffusion
3. 学会等名 The 6th International Symposium on Bioimaging
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本奈太郎
2. 発表標題 蛍光ゆらぎ解析による細胞およびソフトマター内分子動態解析
3. 学会等名 第30回日本バイオイメージング学会 学術集会（招待講演）
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
研究協力者	金城 政孝  (Kinjo Masataka)		
研究協力者	佐々木 章  (Sasaki Akira)		

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