

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03192

研究課題名(和文) 神経変性疾患に関連した反復配列RNA分子の反復回数に依存した液液相分離の構造基盤

研究課題名(英文) Structural basis of LLPS of RNA repeats related to neurodegenerative diseases

研究代表者

片平 正人 (Katahira, Masato)

京都大学・エネルギー理工学研究所・教授

研究者番号：70211844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：瀧ノ上らによって見出されたY字型DNA(Y-DNA)に関して生じる液液相分離(Sato等, Science Advances, 2020)について、コンデンセート層における分子の挙動を、並進運動の速度を反映する拡散係数と回転運動の速度を反映する横緩和時間をNMR法によって決定する事で解析した。コンデンセート中のY-DNAにおいては、並進と回転が共に抑制されていた。このコンデンセートに他の分子が巻き込まれた場合には、その分子の大きさと電荷に依存して、並進と回転が抑制される事とされない時がある事が分かった。液液相分離で生じる液滴を反応場として理解・活用する上で、今回得られた知見は意義深い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質あるいはタンパク質と核酸の複合体が液液相分離を生じる事が見いだされ、生命現象を理解する鍵となる事象として大きな注目を集めている。また液液相分離で生じる液滴は、反応場として活用できる可能性もある。その後、核酸のみで生じる液液相分離も見出されたが、知見は未だ限られている。今回核酸のみからなるコンデンセート中の分子の挙動に関する定量的な情報が得られた事により、同液滴に関する理解とその応用が格段に進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regarding the liquid-liquid phase separation (Sato et al., Science Advances, 2020) that occurs with Y-shaped DNA (Y-DNA) discovered by Takinoue et al., the behavior of molecules in the condensate layer was analyzed by determining the diffusion coefficient reflecting the speed of translational motion and the transverse relaxation time reflecting the speed of rotational motion by NMR method. In the case of Y-DNA in condensate, both translational and rotational were suppressed. When other molecules are involved in this condensate, it was found that the translation and rotation may or may not be suppressed, depending on the size and charge of the molecules. The findings obtained in this study are significant in understanding and utilizing the droplets generated by liquid-liquid phase separation as reaction fields.

研究分野：生物物理化学

キーワード：液液相分離 コンデンセート 拡散係数 並進運動 横緩和時間 回転運動 核酸

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質あるいはタンパク質と核酸の複合体が液液相分離を生じる事が見いだされ、生命現象を理解する鍵となる事象として大きな注目を集めている。また液液相分離で生じる液滴は、反応場として活用できる可能性もある(Dolgin 等, Nature, 2018)。その後、核酸のみで生じる液液相分離も見出された。特定の 3 つの塩基の並びが繰り返す事で生じるトリプレットリピート病というものがあるが、特定の 3 つの塩基の並びが繰り返した RNA は液液相分離を生じる事が見出された(Jain 等, Nature, 2017)。病気を発症するリピートの繰り返し数あたりから液液相分離が生じるようになる事から、液液相分離が生じる事が発症と関係している可能性が指摘された。しかし、核酸のみで生じる液液相分離に関する報告・知見は限られていた。

瀧の上らは、部分的に相補性を有する 3 本の DNA が Y 字型を形成し、さらに末端に自己相補的な配列を有する為にお互いが末端で結合して延伸する DNA (Y-DNA) が、液液相分離を生じる事を報告した(Sato 等, Science Advances, 2020) (図 1)。上述のトリプレットリピートからなる核酸は、その特異な塩基配列の為に発現と精製が困難で、生物物理化学的な解析を行うのに十分な量を調製する事ができなかった。一方 Y-DNA に関しては、生物物理化学的な解析を行うのに十分な量を調製する事が可能であった。そこで、Y-DNA が生じる液液相分離を NMR 法によって解析する事で、核酸のみで生じる液液相分離に関する知見を獲得する事とした。

## 2. 研究の目的

Y-DNA が生じる液液相分離を NMR 法によって解析する事で、核酸のみで生じる液液相分離の実態を、分子レベルの分解で解明する事を目的とした。第一に、液液相分離で生じたコンデンセート中における Y-DNA の分子挙動(並進運動と回転運動)を、NMR 法によって並進拡散速度と横緩和時間を決定する事によって決定する。次に Y-DNA が生じる液液相分離に巻き込まれた他の分子(テロメア配列の DNA が形成する 4 重鎖 DNA(これ自体は液液相分離を生じない)、AMP 及びアルギニン)の分子挙動(並進運動と回転運動)に関しても、NMR 法によって並進拡散速度と横緩和時間を決定する事によって、各々決定する。液液相分離で生じる液滴は反応場として機能するのではないかという事が議論されているが、後者の研究によって、液滴の反応場としての性質に関する情報・知見が得られると期待される。また、将来的に生細胞内における液液相分離を解析する事を見越して、核酸に関するインセル NMR の方法論の開発も並行して行う事とした。

## 3. 研究の方法

(1) 図 1 に示す 3 本の DNA を調製し、これを混ぜてアニーリングする事で Y-DNA を形成させた。液液相分離が生じる温度以下で静置する事で下層(コンデンセート相)と上層(分散相)に分離させ、上層と下層を各々別の NMR 試料管に入れて NMR 法による解析に供した(図 2)。

上層と下層の各々に関して、並進拡散係数と横緩和時間を NMR によって決定し、並進運動と回転運動に関する知見を得た。

(2) テロメア配列の DNA が形成する 4 重鎖 DNA(これ自体は液液相分離を生じない)を Y-DNA と混合し、アニーリングした。液液相分離が生じる温度以下で静置する事で下層(コンデンセート相)と上層(分散相)に分離させ、上層と下層を各々別の NMR 試料管に入れて NMR 法による解析に供した。上層と下層の各々に関して、並進拡散係数と横緩和時間を NMR によって決定し、並進運動と回転運動に関する知見を得た。これにより、Y-DNA による液液相分離に巻き込まれた 4 重鎖 DNA の挙動に関する情報を獲得した。

(3) テロメア DNA の代わりに AMP を Y-DNA と混ぜ、上記と同様な実験を行った。これにより、Y-DNA による液液相分離に巻き込まれた AMP の挙動に関する情報を獲得した。

(4) テロメア DNA の代わりにアルギニンを Y-DNA と混ぜ、上記と同様な実験を行った。これにより、Y-DNA による液液相分離に巻き込まれたアルギニンの挙動に関する情報を獲得した。

(5) 核酸に関するインセル NMR 法の方法論の開発も並行して行った。

## 4. 研究成果

(1) 下層(コンデンセート相)の Y-DNA の並進拡散係数は、上層(分散相)の Y-DNA の並進拡散係数よりも小さい事が分かった。これはコンデンセート層においては、Y-DNA の末端の自己相補的な塩基配列において生じた Y-DNA 間の塩基対によって Y-DNA の網目構造が形成され、並進運動が抑制されている為だと考えられる(図 3)。また、下層(コンデンセート相)の Y-DNA の横緩和時間は、上層(分散相)の Y-DNA の横緩和時間よりも小さい事が分かった。これも、コンデンセート

層においては、Y-DNA の網目構造の為に回転運動が抑制されている為だと考えられる (図 3)。

(2) 下層(コンデンセート相)において Y-DNA による液液相分離に巻き込まれたテロメア配列の DNA が形成する 4 重鎖 DNA の並進拡散係数は、上層(分散相)の 4 重鎖 DNA の並進拡散係数よりも小さい事が分かった。これはコンデンセート層においては、Y-DNA の末端の自己相補的な塩基配列において生じた Y-DNA 間の塩基対によって Y-DNA の網目構造が形成され、4 重鎖 DNA の並進運動が抑制されている為だと考えられる (図 4)。一方は下層(コンデンセート相)の 4 重鎖 DNA の横緩和時間は、上層(分散相)の 4 重鎖 DNA の横緩和時間と同じであった。これは、コンデンセート層においても、4 重鎖 DNA がその場で回転運動を行う為の空間は確保されており、回転運動が抑制される事は無い事を示しているのだと考えられる (図 4)。

(3) 下層(コンデンセート相)において Y-DNA による液液相分離に巻き込まれた AMP の並進拡散係数は、上層(分散相)の AMP の並進拡散係数と同じである事が分かった。これはコンデンセート層においては、Y-DNA の末端の自己相補的な塩基配列において生じた Y-DNA 間の塩基対によって Y-DNA の網目構造が形成されるが、AMP はこの網目の大きさより小さい為に、並進運動が抑制される事は無い為だと考えられる。

(4) 下層(コンデンセート相)において Y-DNA による液液相分離に巻き込まれたアルギニンの並進拡散係数は、上層(分散相)のアルギニンの並進拡散係数よりも小さい事が分かった。これはコンデンセート層においては、Y-DNA の末端の自己相補的な塩基配列において生じた Y-DNA 間の塩基対によって Y-DNA の網目構造が形成されるが、この網目構造中のリン酸基の負電荷とアルギニンの正電荷の間の静電引力により、アルギニンの並進運動が抑制される為だと考えられる。

(5) 核酸に関するインセル NMR 法の方法論の開発も並行して行い、新たな結果を得た。

## Y字型DNA (Y-DNA)

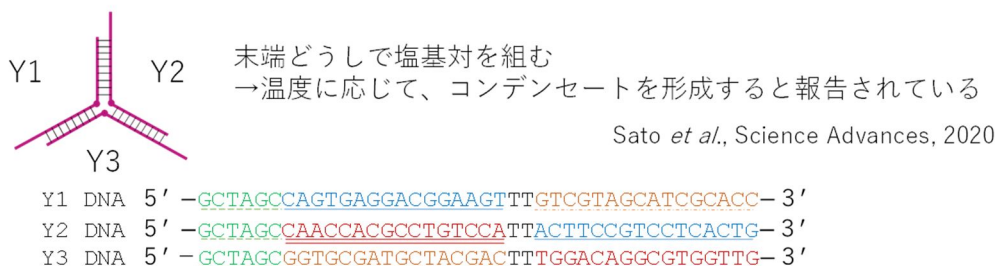


図 1 Y-DNA の塩基配列と 2 次構造

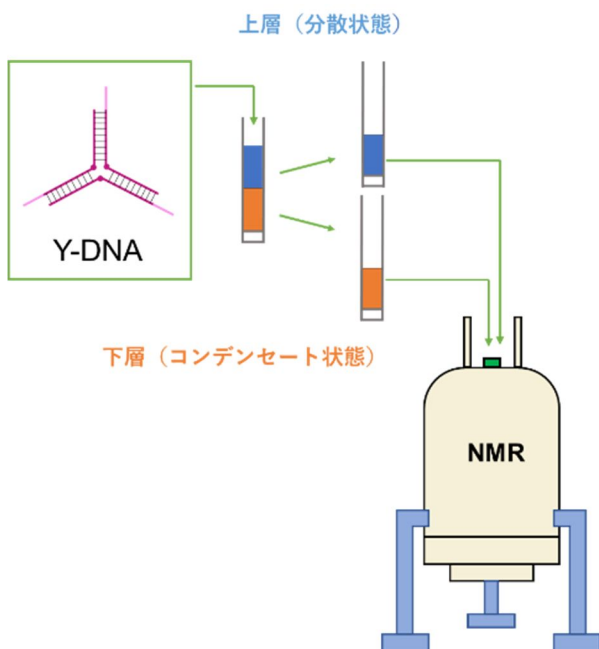


図 2 コンデンセート相と分散相の NMR スペクトル

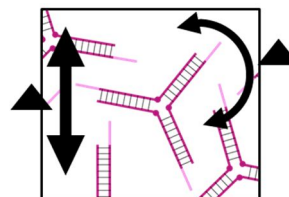


図 3 コンデンセート中の Y-DNA の分子描像

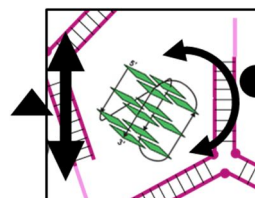


図 4 コンデンセート中に巻き込まれた 4 重鎖 DNA の分子描像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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<br>Eladi Omar, Yamaoki Yudai, Kondo Keiko, Nagata Takashi, Katahira Masato   | 4. 巻<br>59              |
| 2. 論文標題<br>Detection of interaction between an RNA aptamer and its target compound in living human cells using 2D in-cell NMR       | 5. 発行年<br>2023年         |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>102 ~ 105 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/D2CC05576G  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |
| 1. 著者名<br>Yamaoki Yudai, Nagata Takashi, Kondo Keiko, Sakamoto Tomoki, Takami Shohei, Katahira Masato                               | 4. 巻<br>13              |
| 2. 論文標題<br>Shedding light on the base-pair opening dynamics of nucleic acids in living human cells                                  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Nature Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>7143      |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41467-022-34822-4  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Hamad Nesreen, Yoneda Ryoma, So Masatomo, Kurokawa Riki, Nagata Takashi, Katahira Masato                                  | 4. 巻<br>11              |
| 2. 論文標題<br>Non-coding RNA suppresses FUS aggregation caused by mechanistic shear stress on pipetting in a sequence-dependent manner | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>9523      |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-021-89075-w  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |
| 1. 著者名<br>Sakamoto Tomoki, Yamaoki Yudai, Nagata Takashi, Katahira Masato   | 4. 巻<br>57              |
| 2. 論文標題<br>Detection of parallel and antiparallel DNA triplex structures in living human cells using in-cell NMR                    | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>5364-6367 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/D1CC01761F  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Eladi Omar, Yamaoki Yudai, Kondo Keiko, Nagata Takashi, Katahira Masato   | 4. 巻<br>24                |
| 2. 論文標題<br>Complex Formation of an RNA Aptamer with a Part of HIV-1 Tat through Induction of Base Triples in Living Human Cells Proven by In-Cell NMR | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences   | 6. 最初と最後の頁<br>9069 ~ 9069 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/ijms24109069  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する              |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Kamba Keisuke, Wan Li, Unzai Satoru, Morishita Ryo, Takaori-Kondo Akifumi, Nagata Takashi, Katahira Masato | 4. 巻<br>123             |
| 2. 論文標題<br>Direct inhibition of human APOBEC3 deaminases by HIV-1 Vif independent of the proteolysis pathway         | 5. 発行年<br>2024年         |
| 3. 雑誌名<br>Biophysical Journal  | 6. 最初と最後の頁<br>294 ~ 306 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bpj.2023.12.015  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Eladi Afaf, Yamaoki Yudai, Kamba Keisuke, Hoshina Shoko, Horinouchi Haruka, Kondo Keiko, Waga Shou, Nagata Takashi, Katahira Masato   | 4. 巻<br>683                   |
| 2. 論文標題<br>NMR characterization of the structure of the intrinsically disordered region of human origin recognition complex subunit 1, hORC1, and of its interaction with G-quadruplex DNAs | 5. 発行年<br>2023年               |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>149112 ~ 149112 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.bbrc.2023.10.044  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>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<br>-                     |

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川上愛加, 山置佑大, 近藤敬子, 阪本知樹, 永田崇, 片平正人 |
| 2. 発表標題<br>核酸から成る液滴のNMR法を用いた物理化学的解析          |
| 3. 学会等名<br>第45回日本分子生物学会                      |
| 4. 発表年<br>2022年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山置佑大, 永田崇, 川上愛加, 阪本知樹, Eladi Omar, 近藤敬子, 片平正人   |
| 2. 発表標題<br>NMR法による核酸のコンデンセートおよびヒト生細胞内における核酸の塩基対開閉ダイナミクスの解析 |
| 3. 学会等名<br>第45回日本分子生物学会                                    |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Katahira, M.   |
| 2. 発表標題<br>Non-coding RNA suppresses FUS aggregation caused by mechanistic shear stress on pipetting in a sequence-dependent manner |
| 3. 学会等名<br>The 44th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (招待講演)   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kurokawa, R., Hamad, N., Yoneda, R., So, M., Kondo, K., Yamaoki, Y., Nagata, T. and Katahira, M.                 |
| 2. 発表標題<br>Analysis of fused in sarcoma aggregation caused by shear stress and suppression of aggregation by non-coding RNA |
| 3. 学会等名<br>The 12th International Symposium of Advanced Energy Science (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Yamaoki, Y., Nagata, T., Kondo, K., Sakamoto, T., Takami, S., and Katahira, M.                                      |
| 2. 発表標題<br>In-cell NMR analysis of the structure and dynamics of hairpin and G-quadruplex structures in the living human cells |
| 3. 学会等名<br>22nd International Society of Magnetic Resonance Conference (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Katahira, M,  |
| 2. 発表標題<br>Structure, dynamics and interaction of nucleic acids in living human cells as revealed by in-cell NMR |
| 3. 学会等名<br>The 10th Asia-Pacific NMR (招待講演) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Katahira, M.   |
| 2. 発表標題<br>Base pair opening dynamics of G4 and aptamer-ligand interaction in living human cells as revealed by in-cell NMR |
| 3. 学会等名<br>Nucleic Acids Secondary Structures: G4s and Beyond (招待講演) (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2023年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Katahira, M.   |
| 2. 発表標題<br>Behavior of nucleic acids in living human cells as revealed by in-cell NMR |
| 3. 学会等名<br>Japan-Taiwan Bilateral NMR Conference (招待講演) (国際学会)                        |
| 4. 発表年<br>2024年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Katahira, M.  |
| 2. 発表標題<br>Difference in the base-pair opening dynamics of nucleic acids between in vitro and in-cell conditions |
| 3. 学会等名<br>23rd International Society of Magnetic Resonance Conference (国際学会)                                    |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

片平研究室  
<http://www.iae.kyoto-u.ac.jp/bio/>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|