

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19205

研究課題名（和文）液-液相分離により形成される新規細胞内区画の探索

研究課題名（英文）Screening for novel intracellular compartments formed by liquid-liquid phase separation

研究代表者

鈴木 邦律（Suzuki, Kuninori）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：20373194

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：私は必須遺伝子にコードされたタンパク質にGFPを融合すると、高温条件下で活性を失い致死となる可能性を想定した。出芽酵母では、各遺伝子がコードするタンパク質のC末端にGFPを融合した4,100種類余りの株のコレクションが存在する。本研究課題では、これらの株から高温で生育が悪くなる株をスクリーニングした。これまでの研究で、スクリーニングが完了し、136種類の株が高温感受性の生育を示した。培養した細胞に1,6-ヘキサジオール処理を行ったところ、いくつかの株でドット状の局在が消失したことから、これらの GFP融合タンパク質が液-液相分離によって形成される新規区画であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、細胞が如何にして細胞内の区画を形成し、生存しているかを解明する点にある。本研究により同定が期待される新規細胞内区画は、細胞の生存に必須な重要なものであるにもかかわらず、生体膜で区画されていない。私が知る限り、細胞内の液-液相分離によって生じる区画を構成するタンパク質をゲノムワイドにスクリーニングした研究はない。本研究は、液-液相分離により形成される細胞内の区画の重要性をゲノムワイドにスクリーニングし、新規候補を同定した点で、成功裏に完了したと考えている。

研究成果の概要（英文）：Disruption of “essential genes” leads yeast cells to death. I hypothesized that fusing GFP to the proteins encoded by essential genes would result in loss of viability at high temperatures. There is a yeast collection of about 4,100 different strains in which GFP is fused to the C-terminus of the protein encoded by each gene. In this research, these strains were cultured on agar plates and screened for strains that grow poorly at high temperatures. I have identified 136 strains found to be sensitive to high temperature. To examine whether the GFP-fused proteins form liquid-liquid phase separation, I treated these cells with 1,6-hexanediol, resulting in the loss of dot-like condensates in some strains. This result suggests that these GFP fusion proteins form novel compartments formed by liquid-liquid phase separation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー 出芽酵母 オートファゴソーム 緑色蛍光タンパク質 温度感受性 高温感受性 液-液相分離

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞アミノペプチダーゼ I (Ape1) は翻訳後 Ape1 複合体を形成し、選択的オートファジーにより液胞へと輸送される。Ape1 に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合し、出芽酵母の通常培養温度である 30°C で培養したのち観察すると、形成直後の Ape1 複合体が細胞質に輝点として観察される。Ape1 複合体は選択的オートファジーにより液胞へと輸送され、液胞内部が GFP の蛍光で満たされる (Suzuki et al. (2002) Dev. Cell)。Ape1 複合体は AP 形成時に容易に変形することから、かなり柔らかい構造を取っていると推測されていた (Suzuki et al. (2013) J. Cell Sci.)。こうした事実から、私は Ape1 複合体が液 - 液相分離により形成されたタンパク質性の液滴である可能性を想定し、Ape1-GFP を発現する出芽酵母を 40°C で培養したのち観察した。すると、Ape1 複合体の輝点が消失すると共に、液胞内部の染色も見られなくなることが分かった。この結果から、温度上昇により Ape1 複合体の形成ができなくなることで、Ape1 の液胞輸送が停止していると考えられた。そこで、Ape1 複合体の形成が液 - 液相分離によるものと想定し、もしそうならば、これらの細胞を通常の培養温度に戻すことで Ape1 の液胞への輸送が回復するに違いないと考えた。期待通り、この細胞を通常温度条件で培養し直すと、Ape1 複合体の輝点および液胞内部の染色が回復した (図 1)。この結果は、Ape1 複合体が液 - 液相分離により形成されている構造体である可能性と矛盾しない。意外なことに、Ape1-GFP から GFP タグを除くと、Ape1 は 40°C 培養時にもほとんど正常に液胞へと輸送されることが分かった。つまり、通常の Ape1 は高温培養条件下でも Ape1 複合体の形成が正常であるといえる。このことから私は、GFP を融合することで Ape1 の液 - 液相分離の温度が上昇しているという現象を見いだしたと考えている。

GFP を融合することで Ape1 の液 - 液相分離の温度が変化すると同様に、細胞の生育に必須な遺伝子産物に GFP を融合しても、液 - 液相分離の温度が変化するのではないかと考えた。そこで、GFP 融合タンパク質を発現する株を網羅的に探索し、高温感受性を示す株を選抜することで、液 - 液相分離により形成される生育に必須な遺伝子を網羅的に取得できるのではないかと考え、本研究を構想するに至った。

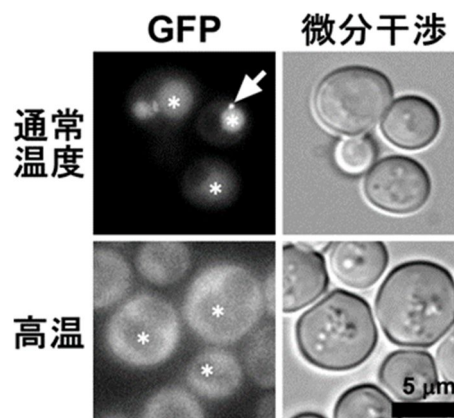


図1. Ape1-GFPは通常温度ではApe1複合体(矢印)と液胞(*)に局在するが、高温ではそれらの局在が消失する。

2. 研究の目的

真核細胞における細胞内分解システムであるオートファジーは、球状の二重膜胞である AP が積荷タンパク質を取り囲んだのち、分解コンパートメントである液胞 / リソソームへと輸送するシステムである。出芽酵母のオートファジーは、細胞質成分の分解以外にも、Ape1 を構成的に液胞内腔に輸送するシステムとして働いている。

Ape1 は前駆型として合成されると速やかに液胞近傍に集結して Ape1 複合体となる。Ape1 複合体を基点として AP 膜が形成されることで、Ape1 複合体は選択的に AP に取り囲まれ液胞へと輸送される。Ape1 に緑色蛍光タンパク質 GFP を融合し、出芽酵母の通常培養温度である 30°C で培養して観察すると、Ape1 複合体が細胞質に輝点として観察され、液胞内部が GFP の蛍光で満たされる (Suzuki et al. (2002) Dev. Cell)。私は最近、Ape1-GFP を発現する出芽酵母を 40°C で培養して観察すると、Ape1 複合体の輝点および液胞内部の染色が消失することを発見した。この細胞を通常温度条件で培養し直すと、Ape1 複合体の輝点および液胞内部の染色が回復した。これらの結果から、Ape1-GFP を使用した場合、Ape1 複合体の形成が温度感受性かつ可逆的であることが分かった。また、Ape1 複合体は AP 膜の形状に従って容易に変形する、柔らかい構造体であることも観察されていたことから (Suzuki et al. (2013) J. Cell Sci.) 応募者は Ape1 複合体が、液 - 液相分離により形成される液滴であると考え、共同研究を進めることでこの事実を証明し、報告した (Yamasaki et al. (2020) Mol. Cell)。液 - 液相分離により形成される構造体は、GFP 等のタグを付加すると液滴としての性質が変化することが知られている。本研究では、Ape1-GFP 複合体が GFP タグの付いていない Ape1 と同様、液 - 液相分離により形成される構造体であることをまず証明する。

興味深いことに、GFP を融合していない Ape1 は高温培養時にも Ape1 複合体を形成することが分かった。つまり、Ape1 は GFP を融合することで、高温培養時に液 - 液相分離しなくなったのだと考えられる。核小体・ヘテロクロマチン・ストレス顆粒などは、液 - 液相分離により形成され、生物の生命活動に重要な構造体である。こうした生命維持に重要な構造体を構成するタンパク質も Ape1 と同様に、GFP を融合すると高温で液 - 液相分離しなくなると仮定すると、GFP 融合株では、高温条件で培養した際に液 - 液相分離による構造体が形成不能となり、細胞が増殖

できなくなる可能性があるのではないかと考え、本研究提案を着想した。

私は、そのようなタンパク質を探索するために、出芽酵母の各遺伝子がコードするタンパク質の C 末端に GFP を融合した 4,100 種類余りの株のコレクション（研究室にて保有）を使用し、高温感受性の株をスクリーニングすることを考えた。候補となる株が得られたら、蛍光顕微鏡観察により、候補タンパク質の局在が温度上昇により変化しているかどうかを確認する。応募者が知る限り、液 - 液相分離を介して機能するタンパク質を網羅的に探索する研究は行われていないので、大いに挑戦的ではあるが、本研究への支援が得られ、候補遺伝子を取得することができれば、生命科学全体への大きな波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

本研究の第一の目的は、Ape1-GFP 複合体が液 - 液相分離により形成される構造体であることを示すことにある。液 - 液相分離により形成される構造体の性質として、複数の構造体が接触すると融合し、球状になる。液体の流れにさらされるとその剪断力により一部がちぎられ得る。

蛍光標識した当該構造体の一部の蛍光を退色させても、内部で物質が拡散することで退色した蛍光が回復する、といった点が挙げられる。に関しては、Ape1-GFP を経時的に観察することで融合を観察することができると考えているが、それが難しい場合、Ape1-GFP と Ape1-RFP を発現する別々の細胞を接合もしくは融合させることで観察を試みる。に関しては、試験管内で Ape1 複合体を再構成する実験には成功しているので、再構成した Ape1 複合体を顕微鏡で観察しつつ、マイクロマニピュレーターによる操作やピペティングで変形可能かどうかを確認する。に関しては、蛍光標識した Ape1 の FRAP 解析により観察可能である。微生物科学研究所の野田展生博士と共同して予備的に FRAP 解析を行ったところ、退色させた Ape1 複合体の一部に経時的な蛍光の回復が見られたことから、Ape1 複合体が液状であることを示唆する結果を得られている。

出芽酵母の生育に必須な遺伝子を破壊すると致死となる。こうした遺伝子は“必須遺伝子”と呼ばれる。上述のように、Ape1 に GFP を融合すると高温条件下で相分離が起こらなくなり、Ape1 複合体形成が不能となる。同様に必須遺伝子にコードされたタンパク質に GFP を融合すると、高温条件下で相分離が起こらなくなり、活性を失う、つまり致死となる可能性を想定した。出芽酵母では、各遺伝子がコードするタンパク質の C 末端に GFP を融合した 4,100 種類余りの株のコレクションが存在する。これらの株を寒天培地にて培養し、高温で生育が悪くなる株をスクリーニングする。これらの株は GFP 融合タンパク質を発現しているので、蛍光顕微鏡観察を二次スクリーニングとし、温度上昇により GFP 蛍光の局在が変化する株を選抜する。得られた候補遺伝子を Gene Ontology 解析し、液 - 液相分離が主要な役割を果たす細胞内経路を探索する。これまで、生物が高温で生育できないのは、タンパク質が変性することが大きな原因であるとされてきたが、生育に必須な構造体の液 - 液相分離ができなくなることもひとつの要因なのかもしれない。液 - 液相分離の関わるプロセスを網羅的に探索する研究はこれまで皆無なので、もちろん成功が保証されているわけではないが、成功したときのインパクトはかなり大きなものになるだろう。

4. 研究成果

当研究室では共同研究を通じて、選択的オートファジーの基質である、Ape1 複合体が液 - 液相分離により形成される構造体であることを示した (Yamasaki et al., Mol. Cell, 2020)。また我々は最近になって、Ape1 に GFP を融合することで高温培養条件下の液 - 液相分離が阻害され、Ape1 複合体形成が不能となる現象を見いだし報告した (Hirata and Suzuki, FEBS Lett., 2023)。本研究課題では、GFP を融合するとタンパク質の活性が温度感受性になる現象が他のタンパク質にも適用可能

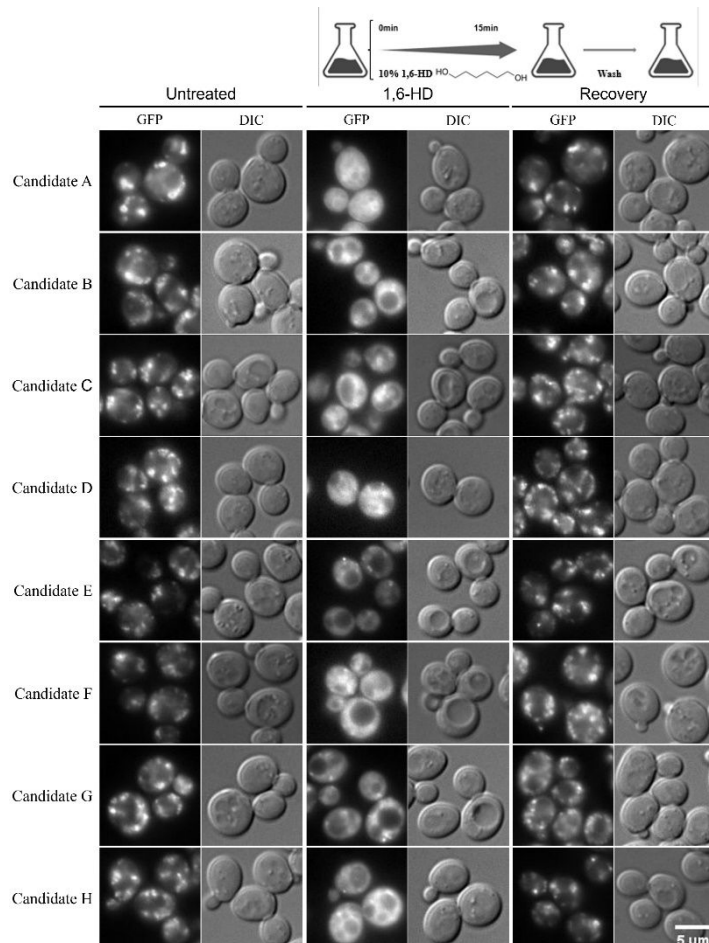


図2. 新規液 - 液相分離区画の候補株。培養した酵母株 (Untreated) に 10% 1,6-ヘキサジオール (1,6-HD) を添加し 15 分培養すると GFP 融合タンパク質の局在が消失した。培地交換により 1,6-HD を洗い流すと局在が回復した (Recovery)。

であることを調べることを目的としている。

上述のように、同様に必須遺伝子にコードされたタンパク質に GFP を融合すると、高温条件下で相分離が起こらなくなり、活性を失う、つまり致死となる可能性を想定した。出芽酵母では、各遺伝子がコードするタンパク質の C 末端に GFP を融合した 4,100 種類余りの株のコレクションが存在する。初年度の研究では、これらの株を寒天培地にて培養し、高温で生育が悪くなる株をスクリーニングすることを目標とした。

初年度の研究で、4,100 種類の株の一次スクリーニングが終了し、556 種類の株が高温感受性の生育を示すことが明らかとなった。二年目以降、スポットティングアッセイによる二次スクリーニングを終了し、136 株が強い表現型を示すことが明らかとなった。これらの候補株を 30 で培養し、液 - 液相分離により形成される構造体を溶解するとされる 1,6-ヘキサンジオール処理を行ったところ、いくつかの株でドット状の局在が消失し、1,6-ヘキサンジオールを洗い流すと速やかに回復した。この結果から、これらの GFP 融合タンパク質のドットが液 - 液相分離によって形成される新規区画であることが強く示唆された (図 2)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Suzuki Kuninori, Hirata Eri	4. 巻 597
2. 論文標題 Liquid droplet formation and cytoplasm to vacuole targeting of aminopeptidase I are temperature sensitive in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 631 ~ 642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14509	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 Eri Hirata, Kyo Shirai, Tatsuya Kawaoka, Kosuke Sato, Fumito Kodama, Kuninori Suzuki	4. 巻 32
2. 論文標題 Atg15 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> consists of two functionally distinct domains	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 645-663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1091/mbc.E20-07-0500	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 Watanabe Yasunori, Iwasaki Yurina, Sasaki Kyoka, Motono Chie, Imai Kenichiro, Suzuki Kuninori	4. 巻 42
2. 論文標題 Atg15 is a vacuolar phospholipase that disintegrates organelle membranes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113567 ~ 113567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113567	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 Watanabe Yasunori, Suzuki Kuninori	4. 巻 20
2. 論文標題 The activation mechanism of Atg15, a vacuolar phospholipase required for the disintegration of organelle membranes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1 ~ 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2024.2333165	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 Shi Yang, Suzuki Kuninori	4. 巻 20
2. 論文標題 Quantitative analysis of the spatial distance between autophagy-related membrane structures and the endoplasmic reticulum in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2024.2330033	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木邦律, 平田恵理
2. 発表標題 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> のCvt pathwayは高温感受性の経路である
3. 学会等名 第54回酵母遺伝学フォーラム研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田 恵理, 白井 亨, 佐藤 公亮, 児玉 史人, 鈴木邦律
2. 発表標題 出芽酵母液胞内リパーゼAtg15は ふたつの独立した機能ドメインを有する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河岡辰弥, 李楚寧, 鈴木邦律
2. 発表標題 Morphometric analysis of the process of autophagosome formation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河岡辰弥, 李楚寧, 平田恵理, 鈴木邦律
2. 発表標題 Morphometric analysis of the process of autophagosome formation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3. 学会等名 The 10th International Symposium on Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生命応答システム分野 (鈴木 邦律 研究室) ウェブページ http://www.yeast-autophagy.k.u-tokyo.ac.jp/publications.html
--

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