

ラマン顕微鏡によるラベルフリーなタンパク質液滴定量法

小林 孝和¹, 梶本 真司¹, 黒井 邦巧²

1. はじめに

液液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) は、2015年ごろから生物学の分野で盛んに研究されるようになり、その勢いは現在も続いている¹⁾。生物学における LLPS とは、タンパク質や核酸 (溶質) を含んだ溶液において、溶質が高濃度で存在する領域 (液滴) と低濃度で存在する領域の二相の液体に分かれる現象を指す。生体分子の水溶液が水と油のように二つの異なる液相に分かれる興味深い現象であり、酵素反応やシグナル伝達の効率化などさまざまな生理現象に対して、LLPSによる寄与が相次いで報告されている。液滴はタンパク質どうし、またはタンパク質と生体分子間の弱い分子間相互作用の総和によって形成され、グリシンなどのアミノ酸が多数配列する低複雑性領域を含んだタンパク質が LLPS を生じやすいとされている。生理的条件下で液滴を形成するタンパク質がこれからも多数報告されることは間違いなさであろう。

一方で、LLPS は神経変性疾患発症におけるタンパク質凝集・線維化への関与も指摘されている。神経変性疾患の発症原因として、原因タンパク質の凝集が提案されているが、タンパク質の凝集機構において、原因タンパク質の液滴がゲル化し、その後凝集化する機構が提案された。アルツハイマー症の原因タンパク質タウや筋萎縮性側索硬化症の原因タンパク質 FUS などにおいて液滴が凝集物の前駆体になりうることが示され、液滴を解消することで神経変性疾患を治癒する研究も進められている²⁾。

2. 液滴の測定手法

LLPS の液滴の計測では、検出には蛍光顕微鏡、構造解析には NMR が一般に用いられる。蛍光観測では、液滴を形成するタンパク質に蛍光分子・蛍光タンパク質をラベル化し、液滴が生じるとラベル化されたタンパク質が高濃度に存在する液滴で強い蛍光が観測される。きわめて高感度であり、液滴の存在を確かめることができる。しかし、ラベル化されたタンパク質しか観測できない、タンパク質の構造情報が得られない、ラベル化することでタンパク質の本来の性質が変化する、などの欠点を持つ。そのために、目的タンパク質以外の成分も蛍光ラベル化した液滴構成成分の探索、FRET (Förster resonance energy transfer) を用いたタンパク質の構造情報の取得、系統的な変異体作製による分子間相互作用の探索など、種々の生化学的・生物物理学的技術と組み合わせることで蛍光から多くの情報が得られている。しかし、タンパク質のラベル化による相互作用変化の問題がどうしても残ってしまう。上述のように、LLPS の液滴はアミノ酸残基間での静電的相互作用、疎水性-疎水性相互作用、 π - π 相互作用、カチオン- π 相互作用などの弱い相互作用の総和によって生成する^{3,4)}。そのために、ラベル化することで弱い分子間相互作用の性質が変化し、液滴の形成能が変化する可能性がある。蛍光タンパク質でラベル化すると蛍光タンパク質共存下での液滴を観測していることになり、目的タンパク質と同程度の大きさの蛍光タンパク質が、液滴形成に本質的な影響を与えることは十分にありえる話である。液滴の性質の詳細を知るには、ラベルフリーで行うことが重要である。

また、NMR による液滴内タンパク質の構造計測では、NMR チューブの中で液滴を含む溶液を二相の溶液に分けて測定が行われる。構造情報を得る最も有力な手法であるものの、単一液滴の状態では測定できない欠点を有する。空間分解能を持たないために、細胞内での液滴計測も NMR では困難である。顕微鏡を用いて単一液滴の状態では計測できれば、液滴間の差異も検出でき、最も重要な細胞内計測へも展開できる。

¹ 東北大学大学院薬学研究科 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6-3)

² 神戸学院大学薬学部 (〒650-8586 神戸市中央区港島1-1-3)

Label-free quantification of a protein liquid droplet using Raman microscopy

Takakazu Nakabayashi¹, Shinji Kajimoto¹ and Kunisato Kuroi²

(¹ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan, ² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, 1-1-3 Minatogima, Chuo-ku, Kobe 650-8586, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940444

© 2022 公益社団法人日本生化学会

3. ラマン顕微鏡

そこで我々は、ラベルフリーかつ単一液滴の状態での測定するLLPSの汎用測定手法として、ラマン顕微鏡を提案している。ラマン散乱はレーザー光を試料に照射することで観測される非弾性散乱光であり、励起レーザー光とラマン散乱光のエネルギー差が試料の分子振動のエネルギーと一致する。このラマン散乱光を分光検出し、横軸を励起光からのエネルギーのシフト値としてプロットすることで試料内分子の振動（ラマン）スペクトルが得られる⁵⁾。ラマンスペクトルにおいて、ラマン強度から試料内にある分子の濃度、スペクトルのピーク位置やピークシフトから分子構造や分子間相互作用などの情報をラベルフリーで得ることができる。連続（CW）レーザーを用いる通常のラマン顕微鏡は、高分解能の分光器・高感度の検出器を用いる点を除けば共焦点蛍光顕微鏡と基本的には同一である。単一液滴の状態での個々の液滴計測、pHや塩濃度などの試料条件を詳細に変化させた測定を行うことができる。励起レーザー光の波長として液滴構成成分が吸収しない波長を用いることで、試料の光吸収による損傷も大きく抑えることができる。

我々はラマン顕微鏡を用いて細胞内環境、特に細胞内の生体分子が高濃度かつ不均一に混み合った環境（分子夾雑環境⁶⁾）の定量測定の研究を進めているが⁷⁻⁹⁾、LLPSによって細胞内に形成する液滴も不均一な分子夾雑環境の一つとみなすことができる。そこで、ラマン顕微鏡がLLPS研究における蛍光・NMR測定の欠点を克服できるポテンシャルを有することに着目し、LLPS研究に取り組むに至った。

4. ATXN3の液滴形成

本稿では原著論文として報告した神経変性疾患の一つであるマシャド・ジョセフ病（Machado-Joseph disease : MJD）の原因タンパク質であるataxin-3（ATXN3）の液滴形成の発見とラマン顕微鏡を用いて単一液滴内の濃度定量、構造情報の取得、液滴内に存在する他成分の同定を行った結果を紹介する^{10, 11)}。MJDは遺伝性脊髄小脳変性症の一種であり、ATXN3の凝集が発症と関係することが提案されている¹²⁾。ATXN3はC末側にグルタミン残基が連続して配列するポリQ領域（polyQ）を持ち、polyQの異常伸長がATXN3の凝集を促進することから、MJDはポリグルタミン病の一つとされる。我々は、ATXN3が他の神経変性疾患関連タンパク質と同様に液滴を生成することを見いだした。細胞内の分子夾雑環境を再現するために、高分子のポリエチレングリコール（PEG）またはデキストラン（DEX）をクラウディング剤として緩衝溶液に

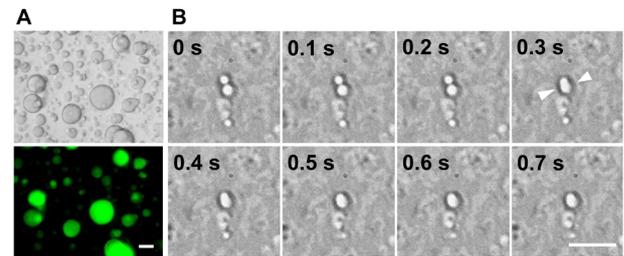


図1 ATXN3液滴の画像
(A) ATXN3液滴の明視野像(上)と対応する蛍光像(下)。(B) ATXN3液滴の時間変化。二つの液滴が融合するようすが観測される¹⁰⁾。

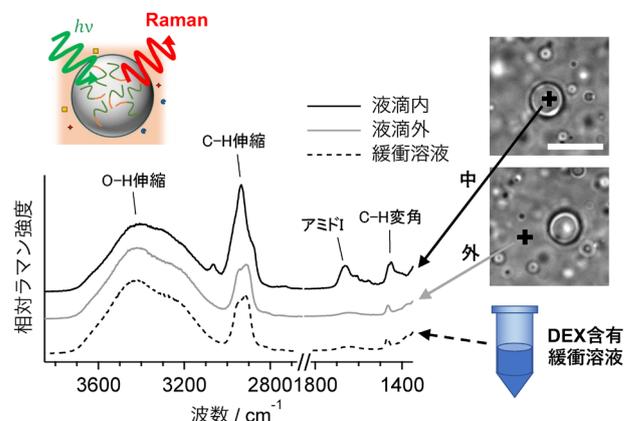


図2 ATXN3液滴のラマンスペクトル
液滴内（黒実線）、液滴外（灰実線）、およびDEX含有緩衝溶液（破線）のラマンスペクトルと液滴の明視野像。+の位置でラマンスペクトルを測定している。

加えた細胞内模倣環境を用意し、その中に蛍光分子で標識したATXN3を加えると、液滴が生じ液滴内のみ強い蛍光が観測された（図1A）。この結果は、生成した液滴内でATXN3が高濃度で存在することを示している。観測した液滴が流動性を持つことは液滴どうしの融合が観測されることで確認できる（図1B）。また、polyQを除いたATXN3の変異体では液滴が観測されないことから、液滴形成にはpolyQが重要であることがわかった。

5. ATXN3の液滴のラマン測定

ATXN3の液滴を用いて、ラマン顕微鏡の液滴応用について検討した。顕微鏡下で液滴を見分け、単一液滴の内側と外側のラマンスペクトルを測定した結果を図2に示す。クラウディング剤としてDEXを用い、DEXのみを含む緩衝溶液のラマンスペクトルも併せて示している。液滴内と外の両方で観測される $3100\sim 3700\text{cm}^{-1}$ の強度の強いブロードなバンドは、水のO-H伸縮振動に由来する。液滴外でみられる $2900\sim 3100\text{cm}^{-1}$ の強いバンドと $1400\sim 1500\text{cm}^{-1}$ の弱いシャープなバンドの形状は、DEXのみの

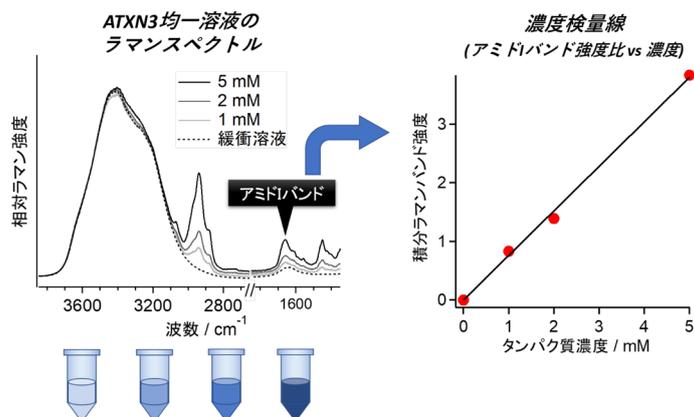


図3 ラマンスペクトルを用いた濃度検量線
 種々の濃度のATXN3均一溶液のラマンスペクトル(左)と水のO-H伸縮振動バンドに対するATXN3のアミドIバンドの強度比を用いて作成した濃度検量線(右)¹⁰⁾。

緩衝溶液のラマンバンドと一致し、DEXのC-H伸縮とC-H変角振動にそれぞれ帰属できる。実際、液滴外のスペクトルはDEXのみの水溶液と同一であり、ATXN3由来のバンドは観測されない。

液滴内のラマンスペクトルでは、ATXN3のアミド結合の振動に由来するアミドIバンドが 1660 cm^{-1} に明瞭に観測され、液滴外に比べて液滴内ではATXN3が高濃度に存在することがラマンスペクトルからも確認できる。また、 $2900\sim 3100\text{ cm}^{-1}$ と $1400\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ のC-H伸縮とC-H変角の領域のバンドは、DEXのみのスペクトルとは異なる形状を示し、別に調製したATXN3のみの水溶液のラマンスペクトルと一致した。この結果は、液滴内では水とATXN3のみが観測され、DEXは観測限界値以下の低濃度でしか液滴内に存在しないことを示している。以上より、ラマン顕微鏡を用いることで、液滴はDEXが液滴内から排除される形で生成し、液滴内は水とATXN3のみから構成されることがわかる。PEGを導入した場合でも同様の結果が得られ、クラウディング剤が排除された形でATXN3の液滴ができることがわかった。

タンパク質のアミドIバンドは、二次構造に応じてピーク位置が変化することが知られており、 α ヘリックスは $1649\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ に、 β シートは $1620\sim 1648\text{ cm}^{-1}$ または $1665\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ に観測される¹³⁾。 α ヘリックス構造の割合が大きいATXN3のアミドIバンドは、液滴を形成しない状態では約 1660 cm^{-1} に観察され、液滴を形成しても波数位置の変化は観測されなかった。この結果から、液滴を形成したのみでは、アミドIバンドの明瞭な変化が観測されるほどの二次構造変化はないといえる。

6. ATXN3液滴の濃度定量

さらに、ラマン顕微鏡を用いて液滴内のタンパク質濃度

をラベルフリーで測定できることを提案した。ラマン散乱は蛍光と同じく絶対強度を測定しており、測定条件(測定の仕方)によって値が変化する。そのために濃度定量には測定条件による違いを補償する強度標準が必要となる。そこで我々はラマンイメージング測定で常に観測される液滴外の水のO-H伸縮振動バンド($3100\sim 3700\text{ cm}^{-1}$)に着目した。水中の水の濃度(密度)はきわめて高く、多くの場合濃度を一定値と置くことができる。そのために、液滴のイメージング測定時に同時に観測される液滴外の水のO-H伸縮振動バンドを強度標準として液滴内のタンパク質のラマン強度の評価を行えば、測定に伴う強度誤差を補正し、液滴内のタンパク質の濃度をきわめて定量性高く、ラベルフリーで測定することができる。O-H伸縮振動バンド強度は比較的強いために精度高く測定を行うことができ、また、上述のようにタンパク質が光吸収を示さない励起波長を用いるために、光退色の影響も無視できる。これらの点もラマン顕微鏡と水のラマンバンドを用いたラベルフリー濃度定量の利点となる。

濃度定量では、水のO-H伸縮振動バンド強度に対するATXN3のラマン強度の検量線をあらかじめ作成し、その検量線を用いて液滴内のラマン強度から濃度定量を行う。緩衝溶液のみではATXN3は液滴を形成しないことを利用して、さまざまな濃度のATXN3の緩衝溶液のラマンスペクトルを測定した後、水のO-H伸縮振動バンド強度に対するATXN3のアミドIバンド強度をATXN3濃度に対してプロットし検量線を得た(図3)。次に、単一液滴の内側と外側のラマンスペクトルを測定し、液滴内のタンパク質濃度の測定を行った。液滴外のDEXによるO-H伸縮振動バンドの影響は、DEXを含む場合と含まない場合のラマン強度を比較することで補正した。 $100\text{ }\mu\text{M}$ のATXN3溶液から生成した液滴内のATXN3の濃度は、 $20\text{ wt}\%$ のDEXの緩衝液中で $12.7\pm 1.3\text{ mM}$ と求めることができ、ATXN3が

液滴内で100倍以上に濃縮されることがわかった。また、20wt%のPEGの緩衝液中で 13.6 ± 0.6 mMとなり、PEGの濃度を30wt%に増加させると、液滴内タンパク質濃度も 15.4 ± 0.5 mMに増加した。この結果は、周囲の分子夾雑環境によって液滴内のATXN3の濃度が変化することを示している。上述したように、神経変性疾患の発症においてタンパク質の液滴からゲル・線維化するモデルが提案されている。今回の結果は、分子夾雑環境の変化によって液滴内のタンパク質濃度が変化して高濃度の液滴が生じ、液滴からゲル・線維に転移する可能性を示唆している。周囲の環境がゲル・線維化のトリガーとなる可能性がある。液滴の物性・機能の理解において周囲の細胞内環境との関係も検討する必要がある。

7. 今後の展開

ラマン顕微鏡を用いて液滴内成分の同定、液滴内のタンパク質の構造と濃度定量をラベルフリーかつ単一液滴の状態で行った。特に、濃度測定は現在さまざまなタンパク質に応用しており、pHや塩濃度、調製濃度の変化による液滴内タンパク質の濃度変化の測定も行っている。構造変化についても、ゲル・線維化に伴う二次構造変化をラマンバンドの変化から追跡できると考えられる。次のステップは実際の細胞内での測定であり、ラベルフリーで細胞内の液滴を定量性高く測定できれば、その波及効果はきわめて高いと考えられる。ラマンスペクトルは統計解析や深層学習と相性がよく、さまざまな解析手法と組み合わせることで細胞内の検出も達成できると考えている。ラマンスペクトルは、クライオ電子顕微鏡やNMRに比べて得られる構造情報は少なく、また蛍光に比べて低感度である。しかし、単一細胞内であるがままの条件で測定でき、また変性状態など任意の分子構造に対して検討できる利点を持つ。このような利点を活かして、ユニークな結果をこれからも出し続けていきたい。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金 (JP17H05869, JP19H02666, JP20H04689) と住友財団基礎科学研究助成の支援を得て行われました。また、村上一輝さん (東北大院薬)、柴田大輝さん (東北大院薬)、藤井文彦先生 (神戸学院大薬) との共同研究になります。ここに深く感謝いたします。

文 献

- 1) Su, Q., Mehta, S., & Zhang, J. (2021) Liquid-liquid phase separation: Orchestrating cell signaling through time and space. *Mol. Cell*, **81**, 4137–4146.
- 2) Zbinden, A., Pérez-Berlanga, M., De Rossi, P., & Polymenidou, M. (2020) Phase Separation and Neurodegenerative Diseases: A Disturbance in the Force. *Dev. Cell*, **55**, 45–68.
- 3) Wang, J., Choi, J.-M., Holehouse, A.S., Lee, H.O., Zhang, X., Jahnel, M., Maharana, S., Lemaitre, R., Pozniakovsky, A., Drechsel, D., et al. (2018) A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell*, **174**, 688–699.
- 4) Das, S., Lin, Y.-H., Vernon, R.M., Julie, D., Forman-Kay, J.D., & Chan, H.S. (2020) Comparative roles of charge, π , and hydrophobic interactions in sequence-dependent phase separation of intrinsically disordered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 28795–28805.
- 5) Kajimoto, S., Takeuchi, M., & Nakabayashi, T. (2017) Raman imaging microscopy for quantitative analysis of biological samples, in Multi-Parametric Live Cell Microscopy of 3D Tissue Models, pp. 163–172, Springer.
- 6) Miyoshi, D., Karimata, H., & Sugimoto, N. (2006) Hydration regulates thermodynamics of G-quadruplex formation under molecular crowding conditions. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7957–7963.
- 7) Takeuchi, M., Kajimoto, S., & Nakabayashi, T. (2017) Experimental Evaluation of the Density of Water in a Cell by Raman Microscopy. *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**, 5241–5245.
- 8) Sugimura, T., Kajimoto, S., & Nakabayashi, T. (2020) Label-Free Imaging of Intracellular Temperature by Using the O–H Stretching Raman Band of Water. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 7755–7760.
- 9) Shibata, D., Kajimoto, S., & Nakabayashi, T. (2021) Label-free tracking of intracellular molecular crowding with cell-cycle progression using Raman microscopy. *Chem. Phys. Lett.*, **779**, 138843.
- 10) Murakami, K., Kajimoto, S., Shibata, D., Kuroi, K., Fujii, F., & Nakabayashi, T. (2021) Observation of liquid-liquid phase separation of ataxin-3 and quantitative evaluation of its concentration in a single droplet using Raman microscopy. *Chem. Sci.*, **12**, 7411–7418.
- 11) 村上一輝, 梶本真司, 中林孝和 (2021) ラマン顕微鏡を用いた疾患関連タンパク質の液-液相分離の定量評価。細胞, **53**, 548–551.
- 12) Koch, P., Breuer, P., Peitz, M., Jungverdorben, J., Kesavan, J., Poppe, D., Doerr, J., Ladewig, J., Mertens, J., Tüting, T., et al. (2011) Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease. *Nature*, **480**, 543–546.
- 13) Sadat, A. & Joye, I.J. (2020) Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Proteins. *Appl. Sci. (Basel)*, **10**, 5918.

著者寸描

●中林 孝和 (なかばやし たかかず)



東北大学大学院薬学研究科教授。博士(理学)。

■略歴 1997年東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士後期課程中退，同年分子科学研究所助手，2002年北海道大学電子科学研究所助教授，14年東北大学大学院薬学研究科教授，現在に至る。

■研究テーマと抱負 分子分光学的手法を駆使したタンパク質・細胞内計測手法

の開発と応用，超硫黄分子の検出と構造-機能相関，細胞内の分子夾雑環境・液液相分離とタンパク質の機能発現の相関。

■ウェブサイト <http://www.tohoku-biostructchem.com>

●梶本 真司 (かじもと しんじ)



東北大学大学院薬学研究科准教授。博士(理学)。

■略歴 2002年東北大学理学部卒業，07年同大学院理学研究科修了。分子科学研究所専門研究職員，東北大学大学院理学研究科助教，同薬学研究科講師を経て，21年より現職。

■研究テーマと抱負 分子分光学的手法を用いた細胞内環境の可視化・定量手法

の開発とその応用。

■趣味 料理。

●黒井 邦巧 (くろい くにさと)



神戸学院大学薬学部助教。博士(理学)。

■略歴 2009年京都大学理学部卒業，15年同大学院理学研究科化学専攻，博士課程修了。分子科学研究所研究員，東北大学大学院薬学研究科助教，神戸学院大学薬学部リサーチ助手を経て，22年より現職。

■研究テーマと抱負 生体分子の構造・機能に関する分光手法を用いた研究。