

グアニン四重鎖構造が誘起するヒストン/DNA液-液相分離

富田 峻介¹, 三村 真大^{1,2}

1. はじめに

近年、液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) と呼ばれる物理現象が、細胞内で起こる生化学反応の制御と密接に関わっている可能性が指摘されている。LLPSとは、液体同士が混ざり合わずに2相以上に分離する現象である。我々が日常的に目にする現象であり、サラダドレッシングの水と油が分離するのもLLPSの一例である。生物学の分野では、とりわけストレス応答やシグナル伝達といった細胞プロセスや、神経変性疾患をはじめとする疾患との関連に焦点が当てられ、試験管内での現象の再現から細胞・個体内での動態の観察に至るまで精力的に研究が進められている¹⁾。試験管内で再現されるLLPSでは、タンパク質や核酸といった生体高分子が濃縮された微量の凝縮相 (液滴とも呼ばれる) が、希薄な相の内部に形成されるのが一般的である²⁾。細胞内でLLPSによって形成される集合体は、特に‘膜のないオルガネラ’などと呼ばれ、流動性の異なる部分が多層化した複雑な相構造を形成する場合もある³⁾。

固-液相分離した凝集やゲルとは異なり、LLPSにより形成した液滴は流動性を示す。その粘度は0.1~100 Pa·s、水含有量は40~90%の範囲であると推定されている⁴⁾。室温における水の粘度が0.001 Pa·s、ガムシロップがおおよそ1 Pa·sであることから、液滴はかなりの粘稠かつ濃厚な液体である。液滴の重要な特徴の一つは、温度やpH等の環境変化に迅速に応答して形成/消失できることである (図

1A)。また、オルガネラや小胞のように膜構造を持たないため、液滴は高い物質透過性を示す。この性質のために、液滴は内部の特性に応じて特定の生体分子を選択的かつ可逆的に取り込むことができる (図1A)。こうしてLLPSは細胞内の生化学反応が起こる‘場’を区画化することで、一連の反応の時空間的な制御を実現していると考えられている⁵⁾。

2. クロマチンが関与するLLPS

一般に生物学の分野で対象とされるLLPSは、タンパク質の天然変性領域 (intrinsically disordered region: IDR) やDNA, RNAのような、柔軟な構造を持つ生体高分子同士が相互作用することで生じる。FUSやhnRNPA1といったIDRを有するタンパク質は、自己集合してLLPSを起こす。こうした1種類の分子によって引き起こされるLLPSは、‘単純コアセルベーション’と呼ばれる (図1B-1)⁶⁾。このLLPSの発生は、分子間で多点的に生じる π - π 相互作用やカチオン- π 相互作用が主な駆動力となる場合が多い。これに対し、反対に帯電した2種類の分子間の静電的相互作用が駆動力となって生じるLLPSは、‘複合コアセルベーション’と呼ばれる (図1B-2)⁶⁾。代表的な例として、負に帯電した核酸と正に帯電したペプチドの混合により生じるLLPSがあげられる⁶⁾。

最近、LLPSとクロマチンの関わりに注目が集まっている。たとえば、クロマチンが核内で密に凝縮したヘテロクロマチン⁷⁾ や緩く凝縮したスーパーエンハンサー⁸⁾、染色体末端のテロメア領域⁹⁾ などは、液滴様の流動的な振る舞いを示すことが報告されている。クロマチンは、正と負にそれぞれ帯電したヒストンタンパク質とDNAの複合体であることから、複合コアセルベーションの観点からも研究が進んでいる。たとえば、リンカーヒストンH1のC末端側に存在するIDR¹⁰⁾ やヒストン八量体¹¹⁾ は、試験管中で二本鎖DNAと混合すると液滴を形成する。こうしたクロマチンの複合コアセルベーションを理解するために、主にタンパク質の関連因子の特定が進められており、リン酸化やアセチル化、メチル化などの翻訳後修飾の影響が明らかになっている¹²⁾。

我々は、特にDNAの構造に焦点を当て、クロマチンの複合コアセルベーションとの関連を調べている。DNAは

¹産業技術総合研究所健康医工学研究部門 (〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-1 中央第六)

²筑波大学大学院数理物質科学研究科 (〒305-8573 茨城県つくば市天王台1-1-1)

Liquid-liquid phase separation of histone/DNA induced by G-quadruplex structure

Shunsuke Tomita¹ and Masahiro Mimura^{1,2} (¹Health and Medical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science & Technology (AIST), Central 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan, ²Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, 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.2022.940754

© 2022 公益社団法人日本生化学会

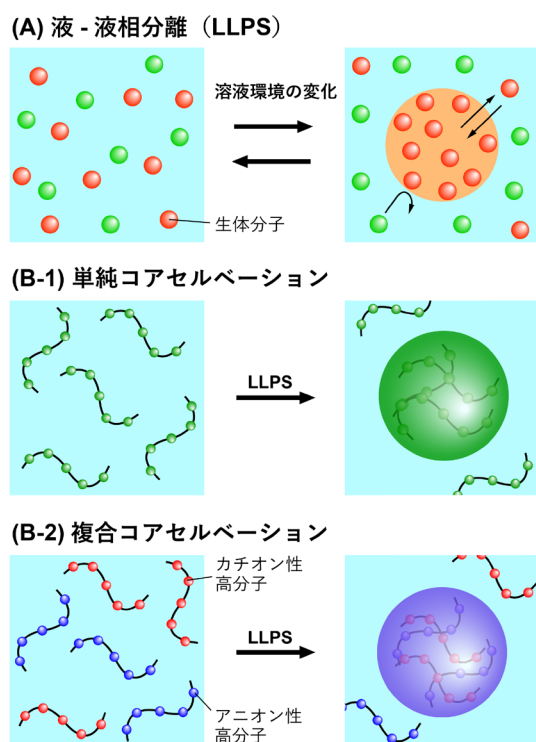


図1 生体分子のLLPS

(A) 細胞内の生体分子には、溶液環境や分子の状態の変化（例：分子濃度やpH, 温度, 翻訳後修飾など）に応じて可逆的に液滴を形成するものがある。このとき、液滴を構成する生体分子との親和性に依存して、内部に他の分子が濃縮または排除される。(B-1) 1種類の分子が起こすLLPSは、単純コアセルベーションと呼ばれる。分子間の π - π スタッキングやカチオン- π 相互作用が主な駆動力となる。(B-2) 反対の電荷を持つ2種類の分子間の静電的相互作用を主な駆動力として生じるLLPSは、複合コアセルベーションと呼ばれる。

二重らせん構造以外にも多様な立体構造を形成することが知られている。なかでも、グアニンに富んだ反復配列が形成するグアニン四重鎖構造は、がんや細胞寿命に関わる遺伝子制御において重要な役割を担っており、形成可能な配列がヒトゲノム中に300,000か所以上存在するともいわれている¹³⁾。興味深いことに、グアニン四重鎖DNAは、ヘテロクロマチンや核小体などの膜のないオルガネラに局在する傾向がある¹⁴⁾。我々はこれらの点に着目し、グアニン四重鎖構造とLLPSの関係性を解明することを試みた¹⁵⁾。

3. グアニン四重鎖構造とヒストンH1のLLPS

グアニン四重鎖構造は、配列中のグアニンどうしが水素結合を介してGカルテットと呼ばれる平面構造を形成し、これがさらにスタッキングすることで形成される（図2A）。この構造がLLPSに及ぼす影響を調べるために、我々は以下のDNA配列を使用した。発がん遺伝子のプロモーター領域に存在するグアニン四重鎖形成性の配

列（Pu22）、Pu22のグアニンをアデニンに置換して四重鎖構造を形成しにくくした配列（Pu22-2）、アデニンの繰り返し配列[poly(dA)]である（図2B）。これらのDNAを、カチオン性の核内タンパク質であるリンカーヒストンH1と混合したときの溶液の変化を調べた。リンカーヒストンH1は両末端にリシンに富んだIDRを持ち（図2C）、静電相互作用を介してヌクレオソームのパッキングを制御する役割を担っている。DNAやヌクレオソームのLLPSを促進する働きも明らかになっており^{10, 11)}、クロマチンLLPSにおいて重要なタンパク質の一つだと考えられている。

一定濃度のDNAに対してヒストンH1を添加すると、グアニン四重鎖形成性のDNAの場合のみ、濃度の増加に伴って溶液の濁度が増加した（図2D）。濁度の増加は、DNAとヒストンH1が溶液中で集合体を形成したことを示唆している。[ヒストンH1]/[DNA]=0.2の濃度比の溶液を明視野顕微鏡で観察したところ、Pu22およびPu22-2の場合は球状の集合体が多数観測され、その数やサイズは概してPu22>Pu22-2であった（図2E）。対してpoly(dA)では、集合体はわずかにしかみられなかった（図2E）。球状の集合体は接触すると速やかに融合したことから、これらは凝集体ではなく液滴であることが判明した（図2F）。これらの結果は、グアニン四重鎖DNAがヒストンH1とLLPSを起こしやすいことを示唆する。Pu22とは異なるグアニン四重鎖形成性の配列でも同様の傾向がみられたため、一般性の高い現象であると推察される。

4. 液滴内部のグアニン四重鎖構造

グアニン四重鎖DNAがLLPSを促進することが明らかになったが、この構造は液滴内部でも維持されているのだろうか。LLPSの発生は、DNAとヒストンH1の静電的相互作用が引き金となっている。また、液滴内部には、周囲の相に比べて数倍から数百倍に構成成分が濃縮される¹¹⁾。こうしたヒストンH1との結合や高濃度環境によって、四重鎖構造が変性している可能性が考えられた。そこで我々は、グアニン四重鎖構造に特異的に結合することで蛍光を発する色素（チオフラビンT: ThT）を用いて、液滴内部でのDNA構造を調べた。DNAとヒストンH1の液滴を含む溶液にThTを添加すると、Pu22が形成した液滴の内部からのみThT由来の強い蛍光が確認された（図3A）。一方で、Pu22-2やpoly(dA)の場合ではその蛍光がほとんど観察されなかった（図3A）。この結果は、液滴内部に濃縮されたDNAのグアニン四重鎖構造にThTが結合したことを示唆する。液滴内部の粘性や誘電率の影響、他の蛍光プローブやDNA配列との比較を合わせて慎重に検討した結果、我々はグアニン四重鎖構造が液滴内部でも維持されていると結論づけた。

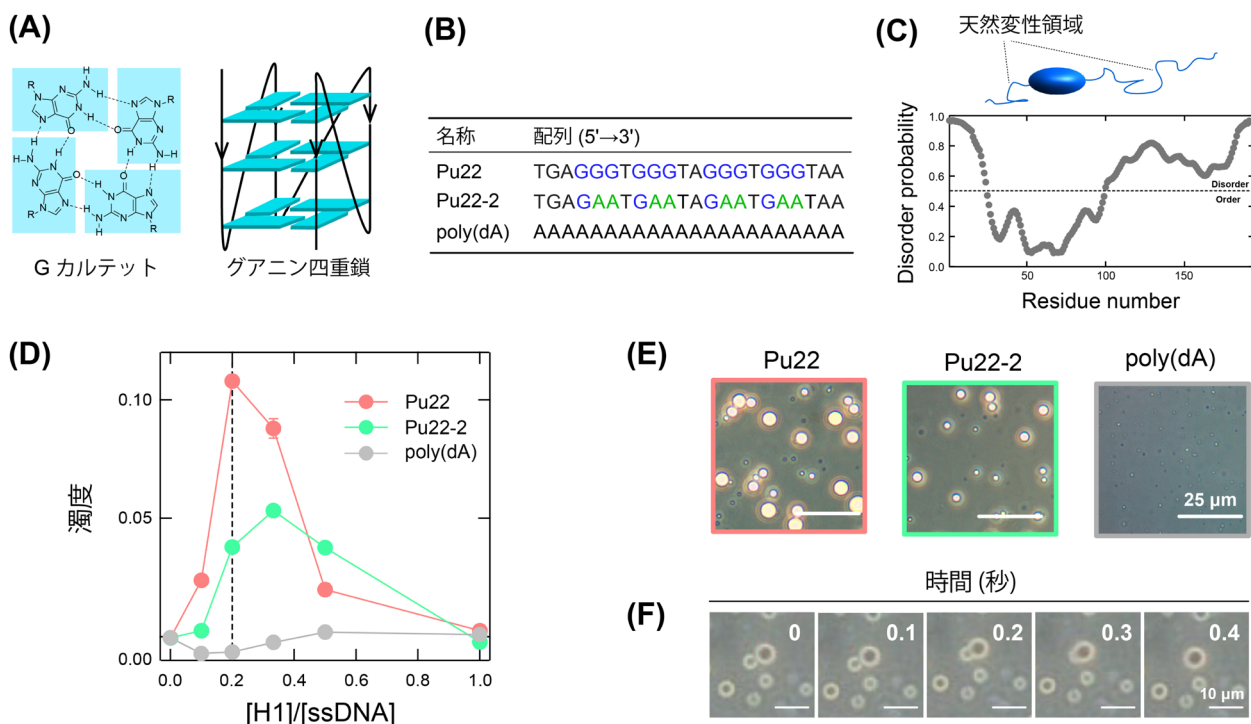


図2 グアニン四重鎖DNAとリンカーヒストンH1のLLPS

(A) グアニン四重鎖構造。グアニンどうしの水素結合により形成したG-カルテット(左)がスタッキングすることで形成される(右)。(B) 使用したDNA配列。(C) ヒストンH1配列にもとづく立体構造の予測結果。縦軸が0.5以上のときIDRである可能性が高い。(D) DNAとヒストンH1の濃度比に対する溶液の濁度(400nmの吸光度の測定値)。(E) [ヒストンH1]/[DNA] = 0.2の溶液の位相差顕微鏡画像。(F) 液滴どうしが融合する様子。文献15の図を改編して転載。

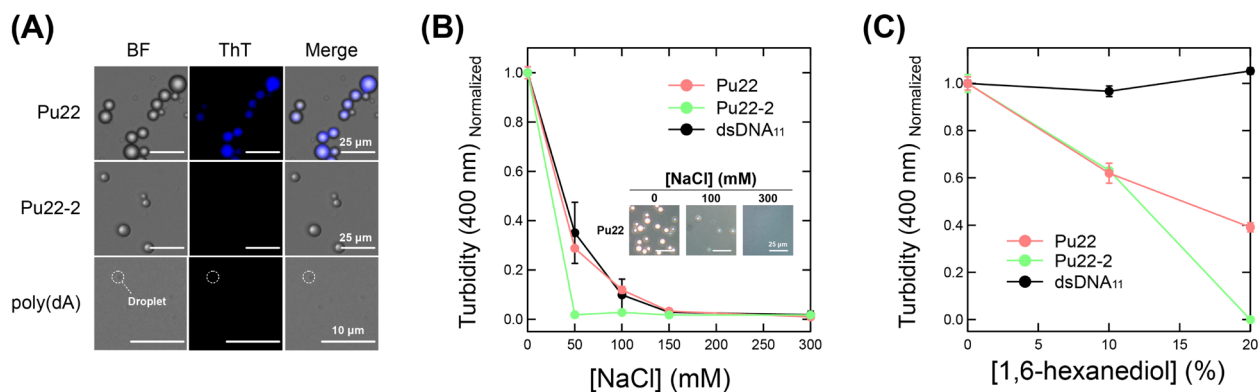


図3 グアニン四重鎖構造依存的な液滴の形成メカニズム

(A) 液滴を含む溶液にグアニン四重鎖特異的な蛍光色素(ThT)を加えたときの蛍光顕微鏡画像。(B, C) 液滴を含む溶液に(B) NaClまたは(C) 1,6-ヘキサンジオールを加えた際の溶液全体の濁度。文献15の図を改編して転載。

5. 液滴形成を促進する因子

なぜグアニン四重鎖構造はLLPSを引き起こしやすいのだろうか。この理由を明らかにするため、2種類の添加剤、すなわち静電的相互作用を阻害するNaClと疎水性相互作用を阻害する1,6-ヘキサンジオールを用いて、その駆動力を調査した。この際、Pu22とPu22-2に加え、二重鎖

DNA(dsDNA)を比較することで機構の解明を試みた。

NaClの添加は、すべてのヒストン/DNA液滴を含む溶液の濁度を減少させ、同時に液滴を溶解させた(図3B)。この結果は、ヒストン/DNA液滴が静電的相互作用によって安定化されており、NaClによって相互作用が阻害されることで液滴が維持できなくなったことを意味する。これは複合コアセルベーションに共通した挙動である。こ

ここで使用した三つの配列はリン酸基の数が同じなのにもかかわらず、四重鎖構造を形成しにくいPu22-2が低濃度のNaClで溶解したことは、液滴の安定化には立体構造形成が関与している可能性を示唆する。二重鎖や四重鎖の形成によって表面電荷密度が増加し、その結果、ヒストンH1とより強く相互作用できるためかもしれない。

続いて、1,6-ヘキサンジオールを添加したところ、Pu22とPu22-2の場合は濁度が濃度依存的に大きく減少したのに対し、dsDNAの場合はほとんど変化しなかった(図3C)。この違いには、核酸塩基の溶媒への露出が関係している可能性が高い。dsDNAの核酸塩基は塩基対形成により埋没しており、外部からアクセスしにくい。対して、グアニン四重鎖の広いGカルテット面は外部に露出しているため、核酸塩基あるいはヒストンH1が有する芳香族アミノ酸が π - π スタッキング等を介して疎水的に相互作用することを可能にする。

以上をまとめると、グアニン四重鎖構造は、(1)電荷密度が高く、(2)疎水的な広いG-カルテット面を溶媒に露出している、という二つの特徴を持つ。こうした特徴的な立体構造により、グアニン四重鎖構造のDNAは、ヒストンH1に対して静電的および疎水的により強く相互作用することができ、その結果、液滴の形成が促進されたと推測される。現在、我々はその詳細な分子機構を明らかにするために、DNAとヒストンH1の相互作用部位の特定を試みている。

6. おわりに

複合コアセルベーションによるLLPSは、一見すると、分子間の静電的相互作用の観点から単純にその現象を理解できそうに思われる。しかし、細胞内LLPSの主役であるタンパク質や核酸は、20種類のアミノ酸と5種類の核酸塩基で構成される複雑なポリマーであり、なおかつ多様な立体構造を形成する。こうしたさまざまな要素が絡み合うため、核酸とタンパク質のLLPSの分子機構は想像以上に複雑になる。我々が見いだした、‘LLPSを促進する’というグアニン四重鎖構造の役割はその一つのよい例であろう。グアニン四重鎖DNAがヒストンH1とDNAのLLPSを促進し、その構造を維持したまま液滴の内部に濃縮されるという結果は、細胞内でグアニン四重鎖形成性のDNAがLLPSを介して集合することで、DNAへの転写因子のアクセスを阻害している可能性を示唆している。こうした*in vitro*のモデル系を用いたアプローチを基に、生体分子のこういった特徴がLLPSに影響を与えるのかを一つ一つ整理していくことで、細胞内でのLLPS現象の理解を深めるための多くのヒントが得られるだろう。今後、分子生物学的な観点からも検証を進め、生命現象をLLPSの観点から解明していきたい。

文 献

- 1) Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N.L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., & Van Den Bosch, L. (2018) Protein phase separation: A new phase in cell biology. *Trends Cell Biol.*, **28**, 420–435.
- 2) Kamimura, Y.R. & Kanai, M. (2021) Chemical insights into liquid-liquid phase separation in molecular biology. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **94**, 1045–1058.
- 3) Lafontaine, D.L.J., Riback, J.A., Bascetin, R., & Brangwynne, C.P. (2021) The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **22**, 165–182.
- 4) Yewdall, N.A., André, A.A.M., Lu, T., & Spruijt, E. (2021) Coacervates as models of membraneless organelles. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **52**, 101416.
- 5) Ditlev, J.A., Case, L.B., & Rosen, M.K. (2018) Who's in and who's out-compositional control of biomolecular condensates. *J. Mol. Biol.*, **430**, 4666–4684.
- 6) Abbas, M., Lipiński, W.P., Wang, J., & Spruijt, E. (2021) Peptide-based coacervates as biomimetic protocells. *Chem. Soc. Rev.*, **50**, 3690–3705.
- 7) Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X., & Karpen, G.H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, **547**, 241–245.
- 8) Sabari, B.R., Dall'Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., et al. (2018) Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science*, **361**, eaar3958.
- 9) Jack, A., Kim, Y., Strom, A.R., Lee, D.S.W., Williams, B., Schaub, J.M., Kellogg, E.H., Finkelstein, I.J., Ferro, L.S., Yildiz, A., et al. (2022) Compartmentalization of telomeres through DNA-scaffolded phase separation. *Dev. Cell*, **57**, 277–290.e9.
- 10) Turner, A.L., Watson, M., Wilkins, O.G., Cato, L., Travers, A., Thomas, J.O., & Stott, K. (2018) Highly disordered histone H1-DNA model complexes and their condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 11964–11969.
- 11) Gibson, B.A., Doolittle, L.K., Schneider, M.W.G., Jensen, L.E., Gamarra, N., Henry, L., Gerlich, D.W., Redding, S., & Rosen, M.K. (2019) Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation. *Cell*, **179**, 470–484.e21.
- 12) Wagh, K., Garcia, D.A., & Upadhyaya, A. (2021) Phase separation in transcription factor dynamics and chromatin organization. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **71**, 148–155.
- 13) Hänsel-Hertsch, R., Di Antonio, M., & Balasubramanian, S. (2017) DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 279–284.
- 14) Zhang, S., Sun, H., Chen, H., Li, Q., Guan, A., Wang, L., Shi, Y., Xu, S., Liu, M., & Tang, Y. (2018) Direct visualization of nucleolar G-quadruplexes in live cells by using a fluorescent light-up probe. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 1101–1106.
- 15) Mimura, M., Tomita, S., Shinkai, Y., Hosokai, T., Kumeta, H., Saio, T., Shiraki, K., & Kurita, R. (2021) Quadruplex Folding Promotes the Condensation of Linker Histones and DNAs via Liquid-Liquid Phase Separation. *J. Am. Chem. Soc.*, **143**, 9849–9857.

著者寸描

●富田 峻介（とみた しゅんすけ）



産業技術総合研究所健康医工学研究部門主任研究員。博士（工学）。

■略歴 2011年筑波大学大学院数理物質科学研究科にて博士取得。11年同研究科博士研究員，12年東京大学総合文化研究科JSPS特別研究員，14年産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門研究員を経て，20年より現職。

■研究テーマと抱負 生体高分子の液-液相分離を駆動する因子の解明と，合成分子ライブラリ×機械学習によって味覚機構を模倣したバイオセンシング技術の開発の二本柱で研究を進めています。

■ウェブサイト <https://staff.aist.go.jp/s.tomita/>

■趣味 料理，ヒトカラ。

●三村 真大（みむら まさひろ）



筑波大学大学院数理物質科学研究科博士後期課程。博士（工学）。

■略歴 2020年日本学術振興会特別研究員（DC2）。22年筑波大学数理物質科学研究科にて博士後期課程修了。

■研究テーマと抱負 生体高分子の液-液相分離を制御する因子について，特にDNAの物理化学的特性の影響を明らかにしたいです。

■趣味 柔道，筋トレ，ゴルフ。