

## 相分離液滴へのゲストタンパク質の取り込みと運動性の解析 —p53やFUSをモデルとして—

鎌形 清人

### 1. はじめに

ストレス顆粒や核小体などの膜のないオルガネラは液-液相分離 (liquid-liquid phase separation: LLPS) によって形成された液体状の会合体 (液滴) であると考えられるようになってきた。LLPSとは、分子が低い濃度で均一に溶解している液相と分子が密に集合した液相 (液滴) に分かれる現象である。タンパク質、RNA、DNAなどのLLPS関連分子が集合した液滴は、DNAの修復、転写、ストレス応答などのさまざまな生物学的な反応場として機能している。この液滴の反応場は、集団を形成することで、希薄な溶液中では達成できない高効率な反応を可能にしている。近年、LAF-1、FUS、TDP-43などのLLPS関連タンパク質が相次いで見つかり、我々も、がん抑制タンパク質p53が単独で液滴を形成することを報告した<sup>1)</sup>。LLPS関連タンパク質は、液滴を単独で形成するホスト (足場) と液滴に局在するゲスト (クライアント) に分類できる。

LLPS関連タンパク質の継続的な発見にもかかわらず、ホスト-ゲスト間の相互作用は複雑であり、タンパク質のLLPSの物理化学的な理解があまり進んでいない。ホストタンパク質として、フォールドしたタンパク質より、特定の立体構造をとらない天然変性タンパク質が多く同定されている。カチオン- $\pi$ や疎水性などの弱いが多価的な相互作用が天然変性領域間で起こり、液滴形成の駆動力となっている。対照的に、膜のないオルガネラに取り込まれるゲストタンパク質の種類はオルガネラごとに異なるが、その取り込み (局在化) のメカニズムは、ホスト-ゲスト間の特異的な相互作用や二つの先行研究<sup>2,3)</sup>を除いてほとんど明

らかにされていなかった。では、どのような因子が液滴へのゲスト分子の取り込みを決めているのであろうか？ また、ゲストタンパク質達は液滴に取り込まれた後で、液滴内でどのように動き回り、集団として機能するのであろうか？ 希薄溶液中では、タンパク質の並進拡散運動の速さは分子のサイズと溶液の粘度に依存するが、液滴中ではゲストタンパク質とその隣接するホストタンパク質との間の相互作用などにより複雑な動きをすると考えられる。

近年、我々は、サイズ、構造、オリゴマー状態の異なる18種類のゲストタンパク質 (蛍光標識) を用意し、斜光照明蛍光顕微鏡を用いて、ホストタンパク質p53の液滴に対するゲストタンパク質の取り込みとその並進運動の解析を行った<sup>4)</sup>。さらに、ホストタンパク質FUSの液滴に対しても同様の解析を行った<sup>5)</sup>。本稿では、これらの解析で明らかにした液滴集団固有の法則を紹介したい。

### 2. 液滴へのゲストタンパク質の取り込み

まず、どのような因子が液滴へのゲストタンパク質の取り込みを決めているかを明らかにするため、蛍光非修飾のp53の液滴に蛍光修飾のゲストタンパク質を取り込ませて、その取り込みの度合いを斜光照明蛍光顕微鏡で計測した<sup>4)</sup>。この実験では、ホストタンパク質を25  $\mu$ Mの濃度で、蛍光修飾したゲストタンパク質を100 nMの濃度で調製した。また、細胞内で生体分子が混雑している環境を模倣し、デキストランを添加することで、ホストタンパク質の液滴を大きくして、計測しやすくした。通常のエピ照明では、z軸方向に液滴だけでなくその外側の溶液も照明してしまうため、選択的に液滴内の蛍光強度を計測することは難しい。一方、斜光照明は、シート状のレーザー光で液滴の断面を照明することができ、より定量的な計測を可能にする (図1A)。液滴への取り込みの度合いは、斜光照明を用いて液滴の中側と外側の溶液からの蛍光強度を求め、その比としてEnrichment index (EI) を計算した (図1A)。EIは、液滴内の蛍光強度が液滴外に比べて何倍高いかを表している。折りたたまれたゲストタンパク質としてHU、Fis、Cas9などを、天然変性のゲストタンパク質としてLAF1のRGGドメイン、Nhp6A、FUS、p53、ポリアルギニンなどを用いた。ホストの相分離タンパク質として天然変性

東北大学多元物質科学研究所 (〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1)

**Molecular principles of recruitment and dynamics of guest proteins in liquid droplets of p53 and FUS**

Kiyoto Kamagata (Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, 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.2023.950330

© 2023 公益社団法人日本生化学会

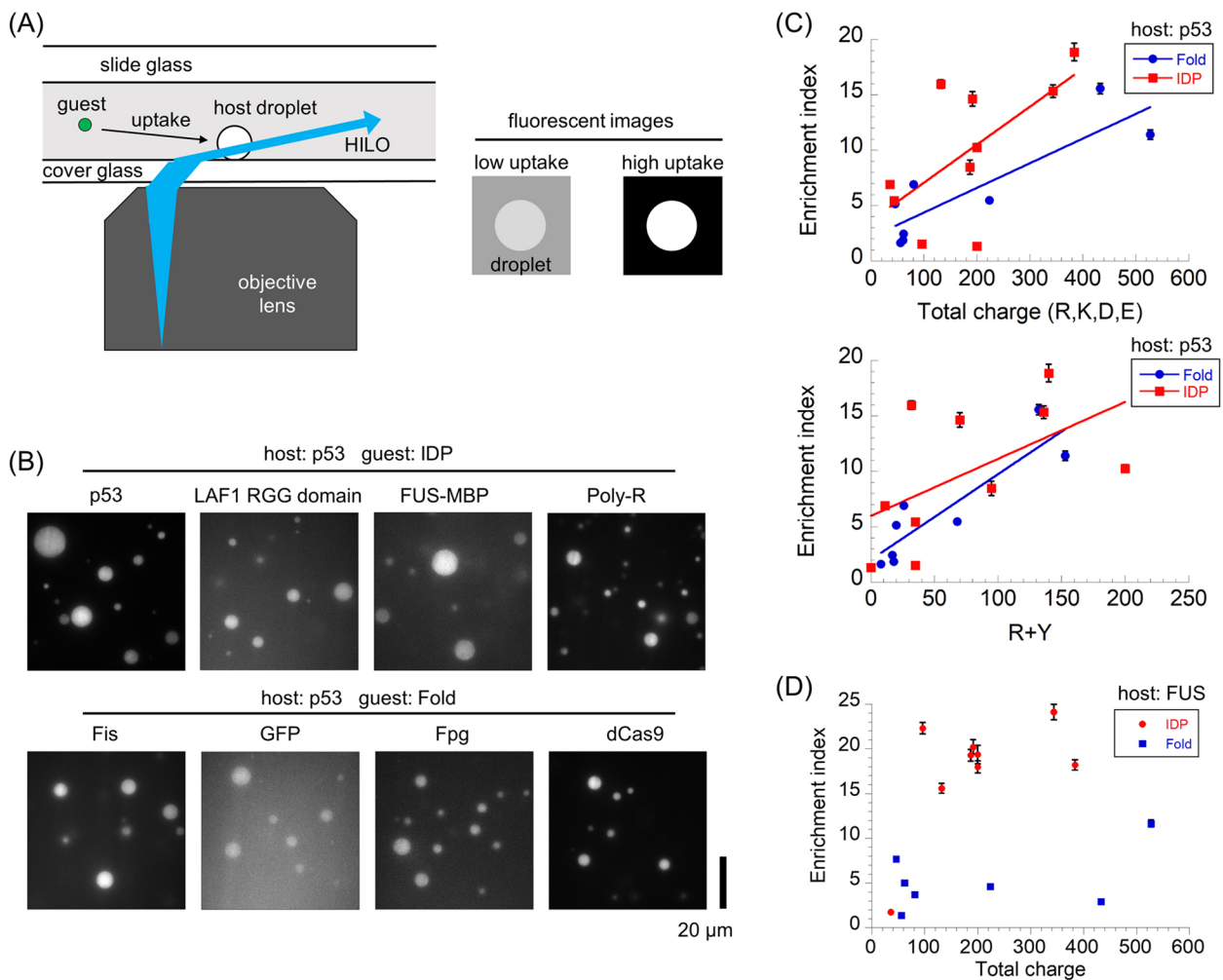


図1 蛍光顕微鏡を用いた液滴内へのゲストタンパク質の取り込み解析

(A)斜光照明蛍光顕微鏡を用いた液滴の蛍光画像解析の模式図。左：蛍光修飾していないホストタンパク質の液滴に蛍光修飾したゲストタンパク質を取り込ませ、斜光照明 (HILO, 水色) でシート状断面を照明し、そこからの蛍光を観測した。右：蛍光画像から液滴内外の蛍光強度の比を計算し、取り込み度を評価した。(B)p53の液滴への蛍光修飾したゲストタンパク質の局在の画像。(C)p53の液滴へのゲストタンパク質の取り込み度 (Enrichment index) とゲストタンパク質の物理パラメータとの関係。(D)FUSの液滴へのゲストタンパク質の取り込み度 (Enrichment index) とゲストタンパク質の物理パラメータとの関係。(B~D)の図では天然変性タンパク質 (IDP) と折りたたまれたタンパク質 (Fold) に分類した。(A)と(D)の図は文献5を、(B)と(C)の図は文献4を改変し使用した。

タンパク質の方が多く見ついているため、天然変性タンパク質の方が折りたたまれたタンパク質よりよく取り込まれると予想した。ところが、この予測に反し、p53の液滴へのゲストタンパク質の取り込み度は、ゲストタンパク質が天然変性かフォールドかによって大きく変わらないことがわかった (図1B)。対照的に、液滴へのゲストタンパク質の取り込みは、ゲストの電荷のある残基 (アルギニン、リシン、アスパラギン酸、グルタミン酸) の総数と相関することがわかった (図1C)。これは、ホスト-ゲスト間の静電的相互作用が液滴への取り込みに重要であることを表している。また、アルギニンとチロシン残基の総数とも相関していたことから、ホスト-ゲスト間でのアルギニンの

正電荷とチロシンの芳香環の $\pi$ 電子との相互作用 (カチオン- $\pi$ 相互作用) も重要であることがわかった (図1C)。これは、FUS液滴へのFUSファミリータンパク質の取り込みを調べた先行研究の結果とも類似していた<sup>2)</sup>。

続いて、ホストをp53からFUSに変えたとき、液滴へのゲストタンパク質の取り込みがどのように変化するかを調べた<sup>5)</sup>。p53の液滴は天然変性領域間での静電的相互作用で形成されている<sup>1)</sup>が、FUSの液滴は天然変性領域間でのクロス $\beta$ 構造やカチオン- $\pi$ 相互作用などで形成されている<sup>2,6-9)</sup>。興味深いことに、p53の液滴の場合とは異なり、FUSの液滴には、折りたたまれたタンパク質よりも天然変性タンパク質がよく取り込まれることがわかった (図

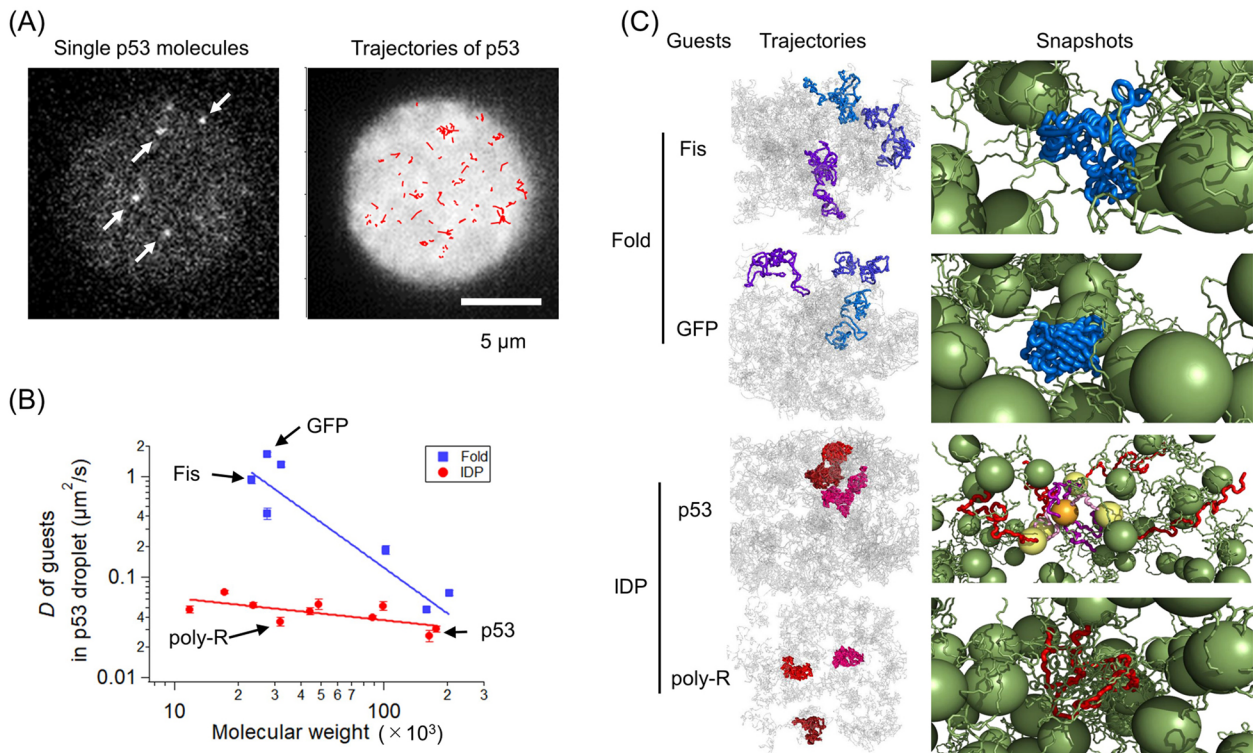


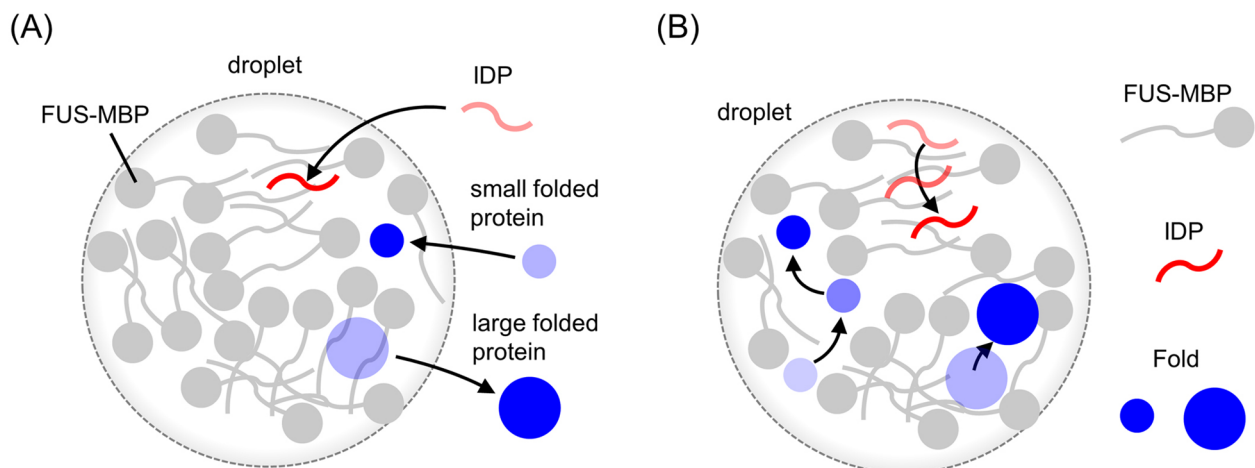
図2 p53の液滴内でのゲストタンパク質の運動解析

(A) 単分子蛍光顕微鏡によって観測されたp53の液滴内でのp53のスナップショット(左)と軌跡(右)。右の図は、赤がp53の軌跡、白色が液滴を表す。(B) p53の液滴内でのゲストタンパク質の拡散係数とゲストタンパク質の分子量との関係。天然変性タンパク質 (IDP) と折りたたまれたタンパク質 (Fold) に分類した。実線はべき乗則でベストフィットしたものである。(C) 分子動力学シミュレーションによって再現されたp53の液滴内でのゲストタンパク質の軌跡(左)とスナップショット(右)。右の図で、ホストのp53は緑色で、他のゲストタンパク質は緑以外の色で色づけた。(A)と(C)の図は文献4を、(B)の図は文献5を改変し使用した。

1D)。サイズの大きな折りたたまれたタンパク質は小さいものと比較してホストと静電相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用しやすいため、液滴によく取り込まれると予測されたが、小さいものと同程度の取り込みであることがわかった。このデータを解釈するため、液滴内の空隙の大きさに着目した。液滴内の空隙の存在は、FUSの液滴に圧力をかけると溶けることから支持されている<sup>10)</sup>。FUSはp53の四量体と比較してそのサイズが小さいため、FUSの液滴内の空隙の大きさはp53の場合と比較して小さくなり、大きな折りたたまれたタンパク質がこの空隙から排除されやすいと考えられる(図3A参照)。一方、天然変性タンパク質は、液滴内の空隙にフィットするように、その立体構造を柔軟に変えることができるため、空隙から排除されにくく、周りのホストタンパク質と強く結合すると考えられる(図3A参照)。以上より、液滴内の空隙がゲストタンパク質のサイズ依存的な取り込みを決める要因の一つであることが明らかとなった。

### 3. 液滴内でのゲストタンパク質の並進運動

液滴に取り込まれたゲストタンパク質がどのように液滴内を移動しているかを明らかにするため、p53やFUSの液滴内の単一分子の動きを追跡し、観察した<sup>4,5)</sup>。レーザー光で照明された液滴のシート状の断面で単一分子が重ならないで識別できるように、蛍光修飾したゲストタンパク質の濃度をnM以下に下げて、計測を行った(図2A)。計測したすべてのゲストタンパク質は液滴内でランダムに動きを変えながら、移動することがわかった(図2A)。平均移動距離の2乗のプロットの解析から、すべてのゲストタンパク質は液滴内で拡散運動をすることがわかった。拡散運動とは、ブラウン運動とも呼ばれ、熱エネルギーによる運動である。また、GFPやFisなどの折りたたまれたタンパク質は、poly-Rやp53などの天然変性タンパク質よりもはるかに速く拡散運動した(図2B)。一連のゲストタンパク質の結果を比較したところ、液滴内での拡散運動の速さはゲストタンパク質がフォールドしているか天然変性領域を持つかで変わることがわかった(図2B)。ゲストが天然



**図3** FUSの液滴におけるゲストタンパク質の取り込み(A)や並進運動(B)のモデル  
液滴(灰色の点線)はホストのFUS(可溶性タンパク質MBPとの融合)によって形成される。(A)では、天然変性タンパク質(赤)と小さい折りたたまれたタンパク質(青)は液滴に取り込まれる。一方、大きい折りたたまれたタンパク質(青)はホスト-ゲスト相互作用が強くなり、小さいものより取り込まれると予想されるが、液滴の空隙から排除されるため、その取り込みは抑えられている。(B)では、小さい折りたたまれたタンパク質(青)は液滴内の空隙をぬってすばやく移動できるが、大きい折りたたまれたタンパク質(青)は空隙にトラップされてゆっくりと移動している。天然変性タンパク質はその立体構造を変えて、ホストのFUSと強く相互作用し、ゆっくりと移動している。(A)と(B)の図は文献5を改変し使用した。

変性タンパク質の場合、その拡散定数は、ホストのp53やFUSと比べてわずかに速いか、または、同程度であり、分子量の増加に伴わずかに減少した。一方、折りたたまれたゲストタンパク質は、そのサイズが小さいとき、天然変性タンパク質より1桁程度すばやく拡散運動した。さらに、折りたたまれたタンパク質のサイズが大きくなると、その拡散定数は遅くなり、天然変性タンパク質と同程度となった。ホストがp53やFUSの場合でも同様の特性がみられたことから、一般的な性質を表していると考えられる。

続いて、液滴内のゲストタンパク質の運動特性がどうして折りたたまれたタンパク質と天然変性タンパク質とで異なるかを調べるため、粗視化した分子動力学シミュレーションを用いて、p53の液滴内でのゲストタンパク質の拡散運動を解析した<sup>4)</sup>(図2C)。図2Cの左パネルは、シミュレーション中に動いたゲストタンパク質の軌跡を表している。FisやGFPなどの折りたたまれたタンパク質のように広がった軌跡は、液滴内ですばやく移動したことを反映している。折りたたまれたタンパク質は、液滴の空隙内で隣接するホストタンパク質と弱く相互作用し、空隙の中をすばやく拡散運動することがわかった(図2C、右パネル)。対照的に、p53およびポリアルギニンなどの天然変性タンパク質はその構造を変えてホストのp53と強く相互作用するため、その拡散運動が遅くなった。

以上の結果を踏まえて、液滴内でのゲストタンパク質の運動モデルを構築した(図3B)。まず、小さい折りたたまれたタンパク質は、液滴の空隙を通過してすばやく移動でき

るが、大きい折りたたまれたタンパク質は空隙の中でその移動が制限されるため、遅い拡散運動をされると考えられる。この折りたたまれたゲストタンパク質の分子量依存性は分子量のべき乗則を使って解析でき、p53の液滴の場合、 $-1.50$ 乗、FUSの液滴の場合、 $-1.55$ 乗であった。タンパク質の液滴内でのべき乗の絶対値は、細胞内でのタンパク質の拡散運動の場合<sup>11,12)</sup>( $-0.70 \sim -0.75$ )より、約2倍大きいことがわかった。これは、タンパク質の液滴では、分子ふるい効果(molecular sieving effect)が強く出ていることを反映している。すなわち、大きなゲストタンパク質ほど液滴の網目(小さな空隙)に引っかかり、移動するのが遅くなるため、小さいものと大きいものの差がより大きくなると考えられる。

ゲストが天然変性タンパク質の場合、その立体構造を柔軟に変形させ、液滴内で隣接するホストタンパク質と強く結合している。そのため、ホストタンパク質の動きと同程度の速さで、または、少し早く動くと考えられる。天然変性タンパク質の分子量依存性は、p53の液滴の場合、 $-0.22$ 乗、FUSの液滴の場合、 $-0.33$ 乗であり、細胞内でのタンパク質の拡散運動よりその絶対値が小さくなった。これは、小さな天然変性タンパク質でもその立体構造を変えて比較的強くホストタンパク質と結合でき、液滴内での移動の速さが大きな天然変性タンパク質の速さに近づいたためと考えられる。

#### 4. まとめと今後の展開

本稿では、生体内で起こる液-液相分離現象に焦点を当て、液滴へのゲストタンパク質の取り込み現象、および液滴内での運動性の解析について解説してきた。まず、液滴へのゲストタンパク質の取り込みでは、ホスト-ゲスト間の静電相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用が駆動力となることがわかった。一方、FUSのような空隙の小さい液滴では、大きな折りたたまれたタンパク質が空隙から押し出され、取り込まれにくいこともわかった。ホストが短い人工相分離ペプチドの場合、液滴内の空隙が小さくなり、ゲストタンパク質のサイズ依存的な排除がより顕著になった<sup>13)</sup>。以上より、液滴を構成するホストが変われば、ホスト-ゲスト間の相互作用や液滴内の空隙の大きさが変わり、液滴へ取り込まれるゲストの種類も変わると考えられる。したがって、膜のないオルガネラは、これらの法則のバランスを変えて、選択的なゲストの取り込みを可能にしている。しかし、膜のないオルガネラは20種類以上存在し、それらに取り込まれるゲストタンパク質の種類はオルガネラごとに異なる。そのため、今回発見した法則のみを使って、膜のないオルガネラへの取り込み現象のすべてを説明することは難しい。液滴への選択的なゲストの取り込みにはまだ未解明の法則があり、近い将来それらが解明されることを期待している。

液滴内でのゲストタンパク質の運動性は、折りたたまれているか変性しているかで異なることがわかった。この性質は二つのホストで共通してみられたことから、一般的である可能性が高い。液滴内ではさまざまなゲストタンパク質が局在し、この運動の性質に従い液滴内で動き、機能している。たとえば、小さな折りたたまれたゲストタンパク質は液滴内ですばやく移動できるため、液滴内でのリガンドの輸送などの役割を担っているかもしれない。今後、液滴内でのゲストタンパク質の運動性と機能との関連性が明らかになるであろう。

最後に、我々の最終目標は、天然のタンパク質の相分離状態を計測し、その背後にある法則を学び、非天然の相分離タンパク質ツールを一から人工的に設計することである。今回得られた、液滴へのタンパク質の選択的取り込みやその運動性の法則を考慮することで、相分離タンパク質をよりスマートに設計できると考えられる。さらに、液-液相分離は効率的な反応場として機能するが、疾患に関連する固体状の凝集体形成を引き起こすリスクがあるため、相分離タンパク質は将来的な創薬のターゲットとなるであろう。創薬では、液滴内で固体状の凝集体に成長しないように、相分離状態を制御することが必要である。天然のタンパク質がFUS液滴の形成を制御できること<sup>14)</sup>が報告されているが、相分離状態を制御できる分子の設計や開

発<sup>15,16)</sup>が今後必要となるであろう。

#### 謝辞

共同研究者 [Reid C. Johnson教授 (UCLA), Bertrand Castaing教授 (フランス国立科学研究センター), Yaakov Levy教授 (ワイスマン研究所), 岩城奈那子さん (東北大学), 高橋聡研究室 (東北大学) の方々] に感謝します。

#### 文 献

- 1) Kamagata, K., Kanbayashi, S., Honda, M., Itoh, Y., Takahashi, H., Kameda, T., Nagatsugi, F., & Takahashi, S. (2020) Liquid-like droplet formation by tumor suppressor p53 induced by multivalent electrostatic interactions between two disordered domains. *Sci. Rep.*, **10**, 580.
- 2) 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.
- 3) Nott, T.J., Craggs, T.D., & Baldwin, A.J. (2016) Membraneless organelles can melt nucleic acid duplexes and act as biomolecular filters. *Nat. Chem.*, **8**, 569–575.
- 4) Kamagata, K., Iwaki, N., Hazra, M.K., Kanbayashi, S., Banerjee, T., Chiba, R., Sakamoto, S., Gaudon, V., Castaing, B., Takahashi, H., et al. (2021) Molecular principles of recruitment and dynamics of guest proteins in liquid droplets. *Sci. Rep.*, **11**, 19323.
- 5) Kamagata, K., Iwaki, N., Kanbayashi, S., Banerjee, T., Chiba, R., Gaudon, V., Castaing, B., & Sakamoto, S. (2022) Structure-dependent recruitment and diffusion of guest proteins in liquid droplets of FUS. *Sci. Rep.*, **12**, 7101.
- 6) Kato, M., Han, T.W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L.C., Mirzaei, H., Goldsmith, E.J., Longgood, J., Pei, J., et al. (2012) Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell*, **149**, 753–767.
- 7) Murakami, T., Qamar, S., Lin, J.Q., Schierle, G.S., Rees, E., Miyashita, A., Costa, A.R., Dodd, R.B., Chan, F.T., Michel, C.H., et al. (2015) ALS/FTD Mutation-induced phase transition of FUS liquid droplets and reversible hydrogels into irreversible hydrogels impairs RNP granule function. *Neuron*, **88**, 678–690.
- 8) Murray, D.T., Kato, M., Lin, Y., Thurber, K.R., Hung, I., McKnight, S.L., & Tycko, R. (2017) Structure of FUS protein fibrils and its relevance to self-assembly and phase separation of low-complexity domains. *Cell*, **171**, 615–627.e16.
- 9) Qamar, S., Wang, G., Randle, S.J., Ruggeri, F.S., Varela, J.A., Lin, J.Q., Phillips, E.C., Miyashita, A., Williams, D., Strohl, F., et al. (2018) FUS Phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation- $\pi$  interactions. *Cell*, **173**, 720–734.e15.
- 10) Li, S., Yoshizawa, T., Yamazaki, R., Fujiwara, A., Kameda, T., & Kitahara, R. (2021) Pressure and temperature phase diagram for liquid-liquid phase separation of the RNA-binding protein fused in sarcoma. *J. Phys. Chem. B*, **125**, 6821–6829.
- 11) Mika, J.T. & Poolman, B. (2011) Macromolecule diffusion and confinement in prokaryotic cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **22**, 117–126.

- 12) Stracy, M., Schweizer, J., Sherratt, D.J., Kapanidis, A.N., Uphoff, S., & Lesterlin, C. (2021) Transient non-specific DNA binding dominates the target search of bacterial DNA-binding proteins. *Mol. Cell*, **81**, 1499–1514.e6.
- 13) Kamagata, K., Hando, A., Ariefai, M., Iwaki, N., Kanbayashi, S., Koike, R., & Ikeda, K. (2023) Rational design of phase separating peptides based on phase separating protein sequence of p53. *Scientific reports*, **13**, 5648.
- 14) Yoshizawa, T., Ali, R., Jiou, J., Fung, H.Y.J., Burke, K.A., Kim, S.J., Lin, Y., Peeples, W.B., Saltzberg, D., Soniat, M., et al. (2018) Nuclear import receptor inhibits phase separation of FUS through binding to multiple sites. *Cell*, **173**, 693–705.e22.
- 15) Kamagata, K., Chiba, R., Kawahata, I., Iwaki, N., Kanbayashi, S., Maeda, K., Takahashi, H., Hirano, A., Fukunaga, K., Ikeda, K., et al. (2021) Characterization of design grammar of peptides for regulating liquid droplets and aggregates of FUS. *Sci. Rep.*, **11**, 6643.
- 16) Kamagata, K., Ariefai, M., Takahashi, H., Hando, A., Subekti, D.R.G., Ikeda, K., Hirano, A., & Kameda, T. (2022) Rational peptide design for regulating liquid-liquid phase separation on the basis of residue-residue contact energy. *Sci. Rep.*, **12**, 13718.

## 著者寸描

### ●鎌形 清人 (かまがた きよと)



東北大学多元物質科学研究所 准教授.  
理学 (博士).

■略歴 2000年上智大学工学部卒業.  
05年東京大学大学院理学研究科物理学  
専攻修了. 学術振興会特別研究員 (東京  
大学) や特任研究員 (大阪大学) や助教  
(東北大学多元物質科学研究所) を経て,  
18年より現職.

■研究テーマと抱負 DNA ガーデンと単  
分子蛍光顕微鏡を用いたDNA結合タンパク質の機能解析. 疾  
患関連天然変性タンパク質に結合するペプチドの設計法の開  
発. 最近では, タンパク質の液-液相分離の計測・制御・設計  
に力を入れている.

■ウェブサイト <http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/takahashi-s/>

■趣味 サッカー観戦と食べ歩き.