

2021.11.18 <計3枚>

報道機関 各位

立命館大学広報課

## タンパク質の異常凝集を観測する新たな測定法を開発 ～タンパク質が作る液-液相分離 (LLPS) の解明に期待～

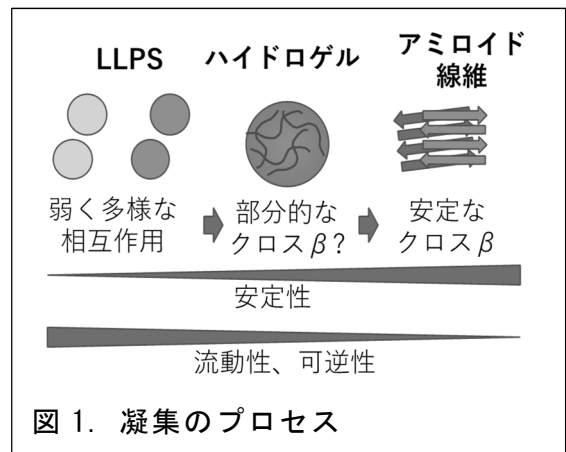
立命館大学薬学部の北原亮教授と生命科学部の吉澤拓也講師の研究グループは、タンパク質が形成する凝集状態の1つ「液-液相分離(LLPS)」の形成と消失をリアルタイムで捉える手法を開発しました。本研究成果は、2021年11月18日(日本時間)にアメリカ化学会の国際誌「Journal of the American Chemical Society」にオンライン掲載されました。

### 【本件のポイント】

- 圧力を急激に変化(圧力ジャンプ)させることで、タンパク質の LLPS の形成や消失の過程を分光法や顕微鏡により観測できる手法を開発した。
- LLPS はアミロイド線維形成の前段階として注目されているが、その形成過程は全くわかっていない。本手法が、LLPS の形成過程の研究を大いに促進する。
- 家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)の原因となる FUS タンパク質が作る2つの LLPS について、形成と消失の速度の違いを発見した。消失速度が遅い LLPS では、タンパク質間の相互作用が強いと言え、異常凝集を生じやすいことが示唆された。

### 【研究の背景】

アルツハイマー病や ALS など多くの神経変性疾患には効果的な治療薬がありません。神経変性疾患の多くは、タンパク質が液-液相分離(LLPS)状態を経てアミロイド線維など不可逆な固体凝集物へと成熟し、細胞毒性を持つことが原因と考えられています(図1)。ALS の患者では、RNA 結合タンパク質である TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)や Fused in Sarcoma (FUS)の細胞質内での異常凝集が見られ、その凝集メカニズムや疾患との因果関係について研究が進められています。一部の家族性 ALS では、細胞質内での FUS の異常凝集が発症の原因であることがわかっているため(Brain 139, 2380-2394, 2016)、異常凝集の形成メカニズムが盛んに研究されています。本研究グループは、以前に FUS の LLPS には2つのタイプ(LP-LLPS と HP-LLPS)があることを圧力紫外可視吸光度測定(UV/vis)法により発見しました。圧力下で安定する HP-LLPS は、LP-LLPS に比べ不安定だが常圧でも存在し、体積が小さく、タンパク質が密に集合した状態であることを示しました(北原ら J. Phys. Chem. B 125, 6821-6829, 2021)。



## 【研究内容】

今回の研究では、瞬時に圧力ジャンプさせることで、LLPS の形成と消失をリアルタイムで分光法や顕微鏡で観察できる手法を開発しました。タンパク質溶液中で LLPS が形成されると溶液の吸光度（濁度）が変化することを利用し、圧力ジャンプ UV/vis 法により濁度の増加や減少をリアルタイムに計測することに成功しました(図2)。FUS の LLPS について調べたところ、1 気圧から 1200 気圧のジャンプにより濁度の減少、つまり LP-LLPS の消失が生じ(0 秒～300 秒)、1200 気圧から 1 気圧へのジャンプにより濁度の増加、つまり LP-LLPS の形成が生じました(300 秒～900 秒)。図2は、加圧と減圧を 3 回繰り返した結果を示していますが、加圧と減圧を 5 回繰り返しても、濁度に高い再現性があることから、LP-LLPS の形成と消失は可逆的に生じると言えます。同様の実験を、2000 気圧と 3100 気圧でも行い、HP-LLPS の形成と消失も可逆的であることを示しました。濁度が半分回復するまでの時間 ( $t_{1/2}$ ) は LP-LLPS では 36 秒、HP-LLPS では 109 秒でした。つまり、HP-LLPS の形成速度は、LP-LLPS のそれに比べ約 2～3 倍遅いことがわかりました。さらに、濁度が半分減少する時間、つまり消失の  $t_{1/2}$  は LP-LLPS と HP-LLPS でそれぞれ 4 秒と 80 秒であり、HP-LLPS は LP-LLPS に比べ 20 倍消失速度が遅いこともわかりました。消失速度が遅いことから、HP-LLPS 内部でのタンパク質間相互作用は LP-LLPS に比べ強いと考えられます。私たちが行った以前の研究結果と今回の研究結果をまとめると、壊れにくい HP-LLPS 内で異常凝集が加速すると考えられ、細胞内での HP-LLPS の形成が異常凝集の起点となることを示唆しました。また、圧力ジャンプ顕微鏡法により、LLPS の形成や消失過程をビジュアルに観察することにも成功しました。

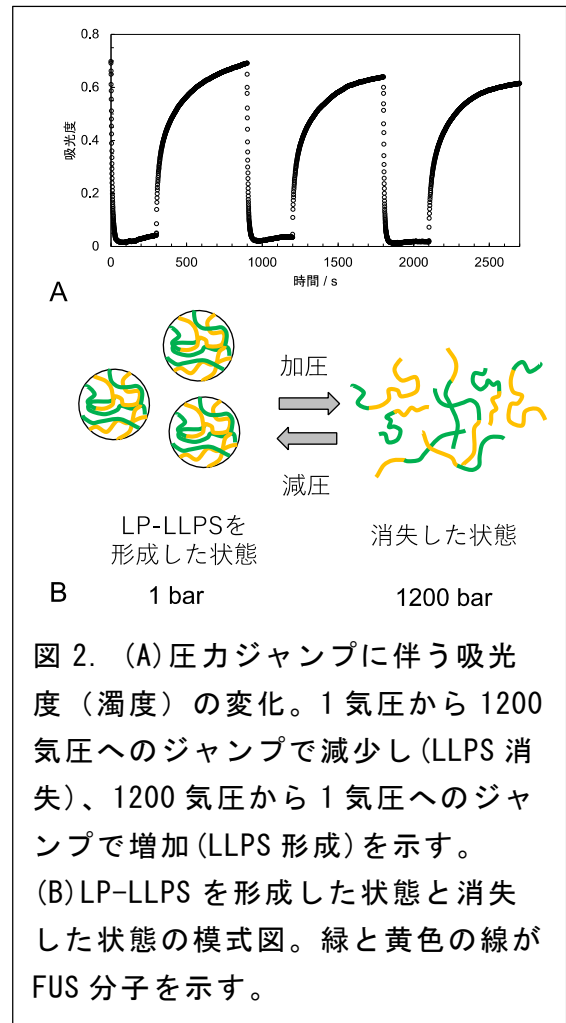


図 2. (A) 圧力ジャンプに伴う吸光度（濁度）の変化。1 気圧から 1200 気圧へのジャンプで減少し (LLPS 消失)、1200 気圧から 1 気圧へのジャンプで増加 (LLPS 形成) を示す。(B) LP-LLPS を形成した状態と消失した状態の模式図。緑と黄色の線が FUS 分子を示す。

## 【今後の展開と社会へのインパクト】

神経変性疾患についてアミロイド線維を標的とした医薬品開発が進められていますが、今後は LLPS を標的とした医薬品開発も期待されます。圧力ジャンプ実験により、LLPS の形成と消失過程の分光学的な解析や顕微鏡観察が可能になったことで、LLPS の形成過程や性質の変化が疾患型変異体でどのように異なるかなど、疾患メカニズムの理解も一層進みます。これら圧力ジャンプの手法は、他の LLPS 研究にも応用可能で今後広く普及することが期待されます。

## 【論文情報】

題目: Pressure-Jump Kinetics of Liquid-Liquid Phase Separation: Comparison of Two Different Condensed Phases of the RNA-Binding Protein, Fused in Sarcoma

著者: Ryo Kitahara<sup>a\*</sup>, Ryota Yamazaki<sup>a</sup>, Fumika Ide<sup>b</sup>, Shujie Li<sup>c</sup>, Yutaro Shiramasa<sup>a</sup>, Naoya Sasahara<sup>b</sup>, and Takuya Yoshizawa<sup>b</sup>

所属: <sup>a</sup>立命館大学薬学部、<sup>b</sup>立命館大学生命科学部、<sup>c</sup>立命館大学大学院薬学研究科

\*: 責任著者

雑誌: Journal of the American Chemical Society

巻ページ: in press (web 公開、オープンアクセスのためどなたでもダウンロードできます。後日印刷版が出版されるときに巻ページが決定します。)

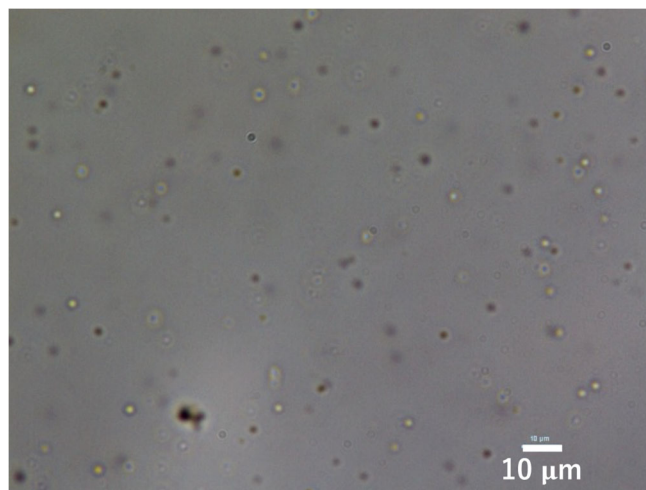
DOI: doi.org/10.1021/jacs.1c07571

URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.1c07571>

## 【用語解説】

### ■液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation: LLPS)

液体が2成分以上で形成されるとき、成分比が異なる複数の液相が形成される場合があります。タンパク質水溶液の場合、タンパク質濃度が薄い相と濃い相に分離します。今回の実験条件では、薄い相の中に濃い相が液滴を形成するため、濁度の変化や顕微鏡により観察できました。図は FUS の液滴形成の高圧顕微鏡写真で、3-5  $\mu\text{m}$  の小さな粒子が液滴です。



## 【取材・内容についてのお問い合わせ先】

(内容について) 立命館大学薬学部 北原亮

TEL.077-561-5751 E-mail: ryo@ph.ritsumei.ac.jp

(取材について) 立命館大学広報課 名和

TEL.075-813-8300 E-mail: r-koho@st.ritsumei.ac.jp