

令和3年6月9日

報道機関 各位

東北大学大学院薬学研究科

タンパク質の液-液相分離現象をその場で定量評価 ～神経変性疾患の発症機構の解明の応用に期待～

【発表のポイント】

- 神経変性疾患^(注1)の発症との関連が指摘される液-液相分離現象の定量解析法を開発した。
- 液-液相分離によって生じた液滴内のタンパク質の構造、濃度、構成成分を単一液滴の状態ですべて計測することに成功した。
- 液滴内のタンパク質濃度は周囲の環境によって変化し、液-液相分離において液滴周囲の環境が重要であることがわかった。

【概要】

筋萎縮性側索硬化症やアルツハイマー病などの神経変性疾患では、原因タンパク質の線維化が発症原因として提案されています。この線維化については、液-液相分離と呼ばれる現象によって生じたタンパク質の濃厚液滴から形成されることが提案され、液滴をターゲットとした創薬研究も進められています。

東北大学大学院薬学研究科の村上一輝氏（大学院修士課程在学中）、梶本真司准教授、中林孝和教授らは、神経変性疾患の発症との関連が指摘されているタンパク質の液-液相分離現象を評価する技術を開発しました。

本研究では、ラマン顕微鏡^(注2)と呼ばれる装置を用いてタンパク質の単一液滴を定量解析できる手法を提案しました。この方法を用いて神経変性疾患であるマチャド・ジョセフ病関連タンパク質の液滴の観測を行い、液滴内のタンパク質の構造、濃度、そして構成成分を単一液滴の状態ですべて評価できることを示しました。ラマン顕微鏡がタンパク質液滴を調べる一般的な手法になりえると考えられます。

本研究結果は、英国王立化学会誌"Chemical Science"に2021年6月7日に掲載されました。

【問い合わせ先】

東北大学大学院 薬学研究科 生物構造化学分野
中林 孝和

TEL : 020-795-6855

E-mail : takakazu.nakabayashi.e7@tohoku.ac.jp

【詳細な説明】

研究の背景

近年、液-液相分離（Liquid-liquid phase separation, LLPS）が細胞生物学の分野で盛んに研究され、生物学の教科書を変える勢いとなっています。細胞生物学における LLPS とは、ある特定のタンパク質・生体分子の高濃度状態（液滴）が細胞内で局所的に生じる現象であり、細胞内で様々な役割を果たしていると言われていています。一方で、LLPS は神経変性疾患におけるタンパク質凝集への関与も指摘されています。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ますが、タンパク質の凝集メカニズムは長年不明のままです。しかし、アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症において、LLPS によって生じたタンパク質の液滴が凝集につながるという報告が行われ（図 1）、また液滴を解消することで神経変性疾患を治療する研究も進められています。

LLPS の研究においては、LLPS を形成するタンパク質に蛍光タンパク質を付加する蛍光ラベル法が主に用いられています。この方法は高感度で液滴を検出できるものの、液滴内のタンパク質の濃度や構造を定量的に調べるのが難しい欠点がありました。蛍光ラベルを行うことでタンパク質の性質が変化し、液滴の性質も変わるという問題点もあります。LLPS の研究では、ラベルフリーかつ一つの液滴の物性をその場で調べる手法の開発が必須です。そこで本研究では、ラベルフリーで分子の構造情報を直接得るラマン分光^(注3)を用いて、液滴内の組成の同定、タンパク質の構造、および液滴内タンパク質の濃度定量をラベルフリーかつ単一液滴の状態で行えることを提案します。

研究の概要

マチャド・ジョセフ病（Machado-Joseph disease, MJD）は難病に指定されている遺伝性運動失調症であり、根治可能な治療法は未だ確立されていません。MJD はその原因タンパク質である ataxin-3 の凝集物が神経細胞内に蓄積することで発症すると言われていています。我々は、MJD の原因タンパク質である ataxin-3 が、凝集形成過程において LLPS が起きているという仮説を立て、緩衝溶液中での ataxin-3 の LLPS を検討しました。その結果、ataxin-3 が細胞内模倣環境において LLPS を起こすことを発見しました（図 2）。細胞内は多くの生体高分子で非常に込み合った環境であるため、ポリエチレングリコール（PEG）やデキストラン（DEX）などの高分子を緩衝溶液中に添加してその環境を模倣しました。緑色に光る蛍光色素を結合させた ataxin-3 を細胞内模倣環境下に置くと液滴を形成し、液滴内のみから強い蛍光を発し、液滴内に ataxin-3 が集積していることがわかります。また、液滴同士が融合することから、液滴は流動性のある液体状であることがわかりました。

続いて、ラマン分光を用いて LLPS で形成された単一の液滴を定量できるという仮説を立て、ラマン分光と顕微鏡を組み合わせたラマン顕微鏡で液滴の測定を行いました。その結果、液滴内外に存在する成分の特定、液滴内のタンパク質の二次構造、水の O-H 伸縮振動バンドを内部強度標準とした液滴内タンパク質濃度の定量に成功しました（図 3）。ラマン顕微鏡を用いて、液滴の内部には水と ataxin-3 のみが存在し、緩衝溶液中に

加えた生体高分子は液滴の外部に排除される形で液滴を生じていることがわかりました。また、水の O-H 伸縮振動バンドの強度に対するタンパク質の Amide I バンドの強度の比とタンパク質の濃度の関係を表す検量線を作成し、液滴内部のタンパク質濃度を算出したところ、溶液状態から約 140 倍にまで濃縮されていることを明らかにしました。さらに、液滴内のタンパク質濃度は外部の環境の混雑度に依存するという結果を導き、LLPS の研究においてはタンパク質濃度と細胞内環境の双方を考慮する必要があることを示しました。

研究の意義と今後の展望

神経変性疾患はその発症機序や根本的な治療法が未だ確立されていないため、疾患の予防・治療のためにも、疾患を理解するための研究が近年数多く実施されています。本研究では、神経変性疾患の一つであるマチャド・ジョセフ病の原因タンパク質の異常凝集に関与する液-液相分離現象を発見し、相分離中のタンパク質濃度を非破壊的に定量する手法を開発しました。この成果は、LLPS 中のタンパク質濃度と細胞内環境という観点から疾患発症メカニズムの解明に一石を投じるとともに、ラマン顕微鏡が LLPS 研究の新たな手法になり得ることを示しました。

本研究は、文部科学省および日本学術振興会による科学研究費助成事業および住友財団の支援を受けて行われました。

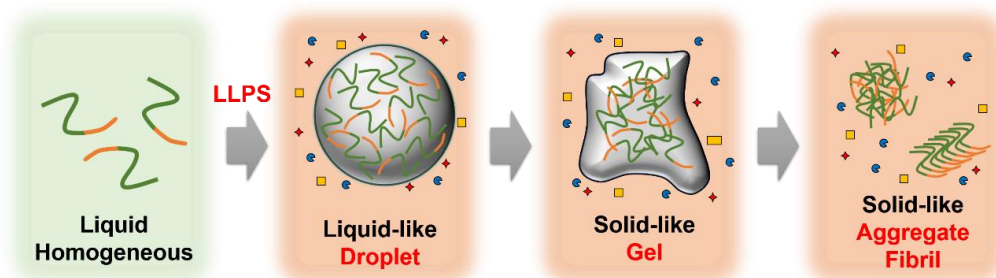


図1 LLPS による液滴形成を経由したタンパク質の凝集メカニズム

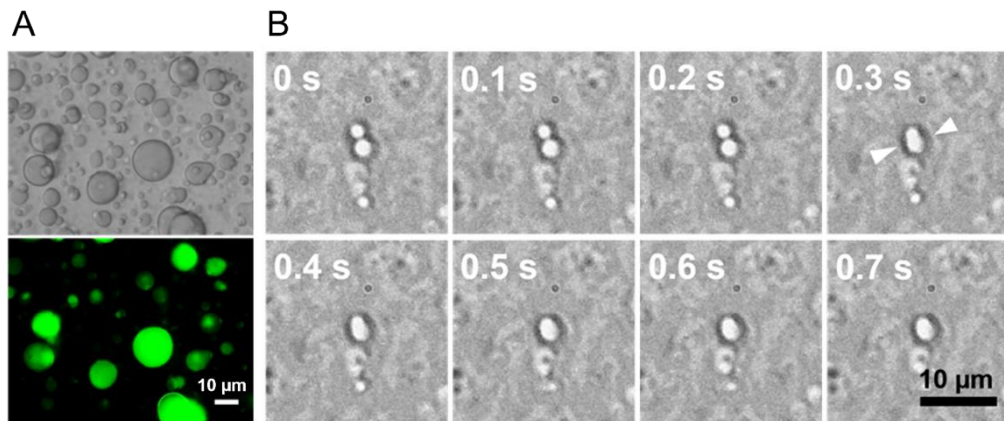


図2 細胞内を模倣した緩衝溶液中における ataxin-3 の LLPS。
 (A) ataxin-3 の LLPS の明視野画像 (左上) と蛍光画像 (左下)。蛍光測定のために ataxin-3 を蛍光色素 Alexa Fluor 488[®] で標識している。
 (B) 形成した液滴同士の融合。白矢印は液滴が融合した箇所を示す。

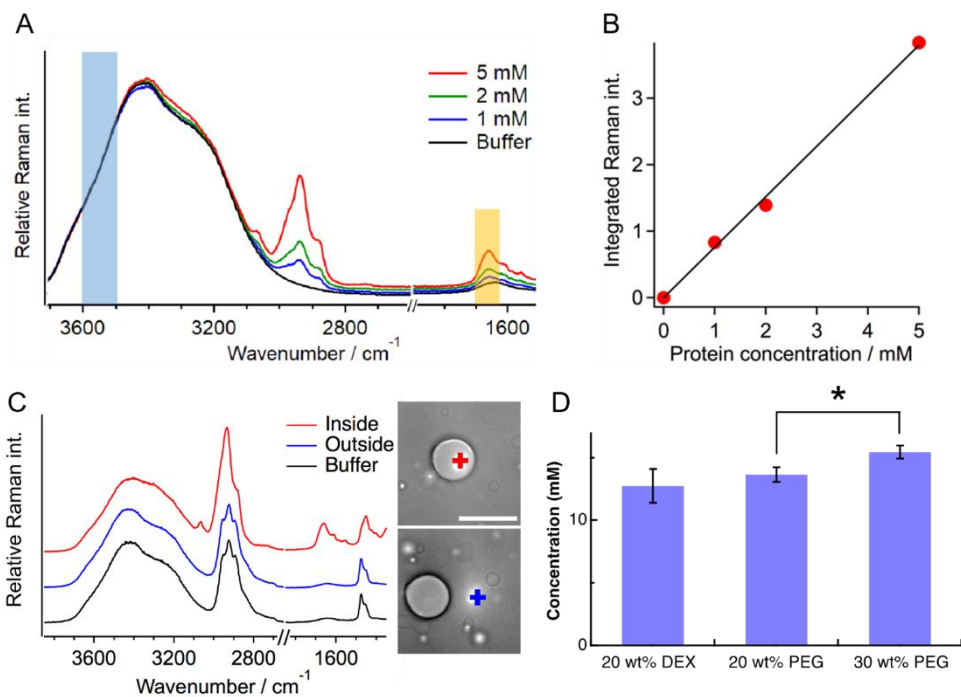


図3 ラマン顕微鏡による液滴内外の測定と液滴内タンパク質濃度の定量。
 (A) 異なる濃度の ataxin-3 のラマンスペクトル。
 (B) O-H 伸縮振動バンド強度 (3500-3600 cm^{-1} (青色)) に対する Amide I バンド強度 (1626-1720 cm^{-1} (橙色)) の比をタンパク質濃度の関数としてプロットした検量線。
 (C) Ataxin-3 液滴内外のラマンスペクトル。画像中の + 印はスペクトル測定点を示す。スケールバーは 10 μm 。
 (D) 異なる混雑環境において形成された液滴内の ataxin-3 濃度 (* $p < 0.05$)。

【用語説明】

（注1） 神経変性疾患

脳や脊髄にある特定の神経細胞群が侵されることで、徐々にさまざまな退行性の変化を呈する疾患群。アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、脊髄小脳変性症などがこの疾患群に該当する。詳細な発症機序は明らかにされておらず、原因となる遺伝子やタンパク質の異常、タンパク質の分解機能欠損、活性酸素による細胞毒性などについて、様々な研究が行われている。

（注2） ラマン顕微鏡

ラマン分光により二次元および三次元構造や試料の化学組成を分析することを可能にした顕微鏡。試料を非破壊的に解析できること、試料の前処理が不要であることがラマン顕微鏡の主な利点である。

（注3） ラマン分光

物質に光を照射したとき、光と物質の相互作用により光の反射、屈折、吸収、散乱が起こる。この散乱光の中には、分子の振動によって入射光とは異なる波長で散乱されるラマン散乱光が含まれる。このラマン散乱光から分子の構造を解析する手法がラマン分光法である。

【論文情報】

Title: Observation of liquid-liquid phase separation of ataxin-3 and quantitative evaluation of its concentration in a single droplet using Raman microscopy

Authors: Kazuki Murakami, Shinji Kajimoto, Daiki Shibata, Kunisato Kuroi, Fumihiko Fujii and Takakazu Nakabayashi

日本語タイトル「Ataxin-3 の液-液相分離の観察とラマン顕微鏡による単一液滴中の濃度の定量評価」

著者名 村上一輝、梶本真司、柴田大輝、黒井邦巧、藤井文彦、中林孝和

Journal : Chemical Science、2021 年、12 巻、7411–7418.

DOI : 10.1039/D0SC06095J