

グアニン四重鎖が織りなす液滴内ドメインの解明

菅井 祥加*

Studies on Domain Structure in Liquid Droplets with Guanine Quadruplexes

Hiroka SUGAI*

Liquid-liquid phase separation (LLPS) is a fundamental mechanism underlying the formation of membraneless organelles in cells. Although LLPS-derived condensates are generally characterized by high molecular mobility, structural ordering can emerge under specific conditions. In this study, we investigated the internal organization of condensates formed by guanine quadruplex (G4) DNA and an oligo-lysine peptide. Using birefringence imaging, confocal fluorescence microscopy, and X-ray diffraction and scattering analyses, we found that ordered domains appeared and grew from the condensate-solution interface several hours after condensate formation. Within the ordered domains, G4 DNA was selectively enriched, exhibited extremely low mobility, and assembled into a hexagonal columnar organization, whereas the peptide component retained dynamic mobility. These results demonstrate that hierarchical ordering can arise within LLPS condensates, revealing the coexistence of molecular mobility and orientational order.

1. 緒言

近年、液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) は、生体内における非膜オルガネラ形成の基本原理として広く認識されるようになってきている。LLPSにより形成される凝縮体は一般に高い流動性を示し、分子が凝集体内部で動的に拡散することで、可逆的かつ応答性の高い反応場として機能する。一方で、生体内にはアクチンフィラメントや微小管、アミロイド繊維のように高度に秩序化された構造体も存在しており、これらは空間的秩序を担う役割を果たしている。すなわち、生体機能は流動性と秩序性という一見相反する性質の巧妙な統合の上に成立している。近年の研究では、LLPSによって形成された凝集体内部においても、特定条件下で内部構造の秩序化が進行することが報告されている。代表例として、剛直なDNA二重鎖と柔軟なカチオン性ペプチドとの会合型LLPS系が、液晶的秩序を形成することが示されている^{1,2)}。我々は、二本鎖DNAよりも高い剛直性を有する分子であれば、LLPSによって形成された凝集体内部においてより顕著な秩序化が生じ得るのではないかと考え、グアニン四重鎖 (G-quadruplex, G4) に着目した。G4は、グアニン四量体の π - π スタッキングによって安定化された非標準的な核酸二次構造であり、その高い剛直性が特徴である。予備検討の結果、G4を含む会合型LLPS系では凝集体内部に配向ドメインが形成されることを見出した。しかしながら、G4が凝集体内部でどのように集合し、どのような空間配置で階層構造を形成しているのかについては明らかになっていなかった。以上の背景を踏まえ、本研究では、G4形成DNAとカチオン性ペプチドからなる会合型LLPS系を構築し、凝集体内部における配向ドメインの形成過程とその階層的配向様式を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

本研究では、G4として*c-myc*プロモーター由来22塩基配列 (5'-TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA-3') が形成する平行型G4 DNAを用いた。カチオン性ペプチドとしては10残基オリゴリジン (H-KKKKKKKKKK-OH) を使用し、これらを混合することで会合型LLPS系を構築した。まず、凝集体内における配向ドメイン形成の時間変化を追跡するため、複屈折リタデーションイメージングを実施した。次に、凝集体内部でのG4 DNAとペプチドの分子局在を評価するため、蛍光標識体を用いた共焦点蛍光顕微鏡観察を行った。さらに、光褪色後蛍光回復法 (FRAP) により、配向ドメイン相および非配向相における各分子の動態を定量解析した。加えて、配向ドメインの秩序構造を分子レベルで評価するため、広角X線回折および小角X線散乱測定を実施した。また、複屈折軸方位イメージングを併用することで、配向ドメイン内部の秩序構造の向きを推定した³⁾。

3. 結果と考察

複屈折リタデーションイメージングの結果、G4 DNAとペプチドからなる凝集体では、5–9時間の経過に伴い、液滴–溶液界面から配向ドメインが出現し、時間依存的に成長することが確認された (図1A)。これは、凝集体界面において自発的な秩序化が進行することを示している。蛍光観察の結果、配向ドメインにはG4 DNAが選択的に濃縮され、一部のペプチドとともに凸レンズ状の構造を形成していることが明らかとなった (図1B)。すなわち、配向ドメイン相と非配向相の間には、分子組成の空間的不均一が生じていることが示された。FRAP解析では、配向ドメイン内のG4 DNAはほとんど蛍光回復を示さず ($\tau > 10^3$ s)、低い流動性を示した。一方、ペプチドは配向ドメイン内においても数秒程度 ($\tau \approx 6.6$ s) で蛍光回復し、高い動的性質を維持していた (図1C)。これらの結果は、配向ドメインが完全な固体相ではなく、秩序化したG4 DNA集合体の内部に動的なペプチド成分が共存する階層構造であることを示唆する。X線構造解析の結果、配向ドメインはヘキサゴナルカラムナー構造 ($a = 3.64$ nm, $c = 0.86$ nm, 9ユニット/回転のらせん対称性) を有することが確認された (図1D)。さらに、複屈折軸方位イメージングから、G4 DNAのグアニン四量体平面が凸レンズ状ドメインの平坦部に沿って配向していることが推定された。以上より、G4 DNAとペプチドからなる会合型LLPS系では、凝集体内部でG4 DNAが階層的に集合し、ヘキサゴナルカラムナー構造を形成することで配向ドメインが出現することが明らかとなった。本構造は、低流動性のG4 DNAと高流動性のペプチドが共存する動的秩序相であり、LLPSによって形成された凝集体内部においても高度な分子配向が実現し得ることを示している³⁾。

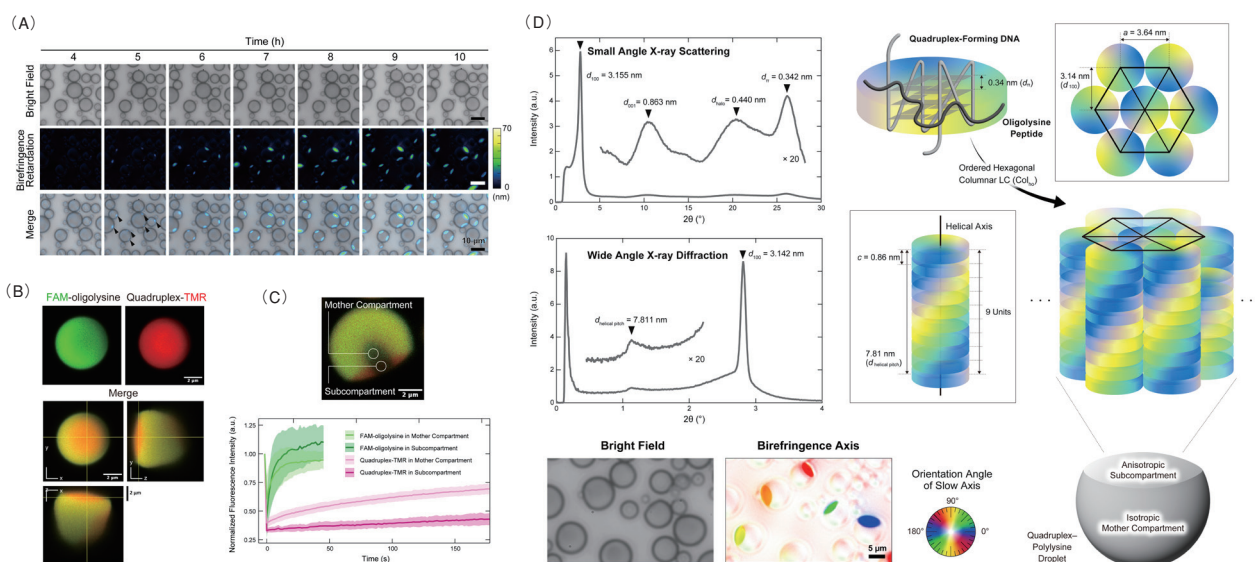


図1 配向ドメインの特徴。

(A) 複屈折リタデーションイメージング。(B) 蛍光 xyz イメージング (緑: ペプチド, 赤: G4 DNA)。(C) FRAPによる流動性測定。(D) X線構造解析と複屈折軸方位イメージングから推定される配向ドメイン内の構造。

4. 結論

本研究では、グアニンG4 DNAとカチオン性ペプチドからなる相分離凝集体を構築し、凝集体内部における秩序構造の形成過程とその階層的配列様式を明らかにした³⁾。本成果は、液–液相分離という生物学的現象の内部においても、分子配向に基づく高度に秩序化した構造が形成され得ることを示すものである。これは、凝集体内部の構造的な理解を深化させる新たな視座を提供する。さらに、凝集体内部の流動性と分子配向の両立という概念は、生体凝縮体の機能発現機構の理解に貢献するのみならず、配向性を精密に制御した人工凝縮体の設計指針としても重要な示唆を与える。

REFERENCES

- 1) T. P. Fraccia and T. Z. Jia, *ACS Nano*, **14** (2020) 15071-15082.
- 2) A. Shakya and J. T. King, *Biophys. J.*, **115** (2018) 1840-1847.
- 3) H. Sugai, S. Tomita, M. Toyoda, K. Watanuki, M. Fukuyama, T. Kajitani and K. Kinbara, *ACS Nano*, *in press*. DOI: 10.1021/acsnano.5c21437