

PERSPECTIVE

Evaluating phase separation in live cells: diagnosis, caveats, and functional consequences

David T. McSwiggen,^{1,2} Mustafa Mir,¹ Xavier Darzacq,^{1,2} and Robert Tjian^{1,3}

¹Department of Molecular and Cell Biology, University of California Berkeley, California 94720, USA; ²California Institute of Regenerative Medicine Center of Excellence, University of California Berkeley, California 94720, USA; ³Howard Hughes Medical Institute, University of California Berkeley, California 94720, USA

- 生命現象と絡めた液-液相分離(LLPS)研究が世間を賑わせているが、細胞内でLLPSが生化学プロセスに参与していることを証明するための条件が明確でなく、十分な根拠が提示されていない例が少なくない。
- このPerspectiveは、過去に報告された引用数の多い細胞内LLPS論文を批判的に検討することで、これらの論文がどのような論拠に基づいていたのかを分析するとともに、今後の細胞内LLPS研究はどのように取り組まれるべきかを議論することを目的としている。

液-液相分離 (LLPS) の特徴

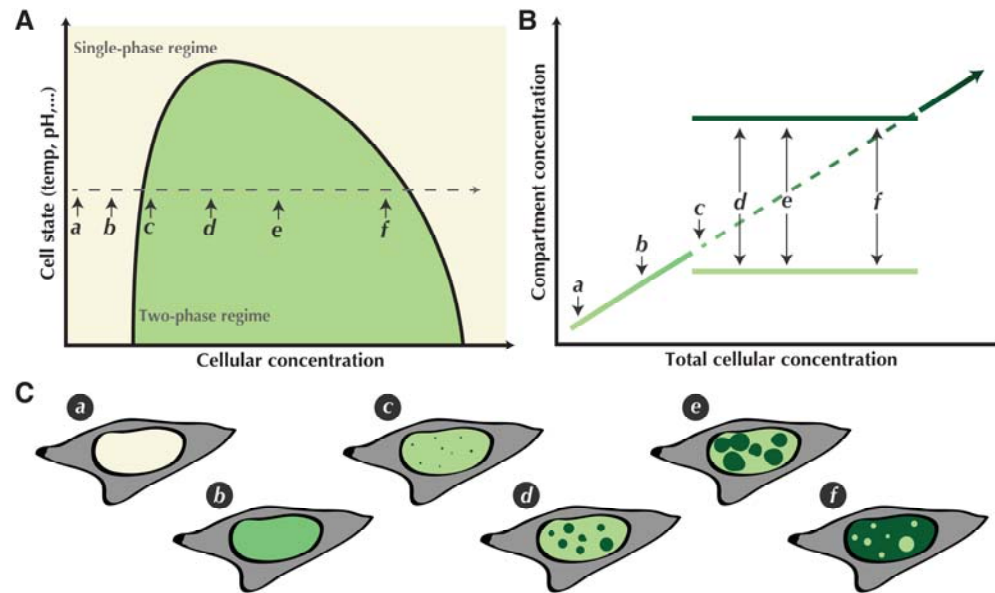


Figure 1. Liquid–liquid phase separation is a function of concentration. (A) A schematic of a phase diagram depicting under what set of environmental conditions (temperature, salt concentration, pH, etc.) the system will remain as a single phase or spontaneously form two phases. An increase in the y-axis would represent any environmental change that would weaken monomer interactions, e.g., increasing temperature. The dashed line depicts how the system responds to increasing protein concentration, further illustrated in B and C. (B) For proteins that can phase separate, at a certain critical concentration (c), droplets form. Past this critical concentration, production of more protein increases droplet size but does not change the concentrations in either phase, until eventually the concentrated phase entirely fills the space whereupon the system returns to the one-

phase regime (A). (C) An illustration of the processes depicted in A and B as it occurs in the cell—in this hypothetical example, in the nucleus.

McSwiggen *et al.*, *Genes Dev.*, **2019**, 33, 1619-1634より転載

- 分子がある濃度になったときに、高濃度相と低濃度相に分離した方が熱力学的に有利になる場合、相分離が起きる (**cの状態**)
- 臨界濃度以上では、主体となる分子の濃度が増加しても各相中の濃度は変化せず、体積が変化するだけ (**c→fの状態**)。
- 高濃度相が空間を完全に満たすと、1相の状態に戻る (**f以降の状態**)

- LLPSという現象の物理的な側面はよく理解されているが、**細胞内の込み合った複雑な環境でどの程度起きているのか**は不明である。
- LLPSを証明するには、様々なパラメータ（濃度やpHなど）を**系統的に変化させたときの影響を調べる必要がある**が、細胞中でそれを行うのは困難である。
- 代わりに、‘丸み’や‘融合’といった記述的特性が論拠とされる傾向がある。
→ 細胞内LLPSを対象とした **50例** がどのようなデータを示しているのかを詳しく調査

Table 1. Cross-study summary of evidence used for LPS

Study	Location	Compartment/ process	Protein (s)	Undergoes LLPS in vitro	Indirect in vivo evidence					Direct in vivo evidence		
					Endogenous or over- expression	Roundness	Fusion/ Ripening	Other expts	FRAP τ1/2 (seconds)	Critical Conc.	Temp/ Ion strength	Affects molecular behavior
Brangwynne et al. 2009	Cytoplasm	P Granules	PGL-1	-	OE	+	+	-	4.7	-	-	-
Brangwynne et al. 2011	Nucleus	Nucleolus	-	-	Endo	+++	+++	+	-	-	-	-
Li et al. 2012	Cytoplasm	Cytoplasm	synthetic SH3/ PRM [NCK and N-WASP]	+++	OE	+	-	-	5*	-	-	-
Nott et al. 2015	Nucleus	Nuages (granules)	DDX-4	+++	OE	+	+++	+	2.5	+++	+++	-
Molliex et al. 2015	Cytoplasm	Stress Granule	hnRNPA1	+++	OE	+	+	-	4.2	+	-	-
Altmeyer et al. 2015	Nucleus	Cell Stress	EWS TAF15 FUS	PR PR PR	OE OE OE	+	+	+	- - -	+	-	-
Berry et al. 2015	Nucleolus	Nucleolus	FIB-1	-	Endo	+	+	-	-	+++	-	-
Patel et al. 2015	Nucleus	Stress Granule	FUS	PR	OE	+++	+++	-	4*	-	-	-
Zhang et al. 2015	Cytoplasm	Whi3 droplets	Whi-3	+++	Endo	+++	+	+++	-	-	-	-
Pak et al. 2016	Nucleus		Nephrin (NICD)	+++	OE	+	+++	-	<1	+	-	-
Feric et al. 2016	Nucleus	Nucleolus	NPM1 FIR1	+++ +++	OE OE	+++ +++	+++ +++	+	64 75	-	-	-
Smith et al. 2016	Cytoplasm	P Granules	PGL-1 MEG-3	- +++	Endo Endo	+	-	+	- -	-	-	-
Su et al. 2016	Plasma Membrane	Plasma Membrane	LAT	+++	OE	-	+	-	12	-	-	-
Schmidt and Rohatgi 2016	Nucleus	Splicing	TDP43	PR	OE	+++	+	-	15	+	-	-
Freeman Rosenzweig et al. 2017	Pyrenoid	Carbon fixation	Rubisco/EPYC1	-	Both	+	+	+	22-42*	-	-	+++
Riback et al. 2017	Cytoplasm	Cell Stress	Pab1	+++	Endo	+	-	-	-	-	-	-
Larson et al. 2017	Nucleus	Heterochromatin	HP1α	+++	OE	+	-	+	-	-	-	-
Strom et al. 2017	Nucleus	Heterochromatin	HP1α	+++	Endo	+++	+++	+	2-5*	+	-	+++

Continued

定性的なデータ (記述的) : +
 定量的なデータ : + + +
 いずれも満たさない : -

間接的な証拠 (*in vivo*)

直接的な証拠 (*in vivo*)
 (熱力学的な視点)

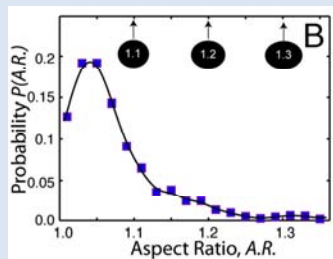
Table 1. Cross-study summary of evidence used for LPS

Study	Location	Compartment/ process	Protein (s)	Indirect in vivo evidence					Direct in vivo evidence			
				Undergoes LLPS in vitro	Endogenous or over- expression	Roundness	Fusion/ Ripening	Other expts	FRAP $\tau_{1/2}$ (seconds)	Critical Conc.	Temp/ Ion strength	Affects molecular behavior
Brangwynne et al. 2009	Cytoplasm	P Granules	PGL-1	-	OE	+	+	-	4.7	-	-	-
Brangwynne et al. 2011	Nucleus	Nucleolus	-	-	Endo	+++	+++	+	-	-	-	-
Li et al. 2012	Cytoplasm	Cytoplasm	synthetic SH3/ PRM (NCK and N-WASP)	+++	OE	+	-	-	5*	-	-	-
Nott et al. 2015	Nucleus	Nuages (granules)	DDX-4	+++	OE	+	+++	+	2.5	+++	+++	-
Molliex et al. 2015	Cytoplasm	Stress Granule	hnRNPA1	+++	OE	+	+	-	4.2	+	-	-
Altmeyer et al. 2015	Nucleus	Cell Stress	EWS TAF15	PR PR	OE OE	+	+	+	-	+	-	-

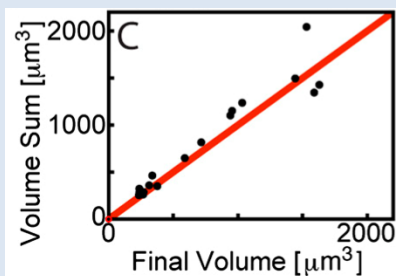
標的タンパク質のLLPSを
試験管中で調べているか
*PR = 引用のみ

内在性 (Endo)* or 過剰発現(OE)
*例えば、ゲノム編集によって
内在性遺伝子座にタグ化したもの

‘丸み’を定量したか
ex. Brangwynne et al., *PNAS*, 2011,
108, 4334より転載

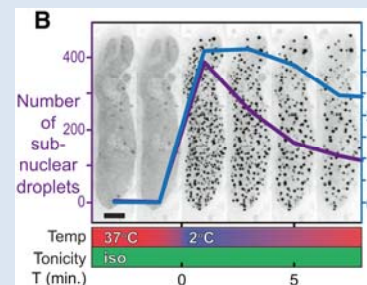


‘融合 or 分裂’を確認したか
+ 前後で分子数が変化
しないことを確認したか
ex. Brangwynne et al., *PNAS*, 2011,
108, 4334より転載

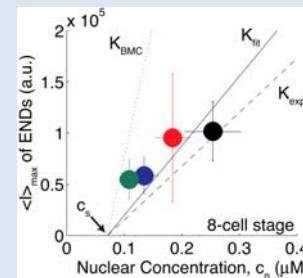


他の実証のための実験を行ったか
(1,6-hex溶解, 他成分の共局在,
分割したドメインの利用など)

温度等に依存して
生じることを確認したか
ex. Nott et al., *Mol. Cell*, 2015, 57,
936より転載



臨界濃度を決定したか
ex. Berry et al., *PNAS*, 2015, 112,
E5237より転載



(または *Cell*, 2018, 175, 1467など)

McSwiggen et al.,
Genes Dev., 2019, 33,
1619-1634より転載

調査結果の分析

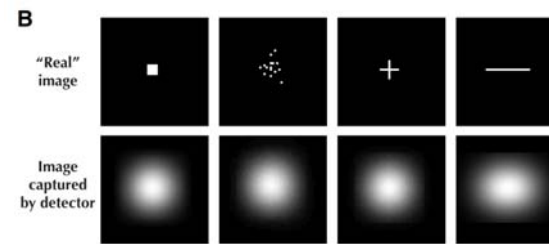
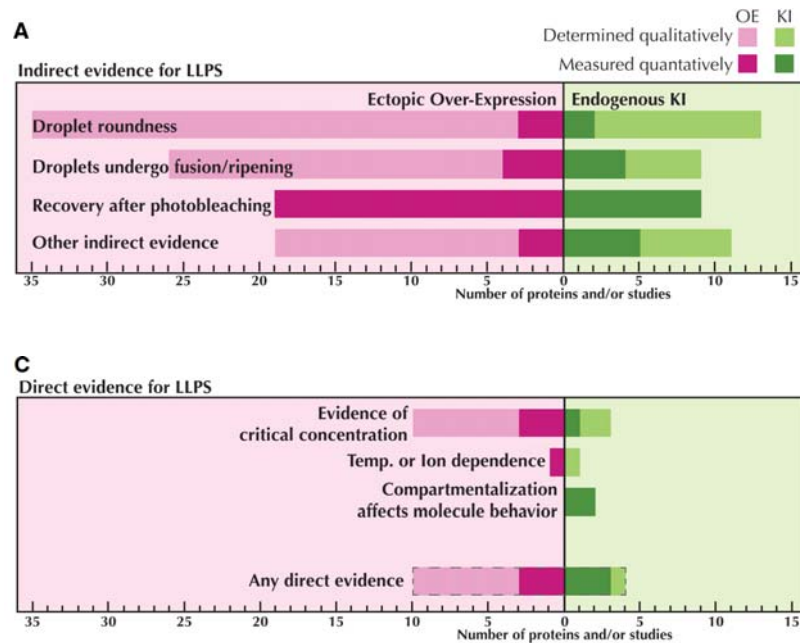


Figure 2. Evidence for LLPS in cells is largely phenomenological. (A) A bar graph quantifying the use of descriptive or phenomenological criteria in the studies from Table 1, separated into experiments that are performed on the endogenous protein (knock-in, KI) compared with those in over-expression systems (OE). The x-axis is the number of proteins from the 33 studies that were claimed to display that evidence. (B) A simulated example of how diffraction-limited fluorescence imaging can obscure fine features. The *top* row depicts various simulated structures, and the *bottom* row is the image acquired by the microscope detector. (C) A bar graph quantifying the use of assays which give direct evidence for LLPS in vivo. “Any direct evidence” is any example which demonstrated at least one of the categories of direct evidence. See Table 1.

McSwiggen *et al.*,
Genes Dev., **2019**, 33,
 1619-1634より転載

50例を分析したところ、ほとんどの論文が間接的な現象論的証拠に基づいていた

- 過剰発現系が多く、定量的な解析もごくわずか（丸いこと or 融合を示す写真のみが多い）(A)
 （高分子はそもそも高濃度にしてPEGを加えたりすると、ほとんどが相分離してしまうことに注意が必要）
- 回折限界に近い輝点は必ずしも液滴とは限らない (B)
 （画像処理プロセスの標準化や画像の処理内容を提示するルール作りを進める必要あり）
- 間接的なデータだけだと証明しきれないが、直接的な証拠を示している例は非常に限定 (C)
 → 本当にLLPSが関係しているかを各自判断する必要がある

本当にFRAP(光褪色後蛍光回復法)は‘gold standard’アッセイなのか？

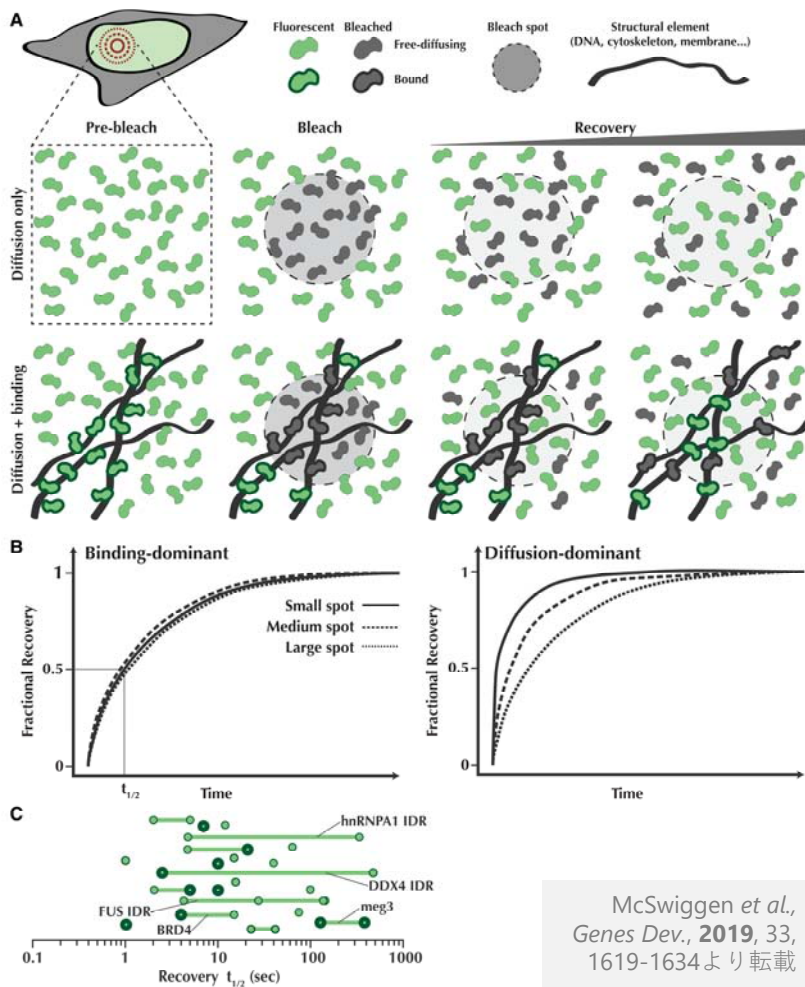


Figure 3. Fluorescence recovery is misleading as an assay for LLPS. (A) A schematic of a Fluorescence Recovery After Photobleaching experiment. Fluorescent molecules in the cell are bleached with a strong laser in one spot and the signal is allowed to recover over time. In simple diffusion, as is expected in a liquid like a phase-separated domain, mixing of bleached and unbleached molecules is only governed by diffusion. In the case where some molecules may bind to an immobile element, diffusing molecules will mix first before the bound molecules can unbind and exchange. (B) Binding and diffusion have different impacts on the rate of recovery and extent of signal recovery. There are many methods to analyze FRAP data, the simplest being measuring the half-life of recovery ($t_{1/2}$). If the molecule under study has a high rate of diffusion compared to its binding rate, modulating the size of the bleach spot (dashed circles in A) will not affect the recovery (dashed lines). If diffusion is the limiting factor, as predicted by LLPS, then the size of the bleach spot should affect the $t_{1/2}$ of the curve. (C) Reported $t_{1/2}$ times from the studies in Table 1. Cases where the same protein or protein domain have been measured more than once are indicated by connected lines. A few such examples have been labeled for reference. Bolded circles represent measurements on endogenous proteins while the other measurements are in overexpression conditions.

- 蛍光回復は、溶液中で自由に拡散している分子に特有の現象ではない
- 足場に結合している分子でも起こり得る(A)
- 拡散係数、分子濃度、結合・解離速度などに依存する
- 回復速度が、“結合律速”ではなく“拡散律速”であることを対照実験で示す必要あり(B)
- 同じタンパク質でも報告されている回復速度に幅がありすぎないか...?(C)
(線維化やゲル化による成熟が反映されている可能性はある)

全体の結論

ほかのモデルで説明できる可能性が残されているので、今までもそうだったようにもっと冷静にフェアにデータを見るようにしよう

今後、以下の技術の利用に期待したいらしい

- 内在性遺伝子座へのタグ化
- 消光面積を変化させたFRAP
- 光遺伝学ツール‘Corelets’
- FCSを利用した分子の絶対定量
- 一分子トラッキング
- デグロンタグによる分解アッセイ