科学通报 2019 年 第 64 卷 第 22 期: 2285 ~ 2291
Science 2018年度十大科学突破解读 进 展
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

液-液相分离与生物分子凝集体

吴荣波*, 李丕龙*

清华大学生命科学学院, 北京结构生物学高精尖创新中心, 北京 100084

* 联系人, E-mail: wrb15@mails.tsinghua.edu.cn; plli_lab@biomed.tsinghua.edu.cn

2019-04-01 收稿, 2019-05-22 修回, 2019-05-23 接受, 2019-06-27 网络版发表
国家自然科学基金(31871443)资助

摘要 真核细胞中有大量的含有高浓度生物大分子的无膜区室, 比如P颗粒、压力颗粒、p62颗粒等, 涉及生殖细胞命运特化、应激反应、选择性自噬等各种细胞过程. 它们被统一称作“生物分子凝集体”, 使生化反应相对独立, 高度有序和高效地进行. 近些年的研究表明, 大多数生物分子凝集体为多价相互作用驱使的“液-液相分离”. 围绕体外重构的相分离, 以及它们与体内生物分子凝集体的联系, 我们对生物大分子相分离的形成与调控、组成与功能的理解愈加深入, 相分离与生物分子凝集体也成为生物学及相关交叉领域的研究热点.

关键词 无膜区室, 液-液相分离, 生物分子凝集体, 多价相互作用, 固有无序区域

长期以来, 科学家们观察到细胞内的生物大分子并非均一分布在水溶液环境中, 而是形成位置和功能各异的胞内区室. 它们构成了细胞的中尺度结构, 使生化反应相对独立、高度有序和高效地进行. 细胞区室大体可分为有膜细胞器和无膜区室. 有膜细胞器利用磷脂双分子层将胞内物质封装在一个局部空间. 疏水的脂质和亲水的蛋白孔道使它们具有半通透、半开放的特性. 无膜区室包括P颗粒(P granules)、压力颗粒(stress granules)、加工小体(processing bodies)等无膜细胞器[1,2], 还包括在一些生化路径和细胞通路中发现的无膜颗粒, 比如膜上受体聚集、突触后致密物、DNA损伤修复位点的信号颗粒、参与选择性自噬的p62颗粒等[3~6]. 根据近些年的研究, 这些无膜区室都通过多价相互作用驱使的“液-液相分离”(liquid-liquid phase separation, 常简称为相分离或称为相变)进行组装, 并被统一命名为“生物分子凝集体”(biomolecular condensates)[7,8]. 关于生物分子凝集体的组装与溶解、组成、物理性质、生化和细胞功能等方面的研究已成为生物学及与相关交叉领域的热点. 本文将综述相关重要进展, 并进行讨论.

1 生物分子凝集体为多价相互作用驱使的相分离现象

1.1 生物分子凝集体为液-液相分离现象

细胞无膜区室非常普遍, 也早为研究者们熟知. 但长期以来, 我们对它们的形成机制和物理性质知之甚少. 2009年, Brangwynne等人[1]在这方面进行了深入探索. 他们发现, 秀丽隐杆线虫中的P颗粒呈现液滴样特点: (1) 游离状态下为球形, 黏附在细胞核表面时为非球形, 与液体在固体表面的润湿现象类似; (2) 在剪切应力下变形、流动; (3) 不同颗粒可融合形成更大的颗粒; (4) 荧光漂白恢复实验表明其具有很好的内部流动性, 并与外部溶液中的分子有快速交换; (5) P颗粒的黏性和表面张力数值表明, 其物理性质与高分子液滴类似. 这些特点表明, P颗粒的形成机制可用高分子物理中的液体相变理论解释. 作者提出的模型认为, P颗粒的形成同局部空间中关键组分的总浓度与在溶液中的

引用格式: 吴荣波, 李丕龙. 液-液相分离与生物分子凝集体. 科学通报, 2019, 64: 2285–2291
Wu R B, Li P L. Liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 2285–2291, doi: 10.1360/N972019-00281

© 2019《中国科学》杂志社

饱和浓度(保持分散状态的临界浓度)间的相对大小有关, 当总浓度高于饱和浓度时, 颗粒形成; 反之, 颗粒溶解. 与此相关的一个现象是, 与P颗粒组分降解有关的MEX-5蛋白在时空上的浓度分布与P颗粒的形成高度负相关, 对P颗粒的形成与溶解有重要影响. 作者推测MEX-5蛋白可能通过影响关键组分在溶液中的饱和浓度的大小, 来调节P颗粒形成.

根据其他生物分子凝集体与P颗粒具有相似外观, 与周围溶液有明显边界, 具有较强流动性以及可浓缩物质等特点, 可推测它们都是一种液-液相分离现象.

1.2 多价相互作用驱使液-液相分离形成

在2006年, Frey等人[9]发现核孔蛋白Nsp1中富含FG重复序列的区域可在体外一定条件下形成固态状水凝胶. 2012年, Kato等人[10]报道了FUS等RNA结合蛋白可通过其低复杂度结构域(low complexity domain, LCD), 即含有高含量的少数几种氨基酸的区域[11], 形成类似于Nsp1的水凝胶. 他们发现, 这些水凝胶含有淀粉样蛋白纤维, 这与体内某些蛋白沉积类似, 但性质显然与体内的功能性生物分子凝集体相差甚远.

也是在2012年, Li等人[8]报道在体外成功重构出与胞内生物分子凝集体类似的生物大分子液滴, 并揭示多价相互作用驱使了该液-液相分离现象发生. Li等人[8]表达纯化了SH3结构域重复蛋白——$SH3_m$, 以及PRM序列重复蛋白——PRM_n, 其可通过多位点的SH3-PRM相互作用来形成多价相互作用网络. $SH3_m$与PRM_n混合后, 可产生明显的相分离现象, 形成动态性很强的、蛋白组分高度浓缩的液滴. 相分离的临界浓度依赖于$SH3_m$与PRM_n的价态, 也即m和n的数目. 只有形成多价相互作用才能发生相分离, 且价态越高, 临界浓度越低, 表明多价相互作用驱使了相分离发生. 研究人员进而重构了体内相分离现象: 与肾小球滤过屏障建立相关的蛋白Nephrin, NCK和N-WASP三者可通过多价相互作用在体外发生相分离. 形成的液滴可募集Arp2/3复合体, 进而富集肌动蛋白, 驱使肌动蛋白组装与微丝分支.

Li等人[8]的工作表明, 生物大分子可通过多价相互作用形成液-液相分离, 且体外重构的相分离体系可模拟体内生物分子凝集体的组成与功能. 此后, 多种生物分子凝集体的关键组分被发现能够通过多价相互作用, 在体外一定条件下发生相分离[3,4,12~16], 比如自噬受体p62与多聚泛素化链在体外混合后产生相分离(图1(a))[16]. 基于体外相分离体系, 研究其的组装、组成和功能等方面的分子机制与调控, 以及探究其与体内生物分子凝集体的联系, 是相分离与生物分子凝集体领域的重要研究思路.

1.3 生物大分子如何建立多价相互作用

胞内生物大分子的多价相互作用是非常普遍的, 形成方式也多种多样(图1(b)). 首先, 同一蛋白上线性排

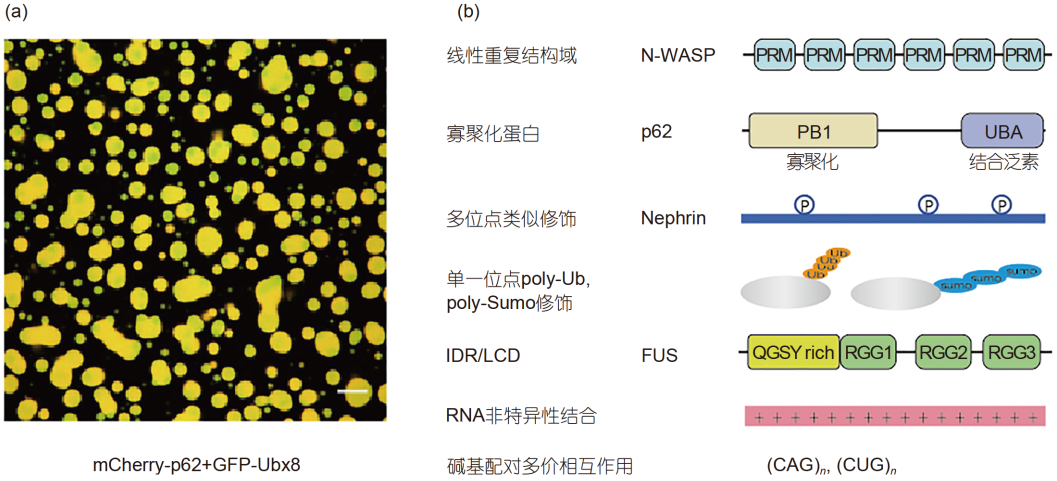


图 1 (网络版彩色)生物大分子多价相互作用驱使液-液相分离形成. (a) 选择性自噬受体p62与多聚线性化泛素形成的液-液相分离[16], 比例尺为10 μm. (b) 生物大分子建立多价的常见方式, 及代表性分子的示意图[8,17,18].

Figure 1 (Color online) Liquid-liquid phase separation is driven by multivalent interactions among macromolecules. (a) Liquid-liquid phase separation formed by mixing mCherry-p62 with GFP-Ubx8[16], scale bar, 10 μm. (b) Various ways to achieve macromolecular multivalence. Representative molecules are shown here[8,17,18]

列的功能类似的多个模块化结构域或基序，是一种形成多价的方式，比如N-WASP蛋白中的PRM基序重复[8]. 与此类似，蛋白在多个位点的修饰，比如磷酸化修饰、乙酰化修饰、甲基化修饰、泛素化修饰、SUMO化修饰等，可以产生多个相似的结合位点，而多聚泛素化、多聚SUMO化修饰，本身也可视作线性的多价态. 而且，蛋白可通过某些结构域形成寡聚，为同一蛋白上的其他区域提供多价，比如自噬受体p62的PB1区域可寡聚化(图1(b))[17]. 另外，核酸与蛋白的结合有时是非特异性的，比如通过带负电的核酸与蛋白带正电区域相互作用，可形成多价相互作用. 核酸的多位点修饰，比如m^6A甲基化，也可以产生多价.

还有一种非常广泛的多价相互作用来自于蛋白的固有无序区域(intrinsically disordered regions, IDRs)，有时也称为低复杂度结构域(图1(b))．该区域不仅能介导分子间的相互作用，而且经常通过介导自身相互作用来单独发生相分离[19]．含有IDRs区域的很多蛋白可发生相分离，且它们在体内定位于特定的生物分子聚集体中，比如P颗粒的组分PGL-1，PGL-3和LAF-1[14,20,21]；核孔蛋白Nsp1，Nup98[9,22]；RNA结合蛋白FUS，hnRNPA1，hnRNPA2，TDP43，Pub1，Lsm4，eIF4GII，Tia1[10,13,18,23]. LCD区域中富含的芳香族氨基酸，带电氨基酸如精氨酸等，可形成多价态π-π相互作用、阳离子-π相互作用、正负电荷模块相互作用、疏水相互作用等，使得LCD易于发生分子内和分子间的多价相互作用，由此产生相分离[7,24].

RNA也能自身发生多价相互作用，驱使相分离形成．核苷酸重复扩展是一种导致神经和肌肉系统退行性疾病的常见遗传因素，比如肌强直性营养不良中发现的*DMPK*基因的CTG重复，脊髓小脑性共济失调和亨廷顿病中发现的*HTT*，*ATXN1*等基因的CAG重复，肌萎缩侧索硬化和额颞痴呆中发现的*C9orf72*基因的GGGGCC重复[25]．Jain和Vale[26]发现，CUG，CAU和GGGGCC重复可通过碱基配对的多价相互作用在体内及体外产生相分离，不过该现象与它们的细胞毒性的关系还有待阐明.

多种生物大分子建立的各式各样的分子内与分子间的多价相互作用，使得相分离现象在体内十分普遍，且它们的具体分子组成和结构基础也非常复杂多变.

2 相分离的调控

生物分子凝集体的组装与溶解，以及组成的调控有多种不同的机制.

首先，生物大分子之所以发生相分离，是由于它们在溶液中的总浓度大于保持分散状态的临界浓度．因此，直接调节生物大分子的总浓度或临界浓度，可调控相分离的形成．转录、翻译以及降解是细胞内常用的调节生物大分子浓度的手段．高分子量的葡聚糖、PEG等拥挤剂和温度可作为促水溶物(hydrotrope)的ATP，能通过不同的机制来影响生物大分子在溶液环境中的溶解度或临界浓度[27~29].

其次，生物大分子的相分离是通过分子内或/与分子间的多价相互作用形成的，那么，调节生物大分子相互作用的方式可用于调节相分离形成．蛋白质翻译后修饰和去修饰，可直接建立或消除结合位点，或通过改变局部结构和构象来影响相互作用[7,30,31]．另外，有些修饰，比如磷酸化修饰、精氨酸上的甲基化修饰，可影响所修饰的氨基酸残基的带电特性，而溶液中盐离子浓度和pH的变化，可影响生物大分子的整体带电特性，都能以类似机制影响阳离子-π、正负电荷相互作用，调控相分离形成[30,32].

通过引入新的分子间相互作用，可调节原来体系的相分离．比如P颗粒的组分PGL-3的相分离可被mRNA所促进，而MEX-5可与PGL-3竞争性地结合mRNA，抑制mRNA的促进作用，这解释了胞内MEX-5的浓度分布与P颗粒形成的负相关关系[14]．另外一个特殊的例子为kapβ2，其可通过结合PY-NLS区域，抑制FUS相分离或凝胶化，以及抑制RNA结合蛋白FUS，TAF15，EWSR1，hnRNPA1，hnRNPA2和TDP43的纤维化[30,33~35]．另外，以FUS为代表的含有IDRs区域的RNA结合蛋白的某些突变使它们易于形成具有细胞毒性的蛋白沉积，导致神经-肌肉系统退行性疾病发生[18,23,33]. FUS通过相分离形成的液滴会随着时间老化，变为含有淀粉样蛋白纤维的、固态样的、动态性更低的类凝胶形式，而疾病相关的某些突变可加剧该现象的发生[18]．这提示体内相分离异常可能与某些疾病的发生有关．kapβ2也可抑制FUS的疾病相关的突变导致的相分离异常，但某些突变体对该抑制效应不敏感[33,34]．筛选小分子来加强kapβ2与FUS等RNA结合蛋白的疾病相关的突变体的相互作用，不失为一种非常有潜力的治疗相关疾病的方案.

生物分子凝集体中仅有某些组分能通过分子内或/与分子间的多价相互作用产生相分离．Pak等人[36]提议将它们称为“骨架蛋白(scaffolds)”，而将其他组分称为

“被招募者(clients)”. 参与建立相分离的液滴中的骨架蛋白通过空余结合位点直接募集特定的生物大分子, 再通过这些一级招募者, 继续募集其他组分. 依此, 生物分子凝集体可含有复杂的组成, 甚至包含上百个组分. 另外, Banani等人[36]报道, 通过简单调节骨架蛋白的比例, 即可改变被招募者的组成. 比如在polySUMO和polySIM通过SUMO-SIM相互作用形成的液滴中, 当溶液中SUMO的化学计量大于SIM时, 或者说SUMO浓度与SIM浓度的比例大于1时, 相分离形成的液滴主要招募SIM, 反之则招募SUMO. 那么在SUMO与SIM比例约为1时, SUMO或SIM浓度的微小变化即可引起被招募者组分的明显变化.

很多生物分子凝集体中并非仅有一个组分可发生相分离, 或仅有一套相分离体系. 依旧以P颗粒为例, 它的组分PGL-1, PGL-3和LAF-1都可以单独形成相分离, 且PGL-1和PGL-3可促进彼此的相分离[14,20,21]. 与前面所述的mRNA可降低PGL-3形成相分离的临界浓度不同, RNA可提高LAF-1液滴的流动性, 而不改变其相分离临界浓度[20]. 多套相分离体系彼此的联系以及各自的调控方式使得生物分子凝集体颇为复杂.

多套相分离体系也有可能形成共存的、不混溶的多层相分离, 用于解释胞内核仁、压力颗粒等生物分子凝集体的多层结构的形成[12]. 核仁从里到外为纤维中心(fibrillar center, FC)、致密纤维组分(dense fibrillar component, DFC)、颗粒组分(granular component, GC)的3层结构, 分别富含蛋白POLR1E, FIB1, NPM1. 纯化的FIB1和NPM1混合后, 形成NPM1液滴包含FIB1液滴的多相相分离, 类似核仁的“核-壳”结构. IDRs区域驱使了FIB1和NPM1液滴的形成, 而液滴之间的不混溶来自于蛋白的RNA结合区域[12]. FIB1和NPM1液滴具有显著不同的表面张力, 与核仁不同结构具有不同的物理特性相一致. 核仁可能采取这种多相相分离形式来使RNA处理步骤在局部区域有效地按序发生.

3 相分离的生化和细胞功能

相分离的主要效应是将骨架蛋白和被招募者富集在一个局部区域. 局部高浓度的分子可通过浓度效应, 促使酶促反应在此处更高效地进行. 局部浓缩产生的拥挤效应, 可以促进生物大分子内部及分子间弱相互作用的稳定, 进而引发自身或彼此在溶液中的构象变化, 促进分子稳定及功能激活, 以及改变生化反应的动力学特性等. 多项研究报道了相分离可延长骨架蛋白在固定空间内的滞留时间, 促进其参与的多步骤的、缓慢的生化过程向不可逆方向更快进行[37,38]. 另外, 被招募者是通过特异结合骨架蛋白或其他招募者而进入到液滴中的, 相分离因此可使生物分子凝集体存储和缓冲特定的生物大分子, 并成为一个组成成分特异的生化反应平台, 完成独特的功能. 最后, 无膜特性使相分离体系较为开放, 与外部分子有快速的交换, 时刻处于一个动态的调控过程, 其组装与溶解、内部组成等都可被快速调控. 上述特点使得相分离有助于将各种生化反应组织在开放的局部区域, 并使它们相对独立地, 高度有序和高度动态, 以及高效地进行.

相分离是与生物分子凝集体关联在一起的, 特定相分离体系的功能与其组成成分密不可分. 特定的组成使生物分子凝集体发挥了各异的细胞学功能, 比如加工小体发挥了RNA处理和降解的作用[2], U颗粒为snRNPs存储和组装的位点[39], 压力颗粒在应激反应中行使mRNA存储和翻译调控的功能[2], p62颗粒可组装待降解的货物以及可能充当自噬小体形成的生化平台[16].

相分离可以驱使膜上受体聚集, 参与信号转导. 比如nephrin-NCK-N-WASP形成的相分离可驱使nephrin受体聚集[3]; LAT-Grb2-Sos1可促使LAT受体聚集, 参与T细胞活化[4]; NR2B-PSD-95-GKAP-Shank3-Homer3体系可促使NR2B受体聚集, 参与突触处的信号转导[40]. 这几个相分离体系还可富集肌动蛋白, 促进其组装, 表明相分离可参与细胞骨架塑造[3,4,40]. 与此类似地, BuGZ液滴[41]、SPD-5液滴[42]、Tau液滴可募集微管蛋白[43], 促进其多聚化, 并分别在纺锤体、中心体和轴突维管束的形成中发挥重要作用.

相分离促进酶促反应的研究也有一些报道. cGAS是一种环GMP-AMP合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS), 在固有免疫反应中发挥重要作用[44]. 它可结合外源双链DNA, 催化GTP和ATP转变为cGAS. Du 等人[45]报道DNA可诱导cGAS的相分离, 因此激活和促进其酶促活性. Sheu-Gruttadauria和MacRae[46]所做的类似研究表明, Ago2和TNRC6B相互作用形成的类似于体内miRISC的相分离可促进Ago2催化的脱腺苷化反应. 由于相分离可浓缩大量组分, 产生的浓度效应, 以及复杂的分子间和分子内的相互作用和构象改变等效应, 使得相分离中生化反应动力学的结构和相互作用基础非常复杂. 我们需要仔细鉴别在特定体系中, 相分离是通过何种具体的分子机制来促进酶促反应的效率和特异性的.

染色体相关的相分离也是一个研究热点. 近期的

一些研究显示，人源的磷酸化的HP1α和果蝇中的HP1a可在体外单独形成相分离，且相分离可被MLA H3K9me3 NA(在H3K9位点具有三甲基化修饰的化学同构物的核小体串)促进[47~49]. 植物中与HP1功能相似的蛋白ADCP1也可与MLA H3K9me3 NA形成相分离[49]. 这与我们熟知的HP1和H3K9甲基化对于异染色质形成至关重要的研究结论相一致，表明HP1与H3K9甲基化的核小体串之间的多价相互作用驱使的相分离，可能是体内异染色质形成的分子机制. 还有研究报道了超级增强子具有液滴样性质，富集转录机器来强化基因的表达, 揭示了相分离与基因调控的相关性[50].

4 总结与展望

多价相互作用驱使相分离的模型使我们对体内生物分子凝集体的组装与溶解、组成成分的调控，生化和生物学功能等有更深入的了解. 现在我们已经在体外通过表达纯化生物分子凝集体的组分建立了很多相分离体系，并对他们形成的分子结构和相互作用基础、物理性质、生化反应的参与等进行了探究，并将这些信息同体内生物分子凝集体的组成、结构和功能等信息联系起来. 但值得注意的是，体内的环境，以及生物分子凝集体的组成和调控十分复杂，我们需要不断优化体外相分离条件，并谨慎地用体外相分离体系来解释体内生物分子凝集体相关的现象. 相分离与生物分子凝集体领域还有非常多的问题亟待解决，比如如何根据生物大分子序列预测相分离发生，液滴组装的起始信号、发生过程、内部结构与动态调控，不同相分离体系之间的联系和相互影响，具体相分离体系如何改变生化反应速率和特异性，相分离与疾病发生的联系等. 单分子成像[38]、光控相分离[51,52]等技术的引进，以及物理分析、数学建模、生物信息学分析和预测等手段, 可帮助我们深入探究这些问题.

参考文献

1 Brangwynne C P, Eckmann C R, Courson D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation. Science, 2009, 324: 1729–1732
2 Decker C J, Parker R. P-bodies and stress granules: Possible roles in the control of translation and mRNA degradation. Cold Spring Harbor Perspectives Biol, 2012, 4: a012286
3 Banjade S, Rosen M K. Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors. eLife, 2014, 3: e04123
4 Su X, Ditlev J A, Hui E, et al. Phase separation of signaling molecules promotes T cell receptor signal transduction. Science, 2016, 352: 595–599
5 Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. J Cell Biol, 2005, 171: 603–614
6 Altmeyer M, Neelsen K J, Teloni F, et al. Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose). Nat Commun, 2015, 6: 8088
7 Banani S F, Lee H O, Hyman A A, et al. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18: 285–298
8 Li P, Banjade S, Cheng H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. Nature, 2012, 483: 336–340
9 Frey S, Richter R P, Görlich D. FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. Science, 2006, 314: 815–817
10 Kato M, Han T W, Xie S, et al. Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. Cell, 2012, 149: 753–767
11 Huntley M A, Golding G B. Simple sequences are rare in the Protein Data Bank. Proteins, 2002, 48: 134–140
12 Feric M, Vaidya N, Harmon T S, et al. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. Cell, 2016, 165: 1686–1697
13 Lin Y, Protter D S W, Rosen M K, et al. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. Mol Cell, 2015, 60: 208–219
14 Saha S, Weber C A, Nousch M, et al. Polar positioning of phase-separated liquid compartments in cells regulated by an mRNA competition mechanism. Cell, 2016, 166: 1572–1584.e16
15 Zeng M, Shang Y, Araki Y, et al. Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity. Cell, 2016, 166: 1163–1175.e12
16 Sun D, Wu R, Zheng J, et al. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. Cell Res, 2018, 28: 405–415
17 Wilson M I, Gill D J, Perisic O, et al. PB1 domain-mediated heterodimerization in NADPH oxidase and signaling complexes of a typical protein kinase C with Par6 and p62. Mol Cell, 2003, 12: 39–50
18 Schmidt H B, Görlich D. Nup98 FG domains from diverse species spontaneously phase-separate into particles with nuclear pore-like permselectivity. eLife, 2015, 4: e04251
19 Brangwynne C P, Tompa P, Pappu R V. Polymer physics of intracellular phase transitions. Nat Phys, 2015, 11: 899–904

20 Elbaum-Garfinkle S, Kim Y, Szczepaniak K, et al. The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112: 7189–7194
21 Zhang G, Wang Z, Du Z, et al. mTOR regulates phase separation of PGL granules to modulate their autophagic degradation. Cell, 2018, 174: 1492–1506.e22
22 Patel A, Lee H O, Jawerth L, et al. A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation. Cell, 2015, 162: 1066–1077
23 Conicella A E, Zerze G H, Mittal J, et al. ALS mutations disrupt phase separation mediated by α-helical structure in the TDP-43 low-complexity C-terminal domain. Structure, 2016, 24: 1537–1549
24 Vernon R M C, Chong P A, Tsang B, et al. Pi-Pi contacts are an overlooked protein feature relevant to phase separation. eLife, 2018, 7: e31486
25 Gatchel J R, Zoghbi H Y. Diseases of unstable repeat expansion: Mechanisms and common principles. Nat Rev Genet, 2005, 6: 743–755
26 Jain A, Vale R D. RNA phase transitions in repeat expansion disorders. Nature, 2017, 546: 243–247
27 Hyman A A, Weber C A, Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014, 30: 39–58
28 Riback J A, Katanski C D, Kear-Scott J L, et al. Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. Cell, 2017, 168: 1028–1040.e19
29 Patel A, Malinovska L, Saha S, et al. ATP as a biological hydrotrope. Science, 2017, 356: 753–756
30 Qamar S, Wang G Z, Randle S J, et al. FUS phase separation is modulated by a molecular chaperone and methylation of arginine cation-π interactions. Cell, 2018, 173: 720–734.e15
31 Saito M, Hess D, Eglinger J, et al. Acetylation of intrinsically disordered regions regulates phase separation. Nat Chem Biol, 2019, 15: 51–61
32 Franzmann T M, Jahnel M, Pozniakovsky A, et al. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. Science, 2018, 359: eaao5654
33 Guo L, Kim H J, Wang H, et al. Nuclear-import receptors reverse aberrant phase transitions of RNA-binding proteins with prion-like domains. Cell, 2018, 173: 677–692.e20
34 Hofweber M, Hutten S, Bourgeois B, et al. Phase separation of FUS is suppressed by its nuclear import receptor and arginine methylation. Cell, 2018, 173: 706–719.e13
35 Yoshizawa T, Ali R, Jiou J, et al. Nuclear import receptor inhibits phase separation of FUS through binding to multiple sites. Cell, 2018, 173: 693–705.e22
36 Banani S F, Rice A M, Peeples W B, et al. Compositional control of phase-separated cellular bodies. Cell, 2016, 166: 651–663
37 Case L B, Zhang X, Ditlev J A, et al. Stoichiometry controls activity of phase-separated clusters of actin signaling proteins. Science, 2019, 363: 1093–1097
38 Huang W Y C, Alvarez S, Kondo Y, et al. A molecular assembly phase transition and kinetic proofreading modulate Ras activation by SOS. Science, 2019, 363: 1098–1103
39 Liu J L, Gall J G. U bodies are cytoplasmic structures that contain uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins and associate with P bodies. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 11655–11659
40 Zeng M, Chen X, Guan D, et al. Reconstituted postsynaptic density as a molecular platform for understanding synapse formation and plasticity. Cell, 2018, 174: 1172–1187.e16
41 Jiang H, Wang S, Huang Y, et al. Phase transition of spindle-associated protein regulate spindle apparatus assembly. Cell, 2015, 163: 108–122
42 Woodruff J B, Ferreira G B, Widlund P O, et al. The centrosome is a selective condensate that nucleates microtubules by concentrating tubulin. Cell, 2017, 169: 1066–1077.e10
43 Hernández-Vega A, Braun M, Scharrel L, et al. Local nucleation of microtubule bundles through tubulin concentration into a condensed Tau phase. Cell Rep, 2017, 20: 2304–2312
44 Sun L, Wu J, Du F, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. Science, 2013, 339: 786–791
45 Du M, Chen Z J. DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. Science, 2018, 361: 704–709
46 Sheu-Gruttadauria J, MacRae I J. Phase transitions in the assembly and function of human miRISC. Cell, 2018, 173: 946–957.e16
47 Strom A R, Emelyanov A V, Mir M, et al. Phase separation drives heterochromatin domain formation. Nature, 2017, 547: 241–245
48 Larson A G, Elnatan D, Keenen M M, et al. Liquid droplet formation by HP1α suggests a role for phase separation in heterochromatin. Nature, 2017, 547: 236–240
49 Zhao S, Cheng L, Gao Y, et al. Plant HP1 protein ADCP1 links multivalent H3K9 methylation readout to heterochromatin formation. Cell Res, 2019, 29: 54–66
50 Sabari B R, Dall'Agnese A, Boija A, et al. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. Science, 2018, 361: eaar3958
51 Shin Y, Berry J, Pannucci N, et al. Spatiotemporal control of intracellular phase transitions using light-activated optodroplets. Cell, 2017, 168: 159–171.e14
52 Bracha D, Walls M T, Wei M T, et al. Mapping local and global liquid phase behavior in living cells using photo-oligomerizable seeds. Cell, 2019, 176: 407

Summary for “液-液相分离与生物分子凝集体”

Liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates

Rongbo Wu* & Pilong Li*

Beijing Advanced Innovation Center for Structural Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China
* Corresponding authors, E-mail: wrb15@mails.tsinghua.edu.cn; plli_lab@biomed.tsinghua.edu.cn

Eukaryotic cells contain many membrane-less compartments, such as P granules, stress granules and p62 bodies, which are composed of highly concentrated biomacromolecules. These compartments are involved in various cellular processes, including germ cell specification, stress response, and selective autophagy. They are called “biomolecular condensates” and function in organizing cellular biochemical reactions, to make them relatively independent, highly ordered, and highly efficient. According to recent studies, biomolecular condensates exhibit liquid-like properties, such as a spherical shape, fusion upon contact and high dynamics. They arise from “liquid-liquid phase separation” (LLPS) driven by multivalent interactions among macromolecules.

There are many ways to achieve macromolecular multivalence: Linear modular domains with similar function, like PRM repeats in N-WASP; oligomerization domains, like the PB1 domain in the selective autophagy receptor p62; similar post-translational modifications at multiple sites; poly-ubiquitination at one site; degenerate binding of RNA to proteins, etc. Additionally, intrinsically disordered regions (IDRs), sometimes called low complexity domains (LCDs), which contain high frequencies of a few specific amino acid types, are a common way to mediate multivalent interactions and drive LLPS. Many IDR-containing proteins, such as the P granule component PGL-3, the nuclear pore protein Nup98, and the RNA-binding protein FUS, were shown to undergo phase separation *in vitro* and localize to specific biomolecular condensates *in vivo*. RNAs with disease-related nucleotide repeat expansions, such as CUG repeats, CAG repeats, and GGGGCC repeats, can also form phase-separated puncta *in vitro* and in patients’ cells.

Mechanisms for regulating phase separation include modulating the relationship between the concentration and saturation concentration of biomacromolecules, and altering biomolecular interactions. Regulation of transcription, translation and degradation can change biomacromolecule concentrations. Temperature, crowding agents, and ATP (which functions as a hydrotrope), can impact protein solubility. Protein modifications and novel interactions with other biomacromolecules can impact inter-molecular or/and intra-molecular interactions, thus disrupting phase separation. A special example is the nuclear transport receptor Kapβ2, which suppresses normal and aberrant phase separation of some RNA-binding proteins with IDRs, including FUS, by interacting with their PY-NLS region.

The components that are essential for establishing phase separation are called “scaffolds”, and they enrich their “clients” via interaction through their free binding sites. The composition of clients can be altered by changing the stoichiometries of scaffolds. Droplets formed by different biomacromolecules, such as FIB1 and NPM, can co-exist to form immiscible multi-phase condensates, which are analogous to multi-layered membrane-less organelles *in vivo*, such as nucleoli and stress granules.

Many *in vitro* phase-separation systems have been established, which can induce receptor clustering, activate actin or tubulin polymerization, facilitate enzymatic reactions, etc. Some studies have suggested a link between phase separation and heterochromatin formation or gene control. Based on reconstituted phase separation systems *in vitro*, and their links to biomolecular condensates *in vivo*, we can gain deep understanding of the assembly, dissolution, composition, physical properties, biochemical activities and cellular functions of biomolecular condensates.

membrane-less compartments, liquid-liquid phase separation, biomolecular condensates, multivalent interactions, intrinsically disordered region (IDR)

doi: 10.1360/N972019-00281