



生物大分子相分离领域的研究进展回顾与展望

何世明[†], 王实[†], 吝易^{*}

清华大学生命科学学院, 清华-北大生命科学联合中心, 清华大学IDG/麦戈文脑研究所, 清华大学膜生物学国家重点实验室, 北京 100084

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: linyi@mail.tsinghua.edu.cn

2024-04-04 收稿, 2024-07-12 修回, 2024-08-27 接受, 2024-09-02 网络版发表

摘要 蛋白质和核酸等生物大分子通过相分离在细胞特定区域富集, 形成无生物膜包被的生物分子凝聚体, 也称无膜细胞器, 为细胞实现了精细区室化. 生物大分子相分离由分子间复杂而又特异的多价相互作用驱动, 所形成的无膜细胞器具有独特的物理特性, 如流动性、融合与分裂能力、表面张力等. 将相分离理论引入生物学研究, 为深入理解生命活动的分子机制提供了新颖的视角. 近年来的研究揭示了生物大分子相分离在众多基本生物过程中的作用, 包括稳定染色质结构、调节基因表达、调控RNA加工、成熟及蛋白质翻译等. 此外, 相分离动态灵活的特征也使其成为细胞响应内外信号刺激, 以及不同细胞类型维持特异亚细胞结构的一种重要方式. 本综述回顾了从生物大分子相分离发现至今的研究进展: 首先概述了无膜细胞器的早期研究历史, 旨在梳理相分离理论引入前无膜细胞器的研究脉络; 其次探讨了相分离的分子机制及生物分子凝聚体的理化性质, 阐释了串联重复结构域和内在无序区域介导的两种相分离发生机制, 并引申出其理化性质与生物功能的相关性; 后续重点讨论了无膜细胞器的众多生物学功能, 突出了无膜细胞器在不同细胞不同环境中功能的多样性和特异性; 最后总结了相分离领域内亟需回答的问题, 并展望了未来领域在成分分析、基础理论、细胞功能、疾病关系、药物开发以及新技术应用等方面的研究前景.

关键词 生物大分子相分离, 生物分子凝聚体, 多价相互作用, 无膜细胞器

17世纪早期, 罗伯特·胡克(Robert Hooke)首次使用光学显微镜描述了植物组织中类似蜂巢的小空间, 并将其定义为细胞. 自那时起, 对细胞结构的研究历经了从简单观察到高分辨率成像、分子水平研究的演变. 这些研究对我们理解生命基本单位的结构和功能具有重要意义.

细胞具有复杂的内部结构. 生物膜系统将细胞细分为不同的区室, 实现分子的有效区隔, 确保各种生化反应在高效、有序的环境中进行. 这类具有膜结构的细胞器包括细胞的能量工厂线粒体、参与蛋白质折叠和修饰的内质网, 以及负责蛋白质降解的溶酶体等.

随着研究的深入, 人们逐渐发现了多种没有磷脂

膜包被的细胞结构, 即无膜细胞器(membranless organelle, MLO). 他们主要由细胞内某些具有自发聚集性质的生物大分子从均一溶液中通过相分离(phase separation)凝聚而成, 因而也称为生物分子凝聚体(biomolecular condensate)^[1]. 无膜细胞器种类繁多, 功能多样. 它们与膜细胞器共同构成了细胞内部复杂而精细的结构, 调控细胞的生命活动^[2].

相分离现象在凝聚体物理及多聚体化学中被广泛研究和讨论. 自2009年Hyman等人^[1]首次用相分离模型解释了细胞内生物分子凝聚体具有液态的物理性质后, 有关生物分子凝聚体的组装机制、组成动态、及生物学功能等方面的研究成为了领域的热点. 图1总结了自

引用格式: 何世明, 王实, 吝易. 生物大分子相分离领域的研究进展回顾与展望. 科学通报, 2024, 69: 4486–4499

He S M, Wang S, Lin Y. Biomolecular phase separation research: Milestones, insights, and future trajectories (in Chinese). Chin Sci Bull, 2024, 69: 4486–4499, doi: [10.1360/TB-2024-0362](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0362)

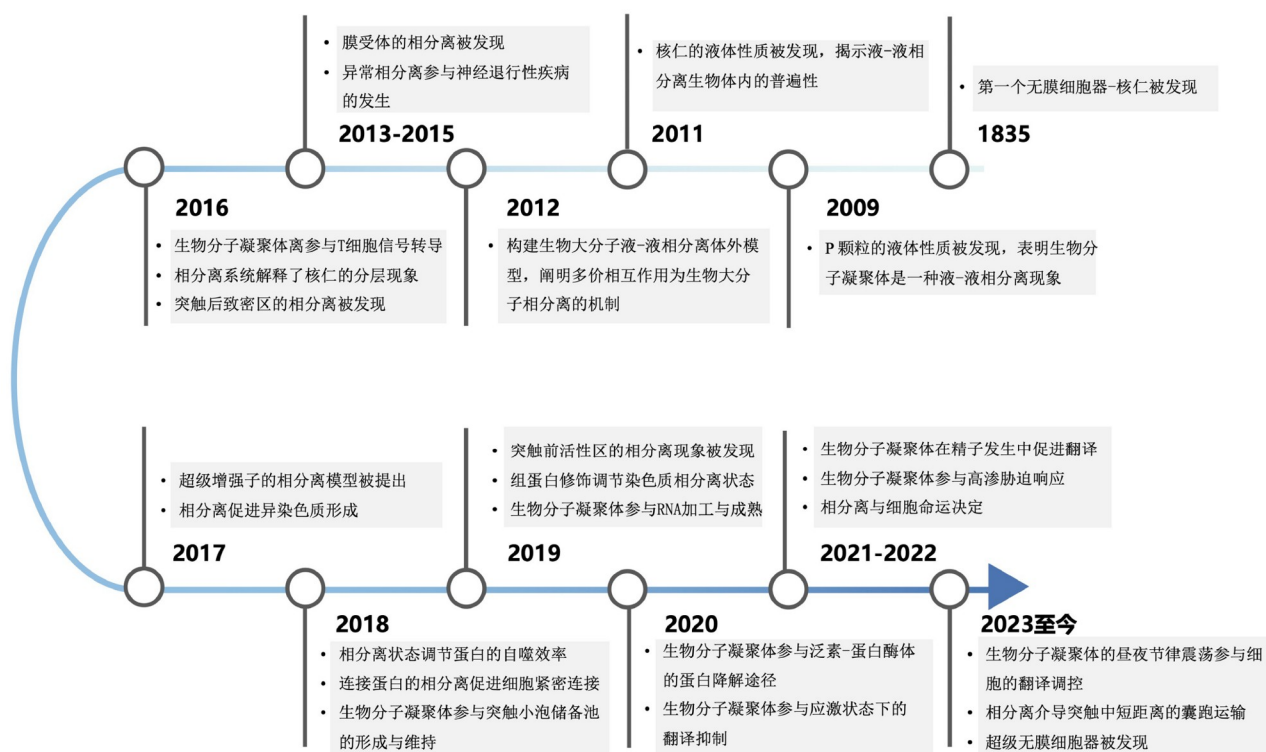


图1 生物分子凝聚体研究时间轴

Figure 1 Timeline of biomolecular condensates research

首个无膜细胞器发现以来至今生物分子凝聚体的部分代表性研究, 这些研究为生物学提供了新的角度和概念。目前针对生物分子相分离的研究大部分集中在蛋白质, 因此本综述主要聚焦于蛋白质相分离现象, 回顾无膜细胞器的发现历程并总结目前生物大分子相分离的前沿, 尤其侧重相分离参与的各种生物功能, 并进一步展望相分离领域的未来发展方向。

1 无膜细胞器的发现及早期研究历史

对无膜细胞器的最早记载可追溯至19世纪30年代。1835年, Wagner^[3]首次用光学显微镜发现了细胞核内的异质性结构-核仁, 并进一步对该结构进行了观察和描述。早期对无膜细胞器的探索主要依赖组织染色技术。20世纪初, 西班牙组织学家Cajal^[4]在运用高尔基染色法观察神经元结构的过程中, 发现了细胞核内除核仁外的另一致密斑块状结构, 并进行了大量的细致绘画记录。此结构后来被命名为卡哈尔体(Cajal body)。随着电子显微镜在20世纪30年代的问世和技术发展, 更多亚细胞结构被发现, 如PML小体(promyelocytic leukaemia body)^[5]等。20世纪60年代以后, 随着高分辨率

光学显微镜及荧光标记技术的进步, 越来越多的无膜细胞器被发现, 例如旁斑(Paraspeckle)、P小体(P body)等^[6-8]。表1按照亚细胞定位的差异汇总了部分代表性无膜细胞器的信息^[3,5,7-17]。

尽管各种无膜细胞器在亚细胞定位、物质组成和生物学功能上存在差异, 但早期的研究也揭示了一些它们相似的特征。例如核仁和卡哈尔小体的组成蛋白可以在秒级到分钟级的时间尺度上与周围环境发生扩散性质的物质交换^[18,19]; 卡哈尔小体和PML小体则存在融合及分裂的行为^[20,21]。然而, 在对无膜细胞器研究的早期阶段, 上述研究仅局限在实验现象的观察和描述。尽管初步解释了无膜细胞器与周围环境物质之间的物质交换, 但对其物理性质和形成的分子机理缺乏系统性的研究。

2 生物分子凝聚体形成的理化性质与驱动机制

2.1 生物分子凝聚体的物理性质研究

2009年, 德国马克斯-普朗克研究所的Hyman等

表 1 部分代表性无膜细胞器的亚细胞定位, 发现时间及生物学功能

Table 1 Subcellular localization, discovery time, and biological functions of representative membraneless organelles

亚细胞分布	名称	发现时间	功能	参考文献
核内	核仁(nucleolus)	1835	核糖体生成及组装	[3]
	卡哈尔小体(Cajal body)	1903	RNA代谢、剪接机器组装	[9]
	PML小体(PML body)	1960	特定蛋白质的聚集、修饰和降解	[5]
	核斑(nuclear speckles)	1910	mRNA剪接机器富集	[10]
	旁斑(paraspeckle)	2002	调节基因表达	[7]
	组蛋白基因位点小体(histone locus body, HLB)	2006	组蛋白mRNA生成	[16]
	PcG小体(PcG body)	1998	转录抑制	[17]
细胞质内	应激颗粒(stress granule)	1986	翻译调控, mRNA储存	[11]
	P小体 (P-body)	2003	mRNA翻译抑制、mRNA降解	[8]
	U小体(U-body)	2007	snRNP储存、组装	[12]
	生殖颗粒(germ granule)	1893	mRNA储存、调控mRNA翻译	[13]
	TIS颗粒(TIS granule)	2018	mRNA富集、调控mRNA翻译	[14]
核膜	核孔复合物 (nuclear pore complex)	1950	调控核质物质交换	[15]

人^[1]的研究揭示了秀丽隐杆线虫P颗粒(P granules)的物理特性, 标志着针对生物分子凝聚体的探索迈出新的一步. Hyman等人通过荧光标记P颗粒的组分蛋白, 观察和描述了P颗粒的典型液态性质: 首先, 游离的P颗粒呈球形, 它们可以相互接触融合形成更大的球形液滴, 在剪切力的作用下, P颗粒在细胞内可以自由流动和变形. 其次, 荧光漂白恢复实验表明P颗粒存在活跃的内部流动现象及快速的内外物质交换过程. 最后, 研究人员进一步评估了P颗粒的表面张力和黏度, 表明其物理特性与高分子液滴相似^[1]. 研究者认为上述P颗粒的特性可以通过高分子物理中的相分离理论解释.

鉴于其他无膜细胞器表现出与P颗粒类似的理化性质, Hyman等人^[1]推测相分离可能是生物分子凝聚体形成的普遍机制. 两年后Hyman等人^[22]进一步发现, 爪蟾卵母细胞的核仁结构同样呈现类似P颗粒的液体性质, 这提示液-液相分离现象在生物体内存在的普遍性. 除了通过液-液相分离形成的液态凝聚体外, 还有一些生物分子凝聚体呈现动态性较低的凝胶态^[23]. 凝胶态的生物分子凝聚体形成不规则的网状结构, 为生物反应和物质运输提供了更大的界面, 例如TIS颗粒(TIS granule)、定位小体(localization bodies)等^[14,24].

不同生物分子凝聚体由于物质组成和结构的差异表现出不同的液态物理特性, 包括黏弹性(viscoelasticity)、扩散性(diffusivity)、表面张力(surface tension)等. 这些物理特性与其生理病理功能密切相关^[25,26]. 目前常用的检测生物分子凝聚体物理特性的方法包括光

镊(optical tweezers)、原子力显微镜(atom force microscopy, AFM)、荧光漂白恢复(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP)、单粒子追踪(single particle tracing, SPT)等. 其中光镊通过控制生物分子凝聚体液滴的融合, 检测凝聚体的黏弹性^[27,28]; 原子力显微镜通过检测扫描探针与生物分子凝聚体之间的相互作用力检测凝聚体的弹性^[29,30]; 荧光漂白恢复利用高能激光在体内或体外漂白荧光标记的生物分子凝聚体, 通过观测荧光的恢复时间和恢复程度评估荧光标记分子的扩散速率和生物分子凝聚体的流动性^[1,22]; 单粒子追踪通过检测外源粒子在生物分子凝聚体的布朗运动轨迹检测其黏弹性^[31,32].

2.2 生物大分子相分离的分子机制

2012年, 体外重构实验进一步解析了生物大分子发生相分离发生的分子机制, 美国德克萨斯大学西南医学中心Rosen组和McKnight组分别在体外重构了两类不同驱动机制的生物大分子相分离系统, 揭示了生物大分子凝聚体形成的分子机制(图2)^[33-35].

Rosen课题组的李丕龙等人^[33]观察和描述了串联重复的SH3结构域肽段与串联重复的SH3互作结构域PRM序列肽段的体外相分离体系, 并研究了Nephrin-NCK-N-WASP相分离系统的生物学功能. 该项工作首次提出了多价相互作用能够作为相分离发生的驱动力, 这些具备串联重复互作结构域的蛋白质介导了液-液相分离的发生. 随着后续研究的深入, 越来越多的类似

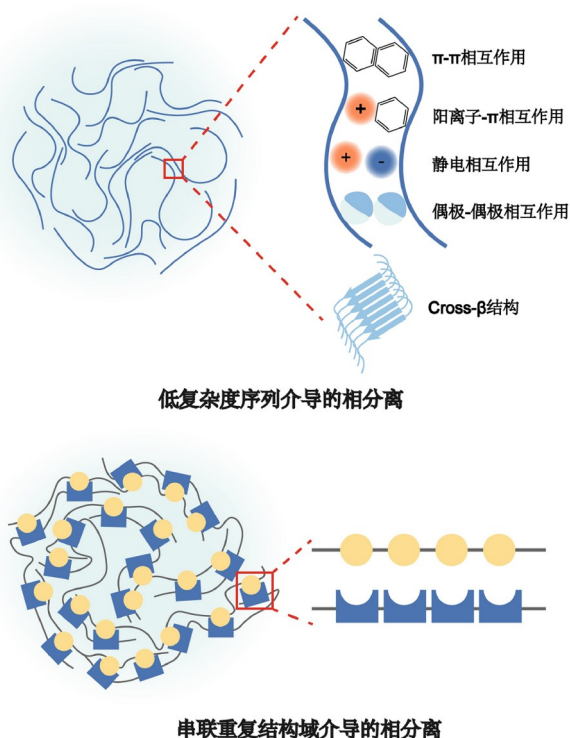


图2 生物大分子相分离机制示意图
Figure 2 Diagram of biomolecular phase separation mechanisms

相分离现象在生物系统中被发现^[31,36~38]。

同年, McKnight课题组^[34,35]发现了另外一种不同的相分离发生机制, 即蛋白质的内在无序区域(intrinsically-disordered regions, IDRs)介导的相分离过程。IDR往往富集某一类或某几类特定性质的氨基酸, 基于此特性, IDR也被称作低复杂度序列(low complexity sequence, LCS)。McKnight课题组的研究证明了IDR具备驱动蛋白质相变的能力, 并可在体外形成可逆的淀粉样纤维构成的水凝胶^[35]。这两部分工作利用生物化学手段揭示了多价相互作用作为生物大分子相分离发生的分子机制, 并为生物大分子相分离体系理化性质和生物学功能的探索提供了新的研究思路。

目前的观点认为生物大分子的相分离过程由多价相互作用介导。在上述两种类型中, 包含串联重复结构域的蛋白质通常由多个相同类型的结构域组成。这些分子内重复的结构域产生多价性并使得它能够同时与多个结合蛋白进行动态互作, 进而促使动态相互作用网络的形成, 驱动相分离发生^[33]。而对于内在无序区如何介导相分离发生的分子机制相对不明确。目前的研究侧重于从结构和氨基酸序列组成两个方面来对IDR

进行描述。一方面, IDR中的带电氨基酸、疏水性氨基酸或含苯环的氨基酸等特定性质的氨基酸的间隔性重复分布提供了多价性, 通过与相分离系统内其他成分发生静电作用、疏水互作等方式, 驱动相分离的发生; 另一方面, 一些研究表明IDR可能具备较灵活的三维结构, 为产生多价互作的主要驱动力^[28,31,37,39,40]。因此对于生物大分子相分离发生机制的研究方兴未艾。

3 生物大分子相分离的生物学功能

生物大分子相分离作为细胞结构、组织和功能发生的一种高效途径, 在细胞内区域性结构形成和功能动态调控方面扮演着关键且必要的角色(图3)。目前已经发现的无膜细胞器种类繁多且具有功能的多样性。一方面, 无膜细胞器能够通过相分离招募、富集参与特定生物学过程的功能效应分子及调节分子, 实现功能复合物分子的区域性定位, 从而完成对无膜细胞器参与生物学过程的催化与效率调节; 另一方面, 部分生物大分子相分离形成的凝聚物还能与其他细胞结构相互作用, 形成更大的区域性结构, 参与调节细胞的重要生物学过程。而根据其出现场景不同, 本综述将无膜细胞器分为三类, 即细胞中普遍存在的无膜细胞器、环境诱发的无膜细胞器及特定细胞类型特有的无膜细胞器。

3.1 细胞中普遍存在的无膜细胞器

3.1.1 相分离与染色质结构调控

在真核生物的细胞核内, DNA与组蛋白组成核小体^[41]。核小体之间通过Linker-DNA相互连接, 并经过一系列复杂且精细的调控, 进一步折叠缠绕形成高度有序且高度压缩的染色质结构^[42]。Rosen课题组^[43]从相分离角度解释了染色质结构的调控机制。其中, 组蛋白的不同修饰状态调节染色质相分离是染色质区室化的基础。该研究为染色质结构的动态调节、基因组复制及协同表达等生物学过程的分子机制提供了更全面、更多样的描述。

根据其结构及功能状态的差异, 染色质结构可以分为常染色质与异染色质。其中异染色质结构相对凝集致密, 很少或不进行转录活动^[44,45]。清华大学李丕龙等人^[46]发现并提出了H3K9me3与HP1(heterochromatin protein 1)蛋白-CD互作驱动的液-液相分离过程是异染色质形成的关键推动力。与此同时, Narlikar等人^[47]对裂殖酵母Swi6(HP1蛋白)参与调控异染色质形成过程

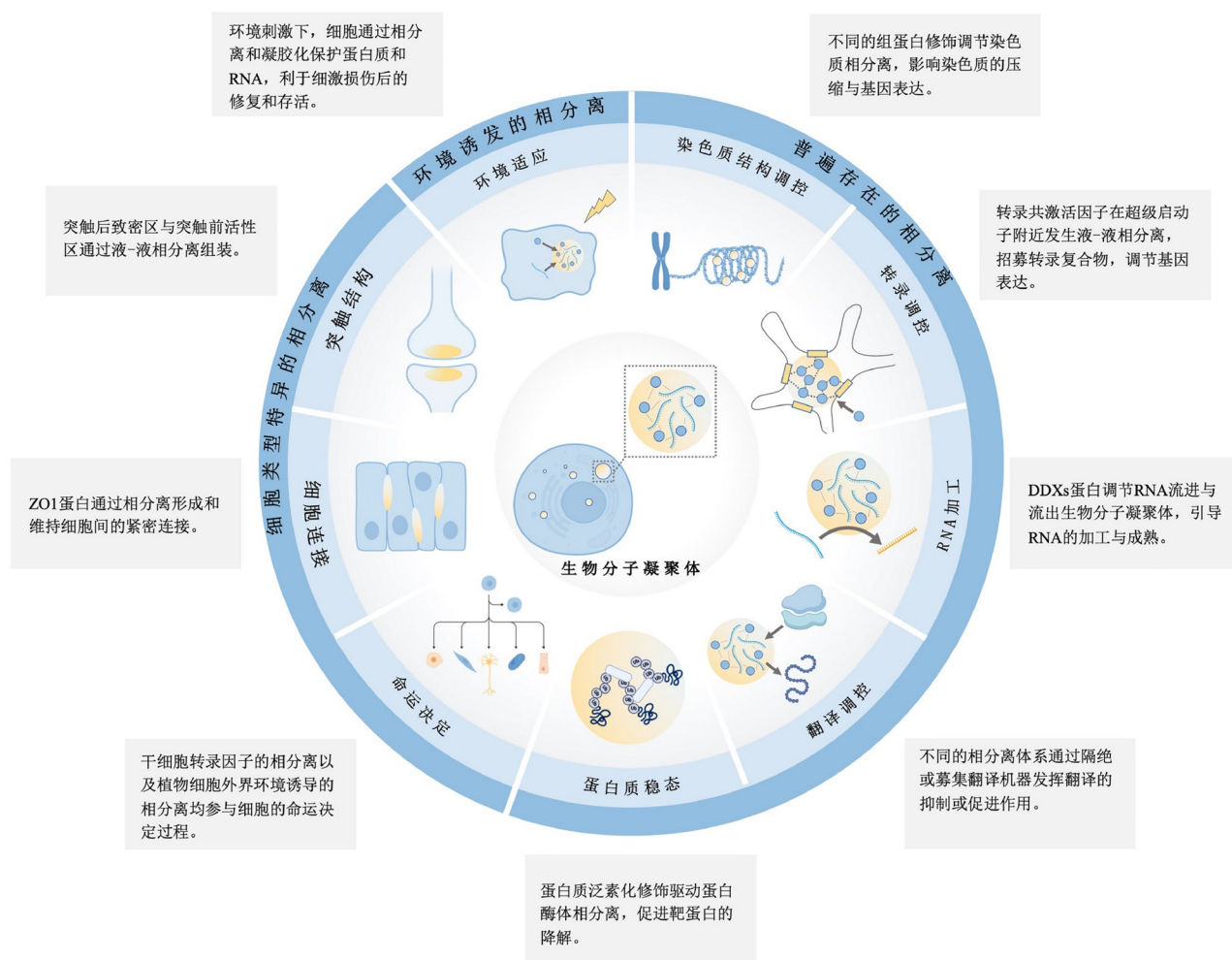


图3 生物分子凝聚体的生物学功能(使用Biorender.com制作)

Figure 3 Biological functions of biomolecular condensates (created with Biorender.com)

的分子机制进行了深入研究, 表明Swi6的结合会对经典的组蛋白八聚构象产生影响, 且多聚化是Swi6-异染色质相分离凝聚物形成的分子基础。HP1参与染色质的相分离体系并促进核小体构象动态的改变, 进而完成对染色质的压缩过程, 促进异染色质结构的形成。该模型进一步丰富了染色质结构动态与生物体基因组表达调控间关系的分子机制, 即组蛋白修饰状态的改变和组蛋白变体可能直接通过对组蛋白八聚体构象动态产生影响以调控染色质的压缩进程, 进而对生物体的基因表达过程实现精准调控。

3.1.2 相分离与转录调控

相分离在mRNA转录调控中的重要性也日益凸显。2013年, McKnight课题组^[48]聚焦于FET家族肿瘤融合蛋白, 包括融合体肉瘤(FUS)、尤文斯肉瘤(EWS)和

TAF15。这些蛋白包含的LCS与多种不同的DNA结合结构域发生融合, 从而激活转录并促进癌细胞的形成。研究发现由这些LCS形成的聚合纤维直接与RNA聚合酶II的C端结构域(CTD)结合, 并被CTD的磷酸化可逆调控。突变分析表明, CTD与LC结构域聚合物之间的结合程度与转录激活的强度相关。这项研究提出LCS通过多聚化招募RNA聚合酶II从而激活转录, 用简单的模型解释了转录调控的关键机制。

2017年, Sharp和Young^[49]从相分离角度出发提出了超级增强子参与基因调控的模型。超级增强子(super-enhancer)是由多个连续排列的增强子串联而成的高密度增强子簇, 富集了大量与之互作的转录相关元件。大多数决定细胞功能和特性的关键基因附近通常伴随着超级增强子的出现, 然而其调控基因表达的具体分子

机理一直不甚清楚^[50,51]。2018年, Young等人^[52]报道了转录共激活因子BRD4和MED1在超级增强子处发生液-液相分离, 招募转录复合物并富集在超级增强子附近, 进而发挥超强增强子的增益效应, 调控关键基因的表达。这项研究为超级增强子通过相分离调控基因表达提供了实验证据。后续, 他们又揭示了转录因子的转录激活结构域与转录中介体复合物通过液-液相分离实现基因表达激活^[53], 同时转录生成的RNA能够通过调控中介体复合物的相分离状态, 从而对转录发生反馈调节, 为基因表达调控模型提供了更丰富的机制解释^[54]。

2018年, 周强等人^[55]阐释了蛋白激酶P-TEFb的组氨酸富集结构域(histidine-rich domain, HRD)能够通过相分离募集CDK9和Pol II, 进而调控转录延伸。次年, Young等人^[56]又报道在转录过程中, Pol II CTD的磷酸化状态是调控其与转录中介复合物解离、从超级增强子处逃逸并开始转录延伸过程, 以及与RNA剪接复合物稳定结合这一转换过程的关键决定因素。该文从相分离角度对转录起始与延伸过程的切换机制进行了详细描述。

3.1.3 相分离参与RNA加工与成熟过程

转录过程生成的mRNA后续的加工与成熟对RNA的稳定性、命运决定和翻译效率等过程起着关键作用^[57,58]。DEAD-box ATPases(DDX)是一类ATP酶活性依赖的RNA解旋酶。Weis等人^[57]于2016年报道了酵母DDX蛋白在体外发生相分离, 并通过其ATP酶活性调节p-body的动态。2019年, 他们又进一步发现和描述了DDX家族蛋白通过相分离形成RNA动态生化反应中心。该反应中心依赖DDX蛋白的ATP水解酶活性来招募RNA分子, 进而完成RNA分子的加工、成熟等过程^[58]。

此外, RNA修饰调控mRNA代谢过程的多个环节, 包括mRNA的转录后剪接、翻译效率调节、稳定性调节等。2019年, Jaffrey等人^[59]与李丕龙课题组^[60]分别揭示了mRNA上的m⁶A修饰促进其与YTHDF甲基化阅读蛋白的相分离, 进而实现对一系列生物学过程的调控。次年, 庄小威等也报道了氧化应激条件下应激颗粒的形成会受到m⁶A修饰RNA与YTHDF的相分离状态影响。这些工作为m⁶A修饰RNA的生物学功能发挥机制提供了全新的理解^[61]。

3.1.4 相分离与蛋白质翻译调控

蛋白质翻译是基因表达和行使正常功能的重要环

节。而生物大分子相分离作为一种高效且灵活的细胞活动调控机制, 也参与了蛋白质翻译的调控过程^[62-64]。

相分离对于蛋白质翻译的早期研究主要聚焦于应激颗粒对蛋白质翻译的抑制作用。当细胞受到热胁迫刺激时, 会大量表达热休克蛋白, 这些蛋白有助于细胞内变性蛋白质的复性和转运, 从而减少胁迫刺激对细胞结构和功能的破坏, 维持细胞的稳态及活性。然而, 对于细胞在胁迫受激状态下如何实现热休克蛋白mRNA特异性翻译的分子机制仍不清楚。2020年, Alberti等人^[62]将不同温度下Ded1p蛋白相分离状态与管家基因翻译效率进行比对, 发现Ded1p相分离状态温度敏感且是导致细胞受激状态下翻译停滞现象出现的重要因素。然而, 同年的另一项研究打破了应激颗粒中的mRNA不进行翻译这一假说。单分子成像实验说明在应激颗粒内仍有mRNA翻译进行, 而且整个翻译周期(起始、延伸和终止)都可以在定位于SG中发生^[65]。综上所述, 这些结果表明mRNA定位到应激颗粒与翻译的作用是多方面的。

另一方面, 近年来也有报道指出相分离能够激活蛋白翻译。在精子发育过程中, 相关基因会提前转录生成相应的mRNA, 并处于翻译抑制状态, 直至特定发育阶段, 这些mRNA的翻译会被激活^[66,67]。2022年, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心刘默芳课题组^[63]详细阐述了FXR1蛋白在精子细胞后期发生相分离, 并进一步募集EIF4G3等多个翻译相关因子和大量mRNA, 从而实现所需蛋白翻译的调控, 以保障精子细胞正常发育。2023年, 清华大学吝易课题组^[64]发现并描述了相分离参与调控昼夜节律过程中细胞内全局性的蛋白翻译, 从而维持稳定昼夜节律周期的分子机制。ATXN2与ATXN2L能够在细胞内发生随昼夜节律振荡的液液相分离, 并在节律振荡过程中募集翻译机器和相关蛋白的mRNA, 促进相关蛋白的翻译, 从而参与昼夜节律中的经典转录翻译负反馈回路(transcription-translation feedback loop)的精细调控^[64]。

3.1.5 相分离参与蛋白质稳态调控

蛋白质稳态调节包括控制蛋白质合成、折叠、构象维持、组装、运输、功能和降解(蛋白酶体降解和自噬过程)等一系列分子过程。相分离在蛋白稳态调控中的作用近年来也被逐步发现。

2018年, 张宏等人^[68]以线虫胚胎发育过程中的PGL颗粒为研究对象, 详细阐释了PGL-1和PGL-3相分离体系状态变化调节与其自身被自噬降解效率间的关

系。其中EPG-2的结合会促进PGL颗粒的水凝胶化,加速自身降解速率;mTORC1在热胁迫条件下会磷酸化PGL-1和PGL-3,增强PGL-1和PGL-3的液液相分离,从而抑制自身自噬降解过程。文章描述了相分离状态对选择性自噬效率的调节作用,以及进一步维持细胞稳态的重要效应^[68]。随后,张宏课题组^[69]进一步揭示了相分离在驱动自噬体结构在内质网或液泡表面形成中的关键作用。研究表明,内质网膜或溶酶体膜表面的钙瞬变能够驱动自噬起始复合物FIP200发生液-液相分离,进而形成FIP200凝聚体。这一过程对于起始自噬体在内质网膜或溶酶体膜表面的形成至关重要。该工作不仅详细地描述了内质网膜或溶酶体膜表面的钙瞬变作为驱动自噬体结构形成的关键决定因素,还进一步丰富了对多细胞生物体自噬过程分子机制的理解^[69]。相分离调控自噬的作用在拟南芥中也得到了验证。2021年,薛红卫等人^[70]发现拟南芥中的ATG3通过调控ATG8的相分离,从而调节细胞自噬过程。

作为细胞内蛋白质质量控制的重要途径,泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome system, UPS)参与细胞内多数蛋白质的降解过程,并对待降解的靶蛋白具有高度的特异性和选择性^[71]。2020年, Saeki等人^[72]揭示了细胞通过靶蛋白的泛素化修饰作用驱动蛋白酶体的相分离促进靶蛋白的降解,从而维持细胞内环境结构及功能的稳态。

除此之外,研究也发现无膜细胞器在蛋白质质量控制中扮演着重要角色。核仁是细胞核内的蛋白质质控中心。其通过相分离形成,并可完成对核内错误折叠蛋白的修复,进而维持和调控细胞在生理和胁迫条件下的蛋白质稳态^[73]。2024年, Boke等人^[74]首次观察到并描述了小鼠卵母细胞中存在一种由RUFY1介导的超级无膜细胞器,它由内溶酶体、自噬体、蛋白酶体及蛋白聚集物构成,并被命名为ELVAs(endolysosomal vesicular assemblies)。ELVAs的生理功能是在卵母细胞中隔绝蛋白质聚集物,并在卵母细胞成熟过程中通过激活蛋白质降解通路来降解其内部的蛋白质聚集物,从而防止对卵母细胞质量及胚胎存活产生不利影响,维持卵母细胞及胚胎细胞的良好状态。

3.2 环境刺激诱发的相分离现象

生物体应对周围环境因素突变带来的胁迫刺激时发生的生理反应被称为生物的环境适应性,是生命进化和自然选择的重要指标^[72]。相分离生成的无膜细胞

器由于其动态灵活的组装机因而而在细胞的环境适应过程中起重要作用。

典型的如细胞在遭受外部压力或内部应激时形成的应激颗粒可以帮助细胞应对压力,维持基因表达和细胞内环境的稳定^[75]。当细胞受到高渗条件胁迫刺激时,细胞脱水导致体积收缩,此时,脱水的细胞须短时间内迅速恢复到正常体积才能够维持稳态,保证其存活。WNK(with-no-lysine kinase)在高渗条件胁迫刺激期间在协调体积恢复过程中发挥着重要作用。Subramanya等人^[76]发现细胞通过WNK1形成的凝聚体启动磷酸化依赖的信号通路,从而驱动SLC12共转运体,介导离子内流,继而恢复细胞体积,揭示了WNK1作为细胞内分子拥挤感受器的生理功能。另一方面,外界胁迫会导致植物细胞的应激反应^[77]。例如,清华大学方晓峰等人^[78]的研究显示,植物中的SEUSS蛋白也同样通过相分离感知细胞内分子拥挤程度,从而响应渗透胁迫。植物经常面临病虫害、干旱、盐胁迫、温度波动等环境胁迫。研究植物的应激反应机制,可以减少环境胁迫对植物生长的影响,帮助开发更有效的农业管理措施。

除生成应激颗粒外,相分离也是细胞适应环境的一种方式。Alberti等人^[72]研究了酵母朊蛋白Sup35,描述其胁迫刺激条件下发生pH依赖的相分离,并凝胶化形成保护性凝胶结构,从而保护Sup35在胁迫刺激条件下的生物学功能,实现酵母细胞应激损伤后的恢复和存活,使之能够在胁迫和突发的不利环境因素变动探索和生存。Groisman等人^[79]描述了ATP依赖的RNA解旋酶Rho固有无序区的相分离能力,并进一步通过将表达Rho不同截断变体的多形拟杆菌移植入小鼠肠道,比较其定植效率,最终发现Rho的相分离能力影响多形拟杆菌在小鼠肠道中的适应性,其通过相分离促进多形拟杆菌对小鼠肠道的环境适应能力。这些工作从相分离角度描述了从肠道微生物到高等生物适应外界应激环境的分子机制。

3.3 特定细胞类型特有的相分离现象

3.3.1 干细胞分化中特异的相分离

干细胞具有多能性,可以分化成多种不同类型的细胞从而形成各种组织和器官。细胞命运决定与转变过程伴随着染色质三维结构的剧烈改变^[80-82]。中山大学丁俊军等描述了关键转录因子OCT4的相分离过程通过调节topological-associated domains(TAD)重组以促进体细胞重编程,进而推动细胞命运转变^[83],并揭示了

CTCF的相分离过程参与对长距离染色质结构间的相互作用调控,进而实现对胚胎干细胞多能性的调控^[84]。

此外,除染色质结构外,代谢环境同时影响着干细胞命运。中科院遗传与发育生物学研究所许操等人^[85]报道了细胞产生活性氧分子(ROS)的生物学功能-ROS通过驱动TMF蛋白发生相分离,调控植物茎尖干细胞命运,抑制茎尖分生组织的过早成熟从而确保植物开花过程的正常有序发生。这项工作描述了ROS驱动的分相在细胞命运决定及转变中的重要调控作用,为细胞命运决定及转变模型提供了新的视角和观点。

3.3.2 相分离介导细胞连接

为了维持动物组织结构,细胞连接(cell junction)起到了连接相邻细胞、细胞与细胞外基质之间的作用。细胞连接可分为紧密连接、锚定连接和通讯连接三种类型^[86,87]。细胞间的紧密连接方式广泛分布于上皮结构中,使得上皮细胞间形成紧密的机械联系。紧密连接的形成机制一直是该领域的研究热点。2019年, Honigsmann等人^[86]描述了紧密连接蛋白ZO的相分离现象,阐释了ZO蛋白通过相分离促进紧密连接形成。同时, Heisenberg等人^[87]以斑马鱼胚胎发育过程中形成的EVL(enveloping layer)和YSL(yolk syncytial layer)为模型,描述了在由锚定连接到紧密连接转化过程中肌动球蛋白骨架张力大小同细胞连接处的ZO-1蛋白富集程度间的关系,即细胞连接的肌动球蛋白骨架张力越大,细胞连接处的ZO-1蛋白富集程度越高,同时伴随相分离的发生。这些工作揭示了细胞紧密连接处起始形成过程中的ZO-1蛋白的逆浓度运输及富集机制,完善了细胞机连接形成和维持的相分离模型,为进一步深入理解细胞间的连接方式提供了全新的研究角度和理解思路。

3.3.3 相分离调控神经元突触结构和功能

神经元作为神经系统的基本功能单元,具有极其精细的区室化结构,通过内部的功能分工执行多种任务。同时,神经元能够根据外部刺激或内部信号的变化,快速、灵活地调整其代谢、电生理活动和突触连接性等特性。这种调控机制使得神经元能够适应各种环境和任务需求,实现有效的信息处理和传递。神经元之所以能维持神经网络的稳定性和灵活性,很大程度上得益于其精细的结构区室化和高度动态的调控机制。而相分离的特性使得神经元能够很好地协调区室化和动态性,这对于神经元发育过程中的细胞命运决定^[88]、极性发生与建立^[89,90]等过程均起到重要作用。本文侧重于探讨相分离在突触中的功能。

突触通过电信号和化学信号之间的转换实现神经元之间的信号传递。典型的化学性突触包括突触前组分、突触间隙和突触后组分。张明杰课题组针对突触中相分离现象进行了系统研究。2016年,他们首次报道了突触后致密区组分PSD-95与SynGAP的液-液相分离过程^[91]。2018年8月2日,他们进一步在体外重构了由突触后致密结构组分蛋白PSD-95, GKAP, Shank和Homer等6个组分构成的相分离体系,还对突触后致密结构相分离体系的选择性进行了探讨与研究。6 x PSD相分离系统会特异性地富集兴奋性的谷氨酸受体,并排斥抑制性突触蛋白Gephyrin,提示该机制可能是兴奋性突触与抑制性突触发生形成的决定因素^[92]。

而突触前的相分离现象也陆续被发现。突触前活性区重要组分蛋白RIM和RIM-BP发生液-液相分离并募集电压门控钙离子通道的胞内段区域,提示相分离参与突触前活性区组装^[93]。同时,突触前终末有突触小泡的集合。突触小泡在突触前分别分布于3个池内,锚定池(tethered pool),循环池(recycling pool)与存储池(reserved pool)^[94]。耶鲁大学Camilli课题组^[94]发现Synapsin蛋白相分离对突触小泡储备池起到了形成和维持作用。而张明杰课题组进一步的体外实验实现了“Synapsin/小的单层脂质体共凝聚体-小的单层脂质体覆盖的RIM/RIM-BP凝聚体-巨大单层脂质体”的重构,从而模拟和揭示了突触结前有序多层次组织的结构特征^[95]。近期的研究更是提出了相分离在细胞内可以实现新型的不依赖于马达蛋白与细胞骨架的零能耗的定向运输方式,介导突触中短距离囊泡运输^[96]。因此突触前结构与突触后结构相分离组装模型更好地解释了突触结构的形成、维持与效应过程。

4 总结和展望

生物大分子相分离领域的研究方兴未艾,这一领域揭示了细胞内复杂功能调控的新机制,并为理解生命现象提供了新的视角。该领域仍有诸多亟待探索和回答的问题:

4.1 解析无膜细胞器成分及特异性

无膜细胞器之间的内部蛋白组分存在显著差异。然而,由于无膜细胞器缺乏生物膜结构的包被,且大多具有高动态性特征,这使得通过生化手段有效分离无膜细胞器变得极为困难。因此,无膜细胞器的成分鉴定一直是该领域内的难点之一。目前,生物分子凝聚体的

分离主要依赖于离心、荧光颗粒分选、邻近标记-免疫沉淀、体外水凝胶沉淀等方法^[97-100]。其中,离心和荧光颗粒分选只适用于相对稳定的无膜细胞器,如P颗粒、应激颗粒等;而邻近标记、体外水凝胶沉淀则难以准确反映生物分子凝聚在细胞内的蛋白-蛋白互作状态。现有方法的局限性有待通过新技术的开发来解决。例如,更高精度的空间蛋白组学和空间转录组学的发展将有助于无偏见地分析各生物分子凝聚体内部的蛋白和核酸成分。未来,更先进的技术和新的研究角度的引入有望解决这些问题。

4.2 深入理解生物大分子相分离分子机制

尽管已经观察到相分离现象在多种生物过程中的作用,但其形成的具体分子机制和驱动力(如多价相互作用)尚未完全阐明。不同蛋白的LCS内部,氨基酸间依赖静电作用、疏水互作或阳离子- π 相互作用等作为LCS间的主要作用力,驱动无膜细胞器的形成。然而,仍有更多的分子机制有待深入挖掘。深入研究生物大分子相分离系统内组分间特异性相互作用的分子机制,将有助于我们更加系统地理解生物大分子相分离发生的内在驱动力,为其体系的理化性质及状态调控提供理论依据,并有望建立生物大分子相分离系统的理论模型。此外,相分离过程是否完全可逆,以及这种可逆性如何受到细胞内外环境的影响,仍需要进一步研究。

4.3 进一步揭示生物大分子相分离的功能

在众多生物学过程中,对于生物大分子相分离如何发挥生物学功能的具体机制,目前的解释仍相对简单,主要侧重于无膜细胞器如何在亚细胞区域内特异性地富集相应分子。2024年Huganir等人^[101]发现突触蛋白SynGAP与PSD-95通过相分离的方式相互作用,进一步介导了突触的可塑性发生,而这一过程与SynGAP自身的催化功能无关。因而,相分离在细胞中发挥功能的更多形式仍有待未来的研究去发现。另一方面,生物大分子相分离与相应生物学功能之间的因果关系也需要进一步确定,从多个角度说明相分离发挥功能的充分和必要性。

4.4 描绘细胞内无膜细胞器图谱

近年来,人们逐渐认识到,无膜细胞器本身也可以具有更加精细的结构。例如,细胞核内的核仁就展现出分层结构,应激颗粒则具有核心和外周结构,而突触前

突触小泡的不同分布区域中,相分离也发挥着独特的作用^[95,102]。此外,无膜细胞器之间并非完全独立,也存在组分及功能上的相互联系,如胁迫条件下细胞内形成的应激颗粒与P小体之间在组成组分和功能发挥上高度关联,共同实现细胞对环境胁迫的抵抗^[103]。未来可以对生物大分子相分离有序性进行深入研究的同时,探索无膜细胞器之间的相互作用联系,以期全面理解相分离系统的组织形式。

此外,无膜细胞器与膜细胞器在许多重要的生物学过程中相互作用,共同协调发挥功能。一方面,细胞膜系统能够作为部分无膜细胞器的动态组装平台,对无膜细胞器的形成、功能起到重要作用。例如,Numb-Pon在果蝇神经母细胞不对称分裂过程中形成的相分离凝聚体,具有极性建立的功能;上皮与内皮细胞之间由ZO蛋白介导形成的细胞间紧密连接凝聚体等也是无膜细胞器在细胞膜系统上动态组装的例子^[87,89]。另一方面,无膜细胞器与膜细胞器之间在结构及功能上紧密联系,共同形成新的细胞内区室化结构,实现对重要生物学过程的精细调控。例如,由TIS11B相分离产生的TIS颗粒与内质网相互缠绕,进而形成新的细胞区室,即TIS颗粒-内质网(TIS granule-ER, TIGER)结构域^[14]。小鼠卵母细胞中,由RUFY1蛋白介导的由内容酶体、自噬体、蛋白酶体和蛋白聚集物形成的ELVAs超级无膜细胞器也参与了细胞状态的维持^[74]。

此外,细胞膜系统内膜蛋白自身相分离形成的凝聚体也对膜细胞器自身的发生、维持及功能调节具有重要意义。例如,核孔复合物组分蛋白Nup具有相分离特性,且其相分离凝聚体具备物质运输的选择性^[104]。因此,在发现更多无膜细胞器的同时,可以开发新的方法,无偏见地发现和定位细胞内的无膜细胞器,并深入理解细胞内膜系统和无膜细胞器间共同相互作用所形成的细胞结构基础。

4.5 探究针对相分离机制的治疗方式

基于相分离机制的靶向药物开发具有广阔的应用前景,特别是在治疗神经退行性疾病和癌症等难治性疾病方面。诸多疾病与生物大分子相分离状态异常相关,包括癌症、神经退行性疾病以及多种传染病等^[105]。因此,从蛋白质相分离状态调控角度针对相关疾病的药物开发可能是有效的延缓或治愈手段。此外,蛋白质相分离系统自身的可调控性和细胞内生物大分子相分离系统的特异性也是其成药可能性的重要理论依据。

2020年,朱继东等发现SHP2变构抑制剂ET070可以通过将SHP2锁定在“关闭”构象来抑制SHP2疾病相关突变的相分离过程^[106]。该发现为通过小分子药物抑制致病蛋白相分离状态的紊乱,以治疗相关人类重大疾病提供了重要的实验支持,同时也为生物大分子相分离过程作为药物研发机制的可能性提供了重要的正向

支持。

综上所述,生物大分子相分离领域的研究在基础理论、细胞功能、疾病关系、新技术应用以及应用前景等方面仍有诸多亟待探索和回答的问题。随着研究的深入和技术的进步,相信这一领域将为我们揭示更多生命现象的奥秘。

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 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
- 3 Pederson T. The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: a000638
- 4 Cajal R. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trabajos del lab. de investig. biolog. de la Univ. de Madrid*, 1903, 2: 129–129
- 5 THE D, Riviere M, Bernhard W. Examination by electron microscope of the VX2 tumor of the domestic rabbit derived from the *Shope papilloma*. *Bull Assoc Fr Etud Cancer*, 1960, 47: 570–584
- 6 Schul W, Groenhout B, Koberna K, et al. The RNA 3' cleavage factors CstF 64 kDa and CPSF 100 kDa are concentrated in nuclear domains closely associated with coiled bodies and newly synthesized RNA. *EMBO J*, 1996, 15: 2883–2892
- 7 Fox A H, Lam Y W, Leung A K L, et al. Paraspeckles. *Curr Biol*, 2002, 12: 13–25
- 8 Sheth U, Parker R. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 2003, 300: 805–808
- 9 Cajal S R Y. Un sencillo metodo de coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab Lab Invest Biol (Madrid)*, 1903, 2: 129–221
- 10 Cajal S R Y. El núcleo de las células piramidales del cerebro humano y de algunos mamíferos. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid*, 1910, 8: 27–62
- 11 Collier N C, Schlesinger M J. The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. *J Cell Biol*, 1986, 103: 1495–1507
- 12 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
- 13 Weismann A, Parker W N, Ronnfeldt H. The germ-plasm: A theory of heredity. *J Anthropol Institute Great Britain Ireland*, 1894, 23: 433
- 14 Ma W, Mayr C. A membraneless organelle associated with the endoplasmic reticulum enables 3'UTR-mediated protein-protein interactions. *Cell*, 2018, 175: 1492–1506.e19
- 15 Callan H G, Tomlin S G. Experimental studies on amphibian oocyte nuclei I. Investigation of the structure of the nuclear membrane by means of the electron microscope. *Proc R Soc Lond B*, 1950, 137: 367–378
- 16 Liu J L, Murphy C, Buszczak M, et al. The *Drosophila melanogaster* Cajal body. *J Cell Biol*, 2006, 172: 875–884
- 17 Saurin A J, Shiels C, Williamson J, et al. The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain. *J Cell Biol*, 1998, 142: 887–898
- 18 Phair R D, Misteli T. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, 2000, 404: 604–609
- 19 Dunder M, Hebert M D, Karpova T S, et al. *In vivo* kinetics of Cajal body components. *J Cell Biol*, 2004, 164: 831–842
- 20 Platani M, Goldberg I, Swedlow J R, et al. *In vivo* analysis of Cajal body movement, separation, and joining in live human cells. *J Cell Biol*, 2000, 151: 1561–1574
- 21 Deldaire G, Ching R W, Dehghani H, et al. The number of PML nuclear bodies increases in early S phase by a fission mechanism. *J Cell Sci*, 2006, 119: 1026–1033
- 22 Brangwynne C P, Mitchison T J, Hyman A A. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 4334–4339
- 23 Tanaka H. Viscoelastic phase separation in biological cells. *Commun Phys*, 2022, 5: 167
- 24 Neil C R, Jeschonek S P, Cabral S E, et al. L-bodies are RNA–protein condensates driving RNA localization in *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell*, 2021, 32: ar37
- 25 Wang Z, Chen D, Guan D, et al. Material properties of phase-separated TFEB condensates regulate the autophagy-lysosome pathway. *J Cell Biol*, 2022, 221: e202112024

- 26 Molliex A, Temirov J, Lee J, et al. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. *Cell*, 2015, 163: 123–133
- 27 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
- 28 Wang J, Choi J M, Holehouse A S, et al. A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins. *Cell*, 2018, 174: 688–699.e16
- 29 Yamasaki A, Alam J M, Noshiro D, et al. Liquidity is a critical determinant for selective autophagy of protein condensates. *Mol Cell*, 2020, 77: 1163–1175.e9
- 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 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
- 32 Feric M, Vaidya N, Harmon T S, et al. Coexisting liquid phases underlie nucleolar subcompartments. *Cell*, 2016, 165: 1686–1697
- 33 Li P, Banjade S, Cheng H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, 2012, 483: 336–340
- 34 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
- 35 Han T W, Kato M, Xie S, et al. Cell-free formation of RNA granules: Bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell*, 2012, 149: 768–779
- 36 Banjade S, Rosen M K. Phase transitions of multivalent proteins can promote clustering of membrane receptors. *eLife*, 2014, 3: e04123
- 37 Nott T J, Petsalaki E, Farber P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Mol Cell*, 2015, 57: 936–947
- 38 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
- 39 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
- 40 Murthy A C, Dignon G L, Kan Y, et al. Molecular interactions underlying liquid–liquid phase separation of the FUS low-complexity domain. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, 26: 637–648
- 41 Kornberg R D. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science*, 1974, 184: 868–871
- 42 Olins D E, Olins A L. Chromatin history: Our view from the bridge. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4: 809–814
- 43 Gibson B A, Doolittle L K, Schneider M W G, et al. Organization of chromatin by intrinsic and regulated phase separation. *Cell*, 2019, 179: 470–484.e21
- 44 Larson A G, Elnatan D, Keenen M M, et al. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*, 2017, 547: 236–240
- 45 Strom A R, Emelyanov A V, Mir M, et al. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, 2017, 547: 241–245
- 46 Wang L, Gao Y, Zheng X, et al. Histone modifications regulate chromatin compartmentalization by contributing to a phase separation mechanism. *Mol Cell*, 2019, 76: 646–659.e6
- 47 Sanulli S, Trnka M J, Dharmarajan V, et al. HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin. *Nature*, 2019, 575: 390–394
- 48 Kwon I, Kato M, Xiang S, et al. Phosphorylation-regulated binding of RNA polymerase II to fibrous polymers of low-complexity domains. *Cell*, 2013, 155: 1049–1060
- 49 Hnisz D, Shrinivas K, Young R A, et al. A phase separation model for transcriptional control. *Cell*, 2017, 169: 13–23
- 50 Whyte W A, Orlando D A, Hnisz D, et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell*, 2013, 153: 307–319
- 51 Hnisz D, Abraham B J, Lee T I, et al. Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell*, 2013, 155: 934–947
- 52 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
- 53 Boija A, Klein I A, Sabari B R, et al. Transcription factors activate genes through the phase-separation capacity of their activation domains. *Cell*, 2018, 175: 1842–1855.e16
- 54 Henninger J E, Oksuz O, Shrinivas K, et al. RNA-mediated feedback control of transcriptional condensates. *Cell*, 2021, 184: 207–225.e24
- 55 Lu H, Yu D, Hansen A S, et al. Phase-separation mechanism for C-terminal hyperphosphorylation of RNA polymerase II. *Nature*, 2018, 558: 318–323
- 56 Guo Y E, Manteiga J C, Henninger J E, et al. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature*, 2019, 572: 543–548

- 57 Mugler C F, Hondele M, Heinrich S, et al. ATPase activity of the DEAD-box protein Dhh1 controls processing body formation. *eLife*, 2016, 5: e18746
- 58 Hondele M, Sachdev R, Heinrich S, et al. DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature*, 2019, 573: 144–148
- 59 Ries R J, Zaccara S, Klein P, et al. m6A enhances the phase separation potential of mRNA. *Nature*, 2019, 571: 424–428
- 60 Gao Y, Pei G, Li D, et al. Multivalent m6A motifs promote phase separation of YTHDF proteins. *Cell Res*, 2019, 29: 767–769
- 61 Fu Y, Zhuang X. m6A-binding YTHDF proteins promote stress granule formation. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 955–963
- 62 Iserman C, Desroches Altamirano C, Jegers C, et al. Condensation of Ded1p promotes a translational switch from housekeeping to stress protein production. *Cell*, 2020, 181: 818–831.e19
- 63 Kang J Y, Wen Z, Pan D, et al. LLPS of FXR1 drives spermiogenesis by activating translation of stored mRNAs. *Science*, 2022, 377: eabj6647
- 64 Zhuang Y, Li Z, Xiong S, et al. Circadian clocks are modulated by compartmentalized oscillating translation. *Cell*, 2023, 186: 3245–3260.e23
- 65 Mateju D, Eichenberger B, Voigt F, et al. Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules. *Cell*, 2020, 183: 1801–1812.e13
- 66 Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in *Spermatogenesis*. *Science*, 2002, 296: 2176–2178
- 67 Idler R K, Yan W. Control of messenger RNA fate by RNA-binding proteins: An emphasis on mammalian *Spermatogenesis*. *J Andrology*, 2012, 33: 309–337
- 68 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
- 69 Zheng Q, Chen Y, Chen D, et al. Calcium transients on the ER surface trigger liquid-liquid phase separation of FIP200 to specify autophagosome initiation sites. *Cell*, 2022, 185: 4082–4098.e22
- 70 Guan B, Xue H W. *Arabidopsis* AUTOPHAGY-RELATED3 (ATG3) facilitates the liquid-liquid phase separation of ATG8e to promote autophagy. *Sci Bull*, 2022, 67: 350–354
- 71 Pohl C, Dikic I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Science*, 2019, 366: 818–822
- 72 Franzmann T M, Jahnel M, Pozniakovskiy A, et al. Phase separation of a yeast prion protein promotes cellular fitness. *Science*, 2018, 359: eaao5654
- 73 Frotin F, Schueder F, Tiwary S, et al. The nucleolus functions as a phase-separated protein quality control compartment. *Science*, 2019, 365: 342–347
- 74 Zaffagnini G, Cheng S, Salzer M C, et al. Mouse oocytes sequester aggregated proteins in degradative super-organelles. *Cell*, 2024, 187: 1109–1126.e21
- 75 Baumann K. Phase separation in stress resistance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 229
- 76 Boyd-Shiwerski C R, Shiwerski D J, Griffiths S E, et al. WNK kinases sense molecular crowding and rescue cell volume via phase separation. *Cell*, 2022, 185: 4488–4506.e20
- 77 Zhang H H, Fang X F. Advances in the regulation of stress sensing and responses by phase separation in plants. *Biotechnol Bull*, 2023, 39: 44–53
- 78 Wang B, Zhang H, Huai J, et al. Condensation of SEUSS promotes hyperosmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 1361–1369
- 79 Kryptou E, Townsend G E, Gao X, et al. Bacteria require phase separation for fitness in the mammalian gut. *Science*, 2023, 379: 1149–1156
- 80 Lieberman-Aiden E, van Berkum N L, Williams L, et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 2009, 326: 289–293
- 81 Dixon J R, Selvaraj S, Yue F, et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 2012, 485: 376–380
- 82 Beagan J A, Gilgenast T G, Kim J, et al. Local genome topology can exhibit an incompletely rewired 3D-folding state during somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 2016, 18: 611–624
- 83 Wang J, Yu H, Ma Q, et al. Phase separation of OCT4 controls TAD reorganization to promote cell fate transitions. *Cell Stem Cell*, 2021, 28: 1868–1883.e11
- 84 Wei C, Jia L, Huang X, et al. CTCF organizes inter-A compartment interactions through RYBP-dependent phase separation. *Cell Res*, 2022, 32: 744–760
- 85 Huang X, Chen S, Li W, et al. ROS regulated reversible protein phase separation synchronizes plant flowering. *Nat Chem Biol*, 2021, 17: 549–557
- 86 Beutel O, Maraschini R, Pombo-García K, et al. Phase separation of zonula occludens proteins drives formation of tight junctions. *Cell*, 2019, 179: 923–936.e11
- 87 Schwyer C, Shamipour S, Pranjic-Ferscha K, et al. Mechanosensation of tight junctions depends on ZO-1 phase separation and flow. *Cell*, 2019, 179: 937–952.e18

- 88 Liu X, Shen J, Xie L, et al. Mitotic implantation of the transcription factor prospero via phase separation drives terminal neuronal differentiation. *Dev Cell*, 2020, 52: 277–293.e8
- 89 Shan Z, Tu Y, Yang Y, et al. Basal condensation of Numb and Pon complex via phase transition during *Drosophila* neuroblast asymmetric division. *Nat Commun*, 2018, 9: 737
- 90 Liu Z, Yang Y, Gu A, et al. Par complex cluster formation mediated by phase separation. *Nat Commun*, 2020, 11: 2266
- 91 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
- 92 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
- 93 Wu X, Cai Q, Shen Z, et al. RIM and RIM-BP form presynaptic active-zone-like condensates via phase separation. *Mol Cell*, 2019, 73: 971–984.e5
- 94 Milovanovic D, Wu Y, Bian X, et al. A liquid phase of synapsin and lipid vesicles. *Science*, 2018, 361: 604–607
- 95 Wu X, Ganzella M, Zhou J, et al. Vesicle tethering on the surface of phase-separated active zone condensates. *Mol Cell*, 2021, 81: 13–24.e7
- 96 Qiu H, Wu X, Ma X, et al. Short-distance vesicle transport via phase separation. *Cell*, 2024, 187: 2175–2193.e21
- 97 Padrón A, Iwasaki S, Ingolia N T. Proximity RNA labeling by APEX-seq reveals the organization of translation initiation complexes and repressive RNA granules. *Mol Cell*, 2019, 75: 875–887.e5
- 98 Hubstenberger A, Courel M, Bénard M, et al. P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons. *Mol Cell*, 2017, 68: 144–157.e5
- 99 Roy R, Das G, Kuttanda I A, et al. Low complexity RGG-motif sequence is required for Processing body (P-body) disassembly. *Nat Commun*, 2022, 13: 2077
- 100 Horste E L, Fansler M M, Cai T, et al. Subcytoplasmic location of translation controls protein output. *Mol Cell*, 2023, 83: 4509–4523.e11
- 101 Araki Y, Rajkovich K E, Gerber E E, et al. SynGAP regulates synaptic plasticity and cognition independently of its catalytic activity. *Science*, 2024, 383: eadk1291
- 102 Lafontaine D L J, Riback J A, Bascetin R, et al. The nucleolus as a multiphase liquid condensate. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 165–182
- 103 Fefilova A S, Antifeeva I A, Gavrilova A A, et al. Reorganization of cell compartmentalization induced by stress. *Biomolecules*, 2022, 12: 1441
- 104 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
- 105 Zbinden A, Pérez-Berlanga M, De Rossi P, et al. Phase separation and neurodegenerative diseases: A disturbance in the force. *Dev Cell*, 2020, 55: 45–68
- 106 Zhu G, Xie J, Kong W, et al. Phase separation of disease-associated SHP2 mutants underlies MAPK hyperactivation. *Cell*, 2020, 183: 490–502.e18

Summary for “生物大分子相分离领域的研究进展回顾与展望”

Biomolecular phase separation research: Milestones, insights, and future trajectories

Shiming He[†], Shi Wang[†] & Yi Lin^{*}

School of Life Sciences, Tsinghua University, Tsinghua-Peking Joint Centre for Life Sciences, IDG/McGovern Institute for Brain Research, State Key Laboratory of Membrane Biology, Beijing 100084, China

[†] Equally contributed to this work

^{*} Corresponding author E-mail: linyi@mail.tsinghua.edu.cn

Biological macromolecules such as proteins and nucleic acids undergo phase separation to form biomolecular condensates, achieving precise compartmentalization within cells and spatial-temporal regulation of various biological functions. Unlike membrane-bound organelles, biomolecular condensates lack a biological membrane but instead rely on complex multivalent interactions among molecules to dynamically separate them from the surrounding environment. These condensates exhibit both relative stability and intricate structural features rich in dynamic changes. They possess unique physical properties akin to liquids, such as fluidity, fusion, and fission capabilities. The introduction of phase separation has provided a novel and insightful perspective for deeply understanding the molecular mechanisms in biology.

Recent studies have uncovered the vital biological roles played by biomolecular phase separation. Phase separation can be classified into three groups based on their occurrence in different cellular contexts: universally present phase separation, environmentally induced phase separation, and cell-type-specific phase separation. Universally present phase separation encompasses fundamental cellular processes including chromatin organization, gene expression regulation, RNA processing and maturation, and protein translation control. Environmentally induced phase separation plays a crucial role in cell's response to external stimuli, demonstrating its importance in maintaining cellular homeostasis and adaptability in response to changing physiological conditions. Additionally, cell-type-specific phase separation contributes significantly in mediating cell-cell connections and modulating synaptic structures and functions.

This review traces the research advancements of research in this field, from the early investigations into membraneless organelles to the more recent developments in phase separation. It begins with the early research history of membrane-less organelles prior to the advent of phase separation theory, aiming to trace the research trajectory before the introduction of phase separation theory. Then it delves into the molecular mechanism of phase separation, particularly those mediated by tandem repeat domains and intrinsically disordered regions, with emphasis on the correlation between their physicochemical properties and the functional roles of condensates. Subsequently, the focus shifts to the diverse biological functions of biomolecular phase separation, emphasizing their functional diversity and specificity in diverse cellular environments.

Finally, the review concludes by identifying pressing questions within the field of biomolecular phase separation and outlining promising avenues for future research. These include further analysis of membraneless organelles compositions, the exploration of fundamental theories governing phase separation, the elucidation of the relationships between condensates and cellular functions, the depiction of the intricate internal structure of membraneless organelles and the interactions between them, and the development of novel technologies to further our understanding of this fascinating and complex biological phenomenon. Additionally, research should focus on the investigation of links between phase separation and disease as well as therapeutic approaches targeting phase separation mechanisms. As research progresses, the continued investigation of membraneless organelles is poised to advance our knowledge of cellular biology and inspire new therapeutic strategies.

biomacromolecular phase separation, biomolecular condensate, multivalent interaction, membranless organelle

doi: [10.1360/TB-2024-0362](https://doi.org/10.1360/TB-2024-0362)