

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K14425

研究課題名(和文) 界面特性が導く特異な相分離構造形成ダイナミクスとその可視化

研究課題名(英文) Characteristic phase separation dynamics guided by interfacial properties and its visualization

研究代表者

渡邊 千穂 (Watanabe, Chiho)

広島大学・統合生命科学研究科(総)・准教授

研究者番号：50838076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、固着液滴(sessile droplet)を用い、蒸発過程でダイナミックに形成される相分離に対する生体膜成分の効果解明を目指しました。まず、二種類の高分子を含む水溶液からなる固着液滴を作成しその蒸発過程を顕微鏡観察したところ、高分子の組成や初期濃度に依存して異なる相分離パターンを示すことを見出しました。これらの溶液に、生体膜の成分をなす脂質を添加したところ、添加が無い場合とは異なるパターンを形成することを見出しました。それぞれの高分子および脂質の分布は蛍光修飾分子を用いて蛍光顕微鏡観察による可視化を行いました。これにより、各成分の分布やより詳細な相分離過程の観察が可能になりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、近年生物学分野でも着目されている相分離現象について、古典的かつ単純な系である固着液滴を用いて、細胞の必須構成分子である脂質の相分離に対する効果を明らかにしようとした。実験から、脂質の添加は、脂質無しの場合に比べ、蒸発にともなう相分離パターンが大きく変化しうることが見出された。これらの結果は、細胞内で起こる相分離現象に対しても脂質分子が関わりうることを間接的に示唆すると考える。それゆえ、物質の側面からの生物現象の理解に対する一つの視点を提供しうるといった意義があると考えている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the effects of biomembrane components on the phase separation that is dynamically formed during the evaporation process using sessile droplets. First, we prepared sessile droplets consisting of an aqueous solution containing two types of polymers and observed the evaporation process under a microscope, and found that they exhibited different phase separation patterns depending on the composition and initial concentration of the polymers. When we added lipids, which are components of biological membranes, to these solutions, we found that a different pattern was observed than when no lipids were added. The distribution of each polymer and lipid was visualized by fluorescence microscopy using fluorescently modified molecules. This makes it possible to observe the distribution of each component and the phase separation process in more detail.

研究分野：ソフトマター科学

キーワード：高分子 相分離 脂質 水 蒸発 乾燥 パターン 蛍光顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

近年、細胞中で特定のタンパク質やRNAが集まる「細胞内相分離」とよばれるダイナミックな不均一構造が見出され、これまでの生体膜によって仕切られた場とは異なる機能発現場として急速に着目されている。相分離自体は物理学分野では古くから広く研究されてきているが、細胞内における機能、および疾病に相関することが明らかにされつつあるため、近年生物学分野においても研究が盛んになっている。実際に、細胞内相分離を経て、液体相からゲル・固体相に移換することが、アルツハイマー病などの神経変性疾患の原因となりうることを示されつつある (Shin, Brangwynne, Science, 357, eaaf4382, 2017)。これらの液体相から固体相への移換過程で、相分離ドメインの粘性散逸=ガラス化・凝集体形成が引き起こされると考えられている。一方で、生体中に多量に存在する生体膜および生体膜を構成する成分である脂質分子が相分離構造形成に与える効果は、とくに生物学分野で扱われる相分離においては、ほとんど未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、ソフトマター物理や高分子材料工学において広く用いられてきている高分子溶液からなる液滴をモデルとして用い、細胞内相分離に対する生体膜成分の効果解明を目指した。「ダイナミックな構造形成には高分子だけでなく生体膜脂質が重要である」との仮説のもと、ソフトマター物理や高分子材料工学において広く用いられてきている界面固着液滴 (sessile droplet) を用いて、この仮説を検証することを目的とした。さらに、ダイナミックな相分離構造形成過程を液晶分子の偏光顕微鏡観察等により可視化することを試みた。本研究により、細胞内相分離という生命現象に対する脂質分子の関わりへの解明を目指すとともに、相分離過程からガラス化・結晶化するダイナミクスを明らかにすることで、印刷技術などの工学応用およびガラス物理の新たな実験系の提案を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究で、細胞内相分離構造形成における脂質の効果、基板上での固着液滴の乾燥過程における相分離ダイナミクスを液晶分子等による可視化法により観察することで、明らかにしようとした。さらに、脂質による界面特性の変化が相分離後の構造 (ガラス化・結晶化) に与える効果を明らかにしようとした。具体的には水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (Dex) のバルク状態で一相状態にある混合水溶液を作成し、乾燥過程で引き起こされる相分離過程および形成される構造を調査・明らかにすることを目指した。具体的には以下の三点を対象に主に顕微鏡下における固着液滴の乾燥・蒸発プロセスの観察を中心とした実験と解析を行った。

- (1) 固着液滴乾燥相分離過程における高分子濃度の効果
- (2) 固着液滴乾燥相分離過程および構造に対する脂質分子の効果
- (3) 固着液滴乾燥相分離過程における溶液内分子流れの可視化

## 4. 研究成果

3. の方法に示した三点について、それぞれ述べる。

### (1) 固着液滴乾燥相分離過程における高分子濃度の効果

生体膜成分の効果解明を目指す準備として、研究計画に基づいて固着液滴乾燥相分離過程における高分子濃度の効果を調査した。具体的には初期条件では一相状態を示す、2種類の水溶性高分子 (デキストラン、ポリエチレングリコール) 混合水溶液をモデル溶液として用い、重量比組成を一定として、様々な濃度で調製、ガラス基板上に固着液滴を作製し (図1、図2a) その乾燥過程の光学顕微鏡 (位相差・簡易偏向) 観察を行った。

その結果、同じ重量比組成であっても、濃度依存的に異なるパターンを示すこと (図2b)、また、初期濃度を等しくし、重量比組成を変化させた場合にも、異なるパターンを示すことが明らかになった

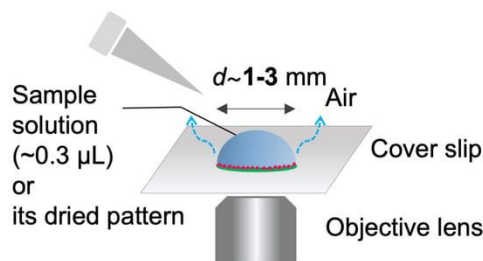


図1 固着液滴の作成および観察方法。

Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373;

<https://doi.org/10.3390/life12030373> より引用。

(図 2 c)。このとき、比較的低い初期濃度の Dex/PEG=4/1(w/w)溶液からなる固着液滴の乾燥においてみられた、液滴周縁部から中心部へと生じる筋状のパターン(string)に着目した(図 2 b、pattern A)。

String パターンの形成メカニズムを明らかにするために、蛍光分子付きのデキストランおよびポリエチレングリコールを初期溶液に混合し、Dex のみ、PEG のみからなる溶液、および Dex/PEG=4/1(w/w)溶液からなる固着液滴の濃度分布の可視化を行った(図 3, 4)。その結果、Dex のみの溶液は液滴周縁部に堆積し、反対に PEG のみは液滴の中央部分に堆積する傾向があることが分かった(図 3)。さらに、Dex/PEG=4/1(w/w)溶液では、液滴周縁部から乾燥にともなう相分離が進行し、Dex-rich 相が波状に堆積、次いで PEG-rich 相が液滴中心部へと後退することにより、周縁部の Dex-rich 相を液滴中心部へと引き込み、最終的に筋状のパターンを形成することが分かった(図 4)。

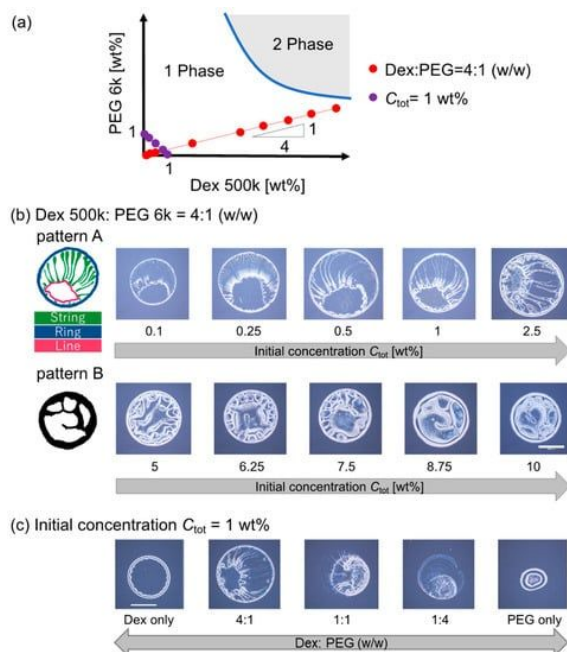


図 2 (a)Dex-PEG 溶液の状態図のイラストおよび実験に用いた組成比(b) Dex と PEG の組成(重量比)を 4:1 に固定し、初期濃度を変化させた際のパターン変化。(c) 初期濃度を 1 wt% に固定し、Dex と PEG の組成(重量比)を変化させた際のパターン変化。Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373 より引用。

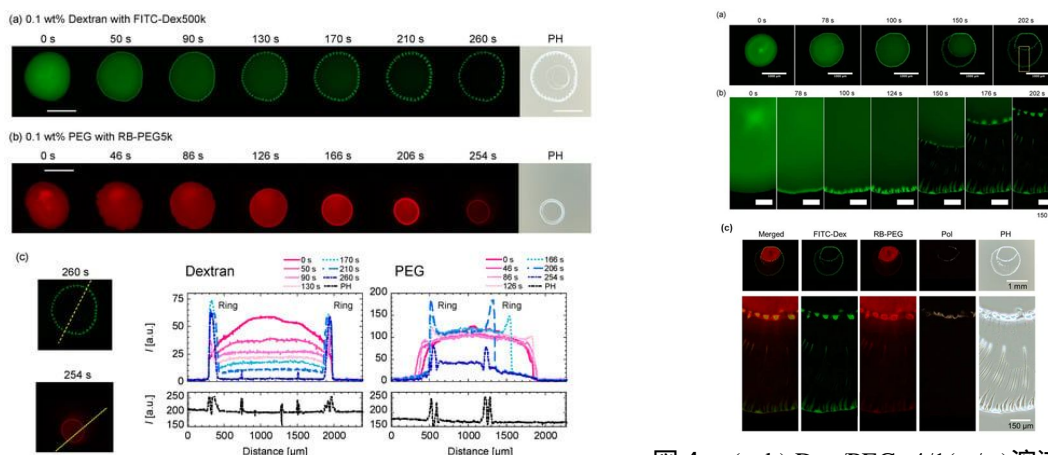


図 3 (a)Dex のみ、(b)PEG のみからなる水溶液の乾燥過程の蛍光顕微鏡画像。緑、赤の蛍光はそれぞれ蛍光修飾 Dex および PEG に由来。(c) 各液滴における蛍光強度ラインプロットの時間変化。Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373 より引用。

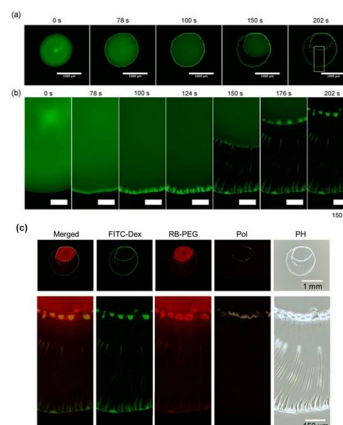


図 4 (a, b) Dex/PEG=4/1(w/w)溶液の乾燥過程の Dex 蛍光顕微鏡像(a)固着液滴全体、(b)液滴周縁部の拡大図。(c)乾燥後のパターンの各種顕微鏡像。Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373 より一部改変して引用。

以上から、筋状のパターン形成は Dex-rich 相および PEG-rich 相のガラス基板面に対する濡れ性の違いが要因となっていると考えられた。濡れ性に対する Dex、PEG 溶液の違いを調べるために、接触角測定を行ったところ、実験を行った濃度域において、異なる傾向を示すことが明らかになった(図5)。以上の結果をまとめた図を図6に示す。

Dex と PEG からなる初期状態で一相状態にある溶液を固着液滴として乾燥過程を観察することにより、その初期濃度に依存して異なるパターンを示すことを見出した。さらに、筋状の特徴的なパターンを見出した。このパターンは、Dex と PEG 溶液が基板に対して異なる濡れ性を示すことによることを示唆した。これらの成果は学会等で発表するとともに、論文 (Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373) として発表した。

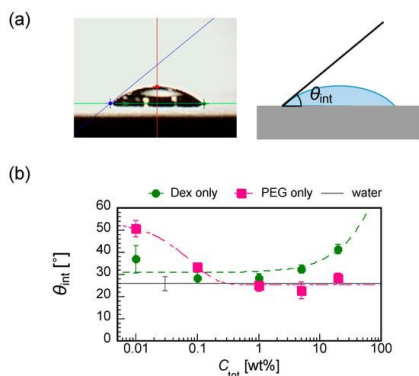


図5 (a)接触角測定法の写真および模式図 (b)Dex, PEG 水溶液の各濃度における接触角。Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373 より引用。

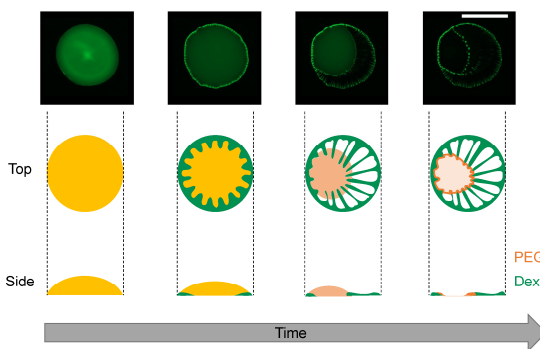


図6 Dex PEG 混合水溶液における筋状乾燥パターン形成の模式図。Watanabe, Yanagisawa, *Life* 2022, 12(3), 373 より一部改変して引用。

## (2) 固着液滴乾燥相分離過程および構造に対する脂質分子の効果

上記の成果に基づき、脂質添加の有無による相分離過程と相分離構造の相違についての実験を行った。はじめに、一般的な構造脂質であるホスファチジルコリンを添加した場合の PEG-Dex 水溶液の相分離にともなう乾燥パターン形成について調査・実験を行った。その結果、脂質添加がない場合と同じ PEG/Dex 組成、濃度条件であっても、脂質添加の有無により、固着液滴の乾燥パターンが著しく変化することを見出した。具体的には、脂質添加がない場合に筋状の乾燥パターンが観察された Dex/PEG 組成の溶液に、脂質を直径 100 nm 程度の二分子膜小胞 (large unilamellar vesicle) として添加し、固着液滴を乾燥させ、蒸発後のパターンを観察した。その結果、筋状のパターンがほとんど消失することを見出した。観察蛍光修飾した PEG および Dex、さらに、蛍光脂質を添加し、乾燥過程を観察したところ、脂質添加の有無により、乾燥にともなう生じる相分離構造に違いがあることが分かった。合わせて、脂質添加の有無により、乾燥初期の接触角にも差があることを見出した。さらに、脂質の添加の有無により、液滴の乾燥スピードに違いが生じるかを調査するために、それぞれの溶液から作成した液滴の乾燥にともなう重量の減少スピードを、精密電子天秤によって計測した。その結果、測定範囲内において、脂質添加の有無による乾燥スピードの明確な差はないことを見出した。これらの結果について、学会や研究会において発表を行った(日本物理学会 2023 年春季大会、定量生物学の会 第十一回年会 (2024) ほか)。現在、他の脂質組成についても同様の検討を行うとともに、上記内容について論文投稿準備中である。

## (3) 固着液滴乾燥相分離過程における溶液内分子流れの可視化

液滴の乾燥過程それ自体、および乾燥過程における流れの可視化について取り組んだ。乾燥過程それ自体の可視化には、ある種の蛍光分子を高分子溶液調製時に混合し、その溶液から固着液滴を作成、蒸発・乾燥する過程を観察した。その結果、乾燥・蒸発過程において蛍光強度の変化が観察され、乾燥・蒸発にともなう液滴の性状変化を可視化できる可能性を見出した。また、乾燥過程の流れの可視化についても、固着液滴の乾燥・蒸発過程で相分離過程にともない生じる球状の相分離ドメインの固着液滴中の動きの観察や、前述の蛍光色素を用いた可視化による手法からも取り組んだ。これらの研究成果の一部についてまとめ、学会等において発表を行った(日本物理学会 2022 年秋季大会ほか)。現在、液滴の乾燥過程の可視化に関する論文の投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Chiho, Furuki Tomohiro, Kanakubo Yuki, Kanie Fumiya, Koyanagi Keisuke, Takeshita Jun, Yanagisawa Miho	4. 巻 4
2. 論文標題 Cell-Sized Confinement Initiates Phase Separation of Polymer Blends and Promotes Fractionation upon Competitive Membrane Wetting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Materials Letters	6. 最初と最後の頁 1742 ~ 1748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmaterialslett.2c00404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Chiho, Yanagisawa Miho	4. 巻 12
2. 論文標題 Evaporation Patterns of Dextran Poly(Ethylene Glycol) Droplets with Changes in Wettability and Compatibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 373 ~ 373
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life12030373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kanakubo Yuki, Watanabe Chiho, Yamamoto Johtaro, Yanagisawa Naoya, Sakuta Hiroki, Nikoubashman Arash, Yanagisawa Miho	4. 巻 3
2. 論文標題 Cell-Sized Confinements Alter Molecular Diffusion in Concentrated Polymer Solutions Due to Length-Dependent Wetting of Polymers	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Materials Au	6. 最初と最後の頁 442 ~ 449
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmaterialsau.3c00018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 高分子-脂質固着液滴の蒸発にともなうパターン形成
3. 学会等名 定量生物学会 第十一回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 in vitro系における液滴形成
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 脂質添加高分子固着液滴の乾燥にともなう相分離
3. 学会等名 日本物理学会2023年春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 in vitro 細胞モデルを用いた相分離の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 ポリエチレングリコール乾燥液滴の外部刺激による結晶化
3. 学会等名 日本物理学会 2022年秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 固着高分子液滴の乾燥と相分離にともなうパターン形成
3. 学会等名 日本物理学会 2021年秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 PEG/Dextran水溶液からなる固着液滴の乾燥と相分離によるパターン形成
3. 学会等名 日本物理学会第77回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 乾燥にともなう高分子溶液の相分離過程
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊千穂
2. 発表標題 乾燥にともなう高分子溶液の相分離ダイナミクス
3. 学会等名 第19回 関東ソフトマター研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学 研究者総覧

<https://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.e93aeb295c335d52520e17560c007669.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------