

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 25 日現在

機関番号：24405

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20512

研究課題名(和文) 光濃縮による細胞内人工液液相分離ツール開拓への挑戦

研究課題名(英文) Challenge toward development an artificial tool for cellular liquid-liquid phase separation by using optical condensation

研究代表者

豊内 秀一 (Toyouchi, Shuichi)

大阪公立大学・研究推進機構・特任講師

研究者番号：40851382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質溶液の気液界面にレーザーを集光照射すると、集光点近傍に過渡的かつ局所的な高濃度ドメインを形成できる。この時空間的に制御された光濃縮を利用し、細胞内液液相分離(LLPS)を人工的に誘起する新規ツールの開発を目指した基礎研究を行った。ニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)をモデルタンパク質とし、光濃縮によってHEWLのLLPS誘起が可能か検証した結果、LLPS微小液滴の形成を確認する事に成功した。細胞内分子クラウディング環境を模倣するため、HEWLとウシ血清アルブミンの混合溶液を光濃縮すると、単一タンパク質溶液と比較して効率的に光濃縮誘起LLPS微小液滴が形成する事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内液液相分離(LLPS)によって形成される非膜オルガネラが様々な生体現象に関わっていることが示され大きな注目を集めている。一方で、LLPSを高い時空間分解能で確実に捉える人工LLPSツールが求められている。本研究で得られた成果は、光濃縮を高時空分解能を有する人工LLPSツールとして利用可能である事を示し、光濃縮誘起LLPSを通じた生化学反応制御さらには細胞操作を可能とする新規光技術へ発展する事が期待できる。観測された光濃縮誘起LLPSは、光濃縮下に特異的なLLPSである事が示唆されており、光濃縮下での生体分子間相互作用の制御に繋がる新しい知見として、今後の研究発展が大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated laser-induced liquid-liquid phase separation (LLPS) of a protein by focusing a laser at the air-solution interface. When a laser is focused on the air-solution interface of a protein solution, a transient and local highly concentrated domain can be formed near the focus point. We conducted basic research to develop a new tool to artificially induce intracellular LLPS by utilizing spatiotemporally controlled optical condensation. Using Hen egg white lysozyme (HEWL) as a model protein, we verified that LLPS could be induced in HEWL solution by optical condensation and succeeded in forming LLPS microdroplets. It has also been shown that when a mixed solution of HEWL and bovine serum albumin underwent optical condensation to mimic the intracellular molecular crowding environment, the optical condensation-induced LLPS microdroplet was formed more efficiently than a single protein solution.

研究分野：物理化学

キーワード：光捕捉 光濃縮 液液相分離

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の体を構成している細胞内では、多種多様な細胞小器官(オルガネラ)が細胞機能の一端を担っているが、はっきりとした区切り(膜)を持たない非膜オルガネラが、遺伝子発現の制御やシグナル伝達などの細胞内制御機構、更にはアルツハイマー病などの神経変異疾患やコロナウイルスの増殖経路に至るまで、様々な生体現象に関わっていること示されてきた。この非膜オルガネラが、核酸やタンパク質などの生体分子を構成因子とする、細胞内液液相分離(Liquid-Liquid Phase separation, LLPS)によって形成される事が明らかとなり、生物分野で大きな注目を集めている。細胞内 LLPS を人工的に誘起することで、細胞内 LLPS が起こるメカニズムや、細胞の持つ複雑かつ高度な機能発現への影響を理解し、さらには細胞の機能制御に繋がる事が期待される。しかしながら、従来の細胞にストレスを与えることで生化学的に LLPS を誘起する細胞任せの方法では、細胞内 LLPS の時空間特性を詳細に解明することは難しく、遠隔的かつ物理化学的に「狙った時間」(高時間分解能)に「狙った場所」(高空間分解能)に LLPS を起こす人工 LLPS ツールが求められている。

一方、光捕捉は、物体に光を集光照射することで、非接触・遠隔的に対象を3次元操作する物質操作技術として、材料科学だけでなく生物分野でも非常に活発に研究が進められて来た。しかしながら、光捕捉においては、アミノ酸やタンパク質といったサブナノから数ナノメートル程度の小さな生体分子には働く捕捉力が弱く、集光点に安定的に生体分子を捕捉することが困難であると考えられてきた。しかし、研究代表者らのこれまでの研究で、リゾチームの重水溶液について、気液界面に光照射を行うと、リゾチーム分子は集光点で安定的に捕捉されないが、集光点付近にリゾチームの高濃度ドメインが形成される事が見いだされていた [P.-W. Yi, S. Toyouchi* et al. J. Phys. Chem. C, 125, 18988 (2021)]。この光捕捉を利用した生体分子の「光濃縮」技術を、高い時空間分解能を有する新規人工 LLPS ツールへと発展させる本計画の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者自身が主導して来た光捕捉による生体分子の光濃縮技術を駆使し、細胞内 LLPS を「狙った位置」かつ「狙った時間」に誘起する新しい人工 LLPS ツールの開拓を目指した基礎的研究を行った。LLPS 現象を、分子集合体から非膜オルガネラへと発展する階層構造から理解し、階層間のつながりやその時間スケールを明らかにする。さらには本研究で得られた知見を基軸とし、光濃縮誘起 LLPS を通した生化学反応制御および細胞操作を可能とする新しい光技術へ発展させる。

3. 研究の方法

まずはこれまでの研究代表者らの研究でも用いてきた ニワトリ卵白リゾチーム(HEWL)重水溶液について光濃縮下での高濃度ドメインの形成過程を詳細に調べた。ここでの実験は、国立陽明交通大学(台湾)とルーバン大学(ベルギー)の協力を得て行った。次に光濃縮技術を、細胞内での人工 LLPS を誘起するツールとして利用する事を目指して、HEWL 緩衝溶液(軽水を使用)について、光濃縮下での高濃度ドメインの形成過程を調べた。さらに、細胞内の多種多様な生体分子が密に混在する分子クラウディング環境を考慮して、HEWL とウシ血清アルブミン(BSA)の混合溶液について調べた。実験は、光濃縮下での LLPS 液滴形成を観測するため、光学透過像および蛍光像測定装置(図1)を研究代表者の所属機関に構築し、光捕捉レーザーの照射開始からタンパク質濃度変化と LLPS 液滴の成長・消失のダイナミクスを追った。

4. 研究成果

HEWL 飽和重水溶液

これまでの HEWL 重水溶液の気液界面における光捕捉誘起高濃度ドメイン形成の研究 [P.-W. Yi, S. Toyouchi* et al. J. Phys. Chem. C, 125, 18988 (2021)] を発展させ、様々な光捕捉レーザー強度や HEWL 初期濃度での光濃縮実験を行い、詳細な高濃度ドメイン形成ダイナミクスを調べた。この結果、HEWL 溶液(200 mg/mL)において(1)光捕捉レーザー照射初期に集光点付近での HEWL 濃度が上昇し、気液界面に薄い HEWL 分子膜が形成・拡大し、(2)光捕捉レーザー照射が継続されると HEWL 高濃度化されたことによって増加した HEWL クラスターが、光捕捉レーザーによって HEWL 分子膜を押し出すよう広がる、2段階の高濃度ドメイン形成・拡大メカニズム(図2)を明らかとし、この成果を APEX に報告した [P.-W. Yi, S. Toyouchi* et al. APEX, 16, 025501 (2023)]。また、HEWL 溶液を光捕捉を用いて高濃度ドメインを形成すると、光照射下ではなく、光照射停止後に HEWL 結晶が現れる事が知られている。この光捕捉誘起結晶のダイナミクスとメカニズムを蛍光分光法及び蛍光画像測定によって調べ、光捕捉誘起結晶を得るための最適条件を明らかにした。さらに、光照射下における HEWL 高濃度ドメインは結晶よりも液相に近い内部構造を有しており、光照射下ではこの液相構造が結晶化を阻害している事を示唆する結果を得て、この成果を J. Phys. Chem. C に報告した [T. Chen, S. Toyouchi, T. Sugiyama, J. Phys. Chem. C, 127, 23340 (2023)]。

HEWL 緩衝溶液

HEWL を緩衝溶液 (10 mM リン酸バッファー、pH 7.0、KCl 150 mM) に溶解し、HEWL 濃度が 100 mg/mL になるように調整した。溶液 12 μ L をカバーガラス上に滴下し、光捕捉レーザー (Nd:YAG、1064 nm、連続発振、100 mW) を対物レンズ (40 倍、NA 0.6) に通して試料溶液の気液界面に集光照射した。図 3A に HEWL 濃度 100 mg/mL の溶液におけるレーザー照射前、照射中、照射後に得られた透過像を示した。実験 1 の HEWL 飽和重水溶液 (タンパク質濃度 375 mg/mL) における結果と同様に、レーザー照射により集光点近傍の透過率が低下し、周辺に白いリングが観測され、微小液滴の形成が確認された。一方、実験 2 では、レーザー強度 100 mW またはタンパク質濃度 100 mg/mL の溶液ではレーザー照射時間 10 分以上でも微小液滴は観測されなかったのに対して、実験 3 では光捕捉レーザー照射開始直後から微小液滴が観測され、細胞内環境により近い条件でより効率的に LLPS 誘起が可能である事が示された。この違いは、実験 3 では重水ではなく軽水を使用しているため、近赤外レーザー照射によって約 2.3 K 程度の温度上昇がある事、または塩 (KCl 150 mM) を添加したことによるタンパク質-タンパク質間での静電相互作用の軽減に起因すると考えている。照射時間が長くなるに伴い、微小液滴は拡大し 15 秒後には直径約 25 μ m にまでに成長した。また、レーザー照射停止すると、1 秒以内に白いリングは観測されなくなり、微小液滴は消失した。一方、微小液滴が消えた後も透過率は 10 秒程度低下したままで、黒い影が観測された。次に蛍光色素 (RhB) で染色した HEWL を 1:1000 の割合で非染色 HEWL に添加し、光濃縮下での蛍光像測定を行った (図 3B)。図 3C に幾つかのレーザー照射時間において得られた蛍光像から、レーザー照射点付近のラインプロファイルを求め、レーザー照射前の蛍光強度で規格化した相対蛍光強度をプロットした。相対蛍光強度はレーザー照射開始から 25 秒程度で約 1.5 倍まで増加し、HEWL が初期濃度から 1.5 倍程度 (約 150 mg/mL) まで濃縮されたことが示された。さらには、レーザー照射 15 秒後以降の断面図を見ると、レーザー照射点を中心とする約 25 μ m の範囲でほぼ一定なトップハット型であった。透過像測定から、微小液滴はレーザー照射約 15 秒で約 25 μ m まで成長していることが分かっているため、光濃縮によって形成された微小液滴の内部では、タンパク質濃度がほぼ一定になっていると考えられる。温度や塩濃度など熱力学的または化学的な変化によって誘起される LLPS では液滴内部のタンパク質濃度が均一である事が知られている。よって、気液界面での光捕捉を利用した光濃縮により、HEWL の LLPS 微小液滴を形成する事に成功した。

HEWL/BSA 混合溶液

次に細胞内の分子クラウディング環境を考慮して、異なるタンパク質として BSA を添加した場合の光濃縮誘起 LLPS 過程を調べた。HEWL と BSA をそれぞれ緩衝溶液 (10 mM リン酸バッファー、pH 7.0、KCl 150 mM) に溶解し、タンパク質濃度が 100 mg/mL になるように調整した。実験 4 の直前に等量混合する事で HEWL と BSA 濃度がそれぞれ 50 mg/mL および HEWL と BSA のトータル濃度が 100 mg/mL となる混合溶液を調整し、実験 1 と同様の実験条件で光濃縮を行った。図 4A にレーザー照射前、照射中、照射後に得られた透過像を示した。実験 5 の HEWL 緩衝溶液における結果と同様に、レーザー照射による集光点近傍の透過率低下が観測され、周辺に白いリングを持つ微小液滴の形成が確認された。レーザー照射時間が長くなるに伴い、微小液滴は拡大し、60 秒後には直径約 85 μ m にまでに成長した。また、レーザー照射停止すると、白いリングは 2~3 秒かけて縮小し、微小液滴は消失した。一方、微小液滴が消えた後も透過率は約 10 秒程度低下したままで、黒い影が観測された。次に実験 6 と同様に RhB で染色した HEWL を添加し蛍光像測定を行った (図 4B)。蛍光強度はレーザー照射開始から約 1.5 倍程度増加し、HEWL が初期濃度から 1.5 倍程度 (約 75 mg/mL) まで濃縮されたことが示された (図 4C)。ラインプロファイルを見ると実験 7 と同様にレーザー照射点を中心とするトップハット型であったため、光濃縮によってタンパク質 LLPS 微小液滴を形成する事に成功したと考えられる。また、単一のタンパク質溶液での光濃縮実験 8 と比較すると、トータル濃度は同じであるにもかかわらず、複数のタンパク質混合溶液での光濃縮では、より効率的な LLPS 誘起が可能である事が示された。

以上、これらの成果は、光濃縮技術を人工 LLPS ツールとして発展させるうえで大きな前進であると考えている。また、実験 9 の光濃縮下で達成される HEWL 濃度 150 mg/mL の溶液では、光捕捉レーザーを照射しない場合、LLPS を観測する事は出来なかった。このため、光濃縮下ではタンパク質が単に濃縮されているだけではなく、通常の熱力学的または化学的に誘起された LLPS とは異なるタンパク質-タンパク質間またはタンパク質-溶媒間相互作用によって、光濃縮下に特異的な LLPS が誘起されている事が示唆される。光濃縮下での生体分子間相互作用の制御に繋がる新しい知見であり、物理化学として今後の研究発展が大いに期待できる。

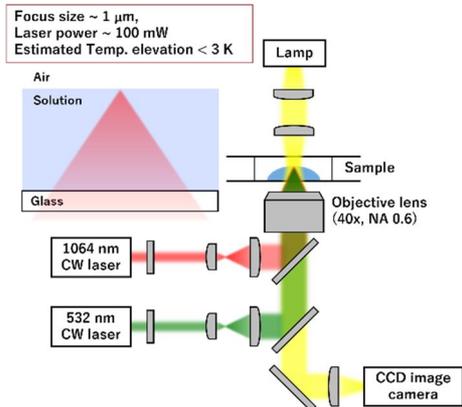


図 1. 構築した光濃縮誘起 LLPS 観測のための透過像・蛍光像測定装置。

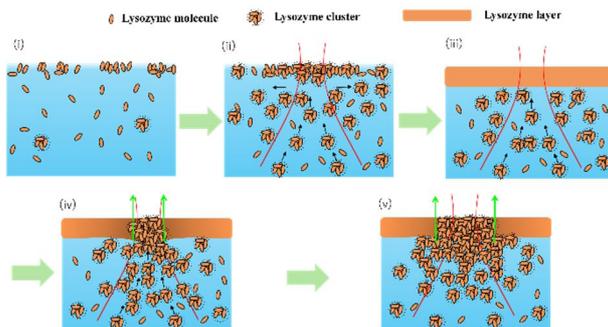


図 2. HEWL 溶液 (200 mg/mL) の光濃縮誘起高濃度ドメイン形成の 2 段階ダイナミクス・メカニズムを示した模式図 [P.-W. Yi, S. Toyouchi* et al. APEX, 16, 025501 (2023)].

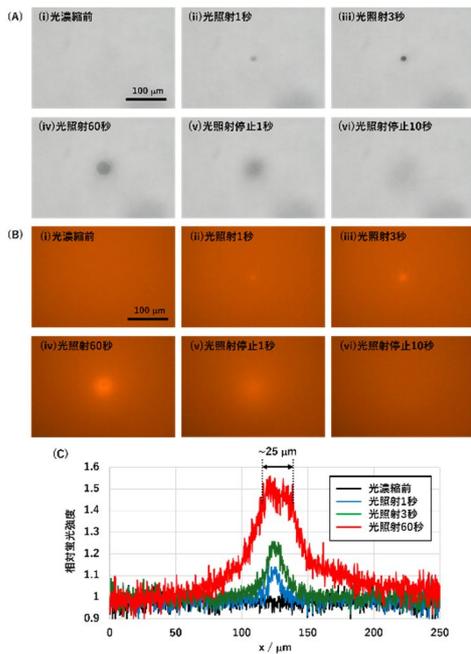


図 3. HEWL 溶液 (100 mg/mL) における光濃縮誘起 LLPS 微小液滴形成。透過像 (A) と蛍光像 (B): 光照射前 (i) 光照射中 (ii, iii, iv) 光照射後 (v, vi) (C) 蛍光像のラインプロファイル。

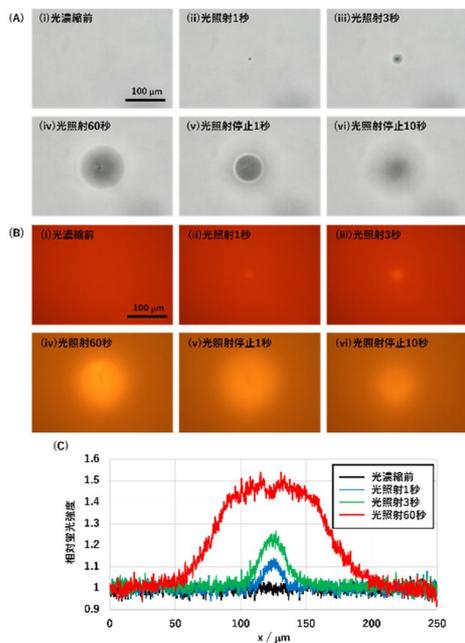


図 4. HEWL(50 mg/mL)/BSA(50 mg/mL)混合溶液における光濃縮誘起 LLPS 微小液滴形成。透過像 (A)と蛍光像 (B): 光照射前 (i) 光照射中 (ii, iii, iv) 光照射後 (v, vi) (C) 蛍光像のラインプロファイル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yi Po-Wei, Chiu Wei-Hsiang, Toyouchi Shuichi*, Bresoli-Obach Roger*, Hofkens Johan, Chatani Eri, Hosokawa Yoichiroh*, Sugiyama Teruki*, Masuhara Hiroshi*	4. 巻 16
2. 論文標題 Two-stage optical trapping and assembling of protein at air/solution interface	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Applied Physics Express	6. 最初と最後の頁 025501 ~ 025501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1882-0786/acb3ab	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 該当する
1. 著者名 Chen Tien, Toyouchi Shuichi, Sugiyama Teruki	4. 巻 127
2. 論文標題 Spectroscopic Analysis of Concentration Dynamics and Crystallization of Hen Egg-White Lysozyme under Optical Trapping Conditions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 23340 ~ 23348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.3c06450	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 該当する
1. 著者名 Peeters Wannes, Toyouchi Shuichi, Fujita Yasuhiko, Wolf Mathias, Fortuni Beatrice, Fron Eduard, Inose Tomoko, Hofkens Johan, Endo Takahiko, Miyata Yasumitsu, Uji-i Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Remote Excitation of Tip-Enhanced Photoluminescence with a Parallel AgNW Coupler	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 38386 ~ 38393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.3c04952	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 該当する
1. 著者名 Feng Guilin, Suzuki Nozomu, Zhang Qiang, Li Jiangtao, Inose Tomoko, Taemaitree Farsai, K. M. Muhammed Shameem, Toyouchi Shuichi, Fujita Yasuhiko, Hirai Kenji, Uji-i Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 A light-mediated covalently patterned graphene substrate for graphene-enhanced Raman scattering (GERS)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 11417 ~ 11420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3cc03304j	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 該当する

1. 著者名 Inose Tomoko, Toyouchi Shuichi, Hara Shinnosuke, Sugioka Shoji, Walke Peter, Oyabu Rikuto, Fortuni Beatrice, Peeters Wannes, Usami Yuki, Hirai Kenji, De Feyter Steven, Uji i Hiroshi, Fujita Yasuhiko, Tanaka Hirofumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Visualizing Ribbon to Ribbon Heterogeneity of Chemically Unzipped Wide Graphene Nanoribbons by Silver Nanowire Based Tip Enhanced Raman Scattering Microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Small	6. 最初と最後の頁 2301841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smll.202301841	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Shuichi Toyouchi
2. 発表標題 Optically Reconfigurable Random Laser using Optically Evolved Assembling of Polystyrene Microparticles
3. 学会等名 2022年第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wei-Hsiang Chiu
2. 発表標題 Cooperative Optical Trapping Dynamics of Two Proteins at Solution Surface
3. 学会等名 2022年第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊内 秀一
2. 発表標題 異種粒子の光圧誘起集合化による 極微量DNA検出
3. 学会等名 新学術光圧ナノ物質操作・若手領域会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊内 秀一
2. 発表標題 異種プローブの光濃縮による迅速・高感度なDNA定量分析法の開発
3. 学会等名 2023年第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Masuhara
2. 発表標題 Two-Stage Optical Trapping Mechanism of Protein at its Air/Solution Interface
3. 学会等名 2023年第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yi-Sian Chien
2. 発表標題 Optical Trapping and Single Droplet Formation of Lysozyme at Solution Surface
3. 学会等名 2024年第71回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Bhagya Lakshmi Sankaramangalam Balachandran
2. 発表標題 Understanding the DNA hybridisation kinetics under optical condensation with simultaneous single particle detection
3. 学会等名 日本化学会第104回春季年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shuichi Toyouchi
2. 発表標題 Heterogeneous Probe Optical Condensation of DNA for Rapid and Sensitive Quantitative Analysis
3. 学会等名 The 14th Asia-Pacific Conference on Near-field Optics (APNFO 14) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 豊内秀一
2. 発表標題 極微量DNAのヘテロプローブ光誘導検出法による定量分析
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuichi Toyouchi
2. 発表標題 Detection of a variety of DNA sequences via optical condensation of multiple-sized particles at the solid-liquid interface
3. 学会等名 The 11th Optical Manipulation and Structured Materials Conference (OMC2024) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			
台湾	国立陽明交通大学			
ベルギー	ルーバン大学			