

「細胞内液滴からのアミロイド核発生機構の解明」

神戸大学理学研究科

茶谷 絵理

1 研究の背景と目的

近年、細胞内でタンパク質や核酸のような生体分子が濃縮し、ストレス顆粒や P 顆粒など、液体状の集合体を形成する現象に注目が集まっている。この集合体は「液滴」、もしくは、脂質二分子膜で区画化されていないにも関わらずオルガネラのように特定の生体分子を特定の箇所に局在化させることから「膜の無いオルガネラ」と呼ばれる。実際に、液滴は細胞内骨格の動的な変化、環境に応じた転写反応、代謝反応など、生理機能に欠かせない様々な反応の促進や調節に関わっており、特定の生体分子を必要な時に必要な部位へと動的に局在させる手段として重要な機能を持つと考えられている。

その一方で、液滴の内部のタンパク質濃度は非常に高く、凝集のリスクと表裏一体である。実際に、液滴は経時的に固体状態へと転移（老化）し、本来の流動性と可逆性を失う。さらには、その中からアミロイド線維が出現し、神経変性疾患を進行させる場合もある。このように細胞内において液滴は、タンパク質の凝集リスクを負いつつタンパク質の濃縮機能を果たしていることが考えられる。しかし、液滴が異常化した際に、液滴の内部ではどのような変化が起きることアミロイド線維の出現（核発生と呼ぶ）に至るのかについては十分に把握されていない。

そこで本研究では、液滴の老化およびアミロイド線維出現の分子メカニズムの解明を目指し、試験管内で人工作製した液滴を用いて、その内部で起きる老化およびアミロイド線維が出現するまでのプロセスを観察することを目的とした。対象タンパクには、シナプス機能の調整や可塑性に関連し、レビー小体型認知症やパーキンソン病などの発症時には液滴からアミロイド線維が形成すると考えられている α シヌクレインを選択し、以下の解析を実施した。

2 研究方法・研究内容

まず、観察対象とする液滴の作製方法を検討した。液滴を試験管内で生成させるために用いられる最も簡便なものには、高分子クラウダーの排除体積効果を利用して液-液相分離状態を誘起する方法がある。 α シヌクレインの場合にも、ポリエチレングリコールを添加することで液滴が生成することが報告されているため、我々も本手法を用いて液滴を生成し、老化の過程を調べた。その結果、チオフラビン T をプローブとした解析により、液滴を介したアミロイド線維の生成を確認することが出来たが、顕微鏡下で液滴毎の観察を行おうとしても、液滴が多数試料中を動き回り、時に融合してサイズ変化も起こすために、個々の液滴の変化を詳細に把握するのは困難であった。そこで、液滴の形成の形成を時空間的に制御しながら形成させるための方法の開発を行うことにした。

その手段として、本研究では、集光近赤外レーザーによる「光圧」を用いることにした。光圧とは、光が物質と相互作用し発生する力学的な力のことである。本研究ではこれを利用し、集光した近赤外レーザーの照射によって α シヌクレイン液滴を形成させることを試みた。実験装置には、1064 nm の近赤外レーザーを搭載した倒立型顕微鏡を用い、対物レンズ (60 倍, 開口数 0.9) を通して α シヌクレイン溶液表面に集光した。近赤外レーザーの集光位置は 633 nm のレーザーにより確認した。近赤外レーザーの強度は 1.0 W を基本とし、集光中に試料温度が上昇することを避けるために、 α シヌクレイン溶液を調製する際には軽水ではなく重水を用いた。基本的な試料組成は、200 μ M α シヌクレイン、25 mM Tris-DCl (pD 7.4)、100 mM NaCl、および 7.5% PEG とした。液滴の形成およびその後の状態の追跡には明視野画像のほかに、ローダミン標識 α シヌクレインを用いた共焦点蛍光イメージングを用いた。さらに、液滴の老化を追跡するために、光退色後蛍光回復 (FRAP) 法、共焦点ラマン分光法、チオフラビン T を用いた共焦点蛍光イメージングを用いた。ローダミン蛍光イメージングでは 1 mW の 532 nm 励起レーザー、チオフラビン T 蛍光イメージングでは 1 mW の 405 nm 励起レーザー、共焦点ラマン分光では 50 mW の 532 nm 励起レーザーを用いた。さらに、液滴の老化が観察された後には、試料を回収し、透過型電子顕微鏡観察を行うことによりアミロイド線維の生成を確かめた。

3 研究成果

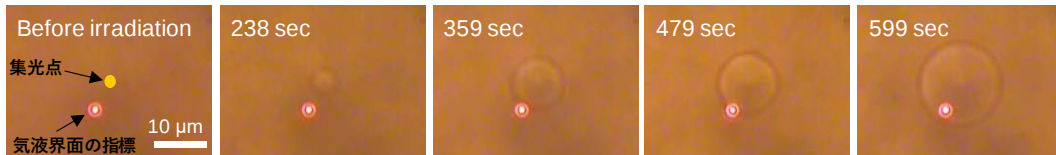
3-1 近赤外レーザー集光による液滴の形成誘導

捕捉対象である粒子が光照射によって得る光圧の強度は、誘電率とサイズに依存する。そのため、集光近赤外レーザーでトラッピングされるのは、一般的にマイクロメートルサイズを持つ誘電体である。これに対してタンパク質分子は、誘電率が溶媒である重水と類似しているうえにサイズもナノスケールと小さく、原理的にはトラッピングが困難であると予想される。ところが α シヌクレインの重水溶液に近赤外レーザーを集光すると、集合体の形成が明瞭に確認された。さらにその後の成長は、レーザー焦点にとどまらず、その範囲を大きく超えて進行した (図 1)。但し、トラッピングの進行にはポリエチレングリコールが必要であり、低濃度で添加した場合にのみ集合体の形成が見られた。FRAP 解析では、その内部構造は液体状であること、また、ローダミン標識を用いた共焦点蛍光イメージングでは、液滴内部に α シヌクレインが数 mM にまで濃縮されていることが確認された。さらには、レーザーを切ると液滴は消失するという可逆性も確認された。

液滴の出現および成長速度は、照射するレーザーの強度だけでなく、試料中に含まれるタンパク質濃度やポリエチレングリコール濃度によっても大きく左右された。このことから、光圧によりトラッピングされたのは α シヌクレイン分子単体ではなく、過渡的に会合することにより生成するクラスターである可能性が示唆された。また、光圧による液滴の形成誘導は気液界面特有のものであり、液中や固液界面では確認することができなかった。光圧による液滴形成の分子メカニズムは検討の最中であるが、液滴中心から端に向かってタンパク質濃度の勾配が見られることから、 α シヌクレインが光圧により集光点へと汲み上げられた後、気液界面での拡散が抑制されることな

どによって形成に至ったことが考えられる。さらには、 α シヌクレインの持つ分子間の相互作用性も寄与し、やがてレーザー焦点を超えて時間とともに成長が進むと考えられるが、詳細なメカニズムの理解は今後の課題である。

明視野画像



共焦点蛍光画像（ローダミン）

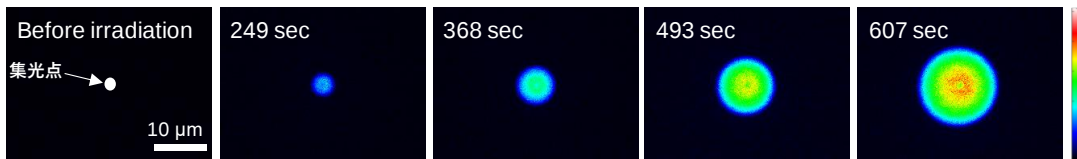


図 1. 集光近赤外レーザーによる α シヌクレイン液滴の形成と成長
(発表論文より引用し改変した)

3-2 光圧誘導液滴を用いた老化とアミロイド線維形成の観察

さらに興味深いことに、近赤外レーザーの集光を継続すると液滴はやがて変形し可逆性が失われることが判明した。これは、光圧は液滴の形成のみならず、その後に起きる老化も誘導することを示唆する。すなわち光圧は、液滴をレーザー集光点に任意のタイミングで形成させ、さらに老化も誘導することが可能な駆動力であり、今後、一つの液滴に注目した老化およびアミロイド線維形成プロセスの観察を実現する手段となることが期待される。

老化のプロセスについては、明視野顕微鏡画像とチオフラビン T をプローブとした共焦点蛍光顕微鏡画像、共焦点ラマン分光法の組み合わせにより追跡した（図 2）。明視野顕微鏡では、先述のとおり液滴の変形が見られ、やがて集光焦点付近から棒状の凝集体が出現した。このとき、レーザー集光を停止させた後にも液滴は消失しなかったことから、液滴内部が固体状態へと変化したことが分かった。同時に、共焦点ラマン分光法により液滴の中心部の構造状態を追跡したところ、液滴内部のタンパク質分子が β シートを多く含む構造に変化したことが判明した。これに加え、チオフラビン T 蛍光を用いたイメージング解析では、上述の構造および形状の変化とともに、中心部から徐々に蛍光強度が上昇する様子を示し、アミロイド線維の形成が起きていることを示唆した。実際に凝集物を回収して透過型電子顕微鏡観察を行うと、アミロイド線維の存在が明確に確認されたことから、一連の変化は、液滴の老化とアミロイド線維の生成のプロセスを捉えていると考えられる。今後は本手法を活用し、より詳細な老化機構の解明に進む予定である。

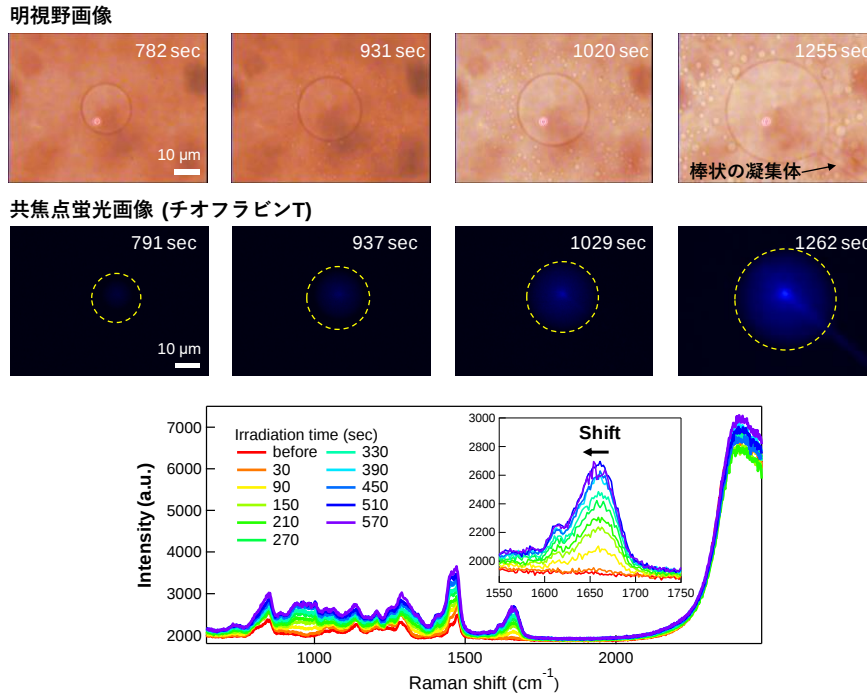


図2. (上) 継続的なレーザー照射により確認された液滴の老化とアミロイド生成と、(下) ラマン散乱スペクトルによるアミロイド生成過程のモニタリング
(発表論文より引用し改変した)

4 生活や産業への貢献および波及効果

以上の成果は、光圧により液滴を時空間的に制御することが、液滴の内部が老化しアミロイド線維形成に至るまでのプロセスを一液滴レベルで調べるための強力な手法になることを強く示す。今後 α シヌクレインの老化プロセスをより明確化し、異なるタンパク質についての研究も発展的に進めば、神経変性疾患の発症に至るまでの液滴内部の変化の実態解明やコントロール法の開発につながり、疾病の予防や治療に役立つことが期待される。さらには、細胞内で液滴を時空間的に操る手段としても光圧を利用できる可能性も考えられ、新規な生命操作手法方面の展開も期待できる。

【発表論文】

Keisuke Yuzu, Ching-Yang Lin, Po-Wei Yi, Chih-Hao Huang, Hiroshi Masuhara, and Eri Chatani

“Spatiotemporal formation of a single liquid-like condensate and amyloid fibrils of α -synuclein by optical trapping at solution surface”

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **121**, e2402162121 (2024)