

「光圧を用いたタンパク質液滴の時空間制御とダイナミクス解析」

神戸大学大学院理学研究科 柚 佳祐

## 1 研究の背景と目的

生物学的液-液相分離とは、タンパク質や核酸などの生体高分子が弱い相互作用によって集合し、液状の凝縮体（液滴）を形成する現象である。液滴は様々な細胞小器官で過渡的に生成し、生体高分子を必要な時に必要な場所に局在させる手段として機能している。液滴は物質輸送や代謝、オートファジーなど様々な生体内プロセスの駆動や調節に関与する一方で、疾患の原因となるアミロイド線維の発生場となることも判明しており、液滴の生成及び老化機構に注目が集まっている。

液滴形成が生体機能に与える影響の解明を指向して、様々な研究が行われている。液滴を人為的に形成させる手段として、現在は高分子クラウダーの添加が主流である。しかし、この方法では液滴の生成場所、タイミング、個数および動きなどを制御することができず、液滴のマイクロレベルでの解析は極めて困難である。したがって、液滴の詳細なダイナミクス解析を行うためには、液滴形成を一液滴レベルでかつ時空間制御する方法の確立が重要である。

我々はタンパク質の液滴形成を駆動する手法として光捕捉に着目した。光捕捉とは、光が物質と相互作用し発生する力学的な力（光圧）によって微小粒子をレーザー集光点に捕捉する技術である。集光レーザーによって粒子が受ける光圧は主に屈折率とサイズに依存するため、基本的に光捕捉の対象はマイクロメートルサイズの誘電体である。これに対して、タンパク質分子はナノメートルサイズであり、屈折率も溶媒の水と類似していることから、通常光捕捉の対象外であった。我々は最近、 $\alpha$ シヌクレインを実験対象として、光捕捉を用いた集光点における液滴形成を見出した。この知見は、天然変性領域および低複雑性配列を有し、多価的に分子間相互作用するタンパク質を用いた場合では、液滴形成条件近傍ではタンパク質の微小クラスターが形成され、光捕捉が促進されることを示唆している。そこで本研究では、光捕捉を用いたタンパク質液滴形成の時空間制御技術の更なる開拓を目的として、以下の研究を実施した。

## 2 研究方法・研究内容

本研究では、タンパク質液滴形成を誘導する手段として光捕捉を用いる。我々の光学系では、波長 1064 nm の近赤外連続発振レーザーを倒立型顕微鏡に導入し、対物レンズ（60 倍、開口数 0.9）を通して実験試料に集光レーザーを照射する。レーザーは顕微鏡導入前に二つの球面平凸レンズを用いてビーム径調整と平行化を行った。レーザー強度は 1/2 波長板と偏光ビームスプリッターを用いて調節した。特に明記しない限り、基本的に対物レンズ通過後のレーザー強度が 1.0 W になるよう設定した。また捕捉用レーザーの集光位置を確認するため、He-Ne レーザーも顕微鏡に導入した。近赤外レーザーの集光による実験試料溶液の発熱を抑えるため、特別な場合を除いて溶媒には重水を用いた。

まず初めに、光捕捉によるタンパク質液滴形成の一般性を確かめるため、タウを実験対象として液滴形成を試みた。タウは主に脳に発現する微小管結合タンパク質であり、タウの線維化は神経変性疾患の原因となることが知られている。 $\alpha$ シヌクレインと同様に、タウは細胞内で液滴を形成することが報告されており、特に液滴の老化による液滴内部でのアミロイド線維化が注目を集めている。したがって、タウ液滴の形成を時空間制御することは、今後タウ液滴の物理化学的研究を進める上で有効な手段となる。タウは試験管内で分子クラウダーの添加によって自発的に液滴形成するが、本研究ではその近傍の条件 (10  $\mu$ M タウ、30 mM Tris-DCl (pD 7.4)、150 mM NaCl、2 mM DTT、5% PEG) を基本的な溶液組成として用いて、光捕捉による液滴形成を試みた。

次に、より低強度のレーザー集光によるタンパク質液滴形成を指向して、軽水溶媒中での  $\alpha$ シヌクレイン液滴形成を調べた。実験試料溶液を重水溶媒から軽水溶媒に変更することで、近赤外レーザーの集光点における温度上昇が生じる。集光点付近に発生する温度勾配が光捕捉に与える影響については、複数の物理現象が絡み複雑であるが、条件によっては微粒子の光捕捉が促進されることが報告されている。本研究では軽水試料中 (200  $\mu$ M  $\alpha$ シヌクレイン、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM NaCl、7.55% PEG) において光捕捉を実施し、集光点での温度上昇が  $\alpha$ シヌクレインの光捕捉に与える影響を調べた。また軽水環境において液滴が形成するレーザー強度条件の探索を行った。

### 3 研究成果

#### 光捕捉によるタウの液滴形成誘導

我々の先行研究では、試料溶液の表面 (気液界面) に近赤外レーザーを集光することで、 $\alpha$ シヌクレイン液滴形成の時空間制御に成功している。溶液中や固液界面に対してもレーザーを集光したが、 $\alpha$ シヌクレイン液滴の形成は現時点では観察されていない。これらの知見を踏まえ、まずタウ溶液の気液界面にレーザーを集光し、タウ液滴の形成を試みた。レーザー照射開始から誘導時間を経て集光点付近に集合体が形成し、さらに集合体は経時的に集光範囲を超えて成長することが観察された (図 1)。また集合体の成長途中でレーザー照射を停止すると、集合体は徐々に縮小し消失することから、集合体は流動性を有する液滴であることが示された。タウは  $\alpha$ シヌクレインと同様に天然変性タンパク質であり、低複雑性配列も有するため、多価的に分子間相互作用しやすい。我々が今回用いた溶液組成は自発的なタウ液滴形成が生じる条件の近傍であり、溶液中でのタウの微小クラスターの形成が光捕捉の促進に寄与していると考えられる。

一方で、 $\alpha$ シヌクレイン液滴と比較すると、タウの場合は液滴の縁が明瞭ではなく、液滴内外でのタンパク質濃度差が小さいことが予想された。現在蛍光色素でラベルしたタウを用いて、共焦点蛍光観察により液滴内でのタウ濃度の定量を試みている。タウがより高度に濃縮された液滴を形成させるために、様々なタンパク濃度や塩濃度の試料溶液に対してレーザーを照射したが、図 1 よりも明瞭な液滴形成は現時点で観察されていない。また光捕捉によるタウ液滴は比較的不安定な挙動にな

る場合が多く、液滴内部で凝集のような小さい集合体が形成し液滴外に放出される、液滴自体が集光点外へ移動するなどの現象が観察された。試料溶液中の流れによる拡散や、タウ分子間の相互作用の不安定さが懸念される。安定したタウ液滴が形成する条件の確立は今後の課題であり、試料調製の方法や溶液組成の最適化の検討を進めていく。



図1. 光捕捉によるタウ液滴の形成

### 軽水環境での $\alpha$ シヌクレイン液滴形成の促進

まず我々の先行研究と同じ高強度 (1 W) の近赤外レーザーを軽水試料溶液の気液表面に集光した。レーザー照射開始直後、集光点に集合体が形成し、さらに集合体の急激な成長が観察された。これより軽水環境では  $\alpha$  シヌクレインの光捕捉が促進されることが示された。この現象は集光点付近での軽水試料の温度上昇 (おおよそ十数°C程度と見積もられる) に起因することが示唆される。その一方で、形成した集合体はレーザー照射の停止後も解消しなかったことより、集合体は固体であることが確認された (図2)。

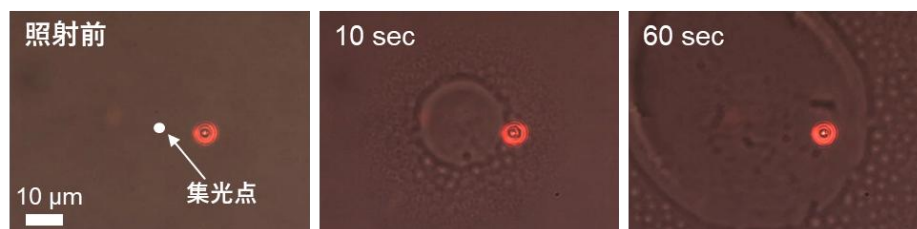


図2. 軽水環境での光捕捉による  $\alpha$  シヌクレイン集合体形成

そこで、軽水環境で  $\alpha$  シヌクレイン液滴が形成する条件を見出すため、低強度のレーザーを試料溶液に集光した。予想通り、集光点における集合体形成はレーザー強度の低下によって遅延することが確認された。また 200 mW まで強度を下げた条件において、以前の重水環境で見られたものと類似した集合体が集光点付近に誘導時間を経て生成した (図3)。この集合体はレーザー照射を停止すると解消したため、液滴であることが示された。軽水環境では、光圧だけではなく、温度上昇による効果も光捕捉に寄与するため、より低強度レーザーの集光でも液滴形成が可能となったと考えられる。

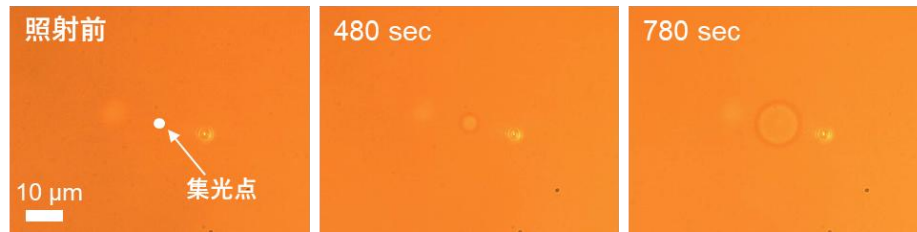


図3. 軽水環境での光捕捉による $\alpha$ シヌクレイン液滴形成

さらに $\alpha$ シヌクレイン液滴形成までの誘導時間に対する軽水濃度およびレーザー強度依存性を測定したところ、軽水濃度およびレーザー強度の増加に伴い誘導時間の短縮が観察された。分子クラウダーの添加によって自発的に生成した $\alpha$ シヌクレイン液滴に関する先行研究では (Ray et al., *Nat. Chem.* 15, 1306 (2023)), 温度の上昇に伴って液滴が解消することが報告されており、温度上昇自体は $\alpha$ シヌクレイン液滴の形成にとって不利であることが判明している。これらを総合すると、集光点における温度上昇による付加的な効果によって光捕捉が促進されることが強く示唆される。温度上昇による対流の発生が一つの要因として考えられるが、詳細なメカニズムは不明であり、今後の重要な研究課題となる。また重水及び軽水環境下で形成する液滴が同等の性質を有するか否かを明らかにする必要がある。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究では、光捕捉を用いたタンパク質液滴の形成、および軽水環境での $\alpha$ シヌクレインの光捕捉の促進について明らかにした。タンパク質液滴形成の時空間制御法が十分に確立されていない状況下で、これらの成果は光捕捉がタンパク質液滴を一液滴レベルで解析するための基盤技術になり得ることを示唆する。今後光圧によるタンパク質の光捕捉ダイナミクスの詳細な解析を進め、様々なタンパク質や実験系に対して本手法の適用を目指す。これにより生物学的液-液相分離の重要な物理化学的知見が得られることを期待する。またタンパク質液滴は神経変性疾患の原因であるアミロイド線維の発生場として注目されていることから、本手法は基礎医学研究に対する貢献も期待される。