

研究終了報告書

「細胞モデルからみる疾病の時空間デザイン」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：渡邊 千穂

1. 研究のねらい

本研究は、細胞内における液液相分離(liquid-liquid phase separation, LLPS)を引き起こす分子とマイクロ構造のデザインを細胞モデル研究から提案することを目的とした。さらに、ここで明らかにした分子とマイクロ構造のデザインから、認知症をはじめとする神経変性疾患に特徴的な凝集体形成の時空間デザインを明らかにすることを目指した。神経変性疾患のメカニズムを、細胞モデルを用いて突き止められるのではないかと考え、研究構想に至った。研究者は、博士課程でアルツハイマー病の原因と目されるアミロイドβペプチド凝集体と脂質膜組成の相関を、細胞膜モデルを用いて明らかにした(Watanabe et al., J. Coll. Int. A., 2016)。この相関は使用する物質が既知であるシンプルなモデル膜を用いたからこそ明らかにできたことである。さらに、博士研究員では、細胞膜だけでなく、細胞内部の分子混雑もモデル化した高分子マイクロ液滴を細胞モデルとして用いて、マイクロな空間への高濃度高分子溶液の閉じ込めが分子拡散に与える影響を蛍光相関分光法(FCS)により明らかにした(Watanabe, Yanagisawa, PCCP, 2018)。マイクロな閉じ込め空間はナノメートルスケールの分子サイズに比較して3桁も大きい。高分子混雑環境下では影響を与える。

真核細胞では、細胞内は高濃度の生体高分子溶液で満たされているだけでなく、脂質膜に覆われたマイクロな膜構造がいたるところに存在している。このような膜構造が分子拡散を変化させるとの報告(Li et al., JACS, 2015)があることから、近年、神経変性疾患との関わりが指摘されているLLPSが、膜によるマイクロな閉じ込め構造によって誘導されているのではないかと、この仮説を立てた。それゆえ、細胞内相分離を引き起こす要因を脂質膜によるマイクロ空間への閉じ込めの観点から分子拡散測定を通して明らかにするとともに、神経変性疾患に特徴的な脂質組成・タンパク質を用いた細胞モデルを作製し、凝集体形成の時空間デザインと脂質膜組成との相関を明らかにするとともに、凝集体物性(液体的か、固体的か?)との相関解明を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

【細胞モデル中での分子拡散】

脂質一分子膜で覆われた高分子マイクロ液滴を細胞モデルとして用い、閉じ込めサイズと分子拡散の相関、および分子拡散の混雑分子種に対する依存性を調査した。数百 mg/mL といわれる細胞質における高分子混雑を、ポリエチレングリコール(PEG)を用いてモデル化、生体膜の構造脂質として知られるホスファチジルコリンの一種 POPC の膜内に閉じ込めた液滴を作成した。様々な液滴サイズ中での分子拡散を蛍光相関分光法(FCS)により測定した結果、小さな細胞モデル中において、分子拡散が低下することを明らかにした。同様の実験を異な

る混雑分子を用いて行い、膜閉じ込めサイズと分子拡散が相関すること、その相関は混雑分子種に依存しないことを見出した。さらに、分子拡散に対する閉じ込め効果のうち、(i)微小体積、(ii)膜からの距離、(iii)膜表面積/体積比のどれかを明らかにするために、液滴をディスク状にした系を開発、測定することで、(iii)膜表面積/体積比の効果が大きいことを示した。この結果に基づき、分子拡散に対する膜界面の効果を詳細に調査するために脂質膜組成と分子拡散の相関を調査した。POPC 膜に対し、PEG により頭部を修飾された脂質(PEG 脂質)の添加の有無により、分子拡散の閉じ込めサイズ依存性および内部高分子溶液の混雑度との相関が変化することが明らかにした。これらの結果から、分子拡散の低下は小さな閉じ込め中における分子のクラスター化が要因であることを示唆した。

【細胞モデル中での相分離】

ミリリットル(mL)量のバルク溶液や大きな閉じ込め中では相分離しない高分子混合水溶液が、ピコリットル(pL)量の細胞サイズ閉じ込め中では相分離することを、PEG-BSA、PEG-デキストラン混合水溶液系において見出した。後者の系から、閉じ込めサイズ依存的に高分子の分配が異なること、同程度のサイズの液滴においては、閉じ込め膜に PEG 脂質を添加することにより PC 膜のみの場合に比べ相分離ダイナミクスが2倍以上速くなることを見出した。

【細胞モデル中でのタンパク凝集過程と物性】

特徴タンパク質として、神経原繊維変化の主成分をなすタウタンパク質のうち、膜の相互作用が知られている2N4Rを用意した。細胞モデル中における凝集体形成をチオフラビンT蛍光や偏光顕微鏡観察から、凝集の閉じ込めサイズ依存性を明らかにするとともに、光褪色後蛍光回復法(FRAP)測定から相分離ドメインの物性を明らかにしていく(実験準備中)。

(2) 詳細

研究テーマ 1「細胞モデル中での分子拡散」(成果論文 1、2)

脂質一分子膜で覆われた高分子マイクロ液滴を細胞モデルとして用い、閉じ込めサイズと分子拡散の相関、および分子拡散の混雑分子種に対する依存性を調査した(成果論文 1、2)。さらに、分子拡散に対する閉じ込め効果のうち、(i)微小体積、(ii)膜からの距離、(iii)膜表面積/体積比のどれかを明らかにするために、液滴をディスク状にした系を開発した(図 1、成果論文 1)。

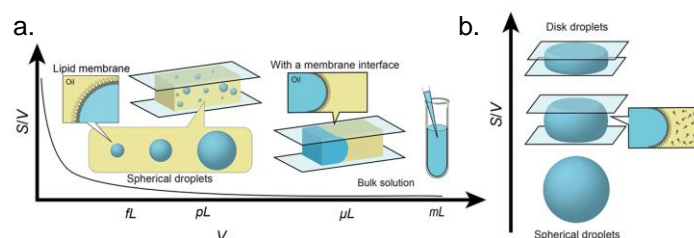


図1. 体積、膜表面積/体積比(S/V)を変えられる高分子液滴の模式図。Reprinted with permission from *The Journal of Physical Chemistry B* 2020 124(6), 1090-1098. Copyright 2020 American Chemical Society.

100–300 mg/mL といわれる細胞質における高分子混雑を、血清タンパク質 (BSA) および鎖状水溶性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) を用いてモデル化、生体膜の構造脂質として知られるホスファチジルコリンの一種 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) の膜内に閉じ込めた液滴を作成した。様々な液滴サイズ中での分子拡散を蛍光相関分光法 (FCS) により測定した (図 2)。

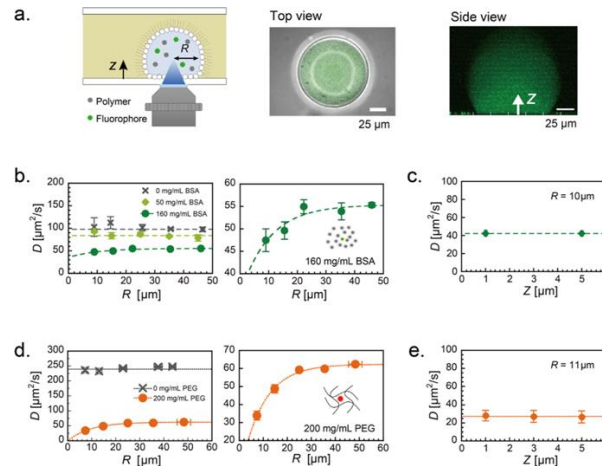


図 2. (a) 細胞モデル中での FCS 測定模式図 (左) 液滴を上から (中央) 側面から (右) 観察した図。(b) 様々な BSA 濃度における液滴サイズ R の GFP 拡散係数 D への依存性 (左) と、160 mg/mL BSA 溶液に対応する拡大図 (右)。(c) 160 mg/mL BSA-GFP 系での $R = 10 \mu\text{m}$ 液滴中 D の z 位置依存性。(d-e) b, c に対応する実験の 200 mg/mL PEG を用いた結果。

Reprinted with permission from *The Journal of Physical Chemistry B* 2020 124 (6), 1090–1098.
Copyright 2020 American Chemical Society.

その結果、半径 $20\text{--}30 \mu\text{m}$ 以下の小さな細胞モデル中において、混雑分子によらず、分子拡散が低下することを明らかになった。この結果は多糖類であるデキストランで再現した場合においても同様であった (成果論文 2)。以上から、小さな細胞モデル中において分子拡散が低下することを明らかにし、膜閉じ込めサイズと分子拡散が相關すること、その相関は混雑分子種に依存しないことを見出した。さらに、分子拡散に対する閉じ込め効果のうち、(i)微小体積、(ii)膜からの距離、(iii)膜表面積/体積比のどれかを明らかにするために、液滴をディスク状にした系を開発、球状の細胞モデルと同体積条件下において分子拡散を比較した (図 3)。その結果、ディスク状の細胞モデル中での分子拡散は球形の細胞モデル中に比べ有

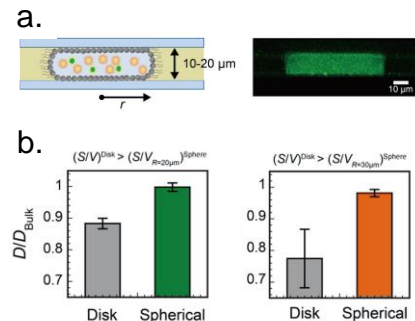


図 3. (a) ディスク状液滴の模式図 (左) と顕微鏡画像 (右)。(b) ディスク状、球状液滴の同体積条件下における規格化分子拡散係数の比較。左は 160 mg/mL BSA、右は 200 mg/mL PEG による結果。Reprinted with permission from *The Journal of Physical Chemistry B* 2020 124 (6), 1090–1098. Copyright 2020 American Chemical Society.

意に低下することが明らかになり、膜閉じ込めによる分子拡散制御において、膜表面積/体積比の効果が大きいことを示唆した(図3)。

これらの結果に基づき、分子拡散に対する膜界面の効果を詳細に調査するために脂質膜組成と分子拡散の相関を調査した。POPC 膜に対し、ポリエチレングリコールにより頭部を修飾された脂質(PEG 脂質)の添加の有無により、分子拡散の閉じ込めサイズ依存性および内部高分子溶液の混雑度との相関が変化することが明らかにした(図4、研究成果2)。PEG 脂質の添加により、POPC のみでは分子拡散の低下が見られなかった高分子溶液濃度(17 wt%)においても分子拡散の低下が観測された。一方で、高分子濃度をさらに上昇させることにより、分子拡散の低下の度合いが抑えられることを明らかにした(23、29 wt%を比較)。

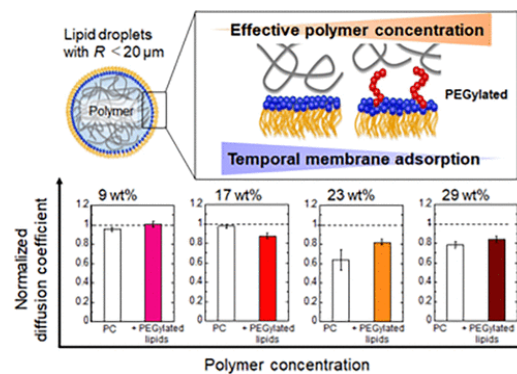


図4(上)液滴(左)および脂質組成変化に伴う内部高分子と膜界面相互作用(右)の模式図、(下)内部高分子溶液濃度の変化に伴う規格化分子拡散係数の脂質組成による違い。Reprinted with permission from *Langmuir* 2021 37(1), 437-444. Copyright 2020 American Chemical Society.

この非単調な分子拡散の変化は、PEG 脂質膜界面もつ、(i)水分子の捕捉効果による内部高分子溶液の実効的な濃度の上昇および(ii)膜界面への高分子吸着の抑制の2つの効果が、内部の高分子濃度依存的に現れた結果と解釈している。さらに、POPC のみの膜で観測された小さな液滴における分子拡散の低下も、膜界面による水分子の捕捉や排除体積効果などにより、液滴内部の実効的な高分子濃度が上昇し、分子同士がクラスターを形成することで、見かけの拡散係数が小さくなるのが要因となっている可能性を考えている。

以上のように、当初の目的閉じ込めサイズと分子拡散の相関、および分子拡散の混雑分子種に対する依存性の2点に加え、閉じ込め効果の幾何的な背景、脂質膜組成と分子拡散との相関を明らかにできた。

研究テーマ 2「細胞モデル中での相分離」

(成果論文 1、3、投稿中)

ミリリットル (mL) 量のバルク溶液や大きな閉じ込め中では相分離しない高分子混合水溶液が、ピコリットル (pL) 量の細胞サイズ閉じ込め中では相分離することを、PEG-BSA (図 5、成果論文 1)、PEG-デキストラン混合水溶液系 (投稿中、bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.23.485531>) において見出した。また、ガラス基板上で PEG-デキストラン混合水溶液系を乾燥させることで、特異な筋状のパターンが形成されることを見出した (成果論文 3)。

研究テーマ 3「細胞モデル中でのタンパク凝集過程と物性」(実験準備中)

特徴タンパク質として、神経原繊維変化の主成分をなすタウタンパクの 6 つのアイソフォームのうち、膜とインタラクションすることが報告されている 2N4R の野生型と P301S ミュータント型を用意した。細胞モデル中における凝集体形成をチオフラビン T 蛍光や偏光顕微鏡観察から、凝集の閉じ込めサイズ依存性を明らかにするとともに、光褪色後蛍光回復法 (FRAP) 測定から相分離ドメインの物性を明らかにする (実験準備中)。

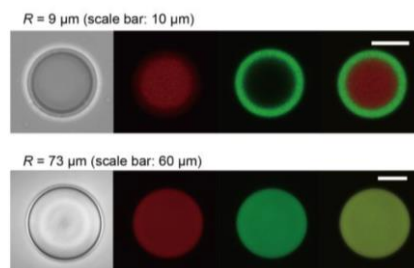


図 5. 半径 $9 \mu\text{m}$ (上) および $73 \mu\text{m}$ (下) の PEG-BSA 混合溶液を閉じ込めた液滴。小さな液滴でのみ、相分離が観察された。Reprinted with permission from *The Journal of Physical Chemistry B* 2020 124 (6), 1090–1098. Copyright 2020 American Chemical Society.

3. 今後の展開

これまでの研究成果を踏まえて、まずは研究テーマ 3 の実施を行う。研究テーマ 2 の結果から小さな膜閉じ込めが特定の高分子が高濃度に存在する状態をもたらすことを示唆しており、神経変性疾患でみられる凝集体形成にも関与するメカニズムであると考えている。さらに、1) 脂質膜組成、2) 細胞質などの溶液画分に存在する溶解性の高い生理活性脂質と凝集体形成との相関も明らかにしていきたい。加えて、これまでの研究に用いてきた脂質一分子膜の高分子液滴だけではなく、より生体膜に近い構造をもつ脂質二分子膜をもつ高分子リポソームの形成を確立し、脂質ラフトをモデル化した膜内ドメインや、浸透圧と凝集体形成の相関を探りたい。真核細胞のオルガネラ膜による膜混雑を再現した「膜 in 膜」系の確立を行い、膜とミクロな空間による凝集体形成メカニズムに迫りたい。さらに生命医科学研究者とのネットワーク形成にも努め、得られた知見の社会実装の可能性を探っていきたい。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

2022年3月現在、研究テーマのうち、1について成果論文が3報(うち一報は総説)得られた。テーマ2については、出版にむけて準備を進め、投稿中(bioRxiv, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.03.23.485531>)である。合わせて、モデルに用いる高分子水溶液の基礎的な実験として、

成果論文3を責任著者として出版した。テーマ3については、現在実験環境を構築し、サンプルの準備を進めており、実験実施と結果の取得を目指している。新型コロナウイルスの感染拡大による影響、異動にともなう研究環境変化等により、当初目指していた達成状況は時間的には遅れてしまっているが、このまま研究をつづけ、目的の達成を目指したい。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

前所属では当時の上長とその学生とともにいき、現所属に異動してからは研究室の実験環境の立ち上げから実験まで、研究者本人が実施する体制で行った。現所属では着任後約半年で独立ポジションとなり、計画の実施に必要な研究設備が全くなかったことから、顕微鏡や試薬、一般消耗品などの研究設備・資材を購入し、実験可能な環境を整えるために研究費を執行した。基本的な環境整備に対し予定以上に研究費が必要となったため、増額をお認めいただいたことは研究を続けていく上で非常にありがたく、感謝している。2022年3月現在、残額はなく、研究費の執行は順調であるといえる。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

脂質膜によるミクロな閉じ込めが、内部の高濃度高分子溶液の分子挙動(分子拡散、相分離)に影響を与えることを明らかにした本研究成果は、今後の細胞モデル中での凝集体形成の物理化学的基礎になるだけでなく、これらの因子を制御した治療法の開発や生命理解の契機になることが期待される。さらに本研究領域に採択いただいたことで得られた同世代の研究者とのネットワークを通じ、違いの得意分野を教え合う共同研究の芽を発掘することができた。また、支援期間中に独立の機会を得、前職の上長、現職での現在のメンター、領域アドバイザーおよび総括の先生、JST ご担当者様からの支援を受け、なんとか研究者としての個を確立しつつある。今後、本研究支援で得た経験と人的な繋がりを活かし、神経変性疾患の物理化学的側面の解明から、社会・経済への波及効果の元となるような研究成果を生み出していきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:3件 (†はco-first, *は責任著者)

1. **Watanabe, C.**[†], Kobori, Y.[†], Yamamoto, J., Kinjo, M., Yanagisawa, M.*, Quantitative Analysis of Membrane Surface and Small Confinement Effects on Molecular Diffusion. *J. Phys. Chem. B*, 2020,**124**, pp. 1090–1098.

概要: 高分子液滴からなる細胞モデル中での分子拡散と閉じ込めサイズとの相関を蛍光相関分光法(FCS)測定から明らかにした。細胞内混雑モデル分子としてポリエチレングリコール(PEG)とウシ血清タンパク(BSA)を用いた。混雑分子種に依存せず、生細胞と同等濃度の高分子溶液を内包した細胞モデルにおいてサイズの減少に伴い分子拡散が低下することを明らかにした。さらに、膜表面積/体積比の増大に伴い分子拡散が低下することを明らかにした。

2. Harusawa, K.[†], **Watanabe, C.**[†], Kitamura, A., Kinjo, M., Yanagisawa, M.*, Membrane Surface Modulates Slow Diffusion in Small Crowded Droplets. *Langmuir*, 2021, **37**, pp. 437–444

概要:細胞モデル中の分子拡散に対する膜表面物性の効果を明らかにした。一般的な構造脂質であるホスファチジルコリン(PC)膜および頭部を PEG 修飾した脂質(PEG 脂質)を添加した膜を用いて細胞モデルを作成し、分子拡散の閉じ込めサイズ依存性を比較、半径20 μ m 以下の小さな細胞モデル中において、脂質膜組成に依存した分子拡散変化を見出した。さらに、内部の高分子溶液濃度に依存して低下の度合いが変化することを明らかにした。

3. **Watanabe, C.***; Yanagisawa, M. Evaporation Patterns of Dextran-Poly(Ethylene Glycol) Droplets with Changes in Wettability and Compatibility. *Life* **2022**, *12*, 373.

概要:細胞内混雑および細胞内相分離のモデルとしてよく用いられる、ポリエチレングリコール(PEG)とデキストラン(Dex)の混合水溶液の特徴を調べるために、のガラス基板上での乾燥過程を観察し、特異的な筋目状のパターンを見出した。このパターンは希薄溶液からの乾燥において見られ、PEGとDexの基板に対する濡れ性の違いと、乾燥にとまない徐々に進行する相分離がカップルして現れるものであることが示唆された。

(2)特許出願

該当なし。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【主要な学会発表】

- “Delayed diffusion and unique phase behavior in polymer crowding micro-emulsions”, 17th Australia-Japan Colloids Symposium (オーストラリアとの二国間シンポジウム、2020. 9. 17)
- “膜表面による細胞サイズ高分子液滴内部分子拡散の制御”、第 59 回 日本生物物理学会年会 2021 年 11 月 25 日(国内学会、招待あり、2021. 11. 25)
- ““Comfort” of cell size seeing from in vitro cell models: molecular diffusion and phase separation”, 第 44 回日本分子生物学会年会(国内学会、招待あり、ワークショップオーガナイザー、2021.12.3)

【受賞】

- The emerging science lecture prize at the 17th Australia-Japan Colloids Symposium Australasian Colloids and Interface Society (2020.9)
- 第 72 回コロイドおよび界面化学討論会 若手口頭講演賞 (2021.9)
- 第17回 日本生物物理学会若手奨励賞 日本生物物理学会 (2021.11)

【著作物】

- **Watanabe, C.**, Yanagisawa, M., Unique phase behavior in cell size space: synergistic effect of molecular crowding and confinement, 2020, *Biophys. Rev.* **12**, pp. 385–386.
- 柳澤実穂, 富田和甫, **渡邊千穂**, 「細胞サイズ空間での相分離から細胞内相分離へ」、相分離 : メカニズムと疾患(ISBN: 9784758103954)、第 1 章 1 節、羊土社(2021 年 6 月)。