

公益財団法人矢崎科学技術振興記念財団
奨励研究助成 成果報告書

公益財団法人矢崎科学技術振興記念財団
理事長 殿

研究助成期間終了にあたり、下記の通り成果を報告します。

2026 年 4 月 29 日

氏名 柚 佳祐
所属 神戸大学大学院理学研究科
職位 理学研究科研究員

1. 申請研究の題目

光圧によるタンパク質液滴形成の時空間制御法の開拓

2. 研究の目的

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。液滴は転写翻訳の制御やシグナル伝達など様々な生体内プロセスに関与する一方で、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、液滴の物理化学的性質が注目を集めている。

液滴を対象とした試験管内研究では、一般的に高分子クラウダーを添加することによって液滴を人為的に形成させる手法が用いられる。また細胞レベル研究では、対象タンパク質の過剰発現や外的ストレスなどによって液滴形成を誘導している。しかし、これらの方法では液滴形成を制御（生成場所、タイミング、個数および動きなど）することができず、現状では液滴の高時空間分解での解析は極めて困難である。したがって、液滴形成を時空間制御する手法の開発が求められる。

このような状況に対して、我々は最近、光捕捉を用いて α シヌクレインの単一液滴形成を駆動できることを見出した。この結果は、光捕捉はタンパク質液滴形成を時空間制御するための有力な手法になり得ることを示唆する。そこで本研究では、光捕捉によるタンパク質液滴形成技術のさらなる開拓を目的とした。

3. 研究の内容

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、通常は光捕捉の対象外であった。我々の先行研究で用いた α シヌクレイン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しやすい。この性質より、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し、光捕捉が促進されることが示唆される。

まず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光捕捉を行った。タウは主に脳に発現する微小管結合タンパク質であり、細胞内での液滴

形成、および液滴内でのアミロイド線維形成が注目を集めている。タウは試験管内で分子クラウダーを添加することで自発的に液滴形成するが、本研究ではその近傍の条件（10 μM タウ、30 mM Tris-DCl (pD 7.4)、150 mM NaCl、2 mM DTT、5% PEG）に対して、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液滴形成を目指し、軽水溶媒中での α シヌクレインの光捕捉を行った。近赤外レーザー照射による発熱を抑えるため、通常は溶媒に重水を用いるが、本実験では温度上昇が液滴形成に与える影響を調べるため、溶媒には軽水を用いた。先行研究と同様に α シヌクレインを実験対象とし、軽水試料条件（200 μM α シヌクレイン、25 mM Tris-HCl (pH 7.4)、100 mM NaCl、7.5% PEG) において光捕捉を試みた。

光捕捉実験では、波長 1064 nm の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) を通して実験試料の溶液表面に集光した。光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。

4. 研究の成果と結論、今後の課題

タウ溶液の気液界面に 1W の近赤外レーザーを集光し、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)。レーザー照射を停止すると、集合体は縮小し消失することから、集合体は液滴であることが示唆された。タウは α シヌクレインと同様に低複雑性配列を有する天然変性タンパク質であるため、多価的に分子間相互作用する。我々が採用し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、タウの微小クラスター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、 α 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。様々なタンパク濃度や塩濃度条件に対してレーザーを照射したが、明瞭な縁を示す液滴は現時点で観察されていない。また光捕捉により形成したタウ液滴は比較的不安定であり、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流され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に向けて、試料調製法や溶液組成の最適化が必要である。



図1. 光捕捉によるタウ液滴の形成

次に軽水試料中での α シヌクレインの光捕捉を行った。先行研究において、重水試料中で液滴形成が観察された条件である、1 W の近赤外レーザーを軽水試料溶液表面に照射した。その結果、集光点に瞬時に集合体が生成し、さらにその急激な成長が見られた。この結果より、軽水環境では α シヌクレインの光捕捉が顕著に促進されることが示された。この促進効果は集光点付近での試料溶液の温度上昇 (およそ十数 $^{\circ}\text{C}$ 程度と見積もられる) に起因すると考えられる。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、液滴ではなく固体であることが確認された。捕捉力はレーザー強度に比例

することから、軽水環境において α シヌクレイン液滴が形成する条件を見出すため、低強度の近赤外レーザーを試料溶液に集光した。その結果、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。さらに 200 mW まで強度を下げた条件において、先行研究で観察さ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2)。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唆された。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し、より低強度のレーザー集光でも液滴形成が可能になったと考えられる。温度上昇による流体環境の変化が有力な要因として挙げられるが、今後さらなる解析が求められる。



図2. 軽水環境での光捕捉による α シヌクレインの液滴形成

現状は光捕捉によるタンパク質液滴形成は溶液表面にレーザー集光した場合に限られており、溶液中や固液界面においては集合体が形成される実験条件を見出せていない。タンパク質に限らず、様々な微粒子についても溶液表面では効果的な光捕捉が生じることが明らかになっており、溶液表面は光捕捉にとって普遍的に有効な環境である。今後この機構を明らかにすることで、溶液中や固液界面でもタンパク分子の光捕捉を達成するための手がかりを得たいと考えている。また α シヌクレインとタウ以外の様々なタンパク質を対象として光捕捉による液滴形成を展開することを予定している。

5. 成果の価値

5-1. 学術的価値

本研究では、光圧を用いた溶液中のタンパク質分子の捕捉技術を用いて、タウの単一液滴形成の制御、さらに軽水試料溶液中での低強度レーザー集光による α シヌクレイン液滴形成を見出した。本技術はタンパク質液滴形成の高度な時空間制御が可能であり、試験管内だけでなく細胞レベル研究への適用が期待される。本手法のさらなる発展によって、様々なタンパク質液滴の物理化学的特性が明らかとなり、液滴の生理学的機能に対する理解が進むことが期待される。

5-2. 社会的価値

冒頭で述べたように、細胞内で生成する液滴は様々な生体内プロセスに関与することが明らかになっている。本手法が今後タンパク質液滴研究の基盤技術として発展することで、基礎研究の立場から医学や薬学分野に対して分子レベルでの知見を提供できる。将来的には疾患に対する治療戦略や創薬の手がかりとなることを期待する。

6. 研究成果

上記の成果は国際学術誌への投稿準備中であり、2026年度内に投稿を予定している。

以上