

研究終了報告書

「細胞内の水を用いた細胞内微小環境の定量評価法の確立と応用」

研究期間: 2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者: 梶本真司

1. 研究のねらい

細胞内に豊富に存在する水分子を直接観測することで、細胞内の局所的な物理的・化学的性質を同時に定量的に評価する手法を確立し、細胞内で起こる生理現象を解明する。特に、液液相分離など細胞内環境の局所的な変化を伴う生理現象について、分子間相互作用や分子構造といった分子レベルの変化から、局所的な濃度や化学組成の変化、さらには固さなどのマクロな物理量の変化を同時に定量的に可視化することで、細胞内生理現象を階層網羅的に明らかにする。

2. 研究成果

(1) 概要

ラマン散乱とブリルアン散乱を同時に観測できるラマン・ブリルアン顕微鏡を構築し、細胞内や緩衝溶液中の化学組成や濃度などの化学的性質と硬さなどの物理的性質を同時に可視化する手法を確立した。特に、水のラマンバンドを内部強度標準とすることで細胞のラマンイメージから生体分子の局所濃度定量を可能にした。さらに、近赤外蛍光観測と組み合わせることで、細胞内液液相分離によって形成したストレス顆粒などの液滴のラマン／ブリルアンイメージングに成功した。その結果から、酸化ストレスや高浸透圧ストレスによって形成したストレス顆粒では、周囲細胞質に比べて核酸濃度が高く、脂質濃度が低いことを定量的に示すことができた。一方で、ストレス顆粒内の夾雑度合いはストレスの種類によって異なり、酸化ストレス下で形成したストレス顆粒は周囲細胞質と夾雑度合いがほとんど変わらないのに対して、高浸透圧ストレス下ではストレス顆粒の方が周囲よりも夾雑度合いが低く、疎な環境であった。この結果は、液液相分離によって形成する細胞内液滴が生体分子を高濃度に含んだ顆粒とは限らないことを示している。多種多様な生体分子が高濃度に混み合った環境にある細胞内では、特定の生体分子が高濃度に集合すると同時に、その他の分子が排除されることで相分離が起こる。このため、結果として形成される液滴の夾雑度合いは周囲よりも低くなりうると結論した。さらに、液滴内の核酸濃度の定量を行い、その役割について考察した。

また、液滴の固液相転移についてもラマン／ブリルアン顕微鏡を用いて追跡した。緩衝溶液中の液滴の固液相転移は多段階的に進み、まずタンパク質の濃度上昇を伴って液滴内部により硬い相が出現した。その後、タンパク質の 2 次構造変化を伴う凝集化が進んだ。一方、細胞への長時間のストレス負荷に伴って形成したストレス顆粒の異常凝集物では、可逆的なストレス顆粒と比べて化学組成が変化しており、より β シート構造のタンパク質の割合が多く、粘性も弾性も増加した。これらの結果から、ラマン／ブリルアン顕微鏡を用いることで、液液相分離や固液相転移など細胞内相転移を定量的に追跡できることを示した。

(2) 詳細

ラマン／ブリルアン顕微鏡の構築

細胞内の局所環境をラベルフリーで観測するために、ラマン散乱とブリルアン散乱を同時にイメージングできるラマン／ブリルアン顕微鏡を構築した。特に、細胞内外に豊富に存在する水のラマンバンドを強度標準として用いることでラマンスペクトルを規格化し、タンパク質や核酸などのラマンバンド強度から細胞内生体分子の局所濃度を定量する手法を確立した。さらに、ブリルアンイメージから細胞内の局所的な固さを評価し、同時に取得したラマンイメージと比較することで、細胞内や溶液内の局所的な“相”としての変化とその背景にある化学的な変化を同時に可視化することを可能にした。

ラマンイメージングによるストレス顆粒の定量観測

細胞に酸化ストレスや浸透圧ストレスなど種々のストレスを与えると mRNA といくつかのタンパク質からなるストレス顆粒が形成することが知られている。生細胞中のストレス顆粒のラマンイメージングを行い、その化学組成と濃度を調べた。試料として、ストレス顆粒の足場タンパク質として知られる G3BP1 に近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 をラベルした iRFP-G3BP1 を発現した HEK293 細胞を用い、培地に亜硫酸、あるいはソルビトールを添加することで酸化ストレス、高浸透圧ストレスを与え、ストレス顆粒の形成を誘起した。ストレス下にある生細胞の近赤外蛍光イメージからストレス顆粒の場所を特定し、その周囲のラマンイメージを取得することで、生細胞中でのストレス顆粒のラマンイメージングに世界で初めて成功した (R. Shibuya et al., *bioRxiv* (2023))。ラマンイメージから、酸化ストレス下でも浸透圧ストレス下でも形成したストレス顆粒は周囲よりも核酸濃度が高く、脂質濃度が低いことが分かった。一方で、生体分子に由来する C-H 伸縮振動バンドと水に由来する O-H 伸縮振動バンドの強度比から見積もられるストレス顆粒内外の生体分子の総濃度、つまり夾雑度合いはストレスの種類によって大きく異なった。酸化ストレス下のストレス顆粒では周囲の細胞質とほとんど夾雑度合いが変わらないのに対して、高浸透圧ストレス下では周囲細胞質よりも夾雑度の低い、疎なストレス顆粒が形成することが分かった。この結果は、ストレス顆粒が生体分子が高濃度に濃縮した顆粒ではないことを示しており、G3BP1 などの特定のタンパク質と核酸分子が集合してストレス顆粒を形成すると同時に、その他の生体分子が顆粒内部から排除されることで、ストレス顆粒内の総生体分子濃度が保たれていると考えられる。特に、高浸透圧下においては、細胞の収縮によって夾雑度がより高くなった周囲細胞質に比べ、ストレス顆粒内部は疎な環境であり、内部の環境を保つことで顆粒内部の生体分子の恒常性が保たれていると考えられる。このような顆粒内部の環境の保持には、顆粒内に高濃度に取り込まれている RNA が重要な役割を示すと考えられる。細胞外の水のラマンバンドを強度標準として、ストレス顆粒内外のラマンスペクトルにおける核酸のラマンバンド強度から顆粒内外の核酸濃度を見積もった。高濃度に存在する液滴内の RNA が RNA 結合タンパク質を引き込み、メッシュ状の構造を形成することで、顆粒内部への巨大な生体分子複合体の侵入を防ぎ、顆粒内部の夾雑度合いを保っていると考えられる。

ストレス顆粒の細胞内相転移過程の定量追跡

細胞内に形成したストレス顆粒がさらに長時間のストレスにさらされると、異常凝集を起こすことが知られている。異常凝集したストレス顆粒は神経変性疾患関連タンパク質を多く含んでおり、その蓄積が疾患の発症機構に関連していると考えられている。ストレス顆粒の異常凝集に伴う、相としての性質の変化と化学組成の変化をラマン／ブリルアン顕微鏡を用いて追跡した。得られたストレス顆粒の凝集物のブリルアンスペクトルは、短時間のストレスによって形成したストレス顆粒とは異なり、周囲よりも高波数側に幅広いバンドを示した。この結果は、長時間のストレスによってストレス顆粒の粘性も弾性も高くなっていることを示しており、長時間のストレス負荷によってストレス顆粒が相転移を起こし、凝集したと結論した。一方、凝集物のラマンスペクトルは凝集物ごとに異なり、核酸、タンパク質ともに高濃度に含んだ凝集物もあれば、タンパク質のみを高濃度に含む凝集物も観測された。また、凝集物内部に生体分子の濃度分布があるような内部構造を持った凝集物も観測された。得られた凝集物のラマンスペクトルについて、k-means クラスタリング法を用いて分類し、クラスターごとの平均ラマンスペクトルと対応する領域のブリルアンスペクトルを比較することで、異常凝集過程における相としての硬さの変化と化学組成の変化、さらには分子構造の変化について考察した。

ヘテロクロマチンの物理的／化学的性質の定量的可視化

クロマチンは、凝縮度が高いヘテロクロマチンと低いユークロマチンに分類されるが、ヘテロクロマチンがどの程度凝縮しているか、あるいはヘテロクロマチンが液相であるか固相であるかもよく分かっていない。マウス由来の培養細胞である 3T3 細胞は、ヘテロクロマチンが特に凝縮し、蛍光染色した際にはクロモセーターとして観測できることが知られている。3T3 細胞のヘテロクロマチンをラマン／ブリルアン顕微鏡を用いて観測することで、化学組成と粘弾性をラベルフリーで定量した。得られた 3T3 細胞のラマンイメージに対して非負条件下で多変量スペクトル解析を行うことで、核内の生体分子分布を可視化し、水のラマンバンドを強度標準とすることでヘテロクロマチンをラベルフリーで濃度定量することに成功した。さらに、それぞれの生体分子の定量結果から核内の密度分布を求め、ブリルアンイメージと組み合わせることで核内の粘弾性分布を求めた。また、ヒストン脱アセチル化阻害剤であるトリコスタチン A を用いて弛緩したヘテロクロマチンを観測し、化学組成の変化と粘弾性の変化を同時に観測することで、ヘテロクロマチンの凝縮過程について考察した。

3. 今後の展開

近赤外蛍光タンパク質によって目的タンパク質をラベルし、近赤外蛍光観測によって目的タンパク質を含む液滴や凝集物の位置を決定し、ラマン／ブリルアンイメージングによってその化学的・物理的性質を定量するという手法を確立することができた。この手法を用いて、領域内外での共同研究を進めており、個々の液滴の生化学的な機能と化学的・物理的性質の相関を解明し、細胞内液液相分離の役割を明らかにしたいと考えている。さらに、培養細胞内だけではなく、ハエの脳切片や腸管など生体組織における液滴のラマン／ブリルアンイメージングも行っており、より生体に近い状態で、生物個体のマクロな生理現象と細胞内のミクロな液液相分離の関係を解明したいと考えている。また、液滴からの凝集機構についても研究を進め、疾患関連変異体と凝集過程の関係を調べることで、疾患の発症機構を解明したいと考えている。

ラマン顕微鏡は細胞内の分子分布などの化学的な性質をラベルフリーで観測できる手法として、多くの研究に用いられているが、ブリルアン顕微鏡と組み合わせることで巨視的な相としての物理的性質を同時に評価することができる。ラマン／ブリルアン顕微鏡は、液液相分離や凝集・線維化など細胞内で起こる相転移現象の研究において重要な「分子の集団としての挙動」を、生細胞内、あるいは生体組織内のままで定量的に可視化することができる唯一の手法であり、新しい基盤的イメージング技術になりうると考えている。また、非接触で観測可能であることから、生体だけでなく高分子材料や溶液など様々な分野で応用可能であり、実際に企業との共同研究も進めている。上に示した共同研究の結果を実例として報告することで、ラマン／ブリルアン顕微鏡の可能性を広く示していきたい。

4. 自己評価

研究題目に掲げた、細胞内微小環境の定量評価法については、ラマン／ブリルアン顕微鏡を構築し、その解析法を確立することで達成できた。特に、申請段階からターゲットにしていた細胞内液液相分離によって形成する液滴については、近赤外蛍光観測と組み合わせることで、細胞内に過渡的に形成した数 μm の液滴をその場定量観測し、周囲と比較することでその性質を調べることができた。また、液滴の凝集過程についても、相転移に伴う硬さの変化と化学組成の変化を同時に観測し、物理的变化と化学的变化を組み合わせ考察することができた。一方で、装置の開発、調整に予算的にも時間的にも多くのリソースを費やしたため、当初考えていたよりも限られた試料の測定に留まり、期間内に論文としてまとめるに至らない結果も多くあったのは反省点だと考えている。確立した測定手法をもとに、できるだけ早く論文としてまとめ、報告したい。

また、さがけに採択いただいたことで、異なる研究背景を持った領域内外の研究者と繋がりができ、*in vivo* でのラマン／ブリルアン測定など、申請当初は考えもしなかった共同研究もいくつか進んでいる。共同研究を通じて視野を広げることができたことも大きな収穫だと考えている。液液相分離や凝集・線維化機構など細胞内で起こる相転移は、生物物理や細胞生物学、臨床医学など多くの分野を横断した重要な課題となっている。ラマン／ブリルアン顕微鏡は、巨視的な相としての情報と微視的な分子の情報を同時に取得できる唯一の観測手法であり、様々な共同研究を通じて、細胞内相転移における分子の集団的挙動を定量的に可視化できる革新的イメージング技術としての地位を確立したい。

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: 11 件

1. Daiki Shibata, **Shinji Kajimoto***, and Takakazu Nakabayashi*, “Label-Free Tracking of Intracellular Molecular Crowding with Cell-Cycle Progression Using Raman Microscopy”, *Chem. Phys. Lett.* **779**, 138843 (2021) (DOI: 10.1016/j.cplett.2021.138843)

概要:細胞周期の進行に伴う細胞内クラウディング環境の変化を細胞内の水のラマンイメージングから定量的に追跡し, 核内では細胞分裂に伴って生体分子の混み合いの程度が10%程度変化するのに対して, 細胞質ではほとんど変化しないことを示した。さらに, ラマンスペクトルの形状変化から核内の夾雑環境の変化が核膜の崩壊に伴う細胞質からの脂質の流入であると結論づけた。

2. Masato Machida, Toshiki Sugimura, **Shinji Kajimoto***, Farsai Taemaitree, Yoshitaka Koseki, Hitoshi Kasai*, and Takakazu Nakabayashi*, “Label-Free Tracking of Nanoprodug Cellular Uptake and Metabolism Using Raman and Autofluorescence Imaging”, *J. Phys. Chem. B* **127**(17), 3851-3860 (2023) (DOI: 10.1021/acs.jpcc.3c01133)

概要:抗がん性プロドラッグナノ粒子のがん細胞内への取り込みとその後に続く代謝と細胞応答を, 自家蛍光およびラマンイメージングを用いてラベルフリーでその場追跡した。抗がん活性分子へと代謝された後もそのほとんどはナノ粒子状に局在したままであり, 少量の抗がん活性分子が核やミトコンドリアに分布することによって DNA に作用し, アポトーシスを誘導することを示した。

3. Ren Shibuya, **Shinji Kajimoto***, Hideyuki Yaginuma, Tetsuro Ariyoshi, Yasushi Okada, and Takakazu Nakabayashi*, “In situ Quantification of Biomolecular Concentration of Cytoplasmic Membraneless Organelles in a Living Cell”, *bioRxiv* (2023) (DOI: 10.1101/2023.05.15.540722)

概要:近赤外蛍光観測とラマンイメージングを組み合わせることで, 生細胞内のストレス顆粒内外の生体分子濃度のその場定量を行なった。ストレス顆粒内は特定のタンパク質と RNA の濃度は高いが, 生体分子の総濃度は高い訳ではなく, 細胞内液液相分離によって形成する液滴がいつも高濃度な顆粒ではないことを示した。さらに, 水のラマンバンドを強度標準として用いることで細胞内の生体分子の濃度分布を可視化できることを示した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(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)

- **Shinji Kajimoto**, Concentration quantification of biomolecular concentration in stress granules formed via LLPS in a living cell, International Symposium for the 80th Anniversary of the Tohoku Branch of the Chemical Society of Japan, 9月8-10日, 仙台, 2023(Invited Talk)
- **Shinji Kajimoto**, Raman and Brillouin microscopy as a tool for quantitative study of LLPS,

Symposium on Phase Separation by Biopolymers: Basics and Applications *in* 第 60 回日本生物物理学会年会, 9 月 28-30 日, 函館, 2022 (Invited talk)

- **Shinji Kajimoto**, Label-Free Observation of Liquid-Liquid Phase Separation in vitro and in a Living Cell, Asian International Symposium on Molecular Science *in* the 102nd CSJ Annual meeting, 23rd March, Online, 2022 (Invited talk)
- **Shinji Kajimoto** and Takakazu Nakabayashi, Label-free visualization of intracellular temperature by using water Raman band, 18th International Conference on Flow Dynamics, 29th October Online, 2021 (Invited talk)
- **梶本真司**, 柴田大輝, 中林孝和, ラマン顕微鏡による相分離の定量解析, 実験医学別冊「相分離の解析プロトコール」それ本当に相分離と言われないための戦略と先端解析方法, 加藤昌人, 白木賢太郎, 中川真一編, 分担著書(担当箇所:8 章 p.115-125) (2022) (ISBN: 978-4-7581-2259-7)