

2024年10月23日

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

疾患の原因となりうる細胞内の顆粒の細胞内定量に成功 ～生きた細胞内の相分離液滴は必ずしも密な構造ではない～

【発表のポイント】

- ALS^(注1) やがんの創薬標的とされるストレス顆粒^(注2) について、内部の化学組成、分子構造、濃度を、生きた細胞内で定量することに成功しました。
- ストレス顆粒内部は高度に濃縮された密な環境ではなく、顆粒の周囲と同程度、場合によっては周囲よりも疎な環境になることがわかりました。
- ストレス顆粒などの相分離液滴（顆粒）の定量的な理解が深まることで、液滴を介した疾患の発症機構の解明や創薬への展開が期待されます。

【概要】

液-液相分離現象^(注3) によって細胞内で形成される生体分子の濃厚相（液滴）は、膜のない細胞内小器官と呼ばれ、細胞の区画化や反応場の提供など様々な役割を有しています。その一方で、液滴内にあるタンパク質の異常凝集により、ALS やがん等を引き起こす原因となることも指摘されています。

東北大学大学院薬学研究科の澁谷蓮大学院生、梶本真司准教授、中林孝和教授らは、ラマン顕微鏡^(注4) と呼ばれる技術を用いて、液-液相分離によって形成された生細胞内の単一液滴をその場で定量評価する手法を提案しました。この手法を用いて、細胞内液滴の一つであるストレス顆粒を測定し、ストレス顆粒内部の核酸濃度をその場で測ることに成功しました。さらにストレス顆粒内外の生体分子の濃度環境を定量的に比較することで、ストレス顆粒は必ずしも密な構造ではないことを明らかにしました。

本手法はあらゆる細胞内液滴の分析に適用可能であり、液滴と様々な生理現象や疾患との関係の解明、創薬への展開など幅広い応用が期待されます。

本成果は2024年10月15日(火)にアメリカ化学会の学術誌 Analytical Chemistry に掲載されました。

【詳細な説明】

研究の背景

液-液相分離（LLPS）によって細胞内に形成される液滴は膜のない細胞内小器官（オルガネラ）と呼ばれており、細胞内の区画化や反応場の提供など様々な役割を果たしています。一方で、液滴内部のタンパク質が異常凝集を起こすことで神経変性疾患^{（注 5）}の発症につながることも提案されており、疾患治療や創薬の分野においても液滴の性質を調べる研究が盛んに行われています。

LLPSによって形成される液滴の特性や機能を理解するための測定手法として、近年、分子の振動スペクトルを測定するラマン顕微鏡を用いた液滴の観察が提案されています。液滴のラマン画像を得ることで、液滴内外の分子の組成や構造の情報を網羅的に得ることができます。さらに、我々は、液滴内の生体分子の濃度をその場で高精度に測る技術の開発も行いました。しかし、ラマン顕微鏡の液滴観察への応用は緩衝溶液中に留まっており、生きた細胞内で実際に機能を発現している液滴のラマン測定はほとんど行われていませんでした。

今回の取り組み

本研究では上記の背景を踏まえ、細胞内液滴の一つであるストレス顆粒を対象に、生きた細胞内の液滴のラマン画像の測定に取り組みました。細胞に酸化や熱などのストレスを与えると、ストレス顆粒と呼ばれる一過性の液滴が細胞内で生じます。ストレス顆粒の細胞内での役割はまだ完全には解明されていないのですが、ALS やがん等の発症へつながることが指摘されています。我々は、ストレス顆粒の足場タンパク質 G3BP1 を近赤外蛍光タンパク質 iRFP で標識し、ストレス顆粒の位置を蛍光で定め、その位置でのラマン測定を行うことでストレス顆粒のラマン画像を得る近赤外蛍光/ラマン顕微鏡を構築しました。

はじめに、亜ヒ酸ナトリウムの添加により酸化ストレスを負荷した細胞の近赤外蛍光およびラマン画像測定を行いました（図 1）。酸化ストレスを負荷した細胞の近赤外蛍光画像において、細胞質に輝点が観察され、ストレス顆粒の形成が確認されました。ラマン画像においては、核酸、脂質の分布を示す画像中に近赤外蛍光画像に対応した構造が可視化され、生細胞内のストレス顆粒のラマン画像測定に初めて成功したと結論づけました。ラマン画像から、ストレス顆粒の内部は周囲の細胞質に比べて核酸が豊富で、脂質が少ないことがわかりました。一方で、タンパク質の分布を示すラマン画像ではストレス顆粒は可視化されませんでした。この結果から、内部のタンパク質濃度は周囲と変わらないことがわかります。

ストレス顆粒がどのような顆粒なのかを理解するために、ストレス顆粒内と細胞質の生体分子の混雑度（平均生体分子密度）の比較を行いました。水分子の濃度を反映する O-H 伸縮振動のラマンバンドの強度に対する、細胞内の生体分子の総濃度を反映する C-H 伸縮振動のラマンバンドの強度比を計算すること

で、分子密度の比較を行うことができます（図 2）。酸化ストレスを負荷した細胞では、細胞質およびストレス顆粒のバンド強度比の違いは 5%未満でした。この結果はストレス顆粒の内外で生体分子の平均密度がほぼ同一であり、顆粒内は周囲の細胞質に比べて生体分子の密度が顕著に高くないことがわかります。ソルビトールの添加により高浸透圧ストレスを負荷した細胞においても同様の比較を行いました。ストレスを負荷していないコントロールの細胞に比べると細胞質、ストレス顆粒のどちらもバンド強度比が高くなり密度は高くなっているものの、ストレス顆粒内は周囲の細胞質よりも強度比が低く、周囲よりも密度が低いことが分かりました。

本研究より、細胞内のストレス顆粒は周囲の細胞質よりも分子密度が顕著に高くないこと、高浸透圧ストレス顆粒では、細胞質に比べて顆粒内部は分子の混み合いが少ない疎な環境に維持されることが示されました。生体分子が混み合っている細胞内では、液滴の内部は必ずしも周囲と比べて生体分子が濃縮された状態ではないことを定量的に示すことができました（図 3）。顆粒と言ってもその内部はそれほど密ではないこととなります。

最後に、ストレス顆粒内部の核酸の濃度定量を行いました。当研究グループが提案した水のラマンバンドを内部強度標準として濃度定量を行う手法を応用しました。細胞外の水のラマンバンドを利用して、核酸に由来するラマンバンドの強度と核酸濃度の関係を表す検量線を作成し、ストレス顆粒および細胞質、核、核小体の核酸濃度のその場絶対定量に成功しました（図 4）。ストレス顆粒内部の核酸量は周囲の細胞質に比べて 20%高く、ストレス顆粒内部に豊富に存在する核酸が、顆粒内部の分子混雑環境を制御している可能性が示されました。

今後の展開

本研究では、液-液相分離によって細胞内に形成された液滴をあるがままの状態定量的に観察する手法を確立しました。提案された手法は、液滴のみならずあらゆる細胞内小器官の局所濃度を定量することができ、生命科学研究において幅広い応用が考えられます。

生きた細胞内での液滴の定量分析が進めば、実際の生体内における液-液相分離現象の役割と液滴の性質の理解が深まり、液滴を介したタンパク質の凝集機構と神経変性疾患の発症メカニズムの関係の解明が大きく進展することが期待されます。現在、我々はこの技術を発展させ、神経変性疾患に関連することが提案されている液滴の異常凝集過程の追跡を行っています。

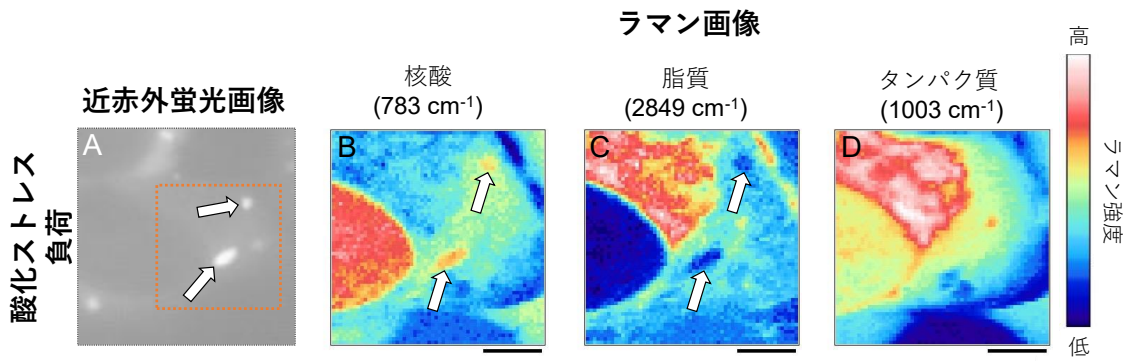


図 1. 酸化ストレスを負荷した細胞の (A) 近赤外蛍光画像と (B~D) 対応するラマン画像。各ラマン画像は (B) 核酸、(C) 脂質、(D) タンパク質の分布を示している。

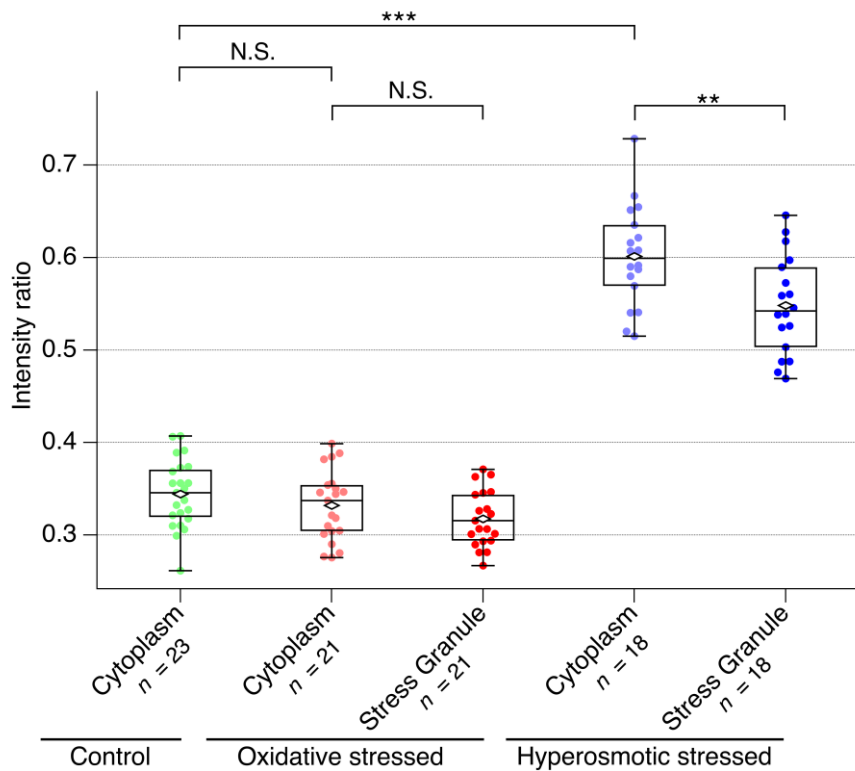


図 2. Control の細胞、酸化ストレスを負荷した細胞、および浸透圧ストレスを負荷した細胞における、細胞質とストレス顆粒の分子混雑環境の比較。強度比が高いほど混み合った環境であることを示している。

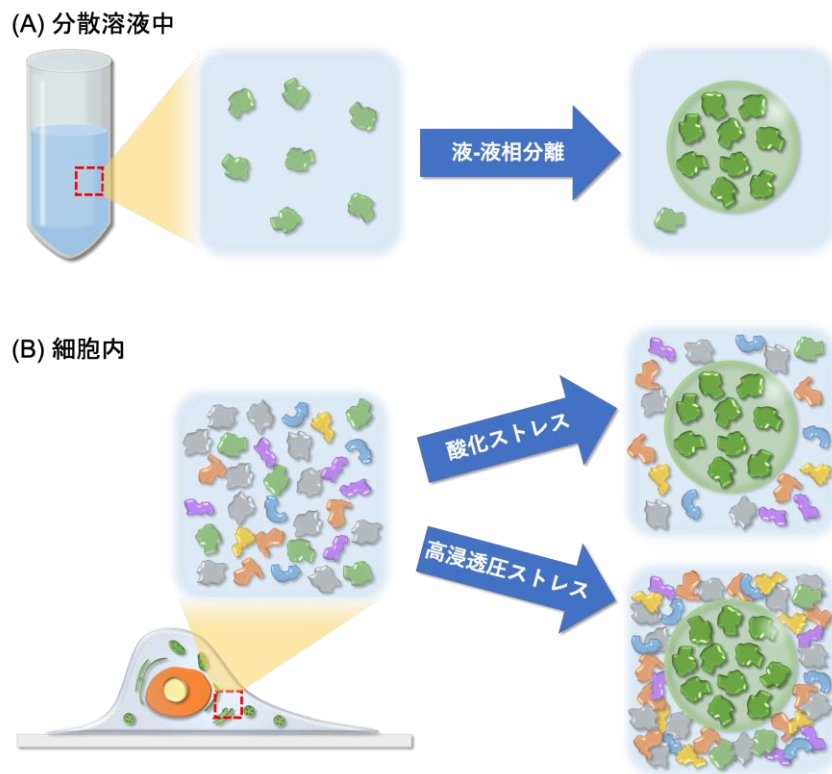


図 3. (A) 緩衝溶液中および (B) 細胞中における液滴内外の分子の混雑環境の違いの模式図。緩衝溶液中の実験では高濃度の液滴が観察されるが、細胞内の液滴では必ずしも周囲と比較して生体分子の濃度が高いわけではない。酸化ストレスによって形成されるストレス顆粒の場合、顆粒形成に関わる特定の生体分子のみが濃縮され、それ以外は排除されるため、ストレス顆粒内部の混雑環境は周囲とほとんど変わらない。一方、高浸透圧ストレスを受けた細胞では、収縮により細胞全体がより混雑するが、そのような条件下でもストレス顆粒の内側はむしろ維持され、周囲の細胞質よりも疎な「顆粒」を形成する。

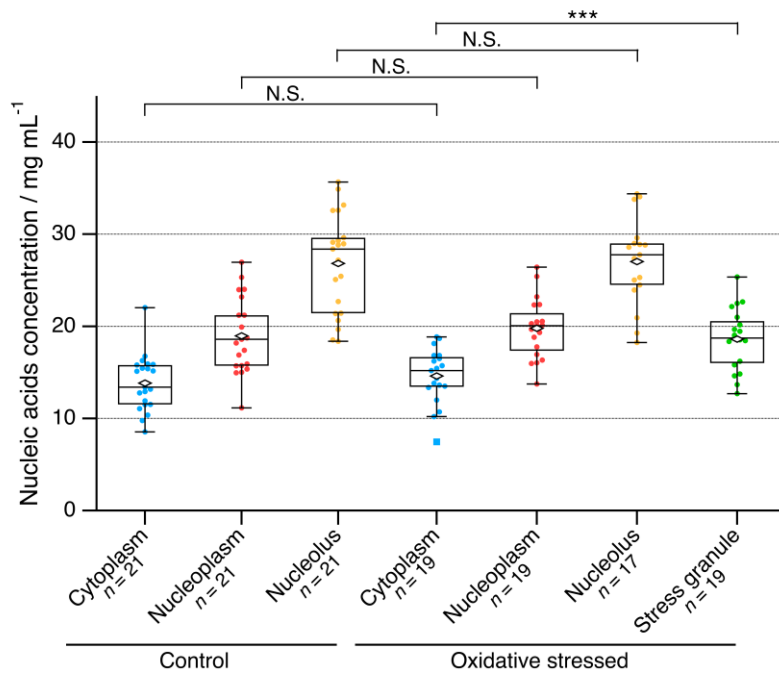


図 4. Control の細胞および酸化ストレスを負荷した細胞における、細胞質、核質、核小体、ストレス顆粒の核酸濃度。

【謝辞】

本研究は、日本学術振興会科研費（JP17H05869, JP21H05261, JP22H02594, JP19H05794, JP19H05795, JP19H02666, JP20H04689）、科学技術振興機構さきがけ（JPMJPR20E5）、CREST（JPMJCR15G2, JPMJCR1852, JPMJCR20E2, JPMJCR2024）、ムーンショット（JPMJMS2025-14）、およびクリタ水環境財団（19E030）の支援を受けて実施されました。

【用語説明】

注1. ALS

筋萎縮性側索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis）の略。神経変性疾患（注5を参照）の一つであり、体を動かす筋肉が萎縮する難病。

注2. ストレス顆粒

細胞がストレスにさらされた際に、液-液相分離（注3を参照）によって一時的に形成される細胞内液滴。主に mRNA や RNA 結合タンパク質から構成され、細胞のストレス適応に重要な役割を果たす。一方で、ストレス顆粒の異常凝集や分解不全が様々な疾患の発症に関連することも示唆されている。

注3. 液-液相分離（Liquid-liquid phase separation, LLPS）

均一な生体分子の水溶液が、生体分子が高濃度で存在する液相（液滴）と希

薄な液相の二相に分離する現象。

注4. ラマン顕微鏡

物質に光を照射すると、光と物質が相互作用を起こすことで散乱が起こる。散乱光のほとんどは入射光と同じ波長を持つレイリー散乱光であるが、ごく一部、物質中の分子の振動の影響を受けて入射光と異なる波長を持つラマン散乱光が含まれている。このラマン散乱光のエネルギー差から、分子の構造を解析する手法をラマン分光法と呼び、この手法を顕微鏡下で行い、微小な領域の分子の情報を得る技術をラマン顕微鏡という。

注5. 神経変性疾患

脳や脊髄にある神経細胞の機能不全により引き起こされる疾患群。アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）などが代表的な例として挙げられる。詳細な発症機序は明らかにされていないが、異常なタンパク質凝集体の蓄積が関連していると考えられている。近年では、液-液相分離によって形成された液滴が、神経変性疾患に関わるタンパク質凝集体の前駆体としてはたらいってしまう可能性が示唆されている。

【論文情報】

タイトル : Nucleic Acid-Rich Stress Granules Are Not Merely Crowded Condensates: A Quantitative Raman Imaging Study

著者 : Ren Shibuya, Shinji Kajimoto*, Hideyuki Yaginuma, Tetsuro Ariyoshi, Yasushi Okada, Takakazu Nakabayashi*

*責任著者 : 東北大学大学院薬学研究科 准教授 梶本真司、同教授 中林孝和

掲載誌 : Analytical Chemistry

DOI : 10.1021/acs.analchem.4c01096

URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.4c01096>

【問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学大学院薬学研究科

教授 中林孝和

TEL: 022-795-6855

Email:

takakazu.nakabayashi.e7@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学大学院薬学研究科・薬学部

総務係

TEL: 022-795-6801

Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp