

補助事業番号 2022M-207

補助事業名 2022年度 難治性疾患を引き起こす細胞内液滴を検出する革新的化学
プローブ開発 補助事業

補助事業者名 金沢大学 准教授 羽澤勝治

1 研究の概要

個体症状として起こるすべての現象は細胞レベルの変化に起因する。細胞は遺伝子やタンパク質の発現、代謝、分化増殖、免疫系などの様々な生命活動を制御している。近年、細胞内で形成される液-液相分離は、タンパク質の分子集合から成り立つ非膜型オルガネラであり、“生命反応を制御するためのマイクロ空間”(細胞内液滴)として注目を集めている。液-液相分離からなる細胞内液滴は複雑な生命現象をつなぐ動的な高次構造体であり、生命システムの根本的に理解するためのカギを握る。ゆえに、液-液相分離により細胞内液滴が形成され機能する仕組みの理解により、生体反応機構を解明できるだけにとどまらず、医療診断や細胞工学分野への貢献が期待できる。

本課題は、細胞内液滴の物性・動態にまで踏み込んだ解析を可能とする世界初のケミカルバイオロジーツールの開発を目指す。本事業により創出される機能性蛍光プローブは、液-液相分離の根本的な理解に基づく生命現象システムの完全解明し、生命科学の発展を加速させるだけでなく、次世代医療を牽引する強力なツールになることが期待される。

2 研究の目的と背景

本事業の目的は“細胞内で構成される生命反応場(細胞内液滴)に指向性をもち、蛍光特性より状態をモニタリングできる蛍光プローブを開発”することである。

申請者らは、細胞生物学と超分子化学の異分野融合研究を推進する中で、液-液相分離の内部状態に応じて異なる発光特性を示す蛍光プローブ、ピレン化合物(Pyr-PEG)を創成した。このPyr-PEGをリード化合物として、化学的・生物学的な最適化を図り、特定の液-液相分離へ取り込まれ、その物性を発光パターンで定量的に解析できる蛍光プローブの創出が可能である。

3 研究内容

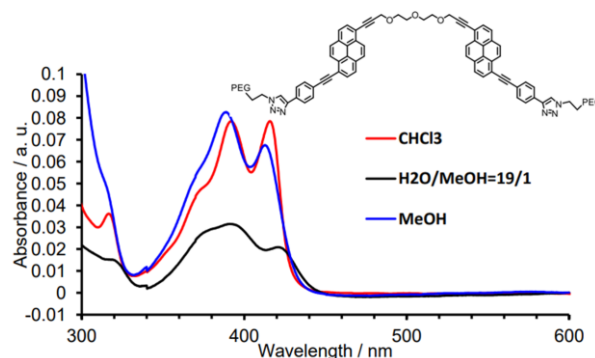
<https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=4485>

(1) 蛍光プローブ最適化

① 長波長化

アルケン導入により、蛍光プローブの長波長化に成功した(右図)。

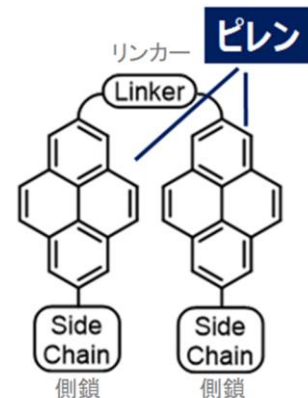
一方で、レオロジー応答性が破綻するため、本アプローチによる長波長化は不適切であることが判明した。



② リンカー構造の最適化

様々なリンカー構造(右図参照)をもつライブラリーを作製し、これらの蛍光特性、およびレオロジー応答について解析した。

ライブラリーからレオロジー応答に必要な構造・活性相関を得ることに成功した。

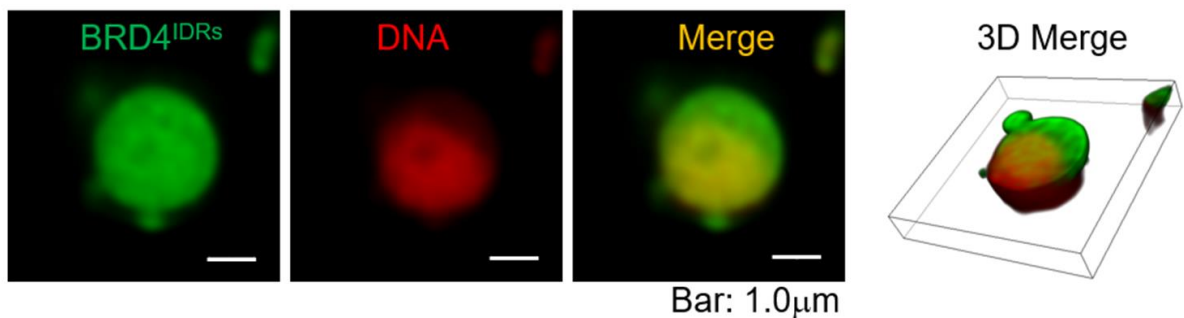


(2) 細胞内相分離実験系の構築

① in-vitro液滴アッセイ評価系の確立

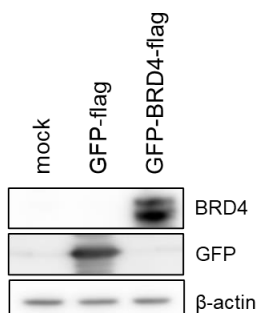
細胞の生命活動は細胞核に格納されたゲノムDNAの情報制御が基盤となる。このDNA情報を読み出す転写過程を制御する液滴について、試験管内で再構成し、そのふるまいを調べることのできる実験手法を確立した。

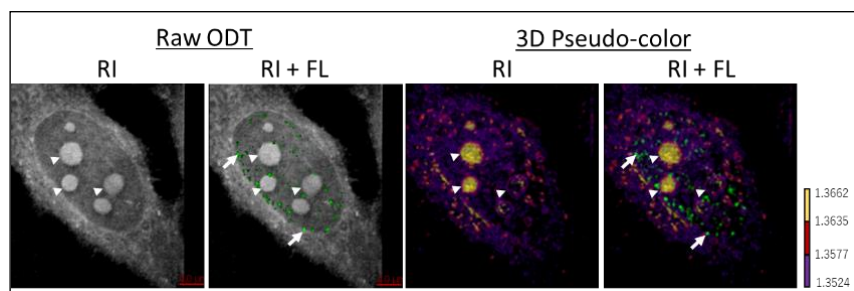
下記図は、転写制御を担うタンパク質BRD4とDNAが液滴をつくる様子を共焦点蛍光顕微鏡解析により解析・可視化した一例である。



② In-Cell液滴アッセイ評価系の確立

細胞核内で形成され、転写制御を担う液滴を可視化・追跡するために、緑色蛍光タンパク質GFPと融合したBRD4を発現するプラスミドベクターを構築し、細胞に発現させた(下図左)。また、ホログラフィック顕微鏡と組み合わせることで、細胞核内の様々な液滴を観察することに成功した(下図右)。今後、これらの液滴のレオロジー経過と生物学的変化の関連性を解明できる蛍光プローブを開発に取り組む。





4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

細胞内液滴の破綻は、神経変性疾患やウイルス感染症、がんなど病態と密接に関与することが明らかになり、細胞内液滴の理解がこれら難治性疾患の診断・治療法の開発につながることを期待されている。よって相分離生物学は生命科学の更なる発展のカギとなるが、細胞内相分離を解析する技術は確立されておらず、有効な研究ツールの開発が求められている。また、難治性疾患の克服ならびに細胞治療に向けた真の細胞工学技術を得るためには、生命反応のプロセスである相分離の理解が必要である。

本研究が築いた技術基盤は、細胞の状態(疾患関連状態やウイルス感染状態、免疫異常、老化等)を簡易に診断する蛍光イメージング診断技術の開発に繋がる。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

申請者は細胞運命の決定に関わる遺伝子発現環境の理解と制御にむけた研究を推進してきた。国内外の研究により、遺伝子発現環境におけるDNA配列の特徴や作用する分子の理解は飛躍的に進み、近年においては、これらの生体分子が集まり構築される高次構造体(細胞内液滴)を理解することが重要課題となっている。

しかし、細胞内液滴の解析に用いられる現行ツールのほとんどは、合成生物学の技術によるラベルが必要であり、自発的に起こる細胞内液滴を評価することはできない。

本研究は、ラベルフリーで簡便に細胞内液滴を評価する技術の基盤創出に値するものであり、本研究の更なる発展により、生命科学の前進に貢献する。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

国内特許出願

羽澤 勝治 ら,「蛍光プローブ、液相の極性及び粘性を評価する方法、並びに化合物」, 金沢大学, 令和 3年 6月 2日(2021.06.02) 特願2021-093100

7 補助事業に係る成果物

該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 金沢大学(カナザワダイガク)

住 所: 〒920-1192

石川県金沢市角間町

担 当 者: 准教授 羽澤 勝治(ハザワ マサハル)

担 当 部 署: 新学術創成研究機構 (シンガクジュツソウセイケンキュウキコウ)

E - m a i l: mhazawa@staff.kanazawa-u.ac.jp

U R L: <http://fsowonglab.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>