

動的溶液環境のセンシング および液-液相分離の制御と計測

菅瀬 謙治^{*1} 池田 将^{*2} 吉田 紀生^{*3}
中曽根 祐介^{*4} 永井 萌土^{*5} 櫻井 庸明^{*6}

Sensing of Dynamic Solution Environments and Controlling and Measuring Liquid-liquid Phase Separation

Kenji SUGASE^{*1}, Masato IKEDA^{*2}, Norio YOSHIDA^{*3},
Yusuke NAKASONE^{*4}, Moeto NAGAI^{*5} and Tsuneaki SAKURAI^{*6}

We have promoted joint research to elucidate the mechanism of protein liquid-liquid phase separation (LLPS) and aggregation regulated by “dynamic solution environments.” In Phase 2, we achieved key developments: Sugase discovered metal X ion-dependent LLPS of Pbp1 and established its photo-control. Nakasone and Nagai constructed a microscopic system integrating transient grating and fluorescence anisotropy with microfluidics. Ikeda and Sakurai developed molecular tools sensing redox and viscosity changes, respectively. Yoshida established computational models for LLPS prediction. These achievements provide a foundation for understanding intracellular protein dynamics.

1. 緒言

生命活動の場である細胞内部は、静的な試験管の中とは異なり、ATP濃度、酸化還元状態（ROS）、イオン濃度、粘度、そして細胞質流動による流れなどが絶えず時空間的に変動する「動的溶液環境」にある。近年、タンパク質の液-液相分離（LLPS）が細胞内の非膜オルガネラ形成や代謝制御において中心的役割を果たすことが明らかになってきたが、このLLPSの形成・崩壊や、疾患に関わる異常凝集（アミロイド線維化等）が、上述のような複雑な環境変動によってどのように制御されているのか、その実体は未だ多くの謎に包まれている。本研究の核心は、この「動的溶液環境」と「タンパク質挙動」の相関を解明し、制御することにある。この課題の解決は、単なるタンパク質科学の進展にとどまらず、医学・薬学・工学といった幅広い分野への波及効果をもたらすものである。医学・薬学分野においては、タンパク質の異常凝集を起点とする様々な疾患の発症機構の解明に新たな視座を提供することが期待される。工学分野においては、環境応答的な分子集合体の制御原理を確立することで、新規機能性材料の創成等への応用が見込まれる。そして何より、従来の「分子の構造」のみに注目する静的なアプローチから、「分子を取り巻く環境」を機能的な生体因子として扱う「動的溶液環境科学」という新たな学術領域の創成に繋がるものである。しかし、これらの実現には、既存の単一分野のアプローチでは限界がある。細胞内の微小かつ過渡的な環境変化を捉える「センシング」、その環境下での動態を追跡する「時空間計測」、そして現象を裏付ける「理論計算」のすべてを高度に統合する必要があるからだ。そこで本共同研究では、タンパク質科学・NMR（菅瀬）、有機・分子集合化学（池田）、計算科学（吉田）、光物理化学（中曽根）、マイクロ・ナノ工学（永井）、有機材料化学（櫻井）という異なる専門分野の研究者が集結した。それぞれの先端技術を持ち寄り、「環境を測る」、「場を操る」、「現象を解く」という多角的なアプローチを融合させることで、動的溶液環境におけるタンパク質の相分離制御メカニズムを解き明かす統合的解析基盤の構築を目指した。

2026年2月26日 受理

豊田理研スカラー共同研究Phase2

^{*1} 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻

^{*2} 岐阜大学工学部化学・生命工学科

^{*3} 名古屋大学大学院情報学研究科複雑系科学専攻

^{*4} 京都大学大学院理学研究科化学専攻

^{*5} 豊橋技術科学大学次世代半導体・センサ科学研究所

^{*6} 京都工芸繊維大学分子化学系

2. 研究活動および成果

(1) 菅瀬 謙治 (京都大学) : Pbp1の相分離制御機構の解明【現象を解く】

オートファジー制御タンパク質Pbp1の液-液相分離(LLPS)が、細胞内のどのような環境変化によって制御されているのか、その複雑な「現象を解く」ことに取り組んだ。Pbp1の相分離制御については、これまでメチオニン残基の酸化還元状態が主要なスイッチであると考えられてきた。しかし、我々が細胞内環境を模した条件下で多角的な解析を行った結果、酸化還元状態の変化以上に、金属Xイオン濃度が決定的な制御因子であることを突き止めた。詳細なドメイン解析により、Pbp1の天然変性領域に含まれる特定のヒスチジンリッチ領域が、金属Xイオンを特異的に配位することでタンパク質間の架橋点となり、LLPSが強力に誘起されるという新たな分子モデルを提唱するに至った。この発見は、細胞内における微量金属イオン濃度の局所的な変動が、タンパク質の集合離散を即座に制御するon/offスイッチとして機能している可能性を強く示唆するものであり、従来の定説を覆す重要な知見となった。

(2) 中曽根 祐介 (京都大学) : 複合光学顕微鏡システムの構築と光制御計測【場を操る・測る】

微小かつ不均一な空間におけるタンパク質ダイナミクスを、高い時空間分解能で「測る」とともに、光刺激によって反応の「場を操る」技術の確立を目指した。まず計測技術として、分子の並進拡散(サイズや分子間相互作用を反映)を捉える「過渡回折格子(TG法)」と、回転拡散(分子形状や剛性を反映)を捉える「蛍光偏光解消法」を、同一視野内で瞬時に切り替え可能な複合顕微鏡システムを世界で初めて構築した。これにより、単一の手法では見落とされていた多面的な物理情報を同時に取得可能とした。さらに、相分離の開始点($t = 0$)を精密に定義するため、光切断性タグ(クマリン誘導体)を導入したPbp1を調製した。UV照射によってタグを切断し、人為的に凝集反応を「操る」実験を行った結果、照射直後の急激な濁度上昇、約10分後の液滴形成、そして約60分後のアミロイド様凝集への転移という一連のプロセスを、連続的かつ定量的に追跡することに成功した(図2)。

(3) 永井 萌土 (豊橋技術科学大学) : マイクロ流体デバイスと電場凝集の発見【場を操る】

相分離のような高速反応の初期過程を追跡するためのデバイス開発に加え、未知の物理的因子によってタンパク質の「場を操る」新たな手法の開拓に挑んだ。まず、従来のピペッティング操作では避けられなかった混合デッドタイムを解消するため、2枚のプレート微小距離だけ摺動させることで、アレイ状に配置された微小液滴を一斉に混合する「Slip Chip」型マイクロ流体デバイスを開発した。これを中曽根の光学系と融合させることで、混合後数秒以内の初期ダイナミクスの計測を実現した。さらに、新たな環境制御因子として「電場」に着目した探索的実験を行った。その結果、ガラスピペット先端に形成される局所的な高電場領域(誘電泳動力が作用する領域)において、IgGなどのタンパク質が特異的に誘引され、高濃度に凝集する現象を見出した。これは、電場を用いることでタンパク質の局在や相分離状態を非接触で自在に操作できる可能性を示しており、動的溶液環境制御の新しいモダリティとして期待される。

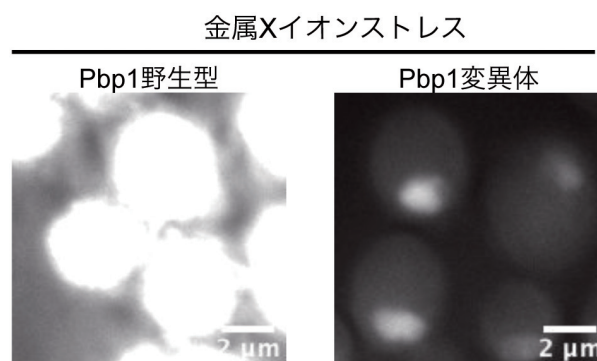


図1 金属Xイオンストレスに応答するPbp1の液滴形成。野生型Pbp1を左ヒスチジンリッチ領域欠損変異体Pbp1の結果を右に示す。

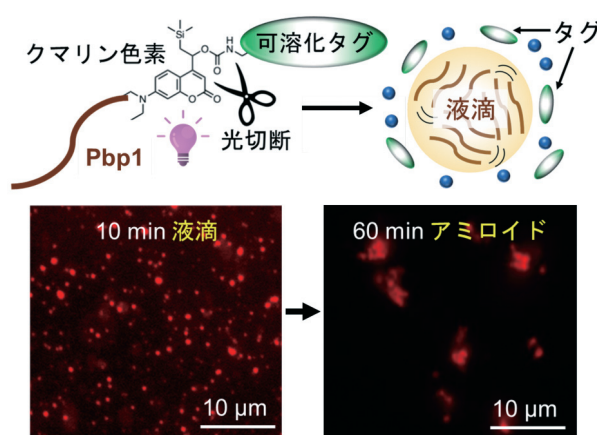


図2 光切断反応を利用した相分離操作と顕微鏡画像。光操作法の概念図を上、UV照射により誘起された液滴形成およびアミロイド様凝集形成の顕微鏡画像を下に示す。

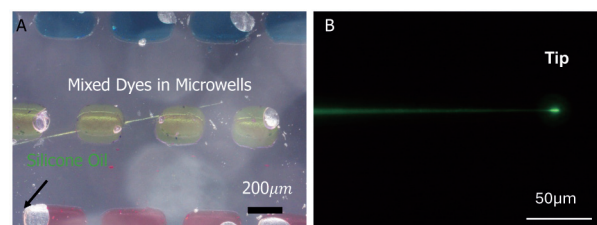


図3 マイクロ流体デバイスと電場凝集の発見。(A) 二液をPDMS製のSlipChipに入れ、スライドさせることで、黄色の混合結果を得た。(B) ガラスピペット先端に電場を集中させることで、蛍光IgGの凝集を確認した。

(4) 池田 将 (岐阜大学) : 酸化還元応答性 ^{19}F 分子ツールの開発【環境を測る】

細胞内の酸化還元状態を、高感度かつリアルタイムに「環境を測る」ための革新的な分子ツールの開発を行った(図4)。設計・合成したフッ素 (^{19}F) 導入自己集合性アミノ酸誘導体 (Fmoc-C(CF₃)Bzl) は、還元環境下では側鎖がスルフィド型でゾル状態を保つが、酸化環境下ではスルホキッド型へと変化し、分子間相互作用が増強されてハイドロゲル(相分離状態)を形成する特性を持つ。この化学構造の変化に伴い、 ^{19}F -NMRシグナルが低磁場側へ鋭敏にシフト ($\Delta\delta = +0.40$ ppm) することを確認した。通常、生体分子にはフッ素が含まれないため、バックグラウンドノイズのない高感度な検出が可能である。この大きな化学シフト変化と明確なゾル-ゲル転移現象を利用することで、溶液環境の酸化還元状態を、分光学的数値(NMR)と視覚的変化(ゲル化)の両面から、極めて高精度に読み出すことに成功した。

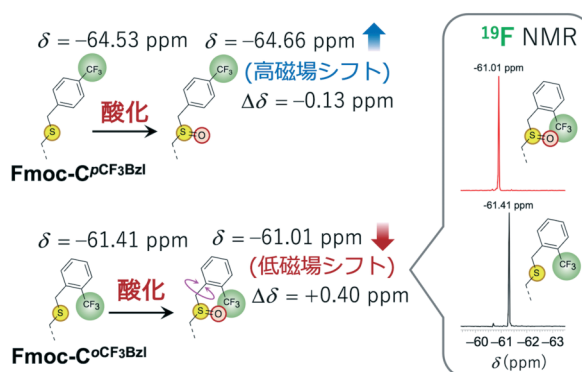


図4 酸化還元応答性 ^{19}F 分子ツール。

開発した分子ツールであるアミノ酸誘導体の酸化応答と ^{19}F -NMRシグナル変化を示す。

(5) 櫻井 庸明 (京都工芸繊維大学) : 粘度応答性蛍光分子ツールの開発【環境を測る】

液-液相分離や凝集に伴って生じる液滴内部などの局所的な粘度変化を、非接触で「環境を測る」ための蛍光性分子ツールの開発に取り組んだ。開発した分子は、溶液中での励起状態において分子内回転運動を行うが、周辺粘度の上昇に伴ってその運動が抑制されることで、無輻射失活が抑えられ蛍光特性(蛍光寿命や蛍光波長など)が変化するメカニズムを有する。種々の粘度標準液を用いた検証実験において、これらの蛍光パラメータが粘度の対数値に対して良好な直線相関を示すことを確認し、プローブとしての高い定量性を実証した。さらに、中曽根との共同研究により、この分子ツールを実際に生細胞内へ導入する実験にも着手している。これにより、従来の物理的プローブでは挿入困難であった、液滴内部や細胞内局所領域といった微小空間の物理的特性(粘度)を、光を通じて可視化・定量する道が拓かれた。

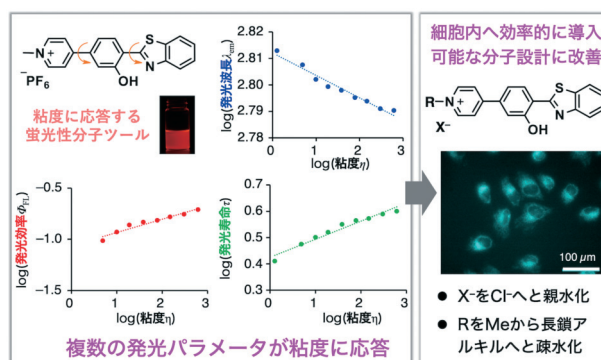


図5 粘度に応答する蛍光性分子ツールの挙動。

(左) 蛍光体の構造式と発光の写真, エタノール/グリセロール標準液を用いた, 各種発光パラメータと粘度との相関。(右) 蛍光顕微鏡像: 構造の改変により HeLa 細胞への取り込み効率が上昇した。

(6) 吉田 紀生 (名古屋大学) : 液-液相分離予測モデルと基礎理論の構築【現象を解く】

実験事実の背後にある物理化学的原理を理解し、理論計算によって「現象を解く」ための強固な基盤構築を進めた(図6)。まず、テトラペプチド全16万通りの配列に対してレプリカ交換分子動力学法(REMD)と3D-RISM理論を適用し、膨大な物性データベースを構築した。これを学習データ(教師データ)とすることで、アミノ酸配列のみからLLPS能を判定する予測モデルを開発し、予測スコア0.88という高い精度を達成した。また、高分子鎖の統計力学理論(Polymer-RISM理論)と量子化学計算を用いた、溶液環境に応答した高分子構造解析手法を開発した¹⁾。さらに3D-RISM理論とREM等を用いて、ATPがハイドロトープとして働く際のタンパク質の構造変化を解析し、ATPがタンパク質表面の溶媒と構造を変化させ、変性状態の自由エネルギーを安定化させることで凝集を防ぐメカニズムを理論的に解明することに成功した。

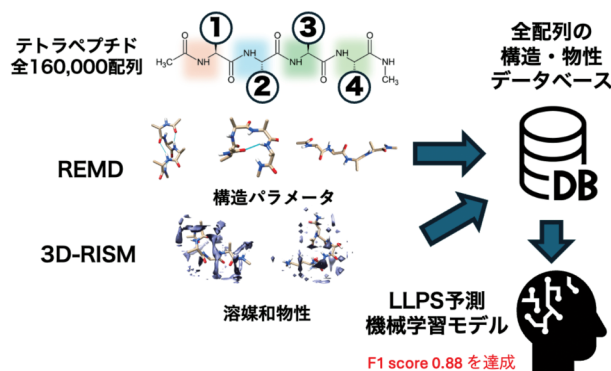


図6 網羅的テトラペプチドデータベースとLLPS予測モデル。

テトラペプチド全組み合わせ160,000通りのREMおよび3D-RISM計算により構造・物性データベースを構築し、LLPSを予測する機械学習モデルを構築した。

3. 研究交流

本スカラー共同研究では、単なる成果の持ち寄りではない実質的な異分野融合を実現するため、オンラインと対面を組み合わせた重層的な研究交流を展開した。まず、Zoomを用いた定期的な進捗報告会を月例で開催し、日常的に生じる実験上の課題やアイデアを即座に共有できる体制を整えた。対面での交流においては、若手研究者の育成とネットワーク構築に重点を置いた。2025年には京都大学にてチーム全員が参集するオンサイトミーティングを実施し、開発した計測システムのデモンストレーションやディスカッションを通じて相互理解を深めた。さらに、本プロジェクトの成果を国際的に発信するため、2025年10月から11月にかけて、タイのチェンマイ大学およびカセサート大学との合同シンポジウムを開催した(図7)。このシンポジウムには現地の副学長をはじめとする研究リーダーに加え、多数の大学院生が参加した。学生によるポスター発表や口頭発表を通じた活発な議論が行われ、国境を越えた「動的溶液環境」研究のネットワーク拡大に大きく貢献した。これらの活動は、次世代を担う若手研究者が国際的な視野と異分野融合のマインドセットを養う絶好の機会となった。



図7 タイ チェンマイ大学との交流。

中央左は吉田(名古屋大学), 中央右はPunyodom チェンマイ大学副学長。

4. 結言

Phase 2の研究活動を通じて、我々は動的溶液環境におけるタンパク質の液-液相分離が、酸化還元のみならず金属Xイオン濃度や電場といった多様な物理化学的因子によって精緻に制御されていることを明らかにした。本研究の特筆すべき成果は、当初の想定を遥かに超える進展と、極めて深いレベルでの異分野融合の実現にある。当初は個別の要素技術開発が主眼であったが、研究が進むにつれて各分野の境界が取り払われ、互いの技術が有機的に結合した。「測る」ための複合光学顕微鏡やマイクロ流体デバイス、「診る」ための ^{19}F ・粘度応答性分子ツール、「解く」ための計算科学的予測・解析基盤は、単なる技術の寄せ集めではなく、相互にフィードバックを与え合うことで高度に統合されたシステムへと昇華した。

加えて、本プロジェクトは国際的な研究交流と若手育成の面でも大きな足跡を残した。タイの連携大学とのシンポジウム開催や、若手研究者が主体となって異分野の壁を越える議論を重ねた経験は、将来の学术界を担う人材に国際的かつ多角的な視野をもたらすものである。このように、研究・教育・国際化の全方位において本共同研究は当初の計画以上の密度で実施され、細胞内という極めて複雑な動的環境下での生命現象を統合的に理解するための強力なプラットフォームを創出するに至った。今後はこの基盤技術を駆使し、生命機能の動作原理に迫る新たな学術領域の開拓が期待される。

REFERENCE

- 1) Kanemaru, Yamaguchi, Sakumichi, Sakai and Yoshida, *J. Phys. Chem. B.*, **129** (2025) 9769-9780.