

国際共同研究に関して、記入日時点の研究成果、研究成果の発表予定について具体的に記入してください。

適宜、行を追加してください。

派遣者所属名	理学研究科
派遣者氏名	茶谷 絵理
研究タイトル	レーザートラッピング法を用いた細胞内液滴の形成と制御方法の開拓
研究目的	<p>細胞内液滴とは、細胞中に形成される高い流動性を持った液滴状のタンパク質濃縮体のことである。この濃縮体は「膜の無いオルガネラ」と称され、細胞内で特定のタンパク質を必要な部位に局在させる手段として機能している。さらに細胞内液滴の形成と消失は時空間的に制御されており、異常化すると流動性を失い、アミロイド線維の生成ひいては神経変性疾患の発症に繋がるということが指摘されている。このような背景から、細胞内液滴は、生命システムを理解し制御するために注目すべき重要な対象であると考えられる。しかし、時空間的に制御しながら液滴を形成誘導する手法は、現在のところ確立していない。</p> <p>そこで本研究では、レーザートラッピングにより液滴を人為的に駆動し、新規な時空間的制御方法としての確立を目指す。神経変性疾患の原因タンパク質であり、なおかつ液滴からアミロイド線維が形成することが報告されているαシヌクレインを研究対象とし、レーザーにより液滴の駆動が見られる可能性を検討する。さらに、レーザーによる液滴の生成と成長だけでなく、後続的に疾病の誘起に関わる液滴老化の現象も見られるのかについても検証する。</p>
研究報告 (内容および成果) 2000字以内	<p>本研究は、台湾国立陽明交通大の増原宏教授より共同研究の承諾を得て実施した。増原宏教授はレーザー化学の第一人者であり、これまでにレーザートラッピング法により様々な物質のクラスターや結晶核形成など多様な分子集合を誘起してきた実績を持つ。茶谷もこれまでに、リゾチームを用いたタンパク質のレーザートラッピングの共同研究に参画してきた (Yi et al., J. Phys. Chem. C, 125, 18988 (2021), Yi et al., App. Phys. Express 16, 025501 (2023))。</p> <p>レーザートラッピングとは、近赤外レーザーを対象物に集光すると、光が物質と相互作用することで力学的な力である光圧が発生し、捕捉される現象である。光圧により物体がレーザー集光焦点に捕捉される現象は光ピンセットとして知られるが、基本的な捕捉対象はマイクロメートルスケールの誘電体であり、ナノスケールのタンパク質分子は通常、捕捉の対象外と考えられていた。ところが、気液界面付近でリゾチームの重水溶液に1064 nmレーザーを照射すると、タンパク質分子が集光点に捕捉されて集合体が大きく発達することが判明した。このとき、トラッピングはリゾチームが分子間で引き合う濃厚条件にて誘起されたことより、ナノサイズのタンパク質でも分子間引力性の強い条件下ではレーザートラッピングが進行する可能性が示唆された。もしこの予測が正しいのであれば、分子間引力性の強い配列を持つ液滴形成タンパク質では、光圧による分子集合が効</p>

果的に進む可能性が期待されることになる。このような仮説を増原教授と議論したところ、共同研究を受け入れていただき、研究を実施することとなった。

【2022年度の実施内容】

実験は2022年12月11日より開始し、3月末までに計3回、増原研究室に滞在し実験を行った。茶谷側からは、博士後期課程学生1名（柚佳祐）が参加し、これが本研究進展の大きな推進力となった。実験は茶谷、柚が増原研に赴いて行い、増原研究室の博士研究員と大学院生に装置セッティングや測定で手厚いサポートを受けながら合同で測定した。測定の合間には増原教授と頻りに議論し、得られた成果に基づきながら研究の方向性を定めた。

増原研究室との数回にわたるオンライン打合せを経て、初回の実験は2022年12月11日～14日（渡航者：茶谷、柚）に行った。先ずいくつかのタンパク質を持参し、レーザートラッピング効果が確認されるか、またトラッピングの結果として液滴が形成するののかについての検討を行った。その結果、 α シヌクレインに良好な液滴形成が見られたため今後の研究対象として選定した。

2回目の実験（2023年2月6日～22日、渡航者：柚）では、 α シヌクレインのレーザーによる捕捉効果の詳細を明らかにするための解析を実施した。1回目の実験により、液滴形成は試料中に含まれるタンパク質濃度や添加物の条件に強く依存することが判明したため、その詳細を検討した。さらに、液滴内部のタンパク質の濃度分布や流動性の評価を行うため、蛍光イメージングおよびFRAP法の適用のための装置のセッティングを行った。

3回目の実験では（2023年3月23日～31日、渡航者：茶谷、柚）、共焦点蛍光イメージングを用いて液滴のサイズ発達および内部濃度の経時変化を追跡した。これと並行し、内部の流動性の評価を行うためのFRAP法を導入するために装置のセッティングを改変した。さらに、液滴内部のラマン散乱スペクトルの測定およびアミロイド線維構造を識別するチオフラビンTを用いた蛍光イメージングを実施し、長時間レーザー照射を行うことによってもたらされる経時的な α シヌクレインの構造変化の調査を行った。

【得られた成果】

以上の実験から、 α シヌクレインは集光近赤外レーザー光圧によってトラッピングが可能であり、液滴の形成が顕著に進行することを明らかにした。液滴は流動的で、レーザー焦点を超えて経時的に大きく成長する様子が確認された。さらに、2023年度にも実験を継続することで、液滴の出現および成長速度が、試料自体の条件だけでなく照射するレーザーの強度や時間にも依存することが確認された。これに加え、レーザー照射を継続すると液滴内部の β シート含量が増加し、やがてアミロイド線維から成る棒状の凝集体が出芽する様子を捉えることもできた。

以上の結果より、レーザートラッピング法は、液滴を高い時空間分解能で生成させ、しかも老化も自在に誘導できる手法として有用であるという将来展望が明らかになりつつある。現在はこれまでに得られたデータの細部の解析と整理を行い、論文発表の準備を進めている。

<p>研究成果の発表予定</p>	<p>【学会発表】 16th international Symposium on Nanomedicine (ISNM2023)に要旨登録しており、2023年11月20-22日のいずれかに口頭発表する予定である。 著者:Keisuke Yuzu, Ching-Yang Lin, Chih-Hao Huang, Po-Wei Yi , Pinxun Huang, Hiroshi Masuhara, and ○Eri Chatani 発表題目 : Optical-force induced spatiotemporal formation of a single liquid-like droplet of α-synuclein and subsequent maturation into amyloid fibrils)</p> <p>【論文発表】 原稿を作成している最中であり、完成次第国際学会誌へ投稿する予定である。 著者:Keisuke Yuzu, Ching-Yang Lin, Chih-Hao Huang, Po-Wei Yi , Pinxun Huang, Hiroshi Masuhara*, and Eri Chatani* (*corresponding authors) 論文題目 (仮題) : Optical-force induced spatiotemporal formation of a single liquid-like droplet of α-synuclein and subsequent maturation into amyloid fibrils</p>
------------------	--