総説

高分子混雑効果を細胞モデル系から読み解く

柳澤実穂 東京農工大学大学院工学研究院先端物理工学部門

藤原 慶 慶應義塾大学理工学部生命情報学科

Molecular crowding and confinement in small spaces are remarkable features of living cells. To reveal the physicochemical aspects of these features, the effects of confinement-size and droplet surface on them should be separated from them. Water-in-oil microdroplets covered with a lipid layer (droplet system) have suitable characters to separate them, because the droplet sizes and lipid species covering the droplet are easily controlled. Here, we introduce recent achievements using the droplet system that has revealed effects of confinements on protein expression, accelerated phase-separation of biopolymer blends, and behaviors of highly concentrated biopolymers.

Macromolecular crowding / Confinement effect / Microdroplet / Liposome / Phase separation / Artificial Cells

1. はじめに —細胞における高分子混雑効果—

細胞の中には、多種多様な生体高分子が非常に高い濃度で存在している (図 1A). このような濃厚な高分子環境は生体高分子の振る舞いに影響する. 例えば生化学反応やタンパク質の折り畳みの効率, 細胞中とバルク量の希薄溶液では大きく異なることが知られている¹⁾. こうした影響は「**高分子混雑効果**」と呼ばれる. 従来研究において, 高分子混雑効果を解析するために, 濃厚な高分子環境を再現する試みがなされてきた. しかし細胞内環境は濃度だけでなく, ①数千に及ぶ種類の生体高分子による超多成分系であること, ②細胞内に存在する高分子溶液の量が非常に微小であること, ③微小な液体を保持するために閉じた細胞膜界面があること, といった特徴が存在する. 特に上記②と③の効果は, 「**閉じ込めの効果**」として近年注目されてきている²⁾⁻⁴⁾. しかし②に起因する『**サイズの効果**』と③に由来する『**膜界面の効果**』を分離して解析することは困難であった. 著者らは, 脂質単分子膜で覆われたマイクロ液滴 (油中水滴型エマルジョン) を用いて, サイズと膜物性を制御し, 上記②と③の効果を分離して議論することに成功してきている (図 1B). 本稿では, 比較的高濃度の多成分高分子溶液をマイクロ液滴へ封入し, そこでの構造形成をバルク系と比較することで明らかとなってきた新たな「**閉じ込めの効果**と**高分子混雑効果**」について紹介したい.

図 1
(A) 細胞内の高分子混雑効果を示す細密な模式図 (David S. Goodsell 氏の許可を得て公式 HP より掲載), (B) それをモデル化した脂質膜で覆われた高分子混合溶液のマイクロ液滴.

2. 閉じ込めと膜界面の効果 —タンパク質合成—

脂質を溶解させた油相に, 少量の水溶液を分散させると, 脂質単分子膜で覆われたマイクロ液滴が形成できる. この水溶液を無細胞タンパク質発現系とすれば, 液滴内で DNA から緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現できる. そこで, ウサギ赤血球由来の無細胞タンパク質合成系を用いた GFP 発現量を指標に, タンパク質合成における閉じ込め効果を定量的に解析した. 封入してから 3 時間後のマイクロ液滴を蛍光顕微鏡で撮影した画像が図 2A である. 単位体積当たりの GFP 蛍光強度から GFP 濃度: C_{GFP} を見積もったところ, 小さな液滴ほど大きな C_{GFP} 値を示すことが分かった. こ

Microdroplets as a Model System for the Study of Macromolecular Crowding in Cells

Miho YANAGISAWA¹ and Kei FUJIWARA²

¹Department of Applied Physics, Faculty of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

²Department of Biosciences and Informatics, Faculty of Science and Technology, Keio University

(A) 大きさの異なるマイクロ液滴でのGFP発現

(B) GFP発現量に対する液滴サイズ (R) と脂質の影響

図 2

マイクロ液滴でのGFP発現量に対する空間閉じ込めと膜界面の影響。(A) 蛍光顕微鏡画像と液滴直径に沿った蛍光強度の分布。(B) 液滴封入後25時間が経過した後の蛍光強度と液滴サイズの関係、蛍光強度の増加率と液滴サイズの関係。色の違いは液滴を覆う脂質の種類を、また control はバルク系の結果を示す。(文献5から改変)

の現象に対して、閉じ込めサイズと膜界面の影響を分けて解析するため、『マイクロ液滴の大きさ』と『液滴表面を覆う脂質の種類』を変化させる実験を行った。脂質は、電気的に中性である Phosphatidylcholine (PC)、水溶液条件によって脂質膜が正あるいは負に帯電する Phosphatidylethanolamine (PE)、負電荷をもつ Phosphatidylglycerol (PG) を用いた。マイクロ液滴の C_{GFP} とその増加率 (GFP 合成速度): dC_{GFP}/dt を、液滴の表面積と体積の比に対応する液滴半径の逆数: $1/R$ に対してそれぞれプロットしたところ、全ての脂質の場合において比例関係が成り立つことが分かった (図 2B)。比例係数は脂質によって異なり $PG > PC > PE$ となった。この値は、生理水溶液中で脂質膜がもつ電気的性質: PG (負) $< PC$ (中性) $< PE$ (正) に由来すると考えられる。以上から、表面積/体積の大きな細胞サイズでは、膜界面がタンパク質発現にポジティブな影響を与え、発現を加速させる効果があることが示唆された⁵⁾。

3. 閉じ込めの効果 —多成分系における相分離—

細胞内に存在する殆どの生体高分子は水溶性であるが、異なる種類の生体高分子を混ぜると、親和性が低下して相分離あるいは沈殿することがある。こうした現象は「水性二相分離」として知られ、タンパク質の精製法としても用いられてきた⁶⁾。生体高分子を分離させる最も代表的な合成高分子は、電気的に中性であ

図 3

直径が約 50, 80, 120 μm の液滴へ DNA/PEG 水溶液を封入してから2時間半後の DNA 分布を示す蛍光顕微鏡画像。スケールバーは 20 μm である。(文献8から改変)

る水溶性高分子: ポリエチレングリコール (PEG) だろう。例えば、DNA に PEG を混合した上で NaCl や KCl などの電解質を一定濃度以上添加すると、DNA が凝集することが知られている⁷⁾。そこで、バルク系では均一相を保つ DNA/PEG 水溶液 (150 bp DNA 52 mg/ml, PEG6000 114 mg/ml, NaCl 71 mM) をマイクロ液滴へ封入することで、相分離に対する空間閉じ込め効果を調べた。内包してから2時間が経過すると、小さな液滴でのみ相分離の様子が観察された⁸⁾ (図 3)。相分離によって DNA はマイクロ液滴の膜界面近傍に局在し、やがてマクロに分離した。さらに偏光顕微鏡を用いて観察したところ、過去の報告例のように⁹⁾、相分離した DNA 相は液晶のような配向性をもった秩序構造を作っていることが確認された。バルク系の DNA/PEG 溶液では、剛直な DNA の周りに柔らかな PEG が入り込めない領域 (枯渇領域) が生じ、DNA 同士が重なり合うことで PEG の並進エントロピーを稼ぐために相分離すると説明されている⁷⁾。表面積/体積比の大きなマイクロ液滴では、壁と高分子との間にも枯渇領域が生じるため、枯渇相互作用が強まり、バルク系では均一相となる条件でも、小さな液滴へ封入することで相分離が起こると考えられる。このような DNA の相分離現象は、その他の柔らかな高分子 (アルギン酸など) を添加した場合でも見られる¹⁰⁾。それゆえ、細胞内に存在する多成分高分子溶液は、その空間サイズに特異的な構造形成メカニズムをもつと考えられる。

4. 閉じ込めと膜界面の効果 —相分離とゲル化—

上記では、高分子溶液について述べてきたが、多くの細胞には液体 (ゾル) 相だけでなく、固体 (ゲル) 相も存在している。その代表例は、細胞膜直下に存在するアクチンゲル相だろう。アクチン繊維をマイクロ液滴へ閉じ込めると、アクチンは液滴サイズや膜界面に依存した構造形成をみせることが報告されている¹⁰⁾。細胞内環境のように、ゲル化する高分子に加えて、ゲル化しない高分子も存在する場合では、どのような構

(A) 相分離後にゲル化が起こる場合

(B) 相分離中にゲル化が起こる場合: PC液滴

図 4

直径約 50 μm の液滴におけるゼラチン・PEG 溶液の相分離パターン。(A) 相分離後にゲル化が起こる場合では、膜界面の影響により三日月形 (PC) とカプセル形 (PE) の 2 つのパターンが現れる。(B) 相分離中にゲル化が起こる場合では、相分離がゲル化によって停止されるため、様々なパターンが現れる。(文献 12 より改変)

造形成が生じるだろうか。この問いに答えるために、マイクロ液滴内に閉じ込められた高分子混合系に対して、相分離とゲル化を同時に進行させた際の構造形成を解析した。

二相分離する高分子混合系は、約 30°C 以下でゲル化するゼラチンにゲル化しない PEG を混合した水溶液を用いた¹¹⁾。ダブル・クエンチ実験により、相分離からゲル化開始するまでの経過時間を制御した結果、マイクロ液滴におけるゲル・ゲル共存相での構造形成は、(1) ゼラチンと脂質の親和性 (濡れ性)、(2) 相分離とゲル化の速度差、(3) 高分子組成、(4) 液滴サイズ、に依存することが分かった。(1) ゼラチンと脂質の親和性は、脂質膜の電気的性質によって変化する (図 4A)。電気的に中性である PC では、ゼラチン相が液滴界面へ部分的に吸着し (部分濡れ)、三日月型のマイクロゲルが現れる。一方、溶液中で帯電する PE では、ゼラチン相が液滴表面を完全に覆う (完全濡れ) ため、マイクロカプセルが形成される。(2) この構造形成に重要となる界面濡れは、相分離中にゲル化が進行する場合でも維持される。それゆえ PE では、相分離からゲル化までの経過時間を短くすると、ゲルカプセルの厚みが薄くなる。PC では、ゼラチン相が早急にゲル化するため、その空間配置と大きさに応じ

(A)

(B)

図 5

高分子混合溶液を封入したリボソームの高浸透圧下での濃縮。(A) 初期のリボソーム内外の浸透圧比 (P_{out}/P_{in}) に応じて閉じ込められた高分子は濃縮される。(B) 濃縮後の高分子溶液と初期の浸透圧比率の関係。濃度は同時に封入した GFP の蛍光から測定している。(文献 16 より改変)

て、円盤型や星型、といった複雑な形のゲルが形成される (図 4B)。(3) また、高分子組成を変化させると、多孔質ゲルなども得られる。(4) 液滴サイズが小さくなると、ゲル形状を決定するギブスの自由エネルギーにおける膜界面の寄与がより支配的となる。それゆえ、比較的大きな液滴 (この場合では半径 20 μm 以上) では球形を維持するが、その閾値よりも小さな部分濡れ液滴では、相分離界面を小さくする変形が見られる。このように、マイクロ液滴に閉じ込められた高分子混合系において相分離とゲル化が結合すると、閉じ込めサイズと膜界面の影響だけでなく、それぞれの進行速度差が大きな制御因子として働くことが示された¹²⁾。通常、細胞内では様々な相転移現象が並行して生じており、本研究結果は、それぞれの相転移が動的に結合することを示唆している。

閉じ込めの効果

5.

—超高濃高分子溶液—

マイクロ液滴はバルクの油水界面に形成した別の脂質単分子膜を通過させることで、リボソーム (リン脂質小胞) を作製できる¹³⁾。この手法を用いると、比較的

自由にリポソーム内に化合物を導入できるが、高濃度の高分子溶液となると容易でない。例えば、生体内の高分子濃度に到達させた細胞抽出液は、スパーテルでつくえるほど高い粘性を示す¹⁴⁾。こうした高粘性の溶液を油中に分散させることは困難であるため、粘性が低い状態でリポソームを形成し、後から内部濃度を上昇させる必要がある。そこで脂質二重膜が、水など100 Daに満たず荷電もない低分子は通過させるが、大きな分子や荷電分子は透過させづらい半透膜の性質をもつことに着目し、細胞内並みに濃厚な生体高分子を内包したリポソームを形成することに成功した¹⁵⁾。内部浸透圧が低いリポソームは、高い外部浸透圧をもつ溶液にさらされることで、水のような非荷電低分子のみが抜け、結果として内部にとどまる成分は濃縮される。最終的な浸透圧のつり合いから、濃縮係数はリポソーム内部と外部の浸透圧比により決定されることが期待される。実際に単成分であるBSAを内包したリポソームの場合、高分子濃縮度と浸透圧比は比例し、400 mg/mLを超える濃度まで濃縮可能であった。一方、非常に興味深いことに、細胞抽出液を内包したリポソームでは濃縮の限界が存在し、その値は生体濃度である300 mg/mLの近傍となった。さらに、浸透圧差にともなう内部体積減少によって余る膜成分の形状が、BSA内包条件では出芽状であるのに対し、細胞抽出液では桿菌のようなチューブ状であった¹⁶⁾。このような違いが何に起因するのかは現在解析中であるが、細胞抽出液に含まれる分子の多成分性が関与している、というアイディアを得ている。膜に内包された細胞並みに濃厚な細胞抽出液の解析は、超多成分な高分子溶液のもつ混雑効果をより鮮明に描き出すだろう。

6. おわりに

マイクロ液滴は、最近のアクチンリング再構成に一役買う^{10), 17)}など、その界面安定性によって再現可能な生命現象を急激に増やしている。これにより、著者らが専門とするソフトマター物理で扱うことが可能な細胞モデルが拡張され、より深く細胞に潜む物理を解析できるようになってきた。今後は、実際の細胞のような非球形のマイクロ液滴や細胞組織のようなマイクロ液滴の集積物^{18), 19)}を用いた研究が本格化し、膜タンパク質を介した細胞間の物質輸送など、物質と生命を定義付ける物理的要因が解明されることが期待される。

謝 辞

本研究における共同研究者である吉川研一教授（同志社大学）、鶴田昌之教授（九州大学）、坂上貴洋博士（九州大学）、D. Biswas博士（インド理科大）、加藤綾子博士らに感謝申し上げる。

文 献

- 1) Ellis, R. J., Minton, A. P. (2003) *Nature* **425**, 27-28. DOI: 10.1038/425027a.
- 2) Minton, A. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 10577-10580. DOI: 10.1074/jbc.R100005200.
- 3) Zhou, H. X. *et al.* (2008) *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 375-397. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125817.
- 4) Kato, A. *et al.* (2009) *Biophys. J.* **97**, 1678-1686. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.06.041.
- 5) Kato, A. *et al.* (2012) *Sci. Rep.* **2**, 283. DOI: 10.1038/srep00283.
- 6) P. A. アルバートソン (1972) 「水性性二層分配法—細胞顆粒, ウィルス, 核酸などの巨大分子・粒子の分離分析法」, 東京大学出版会.
- 7) Vasilevskaya, V. V. *et al.* (1995) *J. Chem. Phys.* **102**, 6595. DOI: 10.1063/1.469375.
- 8) Biswas, N. *et al.* (2012) *Chem. Phys. Lett.* **539**, 157-162. DOI: 10.1016/j.cplett.2012.05.033.
- 9) Kojima, M. *et al.* (2006) *J. Chem. Phys.* **124**, 024902. DOI: 10.1063/1.2145752.
- 10) Yanagisawa, M. *et al.* (2014) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **307**, 175-204. DOI: 10.1016/B978-0-12-800046-5.00007-2.
- 11) Yanagisawa, M. *et al.* (2014) *J. Mol. Liq.* **200**, 2-6. DOI: 10.1016/j.molliq.2013.12.035.
- 12) Yanagisawa, M. *et al.* (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 15894-15899. DOI: 10.1073/pnas.1416592111.
- 13) 山田彩子ら (2009) *生物物理* **49**, 256-259. DOI: 10.2142/biophys.49.256.
- 14) Fujiwara, K., Nomura, N. S. (2013) *生物物理* **53**, 262-263. DOI: 10.2142/biophys.53.262.
- 15) Fujiwara, K. *et al.* (2014) *BIOPHYSICS* **10**, 43-48. DOI: 10.2142/biophysics.10.43.
- 16) Fujiwara, K., Yanagisawa, M. (2014) *ACS Synth. Biol.* **3**, 870-874. DOI: 10.1021/sb4001917.
- 17) Miyazaki, M. *et al.* (2015) *Nat. Cell Biol.* **17**, 480-489. DOI: 10.1038/ncb3142.
- 18) Yanagisawa, M. *et al.* (2013) *Soft Matter* **9**, 5891-5897. DOI: 10.1039/C3SM50938A.
- 19) Carrara, P. *et al.* (2012) *ChemBioChem* **13**, 1497-1502. DOI: 10.1002/cbic.201200133.

柳澤実穂

柳澤実穂（やなぎざわ みほ）

東京農工大学大学院工学研究院先端物理学部門特任准教授。2009年お茶の水女子大学大学院人間文化創成科学研究科博士課程修了，博士（理学）。JSPS 特別研究員 PD（京都大学），九州大学理学部助教を経て，14年より現職。

研究内容：脂質膜小胞や高分子液滴での相転移に関する物性実験

連絡先：〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16
E-mail: myanagi@cc.tuat.ac.jp

藤原 慶

慶應義塾大学理工学部生命情報学助教。2009年東京大学新領域創成科学研究科修了，博士（生命科学）。京都大学 iCeMS 特定研究員，JSPS 特別研究員 PD（東北大学）を経て，14年より現職。

研究内容：生細胞に近い人工細胞の構築と解析
連絡先：〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1
E-mail: fujiwara@bio.keio.ac.jp

URL: <http://user.keio.ac.jp/~kfujiwara/>