細胞内部のレオロジーと活きの良さの測り方

～活きの良さが細胞のレオロジー的性質を制御する～

九州大学 理学研究院　水野大介

細胞の力学特性の重要性と歴史（様々な計測法）

レオロジーは物質が持つ最も基礎的な性質であり、工業製品やハイテク機器、建築材の機能や耐久性を評価するために必ず計測される。幹細胞の分化[1]や個体の発生、癌の悪性化[2]、老化や疾病の進行等々、生命現象においても至るところで、細胞や細胞集団のレオロジー的性質が重要な役割を果たす。例えば、癌の浸潤・転移やその他の疾病が進行する過程では、疾患細胞が自身とその周辺組織の構造や力学的性質を巧妙に変化させて生存に都合の良い力学的環境を作り出す。そのため、癌細胞や腫瘍間質の力学特性は、癌の悪性度を診断するための指標となる。

私たちの体の基本的な構成単位である細胞の性能や機能を評価するために、これまでも様々な方法で細胞のレオロジーを計測することが試みられてきた。図１に１部であるが、その例を示す。一覧を見て分かるとおり、細外側から細胞を押したり・つついたりしてその変形を評価するものが殆どである。細胞の“内側”の力学特性は計測することが難しく、これが細胞の理解に不明な点が残る一つの原因であった。

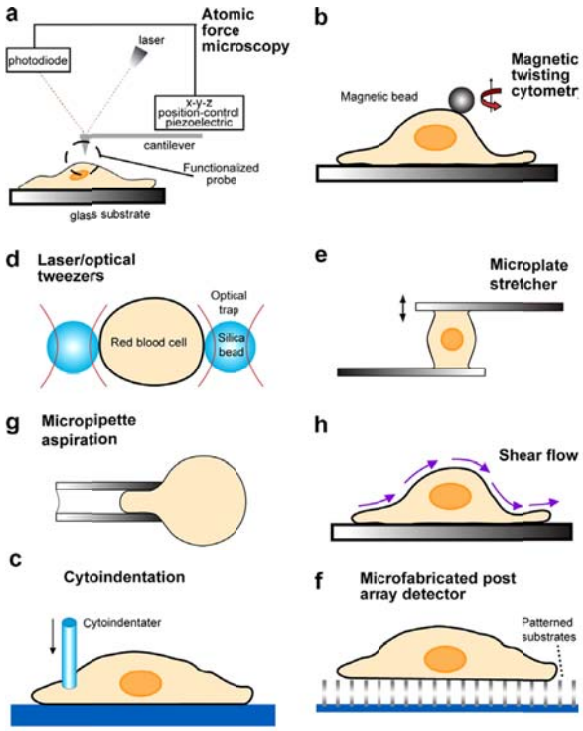


図１：細胞レオロジーの様々な計測法
Biomechanics and biophysics of cancer cells (2007)より

光捕捉とレーザー干渉法による細胞内部のマイクロレオロジー計測

そこで最近我々は、マイクロレオロジー(MR)と呼ばれる手法を用いて、細胞内部のレオロジーを計測している[3]。MR 計測とは、プローブとして媒質に導入した直径約 1 μm ほどのコロイド粒子のブラウン運動や外力を加えた際の応答から、周囲の媒質の力学特性（硬さや粘性）を計測する手法である。細胞質中に埋め込んだ粒子には、光捕捉(OT)により外力を加えることができ、それに対する応答をレーザー干渉法(LI)により精密に計測した。これにより、粒子周辺の細胞内部空間の硬さや粘性を広い周波数帯域(1 mHz － 1 MHz)で知ることができる。平衡状態にある物質ならば、媒質内部でのブラウン運動による粒子のゆらぎの大きさを観察することにより、同様の力学特性を得ることが可能である。しかし、細胞のように“生きている物質”では、ブラウン運動だけでなく、自分自身が“力”を生み出し内部の環境を乱雑にかき混ぜている。その際、導入した粒子は細胞自身の生み出す“力”によって大きくゆらぐ。そのため、粒子が大きく揺らぐからといって、細胞が柔らかい、あるいは、さらさらであるとは言えない[4]。このことを逆手

に取り、そのゆらぎの大きさから細胞の生み出す“力”（＝活きの良さ）や消費しているエネルギーを定量することが可能となる[5, 6](図 3 下）。

光捕捉(OT)は 1990 年頃に Ashkin らにより発明された技術である。対物レンズを用いて急峻に収束させたレーザー光の収束点に屈折率の高い微細物体を捕捉する。OT による微細物体の捕捉後、試料を透過したレーザー光をコンデンサーレンズを用いて再度コリメートさせると、後側焦点面(BFP)に散乱光と透過光の干渉パターンが現れる。この干渉パターンは、光捕捉された微細物体の位置に依存して変化するために、これを BFP に 4 分割光ダイオード(QPD)を設置して検出すれば、高い時空間分解能で微細物体を精密に追跡できる(図 2)。そのためにこの方法はレーザー干渉法(LI)と呼ばれる。OT と LI を用いる MR 計測は、高い時空間分解能計測が可能な点で他の手法(ビデオ観察等)に比べて優位であり、実用的な性能を持つ唯一の MR 手法であると考えている[7]。

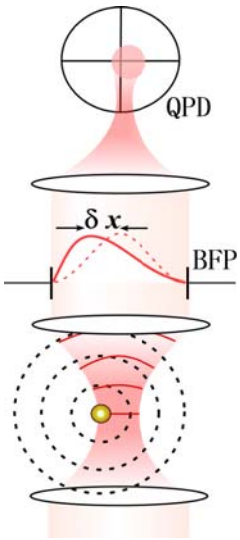


図 2：光捕捉と
レーザー干渉法

OT と LI は、均質かつ静謐な媒質中で実行される必要があるために、従来の MR 計測も人工的に合成・抽出した試料に使用が限定されることが多かった。他方で、細胞内部の媒質は分子サイズのモーターが生み出す力やその他の代謝活動によってかき乱され、激しい細胞質流動が生じている。そのために、レーザーの集光部位にコロイドを安定的に光捕捉して力を加えつつ、レーザー干渉法により揺らぎと応答を計測することが困難であった。強力なレーザー光を用いれば細胞内で光捕捉を行うこと自体は可能であるが、光化学的な擾乱により周辺の細胞質が変性してしまう。また、強力な光捕捉は計測したい粒子の揺らぎや応答自体を抑制してしまう[7]。

そこで我々は、細胞内部の粒子変位を LI 計測しつつ、これに基づいて OT に用いるレーザー光と試料を設置するピエゾステージを Feedback 制御することで、細胞質流動に伴う粒子の動きを時々刻々追跡した。速いが狭い範囲に留まる揺らぎにはレーザーが追随し、遅くても広い範囲に渡る揺らぎにはピエゾステージが追跡できる。こうした多重のフィードバック制御を行うことで、初めて細胞内部のレオロジー特性と揺らぎ(活きの良さ)を同時に計測することが可能になった。その結果、細胞内部では熱平衡系では必ず成立する揺らぎと力学応答の間の関係(揺動散逸定理)が、破れていることが分かった[3]。このスペクトルの形状を議論することで、細胞が生み出す力のスペクトルが得られる[5, 7-9]。また、揺動散逸定理の破れ量として、図の緑の斜線部分の面積を議論することで、細胞が消費(散逸)するエネルギーを定量することも期待されている[6, 10]。

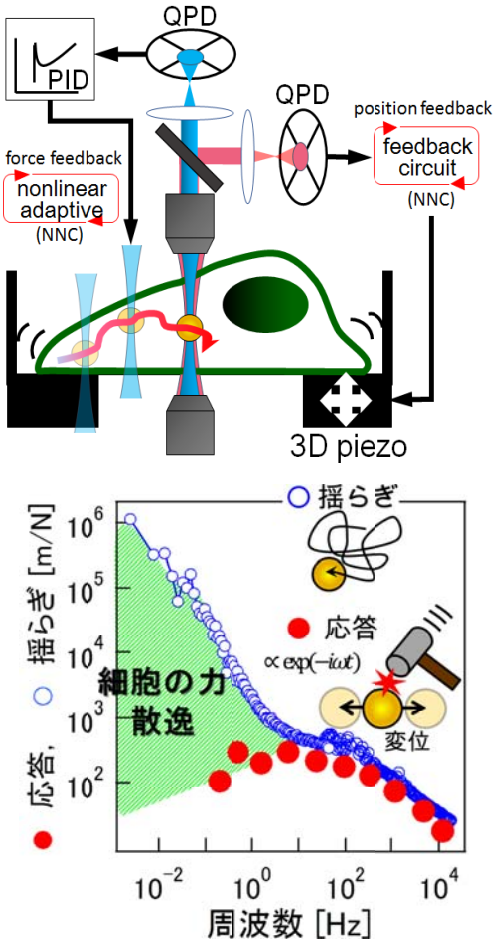


図 3：フィードバック MR(上)、
細胞内における揺動散逸定理の破れ(下)

ガラス形成物質としての細胞内部のレオロジー特性の理解
～活きの良さが細胞質を流動させる[11]～

早速各種の細胞内部の力学特性の計測を始めたところ、意外なことが分かった。これまで細胞の力学特性は主にアクチン等の細胞骨格により決定されると考えられてきたが、細胞内部で観測された粘弾性スペクトルは、細胞骨格のものとは本質的に異なっていた(図 4)。むしろ、エマルジョンや柔らかいゲルやコロイドが混み合った濃厚懸濁系(コロイドガラス)と同じ特徴を示している。実際、細胞の中身はとても混み合っていて(図 5 上)、細胞骨格は表皮に主に存在して細胞内 MR にはあまり影響を及ぼさない。逆に、外側から押して計測する従来法では主に細胞骨格のレオロジーが計測される。そこで、細胞内における固形物濃度を増加させ、混み合いを調節しながらマイクロレオロジー計測を行ったところ、粘性が濃度の指数関数として上昇することが分かった。この傾向も高分子溶液・ゲルの理論モデルでは説明できず、むしろ、体積が何倍も変化できる極めて柔らかいコロイドからなる濃厚懸濁系(コロイドガラス)の振る舞いに近い[12]。しかも、その振る舞いは細胞種に依存しない普遍性を持っていた。

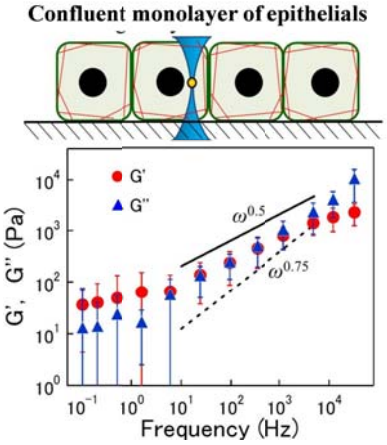
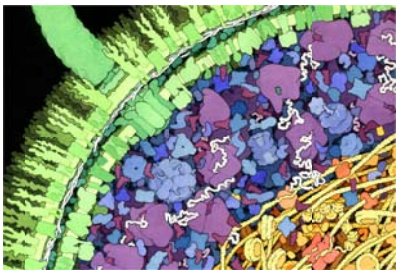


図４：細胞内部の粘弾性$(i\omega)^{0.5}$
破線は細胞骨格のべき則$(i\omega)^{0.75}$

そこで、細胞の中身を取り出した抽出液を用意し、細胞骨格と代謝活性を除去した後、その他の固形物濃度を変化させながらそのレオロジーを計測した。すると、細胞内における生理的濃度(≃300mg/ml)よりも低い濃度域において、僅かな濃度の増加に伴い粘性率が急激に(超指数関数的に)上昇・発散し、固化することが分かった。この抽出液の振る舞いも、ヒトもバクテリアも、卵細胞も組織細胞も定量的に同じ依存性を示し、細胞の種類に依らずない普遍性を示した。もし、生きた細胞も抽出液のように固化してしまうと、細胞内における活動もほぼ静止してしまう。必要な物質を合成して、必要な場所に送ることが出来なくなる。幸いなことに、実際にはこれは起こっていない訳である。しかしながら、内容物は全く同じであるにもかかわらず、生きた細胞内部が抽出液より高い濃度でも流動性を保つことができる理由は何であろうか？



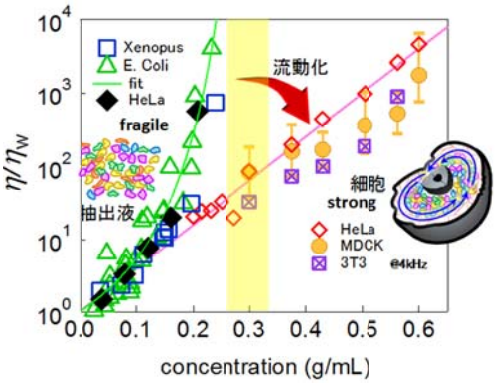


図 5：細胞内部の混み合い(上図：Goodsell 2009 より)；細胞内部と細胞質の粘性(下図)；活きの良さが細胞質を流動化させる

両者のレオロジー特性の相違を詳しく解析した結果、我々は、生きた細胞と抽出液のレオロジーに決定的な違いが生じる原因が、細胞内部の掻きまぜにあると予測している。つまり、細胞内部の原形質は、モータータンパク質が生み出す力やその他の代謝活動によって、激しく掻き乱されている。そのために、熱的揺動力のみでは構造緩和が引き起されない濃度においても、固化を免れて流動できる。

この仮説を確認するために、エネルギー源である ATP を枯渇させることで細胞の代謝活動を制御しつつ、細胞内部の MR 計測を行った。計測されたずり弾性率の実部の周波数依存性を図 6 に示す。エネルギーが枯渇し、モーター蛋白質による力生成や代謝活動が減退した細胞では、低周波数域における弾性プラトーの値(ゴム弾性)が顕著に増大していることが確認できた。これは、予測どおり代謝活動の減退に伴い細胞内部の流動性を保つことが困難になり、細胞内部の環境がガラス化していることを示す。

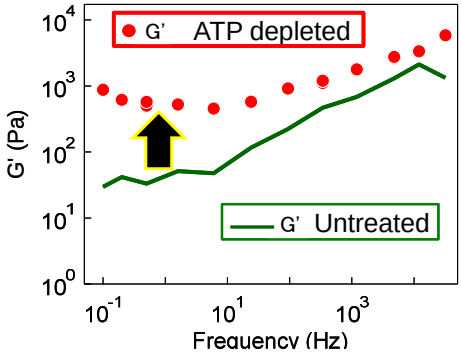


図 6：2-deoxyglucose および NaN_3 の投与により ATP 枯渇させた HeLa 細胞における弾性プラトーの出現

細胞の活きの良さとレオロジー

私たちの身の回りの機械やハイテク製品は、大抵が金属や半導体・プラスチック等の硬い物質からなる。これらの硬い物質は多少周囲の環境が変化してもその性質や働きをあまり変えないために、個々の部品を積み上げて出来上がる機械の働きを予測して設計できる。他方で、私たちの体を形成する細胞内部は、柔らかく形も機能も定まりにくい物質（ゲルやコロイド、脂質膜等のソフトマター）からなる。細胞内部でモーター蛋白質が生み出す程度の僅かな力や相互作用によって、構造の形成や組み換えが進行する柔らかい物質が、細胞内部環境を構成している。これが代謝活動に伴う掻きまぜによって、細胞質のレオロジー的性質が大きく変化する所以である。

こうした柔らかい物質からなるシステムである細胞の内部では、無数の分子機械が働いている。外部資源を取り込み、細胞内部でそれらを力学的なエネルギーに変換することで分子機械は動かされており、複雑な微細構造を作り上げたり、物質を生産・輸送したりする。今回、こうした代謝活動によって、細胞内部において揺動散逸定理が破れて、レオロジー的性質が顕著に変化することを報告した。しかしながら、その詳細な物理的機構の究明は始まったばかりである。“揺動散逸定理の破れ”としての細胞の“活きの良さ”は、個々の分子機械や代謝活動が生成する揺らぎをミクロンスケールまで“粗視化”して得られた量である。今後、活きの良さとレオロジー特性の密接な関連性の背後に潜む物理法則を探ることが、柔らかい物質からなる非平衡開放系としての細胞内空間のレオロジーを理解することに繋がると信じている。

参考文献

[1] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, Cell **126**, 677 (2006).
[2] M. Plodinec, M. Loparic, C. A. Monnier, E. C. Obermann, R. Zanetti-Dallenbach, P. Oertle, J. T. Hyotyla, U. Aebi, M. Bentires-Alj, R. Y. H. Lim, and C. A. Schoenenberger, Nature Nanotechnology **7**, 757 (2012).
[3] K. Nishizawa, M. Bremerich, H. Ayade, C. F. Schmidt, T. Ariga, and D. Mizuno, Sci Adv **3**, e1700318 (2017).
[4] D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. MacKintosh, Science **315**, 370 (2007).
[5] M. Guo, A. J. Ehrlicher, M. H. Jensen, M. Renz, J. R. Moore, R. D. Goldman, J. Lippincott-Schwartz, F. C. Mackintosh, and D. A. Weitz, Cell **158**, 822 (2014).
[6] T. Harada, and S. Sasa, Phys. Rev. Lett. **95**, 130602 (2005).
[7] D. Mizuno, D. A. Head, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt, Macromolecules **41**, 7194 (2008).
[8] D. Mizuno, R. Bacabac, C. Tardin, D. Head, and C. F. Schmidt, Phys. Rev. Lett. **102**, 168102 (2009).
[9] A. W. C. Lau, B. D. Hoffman, A. Davies, J. C. Crocker, and T. C. Lubensky, Phys. Rev. Lett. **91**, 198101 (2003).
[10] T. Ariga, M. Tomishige, and D. Mizuno, arXiv:1704.05302.
[11] K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa, and D. Mizuno, Sci Rep-Uk **7** (2017).
[12] J. Mattsson, H. M. Wyss, A. Fernandez-Nieves, K. Miyazaki, Z. B. Hu, D. R. Reichman, and D. A. Weitz, Nature **462**, 83 (2009).