

液滴混み合い状態としての細胞内レオロジー Microrheology of intracellular phase separation

水野大介, 藤原誠, 井口昇之

柔らかい物質(ソフトマター)からなる細胞内部のレオロジーは、液滴形成の主要な原動力でもある特異性を持たない弱い相互作用により決定されている。したがって、細胞内部のレオロジーを計測することで、相分離に伴う液滴の形成機構や、形成された液滴の物理的特性の理解を深めることができる。ただし細胞内部では、代謝活動に伴って生じる非熱的な揺らぎが内部状態を攪乱するために、レオロジーも相分離現象も、平衡系ではあり得ない様々な特徴を示す。本稿では、細胞内部のレオロジーに加えて、非平衡系に特有の非熱的な“揺らぎ”も観測できるマイクロレオロジーを用いることで、細胞内部の相分離現象の理解を深める最近の試みについて紹介する。

略語

MR：マイクロレオロジー (microrheology)

FDT：揺動散逸定理 (fluctuation-dissipation theorem)

■はじめに

従来の生命科学研究では、個別の強い分子間相互作用に基づいて進行する生化学反応(酵素反応や信号伝達)を探索して発見することが、生命の理解や医療の発展に繋がると信じられてきた。そのため、鍵と鍵穴のような明確な構造を生み出さない弱い相互作用は、あまり重視されてこなかった。しかしながら近年、弱い相互作用が引き起こす相分離に伴って形成される細胞内液滴が近年生物・医学分野で興味を集めており、関与する因子や構造の解析が急速に進みつつある¹。相分離は弱い相互作用が集団的に働くことで初めて現れる巨視的な現象であり、個別の分子間相互作用に基づいて還元的に理解することは原理的に困難である。そのため、相分離現象の基本的機構は、関与する分子の詳細に依らない現象論的な視点で明らかにされてきた歴史があり、平衡系における相分離の古典的な描像は既に確立している。しかしながら、代謝活動の活発な細胞内で生じる相分離現象は、そうした古典的描像では説明できない問題を孕んでいる。

生体を形成する柔らかい媒質(生体ソフトマター)の様々な性質や振る舞いは、個別には計測できないほど弱い分子間相互作用が巨視的なスケールで足しあわされた結果として出現する。したがって、分子集団の外場に対する応答(変形や流動)を扱う学問である“レオロジー”は、生体ソフトマターの物性研究において中心的な役割を果たしている。細胞のような生体ソフトマターからなる微小な非平衡系の力学特性や非平衡性を定量化できる手法にマイクロレオロジー(MR)がある。本稿では、まず、細胞内部に導入したコロイド粒子の外場に対する応答や、代謝活動に伴う非熱的な揺らぎを計測する手法を紹介する。この手法を細胞やそのモデル系に適用した最近の研究から、細胞内部の力学特性は、活発な代謝活動に伴う系の非平衡性が深く関与して決定されることを解説する。その上で、細胞内部のレオロジーと相分離現象が結びついた話題として、1) ミクロに相分離した液滴の混み合い状態として細胞内部の力学特性が理解されることや、2) 細胞の内部状態が揺らぎによって攪乱されることで、非平衡系に特有のレオロジーや相分離現象が出現し得ることを説明する。

最後に最近行っている試みとして、顕微鏡観察が可能な大きさまで細胞内部で成長させた相分離液滴”内部”のレオロジー計測について紹介する。

■生体ソフトマターのレオロジー計測で分かること

1) 弱い相互作用が形成するソフトマター

ソフトマターとは、ファンデルワールス力のような弱い相互作用により、 $1\text{ nm} \sim 1\text{ }\mu\text{m}$ 程度の大きさを持つ基本構造（コロイド）が集合した系のことであり、液体・高分子ゲル・液晶・ミセル等、私たちの身の回りで容易に変形する物質群が全て含まれる。蛋白質・糖類・核酸・生体膜やそれらの複合体(各種のオルガネラ)からなる細胞質もソフトマターであり、その柔らかさの根源的理解を目指す学問がソフトマター物理学である。巨視的な分子集団の流動や変形の機構を調べるレオロジー計測はソフトマター研究に不可欠であり、系に自発的に生じている揺らぎ(流動や変形)を観測する手法と、系を集団的に変形・流動させて、それに対する復元力（抵抗力）を計測する手法が存在する。実行が容易であることから前者の“揺らぎ観測”が頻繁に行われるが、揺らぎがどのように発生したのかを物理的に解釈するためには、後者の“応答計測”により媒質の粘弾性を求めることが重要である。系に巨視的な入力刺激(変形・流動)を加えると、分子間相互作用を集団レベルで足し合わせた復元力や抵抗力が発生する。応答計測では、これを計測することで、媒質の粘弾性率を求めている。ここで、弾性は大雑把には単位体積当たりの相互作用エネルギーを表し、粘性は分子の集団的な運動状態が散逸して失われる傾向を表している。つまり、ソフトマターの巨視的な外場応答に反映される形で、個別には直接計測しようが無いほど弱い分子間相互作用に関する情報が得られる。そのため、レオロジー計測は弱い相互作用により引き起こされる細胞内相分離現象の研究にも有用であると考えられる。

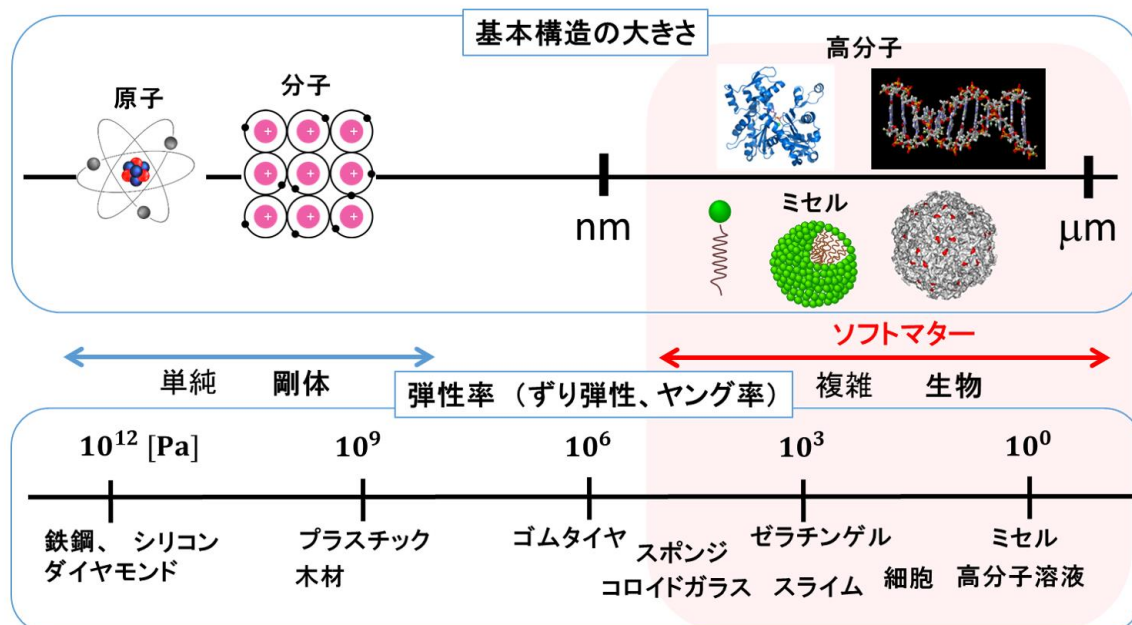


図1 ソフトマター

生体を形作る主要物質は、現代のハイテク機器や工業製品に使われる物質群よりもはるかに (~10桁程度) 柔らかく、固定された形状を持たない物質(ソフトマター)からなる。弱い相互作用に基づいて形成される分子集合体や、分子集合体同士の弱い相互作用が、その柔らかさを決定している。

2) マイクロレオロジーを用いた細胞内における揺らぎと応答の計測

マイクロレオロジー(MR)とは、コロイド粒子の運動からその周囲の媒質のメソスケール(nm~mm)の力学特性を計測する手法の総称である。コロイド粒子に周期的外力 $F(t) = \hat{F}(\omega) \exp(-i\omega t)$ を加えてその速度の周波数応答 $v(t) = \hat{v}(\omega) \exp(-i\omega t)$ を観測する応答計測と、外場を加えずに自発的な速度揺らぎ $v(t)$ を観測する揺らぎ計測がある。加えた外力に対して粒子の応答が大きいほど、また、平衡系における粒子の熱揺らぎ(ブラウン運動とも呼ばれる)が大きいほど、周囲媒質は柔らかく、さらさらである。したがって、粒子の速度応答関数(複素易動度) $R(\omega) \equiv \hat{v}(\omega)/\hat{F}(\omega)$ を、ストークスの式 $G^*(\omega) = -i\omega/(6\pi a R(\omega))$ に代入することで、周囲媒質の複素粘弾性 $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$ が求まる。ここで、 a はコロイド粒子の粒径であり、複素粘弾性率の実部 $G'(\omega)$ は弾性項、虚部 $G''(\omega)$ は粘性項である。速度応答関数 $R(\omega)$ と、熱揺らぎのパワースペクトル $\langle |\hat{v}_{th}(\omega)|^2 \rangle$ の間に成立する関係 $\langle |\hat{v}_{th}(\omega)|^2 \rangle = 2k_B T R'(\omega)$ が揺動散逸定理(FDT)である。ここで、 $\langle \rangle$ は統計平均、 $\hat{v}$ はフーリエ変換、 $\hat{v}$ は位相情報を含む複素量としての正弦波の振幅を表す。非平衡系では、熱揺らぎに加えて非熱的な揺らぎ $\langle |\hat{v}_A(\omega)|^2 \rangle$ が発生するために、両者の和 $\langle |\hat{v}(\omega)|^2 \rangle = \langle |\hat{v}_{th}(\omega)|^2 \rangle + \langle |\hat{v}_A(\omega)|^2 \rangle$ が揺らぎ計測で観測される。そのために、揺動散逸定理の破れ $\langle |\hat{v}(\omega)|^2 \rangle - 2k_B T R'(\omega)$ として非熱的な揺らぎ $\langle |\hat{v}_A(\omega)|^2 \rangle$ が求まる(図 3-b)。実際には、光捕捉を用いた力の印加とレーザー干渉によるコロイド粒子位置計測により、揺らぎ $\langle |\hat{v}(\omega)|^2 \rangle$ と応答 $R'(\omega)$ を同時に高い時空間分解能で求める²(図 2-a)。ただし、これらのコロイド粒子の操作・計測法では、レーザーの収束点近傍にコロイド粒子が存在している必要がある。そこで、コロイド粒子が激しく揺らぐ細胞内部でMRを行う際には、フィードバック制御による追跡をする(図 2-b)。これにより、細胞内部でも精密な力印加と変位計測によるMR計測を実現している^{3,4}。

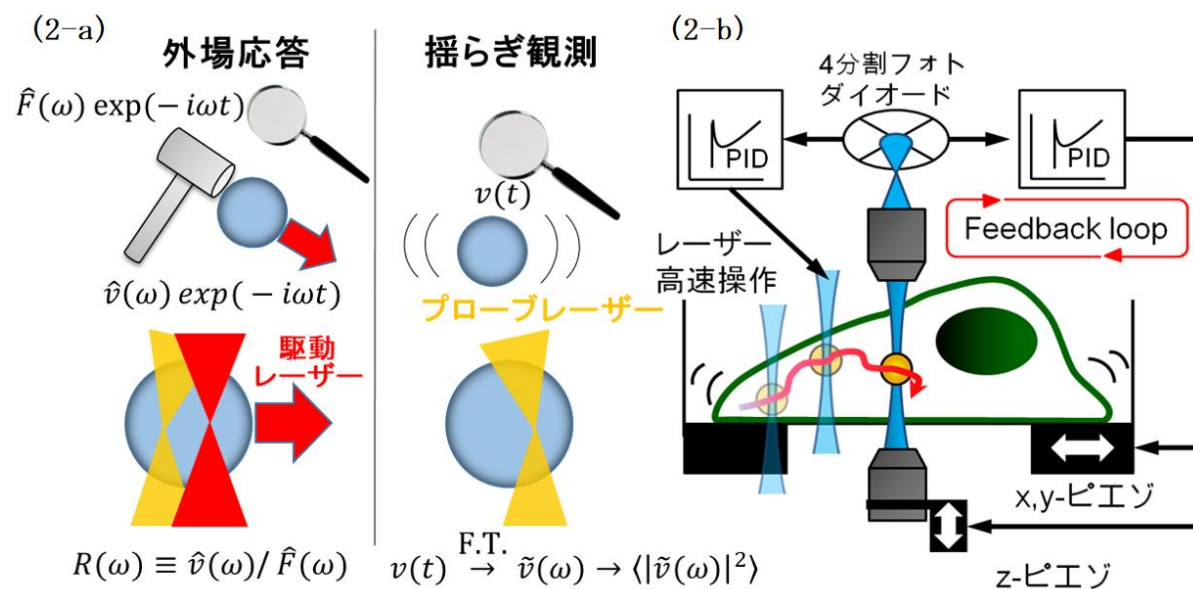


図2 細胞内部環境のマイクロレオロジー
(2-a) 外場に対する応答計測と自発揺らぎの観測からなるマイクロレオロジー計測法。(2-b) 生細胞内部や代謝を維持した細胞質内部の激しい流動に追従しながら、光捕捉した粒子の揺らぎと応答を観測し、レオロジーと実効温度を求める装置。

3) 平衡系とは異なる物理法則が支配する細胞内部環境

液—液相分離を始めとする細胞内現象の物理的な機構は、少数の成分から構成される平衡系の希薄溶液中(モデル系)で研究されることが多かった^{5,6}。他方で実際の細胞内環境は、多数の成分が混み合った状態で混在しつつ代謝活動が進行する非平衡系である。このような細胞内部で生じる現象には、モデル系とは異なる点がいくつか報告されてきた。例えば細胞内部は極端な分子夾雑環境にあるにもかかわらず、酵素反応が効率的に進んでいる。モーター蛋白質による能動輸送も、周囲に邪魔するものの無いモデル系よりも、混み合った細胞内のほうが速いことが知られる⁷。言わば、設備の整った陸上競技場で誰にも邪魔されずに走るよりも、満員電車(細胞内)の中のほうが速く走れるようなものであり、従来の科学的知見に基づいて理解することは困難である。以下に述べる通り、代謝活動に伴う非熱的な“揺らぎ”により内部状態が攪乱されるために、細胞内では非平衡系特有のレオロジー的挙動が生じる。細胞内における上記の不可解な現象は、この細胞の非平衡レオロジーに由来する。細胞内部で生じる液—液相分離現象にも平衡系とは異なる特徴があり、その物理的機構には細胞の非平衡レオロジーが関わっていると我々は考えている。

4) 混み合いと流動性が共存する細胞内部環境

細胞質は、細胞内部の生理活動のために基礎的な環境を提供する重要な媒質である。細胞質は、通常、たんぱく質、多糖類や核酸、脂質等の各種生体分子からなる複合体(オルガネラ)がひしめき合った混雑状態にある。そのため、細胞質も代謝活動が失われると流動性を失ってガラス化することが最近明らかとなった(図 3・a)。混み合いに伴う流動性の消失はガラス転移現象と呼ばれ、平衡系では密度(固形物濃度)の上昇以外にも、熱力学的な真の温度の低下によっても生じることが知られている。つまり、温度が表現する熱的な揺らぎの強さが、混み合いに伴う互いの閉じ込め効果を下回ったときに媒質はガラス化する。他方で代謝活動する生きた細胞内部では、何故か流動性が保たれている⁸。生きた細胞内部では、熱的な揺らぎに加えて代謝活動に伴う非熱的な揺らぎが生じている。こうした熱力学的な温度では表現できない非平衡系に特有の揺らぎが、混み合いに伴うガラス転移現象に影響を及ぼしていると考えられている。

揺らぎと応答を計測する MR 法では、熱的な揺らぎと代謝活動に伴って生み出される非熱的揺らぎを個別に求めることが可能であり、その結果非平衡系の“実効的な温度”に相当する指標が得られる⁹⁻¹¹。これまでに細胞内の実効温度 T_{eff} は、熱力学的な真の温度 T よりもはるかに高いことが明らかとなった(図 3・b)。つまり、混み合い要素の間に働く弱い相互作用が高い実効温度(が表現する揺らぎ)によって攪乱されるために、ガラス化が阻害されて細胞質の流動性が保たれている。このように代謝活動に伴う非熱的揺らぎによって混み合いと流動性を両立させることは、反応分子との出会いの確率を維持しつつ、生体分子機械が身動きして稼働することを担保できる点で、細胞内反応が効率的に進行する一因であると思われる。

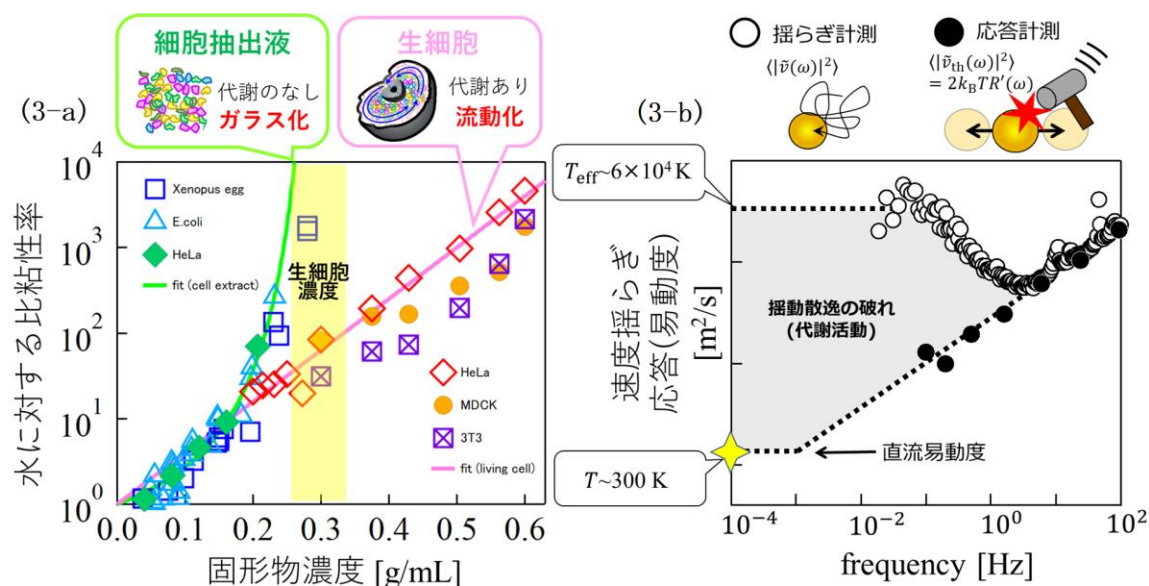


図3 細胞質の代謝による流動化と実効温度

(3-a) 細胞質と細胞の水に対する粘性率の固形物濃度依存性。ATP の加水分解に伴う代謝活性が無い時には、生理濃度以下でガラス転移を起こして固化する細胞質が、ATP 活性時(生細胞)は流動化する。(3-b) 細胞内部の揺らぎ応答スペクトル。代謝活性のない細胞質の実効温度は室温に等しいのに対し、細胞内部では室温よりも2桁以上高い実効温度(低周波数域の非熱揺らぎ)が観測される。

5) 細胞内では、何が混み合っているのか？

～ミクロに相分離した液滴の混み合いとしての細胞内部環境～

しかしながら細胞内部の混み合い状態を生み出す物質の実体は、良く分かっていない。蛋白質を始めとする生体高分子が混み合ってガラス化するためには、細胞内(～30%弱)よりもはるかに高い固形物濃度(～60%程度)が必要である。実際に、球状蛋白質である BSA の水溶液は、60%程度まで濃厚化して初めてガラス化する(図 4-a)。また、細胞質や細胞内部の粘弾性を調べると、水中に油の液滴が高濃度で分散したエマルジョンと同じ、特徴的な周波数依存性 $G''(\omega) \propto \omega^{0.5}$ を示す(図 4-b, c)。他方で、BSA 水溶液の粘弾性は、濃厚状態でも液体に特徴的な挙動($G''(\omega) \propto \omega$)を示し、この周波数依存性は細胞質やエマルジョンとは全く異なる。媒質の粘弾性の絶対値は溶質濃度次第で如何様にも変わり得るが、周波数依存性のべき指数は系の力学特性を支配する物理的な機構を反映している点で、より本質的な意味を持つ。つまり細胞質のガラス化は、個々の生体高分子ではなく、多数の生体高分子からなる液滴が混み合うことで生じている可能性が高い。液滴自体が内部に溶媒を含有するため、生体高分子の濃度は低くとも液滴の実効的な濃度は混み合いを生じる程度に十分高くなり得る。

近年、顕微鏡観察できるスケールに人為的に成長させた液滴の動態を観察することで、細胞内部での液-液相分離現象が研究されて来た^{12,13}。他方で、通常の細胞内環境では巨大な液滴の発生は特殊な例であり、今回紹介した細胞内レオロジー研究は、むしろ微小な(10・300 nm 程度の)液滴として細胞内に多量に存在することを、示唆する(図 4-b, c)。細胞内液滴は、特定の化学反応を効率的に進める場としての機能を持つため、ミクロな液滴の内外で迅速な物質交換(反応物の供給と生成物の排除)が行われることで、細胞内反応が効率的に進む可能性がある。

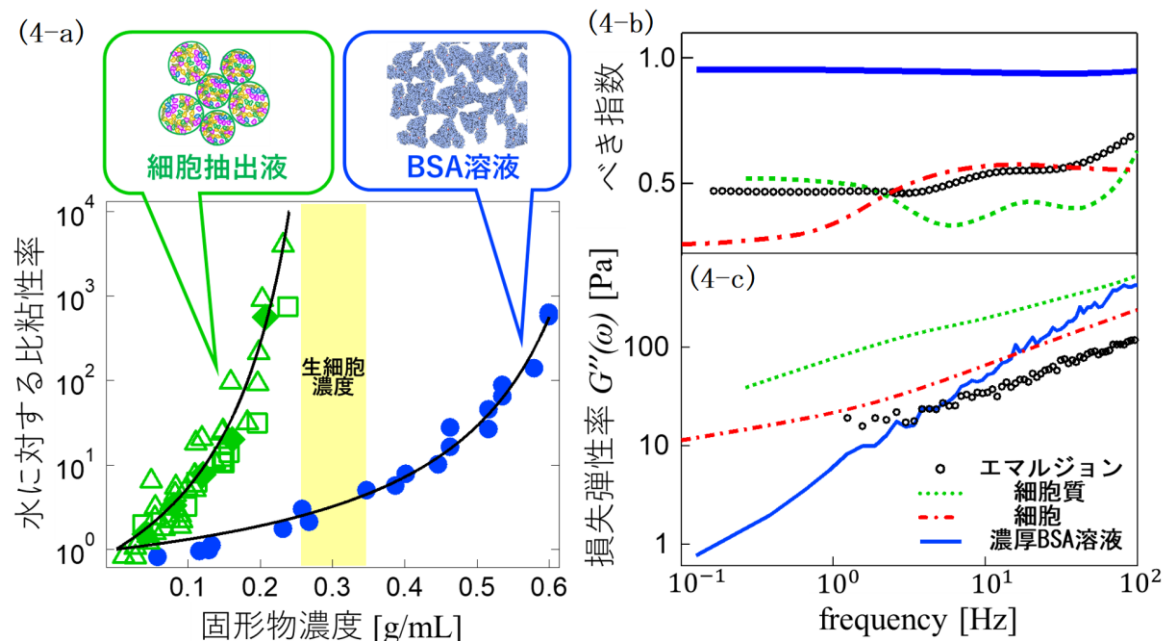


図 4 細胞質の液滴様レオロジー

(4-a) レオロジー計測の結果は、細胞内の混み合いを生み出す実体が、個々の生体高分子ではなく、高分子が凝集してできる液滴であることを示唆する。単成分の蛋白質 (BSA) 溶液は、細胞内濃度ではガラス化しない。(4-b, c) また、細胞や細胞質のべき指数は、単純な 1 成分蛋白質濃厚試料や細胞骨格ゲルとは全く異なり、人工的に作製した液滴集団であるエマルジョンと広い周波数範囲でよく一致する。

6) マクロに成長した細胞内液滴内部のレオロジー

これまでに述べた通り、ミクロな液滴同士が弱い相互作用を及ぼしつつ、代謝に伴う揺らぎによって互いに配置換えすることが細胞内部の力学特性を決定していることが分かりつつある。他方で、細胞内液滴の物理的な理解は殆ど進んでいない。例えば、液滴の発生と成長がどのような法則に従うのかは明らかではない。相分離液滴を発生させる原動力である、液滴内部の個々の生体高分子間の弱い相互作用に関する知見を得るためには、個々の液滴のレオロジーを計測することが有効である。これを実現するために、内部にコロイド粒子を含有できる程度に成長させた細胞内液滴のレオロジー計測を試みている。

図 5-a に、オートファゴソームの形成の前段階に現れる細胞内液滴の形成を誘導する蛋白質 P62 を GFP で標識した細胞の(蛍光)顕微鏡画像を示す。この細胞には、隔離膜の形成を阻害する遺伝子組み換え(ATG3 の欠損)が施されているために、P62 凝集物の周囲に膜構造は存在しない。蛍光観察される凝集体内部に、GFP に対する抗体を修飾したコロイド粒子を導入して、液滴内部の MR 計測を行った。その結果、得られた粘弾性スペクトルを図 5-c に示す。これまでに 1) 液体的 2) ゲル的、な 2 種類に類別できる結果が得られつつある。興味深いことに、液体的な液滴においても、典型的に液体的なレオロジー的性質は 100 Hz 以上の高周波数帯域に現れており、顕微鏡観察される液滴の形態変化に関わるような遅い応答はむしろ弾性的であった。ただしその弾性率は極めて小さい(0.1 Pa 程度)ために、数ミクロン程度の大きさの液滴は 1 pN 程度の力の印加により容易に歪むことができる。他方でゲル的な液滴は、100~1 kHz 付近で MR 法の測定限界に近いほど高い弾性率(~k Pa)を示し、これは周囲の細胞質の典型的な値よりも大きかった。ただし、正体不明な粘弾性

緩和挙動が 10 Hz 以下の領域に現れて、低周波数域の粘弾性が顕著に減少するために、このゲル的な液滴もゆっくりと形態を変化させることが可能と思われる。そのために、過渡的に非球体的な形状を取ることがあっても、長時間観測を続ければ界面の表面張力に由来する、液滴に典型的な球状形状を示すものと思われる。

(5-a)

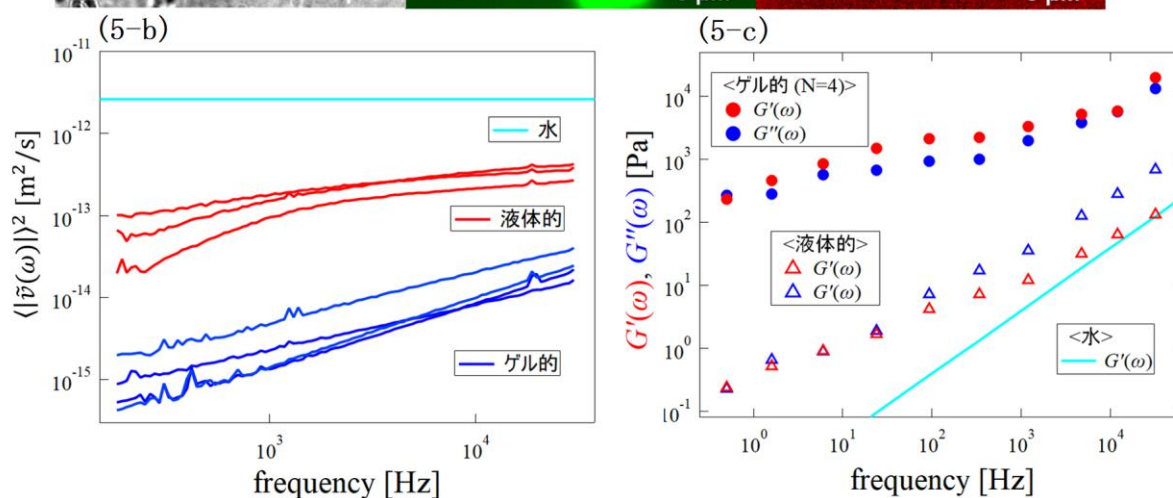
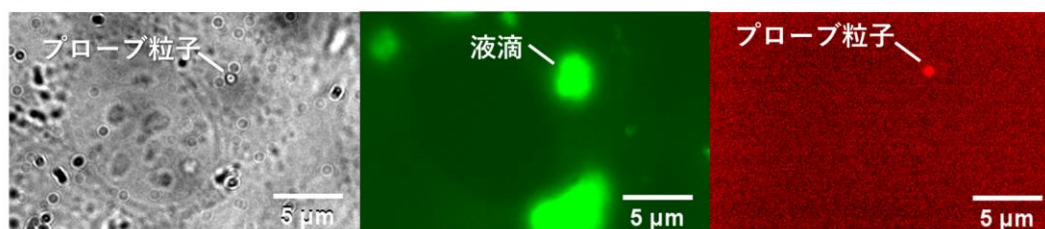


図 5 細胞内部液滴のレオロジー

(5-a) P62 蛋白質により液滴が形成されたマウス繊維芽細胞(左段)。GFP で標識された P62 が凝集した液滴が、蛍光顕微鏡画像で確認できる(中段)。内部に導入されたコロイド粒子は、ローダミン B により標識されており、蛍光顕微鏡写真で確認できる(右段)。(5-b) 速度揺らぎスペクトル。(5-c) 複素粘弾性スペクトル。高周波において、弾性が支配的なゲル的な液滴と、粘性が支配的な液体的な液滴に類別される。

■おわりに

細胞内部では、弱い相互作用が、非平衡系に特有の“揺らぎ”により攪乱されることで、平衡系では起こりえないレオロジー的現象が生じ得る。本稿では、柔らかい物質(ソフトマター)からなる細胞内環境の力学特性や非平衡性を調べるための手法として MR 法を解説し、ガラス転移が関わる、細胞内に特有のレオロジーについて説明した。非熱的な揺らぎの強さを反映する指標として、揺らぎと応答を観測する MR 計測を用いて決定される実効的な温度を導入し、細胞内部環境のガラス転移現象が、この実効温度によって制御されていることを示した。また、得られた細胞(質)の粘弾性スペクトルは、単に個々の生体高分子が濃厚に溶解した水溶液とは全く異なり、多数の生体高分子が凝集したマイクロな液滴が細胞内部の混み合いの起源であることを示していた。

しかしながら本来、平衡系における相分離現象の古典的描像に基づけば、マイクロな液滴は不安定であり、いずれマクロに成長するはずである。事実、代謝活動が停止している細胞質は、混み合いのためにゆっくりとではあるが、1~2day の時間スケールで徐々にマクロに相分離してゆく。つまり、

物理法則からは平衡系における相分離構造はマクロスケールまで成長するはずであるのに、何故、細胞内液滴はミクロな大きさに留まることができるのか？また、ミクロな液滴は、生体分子の活動にどのような影響を与えるのか？その詳細は未だ明らかになっていない。

ガラス転移現象と同様に、相分離・相転移現象も平衡系では熱力学的な温度により制御される。最近では、相分離・相転移現象も系に導入された非平衡性(非熱的揺らぎ)によって攪乱されることを示唆する報告がなされている^{14,15}。MR による揺らぎ・応答計測が導く細胞質の実効温度(非熱揺らぎ)は、細胞内のガラス転移現象と同様に、相分離現象も制御しているのではないだろうか？すなわち、本来平衡系ではマクロに成長するはずの細胞内液滴が、細胞内部では”揺らぎ”によりかき乱され、その成長が阻害されている可能性がある。揺らぎと応答を観測する MR 計測を用いれば、非平衡系である細胞内部で生じる相分離・相転移現象において、実効温度(非熱揺らぎ)が果たす役割を調べることが可能であり、細胞内において相分離液滴がマクロなサイズに成長しない理由も明らかにできるかもしれない。細胞内の液-液相分離現象の謎を解く一つのツールとして、細胞内 MR 計測の今後に期待して欲しい。

■参考文献

1. Y. Shin and C. P. Brangwynne, *Science* **357** (6357) (2017).
2. D. Mizuno, D. A. Head, F. C. MacKintosh and C. F. Schmidt, *Macromolecules* **41** (19), 7194-7202 (2008).
3. K. Nishizawa, M. Bremerich, H. Ayade, C. F. Schmidt, T. Ariga and D. Mizuno, *Sci Adv* **3** (9), e1700318 (2017).
4. Y. Sugino, M. Ikenaga and D. Mizuno, *Appl Sci-Basel* **10** (14) (2020).
5. A. G. Larson, D. Elnatan, M. M. Keenen, M. J. Trnka, J. B. J. Ohnston, A. L. Burlingame, D. A. Agard, S. Redding and G. J. Narlikar, *Nature* **547** (7662), 236-+ (2017).
6. S. Elbaum-Garfinkle, Y. Kim, K. Szczepaniak, C. C. H. Chen, C. R. Eckmann, S. Myong and C. P. Brangwynne, *P Natl Acad Sci USA* **112** (23), 7189-7194 (2015).
7. J. L. Ross, *Biophys J* **111** (5), 909-916 (2016).
8. K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa and D. Mizuno, *Scientific Reports* **7** (2017).
9. D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt and F. C. Mackintosh, *Science* **315** (5810), 370-373 (2007).
10. D. Mizuno, R. Bacabac, C. Tardin, D. Head and C. F. Schmidt, *Phys Rev Lett* **102** (16), 168102 (2009).
11. S. Jabbari-Farouji, D. Mizuno, D. Derks, G. H. Wegdam, F. C. MacKintosh, C. F. Schmidt and D. Bonn, *Epl-Europhys Lett* **84** (2) (2008).
12. J. Berry, S. C. Weber, N. Vaidya, M. Haataja and C. P. Brangwynne, *P Natl Acad Sci USA* **112** (38), E5237-E5245 (2015).
13. A. A. Rebane, P. Ziltener, L. C. LaMonica, A. H. Bauer, H. Zheng, I. L?pez-Montero, F. Pincet, J. E. Rothman and A. M. Ernst, *Febs Lett* **594** (7), 1132-1144 (2020).
14. M. Han, J. Yan, S. Granick and E. Luijten, *P Natl Acad Sci USA* **114** (29), 7513-7518 (2017).
15. J. Palacci, C. Cottin-Bizonne, C. Ybert and L. Bocquet, *Phys Rev Lett* **105** (8) (2010).