

生きている細胞の非平衡力学

水野大介 杉野裕次郎

はじめに

生命の基本構成単位である細胞は、生理活性物質を外界から取り込んで、様々な形態のエネルギーに変換して利用した後、外部へと排出する非平衡開放系である[図 1(a)][1]。代謝活動とも呼ばれるこのエネルギー変換を伴う過程は、モーターたんぱく質などの生体高分子機械が担う。その多くは ATP のような高エネルギー分子の(加水)分解を触媒する過程で、化学エネルギーを力学的エネルギーに変換することで力を生成し、ナノスケールの仕事として生理的な機能を果たす[2]。

モーターたんぱく質に典型的に見られる通り、生体高分子機械が稼働するためには分子形態が変化できること(身動きできること)や、関連する分子が速やかに供給・排出される必要がある。したがって、細胞内の生体高分子機械が担う代謝活動は、細胞質の“動きやすさ”つまりは力学的な特性に強く影響される。例えば、図 1(b)のように細胞内部にはたんぱく質や核酸が濃厚に混み合っているため、本来生体高分子機械は身動きが取りにくいはずである。しかしながら驚くべきことに、モーター分子はこのような混み合い環境下で、希薄な *in vitro* 環境よりも速く動くことが知られている[3]。細胞を始めとする生き物(非平衡系)の性質や振る舞いには、現在の科学では理解できない事柄が数多く存在する。細胞内の代謝活動と力学特性の非自明な関係性の基礎となるべき物理法則も、生命現象全般に関わる重要な問題でありながら、全く不明である。

本稿では、代謝活動に伴って熱揺らぎを遙に凌駕する過剰な揺らぎ(非熱的揺らぎ)が細胞内で生成されていることを示す。熱平衡状態にはみられない多彩なダイナミクスを研究する”非平衡力学”の知見に基づけば、この非熱的揺らぎが細胞の力学環境を解明するための有力な手掛かりとなることが推察できる。以下では、その計測・解析法にも重点を置きつつ細胞の非平衡力学を紹介する。

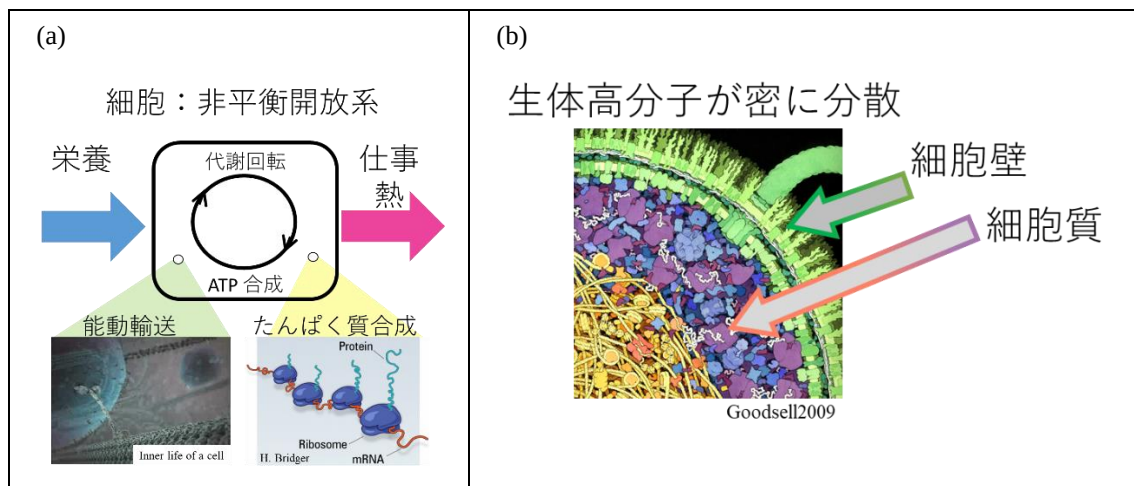


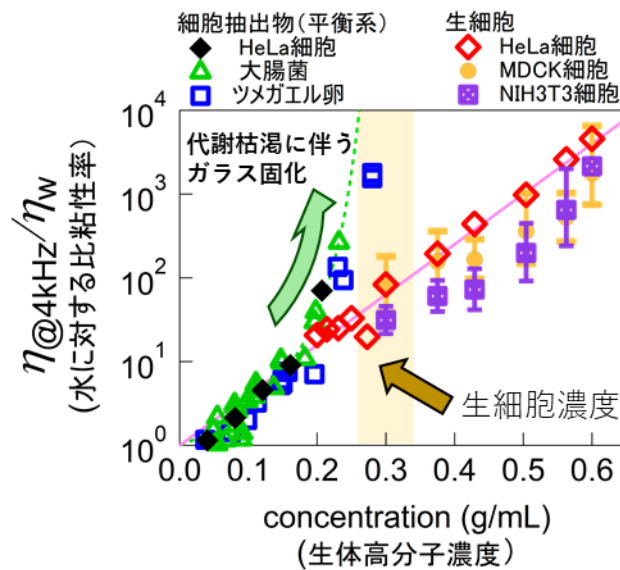
図 1:細胞質は混み合った非平衡開放系である (a)非平衡開放系としての細胞。(b)細胞内は生体高分子が濃厚に満たされている。

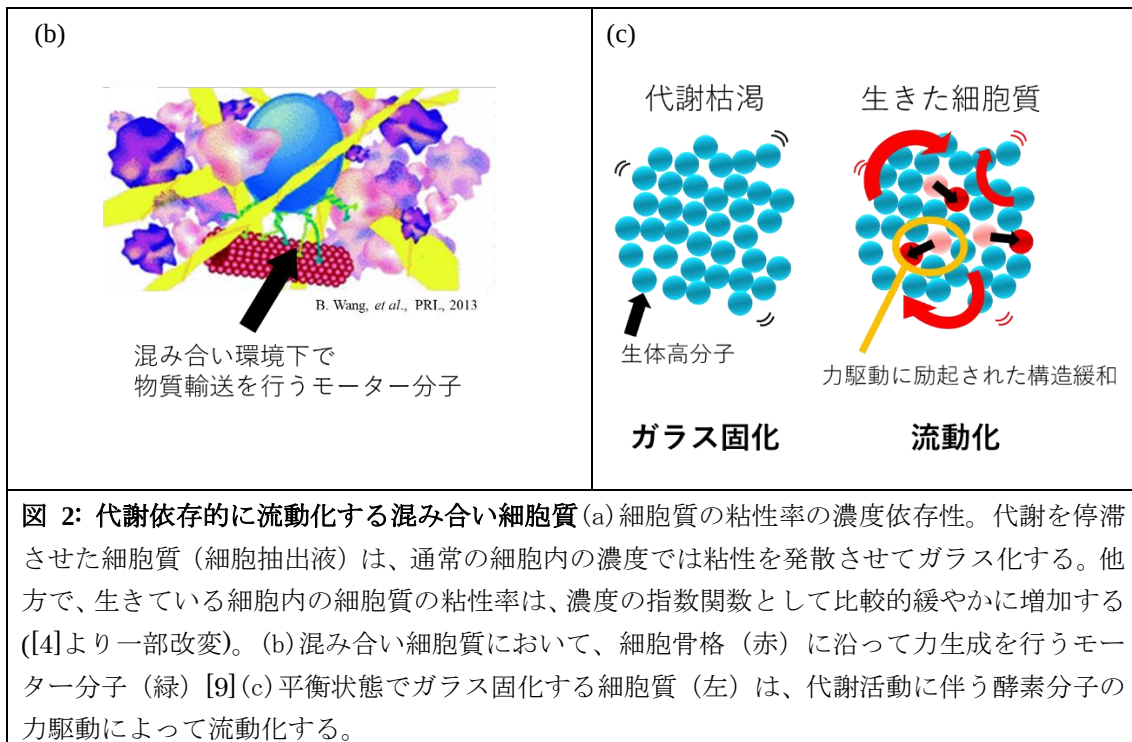
1) 非平衡開放系としての細胞内部環境の力学

近年、細胞の内部環境を構成する媒質(細胞質)が、代謝活動を失うと混み合いに伴いガラス化することが明らかとなった[4, 5]。ここでガラス化とは、構成要素が乱雑な配置を保ったまま、その揺らぎが凍結して固化する現象である[6]。具体的な例として図 2(a)に示す通り、代謝活動を阻害された細胞質の粘性率は、典型的なガラス転移挙動を示す。計測した全ての細胞種において、細胞質粘性は溶質濃度とともに急激に上昇して、細胞内濃度(~0.3 g/mL)では発散する(流動性を失って固化する)傾向を示す。細胞質の動力学(揺らぎ)がガラス化により凍結してしまえば、形態変化や物質の供給等が抑制され生体高分子機械は機能を停止するはずである。ところが実際には、活発な代謝が行われる生きた細胞内部の流動性は有限に保たれている。細胞内の溶質濃度を上昇させても穏やかに粘性を上昇させるのみで、ガラス転移に特有の異常性(特定の濃度で発散する傾向)は見られない[図 2(a)] [4]。

先に述べたように、酵素分子を始めとする生体高分子機械は触媒反応の際にその構造を変化させる。例えば、キネシンやミオシンなどのモーター分子は特にエネルギーを効率よく力学的な過程(分子の変形・運動や力)に変換する[7]。この時、生体高分子で埋め尽くされた周囲の細胞質には、力が伝搬され、揺らぎが生じる [図 2(b)]。その結果としてのように、構成物質の配置換え(構造緩和)が励起されるために [図 2(c)]、平衡状態ではガラスを形成する細胞質も流動化すると考えられる[8]。

(a)





2) 非平衡ソフトマターのメソスケール力学特性計測法の開発

前節で紹介した観測結果は、細胞内部が典型的な非平衡力学系であり、その力学的性質は平衡媒質とは異なる機構で決定されていることを示唆する[7]。その機構の詳細を調べるためには、細胞内部における非平衡性を特徴づける物理量を定義し(非熱的な揺らぎ)、観測により定量的に決定するための方法論を確立する必要がある。以下では、マイクロレオロジー(MR)法を用いて「揺動散逸定理(FDT)」の破れを観測することで、これを実現する方法について解説する[5, 7, 10, 11]。

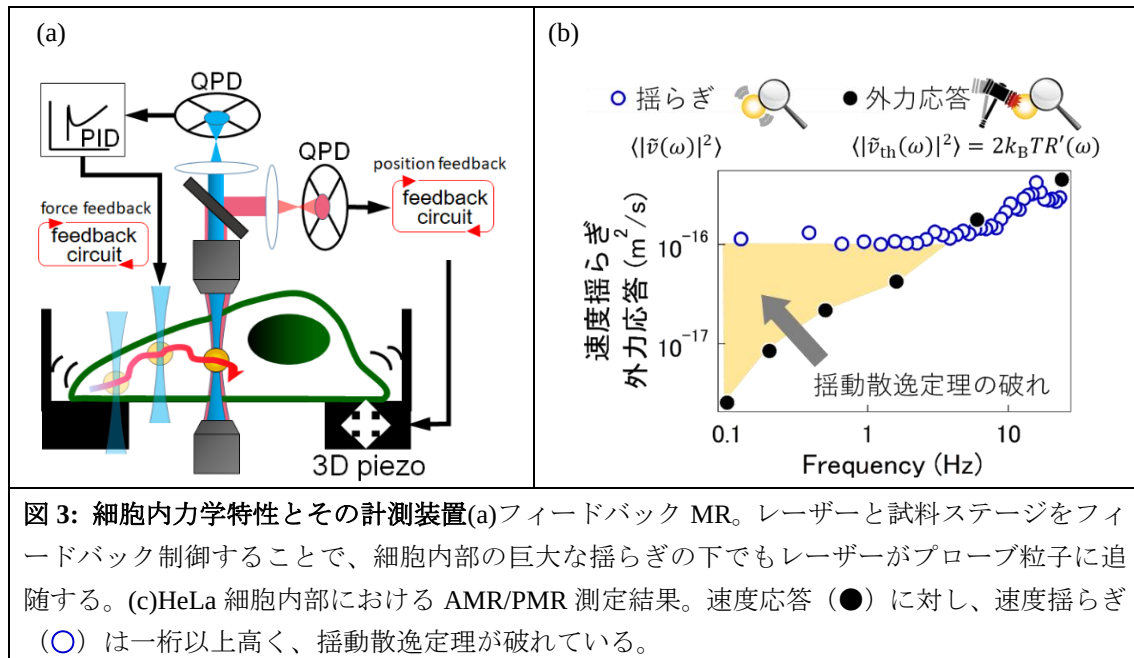
マイクロレオロジー(MR) [11]

MR 法とは、プローブとして媒質に分散させたコロイド粒子($\sim \mu\text{m}$)の運動から周囲の媒質のメソスケール($\text{nm} \sim \mu\text{m}$)の力学的性質を計測する手法の総称である。マイクロレオロジー法は、コロイド粒子に外力 $F(t) \equiv \hat{F}(\omega)\exp(i\omega t)$ を加えてその速度応答 $v(t) = \hat{v}(\omega)\exp(i\omega t)$ を観測する Active MR (AMR)、および、外場を加えずに自発的な速度揺らぎ $v(t)$ を観測する Passive MR (PMR)法に分けられる。熱的平衡条件の下では、AMR で求まる速度応答関数(易動度) $R(\omega) \equiv \hat{v}/\hat{F}$, $R(\omega) = R'(\omega) + iR''(\omega)$ と、PMR で求まる速度揺らぎのパワースペクトル $\langle |\hat{v}(\omega)|^2 \rangle$ は等価な情報を与え、この関係 $\langle |\hat{v}(\omega)|^2 \rangle = 2k_B T R'(\omega) \equiv \langle |\hat{v}_{\text{th}}(\omega)|^2 \rangle$ は揺動散逸定理(FDT)と呼ばれている。ここで $\langle \rangle$ は統計平均を表す。したがって、熱揺らぎのみが存在する熱平衡条件では AMR と PMR どちらか一方を実行して応答関数を求めれば、摩擦と周囲媒質の弾性率の関係を表すストークスの関係式 $R(\omega) = i\omega/6\pi G(\omega)a$ より、周囲媒質のずり粘

弾性 $G(\omega)$ が求まる (a : プロブ半径)。

フィードバック MR

細胞内において、AMR と PMR を同時に、かつ高い時空間分解能で実行するには、光捕捉による力の印加[12]と、4 分割フォトダイオードによる粒子位置検出法[13]を用いた MR 計測が有効である[14]。ただし、位置検出・力印加に用いるレーザーの光軸は固定されているために、代謝の活発な細胞内で激しく揺動するコロイド粒子はレーザーの集光位置から容易に逸脱されて力学計測が行えない。そこで我々は、レーザーと試料ステージを同時にフィードバック制御することで、細胞内の様々な時空間スケールの揺らぎ（遅くて巨大な揺らぎと速くて微弱な揺らぎ）に精密に追従しつつ、AMR/PMR 計測を行っている[フィードバック追跡 MR、図 3(a)] [5, 15]。実際に生きた細胞内部においてフィードバック MR を行った結果が図 3(b)である。低周波数域において、AMR と PMR の測定結果が一致せず、揺動散逸定理の破綻が観測された。細胞内のような非平衡系であっても、AMR は熱揺らぎの情報 $2k_B TR'(\omega) = \langle |\tilde{v}_{th}(\omega)|^2 \rangle$ を与える。他方で、細胞内部では、熱揺らぎ $\langle |\tilde{v}_{th}(\omega)|^2 \rangle$ のほかに生体高分子機械が稼働する際に生み出される過剰な揺らぎ（非熱的な揺らぎ） $\langle |\tilde{v}_A(\omega)|^2 \rangle$ が存在し、PMR は両者の和 $\langle |\tilde{v}(\omega)|^2 \rangle = \langle |\tilde{v}_{th}(\omega)|^2 \rangle + \langle |\tilde{v}_A(\omega)|^2 \rangle$ としての全揺らぎを観測するため FDT は破れる。



3) 揺動散逸定理の破れとその意義

前節で述べた通り、細胞内部で MR 計測を行うと揺動散逸定理の破れが観測される。これは、生体高分子機械が稼働することで、系が非平衡状態へと力学的に駆動されていること

を直接的に反映していると期待される。本節では、得られた揺動散逸定理の破れ（非平衡揺らぎ）から具体的に何が分かり、どのように役に立つのか？概説する。

(i) 生体高分子機械が生み出す非熱的駆動力

媒質中に分散されたコロイド粒子は、溶媒分子の衝突に起因するランダム力（揺動力） $f_{th}(t)$ 、を受けて熱的に揺らぐ。細胞内のコロイド粒子の運動は、 $f_{th}(t)$ に加えて生体分子機械が生成した非熱的な駆動力 $f_A(t)$ を含むランジュバン方程式、

$$\int_{-\infty}^t dt' \gamma(t-t')v(t') = f_A + f_{th} \quad (1)$$

で表現される[11, 16]。ここで、 $\gamma(t)$ は摩擦関数、 $v(t)$ はプローブ粒子の速度である。これをフーリエ変換すると $\tilde{\gamma}(\omega) \cdot \tilde{v}(\omega) = \tilde{f}_A + \tilde{f}_{th}$ であるから、 $f_A(t)$ と $f_{th}(t)$ が相関しない仮定の下で、生体高分子が生み出した駆動力のパワースペクトル密度は、

$$\langle |\tilde{f}_A|^2 \rangle = |\tilde{\gamma}|^2 \langle |\tilde{v}|^2 \rangle - \langle |\tilde{f}_{th}|^2 \rangle = |\tilde{\gamma}|^2 (\langle |\tilde{v}|^2 \rangle - 2k_B TR') \quad (2)$$

と書ける。ここで $\sim$ はフーリエ変換を表す。式(2)の右辺の最後の()内が速度の揺らぎと応答に関する揺動散逸定理の破れであり、非熱的な速度揺らぎ $\langle |\tilde{v}_A|^2 \rangle$ を表す。すなわち Active/Passive MRを行えば、(2)式の右辺を計算するために必要な物理量が全て求まり、生体分子機械が生み出した駆動力(の揺らぎ)が得られる [10, 11, 17]。この方法論は”Force-Spectrum Microscopy”と命名され、非平衡媒質中で発生する力の計測・解析法として定着しつつある [18]。非熱的駆動力 $\langle |\tilde{f}(\omega)|^2 \rangle$ には、絶対値とともにその周波数依存性に、生体分子機械の力生成ダイナミクス、力生成時間などが反映されている。そのために、細胞や細胞のモデル系における観測結果を解析することで、例えばミオシンモーターが媒質中で力生成する時間(processive time)や頻度・細胞骨格に与える張力などが見積もられてきた[5, 11, 17, 19]。従来1分子計測でしか得られなかったこれらの情報が、より細胞内に近い条件で得られることを特徴とする。

(ii) 非平衡系のエネルギー散逸

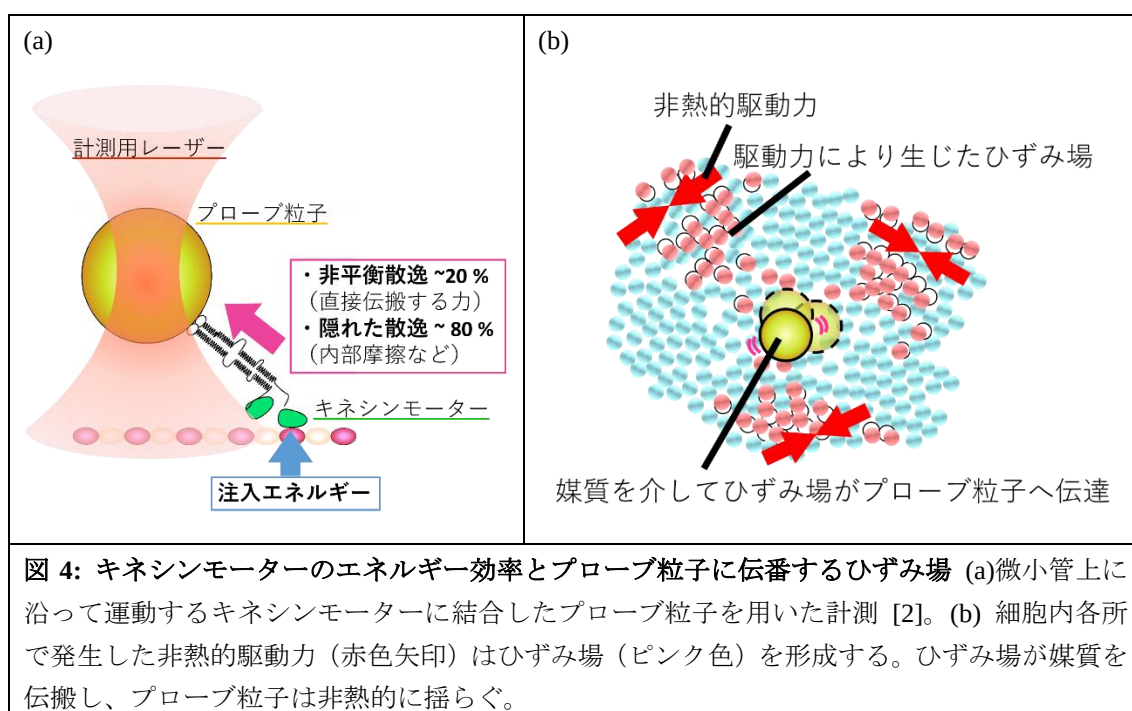
原田と佐々らは、(1)式をフーリエ空間で解析することで、観測自由度(ここではコロイド粒子の変位)を介したエネルギー散逸 $J_x \equiv \langle f_A \cdot v \rangle$ を表現する等式を導いた [16]。

$$J_x = \gamma \langle v_0 \rangle^2 + \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{\gamma} \left[\langle |\tilde{v}|^2 \rangle - 2k_B TR' \right] d\omega. \quad (3)$$

ここで、 J_x は着目する運動の自由度を通じた単位時間あたりの散逸(以下、非平衡散逸)、 γ_0 は直流の粘性抵抗、 v_0 は定常速度を示す。この式は、コロイド粒子と周囲媒質の間の摩擦を介して単位時間あたりに散逸するエネルギー(右辺)を観測することで、生体高分子機械が生み出した力 $f_A(t)$ が観測用のコロイド粒子に対して単位時間当たり行った力学的仕事 $\langle f_A \cdot v \rangle$ を見積もることができることを示している。右辺の被積分関数の [] の内部が揺動散逸定理の破れを表し、AMR/PMRを行えば、式(3)の右辺を計算するために必要な情報が全て

得られる。

原田一佐々等式 [式(3)]は、これまで主に分子モーターの 1 分子計測に適用されてそのエネルギー変換効率が調べられて来た。例えば、1 方向性の並進運動を行う分子モーター(キネシン) を結合させたコロイド粒子をプローブとして用いて揺らぎ $\langle |\tilde{v}(\omega)|^2 \rangle$ と応答 $R'(\omega)$ の計測を行い[図 4(a)]、式(3)の右辺を計算すると、キネシンは ATP の加水分解により得られるエネルギー20 %程度しか観測用粒子に対する仕事に変換していないことが分かる[2]。観測されなかったエネルギーの多くは、分子モーター内部の自由度に起因する摩擦や緩和のために、コロイド粒子の並進自由度の揺らぎに変換されることなく、直接熱に変換されて失われた可能性が高い[図 4(a)]。



他方で、モーターたんぱく質等の生体高分子機械に直接結合させずに細胞質中に分散させたコロイド粒子を用いて MR 計測を行う場合を考えよう。この時、図 4(b)のように生体高分子機械が生み出した非熱的駆動力は、周囲媒質の揺らぎを介してプローブ粒子に伝わる [17, 19]。こうした周囲媒質を介した揺らぎの伝搬を考慮するように式(3)を拡張することができ、周囲媒質中の単位体積あたりに生じている非平衡散逸が得られる。詳細は割愛するが、式(3)は細胞質の流動化に寄与し得る非平衡エネルギーを定量化している点で、代謝の活発な細胞の力学を理解するために有用な情報を与えると期待される。

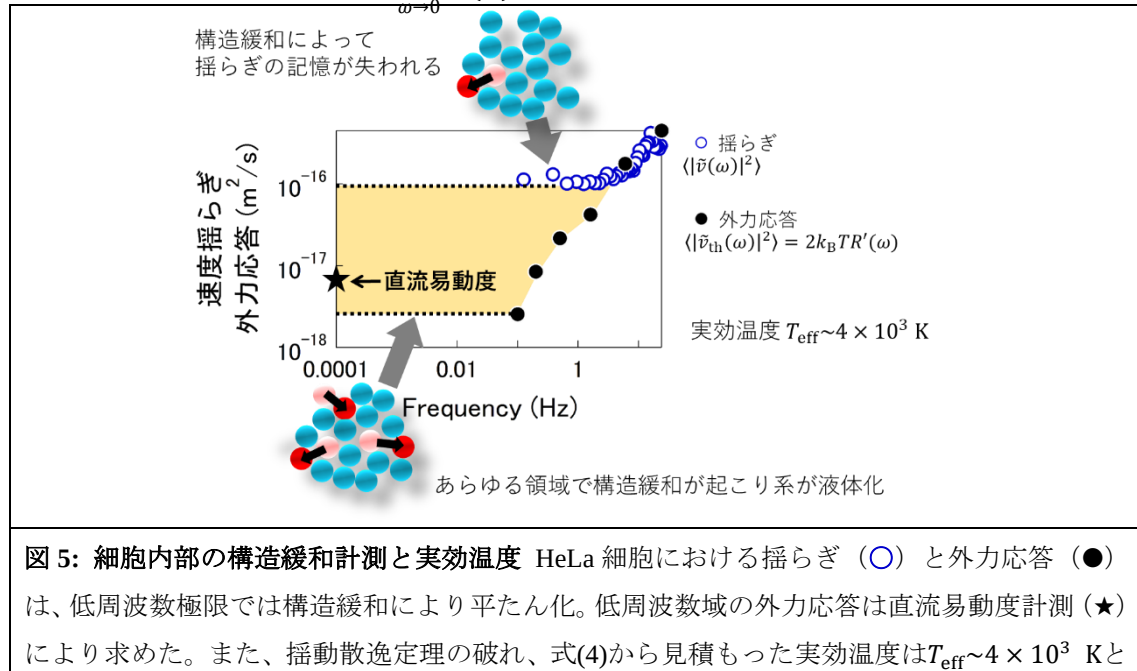
(iii) 細胞内部の“実効的な”温度

揺動散逸定理に基づけば、熱平衡系におけるプローブ粒子の揺らぎ $\langle|\tilde{v}_{th}|^2\rangle$ と応答 R' を観測することで熱力学温度を $T \equiv \langle|\tilde{v}_{th}|^2\rangle/2k_B R'$ で決定できる。同じ方法を非平衡系に拡張して適用し、「温度」らしきものを定義できないだろうか？すなわち、非平衡系における”実効的な”温度を、

$$T_{\text{eff}} \equiv \frac{\langle|\tilde{v}|^2\rangle}{2k_B R'} = \frac{\langle|\tilde{v}|^2\rangle}{\langle|\tilde{v}_{th}|^2\rangle} T \quad (4)$$

と定義することが提唱されてきた [20, 21]。ただし、この実効温度 T_{eff} は試行的概念であり、その定義の根拠や、意義・有用性に疑問が投げかけられて来た [22, 23]。例えば、式(4)から得られる T_{eff} は一般には周波数に依存するが、温度という物理量は本来周波数には依らないはずである。他方で最近になって、実効温度 T_{eff} が、自己駆動粒子の沈降平衡現象[24]や相分離現象[25]を制御していることを示す実験的証拠も集まりつつある。

実効温度の周波数依存性の問題は、低周波数域における揺らぎ $\langle|\tilde{v}(\omega)|^2\rangle$ と易動度（熱揺らぎ） $2k_B T R'(\omega)$ の ω 依存性に着目すれば解決できる。図 5 に示す通り、細胞内部の揺らぎ $\langle|\tilde{v}(\omega)|^2\rangle$ は揺動散逸定理が破れる領域では周波数依存性を失い拡散的な挙動を示す。これは、図 2(a)で議論したように、代謝活動に伴ってガラス的な細胞質に構造緩和が生じるためである。このとき、試料の一部で構造緩和が引き起こされれば、その周囲の広い範囲にわたって拡散的な非熱揺らぎが引き起こされる。他方で熱揺らぎを表す $2k_B T R'(\omega)$ は、同じ周波数域で拡散挙動を示していない。これは、着目する時間スケールにおいて試料内の全ての場所が構造緩和したときに、試料が完全に流動化して液体となることに起因する。そこで 1 pN 未満の極めて微弱な一定外力 F をコロイド粒子に長時間($\sim 1\text{h}$)印加しつつ、その時の速度 v を計測することで直流易動度 $R \equiv \lim_{F \rightarrow 0} v/F$ を得た(図 5 の★)。この直流易動度 R は、AMR 計測で求まる R' の低周波数極限值 $\lim_{\omega \rightarrow 0} R'(\omega)$ に等しい。



なった。

この超低周波数域における FDT の破れから、細胞内部の実効温度 $T_{\text{eff}} \sim 4 \times 10^3$ Kが周波数に依らない量として得られた。この極めて高い実効温度が細胞の非平衡現象、殊に代謝活動に伴う流動化を導いている可能性があり、細胞の非平衡力学(流動化)の理解に繋がる知見が得られると期待している。

おわりに

細胞内に導入したコロイド粒子の揺らぎと応答を同時に観測する手法(マイクロレオロジー:MR)を用いた細胞の非平衡力学の研究について紹介した。MR 計測により、細胞内部環境の力学特性を求めることができ、また、揺動散逸定理(FDT)の破れから非熱揺らぎの成分のみを取り出すことができる。

近年、熱的ではない巨大な揺らぎや流動を観察することで、細胞を含む非平衡系を理解しようとする試みが盛んになされている。他方で、揺らぎが発生した起源(エネルギーや力生成)にまで遡って非平衡系の理解を深めるためには、揺らぎに加えて”応答”の計測も行い、系の力学特性を知ることが重要である[26]。本稿で示したように、細胞質の力学特性は代謝活動の有無で大きく変化する。両者の関係性は平衡系の物理法則に基づいて理解することは困難であり、代謝活動に伴って生成された非熱的揺らぎによって決定されている可能性が高い。

細胞内の代謝活動は、無数の生化学反応の総体として確かに存在する。しかしながら、個別の反応を調べても明確に定量化することが難しい抽象的な概念でもある。本稿では、細胞の MR 研究を通して非平衡系(細胞の代謝活動)を特徴づけ得る新しい3つの物理量、1) 非熱的駆動力のパワースペクトル密度、2) エネルギー散逸量、そして 3) 実効温度を導出した。これら3つの物理量は、いずれも近い理論枠組み(ランジュバン方程式の拡張)により厳密に定義された定量可能な物理量であり、細胞の代謝活動と密接に関連していると期待される。これらの物理量を様々に制御された細胞および細胞モデル系において定量することで、生命という得体の知れない非平衡系の理解に貢献したいと考えている。

参考文献

- [1] Y. Demirel, Nonequilibrium thermodynamics modeling of coupled biochemical cycles in living cells, J Non-Newton Fluid, 165 (2010) 953-972.
- [2] T. Ariga, M. Tomishige, D. Mizuno, Nonequilibrium Energetics of Molecular Motor Kinesin, Phys Rev Lett, 121 (2018).
- [3] J.L. Ross, The Dark Matter of Biology, Biophys J, 111 (2016) 909-916.
- [4] K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa, D. Mizuno, Universal

- glass-forming behavior of in vitro and living cytoplasm, *Scientific Reports*, 7 (2017).
- [5] K. Nishizawa, M. Bremerich, H. Ayade, C.F. Schmidt, T. Ariga, D. Mizuno, Feedback-tracking microrheology in living cells, *Sci Adv*, 3 (2017) e1700318.
 - [6] G.L. Hunter, E.R. Weeks, The physics of the colloidal glass transition, *Rep Prog Phys*, 75 (2012) 066501.
 - [7] D. Mizuno, C. Tardin, C.F. Schmidt, F.C. MacKintosh, Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks, *Science*, 315 (2007) 370-373.
 - [8] P. Sollich, F. Lequeux, P. Hebraud, M.E. Cates, Rheology of soft glassy materials, *Phys Rev Lett*, 78 (1997) 2020-2023.
 - [9] B. Wang, J. Kuo, S. Granick, Bursts of Active Transport in Living Cells, *Phys Rev Lett*, 111 (2013).
 - [10] D. Mizuno, R. Bacabac, C. Tardin, D. Head, C.F. Schmidt, High-Resolution Probing of Cellular Force Transmission, *Phys Rev Lett*, 102 (2009) 168102.
 - [11] D. Mizuno, D.A. Head, F.C. MacKintosh, C.F. Schmidt, Active and Passive Microrheology in Equilibrium and Nonequilibrium Systems, *Macromolecules*, 41 (2008) 7194-7202.
 - [12] A. Ashkin, J.M. Dziedzic, J.E. Bjorkholm, S. Chu, Observation of a Single-Beam Gradient Force Optical Trap for Dielectric Particles, *Optics Letters*, 11 (1986) 288-290.
 - [13] F. Gittes, C.F. Schmidt, Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers, *Optics Letters*, 23 (1998) 7-9.
 - [14] F. Gittes, C.F. Schmidt, Signals and noise in micromechanical measurements, *Methods in Cell Biology*, Vol 55, 55 (1998) 129-156.
 - [15] Y. Sugino, M. Ikenaga, D. Mizuno, Optimization of Optical Trapping and Laser Interferometry in Biological Cells, *Appl Sci-Basel*, 10 (2020).
 - [16] T. Harada, S. Sasa, Equality connecting energy dissipation with a violation of the fluctuation-response relation, *Phys Rev Lett*, 95 (2005) 130602.
 - [17] D. Mizuno, C. Tardin, C.F. Schmidt, Rapid local compression in active gels is caused by nonlinear network response, *Soft Matter*, 16 (2020) 9369-9382.
 - [18] M. Guo, A.J. Ehrlicher, M.H. Jensen, M. Renz, J.R. Moore, R.D. Goldman, J. Lippincott-Schwartz, F.C. Mackintosh, D.A. Weitz, Probing the Stochastic, Motor-Driven Properties of the Cytoplasm Using Force Spectrum Microscopy, *Cell*, 158 (2014) 822-832.
 - [19] D.A. Head, D. Mizuno, Nonlocal fluctuation correlations in active gels, *Phys Rev E*, 81 (2010) 041910.
 - [20] N. Greinert, T. Wood, P. Bartlett, Measurement of effective temperatures in an aging colloidal glass, *Phys Rev Lett*, 97 (2006).
 - [21] B. Abou, F. Gallet, Probing a nonequilibrium Einstein relation in an aging colloidal glass, *Phys Rev Lett*, 93 (2004).

- [22] S. Jabbari-Farouji, D. Mizuno, D. Derks, G.H. Wegdam, F.C. MacKintosh, C.F. Schmidt, D. Bonn, Effective temperatures from the fluctuation-dissipation measurements in soft glassy materials, *Epl-Europhys Lett*, 84 (2008).
- [23] S. Jabbari-Farouji, D. Mizuno, M. Atakhorrami, F.C. MacKintosh, C.F. Schmidt, E. Eiser, G.H. Wegdam, D. Bonn, Fluctuation-dissipation theorem in an aging colloidal glass, *Phys Rev Lett*, 98 (2007) 108302.
- [24] J. Palacci, C. Cottin-Bizonne, C. Ybert, L. Bocquet, Sedimentation and Effective Temperature of Active Colloidal Suspensions, *Phys Rev Lett*, 105 (2010).
- [25] M. Han, J. Yan, S. Granick, E. Luijten, Effective temperature concept evaluated in an active colloid mixture, *P Natl Acad Sci USA*, 114 (2017) 7513-7518.
- [26] C.P. Brangwynne, G.H. Koenderink, F.C. MacKintosh, D.A. Weitz, Intracellular transport by active diffusion, *Trends in Cell Biology*, 19 (2009) 423-427.