

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03710

研究課題名(和文) フィードバックマイクロレオロジーによる細胞力学の観測

研究課題名(英文) Feedback microrheology in living cells

研究代表者

水野 大介 (Mizuno, Daisuke)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：30452741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：非平衡系に特有の巨大な揺らぎの中で、フィードバックによりコロイド粒子を自動的に追跡しつつ、Active/Passive MR計測を実行するための技術開発を行った。開発したシステムを用い、培養細胞や細胞モデル系のメソスケールの力学挙動(“生きの良さ”と力学特性の相関)を、代謝活性を制御する薬剤を投与して系統的に観測した。また、平衡状態にある生体ソフトマターを人工的な力学外場やモーターたんぱく質を用いて物理的に駆動しつつ同様の計測を行い、生き物の代謝による駆動と人工的な駆動に対する系の力学応答を比較した。これにより、細胞内部環境の力学特性を決定する機構を究明するための実験的知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体中のソフトマターは、熱的な揺らぎよりもはるかに大きな力の生成と散逸によって非平衡状態に駆動されている。細胞や生体組織の様々な機能は、生体ソフトマターが力学的に駆動されることでその性質を多彩に変化させる中で発現している。今回、生体ソフトマターの複合体が織りなす非線形・非平衡系の動力学を究明するための有効な手段として、非平衡度と力学特性を同時観測できるActive/Passive MR法を開発した。多重フィードバックにより生体系に特有の巨大な揺らぎに追従し、系に余計な力学的擾乱を与えずにMR観測を行うことで、生き物の非平衡力学挙動の動作原理の一端を知る知見を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Living cells are composed of active materials, in which forces are generated by energy derived from metabolism. Understanding the out-of-equilibrium mechanics is challenging because constituent materials are heterogeneous and their physical properties are strongly affected by the internally generated forces. Here, we have analyzed dynamics inside eukaryotic cells with simultaneous active and passive microrheology using laser interferometry and optical trapping technology. We developed a method to track microscopic probes stably in cells in the presence of vigorous cytoplasmic fluctuations, by employing smooth 3D feedback of a piezoactuated sample stage. We present a theory that adapts the fluctuation-dissipation theorem to out-of-equilibrium systems that are subjected to positional feedback. We discuss the interplay between material properties and non-thermal force fluctuations in the living cells that we quantify through the violations of the FDT.

研究分野：ソフトマター・生物物理

キーワード：細胞力学 マイクロレオロジー 非平衡統計 揺動散逸定理 非平衡力学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内部では、細胞骨格と呼ばれる繊維状タンパク質が3次元のネットワーク構造を形成しており、その間隙はたんぱく質、多糖類や核酸、脂質等、様々な生体ソフトマターやその複合体(オルガネラ)がひしめき合った凝縮状態にある。つまり、細胞の力学特性は、細胞骨格のみならず、細胞内部の混雑状態にも強く影響されて決定される可能性がある。しかも、生きている細胞内部では代謝により生み出される非熱的な力により、細胞質は強制的に駆動されて流動している。こうした生体ソフトマターの凝縮系が織りなす複雑な非平衡挙動を記述する物理学は、生命システムの振る舞いを本質的に理解し、予測・制御するために必要であるが、その全貌・詳細は未だ全く不明である。

2. 研究の目的

生き物は生体ソフトマターの凝縮状態が織りなす典型的な非線形・非平衡系である。その振る舞いを理解するためには従来の線形系・平衡系科学の枠組みを超えた新しい生命物理学の発展が必要である。本研究では、代謝や外力によって非平衡状態に駆動された生体ソフトマターの動力学を研究するために、多重のフィードバックを適用したマイクロレオロジー計測法を新たに開発する。開発したシステムを用い、細胞や細胞モデルにおける巨大な揺らぎや流動に追従しつつ、力生成と力学特性を非侵襲観測する。これにより、生き物や細胞の力学的振る舞いに現れる法則性を、生体ソフトマターの非平衡系としての観点から実験的に見出す。

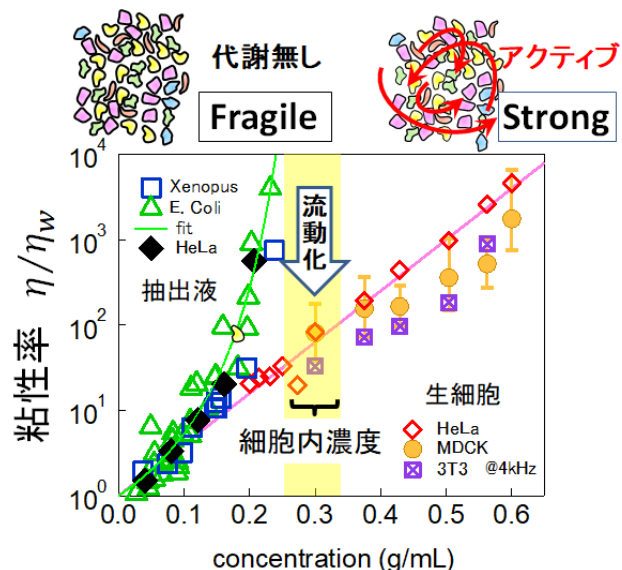
3. 研究の方法

非平衡ソフトマターに特有の巨大な揺らぎの中で、フィードバック技術によりコロイド粒子を自動的に追跡しつつ、Active/Passive MR 計測を安定的に実行するための技術開発を行った。開発したシステムを用い、培養細胞や細胞モデル系のメソスケールの力学挙動(“生きの良さ”と力学特性の相関)を、適宜代謝活性を制御する薬剤を投与して系統的に観測した。また、平衡状態にある生体ソフトマターを人工的な力学外場やモーターたんぱく質を用いて物理的に駆動しつつ同様の計測を行い、生き物の代謝による駆動と人工的な駆動に対する系の力学応答を比較した。これにより、細胞内部環境の力学特性が決定される非平衡メカニズムを究明するための実験的知見を得た。

4. 研究成果

多重フィードバック下のマイクロレオロジーによる細胞のガラス的挙動の観測:

ソフトマターのメソスケールでのゆらぎや力学応答を観測する手段であるマイクロレオロジー(MR)法を用いた研究を推進した[1]。MR法は、大別してコロイド粒子に外場を加えてその応答を観測する active MR、および、外場を加えずに自発的な揺らぎを観測する passive MR に分けられる。平衡状態では active MR と passive MR が等価な情報を与えるため、両者の差(揺動散逸定理の破れ)が系の非平衡性の指標となる。我々はこれを非平衡環境下で実行するために、流れや揺らぎに対して多重のフィードバックで追従しながら計測を行うシステムを開発した[2]。当該システムを用いて生きている細胞内部や細胞抽出液のレオロジー計測を行った結果、細胞質は混みあいによりガラス化するが、細胞内部は代謝活性により流動化し



ていることが分かった[3]。しかも、生きている細胞内部環境がアレニウスの粘性上昇する strong glass former であるのに対して、代謝の失われた細胞抽出液は、fragility の大きなガラス形成挙動を示すことが分かった[3]。

細胞の代謝活性と非平衡ダイナミクス

生細胞は細胞周期の進行とともに、代謝活性を変化させ、細胞骨格構造や、細胞小器官などの複製・再構築を行い、内部の力学環境を変化させる。また、生体組織の適切な配置・発達には、異なる細胞種が互いに物理的な力を及ぼしつつ限られた空間を奪い合う「競合」が重要な役割を果たしており、正常細胞によるガン細胞の排除はその典型例である。これらの現象（細胞競合や細胞周期）は力学的な過程であり、内外からの刺激に応じた生理的な非平衡活動によって細胞内部の力学的環境が調節されることで適切に進行する。すなわち生き物は典型的な非線形・非平衡系であるために、その力学的振る舞いを理解するためには、多成分の高分子コロイドの組み合わせや細胞骨格、自発的な力駆動が絡み合って発現する力学特性と力生成の両方を同時に定量することが重要である。そこで、細胞周期や細胞競合現象による代謝変化と、それぞれの過程が進行する際の細胞内力学との関連性を MR 法により調べた。

まず、ATP の生成を阻害する薬剤を用いて細胞内部のエネルギー源を枯渇させ、代謝活性を低下させた細胞の内部の力学特性を測定した。代謝が低下した細胞が生み出す非熱的な揺らぎは大きく減少し、粘弾性は増大した。次に、細胞周期を核の蛍光発色によりリアルタイムで識別できる Fuuci 技術が導入された HeLa 細胞を用いて、細胞周期進行を観測しつつ、生細胞内部の複素ずり弾性率を測定した。細胞周期が進行した S/G2 期の細胞の方が G1 期より複素ずり弾性率が上昇する（硬くなる）ことが分かった。また、正常な細胞に囲まれたために、細胞競合により管腔側に排除されたガン細胞内部の力学特性も測定した。ガン化した細胞や正常な細胞に囲まれたガン細胞では代謝活性が上昇して粘弾性が低下した。さらに、排除された後のガン細胞を測定したところ、逆に細胞の代謝活性が低下、粘弾性が上昇した。

細胞内部に存在する生体高分子や器官は組み合わせによりガラス形成する。事実、本研究と同様の条件で培養された HeLa 細胞の内部環境も、わずかな濃度上昇により急激に固化する。ガラスは力学的な駆動により流動化する。つまり、今回得られた成果は、代謝活動に伴う力学的駆動が細胞内部のガラス化を阻害して流動化させると解釈できる。つまり、1) エネルギーを枯渇させた細胞や、組織からはじき出され劣悪な環境下にさらされた細胞では、力学駆動が抑えられ、ガラス化の進行によって粘弾性が上昇し、また、2) 細胞周期進行によるわずかな代謝活性の変化も粘弾性に影響を与えた可能性がある。すなわち、細胞自身の代謝活性や非熱的な力学駆動は、ガラス形成の機構を介して、成長段階や、周囲環境との相互作用に依存した細胞内部の力学環境の決定に重要な役割を果たしている。

- [1] D. Head, E. Ikebe, A. Nakamasu, P. Zhang, L. Villaruz, S. Kinoshita, S. Ando, and D. Mizuno, *Phys. Rev. E* 89, 042711 (2014).
- [2] K. Nishizawa, M. Bremerich, H. Ayade, C. F. Schmidt, T. Ariga and D. Mizuno, *Science Advances* 3, e1700318 (2017).
- [3] K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa, and D. Mizuno, *Scientific Reports* 7, 15143 (2017).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- [1] T. Ariga, M. Tomishige, and **D. Mizuno**,
Nonequilibrium Energetics of Molecular Motor Kinesin
Phys. Rev. Lett. 121, 218101 (2018). 査読有り
- [2] K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa, and **D. Mizuno**,
Universal glass-forming behavior of in vitro and living cytoplasm

Scientific Reports, 7, 15143 (2017). 査読有り

[3] K. Nishizawa, M. Bremerich, H. Ayade, C. F. Schmidt, T. Ariga and **D. Mizuno**,
Feedback-tracking microrheology in living cells
Science Advances, 3, e1700318 (2017). 査読有り

[4] T. Kurihara, M. Aridome, H. Ayade, I. Zaid, and **D. Mizuno**,
Non-Gaussian limit fluctuations in active swimmer suspensions
Phys. Rev. E 95, 030601R (2017). 査読有り

[5] I. Zaid, **D. Mizuno**,
Analytical limit distributions from random power-law interactions
Phys. Rev. Lett. 117, 030602 (2016). 査読有り

〔学会発表〕(計 60 件)

(1)

国内研究会, 水野大介

Non-Gaussian limit fluctuations in active swimmer suspensions

アクティブマター研究会 2018, 2018/1/19, 京都大学福井謙一記念研究センター 招待講演

(2)

国内研究会, 水野大介

細胞サイズと力学特性

2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017/12/8, 神戸ポートピアホテル 招待講演

(3)

国内研究会, 水野大介

Glassy dynamics of cell interiors studied with feedback-tracking microrheology

アクティブマター概念で繋ぐ生命機能の階層性, 2017/9/12, 函館グリーンピア大沼 口頭

(4)

国内研究会, 水野大介

非熱的に駆動されたソフトマターの非平衡状態としての細胞内部環境

第 56 回生物物理若手の会夏の学校(招待), 2016 年 9 月 4 日, 支笏湖ユー スホステル, 招待講演

(5)

国際学会, 水野大介

FDT violation and Non-Gaussian Glassy Dynamics in jammed and active cell interior

ジャムドマターの非ガウス揺らぎとレオロジー(国際、招待)

2017 年 3 月 9 日 ~ 11 日 (3/10 口頭) 京都大学 基礎物理学研究所 招待講演

(6)

国内研究会, 水野大介

非平衡媒質中における非ガウス揺らぎと異常拡散 (active diffusion)

異常拡散現象をめぐる最近の進展(招待), 2016/08/31~2016/9/1 (8/31 口頭)

慶応大学 日吉キャンパス 来往舎シンポジウムスペース 招待講演

(7)

国内研究会, 西澤賢治

細胞内部の混み合いガラス状態と非熱的な力学駆動

第 6 回ソフトマター研究会, 2016 年 10 月 24 日, 北海道大学, 口頭

(8)

国際学会, 水野大介

Non-Gaussian glassy dynamics in living cells and cytoskeletons

International Workshop on "Hydrodynamic Flows in/of Cells" Hydrodynamic Flows of cells(国際)

11 月 24-25, Tokyo Metropolitan University, Bulding 8, Room 303, 口頭

(9)

国内研究会, 水野大介

非平衡系としての生き物の揺らぎと力学特性

機能物性セミナー (招待) 2016 年 11 月 28 日 東京大学, 物性研究所, 招待講演

(10)

国際学会, D. Mizuno

FDT violation and Non-Gaussian Glassy Dynamics in Active Systems

2016 (12/1 口頭) POSCO International Center, Korea 招待講演

(11)

Daisuke Mizuno

Glass-like behavior of in vitro and living cytoplasm

Mechanobiology - Mechanisms of force sensation and transduction that control cell behavior in health and disease, 2016 March 23, Het Trippenhuus, Amsterdam, The Netherlands 口頭

(12)

Daisuke Mizuno

High frequency affine mechanics of locally stressed cytoskeletons
Mechanobiology - Mechanisms of force sensation and transduction that control cell behavior in health and disease, 2016 March 22-24, Het Trippenhuis, Amsterdam, The Netherlands ポスター

(13)

国際学会

Natsuki Honda, Kenji Nishizawa, Takayuki Ariga, and Daisuke Mizuno、
Dual-feedback microrheology in cytoskeletal networks 口頭
APS March Meeting 2016, 17th Mar. 2016, Baltimore, The United States of America、

(14)

Daisuke Mizuno

Non-Gaussian limit distributions out of truncated power-law interactions
One-day meeting on non-Gaussian fluctuation
2016 feb 22, 京都大学基礎物理学研究所 国際ワークショップ 招待

(15)

Daisuke Mizuno

Rheology and fluctuations in active systems
EAJSSP2015, The third east asia joint seminar on statistical Physics,
2015 Oct 15, KIAS, Seoul, Korea 招待

(16)

水野大介

力と力学特性による細胞競合メカニズム
細胞競合 第3回領域会議, 2015 Sep 11,
京都大学 芝蘭会館 口頭

(17)

Daisuke Mizuno

Microrheology towards the characterization of forces and mechanics in living cells
第26回CDBミーティング Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization
2015 Sep 8, 国際ワークショップ 招待

(18)

水野大介

Microrheology in cells under dual feedback control
The 1st International Symposium of Cell Competition, 2015 Sep 9,10, 京都大学, 芝蘭会館

(19)

Daisuke Mizuno

Microrheology of Active Systems
SFS2015 _ International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium
2015 Aug 22, Kyoto, Japan 口頭

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

該当なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。