

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2010

課題番号：20684018

研究課題名 (和文) 生きものの力学物性を支配する非平衡統計力学

研究課題名 (英文) non-equilibrium statistical mechanics of life

研究代表者

水野 大介 (MIZUNO DAISUKE)

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：30452741

研究成果の概要 (和文)：

生きている細胞を培養しつつ、active/passive マイクロレオロジー計測を遂行できる計測システムを開発した。生きている細胞は周囲環境の力学的な性質を調べることで、自らの振る舞いを決定している(力学知覚および力学適応)が、そのメカニズムは不明であった。本研究では開発したシステムを用いて生きている細胞の力生成と非平衡力学を同時に計測することで、その物理的メカニズムを初めて明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We developed an active/passive microrheology setup which is possible to measure nonequilibrium properties of living cultured cells. Cells in general decides their behaviors depending on the mechanics of surrounding matrices. With the developed setup, we found the physical mechanism of this cellular mechano-sensing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：ソフトマター・生物物理

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：非平衡、力学物性、マイクロレオロジー、力学知覚

1. 研究開始当初の背景

コロイド粒子の運動を解析することで周囲の媒質の局所的な粘弾性を求める手法は総称してマイクロレオロジーと呼ばれる。熱力学的平衡状態ではコロイド粒子の熱揺らぎが、周囲の媒質の力学的性質を反映しており、揺動散逸定理を利用することで周囲の媒質の粘弾性スペクトルが得られる

(Passive マイクロレオロジー:PMR)。また、(交流)外場に対するコロイド粒子の変位の応答関数から直接粘弾性を求める方法が存在し、Active マイクロレオロジー (AMR) と呼ばれる。研究代表者はこれまで広帯域 AMR/PMR の開発を担い、平衡状態において、AMR および PMR を使用して測定された粘弾性スペクトルが完全に一致することを示し、マイクロレオロジーの手法としての妥当性

を完全に証明した。

2. 研究の目的

本研究ではアクチン/ミオシゲルの非平衡力学物性を記述する理論が、培養細胞にも普遍的に適用可能であるかを実験的に検証する。そのために培養細胞に貪食あるいは結合させたコロイド粒子を利用してAMR/PMR同時計測を行う。これにより、*in vivo* 培養細胞でも内部生成される応力と粘弾性が両方得られると期待される。

3. 研究の方法

細胞培養可能なAMR/PMRマイクロレオロジー計測システムを共焦点光学顕微鏡上に構築する。人工細胞作製や培養細胞の蛍光標識のためのマイクロインジェクション、および細胞に定量的力学刺激を加えるためのバイオAFM(原子間力顕微鏡)も同じシステムに組み込む。力生成と代謝が制御された人工細胞を利用して、非平衡な細胞の統計力学を構築するために必要な知見を得る。

4. 研究成果

(1) 細胞の非平衡揺らぎと力学変換過程

細胞は周囲の環境と情報のやり取りを行いその性質を調べることで、適切な時・場所において生命活動の維持・増進に必要な役割を果たす。最近になって細胞は周囲の環境の化学的な性質のみならず、力学的な性質にも依存して自らの振る舞い(分化、成長、運動、物質生産等)を決定することが明らかになりつつある。人間は物質の力学的な性質を調べるために、力を加えてその応答を計測する。

細胞も自らの内部に存在する筋肉(細胞骨格)を収縮させることで力を発生させる。発生した力は、細胞膜上に存在する(焦点接着斑と呼ばれる)細胞骨格と細胞外物質との間の結合部位を通して外部環境に対する牽引力として伝播する。

これまで、細胞が外部環境の力学物性を知覚する物理メカニズムに関しては不明な部分が多かった。細胞内部で発生した収縮力に起因する内部応力の分布は、細胞の形状や内部構造の複雑さのために定量化することが難しい。かつ、内部で発生した収縮力が外部環境に対する牽引力に変換される効率は、細胞と細胞外物質の力学特性や両者の結合の仕方といった複雑な要因によって決定されるため、その力学変換過程の定量的解析が困難であったためである。

そこで本研究では、単純な球状を保った細胞の両側にコロイド粒子を接着させ、これらを光トラップすることで細胞の力学特性と牽引力の両者をマイクロレオロジーと呼ばれる手法を用いて計測した(図1)。マイクロレオロジーとは、コロイド粒子の運動から周囲の媒質の力学的な性質を求める手法の総称であり、大きく分けてactiveマイクロレオロジー(AMR)、passiveマイクロレオロジー(PMR)の2種類に分けられる[7]。AMRでは、コロイド粒子1に外力 $f_1(\omega)$ を加え、他方の粒子2の変位 $u_2(\omega)$ を計測することにより、応答関数 $A_{12}(\omega) \equiv u_2 / f_1$ を直接求める。それに対してPMRでは外場を加えずに2つのコロイド粒子の揺らぎの相関 $\langle C(\omega) \rangle = \langle u_1(\omega)u_2^*(\omega) \rangle$: クロスパワースペクトルを計測し、平衡状態において成立する揺動散逸定理($A_{12}''(\omega) = \omega C(\omega) / 2k_B T$)を介して応答関数の虚部 A_{12}'' を求める。我々は、揺動散逸定理が成り立たない非平衡状態においても、便宜上 $\omega C(\omega) / 2k_B T$ を応答関数と呼ぶ。

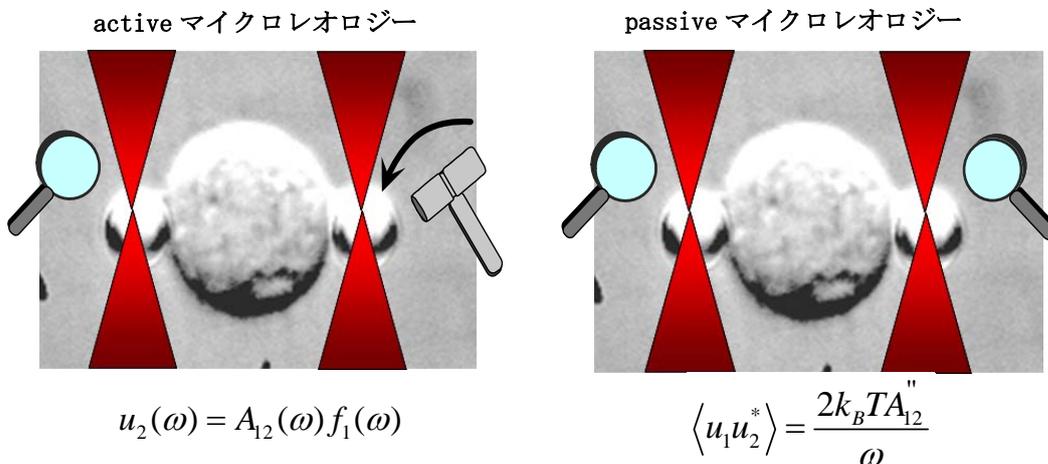


図1: 細胞に付着させた2つのコロイド粒子を用いたマイクロレオロジー

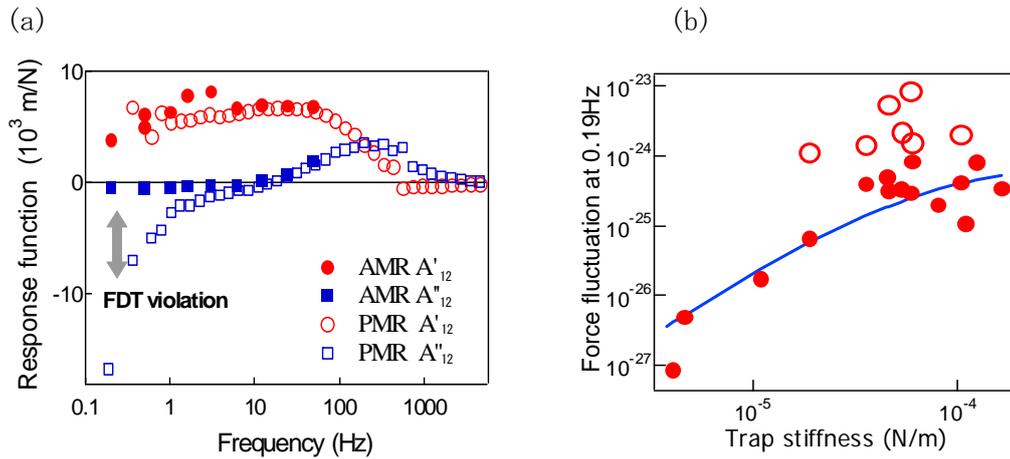


図2 (a)細胞の応答関数スペクトル (b)細胞が生み出した収縮力(○)の伝達効率 (●/○)のトラップ強度依存性

このようにして求めた応答関数の周波数スペクトルを図2に示す。AMR, PMRを用いて計測した応答関数は、揺動散逸定理が成り立つ平衡状態では一致するはずであるが [Science 315, 370-373 (2007), D.Mizuno *et al*], 細胞がコロイド粒子に非平衡力を及ぼす低周波数域で、両者の間に顕著な違いが見られた。詳細な解析により、この揺動散逸定理の破れから、細胞が生み出している全収縮力と、そのうちコロイド粒子に対する牽引力として外部環境に伝達された成分の両方が定量的に求められることが分かった[6]。応募者の計測方法では、光トラップの強度が通常の細胞にとっての外部環境の力学特性に相当する。そこで光トラップ強度を調節しつつ上記実験を行った結果、細胞が生み出した力が細胞外物質に伝播する効率は外部環境の力学特性に強く依存することが分かった。細胞が外部から加えられた力を検出する部位(メカノセンサー)は、細胞膜上に存在し細胞内部の細胞骨格ネットワークと細胞外物質との間を連結する焦点接着斑と呼ばれる構造である。応募者の研究は、細胞外物質が細胞自身よりも硬いときに、細胞骨格内部で生み出された力が牽引力として効率よくこのメカノセンサー部位に伝達されることを示している。つまり、細胞は自らが生成した力のうち、牽引力として外部環境に伝達する成分を検出することで、周囲の環境の力学的性質を計測している。その際に細胞が自らの力学的な特性を「ものさし」として利用して、外部環境の硬さ・柔らかさを測っている。応募者は上記のメカニズムにより、**mechano-sensing** や **mechanical adaptation**, **mechano-taxis** といった広範な細胞の力学現象を説明できることを主張している。本研究は[5]に掲載された。

(2) 生きた細胞骨格の非平衡揺らぎの理論解析

生体系は非平衡状態にあることを特徴としており、内部で力学エネルギーを生成してこれを消費することで様々な生命活動を営んでいる。しかしながら、こうした典型的な非平衡システムを支配する物理が平衡系とはどのように異なるかよく分かっていない。いかなる観測を行えば、非平衡システムの特性を定量的に議論できるかすら定かではない。

非平衡システム中におけるマイクロな自由度を観測すると(例、コロイド粒子の運動)、しばしば熱揺らぎよりもはるかに大きな揺らぎが観測される。最近の計測技術の向上により、この非平衡系に特有の揺らぎ(非平衡揺らぎ)を定量的に観測することが可能となってきた。そこで本研究では、この比較的新しい観測量を用いて、非平衡系の特性を理解するための理論的枠組みを与えることを目標とした。

今回応募者が解析するシステムは、生体や細胞中のように、粘弾性媒質中に非熱的に力を生成する”力生成子”が分散しているシステムである。塑性的な媒質中に力生成子が分散した場合、非平衡な流動パターンや構造が生成することが実験で確認されている。ここではまず、弾性的な安定構造を持つ媒質中に力生成子が分散されている単純なシステム(架橋した細胞骨格中にモーター蛋白質が分散している場合に相当する)を理解することを目指した。この場合、安定した弾性構造が複雑な非平衡パターンや散逸構造の形成を阻害するため、観測される非平衡揺らぎは静的な媒質において熱揺らぎと線形な非平衡ノイズが重畳されたものとして簡単に理解できる。

内力に関する力のつりあいのため、力生成子は力双極子あるいは等方圧縮点としてモデル化できる。生体内部力学構造は、力を生成し伝達させる構造(細胞骨格)と溶媒である水の混合系として理解される。そこで応募者はこれらの力生成子が水と細胞骨格からなる2成分流体中に一樣にそして等方的に分布する場合の揺らぎの相関を求めた。こうして求め

られた非平衡揺らぎの時空間相関と、システムの力学挙動が非平衡度に依存して変化する振る舞いを関連付ける理論モデルを提示した。本成果は[3]に掲載された。

(3) 細胞外糖衣の力学計測と制御

細胞糖衣とは、細胞により分泌された各種の生体高分子により細胞膜の外側に形成される(通常は)薄い細胞外物質層のことであり、ヒアルロン酸やグリコサミノグリカン等の多糖類やこれと結合するプロテオグリカンを主成分とする。この細胞糖衣は、細胞を力学刺激から保護し、また分子篩として働くことで細胞間の生化学信号伝達にも影響を与えている。応募者は、HAやその他のプロテグリカンからなるゲルの力学挙動を計測し、それらがflexibleな荷電性高分子の絡み合いゲルとしていずれも定量的に理解できることを示した[4, 8]。さらにアグレカと呼ばれるプロテオグリカンで処理した非常に悪性度の強い前立腺癌細胞株(PC3)の表面に発現した厚い(~10 μ m)細胞糖衣の力学的性質をマイクロレオロジーを用いて初めて計測した。また、通常信号伝達物質とは考えられていないプロテオグリカンが、細胞糖衣と同程度の長さの微繊毛を発現することを発見した。この微繊毛は内部にアクチン細胞骨格を含み、ヒアルロン酸合成酵素を多量に細胞膜上に発現していると考えられる。細胞糖衣の発現は癌の悪性度の進行と歩調を合わせて進行することが知られており、現在はこの細胞糖衣を介した癌細胞と周囲媒質との間の相互作用が、癌細胞を悪性化させる物理的機序を究明すべく研究に取り組んでいる。本成果は、Journal of the royal Society Interface誌に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件) *全て査読有

- [1] T. Toyota, D. A. Head, C. F. Schmidt and D. Mizuno "Non-Gaussian athermal fluctuations in active gels" *Soft Matter* **7**, 3234-3239 (2011)
- [2] D. Head and D. Mizuno, "Non-local fluctuation correlations in active gels" *Physical Review E* **81**, 041910 (2010)
- [3] D. Head and D. Mizuno, "Non-local fluctuation correlations in active gels" *Physical Review E* **81**, 041910 (2010)
- [4] N. Nienhuis, D. Mizuno, J. A. E. Spaan, and C. F. Schmidt, "Viscoelastic response of a model endothelial glycocalyx" *Physical Biology* **6**, 025014 (2009)
- [5] D. Mizuno, R. G. Bacabac, C. Tardin, D. Head, C. F. Schmidt, "High-resolution probing of cellular force transmission" *Physical Review Letters* **102**, 168102 (2009)
- [6] D. Mizuno, R. G. Bacabac, C. Tardin, D. Head, C. F. Schmidt, "High-resolution probing of cellular force

transmission" *Physical Review Letters* **102**, 168102 (2009)

- [7] D. Mizuno, D. A. Head, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt "Active and Passive Microrheology in equilibrium and non-equilibrium systems" *Macromolecules* **41**, 7194-7202 (2008)
- [8] N. Nijenhuis, D. Mizuno, C. F. Schmidt, H. Vink, and J. A. E. Spaan "Microrheology of hyaluronan solutions: implications for the endothelial glycocalyx" *Biomacromolecules* **9** (9): 2390-2398 (2008)

[学会発表] (計 32 件)

1. 細胞内部の混雑状態と力学特性 (ポスター) Peijuan Zhang, 中益朗子, 水野大介 2011春物理学会 2011年3月26日 新潟
2. 細胞骨格の外力誘起力学異方性のマイクロレオロジー観察 (ポスター) 中益朗子, Peijuan Zhang, 池辺詠美, 木下英, 安藤祥司, David Head, 水野大介 2011春物理学会 2011年3月26日 新潟
3. 非平衡ゲルの非熱的揺らぎの非ガウス性 (ポスター) 豊田聖啓, David Head, Peijuan Zhang, Schmidt CF, 水野大介 2011春物理学会 2011年3月26日 新潟
4. Non-Gaussian athermal fluctuations in active gels (poster) D. Mizuno *Mechanics and Growth of Tissues From Development to Cancer* 2011年3月23日 Dresden, Germany
5. レーザーインターフェロメトリーによる細胞(骨格)の非平衡力学特性計測(招待・口頭) 水野大介 (社) レーザー学会 第31回年次大会(電気通信大学、東京) 2011年1月10日
6. 非平衡揺らぎを通して考える細胞の力学知覚の物理メカニズム (口頭) 水野大介 非平衡ソフトマター・東京大学 本郷 2011年1月8日
7. 細胞骨格の非平衡力学特性と細胞の力学知覚の物理メカニズム(招待・口頭) 水野大介 第3回定量生物学会(東京大学生産技術研究所) 2010年11月27日
8. 中間径フィラメント細胞骨格の外力誘起異方性のマイクロレオロジー観察 (ポスター) 水野大介 京都大学基礎物理学研究所研・非平衡系の物理-非平衡ゆらぎと集団挙動 2010年11月19日、京都
9. 細胞骨格の非平衡力学特性(口頭) 水野大介 レオロジー討論会 2010年10月6日、東北大学 (仙台)
10. 細胞の非平衡力学特性(口頭) 水野大介 レオロジー討論会 2010年10月6日 東北大学 (仙台)
11. 細胞骨格ネットワークの非平衡力学特性(招待・口頭) 水野大介 "第59回高分子討論会特定テーマ バイオの視点からのゲル科学の新展開" 2010年9月15日 北海道大学
12. Shear induced mechanics and active fluctuations in cytoskeletal network (oral) Toshihiro

- Toyota, Hayato Sakamoto, Peijuan Zhang, D. Head and Daisuke Mizuno 5th Pacific Rim Conference on Rheology PRCR2010 (北海道大学) 2010年8月6日
13. Exploring physical calibration mechanism for cellular mechano-sensing (poster) Akiko Nakamasu, R. G. Bacabac, Christoph Schmidt, Daisuke Mizuno PRCR2010 (北海道大学) 2010年8月5日
 14. Exploring the physical calibration mechanism for cellular mechano-sensing (招待・口頭) D. Mizuno SPIE: Optical Trapping and Optical Micromanipulation (Sandiego Convention center) 2010年8月4日 Sandiego, USA
 15. 物理学会若手奨励賞受賞記念講演「生き物の非平衡力学物性」(口頭・招待) 水野 大介 岡山大学 津島キャンパス 2010. 3. 21
 16. 非平衡(アクチン・ミオシン)ゲルのマイクロレオロジー(口頭) 豊田聖啓, 山本直樹, 木村康之, 水野大介 物理学会九州支部会 H21 冬 宮崎大学 宮崎
 17. vimentin ネットワークのマイクロレオロジー(口頭) 木下英, 池辺詠美, 木村康之, 水野大介 物理学会九州支部会 H21 冬 宮崎大学 宮崎
 18. 特定領域 非平衡ソフトマター 公開シンポジウム「細胞の非平衡揺らぎと力学変換過程」(口頭・招待) 水野 大介 京都大学桂キャンパス、京都 2009. 11. 20
 19. International workshop on dynamic cross-effect in softly condensed matter 「Probing molecular force generations and transmission in active materials」(口頭・招待) Daisuke Mizuno 国立情報学研究所 2009. 11. 5、東京
 20. 「細胞骨格のマイクロレオロジー」(ポスター) 木下英 木村康之 水野大介 物理学会 H21 秋 熊本大学 熊本
 21. 「生きた細胞骨格の非平衡揺らぎ」(ポスター) 豊田 聖啓 木下 英 山本 直樹 坂本隼人 木村康之 C.F.Schmidt 水野大介 物理学会 H21 秋 熊本大学 熊本
 22. 特定領域 非平衡ソフトマター 第4回領域研究会「生き物の非平衡揺らぎと力学物性」 水野大介 北海道大学 2009年7月1・2・3日
 23. High-Resolution Measurements of Cellular Contractile Forces Florian Schlosser, Florian Rehfeldt, Daisuke Mizuno, Christoph Schmidt 2009 ドイツ物理学会 H21 3月 Dresden Germany
 24. Microrheology of hyaluronan solutions: implications for the endothelial glycocalyx (口頭) Nadja Nijenhuis, Daisuke Mizuno, Christoph F. Schmidt, Hans Vink, and Jos A.E. Spaan 2009 ドイツ物理学会 H21 3月 Dresden Germany
 25. 生きた細胞骨格の非平衡揺らぎ(口頭) 豊田聖啓, 木下英, 坂本隼人, 木村康之, Schmidt C.F., 水野

大介 H21 物理学会春 H21 3月立教大学 東京

26. 細胞牽引力の力学変換過程(口頭) 水野大介, R.G. Bacabac, C. Tardin, D.A. Head, C.F. Schmidt H21 物理学会春 H21 3月 立教大学 東京
27. Microrheology of the pericellular matrix (ポスター) Nadja Nijenhuis, Daisuke Mizuno, Jos A. E. Spaan and Christoph F. Schmidt 2009 American Biophysical Society H21 2月 Washington D.C., USA
28. 応力の存在下におけるマイクロレオロジー(口頭) 坂本 隼人, 水野 大介, 木村 康之 H20 物理学会九州支部会 H20 12月 福岡工業大学 福岡
29. 細胞骨格の非平衡揺らぎ(口頭) 木下英, 豊田聖啓, 山本直樹, 坂本隼人, 水野大介, 木村康之 H20 物理学会九州支部会 H20 12月 福岡工業大学 福岡
30. 生きた細胞(骨格)の非平衡動力学(口頭・招待) 水野大介 H20 物理学会秋 H20 9月岩手大学 岩手
31. 応力の存在下における粘弾性測定(口頭) 坂本隼人, 木村康之, 水野大介, 市川正敏 H20 物理学会秋 H20 9月 岩手大学 岩手
32. Nonequilibrium mechanics and stress-fluctuation in the motor-activated cytoskeletons Mizuno, Daisuke, Tardin, Catherine, Head, David, MacKintosh, Fred, Schmidt, Christoph The XVth International Congress on Rheology H20 8月 Monterey, California, USA

[図書] (計 1 件)

Cell Mechanochemistry. Biological Systems and Factors Inducing Mechanical Stress, Such as Light, Pressure and Gravity, Chapter 2, P.23-54
Rommel G. Bacabac, Daisuke Mizuno, Gijssje H. Koenderink
Transworld Research Network, 2010

[その他]
ホームページ等

<http://sleipnir.sci.kyushu-u.ac.jp/mizuno/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 大介 (MIZUNO DAISUKE)

九州大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号: 30452741