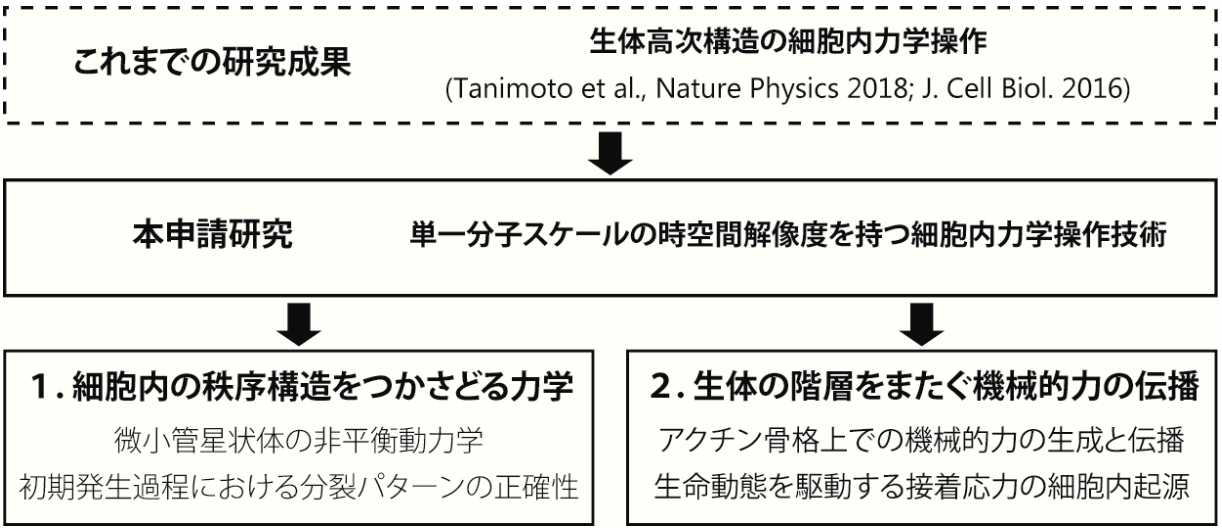
144　細胞内構造の生体力学	谷本　博一

【目的】生体力学は形態学の一分野として長い歴史をもち、分子、細胞、組織の各スケールにおける機械的力の直接測定に基づいて、各々の階層における生命動態の力学的理解を構築してきた。一方で、分子と細胞の間の階層、1 ナノメートルから 100 マイクロメートルまで長さにして 100,000 倍にもわたるメゾスコピックな階層における直接力学測定技術は未だ全く確立されていない。この準細胞スケールは、細胞骨格の高次構造形成、染色体の分配を始めとする、細胞生物学における主要な研究対象である。準細胞スケールの生体力学測定技術を確立することで、様々な細胞生物学的課題の力学的側面を解き明かして、分子からマクロスケールまでの生命動態を連続的に理解することが可能となると考える。

【方法】本研究は、研究代表者がこれまでに構築した細胞内磁気ピンセット技術（Tanimoto et al., Nature Physics 2018）を発展させることで、生細胞内における機械的力の時空間動態をピコニュートンオーダーで精密に測定するための基盤技術を開発した（下図）。

【結果】本研究で得られた成果は以下の 3 つである。1. 出力をリアルタイム制御した電磁石を用いた細胞内磁気ピンセットを構築し、受精卵細胞および培養細胞内で磁気プローブ粒子を力学制御できることを検証した。2. 受精卵細胞内の微小管星状体構造の精密力学測定のために、星状体に磁気プローブ粒子を細胞内で結合させる方法を比較検討した。3. 細胞内磁気ピンセットと標的構造の可視化および分子生物学的摂動実験を組み合わせるために、動物培養細胞を用いた実験系の構築を進めた。微小管およびアクチン骨格を可視化した動物培養細胞に直径 1 ミクロン程度の磁気プローブ粒子を導入するマイクロインジェクションプロトコルを確立した。

本研究の概要



144. 細胞内構造の生体力学

谷本　博一

横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科

Key words：生物物理学，細胞生物学

緒　言

生体力学は形態学の一分野として長い歴史をもち、分子、細胞、組織の各スケールにおける機械的力の直接測定に基づいて、各々の階層における生命動態の力学的理解を構築してきた。一方で、分子と細胞の間の階層、1 ナノメートルから 100 マイクロメートルまで長さにして 100,000 倍にもわたるメゾスコピックな階層における直接力学測定技術は未だ全く確立されていない。この準細胞スケールは、細胞骨格の高次構造形成、染色体の分配を始めとする、細胞生物学における主要な研究対象である。準細胞スケールの生体力学測定技術を確立することで、様々な細胞生物学的課題の力学的側面を解き明かして、分子からマクロスケールまでの生命動態を連続的に理解することが可能となると考える。

本研究は、研究代表者がこれまでに構築した細胞内磁気ピンセット技術［1］を発展させることで、生細胞内における機械的力の時空間動態をピコニュートンオーダーで精密に測定するための基盤技術を開発する（図 1）。さらに開発した生体力学操作技術を応用して、典型的な細胞生物学的現象である 1．動物の初期発生パターンを決める微小管　　星状体の細胞内運動［2］と、2．細胞の接着応力場を生成するアクチン骨格［3］の力学を解明する。これらの研究は骨格高次構造の動力学を分子スケールの力生成および細胞スケールの生体運動と結びつけて、その分子制御機構を明らかにする。その成果は、細胞骨格が重要な役割を果たす多彩な細胞生物学的現象を物理・力学的に理解するための一般的な枠組みとなり得るものである。

なお本研究の一部を論文として発表した［4］。

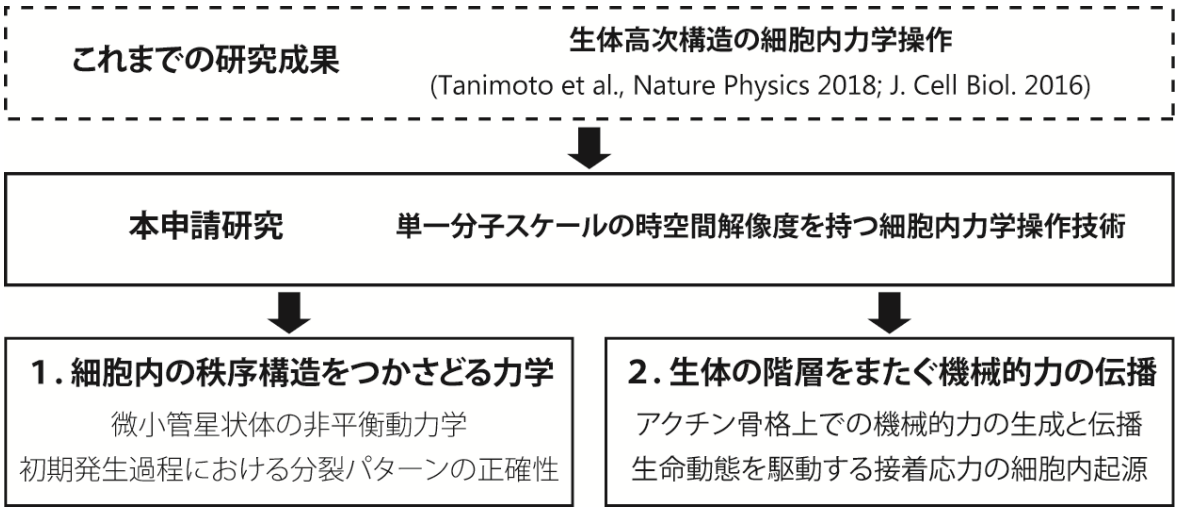


図 1．本研究の概要

本研究は定量的な細胞内磁気ピンセットを構築して細胞内構造の生体力学を解明することを目標とした。

方法、結果および考察

1. 定量的かつ汎用性の高い細胞内力学操作技術の構築

研究代表者がこれまでに構築した細胞内磁気ピンセットを発展させて、ピコニュートン精度かつサブ秒で時間変調する細胞内力学操作が可能な実験技術を構築した。具体的には直流安定化電源とコイルおよび高透磁率材料であるパーマロイを用いて出力が PC 制御可能な高出力磁気ピンセットを構築した（図 2）。特に、電磁石の先端形状を最適化することで、100 マイクロメートル程度にわたって 100 ピコニュートン程度の外力を生成することに成功した。この構築した細胞内磁気ピンセットを用いて、顕微鏡下で細胞を観察しながら、細胞内の任意の場所に制御された磁力を加えることが可能となった。

構築した細胞内磁気ピンセットの検証として、棘皮動物の受精卵細胞内に導入した直径 1 ミクロンの磁気粒子に時間変調させた外力を加えられることを実証した。100 ピコニュートン程度の振幅かつ秒単位の時間スケールで変動する外力を磁気粒子に印加することで、細胞直径の 100 マイクロメートルの長距離にわたって磁気粒子の運動を時空間変調させられることを実証した。

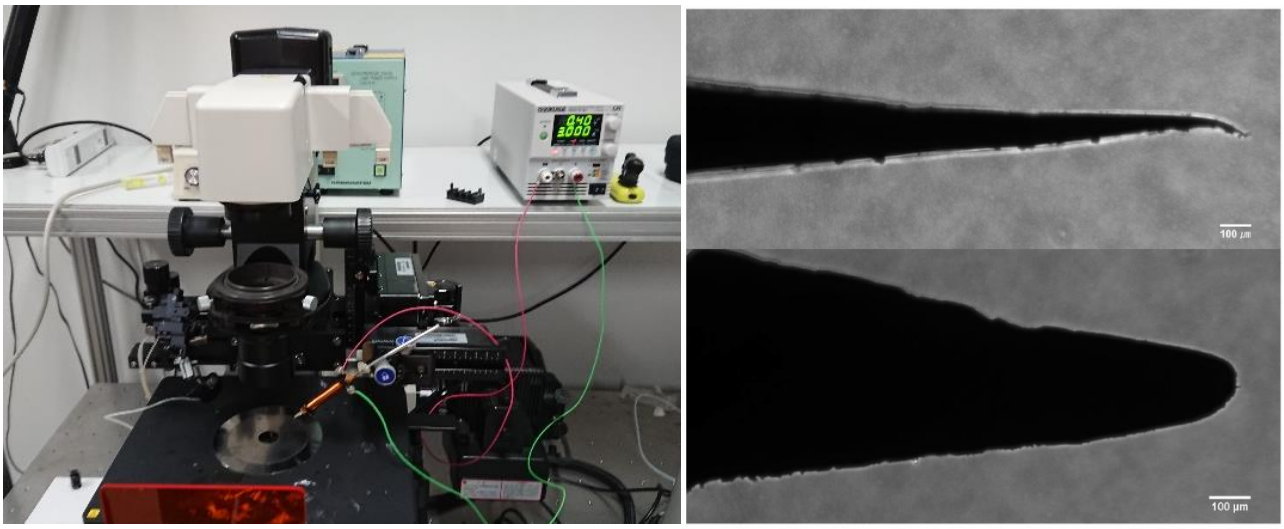


図 2. 高出力電磁石を用いた細胞内磁気ピンセット

本研究助成を活用して、高い出力を時空間制御可能な細胞内磁気ピンセットを構築した。

左：構築した細胞内磁気ピンセット。倒立蛍光顕微鏡と組み合わせて、細胞内構造を可視化しながら外力を加えることができる。

右：磁気ピンセットの先端形状。細胞の直径である 100 ミクロン程度に亘って十分な大きさの力を印加することができるように磁場勾配を最適化した。

2. 動物培養細胞への汎用化

構築した細胞内磁気ピンセットを動物培養細胞に応用するためには、動物培養細胞に磁気プローブ粒子を導入する必要がある。そのために 1．エンドサイトーシスを利用した取り込み、2．パーティクルガンを用いたインジェクション、3. 微細ガラス針を用いたインジェクション、を検討した。1. では磁気プローブ粒子を細胞膜が取り囲んでしまうので、今後の研究発展（磁気プローブ粒子の表面修飾）には適当でないと考えられる。2. は細胞への導入効率が悪く、インジェクションに成功した細胞を探すのに時間がかかる。3. の手法は外側に細胞膜などが付着していない「きれいな」状態で細胞内に磁気プローブ粒子を導入することができ、さらに、実験者の熟練が要求されるものの、標的の細胞に確実に粒子を導入することができる。3．の微細ガラス張りを用いたインジェクション法を採用することで、動物培養細胞に安定して磁気プローブ粒子を導入して、細胞内磁気ピンセットを用いて力学操作することに成功した（図 3）。

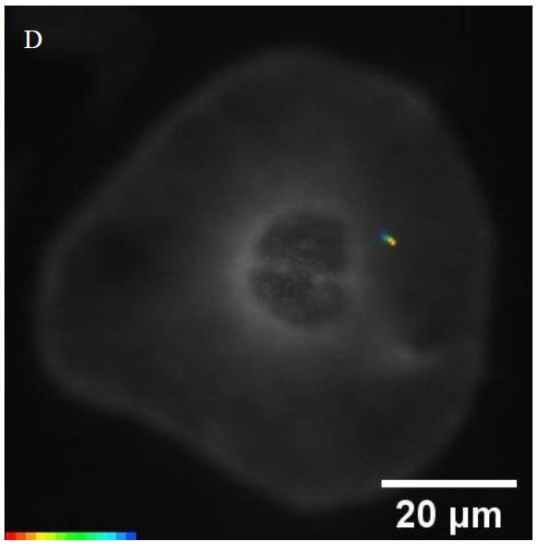


図 3. 動物培養細胞への細胞内磁気ピンセットの汎用化
微細ガラス針を用いたマイクロインジェクション法により動物培養細胞に 1 ミクロン程度の大きさの磁気プローブ粒子を安定して導入する実験プロトコルを確立した。さらにインジェクションしたプローブ粒子に外部磁場を印加させることでプローブ粒子を細胞内において力学操作できることを検証した。

細胞内で働いている機械的力の直接測定は生体力学分野における最重要課題の 1 つである。しかし測定の困難さゆえに、そのような細胞内力学測定は数例しか報告されておらず、実験技術は全く確立されていない。本研究で構築する汎用性の高い細胞内力学測定技術が、生体力学・細胞生物学の新しい展開を生み出すことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学理学部細胞生物物理学研究室の川島久実氏と宮村香澄氏である。

文　献

1) Tanimoto, Hirokazu, and Masaki Sano. "A simple force-motion relation for migrating cells revealed by multipole analysis of traction stress." Biophysical journal 106.1 (2014): 16-25. PMID: 24411233 PMCID: PMC3907257 DOI: 10.1016/j.bpj.2013.10.041

2) Tanimoto, Hirokazu, Akatsuki Kimura, and Nicolas Minc. "Shape–motion relationships of centering microtubule asters." *Journal of Cell Biology* 212.7 (2016): 777-787. PMID: 27022090 PMCID: PMC4810306 DOI: 10.1083/jcb.201510064

3) Tanimoto, H., Sallé, J., Dodin, L., & Minc, N. (2018). Physical forces determining the persistency and centring precision of microtubule asters. *Nature physics*, *14*(8), 848-854. PMID: 30079097 PMCID: PMC6071857 DOI: 10.1038/s41567-018-0154-4

4) Davì V, Chevalier L, Guo H, Tanimoto H, Barrett K, Couturier E, Boudaoud A, Minc N. (2019). Systematic mapping of cell wall mechanics in the regulation of cell morphogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 116(28), 13833-13838. doi: 10.1073/pnas.1820455116. Epub 2019 Jun 24. PMID:1235592 MCID:PMC6628811 DOI:10.1073/pnas.1820455116