

遠心偏光顕微鏡を活用して細胞内でオルガネラを移動させる力を測定する

木村 暁

Key words : 遠心偏光顕微鏡 (CPM), 方向非依存微分干渉顕微鏡 (OI-DIC), 細胞核, 細胞骨格, 遠心力

遠心分離装置は生物学の多くの実験室に備わっているなじみの深い装置であろう。様々な生化学, 分子生物学の実験において, 混合物を密度に応じて分離する際に用いられている。生きた細胞にそのまま遠心力をかける実験は近年はほとんど見かけなくなってきたが, 古典的には細胞の性質を明らかにすることに貢献してきた。

本稿では, 生きた細胞に遠心力をかけながら観察できる遠心顕微鏡を使って, 細胞内の力を測定する筆者らの最近の試みについて紹介したい。細胞内で発生する力を測定する方法は限られており, 本稿で提案する手法が細胞内の力を理解する助けになると期待する。

I. 細胞内オルガネラの配置の駆動力

細胞内は均一な溶液ではなく, 細胞内小器官(オルガネラ)と名づけられた区画(コンパートメント)に分かれている。それらのオルガネラが適切な位置に配置していることが細胞の機能にとって重要である。例えば, 紡錘体は細胞の中央に位置することで, 細胞分裂面を細胞の中央に誘導し, 均等な細胞分裂を保証している。

このような適材適所なオルガネラの配置は, 細胞内で発生している力によって駆動されている。細胞内の力発生は, 主に細胞骨格とその上を移動するモータータンパク質によってなされている。

細胞骨格やモーターが, 分子としてどのようにどの程度の力を発生するかは, 試験管内 (*in vitro*) の生物物理学的な測定によって多くのことがわかっていて。また, 細胞抽出液など細胞内に近い環境での測定も行われている¹⁾。一方で, 細胞膜や細胞壁に囲まれた細胞内で発生する力を測定することは困難である。細胞内での力を測定する有力な方法として, 磁気ピンセット法がある。この手法では, 磁気ビーズを細胞内に導入して, 外から磁場をかけることにより細胞内構造物に外力をかけ, 力を明らかにする²⁾。細胞内で発生する力を測定することは重要であるにもかかわらず, 用いることができる手法は限られており, 新たな方法の開発が重要である。

細胞に力を与える手法として古典的に用いられてきたのは遠心力である。初期の研究では, 遠心分離機を用いて細胞を遠心し, 直後に観察する試みがなされてきた(文献3に古典的な研究がまとめられている)。更には遠心をかけている最中に顕微鏡観察できる“遠心顕微鏡”も開発されてきた(文献3-5に様々なタイプの遠心顕微鏡がまとめられている)。近年では, 植物細胞の重力感知のメカニズムを理解するために, 遠心した直後に共焦点画像が取得できる装置や, 顕微鏡ごと回転させて遠心力をかけている最中の細胞を観察することもなされている^{6,7)}。

A new approach to measure intracellular forces to move the organelles using the centrifuge polarizing microscope

Kimura Akatsuki : 国立遺伝学研究所細胞建築研究室 (〒 411-8540 静岡県三島市谷田 1111), 総合研究大学院大学 遺伝学コース, ウッズホール海洋生物学研究所

0370-9531/08/¥500/論文/JCOPY

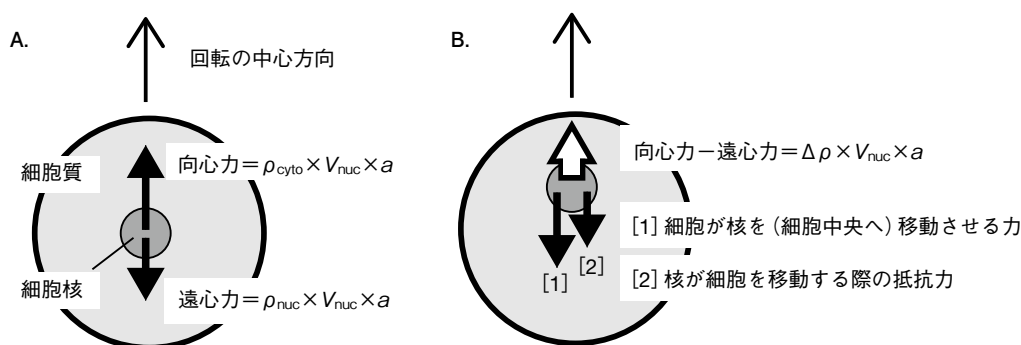


図 1 細胞に遠心操作を加えることにより、細胞が核を移動させる力を測定する原理

- A. 細胞に遠心操作を加えることにより細胞核にかかる力。遠心加速度を a [m/s²] とする。核の重量 (核の密度 ρ_{nuc} [kg/m³] と核の体積 V_{nuc} [m³] の積) に遠心加速度をかけた遠心力が加わる一方で、排除している細胞質 (密度 ρ_{cyto}) の重さの分の向心力がかかる。線虫胚では、細胞核は細胞質よりも密度が低いため、向心力のほうが大きく、回転の中心方向へ力が加わる。
- B. 遠心によって発生する力 (白抜き矢印) と細胞が発生する力 (黒矢印) のバランスから、細胞が発生する力を求めることができる。細胞が発生する力としては、核を細胞中央などへ移動させる力に加えて、核が移動している際は細胞質の粘性などによる抵抗力がかかる。核の移動速度がゼロのときは抵抗力がゼロになり、核が中央に位置しているときは中心に移動させる力はゼロとなるため、それぞれの力を個別に求めることができる。

一方で、多くの場合、細胞内オルガネラを遠心力を利用して細胞内で移動させるには、次節で説明するように大きな重力加速度が必要となる。これは、細胞内オルガネラと、その周囲の細胞質との密度差が小さいことに起因する。

II. 遠心力によって細胞内オルガネラを動かす：力の見積もり

遠心操作を行ったときに細胞内のオルガネラに働く力の大きさは、ニュートンの運動の第二法則、 $F = m a$ の運動方程式に従う。 F は力 (単位はニュートン [N])、 m は物体の質量 [kg]、 a は加速度 [m/s²] である。ここでは、オルガネラの例として細胞核を遠心操作によって動かすことを考える。核の質量密度を ρ_{nuc} [kg/m³]、体積を V_{nuc} [m³] とすると、核の質量は $m_{\text{nuc}} = \rho_{\text{nuc}} V_{\text{nuc}}$ [kg] となる。ここに回転により重力加速度 a が加わると、核に対して回転の外側に向かって (遠心方向) にかかる力の大きさは $F_{\text{out}} = \rho_{\text{nuc}} V_{\text{nuc}} a$ [N] となる (図 1A)。

一方で、重力があっても水の中では身体に浮力がかかって浮くように、細胞質の中に存在する核には、細胞質の質量密度 (ρ_{cyto} [kg/m³]) に依存する向心力 (回転中心方向への力) がかかる。アルキ

メデスの法則では、液体に浸かっている物体にかかる浮力は、その物体が押し出した液体の重量分の重力に等しいとされる。同じ考え方で、細胞に遠心操作を加えると、細胞核には細胞質の密度 (ρ_{cyto} [kg/m³]) に細胞核の体積 (V_{nuc}) と遠心加速度 a を掛け算した $F_{\text{in}} = \rho_{\text{cyto}} V_{\text{nuc}} a$ の向心力がかかる (図 1A)。

したがって、核にかかる力の合計は、向心力と遠心力の差で計算される。核は細胞質に比べて軽い場合 ($\rho_{\text{cyto}} > \rho_{\text{nuc}}$)、核には差し引き $F_{\text{in}} - F_{\text{out}} = (\rho_{\text{cyto}} - \rho_{\text{nuc}}) V_{\text{nuc}} a$ の力が回転の中心方向に向かって生じる (図 1B)。ここで、事例に即して具体的な数値を計算してみることにする。筆者らが研究している線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の 1 細胞期胚を例に考える。筆者らの測定で、核は細胞質に比べて密度が低く、その密度差は $\Delta \rho = \rho_{\text{cyto}} - \rho_{\text{nuc}} = 0.04$ [g/mL] = 40 [kg/m³] と見積もられた⁸⁾。線虫 1 細胞期胚の核の体積 V_{nuc} を 500 μm^3 (半径 5 μm) とした場合、 $\Delta \rho \times V$ は 2×10^{-14} [kg]。遠心加速度が a [m/s²] のときに、核にかかる回転中心方向への力 (向心力) は $0.02 \times a$ [pN] となる。地上の重力加速度 g は 9.8 [m/s²] なので、通常の重力では核にかかる浮力は 0.2 [pN] となる。細胞骨格上で力を発生する分子モーター 1 分子が発生



図 2 遠心偏光顕微鏡の写真

サンプルは“サンプル位置”に固定されるチャンバー内にマウントされる。ステージが回転すると、その中心に設置された鏡に向かって照射されるレーザーが、鏡が特定の角度のときにだけ検出器で検出されることを合図として、対物レンズの下からパルスレーザーが照射される。これにより、サンプルが高速で回転していても、あたかも止まっているように撮像することができる。

する力は数 pN であり、細胞内で発生している様々な力に比べて、重力の影響は微々たるものであることがわかる。

谷本らが磁気ピンセット法で測定を行ったところ、核(と星状体の複合体)をウニの胚の中で動かすには 580 pN の力が必要であることがわかった²⁾。これに相当する力を遠心操作で発生させるには、 $30,000 \text{ [m/s}^2\text{]}$ 、すなわち重力加速度 g の約 3,000 倍 ($3,000 \times g$) 程度の遠心加速度が必要と見積もられる。

Ⅲ. 遠心偏光顕微鏡 (CPM)

このような高速回転をしながら、小さい細胞内構造物が見えるような高解像度の顕微鏡として開発されたのが、遠心偏光顕微鏡 (centrifuge polarizing microscope: CPM) である (図 2)。CPM は、細胞観察を目的とした偏光顕微鏡を開発し、紡錘体の観察に初めて成功⁹⁾した井上信也博士が中心となって開発した顕微鏡である^{3,10,11)}。開発には

井上博士の研究グループに加え、浜松ホトニクス社、オリンパス(現・エビデント)社も加わった。高速にサンプルを回転させながら、偏光観察に必要な細胞由来の微弱な複屈折を検出可能にするために、ステージ以外の光学系は回転しない設計となっている。高速で動くサンプルがあたかも静止しているかのように見えるのは、サンプルが格納されているチャンバーが対物レンズの真下の決まった角度にいた時のみ、サンプルに 6 ns だけパルスレーザーが照射されるしくみになっているからである (図 2)。チャンバーの位置はステージの回転中心から 7.5 cm の位置にあり、10,000 rpm で回転しているときの移動速度は毎秒 80 m にも及ぶが、それでも 6 ns という短い照射時間の間に動く距離は $0.5 \mu\text{m}$ 以下となり、細胞内の小さな構造物もほぼブレがなく撮影できる。

このように、井上博士らが開発した CPM を使えば、サンプルを高速で回転させながら細胞内構造物を可視化することができるため、遠心力を

使って細胞内のオルガネラにかかっている力を測定する、という実験が可能となる。

IV. 屈折率顕微鏡を使った質量密度推定

遠心顕微鏡を使って細胞内のオルガネラにかかる力を測定する場合、そのオルガネラと周囲(細胞質)との密度差($\Delta\rho$)の定量的情報が必要となる(第 II 節参照)。細胞内の局所的な密度を直接測定することは容易ではない。しかし、密度と屈折率には、分子の種類にほぼ依存せず、比例関係があることが知られている¹²⁻¹⁴⁾ことから、局所的な屈折率がわかれば、局所的な質量密度を推定することができる。屈折率の違いは、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡など、透明なサンプルに対してもコントラストをつけて像を得るための顕微鏡で広く使われている。ここで、屈折率を定量化するには光がサンプルを通過した際の光路長差(optical path difference)を正確に定量する“定量的位相イメージング(quantitative phase imaging; QPI)”技術が有効である。Michael Shribak 博士が開発した方向非依存微分干渉顕微鏡(orientation-independent differential interference microscope; OI-DIC)^{15, 16)}は QPI 技術の一つで、細胞内での密度推定にも実績がある^{17, 18)}。筆者らも OI-DIC を使って核と細胞質の密度差を見積もり、その妥当性を CPM を使って確認した⁸⁾。

V. 提案手法を用いた細胞核の移動にかかる力の測定

筆者らは、上記で提案した手法を実際に線虫胚における細胞核の中央化にかかる力を測定するのに用いている⁸⁾。多くの細胞で、細胞核は細胞の中央に配置している。これには細胞核を細胞の中心に移動させ、そこで留めさせる力が作用していると考えられる。細胞核が細胞中央に配置する現象は顕微鏡で細胞の観察ができるようになってからすぐに見いだされた特徴であるが、その力の発生メカニズムについては現在でも議論の対象となっている。力の発生メカニズムを考えるうえで、力の測定は重要である。どれくらいの力が必要であるかがわかれば、それを可能にする分子メカニズムが限られてくるからである。

そこで筆者らは CPM を用いて細胞核の移動に必要な力を測定することを計画した。筆者らは、OI-DIC を用いて、線虫胚の細胞核と細胞質の密度を測定したうえで、様々な遠心加速度を線虫胚にかけ、そこでの動きを計測した⁸⁾。様々な遠心加速度をかけたときに細胞核が中央からどれだけ離れるかを測定すれば、核を中央に向かわせる力の大きさがわかるし、細胞核が中央を通り過ぎる時の速度から、細胞核が細胞内で受けている粘性抵抗の大きさもわかる(図 1B)。線虫を実験材料として用いる利点は、遺伝学的操作が容易であることから、遺伝子機能欠損体で測定することにより、遺伝子の機能と力や粘性抵抗の大きさを結びつけることができることにある。実際に筆者らの研究では、細胞核に会合している中心体から放射状に伸びる星状体微小管が核を動きにくくしていることを定量的に明らかにした⁸⁾。なお、このように遠心をかけて細胞核を外力で移動させたのちに胚を CPM から移動させると、翌日には胚の孵化が認められたため⁸⁾、本手法は細胞に対して非侵襲的である。

VI. 今後の展望

今回、筆者らは高速で細胞に遠心力をかけながら高解像度で観察できる CPM を用いて、細胞内のオルガネラの移動を担う物理的な力を測定する新たな手法を提案した。そして、実際に線虫の胚における細胞核の移動力の測定に適用できることを示した⁸⁾。細胞核は細胞質との密度差が比較的大きく、また体積も大きいので遠心加速度の影響を受けやすく、本手法の威力を発揮しやすい対象である。今後、周辺環境との密度差や体積が小さい対象に対して、本技術の応用を進めて、本手法の効果や限界を明らかにしていきたい。密度が大きい人工のビーズのようなものを細胞内に導入して、遠心力によって動かすというような応用も考えられ、本手法を細胞内の力の測定法として発展させたい。

謝辞 故・井上信也博士は CPM の開発者であり、筆者らにこの顕微鏡を使わせてくださり、更には日本への移設の許可をくださいました。厚くお礼申し上げます。

げます。五島剛太博士は CPM の存在を筆者に教えてくださり、同顕微鏡を使った実験をサポートしてくださいました。CPM の開発者の一人でもある合田真博士は、CPM を使った実験を筆者と一緒に進めてくださいました。同じく顕微鏡の開発にも携わったオリンパス社の岡田尚史氏、高橋一氏には、合田博士、谷知己博士と共に CPM の日本への移設にご尽力いただきました。Michael Shribak 博士は OI-DIC の開発者であり、OI-DIC を使った実験と一緒に進めてくださいました。Rudolf Oldenbourg 博士と谷博士にはウッズホール海洋生物学研究所での研究や顕微鏡移設をサポートいただきました。池田善貴博士をはじめ、筆者の研究室の現在と過去の在籍者にも研究のサポートをいただきました。本研究へのアドバイスをくださった多くの方々にも感謝申し上げます。本研究はウッズホール海洋生物学研究所のフェローシップや科研費などの支援を受けて実現したものです。

●文 献

- 1) Shimamoto Y, Maeda YT, Ishiwata S et al : *Cell*. **145** : 1062-1074, 2011
- 2) Tanimoto H, Sallé J, Dodin L, Minc N : *Nat Phys*. **14** : 848-854, 2018
- 3) Inoué S, Knudson RA, Goda M et al : *J Microsc*. **201** : 341-356, 2001
- 4) Hiramoto Y, Kamitsubo E : *Int Rev Cytol*. **157** : 99-128, 1995
- 5) 豊田正嗣, 森田(寺尾)美代, 池田憲文, 田坂昌生 : *Plant Morphol*. **24** : 23-32, 2012
- 6) Toyota M, Ikeda N, Sawai-Toyota S et al : *Plant J*. **76** : 648-660, 2013
- 7) Nakamura M, Toyota M, Tasaka M, Terao-Morita M : *Methods Mol Biol*. **1309** : 57-69, 2015
- 8) Goda M, Shribak M, Ikeda Z et al : *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.01.03.574024>
- 9) Inoué S, Suzuki K, Ichie K : *Chromosoma*. **5** : 487-500, 1953
- 10) Inoué S, Suzuki K, Ichie K et al : US Patent : US1907803A, 1999
- 11) 合田 真, 鈴木慶介, 岡田尚史 他 : *電子顕微鏡*. **37** : 145-147, 2002
- 12) Davies HG, Wilkins MHF : *Nature*. **169** : 541, 1952
- 13) Davies HG, Wilkins MHF, Chayen J, La Cour LF : *J Cell Sci*. S3-S95 : 271-304, 1954
- 14) Wayne R : *Light and Video Microscopy*, 2nd edition, pp169-187. Academic Press, New York, 2013
- 15) Shribak M, Inoué S : *Appl Opt*. **45** : 460-469, 2006
- 16) Malamy JE, Shribak M : *J Microsc*. **270** : 290-301, 2018
- 17) Imai R, Nozaki T, Tani T et al : *Mol Biol Cell*. **28** : 3349-3359, 2017
- 18) Iida S, Ide S, Tamura S et al : *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.11.11.566679>, 2023