

平成 12 年度新世代研究所研究助成 報告書

研究課題「細胞運動に伴う力学特性の AFM 局所粘弾性測定」

北海道大学大学院 理学研究科 物理学専攻 芳賀 永

1 研究成果

生命の最小単位である細胞レベルにおける細胞分裂や運動は、細胞を構成する生体高分子、蛋白、酵素等の分子レベルでの多くの現象が複雑に関係し生じる。このため、個別の構成分子に関する研究だけでは解明できない。他方、細胞運動を細胞システムとして生じる局所的な力学的変化のバランスから解明するアプローチが考えられている。しかし、既存の局所的な測定法には精度に限界があるため、この観点からの研究は進んでいなかった。最近発展しつつある原子間力顕微鏡 (AFM) は、液体中においても試料の凹凸像をナノスケールの精度で定量的に測定できることから、培養液中の生きた細胞の研究に有効であると期待されている。また、この装置を用いて、試料の局所的な粘弾性を測定する方法が提案されている。しかし、実験例は非常に少なく未だ確立されていない。本研究では、AFM をもちいて生きた細胞における粘弾性測定法を確立するとともに、光学・蛍光顕微鏡と AFM を用いて細胞運動や形態を支配する要因を解明することである。本研究助成による成果を以下に記す。

1. Force modulation 法を用いて、細胞の弾性分布が細胞運動に連動して変化することを明らかにした。細胞核付近の硬さが運動開始前に硬くなるが、運動の開始に伴ってやわらかくなることを見出した。これにより、細胞の硬さは、細胞内に働く張力の変化を反映しているモデルを提案した。
2. 原子間力顕微鏡 (AFM) と高感度蛍光顕微鏡を組み合わせた、ハイブリッド AFM を立ち上げた。
3. 緑色蛍光タンパク (GFP) をマウス繊維芽細胞 (NIH-3T3) に導入し、生きた状態での細胞内のアクチンフィラメントの動態観察を可能とした。
4. ハイブリッド AFM をもちいて、生きた状態における細胞のアクチンフィラメントネットワークと弾性分布の同時測定に成功した。

原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた局所粘弾性測定により、生きた細胞の粘弾性分布が細胞運動にどのように関連しているかを見出した。細胞内の協調機構として、張力を伝達するアクチンネットワークの存在が注目される。これは、協調機構の新たな視点を示唆するものである。ハイブリッド AFM は GFP を用いて生きた状態の細胞内のいろいろなタンパクのダイナミクスと力学量を直接結びつけることを可能とするものである。本研究は、生命科学に対する新たなアプローチとして、2つの国際会議から招待講演をうけ、また全国規模の国内学会からも講演依頼を受けた。

2 成果発表

【原著論文】

- 1) H. Haga, S. Sasaki, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki, and T. Sambongi:
"Elasticity Mapping of Living Fibroblasts by AFM and Immunofluorescence Observation of Cytoskeleton", *Ultramicroscopy*, **82**, 253-258 (2000).
- 2) H. Shiga, Y. Yamane, E. Ito, K. Abe, K. Kawabata, and H. Haga:
"Mechanical Properties of Membrane Surface of Cultured Astrocyte Revealed by Atomic Force Microscopy", *Jpn. J. Appl. Phys.*, **39**, 3711-3716 (2000).
- 3) Y. Yamane, H. Shiga, H. Haga, K. Kawabata, K. Abe, and E. Ito:
"Quantitative Analyses of Topography and Elasticity of Living and Fixed Astrocytes", *J. Electron. Microsc.*, **49**, 463-471 (2000).
- 4) H. Haga, M. Nagayama, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki, and T. Sambongi:
"Time-Lapse Viscoelastic Imaging of Living Fibroblasts Using Force Modulation Mode in AFM", *J. Electron. Microsc.*, **49**, 473-481 (2000).
- 5) T. Tojima, Y. Yamane, H. Takagi, T. Takeshita, T. Sugiyama, H. Haga, K. Kawabata, T. Ushiki, K. Abe, T. Yoshioka, and E. Ito:
"Three-dimensional characterization of interior structures of exocytotic apertures of nerve cells using atomic force microscopy", *Neuroscience*, **101**, 471-481 (2000).

【解説、会議抄録等】

- 1) 芳賀 永、川端 和重:
『細胞運動に伴う力学構造のAFM粘弾性測定』 *電子顕微鏡*, **35**, 276-278 (2000). <解説>
- 2) K. Kawabata, H. Haga, T. Nitta, Y. Endo, M. Nagayama, E. Ito and T. Sambongi:
"Big Softer Hole on Living Cell: Elasticity Imaging with AFM", *Scanning and Force Microscopies for Biomedical Applications*, *Proceedings of SPIE*, **3922**, 91-98 (2000). <会議抄録>

3 学術講演

【招待講演】

- 1) K. Kawabata, H. Haga, T. Nitta, Y. Endo, M. Nagayama, E. Ito and T. Sambongi:
"Big Softer Hole on Living Cell: Elasticity Imaging with AFM", *SPIE-BIOS 2000, SanJose (USA)*, 2000.
- 2) K. Kawabata, M. Nagayama, H. Haga, and T. Sambongi:
"Mechanical effects on collective phenomena of biological systems: cell locomotion", *Int. Symp. on Quantum Transport and Synthetic Metals, Seoul (Korea)*, 2000.

- 3) 永山 昌史、芳賀 永、川端 和重、三本木 孝:

『AFM を用いた細胞運動に伴う粘弾性分布の時間変化測定』 日本電子顕微鏡学会学術講演会 (2000 年 王子) .

- 4) 川端 和重、芳賀 永:

『細胞運動に伴う弾性分布の時間変化』 日本電子顕微鏡学会 AFM 研究会 (2000 年 新潟) .

【一般講演】

- 1) H. Haga, S. Sasaki, M. Nagayama, Y. Sado, and K. Kawabata:

" Time-lapse Viscoelastic Imaging of Living Fibroblasts by AFM and Immunofluorescence Observation of Cytoskeleton", Gordon Research Conference, Oxford (England), 2000.

- 2) 永山 昌史、芳賀 永、川端 和重、伊藤 悦朗、三本木 孝:

『細胞運動に伴う局所粘弾性分布の時間変化 ～AFM による高解像度力学測定～』 日本生物物理学会北海道支部例会 (2000 年 北海道大学)

- 3) 佐戸 康洋、芳賀 永、川端 和重、松岡 一郎、三本木 孝:

『ハイブリッド AFM による生きた細胞の GFP 細胞骨格観察と弾性分布測定』 日本生物物理学会北海道支部例会 (2000 年 北海道大学)

- 4) 志賀 葉月、山根 ゆか子、伊藤 悦朗、川端 和重、芳賀 永:

『原子間力顕微鏡による培養アストロサイトの弾性率の測定』 日本生物物理学会北海道支部例会 (2000 年 北海道大学)

- 5) 永山 昌史、芳賀 永、川端 和重:

『生きた細胞におけるかたさ分布の時間発展』 日本生物物理学会年会 (2000 年 東北大学)

- 6) 佐戸 康洋、芳賀 永、松岡 一郎、川端 和重:

『ハイブリッド AFM による生きた細胞の細胞骨格分布と弾性率分布の観測』 日本生物物理学会年会 (2000 年 東北大学)

4 謝辞

本研究の遂行にあたり、財団法人新世代研究所の研究助成を受けました。新世代研究所の関係者各位に厚く御礼申し上げます。