

2006年1月6日
独立行政法人 理化学研究所

生体内の物質移動を「拡散係数」で初めて正確に測定

- 見えない小さな分子の運動の新しい測定法 -

◇ポイント◇

- ・生体内モデルとしてヒアルロン酸を使い「異常拡散現象」を直接観察
- ・「蛍光相関分光装置」の視野の大きさを可変にするように改善し実現
- ・医療診断、ドラッグデリバリー、発生再生研究、がん細胞研究などへの貢献に期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、軟骨組織など細胞以外の組織（細胞外マトリックス^{*1}）で見られる分子の「異常拡散^{*2}現象」を、ヒアルロン酸^{*3}をモデル系として用い、直接観察することに初めて成功しました。すなわち、「拡散係数^{*4}が測定空間の大きさによって変化する現象」を確認しました。理研中央研究所（茅幸二所長）環境ソフトマテリアル研究ユニットの丑田公規（うしだきみのり）研究ユニットリーダーらによる研究成果です。

生体細胞の周辺や細胞内では、様々な情報伝達物質や、時には薬剤などが行き来し、多彩な生理作用を引き起こしています。これらの物質は意志を持って移動しているわけではなく、ブラウン運動^{*5}でランダムに動く「拡散」という物理現象にもとづいて移動しています。この物質のランダム運動は、光で捕らえられる数十ナノメートル（nm）以上の大きさの分子では、実際の動きとして容易に観察できますが、光の波長よりはるかに小さい通常の分子や原子では観察することができず、拡散係数として測定するしかありません。生体反応の速度は、この拡散係数に直接比例するため、生命の維持にとって重要な目安になります。しかし、生体内の拡散係数は定数ではなく、測定スケールの大きさで変化する変数となっていますので、これまでは正確に測定することができませんでした。研究ユニットでは、この異常拡散現象を、開発した新しい「蛍光相関分光装置^{*6}」を使い、化粧品や医薬品でも用いられるヒアルロン酸の水溶液を細胞外マトリックスのモデル系として使い、直接観察に成功しました。

この直接観察は、細胞レベルの情報伝達物質の研究に直接的に役に立つばかりでなく、医療診断やドラッグデリバリー^{*7}、発生再生研究、がん細胞やウイルスの研究現場に広く用いられる手法になることが期待されます。

この研究成果は米国物理学会誌『Physical Review E（フィジカル レビュー）』Vol.172, issue 6（12月号）、Rapid Communication（ラピッド コミュニケーション）として発行されます。

1. 背景及び趣旨

2005年は世界物理年でしたが、これは1905年にアインシュタインが3つの大きな発見^{*8}をしてから100周年を記念して設定されたものです。この発見の1つに「アインシュタインの関係」と呼ばれる、分子や原子の拡散に関する理論があります。アインシュタインは、マクロな拡散係数を、ブラウン運動というミクロな現象と結

びつける理論をつくることに成功しました。例えば、コップの水に赤インクを垂らしたときにコップ一杯にインクが拡がって均一になっていく現象は、ブラウン運動の積み重ねであると考えられ、「アインシュタインの関係」で説明できます。これを、通常の液体（均一系）を用いると、変化しないただ1つの拡散係数（拡散定数）によって書き表すことができ、通常の均一系で起こるこのような現象は「正常拡散」と呼ばれています。

しかし、寒天などのゲル、高分子溶液、コロイド、ガラスなどの複雑系（ソフトマテリアル）では、物質が様々なスケールの構造を持っているため、この「正常拡散」が起こらず、測定スケールによって拡散係数が変化する「異常拡散(Anomalous Diffusion (アノマロス ディフュージョン))」が起こります。生体の情報伝達物質も、ブラウン運動のようなランダムな運動を繰り返して移動していますが、生体内にはナノスケールで網目構造や膜構造といった様々な「不均一な障害物」が存在するために「異常拡散現象」が起こります。

近年、生物において、細胞内外に様々な情報伝達物質が移動することが知られるようになり、再びこの異常拡散現象が注目されるようになりました。情報伝達物質の運動を正確に把握するためには、異常拡散現象を直接観察できるようにすることが望まれてきました。

2. 実験装置

研究ユニットは、蛍光分子の観察によく用いられる「共焦点レーザー顕微鏡^{*9}」を用いた測定装置である「蛍光相関分光(Fluorescence Correlation Spectroscopy (フルオレセンス コリレーション スペクトロスコピー) : FCS)装置」を改造し、異常拡散現象を正確にとらえる工夫を試みました。市販の装置を含めてFCSでは、次のような原理で拡散係数を測定します。

共焦点レーザー顕微鏡の視野は、最小0.2フェムトリットル程度^{*10}になりますので、試料を希釈しさえすればこの極端に小さな体積の中に入る分子の数を平均1個から10個程度にすることができます。この分子が視野内を出入りすることによって数が変化するので、分子が発する蛍光の信号を観察すると信号が揺らぎます。揺らぎは拡散係数の大きい分子（拡散しやすい動きの速い分子）では速くおこり、小さい分子（拡散しにくい動きの遅い分子）では遅くなります。その揺らぎの時間相関を解析して拡散係数を決めるのがFCS法です。(図1)

今回、FCS法を用いて異常拡散現象をとらえるため、図2に示すように測定装置の視野の大きさを半径220 nmから490 nmまで変化させることができる装置を、新たに加えました。この視野の変化によって、拡散係数がどのように変化するかを調べました。

3. 実験結果

細胞外マトリックスのモデル物質としてヒアルロン酸水溶液を用いました。ヒアルロン酸は、水溶液中では空間いっぱいには拡がったランダムな網目構造を作ることが知られています（コラーゲンなど他の細胞外マトリックス物質も一般的に網目構造を作ります）。0.1重量パーセント（重量%）のヒアルロン酸水溶液は、平均33 nmの網目を作ります。この水溶液の中に蛍光色素分子^{*11}を入れて、ナノメータスケ

ールで視野の大きさを変えながら拡散係数を測定しました。図 2 には、おおよその視野の大きさを方眼にして示してあります。最も小さい視野の 220 nm の半径は網目 6 個程度、最も大きい 490 nm の網目は 15 個程度の網目に対応します。得られた拡散係数は、非常に狭い領域で変化しました。

図 3 に示すように、0.1 重量%のヒアルロン酸を含む溶液（赤い線）では 200 nm から 350 nm までの視野範囲で拡散係数が低下していき、350nm より大きな視野ではほぼ一定になります。ヒアルロン酸が存在しない通常の水（青い実線の直線）ではこのようなことは起きませんでした。また、ヒアルロン酸が存在しないときと比べ、拡散係数が約 10 %減少しています。0.9 重量%（緑線）や 1.5 重量%（青線）濃度のヒアルロン酸で測定すると、濃度が高くなることで網目が 33 nm よりさらに小さくなるので、拡散係数の減少は著しく、さらに小さな視野半径で低下が始まることがわかります。このことは、異常拡散が起こっていることを示し、ヒアルロン酸のような細胞外マトリックスを構成する物質の重要な性質であると考えられます。

拡散係数は、分子が情報を伝える反応速度に直接比例します。図 3 の結果は、例えば蛍光色素分子の代わりに同じ大きさの生体情報伝達分子を用いた場合に、網目が 6 個程度離れた細胞には情報が伝わりやすいが、15 個離れると少し伝わりにくいということを直接示していることとなります。生体情報伝達の伝わりやすさは、拡散する分子の大きさや移動する空間の環境によって大きく異なると考えられ、個々の生体系で測定する手法が重要な鍵となります。

4. 研究成果の展開

細胞外マトリックスは、細胞接着と密接な関係にあり、生物の発生や再生に重要な役割を果たしているといわれています。これは、図 4 に示すように、細胞の表面に存在する様々な情報伝達物質が、細胞外マトリックス中に放出されたり、移動したりすることによって、それぞれの細胞が機能を果たしているからです。また、がんの浸潤や転移も細胞外マトリックスとの相互作用を無視して考えることはできません。さらに、細胞に薬剤を与えるときや、ウイルスなどが感染するときも細胞外マトリックス中の移動を考慮する必要があります。正常な細胞外マトリックスでは、あらゆる場所で「異常拡散」が起こっていると考えられ、この新しい方法を用いた基礎研究や診断が有益になると予想できます。また、同じ方法を細胞内に拡張することも可能です。特に細胞外マトリックスを考慮した診断は、医療分野において、発生、再生のメカニズム、軟骨組織、皮膚などの診断手法として発展する可能性を秘めています。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所 中央研究所

環境ソフトマテリアル研究ユニット 研究ユニットリーダー 丑田 公規

Tel : 048-467-7963 / Fax : 048-462-4668

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 ヒアルロン酸

二つの糖 (N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸) を構成単位とする単純な直鎖高分子 (図 5 参照) で、ほとんど全ての動物が細胞外マトリックスとして用いており、代替物質が存在しない。高分子は螺旋状によじれているので曲がりやすく、水溶液中では空間いっぱいにはたがり絡み合った網目の様なランダム構造を作るとともに大量の水分を保持する。

※2 異常拡散

Anomalous Diffusion (アノマロス ディフュージョン) という言葉を直訳した日本語。必ずしも「異常現象」が起きているという意味ではなく、拡散係数が、拡散する分子の移動距離や移動時間によって変化する関数になってしまうという意味で用いる。

※3 細胞外マトリックス

動物の体を構成する組織のうち、細胞以外の部分を細胞外マトリックスと総称する。通常は細胞が作り出すコラーゲンのようなタンパク質や、ヒアルロン酸のような糖質が混合して作られており、骨組織、軟骨組織などが代表的例である。

※4 拡散係数

1855年フィックが提唱したフィックの第1法則と第2法則から得られる、物質の動きやすさを表す物理量で、「拡散方程式」に係数として表されるので、この呼び名になる。

※5 ブラウン運動

1827年、イギリスの植物学者ロバート・ブラウンが水に浮かべた花粉微粒子を顕微鏡観察しているうちに発見した、生物でない物体のふるえるようなランダムな動きのこと。

※6 蛍光相関分光 (Fluorescence Correlation Spectroscopy(フルオレセンス コリレーション スペクトロスコピー): FCS)装置

共焦点レーザー顕微鏡に蛍光の揺らぎを測定する装置を組み込んだ測定装置。蛍光分子の動きやすさを、その拡散係数として測定することが出来る。

※7 ドラッグデリバリー

細胞や組織に必要最小の薬剤を効率よく、しかもタイムリーに投与する技術のこと。

※8 アインシュタインの1905年の発見

「特殊相対性理論」「光電効果の理論」「拡散係数とブラウン運動の理論」の3つを指す。

※9 共焦点レーザー顕微鏡

顕微鏡に対物レンズを通してレーザー光を試料に当てる装置を組み込んで、レーザー光の焦点と観察の焦点を完全に共通にした顕微鏡。さらにレーザー光を走査（スキャン）し、発光観察すると、光による限界程度まで解像度を上げることが出来る。

※10 フェムトリットル

1リットルの1000兆分の1の体積のこと。この程度の小さな体積になると、人間が操作できる範囲の希釈をすることによって、その体積内の分子数を数個程度にすることが出来る。

※11 蛍光色素分子

レーザーなどの光を当てると、効率よく別の波長の光を発生すること（蛍光）のできる分子。今回はAlexa（アレクサ）488と呼ばれる色素を用いた。

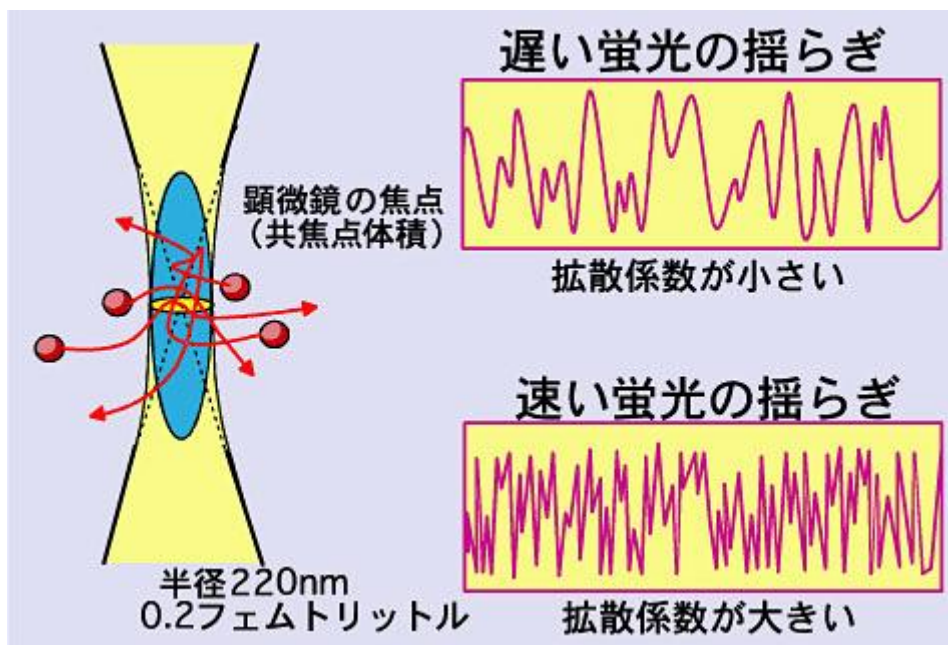


図1 蛍光相関分光(FCS)の測定原理

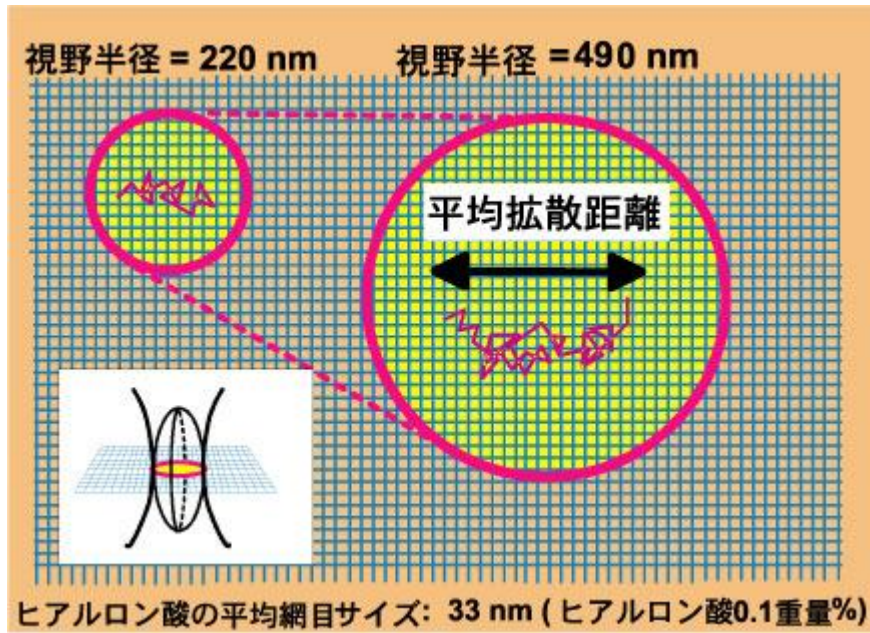


図2 測定で変えた視野の大きさとヒアルロン酸の持つ平均網目サイズの大きさとの比較

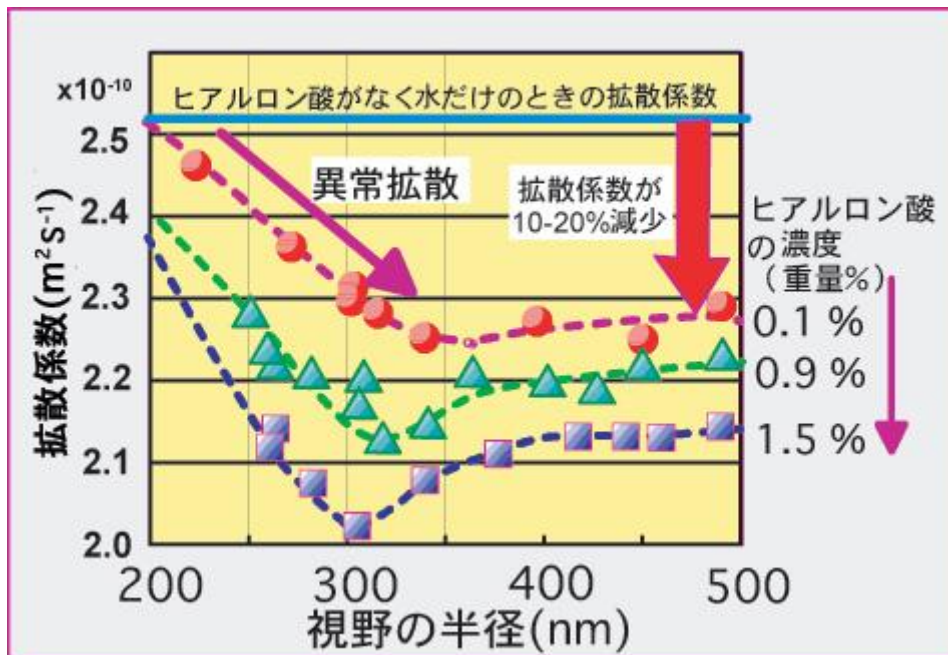


図3 新しい蛍光相関分光装置で見たヒアルロン酸マトリックス中の蛍光分子の示す異常拡散

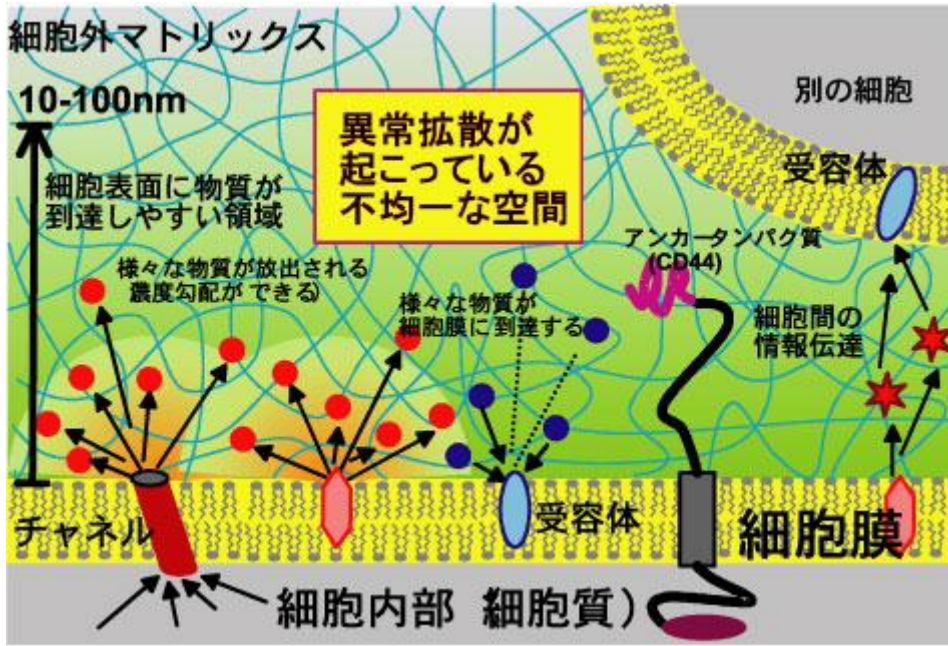


図4 細胞表面に存在すると思われる異常拡散が起こる不均一な空間

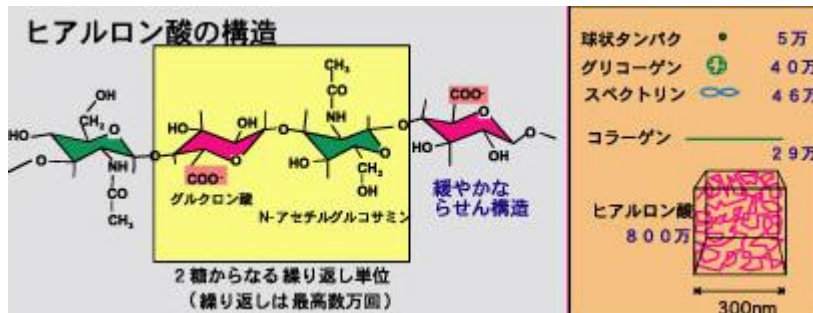


図5 ヒアルロン酸の構造

左のような構造を持っている分子の構成単位（ユニット）が、数千から数万回程度繰り返されたひも状の高分子がヒアルロン酸である。ヒアルロン酸のひも部分は曲がりやすく、空間いっぱいに拡がりやすい。右の図はその拡がり方を比較のために、その他の生体高分子とともに示したもの。例えば分子量800万のヒアルロン酸は1辺300nmの立方体に相当する体積を占めるが、大きな隙間ができ、その隙間に大量の水が保持される。