

2022 年度修士論文

# 細胞質の代謝依存的エイジングと力学特性

熊丸一平

指導教員：水野 大介教授

九州大学大学院 理学府 物理学専攻

複雑生命物性研究室

2023/02/24

---

# 要旨

生きた細胞は外界からエネルギーを受け取り、内部で消費した後再び外部へ放出する非平衡開放系である。その内部ではモーター蛋白質などの様々な生体高分子機械が力を生成して生理的な機能を果たしている。このような非熱的な駆動力は細胞質の力学的性質に強い影響を与えている。例えば、代謝活動を阻害した細胞抽出液は細胞内と同じ高分子濃度付近で粘性が急激に増大してガラス化するが、生細胞の細胞質は流動性を保っている。また、代謝活動の主要なエネルギー源である ATP を枯渇させた生細胞では、低周波の非熱的揺らぎが通常の生細胞に比べて大きく減少し、細胞質が弾性的になる。このように、代謝によって誘起される非熱的な揺らぎは、細胞質の力学的性質に決定的な影響を及ぼす。しかしながら、複雑で自律的な化学反応経路を持つ生細胞の内部状態を制御することは困難であり、その物理的な機構は解明されていない。

本研究では細胞内部の物理環境の単純かつ制御可能なモデル系として細胞抽出液を用い、そのレオロジーと代謝活動との関係を調べることを目指した。抽出液の高分子濃度や ATP 濃度を制御しつつ、マイクロレオロジーによる力学特性の計測や吸光度測定、顕微鏡観察を行った。生細胞中では低周波数帯において揺動散逸定理の破れが観測され、熱揺らぎと非熱揺らぎが存在することが確認された。他方で、細胞抽出液中の揺らぎは生細胞中の熱揺らぎよりもさらに小さかった。これは生細胞中では代謝由来の非熱揺らぎが細胞の粘弾性を低下（細胞質を流動化）させていることを示唆する。

また、生体高分子濃度が 0.3 g/ml 程度と生細胞に近い濃度の細胞抽出液のレオロジーを長時間にわたって測定した。生細胞内とは異なり、抽出液の粘弾性が試料作製後時間経過とともに変化するエイジング現象が観測された。さらに抽出液に ATP を加えると、試料作製直後は ATP を加えていない抽出液と比べ流動化し、生細胞と同程度の粘弾性を示した。しかしながら、時間経過とともに ATP を加えなかった試料よりも粘弾性は急激に大きくなった。この抽出液中の ATP 濃度は時間経過とともに減少したために、試料内の生体高分子は代謝活性を維持している。したがって、代謝活動によって試料作製直後の抽出液は流動性を保つとともに、その後の時間経過によるエイジングも早められている可能性がある。

上記のレオロジー計測を行った際には、試料は光学的計測が可能な程度の均一性を保っていたが、さらに時間にわたり顕微鏡観察したところ、ATP の有無に関わらずいずれ巨視的に相分離し完全に白濁することが分かった。生細胞濃度 (0.3 g/ml) の試料では、混み合いやゲル化による動力学の凍結のために、相分離の進行も著しく阻害されるようであった。そ

---

ここで、濃度を 0.15-0.23 g/ml に低下させた試料の顕微鏡観察と濁度測定を行ったところ、ミクロにゲル化しつつ巨視的な相分離が進行する様子が観測できた。アクチン細胞骨格とミオシン分子の相互作用による超沈殿は阻害しているために、このエイジング・相分離は細胞質自体が持つ性質である。生細胞内では代謝活動により逆行する若返り現象が起きて、エイジングと拮抗することで恒常性が維持されていると推察される。しかしながら抽出液におけるエイジング過程は、ATP を加え生細胞内の代謝環境に近づけたはずの操作によって、逆に促進された。今回測定した試料は外部との物質交換が行われない閉鎖環境に置かれていたため、観測されたエイジング現象は代謝副産物によってもたらされた可能性もあり、その物理的解釈は容易でない。今後は代謝活動に関わらず環境が制御できる交換系での測定が必要である。

---

# Contents

<b>I</b>	<b>序論</b>	<b>8</b>
1	生体ソフトマター	8
2	ATP と代謝	10
2.1	代謝 . . . . .	10
2.2	ATP の働き . . . . .	10
3	細胞骨格	12
4	ガラス化	14
4.1	温度依存的ガラス化 . . . . .	14
4.2	混みあいによるガラス化 . . . . .	14
4.3	エネルギーランドスケープ描像 . . . . .	17
4.4	細胞質のガラス化 . . . . .	19
5	相分離	21
5.1	相分離一般論 . . . . .	21
5.2	たんぱく質の相分離 . . . . .	23
6	生細胞の力学特性	25
6.1	非熱的な揺らぎと揺動散逸定理の破れ . . . . .	25
6.2	ATP を枯渇させた生細胞のレオロジー . . . . .	26
6.3	本研究の目的と本論文の構成 . . . . .	27
<b>II</b>	<b>マイクロレオロジー</b>	<b>29</b>
7	レオロジー一般論	29
7.1	理想的弾性率 . . . . .	29
7.2	純粘性液体 . . . . .	29
7.3	複素ずり弾性率 . . . . .	30

<b>8</b>	<b>マイクロレオロジー測定</b>	<b>31</b>
8.1	レーザーインターフェロメトリー法 . . . . .	31
8.2	Active MR . . . . .	35
8.3	Passive MR . . . . .	38
8.4	キャリブレーション . . . . .	39
8.4.1	スケーリング変数 $C$ . . . . .	39
8.4.2	トラップ強度 $k$ . . . . .	40
<b>9</b>	<b>ステージフィードバックマイクロレオロジー</b>	<b>41</b>
9.1	ステージフィードバック MR . . . . .	41
9.1.1	Piezo ステージ: $x$ , $y$ 方向 . . . . .	41
9.1.2	Piezo ステージ: $z$ 方向 . . . . .	42
9.2	ステージフィードバック Active MR . . . . .	43
9.2.1	Feedback Active MR から得られた電圧信号からの解析原理 . . . . .	44
9.3	ステージフィードバック Passive MR . . . . .	45
<b>10</b>	<b>引っ張り計測</b>	<b>46</b>
<b>III</b>	<b>試料作製と計測手法</b>	<b>47</b>
<b>11</b>	<b>HeLa 生細胞</b>	<b>47</b>
11.1	細胞の培養 . . . . .	47
11.2	測定粒子の導入 . . . . .	47
<b>12</b>	<b>HeLa 細胞抽出液</b>	<b>50</b>
12.1	濃度の決定 . . . . .	51
12.1.1	Bradford Assay . . . . .	51
12.1.2	乾燥重量測定 . . . . .	51
12.2	MR 測定試料の作製 . . . . .	52
<b>13</b>	<b>ルシフェラーゼアッセイによる代謝活性の測定</b>	<b>54</b>
13.1	ルシフェラーゼアッセイの原理 . . . . .	54
13.2	測定方法と測定装置 . . . . .	54

---

13.3	ルシフェラーゼアッセイ測定試料の作製	55
<b>14</b>	<b>吸光度測定</b>	<b>57</b>
14.1	吸光度測定試料の作製	58
<b>IV</b>	<b>結果と考察</b>	<b>60</b>
<b>15</b>	<b>HeLa 生細胞</b>	<b>60</b>
15.1	生細胞のレオロジー測定	60
15.2	引っ張り測定	61
15.3	得られたデータの一般性	62
<b>16</b>	<b>HeLa 細胞抽出液</b>	<b>63</b>
16.1	レオロジー測定	63
16.1.1	抽出液中の揺らぎ	63
16.1.2	ATP が粘弾性に与える影響	67
16.2	ルシフェラーゼアッセイ	71
16.2.1	結果	71
16.3	考察	73
16.4	抽出液の相分離現象	77
16.4.1	顕微鏡観察	78
16.4.2	吸光度測定による濁度の計測	80
16.4.3	高濃度の抽出液のゲル化	83
16.5	考察	86
<b>V</b>	<b>結論と展望</b>	<b>89</b>
<b>17</b>	<b>結論と展望</b>	<b>89</b>
17.1	結論	89
17.2	展望	90
<b>VI</b>	<b>付録</b>	<b>90</b>



# Part I

## 序論

### 1 生体ソフトマター

ソフトマターとは柔らかな物質の総称である。例えばシャンプーやジェルは界面活性剤や高分子からなるソフトマターであるし、ゴムや液晶もソフトマターにあたる。これらを構成している物質は様々であるが、共通しているのは構成単位が  $\text{nm} \sim \mu\text{m}$  と原子や分子に比べて非常に大きいということである。これによりソフトマターは外場に対して非線形的に応答し、平衡状態に戻るために必要な緩和時間が長いという特徴を持つ [1]。

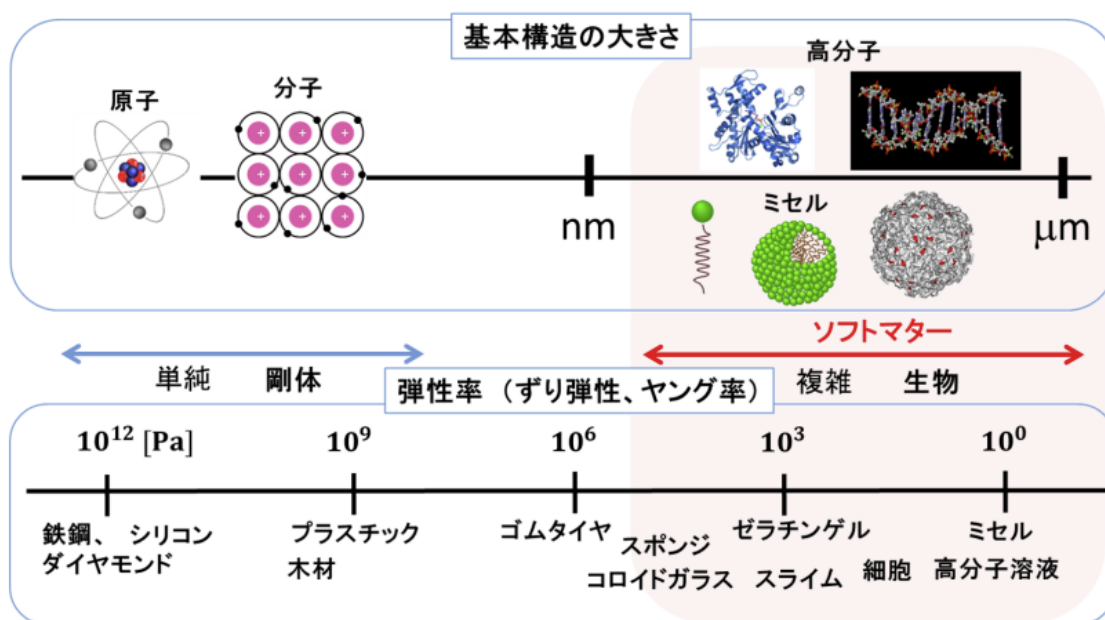


Figure 1: ソフトマターの基本構造の大きさ

生き物は様々なスケールの構造体により形作られているが (図 2)、その中でも基本単位ともいえる数十  $\mu\text{m}$  の大きさを持つ細胞は生体高分子が密に混みあって構成されている生体ソフトマターである。細胞内部では柔らかなモータータンパク質などの様々な生体高分子機械が密に混みあって力を及ぼし合い、相互作用することで生命としての機能を果たしている。

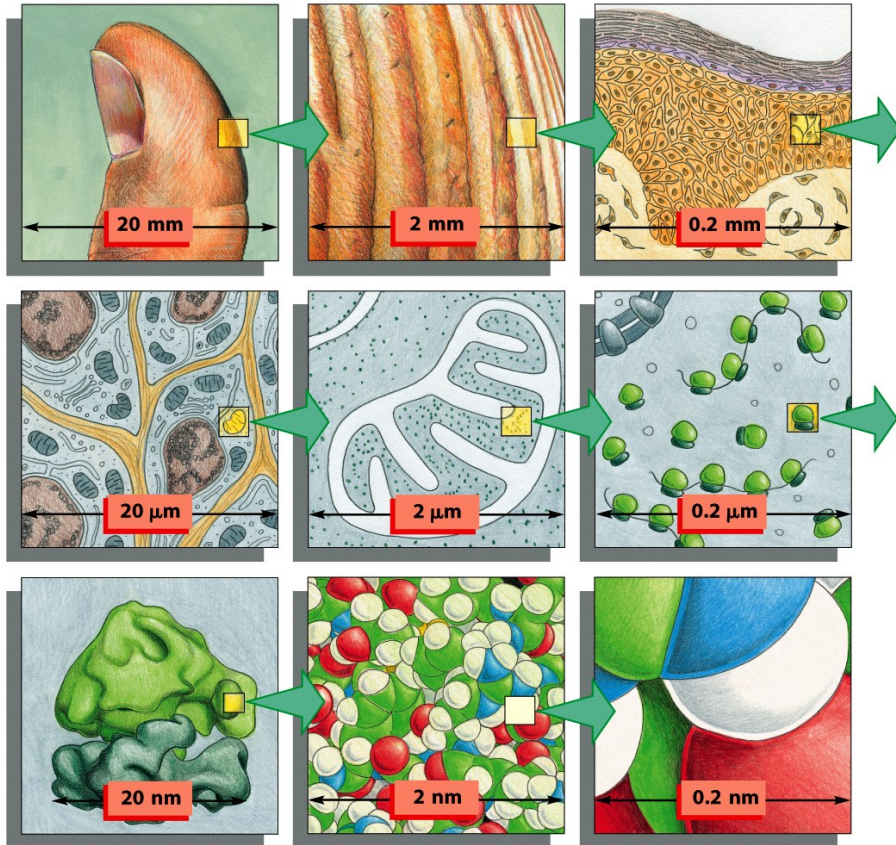


Figure 1-9 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figure 2: 生き物を構成するスケール [2]

## 2 ATP と代謝

### 2.1 代謝

熱力学第二法則より時間経過によって孤立系のエントロピーは増大する。しかし、生細胞はこれに逆らい、あらゆるスケールで秩序を維持している（図3）。これは非平衡開放系である生細胞が外部からエネルギーを取り込み、内部で生体分子の合成・分解といった代謝活動を絶えず行っているからである。代謝活動によって生じた熱エネルギーは細胞の外部に放出され、全体としてエントロピーは増大し熱力学第二法則は満たされている。

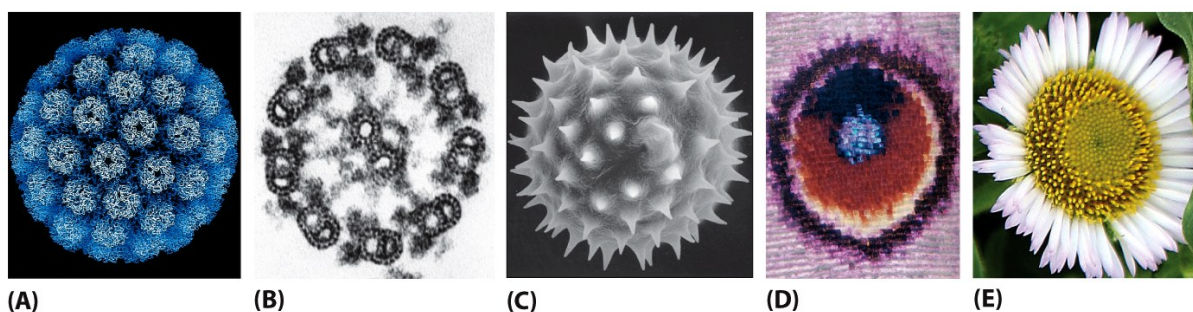


Figure 3-3 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

**Figure 3:** 生物の構造の秩序 (A) ウイルス外被のたんぱく分子 (ウイルスは生物とは言えないが) (B) 精子の尾の断面に見られる微小管 (C) 花粉粒子の表面 (D) チョウの羽の模様 (E) 花の種の渦巻き状の配列 [2]

### 2.2 ATP の働き

上で述べように生細胞はエネルギーを取り込み、代謝活動を行っているが、このエネルギーは消費される直前まで活性運搬体分子と呼ばれる生体分子に化学結合エネルギーとして一次的に貯蔵されている。活性運搬体分子の中でも最も重要で多様な機能を持つのは ATP (アデノシン三リン酸) と呼ばれる小分子である。ATP は (図4) に示すような ADP (アデノシン二リン酸) とリン酸に変化する加水分解の過程でエネルギーを放出する。

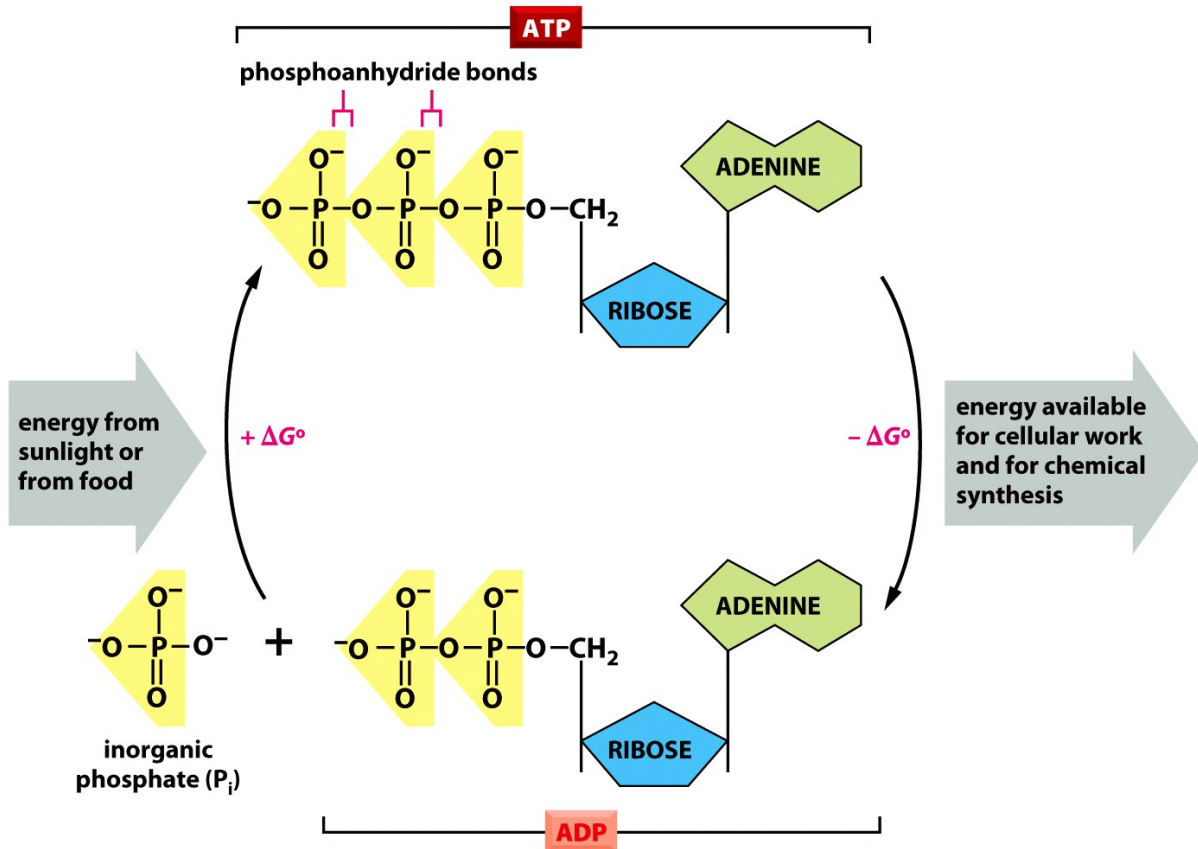


Figure 3-31 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figure 4: ATP は加水分解によりエネルギーを放出する [2]

### 3 細胞骨格

細胞質はただ単に生体高分子が乱雑に混ざりあったスープではなく、細いたんぱく繊維が張り巡らされている。この繊維系を細胞骨格といい、細胞の強度を保ったり、外界との相互作用や細胞全体の動きを決定している。細胞骨格は三種類に分類されており、最も細く多く存在しているアクチンフィラメント、最も太く中空の管である微小管、これらの中間の太さを持つ中間径フィラメントと呼ばれている (図5)。この中でもアクチンフィラメントは他のたんぱく質と相互作用し力生成に寄与する。アクチンフィラメントはミオシンモーターと呼ばれる分子と相互作用する。ミオシンが束化した双極性のミオシンフィラメントがATPの加水分解に伴って、結合と解離を繰り返し、アクチンフィラメント状を歩くように力を加える。この際、図(6)で示すようにミオシンは複数のアクチンフィラメントを引き寄せするように力を加える。これによりアクチンにはアクチン同士が近づくような収縮する力を与えられる。Szent-Gyorgyらによって、生理的イオン環境においてアクトミオシン懸濁液はATPと反応して凝集・沈殿する、超沈殿を起こすことが知られている。

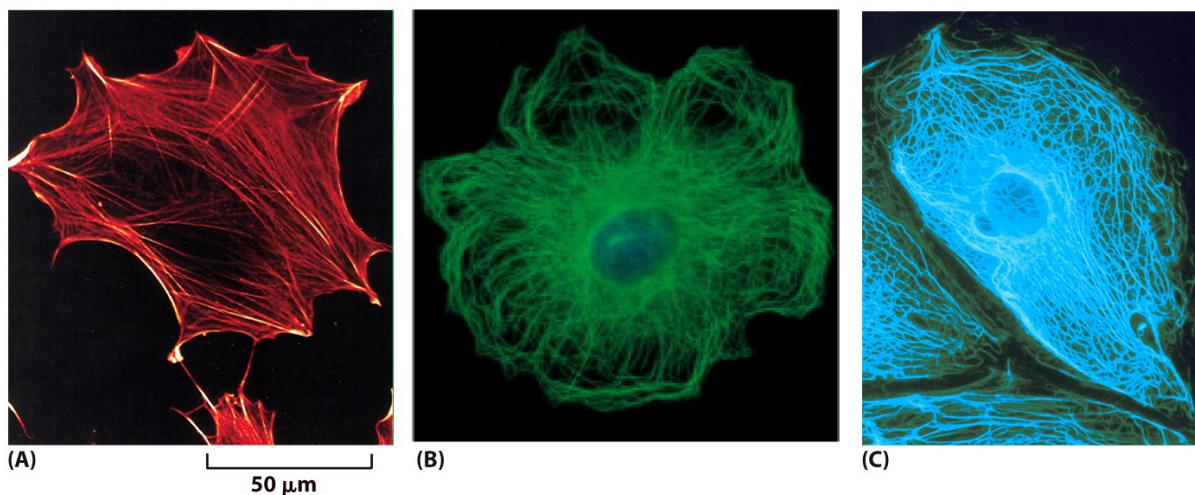


Figure 1-27 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

**Figure 5:** 細胞骨格。(A) アクチンフィラメント, (B) 微小管, (C) 中間径フィラメント [2]

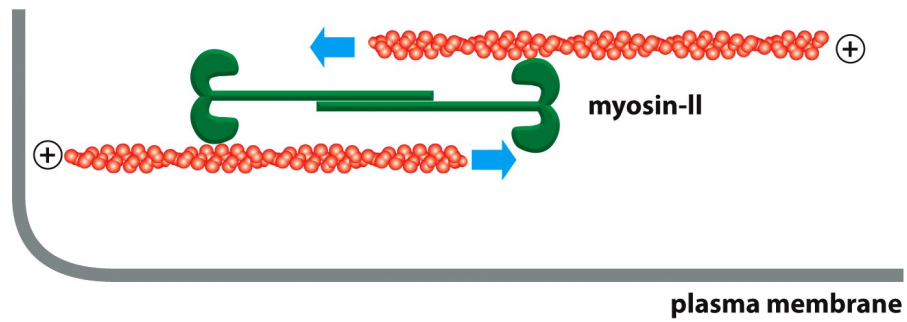


Figure 17-39 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

**Figure 6:** アクチンとミオシン。ミオシンがアクチンに収縮力を与える [2]

## 4 ガラス化

### 4.1 温度依存的ガラス化

単純な粘性液体の物性は粘性率  $\eta$  によって特徴づけられる。一定の温度範囲において  $\eta$  は以下のようなアレニウス則に従う。

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{E}{k_B T}\right) \quad (1)$$

ここで  $E$  は活性化エネルギー、 $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  は絶対温度である。粘性は温度が低くなるにしたがって大きくなることがわかる。しかし、式 (1) は広い範囲では成立しない。特に過冷却液体は一定温度  $T^*$  に近づくとつれて温度依存性が急激に高くなり発散する。この状態の粘性は経験的に成り立つ Vogel-Fulcher 則 (式 2) に従う。

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{AT^*}{T - T^*}\right) \quad (2)$$

ここで  $A$  は定数である。この急激な粘性率の増加はガラス化と呼ばれ、物質の構成物が安定な配置をとり結晶化する前に動力学が凍結され固化することによって起こると考えられる。見かけ上ガラス化がおこる温度をガラス転移点と呼び、便宜上粘性率が  $10^{12}$  [Pa·s] となる温度や緩和時間が一定以上となる温度で定義されている。

実際に液体の温度依存性 (図 7) を見てみると、分子間ネットワークがしっかりと保持されたシリカガラスなどは式 (1) に従っているのに対し、*o*-terphenyl のような相互作用が等方的な分子性液体は超アレニウスの式 (2) に従っている [3][4]。前者のように温度に対して粘性が緩やかに変化する系をストロングガラスと呼び、後者のような急激に粘性が変化する系をフラジャイルガラスと呼ぶ。これらの差異はフラジャイルガラスに分子の個別的な熱運動だけでなく複数分子が関与する協調運動が存在するからであると考えられている。

### 4.2 混みあいによるガラス化

温度だけでなく濃度にも依存してガラス化は引き起こされる。剛体球コロイドのコロイド懸濁液において、体積分率を大きくするにしたがって粘性率が急激に増加・発散しガラス化することが知られている (図 8) [5]。懸濁液中の剛体球コロイドが占める体積分率  $\phi$  が  $\phi < 49.4\%$  においては液体、 $49.4\% < \phi < 58\%$  では過冷却状態、 $58\% < \phi < 64\%$  ではガラス状態、 $64\% < \phi$  で乱雑最密充填となる。

これは体積分率の増加による混みあいによって構造緩和の自由エネルギー障壁が高くな

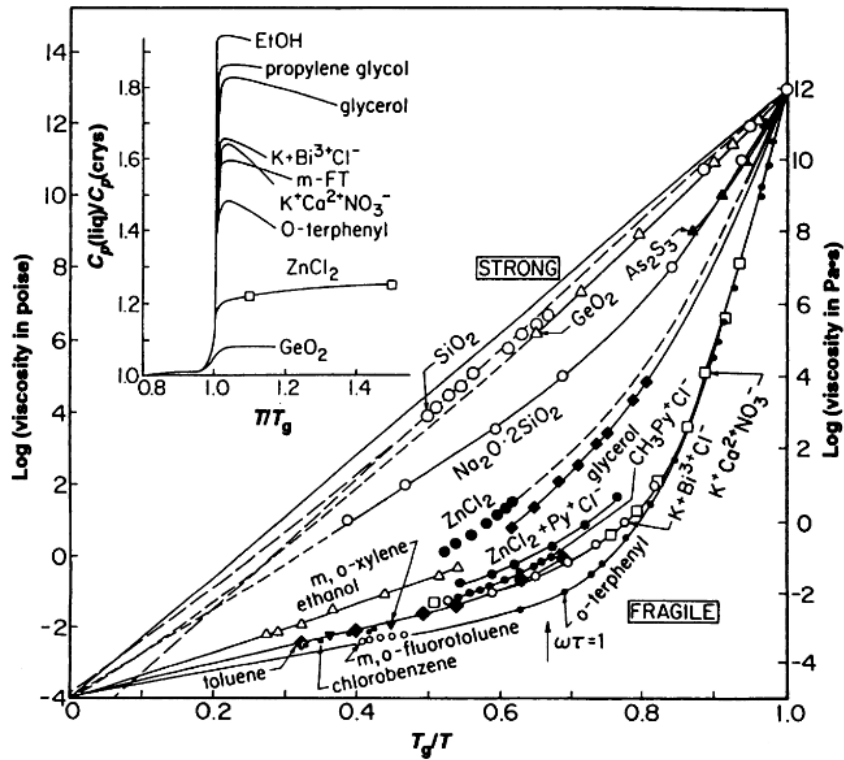


Figure 7: 様々な物質のガラス転移 [3]

り、熱的な揺らぎによって与えられるエネルギーを越えてしまうためである。実際に Gary L Hunter と Eric R Weeks によって剛体球コロイド懸濁液の体積分率と粘性率が測定されており、図 (9) で示されている。横軸は異なるがフラジイルガラスのように超アレニウスの粘性が增加している。実際に温度依存的なガラス化と同様の考察ができ、Vogel-Fulcher 則により

$$\eta = C\eta_0 \exp\left(\frac{D\phi}{\phi_m - \phi}\right) \quad (3)$$

と表せる。図 (9) に式 (3) をあてはめることで  $C=1.20$ 、 $D=1.65$ 、 $\phi_m=0.638$  が得られる。

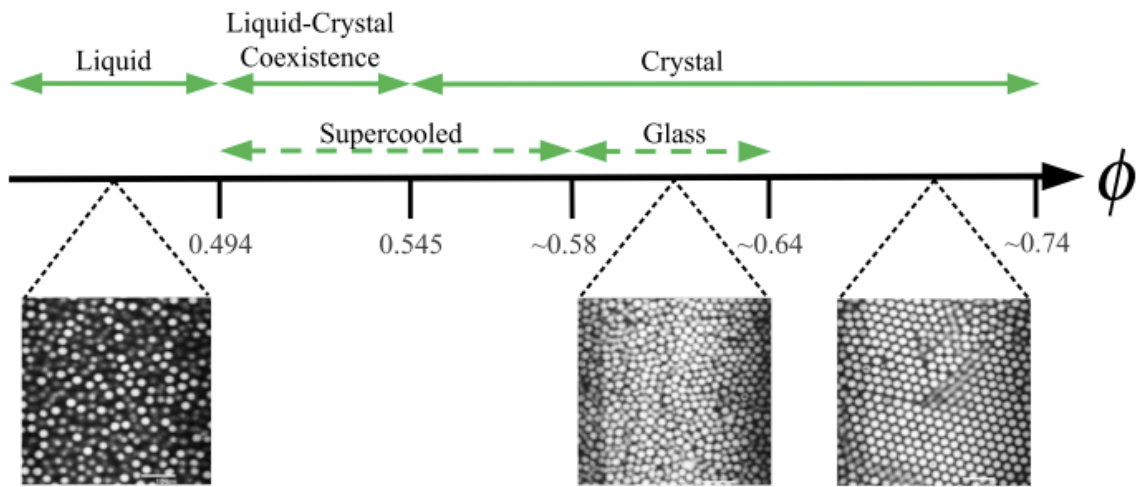


Figure 8: 混みあいによるガラス化

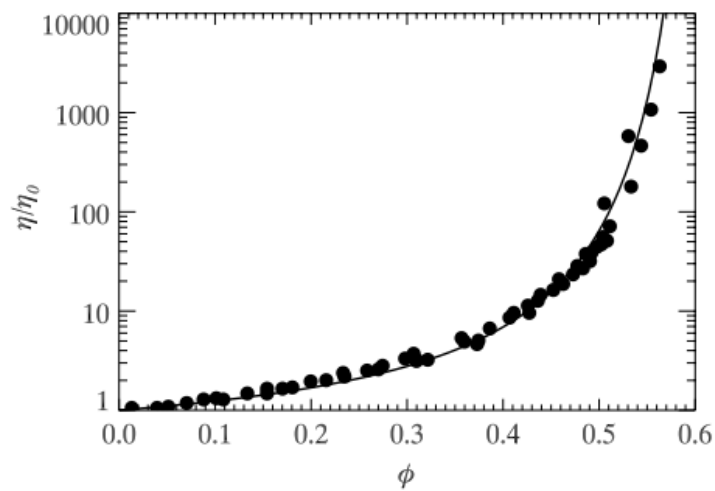


Figure 9: コロイド懸濁液の体積分率に伴うガラス化 [5]

### 4.3 エネルギーランドスケープ描像

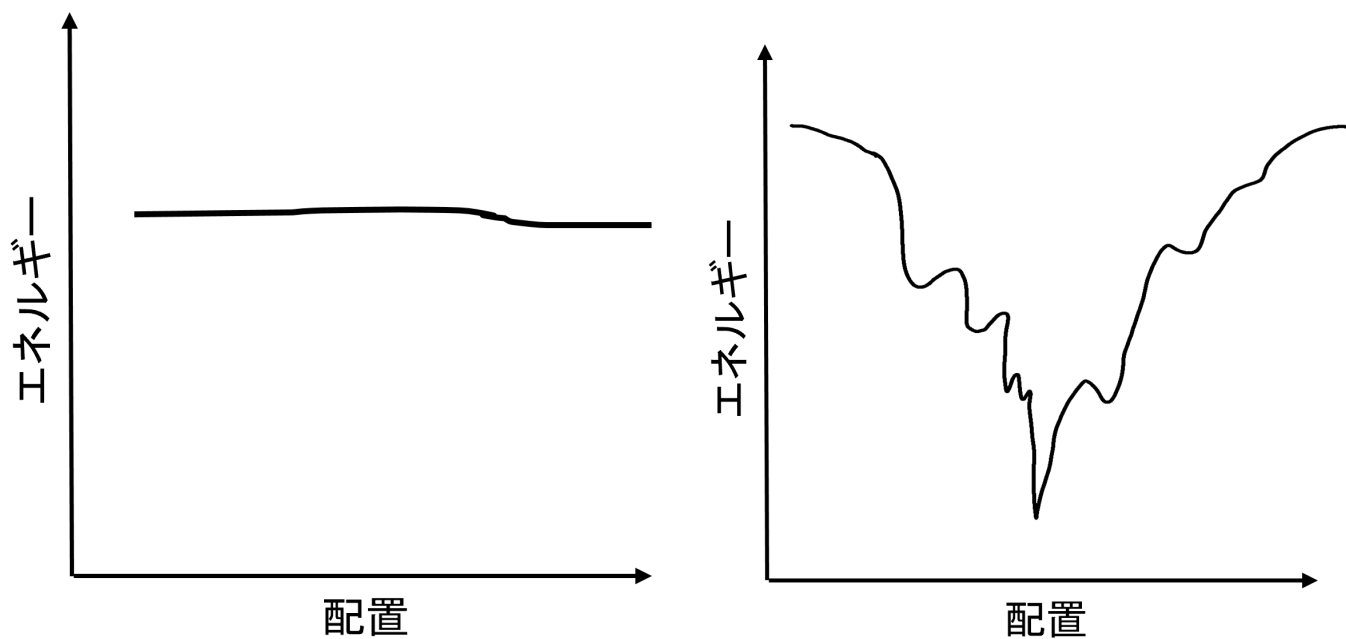
ガラス転移を構造緩和に必要な時間が発散する点と捉える考え方も存在する [6][7]。この考え方を理解するために用いられる自由エネルギーランドスケープ描像が用いられる。ガラスを構成する原子をある配置  $\{R_i\}$  に固定し、その構造のトポロジーを変えない範囲で各原子を変位させたときの、分布関数を以下のように定義する。

$$Z(T, V, N, \{R_i\}) = \int \cdots \int \exp[-\beta\phi(\{r_i\})] \Delta(\{r_i - R_i\}) d\{r_i\} \quad (4)$$

ここで  $\beta = 1/k_B T$  であり、 $\{r_i\}$  は原子の位置ベクトル、 $\phi(\{r_i\})$  は位置エネルギーを表す。また、 $\Delta(\{r_i - R_i\})$  は各原子の積分領域を規定するものである。部分分配関数から自由エネルギーを  $\{R_i\}$  の関数として以下のように求めることができる。

$$F(T, V, N, \{R_i\}) = -k_B T \ln Z(T, V, N, \{R_i\}) + K.E. \quad (5)$$

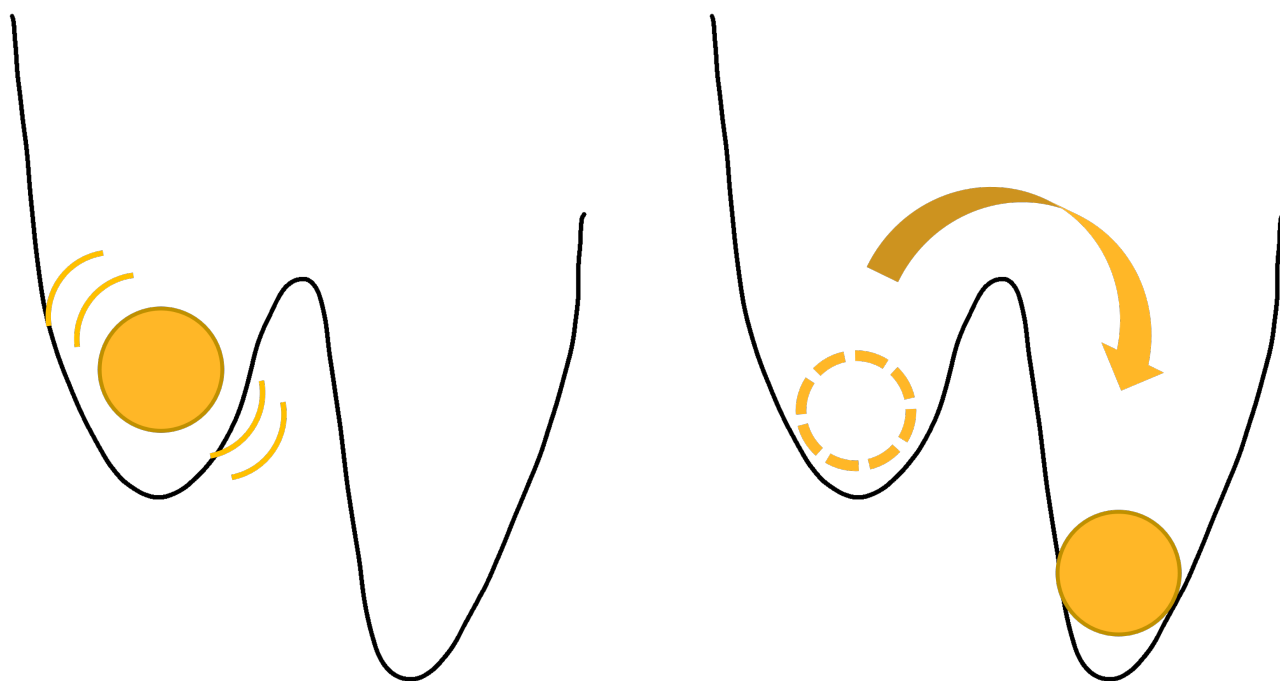
ここで  $K.E.$  は運動エネルギーの寄与を表す。この  $F(T, V, N, \{R_i\})$  が自由エネルギーランドスケープである。自由エネルギーランドスケープは、高温時は平坦であるが、低温になると多くの局所的な最小点（ベイソン）が現れ（図 10）、ガラスの状態がベイソンにとらわれる。ガラスが緩和していく過程はベイソン内の速く小さい緩和（図 11a）と、別のさらに低いベイソンへ移動する遅く大きい緩和（図 11b）に分けられ、温度が下がっていくとベイソンが深くなっていき構造緩和が遅くなっていく。そして遅い緩和に必要な時間が観測時間より十分に長くなる点をガラス転移点とされている [8]。



(a) 高温時の平坦な自由エネルギーランドスケープ

(b) 低温時の多数のベイスンを持つエネルギーランドスケープ

Figure 10



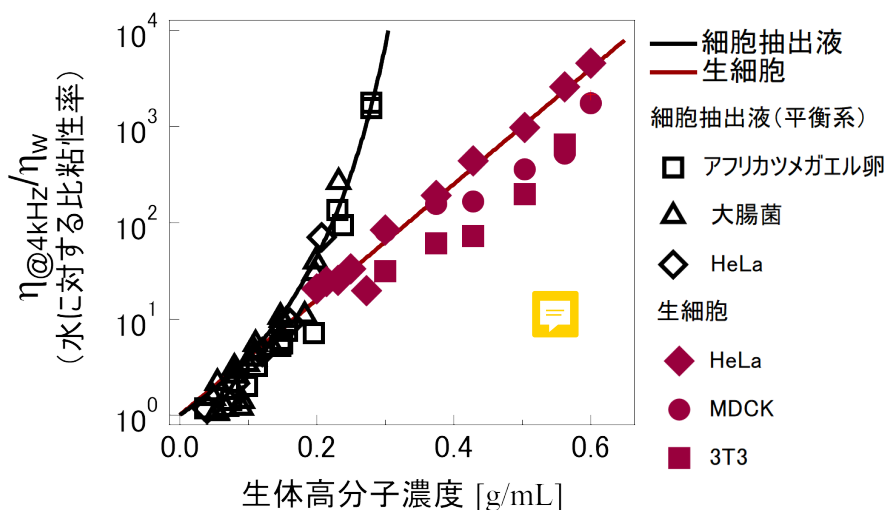
(a) ベイスン内の速く小さな緩和

(b) ベイスン間を飛び越える遅く大きな緩和

Figure 11

## 4.4 細胞質のガラス化

先行研究では、後述するレーザーを用いたマイクロレオロジー計測によって複数種の生細胞と、細胞から抽出し代謝を取り除いた細胞抽出液のレオロジー測定を行っている [9]。図 (12) は試料の 4kHz の揺らぎのパワースペクトルから求めた生体高分子と粘性率との関係を表している (詳しくは付録にて後述する)。生細胞は生体高分子濃度の上昇に伴ってアレニウスの的に粘性率が増加しているのに対し、細胞抽出液は生細胞中の生体高分子濃度 (約 0.3g/ml) に到達する前に、粘性が急激に増加しフラジヤイルガラスのような濃度依存性を見せている。これは生細胞は通常であればガラス化してしまうほどの濃度の中で、代謝活動などの何らかの生体的な作用によって流動性を保っていることを表している。フラジヤイルガラス系は構成要素にアクティブな力を受けると緩和挙動が変化し、ストロングガラス系に転移することが予測されている。図 (13) [10]。生細胞は平衡状態であればフラジヤイルガラス的な性質を持っている細胞質で構成され、生きている状態では生体的な作用によってストロングガラス的に変質しているとも考えられる。



**Figure 12:** 生細胞と抽出液の濃度に対する粘性率。抽出液の粘性が発散していくのに対し、生細胞は流動性を保っている。

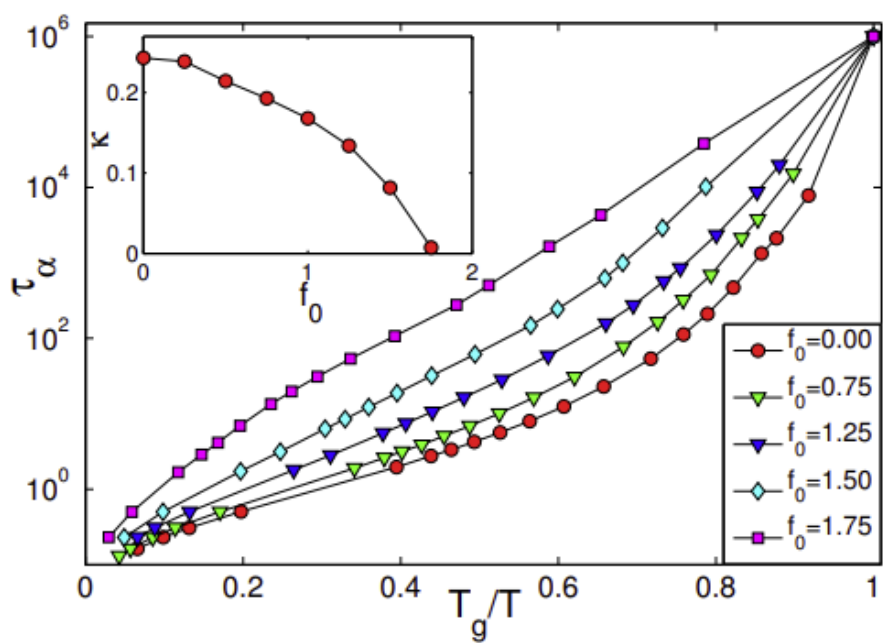


Figure 13: アクティブな力  $f_0$  に依存したフラジイルガラスからストロングガラスへの転移 [10]

## 5 相分離

### 5.1 相分離一般論

溶媒の中に溶質が溶けている溶媒の振る舞いは溶液の自由エネルギーで決まる。温度  $T$ 、圧力  $P$  のもとで  $N_p$  個の溶質分子を  $N_s$  個の溶媒分子の中に溶かした溶液を考える。自由エネルギーは物質の量に比例する変数であるため、この溶液の自由エネルギーは

$$G(N_p, N_s, T, P) = Mg(N_p/N_s, T, P) \quad (6)$$

と書ける。ここで  $M$  は溶液の全質量であり、溶質分子、溶媒分子の質量をそれぞれ  $m_p, m_s$  とすると  $M = m_p N_p + m_s N_s$  と表せる。 $g$  は単位質量あたりの溶液の自由エネルギーである。また、 $N_p/N_s$  は溶質と溶媒のモル混合比であり、溶液の濃度と関係している。濃度は重量濃度や溶質分子の数密度で表すこともできるが、ここでは濃度を表すのに溶質の重量分率を用いる。重量分率  $\phi$  は

$$\phi = \frac{N_p m_p}{M} = \frac{N_p m_p}{N_p m_p + N_s m_s} \quad (7)$$

と定義される。これを用いると式 (6) は

$$G(N_p, N_s, T, P) = Mg(\phi; T, P) \quad (8)$$

と書ける。

質量  $M_1$ 、濃度  $\phi_1$  の溶液と、質量  $M_2$ 、濃度  $\phi_2$  の溶液を混ぜ合わせた溶液があるとする、その質量  $M = M_1 + M_2$  であり、濃度は  $\phi = (M_1 \phi_1 + M_2 \phi_2)/M$  である。一様に混ざりあうためには、混合後の自由エネルギーが混合前の自由エネルギーよりも低くなっていないといけない。つまり

$$M_1 g(\phi_1) + M_2 g(\phi_2) > Mg(\phi) \quad (9)$$

が成り立つはずである。ここでは一定に保たれている変数  $T$  と  $P$  は省略している。溶液を混ぜるときの混合比を  $x = M_1/(M_1 + M_2)$  と定義すれば混合液の濃度は  $\phi = x\phi_1 + (1-x)\phi_2$  であるから式 (9) は

$$xg(\phi_1) + (1-x)g(\phi_2) > g(x\phi_1 + (1-x)\phi_2) \quad (10)$$

と書くことができる。

濃度  $\phi_1$ 、 $\phi_2$  の溶液をどんな混合比で混ぜても一様に混ざりあうとすると、式 (10) は  $0 < x < 1$  の任意の  $x$  で成り立つことになる。これは関数  $g(\phi)$  が図 (14) のように  $\phi_1 < \phi < \phi_2$

で下に凸な関数であることを表す。一方で図 (15) のように関数  $g(\phi)$  が上に凸な部分を持つ場合は混合することでかえって自由エネルギーが増加することとなり、その場合溶液は異なる二つの相に分かれる。これが溶液の相分離である [1]。

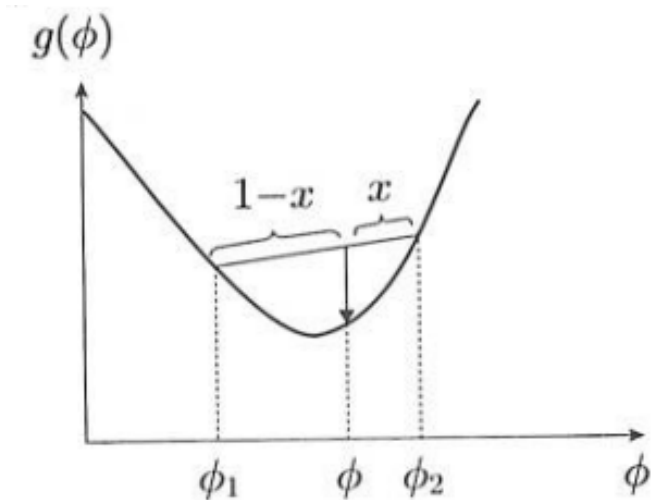


Figure 14: 溶質と溶媒が任意の割合で一様に混ざりあう混合液の自由エネルギー [1]

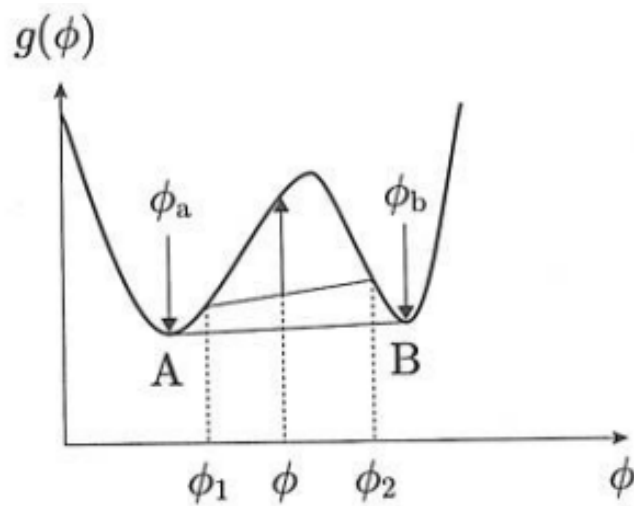


Figure 15: 相分離が生じる混合液の自由エネルギー。溶液は濃度  $\phi_a$  の相と濃度  $\phi_b$  の相に分離する。  
[1]

## 5.2 たんぱく質の相分離

生細胞内ではたんぱく質が密に混みあっており、互いに相互作用を及ぼし合っている。Vekilov らによってたんぱく質が *in vitro* 系において、引力相互作用やたんぱく質濃度に応じて多くの異なる物理的状态で存在できることが示唆された (図 16[11])。引力相互作用が小さく、濃度が低い状態であればたんぱく質溶液は一様な状態を維持できるが、引力相互作用が大きくなると相分離を引き起こし凝集体を形成する。相分離した直後では液体的であるが次第に形状が変化したり緩和時間が長くなっていくたんぱく質凝集体も報告されている [12][13]。また、*in vivo* 系においても生体高分子で構成された境界に膜のない凝集区画が発見され、生化学反応の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。相分離現象の基本的な原理は理論的に明らかにされているが、代謝活動により駆動力が生成されて生細胞内において生じる相分離現象は未だ未解明な部分が多い。

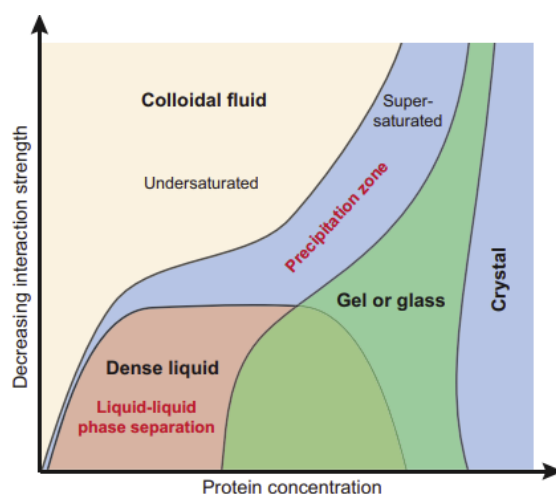
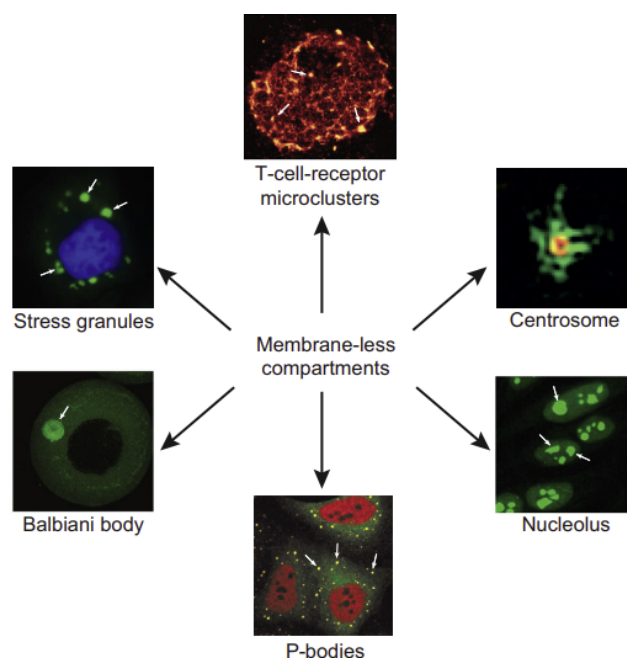


Figure 16: たんぱく質濃度と引力相互作用におけるタンパク質の相図 [11]

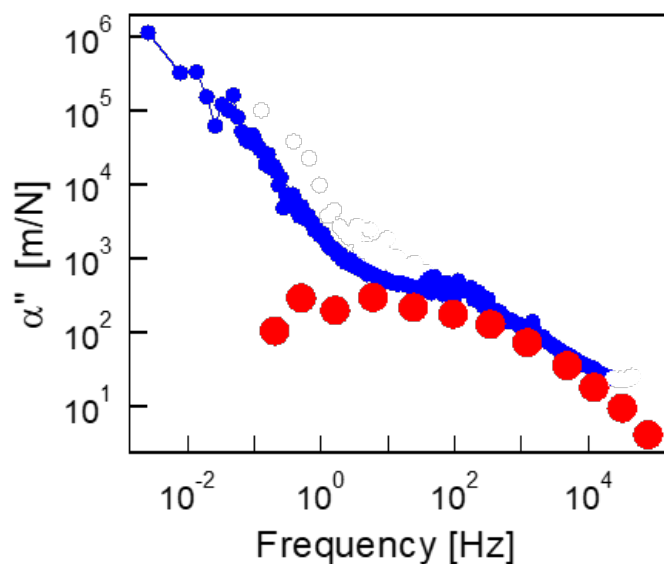


**Figure 17:** 生細胞内の膜のない凝集区画 [11]

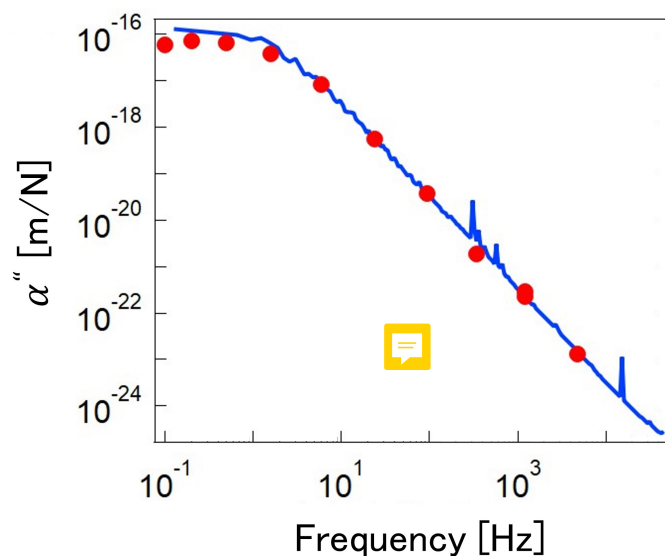
## 6 生細胞の力学特性

### 6.1 非熱的な揺らぎと揺動散逸定理の破れ

生細胞の細胞質は代謝活動に伴って高分子機械に力駆動がなされエネルギーが散逸する過程で非熱的な揺らぎが生み出される非平衡開放系である。この様子は後述するマイクロレオロジー測定で観測される。揺動散逸定理とは平衡系において成り立つ、系の自発的な揺らぎと外部から受けた摂動に対する線形近似できる範囲の応答とが一致することを表す理論である。図(18a)、(18b)は生細胞の細胞質と平衡系に打ち込んだ粒子の揺らぎから求めた応答関数(実線)とその粒子に外場を加えたときの応答(丸印)を表している。これらは平衡系においては図(18b)のように一致する。生細胞のように非平衡な系では、熱的な揺らぎに加えて遅い非熱的な揺らぎが存在するため、低周波において実線と丸印は一致せず、揺動散逸定理が破れている。この揺動散逸定理の破れはその系が非平衡系であることを示す。



(a) 生細胞の応答と揺らぎから求めた応答関数 [14]

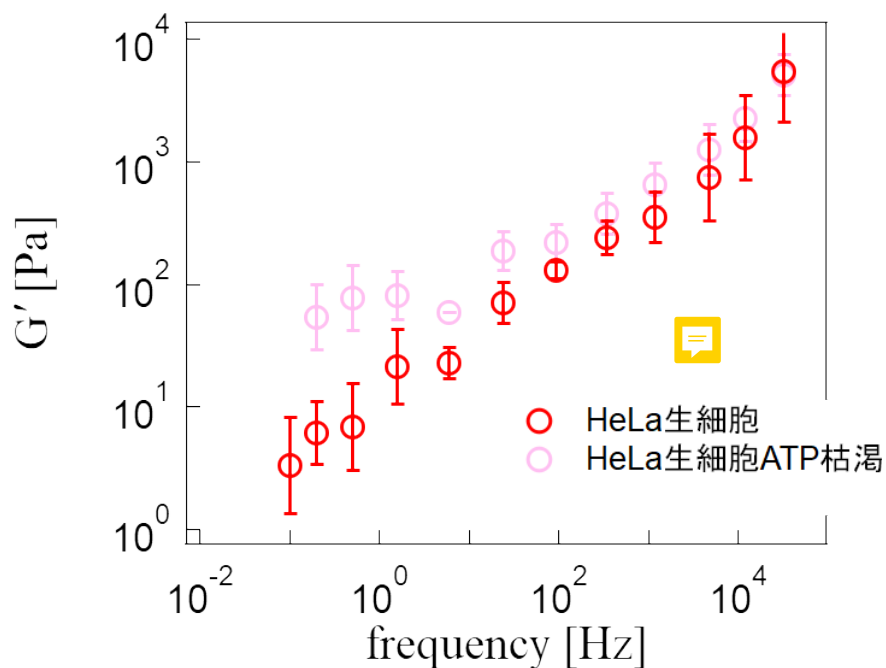


(b) 平衡系(90%グリセロール)の応答と揺らぎから求めた応答関数

**Figure 18:** 実線は試料内の粒子の揺らぎから算出した応答関数であり、丸印は粒子に外場を加えたときの応答を表す。

## 6.2 ATP を枯渇させた生細胞のレオロジー

図 (12)、図 (18a) で示されるように生細胞はエネルギーを消費し、代謝活動を行うことで細胞内に非熱揺らぎを発生させ、細胞質を流動化に寄与していると考えられる。先行研究によってエネルギー源である ATP を枯渇させた生細胞内においてマイクロレオロジー測定を行っており [15]、図 (19) は計測された複素弾性率の実部である。エネルギーが枯渇して代謝が減衰した細胞質は低周波域において弾性プラトーの値が増大している。このことから細胞質において代謝活性はその力学特性に大きな影響を与えている。



**Figure 19:** 生細胞質の貯蔵弾性率。丸印が ATP を枯渇させた生細胞の貯蔵弾性率を表し、実線が通常の生細胞の貯蔵弾性率を表す。

---

### 6.3 本研究の目的と本論文の構成

図(12)で示されたように生細胞と細胞抽出液ではそのレオロジーは大きく異なる。また、同じ生細胞内でもエネルギー源である ATP を枯渇させ、代謝活性を阻害すると、細胞質の流動性は低下する。生細胞の細胞質は本来ガラス化する性質を持ちながら代謝活性による作用によって特有のレオロジーを保っていることが示唆される。しかしながら生細胞内部の化学反応経路は自律的かつ非常に複雑である。例えば、代謝の中心的な位置を占める解糖系ではグルコースから 10 段階の酵素反応を経て ATP を合成する(図 20)。そしてその過程で約 500 もの代謝反応が必要な小分子を送り込んだり、代謝副産物を別物質に変化させたりしている(図 21)。そのような細胞質の内部状態を制御することは困難であり、代謝が細胞質のレオロジーに及ぼす物理的な機構は解明されていない。

そこで本研究では細胞内部の物理環境の単純かつ制御可能なモデル系として細胞抽出液を用い、そのレオロジーと代謝活動との関係を調べることを目指した。抽出液の高分子濃度や ATP 濃度を制御しつつ、マイクロレオロジーによる力学特性の計測や吸光度測定、顕微鏡観察を行い、得られた結果の時間発展の様子から代謝が細胞質に与える影響を考察した。

本論文では第 2 部でマイクロレオロジー測定や吸光度測定を行うための方法論を述べる。第 3 部において各種試料の作製方法について言及する。第 4 部において得られた結果を示し考察を行う。最後に本研究の成果をまとめ展望を述べる。

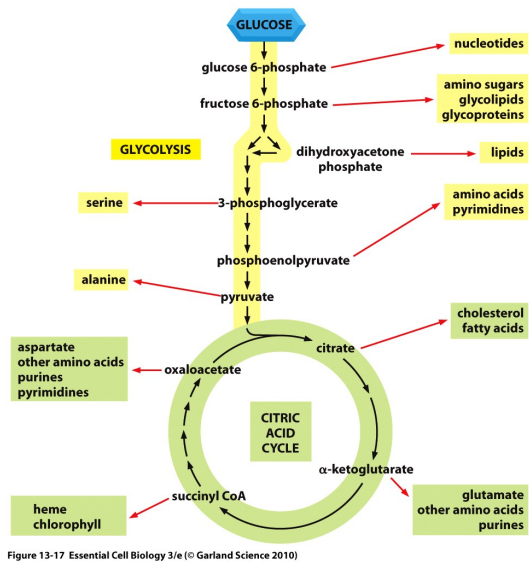


Figure 13-17 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figure 20: 解糖系とクエン酸回路 [2]

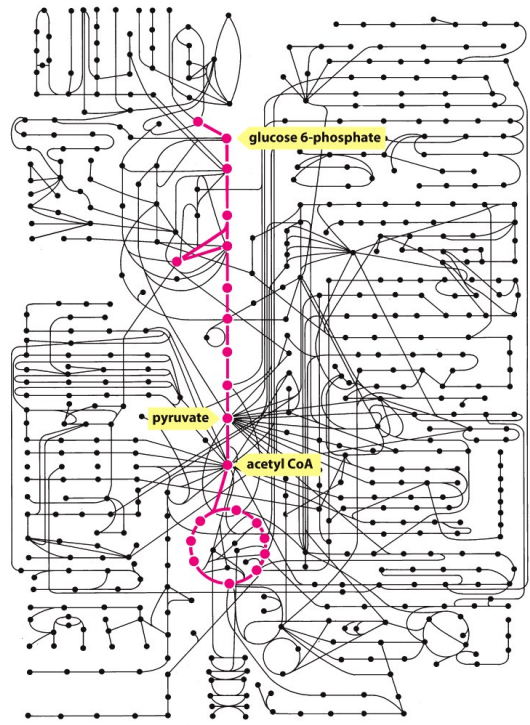


Figure 13-19 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figure 21: 代謝マップ。丸印が代謝経路中の分子、実線が酵素反応を表している。図(20)の反応(赤い実線と丸印)を中心として複雑な反応経路が構築されている。[2]

---

## Part II

# マイクロレオロジー

## 7 レオロジー一般論

レオロジーとは、物質の変形と流動を扱う科学の一分野である。生体を構成する物質や、コロイド懸濁液のようなソフトマターは、ゴムのような単純な弾性体や、水のようなニュートン流体では表せない、複雑な粘弾性を示す。細胞はソフトマターの代表的な例であり、この章では、細胞内部のレオロジーを議論する上で必要な粘弾性基礎論について記す。

### 7.1 理想的弾性率

理想弾性体においては以下のフックの法則が成り立つ。

$$\sigma = G\gamma \quad (11)$$

ここで、 $\sigma$  は外部から印加されたずり応力、 $G$  はずり弾性率、 $\gamma$  はずりひずみである。 $\sigma$  が周期的な動的応力であるとする、複素数を用いて以下のように書ける。

$$\sigma = \sigma_0 e^{i\omega t} \quad (12)$$

これを式 (11) に代入すると、ずりひずみ  $\gamma$  とその速度勾配  $\dot{\gamma}$  は以下ようになる。

$$\gamma = \frac{\sigma_0}{G} e^{i\omega t} \quad (13)$$

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = i\omega \frac{\sigma_0}{G} e^{i\omega t} \quad (14)$$

応力  $\sigma$ 、ひずみ  $\gamma$ 、速度勾配  $\dot{\gamma}$  の位相を比較すると、 $\sigma$  と  $\gamma$  は同位相であり、 $\sigma$  と  $\dot{\gamma}$  は位相が  $\pi/2$  ずれている。これは外力を印加すると直ちに応答を示すことを意味している。

### 7.2 純粘性液体

純粘性体においては、外力の印加に対して以下のニュートン粘性法則が成り立つ。

$$\sigma = \eta \frac{d\gamma}{dt} \quad (15)$$

ここで、 $\eta$ は粘性率である。式(12)を式(15)に代入することで、ひずみ $\gamma$ と速度勾配 $\dot{\gamma}$ がそれぞれ式(16)(17)のように求まる。

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{\sigma_0}{\eta} e^{i\omega t} \quad (16)$$

$$\gamma = -i \frac{\sigma_0}{\eta\omega} e^{i\omega t} \quad (17)$$

この場合は、応力 $\sigma$ と速度勾配 $\dot{\gamma}$ は同位相、 $\sigma$ とひずみ $\gamma$ は位相が $\pi/2$ ずれている。これは周期的な外力を加えると、応答が1/4周期だけ遅れることを意味している。

### 7.3 複素ずり弾性率

力を加えると変形し、取り除くと元に戻る弾性的な振る舞いと、自由に形を変え流れ続ける流体的な振る舞いの両方を兼ね備えている物体のことを粘弾性体という。ソフトマターは粘弾性体である。この粘弾性体の力学特性の記述のために以下の複素ずり弾性率 $G(\omega)$ が用いられる。

$$G(\omega) = \frac{\sigma}{\gamma} \quad (18)$$

$G(\omega)$ は複素数であり、以下のように書き表せる。

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (19)$$

実部の $G'(\omega)$ は貯蔵弾性率、虚部の $G''(\omega)$ は損失弾性率と呼ばれる。貯蔵弾性率は応力に対して直ちに応答する弾性的な性質、損失弾性率は周期的な応力に対して1/4周期遅れて応答する粘性的な性質を示す。

## 8 マイクロレオロジー測定

本研究では、生細胞内部及び細胞抽出液の力学特性を測定する手法として、マイクロレオロジー（以下 MR と表記）法を用いた。MR 法とは、試料に分散させた数ナノから数マイクロメートル程度の微小なプローブ粒子の運動状態を観察することで、系の粘弾性等を求める手法である [16][17]。

本研究での MR 法は大きく分けて「Passive MR」法と「Active MR」法の2つに分けられる。Passive MR とは、計測用プローブ粒子の揺らぎの軌跡から試料媒質内の粘弾性を求める手法である。Active MR とは、プローブ粒子に外力を加え、その応答から試料の粘弾性を求める手法である。

### 8.1 レーザーインターフェロメトリー法

試料中に分散させたプローブ粒子にレンズで集光させたレーザーを照射すると、プローブ粒子と周囲の媒質との屈折率の違いによって、粒子の表面で光が散乱・屈折する。その際、プローブ粒子には光の運動量の変化を補うようにレーザーの集光点に向けてトラップ力が働く。(図 22)。光ピンセットと呼ばれる技術であり、レーザーの集光点を意図的にプローブ粒子の中心から外すと、プローブ粒子に既知の外場を与えることができる。

さらに、プローブ粒子によって散乱・屈折したレーザー光の干渉パターンを QPD (4分割フォトダイオード) を用いて検出する。プローブの運動によって干渉パターンも変化するため、これを検出することで高い時空間能で粒子の変位を得ることができる。QPD が光を受け取ると、これを電圧 (電流) に変換する。すなわち、光軸を基準とした  $x, y$  方向の粒子変位を、電圧 (電流) 信号として計測することができる (図 23)。この方法をレーザーインターフェロメトリー法という [18][19][20][21][22]。

QPD は 4 つのフォトダイオードという受光面に受けた光量に比例して電流を出力する素子が図 (24) のような配置となるように設置されている。それぞれのフォトダイオードを A, B, C, D とすると、これらにレーザーが当てると 4 つのフォトダイオードからそれぞれ電流  $I_A, I_B, I_C, I_D$  が出力される。図 24 のように  $x, y$  方向をとったとして、 $x$  方向で検出される電気信号  $I_x$  を考える。 $I_+ \equiv I_A + I_B$ 、 $I_- \equiv I_C + I_D$  とすると  $I_x$  は

$$I_x = \frac{I_+ - I_-}{I_+ + I_-} \quad (20)$$

と計算できる。

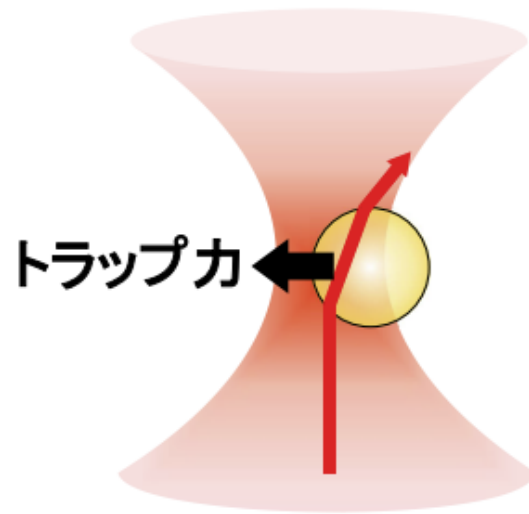


Figure 22: 光ピンセットによる粒子のトラップ

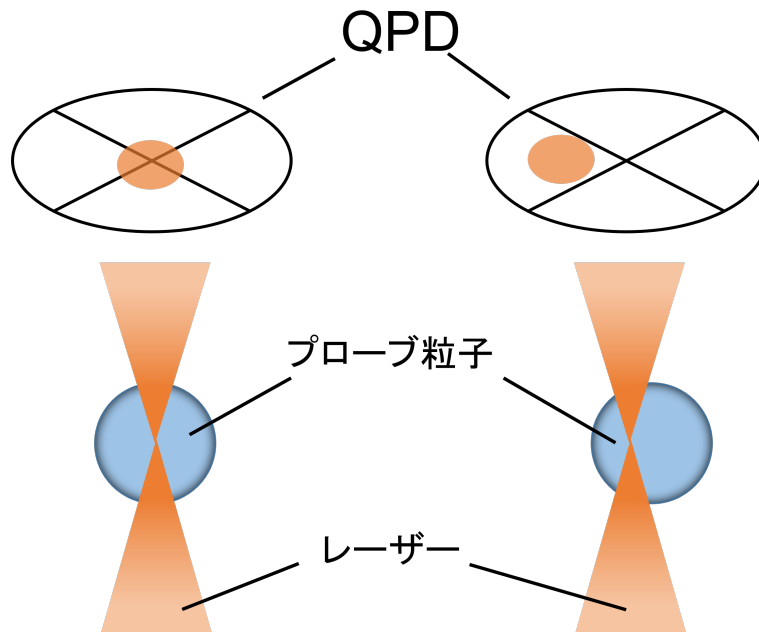


Figure 23: レーザーインターフェロメトリー法のイメージ図。粒子が動くと QPD 上の干渉パターンが変化する。

$I_y$  についても同様に考えられる。このとき、 $I_x$  は粒子変位に伴って図 25 のように変化する。今回は QPD によるレーザー光の検出を電流表記で議論したが、実際には電圧信号を検出した。後述するが、計測した電圧信号にキャリブレーションファクター  $C$  [m/V] を掛けることでプローブ粒子の変位を得る。そのため粒子変位と QPD の出力が線形関係にある必要があり、これは図 (25) で示されるように QPD の中心付近にレーザーが照射されたときのみ成立する。本論文のマイクロレオロジー測定は後述するフィードバック機構を用いながらこの線形範囲で測定されたものである。

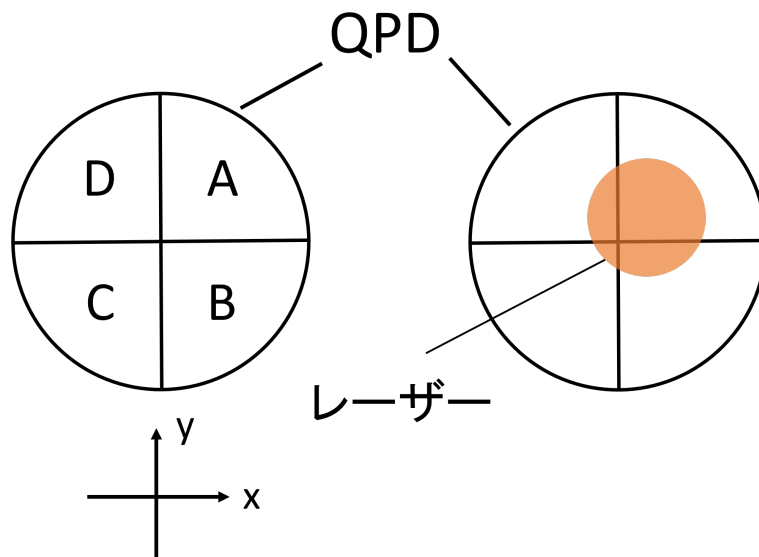


Figure 24: QPD の模式図

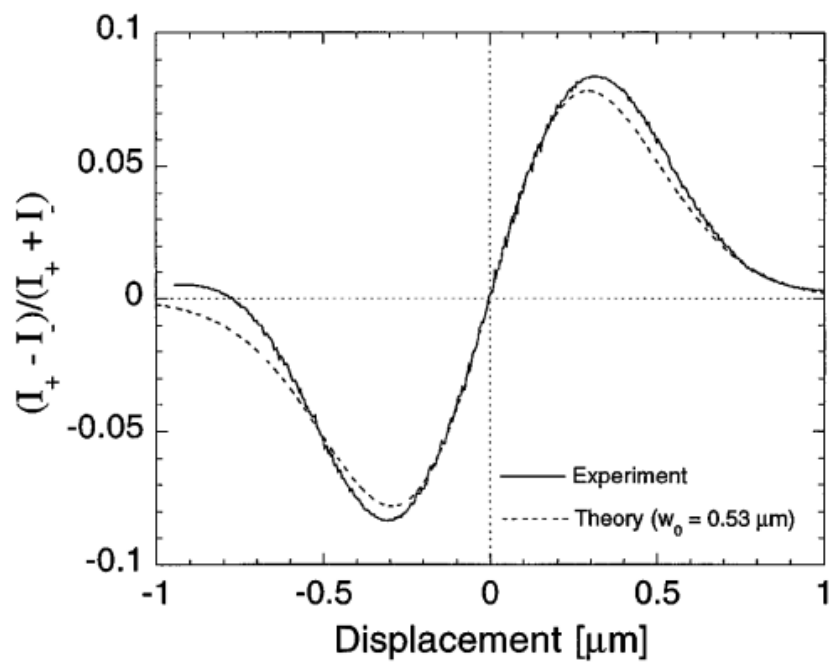


Figure 25: QPD から出力される  $I_x$  の変位 [24]

## 8.2 Active MR

Active MR (AMR) とは、媒質中の計測用粒子に外場を加えた際の応答から、周囲媒質の粘弾性を求める手法である [23]。図 (26) に測定装置の概略図を示す。AMR では粒子の位置を検出するための波長が 830 nm の観測用レーザーに加えて、1064 nm の駆動用レーザーを用いて粒子に外力を印加した。駆動用レーザーは IntraAction 社製の AOD (Acousto-Optic Deflector: 音響光学回折器) より、進行角度を変化させることで、試料面における集光位置を動かすことができる。実験を行う際、はじめに 2 本のレーザーの集光位置をオーバーラップさせておく。その状態で粒子をトラップし、駆動用レーザーを正弦波で駆動させて、その時の粒子の変位と位相遅れをロックイン検出器で検出した。複数の周波数の正弦波でレーザーを駆動させて測定することで、粒子の運動の周波数依存性を測定した。2 本のレーザーはダイクロイックミラーで分けられ、それぞれの QPD に投影された回折像が検出される。

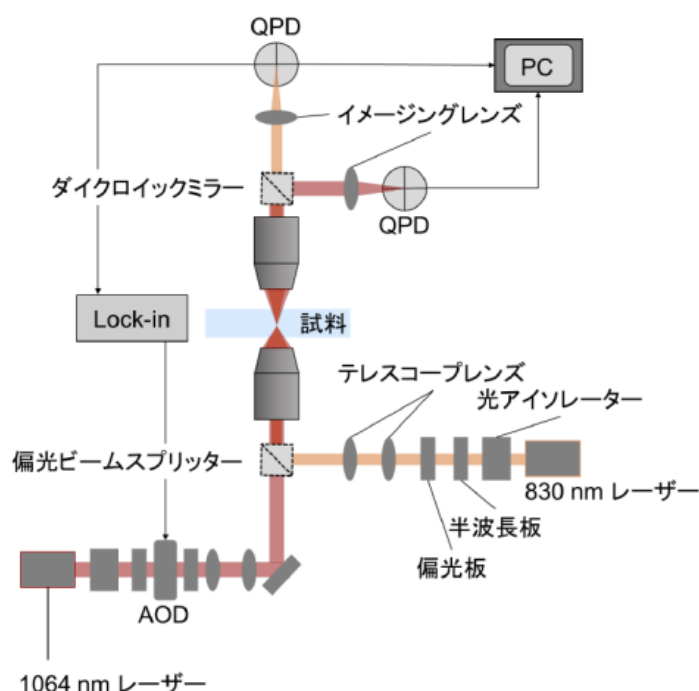


Figure 26: 計測装置の概略図

Active MR 測定によって得られる情報を述べる。周波数  $f = \omega/2\pi$  の外力  $F(t)$  を受けるプローブ粒子の運動は Langevin 方程式によって以下のように表せる。

$$k_p u(t) + \int_{-\infty}^t \gamma(t-t') \dot{u}(t') dt' = k_d (Le^{-i\omega t} - u(t)) + \zeta(t) \quad (21)$$

ここで、プローブ粒子の質量は十分小さく無視できるものとして慣性項は省略している。 $k_d$ 、 $k_p$  はそれぞれ駆動用レーザー、観測用レーザーのトラップ力を表し、 $\gamma(t)$  は周辺媒質とプローブ粒子間の摩擦係数、 $L$  は駆動用レーザーの振幅、 $\zeta$  は熱的な揺動力を表す。また、正弦的外力  $F(t)$  は  $F(t) = k_d L e^{-i\omega t}$  である。図 27 に観測用レーザーに対する粒子の変位  $u(t)$  と観測用レーザーに対する駆動用レーザーの変位  $L e^{-i\omega t}$  の概略図を示す。

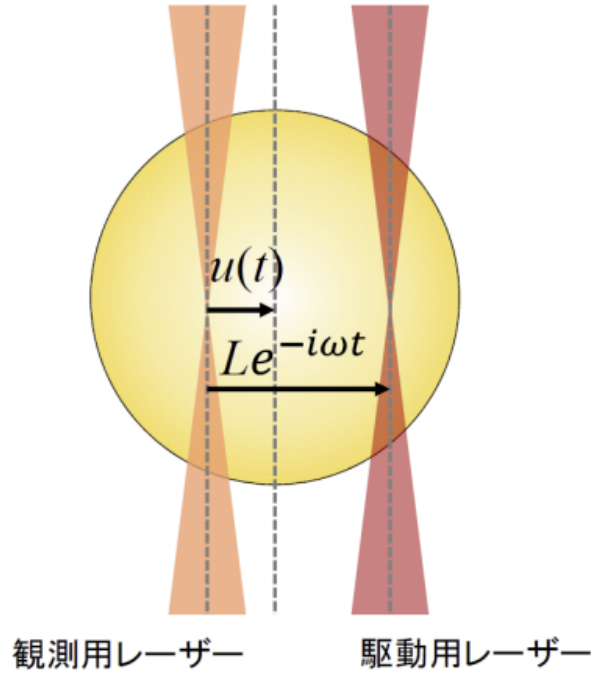


Figure 27: AMR におけるプローブ粒子とレーザーの関係

ここで、プローブ粒子が駆動用レーザーから駆動され、正弦運動をしていると仮定すると正弦的外力  $F(t)$  および  $u(t)$  は

$$F(t) = \hat{F}(\omega) e^{-i\omega t} \quad (22)$$

$$u(t) = \hat{u}(\omega) e^{-i\omega t} = k_d L e^{-i\omega t} \quad (23)$$

と表せる。さらにいま、次のように応答関数  $A(t)$  を定義する。

$$u(t) = \int_{-\infty}^t A(t-t') F(t') dt' \quad (24)$$

$u(t)$  および  $F(t)$  が式 22、式 23 のように書けるとき、式 24 は

$$\hat{u}(\omega) e^{-i\omega t} = \int_{-\infty}^t A(t-t') \hat{F}(\omega) e^{-i\omega t} dt' \quad (25)$$

となる。両辺に  $e^{i\omega t}$  をかけると

$$\hat{u}(\omega) = \int_{-\infty}^t A(t-t') \hat{F}(\omega) e^{-i\omega(t-t')} dt' \quad (26)$$

$$= \hat{F}(\omega) \int_{-\infty}^0 A(t-t') e^{-i\omega(t-t')} d(t-t') \quad (27)$$

$$= \hat{F}(\omega) A(\omega) \quad (28)$$

となる。 $A(t)$  をフーリエ変換した関数を簡便化するために  $A(\omega)$  と書いた。式 (24) と式 (28) はフーリエ変換の関係にある。

次に、Langevin 方程式 (21) に従う系の応答関数  $A^*(t)$  を求める。式 (21) に式 (22)、(23) を代入して両辺に  $e^{i\omega t}$  をかけると次のようになる。

$$k_t \hat{u}(\omega) = \hat{F}(\omega) + i\omega \hat{u}(\omega) \tilde{\gamma}(\omega) \quad (29)$$

ここで、 $k_t \equiv k_p + k_d$  とし、 $\tilde{\gamma}(\omega)$  は  $\gamma(t)$  をフーリエ変換したものである。 $\hat{u}(t)$  についてまとめると、

$$\hat{u}(\omega) = \frac{\hat{F}(\omega)}{k_t - i\omega \tilde{\gamma}(\omega)} = A^*(\omega) \hat{F}(\omega) \quad (30)$$

となる。したがって、Langevin 方程式に従う系の応答関数  $A^*(t)$  は、

$$A^*(\omega) = \frac{1}{k_t - i\omega \tilde{\gamma}(\omega)} \quad (31)$$

と書ける。

さらに、プローブ粒子が受けるトラップ力の作用を取り除いた、試料本来の真の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  は式 (31) について、 $k_t = 0$  とした関数  $\alpha^*(\omega) = 1/(-i\omega \tilde{\gamma})$  である。これを式 (31) に代入して、

$$\alpha^*(\omega) = \frac{A^*(\omega)}{1 - k_t A^*(\omega)} \quad (32)$$

を得ることができる。

最後に、一般化された Stokes の関係式 [18][19] を用い、真の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  から複素ずり弾性率を求めて、

$$G^*(\omega) = \frac{1}{6\pi a \alpha^*(\omega)} \quad (33)$$

を得ることができる。ここで  $a$  はプローブ粒子の半径である。 $G^*(\omega)$  の実部は弾性、虚部は粘性の大きさを表し、それぞれ貯蔵弾性率、損失弾性率と呼ばれる。

### 8.3 Passive MR

Passive MR (PMR) とは、媒質中に分散させた計測用コロイド粒子がブラウン運動する揺らぎを計測して周囲の媒質の粘弾性を求める方法である [19][25][26]。プローブ粒子を1本の波長 830 nm の観測用レーザーでトラップし、プローブ粒子で散乱・屈折したレーザーを QPD で検出する。図 (26) の 830 nm レーザーの光路のみを Passive MR では使用する。

まず、QPD から得られたプローブ粒子の変位を高速フーリエ変換することでパワースペクトル密度 (PSD) を計算する。

$$\langle |\tilde{u}(\omega)^2| \rangle^{\text{trap}} = \int_{-\infty}^{\infty} \langle u(t)u(0) \rangle e^{i\omega t} dt \quad (34)$$

添え時の trap はトラップ力を受けた状態を表す。図 (28) にプローブ粒子とレーザーの概略図を示す。

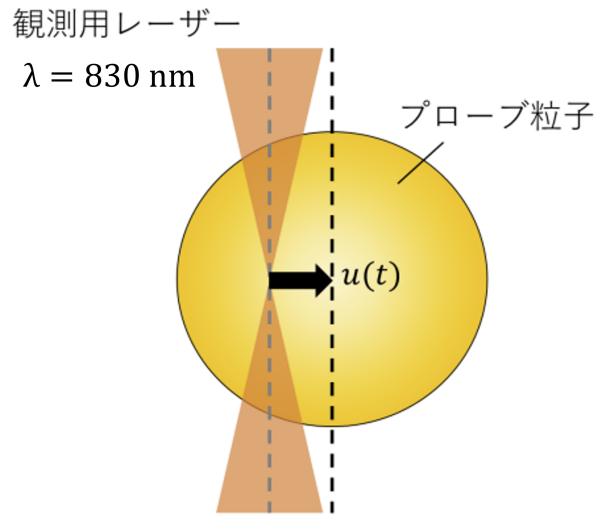


Figure 28: PMR で得られる変位

次に、パワースペクトル密度  $\langle |\tilde{u}(\omega)^2| \rangle^{\text{trap}}$  から第1種揺動散逸定理を用いることで、レーザートラップの影響があるときの応答関数  $A(\omega)$  の虚部  $A''(\omega)$  を求めた。

$$A''(\omega) = \frac{\omega}{2k_B T} \langle |\tilde{u}(\omega)^2| \rangle^{\text{trap}} \quad (35)$$

揺動散逸定理は平衡状態のみで成立するため、式 (35) は非平衡系では使用できない。応答関数の実部  $A'(\omega)$  は、Kramers-Kronig の関係式 [20][27] を用いて以下のように求まる。

$$A'(\omega) = \frac{2}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\zeta A''(\zeta)}{\zeta^2 - \omega^2} d\zeta \quad (36)$$

ここで  $P$  は主値積分であることを示している。こうして求められた複素数  $A^*(\omega)$  から、レーザートラップの影響を式 (32) により補正することで、試料本来の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  が求まる。

最後に、試料本来の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  から一般化された Stokes の関係式を用いて複素数弾性率  $G^*(\omega)$  を求めた。

$$G^*(\omega) = \frac{1}{6\pi a \alpha^*(\omega)} \quad (37)$$

ここで  $a$  は粒子半径である。

## 8.4 キャリブレーション

Passive/Active MR ともに、レーザーインターフェロメトリー法による計測信号を解析する際、4分割フォトダイオードの出力  $V(t)$  [V] と粒子の変位  $u(t)$  [m] の間のスケール変数  $C$  [m/V] とレーザーのトラップ強度  $k$  [N/m] の値を求める必要がある。

### 8.4.1 スケール変数 $C$

#### 屈折率が既知かつ力学的に平衡な試料の場合

水の中でブラウン運動する光トラップされたプローブ粒子のパワースペクトル密度  $\langle |\tilde{u}(\omega)^2| \rangle^{\text{trap}}$  は以下の Lorentian の式でフィッティングできる [28]。

$$\langle |\tilde{u}(\omega)^2| \rangle^{\text{trap}} = \frac{2k_B T}{\gamma(\omega_c^2 + \omega^2)} \quad (38)$$

ここで  $\omega_c = k/\gamma$  は Lorentzian のコーナー周波数と呼ばれ、 $\gamma$  は Stokes の関係式  $\gamma = 6\pi\eta a$  の式から得られる摩擦係数である。また、 $\eta$  [Pa·s] は試料の粘性率である。 $a$  は計測用粒子の半径である。よって水の中でブラウン運動する光トラップされたプローブ粒子の変位  $u(t)$  を PMR によって計測し、その際の粒子半径  $a$  と室温が分かっていると、水の粘性率  $\eta$  [Pa·s] は既知であるため、パワースペクトル密度  $\langle |\tilde{u}(\omega)^2| \rangle^{\text{trap}}$  を式 (38) でフィッティングすることにより  $C$  [m/V] と  $k$  [N/m] が求まる。

#### 屈折率が未知かつかたい試料の場合

レーザー光は、プローブ粒子と試料に屈折率差があることにより回折される。すなわち、レーザー光の回折強度は試料の屈折率に影響され、これを4分割フォトダイオードで検出する際の感度、 $C$  [m/V] の値も、試料の屈折率に影響される。試料の屈折率が水より大き

---

い試料では、水の中でブラウン運動するプローブ粒子のパワースペクトル密度を計測して  $C$  [m/V] を見積もる手法を用いることが出来ないため。そのため、測定したい試料の中で直接  $C$  [m/V] を見積もる手法を用いた。

まず、レーザーの集光位置とプローブ粒子の中心を一致させる。このとき、レーザーのトラップ強度を十分小さくし、Piezo ステージを正弦駆動させると、プローブ粒子は Piezo ステージとともに正弦駆動される。この状態で4分割フォトダイオードの出力電圧を測定するとともに、カメラで粒子の軌跡を撮影する。4分割フォトダイオードの出力電圧  $V(t)$  [V] と画像から得られる粒子の変位  $u(t)$  [m] から  $C$  [m/V] を見積もった。生細胞や細胞抽出液のマイクロレオロジー測定ではこの方法でスケーリング変数  $C$  [m/V] を得た。

#### 8.4.2 トラップ強度 $k$

##### 生細胞内部

屈折率が既知かつ力学的平衡の試料の場合はスケーリング変数  $C$  [m/V] と同様に PMR を行うことでトラップ強度  $k$  [N/m] を見積もることができる。

一方で、力学的に非平衡な試料や、非常にかたい試料に対してトラップ強度  $k$  [N/m] を直接見積もることは難しい。そこで、レーザー光強度を変えなければ、異なる屈折率の試料間でもスケーリング変数  $C$  [m/V] とトラップ強度  $k$  [N/m] の積は一定であることから [29]、スケーリング変数  $C$  [m/V] とトラップ強度  $k$  [N/m] を見積もる。まず、小節 8.4.1 の手法で試料中の  $C$  [m/V] を求める。次に粘性率が既知の平衡試料を用いて Passive MR 計測を行い、パワースペクトル密度  $\langle |\tilde{u}(\omega)|^2 \rangle^{\text{trap}}$  を式 38 でフィッティングすることで  $C_{\text{eq}}$  [m/V] と  $k_{\text{eq}}$  [N/m] を求める。これらを用いて、試料におけるトラップ強度  $k$  [N/m] は

$$k = \frac{k_{\text{eq}} C_{\text{eq}}}{C} \quad (39)$$

として見積もることができる。ただし、この方法で求めたトラップ強度は高い精度で算出できないことに注意が必要である。

## 9 ステージフィードバックマイクロレオロジー

### 9.1 ステージフィードバック MR

小節 8.1 で述べたように、レーザーインターフェロメトリー法を用いたマイクロレオロジー測定は、プローブ粒子によって散乱・屈折されたレーザー光が QPD の中心付近に当たらなければ正確な測定は行えない。細胞内部のように大きな揺らぎや流動が起きている場合、レーザーのトラップ力が弱いとプローブ粒子がレーザーのトラップ域から外れてしまう。そのため、プローブ粒子を安定してトラップしておくためには、レーザーのトラップ力を十分大きくしておく必要がある。しかし、トラップ力が大きすぎると粒子本来の揺らぎを阻害してしまったり、試料の状態に影響を与えたりする可能性があり、試料本来の応答を正確に計測することができない。そこで、フィードバック制御を用いる。これにより細胞などの非熱的な揺らぎが大きな試料の応答を計測することができる。本研究では、Piezo ステージの  $x$ 、 $y$  方向、Piezo ステージの  $z$  方向の位置をフィードバック制御し、MR 計測を行った。Piezo ステージをフィードバック制御し、MR 計測を行う手法を示す [14]。Stage Feedback MR では、揺らぐプローブ粒子の変位を QPD で観測し、瞬時にその変位を打ち消す方向にステージを動かす操作を行う。こうすることで、レーザーのトラップ力が弱い場合でも、常に粒子がレーザーの集光域に留まり続け、安定して粒子の運動を観測することができる。Stage Feedback MR の装置の概略図を図 (29) に示す。

#### 9.1.1 Piezo ステージ: $x$ 、 $y$ 方向

Stage Feedback MR では、電圧で位置を制御できる Piezo ステージの  $x$ 、 $y$  をそれぞれ制御して計測を行う。Piezo ステージのフィードバック制御には PID コントローラー (スタンフォードリサーチシステムズ社, SIM960) を使用している。試料に応じて Feedback の応答速度を変えることができ、様々な状況に対応できる。レーザー光の集光位置に計測用粒子がある状態で 4 分割フォトダイオードの出力電圧を PID コントローラーの measure input に入れ、PID コントローラーの output を Piezo ステージ (MAD CITY LABS 社, Nano-LP200) に入れている。これにより、ゆっくりとした大きな計測用粒子の揺らぎには Piezo ステージが応答し、粒子が常にレーザーの焦点にある状態となる。

一般に、PID コントローラーの応答は以下のように書ける。

$$\epsilon(t) = P(V - s) + I \int (V - s)dt + D \frac{d}{dt}(V - s) \quad (40)$$

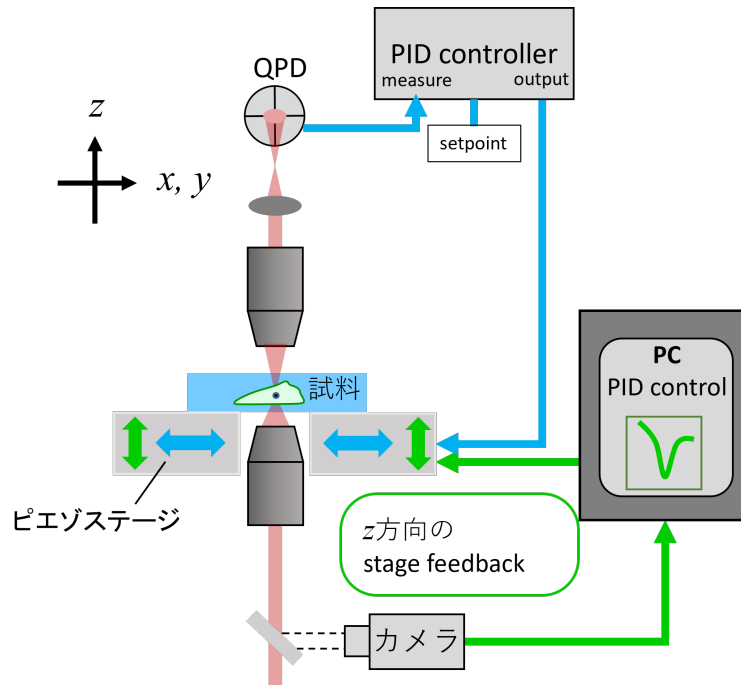


Figure 29: Stage Feedback MR の概略図

ここで、 $\epsilon(t)$  は PID コントローラーの出力電圧、 $V$  は PID コントローラーの入力電圧、 $s$  は PID コントローラーの setpoint である。本研究では、 $P = D = 0$  として  $I$  の値を変えることでフィードバック制御を行っている。4 分割フォトダイオードで検出した粒子の変位  $u_{\text{QPD}}$  と Piezo ステージの制御電圧として得られるステージの変位  $u_{\text{stage}}$  をともに測定しておくことで、プローブ粒子の試料に対する変位を

$$u = u_{\text{QPD}} + u_{\text{stage}} \quad (41)$$

として得た。PID コントローラーを 2 台用いることで  $x$  軸、 $y$  軸の 2 次元でフィードバック制御が可能となっている。

### 9.1.2 Piezo ステージ: $z$ 方向

小節 8.1 で述べたように、粒子と媒質間でレーザーが線形に回折することにより、レーザーインターフェロメトリー法では粒子変位を検出できる。この回折が強いほど、微小な変位も検出できるため、回折感度は非常に重要な要素となる。先行研究によれば、回折感度は高さ依存性を持つことが実験面と理論面双方で調べられている [30]。そのため  $z$  方向のステージフィードバックも非常に大切である。

Piezo ステージ  $z$  軸方向の PID 制御は、カメラで撮影した粒子の輝度分布を用いて行った。

レーザー光の集光面からの粒子のずれは、CCD カメラから得られる粒子の画像の濃淡から解析できる。プローブ粒子の顕微鏡画像を Naional Instruments 社のイメージキャプチャボード (IMAQ PCI-1408) に取り込み、Naional Instruments 社のソフトウェア (LabVIEW 8.6) によりリアルタイムで解析される。LED 照明 (Audio-Q 社, NVSW119BT) が粒子に反射または透過することにより、図 (30) のように、粒子の高さによってカメラで撮影される粒子画像は変化する。粒子がレーザーの集光位置より上にあるときは粒子の中心が明るく、集光位置より下にあるときは暗く見える。この変化を利用して、カメラが撮影する粒子が常に同じ見え方になるように制御すれば、常に一定の高さを保つことができる。

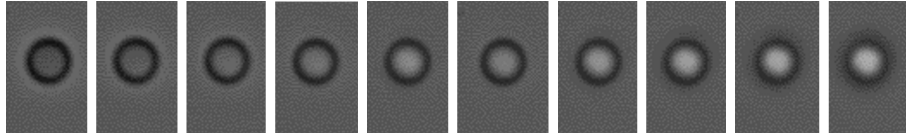


Figure 30: 高さの異なるプローブ粒子の輝度分布

## 9.2 ステージフィードバック Active MR

Feedback 制御下における Active MR の測定原理を説明する。前節で述べたように、試料が乗った Piezo ステージがフィードバック制御されているとき、試料中でのプローブ粒子の変位  $u$  は式 (41) のように書ける。このとき、プローブ粒子が観測用レーザーと駆動用レーザーから受けるレーザートラップ力は  $k_d Le^{-i\omega t} - (k_d + k_p)u_{\text{QPD}}$  となり、フィードバック制御下におけるプローブ粒子の運動を表す Langevin 方程式は以下のように与えられる。

$$k_p u_{\text{QPD}}(t) + \int_{-\infty}^t \gamma(t-t') \dot{u}(t') dt' = k_d (Le^{-i\omega t} - u_{\text{QPD}}(t)) + \zeta(t) \quad (42)$$

ここで、 $\dot{u}(t)$  は試料中でのプローブ粒子の速度である。式 (42) をフーリエ変換して Feedback 制御下におけるプローブ粒子の周波数応答は以下のように得られる。

$$\begin{aligned} \langle \tilde{u}(\omega)^2 \rangle^{FB} &= \langle \hat{u}_{\text{QPD}}(\omega)^2 \rangle + \langle \hat{u}_{\text{stage}}(\omega)^2 \rangle \\ &= \alpha^*(\omega) \{ \hat{F}(\omega) - (k_d + k_p) \langle \hat{u}_{\text{QPD}}(\omega)^2 \rangle \} \end{aligned} \quad (43)$$

以下  $FB$  の添え字は Piezo ステージが Feedback 制御されている際の合計の変位を意味する。フィードバック制御下における Active MR の計測では、I のみを制御し  $P = D = 0$  の条件下で、式 (40) が満たされるため、PID コントローラーの出力電圧  $\epsilon(t)$  は以下のように得ら

れる。

$$\epsilon(t) = I \int V dt \quad (44)$$

PID コントローラーの出力電圧  $\epsilon(t)$  は Piezo ステージの外部制御電圧となる。Piezo ステージの変位  $u_{\text{stage}}$  は  $\epsilon(t)$  に即座に  $B \equiv u_{\text{stage}}(t)/\epsilon(t) = 5.4 \times 10^{-6}$  [m/V] の比で応答する。よって  $u_{\text{stage}}$  は

$$u_{\text{stage}}(t) = B\epsilon(t) = BI \int V dt = \frac{BI}{C} \int u_{\text{QPD}} dt = \int \frac{1}{\tau} u_{\text{QPD}} dt \quad (45)$$

と書ける。ここで、 $\tau = C/BI$  はわれわれの実験装置における Feedback システムの遅れ時間である。正弦駆動に対するステージの応答の振幅  $u_{\text{stage}}(\omega)$  は以下のように書ける。

$$\hat{u}_{\text{stage}}(\omega) = -\frac{1}{i\omega\tau} \hat{u}_{\text{QPD}}(\omega) \quad (46)$$

試料本来の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  や複素ずり弾性率  $G^*(\omega)$  を得るために、フィードバック制御された状態での駆動用レーザーによる外力に対する全体の応答関数を  $A_{\text{FB}}^*(\omega) \equiv \langle \hat{u}(\omega) \rangle^{\text{FB}} / \hat{F}(\omega)$  と定義した。ここで実際の計測では、ピエゾステージの変位  $u_{\text{stage}}$  は計測しないため、式 (43) に式 (46) に代入することで、 $A_{\text{FB}}^*$  と  $\alpha^*(\omega)$  の関係は以下のように書ける。

$$A_{\text{FB}}^*(\omega) = \frac{\langle \hat{u}(\omega) \rangle^{\text{FB}}}{\hat{F}(\omega)} = \frac{\alpha^*(\omega)}{1 + \beta\alpha^*(\omega)} \quad (47)$$

ここで  $\beta \equiv k_t/(1 - 1/i\omega\tau)$  はフィードバックの補正をするためのパラメータである。よって試料本来の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  は全体の変位  $\langle \hat{u}(\omega) \rangle^{\text{FB}}$  から以下のように得られる。

$$\alpha^*(\omega) = \frac{A_{\text{FB}}^*(\omega)}{1 - \beta A_{\text{FB}}^*(\omega)} = \frac{\langle \hat{u}(\omega) \rangle^{\text{FB}}}{\hat{F}(\omega) - \beta \langle \hat{u}(\omega) \rangle^{\text{FB}}} \quad (48)$$

複素ずり弾性率  $G^*(\omega)$  は、応答関数  $\alpha(\omega)$  から式 (37) の一般化された Stokes の関係式を用いて得られる。

### 9.2.1 Feedback Active MR から得られた電圧信号からの解析原理

実際の計測ではステージと4分割フォトダイオードで得られた合計の変位  $u(t)$  を直接得ることはできない。 $u(t)$  の代わりに電圧信号は  $V(t)$  しか直接測定できないが、ロックイン検出器を用いることでこの信号はデジタル化する過程を経ることなく、直接  $\langle \hat{V}(t) \rangle$  に変換できる。フィードバック Active MR の解析は以下のような手順で行う。

4分割フォトダイオードの出力電圧  $\langle \hat{V}(\omega) \rangle = \langle \hat{u}_{\text{QPD}}(\omega) \rangle / C$  を利用する。見かけの応答関数  $A_{\text{QPD}}^*(\omega)$  を  $\langle \hat{u}_{\text{QPD}} \rangle$  と加えられた力  $\hat{F}(\omega)$  の比として定義し、式 (43) に式 (46) を代入する

ことで以下の関係式が得られる。

$$A_{\text{QPD}}^*(\omega) \equiv \frac{\langle \hat{u}_{\text{QPD}}(\omega) \rangle}{\hat{F}(\omega)} = \frac{\alpha^*(\omega)}{1 - 1/i\omega\tau + k_t\alpha^*(\omega)} \quad (49)$$

さらに、 $A_{\text{QPD}}^* = C\langle \hat{V}(\omega) \rangle / \hat{F}(\omega)$  の関係式を用いて、試料本来の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  は4分割フォトダイオードの出力電圧信号  $\langle \hat{V}(\omega) \rangle$  から以下のように求めることができる。

$$\alpha^*(\omega) = \frac{(1 - i\omega\tau)A_{\text{QPD}}^*(\omega)}{i\omega\tau(1 - k_t A_{\text{QPD}}^*(\omega))} = -\frac{(1 - i\omega\tau)C\langle \hat{V}(\omega) \rangle}{i\omega\tau(\hat{F}(\omega) - k_t C\langle \hat{V}(\omega) \rangle)} \quad (50)$$

複素ずり弾性率  $G^*(\omega)$  は、応答関数  $\alpha^*(\omega)$  から式 (37) の一般化された Stokes の関係式を用いて得られる。

### 9.3 ステージフィードバック Passive MR

ここではプローブ粒子の位置検出のために波長 830 nm の観測用レーザーを用い、観測用レーザーの中心に常に粒子があるよう Piezo ステージをフィードバック制御した。観測用レーザーで計測した粒子の変位とともにステージの変位も測定し、この2つの和をとることで試料中の実際の変位を求めた。

プローブ粒子の熱揺らぎをステージのフィードバック制御によって相殺するとき、プローブ粒子の変位に対する Langevin 方程式は式 (21) より以下のように書ける。

$$k_t u_{\text{QPD}}(t) + \int_{-\infty}^t \gamma(t-t')\dot{u}(t')dt' = \zeta(t) \quad (51)$$

レーザートラップ力  $k_t u_{\text{QPD}}(t)$  は熱揺らぎ  $\zeta(t)$  と強い相関がある事は明白である。相関性を無視して、 $u$  と  $u_{\text{QPD}}$  の線形性  $\tilde{u}(\omega) = \tilde{u}_{\text{QPD}}(\omega) + \tilde{u}_{\text{stage}}(\omega) = (1 - 1/i\omega\tau)\tilde{u}_{\text{QPD}}$  と式 (40) を用いることで、熱揺らぎ  $\tilde{\zeta}(\omega)$  に対する全体の変位  $\tilde{u}(\omega)$  は以下のように書ける。

$$\tilde{u}(\omega) = A_{\text{FB}}^*(\omega)\tilde{\zeta}(\omega) = \frac{\alpha^*(\omega)}{1 + \beta\alpha^*(\omega)}\tilde{\zeta}(\omega) \quad (52)$$

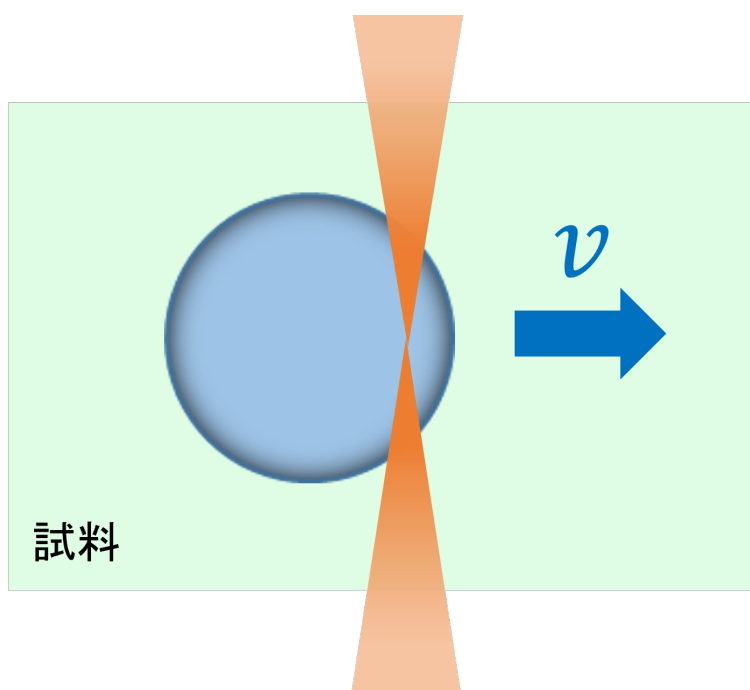
ここで、 $\beta = k_t/(1 - 1/i\omega\tau)$  である。これによって得られたステージフィードバック制御下におけるトラップ力の効果を取り除いたパワースペクトル密度から、応答関数  $\alpha^*(\omega)$  や複素ずり弾性率  $G^*(\omega)$  を求める。

## 10 引っ張り計測

通常は粒子の遅い運動に Piezo ステージを追従させ、レーザーがプローブ粒子の中心を捉えられるようにするのがステージフィードバック機構である。これを応用し、PID コントローラーの setpoint を一定値にすることで、図 (31) のようにプローブ粒子の中心とレーザーの集光位置をずらすことで、プローブ粒子に力  $F$  を印加することができる。一定の力  $F$  を与えたとき、プローブ粒子の変位と力を加え続けた時間からプローブ粒子の速度が求められるため、Stokes の式から以下のようにソフトマター試料の粘性率を求めることができる。

$$\eta = \frac{F}{6\pi a v} \quad (53)$$

ここで  $a$  はプローブ粒子の半径である。上記で述べたレーザーと QPD 間のスケールング変数  $C$  [m/V] 及びレーザーのトラップ力  $k$  [N/m] を求め、これらの [N/V] 積と QPD の出力電圧 [V] の値から粒子に加わる力  $F$  を求める。この測定では粒子が一定方向に数  $\mu\text{m}$  移動することもあるため Stage Feedback を行う必要がある。



**Figure 31:** 引っ張り計測の概略図。レーザーから  $F$  の力を受けてプローブ粒子は速度  $v$  で運動する。

---

## Part III

# 試料作製と計測手法

## 11 HeLa 生細胞

### 11.1 細胞の培養

HeLa 細胞の内部にプローブ粒子を導入し、生きた細胞における細胞質の MR 計測を行った。HeLa 細胞は、ヒト子宮頸がん由来の細胞であり、増殖してシート状の細胞層を作る。培地として D-MEM（型番 043-30085, L-グルタミン, フェノールレッド, ピルビン酸ナトリウム含有, 和光純薬社）にグルコース 1 mg/mL、ペニシリン 100 units/mL、FBS（ウシ胎児血清）10%（いずれも最終濃度）を加えたものを用いた。細胞培養フラスコで 5%CO<sub>2</sub> の CO<sub>2</sub> インキュベーター内に静置し培養した。フラスコ内でコンフルな状態になりすぎると形質が変わってしまう可能性があるため 4-5 日程度で継代を行った。また、継代を重ねることで細胞の形質が変わる可能性があるため、継代回数が 1-10 回の細胞で測定を行っている。レオロジー測定は、後述する通りにプローブ粒子を細胞内部に導入し、細胞の膜が回復するまで 37 °C で数時間インキュベートした後に行った。また、測定時は外気中で細胞を培養できるように、FBS 10%L-15 培地（型番 21083027, 和光純薬社）にペニシリン 100 units/mL、FBS（ウシ胎児血清）10% を加えた培地を用いて培養した。

### 11.2 測定粒子の導入

細胞をフィブロネクチン（型番 150025, 和光純薬社）で表面処理したガラスボトムディッシュ上で単層を形成するまで培養し、測定用粒子の導入を行なった。PDS-1000HeTM and HeptaTM Systems（BIORAD 社, 1652257J1）（図 33）を用いて、直径 1 μm のメラミン粒子を、空気圧で加速させ、細胞内部に粒子を打ち込んだ。また、細胞内部のタンパク質等が付着しないように、メラミン粒子表面にポリエチレングリコール（PEG）でコーティングした [31]。

粒子の打ち込みは以下の手順で行った。まず、円形上のマクロキャリアー上（BIORAD 社製 型番 165-2335）に、エタノールに分散させたメラミン粒子懸濁液を滴下する。エタノールが蒸発すると、マイクロキャリアー上に粒子が付着する。その際、冷却トラップ（Uni Trap, UT-

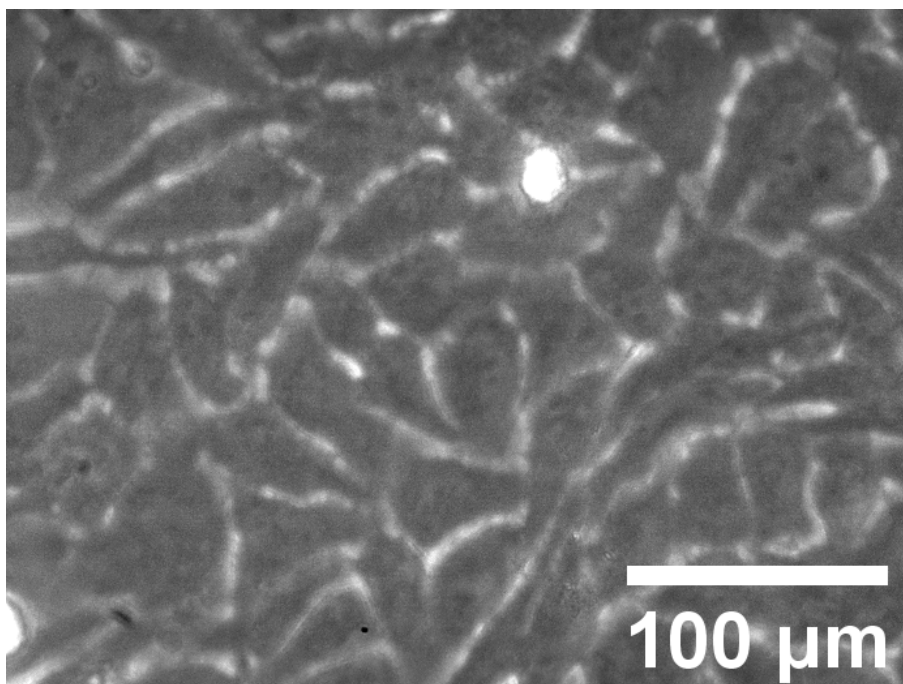


Figure 32: HeLa 細胞の顕微鏡画像

1000, EYELA 東京理化学株式会社) と接続した油回転真空ポンプ (GCD-051X, ULVAC 社) で空気圧を下げることで速やかに蒸発させている。これにより付着する粒子のムラを小さくしている。このマイクロキャリアーにヘリウムガスボンベから供給される 900 psi の圧力をかけると、ラプチャーディスク (BIORAD 社, 型番 165-2326) が割れ、マクロキャリアーが、空気圧によって網状のストッパー (BIORAD 社, 165-2336) に向けて加速される。マクロキャリアーはストッパーに衝突して急激に静止するが、コロイド粒子は慣性力により飛び出し、細胞内部に打ち込まれる (図 34)。粒子打ち込みの際には、細胞シート上に付着している細胞の死骸などを PBS を用いて洗浄した後、ガラスボトムディッシュから培養液を除去している。ディッシュが完全に乾燥すると細胞の状態が悪化するため、打ち込み後はすぐに新しい培養液を加えて、37 °C でインキュベートする。粒子を打ち込んだ際、細胞は少なからずダメージを負うため、性質を安定させるためにも、測定まで少なくとも一晩以上静置させる。

生細胞内部の粘弾性・揺らぎ測定の際は、細胞を培養液 [10 %FBS L-15 培地 (ThermoFisher Scientific 社, 21083027)] の中で培養しつつ、温調を用いて温度を 37°C に保ちながら計測した。細胞を生きたまま測定するために、コンデンサーレンズに水浸レンズを用いて培養液にコンデンサーレンズが浸からせた状態で測定を行った。これにより生細胞を培養液の中に置いたまま測定できる。計測の際は細胞がコンフルな状態で上皮シートを形成している状態で

行う。HeLa 細胞は上皮シートを形成しておらず孤立している場合、細胞は平たく伸び、ガラス面に対してしっかりと接着されたような状態となる。この場合、細胞骨格がより多く発現している可能性が高く、細胞骨格の非熱的な駆動が測定結果に現れる可能性がある。本研究は、細胞質のレオロジーを調べることを目的としているため、そのような状態での計測は避け、上皮シートを形成した状態の試料で計測を行った。また同様の理由から、計測するプローブ粒子は細胞壁や核に近くなく、複数の粒子が集まっていないものを選ぶ。



Figure 33: 細胞に粒子を導入する装置

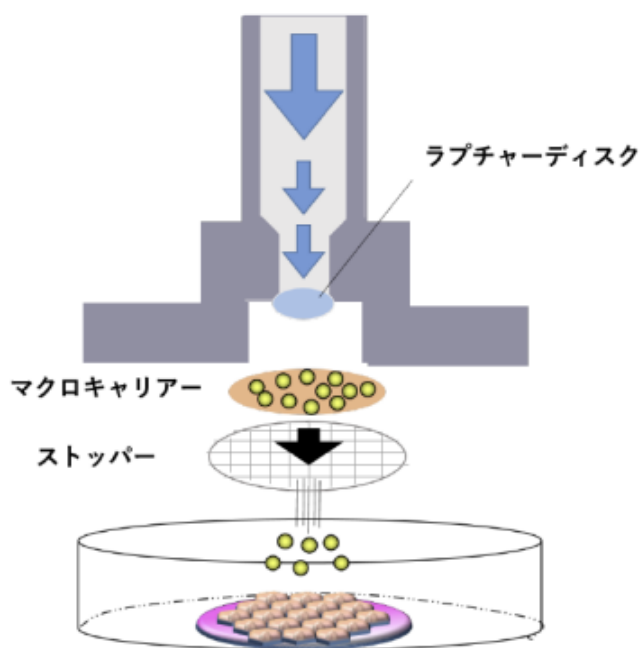
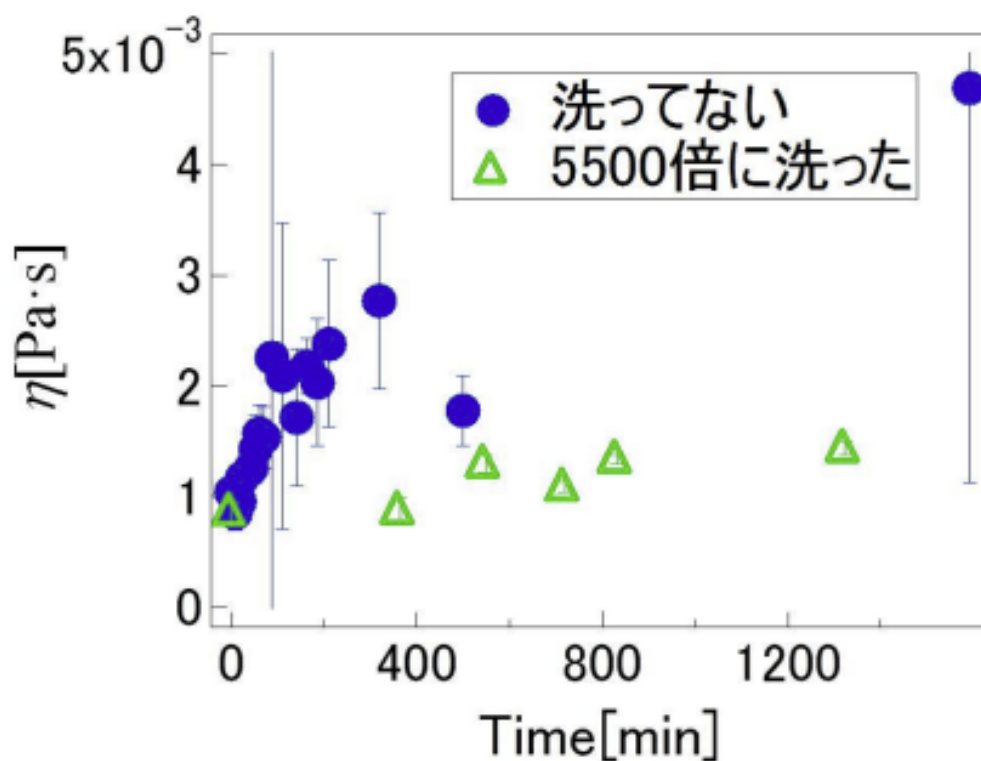


Figure 34: 粒子の打ち込む概略図

## 12 HeLa細胞抽出液

本研究では生細胞の計測で用いた細胞種である HeLa 細胞を細胞抽出液の試料とし、CIL-BIOTECH 社で購入した HeLa 抽出液（品番 CC-01-40-50）を元に測定試料を作製した。細胞抽出液は様々なタンパク質や RNA 等の高分子が含まれており、購入した状態のまま試料とすると、時間経過によって粘性率が上昇する [32]。また、フィルターを用いてバッファーを入れ替えることで試料を洗い、低分子を除去するとこれが測定に必要な時間に対して無視できるほど穏やかになる。そこで本稿では 3 kDa のフィルター（Merck-Millipore, Darmstadt, Germany）を用いて低分子を除去し、生細胞内部の生体高分子濃度付近まで濃縮して測定を行った。



**Figure 35:** 抽出液の時間経過による粘性の変化。丸印が洗っていない抽出液の時間ごとの粘性率を表し、三角印が十分に洗った抽出液の時間ごとの粘性率を表す。[32]

## 12.1 濃度の決定

4.4 節で示したように、細胞抽出液の力学特性はその濃度に大きく依存するため、試料の濃度を決定することは重要である。今回は簡易的で試料のロスが少ない Bradford Assay と正確ではあるが多くの試料を必要とする乾燥重量測定を併用して試料濃度を決定した。

### 12.1.1 Bradford Assay

Coomassie Brilliant Blue G-250 は酸性条件下でたんぱく質と結合すると最大吸光波長が 465 nm から 595 nm にシフトし、元々赤茶色だった色がそのたんぱく質濃度が高いほど濃い青色に変化する。これを利用して既知の濃度のたんぱく質希釈系列と試料の 595 nm に対する吸光度を測定し、試料の濃度を定量的に求める。ただし、この方法は試料のたんぱく質濃度のみを測定するため核酸など抽出液中の固形物濃度を全て求めることはできない。そのため後述する乾燥重量測定と組み合わせて用いた。

BSA と L15 を用いて希釈系列 (1 mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0 mg/ml) を作成し、室温に戻した Bradford 溶液 (Quick Start Bradford assay, 500-0201, Bio-Rad 社) 1 ml に対して 20  $\mu$ l 加える。よく攪拌した後、紫外可視分光光度計 (BioMate 3 Spectrometer, 840208400) を用いてそれぞれの 595 nm の吸光度を測定して標準曲線を求める。その後、試料をこの範囲に収まるように濃度を調整 (600 倍程度) して測定を行う。10  $\mu$ l 程度の試料で濃度を測定できるため試料の大きなロスがないことがメリットである。[33]

### 12.1.2 乾燥重量測定

乾燥重量測定は正確かつ確実に濃度を測定できる。重量を測定した 15 ml チューブに試料を封入し、デシケーターに入れてポンプ (GCD-051X, ULVAC 社) で引くことで試料を乾燥させた。水分が取り除かれることによる重量変化がなくなるまで真空処理を行い、試料を封入したチューブの重量、つまりは試料とチューブの重量の和からあらかじめ測っておいたチューブの重量を引くことで試料の重量が得られる。封入した試料の体積と得られた試料の重量から濃度が求められる。ただし、溶媒に含まれる塩はそのまま残るため乾燥重量から差し引く必要がある。

乾燥重量測定を精度良く行うためには最低でも 100  $\mu$ l の試料が必要であり、濃厚化後の少量の試料から毎回乾燥重量測定を行うことは大きなロスである。そこで十分量の試料を用いた乾燥重量測定と同時に Bradford Assay を行いその比を得た。洗う培地や LOT ナンバーが

---

同じ試料に関してはこの比が一定であると考え Bradford Assay のみで固形物濃度を求めた。

## 12.2 MR 測定試料の作製

CILBIOTECH 社で購入した HeLa 抽出液（品番 CC-01-40-50）は時間経過で細胞骨格由来と思われる相分離が見られた。ATP を含む培地でこれは顕著になり測定に支障をきたすため細胞骨格の重合を阻害するサイトカラシン B を実験を通して 0.1 M になるように加えた。4 °C の条件下で抽出液を L15 培地に溶かし、3 kDa フィルターを用いて小分子を取り除く工程を複数回行い、試料を洗った。具体的には 3 kDa のフィルターがついたチューブに抽出液と L15 培地を入れる。このとき、抽出液に対する L15 培地の量で何倍に希釈できるか決まる。例えば抽出液 2 ml に対して L15 培地を 8 ml 入れたらなら元の溶媒を 5 倍に希釈（交換）できたと考える。その後、4 °C、5000 rpm の条件で 1 時間遠心に向け、ピペッティングした後、フィルターを通り抜けた分の L15 培地を再び加える。これを繰り返し、元の溶媒を 1000 倍以上希釈する。その際、代謝活性がレオロジーに与える影響を調べるため、3.5 mM の ATP を加えた L15 培地で洗った試料と ATP を加えずに L15 培地のみで洗った試料を用意した。その後、3 kDa のフィルターを用いて、4 °C、10000 rpm の条件で 30 分間遠心にかかる操作を複数回行い、試料を濃厚化した。

十分に濃厚化した試料をマイクロレオロジー測定のために図（36）のようなチャンバーに封入した。適当な大きさに切った厚さ 145  $\mu\text{m}$  の両面テープに穴あけパンチで直径 6 mm の穴をあけ、スライドガラスに貼り付ける。穴の部分にプローブ粒子（PEG でコーティングした直径 1  $\mu\text{m}$  のメラミン粒子）を拡散させた試料を 4  $\mu\text{l}$  程度入れ、気泡が入らないように静かにカバーガラス（18 mm $\times$ 18 mm）を被せた。その後、カバーガラスとテープの間に気泡が入らないように綿棒などで軽く押さえ密着させた。

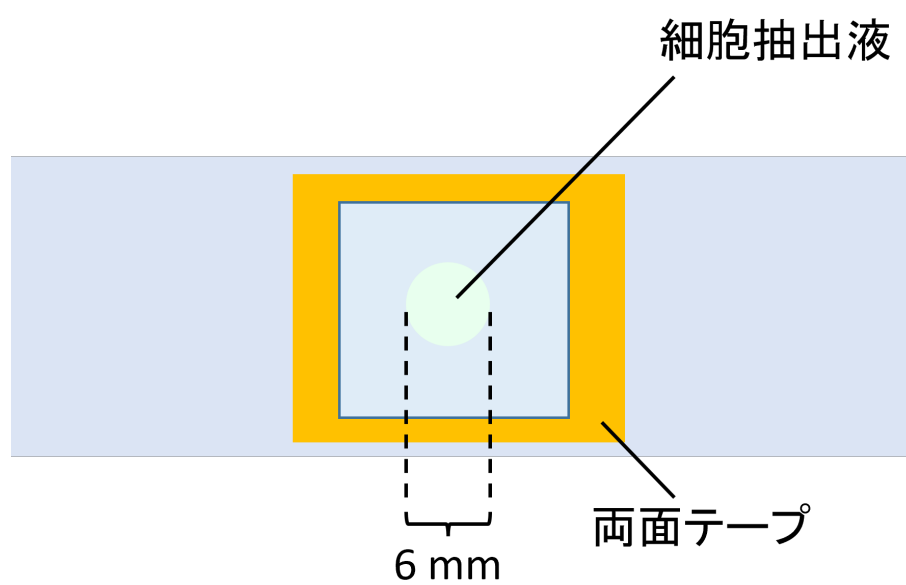


Figure 36: MR 測定試料

## 13 ルシフェラーゼアッセイによる代謝活性の測定

37 °C の条件下で細胞抽出液中の ATP 濃度の時間変化を追跡することにより、細胞抽出液が持つ代謝活性を調べる。ATP 量の検出をホタルルシフェラーゼアッセイ（菌士郎 ATP 発光キット Ver.2, LL100-1-2, 東洋ビーネット株式会社）により行った。

### 13.1 ルシフェラーゼアッセイの原理

ルシフェラーゼは ATP 存在下で D-Luciferin と反応し発光する（図 37）。ATP の濃度に依存して発光量が変化するため、抽出液内の ATP 濃度変化を定量的に追跡できる。また、この発光自体に ATP が消費されるため、一度反応が始まると発光量は減衰していく。そのため発光量の測定は反応開始から 10 秒後に統一した。

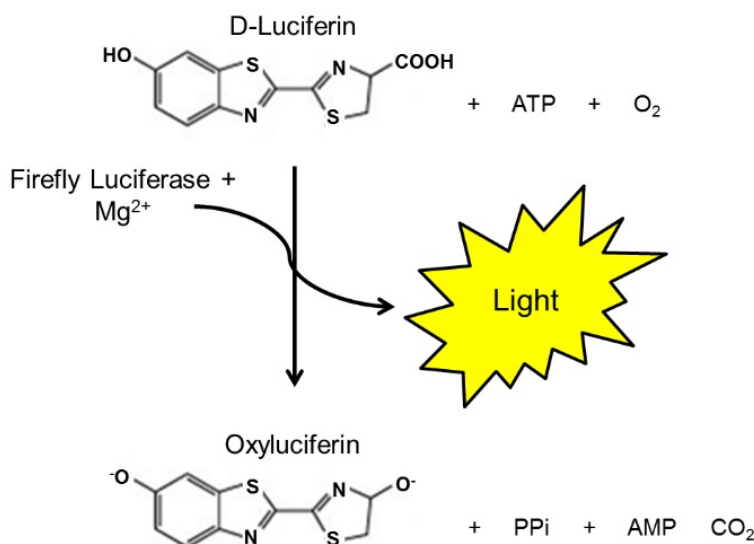


Figure 37: ルシフェラーゼアッセイの原理

### 13.2 測定方法と測定装置

この発光を小型卓上ルミノメーター（Lu-mini, Vitl Life Science Solutions）（図 38）を用いて検出した。あらかじめ 37 °C 下で 100 ml の細胞抽出液に濃度 7.0 mM ATP 溶液を 100 ml 混合し、最終濃度が生細胞内部と同程度の 3.5 mM となるようにする。その後、事前に定めた時間経過させ、抽出液と ATP の反応を進行させる。時間が経過したら、室温の反応

溶液 100  $\mu$ l (Luciferase, Luciferin 等を含む) と抽出液と ATP の混合液をキュベット内で素早く振って混合させたのちに測定を行った。

初期濃度である 3.5 mM の ATP と反応溶液を混合すると非常に強く発光し今回使用した測定装置では正確に光量を測定できなかった。そこで、水と当研究室で抽出液の溶媒として使われる無機塩バッファー (10 mM HEPES, 50 mM NaCl) を溶媒とする ATP 希釈系列を作製し、測定装置の測定可能範囲を調べた。図 (39) に結果を示す。 $10^{-5}$  M から  $10^{-10}$  M まで ATP 濃度と発光量が線形の関係になっている。また、同じ濃度でも無機塩バッファーを溶媒とする ATP 溶液の発光量は水のそれよりも小さくなっている。東洋ビーネット株式会社に問い合わせたところ、NaCl が発光を阻害するようである。以上のことから、本論文のルシフェラーゼアッセイの測定結果は、抽出液と 3.5 mM ATP 溶液を混合させ一定時間経過させたのち、装置の測定可能範囲まで水で希釈したものを反応液と混ぜ合わせて発光させた。



Figure 38: ルシフェラーゼアッセイ測定装置

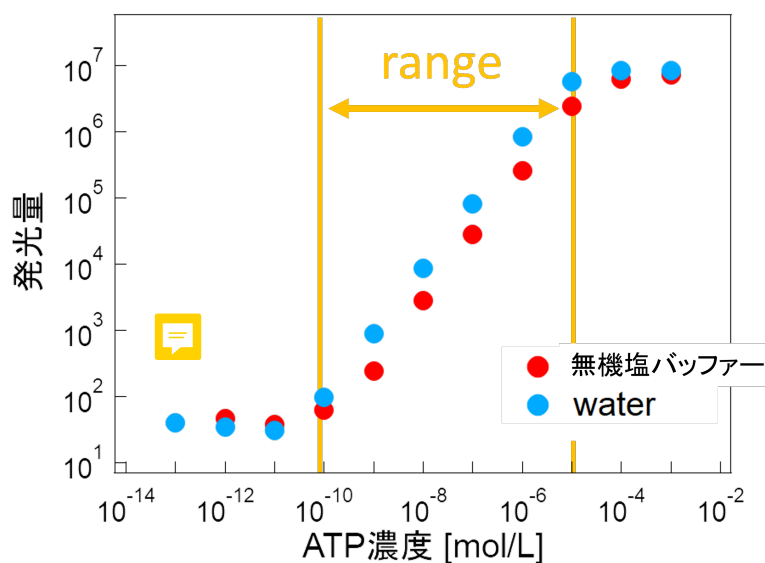
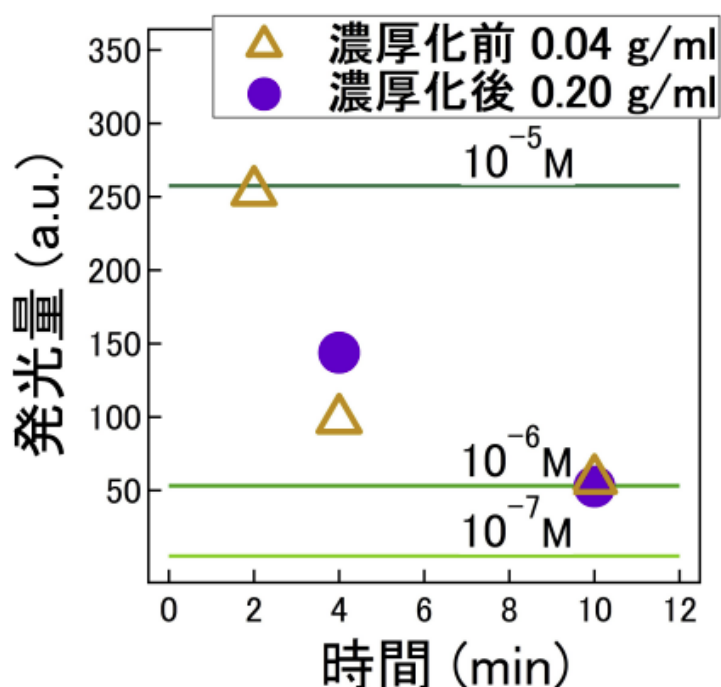


Figure 39: 測定装置のレンジ

### 13.3 ルシフェラーゼアッセイ測定試料の作製

ルシフェラーゼアッセイ測定はMR測定で用いたHeLa細胞抽出液に加えて、大腸菌抽出液、Xenopus egg抽出液を試料とした。マイクロレオロジー測定を行うHeLa細胞抽出液の

試料は12.2節で述べたようにL15培地で十分に培地を交換したのち、生細胞内部に条件を近づけるため、生細胞内濃度と近くなるよう濃厚化させる。一方で先行研究によって、抽出液内部のATPの消費はその濃度に依存しないことが分かっている(図40) [34]。そのため、ルシフェラーゼアッセイ測定に用いた試料は培地で洗ったのち、濃厚化は行っていない。また、培地交換の際ATPは添加していない。測定条件を一定にするために、測定前にBradford Assayを用いて濃度を測定し、試料ごとにばらつきがないように濃度を調整している。次章で言及するが、試料の条件次第では3.5 mM ATPを添加した後、これを消費し切る前にアクトミオシン由来と思われる液体相と凝集相の分離が生じた。本研究は細胞質の代謝活性を調べることが目的であることに加え、分離によって抽出液とATPが接触する機会が減少してしまう可能性がある。そのため細胞骨格を持つ細胞種はサイトカラシンBを0.1 Mの濃度になるように加え、アクチンの重合を阻害した。



**Figure 40:** 異なる濃度の大腸菌抽出液のATP濃度変化。三角印は希薄な大腸菌抽出液中のATP濃度変化を表し、丸印は濃厚化させた大腸菌抽出液内のATP濃度変化を表している。

## 14 吸光度測定

細胞抽出液の相分離による見た目の変化を定量的に測定するため吸光度の時間経過を紫外可視分光光度計（BioMate3 Spectrometer, 840208400）を用いて測定した。

吸光度（A）とは光学密度（OD）とも呼ばれ、試料に既知の強度の光を当てたとき、溶液に吸収される光の量のことである。試料に入射される光の強度を  $I_{in}$ 、試料を透過した光の強度を  $I_{out}$  とすると吸光度 A は以下のように定義される。

$$A = -\log_{10} \frac{I_{out}}{I_{in}} \quad (54)$$



Figure 41  
吸光度測定装置

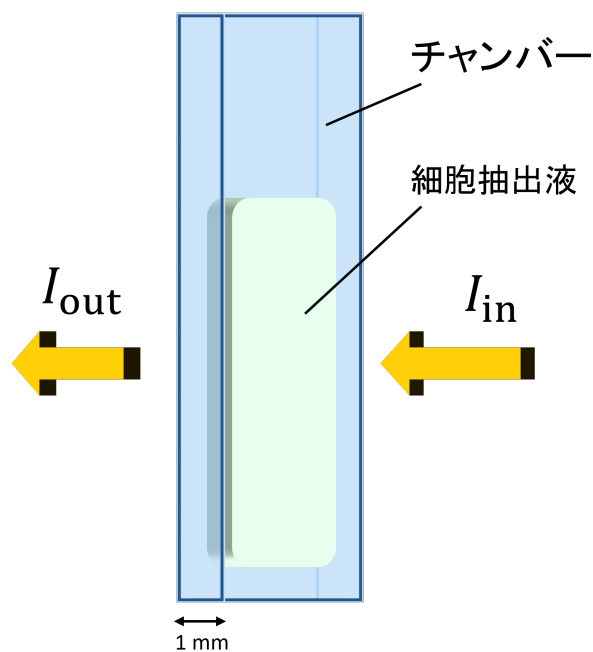


Figure 42: 吸光度測定の模式図

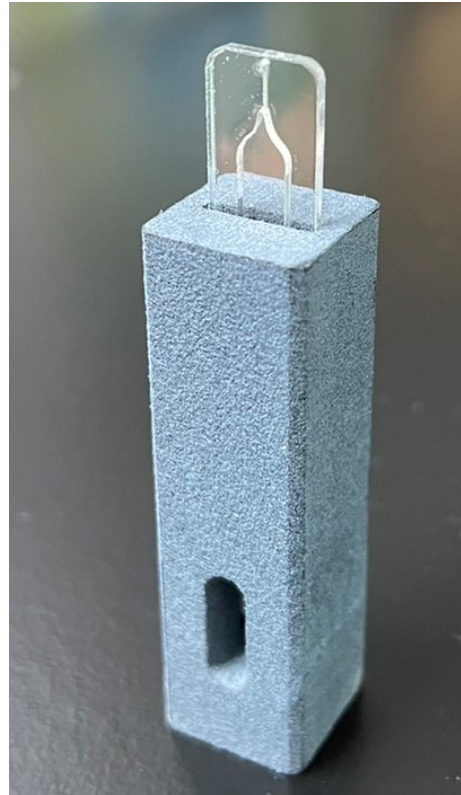
---

## 14.1 吸光度測定試料の作製

細胞抽出液は時間経過で目に見えて白濁していく。そのため試料が厚すぎると透過光が弱くなりすぎてしまい、正確に吸光度を測定できない。また、濃厚化した試料は初期濃度の試料と比べて非常に少量しか得られない。そこで、吸光度測定を試料の作製には ALINE 社の Specvettes (図 43) を用いて、厚さ 1 mm のチャンバーを作製した。模式図を図 (42) に示す。図 (43a) のようなチャンバーに、培地で洗い濃厚化させた試料を封入する。試料内に気泡などが入るとその部分から余計に光が透過し、正確な吸光度を測定できない。そのため、チャンバーのダイヤ型の空間を試料で満たさなければならないが、生細胞程度まで濃厚化させた場合、その高い粘性から壁面との表面張力のみで厚さ 1 mm の空間に封入することは困難であった。そこで今回は 3.5 mM ATP を加えた L15 で洗った HeLa 抽出液と、L15 のみで洗った HeLa 抽出液を用意し、0.15 g/ml と生細胞の半分程度の濃度まで濃厚化させてチャンバーを作製した。また、どちらの試料にも 0.1 M のサイトカラシン B を加え、アクチンの重合を阻害している。



(a) 吸光度測定に用いるチャンバー (Specvettes, ALIN 社)



(b) ホルダー

**Figure 43:** 吸光度測定に用いるチャンバー (a) とそのホルダー (b)。測定時は真ん中付近の小さな穴から試料を入れ、チャンバーのダイヤ型の部分が試料で満たされる。

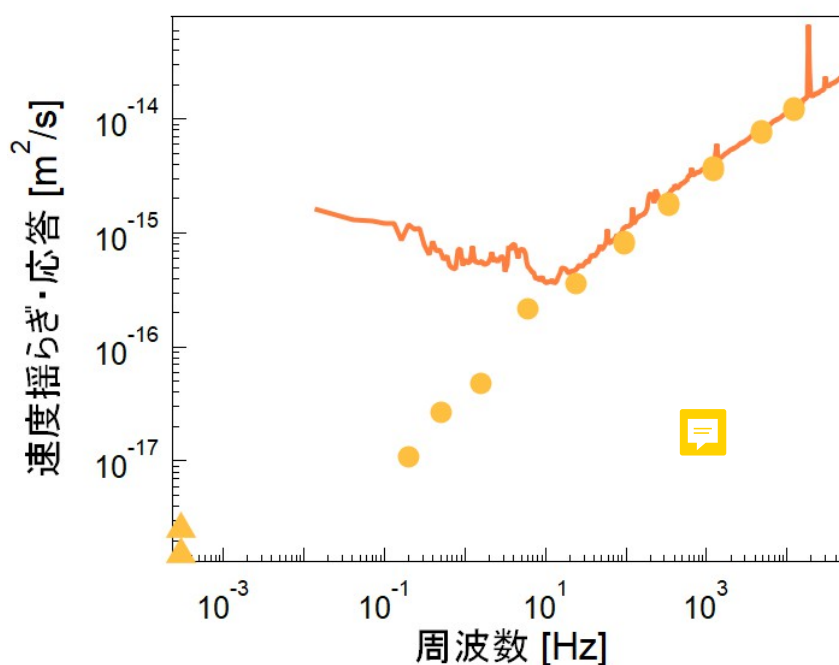
## Part IV

# 結果と考察

## 15 HeLa 生細胞

### 15.1 生細胞のレオロジー測定

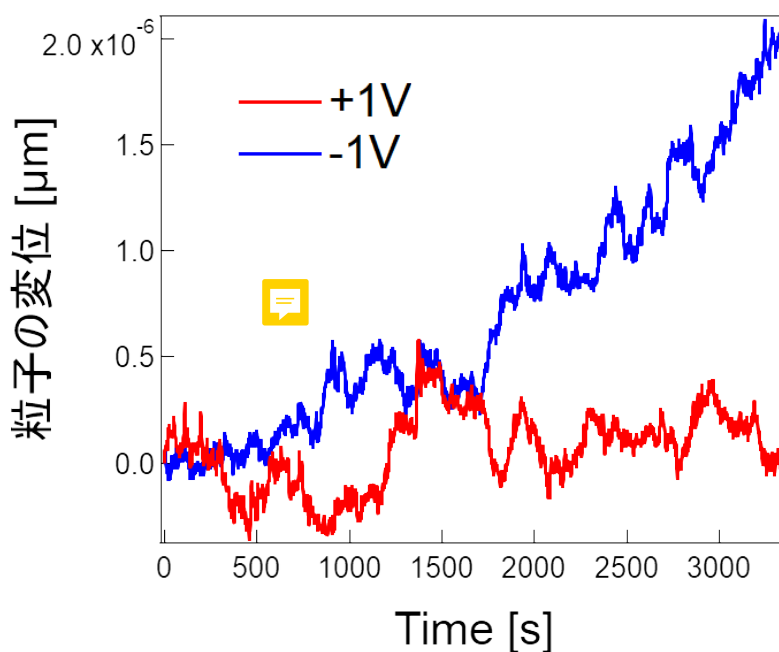
HeLa 生細胞に導入したプローブ粒子（直径  $1 \mu\text{m}$  の表面を PEG コートしたメラミン粒子）の揺らぎ（Stage Feedback PMR）及び外力に対する応答（Stage Feedback AMR）を測定した。その結果を図（44）に示す。PMR によって得られたプローブ粒子の速度揺らぎ（実線）と AMR で得られた応答から算出された値は高周波では一致するが、低周波域で大きく異なっている。生細胞内のゆっくりとした非熱的な揺らぎにより低周波域で揺動散逸定理が破れていると考えられる。



**Figure 44:** HeLa 生細胞の速度揺らぎと応答。オレンジ色の実線が PMR で測定された非熱揺らぎと熱揺らぎを合わせた揺らぎの大きさを表す。黄色の丸印が AMR で測定された外場に対する粒子の応答を表す。

## 15.2 引っ張り測定

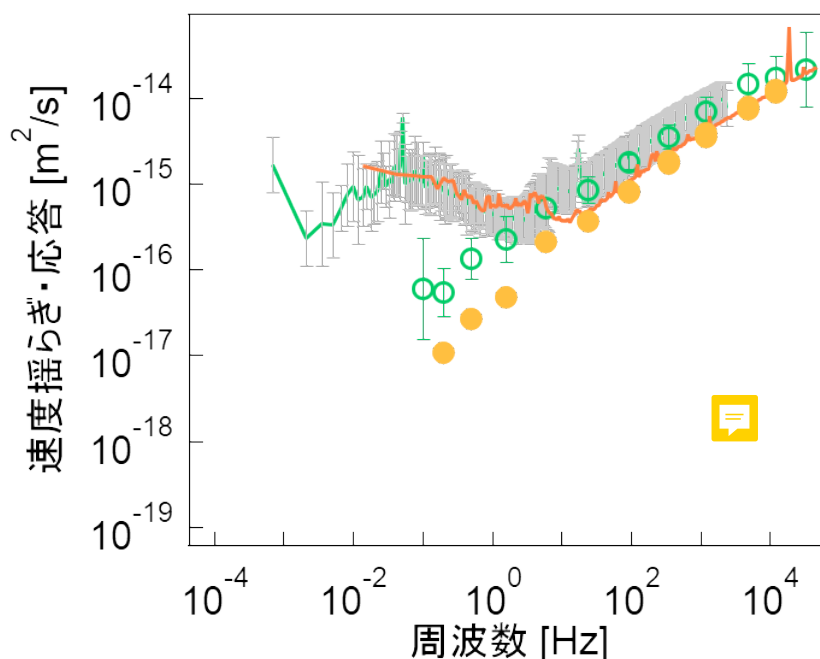
ステージフィードバックを用いて生細胞内で引っ張り測定を行った。今回はPIDコントローラーの setpoint を  $\pm 1$  V とし、0.69 pN で約一時間  $\pm y$  方向に牽引した。図 (45) は牽引した粒子の変位である。ただし、 $t = 0$  で変位が 0 としている。牽引する方向によって粒子の動く速度が異なることから、細胞内流動が一定方向に発生していたと考えられる。そこで得られた速度の平均をとることで細胞内流動の影響を差し引いた。得られた速度から粘性率を求め低周波極限の粒子の応答を算出した。図 (44) に三角印として示した。



**Figure 45:** 引っ張り測定による HeLa 生細胞内のプローブ粒子の変位。PID コントローラーの setpoint が +1 V のとき、粒子はこのグラフの負の変位方向に牽引されている。-1 V のときは逆向きに牽引させる。

### 15.3 得られたデータの一般性

生細胞は同じ細胞種であっても細胞ごとに個性があり、そのレオロジーも細胞ごとに多少異なる。そのため今回得られたレオロジーが HeLa 生細胞のレオロジーとして代表的なものか吟味する必要がある。当研究室では HeLa 生細胞のレオロジー測定は盛んに行われており、多くの測定結果が存在する。そこで今回得られた結果と当研究室の測定結果の平均を重ねたものを図 (46) に示す。今回得られた結果は、AMR から得られた応答 (熱揺らぎ) の大きさが平均より低く測定された。一方で低周波域の非熱的な揺らぎは平均的な挙動と一致していることから、プローブ粒子が細胞内に張り巡らされた細胞骨格の影響を受け非熱的に駆動されながらも、熱揺らぎは抑制された可能性がある。16.1 節でも述べるが、細胞抽出液内には生細胞のような非熱的な駆動力はないと思われ、低周波域で揺動散逸定理が破れるような非熱的な揺らぎは見られなかった。そのため、生細胞と細胞抽出液のレオロジーを比較するとき、注目されるのは熱的な揺らぎである。今回の生細胞の熱揺らぎの測定結果は生細胞の代表的なものとはいえないため、本稿では生細胞の熱揺らぎから得られる値は図 (46) において緑色の丸印の値から求めるものとする。



**Figure 46:** 今回得られた HeLa 生細胞のレオロジー (オレンジの実線と黄色の丸印) と、当研究室で集計された HeLa 生細胞のレオロジーの平均値 (緑色の実線と丸印)。

## 16 HeLa細胞抽出液

### 16.1 レオロジー測定

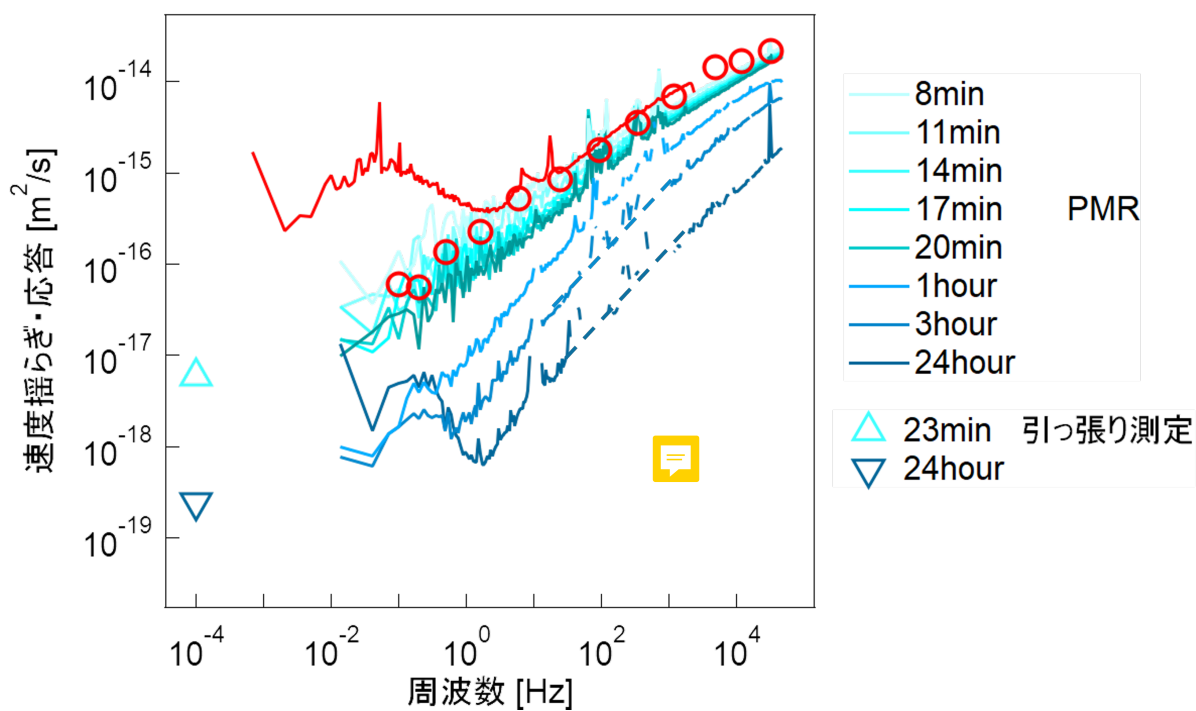
#### 16.1.1 抽出液中の揺らぎ

12.2節で述べたように、HeLa細胞抽出液の溶液をフィルターを用いてL15培地で十分に交換したのち、濃厚化させた試料のマイクロレオロジー測定を行った。抽出液の溶媒を交換する際にL15培地に濃度3.5mM ATPを添加して作製した試料と、ATPと代謝を加えずに作製した試料を用意した。ATPを添加した試料では生細胞と同様のステージフィードバックを用いた引っ張り計測を時間を空けて2回行った。1回目は試料作製から23分後に0.12 pNの力で+y軸方向と-y軸方向にそれぞれ約13分間牽引した。2回目は試料作製から24時間経過後に2.2pNの力で+y軸方向と-y軸方向にそれぞれ約13分間牽引した。

図(47)、図(48)に結果を示す。図(47)はATPを添加した溶媒で交換した抽出液のレオロジー測定の結果である。青い実線は全てPMRで得られた揺らぎであり、0.3 g/mlまで濃厚化させた抽出液を図(36)で示したチャンバーに封入した時点を時刻0として、測定した時刻ごとに色分けしている。チャンバーに封入してから8分後から測定を始め、24時間後まで測定した。また、点線の部分は大きなノイズがのっており、グラフ同士が重なり合い見にくくなっていたためにデータの表示を割愛している。三角印はそれぞれ牽引実験から得られた低周波極限の応答である。加えて、生細胞の揺らぎ(赤い実線)と応答(赤い丸印)を比較対象として表示している。ATPの添加の有無に関わらず、抽出液の揺らぎは生細胞中の非熱的な揺らぎ(赤い実線)とは大きく異なる。これにより、抽出液中にはプローブ粒子を揺らがせるような、波長の長い非熱的な揺らぎは存在しないと考えられる。ATPを添加した抽出液の揺らぎに注目すると、濃度が0.3 g/mlと図(12)に従えば粘性が発散してしまうはずの濃度であるにも関わらず、細胞抽出液中の揺らぎは試料作製直後は生細胞の熱揺らぎ程度の活発な揺らぎを見せた。しかし、時間経過によって急激に揺らぎが低下しており、引っ張り測定値も大きく減少した。図(49)、図(50)はATPを添加して作製した濃度の異なる抽出液の速度揺らぎである。これらの試料でも試料作製直後の活発な熱揺らぎと時間経過による急激な揺らぎの低下が見て取れる。

一方で図(48) ATPを添加していない抽出液の揺らぎを示す。L15培地で抽出液の培地を交換し、0.24 g/mlまで濃厚化させてチャンバーに封入している。ATPを添加した抽出液と同様に試料作製を時刻0として時間経過でPMRで得られた揺らぎを黄色の実線で色分けしており、赤い実線と丸印は生細胞の揺らぎと応答である。ATPを添加した抽出液と比較し

て、時間経過によって緩やかに揺らぎが減少した。



**Figure 47:** ATP を添加した HeLa 細胞抽出液の速度揺らぎの時間変化。青い実線が抽出液の揺らぎであり、三角印は牽引実験で得られた低周波極限の応答である。

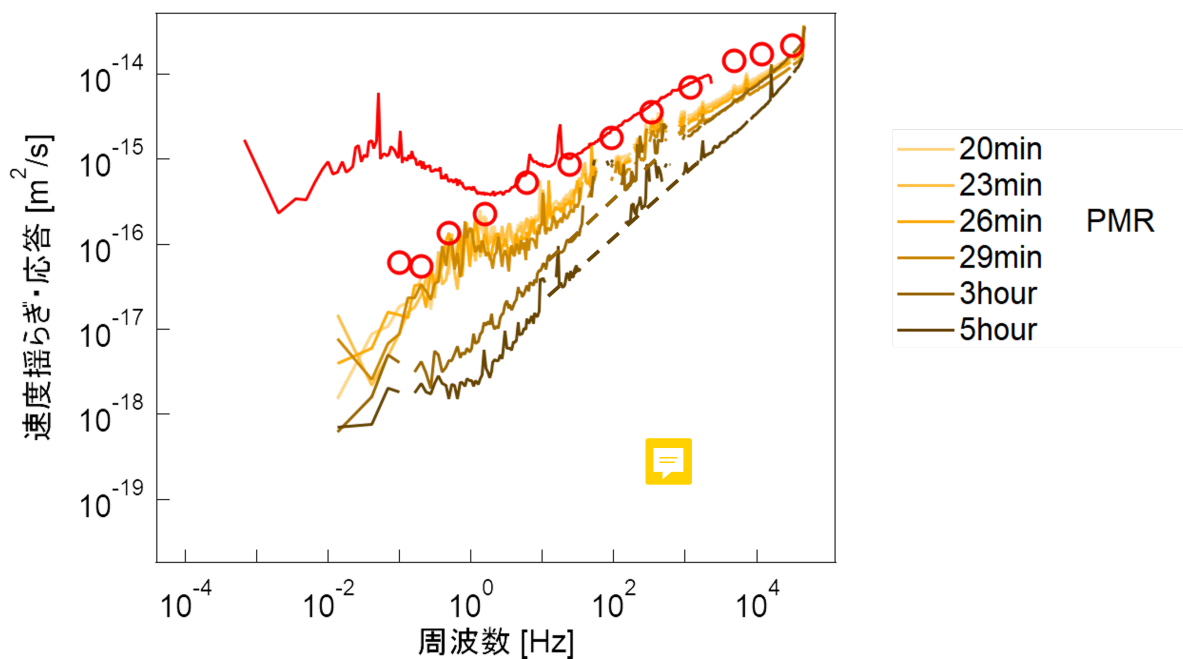


Figure 48: ATP を添加していない HeLa 細胞抽出液の速度揺らぎの時間変化。

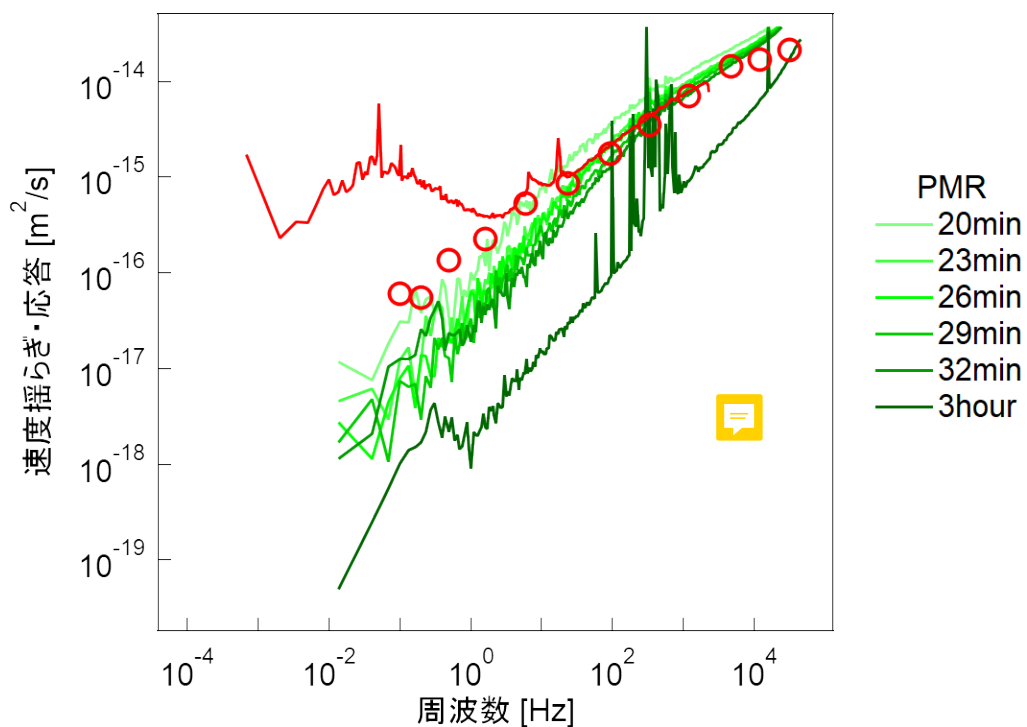


Figure 49: 濃度 0.225 g/ml で ATP を添加した HeLa 細胞抽出液の揺らぎの時間変化。

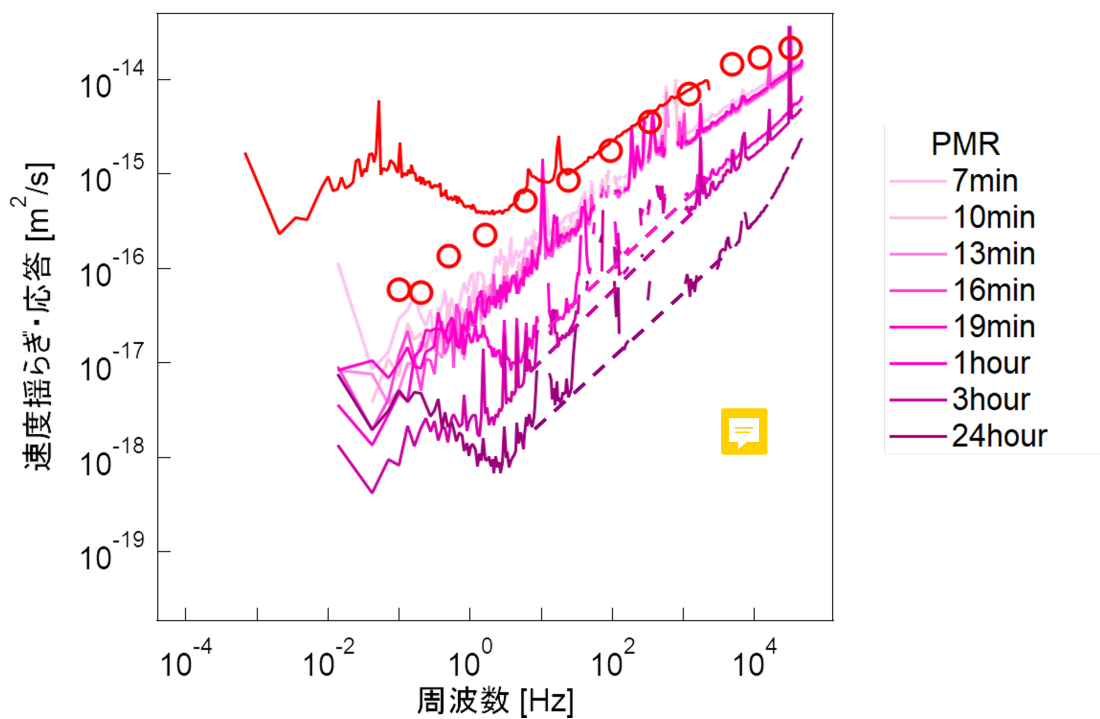
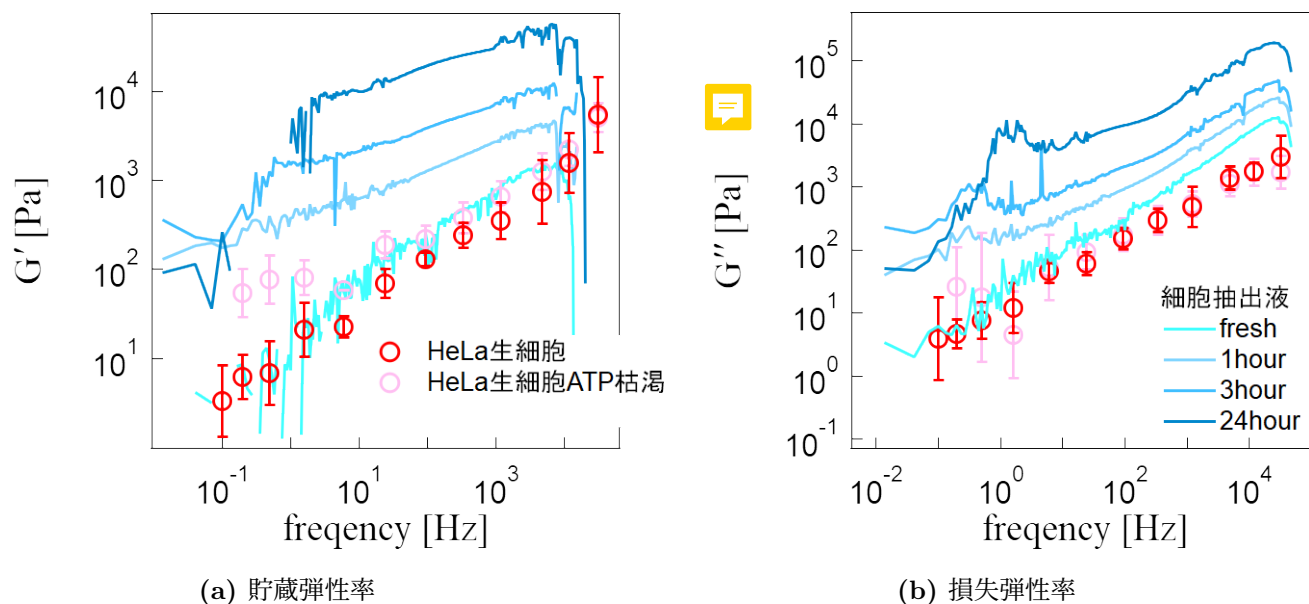


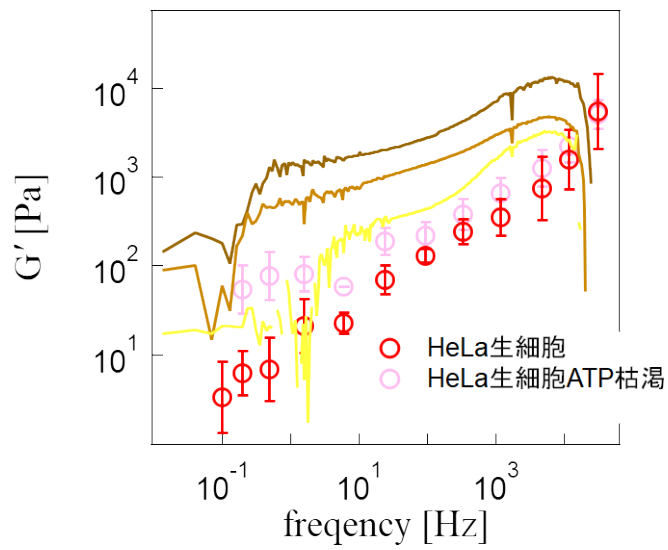
Figure 50: 濃度 0.29 g/ml で ATP を添加した HeLa 細胞抽出液の揺らぎの時間変化。

### 16.1.2 ATP が粘弾性に与える影響

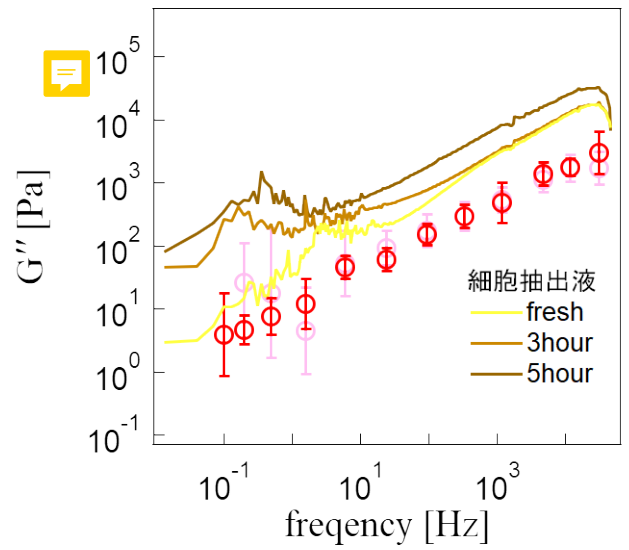
観測した揺らぎから式 (34) ~ 式 (37) を用いて、図 (47)、図 (48) に示した試料の粘弾性を求めた。結果を図 (51) に示す。ATP を加えた抽出液の複素弾性率の時間変化を青い実線で、ATP を加えていない抽出液の複素弾性率の時間変化を黄色の実線で書いている。また、赤い丸印は生細胞の、桃色の丸印は ATP を枯渇させた生細胞の複素粘弾性率を表している。6.2 で述べた通り、ATP 枯渇させた生細胞は弾性的となり、貯蔵弾性率は低周波域においてプラトーが現れる。図 (51a) より、ATP を加えた抽出液の貯蔵弾性率は低周波域においても生細胞と同じ  $\omega^{0.5}$  を保っており、ATP を枯渇させた生細胞よりも流動的であるとわかる。しかし、時間経過により貯蔵弾性率が大きく上昇し、傾きも緩やかになっている。これは弾性的になっていることを表す。一方で、ATP を加えていない抽出液の貯蔵弾性率 (図 52a) は 1 Hz 以下の低周波域に存在するノイズのために見えづらくなっているが、10 Hz 近辺において傾きが小さくなり ATP を枯渇させた生細胞と類似した弾性プラトーが存在しているように見える。



**Figure 51:** ATP を添加した抽出液の貯蔵弾性率と損失弾性率の時間変化。赤い丸印が生細胞、桃色の丸印が ATP 枯渇させた生細胞を表す。青い実線が細胞抽出液を表しており、色が濃いほど試料作製から測定までの時間が経過していることを表す。



(a) 貯蔵弾性率



(b) 損失弾性率

Figure 52: ATP を添加していない抽出液の貯蔵弾性率と損失弾性率の時間変化。

複素弾性率はレオロジーを判断する良い材料となるが、時間が経過した抽出液は揺らぎが小さく、測定装置の機械的なノイズにより議論が困難な可能性がある。実際、16.1で示している揺らぎは見やすさのためにノイズを補正している。図(12)で示したように先行研究では4kHzの揺らぎから求めた生細胞と抽出液の粘性率を比較している。高周波域の揺らぎは比較的ノイズがのりにくく、比較に適している。また、先行研究では抽出液は完全な平衡系とみなされており、時間経過などは考慮されていないが、本研究では上記の揺らぎや複素弾性率の結果から、抽出液の時間経過によるレオロジーの変化が観測された。そこで本研究で測定した抽出液においても、試料作製直後と時間が経過した後でそれぞれ4kHzの揺らぎから粘性率を求め、先行研究と比較を行った。図(53)において図中の表でATPの添加の有無と抽出液の濃度を表している。溶媒にATPを含む抽出液は試料作製直後から5時間程度の時間まで急激に粘性率が増加している。一方でATPを加えていない抽出液の粘性率の上昇幅は小さい。図(54)では各試料の作製直後の粘性率を中抜きの印で表し、測定終了後の粘性率を塗りつぶした印でプロットしている。溶媒にATPを含む抽出液は異なる濃度においても試料作製直後は生細胞と同程度の粘性率を示し、時間経過によってガラス的な細胞抽出液のレオロジーに遷移していった。

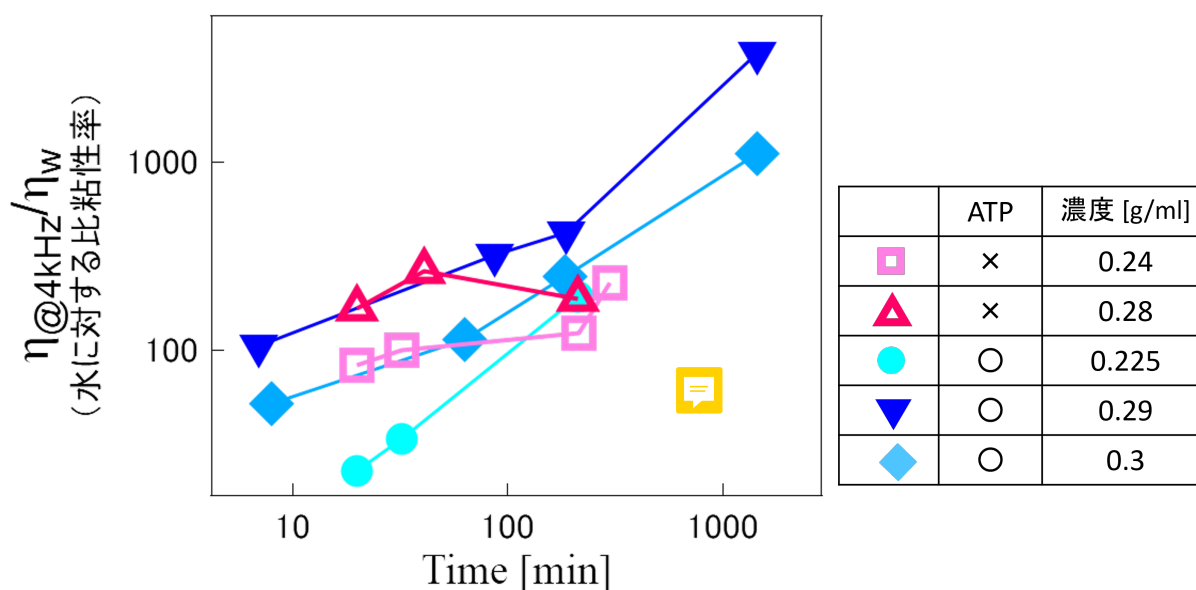


Figure 53: 水に対する比粘性率の時間変化。

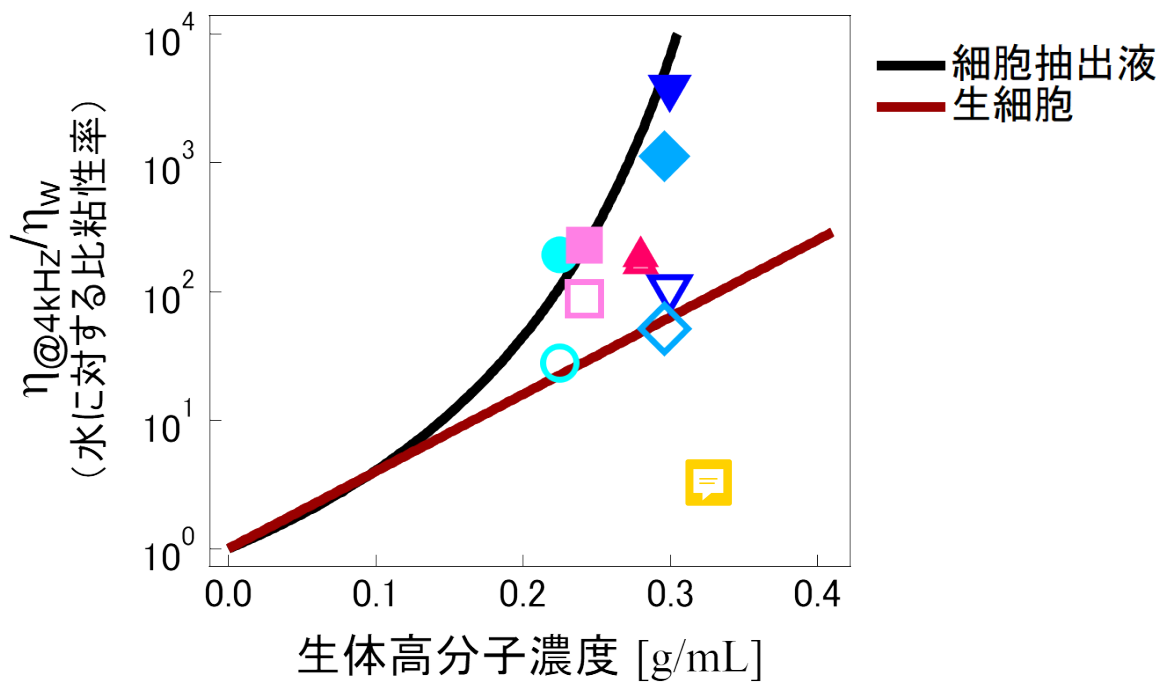


Figure 54: 細胞抽出液の粘性率の時間変化。図 (12) で示したグラフに試料作製直後および測定終了時の細胞抽出液の粘性率をプロットしている。

---

## 16.2 ルシフェラーゼアッセイ

16.1 節で ATP が細胞抽出液に影響与えることが示唆されたが、粉碎され生細胞のような秩序だった分画構造を持たない細胞抽出液が ATP を加水分解する代謝活性を維持しているか確認するためルシフェラーゼアッセイ測定を行った。L15 培地で交換した HeLa 細胞抽出液、大腸菌抽出液、Xenopus egg 抽出液で測定を行った。3.5 mM ATP を添加したのち、一定時間ごとに抽出液内部の ATP 濃度を測定し、ATP を消費していく様子を観測した。

### 16.2.1 結果

結果を図 (55) に示す。試料によっては ATP を添加せずバックグラウンドとして観測した。また、コントロールとして抽出液を洗うのに用いる L15 培地と、抽出液を洗う際にフィルターによって取り除かれる小分子溶液の ATP 濃度変化も観測し、これらに ATP を消費する能力がないことがわかった。試料ごとに添加した物質は図中の表に示している。丸印で示した HeLa 抽出液、大腸菌抽出液、Xenopus egg 抽出液は生細胞内部の ATP 濃度を約 5 時間で消費した。抽出液となっても内部の ATP を消費する何らかの代謝機構は残っていると考えられる。ここで、三角印で示されたサイトカラシン B を添加しなかった HeLa 細胞は ATP を消費しきれないが、このとき試料は図 (56) のように液体相と凝集相に相分離していた。これにより細胞質と ATP 分子が接する面積が狭くなり、反応する機構と ATP が出会う機会が減ることで消費しきれなかったと思われる。また、この相分離は ATP とともにサイトカラシン B を試料に添加すると程度が抑えられたため、アクトミオシン系による凝集と思われる。

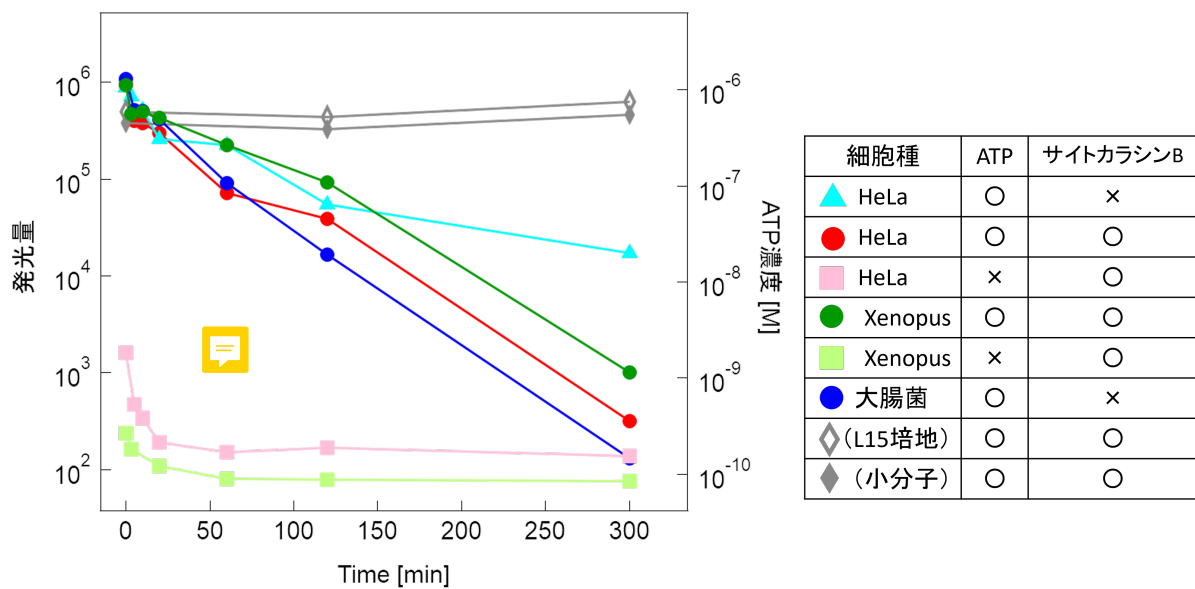


Figure 55: 3.5mM の濃度の ATP を添加した抽出液内部の ATP 濃度の時間変化。

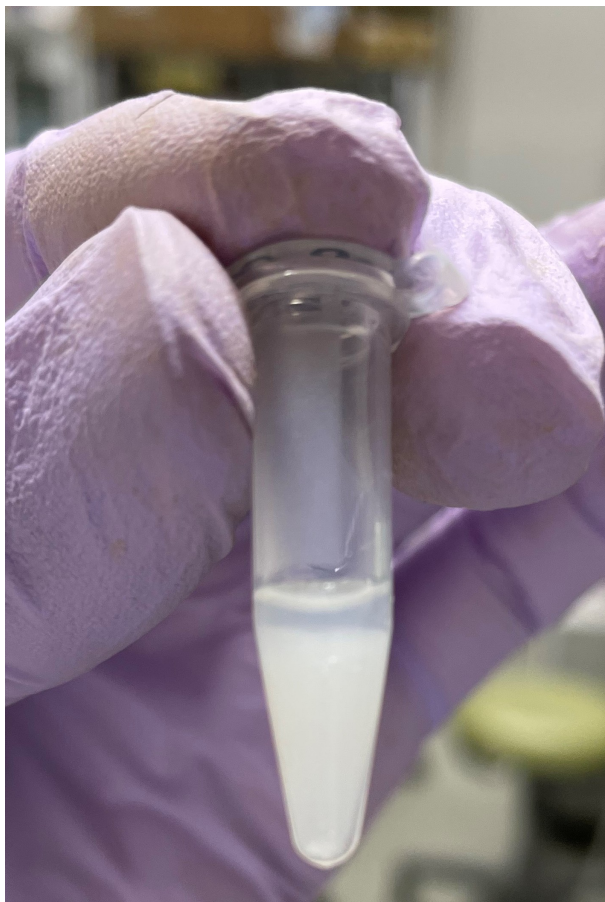


Figure 56: ATP を加えた HeLa 細胞抽出液が相分離している様子。アクトミオシンによる凝集が原因と思われる。

### 16.3 考察

抽出液が ATP を消費できることを踏まえて、細胞抽出液のレオロジーについて得られた結果を考察する。まず、抽出液は ATP の添加の有無に関わらず、非熱的な揺らぎは見られなかった。また、時間経過によって揺らぎが低下した。これはガラス系などで見られるエイジング現象ではないかと考察する。エイジング現象とはガラスを構成する物質が、時間経過によってエネルギー的に安定な配置をとるように緩和し、4.3 節で示したエネルギーランドスケープの低い位置に落ちていくことで粘性率・弾性率が上昇する現象である。図 (57) に先行研究の実験によって示されたガラスの時間経過による複素弾性率の変化を示す。

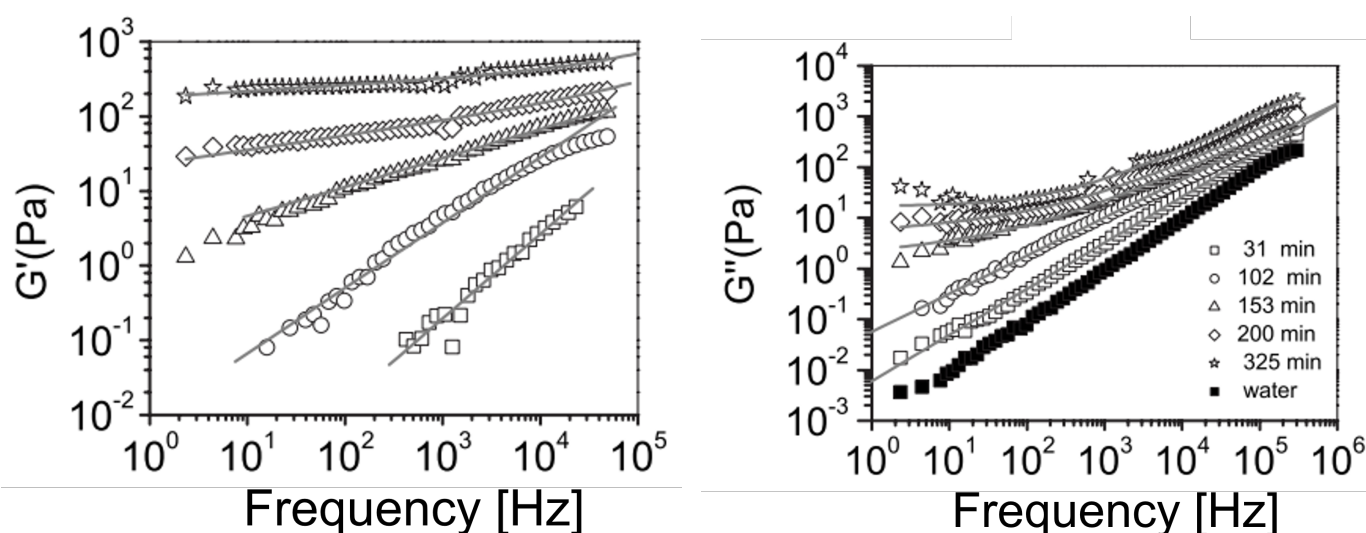
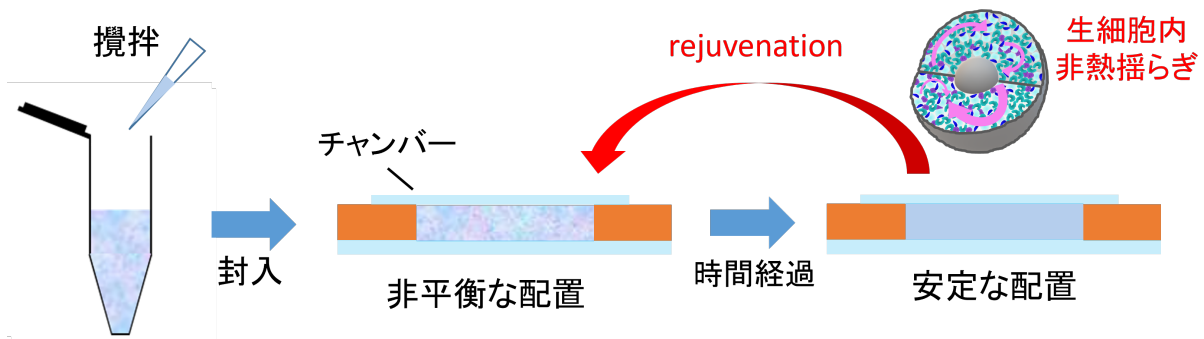


Figure 57: 時間経過によるガラスの複素弾性率の変化 [35]

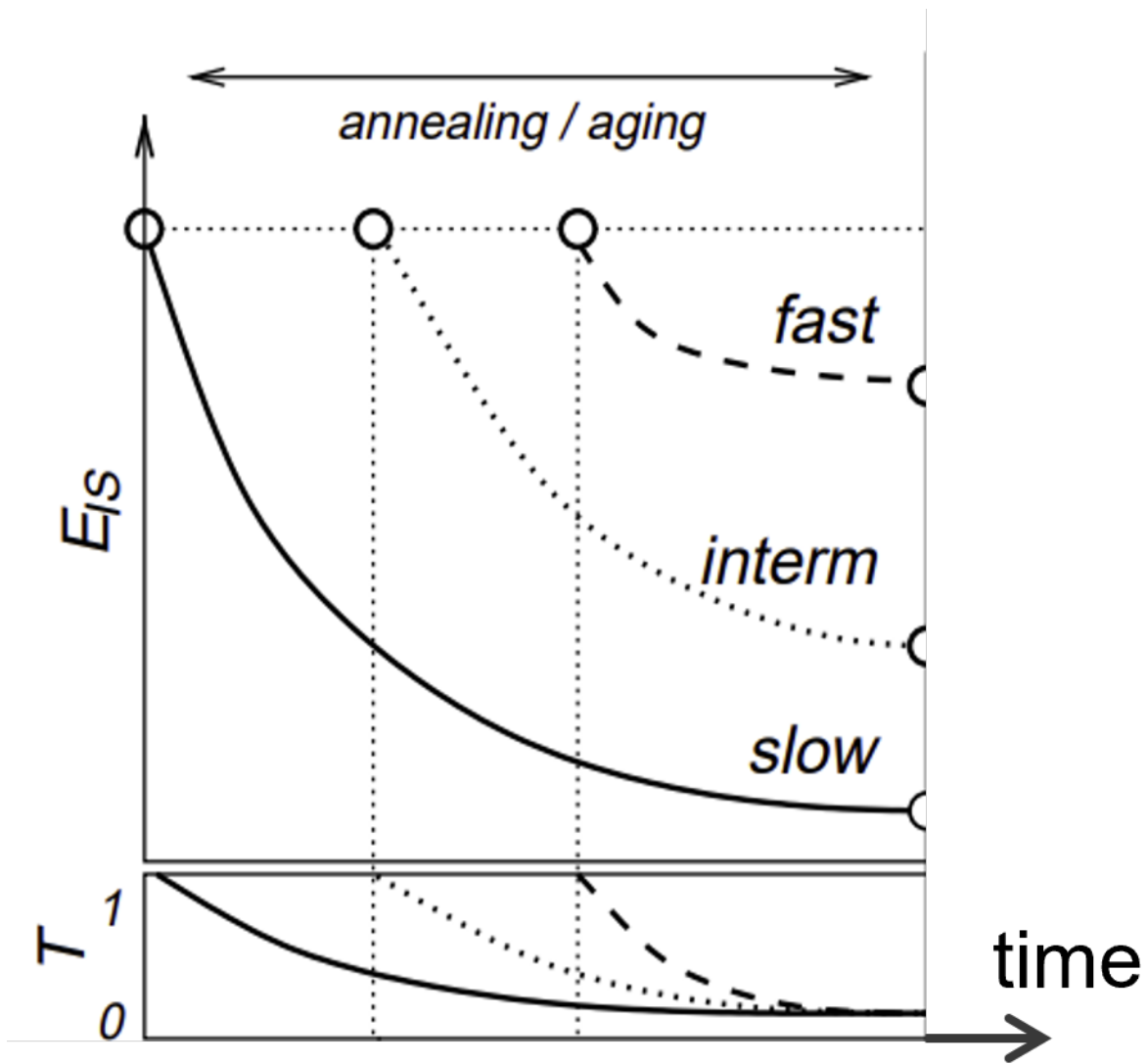
今回の計測で観測されたエイジングは以下のようにして生じたと考察する。まず、抽出液を試料としてチャンバーに封入する際、試料を均一化させるためのピペッティングなどの操作によって抽出液が攪拌され、一時的に不安定な配置となる。そしてチャンバー内で安定した配置に緩和していき、エイジングしたのではないかと考える (図 58)。

この結果から、細胞質は本来、時間経過でエイジングする性質を持つ物質であると分かった。しかし、生細胞内ではエイジング現象は見られず、一様なレオロジーが保たれている。これは生細胞内では、抽出液で見られなかった、揺動散逸定理を破れとして観測される非熱的な揺らぎ (図 44) によってエイジングと拮抗する若返り現象が起きているのではないかと推測される。



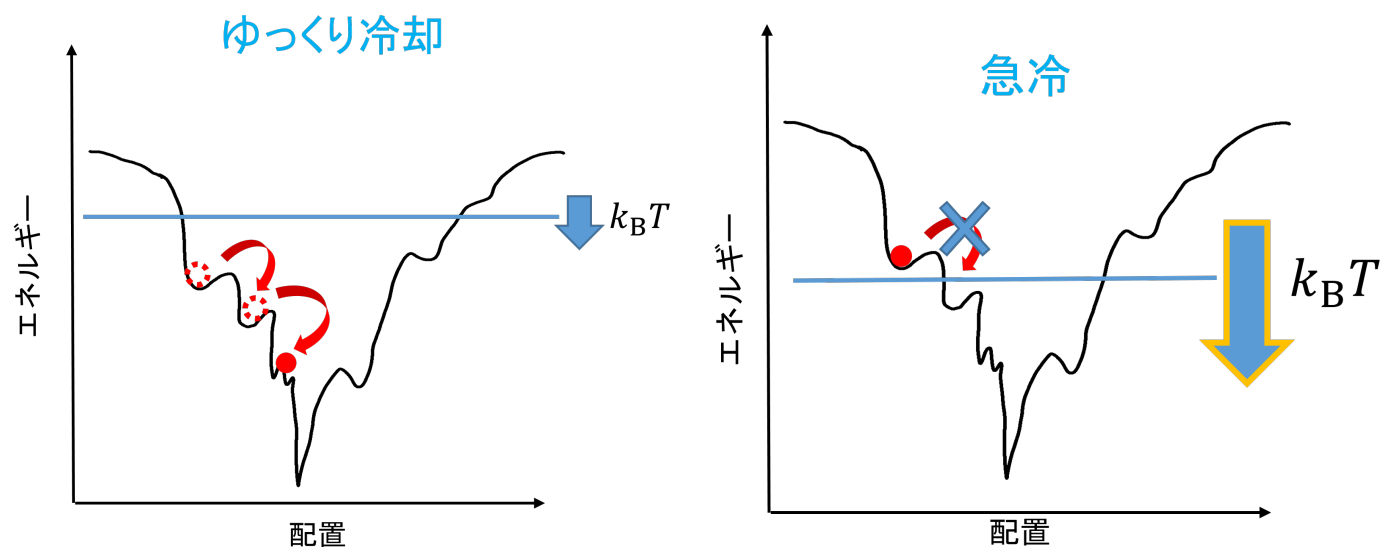
**Figure 58:** 抽出液試料のエージングの過程。生細胞内では非熱揺らぎによってエージングに拮抗する若返り現象が起きていると考えられる。

また、ATP を添加した抽出液は添加していない抽出液と比べて急激にエージングしたという結果も得られた。これはガラスのエージングに冷却速度依存性があることと同じ描像が当てはめられるのではないかと考察する。図 (59) はガラスの温度  $T$  を下げ、冷却したときのポテンシャルエネルギーの変化をシミュレーションによって求めたものである [36]。ゆっくりと冷却されたガラスはポテンシャルエネルギーが十分低くなっているが、急冷されたガラスは最終的な温度が同じであるにもかかわらずポテンシャルエネルギーは高いままとなっている。これは 4.3 節で述べたエネルギーランドスケープ描像で原理を考察できる。



**Figure 59:** ガラスの冷却に伴うポテンシャルエネルギーの低下 [36]。冷却速度によって最終的なポテンシャルエネルギーの値が異なる。

ガラスをゆっくりと冷却した場合、系の状態がエネルギーランドスケープの深い位置に落ちていき、エネルギーが低下していく過程で、複数のベイスンに一時的にとらわれつつも、遅い大きな緩和によって隣のベイスンに移ることができ、順当にエネルギーが低下していく（図 60a）。一方で急冷した場合、系のエネルギーが落ちきる前に動力学が凍結し、高い位置にあるベイスンを脱出することができなくなってしまう（図 60b）。



(a) ガラスをゆっくりと冷却したときのエネルギーランドスケープ描像

(b) ガラスを急冷したときのエネルギーランドスケープ描像

Figure 60

このような描像を今回の抽出液に置き換えて考える。上記で考察したように抽出液は試料を封入する際にピペッティングなどの操作によって攪拌され、一時的に不安定な配置となるが、これは抽出液の実効的な温度の上昇に対応する。そして抽出液を添加していない抽出液はチャンバー内で平衡状態におかれるため急冷された状態に対応する。一方で、ATPを添加した抽出液内部では、ATPを消費することで酵素たんぱく質の変形などのマイクロな非熱揺らぎが生じるのではないかと考える。このマイクロな非熱揺らぎによって系はベイスンを乗り越えて隣のベイスンに移ることができる。これはATPの消費に伴ってゆっくりと冷却していることに対応する。このようにガラスのエージングが冷却速度に依存する描像によって、ATPを添加した抽出液は急激にエージングしたと考える。

## 16.4 抽出液の相分離現象

レオロジー測定よりもさらに長い時間が経過した抽出液試料を観察すると巨視的に相分離し白濁する。また、図(61)は同時刻に作製した、ATPを添加した抽出液試料と入れていない抽出液試料である。相分離に関してもATPの有無によって白濁の程度が異なることを示している。

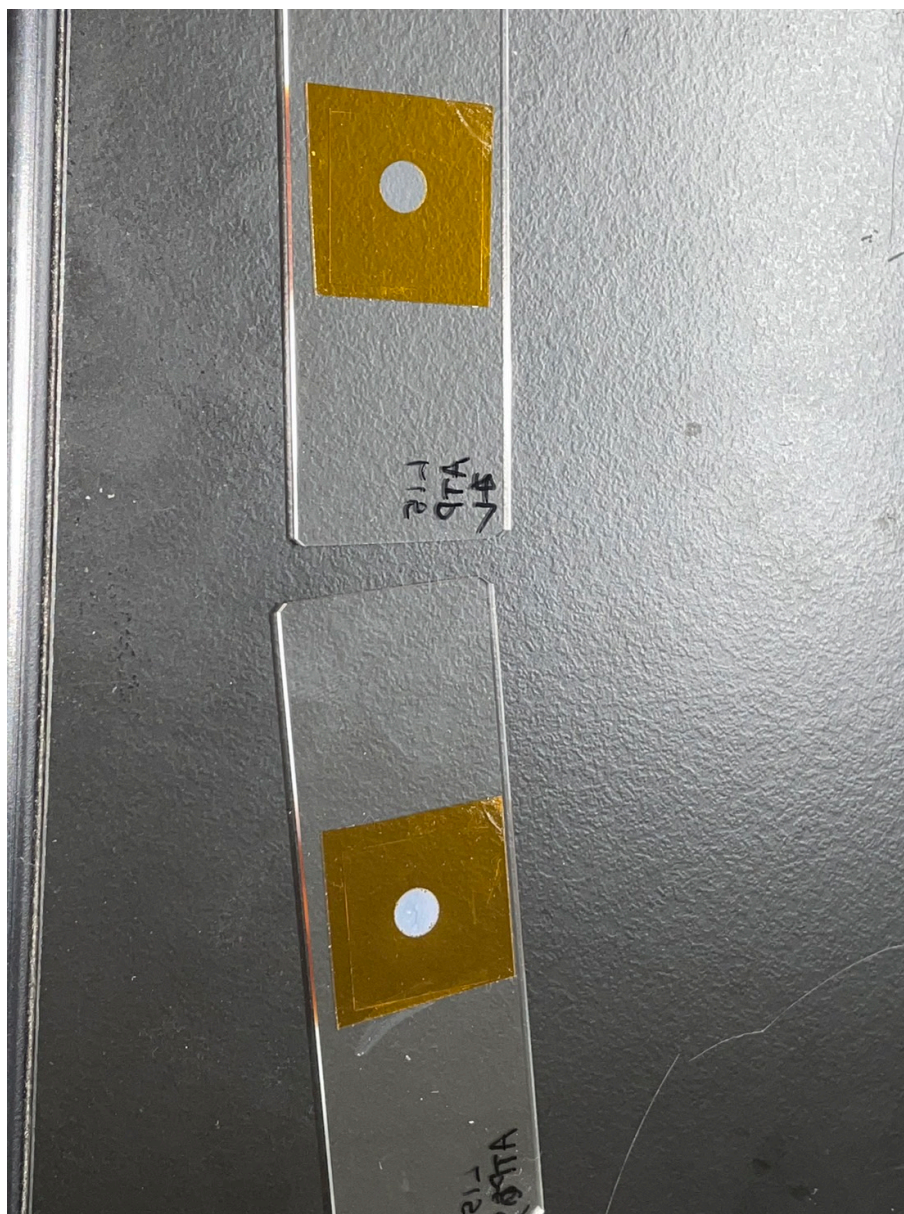
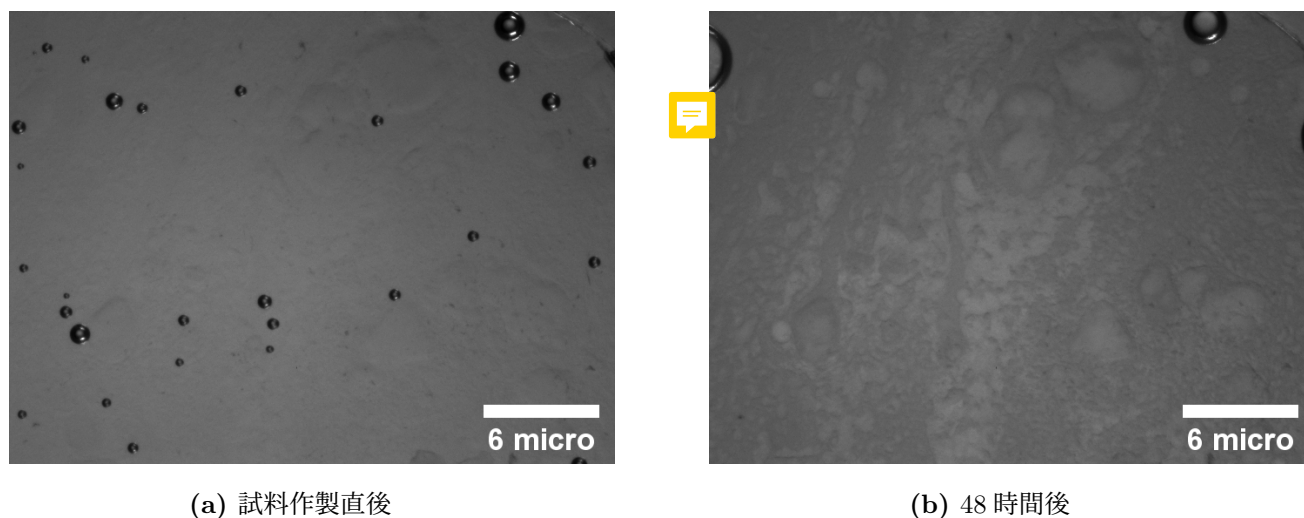


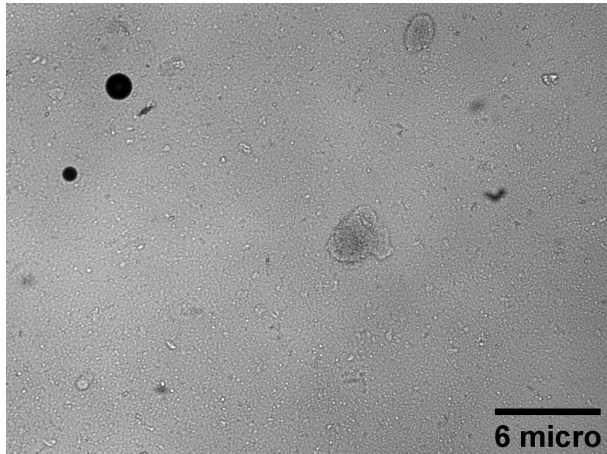
Figure 61: 同時刻に作製した ATP を添加していない抽出液（上）と添加した試料（下）

### 16.4.1 顕微鏡観察

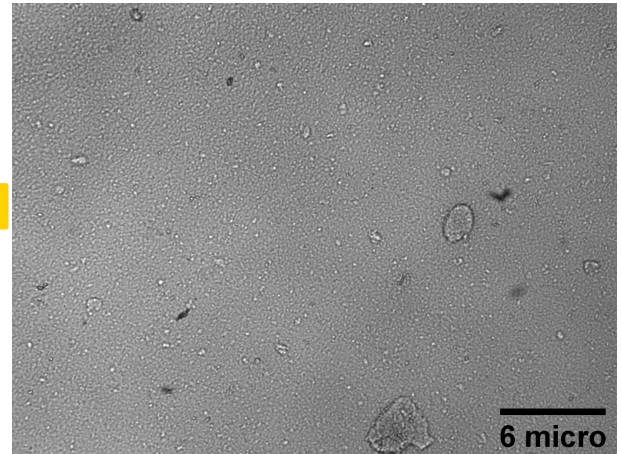
ATP が相分離に与える影響を確かめるため、濃度 0.23 g/ml の抽出液を ATP を加えたものと加えていないもので 2 つ用意し、2 日間顕微鏡観察を行った。図 (62) と図 (63) はその結果である。ATP を添加した抽出液は大きく相分離しているのに対して、ATP を添加していない抽出液はほとんど見た目が変わらなかった。また、図 (62b) はコントラストを調整すればより鮮明に分離している様子が観察できる。図 (64) にこれを示す。



**Figure 62:** 溶媒に ATP を添加した HeLa 細胞抽出液の顕微鏡画像。(a) は試料作製直後の抽出液の画像であり、(b) は同じ試料の 48 時間経過した後の画像である。明視野 4 倍の対物レンズで観察している。

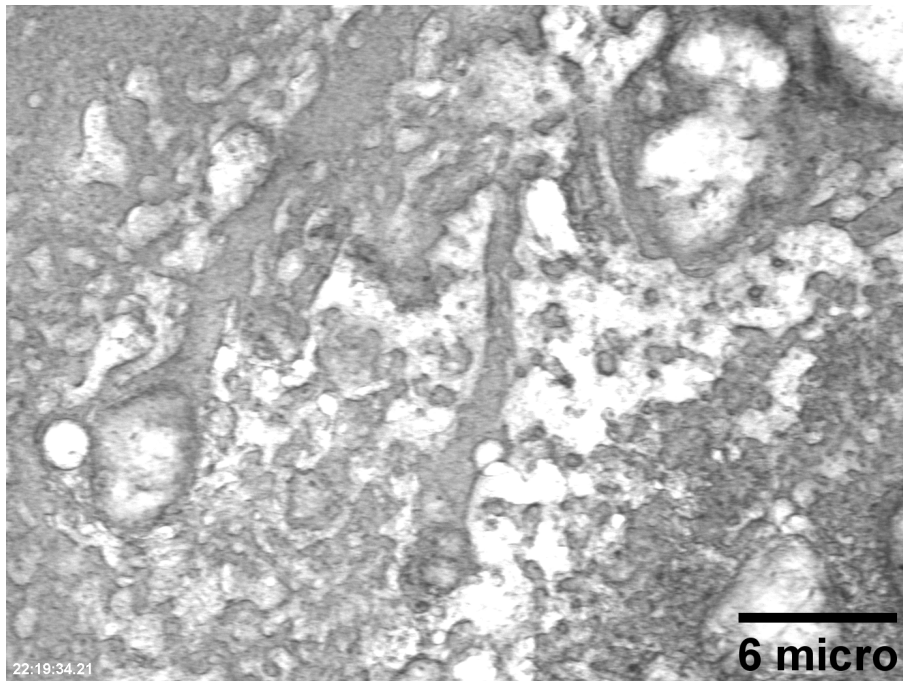


(a) 試料作製直後



(b) 48 時間後

**Figure 63:** 溶媒に ATP を添加していない HeLa 細胞抽出液の顕微鏡画像。(a) は試料作製直後の抽出液の画像であり、(b) は同じ試料の 48 時間経過した後の画像である。抽出液の濃度は 0.23 g/ml であり明視野 4 倍の対物レンズで観察している。



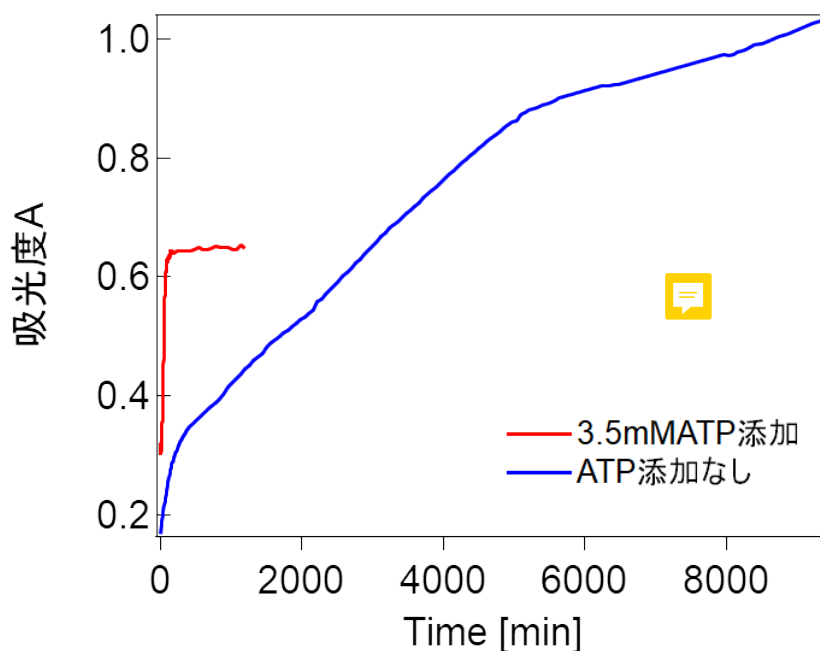
**Figure 64:** 図 (62b) のコントラストを調整したもの。

## 16.4.2 吸光度測定による濁度の計測

顕微鏡観察により ATP を加えた抽出液では、加えていないものに比べ短い時間で相分離することがわかった。抽出液が相分離すると全体が白濁する。これに伴って吸光度が変化すると予測を立て、相分離の様子を定量的に表す手段の一つとして吸光度測定を行った。3.5 mM ATP を添加しながら洗った抽出液と、ATP を入れずに洗った抽出液を用意し 0.15 g/ml まで濃厚化して厚さ 1 mm のチャンバーに封入し試料とした。また、どちらの試料にもサイトカラシン B を濃度が 0.1 M となるように加え、細胞骨格の働きを阻害した。

### 結果

結果は図 (65) のようになった。赤い実線が ATP を添加した試料の、青い実線が ATP を添加していない試料の吸光度の時間発展である。議論をする前に ATP を添加した試料の吸光度がかなり早い段階で飽和している。最終的に真っ白に白濁する抽出液の吸光度が 0.6 で飽和するとは考えにくい。恐らく気泡などが生じ、一定の光がそのまま透過していると考えられる。そこでまず、これを補正する。



**Figure 65:** 吸光度測定測定の結果。赤い実線が ATP を添加した抽出液の、青い実線が ATP を添加していない抽出液の吸光度の時間変化を表す。

本来の吸光度は式 (54) で求められる。しかし、光を当てる試料に気泡が入るなどして一定の割合  $x$  で光が透過していくとき出力される吸光度  $a$  は以下ようになる。

$$a = -\log_{10} \frac{(1-x)I_{\text{out}} + xI_{\text{in}}}{I_{\text{in}}} \quad (55)$$

時間が十分に経過して試料の吸光度が上昇すると、透過光のほとんどは気泡部分などを直接抜けてきた光となる。つまり

$$(1-x)I_{\text{out}} \ll xI_{\text{in}} \quad (56)$$

が成り立つ。このとき式 (55) は

$$a = -\log_{10} \frac{xI_{\text{in}}}{I_{\text{in}}} = -\log_{10} x \quad (57)$$

図 (65) より、今回の測定では値が飽和している  $a = 0.645$  程度でこの状態になっていると考えられる。したがって透過光の割合  $x$  が  $x = 10^{-0.645} \simeq 0.226464$  とわかる。

求めたいのは  $a = -\log_{10} \frac{(1-x)I_{\text{out}} + xI_{\text{in}}}{I_{\text{in}}}$  のときの  $-\log_{10} \frac{I_{\text{out}}}{I_{\text{in}}}$  であるから、

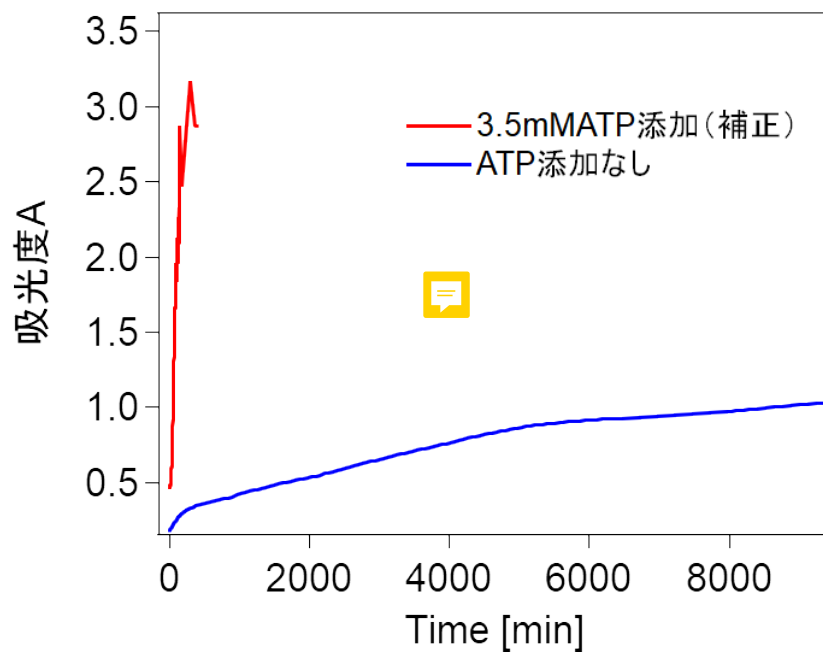
$$a = -\log_{10} \frac{(1-x)I_{\text{out}} + xI_{\text{in}}}{I_{\text{in}}} \quad (58)$$

$$10^{-a} = (1-x) \frac{I_{\text{out}}}{I_{\text{in}}} + x \quad (59)$$

$$-\log_{10} \frac{I_{\text{out}}}{I_{\text{in}}} = -\log \left( \frac{10^{-a} - x}{1-x} \right) \quad (60)$$

$x$  は既知であるため測定されていた  $a$  から本来の吸光度  $A$  を見積もることができる。図 (65) を補正した結果を図 (66) に示す。

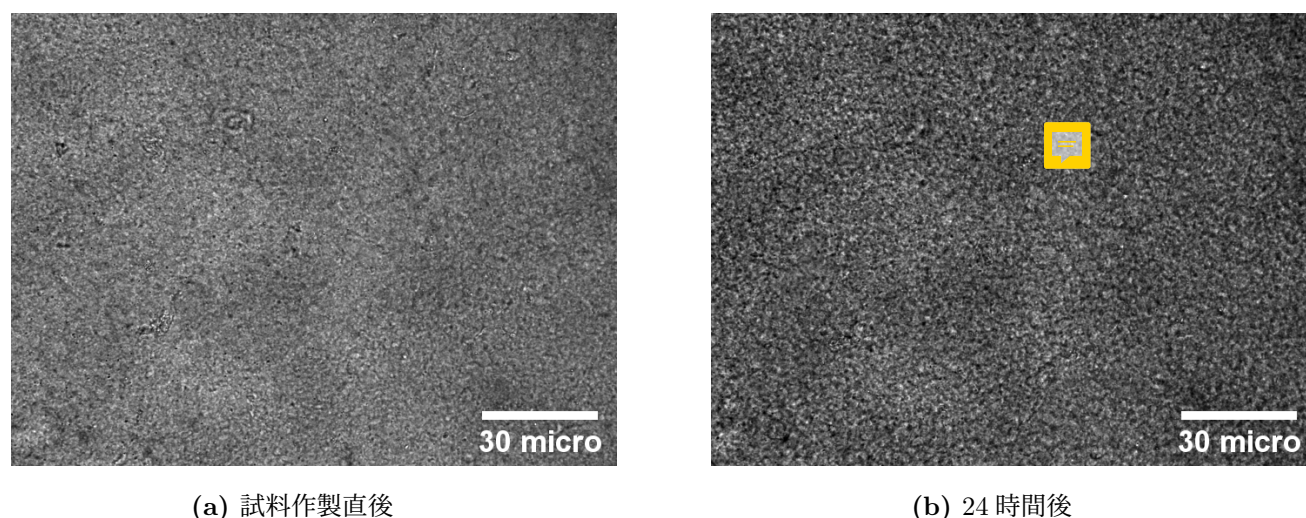
吸光度の上昇幅の差は明らかである。ATP を加えた抽出液は測定開始直後から白濁していつている。  $t = 0$  の値が異なることから、試料を測定装置にセットする間にも相分離が進行していると考えられる。次節でも言及するがこの相分離の時間スケールはこの測定に用いた抽出液の濃度の低さに起因すると考えられる。



**Figure 66:** 補正した吸光度測定結果。ATP を添加した抽出液試料（赤い実線）と ATP を添加していない抽出液試料（青い実線）の吸光度の時間変化を表す。ともに濃度は 0.15 g/ml である。

### 16.4.3 高濃度の抽出液のゲル化

レオロジー測定を行っているような生細胞内濃度程度の高濃度の試料では ATP を加えても前節で見られたような短時間に相分離は発生しない（だからこそ長時間のレオロジー測定が可能であった）。また、図（64）のように大きな構造を伴わない形質変化をする。その様子図（67）に示す。20 倍の対物レンズで撮影している。大きな構造体は見られないが全体が白濁によって暗くなり、特徴的な模様が広がっているように見える。

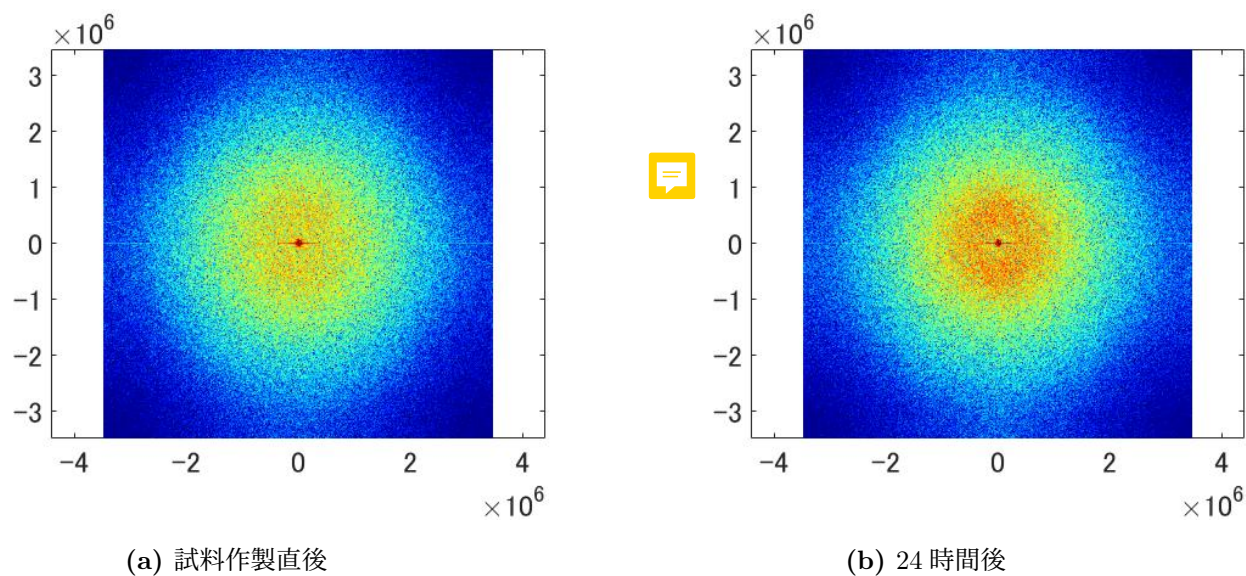


**Figure 67:** ATP を添加した高濃度（0.29 g/ml）の抽出液の顕微鏡画像。明視野 20 倍の対物レンズで撮影。

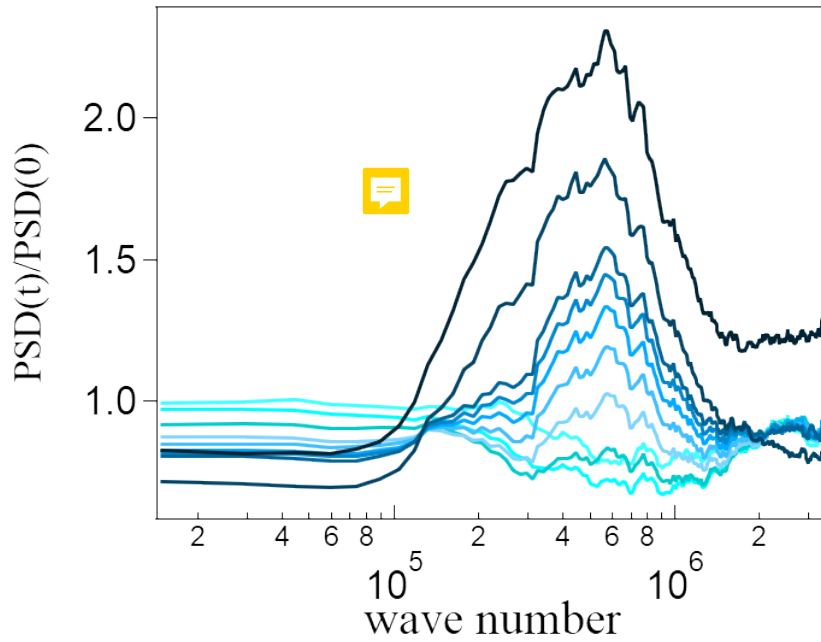
### FFT 画像解析

この変化を定量的に表現するため図（67）をフーリエ変換により画像処理を行った。図（68）に波数空間におけるパワースペクトルのカラーマップを示す。(a) が図（67a）を解析したものであり (b) が図（67b）を解析したものである。24 時間後の試料には中心付近で黄色い色が強くなっておりパワースペクトルパターン構造が等方的に成長していることを示唆する。実際にパワースペクトルが大きくなっていると思われる波数あたりを見つけ、中心からの距離で角度積分したのが図（69）である。横軸が波数の絶対値であり、縦軸はある時刻  $t$  のパワースペクトルを時刻  $t = 0$  のパワースペクトルで割ったものである。実線の色が濃いほど時間が時刻  $t$  の値が大きい。成長しているパワースペクトルの逆数からパターンの大きさが約 10 数 [ $\mu\text{m}$ ] であると分かった。構造の大きさが近いこと、高濃度の抽出液であること、粘弾性特性が大きく異なる溶質と溶媒で構成されている、という特徴から、これは濃厚なたんぱく質相で、相分離の直後にゲルが形成されたのち溶媒が排出されてスポンジ状

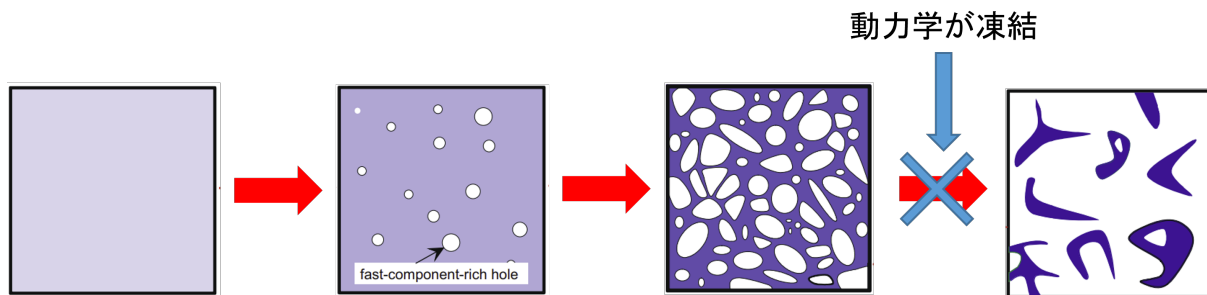
のネットワークが残る粘弾性相分離の一種だと考えられる (図 70) [37]。



**Figure 68:** 図 (67) を FFT 画像解析した結果。24 時間後の試料は等方的なパターンの成長が示されている。



**Figure 69:** 一定時間ごとのパワースペクトルを時刻0のパワースペクトルで割った値を、波数の絶対値を横軸としてプロットしている。



**Figure 70:** 粘弾性相分離が起きる過程の模式図。溶質と溶媒が一樣な状態（左）から粘弾性の小さい相が凝集（左から二番目）しだし、粘弾性の高い相がスポンジ状となる（右から二番目）。このままゲル化して完全に相分離（右）することなく構造が残る。[37]

## 16.5 考察

得られた結果をまとめると図 (71) のようになる。ATP の添加や抽出液の濃度によって相分離現象に違いが見られた。これを考察するために 5.2 節で触れた図 (16) を考える。この相図は平衡系のたんぱく質で考えられてきたものであり、ATP による代謝が加わると変化する。特に緑色で描かれたゲル相はアクティブな力生成によって高濃度側に移行すると考えられている。16.3 節で述べたように、抽出液は試料を作る過程で一時的に実効的な温度が上昇し、ATP の添加により冷却の速度が変化する。これを踏まえて以下のように考察する。

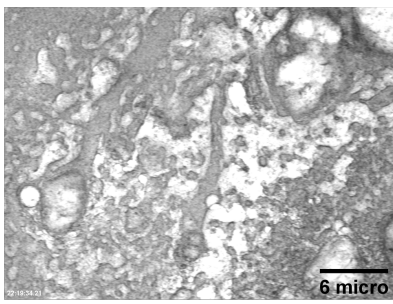
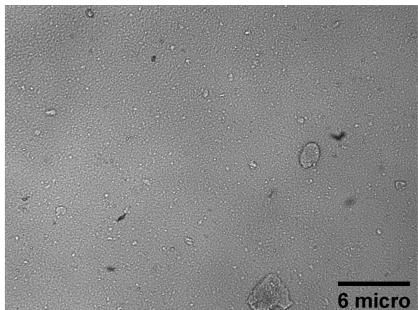
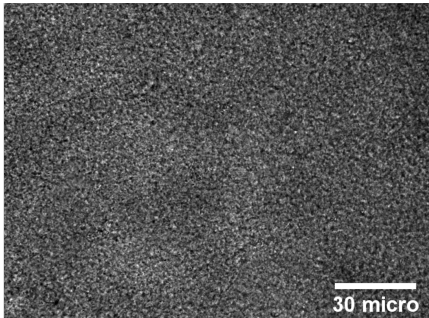
	ATP 添加	ATP なし
低濃度 0.23 g/ml	相分離 	ゲル化 
高濃度 0.29 g/ml	ゲル化 (粘弾性相分離) 	

Figure 71

抽出液の状態は相図上では図 (72) のように相分離相とゲル相が重なる部分に位置しているのではないかと考える。この状態では抽出液はゲル化にしてしまい、相分離は起こらない。しかし、チャンバーに封入する際の実効温度の上昇によりゲル相が高濃度側に遷移し、チャンバー内で冷却され再びゲル相が元の位置に戻る過程で一時的に抽出液は相分離相に存在することになる (図 73)。このとき ATP を添加していない抽出液は急冷されている状態

に対応するため、相分離が起こる前に瞬時にゲル相が元の位置に戻るのに対し、ATP を添加したほうはマイクロな非熱揺らぎによってゆっくりとゲル相が戻り、相分離と考えられる。高濃度の抽出液の場合は、チャンバーに封入する際に、同様に実効温度は上昇するものの、濃度が高いためにゲル相から抜けだすには至らず、大きな相分離が見られなかったのではないかと考える（図 74）。実際の生細胞内ではゲル化は起こっておらず、相分離によって生じた凝集体が重要な役割を果たしていると考えられている。代謝によってゲル相や相分離相がコントロールされていると考えられる。

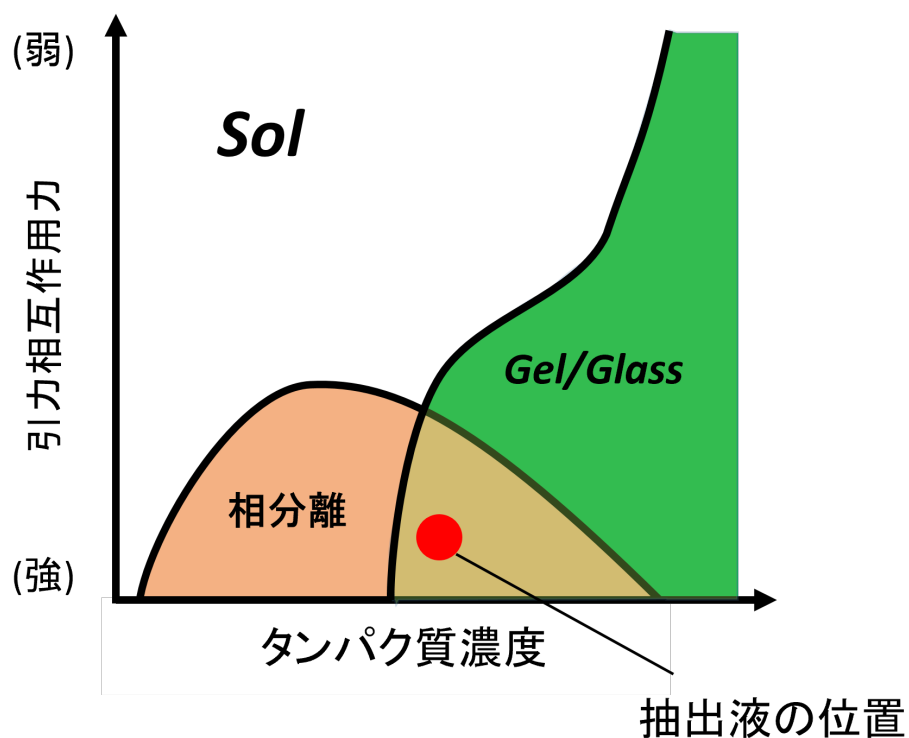


Figure 72: 相図上の抽出液の位置

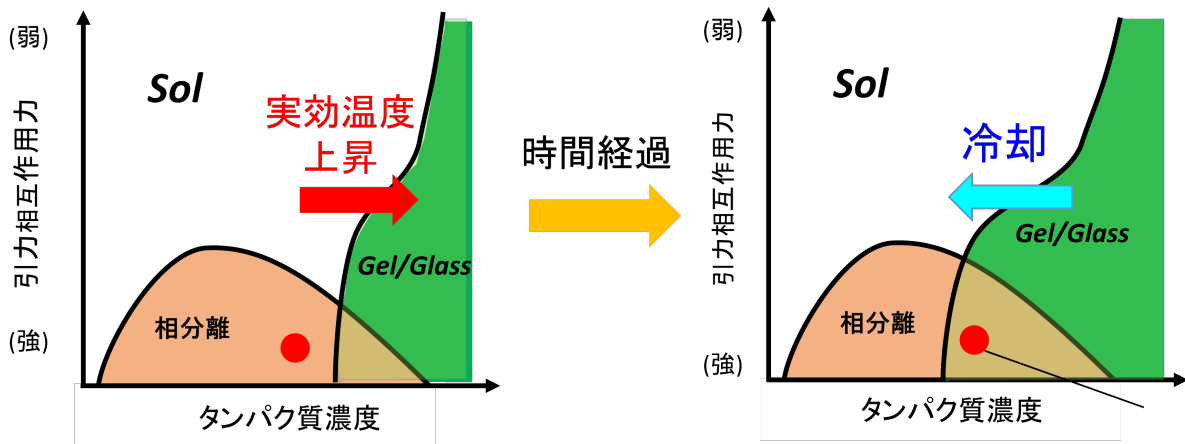


Figure 73: 実効温度の上昇による相図の変化

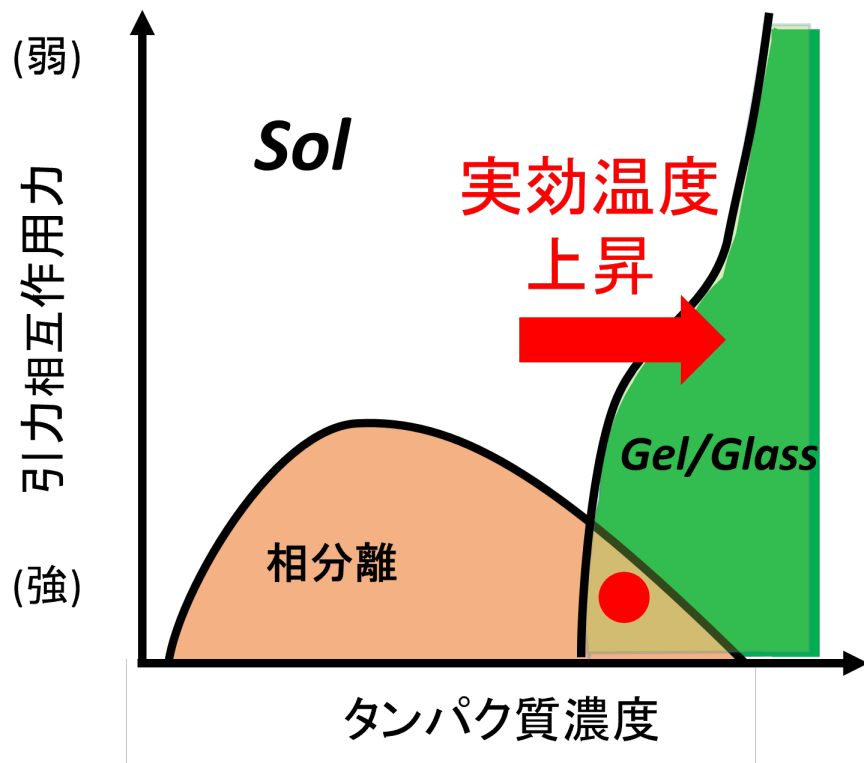


Figure 74: 高濃度抽出液の実効温度の上昇による相図の変化。ゲル相が高濃度側に遷移後もゲル相から抜け出せない。

---

## Part V

# 結論と展望

## 17 結論と展望

### 17.1 結論

本研究では複雑な反応経路を持つ生細胞の単純かつ代謝を制御可能なモデル系として細胞抽出液を用いて、レオロジーと代謝活性の関係を調べた。

ATP の添加の有無に関わらず細胞抽出液は、閉鎖系チャンバーに封入した直後は揺らぎが大きく、4 kHz の揺らぎから求めた粘性率は同濃度の生細胞と同程度まで流動化していた。しかし、PMR に必要な時間スケールで激しくエイジングした。ATP を添加した抽出液は特に大きくエイジングし最終的には、Vogel-Fulcher 則で予測されたガラス的な抽出液のレオロジーへ遷移した。これはガラスのエイジングが冷却速度に依存する描像で考察がなされた。ATP が抽出液のレオロジーに影響を与えていること示唆されたため、これを確かめるためルシフェラーゼアッセイ測定を行い、抽出液中に添加した ATP 濃度の時間変化を追跡した。その結果、細胞骨格による分離をサイトカラシン B によって抑えれば、今回主に計測に用いた HeLa 細胞抽出液だけでなく原核細胞の大腸菌抽出液や *Xenopus* egg 抽出液も、生細胞内濃度とされる 3.5 mM ATP を 5 時間程度で消費した。これらの結果から、抽出液の状態となっても細胞は代謝活性の何らかの機構を残しているとわかった。

マイクロレオロジー終了後の長い時間が経過した閉鎖系チャンバーの観察により ATP が抽出液の相分離にも影響を与える可能性が示唆され、顕微鏡観察を行った。その結果を ATP を添加した抽出液は短時間で大きく相分離した一方で同濃度で同時刻に作製した ATP を添加していない抽出液はほとんど見た目が変わらなかった。相分離の様子を定量的に表す手段として吸光度測定を行い、ATP を添加した抽出液が添加していないものに比べて、非常に短時間に吸光度を上昇させ相分離する様子を測定した。一方で、生細胞内部程度の高濃度の細胞抽出液は ATP を添加しても大きく相分離することはなく、全体に 10 数  $\mu\text{m}$  の大きさを持つ特徴的なパターンが生じた。この結果から、抽出液の試料によってはゲル・ガラス相と相分離相が重なる相に分布し、試料を封入する際の実効的な温度の上昇によってゲル・ガラス相を脱した際に相分離が生じると考察する。生細胞濃度程度の抽出液において生じたパターンは、相分離過程で過渡的に生じたネットワーク上のたんぱく質が、二相に分かれるに

至る前にゲル化して生じた粘弾性相分離によるものだと考えられる。これにより細胞抽出液が、たんぱく質濃度と引力相互作用によって描かれるたんぱく質相図の中で代謝活性によってゲル・ガラス相を高濃度側まで押し広げることで流動的になる描像が示唆された。

## 17.2 展望

本研究では試料はすべて閉鎖系のチャンバーを用いた。そのため抽出液の代謝によって代謝副産物が生じ測定結果に影響を及ぼす可能性がある。特に、ATP を添加した抽出液の短時間での急激なエイジングは、代謝副産物の影響を考えざるをえない。また、そこで今後は交換チャンバー（図 75） [34] という半透膜を介して外液と物質を交換可能なチャンバーを用いて測定を行い、代謝活性物質を取り除きつつ、継続的に抽出液の ATP 濃度を維持した状態で計測を行う。

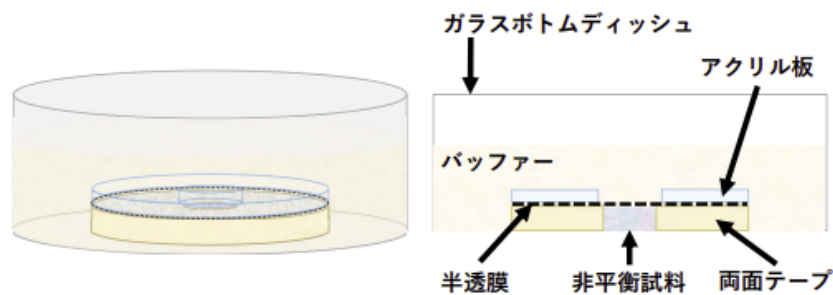


Figure 75: 交換チャンバー（仮）

---

## Part VI

# 付録

## 18 4kHzの揺らぎから求める粘性

4kHzの揺らぎから粘性率を求める方法を記す。式(33)と高周波域で応答関数の実部と虚部が一致することから以下の関係が成り立つ。

$$G''(\omega) = \frac{\alpha''}{6\pi a|\alpha|^2} \quad (61)$$

$$= \frac{1}{12\pi a\alpha''} \quad (62)$$

加えて、揺動散逸定理より

$$\alpha'' = \frac{\omega \langle |\tilde{u}(\omega)|^2 \rangle}{2k_B T} \quad (63)$$

また、単純粘性体において

$$\eta = G''/\omega \quad (64)$$

したがって

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi a \omega^2 \langle |\tilde{u}(\omega)|^2 \rangle} \quad (65)$$

---

## References

- [1] 土井正男. ソフトマター物理学入門
- [2] Essential 細胞生物学
- [3] C. A. Angell. Formation of glasses from liquids and biopolymers. *Science*, Vol.267, No. 5206, pp. 1924–1935, 1995. 267, No. 5206, pp. 1924–1935, 1995.
- [4] 金 鋼. ガラス転移のフラジリティと動的不均一性：モデル依存性の系統的な解析. *アンサンブル*, Vol.16, No.2, April 2014, 66 号
- [5] Hunter, G. L.; Weeks, E. R. *Reports on Progress in Physics* 2012, 75, (6)
- [6] T.Odagaki, Glass Transition Singularities, *Phys. Rev. Lett.* 75, 3701 (1995)
- [7] T.Odagaki, Non-Ergodicity and Non-Gaussianity in Vitrification Process, *Phys. Suppl.* 126, 9 (1997)
- [8] T.Odagaki, Free Energy Landscape Approach to Glass Transistio, *日本中性子科学会誌「波紋」*, Vol.16, No.1, 2006
- [9] Kenji Nishizawa, Kei Fujiwara, Masahiro Ikenaga, Nobushige Nakajo, Miho Yanagisawa, and Daisuke Mizuno. Universal glass-forming behavior of in vitro and living cytoplasm. *Scientific Reports*, Vol. 7, No. 1, pp. 1–12, 2017.
- [10] Rituparno Mandal, Pranab Jyoti Bhuyan, Madan Rao, and Chandan Dasgupta. Active fluidization in dense glassy systems. *Soft Matter*, Vol. 12, No. 29, pp. 6268–6276, 2016.
- [11] Simon Alberti. The wisdom of crowds: regulating cell function through condensed states of living matter. *Journal of cell science*, Vol. 130, No. 17, pp. 2789–2796, 2017.
- [12] Louise Jawerth. Protein condensates as aging Maxwell fluids. *Sicence*, p1317-1323, 2020
- [13] Avinash Patel, Hyun O Lee, Louise Jawerth, Shovamayee Maharana, Marcus Jahnelt, Marco Y Hein, Stoyno Stoyanov, Julia Mahamid, Shambaditya Saha, Titus M Franzmann, et al. A liquid-to-solid phase transition of the als protein fus accelerated by disease mutation. *Cell*, Vol. 162, No. 5, pp. 1066–1077, 2015.

- 
- [14] Kenji Nishizawa, Marcel Bremerich, Heev Ayade, Christoph F. Schmidt, Takayuki Ariga, and Daisuke Mizuno. Feedback-tracking microrheology in living cells. *Science Advances*, Vol. 3, No. 9, pp. 1-13, 2017.
- [15] H.Ebata, K.Umeda, K.Nishizawa, W.Nagao, S.Inokuchi, Y.Sugino, T.Miyamoto, D.Mizuno. Activity-dependent glassy cell mechanics I : Mechanical properties measured with active microrheology.
- [16] F C Mackintosh and C F Schmidt. *Microrheology. Current Opinion in Colloid & Interface Science*, pp. 300–307, 1999.
- [17] Pietro Cicutta and Athene M. Donald. *Microrheology: A review of the method and applications. Soft Matter*, Vol. 3, No. 12, pp. 1449–1455, 2007.
- [18] T. G. Mason and D. A. Weitz. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. *Physical Review Letters*, Vol. 74, No. 7, pp. 1250–1253, 1995.
- [19] F. Gittes, B. Schnurr, P. D. Olmsted, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt. Microscopic viscoelasticity: Shear moduli of soft materials determined from thermal fluctuations. *Physical Review Letters*, Vol. 79, No. 17, pp. 3286–3289, 1997.
- [20] B. Schnurr, F. Gittes, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt. Determining microscopic viscoelasticity in flexible and semiflexible polymer networks from thermal fluctuations. *Macromolecules*, Vol. 30, No. 25, pp. 7781–7792, 1997.
- [21] T. G. Mason, K. Ganesan, J. H. Van Zanten, D. Wirtz, and S. C. Kuo. Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*, Vol. 79, No. 17, pp. 3282–3285, 1997.
- [22] John C. Crocker, M. T. Valentine, Eric R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh, and D. A. Weitz. Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Physical Review Letters*, Vol. 85, No. 4, pp. 888–891, 2000.
- [23] Daisuke Mizuno, Catherine Tardin, C. F. Schmidt, and F. C. MacKintosh. Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science*, Vol. 315, No. 5810, pp. 370–373, 2007.

- 
- [24] Frederick Gittes and Christoph F. Schmidt. Interference model for back-focalplane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters*, Vol. 23, No. 1, p. 7, 1998.
- [25] D. Mizuno, D. A. Head, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt. Active and passive microrheology in equilibrium and nonequilibrium systems. *Macromolecules*, Vol. 41, No. 19, pp. 7194–7202, 2008.
- [26] Jingyuan Xu, Andre Palmer, and Denis Wirtz. Rheology and microrheology of semiflexible polymer solutions: Actin filament networks. *Macromolecules*, Vol. 31, No. 19, pp. 6486–6492, 1998.
- [27] L. D. Landau, E. M. Lifshits, and L. P. Pitaevskii. *Statistical Physics*. Oxford; New York, 1980.
- [28] Frederick Gittes and Christoph F. Schmidt. *Signals and Noise in Micromechanical Measurements*. *Methods in Cell Biology*, 1997.
- [29] Tsvi Tlusty, Amit Meller, and Roy Bar-Ziv. Optical gradient forces of strongly localized fields. *Physical Review Letters*, Vol. 81, No. 8, pp. 1738–1741, 1998.
- [30] Ai Tang Chang, Yi Ren Chang, Sien Chi, and Long Hsu. Optimization of probe laser focal offsets for single-particle tracking. *Applied Optics*, Vol. 51, No. 23, pp. 5643–5648, 2012.
- [31] MT Valentine, ZE Perlman, ML Gardel, Jennifer Hyunjong Shin, P Matsudaira, TJ Mitchison, and DA Weitz. Colloid surface chemistry critically affects multiple particle tracking measurements of biomaterials. *Biophysical journal*, Vol. 86, No. 6, pp. 4004–4014, 2004.
- [32] K.Nishizawa, D.Mizuno. 高分子混み合いに伴う細胞内ガラス的挙動のマイクロレオロジー研究, 2015
- [33] Yoshio Suzuki. *Analytical Methods of Total Proteins*. ぶんせき, 2018.
- [34] Y.Sugino, D.Mizuno, 代謝回転を導入した細胞質モデルの力学計測, 2020.
- [35] S. Jabbari-Farouji, High-bandwidth viscoelastic properties of aging colloidal glasses and gels, *Phys. Rev.*78, 2008

- 
- [36] Marcel Utz, Pablo G. Debenedetti, Frank H. Stillinger, Atomistic Simulation of Aging and Rejuvenation in Glasses, *Phys. Rev. Lett*, Vol84, No.7
- [37] T.Hijima, Viscoelastic phase separation in biological cells, *Nature*, 2022.

---

# 謝辞

本論文を書き上げるにあたって、多くの方に感謝しきれないほどのご指導・ご協力をしていただきました。水野先生は、なかなか研究が進まない私に最後まで根気強く付き合ってください、休日・深夜問わず相談にのっていただきました。4年生の頃から、何度も私はどこに向かえばいいのかとわからなくなりましたが、その度に研究背景から丁寧に説明していただき、示唆を与えていただきました。今私がこの文章を書けているのは、水野さんのご尽力・ご指導があったからです。凡庸な言葉で申し訳ありませんが、本当にありがとうございました。

江端先生は何度か一緒に実験を行ったり、普段から居室にいらっしゃったりすることもあり、私たちに近い立場で相談をさせていただきました。にこやかで柔らかな言葉遣いで研究以外の話も楽しくお話をさせていただいた一方で、研究の質問には的確な答えを返して下さる江端先生は非常に心強かったです。ご家庭に一度帰られた後、夜分遅くにも関わらず私が何度も何度も送る slack や電話に対応して下さったことには頭が上がりません。大変ご迷惑をおかけしました。ありがとうございました。

植松先生は副指導教官を引き受けてくださりありがとうございました。なかなかご相談に伺うことはできませんでしたが、居室にいらっしゃった際には気軽に話しかけていただき、研究の合間に楽しく世間話をさせていただきました。私が論文をなかなか読み進められず困っていたときに、さらさらとホワイトボードに明快に説明していただき、感動したことを覚えています。他大学にご転出後も時折お声をかけていただき励みになりました。

杉野さんには私が研究室に入ったばかりのときから、時には隣で指導していただき、時にはアイドルについて語り、時には叱っていただきました。私の未熟さゆえに4年生のころは杉野さんの叱咤を受け入れられないこともありましたが、あのときの杉野さんの指導のおかげで研究をやりきることができました。ありがとうございました。研究室の取りまとめとして常に忙しくされている中でも、私が質問したときには手をとめ、丁寧に教えていただきました。水野研に所属していた三年間を杉野さんと共に過ごすことができたことを大変幸運に思います。

OBの先輩方には研究だけでなく個人的な相談にもものっていただきました。特に井口さん、荊原さん、江藤さんにはキャッチボールや、卒業された後の zoom でのおしゃべりなど、研究室を飛び出して仲良くしていただきました。先輩方が必死に発表資料を作る背中や、社会人として頑張っている姿に感化され研究に取り組むことができました。ありがとう

---

ございます。

同じ研究室で唯一の同期であった富田君にも大変お世話になりました。修士二年間で、恐らく最も長く時間を過ごしたのが富田君ではないでしょうか。富田君は修士一年生から水野研の仲間入りをし、私より一年遅い加入であったにもかかわらずメキメキと理論的知識と測定技術を身に着け、意欲的に研究に取り組む姿を見て尊敬していました。富田君は僕よりも一歩も二歩も先にいきながらも、常に最も近くで、隣で、並走し、戦ってくれました。この修士生活の二年間で心が折れそうになった瞬間が何度あったかわかりません。研究室に向かうことができない期間もありました。そのたびに富田君の「学食いこう」に助けられ、足を引きずりながらも走りぬくことができました。どんな感謝の言葉でも伝えきれませんが、二年間ありがとうございました。

松岡君、濱田君、吉良君、杜海洋さん、安部君、田尾君とは居室での雑談の中で見えていなかった部分に気づくことができたり、一緒に測定することでわかったつもりになっていた部分の理解を深めることができたりしました。私は、杉野さんやOBの先輩方と比べると限りなく頼りない小さな先輩でしたが、仲良くしていただきありがとうございました。今後とも水野研を盛り上げていってください。

元から仲良くしてくれていた山科さんをはじめとする木村研、稲垣研、前田研の皆さんとは、楽しく雑談させていただいただけでなく、広い分野のお話をさせていただ来ました。皆さんが頑張っている姿を見て私も頑張ろうと思えました。ありがとうございました。

最後に両親に深く感謝します。社会的に非常に未熟な私を様々な側面から手厚く支えつつ、時には厳しく愛を持って今まで私を育ててくれたこと、学士の4年間だけでなく修士まで不自由なく通わせてくれたことには感謝しきれません。社会人として大きく羽ばたき、恩返ししていきます。