

2026 年度 修士論文

# 細胞抽出液のエイジング・レオロジー

2026 年 2 月 2 日

九州大学  
理学府 物理学専攻

2SC24032T 富山尊清

Tomiyama Takasumi

指導教官 水野大介

Mizuno Daisuke

## 概要

水などの液状物質は室温で放置しても時間経過によって氷に変化することはない。一方で、液状物質の中には、時間経過とともに粘弾性が増加し、固化（ゲル化・ガラス化）するものがある。典型例として液体のりが挙げられ、これは水分の蒸発によって固化する。また、豆腐も豆乳ににがりを加えることで固化する。これらとは異なり、自身の組成を変化させることなく室温で放置するだけで固化が起こるものとして、コロイド懸濁液が挙げられる。コロイド懸濁液は、液体溶媒中にマイクロスケールの粒子を分散させた系であり、粒子同士が接触するほど高密に混み合っている [1]。同様にタンパク質が高密に混み合った生細胞内の細胞質も、細胞外に取り出すと時間経過で固化する [2]。生細胞中の細胞質を外界に取り出した細胞抽出液が、細胞骨格の重合反応により固化（ゲル化）する現象は以前から観測されていた [2]。

しかし近年、細胞骨格の影響を取り除いても、細胞抽出液はコロイド懸濁液と同様に流動性を失い、時間経過とともに固化（エイジング）することが分かった [3]。生細胞内では細胞質が流動性を保っているが、これは ATP のエネルギーを利用した攪拌（非平衡揺らぎ）により、粘弾性の増加が抑制されているためだと考えられる [4]。この現象は、細胞内において「非平衡揺らぎによる粘弾性増加の抑制」と「細胞質が本来もつエイジングに伴う粘弾性増加」が拮抗している可能性を示唆する。一方で、細胞質が常にエイジングを起こす物質なのか、どのような環境条件でエイジングが生じるのか、またその原因は何かといった点の解明は発展途上である。

本研究では、細胞質のエイジング現象の理解を深化させることを目的とする。細胞骨格および非平衡揺らぎの影響を除外した上で環境条件を変化させ、レーザーインターフェロメトリー法を用いた Passive Microrheology (PMR) 計測により、細胞抽出液がエイジングする様子を複素粘弾性率で観測した。その結果、生細胞内濃度に近いタンパク質濃度では、エイジング初期に生細胞内よりも低い粘弾性から始まり、生細胞内と同程度の粘弾性を経て、最終的には生細胞内を上回る粘弾性へと増加した。さらに、イオン強度を低下させた場合にも同様のエイジングが確認されたが、この場合、エイジング過程全体にわたり生細胞内よりも粘弾性が高く現れた。これらの結果を踏まえ、各バッファーの組成とエイジング挙動および粘弾性の強さを比較した。その結果、本研究では、 $Mg^{2+}$  などの二価イオンによるタンパク質間の引力相互作用が、エイジングおよび粘弾性の強さに強く影響している可能性を指摘した。以上より、細胞骨格および非平衡揺らぎの影響を排除したタンパク質混み合い系である細胞抽出液は、条件に依存してエイジングを起こす物質であることが示された。本研究は、細胞質のエイジング現象の原因解明に貢献する。

# 目次

<b>第1章</b>	<b>研究における基本知識</b>	<b>3</b>
1.1	細胞の構造	3
1.2	ソフトマターについて	4
1.3	ソフトマターとしての細胞質	6
1.3.1	体積分率増加に伴う粘度発散の観点から見た、コロイド懸濁液と細胞抽出液の類似性	6
1.4	引力・斥力相互作用と粘弾性	9
1.4.1	引力相互作用とエイジングの関係	11
1.5	イオン環境依存のタンパク質間の相互作用	12
1.5.1	細胞質の粘弾性のエイジング	12
1.6	非平衡揺らぎと細胞質の粘弾性の関係	15
1.6.1	非平衡揺らぎ起源	18
1.7	無細胞タンパク質合成 (CFPS) とは	19
1.8	研究目的：細胞質のエイジングと非平衡揺らぎの関係性	20
<b>第2章</b>	<b>測定装置と測定方法について</b>	<b>21</b>
2.1	せん断粘弾性	21
2.1.1	弾性率	21
2.1.2	粘性率	22
2.1.3	複素粘弾性 (線形粘弾性)	22
2.2	マイクロレオロジー	23
2.3	レーザーインターフェロメトリー法	24
2.4	パッシブマイクロレオロジー (PMR)	25
2.4.1	応答関数	25
2.4.2	トラップ力の補正	26
2.4.3	トラップ力の影響を受けているときの応答関数	26
2.4.4	複素弾性率	27
<b>第3章</b>	<b>測定試料の準備 細胞抽出液</b>	<b>28</b>
3.1	細胞抽出液の解凍	28
3.2	細胞抽出液の透析と濃厚化	28
3.2.1	先行研究の小分子除去方法	28
3.2.2	透析方法 改良後	29
3.2.3	濃厚化	29
3.3	添加するサイトカラシン B の濃度の計算	30

3.4	タンパク質濃度の測定方法 . . . . .	31
3.4.1	Bradford Assay . . . . .	31
3.4.2	質量乾燥測定 . . . . .	31
3.5	試料封入チャンバーの作製 . . . . .	32
3.6	ATP 濃度測定 ルシフェラーゼアッセイ . . . . .	33
3.6.1	ルシフェラーゼアッセイの原理 . . . . .	33
<b>第 4 章</b>	<b>実験結果</b>	<b>34</b>
4.1	細胞抽出液とコロイド懸濁液 . . . . .	34
4.2	L15 透析時の HeLa 細胞抽出液 . . . . .	34
4.2.1	PSD 時間経過と先行研究のデータとの比較 . . . . .	35
4.2.2	複素粘弾性の時間経過と先行研究のデータとの比較 . . . . .	37
4.2.3	L15 透析時の HeLa 細胞抽出液の PSD および複素粘弾性について、 生細胞中との時間経過の比較 . . . . .	41
4.3	今回の実験結果 Hela 細胞抽出液 S30 透析時 . . . . .	44
4.3.1	S30 透析時の HeLa 細胞抽出液における PSD および複素粘弾性のエ イジングの様子 . . . . .	44
4.3.2	S30 透析時の HeLa 細胞抽出液の PSD および複素粘弾性の時間 経過を生細胞中と比較 . . . . .	47
4.4	細胞抽出液のエイジングと代謝 . . . . .	53
4.4.1	先行研究 . . . . .	53
4.4.2	今回の計測結果 . . . . .	54
<b>第 5 章</b>	<b>考察</b>	<b>55</b>
5.1	先行研究の再現性について . . . . .	55
5.2	細胞抽出液のエイジングから考える、細胞質のレオロジー . . . . .	55
5.3	Buffer の環境がエイジングの有無に及ぼす影響 . . . . .	56
5.4	Buffer の環境が粘弾性の強度に及ぼす影響 . . . . .	57
5.4.1	1 価、2 価 無機 陽イオンの影響 . . . . .	57
<b>第 6 章</b>	<b>まとめ</b>	<b>58</b>
6.1	まとめ . . . . .	58
<b>第 7 章</b>	<b>展望</b>	<b>59</b>
<b>第 8 章</b>	<b>謝辞</b>	<b>65</b>

# 第1章 研究における基本知識

[5]

## 1.1 細胞の構造

図 1.1 は真核細胞の概略図である。真核細胞は、外界と細胞内部とをリン脂質二重膜を主成分とする細胞膜によって隔てられている。細胞膜直下には、アクチンフィラメントおよびミオシンから構成されるアクトミオシン系を含む細胞骨格が存在し、細胞分裂時や細胞移動時における細胞形態変化に重要な役割を果たしている。細胞内部には、総タンパク質濃度がおよそ 0.2~0.3 g/mL に達する高濃度のタンパク質溶液からなる細胞質が存在し、その中に多様な細胞内小器官（オルガネラ）が分散している。細胞中央部には核が位置し、核内には遺伝情報を担う DNA が保持されている。核内では、DNA を鋳型とした転写反応が進行している。さらに、核近傍に存在する中心体から細胞膜近傍に向かって微小管が放射状に伸長している。これらの微小管上をモータータンパク質（キネシンやダイニンなど）が移動することにより、合成されたタンパク質や小胞などのさまざまな分子・構造体の細胞内輸送が行われる。また、細胞質内では解糖系などの代謝経路が活発に機能しており、糖などの栄養分子から ATP を産生する反応が進行している。これにより、細胞活動に必要なエネルギー供給が維持されている。

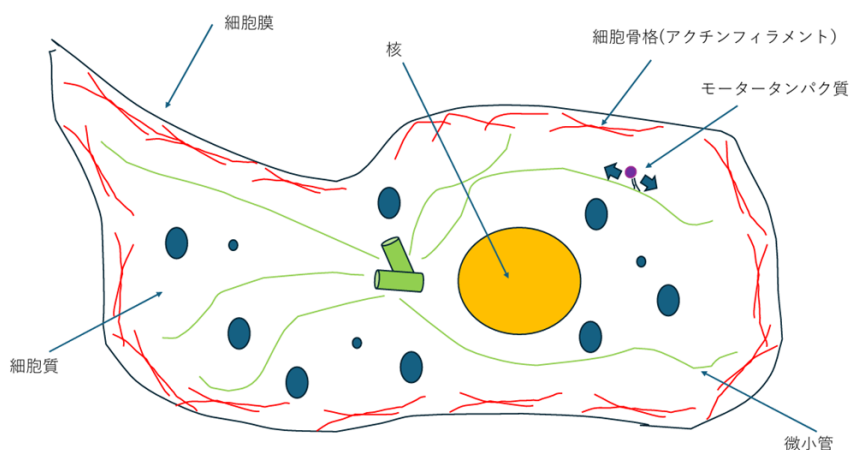


図 1.1: 真核細胞 概略図

図 1.2 は原核細胞の概略図である。原核細胞においても、リン脂質二重膜からなる細胞膜によって外界と細胞内部とが隔てられている。細胞膜直下には細胞骨格が存在し、細胞質が内部を満たしている点は真核細胞と共通している。一方で、原核細胞には核膜によって区画化された核が存在しない。そのため、DNA は細胞中央付近において膜構造に包まれることなく凝集して存在している。この DNA が局在する領域はヌクレオイドと呼ばれる。ヌクレオイド領域において DNA から mRNA への転写が行われる。転写された mRNA は、ポリソームと呼ばれる複数のリボソームからなる複合体を形成し、ATP を消費しながらタンパク質合成を行うことが知られている [6]。さらに、原核細胞の細胞質においても、真核細胞と同様に解糖系などの代謝経路を介して糖から ATP が産生されており、細胞活動に必要なエネルギー供給が維持されている。

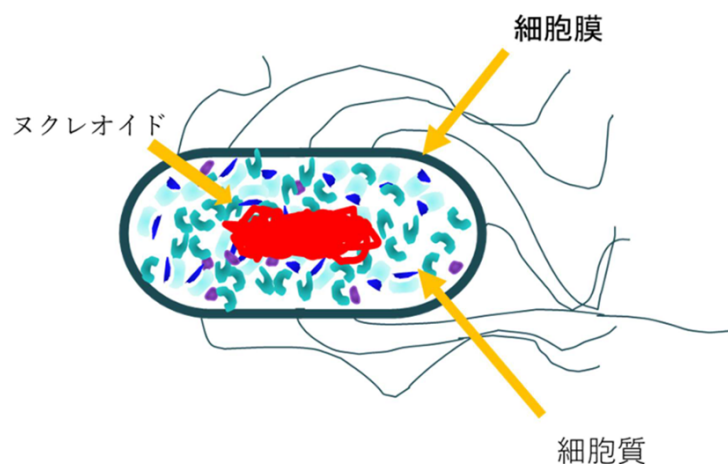


図 1.2: 原核細胞 概略図

細胞質中では、真核細胞および原核細胞のいずれにおいても、生命活動の維持に不可欠な各種代謝反応が活発に進行している。また、細胞質は粘性と弾性を併せ持つ粘弾性体として振る舞い、いわゆるソフトマターに分類される物質的性質を有している。このような細胞質の粘弾性は、細胞内代謝活動と密接に関連していることが知られている。例えば、酵母細胞の観察においては、休眠状態と呼ばれる代謝活性が著しく低下した条件下で、細胞質が固化する様子が報告されている [7]。これらの現象が起きる理由を解明し、細胞の普遍的理解を目指す上で、細胞質のレオロジー特性の解明は不可欠である。[1, 8, 9]。

## 1.2 ソフトマターについて

ソフトマターは、細胞質、大腸菌懸濁液、コロイドガラスなどに加え、高分子溶液、液晶、ゾル、ゲル（寒天やスライムなど）などの物質である（図 1.3）。これらは、液体的性質と固体的性質を併せ持つという特徴を有している。ソフトマターの多くは、高分子鎖やコロイド粒子などの比較的大きな構成要素が溶媒中に分散した系として存在する。このように、ソフトマターには多様な物質が含まれるが、それらに共通する特徴は、構成単位

(高分子やコロイド粒子など) が小分子や原子と比較して著しく大きなサイズを有する点にある。

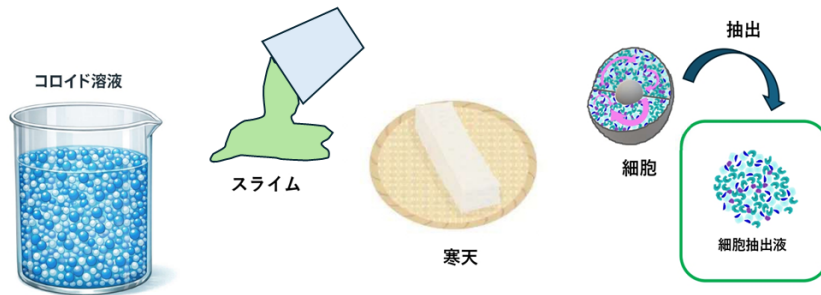


図 1.3: ソフトマター 例

この構成単位の大きさが、ソフトマターに二つの特徴を与える。

- (1) 非線形性: 通常物質においては、加えた力に比例した変形の応答が現れるが、ソフトマターでは、力と応答の関係は多くの場合、非線形となる。つまり、加えた力に対する応答の関係が比例関係にならないのである。むしろ破壊されずに大変形が可能であり、その結果、広い変形領域にわたって安定した非線形応答が支配的となる。このことがソフトマター特有の力学挙動を決定づけている。
- (2) 非平衡性: 物質に一定の外場を加えると、ある構造緩和時間を経た後に定常状態が実現される。また、外場を切った後でも、物質が元の平衡状態に戻るためには、ある構造緩和時間が必要である。通常の液体では、構造緩和時間は  $10^{-9}$  s 程度と短いですが、ソフトマターでは、 $10^{-9} \sim 10^6$  s と構造緩和時間が液体と比べて長い。よって、ソフトマターは非平衡状態にあることが多く、非平衡状態のダイナミクスが重要である。

こういった、特徴を持つ、ソフトマターは概して、弾性的性質、粘性的性質を併せ持つことが多い。citeBD[10]。

### 1.3 ソフトマターとしての細胞質

細胞質は、細胞膜内にあるタンパク質溶液である (図 1.4)。ソフトマターに典型的に見られるように、細胞骨格および細胞質は粘性と弾性を併せ持つ粘弾性体として振る舞うことが報告されている [1][11]。さらに研究の進展により、細胞骨格の影響を極力排除した条件下において、細胞質自体がガラス形成能を示すことが明らかにされている [12]。このような知見を背景として、細胞質のガラス的レオロジーは、その力学応答の類似性に基づき、コロイドガラスをモデル系として記述可能であるという考えが活発に議論されている [1][12–14]。細胞質の物性をコロイド懸濁液と比較・検討することにより、生命活動に内在する普遍的な物理法則の理解へと接続できる可能性がある。

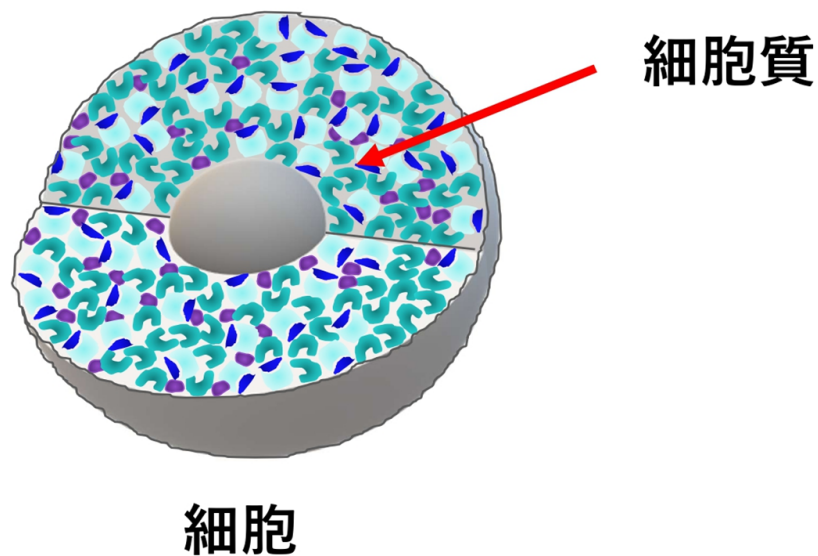


図 1.4: 細胞質 概略図

#### 1.3.1 体積分率増加に伴う粘度発散の観点から見た、コロイド懸濁液と細胞抽出液の類似性

細胞質のレオロジー特性を明らかにする計測について述べる。

生細胞中における細胞質のアクティブマイクロレオロジー (AMR) 計測では、貯蔵弾性率および損失弾性率がともに入力変位の周波数  $\omega$  の 0.5 乗に比例する挙動が確認されている (図 1.5、1.6)[15]。この 0.5 乗のべき乗則は、0.1 ~ 100 kHz に及ぶ広い周波数帯域にわたって観測されている。このような複素粘弾性率のべき乗則は、コロイド懸濁液においても報告されており、細胞質のレオロジーはコロイド懸濁系と同様の枠組みで記述可能である可能性が示唆されている [1, 16]。

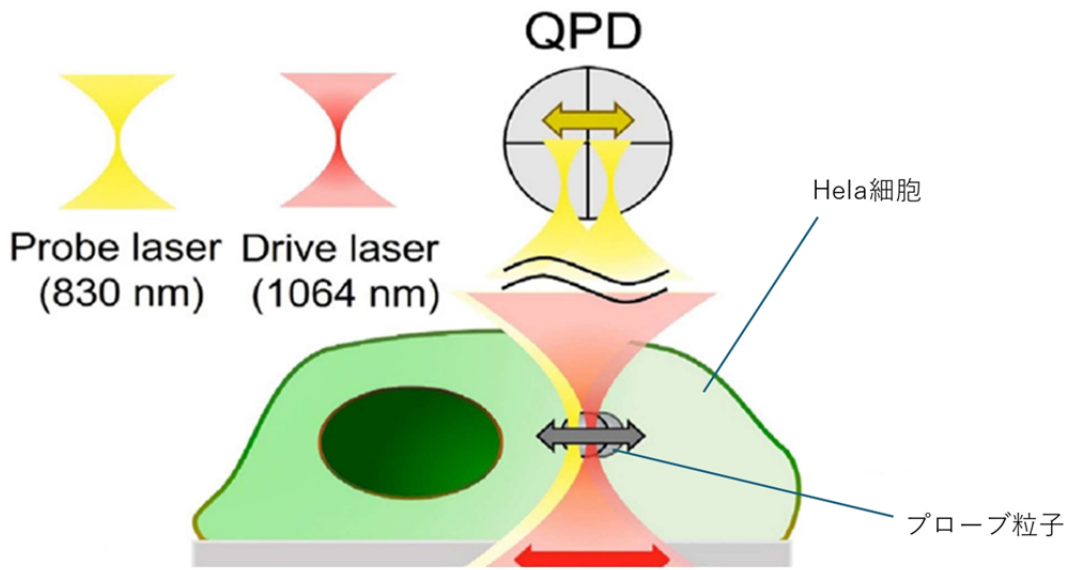


図 1.5: HeLa 生細胞中の AMR 測定 概略図 レーザーでプローブ粒子に力を加え、その応答から粘弾性を測定する。 出典:[15]

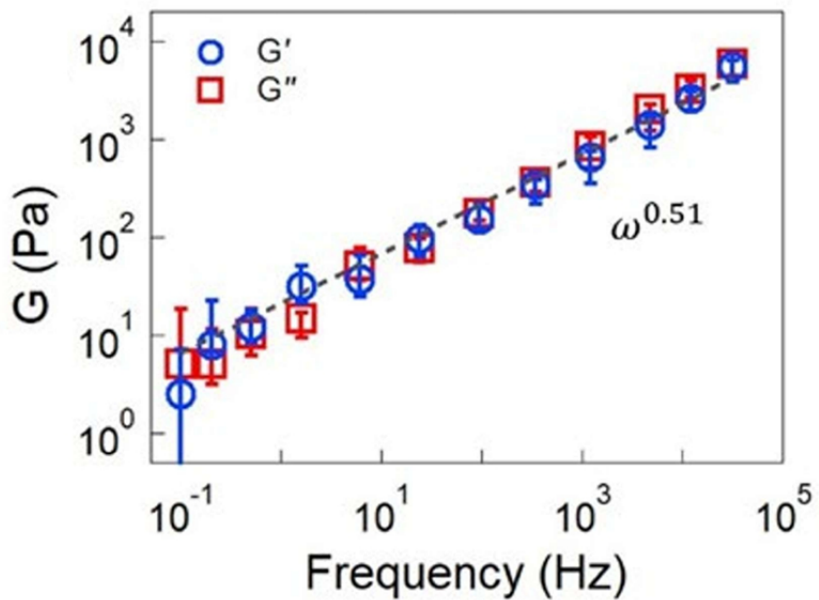


図 1.6: HeLa 生細胞中の複素粘弾性率 出典:[15]

細胞質を生細胞中でそのままレオロジー測定を行うと、塩濃度、温度、pH、タンパク質

濃度などの条件を正確に設定することは難しいため、細胞質を細胞外に取り出した細胞抽出液が細胞質のモデル系としてよく用いられる。細胞抽出液のレオロジーについて現時点で明らかになっていることとして、先行研究では体積分率の増加に伴い、細胞質のモデル系である細胞抽出液の粘度が増加し、発散することが知られている。(図 1.7)。これは様々な種類の細胞抽出物で共通してみられる現象であった [12]。この溶質の体積分率の増加に伴う粘性の増加はコロイド溶液などのソフトマターでも普遍的にみられる [17]。

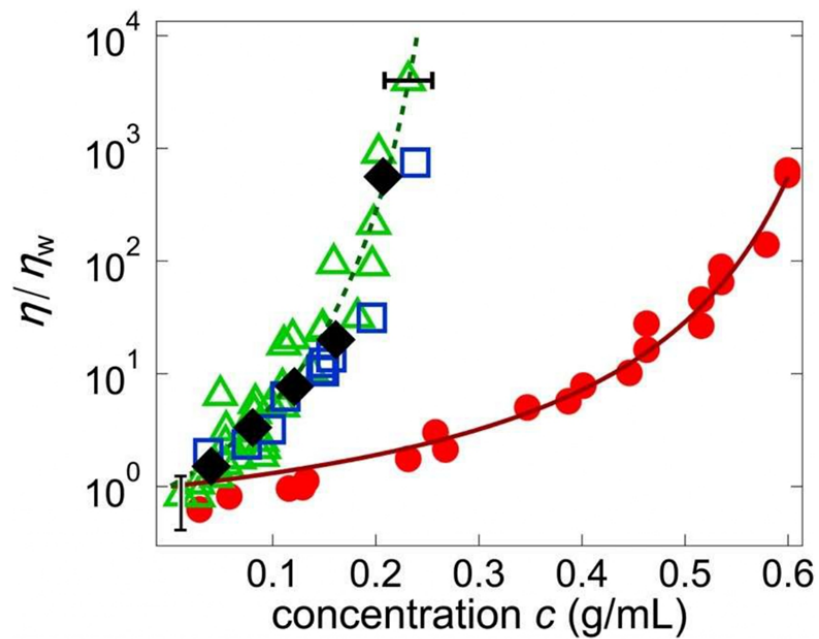


図 1.7: 粘度のタンパク質濃度依存性。BSA 溶液（赤丸）と細胞抽出液（緑三角：大腸菌、青四角：アフリカツメガエル卵、黒ひし形：HeLa 細胞）の  $\eta/\eta_w$  ( $\eta_w$ ：水の粘度)。出典:[12]

## 1.4 引力・斥力相互作用と粘弾性

本節では、コロイド懸濁液について概説する。コロイド懸濁液とは、コロイド粒子が溶媒中に分散した系である。コロイド懸濁液は、外部からのせん断力に対して粘弾性応答を示すことが知られている。これは、コロイド粒子間に引力および斥力の相互作用が働くためである（図1.8）。

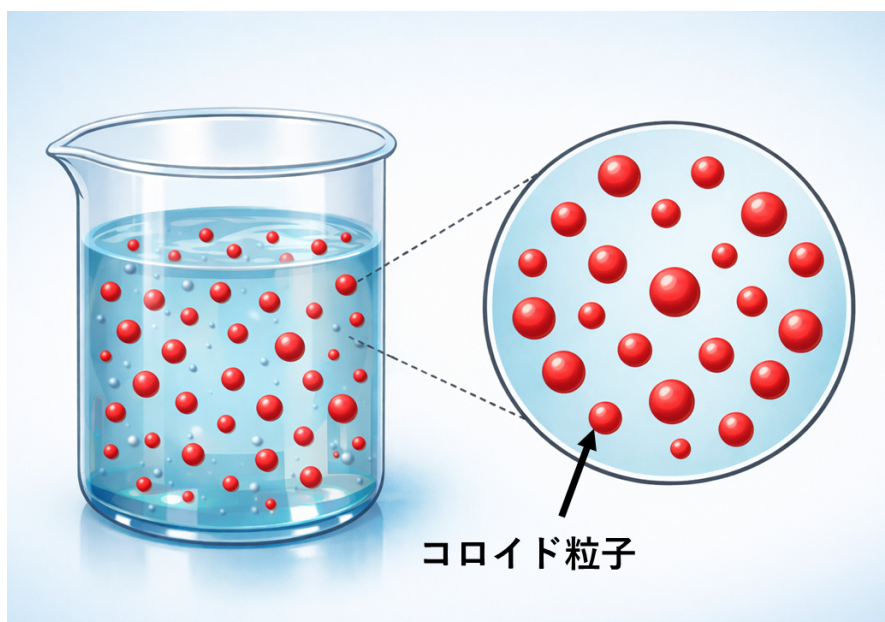


図 1.8: コロイド懸濁液の模式図

コロイド懸濁液では、引力相互作用の増大と斥力相互作用の増大が、それぞれ異なる機構を通じて粘弾性の増加をもたらすことが報告されている [18, 19]。

粒子間の引力相互作用が強くなると、粒子間に一時的な結合や拘束が形成される。その結果、粒子の相対運動が抑制され、外部せん断に対する応力緩和が遅延する。すなわち、応力緩和時間の増大により粘弾性が増加する。したがって、粒子間引力が強まると、コロイド懸濁液の粘弾性は増加する（図 1.9）。

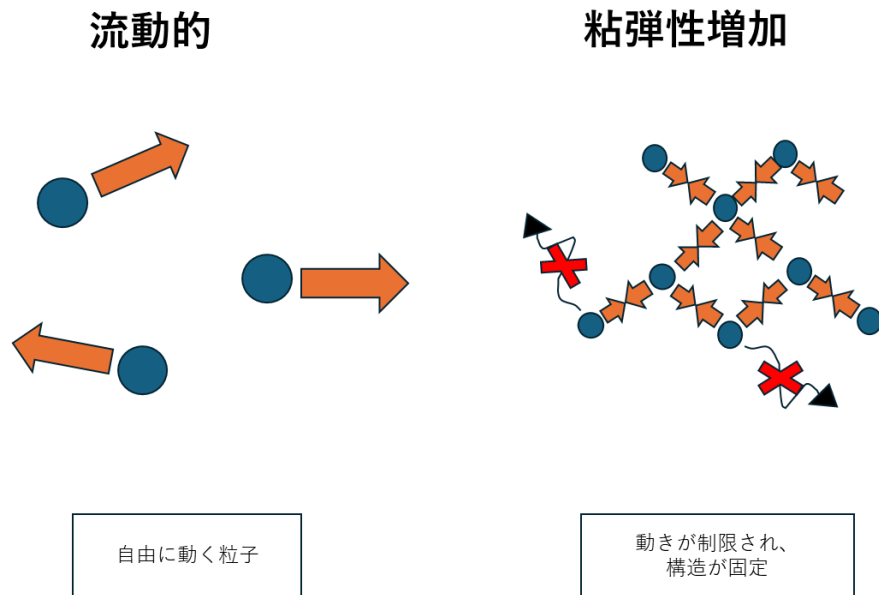


図 1.9: 引力相互作用による粘弾性増加の模式図

一方、粒子間の斥力相互作用が強くなった場合にも、粘弾性が増加することが知られている。これは、斥力によって粒子同士が互いに接近できなくなり、周囲の粒子によって運動が幾何学的に拘束されるためである（いわゆるケージ効果）。その結果、粒子の再配列が困難となり、せん断力に対する応答が遅延することで、粘弾性が増加する（図 1.10）。

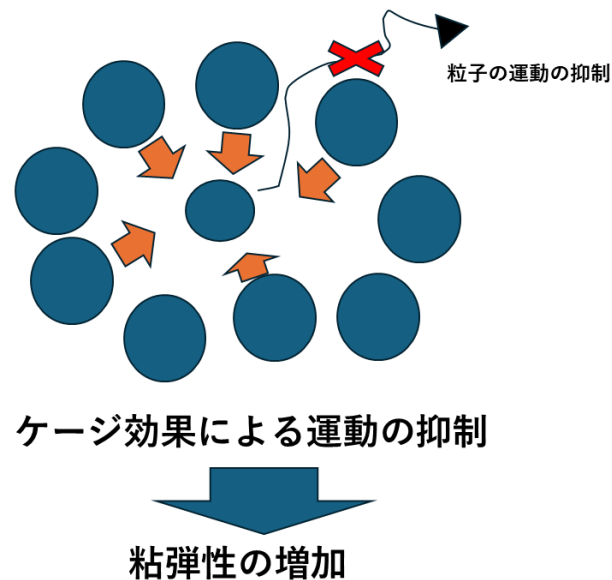


図 1.10: 斥力相互作用による粘弾性増加の模式図

#### 1.4.1 引力相互作用とエイジングの関係

コロイド懸濁液において、引力相互作用とエイジングが密接な関係にあることが報告されている。「オクタデシル基」を表面に有するシリカナノ粒子をテトラデカンに分散させた実験では、温度変化によりオクタデシル基の秩序を変化させることで、引力相互作用の働きを切り替えることができる。この実験では、高温（例：40℃）では引力相互作用が弱くなることで試料が流体的になり、低温（例：29.4℃）へ急冷すると引力相互作用によりエイジングが始まり、弾性が上昇する様子が観測された。以上より、引力相互作用がコロイド粒子間で働くと、エイジングが引き起こされることがわかる [5]。

## 1.5 イオン環境依存のタンパク質間の相互作用

タンパク質はアミノ酸残基が連なって折りたたまれた高分子であり、表面には多数の官能基が露出している。カルボキシル基 (Asp/Glu など) やアミノ基 (Lys/Arg/His など) を有する残基の寄与により、タンパク質は pH に依存して平均的な電荷を帯びる [20]。このときタンパク質間には静電相互作用が働き、その符号や大きさは溶液条件 (特に pH とイオン強度) に依存する。低イオン強度条件では静電相互作用が長距離に及ぶため、条件によってはタンパク質同士の会合や凝集が促進され、溶解性が低下する場合がある [21]。そこで NaCl、KCl、CH<sub>3</sub>COOK … などの電解質を添加すると、溶液のイオン強度が増加して、タンパク質間の静電相互作用が弱まる (静電遮蔽)。この遮蔽により、低塩条件で生じていた会合が抑制され、典型的には数十 mM から数百 mM 程度の塩濃度で溶解性が増す (塩溶) ことが多い [22]。

一方で、陰イオン・陽イオンは同じ価数をもつ場合でも、静電遮蔽だけでは記述できない効果——例えば局所的な脱水による接触状態の安定化、イオンサイズや分極性の差、水和の強さ、短距離の非静電相互作用など——を通じて、タンパク質間相互作用や溶解性に異なる影響を及ぼしうる。これらのイオン種依存性を系統的に捉える枠組みの一つがホフマイスター系列であり、塩析・塩溶などの挙動に対するイオンの効果を (条件依存性を伴いつつ) 序列として整理したものである。この序列はその後、溶解度や塩析能力に限らず、タンパク質近傍への塩の集まりやすさ、タンパク質同士の有効な「引力/反発」への寄与など、より広い文脈での水溶液系におけるイオン特異効果 (Specific Ion Effects, SIE) の代表例として解釈されてきた [23]。

その中でも二価陽イオンの効果は、静電遮蔽による静電相互作用の低下にとどまらず、局所的な結合、さらには条件によっては架橋 (ブリッジ) を介してタンパク質間に有効な引力を導入しうる点に特徴がある [24]。特に二価陽イオンはカルボキシル基などと相互作用し、タンパク質間の引力相互作用を促進する場合がある。Mg<sup>2+</sup> は代表的な二価陽イオンであり、ホエイタンパク質 (牛乳由来タンパク質) に Mg<sup>2+</sup> を添加すると弾性が増大するという報告 [25] や、豆乳に Mg<sup>2+</sup> を含むにがりを加えると固化する現象が知られている [26]。ただし、これらの挙動は pH、温度、タンパク質濃度、共存成分など他の条件に依存するため、Mg<sup>2+</sup> の効果を単純に一般化することは難しい。近年、Mg<sup>2+</sup> は強い水和をもつ二価陽イオンであり、カルボキシル基との相互作用として、脱水して直接配位する場合に加え、水和殻 (配位水) を保ったまま相互作用する場合もあり得ることが指摘されている [27]。今後さらなる研究により、塩が媒介するタンパク質間相互作用の詳細機構が明らかになり、SIE の統一的理解が進むと期待される。

### 1.5.1 細胞質の粘弾性のエイジング

タンパク質溶液が時間経過とともに固化する現象が確認されている。この時間依存的な固化過程はエイジングと呼ばれる。以降、本研究では、エイジングとは、時間経過に伴って粘弾性が増加する性質を指す。粘弾性増加の機構としては、タンパク質間の架橋形成によるゲル化や、コロイド懸濁液に類似したガラス化などが考えられている [13]。単一種類のタンパク質凝集体がエイジングを示すことは、種々の疾患との関連が指摘されており、その機構解明に向けた研究が盛んに行われている [28]。しかし、多様なタンパク質を含む

混合系としての細胞質様モデル系である細胞抽出液のエイジングについては、その物性の複雑性ゆえに、実験的研究はなお発展途上にある。細胞抽出液のエイジングに関しては、アフリカツメガエル卵抽出物、大腸菌抽出物 (*E.coli* 抽出物)、ヒト子宮頸癌細胞抽出物 (HeLa 細胞抽出物) を用いた研究により、細胞骨格が細胞抽出液の固化 (ゲル化) の一因となることが報告されている。[2, 29, 30]。しかしながら、タンパク質凝集体研究の知見から推察されるように、細胞抽出液は条件によっては細胞骨格を含まない場合であってもエイジングを示す可能性がある。

先行研究では細胞抽出液に、NH-buffer(100mM NaCl, and 20 mM Hepes-KOH pH7.6) による透析処理を行い、細胞抽出液の溶媒環境を人工的に制御して、エイジング現象を観察している。この研究では透析処理により、細胞抽出液 (大腸菌抽出物、アフリカツメガエルの卵の抽出物、HeLa 細胞抽出物) のエイジングによる固化が無視できる程度になることを確認されている。(図 1.11)[12]。

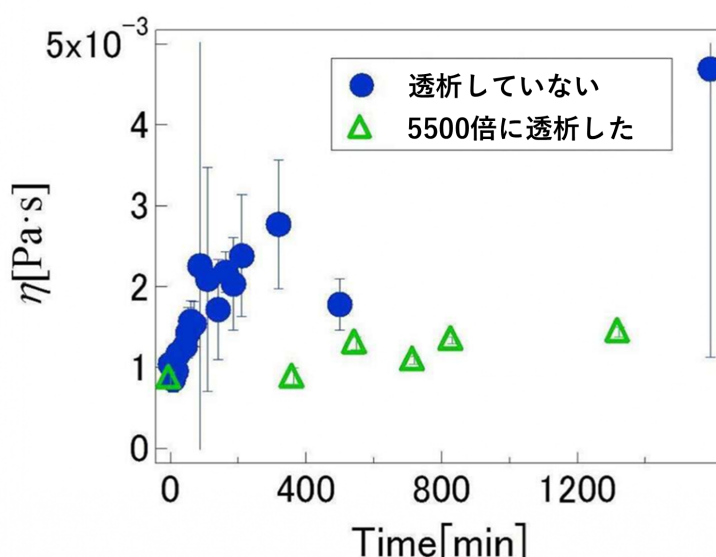


図 1.11: *E.coli* 細胞抽出液を透析した場合と、処理を施さなかった場合の粘性  $\eta$  の時間経過の観察 出典:[12]

さらに先行研究 (熊丸修論) では、NH-buffer のような単純な塩環境ではなく、アミノ酸、糖などを含んだ L15-buffer で透析した場合の細胞抽出液のレオロジーを計測をおこなった。その結果アクトミオシンなどの細胞骨格によるゲル化を阻害した状態でも細胞抽出液はエイジングを起こし、時間経過とともに固化することが示されている (図 1.12)[3]。先行研究 (熊丸修論) [3] では、生細胞中の細胞質と細胞抽出液における変位のパワースペクトル密度 (PSD) および複素粘弾性率のエイジング挙動が比較されている (図 1.12)。

ここでは、計測開始時点では、細胞抽出液が生細胞中と等しい粘弾性を示し、時間経過とともに、生細胞以上の粘弾性を示し、周波数依存性についても生細胞中と同様であった。

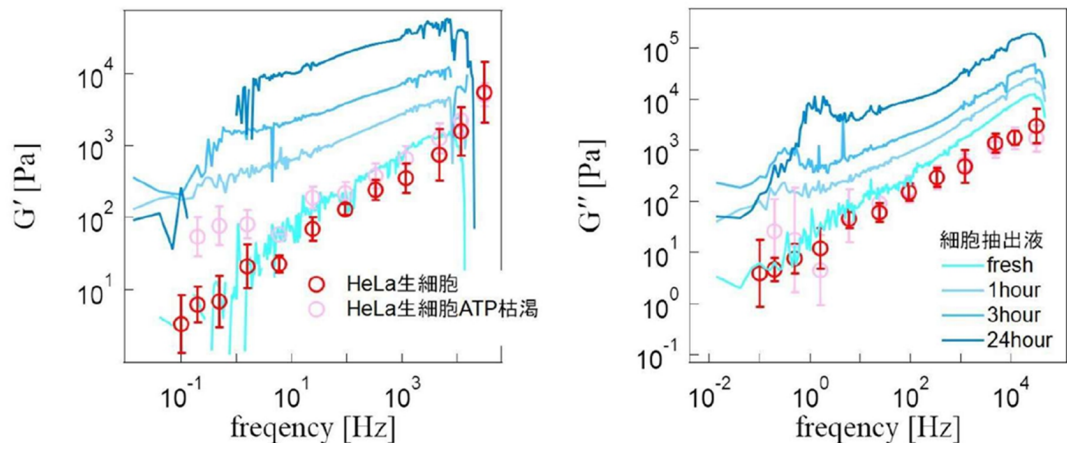


図 1.12: L15 で透析し、ATP を添加した抽出液 (タンパク質濃度 0.3 g/mL) の貯蔵粘弾率と損失弾性率の時間変化。赤い丸が HeLa 生細胞中。桃色の丸が ATP を枯渇させた生細胞を表す。青い実線が、HeLa 細胞抽出液を表しており、色が濃いほど試料作製から、測定までの時間が経過していることを表す。 出典:[3]

## 1.6 非平衡揺らぎと細胞質の粘弾性の関係

前節で述べたように、細胞質のモデル系である細胞抽出液はエイジング挙動を示す。一方で、生細胞内において細胞質がエイジングを起こす場合、代謝活性が低下することも報告されている。ここで重要となるのが、生細胞内に存在する非平衡揺らぎと呼ばれるメソスケールの活発な揺らぎである（図 1.13）。

細胞内計測においては、揺動散逸定理から予測される熱揺らぎを超える強度をもつ非平衡揺らぎが観測されている（図 1.14） [4]。

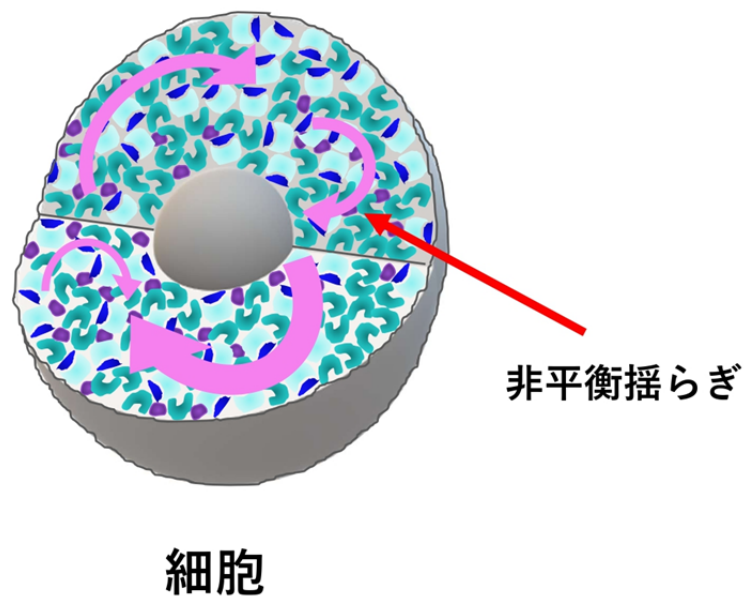


図 1.13: 非平衡揺らぎ 概略図

非平衡揺らぎは、揺動散逸定理（FDT）の破れとして観測される。すなわち、測定した細胞質の粘性（あるいは応答関数）から揺動散逸定理に基づいて予測される熱平衡状態での熱揺らぎと、実際に観測される揺らぎとの間の差として評価される。この差分は、細胞質内の代謝活性などに由来する、熱揺らぎを超えた非平衡起源の揺らぎを反映している。

A

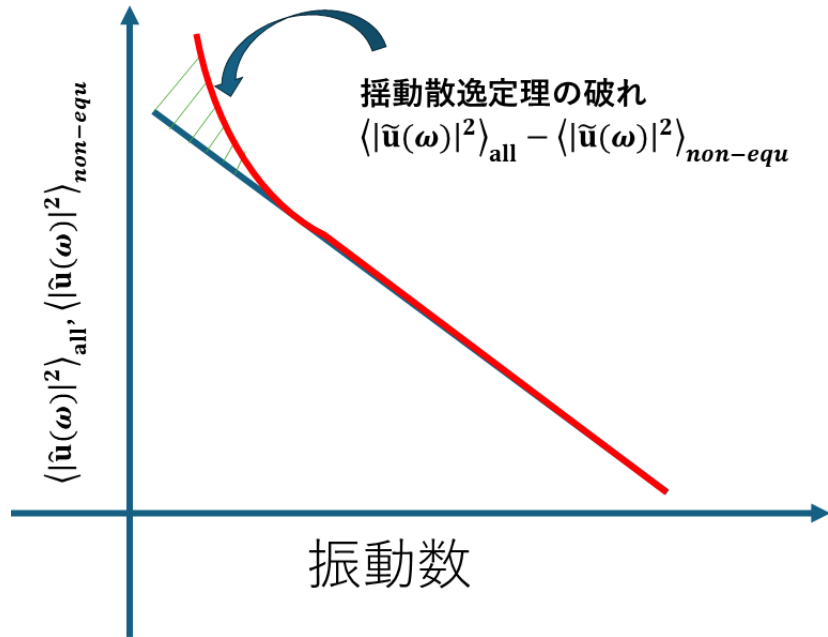


図 1.14: 揺動散逸定理の破れ  $\langle |\hat{u}(\omega)|^2 \rangle_{\text{all}}$ : 観測される熱揺らぎ、非平衡揺らぎを含めた、存在するすべての揺らぎ  $\langle |\hat{u}(\omega)|^2 \rangle_{\text{non-equ}}$ : 揺動散逸定理から求められる、熱揺らぎ概略図

別の実験では *E.coli* 内で発現させた粒状タンパク質に蛍光タンパク質 (GFP) を付加し、その平均二乗変位 (MSD) を観測する研究が報告されている [31]。この研究では、ATP 産生を阻害した条件と非阻害条件とを比較している。ATP 産生を阻害した場合には、非阻害条件と比較して MSD が小さくなることが示された。この結果は、代謝活動が細胞内の揺らぎと関連があることを示唆している。

先行研究では、アジ化ナトリウムを用いて代謝を阻害し、生細胞内の ATP を枯渇させた場合と通常条件下におけるレオロジー特性の比較が行われている [32]。ATP を除去した条件では、通常時と比較して非平衡揺らぎが低下するとともに、低周波数領域において弾性が増加し、弾性プラトーが観測された (図 1.15)。一方、ATP 産生を回復させる (レスキューする) と、非平衡揺らぎが増大し、低周波数領域における弾性の低下が確認された (図 1.16)。

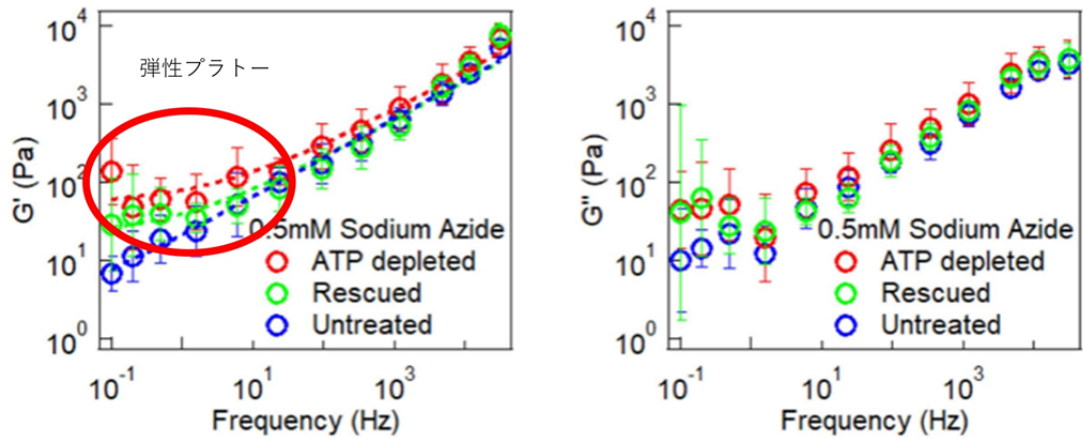


図 1.15: 左: 貯蔵弾性率 (通常時、ATP 除去時、レスキュー時) 右: 損失弾性率 (通常時、ATP 除去時、レスキュー時) 出典:[32]

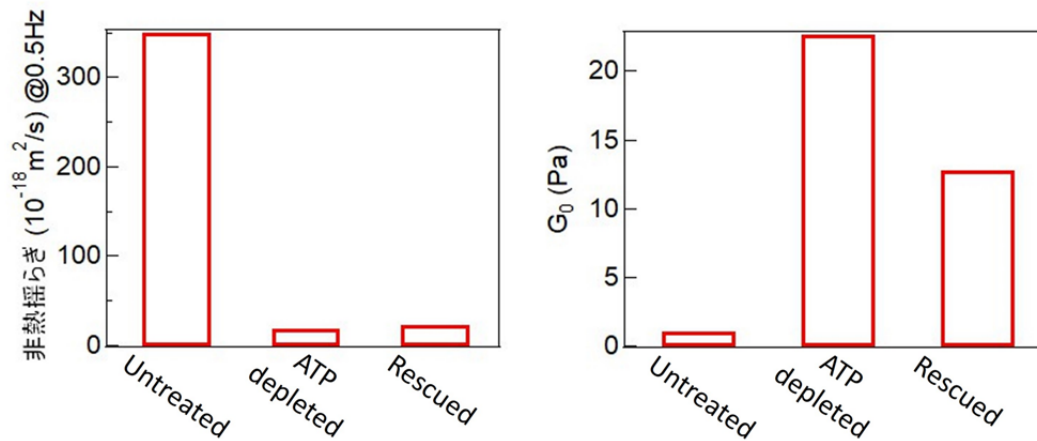


図 1.16: 左: HeLa 細胞中の非平衡揺らぎ (通常時、ATP 除去時、レスキュー時) 右: HeLa 細胞中の低周波弾性プラトー (通常時、ATP 除去時、レスキュー時) 出典:[32]

以上の結果より、非平衡揺らぎは ATP 濃度に依存して変化することが示唆される。このことから、ATP を利用した代謝活動が非平衡揺らぎを生成していると考えられる。さらに、これらの非平衡揺らぎは細胞内部を攪乱することで、粘弾性の増加、すなわち固化傾向を抑制している可能性がある。

### 1.6.1 非平衡揺らぎ起源

非平衡揺らぎの起源としては、モータータンパク質・ポリソームなどの力学的駆動力、細胞骨格の筋収縮、代謝に依存した解糖系タンパク質の触媒活性によって生じる、タンパク質の立体構造の微視的な揺らぎが、フォース・ダイポールのような力学的効果を生み出す可能性も指摘されている。(図 1.17)[4][33]。しかし、非平衡揺らぎの起源について、全容は明らかになっていない。

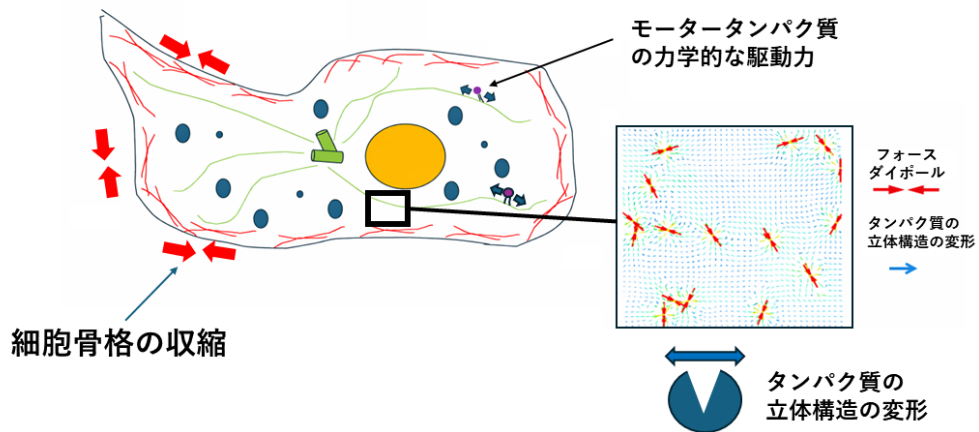


図 1.17: 非平衡揺らぎの起源 概略図

## 1.7 無細胞タンパク質合成（CFPS）とは

無細胞タンパク質合成（CFPS）は、細胞膜の外、すなわち試験管内で転写および翻訳反応を進行させ、タンパク質を合成する技術である。細胞そのものを用いる代わりに、リボソーム、翻訳因子、tRNA、アミノ酸、エネルギー再生系など、タンパク質合成に必要な構成要素を反応液中にあらかじめ揃え、DNA あるいは mRNA を鋳型として目的タンパク質を産生する。この翻訳過程では、1 本の mRNA 上に複数のリボソームが同時に結合して翻訳を行うポリソームが形成され、高効率なタンパク質合成が実現される（図 1.18）[34]。

さらに近年では、CFPS と解糖系を同一反応系内で同時に作動させ、解糖系で生成された ATP を CFPS のエネルギー源として利用する試みも報告されている [35]。

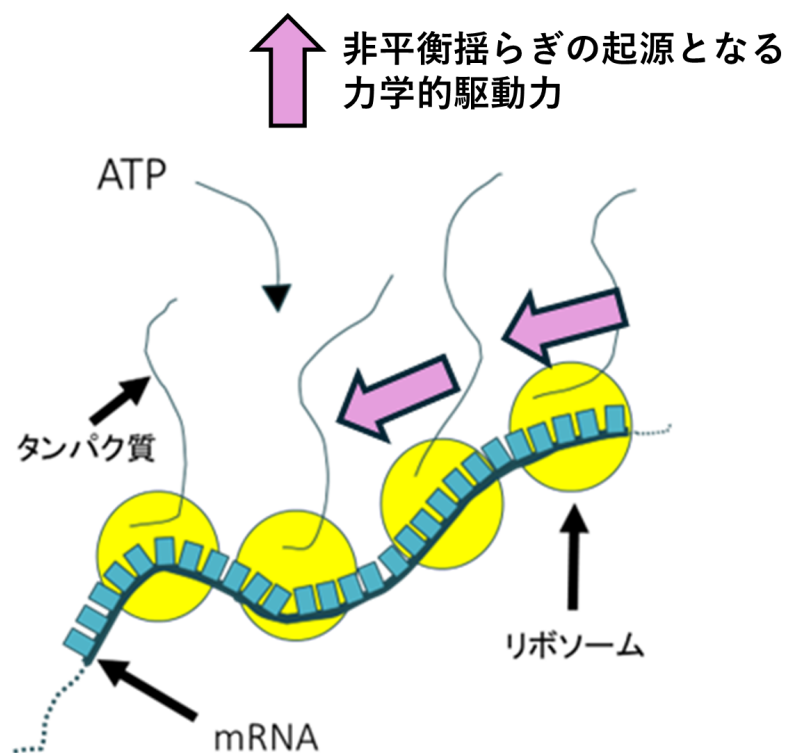


図 1.18: ポリソームによるタンパク質合成の模式図

## 1.8 研究目的：細胞質のエイジングと非平衡揺らぎの関係性

細胞骨格の影響下でない生細胞中における細胞質は、ATP を枯渇させ、非平衡揺らぎを抑制すると、弾性率が上昇する [4]。また、様々な種類のタンパク質溶液は外環境で、時間経過で固化(エイジング)することが確認されている [13]。このことから、生細胞内では、非平衡揺らぎのかき混ぜによる、粘弾性の増加の抑制と、タンパク質溶液自体が持つエイジングによる粘弾性の増加が拮抗している可能性がある (図 1.19)。

将来的には、細胞外環境において細胞抽出液中の解糖系あるいはポリソームを駆動させることで、非平衡揺らぎを再現することを計画している。本研究はその前段階として、解糖系およびポリソームが駆動する環境に近い条件を模擬することを目的とする。具体的には、無細胞タンパク質合成系で広く用いられている S30 -buffer 条件下で試料を透析し、その後レオロジー計測を行った。これにより、系におけるエイジング現象の有無およびイオン濃度とレオロジー特性との関係を明らかにすることを目的とした。さらに、得られた結果については、塩濃度に依存して変化するタンパク質間の引力相互作用および斥力相互作用の観点から考察する。

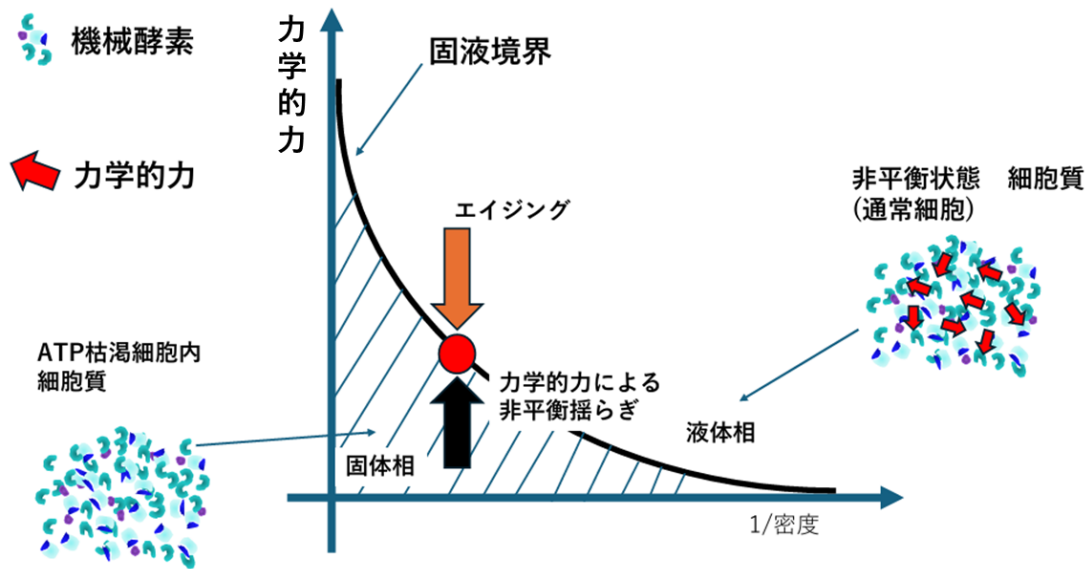


図 1.19: 非平衡揺らぎとエイジングの拮抗 概略図

## 第2章 測定装置と測定方法について

### 2.1 せん断粘弾性

今回測定しているのは、主にずり場に対する粘弾性 (せん断粘弾性) である。わかりやすくするために、初めに、弾性と粘性を分けて考える。

#### 2.1.1 弾性率

ずり弾性率  $G$  は、物質にせん断力を加えた際の変形応答を記述する物理量であり、せん断変形を生じさせるために必要な応力の比例係数を表す。体積弾性率とは異なり、体積変化を伴わない形状変化のみに対応する弾性応答を扱う。理想的な非粘性流体は、静的なせん断変形に対して応力を保持することができない。一方、弾性体は形状を変化させる際に復元力を生じ、その大きさは変形量に依存する。

理想的な線形弾性体にずりひずみ  $\gamma$  を付与する場合を考える (図 2.1)。ここで、ずりひずみは変形の程度を表す無次元量である。このとき、必要とされるずり応力 (試料表面に作用する単位面積当たりのせん断力) を  $\sigma$  とすると、フックの弾性法則より

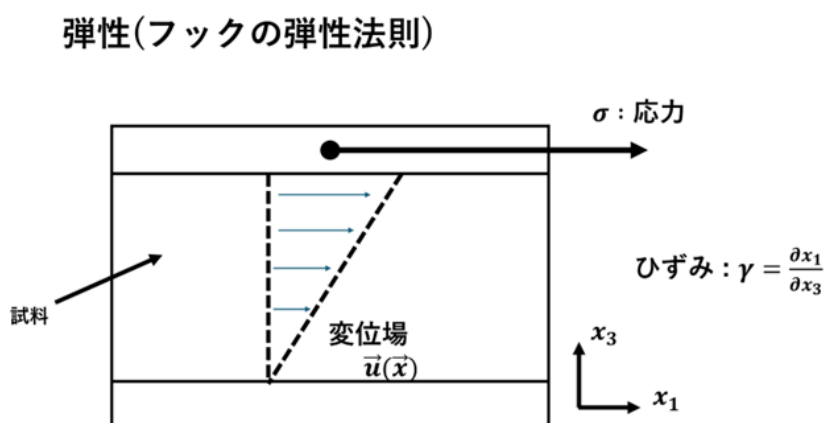


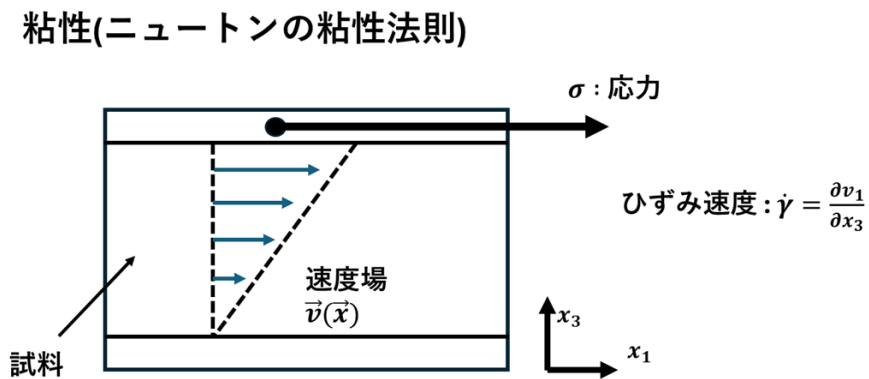
図 2.1: 応力とずり弾性率の関係

$$\sigma = G\gamma \quad (2.1)$$

が成り立つ。

### 2.1.2 粘性率

粘性とは、ずり応力をかけたときに、速度をできるだけ均一にしようとする性質のことである。粘性成分のみを持つ理想粘性流体について、ニュートンの粘性法則より、ずり応力  $\sigma$  とずり歪  $\gamma$  の関係は次のようにかかる (図 2.2)。



$$\sigma = \eta\dot{\gamma} \quad (2.2)$$

$\eta$  は粘度である。

### 2.1.3 複素粘弾性 (線形粘弾性)

細胞質は、粘性と弾性の両方の性質を持つソフトマターである。平衡系に小さな応力を加えたときには、重ね合わせの法則が成り立ち、応力と応答の関係は、応答関数で書き表される。時刻  $t = 0$  で試料にステップ歪み  $\gamma(t) = \gamma_0\Theta(t)$  ( $\Theta(t)$  はステップ関数) を加えたときのずり応力の応答を次のように表す。

$$\sigma(t) = \gamma_0 G(t) \quad (2.3)$$

$G(t)$  を緩和弾性率と呼ぶ。ソフトマターの典型的な緩和弾性率に考えている試料が従うとすると、

$$G(t) = G_e + Ge^{-t/\tau} \quad (2.4)$$

$G_e$  は平衡ずり弾性率と呼ばれる。 $G(t)$  の  $t$  を無限大にしたときに残る成分で定義される。 $G_e$  が正の粘弾性体を粘弾性固体と呼び、 $G_e$  が 0 の粘弾性体を粘弾性流体と呼ぶ。時間に依存する任意の歪み  $\gamma(t)$  は、時刻  $t$  に到達するまでの時間  $t'$  として、 $t'$  と  $t' + dt'$  の時間の間に加えた大きさ  $\dot{\gamma}(t')dt'$  のステップの歪みの重ね合わせと考えることができる。計測時刻  $t$  までの影響をすべて重ね合わせると考えると、

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t dt' G(t-t') \dot{\gamma}(t') \quad (2.5)$$

と書ける。 $G(t-t')$  は時刻  $t'$  に与えた  $\dot{\gamma}$  の歪み速度の影響が、 $t-t'$  時間経過した時刻  $t$  ではどの程度残っているかを表す。

今回の研究では、試料に対して微小な振動的歪みを加えることにより、線形粘弾性を測定している。線形応答を仮定するとき、非線形的な効果の現れる、大きなずり場で実験を行ってはならない。ここで、微小な振動的歪み  $\gamma(t)$  は、

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos \omega t \quad (2.6)$$

と書ける。ここに 2.5 を用いると、このずり場に対する応答は以下のようにかける。

$$\sigma(t) = \gamma_0 [G'(\omega) \cos \omega t - G''(\omega) \sin \omega t] \quad (2.7)$$

ここでは、

$$G' = \omega \int_0^{\infty} dt \sin \omega t G(t) \quad (2.8)$$

$$G'' = \omega \int_0^{\infty} dt \cos \omega t G(t) \quad (2.9)$$

$G'(\omega)$ 、 $G''(\omega)$  は、それぞれ、貯蔵弾性率、損失弾性率と呼ばれる。ソフトマターの分野ではしばしばこれらを、弾性、粘性と呼ぶことがあるが、厳密な定義とは異なるので注意したい。これら二つを用いて、 $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$  を複素弾性率と呼ぶ。これを用いて、粘弾性の式を書き直すなら、

$$\sigma^* = \gamma^* G^* \quad (2.10)$$

と書ける。 $\sigma^*$  は、周期的に変動する応力である。 $\gamma^*$  は、振動歪みを表す。式 2.10 の変数はすべて複素数である。

## 2.2 マイクロレオロジー

本研究では、細胞抽出液の力学特性を評価する手法としてマイクロレオロジー法を用いた。マイクロレオロジー法とは、試料中に分散させた数ナノメートルから数マイクロメートル程度の微小な観測用粒子（プローブ粒子）の運動を、光干渉法（レーザーインターフェロメトリー法）を用いて計測することにより、系の粘弾性特性を定量的に求める手法である。[36][37]。本研究では、マイクロレオロジー法のうち、受動的手法であるパッシブマイクロレオロジー（Passive Microrheology: PMR）を用いた。

## 2.3 レーザーインターフェロメトリー法

レーザーを観測粒子に照射すると、粒子の運動に伴ってレーザーの結像点が変わる。この結像点の変位を四分割フォトダイオードによって計測することで、粒子の変位量を定量的に測定する。(図 2.3) [38][39]。

QPD (Quadrant Photodiode) は、光ダイオードを四枚、まとめた構造をとっている。図 2.3 に示すように、四つのダイオードをそれぞれ、A、B、C、D とする。それぞれのダイオードはレーザーの当たる位置により、発生させる電流の強弱が変化する。それぞれが発生させる電流の大きさを  $I_A$ 、 $I_B$ 、 $I_C$ 、 $I_D$  とする。 $x$  軸方向についてのレーザーの移動について考える。 $I_+ \equiv I_A + I_B$ 、 $I_- \equiv I_C + I_D$  とすると、 $x$  方向の変位を表す  $I_x$  は、 $I_x = (I_+ - I_-)/(I_+ + I_-)$  と書ける。この変位に比例した大きさを持つ電流は、途中で電流信号から電圧信号に変換される。そして、この電圧信号と実際の変位の比例係数  $C$  (キャリブレーション値) をかけることで、実際の変位に変換する。これは、 $y$  軸についても同様である。注意したいのが、変異と電圧信号の線形関係が成り立つ範囲があり(図 2.4)、その領域は今回使用した光学系では、粒子の変位がおおよそ  $0.4 \mu\text{m}$  の領域である。

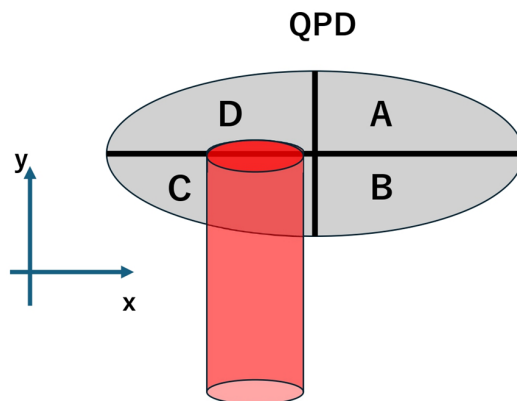


図 2.3: レーザーインターフェロメトリー法

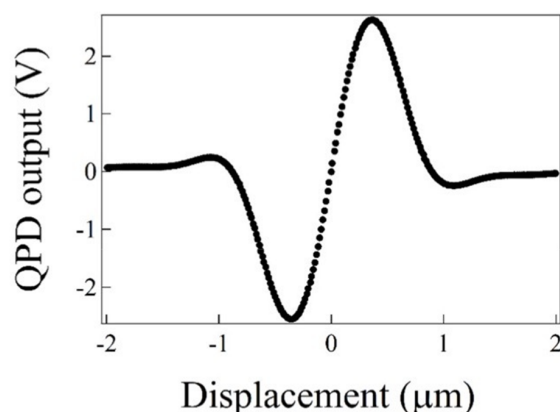


図 2.4: 実際に使用した光学系における粒子変位検出の線形範囲 出典:[40]

## 2.4 パッシブマイクロレオロジー (PMR)

PMR は、プローブ粒子の熱揺らぎから、周囲の媒質の粘弾性を求める計測方法である。図 2.5 のように、プローブ粒子を観測用レーザー (波長 830 nm) でトラップし、ブラウン運動する観測粒子の動きを QPD で検出する (レーザーインターフェロメトリー法)。ここでは、レーザーインターフェロメトリー法で計測した粒子変位  $u(t)$  から、複素粘弾性  $G^*(\omega)$  を求める手順を示す。

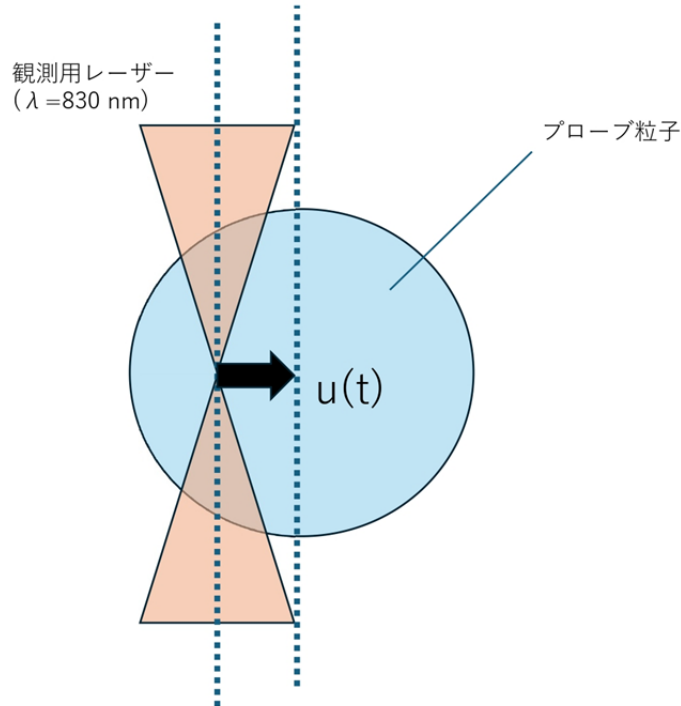


図 2.5: レーザーの集光点に対する粒子の変位  $u(t)$  の概念図

### 2.4.1 応答関数

$G^*(\omega)$  を求めるためには、次の式で表される応答関数  $\alpha^*(\omega)$  を求める必要がある。

$$\tilde{u}(\omega) = \alpha^*(\omega)\tilde{\zeta}(\omega) \quad (2.11)$$

ここで、 $\tilde{\zeta}(\omega)$  は、熱揺動力のフーリエ変換であり、応答関数  $\alpha^*(\omega)$  は、外力 (ここでは、熱的揺動力) に対する粒子変位の応答の大きさを表す。

熱的揺動力を受けている微粒子の運動に関するランジュバン方程式は、摩擦係数  $\gamma(t)$  を用いて、以下のように書ける。

$$m \frac{d^2 u}{dt^2} = - \int_{-\infty}^t \gamma(t-t') \dot{u}(t') dt' + \zeta(t) \quad (2.12)$$

粒子が十分に小さいとすれば、慣性項は無視できる。また、ここで考える変位は周期的に揺れているので過去履歴を必要とし、摩擦項が時間積分で表される。従って、両辺をフーリエ変換、積分の項をフーリエラプラス変換して、式 2.11 に倣い、式変形を行えば、応答関数を導出できる。

$$\tilde{\zeta}(\omega) = -i\omega\hat{\gamma}(\omega)\tilde{u} \quad (2.13)$$

式 2.11 と比較して、

$$\alpha^*(\omega) = -\frac{1}{i\omega\hat{\gamma}(\omega)} \quad (2.14)$$

ただし、実際に計測した、粒子変位は、レーザーによるトラップ力の影響を受けているため、補正が必要である。

#### 2.4.2 トラップ力の補正

次にトラップ力の影響を受けているときの、応答関数  $A^*(\omega)$  を求め、レーザーによるトラップ力の補正式について、説明する。レーザーのトラップ力を  $k_t$  とするランジュバン方程式は以下のように書ける。

$$m\frac{d^2u}{dt^2} = -\int_{-\infty}^t \gamma(t-t')\dot{u}(t')dt' - k_t u(t) + \zeta(t) \quad (2.15)$$

微粒子が十分に小さいとして、慣性項を無視し、この式の両辺をフーリエ変換、積分の項をフーリエラプラス変換すると次のようになる。

$$(k_t - i\omega\hat{\gamma}(\omega))\tilde{u}(\omega) = \tilde{\zeta}(\omega) \quad (2.16)$$

$$\tilde{u}(\omega) = \frac{\tilde{\zeta}(\omega)}{k_t - i\omega\hat{\gamma}(\omega)} \quad (2.17)$$

よって、トラップ力を受けているときの応答関数は、

$$A^*(\omega) = \frac{1}{k_t - i\omega\hat{\gamma}} \quad (2.18)$$

となる。ここで、式 2.14 で示したように、トラップ力のないときの応答関数は  $\alpha^*(\omega) = -\frac{1}{i\omega\hat{\gamma}}$  であるから、以下の式で、トラップ力を補正できる。

$$\alpha^*(\omega) = \frac{A^*(\omega)}{1 - k_t A^*(\omega)} \quad (2.19)$$

#### 2.4.3 トラップ力の影響を受けているときの応答関数

PMR 計測において、まず、レーザーのトラップ力の影響を受けている応答関数  $A^*(\omega) = A'(\omega) + iA''(\omega)$  を求める。ウィーナー・ヒンチンの定理より [41]、観測した粒子変位の自

自己相関関数  $\langle u(t)u(0) \rangle$  をフーリエ変換することで、次式のようにパワースペクトル密度 (PSD) が求まる。

$$\langle |\tilde{u}(\omega)|^2 \rangle^{\text{trap}} = \int_{-\infty}^{\infty} \langle u(t)u(0) \rangle e^{i\omega t} dt \quad (2.20)$$

次に、第一種揺動散逸定理を用いて、パワースペクトル密度 (PSD)  $\langle |\hat{u}(\omega)|^2 \rangle$  から、レーザートラップ力の影響があるときの、応答関数  $A^*(\omega)$  の虚部  $A''(\omega)$  を求める。揺動散逸定理は、平衡状態における応答の関係を示す定理である。[42]

$$\langle |\hat{u}(\omega)|^2 \rangle^{\text{trap}} = \frac{2k_B T}{\omega} A''(\omega) \quad (2.21)$$

式 2.21 の揺動散逸定理を用いて、 $A''$  が求まると、Kramers-Kronig の関係式を用いて、以下のように実部も求まる [42]。

$$A'(\omega) = \frac{2}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\zeta A''(\zeta)}{\zeta^2 - \omega^2} d\zeta \quad (2.22)$$

$P$  は、主値積分であることを示している。

#### 2.4.4 複素弾性率

最終的に、試料本来の応答関数  $\alpha^*(\omega)$  から、一般化ストークスの関係式を用いて、複素弾性率  $G^*(\omega)$  を求めることができる。[43]。  $a$  は粒子半径である。

$$G^*(\omega) = \frac{1}{6\pi a \alpha^*(\omega)} \quad (2.23)$$

$$G^* = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (2.24)$$

$G'$  は貯蔵弾性率、 $G''$  は損失弾性率と呼ばれる。

## 第3章 測定試料の準備 細胞抽出液

### 3.1 細胞抽出液の解凍

IPRACELL 社で購入した HeLa 細胞の細胞抽出液 (IPRACELL 社 HeLa Cytoplasm Extracts CC-01-40-50) は、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存されている。これを測定に使用する量である 0.7 mL ずつチューブに分注する際には、凍結保存されている HeLa 細胞抽出液は、エッペンドルフチューブのまま水浴にかけ、 $4.0^{\circ}\text{C}$  の冷蔵庫内で約 10 分程度かけて完全に解凍する。 $4.0^{\circ}\text{C}$  で解凍する理由は、解凍過程において HeLa extract 内で生じる化学反応を抑制するためである。

### 3.2 細胞抽出液の透析と濃厚化

細胞抽出液はそのままでは、細胞内では局在していた酵素・基質、ER 内の  $\text{Ca}^{2+}$  が混ざり、タンパク質や RNA の分解や変性が進む。酸化ストレスも進んで有害物質も溜まっていると思われるため。そのため、時間の経過とともに粘性率が急激に増加し、測定が困難となる [44]。これは、本研究で観測対象とする高分子込み合い系としての細胞質の物性とは趣旨の異なる効果である。

そこで、本研究の実験では、3 kDa の透析膜を使用して細胞抽出液のバッファーを交換し、低分子成分を除去するとともに、塩濃度条件を調整した。具体的には、粘弾性の急激な増加を抑制する目的で、L15 培地 (Thermo Fisher scientific Leibovitz's L-15 Medium, no phenol red) または S30 培地 (トリス酢酸 5 mM、酢酸マグネシウム 14 mM、酢酸カリウム 60 mM、DTT [ジチオスレイトール] 1 mM) を用いて透析を行った。

また、HeLa 細胞抽出液には細胞骨格を形成するアクチン分子が含まれており、これが重合すると粘弾性が著しく増加し、ゲル化が生じる。これを防ぐため、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン B (Sigma-Aldrich *Drechslera dematioidea* 由来) を細胞抽出液および L15 または S30 に添加し、その条件下で透析を実施した。

#### 3.2.1 先行研究の小分子除去方法

前節では、HeLa 細胞抽出液中の小分子成分を除去し、本研究で任意に設定した環境へ調整する必要があることを記述した。先行研究では、抽出液に L15 培地を混合し、その混合液を 3.5 kDa のフィルター付き遠心チューブに入れ、 $4.0^{\circ}\text{C}$  の環境下で遠心を行い、フィルターで濾過する操作を複数回繰り返す「遠心フィルタリング」と呼ばれる方法により、小分子濃度を 1000 倍に希釈することでこの目的を達成していた。

しかしながら、この方法は複数回の操作を要するため、その過程で抽出液を室温に何度も曝露することになる。また、1000 倍希釈を達成するまでに相当の時間を要するという問題がある。そこで本研究では、別の透析方法を用いて小分子の除去を達成した。

### 3.2.2 透析方法 改良後

解凍した HeLa 細胞抽出液を 3.5 kDa のマイクロダイアライザー (Scienova 社 Xpress Micro Dialyzer) に封入し、細胞抽出液の 50 倍体積の L15 培地 or S30 培地を入れたビーカー中に浸す。これを 4℃、200 rpm の振盪機で揺動させながら 1 時間攪拌し、バッファーを交換する。この操作を 2 回繰り返すことで、実質的に 100 × 100 倍、すなわち 10000 倍以上の透析を行う。

この際、細胞抽出液と L15 培地 or S30 培地の合計量 (L15 培地 or S30 培地 50 mL、HeLa 細胞抽出液 0.5 mL、合計約 50 mL) に対して、サイトカラシン B の最終濃度が 21 μM となるように添加する。サイトカラシン B (エタノール溶液 10 mg/mL) は、L15 培地 or S30 培地と細胞抽出液に分けて添加し、それぞれ L15 培地 or S30 培地に 40 μL、HeLa 細胞抽出液に 10 μL 加える。

サイトカラシン B の拡散時間を考慮し、細胞抽出液には L15 or S30 よりも多めに添加する。ただし、細胞抽出液と L15 or S30 を合わせた全体のサイトカラシン B 濃度は 21 μM に保たれている。

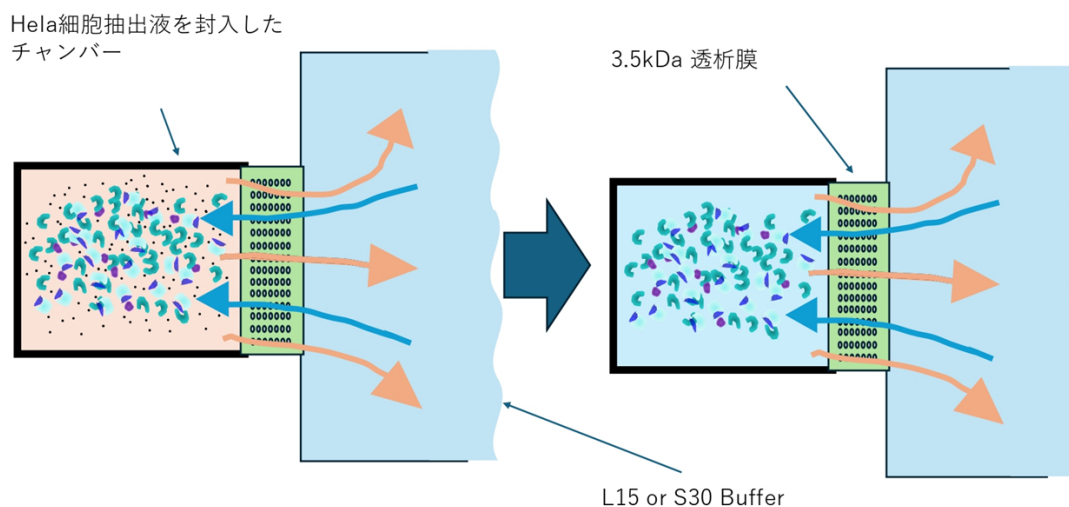


図 3.1: 透析 概略図

### 3.2.3 濃厚化

透析後、遠心操作により細胞抽出液の濃縮を行った (図 3.2)。透析済みの細胞抽出液 0.5 mL を 3 kDa の遠心フィルター (Millipore 社 Amicon Ultra) に添加し、14,000 rpm で

1 時間遠心することで濃縮した。

この条件で濃縮を行うと、タンパク質濃度はおおよそ 0.3 g/mL に達し、生細胞内の細胞質における通常のタンパク質濃度に近い値まで調整することが可能である。

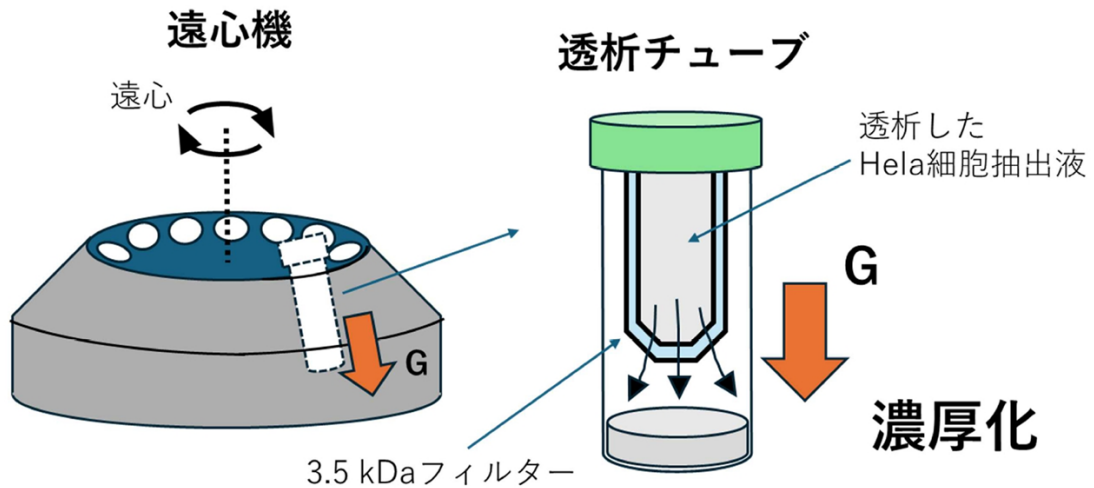


図 3.2: 濃厚化 概略図

### 3.3 添加するサイトカラシン B の濃度の計算

HeLa 細胞の細胞抽出液は、そのままではアクチンが重合し、アクチンフィラメントを形成し始める。これを阻害するために、サイトカラシン B を細胞抽出液に添加する。ここでは、添加するサイトカラシン B の適切な濃度について計算を行う。

[A]: アクチンの濃度 [C]: サイトカラシン B の濃度 [AC]: アクチンとサイトカラシン B の複合体の濃度 [D]: アクチンとサイトカラシン B の平衡定数  $k$ : サイトカラシン B とアクチンが結合する反応の反応速度定数  $k_D$ : アクチンとサイトカラシン B の複合体の解離反応の反応速度定数

とすると、以下の式が成り立つ。

$$k[A][C] = k_D[AC] \quad (3.1)$$

$$\frac{[A][C]}{[AC]} = \frac{k_D}{k} = D \quad (3.2)$$

透析バッファーには大量のサイトカラシン B が存在するので、[C] は一定と考えられる。[A] =  $x$  の濃度があるとし、初期濃度を  $x_0$  として、

$$[AC] = x_0 - x \quad (3.3)$$

よって、式 (3.2) より、

$$D(x_0 - x) = x[C] \quad (3.4)$$

$$x([C] + [D]) = Dx_0 \quad (3.5)$$

$$x = \frac{Dx_0}{C + D} \quad (3.6)$$

式 (3.6) より、 $[C]$  と  $[D]$  が等しいとき、初期に存在していたアクチンの半分がサイトカラシン B と結合することになる。したがって、 $[D]$  よりも十分に大きい濃度でサイトカラシン B を細胞抽出液および透析バッファーに添加する必要がある。

$[D] \simeq 2 \sim 20 \mu\text{M}$  であることから、この計算に基づき、 $21 \mu\text{M}$  の濃度となるようサイトカラシン B を添加した。

## 3.4 タンパク質濃度の測定方法

### 3.4.1 Bradford Assay

Coomassie Brilliant Blue G-250 は、酸性条件下でタンパク質と結合すると、最大吸光波長が  $465 \text{ nm}$  から  $595 \text{ nm}$  へシフトし、溶液の色も茶色から青色へ変化する。この性質を利用し、タンパク質と Coomassie Brilliant Blue G-250 を混合した試料の  $595 \text{ nm}$  における吸光度を測定することで、タンパク質濃度を定量的に決定する。この手法を Bradford Assay という (3.3)。

しかしながら、この方法で直接得られるのは  $595 \text{ nm}$  における吸光度である。したがって、濃度を正確に決定するためには、タンパク質濃度と吸光度との対応関係（吸光の絶対量）をあらかじめ求めておく必要があり、これが不明な場合には定量的な濃度評価はできない。

さらに、試料が異なれば、含まれるタンパク質と Coomassie Brilliant Blue G-250 との結合特性が異なるため、タンパク質濃度と吸光度の比例関係も変化する。そのため、タンパク質溶液の環境が異なる場合には、その都度、濃度と吸光度の対応関係を求める必要がある。この比例関係は、次に示す質量乾燥測定によって求めた [45]。

### 3.4.2 質量乾燥測定

質量乾燥測定 (図 3.3) は、正確に濃度を測定できるが、試料の量が最低でも  $100 \mu\text{L}$  以上必要であり、コストパフォーマンスが悪い。よって、これを Bradford Assay と組み合わせることにより、濃度を測定することで、濃度測定に必要な試料を少なくすることができる。質量乾燥測定では、細胞抽出液のストックから、一部  $100 \mu\text{L}$  以上の試料をチューブに入れ、それをデシケーター（シリカゲルは入れていない）に入れて、ポンプ（GCD-051X、ULVAC 社）で真空引き（6h 以上）をすることで、試料の溶質以外を乾燥させ、残った試料の質量を真空引きする前の試料の体積で割ることで、濃度を算出する。のちに、この質量乾燥測定で濃度がわかっている残りの細胞抽出液で Bradford Assay を行うことで、タンパク質濃度と吸光度の比を求め、以降、同じ試料タンパク質濃度を測定するときは、同じ比を用いて、Bradford Assay でタンパク質濃度を求める。

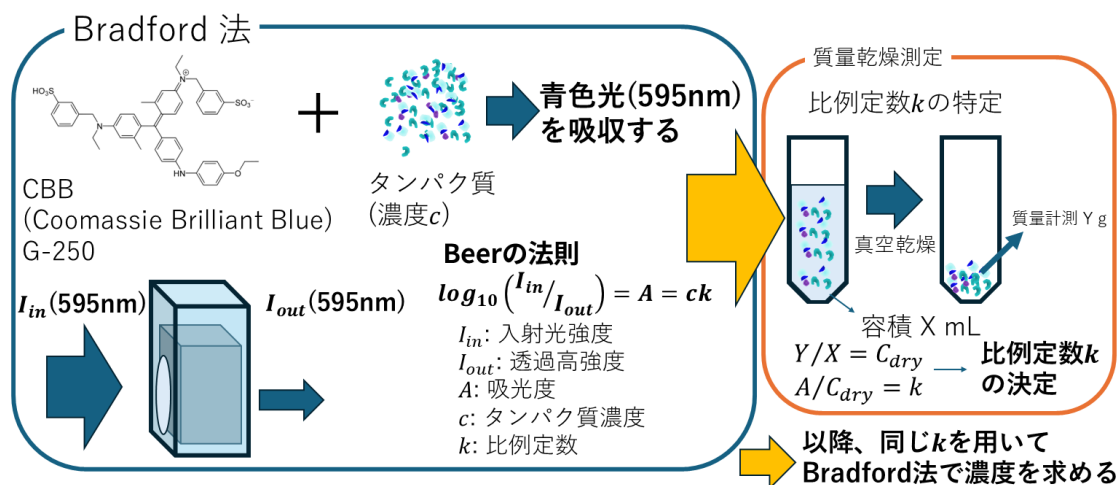


図 3.3: Bradford 法・質量乾燥測定 概略図

### 3.5 試料封入チャンバーの作製

前任者の熊丸は [3]、厚さ  $145 \mu\text{m}$  のポリイミドテープに直径  $6 \text{ mm}$  の穴を開けてスライドガラスに貼り付け、その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) を分散させた試料を封入していた (図 3.4)。しかし、今回の執筆者が実験を繰り返す中で、ポリイミドテープが厚すぎる場合、長時間の計測において粒子がタンパク質の凝集物に覆われ、位置の特定が困難になることが明らかとなった。そこで、長時間の PMR 測定を行う際には、試料の状態に応じて厚さ  $45 \mu\text{m}$  のポリイミドテープを使用した。

また、穴の直径が大きすぎると、チャンバー外へ試料が染み出すことによって生じるマクロスケールの流れ場 (ドリフト) が発生しやすいことが分かった。そのため、穴の直径を  $2 \text{ mm}$  に変更した。このとき、封入する試料量は、厚さ  $145 \mu\text{m}$  のチャンバーでは  $1.2 \mu\text{L}$ 、厚さ  $45 \mu\text{m}$  のチャンバーでは  $0.4 \mu\text{L}$  とすることで、最もドリフトを抑制できた。

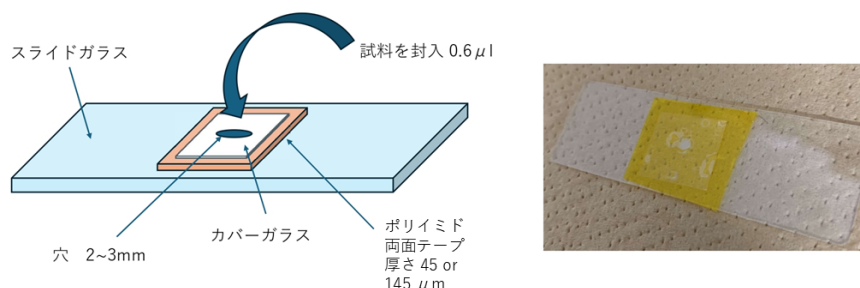


図 3.4: 試料封入 閉鎖系チャンバー 概略図

### 3.6 ATP濃度測定 ルシフェラーゼアッセイ

20℃の条件下で ATP の濃度の時間変化を追跡し、細胞抽出液の代謝活性を調査した。ATP 濃度の測定は、ホタルルシフェラーゼ (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。

#### 3.6.1 ルシフェラーゼアッセイの原理

D-Luciferin が ATP と結合するときに発光することを利用して、ATP の濃度を測定する。ホタルルシフェラーゼ発光は、ルシフェラーゼにより、D-Luciferin が ATP を通じて酸化するときに、光を生じる反応である (図 3.5)。D-Luciferin は、ルシフェラーゼ、マグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ ) の存在下において ATP と反応した後、酸素 ( $O_2$ ) と反応して、励起状態のオキシルシフェリンを生成し、基底状態に戻るときに光を発する。発光量  $Y$  (RLU) と、濃度  $C$  (M) の間には次のような関係がある。

$$\log Y = A \log C + B \quad (3.7)$$

( $A, B$  は定数)

あらかじめ ATP 濃度のわかっている溶液で、 $A, B$  を決定しておいて、その  $A, B$  を用いて、発光量から、ATP 濃度を特定する。ホタルルシフェラーゼ発光は、時間経過で、発光量が減衰する。よって、前任者である熊丸と実験条件を同じにするために、試料とルシフェリンを混ぜて 10 秒間混和して、測定する条件にそろえた。

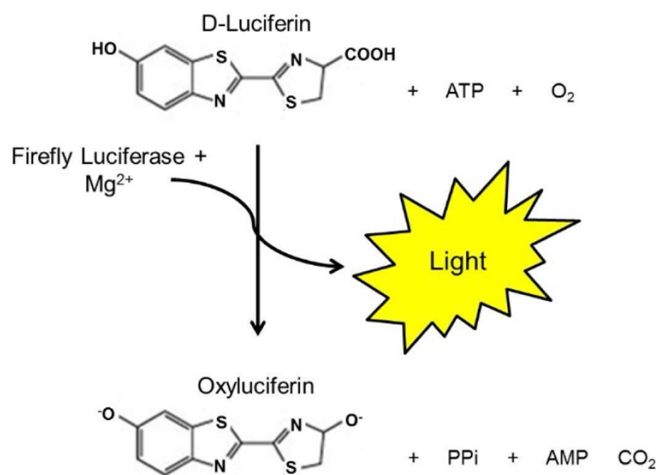


図 3.5: ホタルルシフェラーゼ発光 概略図 出典:[3]

## 第4章 実験結果

### 4.1 細胞抽出液とコロイド懸濁液

### 4.2 L15 透析時の HeLa 細胞抽出液

先行研究（熊丸修論）[3] とおなじ L15 Buffer で、小分子除去を遠心フィルタリングではなく、透析で行った場合の結果を載せる。ATP は加えていない。計測は、試料を封入してから、8.5 ~ 58 分後の間に 5 分刻み、2 時間後計測を一回行っている。試料封入は、遠心機で、濃厚化してから、2 ~ 3 分で完了する。薄い色から濃い色への色の濃さの変化で時間経過を示した。

今回の実験で使った HeLa 細胞抽出液は、L15 培地透析環境、ATP なし、タンパク質濃度 0.28 g/mL である。先行研究（熊丸修論）のデータ（HeLa 細胞抽出液、遠心フィルタリング、タンパク質濃度 0.24 g/mL、ATP なし）である。計測開始から 30 分後に観測電圧と変位のキャリブレーションを一回行い、各時間ラップごとの観測電圧と変位のキャリブレーションは実施していない。長時間計測においては、試料の屈折率が時間経過で変化する可能性があるため、計測ごとのキャリブレーションの実施が推奨される。

#### 4.2.1 PSD 時間経過と先行研究のデータとの比較

まずは、今回の実験で観測されたデータ (L15 培地透析環境、タンパク質濃度 0.28 g/mL) の PSD を示す。時間経過で PSD が低下し、エイジングをする様子が観測された。周波数依存性は時間経過で一定であった (図 4.1)。

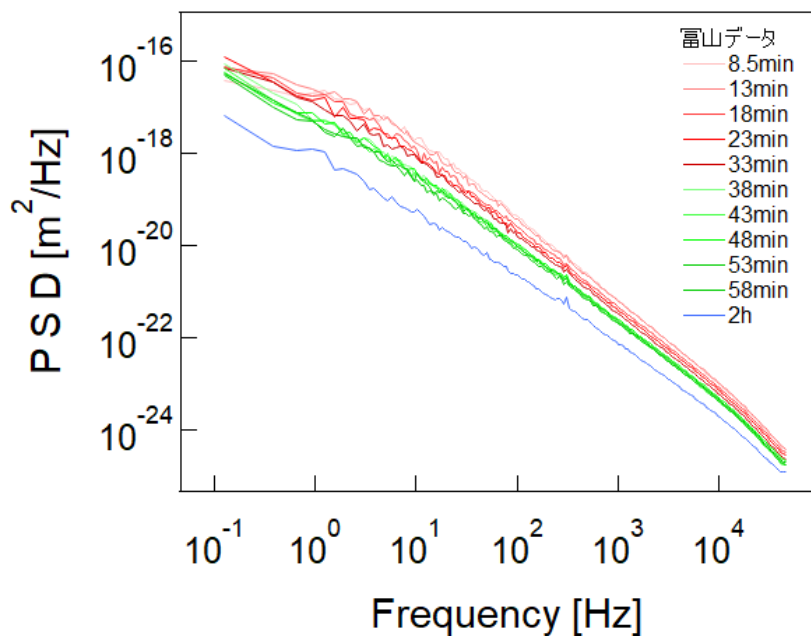


図 4.1: L15 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、PSD 解析によるエイジング過程

次の図は、図 4.1 のデータの最初の計測開始から 8.5 ~ 33 min 経過後と 6 h 経過後のデータ (紫系統) を先行研究 (熊丸修論) のデータ (黒点線) と比較したものである (図 4.2)。先行研究を行った熊丸のデータよりも、高い PSD が広い周波数域で見えている。

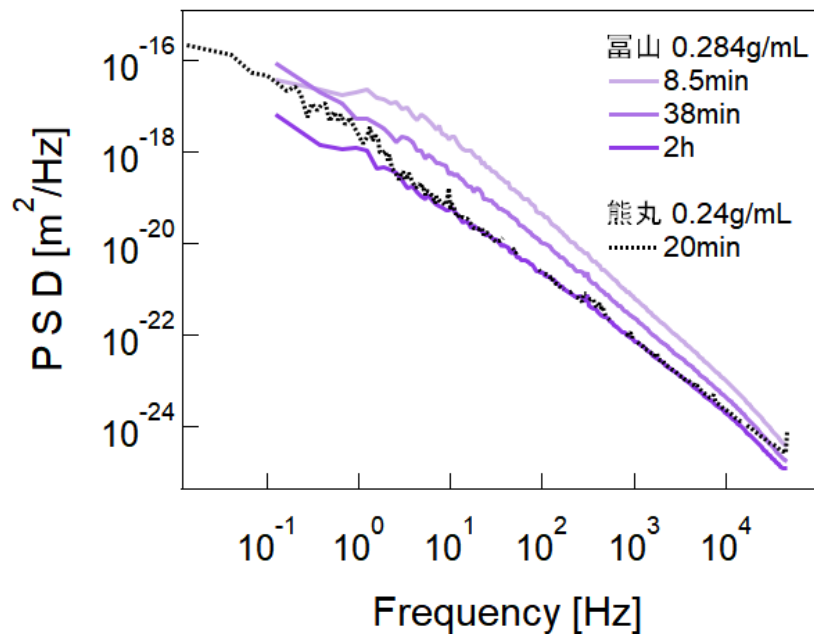


図 4.2: L15 透析時における HeLa 細胞抽出液の PSD から観測されるエイジング過程の、先行研究データとの比較

#### 4.2.2 複素粘弾性の時間経過と先行研究のデータとの比較

同様に、今回測定した HeLa 細胞抽出液のレオロジー特性 (L15 培地透析環境、ATP なし、タンパク質濃度 0.28 g/mL) について、先行研究 (熊丸修論) による測定結果 (HeLa 細胞抽出液、遠心フィルタリング、ATP なし、タンパク質濃度 0.24 g/mL) と複素粘弾性率の比較を行った。

図 4.1 から計算した、 $G'$  (貯蔵弾性率) を図示する。全体的に  $G'$  が大きくなっていく様子 (エイジング) が観測された。また、広い範囲で周波数依存性を傾きとして確認できる (図 4.3)。

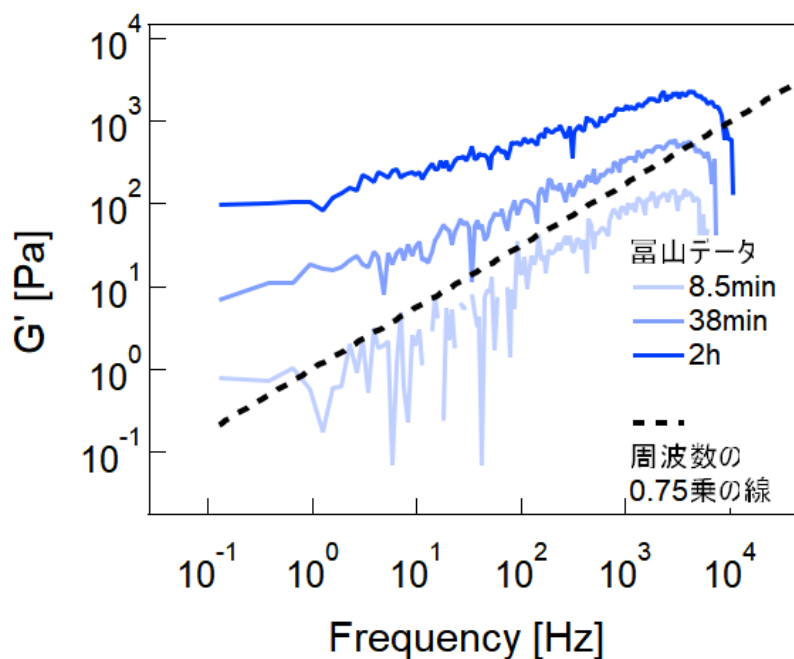


図 4.3: L15 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G'$  で評価したエイジング過程

次に、図 4.3 のデータを先行研究 (熊丸修論) のデータと比較した結果を図示する (図 4.4)。先行研究 (熊丸修論) と比べて柔らかく出てきている。

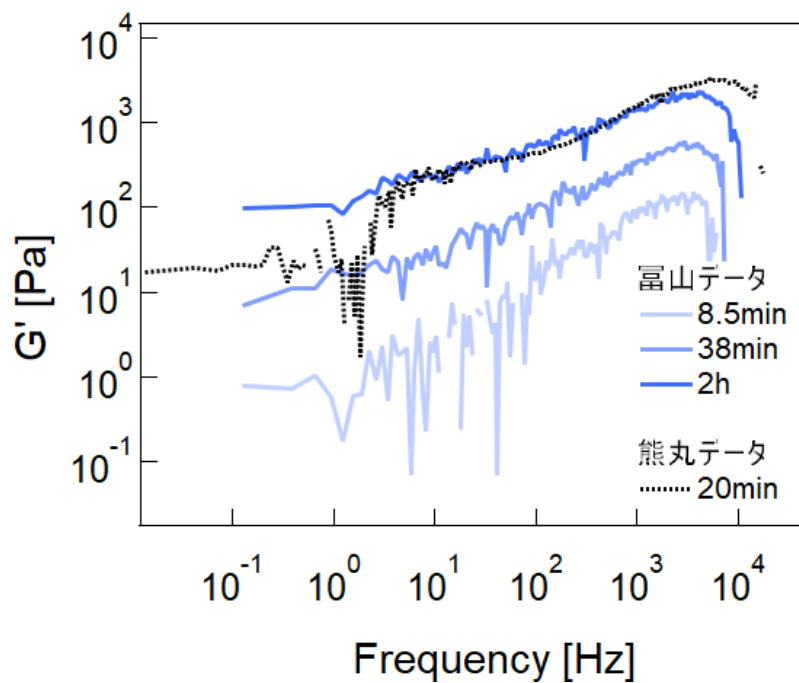


図 4.4: L15 透析時における HeLa 細胞抽出液の  $G'$  から観測されるエイジング過程の、先行研究データとの比較

図 4.1 から計算した、 $G''$  (損失弾性率) を図示する。全体的に時間経過で  $G''$  が大きくなっていく様子 (エイジング) が観測された。広い範囲で周波数依存性の傾きを観測できている (図 4.5)。

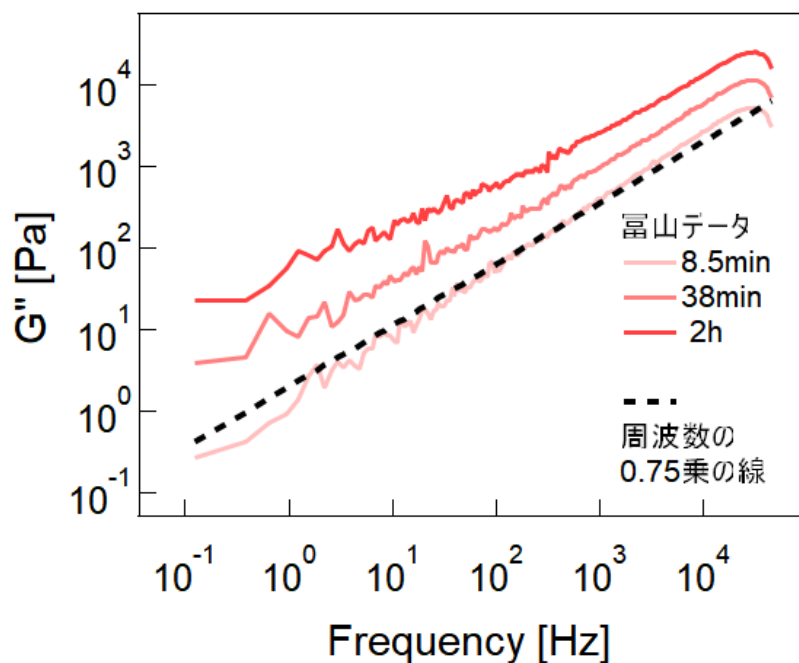


図 4.5: L15 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G''$  で評価したエイジング過程

次に、図 4.5 のデータを先行研究（熊丸修論）のデータと比較したものを図示する。先行研究（熊丸修論）と比べて、より柔らかい状態を示している（図 4.6）。

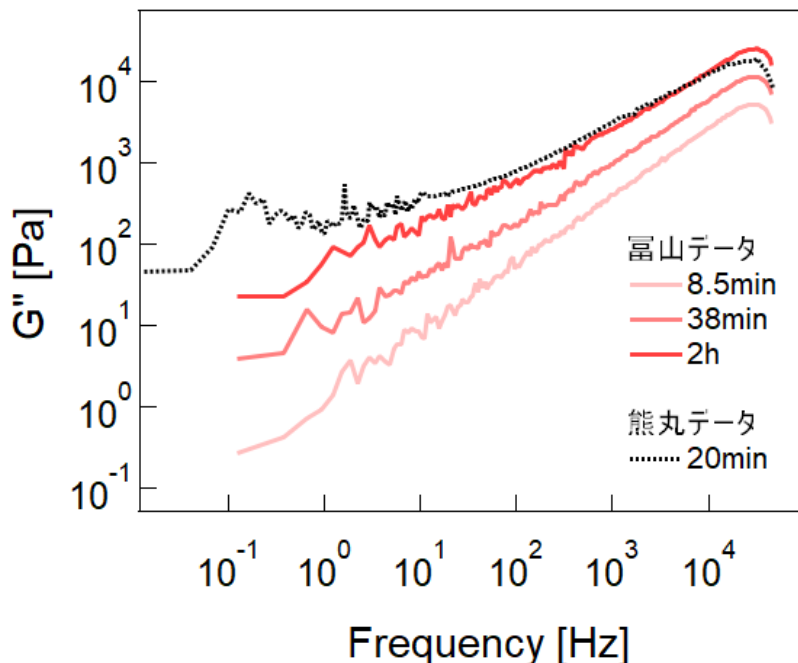


図 4.6: L15 透析時における HeLa 細胞抽出液の  $G''$  から観測されるエイジング過程の、先行研究データとの比較

本研究ではノイズの影響を低減することで測定精度が向上し、複素粘弾性率の周波数依存性をより詳細に観測することが可能となった。具体的には、チャンバーを載せるピエゾステージの微小振動が測定に影響していたため、計測時には電源を遮断した。また、チャンバーの開口部を可能な限り小さくすることで、ドリフトの抑制を行った。

今回の測定では、貯蔵弾性率および損失弾性率はいずれも、PSD の場合と同様に、先行研究（熊丸修論）よりも柔らかく見積もられた。タンパク質濃度が高くなるほど粘弾性が増加することが報告されている [12]。この点を踏まえると、先行研究（熊丸修論）におけるタンパク質濃度は  $0.24 \text{ g/mL}$ 、今回のタンパク質濃度は  $0.28 \text{ g/mL}$  であるため、本来は今回のほうが粘弾性が大きく（硬く）なることが予想される。しかし実際には、今回の結果は先行研究と比べて柔らかく得られており、両者は傾向として一致しない。貯蔵弾性率については、先行研究（熊丸修論）の主張と一致して、時間経過とともに大きく上昇し、同時に周波数依存性の傾きが緩やかとなる弾性プラトーが確認された。損失弾性率については、周波数依存性の傾きは先行研究のデータと概ね一致していることが確認された。

### 4.2.3 L15 透析時の HeLa 細胞抽出液の PSD および複素粘弾性について、生細胞中との時間経過の比較

前節と同じデータ (HeLa 細胞抽出液、L15 培地透析環境、ATP なし、タンパク質濃度 0.28 g/ml) を生細胞中の測定データと比較した。

次に、図 4.1 のデータを生細胞中と比較した図を添付する。PSD について、エイジング初期には生細胞中よりも大きな値を示していたが、時間の経過とともに生細胞中と同程度の値を通過し、さらに小さくなる様子が観察された (図 4.7)。

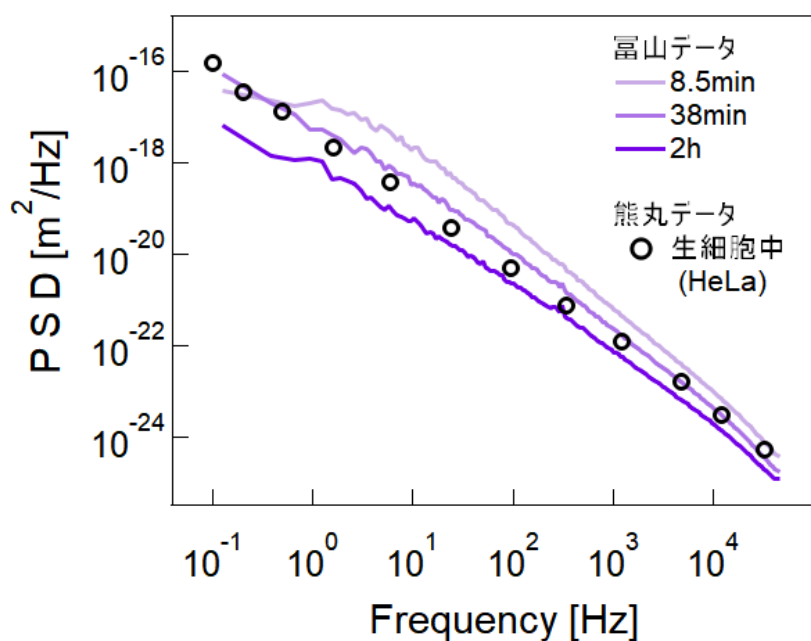


図 4.7: L15 透析時における HeLa 細胞抽出液の PSD から観測されるエイジング過程の、生細胞中との比較

次に、図 4.3 のデータを生細胞中と比較した図を添付する。貯蔵弾性率  $G'$  は、初期には生細胞中よりも小さく、より柔らかい状態を示していたが、時間の経過とともに生細胞中と同程度の値を経て、さらに大きくなり硬化していく様子が観察された。また、その傾きについても、途中で生細胞中と同様の傾きを示す段階を経ることが確認された (図 4.8)。

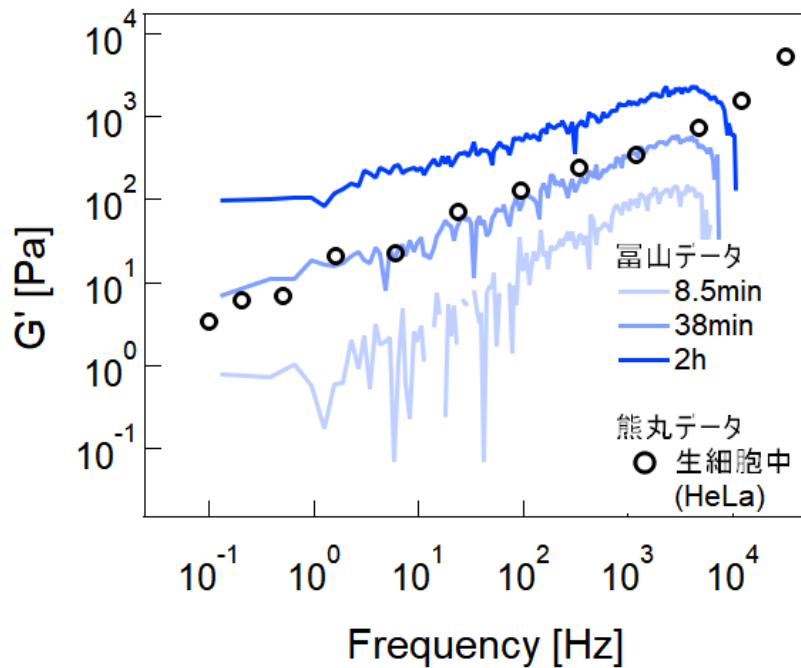


図 4.8: L15 透析時における HeLa 細胞抽出液の  $G'$  から観測されるエイジング過程の、生細胞中との比較

次に、図 4.5 のデータを生細胞中と比較した図を添付する。損失弾性率  $G''$  は、初期には生細胞中よりも小さく、より流動的な状態を示していたが、時間の経過とともに生細胞中と同程度の値を経て、さらに大きくなり粘稠になる様子が観察された。また、傾きについても、途中で生細胞中と同様の傾きを示す段階を経るが、低周波は傾きが一致するが、高周波については生細胞よりも傾きが大きかった（図 4.9）。

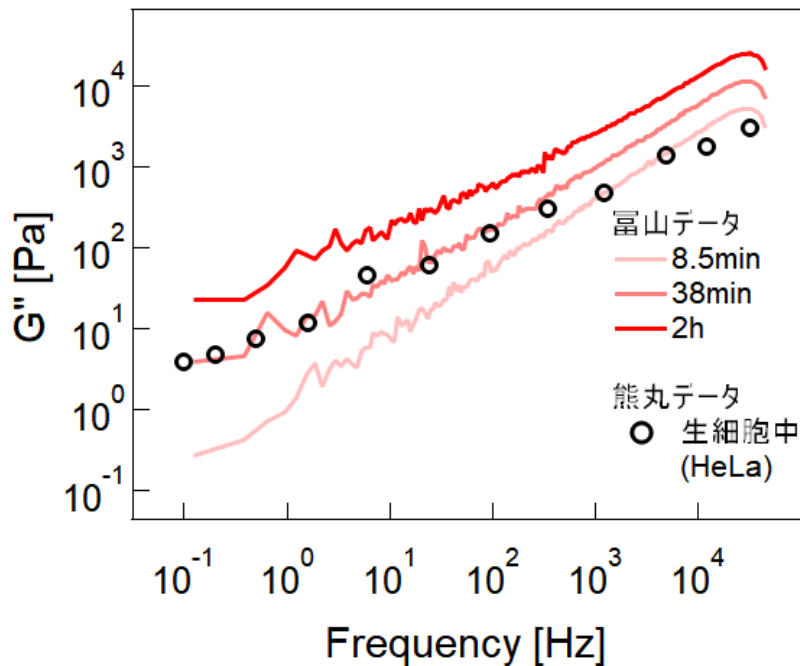


図 4.9: L15 透析時における HeLa 細胞抽出液の  $G''$  から観測されるエイジング過程の、生細胞中との比較

PSD の計測結果より、初めは生細胞より柔らかかったのが、時間経過とともに生細胞中よりも固くなっていく様子が見られた（図 4.7）。

貯蔵弾性率は、生細胞中よりも柔らかかったものが、時間経過で生細胞中と等しい値を通過して、固くなっていく様子が見られた。周波数依存性については、途中で生細胞中と同様の傾きを通過していく様子が見られた。

損失弾性率についても、生細胞中よりも柔らかかったものが、時間経過で生細胞中と等しい値を通過して、粘稠になっていく様子が見られた。傾きについて、 $10^2$  Hz 以下で生細胞と等しい傾きになっていたが、それ以上の高周波域ではより粘稠な値が出てきた。

### 4.3 今回の実験結果 HeLa 細胞抽出液 S30 透析時

#### 4.3.1 S30 透析時の HeLa 細胞抽出液における PSD および複素粘弾性のエイジングの様子

透析に用いるバッファーの変更によってエイジングの有無や進行挙動が変化するかを検討するため、バッファーを S30 に変更して PMR レオロジー計測を行った。

次に、S30 を透析した場合のエイジングの様子を PSD で示す。(HeLa 細胞抽出液 タンパク質濃度 0.28 g/mL ATP なし) L15 で透析した場合と同じく、時間経過でエイジングする様子が見られた。今回取得したデータでは、ドリフトの影響で  $10^1$  Hz 以下で、PSD が若干跳ね上がっている (図 4.10)。

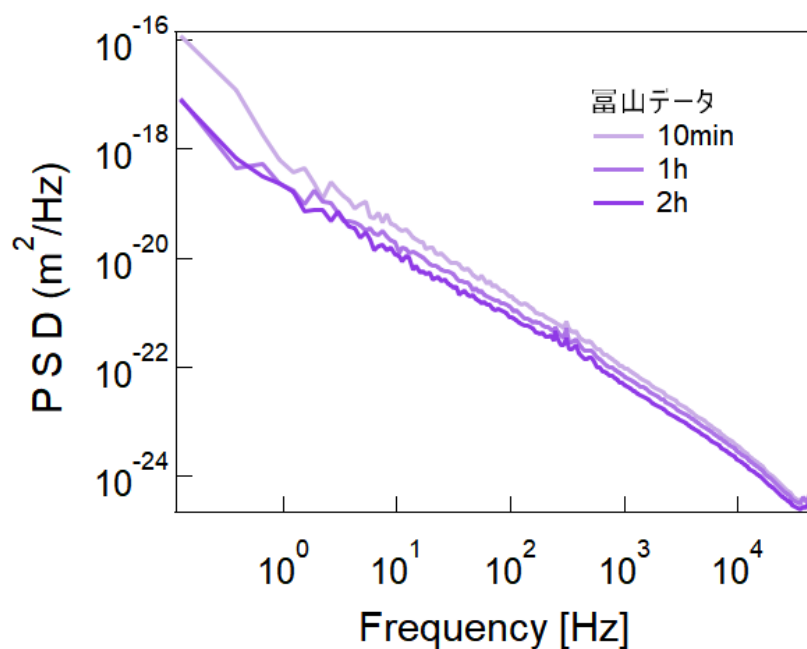


図 4.10: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、PSD 解析によるエイジング過程

次に、S30 を透析した場合のエージングの様子を  $G'$  で示す。貯蔵弾性率  $G'$  は、エージングの進行に伴って時間とともに増加し、硬化していく様子が観察された。 $10^0$  Hz 以上の周波数域では、周波数依存性が見られる (図 4.11)。

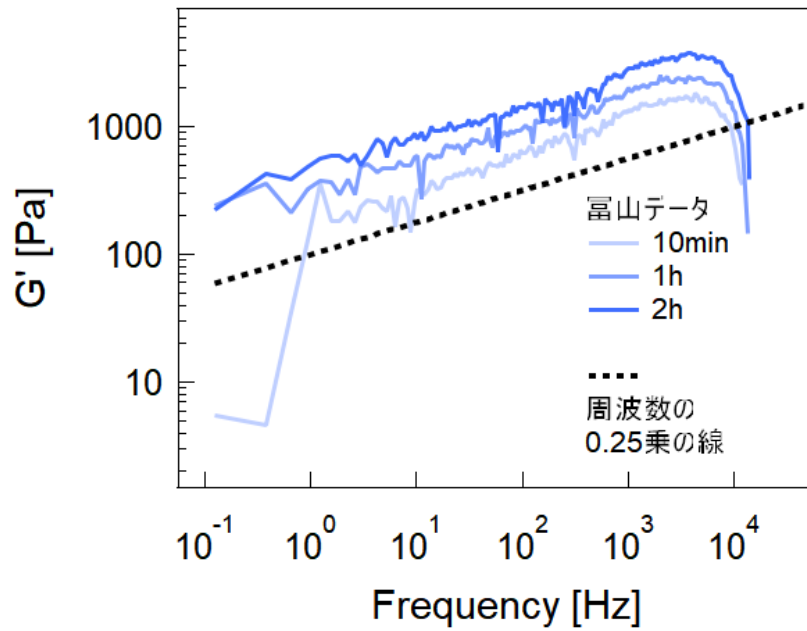


図 4.11: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液の  $G'$  で評価したエージング過程

次に、S30 を透析した場合のエイジングの様子を  $G''$  で示す。損失弾性率  $G''$  は、エイジングの進行に伴って時間とともに増加し、粘稠になる様子が観察された。貯蔵弾性率と同様に、周波数依存性が見られる（図 4.12）。

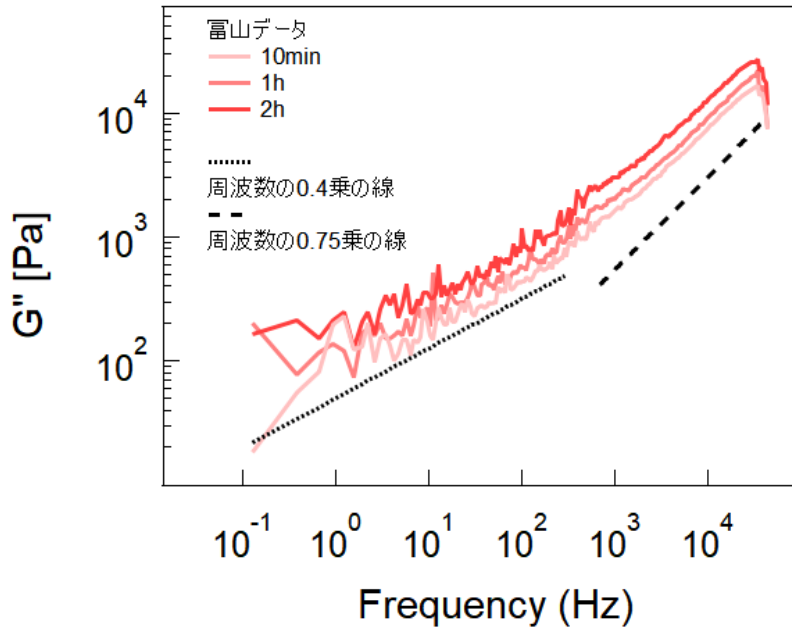


図 4.12: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G''$  で評価したエイジング過程

今回の研究により、S30 条件においてもエイジングが生じることが確認された。一方で、タンパク質濃度が同一であるにもかかわらず、L15 と比較して、貯蔵弾性率および損失弾性率はいずれもエイジング初期から計測終了時まで一貫して大きな値を示した。すなわち、S30 条件では、より硬く、かつ粘稠な力学特性を示すことが明らかとなった。今回の実験では、チャンバーに封入する試料の適切な量を事前に決定できていなかったため、試料封入時にチャンバー外へ試料が染み出し、外界との通り道が生じた。その結果、ドリフトが発生してしまった。

### 4.3.2 S30 透析時の HeLa 細胞抽出液の PSD および複素粘弾性の時間経過を生細胞中と比較

図 4.10 のデータを生細胞中と比較した図と、タンパク質濃度がより濃い場合の生細胞中と比較した図を乗せる (図 4.13、4.14)。PSD の値はどちらも、観測初期の段階から生細胞中と比較して低い値を示しており、さらにエイジングの進行に伴って一層低下する様子が観察された。

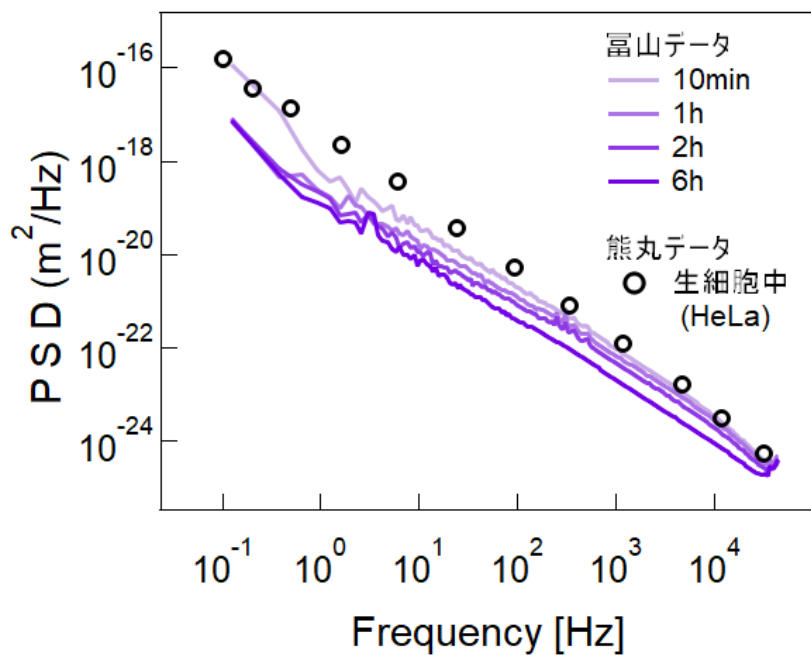


図 4.13: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、PSD から観測されるエイジング過程の生細胞中との比較

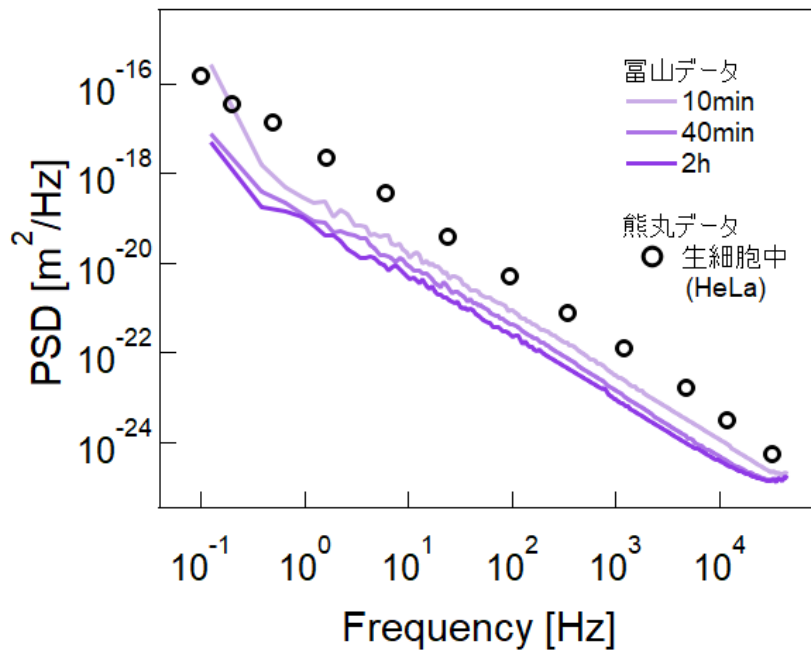


図 4.14: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.30 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、PSD から観測されるエイジング過程の生細胞中との比較

図 4.10、図 4.14 のデータにおける貯蔵弾性率  $G'$  を生細胞中と比較した図を示す (図 4.15、4.16)。貯蔵弾性率  $G'$  は、観測初期の段階ですでに生細胞中と比較して大きな値を示しており、全体として生細胞中よりも硬い力学特性を示していた。 $10^1$  Hz 以下では、ドリフトの影響で、弾性が落ち込んでいる。

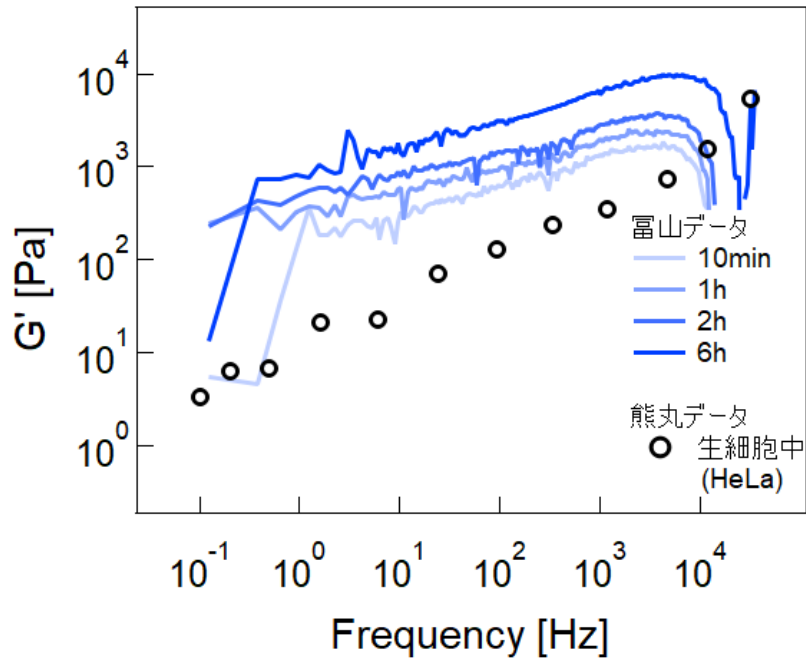


図 4.15: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G'$  から観測されるエイジング過程の生細胞中との比較

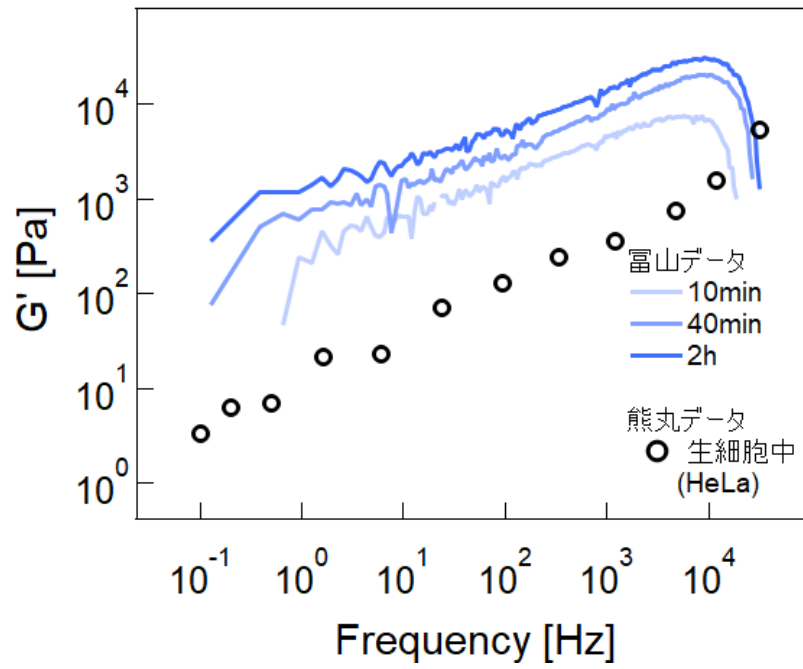


図 4.16: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.30 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G'$  から観測されるエイジング過程の生細胞中との比較

図 4.10、4.14 のデータにおける損失弾性率  $G''$  を生細胞中と比較した図を示す (図 4.17、4.18)。また、貯蔵弾性率  $G'$  と同様に、観測初期の段階ですでに生細胞中と比較して大きな値を示しており、全体として生細胞中よりも粘稠な力学特性を示していた。

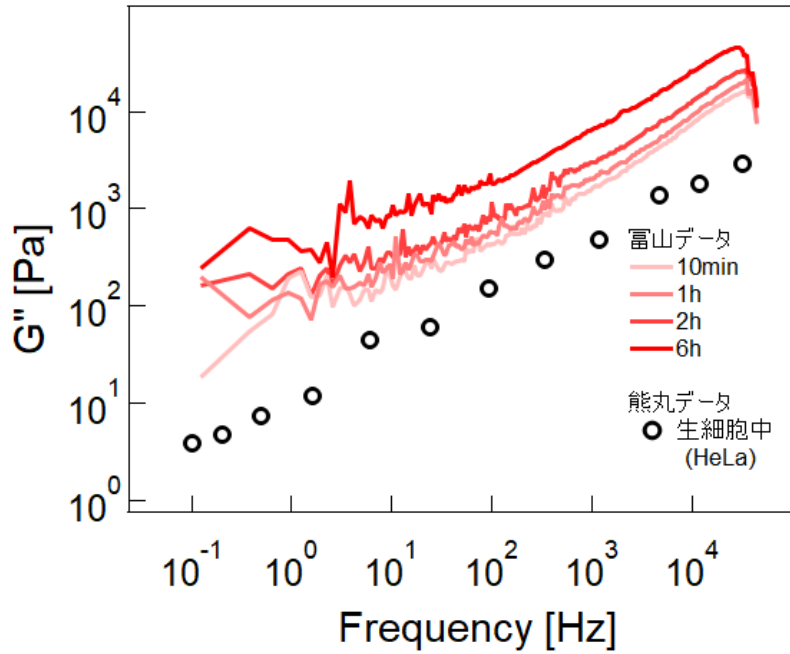


図 4.17: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.28 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G''$  から観測されるエイジング過程の生細胞中との比較

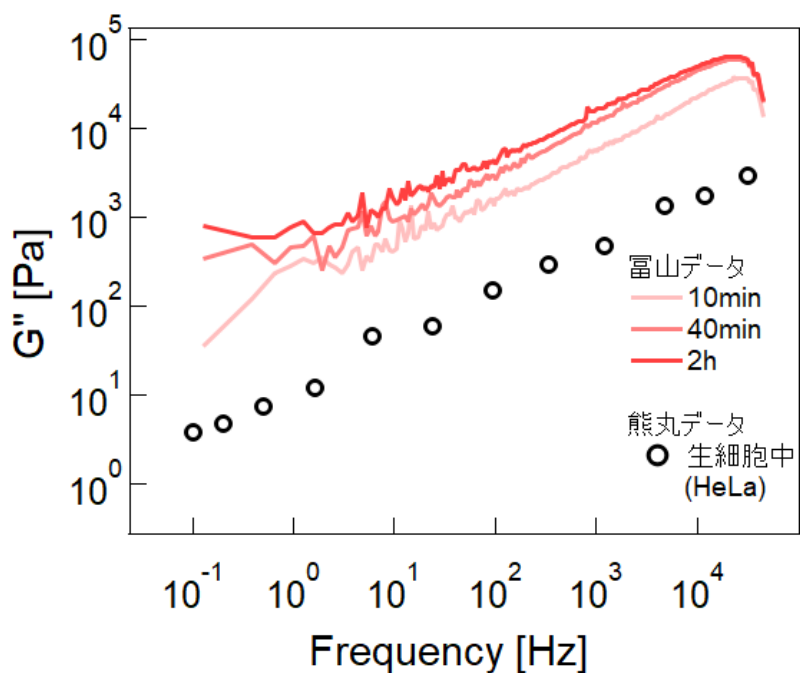


図 4.18: S30 透析時におけるタンパク質濃度 0.30 g/mL の HeLa 細胞抽出液について、 $G''$  から観測されるエイジング過程の生細胞中との比較

1.5.1 節では、タンパク質濃度 0.30 g/mL の細胞抽出液が、計測開始時点で生細胞中と同程度の PSD、複素粘弾性率を示した。また、今回のデータでは、L15 透析時のタンパク質濃度 0.28 g/mL の細胞抽出液が、計測開始時において生細胞中よりも柔らかい PSD、複素粘弾性率を示した (4.2.3)。これらと比較して、今回計測した S30 透析時のタンパク質濃度 0.28 g/mL、0.30 g/mL の細胞抽出液は、計測開始初期からかなり硬い PSD、複素粘弾性率を示す結果となった。

## 4.4 細胞抽出液のエージングと代謝

### 4.4.1 先行研究

先行研究(熊丸修論)[3]では細胞抽出液(HeLa 細胞抽出液、Xenopus egg 細胞抽出液、大腸菌抽出液)の3.5 kDa以上のタンパク質がATP加水分解能を持ち、細胞抽出液に添加したATPは時間経過で分解されることを示した(図4.19)。

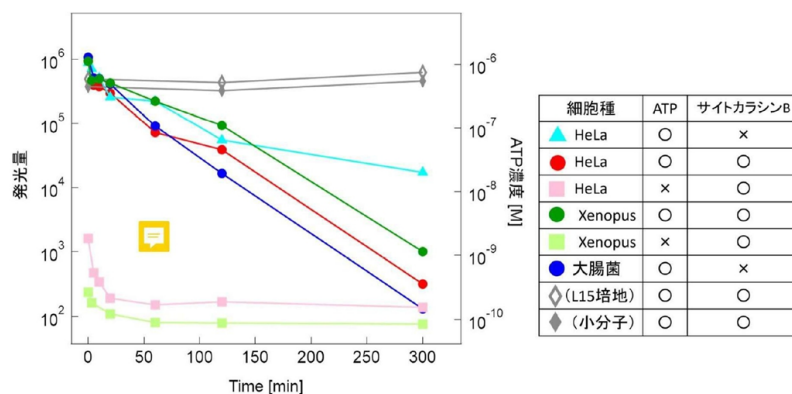


図 4.19: 3.5 mM の濃度の ATP を添加した各抽出液中の ATP 濃度の時間変化。どの抽出液でも、ATP が加水分解されている。

また先行研究(熊丸修論)では、ATPの加水分解が細胞抽出液のエージングに与える影響を解明することを試みた。先行研究では、ATPを細胞抽出液に添加した場合は、エージングが急激に進み、ATPがない場合は、緩やかにエージングが進むことが示された(図4.20)。

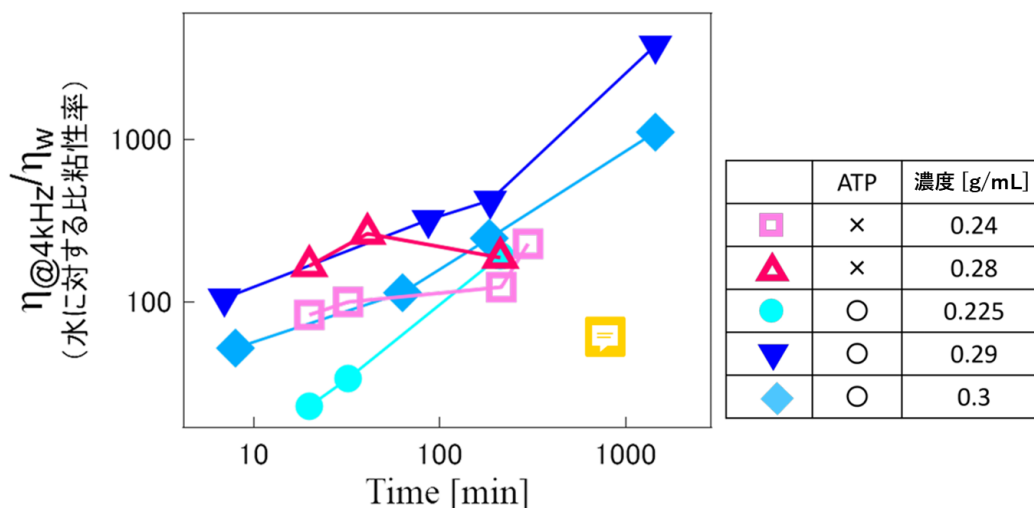


図 4.20: HeLa 細胞抽出液の水に対する非粘性率の時間変化

#### 4.4.2 今回の計測結果

以下に先行研究（熊丸修論）の ATP 分解能を今回の計測と比較したものを図示する (図 4.21)。ATP の分解能計測方法はルシフェラーゼアッセイである。

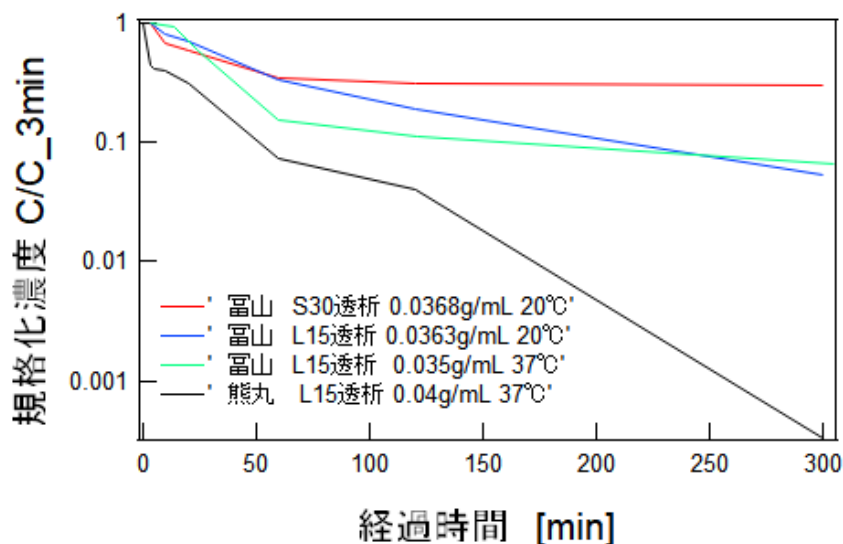


図 4.21: ルシフェラーゼアッセイによる、ATP 濃度の時間経過

今回の研究では、L15 で透析した場合と、S30 で透析した場合の ATP 分解能を先行研究と比較した。先行研究では、ATP の加水分解能測定は、37℃環境下で行っていたが、PMR によるレオロジー測定の実験環境は 20℃である。よって、今回は L15 については、37℃環境下、20℃環境下、S30 については 20℃環境下で ATP 加水分解能測定をおこなった。どの場合でも ATP は分解されているが、先行研究に比べて、今回扱った系では、ATP 分解が L15、S30 とともに緩やかになっており、ATP 分解能が今回の研究で使用した系では落ちていることがわかる。

## 第5章 考察

### 5.1 先行研究の再現性について

HeLa 細胞抽出液を L-15 培地で透析した場合、先行研究と比較して、PSD、貯蔵弾性率、損失弾性率のいずれについても、初期値が本研究の測定結果の方が小さく得られた。この原因として、以下の点が考えられる。

第一に、本研究では HeLa 細胞抽出液として、1 年以上の $-80^{\circ}\text{C}$ 長期保存を経た試料を使用した点である。長期保存に伴うタンパク質の変性や活性低下が、力学応答の低下につながった可能性がある。

第二に、サイトカラシン B 添加時の操作の影響が挙げられる。サイトカラシン B は、一般的には DMSO に溶解させるところを、エタノールの溶液として添加したが、この際、エタノールに溶解したサイトカラシン B 溶液を、細胞抽出液に対して体積比で約 2% 添加し、ピペティングによって混合したのちに、透析を行った。この操作により、添加したエタノールおよびサイトカラシン B の量が相対的に多くなり、何らかの形で細胞抽出液中のタンパク質に不可逆的な影響を与えた可能性が考えられる。

また、そもそも小分子除去を遠心フィルタリングから透析に変更しているため、この影響も考えられる。

ATP の加水分解能が落ちていることも、エタノール、サイトカラシン B の影響による可能性がある。

### 5.2 細胞抽出液のエイジングから考える、細胞質のレオロジー

細胞抽出液が条件次第でエイジングを示すことは、先行研究とも整合的である [13]。生細胞中では、ATP 枯渇により非平衡揺らぎが抑制されると、細胞質の貯蔵弾性率が低周波域 ( $< 10^1$  Hz) において増加することが知られている [4]。このことは、細胞質が非平衡揺らぎの抑制された環境下では、本来は、低周波域で弾性的性質を強める傾向を有することを示唆している。

ここで、本研究の実験結果から生じる疑問は、生細胞中における非平衡揺らぎの抑制が、なぜ高周波数帯 ( $10^1 \sim 10^4$  Hz) における貯蔵弾性率および損失弾性率の増加に必ずしも結びつかないのか、という点である [4]。今回行った細胞抽出液の粘弾性計測では、エイジングに伴う貯蔵弾性率および損失弾性率の増加が、広い周波数帯 ( $10^0 \sim 10^4$  Hz) にわたって観測された。

この結果は、非平衡揺らぎが存在しない環境下において、細胞抽出液が条件次第で広帯域にわたり粘弾性を増大させる性質を有することを示している。細胞抽出液と生細胞中の細胞質は物質的に類似した構成要素を持つことから、生細胞中の細胞質も潜在的には同様

の性質を有する可能性が考えられる。したがって、生細胞においては、何らかの機構が高周波数帯における粘弾性変化を抑制していると考えられる。

### 5.3 Buffer の環境がエイジングの有無に及ぼす影響

表 5.1: 各バッファの組成とエイジングの関係

		NH-buffer		L15-buffer		S30-buffer	
1価 イオン	ナトリウム塩	塩化ナトリウム (NaCl)	100mM	塩化ナトリウム	137mM	なし	
	カリウム塩	なし		ピルビン酸ナトリウム	5mM		
2価 イオン				塩化カリウム (KCl)	5.3mM	酢酸カリウム (CH <sub>3</sub> COOK)	60mM
	マグネシウム塩			硫酸マグネシウム (MgSO <sub>4</sub> )	0.8mM	酢酸マグネシウム (Mg(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> )	14mM
				塩化マグネシウム (MgCl <sub>2</sub> )	1.0mM		
	カルシウム塩	なし		塩化カルシウム (CaCl <sub>2</sub> )	1.2mM	なし	
	アミノ酸	なし		17種類	26mM	なし	
	ビタミン	なし		8種類	0.04mM	なし	
	緩衝剤	HEPES-KOH	20mM	リン酸水素ナトリウム (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.3mM	トリス酢酸	5mM
				リン酸二水素カリウム (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.4mM		
	その他			ガラクトース	5mM	DTT(還元剤)	1mM
pH			7.6		7.6		8.2
エイジング		なし		あり		あり	

表 5.1 は、各バッファの組成とエイジングの関係である。ATP が存在していない環境において、先行研究で細胞抽出液を NH-Buffer で透析した場合、エイジングを起こさなかったのに対し、L15、S30 では、エイジングを起こした。

ナトリウム、カリウム、マグネシウムなどの塩が入っているのは、NH、L15、S30、三つのバッファで共通している。この中で、L15 では、アミノ酸、ビタミン、ガラクトースがそれ以外に含まれている。これらは、タンパク質の酵素としての反応にかかわってくる。(翻訳、各種酵素反応)

先行研究の時点 (NH、L15 のデータのみ) では、これら、塩以外のアミノ酸、ビタミン、ガラクトースなどが、エイジングに関わる可能性があった。

しかし、今回の S30 buffer による実験結果により、アミノ酸、ビタミン、ガラクトースなどの物質がない環境でもエイジングを起こすことが分かった。

よって、アミノ酸、ビタミン、ガラクトースによる、タンパク質の化学的な反応が、エイジングのする、しないに関わる可能性は低いことが分かった。対して、アミノ酸、ビタミン、ガラクトースのない NH-buffer ではエイジングが起こなかったのに対し、S30-buffer ではエイジングが起こったことから、エイジングの有無には、塩環境が重要であることが示唆される。

## 5.4 Bufferの環境が粘弾性の強度に及ぼす影響

### 5.4.1 1価、2価無機陽イオンの影響

NH-bufferではエイジングを起こさないのに対し、L15、S30-bufferではエイジングを起こし、さらにS30-bufferでは全体的に粘弾性が高く、固く、粘稠に出てきている。原因として、NH、S30、L15-bufferの組成の違いを考えると、イオン環境に関わる可能性が考えられる[46]。

タンパク質は多数のカルボキシル基およびアミノ基を有し、表面は正負の電荷が不均一に分布している。NaCl、KCl、CH<sub>3</sub>COOKなどの塩は、今回のNH、L15、S30-bufferのような数十mMから数百mM程度の濃度では、タンパク質の静電引力相互作用を遮蔽し(静電遮蔽)、タンパク質の溶解させる効果(塩溶)が大きいと考えられる。

これに対し、Mg<sup>2+</sup>濃度を増やした条件ではホエイタンパク質(牛乳由来のタンパク質)やactinネットワーク等のモデル系で弾性率*G'*が増加する例が報告され、溶液の粘弾性を変化させることが示されている[47][48]。また、二価のイオンはタンパク質のカルボキシル基を介して、引力相互作用を及ぼす可能性がある。Mg<sup>2+</sup>を介した引力相互作用は水和の効果を考慮した研究が現在進行中であり、マグネシウムイオンがタンパク質間に静電遮蔽以外に引力相互作用の効果以外に、水分子を介した引力相互作用を及ぼす可能性は捨てきれない。

これを踏まえて、NH-bufferでは、Na<sup>+</sup> 100 mM、K<sup>+</sup> 少量の1価イオンのみが含まれる。L15-bufferでは、Na<sup>+</sup>が約140 mM、K<sup>+</sup> 5 mM程度と1価のイオンがメインだが、Mg<sup>2+</sup> 2 mM程度、Ca<sup>2+</sup> 1 mM程度2価のイオンが多少含まれる。S30-bufferでは、K<sup>+</sup> 60 mM、Mg<sup>2+</sup> 14 mMと2価のイオンが大量に含まれることを考慮すると、

#### NH-buffer

1価イオンのみからなるNHバッファーでは、静電遮蔽効果は働く一方で2価イオンが存在しないため、タンパク質間の引力相互作用が弱く、固化(エイジング)が起こりにくかった。

#### L15-buffer

1価のイオンが主体だが、少量の2価のイオンを含むL15-bufferは、静電遮蔽効果以外に、タンパク質間の引力相互作用が多少働き、エイジングした。

#### S30-buffer

1価のイオン以外に、2価のイオンが大量に含まれるS30 bufferは、静電遮蔽効果に加えて、タンパク質間の引力相互作用が強く働き、エイジングするとともに、粘弾性が強く出た。

と考えられる。

## 第6章 まとめ

### 6.1 まとめ

本研究では、細胞抽出液を用いた粘弾性計測を通して、生細胞外の条件下で、バッファー環境が細胞抽出液のレオロジー特性とエイジング挙動に与える影響を検討した。

まず、細胞骨格の影響を排した細胞抽出液においても、条件次第でエイジングが生じ、貯蔵弾性率および損失弾性率が広い周波数帯にわたり増加することを示した。この結果は、ATP 枯渇下の生細胞で低周波域に限って弾性的性質が強まるという先行研究と対照的であり、生細胞中では高周波数帯における粘弾性の増大を抑制する何らかの制御機構が存在する可能性を示唆している。

次に、ATP 非存在下におけるバッファー依存性を比較した結果、NH-buffer ではエイジングが観測されなかった一方、L15-buffer および S30-buffer では明確なエイジングが生じた。S30-buffer にはアミノ酸やビタミン、糖類が含まれていないことから、細胞抽出液のエイジングはこれらの物質に関連する可能性は低い。

さらに、各バッファー条件における粘弾性の強度の違いは、溶液中のイオン組成、特に二価陽イオン ( $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ ) の存在量と強く相関していた。1 価イオンを含む NH-buffer では、静電遮蔽によりタンパク質間の長距離静電反発はある程度抑制されている。しかし、二価イオンによる引力相互作用が存在しないため、短距離の引力相互作用は十分に発達せず、安定なネットワーク形成やエイジングには至らなかったと考えられる。一方、L15-buffer では少量の二価イオンによりタンパク質間引力が部分的に増大し、エイジングが生じた。S30-buffer では高濃度の二価イオンが存在し、強い静電遮蔽と引力相互作用により、エイジングの進行および高い粘弾性が顕著に現れたのではないかと考察した。

以上の結果から、細胞抽出液のエイジングおよび粘弾性の増大は、タンパク質間の静電的相互作用を中心とした物理的要因に支配されており、特に二価陽イオン濃度がその主要な制御因子である可能性を指摘した。本研究は、生細胞中の細胞質が条件により、エイジングしうる物質であること、そして生体内では非平衡揺らぎやイオン制御によってその物性が動的に調節されている可能性を示すものである。

## 第7章 展望

私の実験研究の重要な成果の一つとして、レオロジーの周波数依存性が明瞭に観測できるレベルまで測定精度を向上させた点が挙げられる。具体的には、ノイズおよびドリフトの除去手法について体系的な How to を確立した。

この成果を基盤として、博士課程では、細胞抽出液、バッファー環境、ATP 環境といった条件が、タンパク質懸濁液としての細胞抽出液のレオロジー特性にどのような影響を与えるのかを明らかにし、その物理モデルを構築することを目指す。

さらに、開放系における実験にも取り組んでいる。細胞抽出液の組成を恒常的に維持することで生体細胞内環境を模倣し、生細胞観測のみでは困難であった定量的な組成操作を可能にする。これにより、細胞質の物性およびレオロジー特性の解明を進める。

加えて、大腸菌懸濁液を用いた実験も並行して行っている。これらの研究を通じて、細胞種に依存しない普遍的な細胞質の物性およびレオロジーの理解に貢献することを目指す。

以上の研究で得られた知見を基盤として、将来的には、なぜ生細胞が高濃度タンパク質環境下においても粘弾性の増大を抑制できるのかを明らかにすることを目的とする。さらに、高濃度タンパク質環境下であっても流動性を維持可能な人工環境を構築し、高濃度・流動化無細胞タンパク質合成系の工業化へと展開する。これにより、大量のタンパク質合成を実現し、タンパク質生産コストの削減に貢献する (図 7.1)。

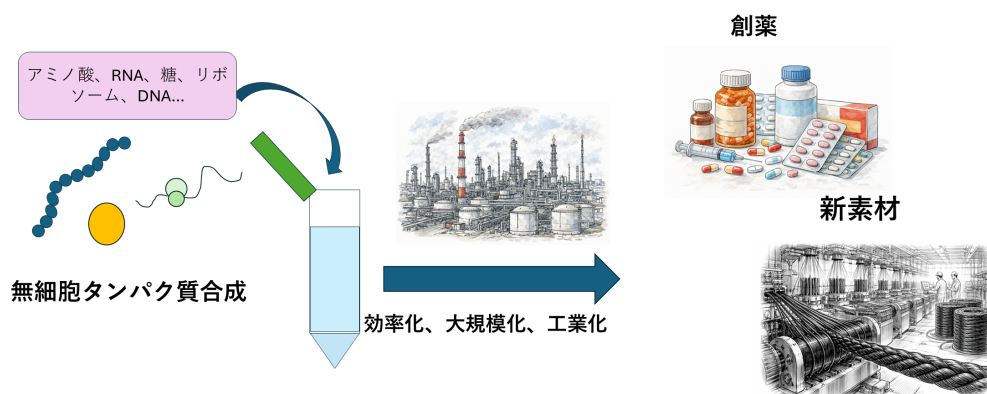


図 7.1: 展望 イメージ図

## 参考文献

- [1] Hiroyuki Ebata, Katsuhiko Umeda, Kenji Nishizawa, Wataru Nagao, Shono Inokuchi, Yujiro Sugino, Takafumi Miyamoto, and Daisuke Mizuno. Activity-dependent glassy cell mechanics i mechanical properties measured with active microrheology. BIOPHYSICAL JOURNAL, 122(10):1781–1793, MAY 16 2023.
- [2] M. T. Valentine, Z. E. Perlman, T. J. Mitchison, and D. A. Weitz. Mechanical properties of xenopus egg cytoplasmic extracts. Biophysical Journal, 88(1):680–689, 2005.
- [3] 水野大介 熊丸一平. 細胞質の代謝依存的エイジングと力学特性. 九州大学, 修論, 複雑生命物性研, 2023.
- [4] K. Umeda, K. Nishizawa, W. Nagao, S. Inokuchi, Y. Sugino, H. Ebata, and D. Mizuno. Activity-dependent glassy cell mechanics ii: Nonthermal fluctuations under metabolic activity. Biophysical Journal, 122(22):4395–4413, 2023.
- [5] Melissa B. Gordon, Christopher J. Kloxin, and Norman J. Wagner. Structural and rheological aging in model attraction-driven glasses by rheo-sans. SOFT MATTER, 17(4):924–935, JAN 28 2021.
- [6] Palash Bera, Abdul Wasim, Somenath Bakshi, and Jagannath Mondal. Protein translation can fluidize bacterial cytoplasm. PNAS NEXUS, 3(12), DEC 5 2024.
- [7] Keiichiro Sakai, Yohei Kondo, Yuhei Goto, and Kazuhiro Aoki. Cytoplasmic fluidization contributes to breaking spore dormancy in fission yeast. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 121(26), JUN 25 2024.
- [8] Samuel R. Plante, Kyung-Mee Moon, Pascale Lemieux, Leonard Foster, and Christian Landry. Breaking spore dormancy in budding yeast transforms the cytoplasm and the solubility of the proteome. PLOS BIOLOGY, 21(4), APR 2023.
- [9] Bradley R. Parry, Ivan V. Surovtsev, Matthew T. Cabeen, Corey S. O’Hem, Eric R. Dufresne, and Christine Jacobs-Wagner. The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity. CELL, 156(1-2):183–194, JAN 16 2014.
- [10] 今井 正幸. ソフトマターの秩序形成. 丸善出版, 2010.

- [11] Emad Moeendarbary, Leo Valon, Marco Fritzsche, Andrew R. Harris, Dale A. Moulding, Adrian J. Thrasher, Eleanor Stride, L. Mahadevan, and Guillaume T. Charras. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. NATURE MATERIALS, 12(3):253–261, MAR 2013.
- [12] K. Nishizawa, K. Fujiwara, M. Ikenaga, N. Nakajo, M. Yanagisawa, and D. Mizuno. Universal glass-forming behavior of in vitro and living cytoplasm. Scientific Reports, 7:Art. 15143, 2017.
- [13] Louise Jawerth, Elisabeth Fischer-Friedrich, Suropriya Saha, Jie Wang, Titus Franzmann, Xiaojie Zhang, Jenny Sachweh, Martine Ruer, Mandiye Ijavi, Shambaditya Saha, Julia Mahamid, Anthony A. Hyman, and Frank Juelicher. Protein condensates as aging maxwell fluids. SCIENCE, 370(6522):1317+, DEC 11 2020.
- [14] Alex Bulpitt, Karl Hawkins, Bharath Sundaramoorthy, Muthusankar Sudalaimuthu, Suresh Pillai, and Francesco Del Giudice. Experimental viscoelasticity of physiological protein solutions. JOURNAL OF RHEOLOGY, 70(1):125–138, JAN 2026.
- [15] H. Ebata, K. Nishizawa, F. A. S. van Esterik, Y. Tao, S. Inokuchi, H. Ise, and D. Mizuno. Single power-law rheology of crowded cytoplasm in living cells. Cell Reports Physical Science, 7(1), January 2026.
- [16] Brian P. Tighe. Relaxations and rheology near jamming. Physical review letters, 107(15):Art.158303, OCT 7 2011.
- [17] Gary L. Hunter and Eric R. Weeks. The physics of the colloidal glass transition. REPORTS ON PROGRESS IN PHYSICS, 75(6):066501, JUN 2012.
- [18] Antonio M. Puertas, Cristiano De Michele, Francesco Sciortino, Piero Tartaglia, and Emanuela Zaccarelli. Viscoelasticity and stokes-einstein relation in repulsive and attractive colloidal glasses. JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS, 127(14):Art.144906, OCT 14 2007.
- [19] AM Puertas, E Zaccarelli, and F Sciortino. Viscoelastic properties of attractive and repulsive colloidal glasses. JOURNAL OF PHYSICS-CONDENSED MATTER, 17(25):L271–L277, JUN 29 2005.
- [20] Andraz Gnidovec, Emanuele Locatelli, Simon Copar, Anze Bozic, and Emanuela Bianchi. Anisotropic dlvo-like interaction for charge patchiness in colloids and proteins. NATURE COMMUNICATIONS, 16(1):4277, MAY 8 2025.
- [21] Effects of ph on protein–protein interactions and implications for protein phase behavior. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics, 1784(4):600–610, 2008.

- [22] Tsutomu Arakawa and Serge N. Timasheff. [3]theory of protein solubility. In Diffraction Methods for Biological Macromolecules Part A, volume 114 of Methods in Enzymology, pages 49–77. Academic Press, 1985.
- [23] Halil I. Okur, Jana Hladilkova, Kelvin B. Rembert, Younhee Cho, Jan Heyda, Joachim Dzubiella, Paul S. Cremer, and Pavel Jungwirth. Beyond the hofmeister series: Ion-specific effects on proteins and their biological functions. JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 121(9):1997–2014, MAR 9 2017.
- [24] Hector Lopez-Laguna, Julieta Sanchez, Ugutz Unzueta, Ramon Mangues, Esther Vazquez, and Antonio Villaverde. Divalent cations: A molecular glue for protein materials. TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES, 45(11):992–1003, NOV 2020.
- [25] M. Vazquez da Silva and J. M. P. Q. Delgado. Cold-set whey protein isolate gels: The influence of aggregates concentration on viscoelastic properties. In A Ochsner, GE Murch, and JMP Delgado, editors, DIFFUSION IN SOLIDS AND LIQUIDS VI, PTS 1 AND 2, volume 312-315 of Defect and Diffusion Forum, pages 1143+, 2011. 6th International Conference on Diffusion in Solids and Liquids, Paris, FRANCE, JUL 05-07, 2010.
- [26] Yasuhiro Aarii and Yasuyuki Takenaka. Magnesium chloride concentration-dependent formation of tofu-like precipitates with different physicochemical properties. BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 77(5):928–933, MAY 2013.
- [27] Maria G. Vazquez de Vasquez, Bethany A. Wellen Rudd, Marcel D. Baer, Emma E. Beasley, and Heather C. Allen. Role of hydration in magnesium versus calcium ion pairing with carboxylate: Solution and the aqueous interface. JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 125(40):11308–11319, OCT 14 2021.
- [28] A. Patel, H. O. Lee, L. Jawerth, S. Maharana, M. Jahnel, M. Y. Hein, S. Stoyanov, J. Mahamid, S. Saha, T. M. Franzmann, A. Pozniakovski, I. Poser, N. Maghelli, L. A. Royer, M. Weigert, E. W. Myers, S. Grill, D. Drechsel, A. A. Hyman, and S. Alberti. A liquid-to-solid phase transition of the als protein fus accelerated by disease mutation. Cell, 162(5):1066–1077, 2015.
- [29] A. Wisniewska, T. Kalwarczyk, J. Szymanski, K. Kryszczuk, K. Matula, and R. Holyst. Cell extract gels as an example of active matter. Rheologica Acta, 59(8):575–582, 2020.
- [30] R. R. Weihing. Effects of myosin and heavy-meromyosin on actin-related gelation of hela-cell extracts. Journal of Cell Biology, 75(1):95–103, 1977.
- [31] Bradley R. Parry, Ivan V. Surovtsev, Matthew T. Cabeen, Corey S. O’Hern, Eric R. Dufresne, and Christine Jacobs-Wagner. The bacterial cytoplasm has glass-like properties and is fluidized by metabolic activity. Cell, 156(1):183–194, 2014.

- [32] 田尾 優樹. 生細胞細胞質のアクティビティ、混み合い依存性. 九州大学, 修論, 複雑生命物性研, 2025.
- [33] Takayuki Ariga. Nonthermal fluctuations accelerate biomolecular motors. Biophysical Reviews, 16(5):605–612, 2024.
- [34] K Madin, T Sawasaki, T Ogasawara, and Y Endo. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 97(2):559–564, JAN 18 2000.
- [35] Gaku Sato, Shintaro Miyazawa, Nobuhide Doi, and Kei Fujiwara. Cell-free protein expression by a reconstituted transcription-translation system energized by sugar catabolism. MOLECULES, 29(13):2956, JUL 2024.
- [36] E. M. Furst and T. M. Squires. Microrheology. In MICRORHEOLOGY. 2017.
- [37] Pietro Cicuta and Athene M. Donald. Microrheology: a review of the method and applications. SOFT MATTER, 3(12):1449–1455, 2007.
- [38] Neda Meshksar, Moritz Mehmet, Katharina-Sophie Isleif, and Gerhard Heinzl. Applying differential wave-front sensing and differential power sensing for simultaneous precise and wide-range test-mass rotation measurements. Sensors, 21(1):164, 2021.
- [39] Gudrun Wanner, Gerhard Heinzl, Evgenia Kochkina, Christoph Mahrtdt, Benjamin S. Sheard, Sönke Schuster, and Karsten Danzmann. Methods for simulating the readout of lengths and angles in laser interferometers with gaussian beams. Optics Communications, 285(24):4831–4839, 2012.
- [40] 水野 大介 杉野 裕次郎. 代謝回転を導入した細胞質モデルの力学計測. 九州大学, 修論, 複雑生命物性研, 2020.
- [41] H. Hashitsume R. Kubo, M. Toda. Nonequilibrium Statistical Mechanics. 2012.
- [42] 早川 禮之助, 伊藤 耕三, 木村 康之, and 岡村 光治. 非平衡系のダイナミクス入門. 培風館.
- [43] TG MASON and DA WEITZ. Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids. PHYSICAL REVIEW LETTERS, 74(7):1250–1253, FEB 13 1995.
- [44] 西澤賢治. 高分子込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. 九州大学, 修論, 複雑生命物性研, 2025.
- [45] Yoshio Suzuki. 総タンパク質定量法. 2018.

- [46] Alexander A. Tokmakov, Atsushi Kurotani, and Ken-Ichi Sato. Protein pi and intracellular localization. FRONTIERS IN MOLECULAR BIOSCIENCES, 8:Art.775736, NOV 29 2021.
- [47] M. Vazquez da Silva, J. M. P. Q. Delgado, and M. P. Goncalves. Impact of mg<sup>2+</sup> and tara gum concentrations on flow and textural properties of wpi solutions and cold-set gels. INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD PROPERTIES, 13(5):972–982, 2010.
- [48] Bekele Gurmessa, Madison Francis, Michael J. Rust, Moumita Das, Jennifer L. Ross, and Rae M. Robertson-Anderson. Counterion crossbridges enable robust multiscale elasticity in actin networks. PHYSICAL REVIEW RESEARCH, 1(1):Art.013016, AUG 28 2019.

## 第8章 謝辞

指導教官の水野大介教授には、私の個性を伸ばしつつ、抑えるべきところは適切に抑え、課題を与えたうえで自発的に解かせるといった、私の特性を最大限に引き出すご指導をしていただきました。

副指導教官の江端宏之准教授には、K2-spring 申請書の添削をはじめ、物理学会の場で悩みを聞いていただくなど、大変お世話になりました。研究の世界の様子についても多くをご教示いただき、そのご指導は私にとって大きな心の支えとなりました。

副指導教官の福田順一教授には、物理理論に関して多大なるご指導を賜り、本研究に対する理解を深めることができました。

栗栖実さんには、修士論文の添削や論文精査に関するアドバイスをいただき、大変お世話になりました。なるほどと思わされるご意見が多く、私自身の成長に大きくつながりました。

趙松川さんには、AIの活用方法について研究的事実に基づく使い方の心構えをご教授いただいたほか、悩みの相談にも乗っていただき、多くのことを学ばせていただきました。

田尾さん、濱田さん、上村君、浜君、前田君、佐々木君、本間さん、金山君、白坂君、竹田さんには、研究室の仲間として切磋琢磨し、互いに高め合いながらここまで来られたことを大変ありがたく感じております。私は今後、博士課程に進学し研究を続けていきますが、これまでの学びを糧に、より一層邁進していきたいと考えております。