

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14669

研究課題名(和文) 外的刺激に対する細胞内“水”の定量評価

研究課題名(英文) Quantitative characterization of intracellular water in response to external stimuli

研究代表者

白神 慧一郎 (Shiraga, Keiichiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：80795021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：独自に構築した全反射減衰テラヘルツ時間領域分光測定系を用いてin vivoでヘアレスマウス中の水分子ダイナミクスを解析した結果、生細胞中と死細胞中ではバルク水：水和水の存在比率が有意に異なっていることが見出された。これは生体高分子の機能発現に直接関与する水和水と、増大するエントロピーの受け皿としてはたらくバルク水の絶妙なバランスが生命活動を下支えしていることを示唆するものである。また、外的影響として純水と化粧水をマウスに塗布したところ、構成成分中に占めるバルク水割合の少ない化粧水のほうが生細胞・死細胞両方に対してより高いバルク水の供給能力を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水分子は「未知なる生命のバッファー」として生物学研究ではその存在が過小評価されていたが、本研究では水の物理的性質が生命活動と関連していることが分子レベルで明らかになった。テラヘルツ分光技術に基づいて、さらに生命現象に関わる水分子の機能を解き明かすことができれば、水分子の秩序やバランスを指標として非標識・非侵襲で細胞の状態を評価する技術を創出し、その先には水分子の能動的制御による細胞操作をも実現できる可能性を秘めていると期待している。

研究成果の概要(英文)：An original terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy system that allows accurate measurement of the complex dielectric constant was developed to analyze water dynamics in the skin epidermis of a hairless mouse in vivo. It was found in this study that the fractional content of bulk water is significantly larger in living cells compared to that in dead ones, indicating a fine balance between bulk and hydration water in living things. When pure water and cosmetic lotion is applied as external influence, lotion that contains lesser amount of bulk water was revealed to have higher ability to provide bulk water to both living and dead cells.

研究分野：生物物理

キーワード：水 水和水 細胞 全反射減衰テラヘルツ時間領域分光 複素誘電率

## 1. 研究開始当初の背景

約 38 億年前に海の中で生命が誕生して以降、水への適応力を身につけながら生命が進化を遂げてきたことは紛れもない事実であり、1937 年にノーベル医学生理学賞を受賞したセント・ジェルジ博士が *matrix of life* と表現した水が生命活動の中核をなすことは想像に難くない。しかし今日の分子生物・細胞生物学ではタンパク質やゲノムを軸に細胞内で繰り広げられる生命現象を事細かに描き出すことに成功している一方で、細胞内の大半を占める水分子に関する理解は驚くほどに少ない。これは、生命活動に重要であると誰もが漠然と理解している“水”は現在の生命科学において「未知なる生命のバッファー」でしかないことを示唆している。

水は 4°C で最大密度を有する、融点・沸点が極端に高いなどの特殊な物理的性質を示すため水分子の振る舞いに関する研究は物理学 (物理化学・生物物理) の研究領域にあり、そこではタンパク質や核酸、リン脂質などの生理機能が水分子との相互作用によってもたらされることが広く知られている。その最たる例は、生体分子と相互作用することでバルク水とは異なる物理的振る舞いを示す水和水であり、酵素活性や細胞膜の自己組織化といった細胞内の秩序は水和水なしでは生まれえないことは周知の事実である。それではなぜ水分子に関する知見は生物学領域にまで浸透していないのであろうか？物理学研究では水溶液のような純粋な系を対象とするため、数多の生体分子が複雑な相互作用を織りなす細胞内環境において水分子を選択的に観測するのは非常に困難であり、過去 20 年間で細胞内水に焦点を当てた研究が単発的に報告されるようになってきてはいるものの、細胞内水の重水素化や凍結化といった前処理を必要としていたため真に“生理状態を保った”細胞内の水に関する知見は得られていなかった。

私はこれまでの研究で、テラヘルツ帯 (0.1~10 THz;  $10^{11}$ ~ $10^{13}$  Hz) の誘電応答は生体高分子の影響を受けにくくほぼ水分子を選択的に反映することを見出しているため、テラヘルツ分光を用いることで複雑かつ不均質な細胞内環境において水分子だけを非標識・非侵襲で観測できるとの着想に至った。培養した HeLa 細胞を用いて実証実験を行ったところ、HeLa 細胞内の水分子のうち約 25 %が生体分子によって動的に束縛された水和水として存在し、残る 75 %程度のバルク様な水分子も純水に比べて著しく水素結合構造が無秩序化していることが明らかになった。この実証結果は生理状態を保った細胞内の水分子の性状を定量的評価することに成功した世界の初めての研究成果であり、今後テラヘルツ分光測定技術をさらに成熟させることで細胞内の水の役割を解明できる可能性を秘めていると期待している。

## 2. 研究の目的

これまで独自に技術構築を進めてきた全反射減衰テラヘルツ時間領域分光を細胞測定用に特化させることで、高精度で細胞内水の物性変化を評価できるようになることを目指す。そしてその新規測定系を用いて、外的影響によって定常状態から変化していく細胞内での水の状態変化を定量評価することで、水分子の生物学的な役割を理解する。

## 3. 研究の方法

液体の水はテラヘル帯で大きい吸収を示すため、信号の減衰が著しい透過測定では細胞内水のわずかな変化を高精度で検出するのが困難である。そこで本研究では過度な吸収の影響を避けて測定精度を向上させるために、全反射減衰テラヘルツ時間領域分光を採用した。波長 780 nm のフェムト秒ファイバーレーザー (FemtoFerb780, トプティカフォトニクス株式会社) を励起光に用いてダイポール型光伝導アンテナ (G10620-11, 浜松ホトニクス株式会社) でテラヘルツパルスを生じさせ、高抵抗シリコン単結晶からなるプリズムで全反射させてからもう 1 個の光伝導アンテナでコヒーレント検出する測定系を構築した。光学系を最適化することで信号対雑音比は最大で約 8 桁にも及び、周波数 0.2~3.0 THz における複素誘電率を 10 秒間の高速スキャンで測定することができる。

哺乳類の皮膚角質における顆粒層 SG1 で特異的に発現する Skin aspartic protease 遺伝子をヘテロで有するヘアレスマウスを測定対象に用い、マウスの腹部 20×30 mm を全反射減衰プリズムに密着させることで測定を行った。全身麻酔を投与したマウスの左腹部と右腹部をそれぞれ交互に 3 回ずつ測定し、その平均値と標準誤差を定常状態におけるマウスの複素誘電率における測定と不確かさとみなした。その後、マウスの左腹部と右腹部に純水と市販の化粧水をそれぞれ 1 mL ずつ塗布し、その 1 分後に表面の残留成分を軽く拭き取ってから左腹部 (純粋塗布) → 右腹部 (化粧水塗布) → 左腹部 → … と左右交互に 3 回ずつ測定を行い、塗布後 1 分目と 11 分目に全反射減衰テラヘルツ時間領域分光測定を実施した。

## 4. 研究成果

本研究で独自に構築した全反射減衰テラヘルツ時間領域分光測定系を用いて、塗布物を適用する前の定常状態におけるマウス皮膚を測定した結果を図 1 (左) に示す。テラヘルツ帯では水分子の誘電応答のみが観測されるため、ヘアレスマウスの誘電損失スペクトルは純水のそれと類似した形状を示すものの、吸収は非常に小さくなることがわかった。挿入図に示すように純水に対するヘアレスマウスの誘電損失の比率は周波数依存性が認められたが、全反射減衰分光では周波数に反比例してエバネッセント光の局在深さが浅くなることを鑑みれば、この結果はマウス表皮の表面に近い領域ほど水による影響が小さい、すなわち含水率が低くなっていると理解できる。ここで、エバネッセント光の強度勾配を考慮して水分量の深さプロファイルを求めたと

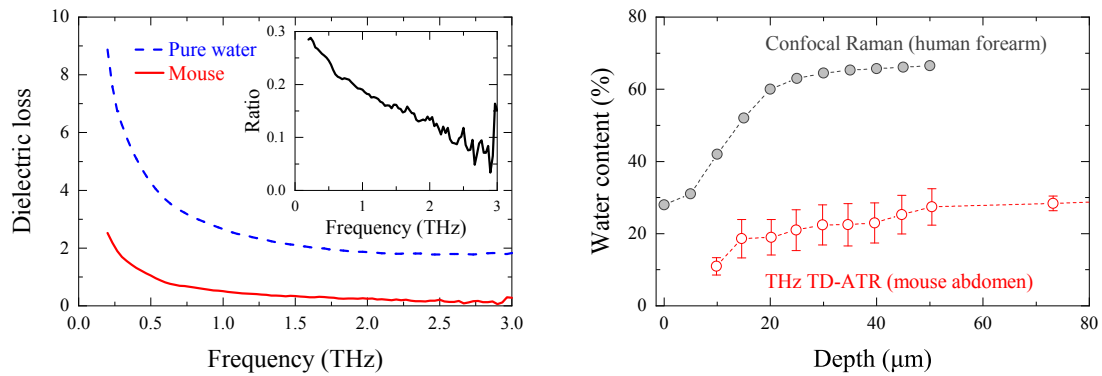


図1 (左) 純水とヘアレスマウス腹部の誘電損失スペクトル. 挿入図は純水に対するヘアレスマウスの誘電損失の比. (右) マウス腹部におけるバルク水量の深さプロファイル.

ころ, 図1(右)の赤丸で示すようにヘアレスマウスの表層から内部にかけて水分量がなだらかに増加していき, 最終的には30%前後で一定に達することがわかった. しかしこの値は共焦点ラマン分光で得られている値(図1右参照)に比べて明らかに小さいため, 全反射減衰テラヘルツ時間領域分光測定で観測する“水”は共焦点ラマン分光測定のそれとは一致しないことがわかる. 共焦点ラマン分光では $3300\text{ cm}^{-1}$ 付近に位置するOH伸縮バンドの面積を用いて水分量を見積もっているため, バルク水と水和水の両方を同時に観測していると考えられる. その一方でテラヘルツ帯の分光情報はピコ秒オーダーの緩和時間を有するバルク水の集団配向緩和が支配的であるため, 全反射減衰テラヘルツ時間領域分光ではヘアレスマウス中のバルク水に由来する信号を主に反映する. したがって, 図1(右)における両者の差分, すなわち(共焦点ラマン分光) - (全反射減衰テラヘルツ時間領域分光)の値はヘアレスマウス中における水和水量に相当する. 概して言えば, 死細胞が重層化して形成されている角質層( $20\text{ }\mu\text{m}$ より浅い領域)ではバルク水と水和水の比率がおおよそ2:1であるのに対し, 生細胞からなる深部領域ではその比率がおおよそ1:1に収束している. これは, タイトジャンクションの外側に位置する角質層ではバリアが存在しないためバルク水が優先的に気化してしまうのに対し, 生細胞中ではバルク水を維持する機構が働いていることを表している. これは, 細胞の生命機能を維持するためには水和水とバルク水のバランスが重要であることを示唆しており, 共焦点ラマン分光のように全ての水分子(バルク水+水和水)を観測する手法とバルク水を選択的に観測するテラヘルツ分光を融合させることで, 今後はさらに細胞内の水を本質的に理解できるようになると期待できる.

次に, 全反射減衰テラヘルツ時間領域分光方を用いて定常状態のヘアレスマウスに純水と化粧水をそれぞれ1 mLずつ塗布したときのバルク水プロファイルの変化を図2(左)に示す. 塗布後1分目の時点では, 純水(上段)と化粧水(下段)ともに著しいバルク水の増加が認められ, その影響は特に表面付近で顕著であった. しかし塗布後11分が経過した時点では, 純水を塗布したヘアレスマウス皮膚中のバルク水量が塗布直前と同程度まで減少しているのに対し, 化粧水塗布ではバルク水量が有意に高いレベルに保たれていることが見出された. バルク水量の増加割合を評価するために, 定常状態に対する塗布後の“相対バルク水量”を求めた結果を図2(右)に示す. 純水塗布時の11分後では相対バルク水量が1となっているが, テラヘルツ測定と並行して実施した電気伝導率測定の結果を鑑みると, この結果は塗布した水が11分間で全て蒸発し

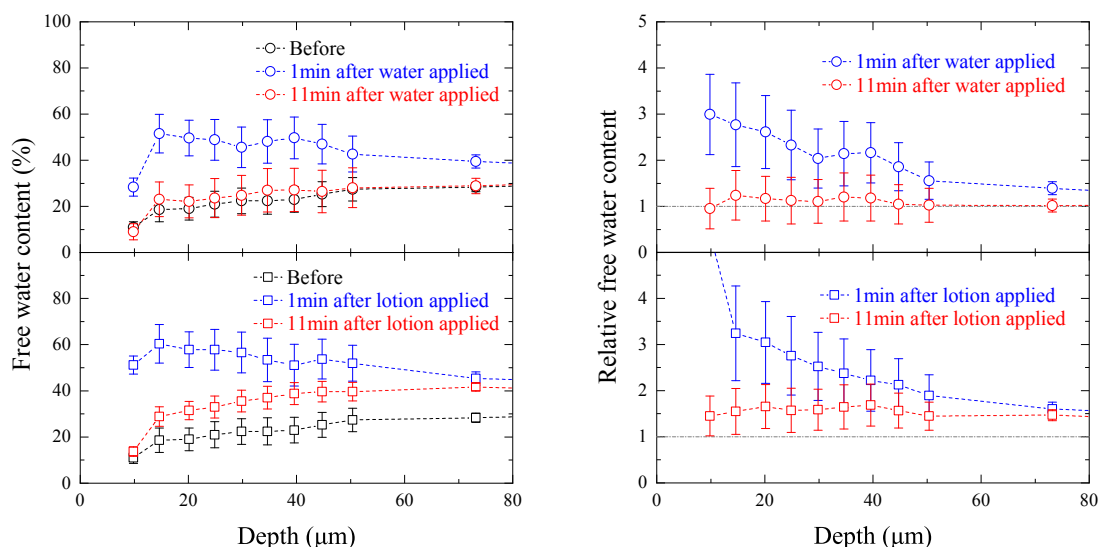


図2 (左) マウス腹部におけるバルク水量の深さプロファイルと塗布後の経時変化. 上段: 水を適用した場合, 下段: 化粧水を適用した場合. (右) 塗布前に対するバルク水量の相対比.

て失われてしまったと考えるのが妥当である。一方で化粧水を塗布した場合は11分目でも深さにかかわらず相対バルク水量が50%程度増加していることがわかる。化粧水中は約1/3がバルク水ではない成分（溶質基材ならびに水和水）で占められているが、純水に比べて化粧水のほうがより高い“バルク水の保湿能力”を有していることは非常に興味深い。

本研究では独自に構築した全反射減衰テラヘルツ時間領域分光測定系を用いて *in vivo* でヘアレスマウス中の水分子ダイナミクスを解析したところ、生細胞中と死細胞中ではバルク水：水和水の存在比率が有意に異なっていることが見出された。これは生体高分子の機能発現に直接関与する水和水と、増大するエントロピーの受け皿としてはたらくバルク水の絶妙なバランスが生命活動を下支えしていることを示唆するものである。また、外的影響として純水と化粧水をマウスに塗布したところ、構成成分中に占めるバルク水割合の少ない化粧水のほうが生細胞・死細胞両方に対してより高いバルク水の供給能力を示すことが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiraga Keiichiro, Tanaka Koichiro, Arikawa Takashi, Saito Shinji, Ogawa Yuichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Reconsideration of the relaxational and vibrational line shapes of liquid water based on ultrabroadband dielectric spectroscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 26200 ~ 26209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8CP04778B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 白神 慧一郎	4. 巻 449
2. 論文標題 テラヘルツ帯における水のスペクトル解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月間OPTRONICS	6. 最初と最後の頁 84-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Usui Keiko, Kadono Nanako, Furuichi Yuki, Shiraga Keiichiro, Saitou Takashi, Kawasaki Hiroshi, Toyooka Kiminori, Tamura Hiroomi, Kubo Akiharu, Amagai Masayuki, Matsui Takeshi	4. 巻 94
2. 論文標題 3D in vivo imaging of the keratin filament network in the mouse stratum granulosum reveals profilaggrin-dependent regulation of keratin bundling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 346 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Shusaku, Shiraga Keiichiro, Suzuki Tetsuhito, Kondo Naoshi, Ogawa Yuichi	4. 巻 294
2. 論文標題 Quantification of starch content in germinating mung bean seedlings by terahertz spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 203 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.foodchem.2019.05.065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小川 雄一、白神 慧一郎	4. 巻 48
2. 論文標題 テラヘルツ分光法による細胞内水分子ダイナミクスの評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 光学	6. 最初と最後の頁 419 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Keiichiro Shiraga, Takeshi Matsui, Mika Sawada, Shojiro Kikuchi, Tetsuhito Suzuki, Takeshi Mitsunaka, Masafumi Yamanoue and Yuichi Ogawa
2. 発表標題 Partially hydrated and markedly destructured hydrogen-bond network of intracellular water investigated with terahertz spectroscopy
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白神 慧一郎
2. 発表標題 超広帯域誘電分光に基づく水の緩和ダイナミクスの再検討
3. 学会等名 第67回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichiro Shiraga
2. 発表標題 Reconsideration of the relaxational line shape of liquid water based on ultrabroadband dielectric spectroscopy
3. 学会等名 The 3rd Aquaphotomics International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白神 慧一郎, 田中 耕一郎, 有川 敬, 斉藤 真司, 小川 雄一
2. 発表標題 水の配向緩和ダイナミクスに関する再検討
3. 学会等名 テラヘルツ科学の最先端
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichiro Shiraga and Yuichi Ogawa
2. 発表標題 Characterization of hydration state in the intact cells investing with terahertz spectroscopy
3. 学会等名 第28回日本MRS年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiichiro Shiraga
2. 発表標題 Characterization of intracellular water involved in physiological changes of cells
3. 学会等名 RIKEN Interdisciplinary Exchange Evening in Yokohama
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白神 慧一郎, 小川 雄一
2. 発表標題 テラヘルツ分光を用いた細胞内水和状態の評価
3. 学会等名 生細胞分光部会シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白神 慧一郎
2. 発表標題 65GHz帯CMOS近接アレイセンサを用いた水和水の高精度評価
3. 学会等名 誘電応答から見るソフトマターの水和ダイナミクス（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 自由水測定方法、及び自由水測定装置	発明者 白神 慧一郎	権利者 国立研究開発法人 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-234605	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 自由水測定装置、自由水測定方法、及びプログラム	発明者 白神 慧一郎	権利者 国立研究開発法人 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-085630	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松井 毅  (Matsui Takeshi)		