

## 研究終了報告書

### 「全反射減衰テラヘルツ分光で切り拓く細胞内の水の世界」

研究期間:2020年11月～2024年3月

研究者:白神 慧一郎

#### 1. 研究のねらい

約38億年前に海のなかで生命が誕生して以降、生命は水への適応力を身につけながら進化を遂げてきたことは紛れもない事実であり、*matrix of life*とも呼ばれる水が生命活動の中核を担うことは想像に難くない。しかし水分子は蛍光色素や放射性同位体を用いて安定的に標識化することができないため、従来の生命科学研究では数多の分子が相互作用を織りなす細胞内で水分子だけを選択的に観測することができていなかった。そのため、細胞の生命活動の中で分子レベルの水が果たす役割はほとんど理解されておらず、現在の生命科学研究は水という未知のバッファーの中で起きる現象を探索せざるを得ない状況に置かれている。

周波数 0.1～10 THz で定義されるテラヘルツ波領域は、タンパク質などの生体分子による干渉をほとんど受けることなく、水分子のピコ秒～サブピコ秒揺らぎを直接的に観測することが可能である。そこで私はこれまでの研究で培養細胞単層のテラヘルツ波スペクトルを測定する独自技術を構築し、非標識・非侵襲で細胞内の水和状態を評価することに成功している。しかしながら、テラヘルツ波領域における水のスペクトルはブロードなピークが部分的に重なり合った複雑な成り立ちを示すことからピークの帰属が十分には理解されておらず、テラヘルツ波スペクトルの解析モデルを最適化するには至っていなかった。また、細胞活動に関わる水分子の重要性を理解するためには、テラヘルツ波分光を用いた水分子ダイナミクスの評価に並行して、蛍光イメージングなどによって細胞の状態を観察する必要がある。

そこで本研究では、テラヘルツ波領域を軸にマイクロ波～赤外領域に及ぶ超広帯域誘電分光を行うことでテラヘルツ波スペクトルの分光学的帰属を明らかにし、スペクトルの定量解析に必要な解析モデルを提案する。そして広帯域テラヘルツ波分光と蛍光イメージングの同時観察を実現することで、経時的に状態が変化する細胞内における水分子ダイナミクスを明らかにすることを目指す。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

本研究では、テラヘルツ波領域を中心として広帯域の誘電スペクトルが測定可能な分光測定系を開発し(研究項目 1)、それを用いて水のテラヘルツ波スペクトルに現れる分子間振動ピークの分光学的帰属を明らかにした(研究項目 2)。そしてこの分光測定系に光学顕微鏡を組み合わせて蛍光イメージングの同時観察を可能にすることで、状態変化する細胞内で水分子ダイナミクスがいつ・どのように変化するのかを明らかにする実証実験を行った(研究項目 3)。

研究項目 1「広帯域分光測定系の開発」では、独自に考案した全反射(ATR)プリズムを用いて、テラヘルツ波～赤外領域にわたって“同一サンプルの同時測定”が可能な ATR 分光光学系を構築した。しかし研究の中で、複雑な成り立ちを示すテラヘルツ波領域の分光スペクトルを

より正確に把握するためには更なる広帯域化の必要性に迫られたことから、測定帯域をマイクロ波～ミリ波領域まで拡張した“超”広帯域誘電分光(30 MHz～235 THz)を実現した。

研究項目 2「分光学的帰属の解明とその応用」では、その超広帯域誘電分光を駆使することで水の分子間伸縮振動(~5 THz)のスペクトル形状を露わにし、その同位体依存性をもとに分子間伸縮のスペクトル幅は分子衝突に由来する均一広がりからなることを見出した。また、超広帯域誘電分光の応用展開として幅広い時空間スケールでグリセリン-水の分子間相互作用を探索したところ、グリセリンを取り巻く水和水はアクセプター水素結合が欠如した特殊な水素結合環境を形成していることが明らかになった。

そして研究項目 3「細胞の状態変化と水分子ダイナミクスとの関係性解明」では、皮膚表皮から単離した細胞のプログラム細胞死の過程において、細胞膜の崩壊に先立って細胞内のバルク水量が不可逆的に変化している可能性を見出した。現在は、より広く研究に用いられている HeLa 細胞を対象として広帯域 ATR 分光と蛍光イメージングの同時観察を行うことで、より多角的に見た水分子ダイナミクス(水和状態と分子衝突頻度)と細胞の状態変化の関係性を評価する研究を進めている。

## (2) 詳細

### 研究項目 1. 広帯域分光測定系の開発

2 光路で ATR 測定が可能な Si 製プリズムを用いて、テラヘルツ時間領域分光 (THz-TDS) とフーリエ変換赤外分光 (FT-IR) の同時測定が可能な ATR 分光光学系を構築した。シリコンのフォノン吸収帯 (12~42 THz) を除く 0.1~235 THz にわたって“同一サンプルを同時に測定できる”広帯域 ATR 分光を実現し、3.5 THz を境に THz-TDS と FT-IR を接続して得た水 H<sub>2</sub>O の複素誘電スペクトルは理論値とも非常によく一致した。

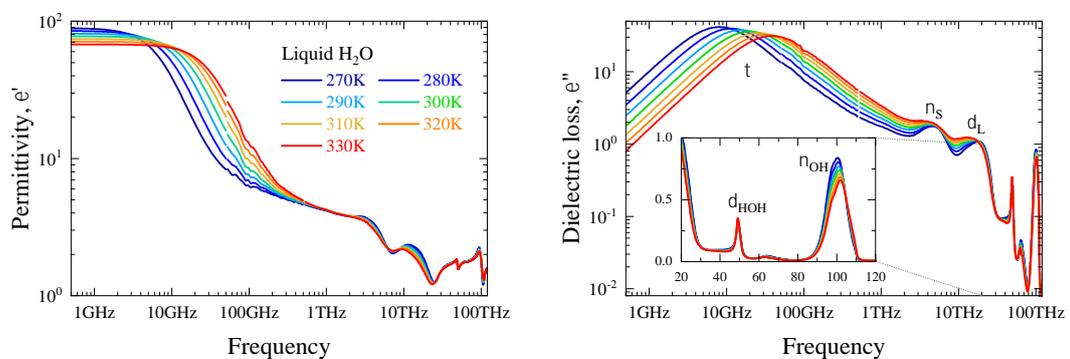


図 1 超広帯域誘電分光で得た純水 H<sub>2</sub>O の複素誘電スペクトル

ただし、テラヘルツ波帯における水の誘電応答はブロードなスペクトル成分が部分的に重なり合った複雑な成り立ちを示すため、テラヘルツ波帯 (0.1~10 THz) の分光スペクトルを理解するためには、誘電緩和 (GHz 帯) やライブラレーション (20 THz 付近) のスペクトル形状も正確に把握しておくことが必要不可欠である。そこで本研究では、当初計画していた“同一サンプルの同時 ATR 測定”の枠組みからは逸脱しつつも、ベクトルネットワークアナライザを用いた誘電緩和分光や、モノシリックダイヤモンドを ATR プリズムに用いた FT-IR 測定などを組み合わせることで、30 MHz~235 THz の複素誘電スペクトルをギャップレスに測定できる“超”広帯域誘電分光を実現した (図 1)。

## 研究項目 2. 分光学的帰属の解明とその応用【代表論文 1,3】

水のテラヘルツ波スペクトルは誘電緩和成分(図 1 中の  $\tau$ )の寄与が支配的であるが、5 THz 付近には分子間伸縮振動( $\nu_s$ )に起因する共鳴モードも観察される。この共鳴モードは四面体状に配位した水素結合構造の揺らぎに伴う電荷移動によって生じていることが理論研究で明らかにされている一方で、そのスペクトル形状(中心周波数やスペクトル幅)がどのような分子描像に対応しているかは未解明であった。そこで本研究では、超広帯域誘電スペクトルの特徴を生かしてマイクロ波領域の誘電緩和成分を減算することで、3 種類の水同位体(軽水  $\text{H}_2\text{O}$ 、重水  $\text{D}_2\text{O}$ 、重酸素水  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ )における“誘電緩和フリーな”誘電スペクトルを導出した(図 2 左)。その結果、分子間伸縮振動のピーク周波数とスペクトル幅は質量効果( $\text{H}_2\text{O}$  vs.  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ )や核量子効果( $\text{H}_2^{18}\text{O}$  vs.  $\text{D}_2\text{O}$ )を反映して変化したが、いずれの水同位体においても分子間伸縮振動の Q 値は同じ値を示すことが分かった。H→D 置換に伴う核量子効果の減少によって水素結合構造の不均一性は低減することを鑑みると、この共鳴モードのスペクトル幅は水素結合構造の不均一性の影響をほとんど受けていないと考えられる。そのため分子間伸縮振動のスペクトル幅は衝突頻度で規定される均一幅に由来すると解釈でき、実際にその減衰定数の同位体依存性は衝突理論とよく一致することが示された。

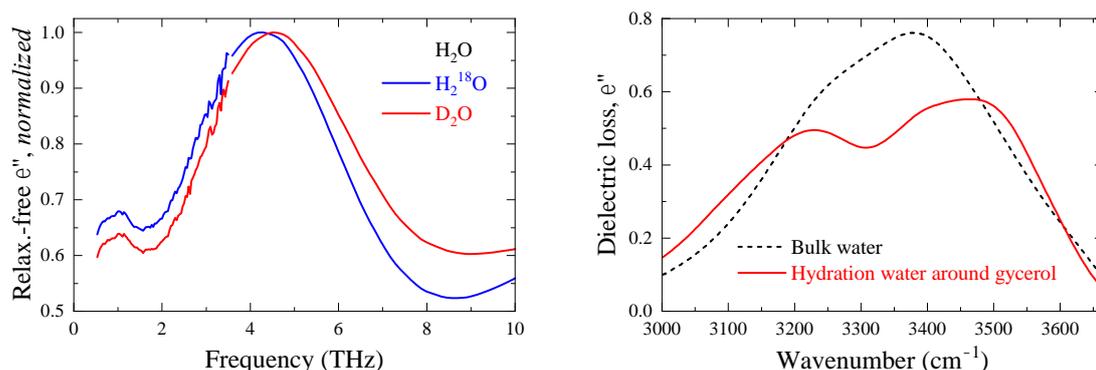


図 2 (左) 誘電緩和成分を減算して求めた分子間伸縮振動スペクトルの同位体依存性. (右) グリセリン水溶液中におけるバルク水と水和水の OH 伸縮振動スペクトル.

幅広い時空間スケールの分子ダイナミクスを評価できる超広帯域誘電分光の応用展開を探るため、本研究ではグリセリン水溶液を例にグリセリン分子-水分子の相互作用を解析する実証実験を行った。マイクロ波・テラヘルツ波帯に現れる誘電緩和をもとにグリセリンの水和状態を見積もったところ、無限希釈においてグリセリン 1 分子あたり約 20 個の水分子が水和水として動的に束縛されていることが分かったが、この水含量(約 4 g  $\text{H}_2\text{O}$  / g solute)は一般的な糖分子( $\sim 1.5$  g/g)やタンパク質分子( $\sim 1.0$  g/g)に比べて際立って大きい。この機序を解明するために局所的な水素結合環境に敏感な OH 伸縮スペクトルを解析したところ、バルク水の OH 伸縮振動は 3400  $\text{cm}^{-1}$  付近に unimodal なピーク形状を示すのに対して、グリセリンに水和した水分子は 3200  $\text{cm}^{-1}$  と 3500  $\text{cm}^{-1}$  に分岐したダブルピーク構造を示した(図 2 右)。OH 伸縮振動のピーク周波数は水素結合のドナー/アクセプター配置に起因する電子密度状態を反映することを踏まえてこの結果を考察したところ、グリセリンに水和した水分子は(バルク水の水素結合パターン

に対して)アクセプター水素結合が欠如した不完全な分子間構造を持つと結論づけられた。これは、グリセリン分子の表面では固有の水素結合パターンが発達することで、著しく広い水和圏が維持されていることを示唆するものである。

### 研究項目 3. 細胞状態の変化と水分子ダイナミクスの関係性解明【代表論文 2】

細胞死の過程で細胞内の水がいつ・どのように変化するかを明らかにするために、65 GHz 帯で動作する LC 共振器を誘電センサーとして利用し、マウス皮膚から単離した顆粒層 SG1 細胞のプログラム細胞死過程の観察を行った。65 GHz 帯はテラヘルツ波と同様にバルク水の誘電緩和が支配的であるため、このセンサー上に置かれたサンプルの静電容量に応じて LC 共振周波数は変化し、その変化量を元にサンプル中のバルク水量を評価することができる。図 3 に示すように、SG1 細胞はプログラム細胞死誘導(0 時間目)直後に不可逆的に共振周波数が 5 MHz ほど変化したのに対し、既に死んでいる SG2 細胞や培地は安定的に一定値に収束している。この結果は、SG1 細胞のプログラム細胞死では細胞死誘導直後にバルク水量が 0.3% だけ不可逆的に増加することを示している。このようなバルク水量の増加は時定数~0.5 時間で起こるのに対し、膜不透過性の核標識色素である DRAQ7 は時定数~1.5 時間で発色を示したことから、この細胞死では細胞膜破綻が生じる前に細胞内の水分子ダイナミクスが不可逆的に変化している可能性が示唆された。

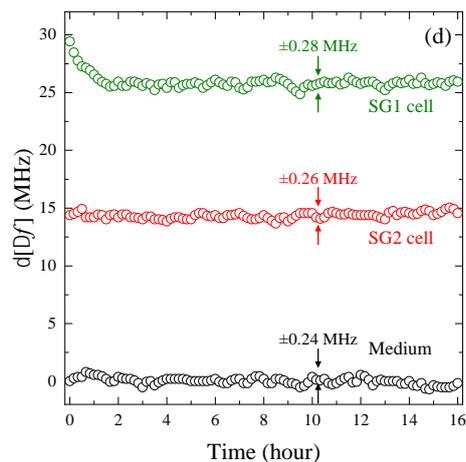


図 3 顆粒層 SG1 細胞のプログラム細胞死に伴う水分子ダイナミクスの経時変化

また本研究では、テラヘルツ波～赤外領域をカバーする広帯域 ATR 分光測定系に正立蛍光顕微鏡を組み合わせることで、細胞内の水分子ダイナミクス評価と並行して蛍光標識のイメージングを可能にした。さらに、光学系の光路を測定用と参照用に分岐させ、参照用信号を基準に長時間揺らぎを補償する機構を導入したところ、誘電スペクトルの時間変動を 1/3 倍程度に抑えることにも成功している。そこで、この測定系を用いて 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加してアポトーシスを誘導した HeLa 細胞を 15 分間隔で 3 時間後まで観察したところ、 $\text{H}_2\text{O}_2$  添加直後から細胞内ではバルク水濃度が連続的に増加し、その後に細胞膜の非対称性が破綻し、膜透過性が上昇することが明らかになった。

### 3. 今後の展開

細胞内の水は水和によって生体高分子の自己組織化を司るだけでなく、物質移動や温度恒常性にも重要な役割を果たしていると考えられるが、世界に先駆けてこのことを実証するために今後は生命科学研究者とより密に連携しながら研究を進めていく計画を立てている。ただしテラヘルツ波の波長(300  $\mu\text{m}$  @ 1 THz)は細胞サイズ(直径 $\sim$ 10  $\mu\text{m}$ )よりも長いので、テラヘルツ波分光では複数の細胞内における“空間平均した水”の情報しか得ることができない。一方、細胞内では液-液相分離が起きて時空間的に制御された微小環境が形成されているという仮説が近年俄かに取り沙汰されるようになっており、それを裏付けるように多共焦点ラマンイメージングでは単一細胞内における水の濃度分布は不均一であることが示されている。そのため今後は、本研究で開発した技術をベースに細胞状態と水の関係性を結びつける基礎的な知見を蓄積しつつ、それと並行して光学顕微鏡と同程度の解像度で細胞内の水分子ダイナミクスを評価できる技術開発を進めることで、水が果たす役割や機能を本質的に理解することを目指す。

また、マイクロ波～赤外領域におよぶ超広帯域誘電分光を用いて水や水溶液の分光データを蓄積する研究は、今後も継続して実施する予定である。これからもラマン分光や中性子散乱分光、MD シミュレーションといった相補的な技術を積極的に取り入れることで、水のスペクトルの分光学的帰属や、生体分子と水分子の相互作用を解明する研究も深化させる。

### 4. 自己評価

#### 本研究課題の目標に対する達成度

研究項目 1「広帯域分光測定系の開発」を順調に行えたことで、腰を据えて研究項目 2「分光学的帰属の解明とその応用」に取り組むことができ、その成果は投稿論文のジャーナルカバーを飾るインパクトのある研究として公表するに至った。ただし一部の備品の納期遅延の影響を受けて、細胞を対象とした研究に着手する時期に遅れを生じてしまったものの、代わりに共同研究を通じて研究項目 3「細胞の状態変化と水分子ダイナミクスの関係性解明」を遂行することで、概ね研究目的を達成することができた。

#### 研究の進め方(研究計画・研究費執行状況・研究体制)

所属研究室に在籍する博士課程学生 1 名、修士課程学生 1 名とともに本研究を実施した。本研究の肝となる広帯域 ATR 分光測定系はスムーズに開発・改良が進んだ一方で、新型コロナウイルスの影響による納期遅延もあって光学顕微鏡のセットアップが遅れたことで、広帯域 ATR 分光を用いた培養細胞の実証実験は、当初の予定より半年ほど遅れて 4 年次の後半から開始することになってしまった。なお研究費については、当初の計画通りに執行することができた。

#### 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究を足掛かりとして技術をさらに成熟させ、さらなる高精度・高感度化と高空間分解能化を実現することで、これまで生命科学研究では“未知のバッファー”とみなされてきた水分子が生命現象の中で果たす機能と役割を明らかにすることに挑戦する。なお、水は全ての生物が共通して有する最も基本的な生体分子であることから、実際に水の機能と役割を解明することができれば、水分子を能動的に制御することで細胞(物質)の状態を操作する新規技術の創出を促すことで、医学・農学・物質科学を含め幅広い分野に波及効果をもたらすことも期待される。

## 当初計画では想定されていなかった展開やそれによる成果、及び研究者としての飛躍につながるような成果

当初はテラヘルツ波～赤外領域の広帯域 ATR 分光だけを軸とした研究計画を想定していたが、研究項目 2「分光学的帰属の解明とその応用」を進めるにあたって、さらに低周波側の分光情報を得る必要性に迫られたことで、マイクロ波～ミリ波領域をカバーする分光測定系を開発した。これによってマイクロ波～近赤外領域(周波数 30 MHz～235 THz;波長 1.3 μm～1 m)の分光スペクトルをギャップレスに測定することが可能となり、テラヘルツ波領域のスペクトル解析精度が著しく向上したことに加え、幅広い時空間スケールで生体分子と水分子の相互作用を評価できるようになった。世界的に見ても近年は誘電分光の広帯域化がトレンド化しているものの、基本的に複数の研究者がコラボレーションしながら広帯域化を実現するのが一般的であり、単一のラボ内で完結する“超”広帯域誘電分光は極めて高い優位性を有している。

### 5. 主な研究成果リスト

#### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 件

1. K. Shiraga\*, Y. Fujii, A. Koreeda, K. Tanaka, T. Arikawa, and Y. Ogawa. Dynamical Collectivity and Nuclear Quantum Effects on the Intermolecular Stretching Mode of Liquid Water. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2021, Vol. 25, pp. 1632-1639.

テラヘルツ波分光と低周波ラマン分光を用いて、水の分子間伸縮振動(~5 THz)の分光学的帰属を明らかにした論文である。分子間伸縮振動は赤外活性とラマン活性を併せ持つが、前者は四面体状に配位した水素結合構造自体の非対称伸縮運動が生み出す双極子モーメントに起因するのに対し、後者は水分子の局所的な並進運動を反映していることが明らかになった。なおこの論文は、出版誌からの推薦を受けてジャーナルカバーに採用されている。

2. K. Shiraga\*, Y. Ogawa, S. Kikuchi, M. Amagai, and T. Matsui. Increase in the Intracellular Bulk Water Content in the Early Phase of Cell Death of Keratinocytes, Corneoptosis, as Revealed by 65 GHz Near-Field CMOS Dielectric Sensor. *Molecules*. 2022, Vol. 27, pp. 2886.

65 GHz 帯で動作する LC 共振器を超高感度・高精度な近接場誘電センサーとして利用し、皮膚表皮から単離した顆粒層 SG1 細胞のプログラム細胞死 (corneoptosis) における水分子ダイナミクスの変化を評価した論文である。この細胞死の初期過程において SG1 細胞内のバルク水濃度が不可逆的に増加し、その後に細胞膜破綻などの細胞死プロセスが進行することが示唆された。

3. M. Morita, F. Matsumura, T. Shikata, Y. Ogawa, N. Kondo, and K. Shiraga\*. Hydrogen-Bond Configurations of Hydration Water around Glycerol Investigated by HOH Bending and OH Stretching Analysis. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2022, Vol. 126, pp. 9871-9880.

マイクロ波領域の誘電緩和と赤外領域の分子内振動を指標に、グリセリンを取り巻く水和圏内における水分子の描像を探索した論文である。誘電緩和とスペクトルで得られた水和状態を指

標に用いてグリセリンを取り巻く水和水の HOH 変角スペクトル・OH 伸縮振動スペクトルを解析的に導出したところ、グリセリンの水和水はアクセプター水素結合が欠如した不完全な水素結合構造パターンを示すことがわかった。なおこの論文は、出版誌からの推薦を受けてジャーナルカバーに採用されている。

(2)特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のもも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 【招待講演】テラヘルツ分光を用いた水の状態評価. 白神慧一郎. 日本化学会 第 102 春季年会シンポジウム「赤外線の利用—近赤外からテラヘルツまで—」. 2022 年 3 月 25 日.
2. 【招待講演】 Water dynamics in cells based on dielectric responses in the terahertz region. K. Shiraga. The 83rd JSAP Autumn Meeting 2022 (JSAP-Optica Joint Symposia). 2022 年 9 月 22 日.
3. 【口頭発表】 HOH 変角振動スペクトルに着目した水素結合環境の解明. 白神慧一郎, 森田美穂. 第 3 回 日本 Aquaphotomics 研究会. 2022 年 11 月 24 日.
4. 【口頭発表】 水の分子間伸縮振動における分光学的帰属の解明. 白神慧一郎, Zheng Ziwei, Chen Siyao. 第 45 回溶液化学シンポジウム. 2023 年 10 月 25 日.
5. 【ポスター発表】 Exploring the world of intracellular water with terahertz spectroscopy. K. Shiraga and S. Nagao. The 61st Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan. 2023 年 11 月 14 日.