

戦略的国際科学技術協力推進事業（日本－スウェーデン研究交流）

1. 研究課題名：「単一細胞における水・イオン動態の同時観測を可能とする技術開発」
2. 研究期間：平成 23 年 4 月～平成 26 年 3 月
3. 支援額： 総額 22,500,000 円
4. 主な参加研究者名：

日本側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	安井正人	慶應義塾大学医学部薬理学	教授
研究者	泰岡顕治	慶應義塾大学理工学部機械工学科	教授
研究者	宮内崇行	慶應義塾大学医学部薬理学	助教
研究者	相馬義郎	慶應義塾大学医学部薬理学	准教授
参加研究者 のべ 4 名			

相手側（研究代表者を含め 6 名までを記載）

	氏名	所属	役職
研究代表者	パー・ウーレン	スウェーデン王国カロリンスカ研究所医科学生物物理学	准教授
研究者	エリック・ニルソン	スウェーデン王国カロリンスカ研究所医科学生物物理学	博士課程
研究者	ニコラス・フリント	スウェーデン王国カロリンスカ研究所医科学生物物理学	ポストドクトラルフェロー
参加研究者 のべ 3 名			

5. 研究・交流の目的

本研究は、CARS イメージングと従来の蛍光イメージングを合わせることで、単一細胞における水 とイオンの動態の同時ライブイメージング法を確立することを目的とする。

具体的には、日本側が細胞の水やイオンの動態にアクアポリンがどのような役割を担っているか検討し、また、スウェーデン側は、日本側と共同して、分子動力学シミュレーションとバイオインフォーマティクスを用いた水・イオンの動態の理論構築計算機科学を用いて、新しい、水・イオン動態に関する理論を創出することを目指していく。

昨年度に引き続き、単一細胞モデル（Hela 細胞）と 3 次元嚢胞形成モデル（MDCK 細胞）を用いて、日本側は CARS による水動態を観測し、スウェーデン側は蛍光標識による細胞内カルシウム動態を観測する。更にホルモン等による調節機構を検討するため、新たに M1 細胞（バソプレッシンによる調節が可能）を導入する。また、日本側は、分子動力学計算を用いてイオン存在下における細胞膜水動態に対する理解を深める。

両国の研究チームが医学および工学の観点から相互補完的に取り組むことで、生命の最も基本的な現象である水・電解質の調整機構の解明やそれらの異常に伴う疾患発症のメカニズムについて解明されることが期待される。

6. 研究・交流の成果

6-1 研究の成果

・我々は蛍光色素等を用いることなく、水分子そのものを可視化する顕微鏡を（株）オリンパス、理研脳科学研究所のグループとともに開発した。それが、Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) 顕微鏡である。CARS は、非線形ラマン散乱の一種で、試料に対して、その差分が試料のラマン活性振動数 ω_R に等しい振動数を持つ 2 種類の極短パルスレーザー光、Pump 光 (ω_P) と Stokes 光 (ω_S) ($\omega_P > \omega_S$)、を入射すると、試料分子との相互作用によってコヒーレントな CARS 光 ($\omega_{\text{CARS}} = 2\omega_P - \omega_S$) が放出される現象である。物質のラマン活性振動数 ω_R は、その物質が持つ共有結合の固有振動数に強く依存するため、O-H 結合に合わせると水分子からの CARS シグナル（イメージ）が観察される。一方、重水 (D_2O) はこのモードでは CARS 光を放出しない。そこで、細胞あるいは複数の細胞で構成されたシストを CARS 顕微鏡のステージ上にセットして、通常の水 (H_2O) で作られた灌流液と重水 (D_2O) で作られた同組成の灌流液を高速に切り替えながら O-H モードで撮影すると O-H 結合を持つ水 (H_2O) が“ポジ”、O-D 結合をもつ重水が“ネガ”として直接観察できる。そして、 H_2O/D_2O 高速交換時における H_2O 濃度の経時的変化を測定し、水の動態を定量化することができる。我々は、この方法を用いて、単一 HeLa 細胞における細胞膜を介する水の交換速度（拡散係数）を計測、算出することに成功した (Ibata, *et al. Biophys. J.*, 2010)。そして、アクアポリンを発現している細胞の水拡散はコントロールに比べて 3 倍近く速いことも確認した。次のステップとして、単一細胞ではなく多数の細胞からなる経上皮の水の交換速度を計測、算出するため、MDCK-3D シストをサンプルとして用いた。同様に H_2O/D_2O 高速交換時における H_2O 濃度の経時的変化を測定し、そのデータにコンピュータシミュレーション（マルチスケールモデル）を用いた解析を行い、管腔側膜、基底層膜の水透過性をそれぞれ分けて決定することに成功した。更に、内在性の AQP2 を発現する腎臓由来の M1 細胞を用いて同様の実験を行ない、抗利尿ホルモンの投与で、AQP2 が管腔側膜へ移動すると同時に管腔側膜のみ水の拡散係数が上昇することも確認した (Yu, *et al., Sci. Rep.*, 2013)。

これまで、単一細胞における水分子動態と細胞内カルシウム応答を同時に計測できる測定技術は確立していない。我々が取り組んで来た CARS 顕微鏡による水分子の可視化は、それを可能とするポテンシャルを持っている。一方、我々には細胞内カルシウム動態の解析の経験に乏しかったため、細胞内カルシウムイメージングの第一人者との共同研究が必須であった。カロリンスカ研究所のウーレン博士は、様々な細胞を用いて、細胞の生理応答や病態とカルシウム応答の関連を研究してきたグループで、これまで細胞内カルシウムのイメージングを独自に改良して来た実績を持つ。今回のプロジェクトに於いても二度に渡り我々の研究室を訪問し、我々の水イメージングの実験条件下における、カルシウム同時イメージングの最適化に向けて様々なアドバイスをいただく事が出来た。期間内に質の高い同時イメージングの条件を決定するにはいたなかったが、細胞容積変化時に於けるカルシウム動態の変化などに関しては、十分な条件検討を行う事が出来たと考えている。本年 6 月には、別の大学院生イヴァが、我々の研究室を訪問し、CARS 顕微鏡を用いて、水動態とカルシウム応答の同時計測を試すことになっている。

一方、分子動力学計算の手法を取り入れ、細胞膜近傍の水分子動態に与えるイオンの影響を検討した。その結果、イオンと膜の直接的な相互作用でなくイオンに影響された水分子が脂質から乖離することで膜の流動性を低下させることを突き止めた。また、膜近傍の水分子が異常拡散を示すこと、アクアポリンのポアを水分子が通過する時、ポアを形成するアミノ酸残基が $1/f$ 揺らぎを示すことを明らかにした (Yamamoto *et al, Sci, Rep.* 2014)。

上皮の分泌や吸収のみならず、細胞周期や細胞のがん化および細胞死に伴う細胞容積の変化は、水とイオンが連携して起こることで導かれる。従って、イオンと水の動きを同時に捉えることは、これらの現象を理解する上で欠かせない技術である。また、この方法が確立できれば、脳梗塞をはじめとする様々な病態に伴う水・電解質異常に対する新薬の開発にも重要な情報を提供できると考えている。

6-2 人的交流の成果

計4回の研究打ち合わせを行ったことで、共同研究に関するコンセンサスを確認すると同時に研究計画の具体的な調整を行うこともでき、日々の研究を促進することができた。また、ウーレン准教授のみならず、大学院生のナビド・サルタニが慶應で実際に実験を行った事で、その後のメールやスカイプを介するコミュニケーションがよりスムーズとなった。

平成26年7月にウーレン准教授の大学院生であるイヴァ・デニッチが慶應を訪れ、CARS顕微鏡を用いて MDCK 3次元培養細胞における水とカルシウムの同時測定を試すこととなっている。

また、ウーレン准教授が慶應で講演を行なった事をきっかけに、慶應の大学院生梶谷が我々の共同研究に興味を示し、博士課程終了後、現在ウーレン准教授の研究室でポストクとして研究に行っている。

更に、我々の教室の大学院生加藤（平成26年3月博士課程修了）も本年5月からウーレン准教授の共同研究先でもある（カロリンスカ研究所カミラ・スペンソン准教授）に留学し、本プロジェクトにも間接的に関与する予定である。

7. 主な論文発表・特許等（5件以内）

相手側との共著論文については、その旨を備考欄にご記載ください。

論文 or 特許	・論文の場合： 著者名、タイトル、掲載誌名、巻、号、ページ、発行年 ・特許の場合： 知的財産権の種類、発明等の名称、出願国、出願日、 出願番号、出願人、発明者等	備考
論文	Yamamoto E, Akimoto T, <u>Yasui M</u> and Yasuoka K. Origin of subdiffusion of water molecules on cell membrane surfaces. <i>Sci. Rep.</i> 4:4720. (2014)	
論文	Yu YC, Sohma Y, Takimoto S, Miyauchi T and <u>Yasui M</u> . Direct visualization and quantitative analysis of water diffusion in complex biological tissues using CARS microscopy. <i>Sci. Rep.</i> 3. Article number: 2745. (2013)	
論文	Yamamoto E, Akimoto T, Hirano Y, <u>Yasui M</u> and Yasuoka K. Power-law trapping of water molecules on the lipid-membrane surface induces water retardation. <i>Phys. Rev. E</i> , 87, 052715. (2013)	
論文	Yamamoto E, Akimoto T, Shimizu H, Hirano Y, <u>Yasui M</u> and Yasuoka K. Diffusive nature of xenon anesthetic changes properties of a lipid bilayer: molecular dynamics simulations. <i>J. Phys. Chem. B.</i> 116(30):8989-95 (2012)	
論文	Akimoto T, Yamamoto E, Yasuoka K, Hirano Y and <u>Yasui M</u> . Non-Gaussian fluctuations resulting from power-law trapping in a lipid bilayer. <i>Phys. Rev. Lett.</i> 107(17):178103. (2011)	