

# テラヘルツ波を用いた人工細胞内転写・翻訳反応の制御

福井大学 学術研究院工学系部門生物応用化学講座  
辻 岳志

## 1. はじめに

遠赤外領域のテラヘルツ波帯の電磁波は、その照射システム構築の困難さからこれまでどのような性質があるのかが未解明であった。古くから電子レンジに代表されるようなメガヘルツ帯の電磁波が、水の分子運動を誘起させ、温度を上昇させることや電波に情報をおせて遠くに伝えるラジオなどが、広く産業的に利用されている (図 1)。また、それよりも振幅の短いギガヘルツ帯の電波は、移動通信システムに利用されており、2000 年代では 3G や LTE 波長として携帯電話の通信規格として利用されてきた。近年利用が始まっている、5G 規格はサブミリ波領域を利用しており、高速かつ大容量の情報通信が可能である。そして、beyond 5G としてテラヘルツ波が注目されており、近年、その照射システムが確立されてきている。またその小型化も進んでおり、テラヘルツ波の波長の性質が盛んに研究されている。

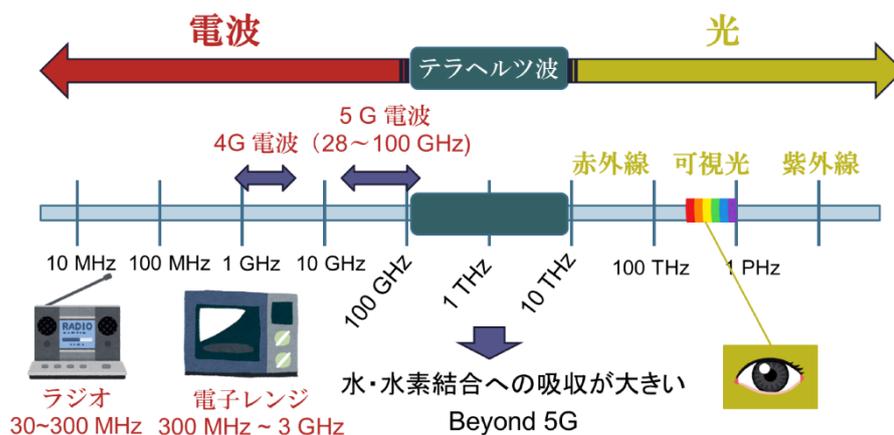


図 1 電波と光の波長 (振幅数) およびその産業応用の概略図

2016 年に、テラヘルツ波帯の光子エネルギーが、タンパク質などの高次構造を形成する水素結合ではなく、水分子ネットワークを形成する水素結合特異的に応答させられることが報告された<sup>1</sup>。細胞内はタンパク質などの生体分子が高濃度に水に溶解しており、反応場としては圧倒的な水分子が存在している。そのため、テラヘルツ波が水分子を介して細胞機能へ作用する可能性が示唆されている。実際に、テラヘルツ波をヒト培養細胞に照射する実験が行われており、460 GHz の波長の電磁波をパルス照射した研究では、照射サンプルと非照射サンプルの温度条件を揃えて、テラヘルツ波の非熱的な影響を観察したところ、アクチンフィラメントの伸長促進 (脱重合阻害) 効果が見られ、その結果として、細胞の分裂が止まってしまうことが報告されている<sup>2</sup>。また、別の研究では、大豆の種子に 110 GHz の波長の電磁波を 20 分照射することで、その後、発芽後の根の伸長促進効果が見られることが報告されている<sup>3</sup>。このような細胞への照射実験に対して、生化学反応を触媒する酵素への影響も、2023 年度に報告されており、460 GHz のテラヘルツ波をリゾチームに非熱的に照射することによって、酵素の触媒活性を担

う、ポケット状の活性部位における水和状態が変化していることが示唆された<sup>4</sup>。このようにテラヘルツ波帯の電磁波が細胞や細胞内の代謝反応やそれを触媒する酵素に作用することが報告されているが、どのような波長やパルス幅での照射が細胞へどのように作用するかはほとんど何も分かっていないのが現状である。

細胞を用いた研究では、照射時間を細胞分裂や細胞内の代謝など、細胞の表現型として現れるまでの長時間の照射が必要となり、照射時に生じた作用（インプット）がどのような結果（アウトプット）となるかを定量的に比較することは困難である。このような現象に対して、試験管内において、細胞内の反応の一部を取り出して再構成する、試験管内再構成系が生物学の分野では盛んに行われている。近年では、大腸菌のゲノム複製機構<sup>5</sup>や、タンパク質の翻訳反応<sup>6</sup>といった様々な反応が無細胞環境下で可能となっている。しかし、そのような試験管再構成された生化学反応は、酵素などのタンパク質を溶解するために細胞内よりも圧倒的多数の水分子が必要であり、そのため、テラヘルツ波の光子エネルギーが溶媒（水分子）に吸収され、生化学反応への影響を測定することができないことが予想される。培養細胞などへの照射でも、培養液に対する吸収を抑えるために、プラスチック製のプレート上に細胞を接着させ、細胞とテラヘルツ波の照射装置との間に水分子がない条件で実験が行われている。

本研究では、細胞を模擬した脂質二重膜小胞（リポソーム）の技術を利用した。細胞サイズのリポソームを効率よく作製する界面通過法が報告されてから<sup>7</sup>、これまでに遺伝子の複製<sup>8</sup>やタンパク質の合成<sup>9</sup>から光合成<sup>10</sup>といった複雑な反応まで様々な生化学反応を内封した細胞様の反応区画が報告されている。その中でも我々は細胞のセントラルドグマ反応に注目した。全ての生細胞は、情報を DNA という核酸分子によって保持し、その情報を RNA という別の核酸分子に変換（転写）し、その一時的な情報保持因子である RNA 情報から、細胞内反応の機能分子であるタンパク質が合成される（翻訳）。この転写反応と翻訳反応を細胞のセントラルドグマと呼ぶ。本研究では転写反応を内封したリポソームに対してテラヘルツ波を照射し、どのような作用があるかを調べることで、細胞に作用するテラヘルツ波の条件を探索した。

## 2. 結果

### 2-1. リポソームへの照射系の確立

リポソームは、細胞と同様にリン脂質膜で包まれた球状の構造体であり、脂質膜内の内液を保持しつつ、外液に分散させて生化学反応を進行させる。そのため、外液存在下では、外液にテラヘルツ波が吸収され、リポソーム内のマイクロ反応場への影響は見られないと考えられた。そこで、まず、外液の非存在下でリポソームの構造を保持し、テラヘルツ波を照射する照射系を確立した。具体的には、アガロースにグルコースと HEPES バッファー、およびグルタミン酸カリウムを混合しゲルを作製した。そして、そのゲル上にリポソーム分散液を滴下した後に、乾燥させた。リポソーム液の乾燥後、外液を添加し、リポソームの回収を試みたところ、50% の数のリポソームの回収に成功した。この時、リポソームの脂質膜に赤色蛍光脂質を混合し、かつ、リポソームの内液に緑色蛍光タンパク質（トランスフェリン結合アレクサ 488）を内封してサイズマーカーとして用いた。まず、フローサイトメーターを用いてリポソーム膜蛍光量を測定したところ、アガロースゲルへの添加前後で、蛍光の減衰が見られた。そのためアガロース

ゲル上での乾燥は、リポソームを小さくすることが示唆された。次に、内封した蛍光タンパク質の蛍光量も減少していたため、内液の一部が流出し、その結果としてリポソームのサイズが小さくなっている可能性が示唆された。一方で、回収したリポソームに対する散乱光を調べ、大きさと膜構造の複雑さ（一枚膜か多重膜か脂質の凝集塊か）を調べたところ、細胞様の一枚膜リポソームの割合は大きく変わらないことが分かった。さらに、顕微鏡下でリポソームの形状を観察しても、アガロースゲル上への添加の有無において大きな違いは見られなかった。そのため、アガロースゲル上での乾燥によって、一部のリポソームの破裂やサイズ変化は見られたものの、テラヘルツ波をリポソームに照射し、回収することが可能であることが分かった。

## 2-2. アガロースゲル上でのリポソーム内転写反応

リポソーム内での転写反応と転写産物（RNA）のフローサイトメーターでの検出方法は我々が過去に報告している<sup>11-12</sup>。これらの報告では、リポソームは外液中に分散しており、反応温度は転写酵素の至適温度である 37° C で反応させている。一方で、テラヘルツ波の照射系では、ジャイロトロンステージ上に温度調節機構がなかったため、室温でテラヘルツ波の照射を行うこととした。そのため、まず予備実験により、テラヘルツ波を照射中のアガロースゲルの温度は 25° C から 27° C の間であることを見出した。そこで、アガロースゲル上で乾燥したリポソームを 25° C および 27° C で 3 保温したときに、リポソーム内の酵素活性の失活や、内容物の流出によってリポソーム内反応が進まない可能性およびゲル上のリポソーム内で RNA が合成されるかを検証した。リポソームに、T7 バクテリオファージ由来の RNA 転写酵素（T7 RNA polymerase）と転写反応に必要な核酸を内封し、アガロースゲル状に添加後乾燥させて、3 時間、25° C あるいは 27° C で保温した後に、リポソームを回収した。そして、37° C で反応させ、RNA 量が増加するかを調べた（図 2）。リポソーム内の RNA は脂質膜を透過し、RNA を蛍光染色できる SYBR Green II を用いて染色し、その後フローサイトメーターで蛍光を検出し比較した。その結果、アガロースゲル上の乾燥リポソーム内でもリポソーム内液が保持されて、内部で転写反応が進むことが回収直後の 0 時間の蛍光強度から示唆された（図 2）。また、回収後、チューブ内のリポソームにおいて RNA 合成が進んだことから、アガロースゲル上での乾燥により酵素の失活などによる転写反応の停止は見られないことが分かった（図 2, 60 min, 120 min）。

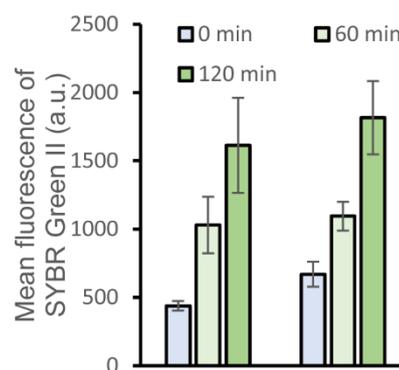


図 2 アガロースゲル上での保温と回収後の RNA 量

## 2-3. 転写反応を内封したリポソームへのテラヘルツ波照射

転写反応に必要な酵素と基質（T7 RNA polymerase と NTP）を封入したリポソームをアガロースゲル状に添加し、乾燥後にジャイロトロンを用いてテラヘルツ波を照射した。この時、照射中の温度を、赤外線カメラ（IR カメラ）を用いてリアルタイムに測定した。そして、テラヘルツ波を照射しているサンプルと、照射していないサンプルの温度条件を揃えた。照射中のサ

サンプルは、照射開始時には 22°C 程度であり、30 分間の間、温度は上昇し、その後、 $26.5 \pm 0.5$  °C が維持された。テラヘルツ波の照射パラメーターとしては、パルス幅 10 ms, パルス間隔 10 Hz または 1Hz, パルス当たりのエネルギー 10 W または 1 W で照射し、各条件で、一秒あたりの照射エネルギー (ジュール毎秒) が同値になるように調整した。テラヘルツ波を 3 時間照射した後に、アガロースゲルに外液を添加し、リポソームをプラスチックチューブに回収した。そして、回収直後 (0hr)、および 37° C での 1 時間または 2 時間反応させた後、リポソーム内の RNA 量を SYBR Green II で蛍光染色し、フローサイトメーターで比較した。その結果、テラヘルツ波非照射サンプルと比べて、照射サンプルは、照射直後の RNA 量が低いことが分かった。すなわち、テラヘルツ波を照射している間は、転写反応の進行が阻害されていることが示唆された。また、照射直後に一過的な転写効率の増大が見られたことから、テラヘルツ波照射中は、酵素と DNA の結合は阻害されないが、酵素が DNA 上をスライドしながら RNA を合成する過程が阻害されている可能性が示唆された。これらの成果は、現在論文投稿中である。

### 3. まとめ

本研究ではリポソーム型人工細胞を用いて、転写反応のみを内封し、テラヘルツ波照射によって、細胞様の区画内生化学反応に対してどのような作用が見られるかを定量的に解析した。その結果、テラヘルツ波帯の電磁波が生化学反応を阻害する可能性が示唆された。また、本研究によって、細胞様の区画を用いた生化学反応へのテラヘルツ波照射実験系の構築に成功した。そのため、今後は、本実験系を用いて、どのような波長が反応場の水を介して生化学反応を阻害するのか、その際に、パルス波であることが重要なのか、連続波でも同様なのか、そして、照射エネルギー量やパルス当たりのエネルギー量について閾値があるのかなど、本研究で見られた阻害作用の一般性について、詳細に解析を進めていく。

### 4. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を賜りました。ここに記して謝意を示します。

### 5. 参考文献

1. Shiraga, K.; Ogawa, Y.; Kondo, N., Hydrogen Bond Network of Water around Protein Investigated with Terahertz and Infrared Spectroscopy. *Biophysical journal* **2016**, *111* (12), 2629-2641.
2. Yamazaki, S.; Ueno, Y.; Hosoki, R.; Saito, T.; Idehara, T.; Yamaguchi, Y.; Otani, C.; Ogawa, Y.; Harata, M.; Hoshina, H., THz irradiation inhibits cell division by affecting actin dynamics. *PloS one* **2021**, *16* (8), e0248381.
3. Zhong, Z.; Furuya, T.; Ueno, K.; Yamaguchi, H.; Hitachi, K.; Tsuchida, K.; Tani, M.; Tian, J.; Komatsu, S., Proteomic Analysis of Irradiation with Millimeter Waves on Soybean Growth under Flooding Conditions. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21* (2).
4. Sugiyama, J. I.; Tokunaga, Y.; Hishida, M.; Tanaka, M.; Takeuchi, K.; Satoh, D.; Imashimizu, M., Nonthermal acceleration of protein hydration by sub-terahertz irradiation. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 2825.
5. Su'etsugu, M.; Takada, H.; Katayama, T.; Tsujimoto, H., Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic acids research* **2017**, *45* (20), 11525-11534.

6. Shimizu, Y.; Inoue, A.; Tomari, Y.; Suzuki, T.; Yokogawa, T.; Nishikawa, K.; Ueda, T., Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature biotechnology* **2001**, *19*(8), 751-5.
7. Pautot, S.; Frisken, B. J.; Weitz, D. A., Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion. *Langmuir* **2003**, *19*(7), 2870-2879.
8. Kita, H.; Matsuura, T.; Sunami, T.; Hosoda, K.; Ichihashi, N.; Tsukada, K.; Urabe, I.; Yomo, T., Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2008**, *9*(15), 2403-10.
9. Sunami, T.; Sato, K.; Matsuura, T.; Tsukada, K.; Urabe, I.; Yomo, T., Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Analytical biochemistry* **2006**, *357*(1), 128-36.
10. Berhanu, S.; Ueda, T.; Kuruma, Y., Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis. *Nat Commun* **2019**, *10*(1), 1325.
11. Tsuji, G.; Sunami, T.; Oki, M.; Ichihashi, N., Exchange of Proteins in Liposomes through Streptolysin O Pores. *ChemBiochem : a European journal of chemical biology* **2021**, *22*(11), 1966-1973.
12. Tsuji, G.; Shimomura, A.; Fukuoka, S.; Oki, M., RNA synthesis in liposomes with negatively charged lipids after fusion via freezing-thawing. *Genes & genetic systems* **2024**, *99*.