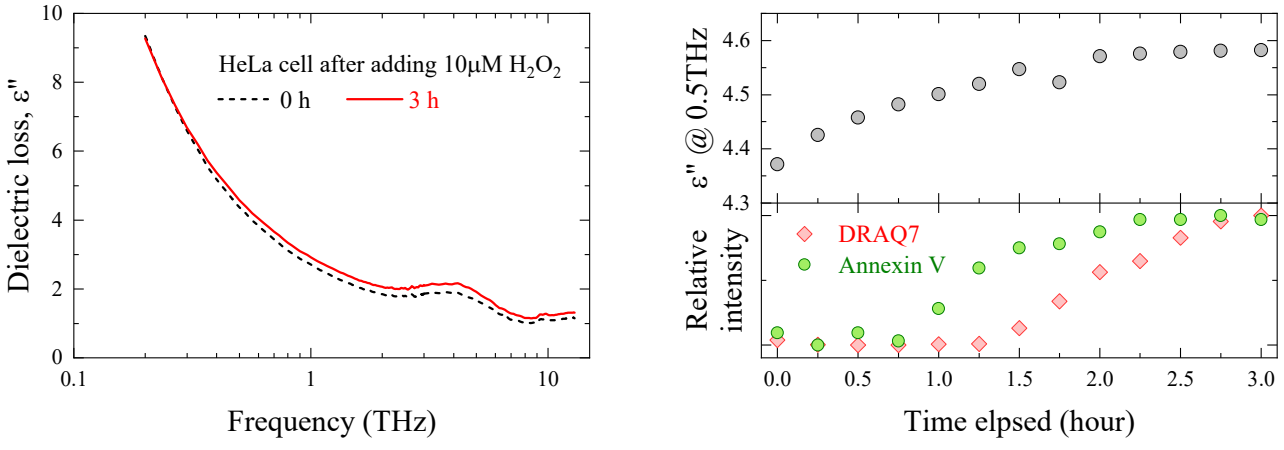
173　細胞内水分子ダイナミクスの評価技術開発	白神　慧一郎

【目的】水は細胞重量の大半をなす最もメジャーな生体分子であり、我々は核磁気共鳴画像法（MRI）のような水の状態変化を表す診断技術を経験的に活用している。しかしその一方で、水分子は極めて複雑な物理的性質を示すことから水が分子レベルで果たす生命科学的な役割・機能は未だほとんど明らかになっておらず、細胞内の大半を占める水はいわば謎の“バッファー”に位置付けられているのが現状である。私はこれまでの研究で、テラヘルツ波と呼ばれる2000 年代以降に急速に応用開拓が進んできた電磁波帯の分光情報が、細胞内の水分子ダイナミクスを切り拓く技術になり得ることを世界に先駆けて見出し、独自に技術開発を行ってきた。そこで本研究課題では、長時間にわたって安定的にテラヘルツ波分光を実施し、蛍光イメージングと照合してその結果を解釈することで、アポトーシス細胞死の過程で細胞内の水が“いつ”・“どのように”変化しているのかを明らかにすることを目指す。

【方法】細胞測定用として独自に開発したテラヘルツ波分光システムを蛍光顕微鏡と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蛍光イメージングを同時に実施できる測定系に改良した。そしてコンフルエントに接着培養した HeLa 細胞に 10 μM H_2O_2を添加してアポトーシス細胞死を誘導し、Annexin V と DRAQ7 の蛍光イメージングと並行してテラヘルツ波分光を行い、細胞内の水和状態を観測した。

【結果】今回の実験で得られた、テラヘルツ波領域における HeLa 細胞の誘電損失ε"（＝吸収）スペクトルを左図に示す。細胞死を誘導する直前（0 h）の誘電損失スペクトルは低周波側に大きい吸収を示し、それに加えて 5 THz 付近にもピークが観察される。これらはともに細胞内の水に由来するスペクトルであり、タンパク質や核酸、リン脂質などの生体分子に由来する吸収ピークは観測されないことから、テラヘルツ波分光では細胞内の水だけが選択的に観測できていることがわかる。ここでε"@0.5 THz の経時変化を抽出したところ、右上図に示すように細胞内の水はアポトーシス誘導直後からほぼ単調に変化することが見出されたが、この結果はアポトーシス誘導直後から細胞内では水和水の量が連続的に減少し続けるという描像を描いている。一方、細胞内でどのような生理状態の変化が起きているのかを理解するために正立顕微鏡を用いて同一細胞群の蛍光イメージングを同時並行で実施したところ、右下図に示すように Annexin V と DRAQ7 はアポトーシス誘導後に時間遅延を伴って発色することが明らかになった。なお DRAQ7 に対して Annexin V が先行して立ち上がっているが、これは Annexin V はアポトーシス前〜中期にみられる細胞膜対称性の喪失をプローブしているのに対し、DRAQ7 は細胞死後期にみられる細胞膜透過性の増加を反映していることに起因する。ここで細胞内の水を表すテラヘルツ波スペクトル（ε"@0.5 THz、右上図）と蛍光強度の経時変化を比較すると、興味深いことに細胞膜の対称性喪失や透過性増大に先立って細胞内では水分子のダイナミクスが変化していることがわかる。この結果は、水の状態が変化（＝水和水の量が減少）することで細胞内の環境がまず変化し、それが“引き金”となってアポトーシス細胞死のプロセスが引き起こされる可能性を示唆するものである。

アポトーシス細胞死における細胞内水分子ダイナミクスと蛍光イメージングの経時変化



173. 細胞内水分子ダイナミクスの評価技術開発

白神　慧一郎

京都大学 大学院農学研究科 地域環境科学専攻 生物生産工学講座

Key words：水分子，水和水，細胞，テラヘルツ波分光，蛍光イメージング

緒　言

約 38 億年前に海の中で生命が誕生して以降、生物は水への適応力を身につけながら進化を遂げてきた。そのため我々の身体は水なくして生命機能を維持することはできず、わずか数%の水を失うだけで脱水症状が現れ、10%以上にも及ぶと死に至る場合もある。ここで、核磁気共鳴画像法（MRI）は人体中におけるプロトンの振る舞いを画像化する技術であり、化学的にいえばその信号の大部分は細胞・組織中の“水”に由来する。そのため我々は、組織ごとに水の振る舞いや水の量が異なっており、さらには悪性腫瘍になると水も特有な振る舞いを示していることを“経験的に”会得しており、このような経験に則した診断は医療の分野で広く有効活用されている。

しかしその一方で、そのような主要な生体分子である“水”に焦点を当てて生体中の水の振る舞いを明らかにしようとする研究例は極めて少なく、細胞内で水が果たす生物学的な役割や機能さえも全く明らかになっていない。これは、水分子は分子間で形成される水素結合を介してピコ秒（10^{-12} s=1 兆分の 1 秒）という極めて短い時間スケールで複雑な分子ダイナミクスを示すうえ、水分子は標識化することができないため、これまでの生物学的手法では水分子の振る舞いを可視化することができなかったからに他ならない。しかし MRI に基づく経験則から、悪性腫瘍の中と正常組織の中では水の振る舞いが異なっていることは自明であることを踏まえると、もし細胞内の水分子ダイナミクスを定量化することができれば、従来の生命科学研究で欠けていた“水”のピースを埋めて、細胞内で起こる生命現象や疾病のメカニズムを新たな視点から再検討できると期待される。

私はこれまでの研究で、永く未踏の電磁波領域と呼ばれてきたテラヘルツ波帯（図 1）の分光情報が、細胞内水分子のピコ秒ダイナミクスを非標識・非侵襲で観測する技術になり得ることを見出し、独自に技術開発を進めてきた［1］。そしてテラヘルツ分光を用いて生理状態を保ったヒト培養細胞内の水分子ダイナミクスを定量評価することに世界で初めて成功し、生細胞の中に存在する水の約 1／4 が生体分子と直接相互作用する“水和水”として存在していることを実証している［2］。また残る 3／4 の水分子も、通常の水に比べて極めて無秩序な水素結合パターンを形成することを見出していることから、私は水が細胞内で単に生体高分子の隙間を埋めるだけのバックグラウンドではなく、細胞の生命活動に対して何らかの形で関与していると仮説を立てて研究を進めている。ただし細胞内の水に焦点を当てた研究は萌芽的な研究分野であるため、現時点では細胞の生理状態が細胞内の水分子ダイナミクスとどのように関係しているのかさえ明らかにはなっていない。そこで本研究課題では、長時間にわたって安定的にテラヘルツ波分光を実施し 、アポトーシス細胞死の過程で細胞内の水が“いつ”・“どのように”変化しているのかを明らかにすることを目指す。

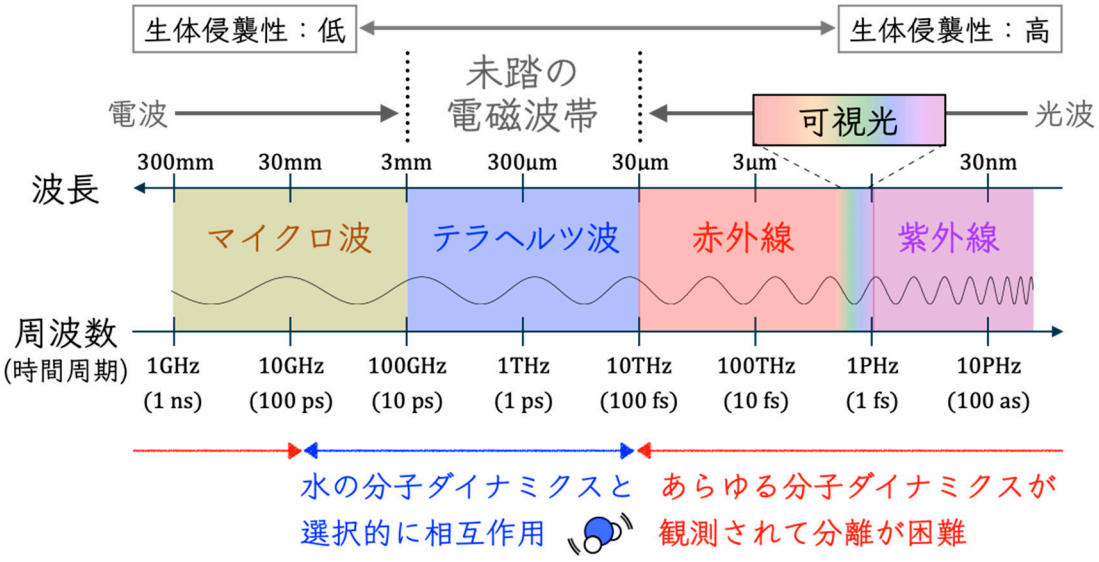


図 1. 電磁波の分類とテラヘルツ波領域における分光情報の特徴

周波数が大きくなるほど波長が短く、そして生体侵襲性が高くなる。テラヘルツ波帯は電波と光波の境界に位置する未踏の電磁波領域であり、水分子ダイナミクスを選択的に観測できるという特徴をもつ。

方　法

フェムト秒ファイバーレーザーFemtoFErb780（Toptica Photonics AG）から出射したパルス幅 50 fs 程度の近赤外パルスを光伝導アンテナ（浜松ホトニクス、G10620）で波長変換し、0.2～3.5 THz の周波数成分を含む p 偏光のテラヘルツパルスを発生させ、Si 製の ATR プリズムに導いた。また、熱光源で発生させた遠赤外線（3.5～12 THz）の p 偏光成分も同じ ATR プリズムに導くことで、0.2～12 THz にわたってテラヘルツ波スペクトルを一度に測定できる独自測定系を構築した。そしてこのテラヘルツ ATR 分光システムの上部に正立顕微鏡を構築し、明視野に加えて 4 色の蛍光画像を同時に取得できるようにした。

ATR プリズムを 37℃に加温し、また外部から 5% CO_2ガスを供給することでプリズム直上に設置したサンプルチャンバーを“細胞培養インキュベーター”に仕上げ、ATR プリズム上で HeLa 細胞を接着培養した。プリズム上で 100%コンフルエンスに達したことを確認したのち、Annexin V と DRAQ7（ともに Thermo Fisher Scientific）、ならびに 10 μM H_2O_2を添加した培地に置換してアポトーシス細胞死を誘導した。そしてアポトーシス誘導後 15 分間隔で 3 時間後まで、テラヘルツ波分光（細胞内水の測定）と蛍光イメージング（細胞状態の観察）を並行して実施した。

結果および考察

1. テラヘルツ波スペクトルの経時変化

今回の実験で得られた、テラヘルツ波領域における HeLa 細胞の誘電損失ε"（＝吸収）スペクトルを図 2 左に示す。細胞死を誘導する直前（0 h）の誘電損失スペクトルは低周波側に大きい吸収を示し、それに加えて 5 THz 付近にもピークが観察される。これらはともに細胞内の水に由来するスペクトルであり、タンパク質や核酸、リン脂質などの生体分子に由来する吸収ピークは観測されないことから、テラヘルツ波分光では細胞内の水だけが選択的に観測できていることがわかる。ここで誘電損失スペクトルの経時変化に着目すると、3 時間経過後の誘電損失はアポトーシス細胞死誘導直前に比べて全ての周波数にわたって有意に増加している。これは、H_2O_2添加に伴うアポトーシスの誘導によって細胞内の水分子ダイナミクスが変化していることを表している。この影響を定量的に理解するために

ε"@0.5 THz の経時変化を抽出したところ、図 2 右上に示すように細胞内の水はアポトーシス誘導直後からほぼ単調に変化することが見出された。ここで、0.5 THz の誘電損失は水和状態に敏感であり、ε"の増加は水和水量の減少（＝自由水量の増加）を表していることを鑑みると、本研究の結果はアポトーシス誘導直後から細胞内では水和水の量が連続的に減少し続けるという描像を描いている。

2. 水分子ダイナミクスと細胞状態の比較

細胞内でどのような生理状態の変化が起きているのかを理解するために正立顕微鏡を用いて同一細胞群の蛍光イメージングを同時並行で実施したところ、図 2 右下に示すように Annexin V と DRAQ7 はアポトーシス誘導後に時間遅延を伴って発色することが明らかになった。なお DRAQ7 に対して Annexin V が先行して立ち上がっているが、これは Annexin V はアポトーシス前～中期にみられる細胞膜対称性の喪失をプローブしているのに対し、DRAQ7 は細胞死後期にみられる細胞膜透過性の増加を反映していることに起因する。ここで細胞内の水を表すテラヘルツ波スペクトル（ε"@ 0.5 THz、図 2 右上）と、蛍光強度の経時変化を比較すると、興味深いことに細胞膜の対称性喪失や透過性増大に先立って細胞内では水分子のダイナミクスが変化していることがわかる。この結果は、水の状態が変化することで細胞内の環境がまず変化し、それが“引き金”となってアポトーシス細胞死のプロセスが引き起こされる可能性を示唆するものである。

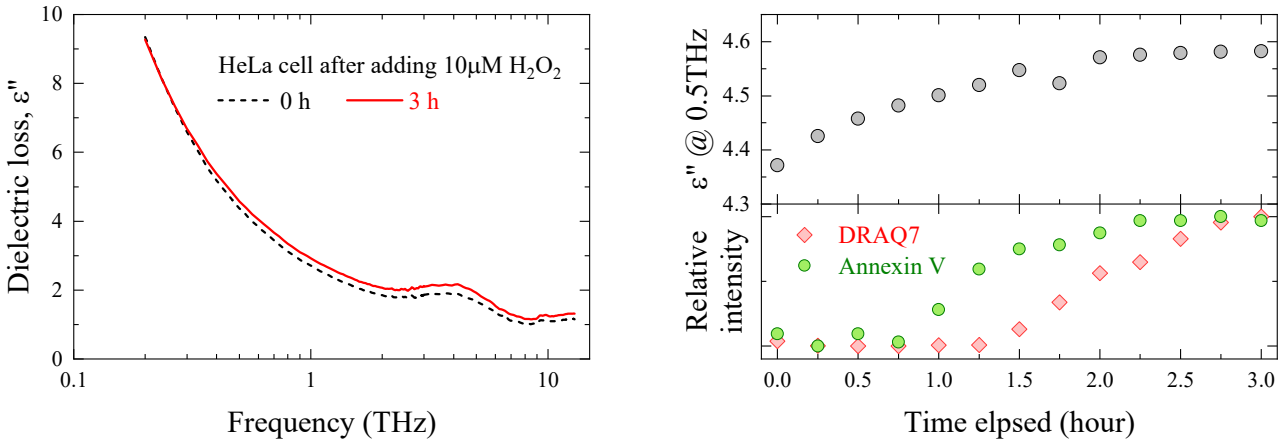


図 2. アポトーシス誘導における細胞内の水の状態変化

a) 10 μM H_2O_2 添加後 0 時間目と 3 時間目における HeLa 細胞の誘電損失スペクトル。

b) 誘電損失スペクトル@0.5 THz、ならびに Annexin V と DRAQ7 の相対蛍光強度における経時変化。

文　献

1) Shiraga K, Ogawa Y, Suzuki T, Kondo N, Irisawa A, Imamura M. Determination of the complex dielectric constant of an epithelial cell monolayer in the terahertz region. Appl. Phys. Lett. 2013 Feb 5; 102(5):053702. DOI: 10.1063/1.4790392

2) Shiraga K, Suzuki T, Kondo N, Tanaka K, Ogawa Y. Hydration state inside HeLa cell monolayer investigated with terahertz spectroscopy. Appl. Phys. Lett. 2015 June 22; 106(25):253701. DOI: 10.1063/1.4922918