

**【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旨とする。

**【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  $10\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  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 $\epsilon''$  (=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 $\epsilon''@0.5\text{THz}$ 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と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 ( $\epsilon''@0.5\text{THz}$ , 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 (=水と水の量が減少) 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

