

複数酵素活性を同時に可視化できる **activatable** 型ラマンプローブの開発

1. 発表者：

神谷 真子 (東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻 准教授)
藤岡 礼任 (東京大学大学院薬学系研究科 薬科学専攻 修士課程 2年)
小関 泰之 (東京大学大学院工学系研究科 電気系工学専攻 准教授)
寿 景文 (東京大学大学院工学系研究科 電気系工学専攻 博士課程 2年)

2. 発表のポイント：

- ◆ 蛍光法と比べて多重検出能に秀でるラマン顕微法を用いて、複数の標的酵素活性を同時に可視化することができる **activatable** 型ラマンプローブの開発に成功した。
- ◆ 生体内の分子に対して化学的に応答して初めて信号が **off** から **on** に **activate** される機能性のラマンプローブを世界に先駆けて開発した。
- ◆ 本研究で創出した原理に基づき更なる機能性ラマンプローブが開発されれば、ラマン顕微法の多重検出能を活かした生命科学研究の発展に大きく寄与すると期待される。

3. 発表概要：

光で分子振動を検出するラマン顕微法(注1)は、特にラマンプローブ(注2)と組み合わせることで、蛍光法と比べて高い多重検出能を実現できることから近年注目を浴びています。しかし、既存のラマンプローブは常に信号を示す **always-on** 型のプローブであり、生体内の分子と反応してラマン信号が **off** から **on** に変化する **activatable** な特性を有するラマンプローブは開発されていないため、その応用が限定されていました。

東京大学大学院医学系研究科の神谷真子准教授、同大学院工学系研究科の小関泰之准教授らの研究グループは今回、**epr**(注3)-**SRS**(注4)を原理とする **activatable** 型ラマンプローブの開発に成功しました。本プローブでは、分子の吸収波長によって検出感度が増えることを利用して、標的酵素との反応前は吸収波長が短いためラマン信号が **off** ですが、反応後は長波長化してラマン信号が **on** となるよう分子を設計しました。さらに、ラマン検出タグである **CN** 基を同位体置換することで、同時検出が可能な 4 種類のラマンプローブを開発し、2 種類の生きた培養細胞間における酵素活性パターンの違いを可視化することに成功しました。

本研究で創出した、分子の吸収波長に基づくラマン信号の制御原理は、機能性ラマンプローブの分子設計において一般化され得るものです。この設計法に基づいて更なる機能性ラマンプローブが開発されれば、ラマン顕微法の多重検出能を活かした生命科学研究の大きな発展が期待できます。

4. 発表内容：

① 研究の背景・先行研究における問題点

ラマン顕微法は、分子の固有振動数に相当する散乱光を観測できるため、試料中に含まれる分子の種類やその状態についての情報を得ることができ、非標識で生体を観察する手法として開発されてきました。さらに近年では、生体分子由来のバックグラウンド信号の影響を受けない **silent region**(注5)に信号が生じる、アルキンなどの三重結合を有したラマンプローブと組み合わせることで、標的分子の高感度かつ特異的な可視化が可能となってきました。しかしながら、既存のラマンプローブは常に同じラマンシフト値(注6)・信号強度を示す **always-on**

型のプローブであり、生体内の分子に応答してその信号が **activate** される、機能性を有したラマンプローブは開発されていませんでした。

② 研究内容

そこで本研究グループは今回、誘導ラマン散乱 (SRS) 顕微法において、分子の吸収波長よりも 100-200 nm 長波長の光で励起する前期共鳴 (ep_r) 条件下でその検出感度が飛躍的に増大することに着目し、分子の吸収波長の変化によってラマン信号を制御可能なプローブの開発を行いました。すなわち、標的酵素との反応前は吸収波長が短いためラマン信号が **off** ですが、反応後は吸収波長が長波長化し ep_r 条件を満たすようになることではじめてラマン信号が **on** になる分子設計を行いました。具体的には、**silent region** での信号検出を可能にするために 9 位に CN 基を導入した種々のキサンテン (注 7) 誘導体を合成し、分光特性・安定性を評価した結果、9CN-JCP を生理的条件下で安定に存在できる有望なプローブ母核として見出しました。実際に、9CN-JCP のアミノ基にアミド結合を介して酵素基質部位を導入した誘導体は、標的酵素との反応によって吸収波長が長波長化し、ラマン信号が **off** から **on** に変化することが示されました。また、ラマン顕微法は蛍光法と比べて多重検出能に秀でており、ラマン検出タグである CN 基の同位体置換を行うことによって異なるラマンシフト値を有する化合物を開発可能であることが知られています。これを利用することで、複数のアミノペプチダーゼやグリコシダーゼの活性を、同一色素母核でありながら異なるラマンシフト値で同時検出可能な **activatable** 型ラマンプローブを 4 種類開発しました。さらに開発したラマンプローブを用いることで、生きた細胞内においてこれら標的酵素の活性を同時にイメージングし、その酵素活性パターン of 細胞種間における違いを検出することにも成功しました。

③ 社会的意義・今後の予定

開発したラマンプローブ群を用いることで、従来の蛍光プローブ (注 8) では蛍光スペクトルの分離能の問題から同時検出が困難であった、複数の標的酵素活性の同時検出が可能になります。本プローブの標的酵素は特定のがん細胞において発現が亢進していることが知られているため、今後例えばがん臨床検体に適用することでがん部位の特異的な可視化を行うことができると考えられ、複数の酵素活性を標的とすることでがんの性状把握、がん種の同定が行えるようになることが期待されます。

さらに、本研究を通じて、分子の吸収波長の変化を用いることでラマン信号を **on/off** することができ、さらに **activatable** な機能性を付与したラマンプローブを設計できることを示しました。本プローブのように、同時に複数の標的分子を可視化できるラマンプローブ群を拡充することができれば、ラマン顕微法の多重検出能を活かしたマルチターゲットな生命科学研究が大きく発展し、生命現象の更なる理解につながることを期待されます。

本研究は、科学研究費助成事業 学術変革領域(B)「機能性ラマンプローブによる革新的多重イメージング (革新ラマン)」(JP20H05724、JP20H05725)の研究の一環であるとともに、JST CREST (JPMJCR1872)、科学研究費 JP19H02826、JP19K22242、JP20H02650、JP19J22546 の支援を受けて行われました。

5. 発表雑誌

雑誌名 : 「*Journal of the American Chemical Society*」 (オンライン版 : 11月 23日)

論文タイトル : Multicolor Activatable Raman Probes for Simultaneous Detection of Plural Enzyme Activities

著者 : Hiroyoshi Fujioka, Jingwen Shou, Ryosuke Kojima, Yasuteru Urano, Yauyuki Ozeki*, Mako Kamiya*

DOI 番号 : 10.1021/jacs.0c09200

アブストラクト URL : <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.0c09200>

6. 問い合わせ先 :

東京大学大学院医学系研究科 生体物理医学専攻 生体情報学分野
准教授 神谷 真子 (かみや まこ)

東京大学大学院工学系研究科 電気系工学専攻 フォトニクス講座
准教授 小関 泰之 (おぜき やすゆき)

7. 用語解説 :

(注 1) ラマン顕微法 : 光と分子の相互作用のひとつであるラマン散乱を検出することによる顕微法。ラマン散乱光は入射光に対して分子の振動数分だけ振動数が低下し、長波長化した光として生じるため、これを検出することで試料に含まれる分子の構造解析を行うことができる。

(注 2) ラマンプローブ : ラマン散乱により検出可能な特有の分子振動を有する分子の総称。異なる分子振動周波数を有するラマンプローブを用いることで、複数種の分子の多重検出が可能となる。分子振動スペクトルは蛍光スペクトルより狭いことから、ラマンプローブは多重度を高める上で有利であると期待されている。

(注 3) epr : electronic pre-resonance (前期共鳴) ; 共鳴ラマン散乱が生じる条件の1つ。ラマン散乱において、分子に入射する励起光の波長が分子の吸収波長に一致するときラマン散乱強度が著しく上昇することが知られており、これを(真正)共鳴ラマン散乱と呼ぶ。このような共鳴効果は分子の吸収波長と励起光の波長が完全には一致しない場合でも生じ、分子の吸収波長よりやや長波長の励起光によって生じるラマン散乱光を前期共鳴ラマン散乱と呼ぶ。

(注 4) SRS : stimulated Raman scattering (誘導ラマン散乱) ; 非線形ラマン効果の1つ。励起光を入射する際に、分子振動数だけ光周波数が異なるストークス光を入射すると、誘導放出と同様の原理によりストークス光が増幅されるとともに、励起光が減衰する現象。SRS を利用した SRS 顕微法は、非常に微弱な光であるラマン散乱光を検出するラマン顕微法と比較して、分子を高感度に検出することができる手法として知られている。

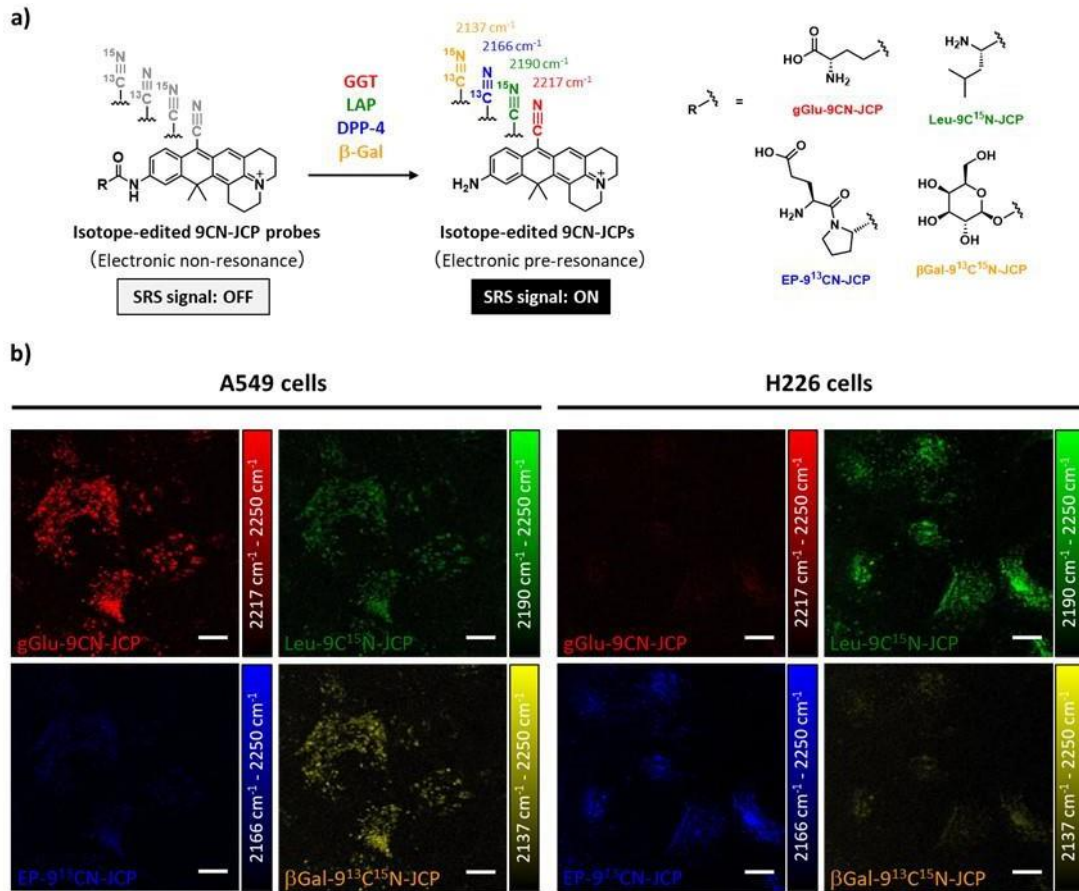
(注 5) silent region : 生体分子のラマン散乱に由来するバックグラウンド信号が生じない波数領域 ($1800\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) のこと。アルキンやニトリルといった三重結合のラマン散乱はこの領域で検出されるため、これらの三重結合を導入したラマンプローブは、生体内においても高感度に検出することができる。

(注 6) ラマンシフト値：ラマン散乱における、励起光からの振動数のシフト量。主に cm^{-1} の単位で表される。1 cm^{-1} は 30 GHz に対応する。

(注 7) キサンテン：アントラセンの中心のベンゼン間をピラン環に置き換えた 3 環構造を有する有機化合物の総称。

(注 8) 蛍光プローブ：最初は無蛍光性であるが、ある特定の標的分子と反応することでその構造が変化して、強い蛍光を発したり、蛍光の色調が変化したりする機能性分子の総称。

8. 添付資料：



a) 本研究で開発した 4 種類の酵素活性を標的とした activatable 型ラマンプローブ。b) 生きた培養細胞における GGT, LAP, DPP-4, β -galactosidase 活性の同時検出。ラマン顕微鏡法の多重検出能力を生かし、4 種類の酵素活性を同時イメージングして、2 種類の培養がん細胞 (A549, H226) における酵素活性パターンの違いを可視化することに成功した。スケールバーは 10 μm 。