

令和 3 年 4 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22242

研究課題名（和文）Activatableラマンイメージングプローブの開発による生体分子の多重検出

研究課題名（英文）Multiplex imaging by the development of activatable Raman probes

研究代表者

神谷 真子（Kamiya, Mako）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・准教授

研究者番号：90596462

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ラマンタグを導入した一連のキサンテン誘導体を合成し、ラマン信号強度を制御するために必要な化学構造要因を探索した。その結果、色素構造や置換基により、ラマン信号強度やラマンシフト値が大きく変化することを見出し、さらにこれまでに培ってきた蛍光プローブの設計原理を拡張することで、生体分子との反応前後でラマン信号強度が変化するラマンプローブの設計指針を得た。今後本知見を活用することで、全く新たなラマンイメージングプローブの開発が進むと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラマン顕微法は、共鳴誘導ラマン散乱顕微法をはじめとした検出系の高感度化によって近年急速に生体適合性が拡大され、また、蛍光法と比較して多重検出に秀でた手法として注目を集めている。従来のラマンプローブでは、生きた生物試料中の動的な生命活動を可視化することは難しかったが、本研究において生体内分子との応答性を示す機能性ラマンプローブの設計指針を得ることができたため、今後本成果に基づき開発する新たなラマンイメージングプローブを用いることで、医学・薬学・生物学に画期的な進展をもたらすと期待される。

研究成果の概要（英文）：We have prepared a series of xanthene derivatives with Raman-tags and examined whether the Raman signal intensity can be controlled by the chemical modification. As a result, we found out that the Raman signal intensity and the Raman shift value can vary depending on the chemical structure of the scaffold dyes. Further, by applying the design strategy for activatable fluorescent probes that we have established so far, we succeeded to establish the strategy for designing Raman probes whose Raman signal intensity changes upon reaction with biomolecules. We expect that our strategy will lead to the development of novel Raman imaging probes.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ラマンイメージング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

物質に光を照射すると散乱光が生じるが、この散乱光の大部分は入射光と同じ波長のレイリー散乱光であるのに対し、ごく僅かに入射光から波長が変化した散乱光が含まれており、これが「ラマン散乱光」である。ラマン散乱における波長のシフト量(ラマンシフト値)は光を散乱した分子の固有振動数に相当するため、ラマンスペクトルを取得することで、どのような構造の分子が試料中に含まれているかを非標識(**label-free**)で得ることができる。また近年では、生体分子由来の信号が生じない **silent** 領域 (**1800-2800 cm⁻¹**) に信号を生じるアルキン・ニトリル・**C-D** 結合などの微小ラマンタグを用いることで、標的分子特異的な生体イメージングも盛んに行われるようになってきた。一方でラマン散乱は極めて微弱な光であるため、検出感度が低く、長時間の観測時間が必要であることが大きな課題であった。このような課題に対し、コヒーレント反ストークスラマン散乱 (**CARS**) や誘導ラマン散乱 (**SRS**) といった非線形ラマン効果を利用した顕微鏡法の発展により、大幅な感度向上が達成され、生体適合性が急速に拡大されている。さらに、特筆すべきラマン顕微鏡法の特徴として、蛍光法と比較してスペクトル分解能が高いことが挙げられる。つまり、アルキン・ニトリルなどの微小ラマンタグを用いた場合に得られるラマンスペクトルの線幅は蛍光スペクトルの線幅に対して **50~200** 倍狭いため、蛍光法の色数の壁(同時解析が可能な分子数が **4~5** 色程度)を突破し、細胞における多数の標的分子を同時検出するイメージング手法として注目を集めている。

このような背景の中コロロンビア大学の **Min** らは **2017** 年、分子の吸収波長に対してやや長波長の励起光を用いることによりラマン散乱信号強度が上昇する前期共鳴 (**EPR**) ラマン散乱と **SRS** 顕微鏡を組み合わせることで、数 μM オーダーという高い感度で検出可能なラマンプローブ **MARS dye** の開発に成功した。さらに、種々の構造展開を行うことで **20** 種類以上のラマンシフト値を示す色素群 **MARS palettes** を開発した。また、開発した **MARS palettes** と蛍光色素を組み合わせることで **8~16** 種類の色素を同時に検出する超多重 (**super-multiplex**) イメージングを達成した。**2018** 年には、アルキン鎖を連結させた **polyyne** 化合物においてアルキン鎖の数に応じて検出感度の上昇・ラマンシフト値の変化が生じることに着目し、計 **20** 種類のラマンシフト値を示す **Carbow** プローブの開発に成功した。さらに、**Carbow** プローブと蛍光色素を組み合わせることで、計 **10** 色の標的分子をライブセルで同時に検出可能であることを示した。

このように、様々なラマンプローブの開発とそれを用いたイメージングが報告されてきたが、これらの既存のプローブの殆どは常に同じラマンシフト値・信号強度を示す「**always-on** 型のプローブ」であり、標的分子との反応によりラマン信号強度が変化する機能性を有したラマンプローブは積極的に開発されてこなかった。特にラマン信号は分子の振動に由来するため、その信号の **off/on** を制御することは極めて難しいと考えられてきた。このような背景の中我々は、前述の **MARS dye** で活用されている **EPR** ラマン効果を活用することで、**activatable** な機能を有するラマンプローブが開発できるのではないかと考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

前項で述べた **MARS dye** で活用されている **EPR** ラマン効果が、分子の吸収波長がラマン顕微鏡の励起波長に近づくにしたがって指数関数的にラマン散乱強度が上昇する現象であることに着目し、「分子の吸収波長変化によりラマン信号を制御することができるか」を検証することを本研究の目的とした。さらに、得られた知見を活用して、細胞内の生体分子と反応してラマン信号が変化する機能性ラマンプローブが設計し得ることの **proof-of-concept** 検証を行うこともあわせて目的とした。

3. 研究の方法

ラマン信号強度を制御するために必要な化学構造要因を探索するべく、**9** 位にアルキンやニトリルを導入した一連の新規キサンテン誘導体を合成し、キサンテン環 **3,6** 位のアミノ基上の置換基、**10** 位元素の置換、**3,6** 位の元素置換により、吸収波長とラマン信号強度やラマンシフト値がどのように変化するかを評価した。さらに、様々な **pH** の緩衝液中での安定性や細胞内成分との反応性を評価した。さらに、本検討で見出した色素骨格を母核として、酵素や細胞内求核成分と反応性を示すラマンプローブの開発が可能か、パイロット化合物を合成して検討した。なお、ラマンスペクトルの測定に際しては、東京大学大学院工学系研究科の小関泰之准教授と共同し、当該研究室で構築した高速 **SRS** 顕微鏡を用いて評価した。

4. 研究成果

< 研究成果 >

まず、**9** 位にアルキンやニトリルを導入した一連の新規キサンテン誘導体を合成し、その吸収スペクトルと誘導ラマン散乱信号 (**SRS** 信号) を評価したところ、**EPR** 条件にかかる吸収波長を有する誘導体では **SRS** 信号強度が増強するという既報文献と一致する結果となった。さらに、様々な **pH** の緩衝液中での安定性や細胞内成分との反応性を評価したところ、これらの条件下における安定性や反応性は誘導体毎に異なることが明らかとなった。特に、**EPR** 条件を満たす吸

吸収長と安定性との両条件を満たす誘導体は限られており、キサンテン環の **10** 位元素がケイ素の場合は、**EPR** 条件を満たす近赤外の吸収波長を示すが安定性が低く、**10** 位元素が酸素の場合は、安定性は高いが吸収波長が **EPR** 条件を満たさない傾向があることを見出した。さらに、**3,6** 位のアミノ基上の置換基も吸収波長と安定性に寄与しており、キサンテン環の **10** 位元素と **3,6** 位のアミノ基上の置換基の最適化により、目的とする特性を示す誘導体が開発できることが強く示唆される結果となり、生きた細胞や組織における生体機能を可視化するラマンプローブを開発するにあたり重要な知見を得た。また、キサンテン環 **3,6** 位の元素を窒素から酸素に置換した誘導体も開発し、これらの誘導体も **SRS** 信号を示すことを確認した。

次に、酵素活性を検出するラマンプローブの開発が可能か、パイロット化合物の合成と評価を行った。合成した一連の誘導体の中で安定性が高く、十分な **SRS** 信号強度を示す色素母核を選定し、キサンテン系色素の **6** 位のアミノ基をアミド化すると吸収波長が短波長化することを利用して、アミノ基にアミド結合を介してアミノペプチダーゼの基質部位を導入したパイロット化合物を合成した。合成した化合物の吸収スペクトルおよび **SRS** 測定を行った結果、本プローブは短波長化して **SRS** 信号強度が低く抑えられているが、標的アミノペプチダーゼとの反応により吸収波長が長波長化して **SRS** 信号が回復することが示された。つまり、本設計法に則り **activatable** 型ラマンプローブが開発可能であることが示唆される結果となった。今後、キサンテン環の **10** 位元素や **3,6** 位のアミノ基上の置換基を最適化することで、**EPR** 条件を十分に満たす吸収波長と高い安定性を有するラマンプローブの開発が可能であると考えられる。

その他、開発した一連のキサンテン誘導体のうち、細胞内求核分子と反応性を示す誘導体の探索と評価を行った。具体的には、細胞内に最も多く含まれる抗酸化物質の一つであるグルタチオン (**GSH**) との反応性を評価したところ、**GSH** がキサンテン環 **9** 位の炭素に付加することで吸収波長が短波長化し、**SRS** 信号が減少する誘導体が複数あることを見出した。さらに、**GSH** との反応性はキサンテン環 **3,6** 位のアミノ基上の置換基および **10** 位元素の種類により異なること、さらに細胞内 **GSH** 濃度範囲 (**0.5-10 mM**) で応答する誘導体があることを見出した。

< 今後の展望 >

酵素活性を検出するプローブとしては、多重検出が可能であるラマンイメージングの利点を最大限に活用するべく、プローブ母核の同位体標識や置換基修飾を行い、ラマンシフト値が異なる一連の誘導体を開発する。さらに、がんでの発現亢進が報告されている複数のアミノペプチダーゼやグリコシダーゼの基質配列を導入したラマンプローブ群を開発し、標的酵素との反応により **SRS** 信号強度が変化するか、またその検出感度について精査する。また、標的酵素を発現する培養細胞に適用し、生きた細胞内における酵素活性を **SRS** 信号強度の変化として検出が可能か、またそのシグナルが阻害剤の同時併用により抑制されるか検証する。さらに、標的酵素の活性パターンが異なる培養がん細胞などの生物試料に適用することで、生きた細胞における複数のアミノペプチダーゼ・グリコシダーゼ活性の同時検出が可能か、またその活性パターンの違いが異なるラマンシフト値における **SRS** 信号のパターンとして検出できるかを検証していく予定である。

GSH 応答性の誘導体に関しては、本研究で見出した候補誘導体を培養細胞に適用することで、その細胞膜透過性・細胞内局在・細胞内滞留性を評価するとともに、反応速度・選択性・可逆性についても精査する。必要に応じて適宜構造修飾を施すことで、培養細胞における **GSH** をラマンイメージングで検出するのに有効なプローブの開発を試みる。適切な骨格が見出された場合には、これを用いて細胞種による細胞内 **GSH** 濃度の差異や、細胞内 **GSH** 濃度変動を **SRS** 信号の変化としてリアルタイムに可視化・追跡できるか評価していく予定である。

< 得られた成果の位置づけとインパクト >

近年急速に生体適合性が拡大しているラマン顕微法であるが、従来の **always-on** 型のラマンプローブでは、生きた生物試料の動的な生命活動を可視化することは難しかった。このような背景の中本研究では、研究代表者がこれまでに培ってきた蛍光プローブの設計原理をラマンプローブの分子設計に展開することで、観測標的分子との反応前後でラマン信号強度が変化する機能性ラマンプローブの設計指針を得た。具体的には、分子の吸収波長を非共鳴条件から **EPR** 条件に変化させることで、ラマン信号の制御が可能であることを本研究で示した。このように生体内分子との応答性を示す機能性ラマンプローブの報告は殆どなく、ラマンイメージング分野における画期的な成果であるとともに、イメージング分野におけるブレイクスルーに成り得ると考えている。また、前期共鳴誘導ラマン散乱 (**EPR-SRS**) では、 μM オーダーの検出感度で観察が可能であり、多重検出が可能であるラマンイメージングの特長を最大限に活用することで、蛍光イメージングでは同時に観察することが難しい多数の生体分子を同時かつ高感度に検出することが可能になると期待される。今後本成果により得られた分子設計指針をさらに拡張することで、全く新たなラマンイメージングプローブの開発が進むと期待されるとともに、医学・薬学・生物学に画期的な進展をもたらすと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤岡礼任、神谷真子、寿景文、飯野敬矩、小関泰之、浦野泰照
2. 発表標題 酵素活性を標的としたactivatable型ラマンプロブの開発
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡礼任、神谷真子、寿景文、飯野敬矩、小関泰之、浦野泰照
2. 発表標題 酵素活性の同時検出を可能とするactivatable型ラマンプロブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Activatable型ラマンプロブ	発明者 浦野泰照、神谷真子、藤岡礼任、小関泰之、寿景文	権利者 国立大学法人東京大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-35842	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------