

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710267

研究課題名(和文) 薬剤標識タンパク質の質量分析を支援するオンラインラマンディテクターの開発

研究課題名(英文) Development of on-line Raman detection system for the assistance of protein analysis

研究代表者

安藤 潤 (Ando, Jun)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：40623369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内部で働く蛋白質は、薬剤などの小分子と結合してその機能を様々に変化させている。細胞内部で小分子が標的とする蛋白質や、それらが作用するメカニズムを分子レベルで解明できれば、創薬や蛋白質の機能解明に重要な知見をもたらす。小分子の結合にともなう質量シフトをもとに解析を行えば、標識タンパク質に関する有用な知見をもたらすが、解析前段に液体クロマトグラフィーで分離、送液された複雑な試料の中から、目的の分子を選択的に解析することは困難であった。本研究では、ラマン分光法を用いて送液される試料を分析し、オンラインで目的分子を探索する検出システムの構築を目指して研究開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Functions of proteins working in a biological cell is regulated by the binding with various kinds of small molecules. Identification of specific proteins, which bind with the small molecules, and the information of their binding mechanism at molecular level, will largely contribute for the drug discovery and the study of protein function. However, complexity of biological samples often prevent to analyze them. In this research, the construction of the system was considered that can combine Raman spectroscopy with liquid chromatography. Since Raman spectroscopy has a variety of chemical information, it will contribute to analyze the samples, which are under fractionation with liquid chromatography.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：ラマン分光法 薬剤標識タンパク質 表面増強ラマン散乱 質量分析法 液体クロマトグラフィー

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に取り込まれた薬剤は、タンパク質と相互作用することで様々な生物活性を示す。新薬の創成や薬剤の活性向上、副作用の抑制を目指した研究開発には、小分子が標的とするタンパク質を探索し、その結合様式を解明することが重要となる。標的タンパク質の探索や、小分子とタンパク質の結合位置を同定する手法の一つとして、質量分析法がある。特にタンパク質と共有結合を呈する化合物の場合、小分子との結合によって生じる質量シフトの情報を元にして標的タンパク質を絞り込み、その結合位置をアミノ酸側鎖のレベルまで詳細に分析することができる。実際に、共有結合を伴うタンパク質の翻訳後修飾においては、こうした分析法が広く実用化されている。しかしながら、薬剤などの小分子の作用を解析する場合には、実用上の大きな課題が残されていた。その課題の一つが、試料の複雑化と、それに伴う解析の困難さである。通常の分析では、目的とするタンパク質試料を消化酵素で断片化する。断片化した混合物は非常に複雑な試料となるため、液体クロマトグラフィーによって分画を行う。分析カラムによって分画された試料を順次送液し、これらを網羅的に解析していくことになるが、膨大な試料の中から、質量情報だけを頼りに小分子が結合した試料を含む画分を見つけ出すことは極めて困難となる。結合効率が低い小分子や、結合様式が不明な小分子の場合、その難易度はさらに上がり、実際に分析を行って成功している事例は限られてきた。

上記の状況を鑑み、分画試料に対して従来と異なるアプローチで分析・探索を行う手法が必要となっていた。そこで今回研究代表者は、ラマン分光法に着目した。ラマン分光法は、分子の振動情報を光学的に取得する振動分光法である。光検出によって直接、かつ無標識で検体の分子種を識別することができる。従来、小分子を追跡する手法としては、蛍光検出法が検討されてきた。この手法では、蛍光色素を小分子に導入し、蛍光発光の強度を頼りに計測する。信号強度が極めて高いこの手法は、微量な試料でも高感度に探索を行うことができる。しかしながら、小分子と蛍光団のサイズが同等程度であるため、蛍光標識によって小分子の活性が低下する可能性が残されていた(Thuaud *et al.*, *J. Med. Chem.*, Vol. 52, pp. 5176, 2009)。また、蛍光団の性質に由来して、元来の小分子と異なる振る舞いを示すなど、アーティファクトを生み出す可能性も含んでいる。特に、タンパク質との結合が見込まれる小分子において、標識を導入する位置によっては、活性が著しく低下する事例が見られてきた。ラマン分光法は、蛍光検出法と比較して、感度の点で大幅に劣るが、反面、標識を導入せずに計測ができるという大きな利点を有する。さらに、ラマンス

ペクトルによって得られる情報は、分子種の識別にとどまらず、分子の構造変化、酸化・還元などの状態変化、周辺環境変化など、様々な情報を同時にもたらす。従来の分析手法に分子振動という新たな次元の情報を付加することで、これまで困難であった複雑な試料の分析効率を、大幅に向上できると期待できる。

## 2. 研究の目的

ラマン分光法を用いて、液体クロマトグラフィーで送液中の試料に対してオンラインで分光分析を行うシステムの構築を行うことを目的とする。従来の液体クロマトグラフィーでは、紫外線(UV)吸収を利用したUVクロマトグラフィーが広く用いられてきた。UV吸収は核酸や脂質、タンパク質、ペプチドなど、様々な生体分子に対して適用でき、送液中の試料の有無を吸光度からオンラインかつリアルタイムで取得することができる。汎用性、感度の面で高い性能を有するが、この方法では原理上、分子種を識別することはできない。UVクロマトグラムから分画がうまく進行していることは確認できても、どの画分を分析するのがよいかを指し示す指標として用いることはできないのである。UVのほか、蛍光発光を利用した蛍光クロマトグラフィーもある。小分子に蛍光団を導入し、送液中の試料に対して順次蛍光検出を行い、蛍光クロマトグラムを得る。この方法では、目的分子を見分ける識別能が得られ、極めて高い感度を有する反面、蛍光団の修飾による目的分子の活性低下や、アーティファクトの可能性が残るといった課題が残されていた。そこで今回、UV吸収や蛍光発光の代わりに、ラマン散乱を利用してクロマトグラムを得るシステムの構築を目的に研究を行った。ラマン分光法では、小分子に標識などを導入することなく、検体自身の分子振動から直接目的分子を識別できる。小分子の活性に影響を与えることがなく、かつ高い分子識別能を有する本手法は、UV、蛍光検出法と比較して、明らかな利点を有する。この手法を実現するには、オンラインで送液中の試料をリアルタイムにラマン分光分析できるシステムの構築が必要となる。ラマン分光法は上記の手法と比べて検出感度が大幅に劣るという問題がある。送液中の試料を順次計測するシステムを構築することは、感度の高い検出システムを構築することに直結する。ラマン散乱を効率よく励起・検出するため、レーザー光による試料の照明系、及び散乱光の検出系に高効率な光学系を配し、この光学系を用いて計測するのに適した流路の設計を行う必要がある。特に、検出に用いる対物レンズは、ラマン散乱の信号光を効率よく捕集できる高開口数のレンズを用いることが重要となる。通常の送液チューブで上記のレンズを収差の影響なく用いることは困難であ

るため、従来の送液チューブに直結が可能なラマン計測専用の接続式流路を設計、構築する。この流路を用いて、高開口数の対物レンズで流路内の分子を高感度に分析するシステムを構築することを目的として、研究開発を進めた。

### 3. 研究の方法

532nm のレーザー光を励起光源としてラマン分光計測を行う。ラマン散乱分光計測では、励起波長が短くなるほど、散乱効率が向上する。一方で、波長を短くすると、試料からの自家蛍光が発生する可能性が高まるという問題がある。自家蛍光は、微弱なラマン散乱光と比較して強度が高く、ラマン散乱光と波長域も重なって計測を妨害してしまう。また、ラマン計測においては、散乱効率の低さを補うため、高光強度で分子を照明する必要がある。高出力で発振するレーザー光源が存在し、かつ自家蛍光の発生が比較的少ない 532 nm を励起光源の波長として選定した。上記の光源を用いたラマン顕微鏡による検討を行い、通常のラマン散乱分光法で計測が可能な液体クロマトグラフィーの検体注入量は、1 nmol 以上という結果を得た。この値は、通常の分析に用いられる注入量の 1000 倍以上の検体注入量が必要であることを意味する。後段の分析も視野に入れると、通常のラマン散乱分光計測は、現実的な選択肢ではないと判断した。

より高感度にラマン計測を行うため、本研究では、表面増強ラマン効果を利用することを選択した。表面増強ラマン散乱分光法は、金属ナノ構造を用いて、粒子表面近傍に存在する分子からのラマン散乱光を増幅する手法である。 $10^4$ - $10^6$  倍程度の増幅効率を示すことがあり、通常のラマン散乱分光では不可能な分析感度に到達することができる。表面増強ラマン効果を用いて、流路内を送液中の分子からのラマン散乱を計測するためには、流路内に金属ナノ構造を配置する必要がある。さらに、高効率にラマン散乱を励起・捕集するためには、高開口数の対物レンズが利用できる流路の設計が必須となる。上記の仕様を満たすため、底面にカバーガラスを配し、ポリマーに微細な溝構造を成型した板を貼付ける仕様の流路の設計を行った。上記の配置にすれば、開口数の高い水浸対物レンズに多く見られるカバーガラスに対する厚み補正をそのまま利用でき、収差の影響なく高効率でラマン分光計測を行うことができる。さらに、カバーガラス上に金属ナノ構造を配置することで、流路底面を通過する分子からの表面増強ラマン散乱光を、ガラス越しに励起・検出することができる。顕微分光計測に適する仕様とするため、流路幅を顕微鏡視野内に収まるスケールになるよう設計を行った。液体クロマトグラフィーで一般的に用いられる送液チューブとの接続を考慮して、流路幅、

及び流路用の溝の高さを、送液チューブの内径とできる限り近い値になるように設計した。設計した流路に実際に金属ナノ構造を配置し、ラマン分光計測を行った。励起波長には上記の 532nm のレーザー光源を用い、金属ナノ構造には、銀のナノコロイドを選択した。ガラス基板の上にコロイド溶液を滴下し、溶液を乾燥させてから、コロイドの吸着した箇所の直上にポリマーで成型した溝部分を合わせる形でポリマー板を貼付ける。ガラスとポリマーの間に形成された流路部分に送液チューブを直結させ、金属ナノ構造が存在する箇所にレーザー光を照射して流路内で表面増強ラマン計測を行う。

### 4. 研究成果

ラマン計測に適した流路の設計を行った。流路は、厚み約 0.17mm のカバーガラス(NEO カバーガラス, 松浪ガラス)と、PDMS にマイクロスケールの溝加工を施したポリマー(PDMS 流路, マイクロ化学技研)を組み合わせ作成した。底面にカバーガラスを配置し、上部にポリマーを配置する。ポリマーの溝部分がガラス面の方を向くようにかぶせることで、底面がカバーガラスのマイクロ流路を作成できる。顕微分光計測を行うことを想定し、110  $\mu$ m の流路幅、70  $\mu$ m の溝深さを設定した。流路の両端に送液チューブとの接続口を設けた。液体クロマトグラフィー等に用いられる送液チューブの間に、作成したマイクロ流路を直接接続できる配置とした。図1に今回設計、試作したマイクロ流路の模式図(全体図、及び断面図)を示す。下側に対物レンズを配置することで、カバーガラスを介してラマン計測を行うことができる。

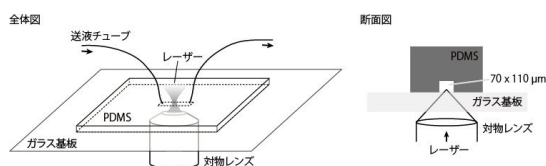


図1 マイクロ流路の模式図

表面増強ラマン効果を利用した計測を行うため、作成したマイクロ流路のガラス基板側に、銀ナノコロイド溶液(Silver Colloid, BBI International)を滴下した。溶液が乾燥するまで静置し、ナノ粒子を基板の上に固定させた。続いて、ナノ粒子を固定させた位置に溝部分を合わせるように、上部からポリマーをかぶせて密着させた。上記の操作により、カバーガラスの上面側にナノ粒子が存在し、直上にマイクロスケールの送液用流路が確保されたシステムを構築することができる。図2に、ナノ粒子を配したマイクロ流路の明視野像を示す。図中の下部に流路壁面が観察でき、上部に流路内のガラス面上に固定された粒子群を確認することができる。

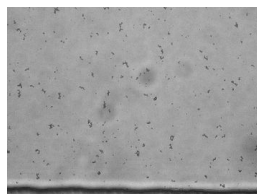


図2 マイクロ流路の壁面(画像下部)と、流路内側(画像上部)のガラス基板上に滴下したナノ粒子の明視野像

上記のマイクロ流路を用いて、実際に検体を注入して表面増強ラマン散乱計測を行った。試料には、核酸の一つであるアデニンを選択した。シリンジを繋いだ送液チューブをマイクロ流路に接続し、濃度を  $100\ \mu\text{M}$  に調整した検体溶液を流入させてから計測を行った。ラマン計測には、スリット走査ラマン顕微鏡で用いられるライン状の照明光を用い、レーザーの焦点から発生するラマン散乱光を平行に分光検出した (Palonpon *et al.*, Nat. Protoc., Vol.8, pp.677, 2013, Fujita *et al.*, J. Biomed. Opt., Vol.14, pp.024038, 2009)。波長は  $532\text{nm}$  のレーザー光を用い、開口数 1.27 の水浸対物レンズ(顕微鏡用対物レンズ, ニコン)を用いてレーザー光の集光、および散乱光の捕集を行った。焦点位置におけるレーザー光強度を  $0.3\ \text{mW}/\mu\text{m}^2$  に調整し、露光時間を 3 秒とした。平行に取得した 250 点のラマンスペクトルを平均して得られた、アデニンの表面増強ラマンスペクトルを図3に示す。アデニンに特徴的な振動モードが  $734\text{cm}^{-1}$  付近に観察できた。

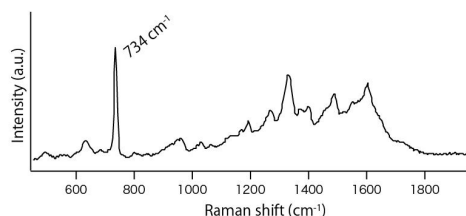


図3 マイクロ流路内で取得したアデニンの表面増強ラマンスペクトル

上記の結果から、本研究で設計、試作したラマン計測専用のマイクロ流路を用い、底面に金属ナノ粒子を配置した構成をとることで、液体クロマトグラフィー等の送液システムから注入される試料をオンラインでラマン計測するシステムを構築できることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Jun Ando, Taka-aki Yano, Katsumasa Fujita, Satoshi Kawata, Metallic nanoparticles for nano-imaging and nano-analysis, Phys. Chem. Chem. Phys.,

Vol. 15, pp. 13713-13722, 2013.

DOI: 10.1039/C3CP51806J

Almar F. Palonpon, Jun Ando, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Raman and SERS microscopy for molecular imaging of live cells, Nat. Protoc., Vol. 8, pp. 677-692, 2013.

DOI: 10.1038/nprot.2013.030

Jun Ando, Katsumasa Fujita, Metallic nanoparticles as SERS agents for biomolecular imaging, Curr. Pharm. Biotechnol., Vol. 14, pp. 141-149, 2013. DOI: 10.2174/1389201011314020003

Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Almar Palonpon, Jun Ando, Katsumasa Fujita, Satoshi Kawata, Mikiko Sodeoka, J. Am. Chem. Soc., Vol. 134, pp. 20681-20689, 2012.

DOI: 10.1021/ja308529n

〔学会発表〕(計 7 件)

Jun Ando, Raman microscopy for visualizing small molecules in live cells, iCeMS-RIKEN Joint Symposium (Kyoto, 2014 年 2 月 7 日, 招待講演)

Jun Ando, Hiroyuki Yamakoshi, Almar Palonpon, Kosuke Dodo, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Mikiko Sodeoka, Alkyne-tag Raman imaging for visualizing small molecules in a living cell, UK-Japan workshop on nanophotonics, metamaterials and plasmonics (Osaka, 2014 年 3 月 14 日)

Jun Ando, Kazuki Bando, Kai-Chih Huang, Nicholas Smith, Katsumasa Fujita, Satoshi Kawata, Dynamic SERS imaging of cellular transport in 3D, 応用物理学会関西支部 平成 25 年度第 3 回講演会 (大阪, 2014 年 2 月 28 日)

Jun Ando, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Almar Palonpon, Satoshi Kawata, Mikiko Sodeoka, Alkyne-tag Raman imaging for visualization of small molecules, Focus on Microscopy 2013 (Maastricht, Netherlands, 2013 年 3 月 26 日)

山越博幸、どど孝介、安藤潤、Palonpon Almar, 藤田克昌、河田聡、袖岡幹子、アルキン修飾化合物の生細胞ラマンイメージング、日本薬学会第 133 回年会 (横浜、2013 年 3 月 27 日)

Katsumasa Fujita, Jun Ando, Nicholas Smith, Satoshi Kawata, Dynamic SERS imaging with gold nanoparticles transported in a living cell, SPIE BiOS (San Francisco, USA, 2013 年 2 月 2 日)

Jun Ando, Katsumasa Fujita, Nicholas Smith, Satoshi Kawata, Surface-enhanced Raman nano-imaging of cellular transport pathways with endocytosed gold nanoparticles, NFO-12 the 12<sup>th</sup>

international conference on near-field optics, nanophotonics and related techniques (San Sebastian, Spain, 2012年9月4日)

〔図書〕(計 1 件)

山越博幸、どど孝介、安藤潤、藤田克昌、袖岡幹子、羊土社、アルキン標識を用いた低分子化合物のラマンイメージング(疾患克服を目指したケミカルバイオロジー), pp. 202-208.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：ラマン分光法を用いた生体分子の解析方法及び装置

発明者：袖岡幹子、安藤潤、浅沼三和子、どど孝介、藤田克昌

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2012-181140, PCT/JP2013/071844

出願年月日：2012年8月17日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 潤 (ANDO, Jun)

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号：40623369