

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26620129

研究課題名(和文) 生体ラマン観察に資する分子プローブの創出

研究課題名(英文) Development of molecular probes for Raman bioimaging

研究代表者

岡本 晃充 (Okamoto, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授

研究者番号：60314233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、ラマン分光生体内解析を行うための新しい標識分子を開発することを目的とする。将来的に生体分析のマルチモダリティを確保するための一つの大きな候補となりうるのが、ラマン分光法である。細胞を構成する分子が与えない 2000cm^{-1} 周辺での分子特異的な周波数を与える標識を化学合成したとともに、温和条件で外部刺激によって活性化した時にだけラマンシグナルを与えるような新しい発想の標識分子を創製した。最終的には、この機能性ラマン標識を用いて生体分子を標識して細胞内での分子挙動を観察した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research is to develop new labeling molecules for Raman bioimaging. Raman spectroscopy is one of the major candidates for gaining the multimodality of bioimaging. We chemically synthesized new labeling agents showing a specific wave number at 2000cm^{-1} , which is not cell-characteristic wave number. These labeling molecules exhibited the Raman signals only when the molecules are activated with external stimulation under a mild condition. Finally, we observed molecular behavior in cells after we labeled the cells with the functional Raman labels tethered to the target biomolecules.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ラマン分光 炭素-炭素三重結合 細胞イメージング 刺激応答性

1. 研究開始当初の背景

生体内解析を行う方法として、蛍光、MRI、PET、X線などがある。どの方法にも一長一短があり、将来的に生体分析のマルチモダリティを確保するためには、さらなる代替法が必要である。一つの大きな候補となりうるのが、ラマン分光法である。現在、装置の研究が物理学的側面から進められており、この1~2年のうちに感度・精度ともに上昇してきた。それによって、細胞丸ごとをラマン分光法でイメージングするような研究まで発展している。この観察では、近赤外光を用いるので、細胞透過性もよく、細胞に対するダメージも小さい。

しかし、現在の研究の力点が、生体そのものをラベルフリーで観察するところに置かれており、その次として特定の薬剤や生体分子のみを特異的に観察する試みまで進展していない。細胞を構成する分子が与えない 2000cm^{-1} 周辺での分子特異的な周波数を与える標識を探し出すことが急務である。最近では、アルキニル化(炭素-炭素三重結合)や重水素化($\text{C}-\text{D}$ 結合)を小分子に導入する方法が研究されはじめています。しかし、これらに新規の発想がなく、例えば生体内の特定部位に存在する分子だけを標識化する方法を持ち合わせていない。蛍光色素でも必要な時にだけ光るといったような機能性の高い色素が開発されているように、ラマンシグナル分子でも活性化した時にだけラマンシグナルを与えるような新しい発想の標識分子が求められている。

2. 研究の目的

本研究課題では、ラマン分光生体内解析を行うための新しい標識分子を開発することを目的とする。将来的に生体分析のマルチモダリティを確保するための一つの大きな候補となりうるのが、ラマン分光法である。 2000cm^{-1} 周辺での分子特異的な周波数を与える標識を化学合成するとともに、温和条件で外部刺激によって活性化した時にだけラマンシグナルを与えるような新しい発想の標識分子を創製する。最終的には、この機能性ラマン標識を用いて生体分子を標識して細胞内の分子観察や個体の中での分子挙動を観察する。

ラマンシグナルを与える標識の開発自体、世界に先駆けた研究である。そこに水中かつ温和な条件、つまり生体内で作用して炭素-炭素三重結合を与える標識を開発することは、バイオセンシングの分野だけでなく、有機化学的、生命化学的にも非常にインパクトのある画期的な研究になる。生体分析のマルチモダリティとしてラマン分光はまだ未開拓の領域であり、標識開発によって画期的な分析法へ展開できる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

- (1) 外部刺激に応答して炭素-炭素三重結合を生成する化学反応を見つけ出す。
- (2) この化学反応に必要な試薬(プロ標識剤)を開発し、実際の反応に即した温和な条件でシグナルを取り出すことができるか試験評価する。
- (3) 開発したプロ標識剤を用いて、生体分子に標識する。
- (4) 標識された分子を細胞内へ導入し、外部刺激によって活性化させてその効果を調べるとともに、当該分子の細胞内挙動を観察する。

4. 研究成果

(1) 薬剤に反応して炭素-炭素三重結合を生成する化学反応を見つけ出した。

通常炭素-炭素三重結合は、強塩基条件下での脱離反応を経て産生される。しかしながら、この方法は生理条件下で行うことができない。

研究代表者らは、ほぼ唯一温和条件下で炭素-炭素三重結合を生じる反応が、 β -ケトエポキシデカリンの分解反応が有効であることを見いだした。この反応は、アルコール溶媒中、トシルヒドラジドを加えることによって、アセチレン末端を含む分解化合物を生じた(図1)。また、水中でもこの反応が進行することを確認した。反応生成物がアセチレン末端を含むことを NMR 等で確認した。また、この生成物が、ラマン分光によって 2100cm^{-1} 近傍に炭素-炭素三重結合伸縮振動に典型的なラマンシグナルを有していることを確認した。

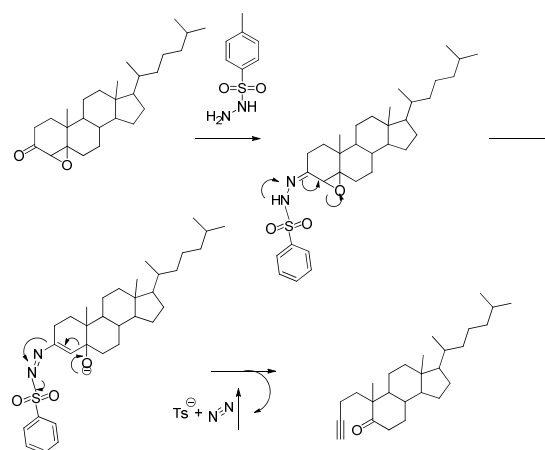


図1 β -ケトエポキシデカリン含有コレステロールからの炭素-炭素三重結合生成反応

(2) この化学反応に必要な試薬(プロ標識剤)を開発し、実際の反応に即した温和な条件でシグナルを取り出すことができるか試験評価した。

反応の鍵は、 β -ケトエポキシ基へのトシルヒドラジドの付加によるヒドラゾンの形成とそれに続くヒドラゾン上の脱プロトン化から始まる脱窒素過程を含む開環反応で

ある。したがって、トシルヒドラゾンを経外部刺激試薬とし、膜上において化学的に炭素炭素三重結合を得る方法を検討した。

-ケトエポキシデカリンを含むコレステロールを化学合成し、これをリポソームへ取り込ませた。ここへトシルヒドラジドを加えたところ、反応が進行した。反応が進行しているため、炭素炭素三重結合由来の 2100 cm^{-1} 近傍のシグナルがリポソーム膜上に観測され、これをラマンイメージングすることができた(図 2)。また、クリックケミストリーを介したアジド置換蛍光色素の標識を共焦点蛍光顕微鏡を通じた観測によって、膜に形成されたラフト構造を観察することができた。

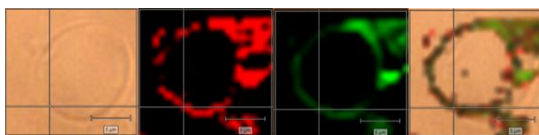


図 2 リポソーム膜上での炭素炭素三重結合生成とそれらに対する蛍光標識

(3) 開発したプロ標識剤を用いて、生体分子に標識した。

-ケトエポキシデカリンの光脱離基修飾ヒドラゾン誘導体を最適化・最小化し、これを新しい外部刺激誘導性ラマン分光素子(プロ標識剤)を得た(図 3)。そうした時に、これをリンカーを介してコレステロールに結合させると、膜をラマン標識、それも求めるときにだけ駆動する標識を導入することができた(図 4)。ここでもクリックケミストリーを介してアジド置換蛍光で標識して、膜ラフト構造を共焦点蛍光顕微鏡で観察することができた。

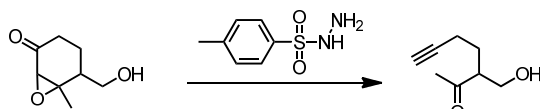


図 3 生体分子に結合可能な化学的活性化ラマン標識試薬とその反応

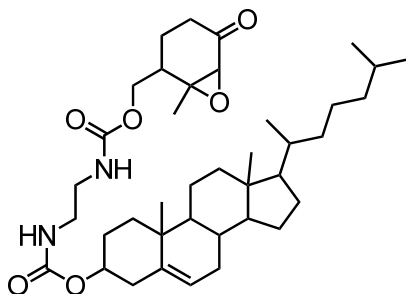


図 4 図 3 の分子をコレステロールに連結

(4) 標識された分子を細胞内へ導入し、外部刺激によって活性化させてその効果を調べるとともに、当該分子の細胞内挙動を観察した。

標識した生体分子をシクロデキストリン

を用いて細胞内へ導入した。細胞内の標識分子の挙動を炭素炭素三重結合由来の 2100 cm^{-1} 近傍のシグナルのラマンイメージングを通して観測した(図 5)。

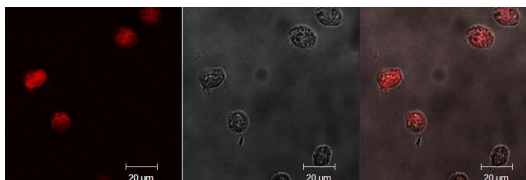


図 5 細胞内炭素炭素三重結合標識の細胞ラマンイメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

松下 卓、山口 哲志、池田 太郎、林剛介、岡本 晃充、「細胞内ラマンイメージングのためのコレステロールプローブの開発」、第 4 回 CSJ 化学フェスタ、東京、2014 年 10 月 14 日~16 日

浦 愛美、山口 哲志、岡本 晃充、「ラマンイメージングのための Turn-on 可能なプローブ分子の開発」、第 4 回 CSJ 化学フェスタ、東京、2014 年 10 月 14 日~16 日

浦 愛美、山口 哲志、岡本 晃充、「化学反応で活性化するアルキンタグを用いた生体分子の可視化」、日本化学会 第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日~29 日、船橋

松下 卓、山口 哲志、徳永 京也、小関 泰之、岡本 晃充、「ターンオン型コレステロールプローブの脂質二分子膜上でのラマンイメージング」、日本化学会 第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日~29 日、船橋

浦野 航、山口 哲志、岡本 晃充、「光活性化可能なラマンイメージングプローブの開発」、日本化学会 第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日~29 日、船橋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/okamoto/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 晃充 (OKAMOTO, Akimitsu)

東京大学・先端科学技術研究センター・教

授

研究者番号：60314233

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし