

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05725

研究課題名（和文）機能性ラマンプローブのための誘導ラマン散乱顕微鏡の最適化・高度化

研究課題名（英文）Optimization and sophistication of stimulated Raman microscope for functional Raman probes

研究代表者

小関 泰之（Ozeki, Yasuyuki）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・教授

研究者番号：60437374

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 36,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、本領域で創出する機能性ラマンプローブを用いた多重酵素イメージング・多重in vivoイメージング・多重超解像イメージングを実現するために、申請者が開発してきた高速誘導ラマン散乱イメージングシステムを最適化・高度化し、生物学応用を通じてこれらのイメージング手法の有用性を実証した。具体的には、神谷班が創出するactivatableラマンプローブの実証、市販フォトクロミック分子による光スイッチングラマンプローブの実証、神谷班が開発した高性能光スイッチングラマンプローブによる超解像イメージングの実証、小幡班との協働による重水素標識アミノ酸代謝イメージングの実証に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、分子の電子・分子振動の光応答を周囲環境や光照射によって制御するという新しい原理を用いた生体観察手法を創出するものです。これにより、生体内の多数の構成要素を同時に観察することが可能となり、複雑な生体の仕組みを解明する新しい手法を実現できました。本研究は、生物学や医学の様々な分野において生命の仕組みや病気の解明の研究に活用されることが期待できます。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have optimized and advanced the high-speed stimulated Raman scattering imaging system that we developed in order to achieve multiplex enzyme imaging, multiplex in vivo imaging, and multiplex-super-resolution imaging using the functional Raman probes created in this research field. Then we demonstrated the usefulness of these imaging methods through applications in biology. Specifically, we successfully demonstrated the use of activatable Raman probes created by the Kamiya team, demonstrated the photoswitchable Raman probes with commercially available photochromic molecules, demonstrated super-resolution imaging with high-performance photoswitchable Raman probes developed by Kamiya team, and demonstrated amino acid metabolic imaging with deuterium labeling in collaboration with Obata team.

研究分野：生体イメージング

キーワード：ラマンプローブ 誘導ラマン散乱 activatableプローブ 超解像イメージング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体内では、様々な生体分子が相互作用したり微細構造を形づくことで生命活動を維持しているため、生命現象を包括的に理解するためには、複数種類の生体分子を同時に観察することが重要である。蛍光イメージング法の発達により、特定の細胞小器官をイメージングしたり、イオンや生体分子の計測を行うことが可能になり、新しい生物学的知見を与えている。しかし、蛍光イメージングには「色数の壁」があり、同時観察可能な色数は4-5色程度に限られる。これは可視光のスペクトル幅(~250 nm)と蛍光スペクトル幅(~50 nm)で決まる原理的な制限である。

近年、蛍光イメージングの「色数の壁」を打破する技術として、ラマンプローブが開発された。ラマンプローブとは、炭素-炭素三重結合(アルキン基)、炭素-窒素三重結合(ニトリル基)、ボリンなどの官能基を有する分子である。これらのラマンスペクトル幅(~10 cm^{-1})は蛍光よりも圧倒的に狭く、また、分子振動周波数を同位体チューニングできることから、超多色イメージングへの応用が注目されている。

しかし、ラマンプローブによる多色イメージングには2つの課題がある。ひとつはイメージングに長時間を要し、生体の動態の計測が困難であること、もうひとつは、“Always on”型のプローブであり、その用途は特定の細胞小器官のラベル化に限られていることである。

1つ目の課題に関しては、申請者の小関が開発した高速波長可変パルスレーザーを活用するSRS イメージングシステムを用いることで、リアルタイムイメージングを実現できる見込みを得ている。実際、4色のラマンプローブと4色の蛍光染色による8色イメージングを30秒で完了できることを実証済みである。従来報告のイメージング時間(15分)と比較してイメージング速度が30倍高速化されている。

2つ目の課題に関して、ラマンプローブはプローブの分子振動の光に対する応答をシグナルとして検出するものであり、分子振動をon/offすることは極めて困難である。これに対し、領域代表者の神谷は、蛍光プローブ設計の知見と経験を駆使して、プローブ分子の電子共鳴波長制御によってラマン信号のon/offを実現するactivatable ラマンプローブを創出し、小関との基礎検討を通じ、細胞内の複数の酵素活性をプローブすることに成功している。また、本プローブは、前期共鳴ラマンによる信号増強を活用するため、ラマンプローブとしては極めて高い検出感度($< \mu\text{M}$)を有する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、本領域で創出する機能性ラマンプローブを用いた多重酵素イメージング・多重 *in vivo* イメージング・多重超解像イメージングを実現するために、申請者が開発してきた高速SRS イメージングシステムを最適化・高度化し、生物学応用を通じてこれらのイメージング手法の有用性を実証することである。

3. 研究の方法

神谷班が開発した機能性ラマンプローブ分子の性能を最大限に活用するための高速・多色・超解像ラマン顕微鏡を小関班が開発し、小幡班との連携によって生体解析に適用してその有効性を実証した。

4. 研究成果

4.1 Activatable ラマンプローブの実証

小関班のSRS顕微鏡を用い、神谷班が開発した9CN-JCPを母核とするactivatable ラマンプローブの計測を神谷班と共同で行った。本プローブは、4つの酵素を標的として、酵素反応後に電子共鳴波長が長波長化することで前期共鳴条件を満たし9位のニトリル基由来のラマン応答が増強される。また、そのラマン周波数をCやNの同位体置換でチューニングしておくことで、異なる分子振動周波数の信号として酵素反応をセンシングできる。本プローブを細胞に投与し、4種の酵素活性の多重センシングに成功した(J. Am. Chem. Soc. **142**, 20701 (2020))。

さらに、本プローブの細胞内滞留性を高め、ヘテロな組織における酵素発現領域を特異的に可視化することを目的として神谷班が開発した9CN-JCRベースの凝集性ラマンプローブの原理確認も行った。小幡班との連携により、本プローブを用いて、ショウジョウバエ中の酵素発現領域のみを可視化することに成功した(J. Am. Chem. Soc. 2023, in press)。

また、Teを導入したローダミン誘導体を用いることで、赤色光照射による光酸化でSRS信号強度が増強する光activatable型ラマンプローブの実証実験も行った(Chem. Asian J. **18**, e202201086 (2023))。

4.2 光スイッチングラマンプローブの実証

超解像イメージングや光マーキング等への応用を狙い、光照射によってラマン応答が変化する光スイッチングラマンプローブの実証を行った。具体的には、市販のフォトクロミック分子であるCMTEへ紫外光もしくは緑色光を照射することで、ラマン応答が溶液中あるいは細胞中で

も on/off できることを確認した(Opt. Lett. **46**, 2176 (2021))。

4.3 光スイッチングラマンプローブによる超解像イメージング

光スイッチングラマンプローブに対し、紫外光を集光照射して特定箇所の分子のラマン信号を on にするとともに、可視光のドーナツビームを照射することで周辺のラマン信号を off にし、プローブの SRS 検出を行うことで、超解像イメージングが実現できる。本イメージング法を実証するため、紫外光および可視光ドーナツビームの照射系を SRS 顕微鏡に導入した。ドーナツビームは空間光変調器で生成した。本システムを用い、神谷班が開発した信号強度の高い光スイッチングラマンプローブである DAE620 の特性評価を行い、良好なスイッチング特性を確認した。さらに、ミトコンドリア標識の可能なプローブ DAE620-mito を用いてミトコンドリアを染色し超解像イメージングを行うことに成功した。さらに、本手法の空間分解能を見積もるために、電子線レジストに DAE620 をドープして電子線露光・現像によりパターンニングを行い、その超解像イメージングを行い、100 nm 程度の空間分解能を実現できることを確認した(accepted)。

4.4 重水素標識によるアミノ酸代謝イメージング

小幡班と連携して、重水素標識による単一アミノ酸の代謝イメージング実験に取り組んだ。具体的には、重水素化メチオニン³を HeLa 細胞に取り込ませ、取り込み量を定量評価できることや、従来のメチオニンアナログである HPG よりも細胞活動への影響が少ないことを実証した(J. Phys. Chem. B **126**, 1633 (2022))。

さらに、重水素化メチオニンをショウジョウバエの餌に混ぜて投与することで、メチオニンが様々な組織に代謝されることや、その分布が幹細胞やリソソームに局在するなど空間的に不均一な分布を示すことを見出した(Front. Chem. **11**, 1141920 (2023))。

このような重水素標識による単一アミノ酸の検出技術は、アミノ酸相互作用やアミノ酸トランスポーターなどの研究に有用であると期待される。

4.5 ラマンプローブのためのレーザー光源の開発

ラマンプローブの実用性を高める上で、SRS 顕微鏡そのものの実用性向上と、波長の最適化が重要である。特に、現状の SRS 顕微鏡システムは大型のレーザーシステムを用いる必要がある上、ポンプ光波長が 843 nm と近赤外領域にあるため、分子設計が難しい。一方、実用性の高いレーザー光源であるファイバーレーザーは、強度雑音が大きいため SRS 顕微鏡への適用には技術的ハードルがある上、波長可変範囲が光増幅ファイバーの利得波長帯域で制限される。

これらの技術的ハードルを打開するため、低雑音ファイバーレーザー(Opt. Express **29**, 11702 (2021), Jpn. J. Appl. Phys. **60**, 080902 (2021), Jpn. J. Appl. Phys. **61**, 080905 (2022))と、光ファイバパラメトリック増幅器による広帯域波長可変光源(Photon. Technol. Lett. **34**, 1293 (2022))の開発を進めた。これらの光源を SRS 顕微鏡に導入することで、SRS 顕微鏡の実用性向上および短波長励起による SRS 観察が実現できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fujioka Hiroyoshi, Kawatani Minoru, Spratt Spencer John, Komazawa Ayumi, Misawa Yoshihiro, Shou Jingwen, Mizuguchi Takaha, Kosakamoto Hina, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako	4. 巻 145
2. 論文標題 Activatable Raman Probes Utilizing Enzyme-Induced Aggregate Formation for Selective <i>Ex Vivo</i> Imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 8871-8881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c12381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Akaboshi Hikaru, Kosakamoto Hina, Okada Rina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Imaging the uptake of deuterated methionine in Drosophila with stimulated Raman scattering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 1141920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fchem.2023.1141920	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sawama Yoshinari, Matsuda Takumi, Moriyama Shogo, Ban Kazuho, Fujioka Hiroyoshi, Kamiya Mako, Shou Jingwen, Ozeki Yasuyuki, Akai Shuji, Sajiki Hironao	4. 巻 12
2. 論文標題 Unprecedented Regioselective Deuterium Incorporation of Alkyltrimethylammonium Chlorides and Raman Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Asian Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 e202200710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajoc.202200710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawatani Minoru, Spratt Spencer J., Fujioka Hiroyoshi, Shou Jingwen, Misawa Yoshihiro, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako	4. 巻 18
2. 論文標題 9 Cyano 10 telluriumpyronin Derivatives as Red light activatable Raman Probes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry - An Asian Journal	6. 最初と最後の頁 e202201086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.202201086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi Shun, Shou Jingwen, Dai Gaoyu, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Fiber Optical Parametric Oscillator With Wide Tuning Range and Fixed Repetition Rate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEE Photonics Technology Letters	6. 最初と最後の頁 1293-1296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/LPT.2022.3212706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Dai Gaoyu, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 61
2. 論文標題 All-fiber polarization-maintaining system for noise suppression and signal amplification of picosecond pulses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 080905 ~ 080905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac825d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shou Jingwen, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Photoswitchable stimulated Raman scattering spectroscopy and microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 2176 ~ 2176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OL.418240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shou Jingwen, Oda Robert, Hu Fanghao, Karasawa Keiko, Nuriya Mutsuo, Yasui Masato, Shiramizu Bruce, Min Wei, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Super-multiplex imaging of cellular dynamics and heterogeneity by integrated stimulated Raman and fluorescence microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102832 ~ 102832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Dai Gaoyu, Goh Chee Seong, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 60
2. 論文標題 Low-intensity-noise wavelength-tunable picosecond Yb fiber laser	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 080902 ~ 080902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac17db	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Spratt Spencer J., Oguchi Kenichi, Miura Keisuke, Asanuma Masato, Kosakamoto Hina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki	4. 巻 126
2. 論文標題 Probing Methionine Uptake in Live Cells by Deuterium Labeling and Stimulated Raman Scattering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1633 ~ 1639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.1c08343	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 H. Fujioka, J. Shou, R. Kojima, Y. Urano, Y. Ozeki, and M. Kamiya	4. 巻 142
2. 論文標題 Multicolor activatable Raman probes for simultaneous detection of plural enzyme activities	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 20701-20707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c09200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 J. Shou and Y. Ozeki	4. 巻 -
2. 論文標題 Photoswitchable stimulated Raman scattering spectroscopy and microscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Optics Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OL.418240	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 G. Dai, K. Katoh, and Y. Ozeki	4. 巻 29
2. 論文標題 Reduction of excess intensity noise of picosecond Yb soliton fiber lasers in a >10-mW power regime	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Opt. Express	6. 最初と最後の頁 11702-11711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OE.422846	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件 (うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 小関泰之、スペンサー・ジョンズプラット、小幡史明
2. 発表標題 重水素化アミノ酸によるラマン代謝イメージング
3. 学会等名 第143回日本薬学会年次大会、S59-03、北海道大学、2023年3月28日。(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋俊、小関泰之
2. 発表標題 広帯域波長可変ファイバ光パラメトリック発振器の高出力化
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会、18a-A501-4、2023年3月18日。
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小関泰之
2. 発表標題 誘導ラマン散乱顕微法のための低雑音/高機能パルスファイバーレーザーの開発
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第43回年次大会、S06-18p-V-07、2023年1月18日。(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小関泰之
2. 発表標題 誘導ラマン散乱顕微法による超多重イメージングおよび代謝イメージング
3. 学会等名 日本分子生物学会、3AW-11-3、幕張メッセ、2022年12月2日。(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小関泰之
2. 発表標題 誘導ラマン散乱顕微法のためのパルスファイバレーザ
3. 学会等名 レーザー学会第570回研究会「次世代ファイバレーザ技術」、名古屋大学、2022年11月18日。(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Spencer John Spratt, Kenichi Oguchi, Hina Kosakamoto, Fumiaki Obata, Yasuyuki Ozeki
2. 発表標題 Probing Methionine Uptake in Live Cells and Tissue by Deuterium Labelling and Stimulated Raman Scattering
3. 学会等名 The 83rd JSAP Autumn Meeting, 20p-C301-11, September 20, 2022.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 俊、寿 景文、戴 高宇、小関 泰之
2. 発表標題 広帯域波長可変ピコ秒ファイバ光パラメトリック発振器の構築
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会、22p-C206-8、2022年9月22日。
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Ozeki
2. 発表標題 High-speed multicolor stimulated Raman microscopy
3. 学会等名 International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2022), NEWT-1-1, Long Beach, Aug. 15, 2022. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Ozeki
2. 発表標題 Multicolor stimulated Raman scattering microscopy -Technologies and applications-
3. 学会等名 Sixteenth Annual Chautauqua on Nonlinear Optics, Purdue University, June 30, 2021. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Ozeki
2. 発表標題 Multicolor imaging with stimulated Raman scattering
3. 学会等名 International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS11), Session 1.2.2 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小関泰之
2. 発表標題 「誘導ラマン散乱顕微法の発展とその応用」
3. 学会等名 光エレクトロニクス産学連携研究専門委員会研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Ozeki
2. 発表標題 High-speed multicolor stimulated Raman imaging
3. 学会等名 Photonics West on demand, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine, paper 1197305 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Ozeki
2. 発表標題 Multicolor stimulated Raman scattering microscopy and its applications
3. 学会等名 Photonics West on demand, Biomedical Vibrational Spectroscopy 2022: Advances in Research and Industry, paper 1195709 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 J. Shou and Y. Ozeki
2. 発表標題 Photoswitchable stimulated Raman scattering spectroscopy and microscopy
3. 学会等名 Photonics West on demand, Biomedical Vibrational Spectroscopy 2022: Advances in Research and Industry, paper 119570A (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Ji-Xin Cheng, Wei Min, Yasuyuki Ozeki, Dario Polli	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 610
3. 書名 Stimulated Raman Scattering Microscopy -Techniques and Applications-	

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------