

領域略称名：革新ラマン

領域番号：20B201

科学研究費助成事業「学術変革領域研究（B）」  
に係る研究成果報告書

「機能性ラマンプローブによる  
革新的多重イメージング」

領域設定期間

令和2年度～令和4年度

令和5年6月

領域代表者 東京工業大学・生命理工学院・教授・神谷 真子

## 目次

1	研究組織	3
2	交付決定額	4
3	研究領域の目的	5
4	研究発表	6
5	研究成果	14

## 1. 研究組織

### ■総括班■

課題番号：20H05723

課題名：機能性ラマンプローブによる革新的多重イメージング

研究代表者 神谷 真子（東京工業大学・生命理工学院・教授）

研究分担者 小関 泰之（東京大学・先端科学技術研究センター・教授）

研究分担者 小幡 史明（理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー）

### ■計画研究■

（A01 班）

課題番号：20H05724

課題名：革新的多重イメージングに資する機能性ラマンプローブの開発

研究代表者：神谷 真子（東京工業大学・生命理工学院・教授）

（A02 班）

課題番号：20H05725

課題名：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

研究代表者：小関 泰之（東京大学・先端科学技術研究センター・教授）

（A03 班）

課題番号：20H05726

課題名：革新的多重イメージングによる組織複雑化過程の可視化

研究代表者：小幡 史明（理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー）

## 2. 交付決定額（配分額）

全体

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	55,770千円	42,900千円	12,870千円
令和3年度	51,090千円	39,300千円	11,790千円
令和4年度	51,090千円	39,300千円	11,790千円
総計	157,950千円	121,500千円	36,450千円

(総括班)

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	3,120千円	2,400千円	720千円
令和3年度	2,730千円	2,100千円	630千円
令和4年度	2,730千円	2,100千円	630千円
総計	8,580千円	6,600千円	1,980千円

(A01班)

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	24,700千円	19,000千円	5,700千円
令和3年度	22,620千円	17,400千円	5,220千円
令和4年度	22,620千円	17,400千円	5,220千円
総計	69,940千円	53,800千円	16,140千円

(A02班)

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	16,770千円	12,900千円	3,870千円
令和3年度	15,470千円	11,900千円	3,570千円
令和4年度	15,470千円	11,900千円	3,570千円
総計	47,710千円	36,700千円	11,010千円

(A03班)

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	11,180千円	8,600千円	2,580千円
令和3年度	10,270千円	7,900千円	2,370千円
令和4年度	10,270千円	7,900千円	2,370千円
総計	31,720千円	24,400千円	7,320千円

### 3. 研究領域の目的

ラマン顕微法は近年、無染色または微小アルキンタグを用いた生体分子の可視化、多重標識タグを用いた多色イメージングなどで注目を集めている。ラマン信号を精密に制御し、生体機能を可視化するラマンプローブを開発することができれば、生体解析ツールとしてのラマンイメージングの有用性が飛躍的に向上すると期待されるが、このようなラマンプローブの開発例は限られており、汎用的な分子設計法も確立していなかった。このような機能性ラマンプローブを開発しその実用性を評価してゆくためには、ラマンプローブを開発するケミカルバイオロジー分野の研究者と、ラマン顕微鏡を開発する光学分野の研究者、ラマンプローブの性能を評価する生物学分野の研究者が有機的に連携して進めていく必要があった。そこで、本領域は、化学・工学・生物の専門分野が異なる研究者が連携することにより、新しい融合領域研究を推進し、従来法を凌駕するラマンイメージング技術の確立を目的とした。

#### 4. 研究発表

##### ■雑誌論文

(A01 班)

1. Fujioka Hiroyoshi, Shou Jingwen, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako, Multicolor Activatable Raman Probes for Simultaneous Detection of Plural Enzyme Activities, *J. Am. Chem. Soc.*, 査読有, 142, 2020 年, 20701-20707
2. Iwaki Hirohisa, Kamiya Mako, Kawatani Minoru, Kojima Ryosuke, Yamasoba Tatsuya, Urano Yasuteru, Fluorescence Probes for Imaging Basic Carboxypeptidase Activity in Living Cells with High Intracellular Retention, *Analytical Chemistry*, 査読有, 93, 2021 年, 3470-3476
3. Takahashi Hironori, Kamiya Mako, Kawatani Minoru, Umezawa Keitaro, Ukita Yoshiaki, Niwa Shinsuke, Oda Toshiyuki, Urano Yasuteru, Neural and behavioral control in *Caenorhabditis elegans* by a yellow-light-activatable caged compound, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読有, 2021 年, 118, e2009634118
4. 藤岡 礼任, 神谷 真子, 複数の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, *ファルマシア*, 査読有, 57, 2021 年, 480-484
5. Kashima Hiroki, Kamiya Mako, Obata Fumiaki, Kojima Ryosuke, Nakano Shotaro, Miura Masayuki, Urano Yasuteru, Photoactivatable fluorophores for durable labelling of individual cells, *Chemical Communications*, 査読有, 57, 2021 年, 5802-5805
6. 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, Activatable Raman Probes Utilizing Enzyme-Induced Aggregate Formation for Selective Ex Vivo Imaging, *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, 145, 2023 年, 8871-8881
7. Sawama Yoshinari, Matsuda Takumi, Moriyama Shogo, Ban Kazuho, Fujioka Hiroyoshi, Kamiya Mako, Shou Jingwen, Ozeki Yasuyuki, Akai Shuji, Sajiki Hironao, Unprecedented Regioselective Deuterium - Incorporation of Alkyltrimethylammonium Chlorides and Raman Analysis, *Asian Journal of Organic Chemistry*, 査読有, 12, 2023 年, e202200710
8. Kawatani Minoru, Spratt Spencer J., Fujioka Hiroyoshi, Shou Jingwen, Misawa Yoshihiro, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako, 9 - Cyano - 10 - telluriumpyronin Derivatives as Red - light - activatable Raman Probes, *Chemistry An Asian Journal*, 査読有, 18, 2023 年, e202201086
9. Imai Keisuke, Tomita Naohito, Fujioka Hiroyoshi, Kamiya Mako, Ogasahara Riku, Ban Kazuho, Shimizu Hyoga, Ishimoto Takayoshi, Sajiki Hironao, Akai Shuji, Sawama Yoshinari, Homemade Solution of NaOD in D<sub>2</sub>O: Applications in the Field of Stilbene - d<sub>1</sub> Synthesis,

Asian Journal of Organic Chemistry、査読有、12、2023 年、e202200690

10. Shou Jingwen, Komazawa Ayumi, Wachi Yuusaku, Kawatani Minoru, Fujioka Hiroyoshi, Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Oguchi Kenichi, Obata Fumiaki, Tachibana Ryo, Yasunaga Shun, Mita Yoshio, Misawa Yoshihiro, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Kamiya Mako, Ozeki Yasuyuki, Super-resolution vibrational imaging based on photoswitchable Raman probe, Science Advances、査読あり、2023 年、in press. doi://10.1126/sciadv.ade9118.

(A02 班)

1. Fujioka Hiroyoshi, Shou Jingwen, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako, Multicolor Activatable Raman Probes for Simultaneous Detection of Plural Enzyme Activities, J. Am. Chem. Soc., 査読有、142、2020 年、20701-20707
2. G. Dai, K. Katoh, and Y. Ozeki, Reduction of excess intensity noise of picosecond Yb soliton fiber lasers in a >10-mW power regime, Opt. Express、査読有、29、2021 年、11702-11711
3. Dai Gaoyu, Goh Chee Seong, Ozeki Yasuyuki, Low-intensity-noise wavelength-tunable picosecond Yb fiber laser, Japanese Journal of Applied Physics、査読有、60、2021 年、080902-080902
4. Shou Jingwen, Oda Robert, Hu Fanghao, Karasawa Keiko, Nuriya Mutsuo, Yasui Masato, Shiramizu Bruce, Min Wei, Ozeki Yasuyuki, Super-multiplex imaging of cellular dynamics and heterogeneity by integrated stimulated Raman and fluorescence microscopy, iScience、査読有、24、2021 年、102832-102832
5. Shou Jingwen, Ozeki Yasuyuki, Photoswitchable stimulated Raman scattering spectroscopy and microscopy, Optics Letters、査読有、46、2021 年、2176-2176
6. Spratt Spencer J., Oguchi Kenichi, Miura Keisuke, Asanuma Masato, Kosakamoto Hina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki, Probing Methionine Uptake in Live Cells by Deuterium Labeling and Stimulated Raman Scattering, The Journal of Physical Chemistry B、査読有、126、2022 年、1633-1639
7. Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Akaboshi Hikaru, Kosakamoto Hina, Okada Rina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki, Imaging the uptake of deuterated methionine in Drosophila with stimulated Raman scattering, Frontiers in Chemistry、査読有、11、2023 年、1141920
8. 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, Activatable Raman Probes Utilizing Enzyme-Induced Aggregate Formation for Selective Ex Vivo Imaging, Journal of the American Chemical Society、査読有、145、2023 年、8871-8881
9. Sawama Yoshinari, Matsuda Takumi, Moriyama Shogo, Ban Kazuho, Fujioka Hiroyoshi, Kamiya Mako, Shou Jingwen, Ozeki Yasuyuki, Akai Shuji, Sajiki Hironao, Unprecedented

Regioselective Deuterium - Incorporation of Alkyltrimethylammonium Chlorides and Raman Analysis, *Asian Journal of Organic Chemistry*, 査読有、12、2023 年、e202200710  
10. Kawatani Minoru, Spratt Spencer J., Fujioka Hiroyoshi, Shou Jingwen, Misawa Yoshihiro, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Ozeki Yasuyuki, Kamiya Mako, 9 - Cyano - 10 - telluriumpyronin Derivatives as Red - light - activatable Raman Probes, *Chemistry An Asian Journal*, 査読有、18、2023 年、e202201086

11. Shou Jingwen, Komazawa Ayumi, Wachi Yuusaku, Kawatani Minoru, Fujioka Hiroyoshi, Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Oguchi Kenichi, Obata Fumiaki, Tachibana Ryo, Yasunaga Shun, Mita Yoshio, Misawa Yoshihiro, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Kamiya Mako, Ozeki Yasuyuki, Super-resolution vibrational imaging based on photoswitchable Raman probe, *Science Advances*, 査読あり、2023 年、in press. doi://10.1126/sciadv.ade9118.

(A03 班)

1. Kashima Hiroki, Kamiya Mako, Obata Fumiaki, Kojima Ryosuke, Nakano Shotaro, Miura Masayuki, Urano Yasuteru, Photoactivatable fluorophores for durable labelling of individual cells, *Chemical Communications*, 査読有、57、2021 年、5802-5805

2. Yamashita Kyoko, Oi Ayano, Kosakamoto Hina, Yamauchi Toshitaka, Kadoguchi Hibiki, Kuraishi Takayuki, Miura Masayuki, Obata Fumiaki, Activation of innate immunity during development induces unresolved dysbiotic inflammatory gut and shortens lifespan, *Disease Models and Mechanisms*, 査読有、14、2021 年、049103-049103

3. Spratt Spencer J., Oguchi Kenichi, Miura Keisuke, Asanuma Masato, Kosakamoto Hina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki, Probing Methionine Uptake in Live Cells by Deuterium Labeling and Stimulated Raman Scattering, *The Journal of Physical Chemistry B*, 査読有、126、2022 年、1633-1639.

4. Kosakamoto Hina, Okamoto Naoki, Aikawa Hide, Sugiura Yuki, Suematsu Makoto, Niwa Ryusuke, Miura Masayuki, Obata Fumiaki, Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to protein restriction in *Drosophila*, *Nature Metabolism*, 査読有、4、2022 年、944~959

5. Onuma Taro, Yamauchi Toshitaka, Kosakamoto Hina, Kadoguchi Hibiki, Kuraishi Takayuki, Murakami Takumi, Mori Hiroshi, Miura Masayuki, Obata Fumiaki, Recognition of commensal bacterial peptidoglycans defines *Drosophila* gut homeostasis and lifespan, *PLOS Genetics*, 査読有、19、2023 年、e1010709

6. 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, Activatable Raman Probes Utilizing Enzyme-Induced Aggregate Formation for Selective Ex Vivo Imaging, *Journal of the*



American Chemical Society、査読有、145、2023 年、8871–8881

7. Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Akaboshi Hikaru, Kosakamoto Hina, Okada Rina, Obata Fumiaki, Ozeki Yasuyuki, Imaging the uptake of deuterated methionine in *Drosophila* with stimulated Raman scattering, *Frontiers in Chemistry*, 査読有、11、2023 年、1141920

8. Shou Jingwen, Komazawa Ayumi, Wachi Yuusaku, Kawatani Minoru, Fujioka Hiroyoshi, Spratt Spencer J., Mizuguchi Takaha, Oguchi Kenichi, Obata Fumiaki, Tachibana Ryo, Yasunaga Shun, Mita Yoshio, Misawa Yoshihiro, Kojima Ryosuke, Urano Yasuteru, Kamiya Mako, Ozeki Yasuyuki, Super-resolution vibrational imaging based on photoswitchable Raman probe, *Science Advances*, 査読あり、2023 年、in press. doi://10.1126/sciadv.ade9118.

#### ■学会発表

(A01 班)

1. 鹿島大幹、神谷真子、浦野泰照、単一細胞標識を目指した新規細胞内滞留性ケージド蛍光団の開発、第 20 回生命科学シンポジウム、2020 年

2. 藤岡 礼任, 神谷 真子, 寿 景文, 飯野 敬矩, 小関泰之, 浦野 泰照、酵素活性を標的とした activatable 型ラマンプローブの開発、第 20 回東京大学生命科学シンポジウム、2020 年

3. 神谷 真子、オリジナル化学プローブの開発による生体分子イメージング、第 12 回光塾、2020 年

4. 藤岡礼任、神谷真子、寿景文、小関泰之、浦野 泰照、複数酵素活性の同時検出が可能な activatable 型ラマンプローブ、第 101 回日本化学会春季年会、2021 年

5. Mako Kamiya, Activatable Chemical Probes for Fluorescence Imaging of Cancer and Multicolor Raman Imaging of Plural Enzyme Activities, *Focus on Microscopy 2021*, 2021 年

6. 河谷稔、神谷真子、岩城弘尚、山本恭子、浦野泰照、がんのカルボキシペプチダーゼ活性を検出する activatable 型蛍光プローブ、日本ケミカルバイオロジー学会第 15 回年会、2021 年

7. Hiroki Kashima, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, Photoactivatable fluorophores for durable labelling of individual cells, *Pacificchem 2021*, 2021 年

8. Mako Kamiya, Multicolor activatable Raman probes for simultaneous detection of plural enzyme activities, *PacificChem2021*, 2021 年

9. 神谷真子、オリジナル化学プローブの創製による生体分子イメージング、第 38 回医用高分子講座、2021 年

10. 神谷真子、酵素活性を標的としたオリジナル化学プローブの創製による生体分子イメージング、酵素工学会第 86 回講演会、2021

11. Mako Kamiya, Multicolor Activatable Raman Probes for Simultaneous Detection of Plural Enzyme Activities, *IUPAC2021*, 2021 年

12. 神谷真子、酵素活性の多重検出に資する activatable 型ラマンプローブの開発、FIBER

核酸化学若手フォーラム、2021 年

13. 神谷真子、オリジナル化学プローブの開発による生体分子イメージング、Q コロキウム、2021 年

14. Minoru Kawatani, Mako Kamiya, Hirohisa Iwaki, Kyoko Yamamoto, Yasuteru Urano, Development of activatable fluorescence probe for carboxypeptidase activity to visualize cancer、日本化学会 第 102 春季年会、2022 年

15. 駒沢歩弥、寿景文、浦野泰照、小関泰之、神谷真子、多重検出に資する新規 photoswitchable 型ラマンプローブの開発、日本薬学会第 142 年会、2022 年

16. 藤岡礼任、寿景文、浦野泰照、小関泰之、神谷真子、糖加水分解酵素を検出する O-function 型 activatable ラマンプローブの開発、日本薬学会第 142 年会、2022 年

17. 神谷真子、酵素活性の多重検出に資する activatable 型ラマンプローブの開発、日本薬学会第 142 年会、2022 年

18. Mako Kamiya, Multicolor activatable Raman probes for simultaneous detection of plural enzyme activities、日本化学会 第 102 春季年会 アジア国際シンポジウム、2022 年

19. Mako Kamiya, Activatable Chemical Probes for Fluorescence Imaging of Cancer and Multicolor Raman Imaging of Plural Enzyme Activities、SPIRITSsymposium2022、2022 年

20. 神谷真子、化学プローブの精密設計によるバイオイメージング、神戸大学次世代光散乱イメージング科学研究センターキックオフシンポジウム、2022 年

21. 神谷真子、化学プローブの精密設計に基づく生体分子イメージング、第 5 回 Deut-Switch セミナー・SPIRITS セミナー、2022 年

22. 神谷真子、Activatable 型ラマンプローブの精密設計による生体分子イメージング、タタバイオ分子クラブ、2022 年

23. 神谷真子、機能性ラマンプローブの開発によるバイオイメージング、メタルバイオサイエンス研究会、2022 年

24. Mako Kamiya, Activatable Raman probes for multiplexed imaging of enzyme activities in tissues、The Chinese Society of Biochemistry and Molecular Biology、2022 年

25. 神谷真子、機能性ラマンプローブの開発による生体多重イメージング、第 45 回日本分子生物学会年会、2022 年

26. Mako Kamiya, Activatable Raman probes for multiplexed imaging of enzyme activities in tissues、SPIE BiOS 2023、2023 年

27. 神谷真子、オリジナルラマンプローブによる高精度・多重イメージング、日本薬剤学会物性 FG セミナー、2023 年

28. Mako Kamiya, Activatable Raman probes for multiplexed imaging of enzyme activities in tissues、日本生理学会第 100 回記念大会、2023 年

29. 神谷真子、凝集体形成を利用した Activatable 型ラマンプローブによる酵素活性イメージング、日本薬学会 第 143 年会、2023 年

30. 神谷真子、光スイッチングラマンプローブの開発 による高精度イメージング、日本薬学会 第 143 年会、2023 年

(A02 班)

1. 小関泰之、「誘導ラマン散乱顕微法の発展とその応用」、光エレクトロニクス産学連携研究専門委員会研究会、2021 年
2. Y. Ozeki、Multicolor imaging with stimulated Raman scattering、International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS11), Session 1.2.2、2021 年
3. Y. Ozeki、Multicolor stimulated Raman scattering microscopy -Technologies and applications-、Sixteenth Annual Chautauqua on Nonlinear Optics, Purdue University, June 30, 2021.、2021 年
4. J. Shou and Y. Ozeki、Photoswitchable stimulated Raman scattering spectroscopy and microscopy、Photonics West on demand, Biomedical Vibrational Spectroscopy 2022: Advances in Research and Industry, paper 119570A、2022 年
5. Y. Ozeki、Multicolor stimulated Raman scattering microscopy and its applications、Photonics West on demand, Biomedical Vibrational Spectroscopy 2022: Advances in Research and Industry, paper 1195709、2022 年
6. Y. Ozeki、High-speed multicolor stimulated Raman imaging、Photonics West on demand, Photonics West on demand, Advanced Chemical Microscopy for Life Science and Translational Medicine, paper 1197305、2022 年
7. Y. Ozeki、High-speed multicolor stimulated Raman microscopy、International Conference on Raman Spectroscopy (ICORS2022)、2022 年
8. Spencer John Spratt, Kenichi Oguchi, Hina Kosakamoto, Fumiaki Obata, Yasuyuki Ozeki、The 83rd JSAP Autumn Meeting、2022 年
9. 小関泰之、誘導ラマン散乱顕微法のためのパルスファイバレーザ、レーザー学会第 570 回研究会「次世代ファイバレーザ技術」、2022 年
10. 小関泰之、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、日本分子生物学会、2022 年
11. 小関泰之、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レーザの開発、レーザー学会学術講演会第 43 回年次大会、2023 年
12. 小関泰之、スペンサージョンスプラット、小幡史明、重水素化アミノ酸によるラマン代謝イメージング、第 143 回日本薬学会年次大会、2023 年

(A03 班)

1. 小幡史明、三浦正幸、腸内細菌によるショウジョウバエ寿命制御基盤、第 65 回日本薬学会関東支部大会、2021 年

2. 小幡史明、ショウジョウバエ遺伝学で明らかになる栄養応答基盤、日本農芸化学会 2022 年度大会、2022 年
3. Fumiaki Obata、Early-life experiences impact Drosophila lifespan via gut microbiota、New Voices in Infection Biology at Max Planck Institute for Infection Biology、2022 年
4. Ayano Oi, Fumiaki Obata、Developmental immune activation alters adult fitness and lifespan in Drosophila、55th Annual Meeting of the JSDB、2022 年
5. 大井綾乃, 三浦正幸, 小幡史明、ショウジョウバエを用いた炎症性細胞死メカニズムの探索、第 30 回日本 Cell Death 学会学術集会、2022 年
6. 小幡史明、ショウジョウバエで解く早期ストレスに対する適用とその長期的影響、放射線影響学会第 65 回大会、2022 年
7. 小幡史明、アミノ酸が支配する個体栄養応答、名古屋市立大学若手イブニングセミナー、2022 年
8. Fumiaki Obata, Hina Kosakamoto、Specific responses to amino acid restriction in Drosophila、19th International Congress of Developmental Biology、2022 年
9. Fumiaki Obata、The function of Gmmt and dietary methionine in ageing、Special Symposium on GNMT and anti-aging、2023 年
10. Fumiaki Obata、Specific sensing of dietary amino acids in Drosophila ageing and metabolism、Symposium for Sensory and Circadian Biology、2023 年

■図書

(A02 班)

1. Ji-Xin Cheng, Wei Min, Yasuyuki Ozeki, Dario Polli、Elsevier、Stimulated Raman Scattering Microscopy -Techniques and Applications-、2021 年、610

■産業財産権

(A01 班)

1. 神谷真子、村尾侑大、藤岡礼任、河谷稔、— S H 基含有化合物検出型ラマンプローブ、特許・特願 2023-34848、国立大学法人東京工業大学、2023 年
2. 浦野泰照、沖中桃子、藤岡礼任、小関泰之、SPRATT SPENCER JOHN、河谷稔、神谷真子ら、凝集誘起増強型ラマンプローブ又は蛍光プローブ、特許・特願 2023- 32292、国立大学法人東京大学・国立大学法人東京工業大学、2023 年
3. 浦野泰照、神谷真子、藤岡礼任、駒沢歩弥、小関泰之、寿景文、DEVELOPMENT OF O-FUNCTIONAL ACTIVATABLE RAMAN IMAGING PROBE、特許・PCT/JP2023/7813、国立大学法人東京大学、2023 年
4. 浦野泰照、神谷真子、藤岡礼任、小関泰之、寿景文、Activatable 型ラマンプローブ、特許・PCT/JP2021/006189、国立大学法人東京大学、2021 年

【参考 URL】

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-20H05724/>

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-20H05725/>

<https://kaken.nii.ac.jp/ja/grant/KAKENHI-PLANNED-20H05726/>

## 5. 研究成果

本領域では、専門分野が異なる 3 班が密に連携し、新たな機能性ラマンイメージングプローブ群の開発 (A01 班)、高速・多色ラマン分光顕微鏡の最適化と高度化 (A02 班)、開発した技術を用いた生物応用 (A03 班) に取り組み、ラマン分光法に基づく新たなバイオイメージング技術の確立を図った。その結果、A01 班では、ラマン信号強度を精密に制御する分子設計法の確立、確立した分子設計法に基づく新たな機能性ラマンプローブ群の開発に成功した。A02 班では、A01 班が創出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、誘導ラマン散乱顕微鏡の最適化・高度化に取り組み、A03 班との連携による生体解析に適用してその有効性を実証した。A03 班では、ショウジョウバエの高度な遺伝学を駆使した生体実証試験を行い、A01 班のプローブ分子と、A02 班の高速・高感度ラマン顕微鏡の有用性・有効性を検証した。

本領域の計画班メンバーの専門分野は化学・光学・生物学と異なっていたが、“革新的なバイオイメージング技術の創出”という大きな目標を共有し、有機的な連携を図った結果、領域研究を大きく進展させることができた。また、領域外の研究者との共同研究も積極的に推し進め、新たな融合研究の発展に至った。その結果として、多数の論文報告、学会報告を行うことができ、若手研究者の育成を含め、学術変革領域研究 (B) の活動として十分な成果を達成することができたと考えている。総括班、各計画班の具体的な成果については、次頁以降に詳述した。

## 5-1. 総括班

課題番号：20H05723

課題名：機能性ラマンプローブによる革新的多重イメージング

研究代表者 神谷 真子（東京工業大学・生命理工学院・教授）

研究分担者 小関 泰之（東京大学・先端科学技術研究センター・教授）

研究分担者 小幡 史明（理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー）

### 5-1-1. 総括班の目的と方法

本領域は、化学・工学・生物の専門分野が異なる研究者が連携することにより、新しい融合領域研究を推進し、従来法を凌駕するラマンイメージング技術の確立を図った。総括班は、計画班代表者3名で構成し、領域会議・シンポジウムの開催、研究交流支援、広報などを担当するとともに、本領域の研究目的と運営方針の明確化、領域研究の目標達成を策定した。また、各研究班の研究内容・進捗を把握し整理することで、領域研究の目標達成に向けた調整を行った。また本領域の学術成果は世界に向けて積極的に発信した。

### 5-1-2. 成果

#### (1) 班会議

##### ・総括班会議

領域運営の方針確認・調整のため、計画班（A01班～03班）の研究代表者により総括班会議を月二回の頻度でオンラインで開催した。2021年度末には、感染対策をとったうえで少人数の総括班会議を行い、各研究班の研究進捗を把握するとともに、領域全体の目標および最終年度の達成目標について改めて共有した。また、会議での議論内容を随時確認できるよう、毎回の議事録を作成し、ドライブに保存した。

##### ・領域会議

計画班連携による異分野融合を効果的に推進するため、各計画班（A01班～03班）の研究代表者・若手研究者・大学院生を参加者とした領域会議を開催した。領域会議はオンラインで行うことを予定していたが、感染状況を鑑み、2020年度、2021年度の領域会議はオンラインで開催した。2022年度の領域会議は東京工業大学すずかけ台キャンパスにて対面で実施した。領域会議においては、各計画班の研究内容・進捗を共有するとともに、領域研究の全体目標度についても確認した。また、バイオイメージング分野を牽引されていらっしゃるアドバイザーの先生（京都大学松田道行教授、理化学研究所/東京大学 岡田康志教授）や学術調査官の先生をお招きし、貴重なご意見・ご助言を頂いた。

#### (2) セミナー開催

領域研究の加速と若手育成のため、バイオイメージング分野で活躍されていらっしゃる国内外の研究者による講演会をオンラインで開催した。本セミナーでは、若手研究者・学生

からも積極的な質疑があり、また講演会後の研究者間の交流において今後の領域内外連携に繋がる議論を行った。

- ・理化学研究所（袖岡有機合成化学研究室） 闔闔孝介先生
- ・コロンビア大学 Wei Min 先生
- ・山梨大学 高橋光規先生（若手枠）
- ・慶応大学 杉浦悠毅先生
- ・順天堂大学 洲崎悦生先生
- ・California Institute of Technology Lu Wei 先生
- ・大阪大学 市村垂生先生
- ・東京大学 Robert E. Campbell 先生
- ・京都大学/理化学研究所 谷口 雄一先生
- ・京都大学 松田道行先生（対面、第三回領域会議にて）

### （３）領域ホームページ等

領域活動や学術成果を広く積極的に発信するため、領域ホームページを立ち上げた (<https://sites.google.com/view/i-raman/>)。領域発足時は外部委託によるホームページ作成・維持・更新を考えていたが、学術成果や領域活動の情報発信の即時性と柔軟性を考慮し、Google site で自前で準備した。ホームページには、領域活動、論文発表や原稿掲載などのニュース、領域メンバーの昇任・受賞、本研究領域メンバーのインタビュー記事などを掲載した。また、領域ロゴ・領域のイメージ図を作成し、領域活動の周知・宣伝に用いた。

### （４）広報

学術成果を発信するため、国内・国際学会において積極的に成果報告を行う他、学会でのシンポジウム共催、学会誌、科学雑誌、化学ポータルサイトに学術成果をまとめた原稿や本領域の趣旨をまとめた記事を寄稿した。

- ・実験医学 2021 年 5 月号の「いま知りたい！」コーナーで領域概要を紹介
- ・日本薬学会の機関誌「ファルマシア」6 月号の最前線 (2021 年 57 巻 6 号 p.480-484) に、研究成果をまとめた記事を寄稿
- ・第 11 回 CSJ 化学フェスタ 2021 にて領域概要を紹介
- ・日本科学振興協会 (JAAS) 第 1 回キックオフミーティングにおいて本領域の研究内容・活動を紹介
- ・BioneX 生命科学の変革 公開シンポジウム 2022 (学術変革領域(B)の複数領域が集まって開催された公開シンポジウム) において本領域の研究内容・活動を紹介
- ・月刊「細胞」2022 年 12 月号 (ニューサイエンス社) に、研究成果をまとめた記事を寄稿
- ・第 45 回日本分子生物学会年会において共催ワークショップ「分子振動イメージングの最前線」を開催



(5) そのほか

- ・分野横断的な視点を有する若手研究者を育成することを目指した活動を行った。
- ・計画班 (A01 班~03 班) の研究代表者 3 名が昇任・独立した。

2021.4 A03 班代表 小幡史明 東京大学大学院薬学系研究科・講師

→ 理化学研究所 生命機能科学研究センター・チームリーダー (PI)

2021.6 A02 班代表 小関泰之 東京大学 大学院工学系研究科・准教授 (PI)

→ 東京大学 大学院工学系研究科・教授 (PI)

2022.4 A01 班代表 神谷真子 東京大学 大学院医学系研究科・准教授

→ 東京工業大学 生命理工学院・教授 (PI)

## 5-2. A01 班

課題番号：20H05724

課題名：革新的多重イメージングに資する機能性ラマンプローブの開発

研究代表者：神谷 真子（東京工業大学・生命理工学院・教授）

### 5-2-1. 研究開始当初の背景

生体は、多種多様な分子が各々の役割を果たすことで機能しているため、生命現象を包括的に理解するためには、複数の分子を同時に観察し、それぞれの動態や機能がどのように関連・相互作用しているかを調べる必要がある。蛍光イメージング法は、生きた生物試料における様々な生体分子の動態や機能をリアルタイムに観測することができるため、生命科学研究に欠かせない研究ツールとして汎用されているが、蛍光色素の吸収・蛍光スペクトルに一定の幅があるため、同時に検出できる標的分子数が4-5種類程度に限定される。これに対し近年、蛍光イメージングの「色数の壁」を打破し、生きた細胞における多数の標的分子を同時検出する手法として、アルキン・ニトリル・ポリインなどの官能基を有するラマンプローブを用いた多重検出法が注目を集めている。これらのラマンプローブは生体分子のラマン信号が生じない silent region ( $1800-2800\text{ cm}^{-1}$ ) にシャープなラマン信号を示し、同位体ラベルや誘導体展開によりラマンシフト値の微調整が可能であることから、10種類以上の細胞内標的構造を同時にライブ検出できることが示されてきた。また、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ラマン効果（EPR 効果）と、非線形ラマン効果を用いた誘導ラマン散乱（SRS）顕微鏡を組み合わせることで、数 $\mu\text{M}$  オーダーという高い感度での観察が可能であることも示されてきた。しかしながら、既存のラマン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多く報告されていなかった。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 を制御することは難しいと考えられてきたが、このような背景の中研究代表者らは、前期共鳴ラマン（EPR）効果をラマン信号制御原理として用いることで、activatable な特性を有するラマンプローブが開発できることが強く示唆される予備検討の結果を得ていた。

### 5-2-2. 研究の目的

本計画研究では、EPR-SRS 検出系において分子の吸収波長の変化に基づいてラマン信号を off/on 制御する原理を確立するとともに、確立した原理に基づき、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を開発し、その有効性を実証することを目的とした。つまり、生きた生物試料中における生体分子の機能や構造を、従来法を凌駕する性能で検出するラマンイメージング法を世界に先駆けて確立することで、生体解析ツールとしてのラマンイメージングの性能を飛躍的に拡張することを目指した。

### 5-2-3. 研究の方法

分子の吸収波長の変化に基づいてラマン信号を off/on 制御する原理を確立するべく、9 位に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・ラマン信号強度・ラマンシフト値がどのように変化するかを評価した。本検討で見出した色素骨格を母核として、酵素などの生体内分子や光によりラマン信号が変化するラマンプローブの開発が可能か検討した。また、ラマン信号の検出感度および細胞内滞留性を向上させるべく、生体分子との反応により凝集性が高まるプローブの開発にも取り組んだ。さらに、ラマンプローブ母核を拡張するべく、代表的なフォトクロミック化合物である diarylethene を母核として、照射によってラマン信号強度が変化する光スイッチングラマンプローブの開発にも取り組んだ。SRS スペクトル測定・イメージングに際しては、東京大学大学院工学系研究科の小関泰之教授と、ショウジョウバエ組織を用いたイメージングに際しては、理化学研究所の小幡史明チームリーダーと共同し、小関研究室で構築された高速 SRS 顕微鏡を用いて観察・評価した。

### 5-2-4. 研究成果

#### <研究成果>

研究開始までの事前検討として、9 位にニトリル基、3 位にアミノ基を有する一ピロニン誘導体を合成し、吸収スペクトルと誘導ラマン散乱信号 (SRS 信号) および安定性を評価したところ、十分に高い SRS 信号強度を示し、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 9CN-JCP を見出した。さらに、3 位のアミノ基をアミド化した誘導体では吸収波長が短波長化して SRS 信号強度が低く抑えたことから、この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することで、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が得られていた。そこで本計画研究においてはまず、9CN-JCP のニトリル基を同位体置換することでラマンシフトが異なる 4 つのプローブ母核を合成し、これらのアミノ基にアミノペプチダーゼやグリコシダーゼの基質部位を導入することで、4 つの酵素を標的とした activatable 型ラマンプローブを開発した。これらのプローブはいずれも、酵素反応前は波長が短く非共鳴条件となるため SRS 信号が低く抑えられているが、それぞれの標的酵素との反応によって長波長化して前期共鳴 (EPR) 条件となることで SRS 信号が増強し、さらにこれらの SRS 信号が同時に分離検出可能な異なるラマンシフト値で得られることを確認した。さらに、開発した 4 つのラマンプローブを酵素活性パターンが異なる細胞に同時に適用したところ、4 つの標的酵素の活性を同時検出でき、異なる酵素活性パターンを SRS 画像として描出できることを示した。つまり、分子の吸収波長変化によりラマン信号を on/off する原理を確立するとともに、activatable な機能性を有するラマンプローブを設計できることを示した。本成果は、J. Am. Chem. Soc. 誌に掲載され

た (J. Am. Chem. Soc. 142, 20701–20707 (2020))。

一方で、上記で開発したプローブは細胞内滞留性が低く、生体組織の標的酵素発現領域を特異的に検出することは困難であることが明らかとなった。そこで次に、色素母核の凝集性を活用することで、組織中の標的酵素を発現する領域を特異的に検出可能な新規ラマンプローブの開発を目指した。具体的には、9CN-pyronin 誘導体の 3 位のアミノ基をヒドロキシ基に置換した 9CN-rhodol 誘導体では、中性条件下での凝集性が高くなることに着目し、この性質を活用して、酵素反応後に生成する色素が凝集体を形成することで細胞外への漏出が低減でき、標的酵素が発現する細胞領域のみを選択的に検出することを考えた。最適な 9CN-rhodol 骨格を探索するべく複数の候補誘導体を合成し、分光特性・安定性・凝集性を評価した結果、9CN-JCR を最適なプローブ母核として選定した。さらに、同位体標識した 9CN-JCR を母核として、異なるグリコシダーゼやアミノペプチダーゼを標的とした 3 種類のラマンプローブを開発し、生きた細胞における 3 種類の酵素活性の同時検出に成功した。特に、開発した 9C15N-JCR-Bn- $\beta$ Gal は、酵素反応によって生成した色素母核が標的細胞内で凝集体を形成するため、組織においても  $\beta$ -galactosidase 発現領域を特異的に検出することが可能であり、凝集体形成によって分子の局所濃度が高くなるため検出感度が上昇することも確認した。本成果は、J. Am. Chem. Soc. 誌に掲載された (J. Am. Chem. Soc. 145, 8871–8881 (2023))。

また上述の設計では、キサンテン環 3 位のアミノ基が吸収波長変化を誘起する反応点であったが、この反応点を拡張することができれば、吸収波長の変化を活用した機能性ラマンプローブの分子設計の幅が広がると考えた。そこで、キサンテン環 10 位元素を反応点とした新たな分子設計として、赤色光照射で SRS 信号が増大するラマンプローブの開発を行った。具体的には、10 位にテルル (Te) を導入したローダミン誘導体は Te の光酸化にともなって吸収スペクトルが 60 nm 以上長波長化することが知られている。そこで、10 位に Te を導入した 5 種類の 9CN-テルルピロニン誘導体を開発し、Te の酸化に伴う吸収スペクトル変化、SRS 信号強度変化を評価した。その結果、9CN-diMeJTeP が酸化後も高い安定性を有し、赤色光 (650 nm) 照射によって水溶液中で光酸化されて吸収スペクトルが長波長化し、SRS 信号強度が増強することを確認した。つまり、赤色光で SRS 信号が増強する activatable 型ラマンプローブが設計可能であることが示された。本成果は、Chem. Asian J. 誌に掲載された (Chem. Asian J., 18, e202201086 (2023))。

次に、確立した EPR-SRS 法に基づくラマン信号制御原理に則り、光照射によってラマン信号強度が変化する光スイッチング特性を有するラマンプローブの開発を行った。具体的には、代表的なフォトクロミック化合物である diarylethene を母核として、閉環体が EPR 条件を満たす波長領域に吸収を持つよう、thiophene 環と indole 環からなる非対称構造を有する DAE620 を設計・合成した。DAE620 の光学特性を評価したところ、紫外光照射により EPR 条件となる長波長吸収を示す閉環体に変換され、可視光照射により短波長吸収を示す開環体に戻り、それに伴い SRS 信号がスイッチングすることを確認した。特に、閉環体

時には、fingerprint region において C=C 伸縮振動に由来する強い SRS 信号を示し、高い S/N 比での光スイッチングが観察された。そこで、超解像蛍光イメージング法のひとつである RESOLFT 法を参考に、東京大学工学系研究科・小関泰之教授らにより構築された新たな超解像ラマン顕微鏡法 Reversible Saturable Optical Raman Transitions (RESORT) と組み合わせて用いることで、空間分解能が向上するか検討した。具体的には、ミトコンドリア局在リガンドを導入した DAE620 (DAE620-Mito) を合成し、固定細胞・生細胞におけるミトコンドリアを観察したところ、RESORT 法では通常の SRS 画像よりも高い空間分解能でイメージングが可能であることが示された (Sci. Adv., in press)。

<今後の展望>

本研究で開発したラマン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誘導体を開発し、多重検出能に秀でたラマンイメージングの利点を生かした応用を進めていく。例えば、酵素活性検出ラマンプローブの標的酵素を拡充したプローブ群を開発し、細胞や組織における標的酵素の活性パターン検出が可能か検証していく。また光スイッチングラマンプローブの多重化を行い、多重超解像イメージングが可能か検討していく。

<得られた成果の位置づけとインパクト>

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原理を確立し、さらに確立した原理に基づき複数の機能性ラマンプローブの開発に成功した。今後本成果により得られた分子設計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み、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。

### 5-3. A02 班

課題番号：20H05725

課題名：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

研究代表者：小関 泰之（東京大学・先端科学技術研究センター・教授）

#### 5-3-1. 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）、ポリイ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<sup>-1</sup>)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 (<μM) を有する。

#### 5-3-2. 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。

### 5-3-3. 研究の方法

神谷班が創出する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。

### 5-3-4. 研究成果

#### 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))。

#### 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))。

#### 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(Sci. Adv., in press)。

#### 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。

#### 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。



#### **5-4. A03 班**

課題番号：20H05726

課題名：革新的多重イメージングによる組織複雑化過程の可視化

研究代表者：小幡 史明（理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー）

##### **5-4-1. 研究開始当初の背景**

生物個体は、一つの細胞から形作られる。発生過程により複雑化した成熟個体は、細胞間・組織間・そして臓器間の高度に有機化された相互作用を介して保たれる。一方、さらに時間を進めると、このような生物組織を構成する秩序が崩壊し、個体が「老化」し、がんを始めとする様々な疾患を発症する。しかしながら、発生、老化、がん化を含め、組織の複雑化過程を可視化することは容易ではなく、その基本的なメカニズムは不明である。時間軸に沿った生物個体の複雑化は、究極的に個々のタンパク質・オルガネラ・細胞の振る舞いの総和により説明されると考えられる。その複雑化過程を理解するには、単一個体の中でこれらの構成要因を同時に視る必要がある。蛍光イメージングの発達によって、単一分子種の挙動を、生きた生物個体の中で観察する事は容易になった。波長の選択により、3つ程度の生体分子の同時イメージングは現実的である。しかしながら、我々を構成する生体分子の数は、少なく見積もって数万、あるいはそれ以上である。また、生体分子同士の有機的な相互作用や、異質な細胞集団が混在する組織構造を鑑みれば、多数のタンパク質・オルガネラの挙動を同一組織内で観察する必要がある。このような超多重イメージングは、現状では技術的に困難である。

##### **5-4-2. 研究の目的**

ラマンイメージングは、その特性から蛍光を用いた生体イメージングの原理的障壁を突破する可能性を秘めている。本計画研究が参画する領域「革新ラマン」内にて開発される新規機能性ラマンプローブは、生体分子を高感度にイメージングするための有用な新技術となる。しかしその実用化においては、適切なプローブの設計、イメージングを可能とする顕微鏡システム、そして生物個体での精緻な検証を要する。本研究では、ショウジョウバエ遺伝学を駆使し、当該イメージング技術の実用性を飛躍的に上昇させると共に、その生物学的有用性を実証する。次項実験計画にも基づき、①代謝酵素・消化酵素活性の組織内多重検出、②オルガネラ構造の動的イメージング、③多重・超解像イメージングの3点について確立する。個体発生・老化・がん化時にみられるヘテロジニアスな組織変容の構造基盤を明らかにし、ラマンイメージング技術の汎用性を大幅に拡大させる。

##### **5-4-3. 研究の方法**

新規プローブの生体実証試験を行う上で、ショウジョウバエの高度な遺伝学は極めて有効である。ショウジョウバエは発生から老化までの様々な生命現象を、生きた個体の中で解

析出来る優れたモデル生物である。遺伝学的ツールが豊富であり、新規プローブの生体応用可能性を迅速に解析するのに長けている。特定の遺伝子を異所発現させて、その機能を解析することも容易である。生体組織内で特定の細胞集団のみの遺伝型クローンを導出することで、本領域で創出する多重イメージングの生体実証試験を行う。

また組織複雑化過程を可視化する際に、どのような酵素・タンパク質を標的とするかを知ることが重要である。本研究では、既存の RNAseq や単一細胞 RNAseq 等のオミクス解析、遺伝学的解析を通して、発生や老化などの組織複雑化過程を記述し、その過程に影響する因子を特定していく。特に栄養や腸内細菌操作を通して、発生や老化の速度を変容させることでその因子特定に貢献する。

ラマンイメージングによるタンパク質動態の解析のため、重水素標識したアミノ酸をショウジョウバエに非侵襲的に摂食させる。合成培地を用いて、アミノ酸を標識体に置換し、生体組織のイメージングに資するショウジョウバエ組織を準備する。

#### 5-4-4. 研究成果

神谷班が開発した複数の activatable ラマンプローブおよびラマンプローブ開発に資する蛍光プローブについて、ショウジョウバエ組織を用いた生体応用を行った(Kashima et al., Chem Commun, 2021、Fujioka et al., J. Am. Chem. Soc. 2023)。ショウジョウバエの wing disc 及び脂肪組織を材料とし、lacZ や Ggt-1 などの標的酵素を組織の一部に過剰発現させ、複数のプローブの選択的可視化が可能であることを確認する実験を行った。特筆すべき成果として、9CN-JCR ベースの凝集性ラマンプローブについて、生体組織において酵素発現領域を特異的に可視化出来るかどうかの検証実験を行い、ショウジョウバエの酵素発現領域のみを可視化することに成功した。本成果については、東京工業大学、東京大学、理化学研究所の共同プレスリリースを行った。また、これらのプローブ以外にも、様々なショウジョウバエ生体飼料を準備し、領域内に開発されたプローブ(未発表のものを含む)の染色可否を検討した。

小関班との共同研究により、メチオニンの取り込みを SRS イメージングによって可視化することに成功した(Spencer et al., J Phys Chem B, 2022, Spencer et al., Front Chem, 2023)。メチオニンを重水素標識したメチオニンに置換するため、細胞用の培地、及びショウジョウバエ個体用の合成培地を開発し、これを用いて SRS イメージングを行った。ショウジョウバエ個体用の合成培地については、幼虫の発生過程に影響が少ないように最適化し、実際にその合成培地を用いて新規アミノ酸応答経路の存在を証明した(Kosakamoto et al., Nat Metab, 2022)。発生期の幼虫の脂肪組織においては、非必須アミノ酸チロシンが特に重要な栄養情報として認識されていること、それが転写因子 ATF4 によるタンパク質合成、摂食量調整に重要であることを明らかにした。

新たに開発した合成培地を用いて、メチオニン制限による寿命延長モデルを確立した(未発表)。メチオニン制限により寿命が延長した個体との比較により、老化した腸において組

織が複雑化していく際のマーカーとなる遺伝子を RNAseq、scRNAseq により同定した。また同解析から、メチオニン制限によって寿命が延長する際には Methionine sulfoxide reductase A が誘導されることが重要であること、成虫早期のメチオニン制限のみで寿命が延長することを発見した。単一アミノ酸制限による寿命延長機構の一端をになう経路の同定と、ライフステージ特異的な栄養応答の変化についての発見であり、論文を投稿中である。

老化による組織複雑化過程に寄与する要因として腸内細菌について解析し、特定の腸内細菌種が自然免疫を介して腸の老化を促進し個体寿命を短縮するメカニズムを発見した (Yamashita et al., Dis Model Mech, 2021、Onuma et al., PLoS Genet, 2023)。Acetobacter 属細菌のペプチドグリカンが、腸上皮に発現するペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP-LC を介して Imd 経路を刺激することが老化促進に重要であることを発見した。この経路は幹細胞の老化にともなう過増殖にも寄与していた。また、発生期に Imd 経路を活性化すると、生涯にわたって Gluconobacter 属細菌が増加し、これが Imd 経路を持続的に活性化させることで寿命を短縮することも明らかとなった。本研究結果は、老化に伴って臓器が障害を受ける機構の一端を解明するものである。

老化にともなう Imd 経路活性化による寿命短縮機構を解析する目的で、Imd 経路活性化個体の臓器傷害に着目した(未発表)。Imd 経路を尿細管にて活性化した場合、臓器障害が起こることが明らかとなった。この臓器障害について、神谷班により開発された蛍光プローブを用いて可視化を行ったところ、通常個体に比べて組織の複雑さが増加する様子が観察できた。また、この障害に必須の Imd 標的遺伝子をスクリーニングにより同定した。