

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2015～2016  
 課題番号：15K20950  
 研究課題名(和文) Hybrid Raman-bioluminescence imaging for the study of proteome-metabolome interaction  
 研究課題名(英文) Hybrid Raman-bioluminescence imaging for the study of proteome-metabolome interaction  
 研究代表者  
 邱 亮達 (Chiu, Liang-da)  
 東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任助教  
 研究者番号：80648220  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本助成の二年の研究期間中、私は一回のスキャンで生細胞のラマンと蛍光画像を同時に撮影できる新しいイメージング手法の開発に成功した。従来の手法だとラマンと蛍光画像を別々に取得する必要があり、常に動き、かつ代謝反応を持つ生細胞の研究には向いていない。本手法を幹細胞分化の研究にも投入し、幹細胞分化過程における Oct-4 タンパク(未分化細胞にしか発現しない分化マーカー)の発現に対応する微細な化学変化を抽出できた。

本来の研究計画では発光プローブを使用する予定であったが、蛍光プローブの方が遥かに明るかったためこちらを採用した。本研究で開発した手法はこれからも細胞代謝過程の解明に貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)： Within the 2-year funding period, I have developed a novel imaging method that can acquire the Raman and fluorescence images of living cells in one single scan. Conventional methods required separate scans for the Raman and fluorescence modes, which is not suitable for the study of living specimen that constantly move or change its chemical condition due to metabolism. The hybrid fluorescence-Raman imaging platform has been further applied to study the differentiation process of embryonic stem (ES) cells. The hybrid imaging platform was able to extract the subtle chemical change in the ES cells according to the expression pattern of Oct-4, a differentiation marker protein that is expressed only in undifferentiated stem cells.

Bioluminescent probes were planned for the original study, but they were out-performed by fluorescent probes due to the difference in emission intensity. The hybrid imaging platform is now a powerful platform to study the metabolism of live-cells.

研究分野：バイオイメージング

キーワード：Metabolome analysis Raman spectroscopy Anti-Stokes fluorescence Differentiation メタボローム解析 ラマン分光法 アンチストークス蛍光 分化

## 1. 研究開始当初の背景

本研究を始めたきっかけは私が博士研究員だった頃の研究にあった。該当研究は胚性幹細胞が分化する過程をラマン顕微鏡で追跡し、胚性幹細胞は分化段階によるラマンスペクトル的な変化を示すかの検証であった。その結果、胚性幹細胞は分化過程によりラマンスペクトル的な変化が見えることがわかった (Ichimura *et al.*, PLoS ONE 2014; Ichimura *et al.*, Sci. Rep. 2015)。しかしそのラマンスペクトル的な変化と分化過程のシグナル伝達経路がどう関連しているかを理解することが極めて困難であった。この課題を解決するため、ラマン分光法で得たスペクトル情報を既知の生物現象と結びつける手法を検討し続けてきた。

ラマン分光法は光の散乱を使って物質の化学組成を調べる手法である。それに対して、生命現象を調べるために一番広く使われている手法は蛍光顕微鏡法である。特に遺伝子工学的手法により導入できる蛍光タンパク標識法は近年の生物研究に大きく貢献した。この二つの技術をうまく融合できれば前述の課題の解決策になると思われる。実際、ラマン分光法と蛍光顕微鏡を融合するイメージング手法の開発は近年注目されつつある (Manen *et al.*, Nano Lett. 2007; Pully *et al.*, Vib. Spectrosc. 2010)。しかしながら、本研究が提案された時点でうまくラマン分光法と融合できた蛍光プローブは量子ドットと低分子蛍光プローブに限られており、遺伝子工学的手法により導入できる蛍光タンパクとラマン分光法の融合は成功した例がまだない。ラマン分光法で得た新たな知見を生物学的に理解しやすくするため、生物研究の分野において一番貢献しているタンパク質標識手法、つまり遺伝子工学的手法により自由に組換えできるタンパク標識法、とラマン分光法の融合が必要不可欠と考え、本研究を提案した。

## 2. 研究の目的

本研究の一番の目的はラマン分光法とタンパク標識法の融合により細胞の化学的狀態とタンパク質発現の拳動を同時に可視化することである。今までの生物研究はタンパク質によるシグナル伝達経路で理解されており、細胞の代謝産物などの化学物質がどのような役割を持っているかは完全に理解されていない。ラマン分光法とタンパク標識法の複合イメージング手法の開発により生体内の代謝物の研究がさらに推進されることを期待している。

本研究で開発する複合イメージング手法を実際に生物応用することも最初から計画していた。特に胚性幹細胞の分化過程におけるタンパク質拳動とラマンスペクトル的な変化を同時に可視化することは本研究の

発端となった課題のため、胚性幹細胞の分化に関連するタンパク質の発現に依存する幹細胞の化学的变化を解析することを本手法の最初の生物的应用例として選んだ。

## 3. 研究の方法

本研究における研究方法の進め方は大まかに二段階に分けられる。

### (1) 発光タンパクを用いた方法

遺伝子工学的手法によるタンパク標識法で一番実績のあるプローブは蛍光タンパクである。しかし蛍光タンパクの光安定性、量子収率(光化学反応を起こす分子/吸収される光子の比)などの光化学的性質は量子ドット、低分子蛍光プローブなどの遺伝子工学的手法により操作不可な蛍光プローブに劣っており、前述の通りラマン分光法と併用した成功例は本研究を提案した時点ではまだなかった。そのため、本研究を提案した時は蛍光タンパクの代わりに発光タンパクをタンパク標識法のプローブとして提案した。発光タンパクは蛍光タンパクと違い、入射光を必要とせず、発光基質を添加することにより光を出すタンパクプローブである。発光タンパクと発光基質の組み合わせによって発光スペクトルが決められるため、より簡単にラマンスペクトルと違う波長領域を選択することができ、蛍光タンパクと比べてよりラマン分光法との融合には適しているタンパク標識プローブと考えた。残念ながら、実験してみたところ発光タンパクから出た発光強度が弱すぎるためうまくラマンと一緒に測定することはできなかった。

### (2) 蛍光タンパクを用いた方法

発光タンパクでは研究がうまく進まなかったため、次は蛍光タンパクの検討に移った。蛍光タンパクの分子生物学においての重要性を鑑み、簡単に思い付くラマン分光法との融合に役立ちそうな手法はすでに試されている可能性が高い。実際、ラマンとの融合を試そうとする報告は存在していた (Bennet *et al.*, Biophys. J. 2014; Krauß *et al.*, Analyst 2015)。しかしそれらはすべて蛍光とラマンの測定を別々に行う手法であった。一回の測定で蛍光タンパクとラマン分光の情報を同時に取得する方法は当時知られていなかったため、様々な波長の蛍光タンパクを一個一個試した。その結果、励起光が連続波レーザーにもかかわらず、励起光より短波長の蛍光タンパクを測定した際にも蛍光放射を確認した(図1)。このように蛍光スペクトルが入射光より短波長側に出る現象はパルスレーザーによる蛍光分子の二光子励起でよく見られるが、連続波レーザーで似たような現象が見えるのは予想外の実験結果であった。この現象の仕組みを調べたところ二光子励起ではなく単一光子吸収によるアンチストークス蛍光励起であることを確認した。

これにて初めてアンチストークス蛍光励起とストークスラマン散乱による蛍光タンパクとラマンスペクトル複合イメージングの実験系を確立した。

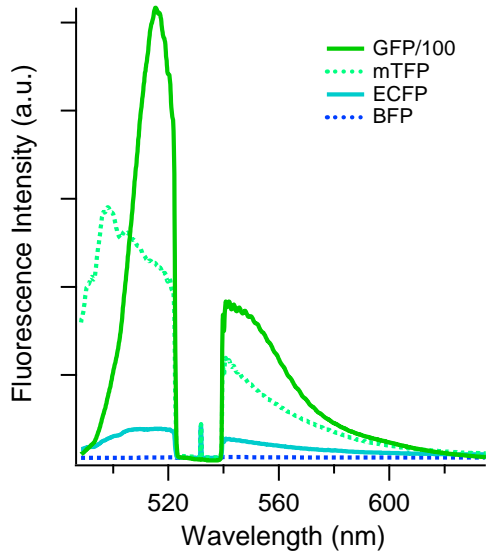


図 1 アンチストークス蛍光励起された蛍光タンパクの蛍光スペクトル。520 nm ~ 540 nm の凹んだ部分は励起光である 532 nm レーザーを遮断するためのノッチフィルターにより除けたスペクトル領域である。

#### 4. 研究成果

アンチストークス蛍光励起による蛍光ラマン複合イメージングの実験系を確立した後、研究の方向性を三段階に分けて徐々に実際の生物研究への応用に移った。

##### (1) 生細胞の蛍光 ラマン複合イメージング

本研究で開発する複合イメージング手法の生物的应用に向けた第一歩は前述のアンチストークス蛍光励起現象が生細胞中で再現されるか、そしてラマン分光法と併用できるかである。これを確認するため、ゴルジ体に蛍光波長が 492 nm にある mTFP 蛍光タンパクを付けた HeLa 細胞を 532 nm の励起光を使い蛍光 ラマン複合イメージングを試した。その結果、一回の測定で得たスペクトルの 532 nm より短波長のアンチストークス側にきちんと蛍光放出が確認され、ラマンスペクトルも同時に 532 nm より長波長のストークス側に確認できた (図 2)。蛍光とラマンの信号それぞれの細胞のイメージを再構成してもお互いのイメージに干渉しないように見えたため (図 2)、生細胞中でも本研究で開発された蛍光 ラマン複合イメージング手法は適用されることを証明した。この結果を踏まえて次の研究計画に移行した。

##### (2) 蛍光 ラマン複合イメージングによる生細胞のオルガネラ化学成分析

ラマン分光法による生細胞の化学成分析は長年研究されているテーマだが、ほと

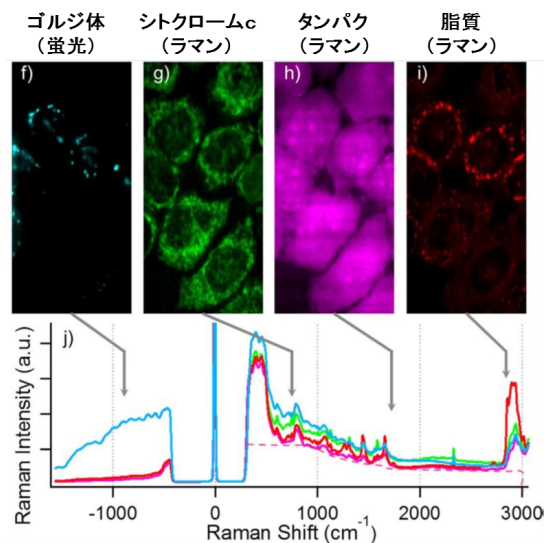


図 2 ゴルジ体が TFP で染めた HeLa 細胞の蛍光 ラマン複合イメージングデータ。スペクトルの 0 波数の位置は入射光。違う色のスペクトルは違う色の画像に対応する。

んどの研究は細胞核、脂肪滴とミトコンドリアに集中していた。その理由は、ほかのオルガネラはラマン分光法では可視化できないからだ。図 2 で示したように、本研究で開発される蛍光 ラマン複合イメージング手法を用いるとゴルジ体の局在を蛍光イメージングで可視化できるため、初めてのラマン分光法による生細胞中のゴルジ体化学成分析に挑戦した。図 2 の青い蛍光信号と共存するラマンスペクトルはゴルジ体のラマンスペクトルと見られる。ゴルジ体のラマンスペクトルの特徴を探るため、ゴルジ体の平均スペクトル (図 3 の赤いスペクトル) とゴルジ体以外の平均細胞スペクトル (図 3 の青いスペクトル) の差を取った。その残差が脂肪成分のラマンスペクトルと一致する (図 3 の緑いスペクトル)。これにてゴルジ体が周りの細胞環境より脂質に富んだ構造であることが分かった。

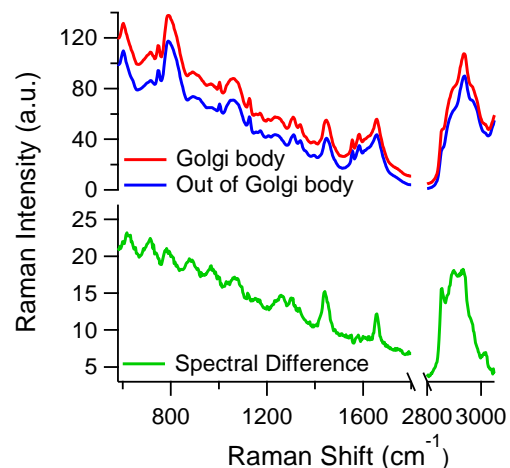


図 3 ゴルジ体 (赤)、ゴルジ体以外の領域 (青) の平均ラマンスペクトルと上記スペクトルの残差スペクトル (緑)。

### (3) 幹細胞分化研究への応用

本研究費の二年間の助成期間の最後に行った生物的应用は研究提案のきっかけになった幹細胞分化に戻った。本段階では、特定の分化過程のシグナル伝達チェックポイントを経過する際に伴う幹細胞の化学的变化をラマン分光法で検出できるか検証することを目的とした。研究のターゲットとして選んだ分化チェックポイントは Oct-4 タンパクの発現状態である。Oct-4 タンパクは幹細胞の分化マーカーとして広く研究されている幹細胞の分化過程において最も重要なタンパク質の一つで、幹細胞が多能性を保つ状態でのみ発現するタンパク質であることが知られている。本研究で開発される蛍光ラマン複合イメージング手法を用い、初めて Oct-4 の発現状態による幹細胞の化学状態分析に取り掛かる。

実験の手順として、まずは Oct-4 の TFP レポーターを発現する胚性幹細胞株を作り、それを分化促進させた。分化過程において幹細胞がちょうど多能性を失う時点で蛍光ラマン複合イメージングを行った。その結果、半分ほどの幹細胞に Oct-4 の発現が残り、残りの半分の幹細胞では Oct-4 の発現が失われた状態の細胞イメージに成功した(図4)。これは幹細胞全体の分化状態が Oct-4 の発現状態が変わる時点の前後にあると示している。

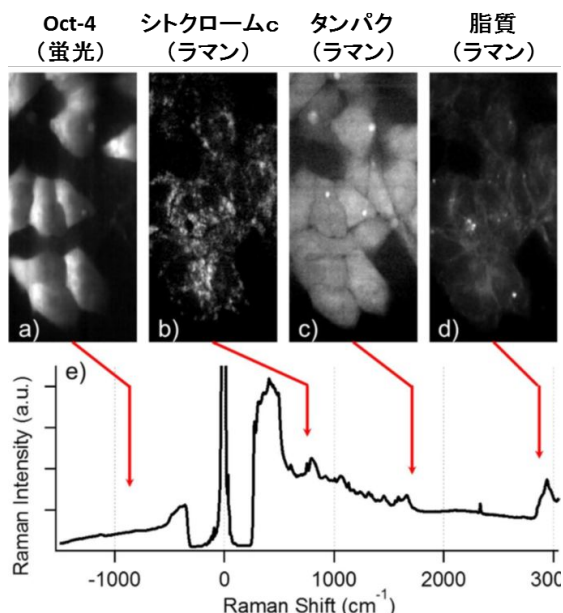


図4 分化中の胚性幹細胞蛍光ラマン複合イメージ。

図4の状態にある胚性幹細胞を Oct-4 の発現状態により Oct-4+ (Oct-4 発現) と Oct-4- (Oct-4 非発現) の二グループに分けラマンスペクトルの判別分析を行った。その結果、Oct-4 の発現状態によりラマンスペクトルが2グループに分けられ、その2グループのラマンスペクトル的な差も判別分析で解明された(図5)。

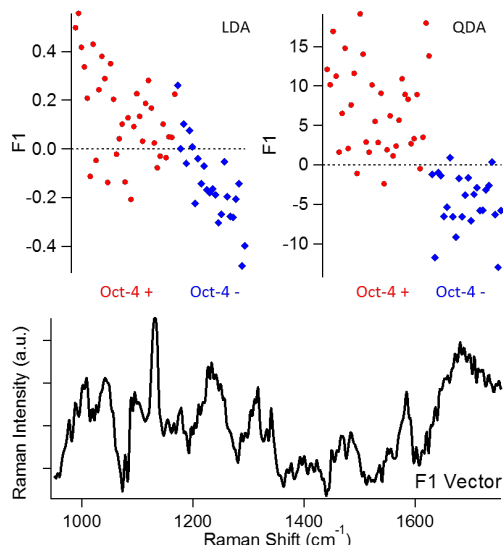


図5 Oct-4 の発現状態による胚性幹細胞ラマンスペクトルの判別分析。

図5で Oct-4+ と Oct-4- 2グループのラマンスペクトル的な差を示す。F1 vectorの化学的意義を取り出せる新しい多変量解析手法の開発は今進行中である。

本研究で開発された蛍光ラマン複合イメージング手法は本研究費の助成期間が終わった後も引き続き改良する予定である。特に図4の蛍光画像で見える各細胞の左から右へのレーザースキニングによって蛍光強度が衰弱する光褪色現象を抑えることが現段階の第一要務である。

### 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)

Liang-da Chiu, Taro Ichimura, Takumasa Sekiya, Hiroaki Machiyama, Tomonobu Watanabe, Hideaki Fujita, Takeaki Ozawa, Katsumasa Fujita  
Protein expression guided chemical profiling of living cells by the simultaneous observation of Raman scattering and anti-Stokes fluorescence emission, *Sci. Rep.*, 2017, 7:43569 査読あり  
DOI:10.1038/srep43569

Liang-da Chiu, Shih-Hsin Ho, Rintaro Shimada, Nan-Qi Ren, Takeaki Ozawa  
Rapid in vivo lipid / carbohydrate quantification of single microalgal cell by Raman spectral imaging to reveal salinity-induced starch-to-lipid shift, *Biotechnol. Biofuels*, 2017, 10:9 査読あり  
DOI: 10.1186/s13068-016-0691-y

邱亮達

顕微ラマン分光における偏光ラマン二成分同時測定, 分光研究, 2016, 65, 306-309 査読あり  
紙本のみ

Taro Ichimura, Liang-da Chiu,  
Katsumasa Fujita, Hiroaki Machiyama,  
Tomoyuki Yamaguchi, Tomonobu  
Watanabe, Hideaki Fujita  
Non-label immune cell state prediction  
using Raman spectroscopy, Sci. Rep., 2016,  
6:37562 査読あり  
DOI:10.1038/srep37562

〔学会発表〕(計 5 件)

Liang-da Chiu  
Hybrid fluorescence-Raman imaging to  
correlate biochemical information to  
protein expression  
日本化学会第 97 春季年会 慶應義塾大学日吉  
キャンパス (神奈川県横浜市) 2017. 3. 18

Liang-da Chiu  
Hybrid fluorescence-Raman imaging to  
correlate biochemical information to  
protein expression  
日台医用分光学国際シンポジウム 淡路夢舞  
台国際会議場 (兵庫県淡路市) 2016. 12. 6.

Liang-da Chiu  
Fluorescent protein guided chemical  
analysis of living cells by hybrid  
fluorescence-Raman microscopy  
第 39 回日本分子生物学会年会 パシフィコ  
横浜 (神奈川県横浜市) 2016. 12. 2.

Liang-da Chiu  
Hybrid fluorescence-Raman microscopy for  
the visualization of protein-metabolome  
interaction in living cells  
第 77 回応用物理学会秋季学術講演会 朱鷺  
メッセ (新潟県新潟市) 2016. 9. 15.

Liang-da Chiu  
Hybrid fluorescence-Raman microscopy for  
the visualisation of protein-metabolome  
interaction  
Focus on Microscopy 2016 National Taiwan  
University Hospital International  
Convention Center (Taipei, Taiwan) 2016.  
3. 22.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

邱 亮達 (CHIU, Liang-da)  
東京大学・大学院理学系研究科・特任助教  
研究者番号: 80648220