

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510111

研究課題名（和文） 表面増強ラマン活性ナノ粒子による単一細胞表面タンパク質のイメージング

研究課題名（英文） Visualization of protein molecules on single cells with surface-enhanced-Raman active nano-particles

研究代表者

石川 満 (ISHIKAWA MITSURU)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：70356434

研究成果の概要（和文）：

細胞膜表面に局在するタンパク質分子を、*in situ* で迅速に検出・同定することが目的である。重要な機能を担っているタンパク質が細胞周期に依存して数分程度で変化するので、通常のラマン分光と比べて格段に高感度な測定が必須である。この要件を満たす測定手段として表面増強ラマン散乱（SERS）に着目してその有効性を検証した。その結果、モデル細胞の出芽酵母の細胞周期を、あるタンパク質を指標として非侵襲で可視化し、さらにそのタンパク質を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of the current project is *in-situ* detection of protein molecules on the surface of a single cell in a highly-sensitive manner. Key proteins on the surface will appear and disappear within several minutes in a cell cycle. Thus, measurement much faster than that by conventional Raman spectroscopy is highly required. We select surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) to meet the requirement. We observed a cell cycle of a single yeast cell as a model system with the help of SERS from a protein in a non-invasive manner. Furthermore, the protein is successfully identified by SERS spectroscopy and inhibition assays for the protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ粒子・ナノチューブ、バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

《研究の学術的背景》

細胞膜表面におけるタンパク質の分布とその種類を同定することは、細胞機能の解明

に不可欠な基礎的要及のひとつです。例えば、細胞膜表面におけるタンパク質発現を *in situ* で解析できれば、数分程度で起こると考えられている細胞の環境変化（温度、pH、化

学物質の変化等)応答の解明に大きく寄与することが期待されます。従来、細胞表面タンパク質の発現は、多数の細胞から構成される集団系を用いて解析されてきました。集団系を対象とした測定では、集団の平均化された情報が得られます。このような情報はもちろん有用です。しかし、一般に細胞ごとの差異、例えば、周囲の環境に依存して、健康状態が個々の細胞で異なることが経験的に知られています。このため、一般に、統計平均に加え個々の細胞を解析して得られる統計分布を評価することが、細胞における遺伝子と遺伝子発現の多様性を解析するために極めて重要なのです。

《蛍光法の問題点》

最近のビデオ顕微鏡技術の発展により、単一細胞の表面タンパク質分子を *in situ* で蛍光観察することが可能になりました。特に、共焦点顕微鏡と蛍光分光法を組み合わせた蛍光イメージング法では、単一分子レベルの感度で細胞膜表面における蛍光分子の3次元光検出が可能なので、抗原・抗体反応を利用して蛍光分子で選択的に標識した単一分子タンパク質の高感度分析が可能となります。しかし、細胞表面のタンパク質の種類は多いので、これらを認識するためにはタンパク質の種類に対応して蛍光分子を標識することが必要になります。さらに、蛍光分子の光退色および蛍光分子間の共鳴エネルギー移動 (FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer) による蛍光消光が、複数種のタンパク質を同時に検出することを困難にしています。光退色が支配的になると、観測そのものが不可能になることが問題になります。FRET 消光が支配的になると、極端な場合、複数の蛍光波長が観測されるべき系であっても、最もエネルギーが低い蛍光のみが観測されるので、標識したタンパク質を区別できないことが問題となります。

《ラマン分光法の特長と限界》

蛍光イメージング法に代わり、ラマン分光法を用いれば退色と FRET 消光の問題を克服できます。ラマン分光法では、分子振動による励起光のエネルギーシフトにより分子を認識するので、発光、非発光性に関係なく原理的にあらゆる分子に適用可能です。ラマンスペクトルは蛍光スペクトルに比べてシャープなので、分子の識別に有利です。共焦点顕微鏡とラマン分光法を組み合わせたイメ

ージング法を用いると、ラマン分光法の特長のひとつとして、蛍光色素で標識することなく、細胞表面の異なった種類のタンパク質を解析することが可能となるのです。

ラマン分光法の1種の CARS (Coherent Anti-Stokes Raman Scattering) 法も蛍光法の光退色の問題を解消できるひとつの方法です (例えば、Xie, X. S. *et al. Biophys. J.* **2006**, *91*, 728)。CARS を用いると、単一細胞に含まれる生体分子に何ら標識することなしで選択的に、しかもビデオレートで可視化できます。しかし、CARS 法を適用可能な分子は事実上脂質に限られます。その理由は、脂質に多量に含まれる C-H 伸縮振動 (2845 cm^{-1}) を選択的に観測することが容易だからです。また、CARS では大掛りな2台のピコ秒パルス光源と構成が複雑な光学系が必要なのが技術的な難点です。

一般に、蛍光断面積 ($\sim 10^{-16}\text{ cm}^2$) に比べラマン散乱断面積 ($\sim 10^{-30}\text{ cm}^2$) は10桁以上小さいので、測定器の検出限界 ($\sim 10^{-16}\text{ cm}^2$) をはるかに下回ります。このため、通常の顕微ラマン測定を用いた単一細胞を対象とした研究では、観測したい分子の数が必ずしも単一分子レベルでない場合でも、良好な S/N 比でスペクトルを得るためには300秒程度積算時間が必要です (例えば、Hamaguchi *et al. Biochemistry* **2005**, *44*, 10009.)。このため、測定対象が単一分子レベルのタンパク質の場合、このような長い測定時間では、数分程度で起こると考えられている細胞の環境変化 (温度、pH、化学物質の変化等) に応答した細胞膜表面におけるタンパク質発現の変化を *in situ* で解析することは極めて困難なのです。このように、適用可能な分子種と測定時間の限界のため、CARS と通常の顕微ラマン分光法では、単一細胞膜表面のタンパク質分子を *in situ* でかつ高感度検出して同定できる可能性は極めて小さいのが現状です。

2. 研究の目的

CARS イメージング法の限界、および通常の顕微ラマン分光法における限界を克服するために表面増強ラマン散乱 (SERS: Surface Enhanced Raman Scattering) に着目しました。これは、分子が金あるいは銀ナノ粒子表面に吸着することによって、分子のラマン散乱断面積が $\sim 10^{10}$ 倍増強される現象です。細胞膜表面におけるタンパク質発現を *in situ* で解析

することを本研究の目的とします。理想的には、タンパク質分子を同定するのみならず定量することも望ましい。しかし、定量性に難があることが、本研究に限らず SERS 法の重要かつ解決困難な課題なことは良く知られています。このため、本研究では、研究期間内の現実的な課題として、タンパク質分子を *in situ* で同定することに焦点を絞ります。

3. 研究の方法

観測された SERS スペクトルと細胞膜に含まれる多糖類とタンパク質のスペクトルを比較して、SERS スペクトルを帰属しました。細胞膜表面に形成された 2 量体銀ナノ粒子の SERS 特性と局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) 特性を評価して、ガラス基板上に調製された 2 量体銀ナノ粒子の SERS/LSPR 特性と比較しました。SERS スペクトルの帰属が困難な場合、遺伝子操作を用いて調製した特定のタンパク質が発現していない酵母細胞 (ノックアウト酵母) の他、細胞表面の特定の糖鎖を分解する酵素で処理するなど、タンパク質の発現を単純化した複数の系で得られた結果を比較して、タンパク質に由来すると考えられる SERS スペクトルを帰属しました。

4. 研究成果

研究代表者らは本プロジェクトの提案に先立ち、酵母細胞膜表面に吸着させた銀ナノ粒子凝集体から SERS が発現していることを見出しました。酵母細胞壁には、ある種のタンパク質の他、マンナン、グルカン、キチン等の多糖類が存在することが知られています。このため、この SERS は細胞表面のこれらの生体分子が単一銀ナノ粒子凝集体と相互作用してそのラマン散乱断面積が増強されて観測されたと考えられます。さらに、原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic Force Microscope) を用いて SERS を発現している酵母細胞膜表面を観測した。驚くべきことに、調製時に単量体であった銀のナノ粒子が細胞膜表面では、多くの場合、2 量体構造を示すことが見出されました。2 量体の銀 (金) のナノ粒子は、その接合部で SERS 活性が著しく高いことがよく知られているので、見出された銀ナノ粒子の 2 量体構造の接合部が SERS 活性を発現している可能性が高いのです。しかも、上記の多糖類ではなく、タンパク質の SERS を選択的に測定している可能性

が高いのです。その理由は、銀ナノ粒子と親和性が高いことが知られているチッソ原子、イオウ原子などを含む官能基が多糖類に含まれていないので、これらの多糖は SERS を示す可能性は小さいからです。このような結果から、SERS を用いて、細胞表面のタンパク質分子を高感度で迅速にイメージングと同定できる可能性が生まれました。

その後、高感度で分子の変化を検知できる SERS の特長を生かして、出芽酵母表面におけるタンパク質の発現過程の変化を実時間で追跡することに成功しました (図 1)。細胞分裂時に特有なタンパク質を *in situ* で初めて検出し、さらにそのタンパク質の同定に成功しました (論文投稿中)。

研究の過程で、酵母では銀ナノ粒子は細胞表面に自発的に効率よく結合すること、一方、大腸菌では銀ナノ粒子が菌体表面に結合する効率が小さいことが判明しました。これが動機となって 1 個の菌体表面を狙って強制的に銀ナノ粒子を“その場”形成して、大腸菌表面の生体分子の SERS 画像とスペクトルを測定するという着想を得ました (図 2、スペクトルは省略)。この“その場形成法”は、分担者 (伊藤) が受けた若手研究 (B) の成果です。

さらに、研究対象を拡張して大腸菌の研究に着手しました。その過程で、銀のナノ粒子が常に菌体の先端近傍に形成されることを発見しました (図 2g)。これは、光トラップが安定に菌体を捕捉したとき、菌体の長軸がガラス面に垂直になる (図 2c, d) ことに起因しています。この結果から、菌体の任意の場所に銀ナノ粒子を形成して、その部分で生体分子の SERS スペクトルを測定したいという新しい着想に到達しました。

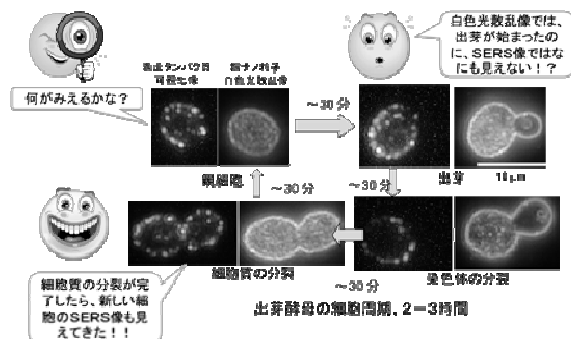


図1. 銀ナノ粒子をその表面に結合させた酵母細胞. その出芽から娘細胞形成直前までの細胞周期 (2-3 時間) を同じ視野で測定した白色光の弾性散乱画像. この画像と 532 nm 励起による SERS 画像すなわち表面タンパク質可視化像との比較. 各画像は実時間で取得可能.

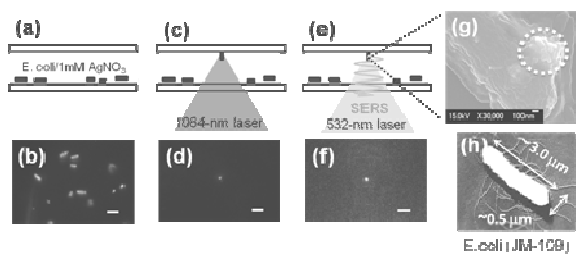


図2. (a)硝酸銀水溶液中における大腸菌模式図. (b)同光学顕微鏡画像(スケールバー3・μm). (c)光トラップされた1個の大腸菌模式図. (d)同光学顕微鏡画像. 丸い点として見えるので菌体の長軸がカバーガラス面と垂直になっていると推定. 垂直に光トラップされた場合、エネルギー的に最も安定となる. (e)トラップされた1個の菌体に532 nm レーザを照射して、光還元によりその場で銀ナノ粒子を形成し、同時にSERSを測定. (f)得られたSERS 画像. (g)SERS測定に使用した菌体のSEM画像. 菌体の先端近傍に銀が付着(破線円)している. (h)菌体のSEM画像.

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6件)

①Y. Kitahama, T. Itoh, T. Ishido, K. Hirano, M. Ishikawa, Surface-enhanced Raman Scattering from Photo-reduced Ag Nanoparticles on an Optically-trapped Single Bacterium, *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **2011**, in press.

②H. Kudo, T. Itoh, T. Kashiwagi, M. Ishikawa, H. Takeuchi, H. Uketa, Surface enhanced Raman scattering spectroscopy of Ag nanoparticle aggregates directly photo-reduced on pathogenic bacterium (*Helicobacter pylori*), *J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry*, **2011**, in press.

③T. Itoh, K. Yoshida, H. Tamaru, V. Biju, M. Ishikawa, Experimental demonstration of the electromagnetic mechanism underlying surface enhanced Raman scattering using single nanoparticle spectroscopy, *J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry*, **2011**, 219, 167-179.

④M. S. Kiran, Itoh, T., Yoshida, K., Kawashima, N., Biju, V., Ishikawa, M., Selective Detection of HbA1c using Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1342-1348.

⑤A. Sujith, T. Itoh, H. Abe, A. A. Anas, V. Biju, M. Ishikawa, Imaging the cell wall of living single yeast cells using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 394, 1803-1809.

⑥伊藤 民武、安部 博子、Biju V. P., 石川 満、表面増強ラマン散乱 (SERS) 分光法

による細胞表面の観察、産総研 TODAY、2009、9、4.

〔学会発表〕(計12件)

①伊藤 民武、「表面増強ラマン分光の基礎とその進展」単一ナノ粒子分光を用いた表面増強ラマン散乱メカニズムの解明と生体サンプルへの応用、岡山理科大学工学部バイオ・応用化学科セミナー、2011/01/19、岡山理科大学工学部.

②北濱康孝、伊藤 民武、石堂 智美、平野 研、石川 満、単一大腸菌表面に光還元合成した銀ナノ粒子からの表面増強ラマン散乱、2010年秋季 第71回 応用物理学会学術講演会、2010/09/16、長崎大学文教キャンパス.

③M. Ishikawa, M. S. Kiran, V. Biju, T. Itoh, Selective detection and identification of protein molecules using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), Dec. 19, 2010, Honolulu, HA, USA.

④北濱康孝、伊藤 民武、石堂智美、平野研、石川 満、レーザートラップされた大腸菌の表面増強共鳴ラマン散乱、日本化学会第90春季年会(2010)、2010/03/28、近畿大学本部キャンパス.

⑤伊藤 民武、M. S. KIRAN、吉田健一、川島永子、V. Biju、石川 満、表面増強共鳴ラマン散乱分光による糖尿病指標分子の識別、2010年春季 第57回 応用物理学会 学術講演会、2010/03/20、東海大学湘南キャンパス.

⑥M. Kiran、伊藤民武、川島永子、吉田健一、V. Biju、石川 満、Surface enhanced resonance Raman scattering of HbA and HbA1c: Implications for diabetic diagnosis、第47回 日本生物物理学会年会、2009/10/31、アスティ徳島.

⑦M. Kiran、伊藤民武、安部博子、吉田健一、V. Biju、石川 満、細胞分裂周期にともない変化する酵母細胞表面タンパク質の表面増強ラマン散乱観察、2009年秋季 第70回 応用物理学会 学術講演会、2009/09/08、富山大学.

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/hri/group/nrg/list.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 満 (ISHIKAWA MITSURU)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究グループ長

研究者番号：70356434

(2) 研究分担者

伊藤 民武 (ITOHI TAMITAKE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工
学研究部門・主任研究員

研究者番号：00351742

安部 博子 (ABE HIROKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工
学研究部門・研究員

研究者番号：40363220