

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15418

研究課題名（和文）複数の細胞内小分子を同時に解析可能なラマンタグの開発

研究課題名（英文）Development of Raman tags to detect the small biomolecules

研究代表者

江越 脩祐（Egoshi, Syusuke）

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：60755932

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）：本研究では生細胞内の複数の低分子化合物を観察するための手法として、安定同位体元素を用いたラマンタグの開発を行なった。安定同位体を用いることでほぼ同じ構造でありながら検出波数が 135cm^{-1} 異なるアルキンの開発に成功して、ステアリン酸とオレイン酸という二つの構造が非常に類似した脂肪酸の細胞内動態を一度に区別して観察する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発されたイメージング法を用いることで、構造の類似する複数の低分子化合物間の相互作用を観察することが可能となった。また、本手法は低分子化合物に限らず様々な生体内分子にも適応可能であり、複雑な生体内分子間の相互作用の解析へ応用展開されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that vibrational frequencies of terminal alkyne were shifted 135cm^{-1} upon deuteration. By using the protonated and deuterated alkynes, we achieved the two-color Raman imaging to monitor the intracellular distributions of similar small biomolecules simultaneously, such as a stearic acid and an oleic acid. This imaging technique can be adapted to detect various small molecules in living cells and is expected to be applied various research fields.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ラマンイメージング アルキン 安定同位体元素

1. 研究開始当初の背景

生命はタンパク質、核酸、脂質、化合物など、様々な組み合わせの分子間相互作用の連鎖で成り立っている。そのため、それぞれの細胞内動態を明らかにすると同時に、細胞内の様々な相互作用を解析することが薬剤の開発や作用機序解明研究で重要である。しかし、低分子の生理活性物質と生体内の低分子化合物の相互作用を観察することは非常に難しく、それらを簡便に観察する手法が求められていた。

2. 研究の目的

蛍光顕微鏡の著しい発展に伴って、細胞小器官、タンパク質、核酸、脂質、化合物などは、その細胞内の動態だけでなくそれぞれの相互作用を観察・解析することが可能になった。また、近年ではラマン顕微鏡を用いることで、蛍光イメージングへの適応が難しかった分子量 300 以下の低分子化合物の細胞内局在が解析できるようになった。加えて、誘導ラマン散乱顕微鏡と蛍光イメージング法と組み合わせることも低分子化合物とタンパク質との相互作用を観察することもできるようになった。一方で、複数の低分子化合物間の相互作用やそれぞれの細胞内動態を同時に解析することはきわめて難しいままである。この問題を解決するため、複数の細胞内小分子を同時に観察可能なラマンタグの開発を目指した。

3. 研究の方法

生細胞内で様々な低分子化合物を観察する手法として、アルキンタグラマンイメージング法を応用した (*J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133, 6102.). 観測するラマン散乱光は分子の振動に応じて生じる光である。アルキン (C≡C) の分子振動は極めて特異的な振動であり、生体内分子に由来するラマン散乱光が生じないサイレント領域 (1800-2600 cm^{-1}) に強いシグナルを示すため、ラマン顕微鏡を用いた測定によって細胞内でもアルキンを選択的に検出してその強度分布をイメージングすることができる。また、アルキンは共役構造に依存して検出されるラマンシフト値が異なるため、その共役構造の異なるアルキンをそれぞれ目的の小分子のタグとすることで、複数の小分子の局在を一度に解析することも可能である (*J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 134, 20681.). しかし、共役構造の違いはそれぞれのタグの分子サイズが異なることにほかならず、類似した小分子のイメージングには向かない上、既存のアルキンタグはそのほとんどが 2100 ~ 2250 cm^{-1} で検出され、サイレント領域に比べて非常に狭い。(図 1)。そこで本研究では、安定同位体標識により生細胞イメージングに適する様々なラマンタグの開発を試みた。

・ HeLa細胞の平均ラマンスペクトル

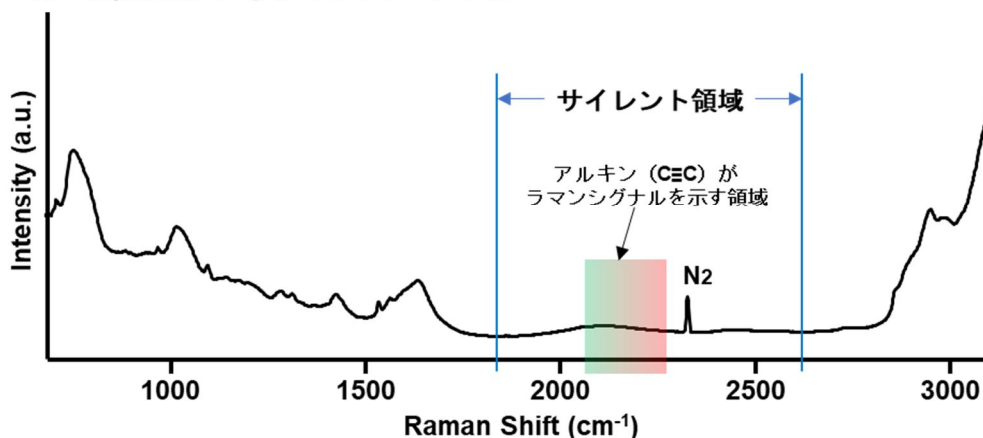


図 1. 細胞内の分子がラマンシグナルを示さないサイレント領域とアルキンがラマンシグナルを示す領域の比較図

4. 研究成果

まず、末端アルキン (H-alkyne) を重水素化することでアルキンのラマンシグナルが低波数側に 135 m^{-1} 程シフトすることを見出した。この重水素化アルキン (D-alkyne) は H-alkyne と構造がほとんど同じで分子量が一しか変わらないため、これら二つのアルキンをラマンタグとして用いることで、非常に類似した構造を持つ 2 種類の低分子化合物を細胞内で区別して観察でき

ると考えられた．そこでまず D-alkyne が生細胞イメージングに適したラマンタグであるか調査した．その結果，共役 D-alkyne は水中では H-alkyne への変換が速いため生細胞イメージングには適さないが，非共役 D-alkyne であれば H-alkyne への変換が遅く，生細胞イメージングへの運用が可能であった．また，水溶液中の D-alkyne から H-alkyne への変換は，温度や pH に依存することが明らかになり，D-alkyne が細胞内の温度や pH のセンサーとしても働くことも期待された．

生体内で構造が非常に類似した低分子化合物として長鎖脂肪酸があげられる．長鎖脂肪酸は同じ炭素数でもその不飽和度(二重結合の数)によってその細胞内動態が異なることが知られている．そこで，D-alkyne で標識した C18 飽和脂肪酸のステアリン酸 (D-alk-SA) と H-alkyne で標識した C18 不飽和脂肪酸のオレイン酸 (H-alk-OA) を用いてそれぞれの細胞内動態の観察を行った (図 2) ．これら二つの脂肪酸の間には分子量の差が 3 しかない．しかし，それぞれの投与濃度や投与時間を変化させて各脂肪酸の細胞内動態を検証した結果，D-alk-SA は細胞に投与すると脂肪滴を経由して生体脂質膜や細胞内全体へと移行した．一方で H-alk-OA は長時間投与してもそのほとんどが脂肪滴へとどまと共に，細胞内の D-alk-SA を脂肪滴へ蓄積させる様子が確認された．このように，H-alkyne と D-alkyne をそれぞれラマンタグとして用いることで，構造がほぼ同じステアリン酸とオレイン酸それぞれの細胞内動態だけではなく，オレイン酸がステアリン酸を脂肪滴に蓄積させる作用を解析することができた．

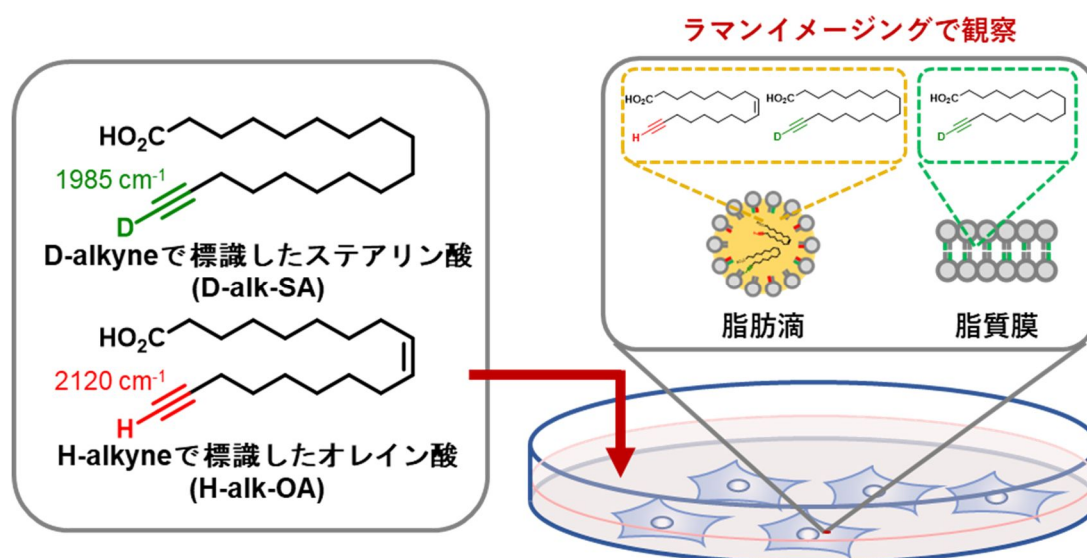


図 2 .D-alkyne 及び H-alkyne をラマンタグとして用いた C18 飽和脂肪酸 (ステアリン酸) と C18 不飽和脂肪酸 (オレイン酸) の生細胞イメージングの概念図 (*Org. Biomol. Chem.*, 2021, 19, 8232.)

また，H-alkyne，D-alkyne の他に内部 diyne をラマンタグとして用いることで，それぞれを導入した 3 種の低分子化合物の細胞内局在を同時に観察することができた．これらのアルキンを安定同位体炭素で標識することで，細胞内でもより多くの低分子化合物を同時に観察することが可能となる．アルキンの他にも，C-D 結合や重水素化したオレフィンなどが細胞内でも特異的に検出できるラマンタグとなることを明らかにしており (*Chem. Commun.*, 2021, 57, 2180.)，それらも用いることで，より多くの低分子化合物間の相互作用の解析ができると期待される．加えて，ラマンタグを用いたイメージング法は低分子化合物に限らず，核酸，タンパク質，脂質など様々な生体内分子への応用が可能である．本手法がより複雑な生体内分子間の相互作用の解析へ応用展開されることが期待された．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Egoshi Syusuke, Dodo Kosuke, Sodeoka Mikiko	4. 巻 70
2. 論文標題 Deuterium Raman imaging for lipid analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Opinion in Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 102181 ~ 102181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2022.102181	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 Toh Kohei, Nishio Kosuke, Nakagawa Reiko, Egoshi Syusuke, Abo Masahiro, Perron Amelie, Sato Shin-ichi, Okumura Naoki, Koizumi Noriko, Dodo Kosuke, Sodeoka Mikiko, Uesugi Motonari	4. 巻 144
2. 論文標題 Chemoproteomic Identification of Blue-Light-Damaged Proteins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 20171 ~ 20176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c07180	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 Egoshi Syusuke, Dodo Kosuke, Ohgane Kenji, Sodeoka Mikiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Deuteration of terminal alkynes realizes simultaneous live cell Raman imaging of similar alkyne-tagged biomolecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 8232 ~ 8236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D10B01479J	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 Kanoh Naoki, Terashima Ryusei, Nishiyama Hiromichi, Terajima Yuta, Nagasawa Shota, Sasano Yusuke, Iwabuchi Yoshiharu, Saito Hiroaki, Egoshi Syusuke, Dodo Kosuke, Sodeoka Mikiko, Pan Chengqian, Ikeuchi Yoshinobu, Nishimura Shinichi, Kakeya Hideaki	4. 巻 86
2. 論文標題 Design, Synthesis, and Antifungal Activity of 16,17-Dihydroheronamide C and <i>ent</i> -Heronamide C	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 16249 ~ 16258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.1c01761	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 Kosuke Dodo, Ayato Sato, Yuki Tamura, Syusuke Egoshi, Koichi Fujiwara, Kana Oonuma, Shuhei Nakao, Naoki Terayama and Mikiko Sodeoka	4. 巻 57
2. 論文標題 Synthesis of deuterated c-linolenic acid and application for biological studies: metabolic tuning and Raman imaging	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 chemical communications	6. 最初と最後の頁 2180-2183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc07824g	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 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 江越 脩祐、どど 孝介、大金 賢司、袖岡 幹子
2. 発表標題 重水素を用いた低分子化合物の生細胞ラマンイメージングの新展開
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第16回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 どど 孝介、江越 脩祐、佐藤 綾人、田村 結城、大金 賢司、藤原 広一、大沼 可奈、中尾 周平、寺山 直樹、袖岡 幹子
2. 発表標題 重水素を利用した γ -リノレン酸の作用機序解析と新規ラマンタグへの展開
3. 学会等名 第39回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dodo Kosuke, Egoshi Syusuke, Sato Ayato, Tamura Yuki, Ohgane Kenji, Fujiwara Koichi, Oonuma Kana, Nakao Shuhei, Terayama Naoki, Sodeoka Mikiko
2. 発表標題 Application of Deuterium for Mechanistic Study of γ -Linolenic Acid and Development of Novel Raman Tags
3. 学会等名 International Chemical Biology Society (ICBS) 11th Annual Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江越脩祐、どど孝介、佐藤綾人、田村結城、藤原広一、大沼可奈、中尾周平、寺山直樹、袖岡幹子
2. 発表標題 重水素とラマン分光法を用いた -リノレン酸の抗がん作用メカニズム解明研究
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江越脩祐、どど孝介、大金賢司、袖岡幹子
2. 発表標題 アルキンと重水素を用いたラマンイメージング研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：63名、技術情報協会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 405
3. 書名 ラマン分光スペクトルデータ解析事例集	

〔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