トピックス

微小タグとラマン顕微鏡による小分子イメージング

藤田克昌^{1,2}, 袖岡幹子^{2,3}¹大阪大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻²ERATO・JST³理化学研究所基幹研究所

1. 見えているのは分子の特性？ラベルの特性？

蛍光ラベルは、観察対象となる生体分子や外部から投入した化合物の所在を明らかにする。しかし、蛍光ラベルは万能ではなく、ラベリングすることによる化学的、生物学的な特性の変化が現れる場合がある。特に小さな構造の分子の場合、その特性変化は顕著である。たとえば、抗がん剤として知られるフルオロウラシル (5-FU) の分子量 130 に対して、代表的な蛍光団の Rhodamine 6G は分子量 479 である。これでは、化合物の特性を観察しているのか、ラベルの特性を観察しているのかわからない。

最近、われわれは、観察対象が小さな分子であっても、その機能を阻害しない微小なタグの開発を行っている。蛍光観察以外にもさまざまな光学的な顕微観察法があり、その中でもラマン散乱顕微鏡は、試料内の分子の振動を検出することで分子の所在を明らかにする。われわれはユニークな分子振動を示す構造を微小なタグとして利用し、ラマン散乱顕微鏡により検出することを試みた。

2. ラマン散乱とラマンタグ

ラマン散乱とは、光を分子に照射した際に生じる、光の波長変化の効果であり、その波長の変化量は試料中の分子の振動数に依存する¹⁾。その振動数は分子の構造に固有であるため、ラマン散乱のスペクトルを分光計測すれば、どのような構造の分子が試料中に存在するか把握できる。

波長 532 nm の光を細胞に照射し、554-633 nm の散乱光 (波数 $\sim 750\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ のラマンシフトに相当) の強度を測定して得たラマン散乱スペクトルを図 1a に示す。細胞内分子のラマン散乱は $1800\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ の波数領域に強いラマン散乱をもたない (Silent Region とよばれる) ため、この領域にラマン散乱ピークを示す

官能基を分子に導入すれば、ラマン散乱を用いて、その分子を細胞内で特異的に検出できると考えられる。

われわれは、この領域にラマン散乱ピークを示す分子構造として、炭素-炭素 3 重結合を有するアルキニル基に着目した²⁾。アルキニル基は $2100\text{-}2300\text{ cm}^{-1}$ に炭素-炭素 3 重結合に由来するラマン散乱ピークをもつ。生体内には 3 重結合を有する分子はほとんど存在しないため、アルキニル基由来のラマン散乱光は、他の分子からの散乱光と分離して検出される。もっとも小さなアルキニル基であるエチニル基は、炭素 2 個と水素 1 個のみで構成されることから、従来の蛍光ラベルよりも格段に小さいタグとして使用できると考えた。

図 1b にエチニル基を有する化合物として EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の構造を示す。EdU と細胞のスペクトルを比較 (図 1a) すると、 2122 cm^{-1} に炭素 3 重結合の伸縮振動 (炭素原子間の距離が伸び縮みする振動) に由来する強いラマン散乱ピークが、上で述べた "Silent Region" に現れていることがわかる。

3. 微小タグを利用した小分子イメージング

われわれは、EdU を HeLa 細胞内に取り込ませ、その細胞内分布をラマン散乱顕微鏡³⁾により観察した。EdU はデオキシウリジン (dU) にエチニル基を導入した構造をもっており、DNA の原料であるデオキシチミジン (dT) と間違えて細胞に取り込まれ、細胞の DNA 合成にあわせて、核内に集積すると予想される。

図 2 に EdU と共に 12 時間培養した HeLa 細胞から得られたラマン散乱スペクトルを示す。細胞由来のラマン散乱光に加え、核ではエチニル基に由来するラマン散乱ピークが 2123 cm^{-1} の波数において 15 cm^{-1} 程度の広がりをもって確認できる (ラマン散乱ピークは分子の周辺環境により若干シフトまた広がることもあり、この測定では、図 1 の結果よりわずかにずれた位置にエチニル基由来のラマン散乱が現れたと考えられる)。

Imaging Small Molecules in Living Cells with a Tiny Tag and Raman Microscopy

Katsumasa FUJITA^{1,2} and Mikiko SODEOKA^{2,3}¹Department of Applied Physics, Osaka University²Sodeoka Live Cell Chemistry Project, ERATO, Japan Science and Technology Agency³RIKEN Advanced Science Institute

このエチニル基によるラマン散乱光の分布を図3に示す。エチニル基の他、シトクローム C、タンパク質、脂質分子内の結合に帰属できるラマン散乱光の分布も示した。これらの図より、エチニル基のラマン散乱ピークの細胞核内への局在を確認できる。さらに、EdU との培養時間を変化させながら同様の観察を行った結

図1 (a) HeLa 細胞、および EdU (固体) のラマン散乱スペクトル。 (b) EdU の分子構造。

図2 EdU を導入した HeLa 細胞のラマン散乱スペクトル。

図3 EdU を導入した HeLa 細胞のラマン像。それぞれ、2124, 749, 1685, 2857 cm^{-1} のラマン散乱の強度分布を示す。励起波長 532 nm, スケールバー 10 μm 。撮像時間約 40 分。画像ピクセル数、および空間分解能は 190×400 、および約 0.3 μm (回折限界)。

果、時間と共に EdU の核内への取り込みが進行し、約 21 時間後、視野内のほぼすべての細胞において EdU の取り込みを確認できた。この EdU の核内蓄積の時間応答は、細胞の増殖周期とほぼ同じであり、タグの導入による dU の特性変化はほとんどないと考えられる。

4. ラマンタグの可能性

ラマンタグを用いれば従来の蛍光観察法では追跡できなかった小分子の細胞内の挙動を追跡できる。しかし、本手法の最大の弱点は、ラマン散乱の散乱効率が低く、長い測定時間を要すること、低濃度の分子の検出が難しいこと (実験結果より、EdU の場合、数 100 μM の濃度が必要と推測) にある。しかし、今後、より高感度に分子振動を検出できるとされるコヒーレントラマン散乱^{4), 5)} の利用や、より高い散乱効率をもつラマンタグの開発により、よりダイナミックな小分子の細胞内動態の観察が実現できると考えている。

“Silent Region” の利用は、アルキニル基の導入以外でも可能である。たとえば、水素分子を重水素で置換すれば、CD 結合の伸縮振動を“Silent Region”に出現させられる。重水素を含むアミノ酸を細胞内に取り込ませ、そのタンパク質代謝を可視化した報告がある⁶⁾。ラマン散乱による分子振動検出も以前と比べ技術的に容易になっており、それを利用した新しい細胞分析法・イメージング法が今後も登場すると期待している。

文 献

- 1) 濱口宏夫, 平川暁子 (1988) ラマン分光法, 学会出版センター。
- 2) Yamakoshi, H. *et al.* (2011) *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6102-6105.
- 3) Hamada, K. *et al.* (2008) *J. Biomed. Opt.* **13**, 044027.
- 4) Cheng, J. X., Xie, X. S. (2004) *J. Phys. Chem. B* **108**, 827-840.
- 5) Freudiger, C. W. *et al.* (2008) *Science* **322**, 1857-1861.
- 6) Manen, H. J. *et al.* (2008) *Anal. Chem.* **80**, 9576-9582.

藤田 克昌

藤田 克昌 (ふじた かつまさ)

大阪大学大学院工学研究科准教授
2000 年大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士 (工学)。日本学術振興会研究員、大阪大学学助手を経て、07 年より現職。08 年から ERATO グループリーダーを兼務。研究内容: 生体観察のための光学顕微鏡の開発。

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

E-mail: fujita@ap.eng.osaka-u.ac.jp

袖岡 幹子

袖岡 幹子 (そでおか みきこ)

理化学研究所主任研究員
1983 年千葉大学大学院薬学研究科博士前期課程修了 (89 年薬学博士)。相模中央化学研究所、北海道大学、ハーバード大学、東京大学、東北大学を経て、06 年から現職。08 年から ERATO 研究総括を兼務。

研究内容: 生命現象メカニズムの解明に役立つ新しい化合物や方法の開発。

連絡先: 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

E-mail: sodeoka@riken.jp