



凝集特性を活用して 酵素活性をラマンで検出

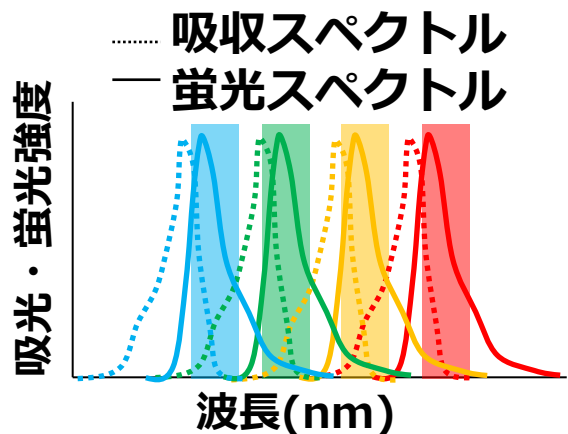
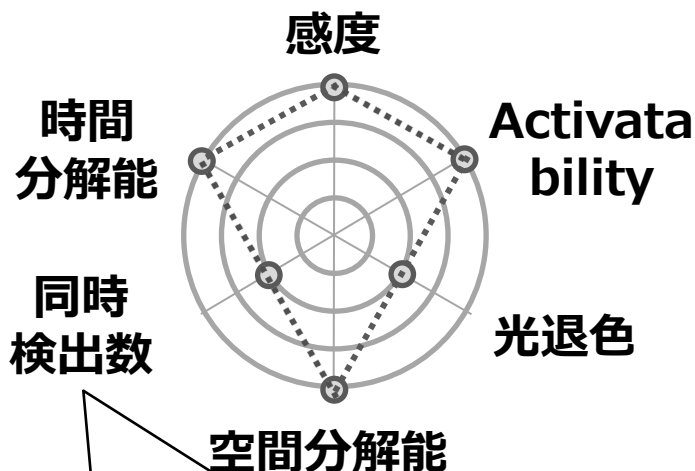
神谷真子

東京科学大学 総合研究院 化学生命科学研究所

2025.6.19
JST新技術説明会

蛍光とラマンの比較

蛍光イメージング法



同時検出：4-5種類

ラマンイメージング法

ラマン顕微鏡
の高度化

時間
分解能

同時
検出数

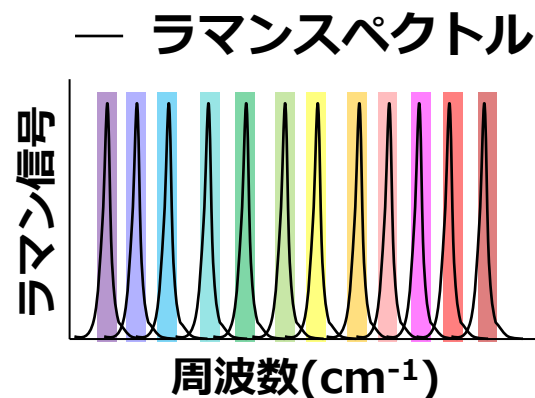
空間分解能

感度

● 既存法

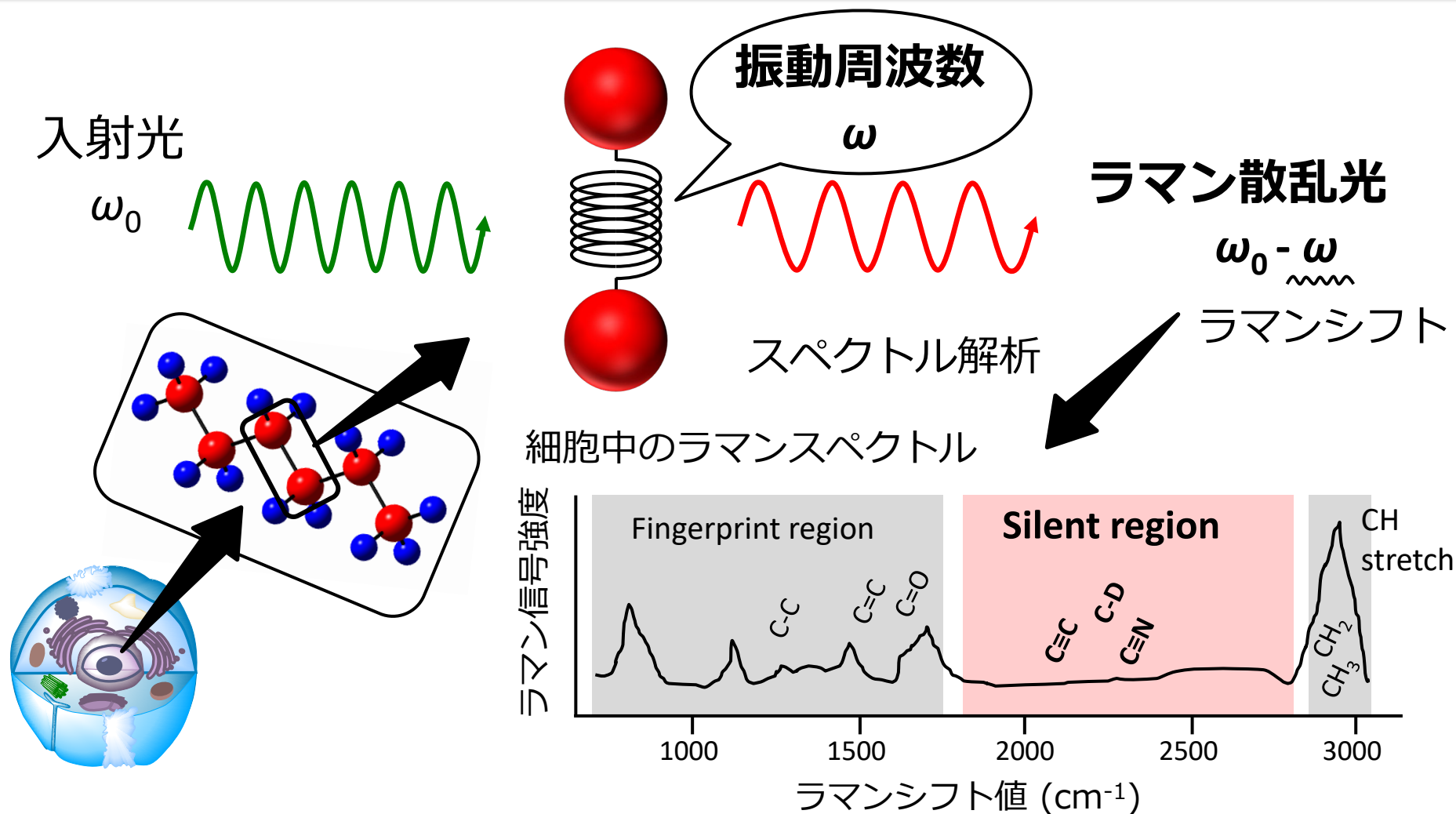
Activatability

光退色



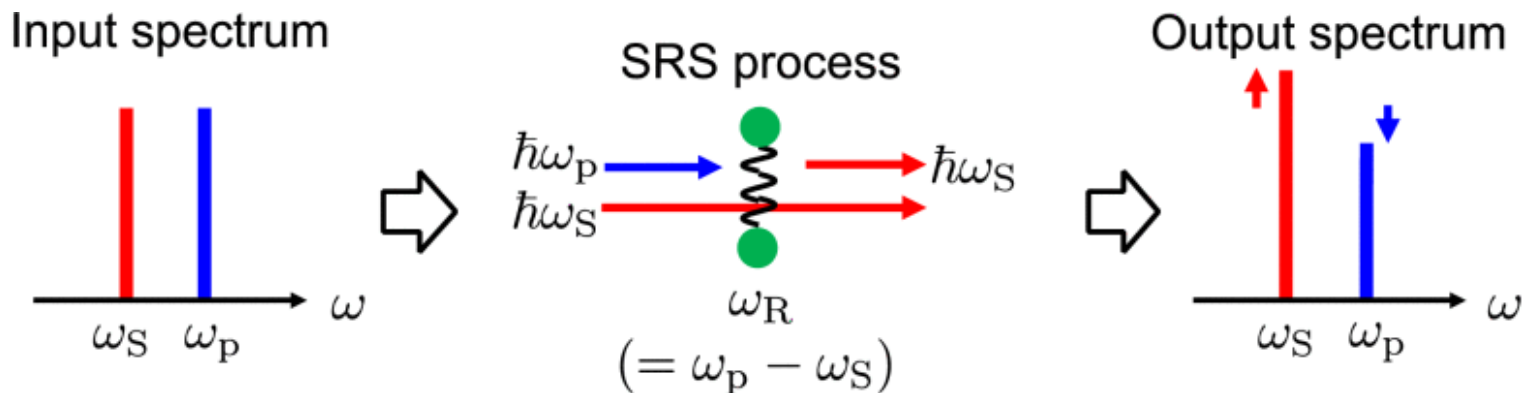
同時検出：10種類以上

ラマン顕微法による生体観察



ラマン顕微法では分子固有の振動情報を抽出できるため、
非標識で生体を観察することができる

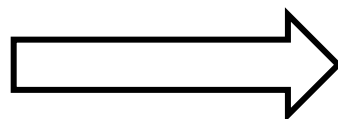
誘導ラマン散乱 (SRS) 顕微鏡



IEEE. J. Sel. Top. Quantum Electron. **2019**,
25, 1-11

励起光 (ω_p) と
ストークス光 (ω_S) の
2色のパルスレーザー
を試料に入射

誘導放出



誘導ラマン散乱 (SRS) 信号
(励起光の減衰) を検出
自発ラマンと比べて
S/N比は**4-6桁**向上

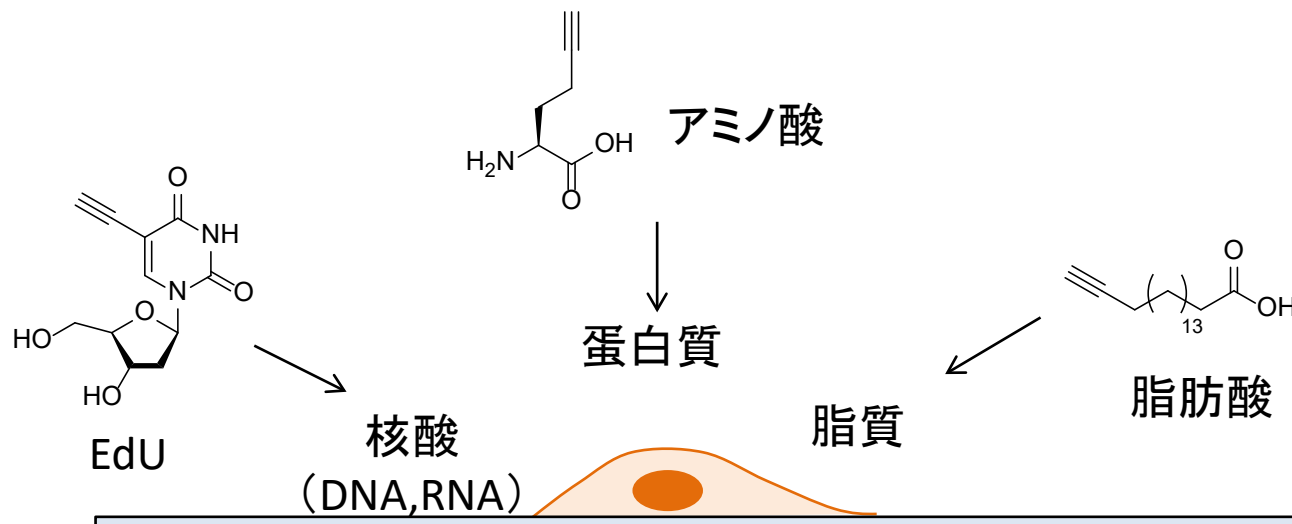
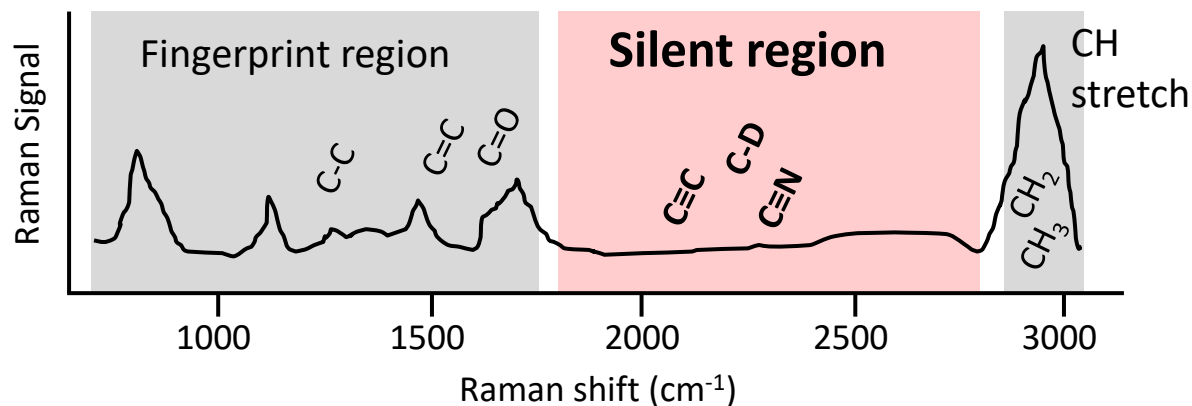
一般的な自発ラマン顕微鏡：

1秒間に1ピクセル

SRS分光顕微鏡： **500×500ピクセルを1秒間に約30フレーム**
(ビデオレート)

**誘導ラマン散乱 (SRS) を利用することで、生体試料にも
適用可能な高速ラマンイメージングが可能である**

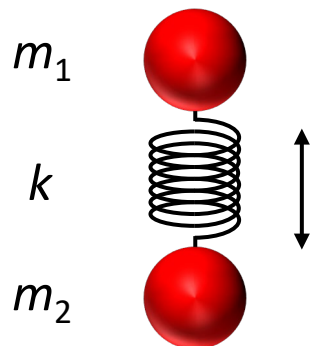
Raman spectra of cells



H. Yamakoshi *et al.*, J. Am. Chem. Soc. **133**, 6102 (2011).

L. Wei *et al.*, Nat. Methods **11**, 410 (2014)

既存の多重検出ラマンプローブ



$$\omega = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}, \quad \mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

同位体置換などによる多色化が可能

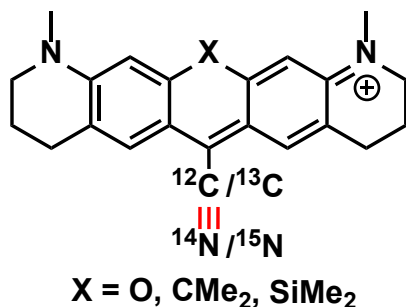
m_1, m_2 : 質量

μ : 換算質量

k : バネ定数

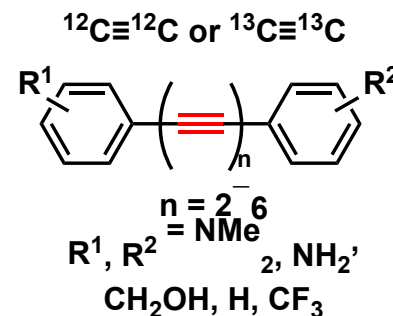
ω : 振動周波数

➤ MARS dye (9CN xanthene-based)



L. Wei et al., Nature 544, 465 (2017)

➤ Carbow (polyynes-based)



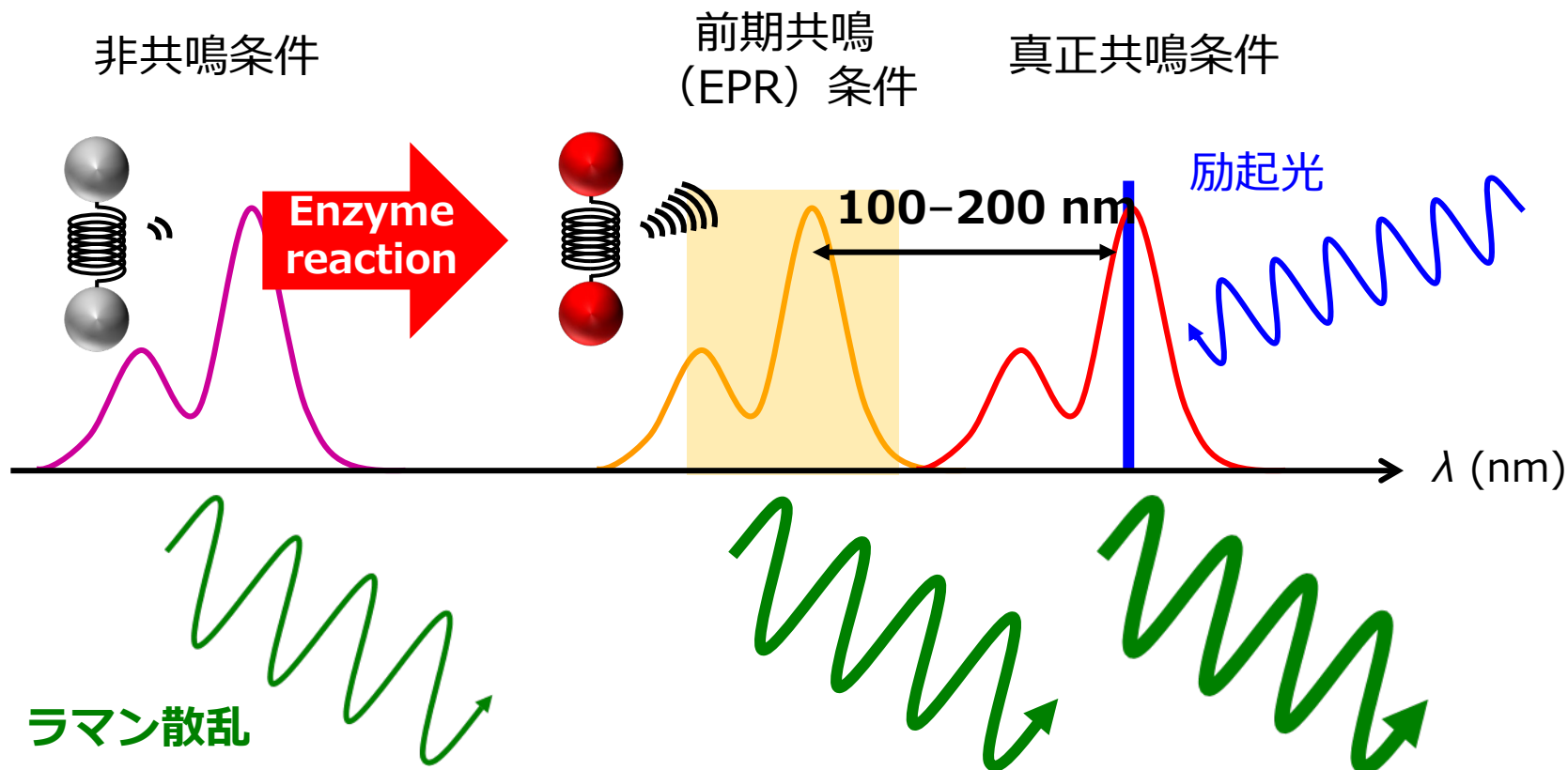
F. Hu et al., Nature Methods 15, 194 (2018)

Always-on型であり、ラベル化剤としての用途が主であった

前期共鳴 (EPR) ラマン散乱

共鳴ラマン効果：

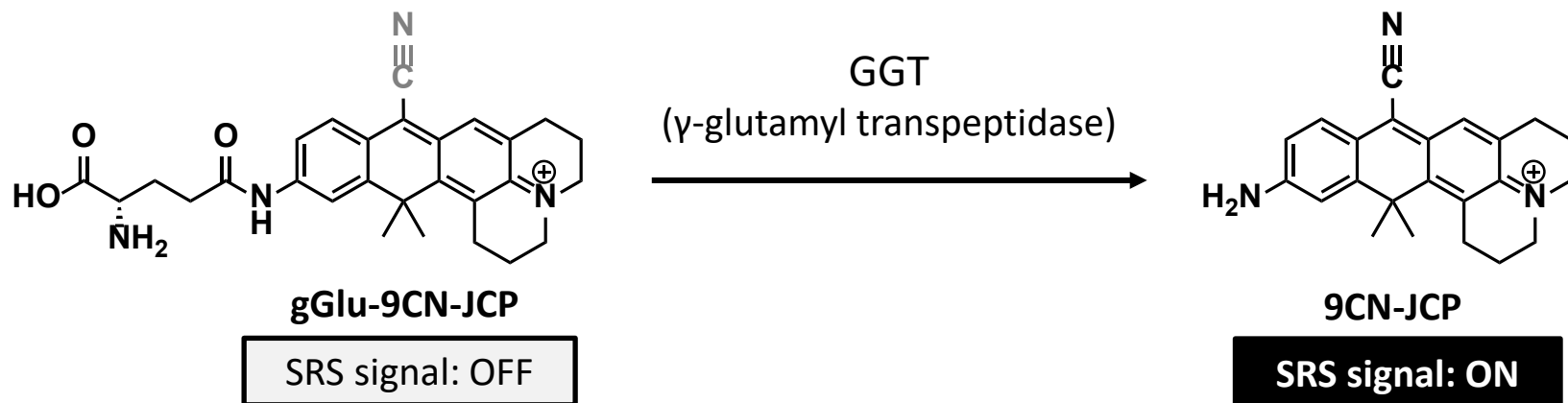
励起光の波長が分子の吸収波長に近づくほどラマン散乱強度が上昇する



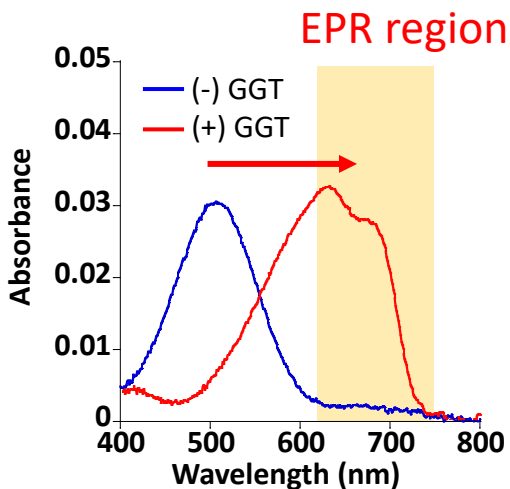
Nature, **2017**, 544, 465–470; *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **1976**, 27, 465–491

標的分子との反応による吸収波長の長波長化に基づき、
SRS信号を増強する

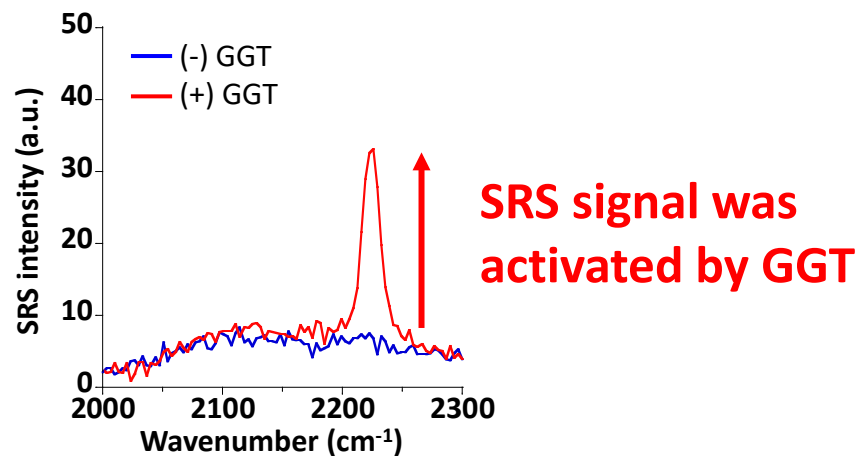
Activatable型ラマンプローブ



Absorption spectra (in PBS)

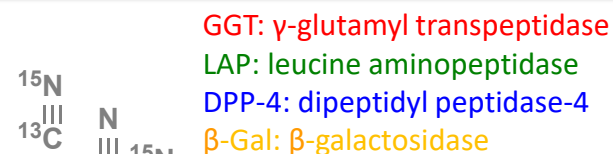


SRS spectra (in PBS)

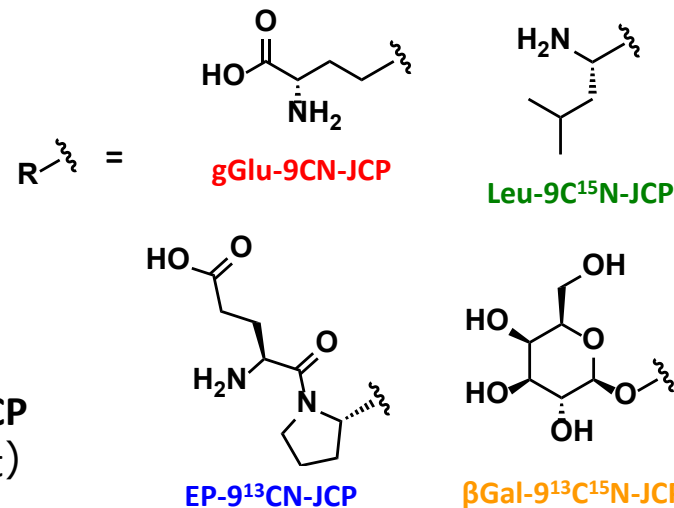
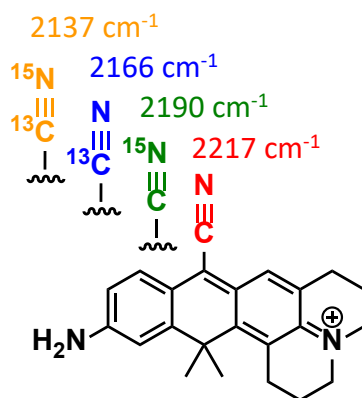


The SRS signal was activated upon reaction with GGT due to the shift in absorption spectra from non-resonant to EPR.

ラマンプローブの多重化



GGT
LAP
DPP-4
 β -Gal

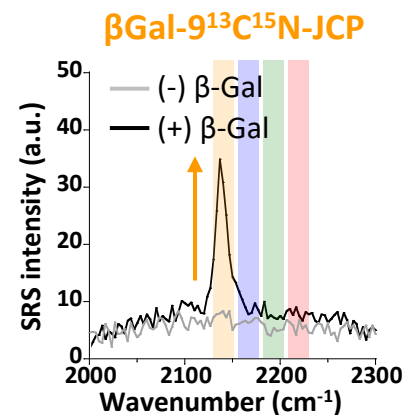
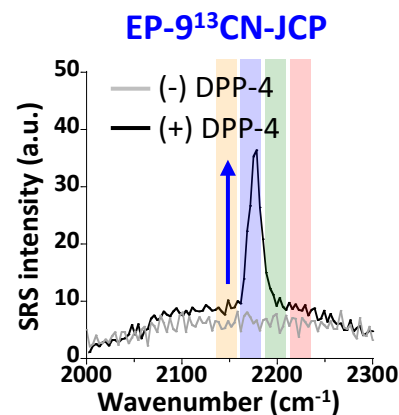
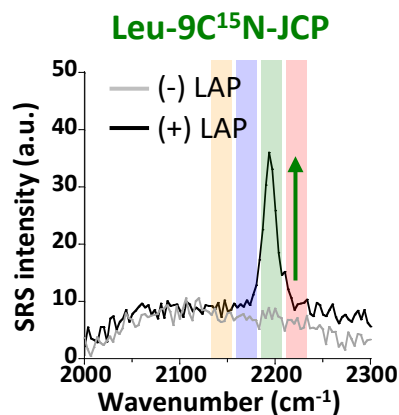
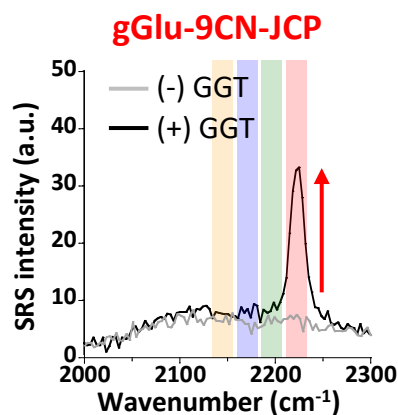


Isotope-edited 9CN-JCP probes
(non-resonance)

SRS signal: OFF

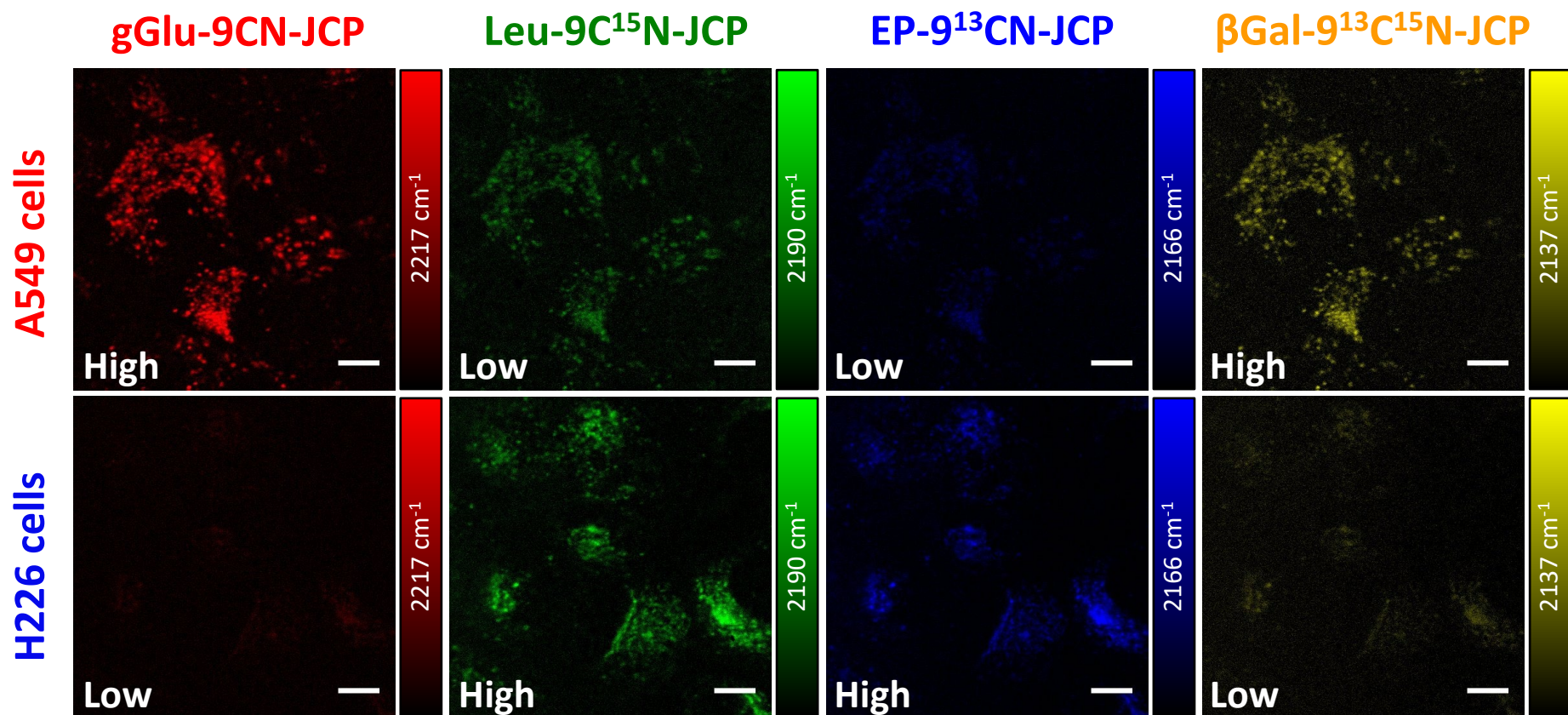
Isotope-edited 9CN-JCP
(Electronic pre-resonant)

SRS signal: ON



Four different enzyme activities can be evaluated simultaneously
by using a mixture of isotope-edited 9CN-JCP probes

複数酵素活性の同時検出



gGlu-9CN-JCP, Leu-9C¹⁵N-JCP, EP-9¹³CN-JCP: **10 μM** , βGal-9¹³C¹⁵N-JCP: **20 μM** .

Acquisition time was **167 s**. Scale bar: 10 μm .

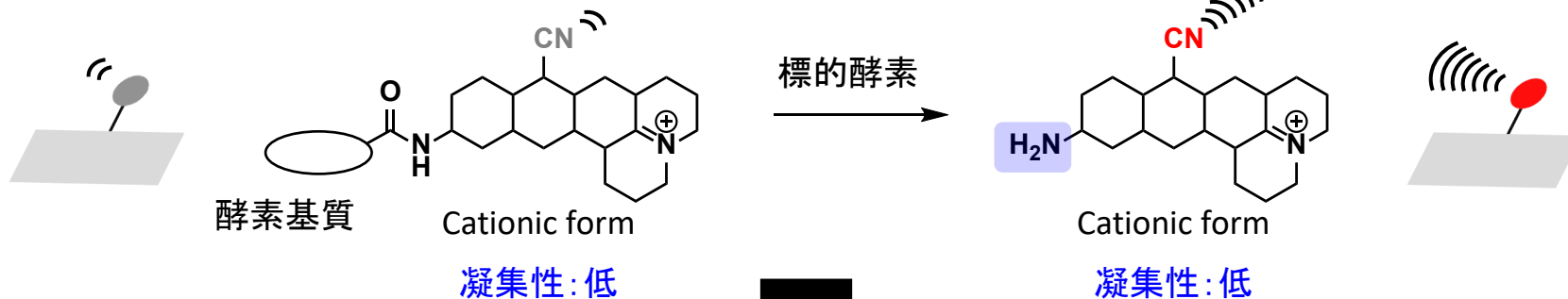
Fujioka H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2020
(Selected to Editors' choice)

SRS images were acquired by subtracting 2250 cm^{-1} image as a background.

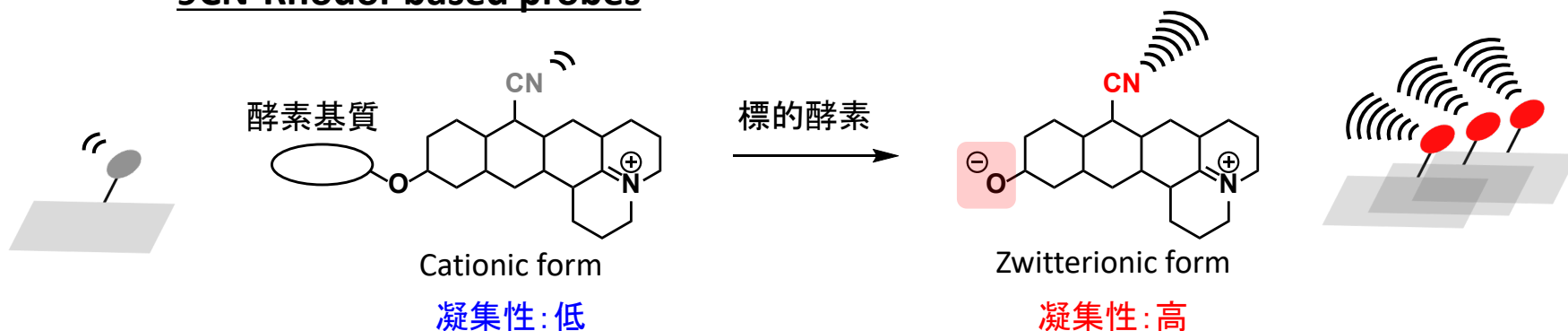
The four different enzyme activities in live cells were simultaneously detected as SRS images at distinct Raman frequencies

標的酵素発現領域の特異的染色 が可能なラマンプローブの開発

9CN-Pyronin-based probes

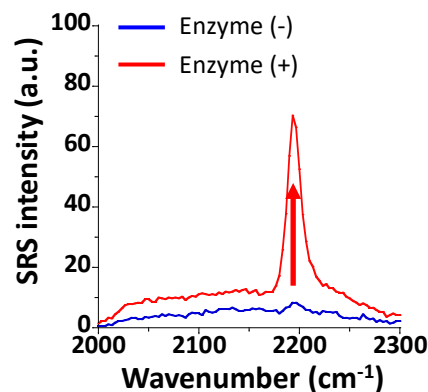
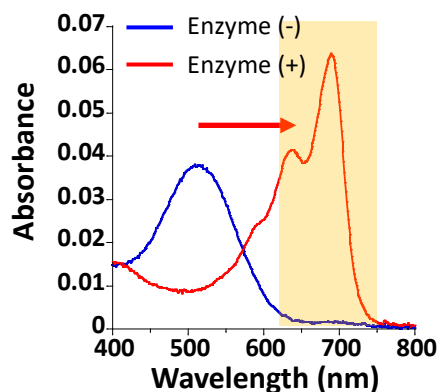
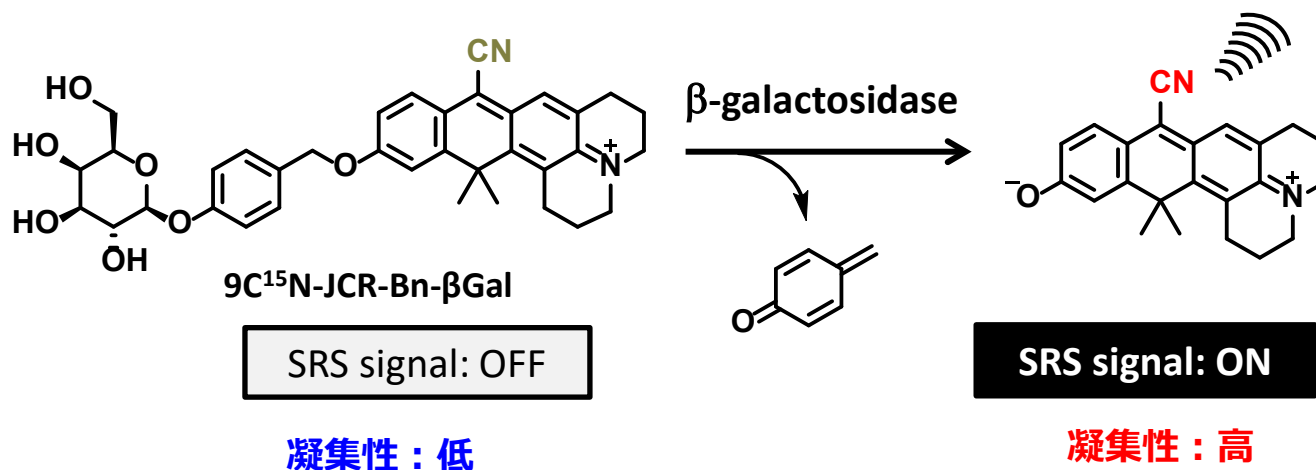


9CN-Rhodol-based probes



生理的条件下で凝集性の高い9CN-Rhodol母核を活用して、凝集体形成によって酵素発現領域に留まるプローブを開発する

βGalプローブの*in vitro*評価



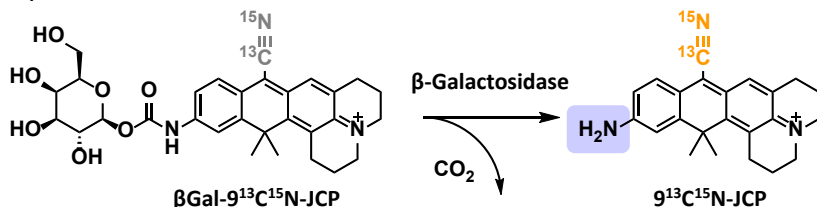
[a] Measured in PBS (pH 7.4) containing 0.1% DMSO as a cosolvent. Probe: 1 μM.

[b] Measured in PBS (pH 7.4) containing 30% DMSO as a cosolvent. Probe: 200 μM.

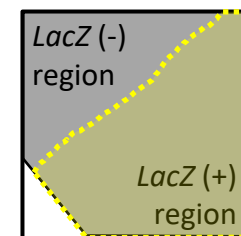
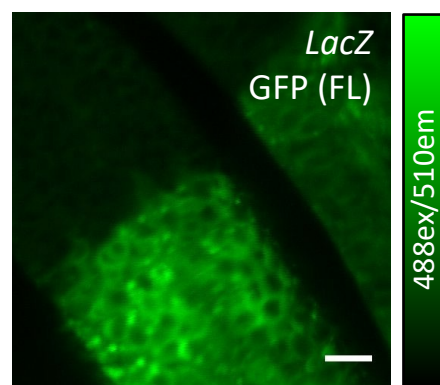
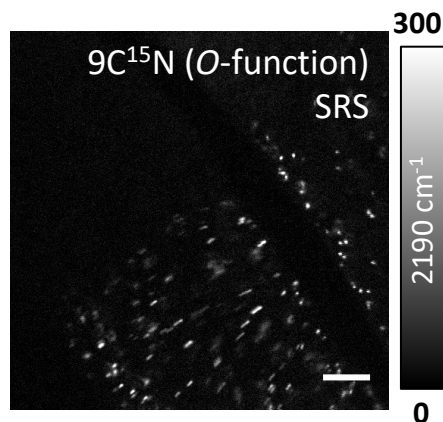
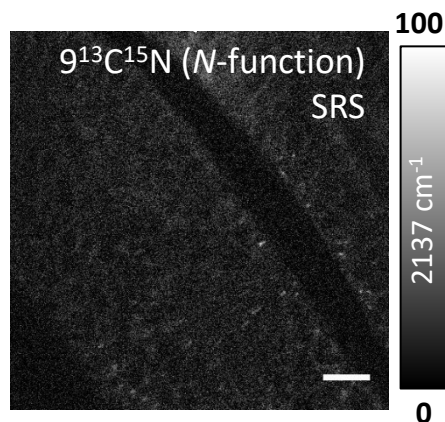
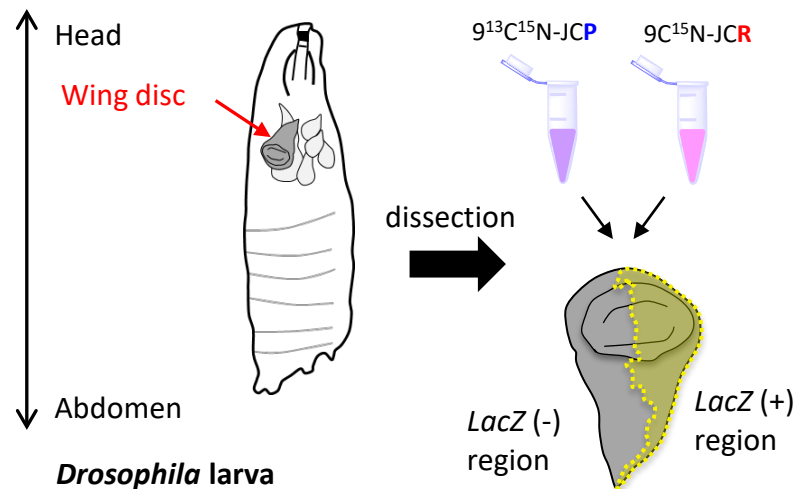
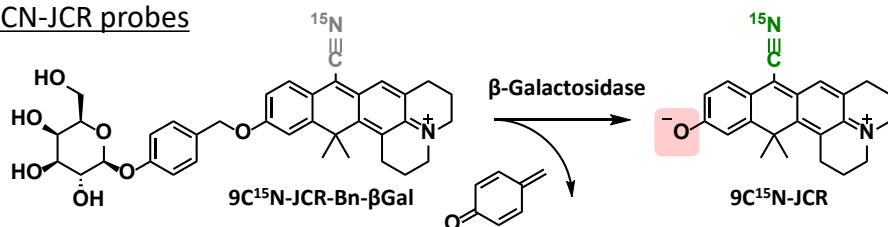
9C¹⁵N-JCR-Bn-βGalは標的酵素である
 β-Galactosidaseと反応してSRS信号がactivateされた

Ex vivo dual color SRS imaging

9CN-JCP probes



9CN-JCR probes



Probe: each 100 μM
Incubation time: 2.5 hr
Scale bars: 10 μm

Fujioka H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2023

組織における標的細胞領域の特異的染色が可能

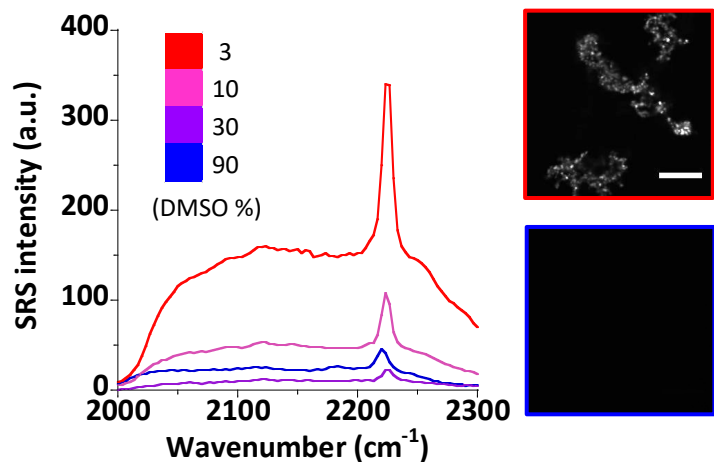
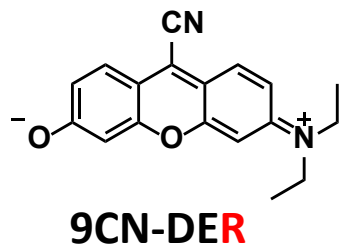
既存技術の課題

- 以前開発したラマンプローブでは、共鳴ラマン効果に基づく分子設計であったため、標的分子との反応前後で電子密度が大きく変化する必要があり、検出標的が限定されていた。

新技術の特徴

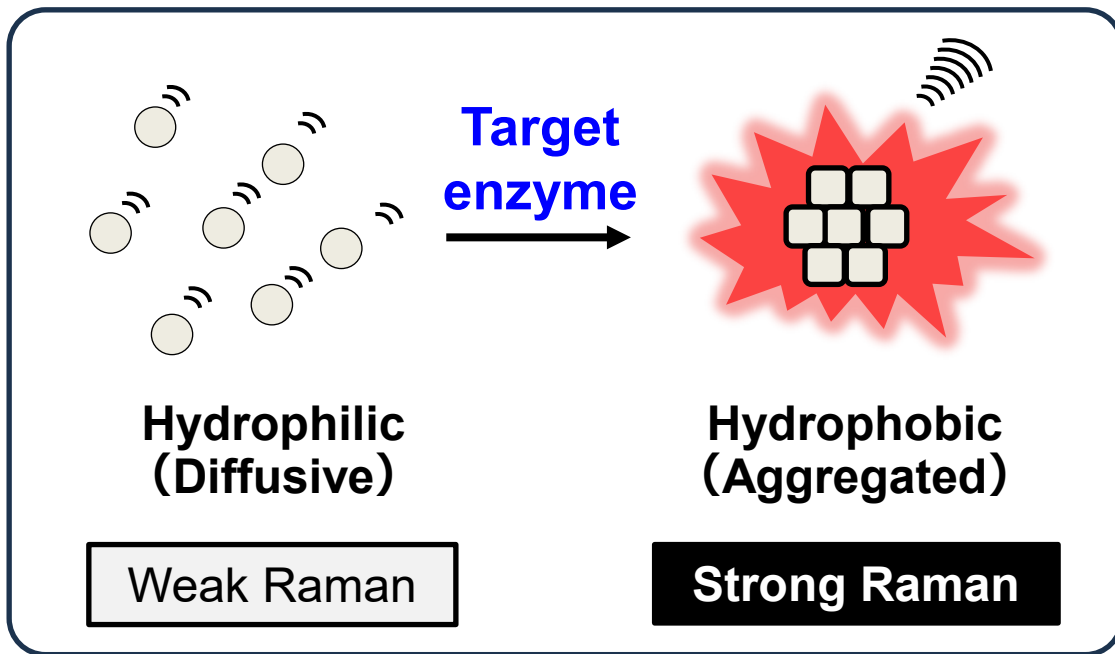
- **凝集制御に基づきラマン信号を制御する分子設計を考案した。**
- **従来は電子密度の変化を伴う反応のみが検出標的だったが、凝集形成に伴うラマン信号増強を活用することで、検出標的を拡張することが可能となった。**
- **本技術の適用により、より幅広い分子の検出が可能となると期待される。**

Aggregation-based Raman probe

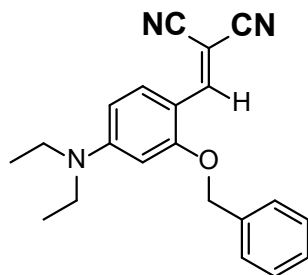


凝集体では溶液
(分散状態) と比較して強いラマン
信号が観察される

Molecular design strategy for enzyme-
activity-detecting Raman probes based
on control of aggregation



分子設計

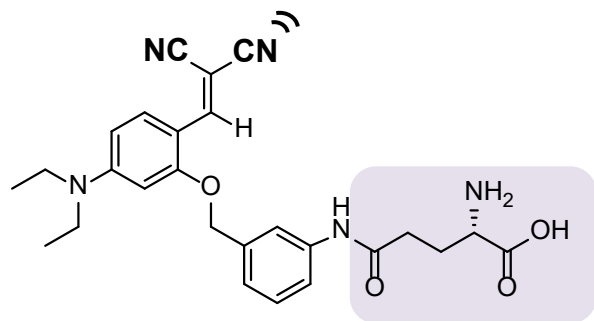


BzBMN

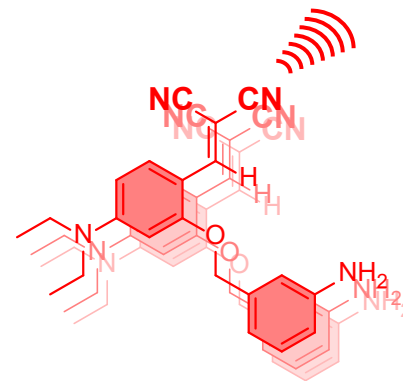
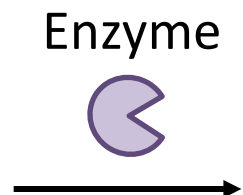
CrystEngComm 13, 4617 (2011)

BzBMN was selected as scaffold

- ✓ Nitrile groups for Raman imaging in silent region
- ✓ Aggregation-induced emission (AIE) property in water that is favorable for analysis of aggregation property
- ✓ Small size (Mw. 331)
- ✓ Flexibility in derivatization at benzyl moiety

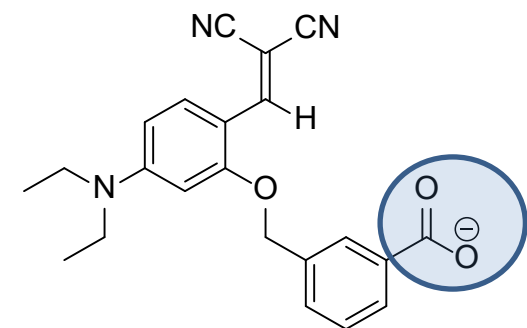


Hydrophilic (Diffusive)
Weak Raman signal

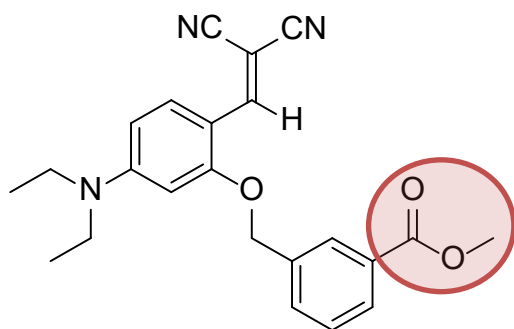
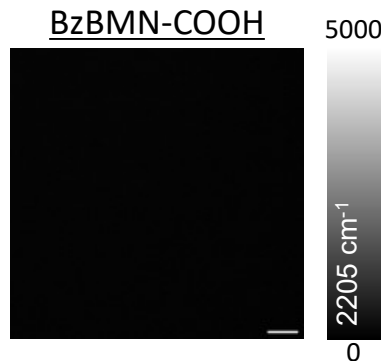


Hydrophobic (Aggregated)
Strong Raman signal

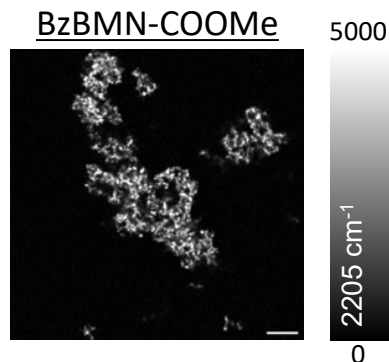
BzBMN誘導体のSRSイメージング



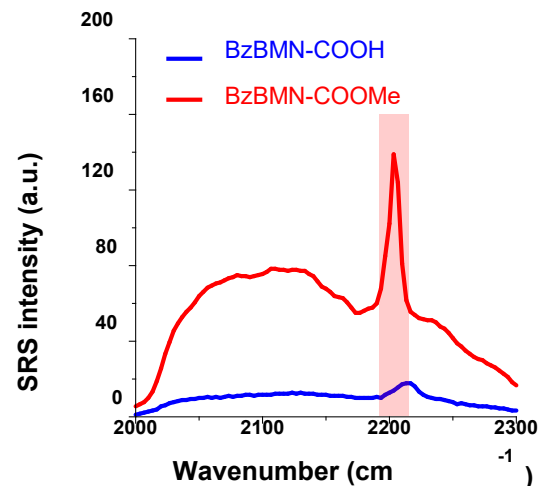
BzBMN-COOH
(Hydrophilic)



BzBMN-COOMe
(Hydrophobic)

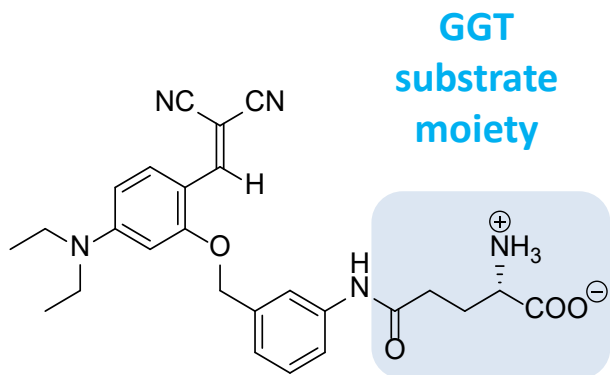


Scale bars, 10 μm .
100 μM dyes in phosphate buffer saline (PBS) pH7.4 (10% DMSO).

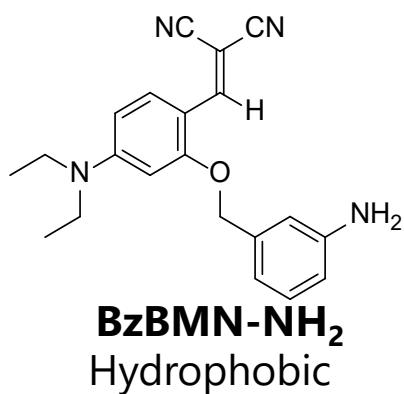


BzBMN-COOHと比較してBzBMN-COOMeは水溶液中で凝集体を生じ、強いラマン信号が観察された

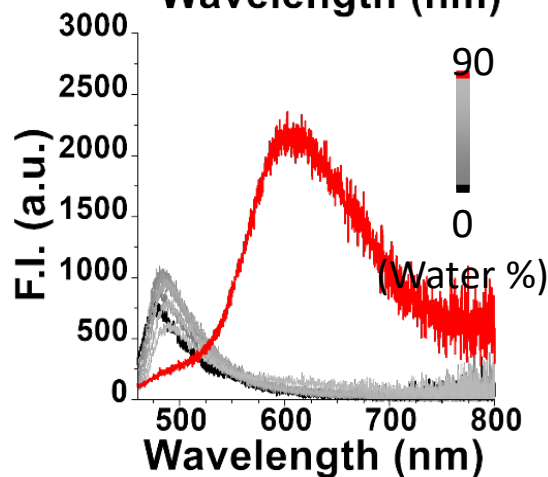
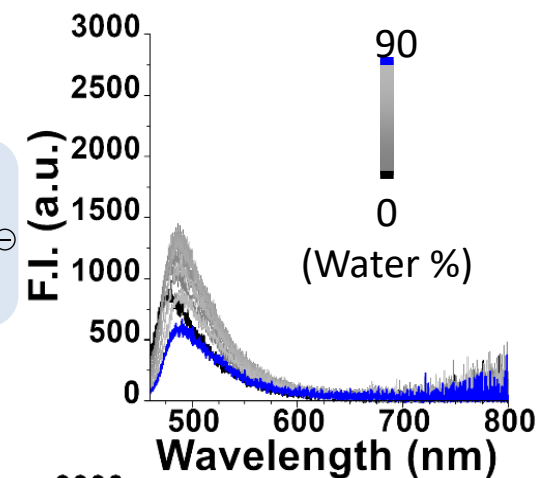
Aggregation capability of the probe



gGlu-BzBMN
Hydrophilic



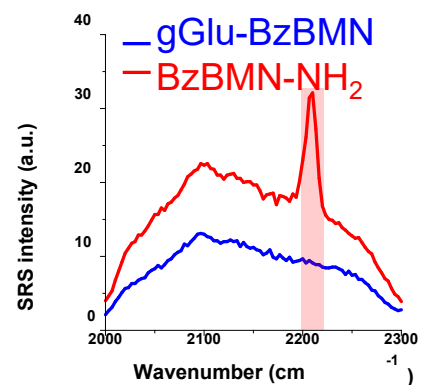
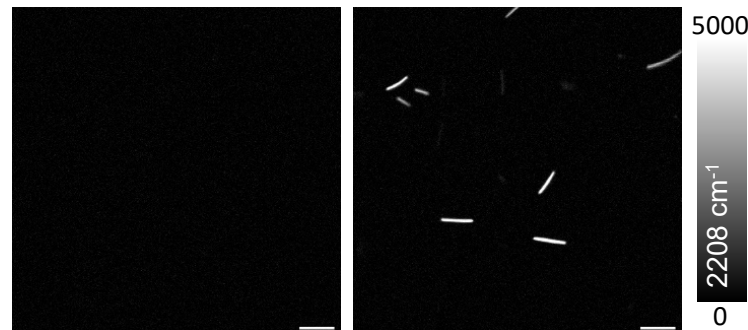
AIE spectra



SRS imaging

gGlu-BzBMN

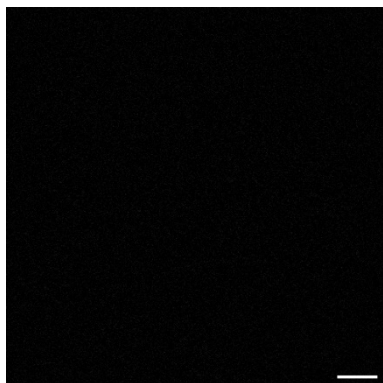
BzBMN-NH₂



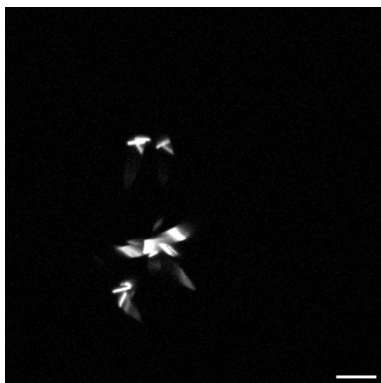
Scale bars, 10 μ m.
50 μ M dyes PBS
pH7.4 (10% DMSO).

GGT標的BzBMNプローブ

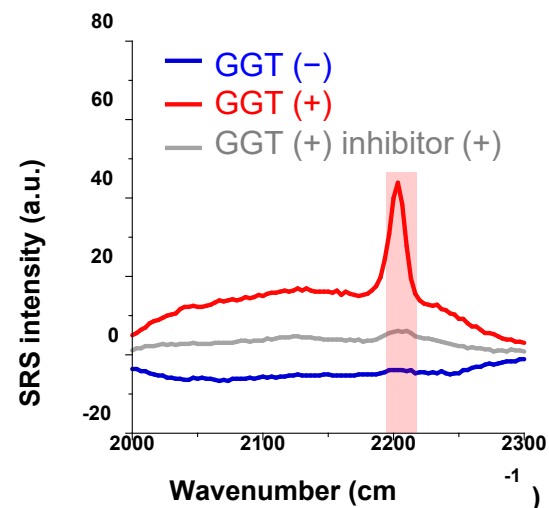
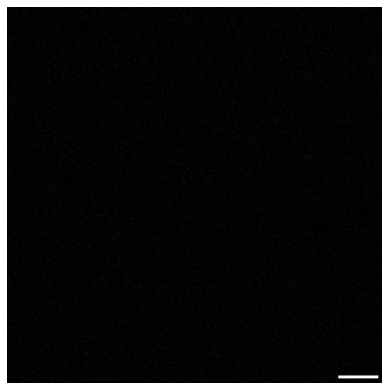
GGT (-)



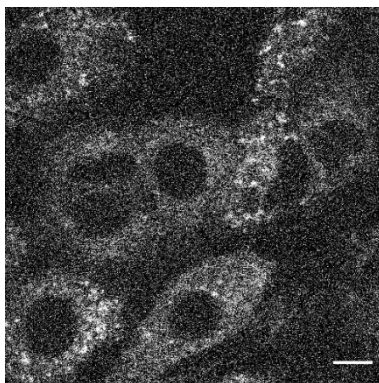
GGT (+)



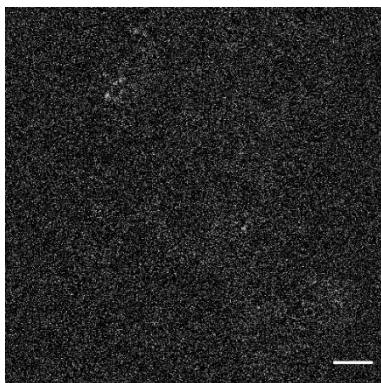
GGT (+)
inhibitor (+)



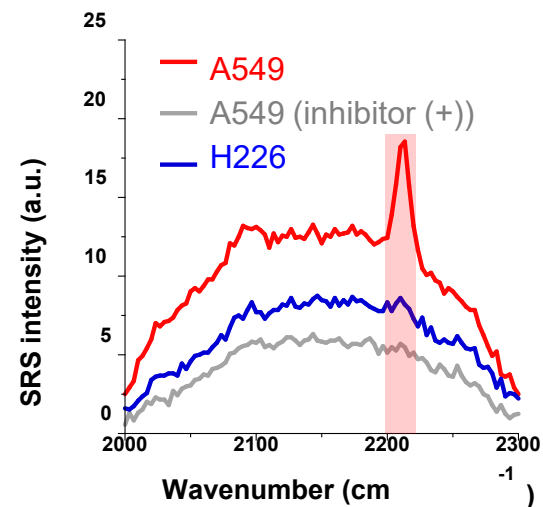
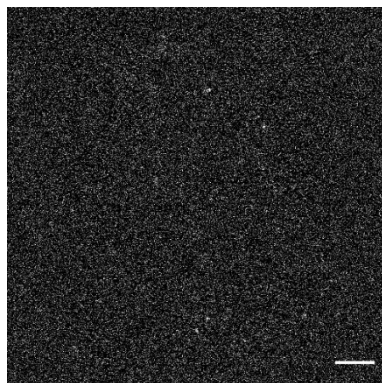
A549 cells
(High GGT expression)



A549 cells
(inhibitor (+))

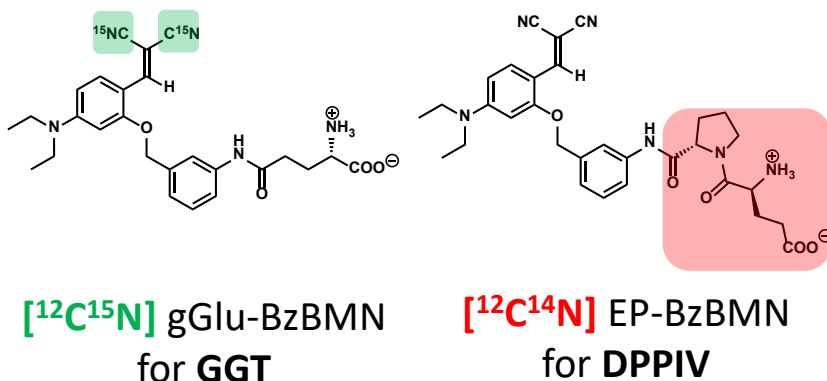


H226 cells
(Low GGT expression)



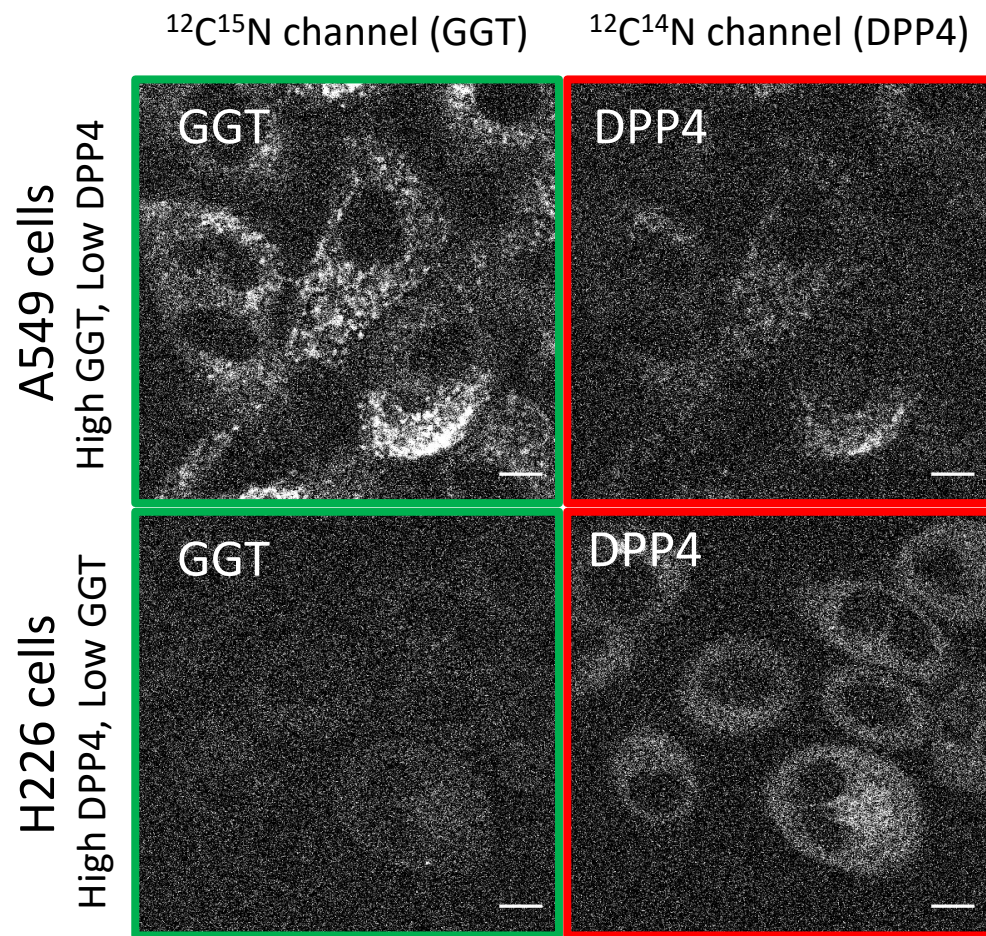
j

Simultaneous imaging of two enzyme activities in living cells



Isotope-editing of nitril group and replacement of enzyme substrate moiety allowed us to perform simultaneous detection of GGT and DPP4 activities in living cells

Okinaka M. et al. *submitted*



[¹²C¹⁵N]gGlu-BzBMN: 50 μM, [¹²C¹⁴N]EP-BzBMN: 50 μM.
 <Incubation> 4 h
 <Data acquisition> 300 averages. Scale bars, 10 μm.

想定される用途

- ラマンシフト値が異なるプローブ群を拡張することで、多重検出のメリットがあると考えられる。

実用化に向けた課題

- 現在までに、SRS顕微鏡での利用が可能なプローブを開発済みであるが、汎用されている自発ラマン顕微鏡での検出が未達。
- 今後、自発ラマン顕微鏡で検出可能な機能性ラマンプローブを開発し、ラマン検出に適用するための分子開発を行っていく。

企業への期待

ラマン顕微鏡を開発中の企業、ラマン顕微技術のバイオイメージング分野への展開を考えている企業との共同研究を希望。

本技術に関する知的財産権

発明の名称 : 凝集誘起増強型ラマンプロ
ローブ又は蛍光プロローブ

出願番号 : 特願2023- 32292

出願人 : 東京科学大学、東京大学

発明者 : 神谷真子、河谷稔、浦野
泰照、藤岡礼任、沖中桃子、小関泰
之、スプラット スペンサー ジョン

お問い合わせ先

東京科学大学 (Science Tokyo)

産学共創機構技術プロモーション室

T E L 03-5734-3817

e-mail consult@cim.isct.ac.jp