

報道機関 各位

国立大学法人東北大学

細胞内チオールのリアルタイム可視化に成功 —ラマンプローブの実用化に向け大きく前進—

【発表のポイント】

- 独自に開発したラマンプローブ^(注1)「iPrCAA」により、体の酸化ストレスや疾病に関わる重要な生体成分であるチオール^(注2)を、生きた細胞のままリアルタイムに計測することに成功しました。
- iPrCAAは小型設計で細胞内外に均一に広がりやすく細胞内の水を濃度の基準として利用できるため、従来よりも簡便にチオールを計測できます。さらに、安価で合成が容易であり光に対して安定で長期保存が可能です。
- 細胞内チオールの解析ツールとして生命科学研究で活用されるとともに、チオール濃度を基盤とした病気の診断への応用も期待されます。

【概要】

チオールは酸化ストレスの制御をはじめ、生体機能の維持に欠かせない分子として広く認識されています。しかし、生きた細胞内でその量を正確に測定することは難しく、生命科学研究における長年の大きな課題となってきました。

東北大学大学院薬学研究科の山越博幸助教らは、これまでに小型のラマンプローブ「ThioRas」を開発し、ラマン顕微鏡^(注3)を用いてチオールを検出できる技術を報告していました。しかし、感度や水への溶解性に限界があり、生細胞中の内在性チオール^(注4)を測定することはできませんでした。

今回、研究グループはこの課題を克服するために改良を重ね、より小型のアミド型^(注5)プローブ「(E)-2-cyano-3-isopropylacrylamide (iPrCAA)」を新たに開発しました。iPrCAAは、チオールとより安定に結合することで高感度な検出を実現しました。また、水に良く溶ける性質を持ちます。これらの特徴により、ラマンプローブを用いた細胞内チオールのリアルタイム定量^(注6)が初めて可能になりました。さらに、培養条件に応じて細胞内チオール量が動的に変化する様子を可視化することにも成功しました。

iPrCAAは簡便に化学合成でき、光の下でも安定に保存できるという利点も備えています。今後は商業化を通じて、生命科学研究の進展に貢献するだけでなく、生体内のチオール計測による疾患診断など、医療への応用も期待されます。

本研究の成果は、2025年11月10日にアメリカ化学会の学術誌 Analytical Chemistry に掲載されました。

なお本成果は、東北大学大学院薬学研究科のワンメイチェン大学院生、古賀圭祐大学院生、梶本真司准教授、栗山佑世博士、笹野裕介准教授、岩淵好治教授、中林孝和教授、および東北大学大学院医学研究科赤池孝章教授との共同研究によるものです。

【詳細な説明】

研究の背景

チオールは多様な生命現象において重要な役割を担っていますが、生きた細胞内でその濃度を正確に測定することは依然として難しい課題です。これまで、細胞でのリアルタイム定量が可能な方法として、蛍光プローブ^(注7)が用いられてきました。蛍光プローブは高感度である一方、細胞内チオールのように高濃度で存在する分子を測定する際にはシグナルが飽和してしまう問題があり、さらに蛍光色素のかさばる構造により細胞内での分布が不均一になるという課題も残されています。この点を補うアプローチとして、研究グループは小型の化学標識を利用したラマンプローブ「ThioRas」を開発し、チオールの新しい検出手法を報告しました(図1)。しかし、感度や水への溶解性に限界があり、生細胞中の内在性チオールを測定することはできませんでした。そこで、同研究グループでは、より実用的な検出法の確立を目指してラマンプローブの改良に取り組んでいます。

今回の取り組み

今回の研究では、以前のラマンプローブ「ThioRas」を改良し、より小型(分子量 167→138 g/mol)で高性能なアミド型プローブ「(E)-2-cyano-3-isopropylacrylamide (iPrCAA)」を開発しました。検出の仕組みは ThioRas と同じで、チオールと結合するかどうかによって目印となるニトリル^(注8)のラマン散乱光の波数がわずかに変化(約 20 cm^{-1})する性質を利用しています。ラマン顕微鏡を用いて、この2種類のラマン散乱光(～2232 cm^{-1} と～2252 cm^{-1})を同時に測定し、その割合からチオールの濃度を算出することができます。

以前の ThioRas はチオールと結合する割合が低く、十分な感度が得られませんでした。一方、計算科学を活用して設計された iPrCAA は、チオールとより安定に結合できるため、高感度な測定が可能となりました。さらに、アミド構造を持つことで水に非常に溶けやすく、30 mM を超える高濃度でも溶解できることが確認され、有機溶媒を使わずにラマンイメージングを実施できる点も大きな進展です。

実際に iPrCAA を用いて HeLa 細胞^(注9)を解析したところ、想定どおり iPrCAA 由来の2種類のラマン散乱光が検出され、細胞質で約 8.7 mM、核で約 10.8 mM、核小体で約 12.8 mM、脂質滴で約 5.3 mM という濃度を定量することに成功しました。これらの値から、細胞内のチオール濃度が従来の報告値

(約 5 mM) よりも少し高い可能性が示唆されました。さらに、チオールが細胞内でタンパク質と似た分布を持つことに加え、培養環境の変化に応じて濃度が時間とともに変化する様子も捉えることができました (図 2)。チオールフリーの培地で培養した場合には、48 時間後に各部位の濃度が約 4 mM で安定することが確認されました。

今後の展開

iPrCAA は、簡便に化学合成できるうえ、光にさらされても安定して保存できるという特長があります。また、ラマン顕微鏡を使った測定では、サンプル中の水の量を基準にすることで、細胞内のチオール濃度を簡便に測ることができます。こうした利点を生かして商業化が進めば、生命科学研究のさらなる発展に貢献できます。また、生体内のチオール測定を通じた疾病の診断など、医療への応用も期待されます。

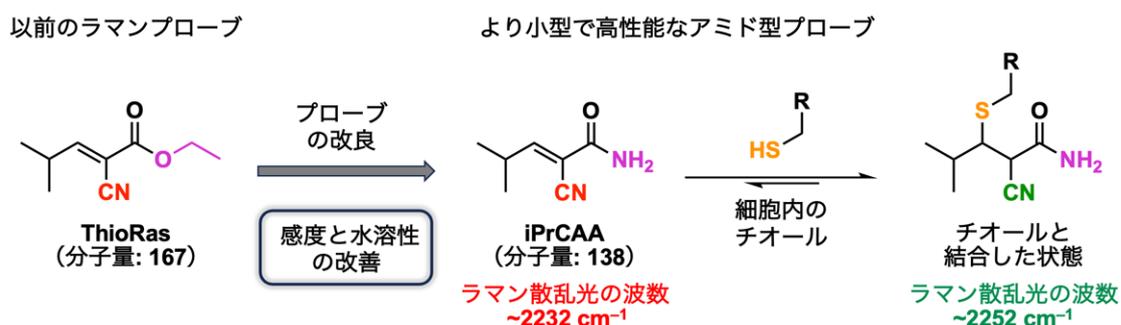


図 1. 開発したチオール検出プローブの構造

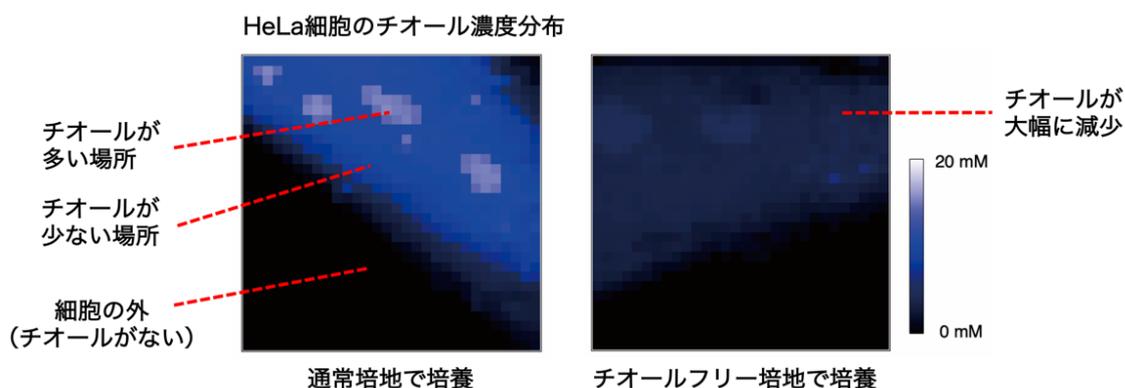


図 2. HeLa 細胞を用いたチオール濃度のラマンイメージング

【謝辞】

本研究は、東京生化学研究会、興和生命科学振興財団、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム（JP22ama121040j0001）、国立研究開発法人科学技術振興機構さきがけ（JPMJPR20E5）、および文部科学省科学研究費補助金（JP22K06495、JP21H05261、JP21H05210）の支援を受けて行われました。また、オープンアクセスにあたり、東北大学 2025 年度オープンアクセス推進のための APC 支援事業の支援を受けました。

【用語説明】

注1. ラマンプローブ

分子に光を当てると、分子の振動によって波数（単位長さあたりの波の数）がわずかに変化した光が散乱されることがあります。この変化した光をラマン散乱光と呼びます。ラマン散乱光の単位としては、分子の振動の回数を表す「 cm^{-1} 」が用いられます。ラマンプローブとは、このラマン散乱光を利用して特定の物質や状態を検出できるように設計された分子です。対象となる物質と結合したり反応したりすると、特徴的な波数のラマン散乱光を発したり、強度が変化することで、その存在や量を調べることができます。

注2. チオール

アミノ酸のシステインや細胞内の抗酸化成分グルタチオンなど、SH 基を含む分子の総称です。細胞の酸化ストレス応答などに関わる重要な生体成分です。

注3. ラマン顕微鏡

試料から出るラマン散乱光を測定するための顕微鏡です。ラマン散乱光の強さや波長の違いから、試料の中の分子の分布を画像として可視化できます。

注4. 内在性チオール

細胞の中にもともと存在するチオールのこと。外から加えられたものと区別して説明したいときに使われる言葉です。

注5. アミド型

アミドは、窒素と結合した炭素が酸素と二重結合でつながった小さな化学構造の一つです。タンパク質を構成する基本的な構造でもあり、水に溶けやすく安定な性質を持っています。このアミド構造を基本にした型を「アミド型」と呼びます。

注6. リアルタイム定量

リアルタイム定量とは、物質の量（ここでは濃度）を時間の経過に沿ってその場で測定・解析する手法を指します。前処理やサンプルの状態を変える操作を必要としないため、ありのままのサンプルを対象にできます。細

胞イメージングでは、生きている細胞内の濃度変化を瞬間ごとに可視化することを意味します。

注7. 蛍光プローブ

特定の波長の光を当てると生じる蛍光を利用して特定の物質や状態を検出するために設計された分子です。対象となる物質と結合したり反応したりすると、特徴的な蛍光を発生することで、その存在や量を調べることができます。

注8. ニトリル

炭素と窒素が三重結合でつながった小さな化学構造の一つです。動物の細胞には元々存在せず、強いラマン散乱光を生じる性質があるため、ラマンイメージングの目印として用いられます。

注9. HeLa 細胞

人工的な環境で生かし続けて使用する実験用細胞の一種です。ヒトの子宮頸がんから樹立された細胞で、標準的に使用されています。

【論文情報】

タイトル : Visualizing thiol stress responses in cells with a water-soluble Raman sensor

著者 : Hiroyuki Yamakoshi,* Meichen Wang, Keisuke Koga, Shinji Kajimoto, Yuse Kuriyama, Yusuke Sasano, Takaaki Akaike, Yoshiharu Iwabuchi, and Takakazu Nakabayashi

*責任著者 : 東北大学大学院薬学研究科 助教 山越博幸

掲載誌 : Analytical Chemistry

DOI : 10.1021/acs.analchem.5c04391

URL : <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5c04391>

【問い合わせ先】

（研究に関すること）

東北大学大学院薬学研究科

助教 山越博幸

TEL: 022-795-6847

Email: hiroyuki.yamakoshi.e1@tohoku.ac.jp

（報道に関すること）

東北大学大学院薬学研究科・薬学部 総務係

TEL: 022-795-6801

Email: ph-som@grp.tohoku.ac.jp