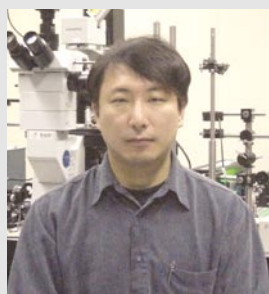


細胞表面タンパク質の超高感度分析法の開発

細胞表面の単一タンパク質分子をその場測定できる新しい方法



伊藤 民武

いとう たみたけ

tamitake-itou@aist.go.jp

健康工学研究センター
生体ナノ計測チーム
研究員
(四国センター)

2005年入所、SERS分光法を定量的な超高感度分子分析法へ発展させるため、その発現機構の研究を行ってきました。現在は、SERSの増強度を最大化するように制御した金属ナノ構造体を作成し、その表面に分子を吸着させ、そしてSERS発現させるという一連のプロセスの最適化の研究に取り組んでおります。

関連情報：

● 共同研究者

石川 満 (産総研)、安部 博子 (産総研)、Vasudevanpillai BIJU (産総研)、尾崎 幸洋 (関西学院大学理工学部)

● 参考文献

1) A. Sujith, T. Itoh, H. Abe, A. A. Anas, K. Yoshida, V. Biju, and M. Ishikawa, *Applied Physics Letters*, 92 1039011-1039013 (2008).

2) T. Itoh, K. Yoshida, V. Biju, Y. Kikkawa, M. Ishikawa, and Y. Ozaki, *Physical Review B*, 76 0854051-08540515 (2007).

3) T. Itoh, V. Biju, M. Ishikawa, Y. Kikkawa, K. Hashimoto, A. Ikehata, and Y. Ozaki, *Journal of Chemical Physics*, 124 1347081-1347086 (2006).

● 用語説明

表面増強ラマン散乱分光法

金属表面に吸着した分子のラマン散乱強度が、通常のラマン散乱強度に比べ、 10^{11} - 10^{14} 倍増強される現象。

タンパク質分子の測定

細胞表面にあるタンパク質は細胞内外の物質輸送、細胞外環境の認識など生体組織の活動に必要な機能を担っています。これらのタンパク質の測定は生命活動の本質の解明だけではなく、創薬、健康診断法開発などの産業応用からも重要です。その測定法としては抗原・抗体反応と組み合わせた蛍光標識法がありますが、この方法には蛍光色素の消光・退色という大きな問題があります。この問題点を解決できる可能性の1つに消光がおこらないラマン散乱分光法がありますが、感度がきわめて低いので、実用的ではありませんでした。そこで、この感度の問題を克服するため、私たちはラマン散乱強度が最大で 10^{14} 倍程度増強する現象、つまり、表面増強ラマン散乱 (SERS: Surface Enhanced Raman Scattering) 分光法を用い、生きている細胞の表面にあるタンパク質分子を数秒程度で迅速にその場 (*in situ*) 測定する方法を開発しました。

生きたままの細胞表面のタンパク質分子1つを迅速に計測

図1は生きている酵母細胞の表面に銀ナノ粒子 (平均直径40 nm) を吸着させてレーザー光を照射しラマン散乱光像を観測したものです。細胞上に多くの輝点が観測できます。顕微鏡で1つ1つの輝点のスペクトルを測定したところ、その形状から輝点はSERS光であることが確認できました (図2)。これまでの細胞のラマン散乱分光の際のレーザー光照射条件 (照射光強度 $\sim 10^5$ W/cm²、測定時間 ~ 300 s) に比べて今回の条件 (15 W/cm²、1秒) は、はるかに微弱

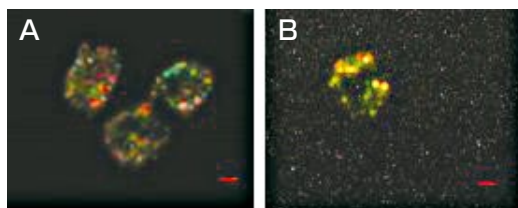


図1 銀ナノ粒子を細胞表面に吸着させた酵母の顕微鏡像 (スケールバーは1 μ m)
(A) ブラズモン共鳴光像: 銀ナノ粒子付近に輝点が観測され、銀ナノ粒子によってSERS現象が起こっていると考えられる。
(B) 表面増強ラマン散乱 (SERS) 光像: 吸着した銀ナノ粒子から選択的にSERS光が出ている。

で短時間の照射であり、細胞にとってマイルドな条件です。図1の輝点は点滅現象を示しました。SERSにおける輝点の点滅現象は銀ナノ粒子に吸着した分子の揺らぎによって生じるとされているため、この観測では多数の分子からのSERS光を測定しているのではなく、単一の分子を測定している可能性が高いといえます。また、SERS現象を示している細胞表面を原子間力顕微鏡で観測したところ、多くの銀ナノ粒子が2個くっついている状態 (2量体) で、細胞表面に吸着していることが確認できました。この2量体の接合部でSERS光が最も増強されることが知られています。また、この接合部に入り込めるタンパク質分子は1個程度です。これからも、測定したSERSスペクトルは銀ナノ粒子2量体の接合部に吸着した単一のタンパク質分子からのものである可能性が高いと考えられます。

酵母細胞の表面には、タンパク質や多糖類などさまざまな分子が存在していますが、今回測定したSERSスペクトルを解析したところ、窒素原子を含む官能基の分子振動に起因するバンドが多く確認されました。これらのバンドはタンパク質に特有のもので、多糖類には含まれないものです。すなわち、今回のSERSスペクトルは多糖類分子のものではなく、細胞表面にあるタンパク質分子のものだと考えられます。

今後の展開

SERS分光法による細胞表面タンパク質の *in situ* 測定技術の汎用性を高めるため、銀の代わりに細胞に対して毒性が弱い金ナノ粒子を用いたSERS分光法を開発を行います。

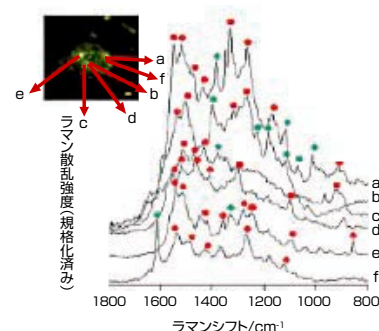


図2 1つ1つの銀ナノ粒子付近から出ているSERS光のスペクトル (左上は酵母細胞のSERS光像) (赤点はタンパク質の窒素に由来する散乱)