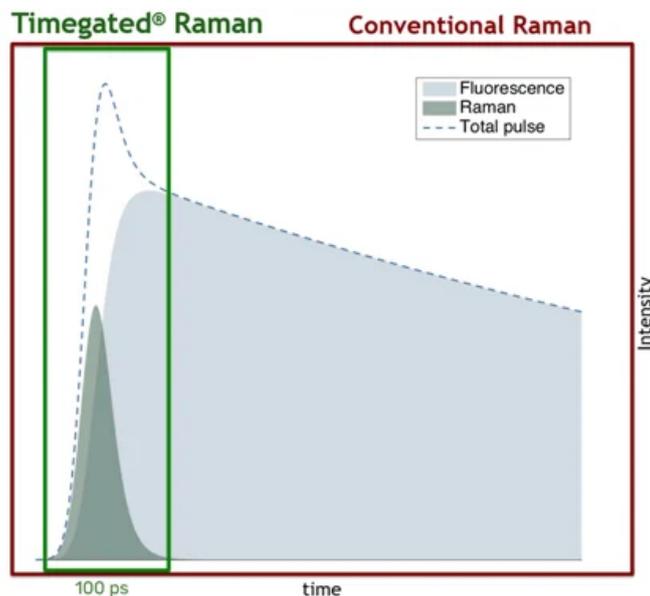


## ライフサイエンスにおけるTimegated®ラマンの研究

ライフサイエンスへのTimegateラマンの応用に関する科学論文を調べたことはありますか？  
今回、その機会をご提供します。この技術の原理を紹介するレビュー論文と、大腸菌の培養や細胞外小胞の識別などのライフサイエンス分野でTimegateラマン技術が有用なツールであることを示す、3つの査読付き論文を紹介します。

## Timegateラマン分光法の原理、歴史、将来の発展

Measurement Science and Technology (IOPscience)に掲載されたMartin Kögler氏とBryan Heilala氏の論文「[Timegateラマン分光法 – レビュー](#)」では、Timegateラマン分光法の開発と動作原理、歴史、将来の展望について紹介しています。



Timegated® Raman の画期的なイノベーションを示すグラフ。パルス ピコ秒範囲レーザーにより、実際の蛍光を抑制しながらラマン スペクトルを取得できます。

## 抄録

タイムゲーティング (TG) ラマン分光法は、試料誘発蛍光がラマン信号の検出時にマスクするという主要な問題に対する効果的な技術的解決策であることが示されています。蛍光排除のための技術的手法は、初期の大規模で高価な実験室機器 (光学ケルゲートなど) から大きく進歩しています。現在では、より手頃な小型の選択肢も利用可能です。これらの進展は、分光学および電子部品の製造技術の進歩に起因しており、これが装置の複雑さとコストの低減を促進しました。TGラマンの重要な要素は、パルスレーザー励起源と敏感で高速な検出器との間の時間的に正確な同期(ピコ秒範囲)です。検出器は、蛍光放出が遅延する間に検出器のデッドタイム中に蛍光を排除し、短いレーザーパルスの中にラマン信号を収集することができます。TGラマンは、環境光や熱的なミッションにも強いいため、短い測定Dutyサイクルによりこれらの影響を回避できます。近年では、高感度かつ高速な検出器の焦点がゲーティング付きおよび強化型電荷結合素子 (ICCD) や、CMOS単一光子アバランシェダイオード (SPAD) アレイに置かれており、これらもTGラマン分光法に適しています。SPADアレイは、ゲーティング付きCCDに比べて感度が高く、優れた時間分解能を持ち、過剰な検出器冷却なしで使用できるという利点があります。このレビューは、TGラマンの初期から最近の開発、応用、および拡張についての概観を提供することを目的としています。

# Timegating®ラマンによる組換えタンパク質生産の評価および大腸菌培養のモニタリング



大腸菌

組換えタンパク質は、研究から製薬開発まで広範な応用があり、大腸菌は組換えタンパク質を生産するために広く使用されています。プロセスの固有の課題により、モニタリングは非常に重要です。

この観点から、Timegating表面強化ラマン分光法 (TG-SERS) が大腸菌における再組換えタンパク質生産の評価に利用されました。Köglerら (2018) は、大腸菌のバイオリアクター培養の細胞フリー上清液サンプルを使用して、グルコース、アセテート、AMP、およびcAMPの濃度をモニタリングしました。さらに、同じグループはタイムゲーティングラマン分光法を利用し、この技術が培養中の生きて大腸菌細胞内でのタンパク質生産と正しい折りたたみを評価するための強力なツールであることを示しました。Timegating®ラマン分光法がこの応用でどのように使用されたかについてさらに学ぶためには、以下の記事をご覧ください：

Kögler M, Itkonen J, Viitala T, Casteleijn M G: [Assessment of recombinant protein production in E. coli with Time-Gated Surface Enhanced Raman Spectroscopy \(TG-SERS\)](#) in Scientific Reports.

## 抄録

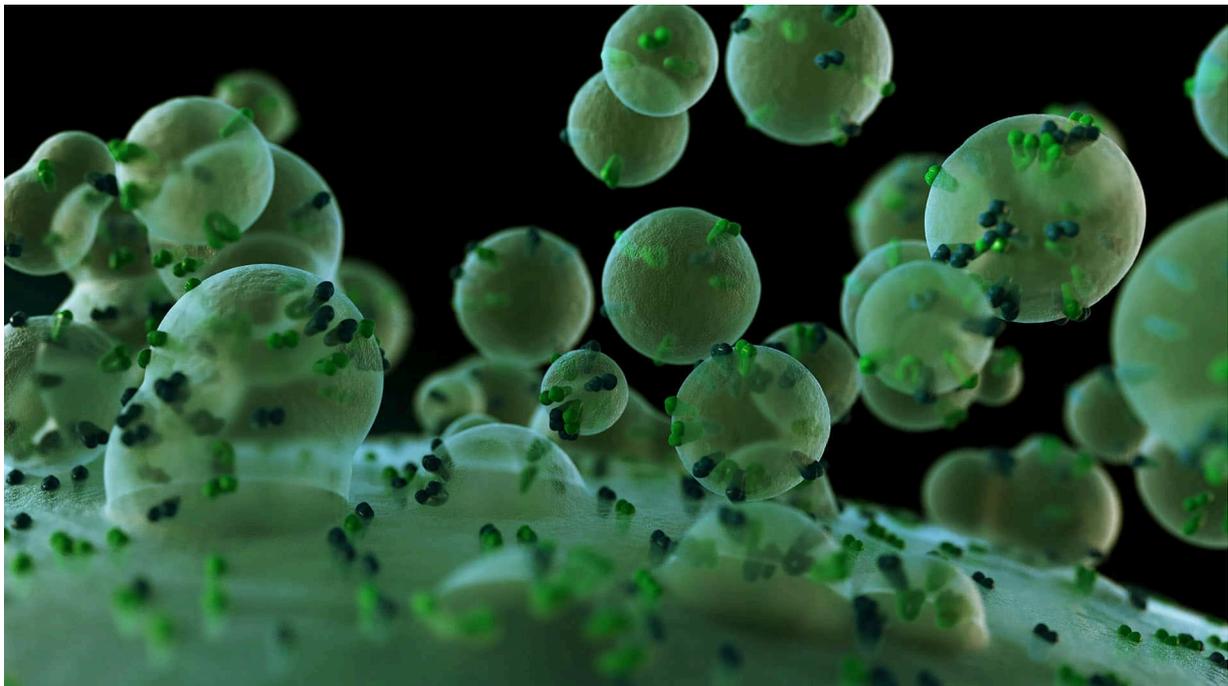
Timegate表面増強ラマン分光法 (TG-SERS) を利用して、大腸菌における組み換えタンパク質の生産を評価しました。TG-SERSは、細菌および培養培地中の生体分子からの蛍光信号を抑制しました。細胞培養のさまざまな時点での特徴的なタンパク質シグネチャを観察し、SERSを使用した従来の連続波(CW)ラマンと比較しました。TG-SERS は、二次構造などのタンパク質の個別の特徴を区別できるため、タンパク質のフォールディングまたはアンフォールディングを示します。ナノ粒子および細菌細胞の安定剤としてナノフィブリルセルロースを使用する新しい方法が、ラマン信号を増強すると同時にバックグラウンド信号を抑制すべく初めて使用されました。バッチ発酵モードを使用して、複合培地での hCNTF、hHspA1、およびhHsp27の発現を評価しました。HCNTFは、EnBaseを使用してフェドバッチのようなモードでも培養されました。HspA1 は細胞内での凝集の問題により発現が不十分でしたが、バッチモードで発現したhCNTFは正しく折り畳まれ、EnBase 培養ではタンパク質の不安定性が確認されました。Timegateラマン分光法は、培養中に生きて大腸菌細胞内でのタンパク質生成と正しい折り畳みを評価するための強力なツールであることが示されました。

Kögler M, Paul A, Anane E, Birkholz M, Bunker A, Viitala T, Maiwald M, Junne S & Neubauer P: [Comparison of time-gated surface-enhanced raman spectroscopy \(TG-SERS\) and classical SERS based monitoring of Escherichia coli cultivation samples](#) in Biotechnology Progress (AIChE).

## 抄録

ラマン分光法はバイオプロセスのモニタリング技術として有望ですが、培養液中の蛍光化合物に起因する大きな背景信号によってその応用が制限されています。本研究では、タイムゲーティングラマン(TG-Raman)、近赤外プロセスラマン(NIR-Raman)、および連続波マイクロラマン(micro-Raman)の各手法を表面強化ラマン分光法(SERS)と組み合わせ、蛍光の制御における性能を比較しました。この目的で、大腸菌バイオリアクター培養の細胞フリー上清液サンプルを用いて、グルコース、アセテート、AMP、およびcAMPの濃度遷移をモニタリングしました。ラマンおよびSERS信号を炭水化物、有機酸、ヌクレオチドのオフライン代謝物分析と比較しました。結果は、SERSがほとんどの場合、識別可能な信号の数が多く、分解能の高いスペクトルを得ることができることを示しました。TGラマンから得られたスペクトルは、マイクロラマンと比較可能で、識別可能なラマンピークが得られ、より多くの化合物の同定が可能でした。一方、NIRラマンは、SERSナノ粒子の有無にかかわらず、データ解析を行うことで、定量的評価に優れた性能を発揮しました。

## Timegate®ラマンによる細胞外小胞の識別モニタリング



細胞外小胞

Time-gatedラマン技術の多様性により、疾患診断や治療の予後テストに使用することができます。

**Samoylenko**らは、腎癌細胞株から得られた低酸素および正常酸素条件下の細胞外小胞(EV)の研究を行いました。過去10年間で、EVに関する研究が大きな注目を集めており、これらの小胞には様々なタンパク質、RNA分子、および代謝物が含まれており、その組成は細胞の生理的状態を反映します。これにより、新たな診断ツールの開発が進められています。本研究では、2つのグループの細胞外小胞の識別を目指して、タイムゲーティングラマン分光法が有用で信頼性のあるラベルフリーかつ迅速な技術であることが証明されました。最新の研究について詳しく学ぶためには、以下の記事をご覧ください：

Samoylenko A, Kögler M, Zhyvolozhnyi A, Makieieva O, Bart G, Andoh S S, Roussey M, Vainio S J, Hiltunen J: [Time-gated Raman spectroscopy and proteomics analyses of hypoxic and normoxic renal carcinoma extracellular vesicles](#) in Scientific Reports).

## 抄録

細胞外小胞（EV）は、細胞間コミュニケーションに関与する膜に包まれた小さな粒子の多様なグループを表していますが、EVを特性評価する技術はまだ限られています。低酸素症は固形腫瘍の典型的な状態であり、癌由来のEVは腫瘍の成長と腫瘍細胞の組織への浸潤を助長します。腎腺癌細胞を低酸素状態にさらすとEV分泌が誘発され、EVタンパク質カーゴが正常酸素状態と比較して顕著に変化することが分かりました。プロテオミクス解析により、低酸素EVサンプルではインテグリンなどの接着に関与するタンパク質が過剰に発現していることが示されました。さらに、EVを特性評価するためのTimegateラマン分光法（TG-RS）と表面増強Timegateラマン分光法（TG-SERS）の有効性を評価しました。従来の連続波励起ラマン分光法では顕著な信号は得られませんが、TG-RSでは顕著な信号が得られ、TG-SERSではさらに増強されました。ラマン信号は、EVタンパク質の化学結合の変化により、アミド領域に特徴的な変化を示しました。結果は、TG-RSとTG-SERSが、酸素欠乏などの外部刺激がEV生成に及ぼす細胞への影響や、異なるEV精製プロトコルから生じる違いを研究するための有望なラベルフリー技術であることを示しています。

Timegated® ラマン分光法、アプリケーションなどに関してご質問がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

また、Timegated® RamanとEVに関する今後の情報にもご期待ください。