

木を見て森も見る

生体分子の指紋で細胞の個性を大規模計測

1. 発表者：

平松 光太郎（東京大学大学院理学系研究科スペクトル化学研究センター 助教）

井手口 拓郎（東京大学大学院理学系研究科物理学専攻 講師）

合田 圭介（科学技術振興機構 プログラムマネージャー／東京大学大学院理学系研究科
化学専攻 教授）

2. 発表のポイント：

- ◆毎秒 1,000 細胞以上のスループットで無標識に細胞内分子の振動に基づく“指紋”を測定する手法を開発した。
- ◆それにより個々の細胞中に存在する生体分子の量と構造を決定し、個々の細胞の個性に注目しつつ多数の細胞を生きたまま解析する“木を見て森も見る”細胞解析が可能となった。
- ◆蛍光標識を用いずに細胞形質の高速スクリーニングを可能にすることで、スマートセル産業への貢献やリキッドバイオプシーを用いた新しい診断法の開発への応用が期待される。

3. 発表概要：

東京大学大学院理学系研究科の平松光太郎助教、井手口拓郎講師、合田圭介教授らは、毎秒 1,000 細胞以上のスループットでラマン分光（注 1）による分子指紋（注 2）の測定が可能な新しい大規模 1 細胞解析法を開発しました。ラマン分光法は分子による光の非弾性散乱を測定する分析手法で、細胞を染色せずに測定できることから細胞生物学の新しいツールとして注目を集めています。本研究では、マイクロ流路を流れる多数の細胞に含まれる生体分子の指紋を測定することで、個々の細胞の個性に注目しつつ多数の細胞を生きたまま解析する“木を見て森も見る”細胞解析を実現しました。これまでに合田教授らによって開発されてきた世界最高速の広帯域ラマン分光測定技術とマイクロ流体工学の技術との融合によって、従来の広帯域ラマン分光法を用いた 1 細胞解析法と比べ 1,000 倍程度の高速化を実現し、分子指紋に基づく大規模 1 細胞解析が可能になりました。それにより、多数の微細藻類中の代謝を 1 細胞レベルで解析し、同じ条件下で培養しても代謝生成物の含有量が細胞ごとに大きく異なっていることを見

出しました。本研究成果によって、細胞に有用性物質の産生を担わせるスマートセル（注 3）産業における生産性向上や、リキッドバイオプシー（注 4）・血液検査による種々の疾病の発見などさまざまな応用が期待されます。

本研究は、内閣府総合科学技術・イノベーション会議の革新的研究開発推進プログラム（ImPACT）のうち、合田圭介プログラム・マネージャーの研究開発プログラム「セレンディピティの計画的創出による新価値創造」の一環として実施されました。

本研究成果は、2019年1月16日（米国時間）にアメリカ科学振興協会（American Association for the Advancement of Science）のジャーナル「Science Advances」のオンライン版で公開されました。

4. 発表内容：

1) 研究の背景と経緯

細胞は生物を構成する基本単位ですが、人間の個体と同じように個々の細胞には個性があります。個々の細胞を区別して測定することで、集団平均の測定では見逃してしまう少数ながらも重要な細胞や、特定の細胞形質の発現に寄与している遺伝子の解析などといった重要な基礎科学的知見が得られます。また、たくさんの細胞を生きたまま測定し、特定の物質をより多く産生する細胞を分取・培養できれば、高効率な物質生産が可能となり、産業的にも大きなインパクトをもたらします。

個々の細胞を高速に測定する方法として、フローサイトメトリー（注 5）があります。通常、フローサイトメトリーでは、細胞内の特定の生体分子を蛍光色素で染色し、蛍光の有無を基準として細胞の解析を行います。しかしながら、蛍光染色を用いた方法では、蛍光色素による細胞毒性、細胞機能の変化や色素の退色、色数の制限、色素以外からの自家蛍光の影響、目的部位に結合していない色素からの背景信号といった欠点があり、また、代謝物質などの比較的小さな生体分子の染色が難しいことからその応用範囲に制限がありました。

2) 研究の内容

本研究では、蛍光染色では捉えることのできないさまざまな細胞形質を無標識に測定することを目的として、ラマン分光法を用いたフローサイトメトリーを開発しました（図 1、2）。ラマン分光法は分子振動に起因する光の非弾性散乱を測定する分析手法で、光を当てるだけで細胞内の生体分子を染色せずに測定することが可能です。しかしながら、通常、ラマン散乱は蛍光に比べて信号強度が桁違いに弱く、一定時間内に測定できる細胞数には限りがありました（1秒間に1個程度）。井手口講師、合田教授らはラマン分光法を高速化するために最先端のレーザー技術を駆使した高速フーリエ変換コヒーレント反ストークスラマン散乱分光法（FT-CARS法、注 6）を開発してきました。高速 FT-CARS 法を用いると、毎秒約 24,000 回もの広帯域ラマンスペクトルの測定が可能であるため、多数の細胞を生きたまま短時間のあいだに測定することが可能となります。高速 FT-CARS 法をマイクロ流体工学技術と組み合わせることで、マイクロ流路中に整列された状態で流れてくる多数の細胞を再現性良く測定することを可能にしました。本手法によって、毎秒 1,000 以上の細胞の広帯域ラマン分光測定という従来法の 1,000 倍程度高いスループットを実現しました（図 3）。さらに、応用の一例として、本手法を微細藻類の 1 細胞代謝解析へと展開しました。多数のヘマトコッカス（注 7）細胞中のアスタキサンチン（注 8）の分子含有量を 1 細胞レベルで定量できることを実証しました（図 4）。アスタキサンチンは高い抗酸化作用から活性酸素に起因するさまざまな疾病を抑制する効果が期待されており、その産生効率を無標識に評価できることは高い産業的な価値があります。また、安定同位体を導入した二酸化炭素を用いた細胞培養と組み合わせることで細胞の代謝ダイナミクス of 1 細胞解析にも応用できることを示しました。これらの解析は従来の蛍光を用いたフローサイトメトリーでは困難であり、本手法によって 1 細胞解析の適用範囲を大きく拡大したことを示しています。

3) 今後の展開

細胞を用いた物質生産では、従来の化学工業的手法では合成できないような複雑な機能性化合物を生み出すことが可能であり、スマートセル産業として注目を集めています。本技術により、従来のフローサイトメトリーでは解析が難しかった代謝生成物の蓄積量やその産生ダイナミクスを無標識かつ高速に解析でき、スマートセルの作製へと貢献することが期待されます。また、血液などの液体検体からさまざまな疾病の予知・発見を行うリキッドバイオプシーでは、血液中の種々の細胞を高速かつ高精度に測定することが必要となります。本手法によって、従来の蛍光法では検出できなかった疾病の検出や予知が可能になると期待されます（図 5）。

本研究チームは、平松光太郎（東京大学大学院理学系研究科スペクトル化学研究センター助教）、井手口拓郎（東京大学大学院理学系研究科物理学専攻講師）、与那嶺雄介（北海道大学理学部助教）、SangWook Lee（東京大学大学院理学系研究科化学専攻特任助教）、Yizhi Luo（研究当時：東京大学大学院理学系研究科化学専攻修士課程）、橋本和樹（研究当時：東京大学大学院理学系研究科化学専攻修士課程）、伊藤卓朗（科学技術振興機構）、長谷美佐（東京大学大学院理学系研究科化学専攻技術補佐員）、Jee-Woong Park（研究当時：東京大学大学院理学系研究科化学専攻博士研究員）、笠井宥佑（名古屋大学大学院工学研究科博士課程）、佐久間臣耶（名古屋大学大学院工学研究科助教）、早川健（中央大学理工学部助教）、新井史人（名古屋大学大学院工学研究科教授）、星野友（九州大学大学院工学研究院准教授）、合田圭介（東京大学大学院理学系研究科化学専攻教授）で構成されています。

本成果は、以下のプログラム・研究開発課題によって得られました。
内閣府 革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) <https://www.jst.go.jp/impact/>
プログラム・マネージャー：合田圭介
研究開発プログラム: セレンディピティの計画的創出による新価値創造
研究開発課題: セレンディピターのための細胞計測技術および細胞分取技術の開発
開発研究開発責任者: 合田圭介（東京大学大学院理学系研究科教授）
チームリーダー: 井手口拓郎（東京大学大学院理学系研究科助教）
研究期間: 平成26年11月～平成29年3月

本プログラムでは、膨大な細胞集団から単一の目的細胞を発見する細胞検索エンジン「セレンディピター」の開発に取り組んでいます。その中で、井手口チームは、高速流体中の細胞のラマンスペクトルを取得し、細胞内物質の高速計測を可能にする「広帯域高速ラマン分光法」の開発を担当しました。

■合田圭介プログラム・マネージャーのコメント■



本研究成果は、内閣府革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) 「セレンディピティの計画的創出による新価値創造」に参画する、光学、流体力学、化学、生物学など異分野研究者の協力によるものです。今回開発したラマン分光による大規模1細胞解析法は、細胞集団からこれまで利用されていない情報を引き出せるため、基礎生物学の新たな研究ツールとなるだけでなく、バイオマテリアル開発や細胞診断などのさまざまな応用展開が期待されます。

5. 用語解説

注1) ラマン分光

分子にレーザー光などの狭帯域光を照射すると、分子振動との相互作用の結果、周波数が増減した散乱光が発生する。散乱光の振動数を分光測定することで、分子構造を推定することができる。

注2) 分子指紋

ラマンスペクトルはさまざまな分子振動の振動数に対応する多数のピークから構成されるが、主に分子の骨格や官能基の振動からなる指紋領域と、炭素と水素間の振動からなるCH伸縮領域に大別される。これまでの高速ラマン測定では、比較的信号が強いことからCH伸縮領域が測定対象となっていた。一方、指紋領域はラマン信号強度が弱いものの、広い振動数領域に渡って多数のピークが観測されるため豊富な分子構造情報が含まれる。人間の指紋から個人を特定できるように、指紋領域のラマンスペクトルの測定によって分子構造を高い精度で決定できるため、指紋領域のラマンスペクトル情報を分子指紋と呼ぶ。

注3) スマートセル

遺伝子改変や培養条件を最適化することで、従来の化学工業的な手法では合成できない複雑な化合物を生合成できるように改変された細胞。DNAの突然変異と目的物質を生産する細胞選別を繰り返し行う指向性進化法(2018年ノーベル化学賞)を用いることでさまざまな物質を生産する細胞をデザインできる。

注4) リキッドバイオプシー

血液などの体液検体を用いて診断を行う医療技術。病変の一部を採取して検査を行う生検と比べ患者の負担が小さく、複数回の診断を行って治療の経過を時系列でモニターすることが可能となる。また、血液中の循環がん細胞やセルフリーDNAを検出することによってがんの早期発見のための技術としても注目を集めている。

注5) フローサイトメトリー

1細胞解析法の一つ。マイクロ流路中に多数の細胞を高速に流し、光学的・電氣的に個々の細胞の特徴を測定する手法。細胞中に導入された蛍光色素からの蛍光を測定する手法や細胞のインピーダンスを測定する手法が広く用いられている。

注6) 高速フーリエ変換コヒーレント反ストークスラマン散乱分光法

近年合田研究室で開発された世界最高速の広帯域ラマン分光法。従来のラマン分光法とは異なり、超短パルス光を用いて分子振動を励起し、その時間発展を別の超短パルス光を用いて測定する。2つの超短パルス間隔を高速に走査することで、高速なラマン分光測定が可能となった。

注7) ヘマトコッカス

微細藻類の一つで、アスタキサンチンを多量産生することが知られており、広く産業利用されている。

注8) アスタキサンチン

天然色素であるカロテノイドの一つで、高い抗酸化作用を有することから健康食品などとして用いられている。また強い赤色を呈し、食品着色料としても広く利用されている。

6. 発表雑誌：

雑誌名：*Science Advances*

論文タイトル：High-throughput label-free molecular fingerprinting flow cytometry

著者：Kotaro Hiramatsu*, Takuro Ideguchi, Yusuke Yonamine, SangWook Lee, Yizhi Luo, Kazuki Hashimoto, Takuro Ito, Misa Hase, Jee-Woong Park, Yusuke Kasai, Shinya Sakuma, Takeshi Hayakawa, Fumihito Arai, Yu Hoshino, and Keisuke Goda*

DOI：[10.1126/sciadv.aau0241](https://doi.org/10.1126/sciadv.aau0241)

9. 添付資料 :

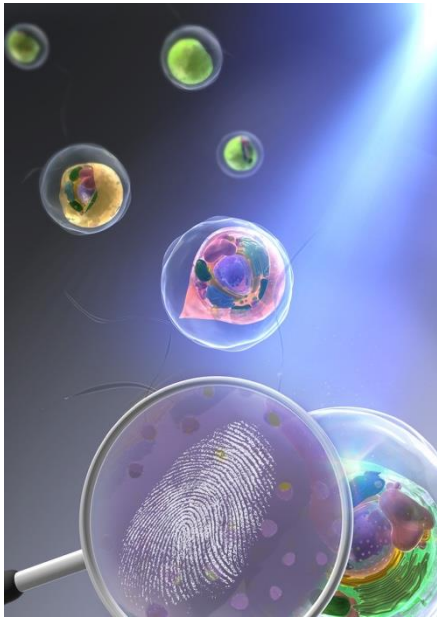


図 1. 本研究で開発した無標識フローサイトメーターの概念図
大規模な細胞集団に含まれる生体分子のラマンスペクトル（分子の指紋）を高速に測定する。

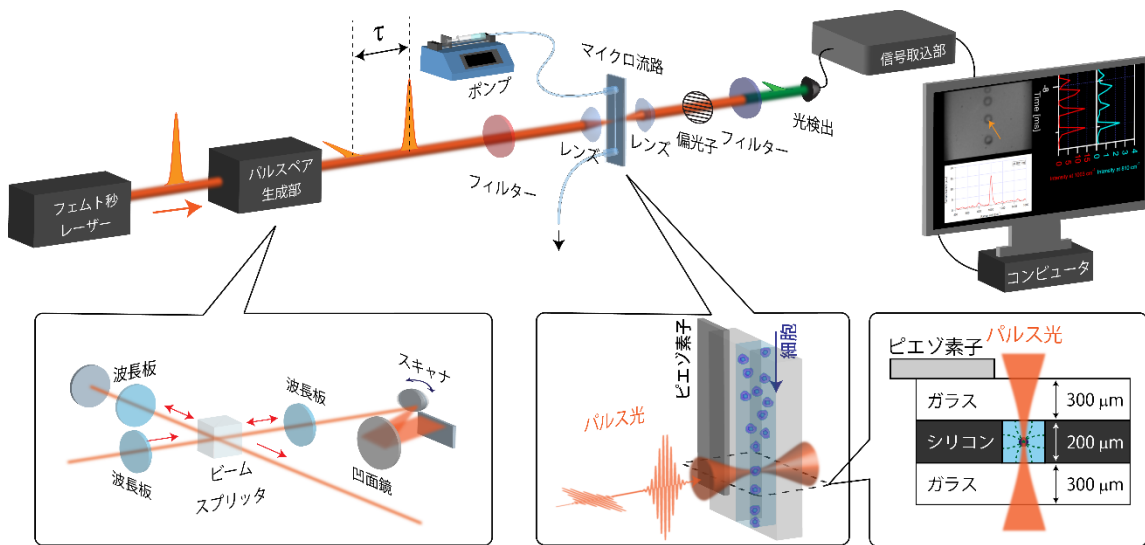


図 2. 本研究で開発した無標識フローサイトメーターの模式図
パルス光ペアを用いて細胞内の生体分子が振動する様子を時間的に追跡する。パルス光の間隔を高速に走査することで 1 秒間に 24,000 回のラマンスペクトル測定が可能となる。ピエゾ素子からの音響光学波を用いることでマイクロ流路の中心を細胞が流れるように調整し、個々の細胞にパルス光ペアを集光することで細胞内分子の測定を行う。

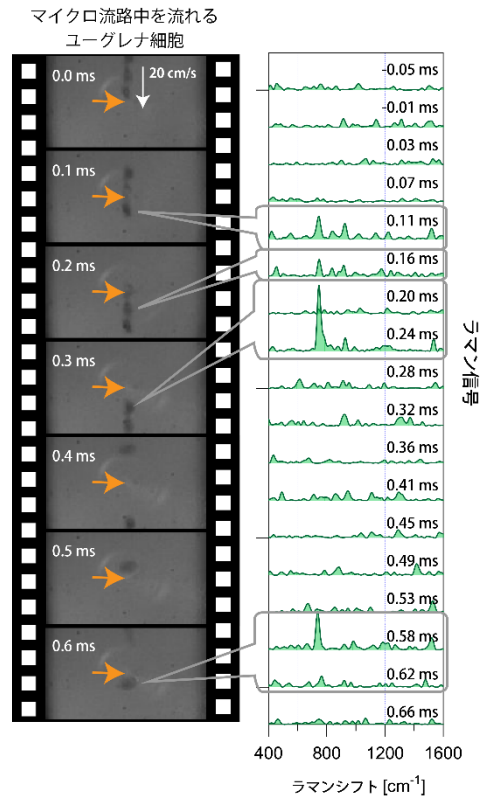


図 3. ユーグレナの高速・無標識 1 細胞解析の様子

マイクロ流路中を高速 (20 cm/s) に流れるユーグレナの 1 細胞ラマン測定の様子。矢印で示した測定部に細胞がやってくると、対応するスペクトル上でユーグレナの細胞内分子であるクロロフィル (光合成において光エネルギーを補足し化学エネルギーに変換する分子) に特徴的なラマン信号が現れている。1 秒間の間に 1,555 細胞のラマンスペクトルの取得を実現している。

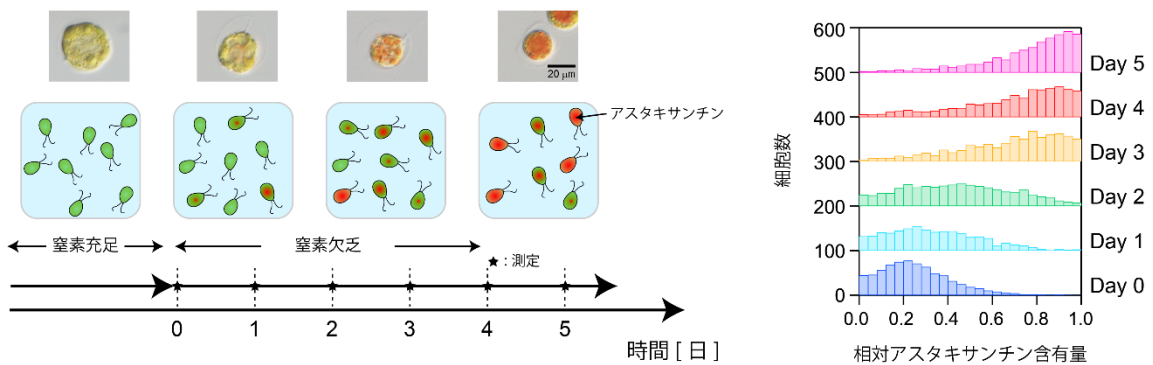


図 4. ヘマトコッカスの 1 細胞代謝解析

左：ヘマトコッカス細胞中のアスタキサンチン含有量の 1 細胞解析の概略図と各時点における細胞の顕微鏡写真

右：窒素欠乏条件培養 0～5 日目のヘマトコッカス細胞群を本手法で解析することによって得られた細胞内アスタキサンチン含有量の分布。0 日目では殆どの細胞が少量のアスタキサンチンしか含有していないのに対し、時間とともにアスタキサンチン含有量が増加する様子を見出し、無標識で検出することに成功した。さらに、1 日目といった早い段階においても一部の細胞は高いアスタキサンチン含有量を示した。このような細胞を用いることで高効率な物質生産へと繋がると期待される。

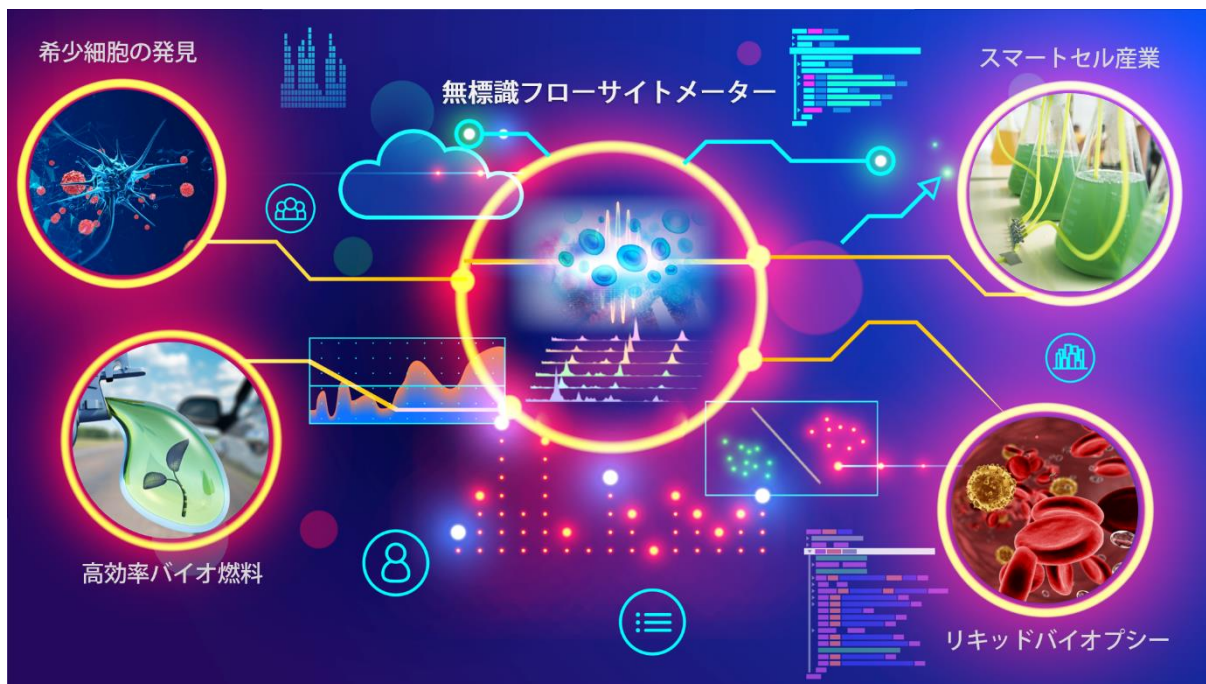


図 5. 今後の展望

本技術により細胞内分子の大規模・無標識測定やその動的挙動の高速測定が可能になる。膨大な細胞を分子レベルで解析することにより、希少細胞の発見などの基礎科学的な発見やスマートセル産業、バイオ燃料の高効率化や高精度なリキッドバイオプシー法などへの応用展開が期待される。