

# 一細胞自家蛍光分析技術 CRIF の開発

八幡 穰

## はじめに

糸状菌をはじめとする真核微生物の一群は多細胞性の増殖を行う。また、細菌など原核微生物もまた多数の細胞からなる構造体（バイオフィーム）を形成する。こうした集団微生物が作るコミュニティは、一見似たような細胞によって構成されているように見えるが、実際には均一な細胞の集団ではない。

シミュレーショングループでは、多細胞性の成育形態をとる糸状菌の菌糸や、細菌バイオフィームの中での細胞ごとの機能分化（ヘテロ性）の定量的理解を目指している。糸状菌や細菌バイオフィームは、醸造・発酵、創薬、工業製品の生産、作物病害などの広範な応用分野に関わる。本稿では、こうした不均一な微生物集団を一細胞の解像度で生きたまま解析するための技術として開発した“一細胞自家蛍光分析技術 CRIF (confocal reflection microscopy-assisted single-cell innate fluorescence analysis)”<sup>1)</sup>と、その応用展開に焦点をあてて解説する。

## 一細胞自家蛍光分析技術 CRIF の開発

すべての細胞は自家蛍光を持っており、後天的な蛍光標識を施さなくても励起光を当てることでそれぞれ特徴的な蛍光を放つ。この細胞自家蛍光は、細胞内の種々の構成要素や代謝産物が放つ、それぞれが特徴的なスペクトルをもった蛍光の集合体であり、そのため細胞の種類や生理状態は細胞自家蛍光の特徴（自家蛍光シグネチャー）に敏感に反映される。こうした特徴から、細胞の自家蛍光シグネチャー解析は細胞の分析を非破壊、非侵襲、無処理で行える手段として広い分野で注目を集めている。

しかし、これまでの自家蛍光シグネチャー解析は、細菌コロニーや細胞培養液など細胞集団の蛍光を蛍光分光器などで測定する形で行われており、多数の細胞からなる細胞集団の平均値のみに着目していたことから、一度に少数のデータしか得ることができなかった。また、こうした細胞集団単位の測定では、細胞外の培地成分や代謝産物などの影響を受けるといった課題もあった。そこで筆者らのグループでは、一細胞単位で正確に細胞内部に由来する自家蛍光を分析する技術の開発を進めている。

筆者らが開発した CRIF は共焦点レーザー顕微鏡をベースとした技術であり、一細胞ごとの自家蛍光シグネチャーを調べることができる。CRIF は共焦点反射顕微鏡技術 COCRM (continuous-optimizing confocal reflection microscopy)<sup>2)</sup>と、超高感度蛍光スペクトル共焦点顕微鏡技術、画像処理技術を組み合わせた技術である。まず COCRM で細胞の形態と位置情報を認識して、多数の細胞の自家蛍光を同時に解析し、“自家蛍光ビッグデータ”を生成する (図1)。次に、超高感度蛍光スペクトル共焦点顕微鏡により、細胞を複数の波長 (色) のレーザーにより励起することで、放出される蛍光の波長特性 (スペクトル) を分析する。これらの情報を統合して細胞が放出するさまざまな種類の自家蛍光を網羅的に取得する。この CRIF 技術は、2018 年 10 月に国内特許 (特許第 6422616 号) を取得し、JST の支援により PCT 出願と米英仏独での各国移行を進めている。

CRIF では、細胞集団を顕微鏡で立体スキャンするため、どのような自家蛍光シグネチャーを持った細胞が、3次元空間のどの座標に存在するかをマッピングしてデータベース化することができる (図2)。したがって、バイオフィームや組織のような立体的細胞集団を CRIF で解析すれば、細胞集団内の不均一性 (自家蛍光シグネ

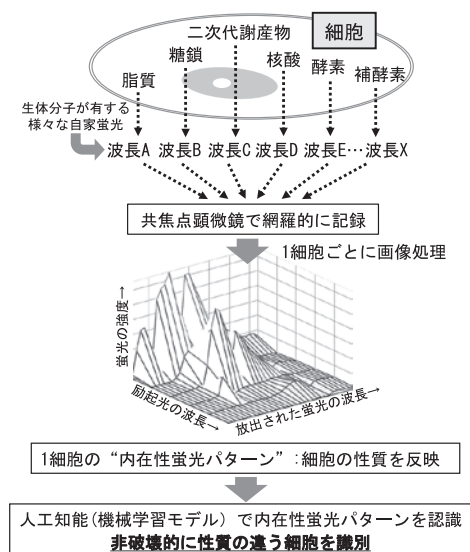


図1. CRIF法の概念図。個々の細胞から自家蛍光を網羅的に取得し、細胞の性質を分析するフローを示す。

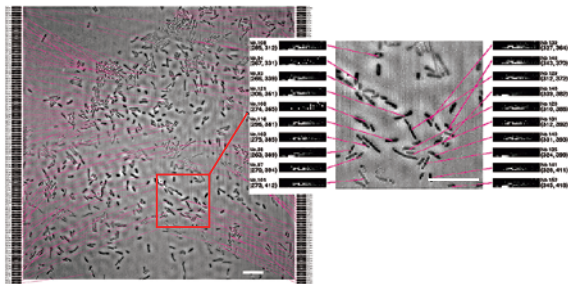


図2. CRIFで得られたデータ(細胞の位置・形態情報とリンクした自家蛍光ハイパースペクトル情報)を可視化した例。左パネル:細菌集団の個々の細胞(黒い部分)に紐付けられた自家蛍光ハイパースペクトルを表示した画像。右パネル:左パネルの部分拡大図。個々の細胞に番号が振られ、各細胞の座標情報と自家蛍光ハイパースペクトル情報(二次元バーコード状のもの)が紐付けられている様子を示す。自家蛍光ハイパースペクトルは、縦軸に励起波長、横軸に放出波長、グレースケールが相対強度を示している。スケールバーは10 μm。

チャーに現れた不均一性)とその空間的構造が非破壊的に可視化できると考えられる。

### CRIFによる集団微生物学

実際に筆者らのグループのCRIFを用いた研究から、一見均一に見える細胞集団内にも想像以上の不均一性(細胞ごとの個性)が存在することが見えてきた。一方で、一細胞レベル解析から得られる多数の細胞のデータを生かして効率的な機械学習を行い、細胞の種類や性質を高精度で予測する判別モデルが構築できることも分かってきた(図3)。

CRIFによる研究には、1)細胞集団の不均一性の解析、2)細胞種の予測、3)細胞の状態や性質の予測、などさまざまな方向性がある。このうちERATOシミュレーショングループとしては微生物集団のヘテロ性の評価に注力している。微生物集団のヘテロ性については、集団としての機能や生存性に関与していることが指摘されている。しかし、どのような条件でヘテロ性が出現するのか、あるいはその出現過程については未知の部分が多い。そこでCRIFにより不均一性を統一的に評価する指標づくりなどの研究を進めており、そのモデルとして微生物バイオフィルム中の不均一性の時空間的発展とその起源を解明する研究を進めている。

### 微生物以外へのスピノフ展開と社会実装への取組み

一方で、微生物分野以外へスピノフ研究も進んでいる。一例として、科研費新学術領域研究の支援により、配偶子の生理状態を非破壊的にモニタリングする技術を開発する研究を進めている。動物配偶子の体外成熟技術(*in vitro*配偶子形成)は日本が世界に先駆けて実現したが、

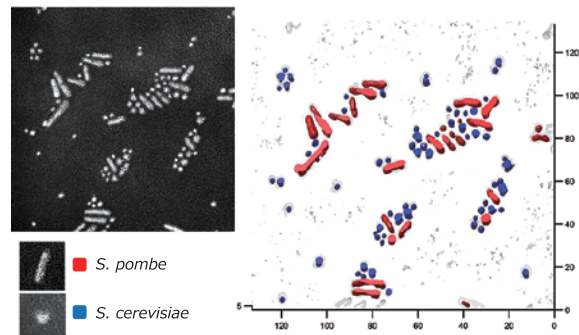


図3. CRIFの応用例(自家蛍光に基づいたTag-less細胞種アノテーション)。左パネル:形態の異なる二種類の酵母の共焦点反射顕微鏡画像。右パネル:取得した自家蛍光シグネチャーに基づく細胞種の予測。赤と青の色分けが予測の結果。形態の違いと色分けの結果がほぼ一致している。

配偶子の発生率(完成度)が低い問題を抱えており、この問題の解決に資することを目指している。

また、CRIFの社会実装においては、細胞の状態管理は有望な分野である。これまでの研究から、細胞の老化やストレス状態などが自家蛍光シグネチャーに反映されることがわかっている。そこで企業との共同研究で、物質生産に用いられる細胞の品質管理を行う技術としての開発を進めている。

### “誰にでも使える技術”化とさらなる高度化

集団微生物の理解と制御を目指した基礎的取組みと並行して、CRIFを誰にでも使えるテクノロジーとして普及させるための取組みをERATO野村集団微生物制御プロジェクトからのスピノフとして進めている。その一環として、NEDOスマートセルプロジェクトの支援を受け、CRIFに最適化された顕微鏡ハードウェアおよびソフトウェアの開発をニコンインステック株式会社との協業で進めている。また、CRIFをより使いやすい技術にするため、SN比を向上させる付着表面コーティング技術を開発し、国内特許を出願している。

さらに、一細胞自家蛍光解析をさらに高度、高感度、ごく低侵襲なものとすることを目指して、JST CRESTの支援により次世代の一光子分光検出技術<sup>3)</sup>(産総研が開発:超伝導転移端光センサ)との融合を進めている。

### CRIFの生物学への応用

CRIFがイノベーションを起こす分野の一つとして期待されるものに、微生物のスクリーニングや育種がある。伝統的なスクリーニング手法では、育種(形質転換など)を施した形質転換体を単離したのち、マルチウェルプレートなどで培養し、代謝産物を定量分析するなど、多

段階にわたる操作や多くの手間と時間を要する。そのためロボット工学を取り入れたハイスループットスクリーニング (HTS) が米国を中心に発展してきた。HTS は基本的には伝統的なスクリーニング手法の培養・代謝物解析などの一連の流れを自動化したものであり、HTS であっても目的に沿った細胞（およびその細胞が産生する代謝物）を、培養を介して選び出す必要があることには変わりはない。しかし、CRIF 評価系に適用すれば、目的物質高生産による細胞内の代謝の変化を非破壊で一細胞を評価できる可能性がある。つまり、培養を介さず、あるいは細胞が混合のまま高生産菌を確認することができれば、飛躍的時間短縮のみならず、一細胞で評価が可能となることから、新しい世代のハイスループット評価技術となることが期待される。

また、CRIF によって得られた各細胞の自家蛍光情報は、データベース化することで価値が高まると考えられる。世界中で利用されている異なる顕微鏡プラットフォーム間でも比較可能なデータを得るために、レー

ザー強度や波長について統一した基準を構築し、自家蛍光データの取得方法と組み合わせた手法の規格化を目指している。将来的には、微生物自家蛍光データのライブラリ構築（データベース）と、そのための手法の国際標準策定を展望している。これらデータベースを基に、たとえば自家蛍光情報による微生物検査機器などのハード開発や、自家蛍光情報による生産現場の微生物の状態診断サービスなど新たな産業分野の創成が期待される。

#### 謝 辞

本研究の一部は、文部科学省科研費および JST ERATO 野村集団微生物制御プログラム (JPMJER1502) により実施したものであり、ここに厚くお礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Yawata, Y. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **85**, e60589 (2019).
- 2) Yawata, Y. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **110**, 3770380 (2010).
- 3) Niwa, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **7**, 45660 (2017).