



東京大学
THE UNIVERSITY OF TOKYO



SCHOOL OF ENGINEERING
THE UNIVERSITY OF TOKYO
東京大学大学院
工学系研究科



東京大学 大学院
理学系研究科・理学部
SCHOOL OF SCIENCE, THE UNIVERSITY OF TOKYO



微生物の個性を測る高速分子イメージング法を開発 ～微生物によるバイオ燃料・バイオ医薬品生産の研究を加速～

1. 発表者：

小関泰之（東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻 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）

2. 発表のポイント：

- ◆分子振動を検出する世界最高速の光学顕微鏡を開発し、無染色で、生きた微細藻類ミドリムシの個々の細胞に含まれる脂質や多糖類のイメージングに成功した。
- ◆微細藻類の細胞を生きたまま染色せずに計測し、さまざまな環境変化や外部刺激に対する細胞のふるまいを詳細に調べることが可能になった。
- ◆多数の細胞集団内の個々の細胞の性質を調べ、希少な細胞を生きたまま探索する手法として本技術を用いることで、微生物による高効率バイオ燃料やバイオ医薬品などの研究を加速させることが期待される。

3. 発表概要：

東京大学大学院工学系研究科電気系工学専攻の鈴木祐太特別研究員、小関泰之准教授、東京大学大学院理学系研究科の合田圭介教授らは、内閣府 総合科学技術・イノベーション会議が主導する革新的研究開発推進プログラム（ImPACT）の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の一環として、生きた細胞の内部に存在する生体分子を光学的に検出する、高速誘導ラマン散乱（SRS）顕微鏡を開発しました。さらに、この顕微鏡を用いて、生きて動くミドリムシ細胞の内部に含まれる脂質や多糖類などをイメージングすることに成功しました。本技術を利用し、膨大な数の細胞集団に含まれるひとつひとつの細胞の個性を調べ、希少な細胞を生きたまま高速に探索することにより、微生物が産生する物質を用いたバイオ燃料やバイオ医薬品の研究を加速することが期待されます。本研究成果は、2016年8月1日16時（英国時間）にネイチャー・パブリッシング・グループ（NPG）の英国科学雑誌「Nature Microbiology」のオンライン版で公開されます。

4. 発表内容：

① 研究の背景と経緯

近年、微生物を用いた物質生産技術は、バイオ燃料、医薬品、食料、プラスチック等の幅広い応用が期待されています（図1）。これらの応用技術を実用化するうえで、微生物による物質の産生効率を高めることが必要不可欠であり、そのためには、生育環境や外部からの刺激に応じて微生物がどのように産生量を変化させるかを知ることが重要です。このような研究分野（システム代謝工学、注1）は、その次世代技術としての重要性が世界的に指摘されています。しかし、従来の化学的な計測法では、多数の細胞内の物質量の総和を計測することはできませんが、個々の細胞内の物質量を調べることは困難でした。また、細胞内の物質を染色（注

2) して顕微鏡により観察する方法もありますが、染色が細胞に影響を与えることが懸念されるうえ、染色のできない物質も存在します。

微生物の中でも、単細胞の藻類の一種であるミドリムシ（学名: *Euglena gracilis*）は、脂質や、多糖類の一種であるパラミロンなどのさまざまな代謝物を産生することが知られています。脂質はジェット燃料を始めとする再生エネルギーへの応用、パラミロンはバイオ医薬品等への応用が期待されており、これらの物質産生効率の向上が求められています。しかし、脂質の染色法は存在するものの、パラミロンの染色法はまだ知られていません。

従来より、無染色での生体観察法として、ラマン顕微法が知られています。ラマン顕微法では、光を分子に照射することで生じるラマン散乱（注3）を検出します。ラマン散乱の光の周波数は分子構造を反映するので、ラマン顕微法により無染色の生体の分子イメージングができます。しかし、ラマン散乱光は極めて微弱であるため、ラマン顕微鏡でのイメージングには数十分～数時間程度の長時間を要していました。これに対し、小関准教授が開発を進めてきた誘導ラマン散乱（stimulated Raman scattering, SRS）顕微法では、2色の光パルス（注4）を分子に照射し、分子振動に由来する光パルスの強度の変化（SRS効果）を検出します（図2）。SRS顕微法では、ラマン散乱に比べて高い感度で高速に生体分子を識別し、数秒程度の短い時間内に分子イメージングを行うことができます。

② 研究の内容

本研究では、SRS顕微法をさらに高速化し、生きて動くミドリムシのひとつひとつの細胞に含まれる脂質やパラミロン等の物質の分子イメージングに成功しました。

まず、ミドリムシ細胞が動かないように薬剤で固定してからSRS顕微鏡で観察したところ、ミドリムシ内部の、脂質とパラミロンを含む4種類の物質がイメージングできることを見出しました（図3）。次に、SRS顕微鏡の画像取得速度を、従来の1秒あたり30枚から1秒あたり110枚に高速化し、生きて動くミドリムシを観察しました。その結果、4つの分子振動周波数に対応するSRS画像を37ミリ秒という極めて短い時間で取得し、ミドリムシが細胞内に蓄積する物質を無染色で分子イメージングすることに成功しました（図4）。

さらに、本手法を応用して、窒素欠乏（注5）状態におかれた細胞の応答を調べました。窒素欠乏状態に置かれる前の細胞集団と、窒素欠乏に置かれてから2日目および5日目の細胞集団から、それぞれ約100匹の細胞を観察・評価し比較しました。その結果、図5に示すように、個々の細胞が含有する分量は細胞ごとに大きく異なりますが、窒素欠乏状態に置かれたミドリムシ細胞では、全体として葉緑体の量が減り、脂質やパラミロンの量が増えることが確認されました。このように、生きて細胞ひとつひとつに含まれる代謝物量と空間分布という細胞の個性に関する情報を得る事が可能になりました。

③ 今後の展開

今回開発した高速SRS顕微法に基づく細胞の個性の評価手法を用いることで、ミドリムシを始めとする微生物がさまざまな環境変化や外部刺激に対してどのような応答を示すかを詳細に調べ、その知見に基づき、高効率な物質産生手法の構築につながることを期待できます。さらに、本技術を発展させ、膨大な数の細胞集団から特異な特長を持った希少な細胞を探索することができれば、微生物を用いたバイオ燃料生産の高効率化や新規バイオ医薬品の開発につながることを期待されます。

本発表の研究チームメンバーは、東京大学の脇坂佳史（理学系研究科化学専攻博士課程学生）、鈴木祐太（電気系工学専攻特別研究員）、合田圭介（理学系研究科化学専攻教授）、小関泰之（工学系研究科電気系工学専攻准教授）、株式会社ユーグレナの岩田修（主任研究員）、中島綾香（主任研究員）、鈴木健吾（研究開発部長）、慶応大学の伊藤卓朗（特任助教）、千葉大学の廣瀬未紗（修士課程学生）、土門亮太（修士課程学生）、菅原麻衣（特任研究員）、津村徳道（准教授）、下馬場朋禄（准教授）、および東京大学医科学研究所の渡会浩志（准教授）で構成されています。

5. 発表雑誌：

雑誌名：「Nature Microbiology」

論文タイトル：Probing the metabolic heterogeneity of live *Euglena gracilis* with stimulated Raman scattering microscopy

著者：Yoshifumi Wakisaka, Yuta Suzuki, Osamu Iwata, Ayaka Nakashima, Takuro Ito, Misa Hirose, Ryota Domon, Mai Sugawara, Norimichi Tsumura, Hiroshi Watarai, Tomoyoshi Shimobaba, Kengo Suzuki, Keisuke Goda*, and Yasuyuki Ozeki*

DOI 番号：10.1038/nmicrobiol.2016.124

6. 問い合わせ先：

東京大学 大学院工学系研究科電気系工学専攻
准教授 小関 泰之（オゼキ ヤスユキ）
〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1

東京大学 大学院理学系研究科化学専攻
教授 合田 圭介（ゴウダ ケイスケ）
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

（報道に関すること）

東京大学工学部広報室

東京大学 大学院理学系研究科・理学部
特任専門職員 武田加奈子、教授・広報室長 山内 薫

（ImPACT プログラム内容およびPM に関すること）

科学技術振興機構 革新的研究開発推進室
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7 K's 五番町

（ImPACT 事業に関すること）

内閣府 革新的研究開発推進プログラム担当室
〒100-8914 東京都千代田区永田町 1-6-1

7. 用語解説：

注1) システム代謝工学

システム工学と生物学が融合した研究分野のひとつ。従来の方法では生産が難しい物質を、生物内の生体合成反応を用いて生産し、その生産効率の向上を図ることを目指している。世界経済フォーラムにおいて 2016 年の次世代 10 大技術分野のひとつに選ばれた。

注2) 染色

生体分子は透明であることが多いため、顕微鏡観察の前処理として、試料に対して蛍光分子や光吸収性の分子を用いた色付けを行うことが多い。このことを染色といい、また、染色を行わないことを無染色という。無染色での顕微鏡観察は、染色によって細胞機能に影響が生じることがないため、生きた細胞の観察に有利である。また、パラミロンのように染色の困難な物質を観察するうえでも有用である。

注3) ラマン散乱

光を分子に照射した際の光の散乱現象のひとつであり、分子振動の周波数だけ光の周波数が変化したもの。分子振動の周波数は分子の構造によって異なるため、ラマン散乱光は分子構造に関する情報を持つ。しかし、ラマン散乱光は極めて微弱であるため、その計測には長い時間を要する。

注4) 光パルス

極めて短い時間にエネルギーが集中したパルス状の光。今回開発した SRS 顕微鏡においては、5 ピコ秒(1 兆分の 5 秒)程度の時間幅を持った光パルスを用いている。

注5) 窒素欠乏状態

細胞培養のための培養液中の窒素の量が通常よりも非常に少ない状態。窒素が非常に少ない状態でミドリムシを培養すると、通常の培養条件よりも、細胞内部にパラミロンや脂質を多く蓄えることが知られている。しかし、細胞ごとのパラミロンの量を調べる事は困難であった。

8. 添付資料：

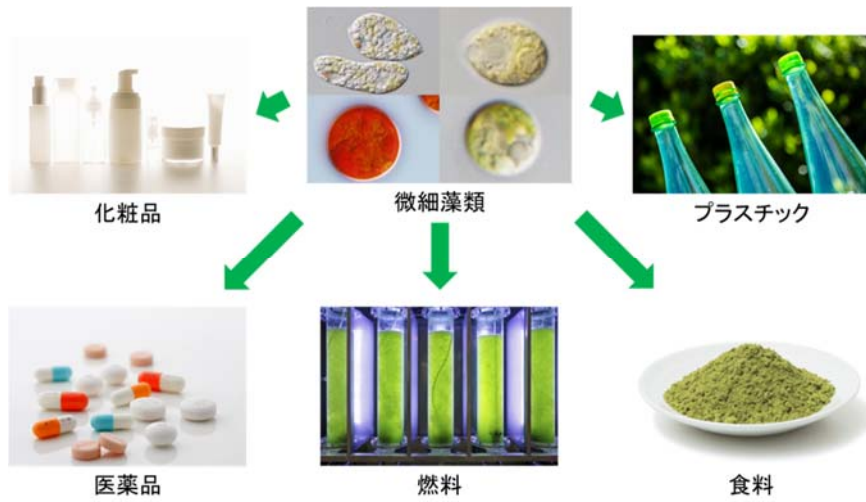


図 1. 研究背景：微細藻類による物質生産の応用例

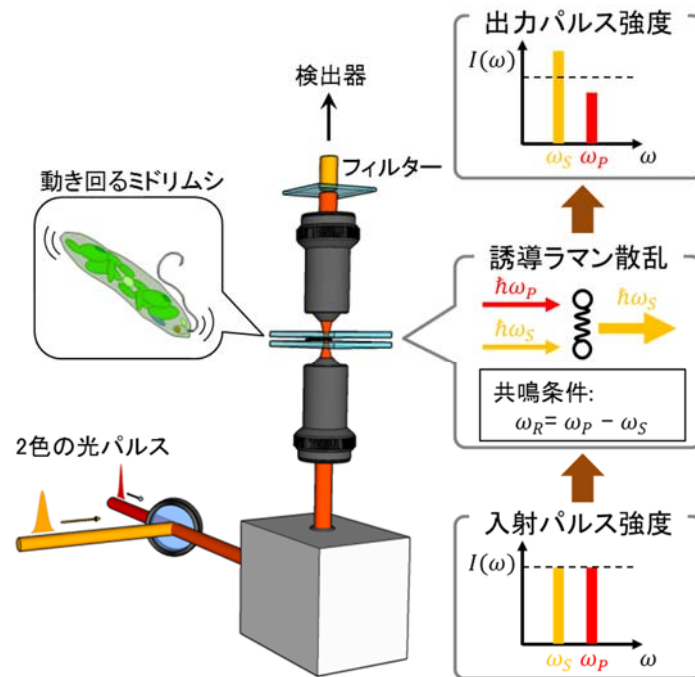


図 2. 誘導ラマン散乱顕微鏡の概念図

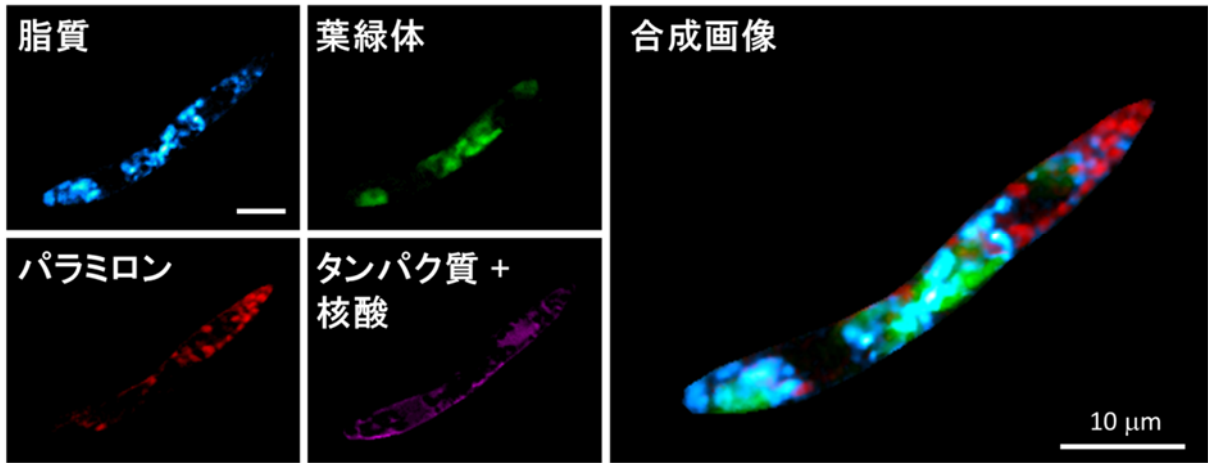


図 3. 固定したミドリムシの観察結果

異なる細胞内成分は異なる色で表示されている。水色、赤、緑はそれぞれ脂質、パラミロン、葉緑体を表す。

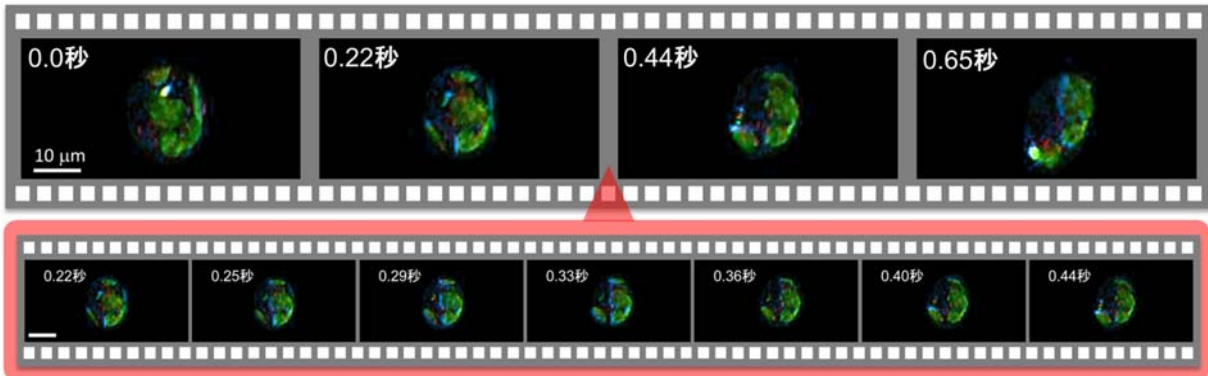


図 4. 高速 SRS 顕微鏡により観察した、生きて動き回るミドリムシの細胞内成分
水色、赤、緑はそれぞれ脂質、パラミロン、葉緑体を表す。

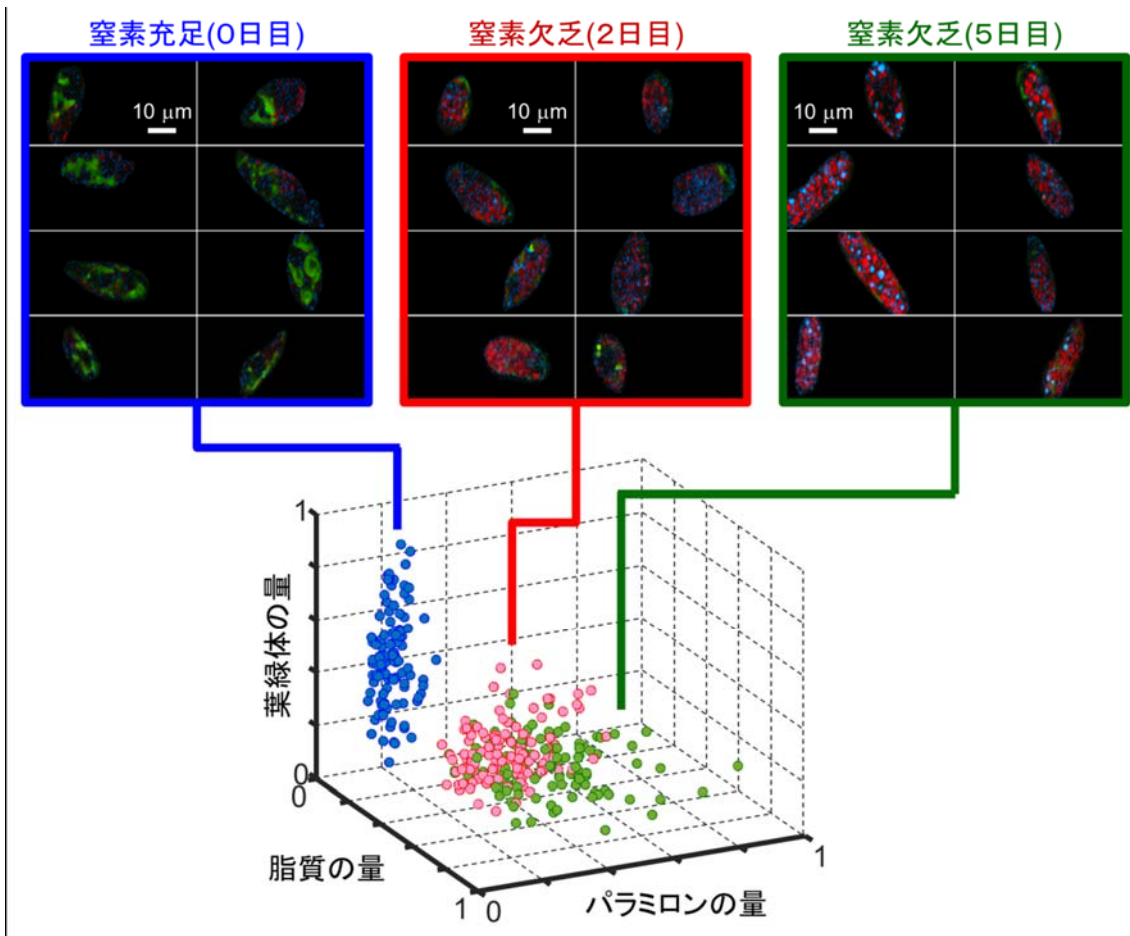


図 5. 窒素欠乏状態に置かれる前（0日目）および窒素欠乏状態に置かれてから2日目、5日目における、生きたミドリムシ細胞の観察結果
 上段：ミドリムシ細胞のSRS像。下段：各ミドリムシ細胞内部の脂質、パラミロン、葉緑体の成分量のグラフ。青色、赤色、緑色のプロットはそれぞれ0日目、2日目、5日目を表す。