

# 新産業創出に向けた無標識 AI セルソーター

研究代表者：東京大学 合田 圭介

## 【基本構想】

本プロジェクトでは、「スマートセル産業」の基盤となる指向性進化法の適用範囲を大幅に拡張する無標識・ハイスループットな品種改良法を確立する。DNA シーケンシング技術やゲノム編集技術、IT 技術の発展に伴い、細胞を自由自在に改変して産業利用するスマートセル産業（市場規模は 200 兆円以上）の時代が幕開けつつある。スマートセルは、その細胞が持つポテンシャルを最大限利用しつつ、物質生産などに人為的に最適化された細胞である。細胞内化合物は例えば、栄養成分や匂い分子が代表的であるが、それに加えて、各種生物が持つ機能性生体分子も対象として、それらが増加、もしくは減少した品種改良株を作出することを目指す。この方法の確立により、各種微生物・細胞において、ゲノム編集技術適用の有無によらず迅速に品種改良を進める事が可能となる。具体的には、研究代表者らがこれまでに構築した分子振動に基づく細胞内分子の高速定量法を応用し、細胞内に含まれるターゲット分子を 1 細胞毎に計測し、その含有量に基づき目的細胞を分取する技術を開発する。遺伝子の変異導入と組み合わせることにより、産業的価値の高い細胞を創出することが可能となる。この方法の確立により、各種微生物・細胞において、ゲノム編集技術適用の有無によらず迅速に品種改良を進める事が可能となる。

## 1. 研究目的

本研究では、蛍光標識を導入することなく細胞内分子量や細胞の機能を定量し、細胞分取を可能にする無標識 AI セルソーターの開発と実証を行う。最近研究代表者らの研究室で開発された高スループット FT-CARS (Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering) フローサイトメーター [1] を基盤技術とし、マイクロ流路を用いた細胞分取技術、人工知能(AI) によるスペクトル解析技術と組み合わせることによって、高スループット (1,000 細胞/秒)・無標識・広帯域 (10 種類以上の細胞形質を測定可能) でのリアルタイム細胞分取を目指す。さらに、本技術をスマートセル産業に展開することで、細胞内の任意成分の多寡を指標にして生物の品種改良 (指向性進化) を実現する。本技術を試作し、実践的品種改良が可能であることを実証し、革新的品種改良サービス提供の基礎とする。プロジェクト 2 年目となる令和 2 年度は、以下の研究項目を達成目標として研究を推進した。

- (1) 細胞分取実証
- (2) FT-CARS 分光計測の高速・高感度化
- (3) 藻類の指向性進化の実証

## 2. 研究成果

上記研究目的に沿って研究を遂行し、令和 2 年度は以下の研究成果を得た。

### (1) 細胞分取実証

前年度までに開発した無標識 AI セルソーター (図 1) を用いた細胞分取を実証した。当初の計画通り、2 形質以上の情報をもとに 10 細胞/秒を超えるスループットでの細胞分取を目標値として実験を行った。分取対象として、これまでに FT-CARS による測定実績 [1,2] のあるヘマトコッカス、ユーグレナ、クロレラ細胞を用いた。これらの細胞はバイオ医薬品、バイオ燃料といった物質生産や、環境中

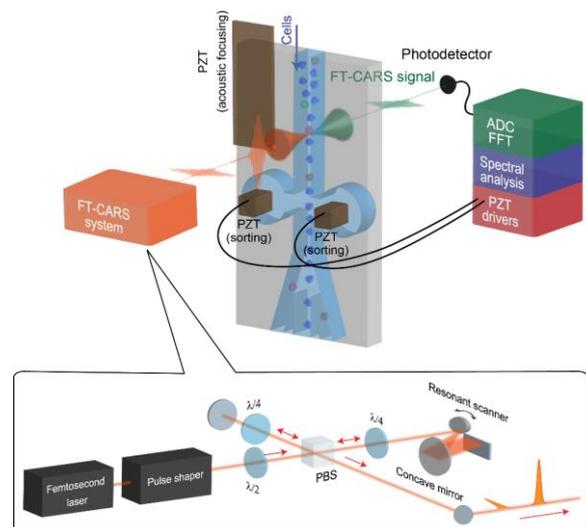


図 1. FT-CARS セルソーターの概略図。超短パルスレーザーを用いて分子振動を高速にリアルタイム計測し、細胞内に含有される目的分子の量に基づいた細胞分取を実施する。

の有害物質を蓄積することによる水質改善に応用することが期待されている。そのため、本項目で取り組む実証は単なる Proof-of-concept ではなく、直接的に応用研究へと繋げることが出来ると予想される。異なる条件で培養した細胞群を対象として無標識 AI セルソーターによって細胞分取が可能であることを実証する。

具体的には、以下の 3 つの条件において細胞分取実験を実施した。

1. *Euglena gracilis* 細胞集団からパラミロン含有量の多い細胞を分取する
2. *Chromochloris zofingiensis* 細胞集団からデンブレン含有量の多い細胞を分取する
3. *Haematococcus lacustris* 細胞と *Euglena gracilis* 細胞を混合した集団からアスタキサンチン含有量の多い

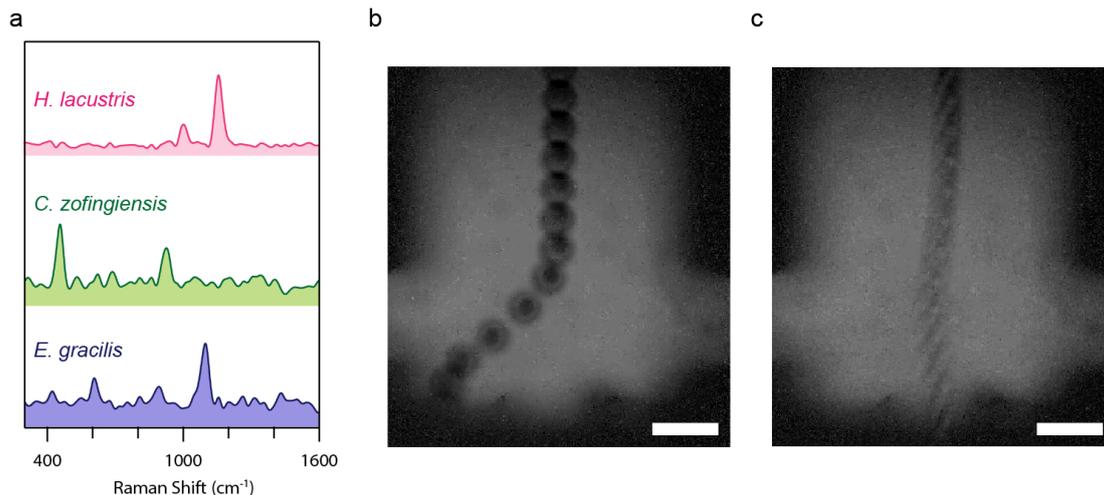


図 2. 無標識 A I セルソーターによる細胞分取. (a) 流路中を流れる異なる 1 細胞から取得したラマンスペクトル (b) 実験 3 において *H. lacustris* を分取する様子 (c) 実験 3 において *E. gracilis* が分取されずに流路を通過する様子

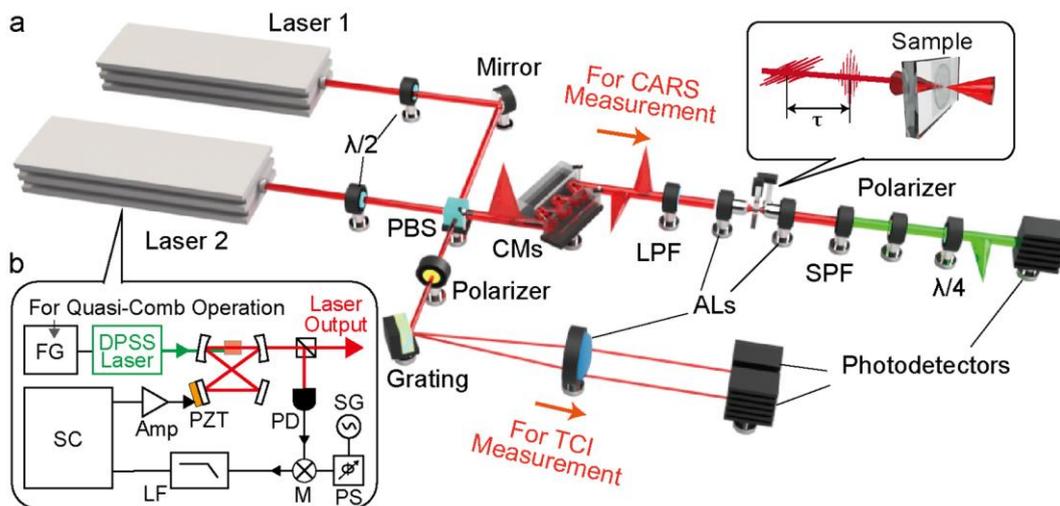


図 3. Quasi-dual-comb CARS 分光装置 (a) 装置全体の概略図 CM: チャープミラー, LPF: ロングパスフィルター, SPF: ショートパスフィルター, AL: アクロマートレンズ. (b) 光源部分における繰り返し周波数制御部の概略図. FG: ファンクションジェネレータ SC: サーボコントローラー, PD: フォトダイオード, PS: 位相シフタ

*Haematococcus lacustris* 細胞を分取する

マイクロ流路中を流れるこれらの細胞から計測した典型的なラマンスペクトルを図 2a に示す. 異なる細胞内分子に由来するラマンスペクトルの特徴量が検出されており, スペクトル形状に基づいた細胞判別が可能であることが分かる. 測定したスペクトルは Field-Programmable Gate array (FPGA) によってリアルタイムに解析され, マイクロ流体チップ下流において細胞を分取する (図 2b-c). 細胞分取にあたっては, ラマンスペクトル中のターゲット分子の特徴的なピークが観測される波数およびラマン信号が観測されない波数における信号強度を用いて 2 次元散布図を作成し, 散布図上で線を引くことで分取/非分取の判断を実施した. 細胞によってはターゲット分子が含まれないにも関わらず, スペクトルのバックグラウンド全体で信号強度が高くなるようなイベントがあり, ターゲット分子を正しく定量するためには複数波数における強度で分取

判断を行うことが重要となる. それぞれの条件における分取性能を評価するために, Sort および Unsort チャンネルに集めた細胞を顕微鏡観察し, それぞれのチャンネルにおける目的/非目的細胞を計数した. すべての条件において 2 形質の情報 (2 次元散布図) をもとに, 20 細胞/秒を超えるスループットでの分取を行っており, **2 形質を用いて 10 細胞/秒で分取するという本プロジェクトの数値目標を達成した.** 細胞分取の Purity も各条件で 80% を超えており, 本手法を用いた指向性進化の実現に向け十分な性能を実証することができた.

(2) FT-CARS 分光計測の高速・高感度化

本研究ではレゾナントスキャナーによる光学遅延の高速走査を用いた FT-CARS 法を用いて細胞内分子の計測を行ってきた. 本手法で判別できる細胞形質の数は FT-CARS 計測の感度によって決まるため, 無標識セルソーターの適

用範囲を拡張するために FT-CARS 計測の高感度化は不可欠である。本研究では、新たに"quasi-dual-comb"法を開発し、それによりラマン分光計測の高速化及び高感度化を実現した。

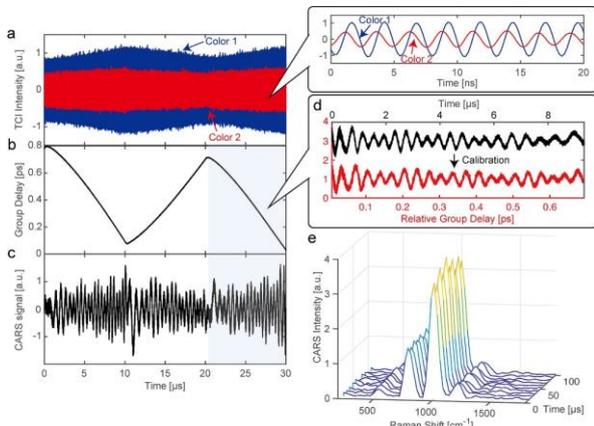


図 4. Quasi-dual-comb CARS 計測 (a) TCIs, (b) ポンプ-プローブ遅延 (c) Time-domain CARS interferogram (d) TCIs から求めた遅延による Time-domain CARS interferogram の校正 (e) ラマンスペクトル

dual-comb 分光法は、2 台のモードロックレーザーの周波数を精密に制御して分子分光計測を行う計測法であるが、高い周波数分解能で広帯域の分光スペクトルが得られる方法として広く用いられている手法である。dual-comb 法を CARS 計測へと応用した dual-comb CARS 法は広帯域ラマン分光計測が比較的高速に出来るとして近年注目を集めている。dual-comb CARS 法の測定速度は 2 つのモードロックレーザーの繰り返し周波数の差によって決まるが、測定速度を大きくするために繰り返し周波数差を大きくすると、サンプリングが疎になり、感度が下がるとともにスペクトルの帯域が狭くなるというトレードオフがある。そのため、これまでの dual-comb CARS 分光法では、指紋領域 (200 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) を計測する場合は 10,000 spectra/s が測定速度の限界であった [3]。

本研究で開発した quasi-dual-comb CARS 法では、2 台のレーザーの繰り返し周波数のうち、一方は固定し、もう一方を高速に変調して計測を行う。そのため、2 パルス間の遅延は任意の範囲で変調でき、上述のトレードオフの関係に制限されることなく測定速度を向上させることが出来る。開発した quasi-dual-comb CARS 分光計を図 3 に示す。2 台の高繰り返し (~1 GHz) チタンサファイアレーザーを光源としてポンプ-プローブ方式で分子振動を時間領域で計測する装置である。レーザーの繰り返し周波数の変調は、チタンサファイア結晶を励起する光の強度を変調することで、チタンサファイア結晶中の実効的な光路長を変調し (光カー効果)、実現した。また、変調によって引き起こされるパルス間の (非再現的な) 遅延は、2 色干渉 (Two-color interferogram: TCI) 計測によってリアルタイムに計測した [4]。

開発した quasi-dual-comb CARS 法によって計測したトルエンの TCI, TCI から求めた遅延時間, CARS 信号 (時間領域), 及び CARS スペクトルを図 4a, b, c, e にそれぞれ示

す。1 回の広帯域 (200 – 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) ラマン分光計測が 10  $\mu\text{s}$  で完了しており、従来の dual-comb CARS 法に比べて 10 倍の高速化が達成されていることが分かる。さらに、図 5 に示すように従来法と同じ計測速度で比べたとき、20 倍程度の信号雑音比の向上が見られ、速度のみならず大幅な感度向上も実現した。本成果によってラマン分光計測の応用範囲を広げることができると期待される。

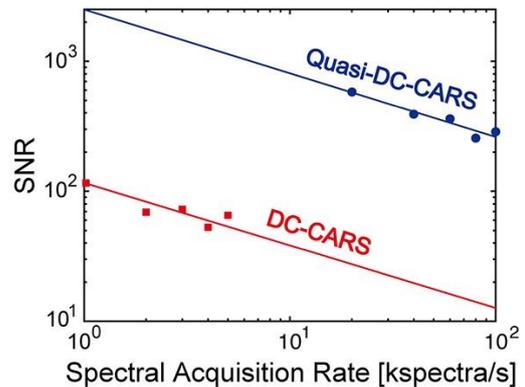


図 5. 様々な測定レートにおける Quasi-dual-comb CARS 法及び dual-comb CARS 法で計測したスペクトルの信号雑音比

### (3)藻類の指向性進化の実証

無標識 AI セルソーターを用いた指向性進化では図 6 に示すプロセスを繰り返すことで高付加価値細胞を産生することを目指す。研究項目(1)においてラマンスペクトルプロファイルに基づく分取が可能となった。培養は通常の実験室培養ですすめる事ができるため、残るプロセスであるランダム変異導入の実証を本項目では実施した。本実証で用いる *E.gracilis* は遺伝子変異への耐性が高く、薬物や紫外線では効率的な変異導入が難しい [5]。そこで本研究

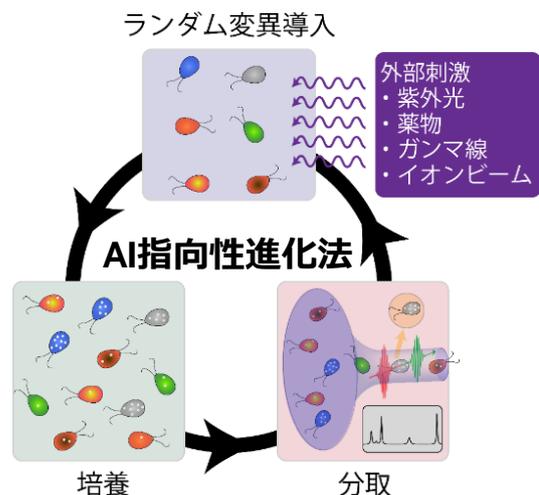


図 6: 標識 AI セルソーターによる指向性進化の概略



図 7: 理化学研究所仁科センターにおける *E. gracilis* 細胞への鉄イオンビーム照射実験の様子。

では理化学研究所・生物照射チーム（チームリーダー：阿部知子博士）及び量子科学技術研究開発機構・イオンビーム変異誘発研究（プロジェクトリーダー：大野豊博士）との協同によって鉄イオンビーム及び炭素イオンビームを細胞に照射し、遺伝子変異導入を試みた（図 7）。

まず、照射した細胞群から FACS 装置を用い、19 クローンを単離した。それぞれのクローンを同一の条件で一定期間培養した後に、無標識 AI セルソーターを用いてパラミロン含有量を定量した。図 8A 各クローンで計測したラマンスペクトルの平均を、図 8B に 1 細胞ラマンスペクトルから見積もったパラミロン含有量の分布を示す。特に鉄

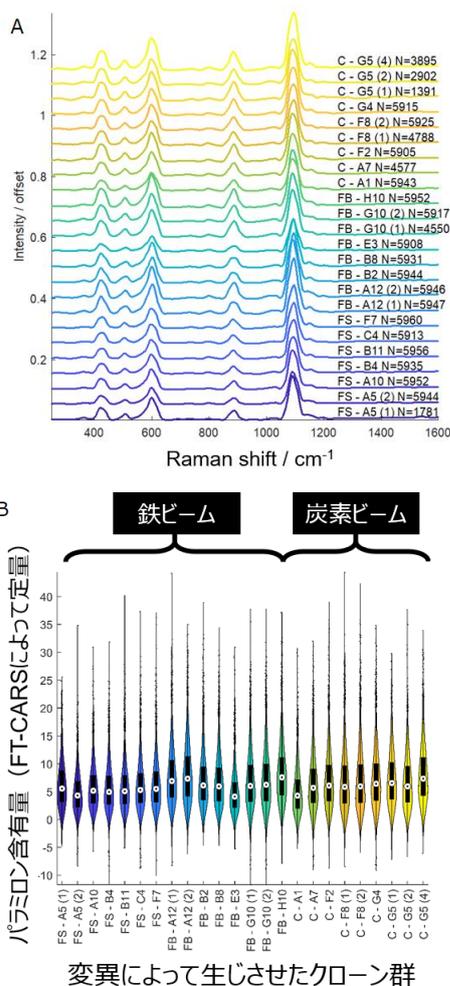


図 8: 変異導入後の *E. gracilis* 細胞に含まれるパラミロン量の定量 A. 各クローンから測定した平均のラマンスペクトル B. 各クローンの 1 細胞ラマンスペクトルから見積もったパラミロン含有量分布

イオンビームを照射したクローンにおいてパラミロン含有量の違いが見られ、遺伝子変異導入および無標識 AI セルソーターによるその定量ができていたことが実証された。

### 3. 今後の展望

本プロジェクトでは、広帯域ラマンスペクトルに基づく高速細胞分取を実現した。今後は本手法の応用によって以下の研究を展開していく。

#### ① 藻類の指向性進化の性能評価および実用化

上記で産生した *E. gracilis* のいくつかのクローン群に対して DNA 解析などを行い、新たな細胞株が樹立できていることの実証を行うとともに、長期培養によって獲得形質が失われない事などを実証する。更に、*C. zofingiensis* などの細胞に関しても同様に指向性進化の実証を進めていく。また、大腸菌や酵母を用いた指向性進化にも取り掛かる。これらの種は藻類に比べ小さいため、分取のスループットは落とす必要があるが、培養速度が速いため、比較的少数の細胞の分取でも実用的であると期待される。

#### ② 装置のさらなる高性能化

本手法では試問領域のラマンスペクトル形状に基づく細胞分取を実施したが、今後より広帯域スペクトルの取得によってさらに多くの形質に基づく細胞分取を実現する。具体的には 2 台のレーザーを同期発振することで、CH 伸縮領域 (2800–3200  $\text{cm}^{-1}$ ) を同時に計測できる手法の開発を進めていく。

### 【参考文献】

- [1] K. Hiramatsu, T. Ideguchi, Y. Yonamine, S. Lee, Y. Luo, K. Hashimoto, T. Ito, M. Hase, J.-W. Park, Y. Kasai, S. Sakuma, T. Hayakawa, F. Arai, Y. Hoshino, and K. Goda, *Sci. Adv.* **5**, eaau0241 (2019).
- [2] K. Hiramatsu, K. Yamada, M. Lindley, K. Suzuki, and K. Goda, *Biomed. Opt. Express* **11**, 1752 (2020).
- [3] T. Ideguchi, T. Nakamura, S. Takizawa, M. Tamamitsu, S. Lee, K. Hiramatsu, V. Ramaiah-Badarla, J. Park, Y. Kasai, T. Hayakawa, S. Sakuma, F. Arai, and K. Goda, *Opt. Lett.* **43**, 4057 (2018).
- [4] R. Kameyama, S. Takizawa, K. Hiramatsu, and K. Goda, *ACS Photonics* **8**, 975 (2021).
- [5] K. Yamada, H. Suzuki, T. Takeuchi, Y. Kazama, S. Mitra, T. Abe, K. Goda, K. Suzuki, and O. Iwata, *Sci. Rep.* **6**, 26327 (2016).

## 業 績

## 【原著論文】

1. Muzhen Xu, Dan Yuan, Sheng Yan, Cheng Lei, Kotaro Hiramatsu, Jeffrey Harmon, Yuqi Zhou, Mun Hong Loo, Tomohisa Hasunuma, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "A morphological indicator for directed evolution of *Euglena gracilis* with high heavy metal removal efficiency," *Environmental Science & Technology*, in press (2021).
2. R. Kameyama, S. Takizawa, K. Hiramatsu, and K. Goda, "Dual-Comb Coherent Raman Spectroscopy with near 100% Duty Cycle," *ACS Photonics* 8, 975–981 (2021).
3. N. Chen, T. H. Xiao, Z. Luo, Y. Kitahama, K. Hiramatsu, N. Kishimoto, T. Itoh, Z. Cheng, and K. Goda, "Porous carbon nanowire array for surface-enhanced Raman spectroscopy," *Nat. Commun.* 11, 1–8 (2020).
4. A. Isozaki, D. Huang, Y. Nakagawa, and K. Goda, "Dual sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput, scalable, multiplexed droplet sorting," *Microfluid. Nanofluidics* 25, 32 (2021).
5. N. Nitta, T. Iino, A. Isozaki, M. Yamagishi, Y. Kitahama, S. Sakuma, Y. Suzuki, H. Tezuka, M. Oikawa, F. Arai, T. Asai, D. Deng, H. Fukuzawa, M. Hase, T. Hasunuma, T. Hayakawa, K. Hiraki, K. Hiramatsu, Y. Hoshino, M. Inaba, Y. Inoue, T. Ito, M. Kajikawa, H. Karakawa, Y. Kasai, Y. Kato, H. Kobayashi, C. Lei, S. Matsusaka, H. Mikami, A. Nakagawa, K. Numata, T. Ota, T. Sekiya, K. Shiba, Y. Shirasaki, N. Suzuki, S. Tanaka, S. Ueno, H. Watarai, T. Yamano, M. Yazawa, Y. Yonamine, D. Di Carlo, Y. Hosokawa, S. Uemura, T. Sugimura, Y. Ozeki, and K. Goda, "Raman image-activated cell sorting," *Nat. Commun.* 11, 1–16 (2020).
6. A. Isozaki, Y. Nakagawa, M. H. Loo, Y. Shibata, N. Tanaka, D. L. Setyaningrum, J.-W. Park, Y. Shirasaki, H. Mikami, D. Huang, H. Tsoi, C. T. Riche, T. Ota, H. Miwa, Y. Kanda, T. Ito, K. Yamada, O. Iwata, K. Suzuki, S. Ohnuki, Y. Ohya, Y. Kato, T. Hasunuma, S. Matsusaka, M. Yamagishi, M. Yazawa, S. Uemura, K. Nagasawa, H. Watarai, D. Di Carlo, and K. Goda, "Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput sorting of large-volume biological compartments," *Sci. Adv.* 6, eaba6712 (2020).
7. A. Isozaki, H. Mikami, H. Tezuka, H. Matsumura, K. Huang, M. Akamine, K. Hiramatsu, T. Iino, T. Ito, H. Karakawa, Y. Kasai, Y. Li, Y. Nakagawa, S. Ohnuki, T. Ota, Y. Qian, S. Sakuma, T. Sekiya, Y. Shirasaki, N. Suzuki, E. Tayyabi, T. Wakamiya, M. Xu, M. Yamagishi, H. Yan, Q. Yu, S. Yan, D. Yuan, W. Zhang, Y. Zhao, F. Arai, R. E. Campbell, C. Danelon, D. Di Carlo, K. Hiraki, Y. Hoshino, Y. Hosokawa, M. Inaba, A. Nakagawa, Y. Ohya, M. Oikawa, S. Uemura, Y. Ozeki, T. Sugimura, N. Nitta, and K. Goda, "Intelligent image-activated cell sorting 2.0," *Lab Chip* 20, 2263–2273 (2020).

## 【総説】

1. J. Gala de Pablo, M. Lindley, K. Hiramatsu, and K. Goda, "High-Throughput Raman Flow Cytometry and Beyond," *Acc. Chem. Res.*, in press (2021).
2. Yuqi Zhou, Akihiro Isozaki, Atsushi Yasumoto, Ting-Hui Xiao, Yutaka Yatomi, Cheng Lei, Keisuke Goda, "Intelligent Platelet Morphometry," *Trends in Biotechnology*, 2020年9月28日
3. A. Isozaki, J. Harmon, Y. Zhou, S. Li, Y. Nakagawa, M. Hayashi, H. Mikami, C. Lei, and K. Goda, "AI on a chip," *Lab Chip* 20, (2020).

## 【口頭発表】

1. Muzhen Xu, Jeffrey Harmon, Tomohisa Hasunuma, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "AI ON A CHIP FOR IDENTIFYING MICROALGAL CELLS WITH HIGH HEAVY METAL REMOVAL EFFICIENCY," *Transducers 2021*, Online, 2021年10月26日
2. Philip McCann, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, "Fluorescence-encoded time-domain coherent Raman spectroscopy through single-photon counting," *Photonics West*, Online, 2021年3月6日
3. Risako Kameyama, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, "Fast, sensitive dual-comb CARS spectroscopy with a quasi-dual-comb laser," *Photonics West, San Francisco*, Online, 2021年3月6日
4. Keisuke Goda, "Emerging opportunities of AI with lab-on-a-chip technology", REM-2021, 東京 Online, 2021年2月3日
5. 合田圭介, 「ナノテクと AI で新型コロナウイルスの重症化を防げ!」, nano tech 2021, 東京ビックサイト, 2020年12月9日
6. 合田圭介, 「ナノテクと AI で新型コロナウイルスの重症化を防げ!」, コロナウィルス感染症とナノメディシン学会, 東京 Online, 2020年12月5日
7. Keisuke Goda, "Intelligent Image-Activated Cell Sorter 2.0", OPTIC-2020, 東京 Online, 2020年12月5日
8. Muzhen Xu, Dan Yuan, Sheng Yan, Cheng Lei, Kotaro Hiramatsu, Jeffrey Harmon, Yuqi Zhou, Mun Hong Loo, Tomohisa Hasunuma, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, "A cellular morphological indicator toward directed evolution of microalgae for highly efficient wastewater treatment," *化学とマイクロ・ナノシステム学会第*

- 42 回研究会, Tokyo, Japan (Online) ,2020 年 10 月 26 日
9. Yuta Nakagawa, Shinsuke Ohnuki, Akihiro Isozaki, Naoko Kondo, Yoshikazu Ohya, Keisuke Goda, “ Exploring the advantage of large droplets for single-cell analysis,” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 42 回研究会, Tokyo, Japan (Online) ,2020 年 10 月 26 日
10. 松村 洋貴, 磯崎 瑛宏, 赵 雅祺, 黄 康睿, 若宮 翼, 袁 丹, 三上 秀治, 大貫 慎輔(1) 上村 想太郎, 大矢 禎一, 合田 圭介, “出芽酵母の大規模な遺伝子解析のための高スループット細胞形態分取法,” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 42 回研究会, Tokyo, Japan (Online) ,2020 年 10 月 26 日
11. Dan Yuan, Julia Gala de Pablo, Matt Lindley, Mun Hong Loo, Mika Hayashi, Yaqi Zhao, Kotaro Hiramatsu, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, “Viscoelastic-fluid-based single-particle analyzer with Fourier-transform coherent anti-Stokes Raman scattering spectroscopy,” 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 42 回研究会, Tokyo, Japan, Online,2020 年 10 月 26 日
12. 合田圭介, 「細胞のウォーリーを探せ!」, 日本学術会議「次世代統合バイオイメージングと数理の協働の展望」シンポジウム, 東京 Online, 2020 年 10 月 14 日
13. Mun Hong Loo, Yuta Nakagawa, Akihiro Isozaki, Keisuke Goda, “High-throughput sorting of nanoliter droplets using an electrode array with a slanted microchannel.” MicroTAS 2020, Online, 2020 年 10 月 8 日
14. Keisuke Goda, “ Vibrational Flow Cytometry and Beyond,” IEEE photonics 2020, Online, 2020 年 9 月 29 日
15. Risako Kameyama, Kotaro Hiramatsu, Keisuke Goda, “ High-speed coherent Raman spectroscopy by repetition-rate modulation,” 分子科学オンライン討論会, Online, 2020 年 9 月 17 日
16. Keisuke Goda, “Intelligent IAC,” スーパー酵母 2020 が拓く未来, 東京, Online, 2020 年 8 月 24 日
17. Keisuke Goda, “ Vibrational Flow Cytometry and Beyond,” CYTO 2020, Online, 2020 年 8 月 5 日
18. Keisuke Goda, “How can biophotonics research be efficiently translated to clinical practice? What role do biomedical institutes play in this translation?” CLEO Pacific Rim 2020, Online, 2020 年 8 月 4 日
19. Akihiro Isozaki, Yuta Nakagawa, Mun Hong Loo, Dino Di Carlo, Keisuke Goda, “Sequentially addressable dielectrophoretic array for high-throughput large-droplet sorting,” CYTO 2020, Online, 2020 年 8 月 5 日
20. Akihiro Isozaki, Hideharu Mikami, Hiroshi Tezuka, Hiroki Matsumura, Kangrui Huang, Yasuyuki Ozeki, Takeaki Sugimura, Nao Nitta, and Keisuke Goda, “ iACS2.0: intelligent image-activated cell sorting upgraded,” CYTO 2020, Online, 2020 年 8 月 5 日
21. Keisuke Goda, “Find cellular Wally with the power of photonics and AI,” IONS OPUMA 2020, Tokyo, Japan, Online, 2020 年 6 月 11 日
22. Keisuke Goda, “ Intelligent Image-Activated Cell Sorting,” ICDIP 2020, Tokyo, Japan, Online, 2020 年 5 月 21 日

【特許】

- (1) 国内特許出願 2 件  
(2) 国外特許出願 1 件