

「さがけ 統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成30年度終了研究課題—

研究総括 浜地 格

1. 研究領域の概要

「さがけ 統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤(1 細胞解析)」研究領域は、1 細胞解析技術の新たな核となる革新的シーズの創出を目指して、唯一無二の技術開発に挑戦する若手個人研究者を結集します。

具体的なテーマは、1 細胞の表現型・機能・個性を理解するために必須となるゲノムやプロテオームなどの生体物質・分子情報、およびそれらの物質間あるいは細胞間の複雑な相互作用ネットワークに関する情報を、定量的・網羅的に極限の精度と分解能で解析するための基盤技術の構築です。これを実現するには、生命科学におけるニーズの確固たる理解に基づき、従来型のバイオテクノロジーのみならず、ナノテクノロジー、化学、工学、材料科学、光科学、情報学、ケミカルバイオロジー等の関連分野間の融合研究を、これまで以上に推進する必要があります。本研究領域は、諸分野の研究者が集うバーチャル・ネットワーク型研究所としての強みを活かし、オリジナルで世界初の技術の確立へ挑戦する個人研究者の苗床となります。

本研究領域ではオープンイノベーションを志向し、技術開発の早期から生命科学・工学への応用展開、潜在的な市場の開拓を強く意識します。ただし、これは短期的成果を求めるという意味ではありません。個々のアイデアを真に求められる技術へと鍛え上げ、熟成させる過程において、本研究領域のさがけ研究者には、研究領域内や対応する CREST 研究はもとより、産学問わず関連研究者との間で積極的に協働関係を構築する姿勢を必須とします。これら研究課題の総体として、本研究領域は 1 細胞解析分野における科学技術イノベーションの源泉となり、世界をリードする革新的技術基盤の構築に貢献します。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 14 件

備考：2014 年度採択であったが、ライフイベント一時中断のため 2018 年 6 月に研究期間が満了した神谷真子研究員、および 2015 年度採択した 14 課題のうち 2019 年 3 月末をもって研究期間が満了する 13 課題を評価する。福山真央研究者の課題はライフイベントによる研究中断により 2020 年 3 月終了となるため、2019 年度の事後評価対象とする。

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「さがけ 統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」領域に設けた選考委員 12 名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さがけ共通の 選考基準 (URL : <http://www.jst.go.jp/pr/info/info1051/sankou2.html>) の他、以下の点を重視した。

細胞は、言うまでもなく生体を構成する最小の機能単位ですが、形態学的に同一に見える細胞でも、実は均一なものではなく、ゲノムや発現タンパク質、糖鎖・脂質や種々の代謝物の量、種類、修飾様式なども含めて、分子レベルで記述しようとする、個々の細胞間で大きく異なると考えられる。1 細胞レベルで、このような多種多様な生体分子群が担う分子情報を、網羅的かつ定量的に解析することは、細胞集団の平均値としてしか分子レベルでの細胞特性を記述できない現状を大きく打ち破る契機となり、生命科学の諸課題解決に対して新しいアプローチの基盤を提供できるだけでなく、バイオテクノロジーや医療応用をより合理的に進める新しいプラットフォームを強化・整備することにつながると期待される。このような背景に基づいて、本研究領域で募集する具体的なテーマ例を以下に示す。

- A. 1 細胞レベルの表現型・機能・個性を理解するために必須となる生体物質・分子情報を定量的・網羅的に極限の精度と分解能で解析するための基盤技術の構築

- a. ゲノムやエピゲノム、トランスクリプトームなど
最近の次世代シーケンサーの革新的進歩という状況を受けて、ゲノム・エピゲノムを対象とする研究提案では、それが真に1細胞レベルへ適用できることを厳格に求める。
- b. プロテオーム、グライコーム、メタボロームなど
これらの解析等においては、1細胞に限定せず少数細胞集団での網羅的解析や機能・イメージング、その基盤材料・ツールなど、1細胞解析を目指した極限の時間的・空間的精度や分解能を実現するための独創的で革新的なアイデアの提案を歓迎する。
- B. 1細胞レベルの表現型・機能・個性を理解するために、生体物質間あるいは細胞間の複雑な相互作用ネットワークに関する情報を極限の精度と分解能で解析するための基盤技術の構築
- C. 1細胞の網羅的解析から得られてくる膨大な分子情報を統合解析するための情報数理学に根ざした提案

いずれにおいても解析対象とする細胞は、原核細胞、真核細胞を問わず、また分離した1細胞だけでなく生体組織内の1細胞解析など、難易度の高いものも含む。また上記の例以外でも魅力的で独創的なアイデアを提案してください。短期的な視野からの発想だけでなく、長期スパンの目標・展望をも見据えた、あらゆる分野からの、骨太で挑戦的なテーマ設定も大いに歓迎する。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザーの3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採択数		
			14件	内訳	3年型
対象数	228件	30件			14件

()内は大挑戦型としての採択数。

※本領域においては、5年型、大挑戦型を公募しなかった。

備考:

- 1) 2015年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。
 - ・福山 真央 研究者
ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。
- 2) 加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。
 - ・神谷 真子 研究者(2014年度採択)
ライフイベントによって研究を一時中断し、2018年6月にさきがけ研究期間を満了したため。

5. 研究実施期間

3年型

2015年10月～2019年3月(2015年採択研究者の内別紙一覧の13名)

2014年10月～2018年6月(神谷真子研究者:2014年採択研究者)

6. 領域の活動状況

領域会議:7回

研究総括の研究実施場所訪問:14回

- ・2015年9月25日 神谷 真子 研究者サイトビジット
- ・2016年2月5日 洲崎 悦生 研究者サイトビジット
- ・2016年9月20日 坂内 博子 研究者サイトビジット
- ・2017年2月23日 城口 克之 研究者サイトビジット

- ・2017年2月23日 谷口 雄一 研究者サイトビジット
- ・2017年6月30日 松崎 典弥 研究者サイトビジット
- ・2017年6月30日 若林 真樹 研究者サイトビジット
- ・2017年6月30日 山下 隼人 研究者サイトビジット
- ・2017年8月29日 猪股 秀彦 研究者サイトビジット
- ・2017年10月27日 山口 哲志 研究者サイトビジット
- ・2018年2月27日 落合 博 研究者サイトビジット
- ・2018年2月27日 三浦 史仁 研究者サイトビジット
- ・2018年4月9日 鈴木 団 研究者サイトビジット
- ・2018年6月20日 竹本 さやか 研究者サイトビジット

CREST/さきがけ合同会議:2回

- ・平成28年1月12日 第1回 日本科学未来館未来館ホール
- ・平成28年11月18日 第2回 日本科学未来館未来館ホール

2期生成果報告会:2回

- ・2018年11月28日 第3回 第41回分子生物学会年会・サテライト会議 パシフィコ横浜
- ・2019年3月17日 第4回 化学会第99春季年会(2019)・コラボレーション企画甲南大学岡本キャンパス

その他:4回

- ・2016年11月16-17日 International Conference on Single Cell Research 2016: Joint Conference of 10th International Workshop on Approaches to Single Cell Analysis
東京大学伊藤記念ホール

NUS-JST(PRESTO) Joint Symposium on BioImaging and Single Cell Analysis と押しかけ講演会

- @シンガポール
- ・2016年12月9日 NUS-JST(PRESTO) Joint Workshop on BioImaging and Single Cell Analysis
University Hall, National University of Singapore
- ・2016年12月8-12日 押しかけ講演会先 National University of Singapore、A*STAR、
Nanyang Technological University、
Singapore University of Technology and Design
ほか

Max Planck Florida Institute for Neuroscience and JST joint Workshop と北米地区押しかけ講演会

- ・2018年10月29-30日 MPIF-JST Joint Workshop on Neuroscience and Single Cell Research
Max Planck Florida Institute for Neuroscience (MPFI)
- ・2018年10月25-11月3日 押し掛け講演先 MPFI、University of Texas, Austin, Columbia University,
Stanford University

Single Cell Surveyor Symposium と欧州地区押し掛け講演会

@Uppsala, Sweden

- ・2019年3月4-5日 12th International workshop on approaches to single cell analysis @Uppsala University
- ・2019年3月1-8日 押し掛け講演先 Institute of Experimental Botany CAS (Czech)
Imperial College, Oxford University (UK), Uppsala University, Karolinska Institute (Sweden),
Swiss Federal Institute of Technology Lausanne (Swiss)、

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成31年1月 評価会開催



8. 事後評価項目

- (1) 研究課題等の研究目的の達成状況
- (2) 研究実施体制及び研究費執行状況
- (3) 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)
- (4) 世界レベルの若手研究リーダーの輩出の観点から、本さがけ研究が、研究者としての飛躍につながったか(今後の期待を含む)」を加味して評価を行った。

9. 評価結果

総論:本研究領域では、1 細胞解析技術の新たな核となる革新的シーズの創出に取り組んできました。本年度は 14 名の研究者がさがけ研究期間を満了しました。外部発表では、論文数 82 件(国際 82 件、国内 0 件)、口頭・ポスター発表 265 件(国際 88 件、国内 177 件)、総説等の著作物 55 件(国際 11 件、国内 44 件)、特許出願 28 件(国内 18 件、外国 10 件)と、高い生産性を示しました。これらの口頭発表の内、海外招待講演が 60 件、国内招待講演が 128 件と、国内外からもさがけ「1 細胞解析」領域-2 期生の研究成果が高く評価されていたことが窺えます。今年度さがけ研究を終了した 14 名の内、神谷真子研究者、洲崎悦生研究者、細川正人研究者の 3 名が本さがけ研究期間、もしくはその翌年に文部科学大臣賞・若手科学者賞を受賞しています。また、坂内博子研究者が、第 14 回(平成 29 年度)日本学術振興会賞受賞し、他研究者も諸団体からの多数の受賞をしており、その業績を認知いただいている証と考えます。

本さがけ領域では、異なる科学的バックグラウンドを持つ研究者が互いの創造性を磨きあい、異分野融合によって新たな創造的研究を生がうまれる場となることを意図しました。この期待に応え、洲崎悦生研究者をはじめとする 2 期生も、領域の各種催しに積極的に参加し、1 期生、3 期生を交え、異分野の研究者同士と高い視点から建設的な討論を行ってきました。自己の研究を異分野の研究者に説明につとめ、聞く側も異分野の課題を理解しようと真摯に取り組む中で、各々の研究に課題を磨き合うことができました。さらには、積極的に提携をはかり創造的な研究を進める動きが生まれてきています。ここで生まれたネットワークから新たなブレイクスルーが萌芽しようとしています。なお、これらの成長は、領域アドバイザーの先生方がメンターとしてさがけ研究者を見守り、時には鼓舞し、時には厳しい言葉と的確な助言をいただいたおかげであることは、言うまでもありません。

いずれの研究課題も、領域にふさわしい成果を挙げましたが、これらの中でも、今後の 1 細胞解析の重要な基盤となる微小液滴内で数万細胞のゲノム解析を並列的に行う革新的な技術開発を達成し、バイオベンチャーを立ち上げた細川正人研究者に対しては、本領域から“Innovation 賞”を贈りました。また、染色体の構造をサブミクロソームの解像度で計測し、2 種類の 4 つのヌクレオソームからなる基本構造を明らかにし、Cell 誌の表紙を飾った谷口雄一研究者の傑出した研究成果に対して、“Rising Star 賞”を贈りました。さらに、洲崎悦生研究者は幅広い知識をもとにした建設的な討論を行い上記の本領域の風土醸成に対する多大な貢献しました。ここに、領域より“特別賞”を贈りました。また、ライフイベントのため 2018 年 6 月課題終了となった神谷真子研究者は昨年度 1 月の 1 期採択生に対する成果評価会において、その「多機能プローブによる組織内 1 細胞機能解析」における傑出した研究成果に対して、“Rising Star 賞”を贈っています。

以下、研究者ごとに評価をコメントします。

1) 神谷 真子 研究者「多機能蛍光プローブ群による組織内 1 細胞機能解析」

従来の酵素活性検出用の小分子蛍光プローブは酵素との反応生成物である蛍光色素が細胞内から拡散するため組織中の 1 細胞レベルの空間分解能で、酵素を発現する細胞の特定やその機能を解析することは困難でした。神谷研究者は反応前は蛍光性・細胞内滞留性もないが、 β Galactosidase を発現している細胞内では反応して蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子蛍光プローブ SPiDER- β Gal を開発しました。本プローブは、固定組織のみならず、未固定の脳スライス中の lacZ 発現細胞を蛍光検出し、蛍光シグナルを指標に電極を刺して電気生理実験を行うことができました。また、時々刻々と変化する細胞内のグルタチオンの酸化還元状態を 1 細胞レベルで可逆的にリアルタイムに定量的に検出する波長変化型蛍光プローブ QG3.0 を開発しました。これらの特許出願、さらには五稜化学からの上梓など、成果の実用化への展開も十分評価に値します。昨年度のさがけ 1 期生の評価を行った際に、これらの傑出した業績に対し、1 期生のライジング・スター賞を贈りました。

2) 猪俣 秀彦 研究者「流体による1細胞解析から1個体解析への応用」

アフリカツメガエルを用いて、胞腔はモルフォゲンを希釈および阻害因子によって活性化する Sink として機能すること、原腸胚後期になるとこの胞腔体液は本研究で見出した ABC-pore を介して原腸に移行すること、さらに神経胚後期になると原腸のモルフォゲンは細胞外体液と共に原口から胚外に排出されることを明らかにしました。ABC-pore の発見とともに、この開閉制御が、初期胚の細胞外体液の流れ、モルフォゲンの移動、ひいてはモルフォゲン依存的なパターン形成など個体レベルの発生に連関していることを明らかにしており、いずれも画期的な成果であると高く評価できます。

今後は、これらの研究成果を quality の高い論文として世界に発信するとともに、初期発生システムを統御する普遍的な原理の解明をさらに発展させてゆくことを期待します。

3) 落合 博 研究者「細胞多様性決定要因の網羅解析技術の開発」

ハイブリッドマウス ES 細胞を用いて 1 細胞 RNA-Seq を実施し、細胞毎に各アレルの発現量を計測することによってゲノムワイドに Tbi ノイズの大きさを定量化しました。このデータの妥当性を純系由来の ES 細胞の 25 種の対立遺伝子に各々 GFP または iRFP をノックインした細胞株で確認しました。また、PRC2 関連因子の結合配列がプロモーター領域に局在する遺伝子は、高い Tbi ノイズレベルを示す傾向があることを見出し、ゲノム編集を利用してこの関連性を確認しました。さらに、CRISPR ノックアウトライブラリーを用いて Tbi ノイズに関連する因子を網羅的に探索し、Akt および MAPK シグナル伝達経路が Tbi ノイズレベルの調節に関与することを明らかにしています。これらのデータのしっかりとした validation をとるとともに、Akt/MAPK シグナルとの関連をさらに突き詰めて、論文化することを期待します。

4) 城口 克之 研究者「生体システム理解・医科学応用を実現する1細胞核酸計測技術の開発」

ランダムバーコード法を精度高く使って 10^4 個以上の single cell 毎の遺伝子発現レベルの定量的解析法を確立しました。DNA バーコードは多くの研究者が使い始めていますが、その有効性を十分に活かしていない事例も多数発表されているのが現状です。城口研究者は腸内細菌叢の解析に用いる手法や、1つの T 細胞からワンステップで T 細胞受容体の RNA 配列を解析する手法などを開発することなどによって、DNA バーコードのユニークな使用法を開発し、その有効性を示しています。今後より有用な応用法の開発によって、用途が拡大し、より広い分野にも展開されることが期待されます。キーとなるテクノロジーには特許も出願しており、大いに評価できる成果を出しています。ただし、16sRNA を用いた stain レベルの解析など以外に、この手法を用いないと解析が不能な応用例を示すなど、より新しさをアピールすることができればと思います。

5) 洲崎 悦生 研究者「組織3D染色による細胞の網羅的解析技術の開発」

CUBIC 法の活用を進めるため、マウス全脳の細胞解像度イメージを最速 10 分強で取得できる高性能のライトシート顕微鏡システムと、取得した画像から各々の細胞をコンピューター上で検出し位置情報とする解析プログラムを開発し、マウス全脳の活動状態の遷移のモニタリングすることに成功しました。また、ヒト病理組織を用いた「3次元病理学」を大阪大学と推進し、実証例を論文発表しました。さらに、CUBIC 法での透明化脳の基本物性をヒドロゲルとして理解し、この観点を活かして、10種類以上の抗体を用いた全脳イメージングに成功し、関連プロトコルを整備しました。成果は、着実に論文化されおり、さきがけ内外との共同研究も活発に進めていることを含めて、優れた成果を高く評価します。

さきがけ領域会議で幅広い知識を背景とした積極的なコメントで、領域内の討論を積極的また刺激的にリードしました。この領域の研究者同士が、積極的に前向きな議論をする風土醸成への貢献に対し、「特別賞」を贈りました。

6) 鈴木 団 研究者「摂動と計測による個体のエネルギーフローの1細胞分解能解析」

熱という物理量を、生細胞内の細胞質や ER などの特定の細胞内器官から、組織・個体まで広いスケールにおいて精密に計測・解析する基礎技術の確立やプローブの開発することに成功しています。さらに、金ナノ粒子を細胞に取り込ませて、細胞内の熱分布を操作する技術を確立し、生体の筋管細胞が Ca^{2+} の変動なしに熱によって収縮することを確かめ、さらにこの熱による収縮誘導を光ピンセットを用いたタンパク質 1 分子顕微計測系における新たな力計測によって確認しました。この時の細胞内温度変化を細胞内温度計で直接計測して定量化したほか、この熱刺激がヒートショックタンパク質の発現の促進やミトコンドリア発生を促す遺伝子の発現を促進することを確かめています。これらの成果は生命科学に新しい視点をもたらす可能性があり、高く評価できます。

この他の研究成果も含め、研究成果は順調に論文発表されており、プレス発表も実施しています。確立した技術の応用展開も進んでいるようです。是非、細胞での熱伝導率の実測までぜひ達成して欲しいと期待しています。

7) 竹本(木村) さやか 研究者「脳深部微小神経回路を構成する細胞個性の機能的・分子的解読と情動制御への応用」

脳深部に存在する分界条床核や扁桃体などの微小領域に焦点を当て、遺伝子工学および蛍光標識技術を駆使することで、マウス脳の微小領域を標識し、重要な役割を果たす分子を同定し、その機能解明を推進してきました。更に、マウス個体レベルで情動の変化をもたらす様々な刺激を与えた際の脳深部の細胞応答を単一細胞レベルで可視化することによって、分界条床核と扁桃体の重複した分子実体と機能を明らかにすることに成功しつつあり、これらの成果は高く評価できます。本研究に新たな解析技術を加え、さらに発展させてゆくことで、生物個体レベルでの情動の理解が1細胞の分解能で進展し、様々な要因によって生じる情動異常の病態解明や治療へと繋がる事が期待されます。

8) 谷口 雄一 研究者「1細胞内多階層オミックス動態の連関性」

ヌクレオソームの配向性をも加味した「サブヌクレオソーム分解能」をもつ精密なゲノム3次元構造解析手法「Hi-CO 法」を開発し、酵母において実証しました。さらにヌクレオソームの3次元配列構造を規定する2つのヌクレオソーム4量体の基本構造を見出し、その成果をCell誌に発表しました。これらは、染色体の構造や遺伝子の発現制御の解明、特に分子レベルでのエピゲノム制御のメカニズムの解明に大きな貢献をすると期待されます。

また、本研究者は、光シート顕微鏡の大きな欠点である試料の制約を除いて一般的なカバーガラス型試料に対して測定を行える「PISA 顕微鏡」を開発しました。さきがけ研究では測定系の安定化のために各種の改良を行い、改良された顕微鏡を様々な生化学分析器の検出系として利用して、様々な分析・分子診断を1分子感度で実現することにも成功しつつあり、今後の展開を楽しみにしています。

ゲノム構造の解析という基礎的な研究からPISA顕微鏡とその応用的な研究まで傑出した業績をあげています。これらの業績に対し、さきがけ1細胞領域ではさきがけ2期生に対するライジング・スター賞を贈りました。

9) 坂内 博子 研究者「細胞膜分子動態1分子解析による細胞の個性の解読」

最大20種類以上の膜タンパク質動態を量子ドットでラベルし観察することができる研究プロトコルを完成しました。これらを利用して脳神経疾患モデル動物やてんかん患者由来のiPS細胞を観察し、てんかんのモデルであるIP₃受容体タイプ1ノックアウトマウス由来の神経細胞では、抑制性神経伝達物質受容体GABA_A受容体の側方拡散の増大が、一方、てんかん患者由来のiPS細胞由来神経細胞では、NMDA受容体拡散運動の増加を観察しました。更に細胞内貯留庫由来と細胞外由来の細胞内Ca変動を測りわけ手法を確立し、それぞれ異なる下流シグナルを活性化し、GABA_{AR}の側方拡散に対して「抑制」と「促進」という正反対の役割を持つことも明らかにしました。また、タウ欠損神経細胞の樹状突起・細胞体において、抑制性シナプス受容体、興奮性受容体の動態とともに異常が示し、これはタウ分子の生理的役割の解明につながる成果と期待されます。多くの共同研究によって、確立した技術の応用展開も広がっているようです。是非、これらの分子の動態を制御機構や生理機能に迫り、大きな論文発表へと繋げて欲しいと期待しています。

10) 細川 正人 研究者「組織内の細胞多様性を明らかにする超並列ゲノム解析技術の創成」

マイクロ流路を用いて直径数十μmの液滴内に細胞を一個ずつ封じ込めた液滴を秒速千個もの速度で作出し、その液滴のゲル化を上手く利用して、1細胞のDNAを読み取り可能な量まで個別・並列に増幅し、細胞1つ1つの遺伝情報を決定する手法を、かなり完成度の高いレベルで確立しました。本手法によって、これまで未知であった部生物のゲノムを1細胞単位で一挙に解読できることを実証しました。これは、機能や存在がほとんどわかっていない土壌細菌・腸内細菌の解析において非常に有効な技術となると期待されます。将来は、ヒトの健康を増進する共生微生物を特定することや、抗生物質や産業用酵素を作り出す新規微生物を探索し、利活用につなげるなどの発見がなされることも期待されます。

コア技術は論文化や特許出願がなされており、これらの技術を軸に、微生物を対象とした世界初のシングルセルゲノム解析サービスを提供する研究成果活用ベンチャーbitBiome株式会社を設立しています。すでに、海外研究機関を含めた共同研究も進めています。さきがけ研究で得た技術の社会実装化・普及を積極的に進めている点も高く評価されます。

これらの傑出した成果に対し、本領域からは「イノベーション賞」を贈りました。

11) 松崎 典弥 研究者「がん幹細胞の生物学的機能を解明する1細胞解析技術の創製」

従来のコラーゲンを用いるのではなく、均一に分散できるようにマイクロ化したコラーゲンを用いることで、ヌードマウスに移植したがん組織と同等の高い濃度の細胞外マトリックス(ECM)を有するがん組織モデルの作成を可能

にし、この方法で、実際のがん組織と同等の ECM 密度やがん細胞、血管網を持つ生体外がん組織の3D モデルの生体外再構築に成功しました。生体外3D がん組織モデルは、普通の培養皿で培養した時と比べ、腫瘍幹細胞もマーカーCD44、CD44wの発現や、抗がん剤への抵抗性が高くなるなど、ヌードマウスに移植したがん組織によく似た性質を持っていることを実証するなど、着実な研究成果をあげており、その論文化も着々と進んでいます。将来的には、このような手法を利用したヒトがん組織モデルが抗がん剤等の開発に使われることによって、動物実験を無くすだけでなく、実際のがん組織に近いモデルでの薬剤評価をすることによって、より有効な薬剤の開発につながる事が期待されます。

12) 三浦 史仁 研究者「トランスクリプトームとメチロームの統合1細胞解析」

これまでの DNA 中のシトシンのメチル化状態をゲノム網羅的に決定する技術である全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)では、バイサルファイト処理によって1本鎖した DNA の両端にアダプター配列を効率よく連結する技術がなく、次世代シーケンサー用のライブラリー生成効率が低く、インサート長も短いことが問題でした。本さきがけ研究では1本鎖 DNA 同士を連結する2つの方法、TCS ライゲーション法と TACS ライゲーション法の開発に成功しました。特に後者の反応効率と実用性は優れており、本法を用いた tPBAT は従来のランダムプライマーを用いる rPBAT 法と比べて収量とインサート長が格段に改善されたシーケンサー用ライブラリーを調製できることを実証しました。実際にtPBAT 法で解析を行い、WGBS の解析効率がどこまで向上したのか、およびそれによる色々なサンプルでの single cell メチローム解析の結果を楽しみにしています。

tPBAT 技術によって WGBS が更に普及し、エピゲノム研究が大きく進展することを期待します。また、これらのライゲーション技術の様々な応用法を考案・発展させ、多くの研究者が使える技術として広がる努力を重ねて欲しいと考えます。

13) 山下 隼人 研究者「生細胞膜分子動態を観る極限時空間分解能 AFM の創成」

時空間分解能が向上した新しい構造の高速・広領域 AFM スキャナーを開発し、世界で初めて生きたバクテリアにおける細胞膜タンパク質の分子構造とその動きを可視化することに成功しました。この高速 AFM を用いて、抗菌薬を投与後、細胞膜から膜分子が脱落し、それによって膜表面の構造が大きく変化し、溶菌に至る過程をリアルタイムに観察することができました。生細胞におけるナノスケールの動的なプロセスを観察する際に、本研究で開発した AFM 技術が非常に有効であることを示すものです。また、細胞だけでなく生体分子やバイオ材料のイメージングでも成果が得られています。これらの技術は特許も出願されており、今後さらなる応用と発展が期待されます。まとまった大きな論文発表につながり、この記述を世界にアピールすることを期待します。

14) 若林 真樹 研究者「単一細胞プロテオミクスが拓く細胞証分析」

細胞1つから採取可能なタンパク質は極めて微量であるため、従来技術では1細胞プロテオームの網羅的解析は困難でした。本研究では、①細胞をキャピラリー内で分解することにより、細胞からタンパク質を効率よく回収する、②カラムを小型化し、回収タンパク質を分離過程で失うことなく測定機器に導入する、③測定機器での検出効率を向上する技術を開発し、従来法と比べて25倍以上の検出感度を達成し、100個程度の細胞を集めることで、十分な種類のタンパク質の同定・定量が可能としました。既に大型の細胞からは1細胞プロテオームを実現しています。近い将来、この技術のさらなる発展によって色々な種類の細胞において、1細胞レベルでのトランスクリプトームとプロテオームの対応づけができるようになり、また、1つ1つの細胞の営みや、個性を解き明かされてゆくことが期待されます。

10. 評価者

研究総括 浜地 格 京都大学 大学院工学研究科 教授

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は2019年3月末現在)

秋吉 一成 京都大学 大学院工学研究科 教授
油谷 浩幸 東京大学 先端科学技術研究センター 教授
伊藤 武彦 東京工業 大学大学院生命科学院 教授
植田 充美 京都大学 大学院農学研究科 教授
小澤 岳昌 東京大学 大学院理学系研究科 教授
神原 秀記 (株)日立製作所 名誉フェロー
後藤 由季子 東京大学 大学院薬学系研究科 教授

島本 啓子 サントリー生命科学財団 生物有機研究所 主幹研究員
 津本 浩平 東京大学 大学院工学系研究科 教授
 野地 博行 東京大学 大学院工学系研究科 教授
 馬場 嘉信 名古屋大学 大学院工学研究科 教授
 松田 道行 京都大学 大学院生命科学研究科 教授

(参考)

件数はいずれも、2019年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	82	82
口頭	177	88	265
その他	44	11	55
合計	181	221	402

(2)特許出願件数

国内	国際	計
18	10	28

(3)受賞等

神谷 真子 研究者

平成28年度日本薬学会奨励賞(2016年3月26日)

平成28年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(2016年4月20日)

落合 博 研究者

平成28年度 広島大学長表彰(2017年11月5日)

洲崎 悦生 研究者

平成29年度科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞(2017年4月11日)

谷口 雄一 研究者

理研産業連携貢献賞(2016年10月18日)

坂内 博子 研究者

第14回(平成29年度)日本学術振興会賞(2018年2月7日)

日仏生物学会第186回例会(2017年6月10日)

細川 正人 研究者

日本化学会第96春季年会 優秀講演賞(学術) (2016年5月13日)

松崎 典弥 研究者

平成27年度日本バイオマテリアル学会科学奨励賞(2015年11月9日)

Best Paper Award in 2015 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2015)(2015年11月23日)

The Award for Young Investigator of Japanese Society for Biomaterials(2016年5月18日)

高分子学会広報委員会パブリシティ賞 (2018年5月23日)

(4)招待講演
国際 80 件
国内 128 件

別紙

「統合1細胞解析のための革新的技術基盤」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(2019年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
神谷 真子 (兼任)	多機能蛍光プローブ群による組織内 1細胞機能解析 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科講師 (同上助教)	44
猪股 秀彦 (兼任)	流体による1細胞解析から1個体解析 への応用 (理化学研究所生命機能科学研究セ ンター)	理化学研究所生命機能科学研究セ ンターチームリーダー (理化学研究所多細胞システム形 成研究センターチームリーダー)	40
落合 博 (専任)	細胞多様性決定要因の網羅解析技術 の開発 (広島大学大学院理学研究科)	科学技術振興機構 (広島大学大学院理学研究科特任 講師)	49
城口 克之 (兼任)	生体システム理解・医科学応用を実現 する1細胞核酸計測技術の開発(理化学 研究所生命医科学研究センター)	理化学研究所生命機能科学研究セ ンターユニットリーダー (理化学研究所生命医科学研究セ ンター上級研究員)	50
洲崎 悦生 (兼任)	組織 3D 染色による細胞の網羅的解 析技術の開発 (東京大学大学院医学系研究科)	東京大学大学院医学系研究科講師 (同上 助教)	50
鈴木 団 (兼任)	摂動と計測による個体のエネルギーフ ローの1細胞分解能解析 (大阪大学蛋白質研究所)	大阪大学蛋白質研究所講師 (早稲田大学重点領域研究機構主 任研究員)	42
竹本(木村) さ やか (兼任)	脳深部微小神経回路を構成する細胞 個性の機能的・分子的解読と情動制 御への応用 (名古屋大学環境医学研究所)	名古屋大学環境医学研究所教授 (東京大学大学院医学系研究科講 師)	48
谷口 雄一 (兼任)	1細胞内多階層オミックス動態の連関 (理化学研究所生命機能科学研究セ ンター)	理化学研究所生命機能科学研究セ ンターユニットリーダー (理化学研究所生命システム研究 センターユニットリーダー)	49
坂内 博子 (専任)	細胞膜分子動態1分子解析による細 胞の個性の解読 (理化学研究所脳科学総合研究センタ ー)	科学技術振興機構 (名古屋大学大学院理学研究科特 任講師)	32
細川 正人 (兼任)	組織内の細胞多様性を明らかにする 超並列ゲノム解析技術の創成 (早稲田大学理工学術院総合研究所)	早稲田大学理工学術院総合研究所 次席研究員 (早稲田大学ナノライ創新機構次席 研究員)	47
松崎 典弥 (兼任)	がん幹細胞の生物学的機能を解明す る1細胞解析技術の創製 (大阪大学大学院工学研究科)	大阪大学大学院工学研究科准教授 (同上 助教)	48
三浦 史仁 (兼任)	トランスクリプトームとメチロームの統 合1細胞解析(九州大学大学院医学研 究院)	九州大学大学院医学研究院講師 (同上)	44.
山下 隼人 (兼任)	生細胞膜分子動態を観る極限時空間 分解能 AFM の創成 (大阪大学大学院基礎工学研究科)	大阪大学大学院基礎工学研究科助 教 (同上)	45

<p>若林 真樹 (兼任)</p>	<p>単一細胞プロテオミクスが拓く細胞証 分析 (国立循環器病研究センター創薬オミ ックス解析センター)</p>	<p>国立循環器病研究センター創薬オ ミックス解析センタープロテオーム 系解析室長 (京都大学大学院薬学研究科助教)</p>	<p>44</p>
-----------------------	---	--	-----------

研究報告書

「多機能蛍光プローブ群による組織内1細胞機能解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 6 月

研究者: 神谷 真子

1. 研究のねらい

生命機能や病因の解明を行う上で、組織や病巣を形成する個々の細胞の挙動や性質を把握することは急務の課題である。本研究は、蛍光イメージングで評価し得る“酵素活性・酸化還元状態”などの生きた細胞が有する質的特徴を、様々な細胞が複雑に入り混じる組織中の1細胞レベルで引き出し、個々の細胞の性質や個性を理解することを目的とした。我々は以前までに、分子内スピロ環化平衡や光誘起電子移動を蛍光制御原理とした、様々な光機能性小分子を開発してきたが、これらの組織への適用を考えた場合、より高次元の分子設計が求められていた。例えば、組織中の1細胞レベルで特定の酵素活性を検出したい場合、既存の小分子蛍光プローブでは、酵素との反応生成物である蛍光色素が拡散してしまい、組織中の1細胞レベルの空間分解能で、酵素を発現する細胞の特定やその機能を解析することは困難であった。また、時々刻々と変化する細胞内の酸化還元状態を観測したい場合には、細胞内の酸化還元物質を可逆的かつ定量的に検出する分子の開発が必須であった。

そこで本研究においては、“組織中における酵素活性を1細胞レベルで検出可能な蛍光プローブ(研究テーマA)”と、“細胞内の酸化還元物質に対し可逆的な蛍光応答を示す検出プローブ(研究テーマB)”を創製することを目標とした。研究テーマAでは、通常は蛍光性・細胞内滞留性がなく組織を透過するが、特定の細胞で高発現している酵素により活性化されると、蛍光性および細胞内滞留性を同時に獲得し細胞内にトラップされる蛍光プローブを、研究テーマBでは、細胞内の主たる還元物質であるグルタチオン(GSH)に対して応答可逆性と定量性を示す蛍光プローブを、独自の分子設計法を活用して開発することを目標とした。さらに、開発した蛍光プローブを培養細胞や組織に適用し、1細胞レベルで標的分子の可視化が可能か、組織中の相対位置を保持した状態での標的細胞の可視化・機能解析を行うことも、併せて本研究の目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、酵素活性や酸化還元状態などの生きた細胞が有する質的特徴を、1細胞レベルで抽出するための新規蛍光プローブの開発を行った。研究テーマAでは、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学を組み合わせることで、通常は蛍光性・細胞内滞留性がなく組織を透過するが、特定の細胞で高発現している標的酵素と反応して初めて蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子プローブの設計法を開発した。本設計法に則り開発した、 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ SPiDER- β Gal は、固定組織のみならず、未固定の組織中における β -galactosidase 活性も1細胞レベルで検出可能であるという、従来のプローブにはない優れた特長を有することが明らかとなった。従って、未固定の脳スライス

中の lacZ 発現細胞を蛍光検出し、その蛍光シグナルを指標に電極を刺して電気生理実験を行うといった実験も可能であることが示された。研究テーマBでは、細胞内の主たる還元物質であるグルタチオン(GSH)の持つ高い求核性に着目し、キサントン色素の9位炭素への求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失を蛍光制御原理として用いた。まず、9位炭素の求電子性や立体的な accessibility が異なる複数種のローダミン、ピロニン誘導体を合成し、生理的 GSH 濃度範囲において吸収/蛍光強度が GSH 濃度依存的かつ可逆的に変化する誘導体を探索した。その結果、シリルローダミン誘導体 2Me' SiR610 が、適切な平衡定数を示すとともに、高い蛍光量子収率および反応速度定数を示すことが明らかとなった。さらに、GSH との反応性を示さないローダミン誘導体(TMR)との FRET ペアとすることで、GSH 濃度の変化に伴い蛍光波長がシフトする波長変化型蛍光プローブ QG3.0 を開発した。さらに、QG3.0 を培養細胞に適用したところ、細胞種により定常状態の GSH 濃度が大きく異なることが示され、さらに、各種酸化ストレス刺激による生細胞内 GSH 濃度変動をリアルタイムかつ定量的に追跡できることを実証した。

(2) 詳細

研究テーマA「組織中における酵素活性を1細胞レベルで検出可能な蛍光プローブの開発」

酵素は、あらゆる生理機能・過程における生体内化学反応を触媒しているが、その活性は組織・時間・環境等により大きく異なるため、細胞集団での解析ではなく、1細胞毎の酵素活性の多寡や局在を解析することで、各々の細胞の個性や機能の理解につながると考えられる。しかしながら、既存の小分子型酵素活性検出蛍光プローブは、酵素反応生成物である蛍光色素が拡散するため、組織中の1細胞レベルの空間分解能で、標的酵素を発現する細胞の特定や機能解析を行うことは困難であった。

そこで本研究では、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学を組み合わせることで、通常は蛍光性・細胞内滞留性がなく組織を透過するが、特定の細胞で高発現している標的酵素と反応して初めて蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子プローブを開発することを考えた。具体的な標的酵素としては、レポーター酵素として汎用されている β -galactosidase を、キノンメチド活性中間体を産生するための脱離基としては、化学的安定性に優れかつ脱離能が高いフッ素を選択し、我々が以前開発した細胞膜透過性 β -galactosidase 蛍光プローブ HMDER- β Gal (*J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 12960-12963) の4位にフルオロメチル基を導入して新規 β -galactosidase 活性検出蛍光プローブ SPiDER- β Gal を設計した(図 1a)。SPiDER- β Gal は中性緩衝液中においてスピロ環化構造の閉環体として存在すると予想されたため、酵素との反応前は無色・無蛍光性であるが、細胞内で β -galactosidase による加水分解を受けると、フッ素原子が脱離して求電子性のキノンメチド体が生成し、これがタンパク質などの細胞内求核分子と反応して蛍光性を獲得すると考えた。つまり、細胞内タンパク質にラベル化された蛍光色素は細胞外へ漏出しないため、蛍光色素の拡散を防ぐことができるのではないかと考えた。

次に、開発した SPiDER- β Gal を基質とした in vitro 酵素反応を行った結果、SPiDER- β Gal は β -galactosidase との反応により、大きな吸収スペクトル・蛍光スペクトルの回復を示すことが明らかとなった(図 1b)。さらに、酵素との反応により、キノンメチド中間体が産生し、それが

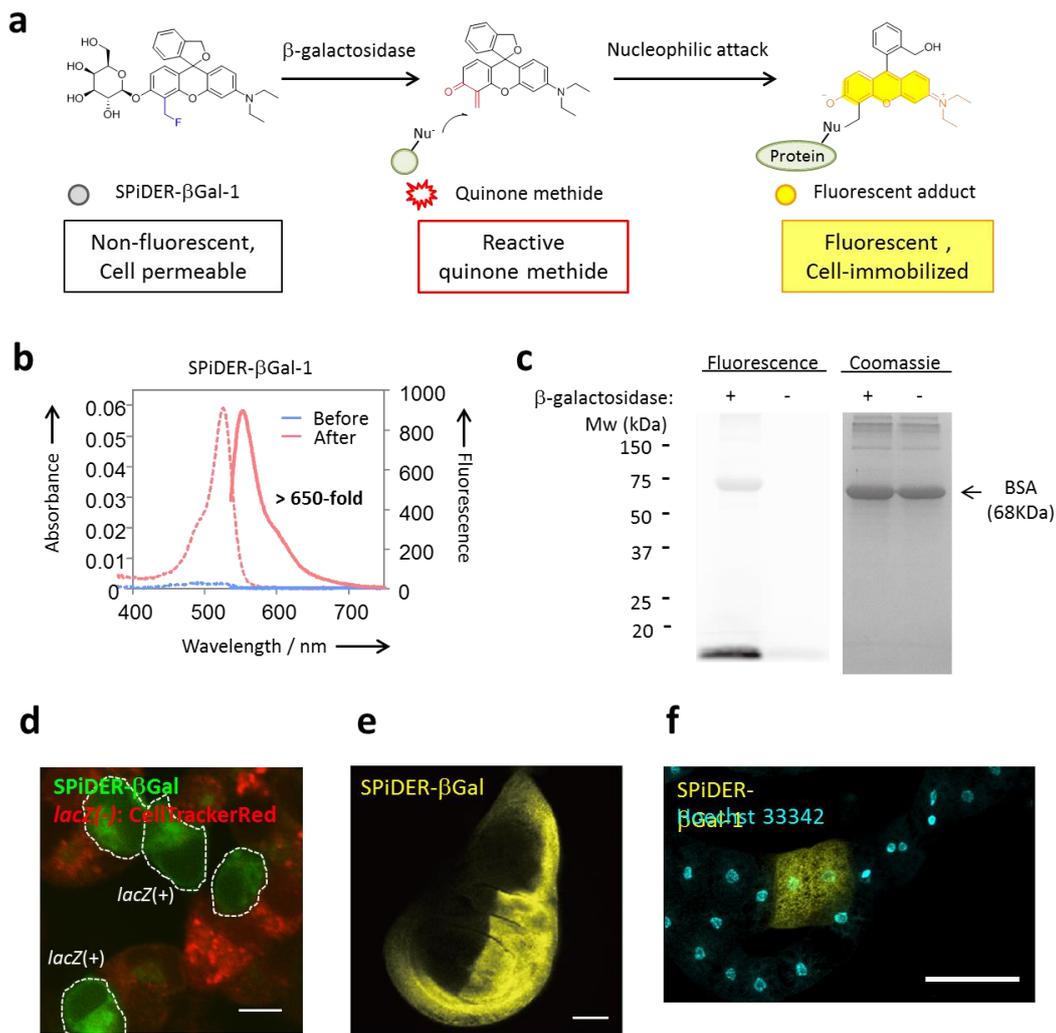


図 1. a) SPiDER-βGal の構造式と動作原理。酵素との反応によりキノンメチド活性中間体が産生し、それがタンパク質等の細胞内分子に捕捉されて細胞内に蓄積するよう分子設計した。b) SPiDER-βGal の β-ガラクトシダーゼとの反応前後の吸収・蛍光スペクトル、c) β-ガラクトシダーゼとの反応前後の SPiDER-βGal 溶液の SDS-PAGE (BSA 存在下)、d) HEK-lacZ(+)細胞と HEK-lacZ(-)細胞の共培養系における lacZ 発現細胞のライブ蛍光検出。緑色：SPiDER-βGal、赤色：Cell Tracker Red。スケールバー：10 μm。e) ショウジョウバエの en-lacZ wing disc における lacZ 発現領域の蛍光検出、f) ショウジョウバエの flip-out clone 脂肪体組織中における lacZ 発現細胞の蛍光検出。スケールバー：100 μm。

周辺の蛋白質などの求核分子と反応することを SDS-PAGE により確認した(図 1c)。さらに、HEK-lacZ(+)細胞と HEK-lacZ(-)細胞 (Cell Tracker Red CMTPX で前処理)を共培養した系に SPiDER-βGal を適用した結果、lacZ 発現細胞と lacZ 非発現細胞が混在している中から lacZ 発現細胞のみを選択的に可視化できることが示された(図 1d)。

さらに、遺伝学におけるモデル動物として汎用されているショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) 組織における lacZ 発現細胞のライブ検出が可能か検討した。まず、posterior

region のみに lacZ を発現している wing disc (翅原基) をショウジョウバエ幼虫から取り出し、SPiDER-βGal とインキュベーションしたところ、lacZ を発現している領域のみで蛍光シグナルの上昇が観察され、明瞭な境界線をもって、lacZ 発現領域と非発現領域を区別可能であることが明らかとなった (図 1e)。次に、確率的なパターンで lacZ を発現するショウジョウバエ脂肪体組織に SPiDER-βGal と核染色剤 Hoechst 33342 を同時適用したところ、lacZ 発現細胞を 1 細胞レベルで描出できることが明らかとなった (図 1f)。さらに、固定組織において抗体染色との併用が可能であることも示した。次に、lacZ 発現マウスから調製した未固定の脳スライスを用いた検討を行ったところ、SPiDER-βGal の適用により lacZ 発現細胞を感度よく蛍光染色できることが明らかとなり、さらに、この蛍光シグナルを指標として電極を刺して電気生理実験を行うことも可能であることが示された。

以上の結果から、SPiDER-βGal は生体組織中の lacZ 発現細胞の選択的な蛍光検出に有用であることが実証された。つまり、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド活性中間体の生成が同時に起こるよう分子設計することで、組織中の 1 細胞レベルの空間分解能で、標的酵素活性を検出する蛍光プローブの創製が可能であることが示された。

本成果は、原著論文として Angew. Chem. Int. Ed. に採択された (研究成果リスト・論文 1)。また、SPiDER-βGal は既に市販化され、国内外の幅広い研究者が使用し高い評価を得ている。

研究テーマB「細胞内の酸化還元物質に対し可逆的な蛍光応答を示す検出プローブの開発」

グルタチオン (GSH) は、細胞内において酸化ストレスに対する主たる還元剤として存在するため、その酸化還元状態 (GSH/GSSG) は細胞内のレドックスステートを反映する一つのパラメータであるが、既存の GSH 検出蛍光プローブの殆どが、GSH の求核性を利用した“不可逆反応”に基づく設計であるため、時々刻々と変化する GSH/GSSG バランスを追跡することは不可能であった。そこで本研究においては、GSH に対する“応答可逆性”を付与することで、生きた細胞内における GSH の濃度変動をリアルタイムに検出することを目的とした。

具体的には、キサンテン環 9 位炭素への GSH 求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失に着目し、本現象を可逆的スイッチング機構として利用することを考えた (図 2a)。そこで、9 位炭素の求電子性や立体的な accessibility が異なる複数種のローダミン、ピロニン誘導体を開発し、生理的 GSH 濃度の範囲内において吸収/蛍光強度が GSH 濃度依存かつ可逆的に変化する誘導体を探索した。その結果、キサンテン環 10 位元素としてケイ素を持つシリルローダミン誘導体が、生理的濃度の GSH 存在下において GSH と分子間平衡反応を示すとともに、GSH 添加後 1 秒程度で平衡に達し、十分に速い反応速度定数を示すことが明らかとなった。さらに、蛍光量子収率や平衡定数といった観点から、シリルローダミン誘導体の構造展開、最適化を行った結果、細胞内グルタチオン濃度を検出するのに最も適した蛍光色素 2Me' SiR610 の開発に成功した。さらに、GSH に対し反応性を示さないローダミン誘導体 (TMR) との FRET (フェルスター共鳴エネルギー移動) ペアとすることで、GSH 濃度の変化に伴い蛍光波長がシフトする波長変化型蛍光プローブ QG3.0 の開発に成功した (図 2b)。QG3.0 は、低 GSH 濃度下においては、TMR から 2Me' SiR610 への FRET が起こるため 630 nm を最大蛍光波長とする蛍光スペクトルを示すが、高 GSH 濃度下においては、SiR610 に GSH が求核付加することでキサンテン部位の共役系が切断されるため、FRET が起こらず 590 nm を最大蛍光波長とした蛍光スペクトルを示す。そのため、630 nm と 590 nm における蛍光

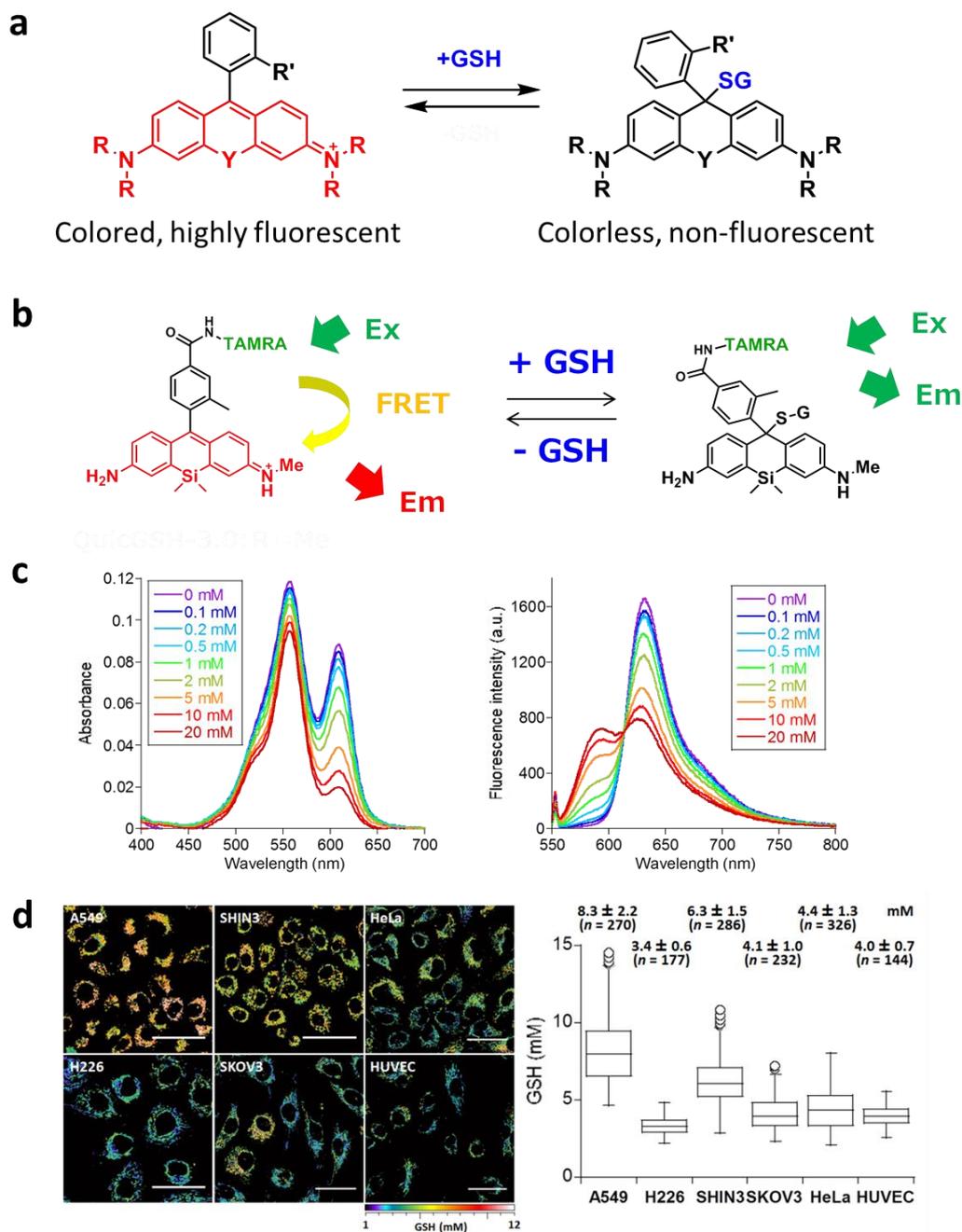


図 2. a) キサンテン環 9 位炭素への GSH 求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失現象、b) QG3.0 の構造式と動作原理、c) QG3.0 の GSH 添加に伴う吸収・蛍光スペクトル変化、d) 各種培養細胞における GSH 濃度定量。スケールバー：50 μm 。

強度の比率を用いることで、定量的かつ可逆的な GSH 濃度解析が可能になった(図 2c)。

次に、QG3.0 を培養細胞に適用し、生細胞内の GSH 濃度の定量が可能か検討した。具体的には、励起光として 550 nm (TMR の励起波長) を用い、560-605 nm (TMR の蛍光波長) および 620-700 nm (SiR610 の蛍光波長) の 2 チャンネルの蛍光強度を測定して、そのレシオ値を用いることで、GSH 濃度の定量を行った。その結果、細胞種により定常状態の GSH 濃度が大き

く異なり、その値は既存法(細胞ライセートより求める手法)から求めた濃度と合致する結果となった(図 2d)。さらに、同じ細胞種の細胞であっても、細胞毎に GSH 濃度にばらつきがあることが示され、これは細胞や組織をすりつぶす系では得られない個々の細胞の情報を得られることを示す結果となった。さらに、本プローブの応答可逆性を活用することで、生細胞内 GSH 濃度変動を追跡できるか検討した。具体的には、QG3.0 を負荷した培養生細胞に、酸化ストレスの一種である過酸化水素を負荷し、その後洗浄除去する操作を行ったところ、過酸化水素添加後数十秒程度で GSH 濃度が低下し、洗浄後徐々に元の GSH 濃度まで回復することが示された。さらに、その GSH 濃度回復速度をがん細胞と正常細胞と比較すると、がん細胞は正常細胞に比べて速い回復を示し、グルタチオンリダクターゼによる GSSG の還元機能が亢進していることを直接的に示す結果となった。このように、QG3.0 を用いることで、酸化ストレス負荷による生細胞内 GSH 濃度変動をリアルタイムに追跡できることを示した。

以上の結果から、GSH との“分子間可逆的反応”を蛍光制御原理として開発した QG3.0 は、生きた培養細胞における GSH 濃度変化をリアルタイムかつ定量的に追跡できる蛍光プローブであることを実証した。

本成果は、原著論文として Nat. Chem. に採択された(研究成果リスト・論文 2)。また、QG3.0 は市販化され、国内外の幅広い研究者が利用できるようになった。

3. 今後の展開

研究テーマAで開発した SPiDER-βGal は、未固定の組織中における lacZ 発現細胞を1細胞レベルで蛍光検出可能であるという、従来のプローブにはない特長を有し、さらに最近、細胞老化マーカーである SA-βGal (senescence-associated-βGal) の検出にも使用できることが示された。従って、今後、様々な医学・生物学研究に用いられることで、病態や生命現象に関する新たな知見が得られることが期待される。また、構造展開により、プローブの多機能化が期待される。具体的には、長波長化や光増感剤への展開が挙げられる。キサントン系色素の 10 位元素を酸素からケイ素に置換することで 100 nm 程度長波長化するという知見 (*Chem. Comm.* 2008, 15, 1780-1782) や、ゼレンに置換することで光増感剤として利用できるという知見 (*Bioorg. Med. Chem.* 2004, 12, 2537 - 2544) を活用することで、生きた組織中の lacZ 発現細胞を1細胞レベルで検出可能なβ-ガラクトシダーゼ活性検出“赤色”蛍光プローブや、lacZ 発現細胞特異的に細胞死を誘導可能な activatable 光増感剤が開発できると期待される。

研究テーマBで開発した QG3.0 は、従来までのプローブでは不可能であった、生細胞中の GSH の濃度の定量やその時間変化の追跡を可能とするプローブであることから、酸化ストレスに関わる基礎研究のみならず、細胞内 GSH 濃度と腫瘍細胞の悪性度、抗がん剤治療や放射線治療耐性との関連など、創薬研究や医療研究など幅広い分野への貢献が期待される。また、更なる構造展開により、励起・蛍光波長が異なる誘導体や、細胞内局在の異なる誘導体の開発ができることと期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

・研究目的の達成状況

研究テーマAでは、分子内スピロ環化平衡による蛍光制御とキノンメチド化学を組み合わせることで、生きた組織中における lacZ 発現細胞を1細胞レベルで検出可能なβ-ガラクトシダーゼ活性検出蛍光プローブ SPiDER-βGal を開発した。研究テーマBでは、グルタチオン(GSH)の持つ高い求核性に着目し、キサンテン環の9位炭素への求核付加反応とそれに伴う可視光領域の吸収・蛍光特性の消失を蛍光制御原理として用いることで、生きた細胞内におけるGSHの濃度変動をリアルタイムかつ定量的に追跡できる蛍光プローブ QG3.0 を開発した。これらのプローブは、従来までのプローブの単なる改良ではなく、有機化学的な観点から精巧な化学修飾を施すことで、従来までのプローブを遥かに凌駕する性能を初めて達成することができたと考えている。開発したプローブの実用性の高さは、学会や学術論文で発表するやいなや多くの共同研究の申し込みがあったこと、既に市販化されるにいたったことが証明しており、いくつかの共同研究では、従来の技法で得られる結果とは一線を画す結果が得られている。これらの成果は、当初目標としていた計画をはるかに上回る成果であったと考えている。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は、東京大学 大学院医学系研究科 生体情報学分野(浦野泰照教授研究室)で実施した研究であり、研究実施体制としては、研究代表者が研究の計画・とりまとめを行い、教室に所属する博士研究員2名および大学院生4名とともに実施した。また、ショウジョウバエ組織への適用実験は、東京大学薬学系研究科・三浦正幸教授ら、マウス脳スライスへの適用実験は、基礎生物学研究所 野田昌晴教授・檜山武史助教らとの共同研究成果である。

研究費は、有機合成にかかる試薬・消耗品類の他、プローブの機能検証実験や細胞実験のための備品・試薬・測定機器周辺の消耗品類の他、共同実験および学会発表のための旅費として使用した。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

上述の通り、本研究で開発したプローブ(SP iDER-βGal、QG3.0)は既に市販化されており、従来の技法では得られなかった結果を生み出す性能を有していることから、科学界への波及効果は高いと考えている。また今後さらに機能の多様化、分子構造の最適化を行うことで、より多様な機能を組織中の1細胞レベルで実現することができると期待される。つまり、本研究で確立した分子設計法に則り開発したプローブ群を医学・生物学研究に用いることで、病態や生命現象に関する新たな知見が得られることが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

従来の酵素活性検出用の小分子蛍光プローブは酵素との反応生成物である蛍光色素が細胞内から拡散するため組織中の1細胞レベルの空間分解能で、酵素を発現する細胞の特定やその機能を解析することは困難でした。神谷研究者は反応前は蛍光性・細胞内滞留性もないが、β Galactosidase を発現している細胞内では反応して蛍光性と細胞内滞留性を同時に獲得する小分子蛍光プローブ SPiDER-β Gal を開発しました。本プローブは、固定組織のみならず

らず、未固定の脳スライス中の lacZ 発現細胞を蛍光検出し、蛍光シグナルを指標に電極を刺して電気生理実験を行うことができました。また、時々刻々と変化する細胞内のグルタチオンの酸化還元状態を1細胞レベルで可逆的にリアルタイムに定量的に検出する波長変化型蛍光プローブ QG3.0 を開発しました。これらの特許出願、さらには試薬メーカーからの上梓など、成果の実用化への展開も十分評価に値します。昨年度のさきがけ1期生の評価を行った際に、これらの傑出した業績に対し、1期生のライジング・スター賞を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Doura, T., Kamiya, M.* , Obata, F., Yamaguchi, Y., Hiyama, T. Y., Matsuda, T., Fukamizu, A., Noda, M., Miura, M., Urano, Y.* Detection of LacZ-Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2016, 55, 9620-9624. (責任著者論文) |
| 2. Umezawa, K., Yoshida, M., Kamiya, M.* , Yamasoba, T., Urano, Y.* Rational design of reversible fluorescent probes for live-cell imaging and quantification of fast glutathione dynamics. <i>Nat. Chem.</i> 2017, 9, 279-286. (責任著者論文) |
| 3. Yogo, T., Umezawa, K., Kamiya, M. , Hino, R., Urano, Y.* Development of an Activatable Fluorescent Probe for Prostate Cancer Imaging. <i>Bioconj. Chem.</i> 2017, 28, 2069-2076. |
| 4. Chiba, M., Ichikawa, Y., Kamiya, M. , Komatsu, T., Ueno, T., Hanaoka, K., Nagano, T., Lange, N., Urano, Y. * An Activatable Photosensitizer Targeted to γ -Glutamyltranspeptidase. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2017, 56, 10418-10422. |
| 5. Iwatate, R. J., Kamiya, M. , Urano, Y.* Asymmetric Rhodamine-Based Fluorescent Probe for Multicolour In Vivo Imaging. <i>Chem. Eur. J.</i> 2016, 22, 1696-1703. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(非公開)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 神谷 真子、浦野泰照、組織中 lacZ 発現細胞のライブ検出を可能とする蛍光プローブの開発日本薬学会 第137年会、2017年3月26日、仙台国際センター・宮城県仙台市(招待講演)

受賞

1. 「日本薬学会奨励賞」(2016)
2. 「科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞」(2016)

プレスリリース

1. 「化学の力で見たい細胞だけを光らせる～遺伝学・脳科学に有用な画期的技術の開発～」(2016年7月)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160708-2/>

2. 「生きた細胞内のグルタチオンを可視化し、定量する～がん治療研究や創薬研究への応用に期待～」(2016年11月)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20161108/index.html>

研究報告書

「流体による1細胞解析から1個体解析への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 10 月～平成 31 年 3 月

研究者: 猪股 秀彦

1. 研究のねらい

発生過程において、様々な組織が適切な時期に適切な場所に形成されることが知られている。このような、組織パターン形成を時空間的に制御している分子の一つにモルフォゲンがある。モルフォゲンは胚の局所から産生され、細胞外に分泌された後、胚内を拡散することにより濃度勾配を形成する。胚を構成する細胞は、この異なるモルフォゲン濃度を感知し様々な組織に分化する。このように、モルフォゲンは胚に空間情報を付与する中心的な役割を担っている。

従って、濃度勾配の形状は発生過程において厳密に制御されていることが知られている。例えば、アフリカツメガエルの初期胚を人為的に半割にすると、濃度勾配の形状が胚サイズに応じて適切に制御され、半分のサイズの相似形を保ったオタマジャクシが発生することが知られている(スケーリング)。モルフォゲン濃度勾配の形成過程において、最も受け入れられているモデルとして Synthesis-Diffusion-Clearance モデル(SDC モデル)がある。このモデルでは、胚の局所に存在する細胞がモルフォゲンを産生(Synthesis)し、モルフォゲンは細胞間隙を拡散(Diffusion)しながら濃度勾配を形成する。しかし、発生過程において初期胚は成体とは異なり、タンパク質を胚と胚外でやり取りする器官(消化管など)が発達していないため、初期胚は閉鎖的な空間として機能すると考えられる。このような、閉鎖的な初期胚で安定な濃度勾配を維持するには、持続的な産生とともに、持続的なモルフォゲンの排除(Clearance)が必要となる。このように、濃度勾配の形状は主にモルフォゲンの産生・拡散・排除の3要素によって制御されており、これらを導入した反応拡散方程式により数理的にモルフォゲン依存的な組織パターン形成の研究も行われている。

しかし、モルフォゲンが溶解する細胞外体液の動態がモルフォゲンの分布にどのような影響を与えるかは明らかにされていない。本研究では、細胞外体液とモルフォゲン分布の関係性に注目して研究を行い、細胞外体液の動態を介した発生システムの新たな側面の解明を目指している。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、発生過程において組織パターン形成の中心的な役割を果たしているモルフォゲン濃度勾配と、モルフォゲンが溶解する細胞外体液の動態に注目して研究を行った。アフリカツメガエル胚の細胞外体液の動態を直接観察するために、細胞外体液で満たされた胞胚腔内に蛍光色素を注入しタイムラプスイメージングを行った。その結果、細胞外体液は胞胚腔から原腸へと移行し、最終的に原口を介して胚外に排出されることを明らかにした。そこで、細胞外体液に含まれる分泌タンパク質が、胚外に排出されるのかナノシフェラーゼを用いて定量的に解析した。その結果、分泌タンパク質の大部分が胚外に排出されることを明らか

にした。これらの結果は、従来考えられていたように初期発生場が分泌タンパク質にとって閉鎖的な空間として機能するのではなく、開放的な空間として機能することを示している。

分泌タンパク質の排出過程をより詳細に解析したところ、細胞外体液の一方向性の流れが排出を制御していることを明らかにした。排出過程は大きく二つの過程に分けることができる。一つ目は、胞胚腔から原腸への移行である。この移行時には、胞胚腔内に存在する細胞外体液が原腸の表面に存在する小さな孔 (Archenteron Blastocoel Connecting pore ; ABC-pore) を通じて移動することを新たに発見した。二つ目は、原腸内の体液が原口を通じて胚外に排出される過程である。蛍光ビーズを用いた実験から、いずれの場合も「胞胚腔から原腸」、「原腸から胚外」への一方向性の細胞外体液の流れが存在することを示した。

さらに、モルフォゲンと細胞外体液の動態を解析したところ、胞胚腔はモルフォゲンを取り込み抑制する“Sink”として機能することを明らかにした。この Sink を誘起する機構として、胞胚腔体液によるモルフォゲンの希釈、及び胞胚腔内に存在するモルフォゲン阻害因子／分解酵素による抑制の二つが協働して制御していることを明らかにした。以上の結果は、これまでに知られていなかった細胞外体液動態を介した発生システムの新たな側面を示しており、1細胞レベルの ABC-pore の開閉が個体発生を制御していることを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ 1. 「細胞外体液の動態と分泌タンパク質の分布」

発生過程におけるモルフォゲン依存的なパターン形成に関しては多くの知見があるが^{1, 2, 3, 4}、モルフォゲンが溶解している細胞外体液の動態に関しては不明な点が多い。アフリカツメガエル胚の細胞外体液動態に関しては P. H. Tuft (1962) が浮沈子を用いて研究を行っており、神経胚後期に細胞外体液が急激に減少する“Collapse of the archenteron”を報告している。そこで、発生過程における細胞外体液の動態を直接観察するために、細胞外体液で満たされた胞胚腔に蛍光色素を注入しタイムラプスイメージングを行った。その結果、細胞外体液は胞胚腔から原腸へと移行し、神経胚後期に原口を通じて胚外に排出されることを明らかにした。この胚外への排出過程は、Tuft が観察した Collapse of the archenteron と合致していた。そこで、細胞外体液が排出する過程において、分泌タンパク質も胚外に排出されるかより詳細に解析を行った。定量的に細胞内タンパク質及び分泌タンパク質の分布を解析するために、ナノルシフェラーゼ (Nluc) 及び分泌型ナノルシフェラーゼ (secNluc) を各々用いた。胚外への排出を解析するために、胚及び培地 (胚外に相当) 中のナノルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、細胞内タンパク質 Nluc の活性は培地画分に検出されなかったが、secNluc 活性の 92% が培地画分に検出された。さらに、ナノルシフェラーゼの基質であるフリマジン培地に添加することにより、直接 secNluc の排出過程をタイムラプスイメージングで検出することに成功した。以上の結果は、閉鎖的な場として機能すると考えられてきた初期発生場が分泌タンパク質にとって開放的な空間として機能し得ることを示している。

以上の観察結果は、細胞間隙に分泌されたタンパク質が Collapse of the archenteron が生じる以前に原腸内に移行する必要性を示している。そこで、細胞間隙に存在する分泌タンパク質が胞胚腔及び原腸内に自由に移行できるか解析した。具体的には、蛍光色素を胞胚腔あるいは原腸に注入し培養後、細胞間隙に蛍光色素が検出されるか調べた (Paracellular flux

assay)。その結果、胞胚腔内に注入した蛍光色素は細胞間隙に移行したが、原腸内に注入した蛍光色素は細胞間隙に検出されなかった。これらの結果は、胞胚腔と原腸は分泌タンパク質に対して異なる透過性を有していることを示している。そこで、傍細胞透過性を制御しているタイトジャンクションの有無に関して解析を進めた。タイトジャンクションの構成成分の一つである ZO-1 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、原腸及び胚の表面に存在する上皮では ZO-1 の強い染色が認められたが、胞胚腔では ZO-1 の存在は認められなかった。さらに、タイトジャンクションの Kissing point を透過型電子顕微鏡により解析したところ、同様の結果を得た。以上の結果から、細胞間隙の分泌タンパク質は胞胚腔内に拡散し、原腸に移行した後に胚外に排出されることが想定された。

しかし、タイトジャンクションで囲われた原腸内にどのようにして細胞外体液及び分泌タンパク質が移行するのか明らかにされていない。この疑問点を調べるために、原腸の表面を走査型電子顕微鏡により解析したところ、タイトジャンクションバリアーの間に 10~20 μm 程度の小さな孔が数個あいていることを発見した。さらに、胞胚腔内に蛍光ビーズを注入すると、一方向性の流れにのって蛍光ビーズが胞胚腔から原腸へとこの孔を介して移行する様子がタイムラプスイメージングにより検出された。以上の結果から、我々はこの新規の孔を Archenteron Blastocoel Connecting pore (ABC-pore) と命名した。さらに、ABC-pore の形成過程を観察したところ、ABC-pore の開閉は発生過程において1細胞レベルで動的に制御されていることが明らかとなった。

研究テーマ 2. 「胞胚腔とモルフォゲン依存的なパターン形成」

以上の結果は、細胞間隙に存在する分泌タンパク質が胞胚腔内に拡散し、その後 ABC-pore を介して原腸に移行した後、原口を通じて細胞外体液とともに胚外に排出されることを示している。従って、胞胚腔は細胞間隙に存在するモルフォゲンを取り込み最終的に胚外に排出する空間として機能する可能性が考えられる。この可能性を解析するために、異なる二つの方法を用いて胞胚腔を人為的に消失させ発生への影響を調べた。その結果、いずれの場合においても胞胚腔の消失によりアニマルキャップ細胞全体が中胚葉に分化することを明らかにした。アフリカツメガエルでは、Tgf β ファミリーである Nodal などが中胚葉を誘導することが知られている。そこで、Nodal の特異的な阻害因子である Cerberus-short を胚に過剰発現させると、胞胚腔消失による中胚葉誘導が完全に抑制された。以上の結果から、胞胚腔は Nodal を取り込むことにより中胚葉誘導に寄与している可能性が考えられた。実際に、Nodal の分布を定量的に解析するために、Nluc を付加した Nodal (Nluc-Xnr2) を胚に発現させると、約 56% の Nodal が原腸胚初期に胞胚腔に移行し、約 82% の Nodal が尾芽胚期に胚外に排出されることを明らかにした。

胞胚腔内に取り込まれた Nodal の役割として、二つの可能性が考えられる。一つ目は、胞胚腔内の Nodal は濃度勾配を形成し活性を維持している可能性である (Intracavitary gradient model)。もう一つは、胞胚腔内に移行した Nodal は不活化している可能性である (Blastocoel sink model)。これらの可能性を検証するために、人為的に胞胚腔内の体液交換を行うことによって、胞胚腔内の Nodal の分布・濃度に摂動を与え発生への影響を解析した。具体的には、胞胚腔内の体液をガラス針により吸出した後、LCMR バッファーを注入した。この過程を 5

回繰り返すことにより、胞胚腔体液を LCMR バッファーに置換した。置換効率に関しては胞胚腔内に蛍光色素を注入して検証を行い、胞胚腔体液が LCMR バッファーに効率的に置換されていることを確認した。しかし、体液交換は発生に影響を与えなかったため、腔内の Nodal が活性状態にある Intracavitary gradient model はアフリカツメガエル胚には合致しないと判断した。

次に、Blastocoel sink model に関して検証を行った。胞胚腔内の Nodal が不活化するメカニズムとして大量の胞胚腔体液による Nodal の希釈、及び胞胚腔内の Nodal 阻害因子による抑制の二通りが考えられる。希釈による効果を検証するために、シリコンオイルを胞胚腔内に注入して胚の形状を保ったまま胞胚腔の体液量を減らした。その結果、Nodal の希釈効果が抑制され中胚葉が大きく拡大することを確認した。さらに、胞胚腔体液の構成成分を LC-MS を用いて解析したところ、胞胚腔体液には Nodal の阻害因子である Cerberus 及び DAN5 が含まれことが明らかとなった。以上の結果から、胞胚腔は希釈および阻害因子により Nodal の活性を抑制する Sink として機能することを明らかにした (Blastocoel sink model)。さらに、胞胚腔は Nodal だけでなく他のモルフォゲンに関しても Sink として機能していることを体液交換により確認した。

以上の結果をまとめると、(1) 胞胚腔はモルフォゲンを不活化 (希釈および阻害因子) する Sink として機能する、(2) 原腸胚後期になると、モルフォゲンを含む胞胚腔体液は ABC-pore を介して原腸に移行する (原腸はタイトジャンクションで覆われているため、この移行により Sink は胚から消失する)、(3) 神経胚後期になると、原腸に存在するモルフォゲンは細胞外体液と共に原口から胚外に排出される、ことを明らかにした。これらの結果は、1 細胞レベルで制御されている ABC-pore の開閉 (マイクロな制御) が、細胞外体液の流れ、モルフォゲンの移動、モルフォゲン依存的なパターン形成など個体レベルの発生を制御 (マクロな制御) していることを示している。本研究成果は、細胞外体液の動態に注目することにより、発生システムの新たな側面を明らかにしたと考えている。

3. 今後の展開

本研究成果により、ABC-pore および原口の二つの孔の開閉が細胞外体液およびモルフォゲンの排出を制御していることを明らかにした。特に、ABC-pore の開閉は細胞と細胞の間隙の非常に微小な空間に形成されるため、1細胞レベルでのさらなる解析を進める必要がある。また、二つの孔の開閉駆動力として、細胞外体液の圧力が寄与している可能性が考えられる。今後さらに研究を進展させることにより、圧力と発生システムの新たな側面を明らかにすることができると考えている。

本研究では、大きな空間である胞胚腔がモルフォゲンの Sink として機能することを明らかにした。発生過程において、アフリカツメガエルだけでなく多くの胚 (ヒト、マウス、サメ、ウニなど) が胞胚腔を形成することが知られている。今後、我々が提唱した Blastocoel sink model が、多くの動物胚共通の普遍的発生システムとして機能しているか更なる検証が必要である。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究期間中に、目標とする細胞外体液の動態とモルフォゲン依存的なパターン形成の関

係性を明らかにすることができた。本研究で導入した共焦点顕微鏡システムにより、細胞外体液の動態を解析することが可能となり重要な知見を得ることができた。本研究成果は、アフリカツメガエル胚だけでなくヒトを含む他の多くの動物胚でも観察される現象であるため、研究の更なる進展が発生システムの普遍的な原理の解明に繋がると考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

アフリカツメガエルを用いて、胞胚腔はモルフォゲンを希釈および阻害因子によって活性化する Sink として機能すること、原腸胚後期になるとこの胞胚腔体液は本研究で見出した ABC-pore を介して原腸に移行すること、さらに神経胚後期になると原腸のモルフォゲンは細胞外体液と共に原口から胚外に排出されることを明らかにしました。ABC-pore の発見とともに、この開閉制御が、初期胚の細胞外体液の流れ、モルフォゲンの移動、ひいてはモルフォゲン依存的なパターン形成など個体レベルの発生に関連していることを明らかにしており、いずれも画期的な成果であると高く評価できます。

今後は、これらの研究成果を quality の高い論文として世界に発信するとともに、初期発生システムを統御する普遍的な原理の解明をさらに発展させてゆくことを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Hidehiko Inomata. Scaling of pattern formations and morphogen gradients. Dev Growth Differ. 2017, 59, 41-51.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. CDB symposium 2016 シンポジウム(招待講演)
2. 第 11 回日本ツメガエル研究集会(2017) (招待講演)
3. 第 50 回日本発生生物学会大会(2017) シンポジウム(招待講演)
4. 第 91 回日本生化学会大会(2018) シンポジウム(招待講演)
5. 第 41 回日本分子生物学会年会(2018) シンポジウム(招待講演)

研究報告書

「細胞多様性決定要因の網羅解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 落合 博

1. 研究のねらい

哺乳類の胚性幹(ES)細胞を含む多能性幹細胞は、各々の細胞の性質に大きな多様性が認められる。この質的多様性は、各細胞において種々の遺伝子発現量の細胞間多様性に起因し、多能性幹細胞から特定の細胞種へと均質に分化誘導させることを困難にすると考えられている。本現象は、遺伝子調節ネットワークおよび細胞間相互作用によるフィードバックに加えて、不連続な転写活性状態の切り替わりによる(転写バースト)によって引き起こされる TBi ノイズ (Transcriptional Bursting-induced noise)などによって主に誘引されることが知られている。TBi ノイズは、特定遺伝子の各々の対立遺伝子上に異なるレポーター遺伝子を挿入するなどし、1細胞レベルで各対立遺伝子の発現量を区別して定量することで求めることができる。しかし、遺伝子ターゲティングが比較的容易な酵母などではレポーターノックインによって複数の報告例があるが、哺乳類細胞ではほとんど報告されていない。一方我々は、マウス ES 細胞において多能性維持に重要で、細胞間で発現量の多様性が比較的大きい *Nanog* 遺伝子において、レポーター細胞を樹立することによって、TBi ノイズが細胞間の発現量多様性に十分影響を与えていることを示してきた(Ochiai *et al.*, *Sci Rep*, 2014)。このことから、マウス ES 細胞において、*Nanog* 以外の遺伝子においても TBi ノイズによって発現量の多様性がもたらされている可能性が十分存在し、それらが多能性幹細胞の性質的多様性を引き起こす一因である可能性が考えられる。しかし、TBi ノイズに関しては転写バーストの性質(頻度およびサイズ)がによって決まることが理論的研究から示唆されているが、TBi ノイズの大きさを網羅的に解析する技術はこれまでに報告されておらず、転写バーストがなぜ生じるのか、TBi ノイズの大きさは何が規定するのか、ほとんど明らかになっていない。

本研究課題の目標は、A)TBi ノイズの網羅的同定技術の確立、B)高効率に各々の対立遺伝子へ異なるレポーター遺伝子を導入する技術の確立、C)対立遺伝子間の発現量多様性に関連する素因を同定し、その機能を制御することにより、発現量の細胞間多様性を調節することである。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、TBi ノイズを網羅的に明らかにするために、1細胞完全長 Total RNA-Seq 法である RamDA-seq を用いてハイブリッドマウス ES 細胞で 1細胞 RNA-Seq を実施した(二階堂 ユニットリーダー(理化学研究所)との共同研究)。得られたデータから細胞ごと、アレルごとの発現量を区別することによってゲノムワイドに TBi ノイズの大きさを定量化した。25 種類の遺伝子に関して、純系マウス由来の ES 細胞のそれぞれの対立遺伝子に GFP または iRFP をノックインした細胞株を樹立し、1細胞 RNA-Seq で得られた TBi ノイズの大きさの妥当性を確認

した。T*Bi* ノイズの大きさとプロモーター領域の特徴を調べたところ、polycomb repressive complex 2 (PRC2) 関連因子がプロモーター領域に局在する遺伝子は高い T*Bi* ノイズレベルを示す傾向があることがわかった。さらに、ゲノム編集を利用して、特定の遺伝子では PRC2 関連因子のプロモーター局在が T*Bi* ノイズレベルと関連していることを確認した。また、CRISPR ノックアウトライブラリーを用いて T*Bi* ノイズに関連する因子を網羅的に探索したところ、Akt および MAPK シグナル伝達経路が T*Bi* ノイズレベルの調節に関与することを見出した。これらシグナル経路を同時に阻害することで、転写伸長因子の発現量増加していることがわかった。転写伸長を阻害すると T*Bi* ノイズの上昇が認められたことから、転写伸長が T*Bi* ノイズと密接に関係し、ゲノムワイドにその大きさをコントロールできる可能性を秘めていることがわかった。

(2) 詳細

研究テーマ A「T*Bi* ノイズの影響が大きい遺伝子の網羅的同定技術の確立」

ゲノムワイドに T*Bi* ノイズを決定するために、129/CAST ハイブリッド ES 細胞を利用して G1 期細胞の 1 細胞 RNA-Seq を実施した。ここでは、1 細胞レベルで転写産物全長を決定できる高感度 RNA-Seq 法である RamDA-Seq を利用し、475 細胞を解析し、419 サンプルが十分なクオリティを示した。これらの情

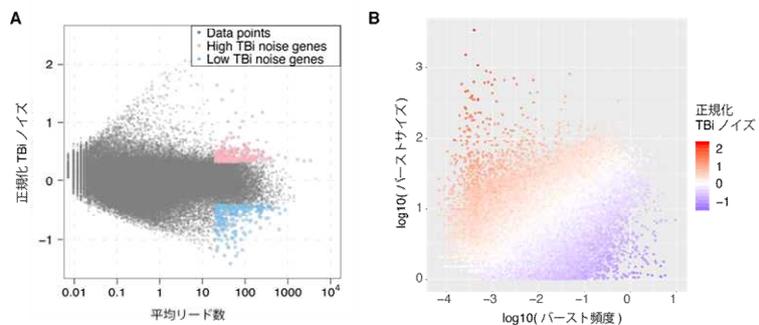


図 1 T*Bi* ノイズの網羅的同定。(A) 1 細胞 RNA-Seq から明らかとなった正規化 T*Bi* ノイズと平均発現量の関係。(B) 正規化 T*Bi* ノイズ、バーストサイズ及び頻度の関係。

報から網羅的に T*Bi* ノイズの大きさを決定した。理論研究から T*Bi* ノイズは発現量に依存すること、また RNA-Seq 解析では遺伝子長にデータが影響を受けることから、発現量および遺伝子長で T*Bi* ノイズを正規化した。発現量が低いものは、技術的または生物学的なノイズを判別できないため、本解析では平均リード数が 20 以下のものは解析から除外した (図 1A)。また、T*Bi* ノイズ、平均発現量、mRNA 分解速度(Sharova *et al.*, *DNA Res*, 2009)から転写バーストサイズおよび頻度を見積もることができる(図 1B)。バーストサイズと頻度の関係をプロットしてみると、正規化 T*Bi* ノイズはバーストサイズが高く頻度が低いものほど高いことがわかった(図 1B)。

研究テーマ B「高効率に各々の対立遺伝子へ異なるレポーター遺伝子の導入技術の確立」

上記の 1 細胞 RNA-Seq の結果はハイブリッド ES 細胞を使用して得られた結果である。これらの細胞には対立遺伝子間に多数の多型を持っており、これらが T*Bi* ノイズに何らかの影響を与えている可能性が考えられた。それを検証するために、純系マウス由来の ES 細胞で複数の遺伝子を標的として、各対立遺伝子に GFP および iRFP を導入した細胞株を樹立する

ことにした。当初の計画では染色体が 1 セットしかないハプロイド(1 倍体)ES 細胞を利用した手法を提案していたが、想定通りに進まなかった。そこで、2 倍体の純系マウス由来のマウス ES 細胞にゲノム編集技術を利用して GFP および iRFP を同時にノックインし、GFP 及び iRFP ポジティブ細胞を FACS で分取する方法に切り替えたところ、効率よくノックイン細胞が得られることがわかった。本手法を利用し、様々な発現量および TBI ノイズを示す 25 種類の遺伝子を標的とし、各対立遺伝子に GFP または iRFP を挿入した ES 細胞株を樹立した。ハイブリッド ES 細胞を利用した 1 細胞 RNA-Seq から算出された正規化 TBI ノイズと、ノックイン細胞株の 1 分子蛍光 RNA-FISH 法によって得られた正規化 TBI ノイズは有意な相関を示したことから ($\rho = 0.422$, $P = 0.041$)、ハイブリッド ES 細胞の 1 細胞 RNA-Seq のデータは信頼できると考えた。

研究テーマ 3「TBI ノイズの影響が大きい遺伝子の網羅的同定

次に、正規化 TBI ノイズの大きさと関連するプロモーターの特徴を抽出するために、様々な ChIP-Seq データ(多能性関連因子、ヒストン修飾、転写関連因子など)から、高および低 TBI ノイズ遺伝子のプロモーター領域における結合程度を計算し、正規化 TBI ノイズ、バーストサイズおよび頻度の大きさととの相関を計算した。その結果、PRC2 関連因子(Ezh2, Suz12 H3K27me3)のプロモーターでの局在と TBI ノイズの大きさが比較的高い相関を示すことがわかった。PRC2 は Suz12, Ezh2, EED などから成る複合体で、クロマチンに結合して H3K27me3 の修飾を導入し、遺伝子発現を負に制御することが知られている。一方で、Suz12 をノックアウトすることによって、この複合体が不安定化し、H3K27me3 の修飾能が完全に失われることがわかっている。そこで、PRC2 が TBI ノイズに如何に関与するか調べるために、比較的プロモーター領域に H3K27me3 マークが多い *Dnmt3L*, *Dnmt3b*, *Peg3*, *Ctcf* 遺伝子の各対立遺伝子に GFP および iRFP をノックインした細胞株において Suz12 をノックアウトした(図 2)。*Dnmt3L* および *Dnmt3b* では Suz12 ノックアウトによって正規化 TBI ノイズの減少が確認された(図 2)。一方で、*Peg3* では正規化 TBI ノイズが上昇し、*Ctcf*に至っては変化が認められなかった。このことから、PRC2 による TBI ノイズの大きさの制御は遺伝子特異的である可能性が考えられた。

上記における、既知の情報(ChIP-Seq データ)との相関解析では、TBI ノイズをゲノムワイドに制御する因子は見いだせなかった。そこで、TBI ノイズの大きさと関連する遺伝子を網羅的に探索するために、CRISPR ノックアウトライブラリを利用した。比較的 TBI ノイズの高い遺伝子である *Nanog*, *Dnmt3L*, *Trim28* ノックイン細胞株に、マウスゲノム中の遺伝子を標的とする CRISPR レンチウィルスライブラリを導入して培養、GFP/iRFP 発現量が小さい細胞を FACS で分取し、ゲノム DNA を回収、コントロールと比較して増減のあった sgRNA 配列を NGS 解析した。GO 解析から、mTOR や MAPK シグナルに関与する遺伝子群がコントロールと比較して減少していることがわかった。これらシグナル

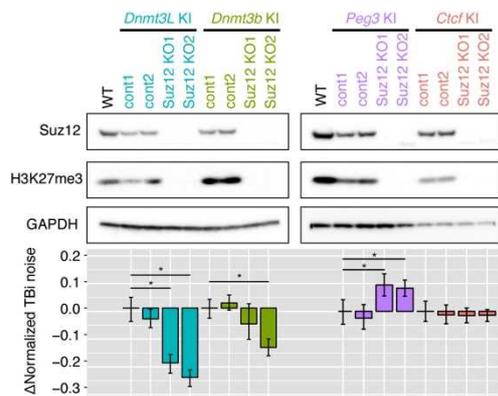


図 2 PRC2 は遺伝子特異的に TBI ノイズを制御する。

経路は PI3/Akt 経路を介して互いにクロストークしていることがわかっている。様々な組み合わせでこれら経路の阻害剤で *Nanog*, *Dnmt3L*, *Trim28* ノックイン細胞株を処理し、正規化 TBi ノイズの大きさの変動を調べた。その結果、Akt および MAPK 阻害剤を組み合わせることでより顕著に正規化 TBi ノイズの減少が見られることがわかった。ここではこれらを PD-MK 条件と呼ぶ。その他のノックイン細胞株(計 24 細胞株)についても PD-MK 条件で培養することによって、一般的な ES 細胞培地と比較して正規化 TBi ノイズがほとんどの遺伝子で減少することがわかった(図 3A)。これらのことから、PD-MK 条件では多くの遺伝子で TBi ノイズを低減させることができることがわかった。一方で、PD-MK 条件でも多能性細胞マーカーはしっかりと発現が見られ、PD-MK 条件で培養した細胞からキメラマウスを作製できたことから、PD-MK 条件でも多能性を維持できることがわかった。

次に、PD-MK 条件の特殊性を調べるために、RNA-Seq 解析を行った。その結果、PD-MK 条件では他の培養条件に比べて、転写伸長関連因子の発現量が特に上昇していることがわかった。転写は開始、伸長、終結の主な 3 ステップに分かれている。不明な点は多いものの、転写バーストは転写伸長との関係性が報告されていたことから、PD-MK 条件におけるこれら転写伸長関連因子の発現上昇と多数の遺伝子における TBi ノイズの減少は理にかなった関係であることが示唆された。そこで、転写伸長が TBi ノイズに関与しているかを調べるために、転写伸長のステップにおいて重要な P-TEFb を阻害する DRB と Flavopiridol(Fla) でノックイン細胞を処理し、TBi ノイズを計測した。その結果、これら転写伸長阻害剤で処理することで、多くの遺伝子で TBi ノイズが上昇することがわかった(図 3B)。これらのことから、転写伸長が効率的に起こることで、バースト頻度が上昇し、TBi ノイズが減少すると考えられる。

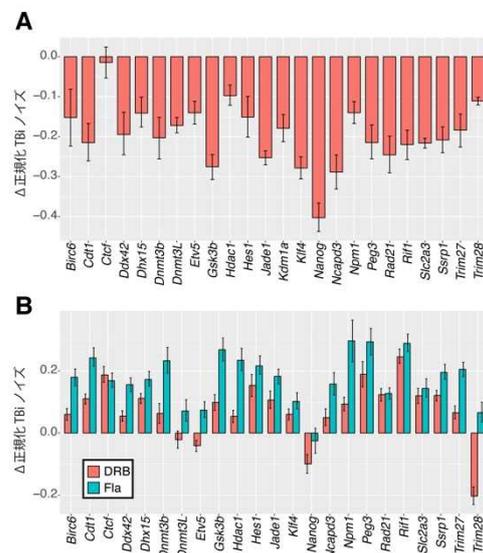


図 3 阻害剤処理による TBi ノイズの変動。(A) PD-MK 条件によるコントロールと比べた正規化 TBi ノイズの差。(B) 転写伸長阻害剤処理によるコントロールと比べた正規化 TBi ノイズの差。

3. 今後の展開

本研究では、多能性幹細胞であるマウス ES 細胞において、遺伝子発現量多様性を引き起こす一因である TBi ノイズを初めて網羅的に解析した。また、Akt/MAPK シグナル経路を同時に阻害する事によって、転写伸長因子の発現量が増加し、転写バーストサイズ/バースト頻度の比が低下し、結果的に TBi ノイズが減少することがわかった。Akt/MAPK シグナルの阻害によって多能性を維持できることが確認されたことから、これらシグナル阻害剤を使用することで、多能性幹細胞の質的均質性を高め、特定細胞種への分化誘導効率を高めることができる可能性が示唆された。また、マウス ES 細胞以外の細胞種では Akt/MAPK シグナル阻害は全く異なった反応を示すことが予想されることから、これらのシグナル阻害剤は細胞種によって効果が異なることが予想される。本研究では、転写伸長ステップが TBi ノイズに深く関与している

ことが示唆されており、何らかの方法で転写伸長の効率を上げることで、様々な細胞種でも TBI ノイズを低下させることができる可能性が示唆された。

4. 評価

(1) 自己評価

[研究目的の達成状況]

テーマ A は目標を十分達成できたと考えている。一般的な 1 細胞 RNA-Seq で使用される手法では RNA の 5' 末端側の情報を取得することが困難である。一方で今回使用した RamDA-Seq (Hayashi et al., *Nat Commun*, 2018) は RNA の全長に渡って情報の取得が可能な特徴がある。今回はハイブリッド ES 細胞を対象とし、各対立遺伝子の転写産物を、系統間の多型を利用して分類する必要があるが、RamDA-Seq を利用することで 5' 側に存在する多型も分類に使用することができ、極めて高感度な解析が可能となった。また、マウス ES 細胞においては mRNA の分解速度がすでに網羅的に解析されており (Sharova et al., *DNA Res*, 2009)、この情報と今回得られた平均発現量および TBI ノイズの大きさから、網羅的に転写バーストサイズおよび頻度も決定できた。これにより各遺伝子の転写バースト特性を把握し、発現量、ノイズの大きさがどのようにして決まるのかを詳細に解析できるようになった。

テーマ B に関しては、当初計画していた方法がうまく行かなかったものの、代替法で問題なく実施することができ、最終的な目的は達成できたと考えている。

テーマ C に関しては、既知の情報(バンクに登録されたマウス ES 細胞の ChIP-Seq データ)と TBI ノイズの相関解析では PRC2 関連因子のプロモーター局在が相対的に高い相関を示したが、相関係数の絶対値はそれほど高いものではなかった ($\rho \approx 0.2$)。実際に PRC2 の機能阻害は遺伝子によって応答が異なり、あくまでも遺伝子特異的な制御がかかっていると考えられた。CRISPR ライブラリを使用したスクリーニングから Akt/MAPK シグナル経路という一見 TBI ノイズとは無関係そうにないものに関連する遺伝子群が TBI ノイズを上昇させる効果がある候補として選抜された。結局これらのシグナル経路は転写伸長関連因子の発現量を抑制しており、転写伸長の効率が低下することでバーストサイズ/バースト頻度の比が大きくなり、結果として TBI ノイズを上昇させることがわかった。これらシグナル経路の阻害剤でマウス ES 細胞を処理することで、多くの遺伝子で TBI ノイズの減少が認められた。このように、TBI ノイズの導出機構を網羅的に解明し、その大きさを制御する方法を見出すことができたことから、目標を達成できたと考えている。

[研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)]

研究費執行は基本的に計画通りに進め、テーマ B など一部想定どおりに進まなかった部分は柔軟に対応し、最終的に目標を達成できた。研究開始時に、本研究を進める上で必要不可欠だった FACS を導入させていただくことで、研究を滞りなく進めることができた。基本的に研究は研究者自身で実施したが、多くの共同研究者にサポートいただいた。

[研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)]

本研究で得られた成果は、これまで不明な点の多かった転写バーストの分子機構解明に向

けた情報基盤を提供するとともに、転写バーストに伴って生じる遺伝子発現量の細胞間多様性の理解を促進し、関連分野に大きく貢献する。また、本研究ではマウス ES 細胞において多様性を減少させることが可能な新たな培養条件を見出し、将来的に効率的な分化誘導法の確立が期待され、再生医療分野への大きな波及効果が見込まれる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

ハイブリッドマウス ES 細胞を用いて 1 細胞 RNA-Seq を実施し、細胞毎に各アレルの発現量を計測することによってゲノムワイドに Tbi ノイズの大きさを定量化しました。このデータの妥当性を純系由来の ES 細胞の 25 種の対立遺伝子に各々 GFP または iRFP をノックインした細胞株で確認しました。また、PRC2 関連因子の結合配列がプロモーター領域に局在する遺伝子は、高い Tbi ノイズレベルを示す傾向があることを見出し、ゲノム編集を利用してこの関連性を確認しました。さらに、CRISPR ノックアウトライブラリーを用いて Tbi ノイズに関連する因子を網羅的に探索し、Akt および MAPK シグナル伝達経路が Tbi ノイズレベルの調節に関与することを明らかにしています。これらのデータのしっかりとした validation をとるとともに、Akt/MAPK シグナルとの関連をさらに突き詰めて、論文化することを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Matsushita M, Ochiai H, Suzuki KT, Hayashi S, Yamamoto T, Awazu A, Sakamoto N., Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during early development of sea urchin, *Journal of Cell Science*, 2017, 130(24):4097-4107
2. Ishihara S, Kotomura N, Yamamoto N, Ochiai H. Ligation-mediated PCR with a back-to-back adapter reduces amplification bias resulting from variations in GC content, *Anal Biochem.*, 2017, 531:37-44

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞

平成 28 年度 広島大学長表彰

主要な学会発表

1. 落合 博, 梅田 茉奈, 林 哲太郎, 芳村 美佳, 原田 哲仁, 大川 恭行, 山本 卓, 二階堂 愛, マウス胚性幹細胞における遺伝子発現量多様性の制御機構の包括的解析, 第 91 回日本生化学会大会, 京都, 2018 年 9 月 26 日

2. 落合 博, 梅田 茉奈、林 哲太郎、芳村 美佳、原田 哲仁、大川 恭行、山本 卓、二階堂 愛, マウス胚性幹細胞における内因性遺伝子発現ノイズの制御機構の包括的解析, 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会, 札幌, 2018 年 5 月 24 日
3. 落合 博, 多能性幹細胞における遺伝子発現量多様性の制御機構, 日本大学文理学部生命科学科セミナー 細胞核機能の発現と制御, 東京, 2017 年 6 月 24 日

主要な著作物

1. Hiroshi Ochiai, Imaging Gene Expression: Methods and Protocols, Second Edition (ed. Yaron Shav-Tal), 担当:分担執筆, 範囲: Real-time Observation of Localization and EXpression (ROLEX) system for live imaging of the transcriptional activity and nuclear position of a specific endogenous gene, Springer, 2019, in press
2. 落合 博, 医療応用をめざすゲノム編集 最新動向から技術・倫理的課題まで 真下 知士/金田 安史 編, 担当:分担執筆, 範囲: 生細胞内の特定ゲノム領域のライブイメージング技術, 化学同人, 2018, ISBN: 978-4-7598-1729-4
3. Hiroshi Ochiai, Takashi Yamamoto, Genome Editing in Animals (ed Hatada Izuhu), 担当:分担執筆, 範囲: Construction and Evaluation of Zinc Finger Nucleases, Springer, 2017, ISBN: 978-1-4939-7128-2
4. 落合 博, All About ゲノム編集 “革命的技術”はいかにして私たちの研究・医療・産業を変えるのか? 真下知士, 山本 卓ノ編, 担当:分担執筆, 範囲: ゲノム編集技術の細胞核内ライブイメージングへの応用, 羊土社, 2016, ISBN: 978-4-7581-0359-6
5. 落合 博, 実験医学別冊「論文だけではわからない ゲノム編集成功の秘訣 Q&A—TALEN, CRISPR/Cas9 の極意」(山本 卓 編), 担当:分担執筆, 範囲: 哺乳類培養細胞でのゲノム編集, 羊土社, 2015, ISBN: 978-4-7581-0193-6

研究報告書

「生体システム理解・医科学応用を実現する1細胞核酸計測技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 城口 克之

1. 研究のねらい

<背景>

細胞集団内の heterogeneity が世界的に注目され、1細胞解析法の開発が進んでいる。一度にたくさん(10^7 - 9 程度)の(c)DNA配列を決定できる次世代シーケンサの登場により、1細胞からの全ゲノム増幅技術やトランスクリプトーム解析技術などが開発され、一度に1,000余りの細胞の計測から、各細胞の違いが記述されてきている。

一方で、たくさん(10^4 以上程度)の細胞を対象にした1細胞定量解析をするための技術開発はあまり進んでいない。腸内細菌叢やT細胞受容体解析などにおいてその heterogeneity を記述するためには、十分な数の細胞の解析が要求される。次世代シーケンサで一度にたくさんの細胞を解析するためには、各細胞毎に異なるタグ(シーケンサで読みだせるDNA配列:本研究ではバーコードと呼ぶ)を付加する必要がある、これまでは1つ1つの細胞に対して手でタグを付加している場合が多かった。近年に市販されている装置では1,000以上の細胞を解析できるようになってきてはいるが、本研究の対象である細菌叢解析では行われておらず、T細胞受容体解析においても精度の高いハイスループット計測の実現までには、まだ改良が必要である。

<開発技術>

本研究では、まずDNA分子バーコード法の定量性について解析し、新機能を開発した。この技術をさらに拡張して、多数(10^4 以上)の細菌を対象に、特定の遺伝子の配列を1細胞ごとに解析できる技術を開発し、細菌の種類を高精度で同定して細菌数の正確な定量を実現した。新しい測定法に必須な解析プログラムも開発し、システム全体をパイプライン化した。

また、免疫システムで重要な役割を果たしているT細胞の受容体配列を解析するため、T細胞受容体の配列をRNAから簡易に増幅できる手法を開発した。この技術は、ハイスループット計測へ向けた基盤となる。

<本技術が生み出すイノベーション>

本研究の重要な点は、選んだ細胞ではなく集団内の細胞を網羅的に測る、また、1細胞の分解能で計測しながらも全体も見る、ことである。これにより、研究者の趣向に依存しうる見落としをなくし、それぞれの細胞による集団への寄与、細胞集団内の細胞 heterogeneity から生み出される細胞集団の機能発現、そしてそれらが組織、個体へ影響を与えるメカニズムの理解を目指す。これは、heterogeneity が存在するという理解の次へ向かう、1細胞研究における重要なステップだと考えられる。細菌叢において高精度の細菌数定量解析の実現により、細菌叢をコントロールする手がかりを得て、腸内細菌叢と相関が報告されている疾患などの治療に貢献できる可能性がある。さらに、多くのT細胞受容体を解析することで、刺激に対してどの受容体をもつT細胞が、いつ、どれくらい増殖・減少するのかといった免疫システムの理解が得られ、さらには、疾患の状態や進行、治療効果の評価にも貢献できる可能性がある。

2. 研究成果

(1) 概要

(i) DNA 分子バーコード法の改良と新機能の開発

細菌数の定量解析を実現するために、まず、DNA 分子バーコード法の詳細について定量解析した。DNA 分子バーコード法は、学术界や企業において世界的に広く利用されているが、その定量性についての解析が報告されていなかった。本研究では、どの程度の数のランダム塩基を用いたらどの程度の数の分子を定量できるのかを示すことを目標とし、研究を実施した。その結果、例えば、我々が用いた計測システムでは、 10^4 の分子を正確に定量するために 14 個のランダム塩基が必要なことが分かった。我々の研究の途中で、“index switching” という問題が Stanford 大学の研究者らにより報告されたが(*)、我々は、分子バーコードを適切に利用することでこの問題を解決し、その方法も含めて論文で報告した(成果リストの論文発表1、特許出願3)。

*<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/04/09/125724>

(ii) 新規腸内細菌叢解析の開発

16S rRNA の部分配列を対象にした新規細菌叢解析法を開発した。既知の細菌を用いて計測システムを評価し、1度に多くの細菌を定量できることを示した。マウスの腸内細菌叢を解析し、再現性の高い結果を得た(投稿準備中)。

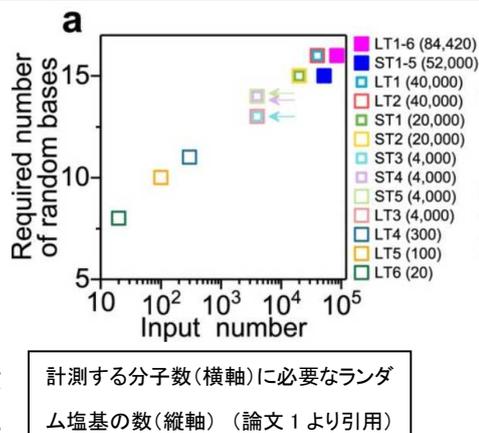
(iii) 5' 端の配列に依存しない RNA 配列簡易的増幅法の開発

T 細胞は基本的に、細胞毎に 5' 端側の配列が異なる受容体を発現しているため、それらの RNA 配列を増幅するためには、5' 端の配列に依存しない方法が必要である。現在、その方法の1つとして、cDNA を合成する(逆転写反応)と同時に 5' 端にアダプター配列を付与できるテンプレートスイッチ法が用いられている。しかしながらこの方法では、増幅反応(PCR)の前にプライマーを加えるなどの実験的操作が必要なため、将来的なハイスループット解析がスムーズに行えない可能性がある。本研究では、これらの問題を解決できる、簡易的な増幅法を開発した(投稿準備中、特許出願1)。

(2) 詳細

(i) DNA 分子バーコード法の改良と新機能の開発

ランダム塩基を 38 個使用した分子バーコードを中心部分に、PCR 増幅用プライマー配列を両端にデザインした DNA オリゴを設計した。この既知の数の DNA オリゴをチューブに入れて PCR で増幅し、増幅産物の配列を次世代シーケンサで解析した。コンピュータ内でバーコードの長さを短くしていき、どれくらいの数の分子を定量するためにどれくらいの数のランダム塩基が必要かを解析した。また、シーケンスの量もコンピュータ内で少なくしてい



き、どれくらいのシーケンス量が高精度の定量に必要なかを解析した。バーコード部分のランダム塩基の間に固定塩基を挿入して、挿入・欠損エラーが起きた場合にエラー検出をできるようにし、その効果を定量解析した。これらの成果として、 10^4 個以上の分子を定量できることを示し(図)、シーケンサの容量が許せば 10^{15} 個の分子も測定可能であるポテンシャルを示した。さらに、同じ分子バーコードを持つ増幅産物には同じサンプルインデックスが付加される、という原則を利用することで、当分野で課題となっている index switching(上述)を解決する方法を提案した。

(ii) 新規腸内細菌叢解析の開発

細胞の数を計測するために、DNA バーコード技術とドロプレットを用いた。上記で開発した DNA バーコードの機能を活用し、再現性の高い測定結果を得た。現在、マウスの腸内細菌叢の解析を進めている。

(iii) 5' 端の配列に依存しない RNA 配列簡易的増幅法の開発

5' 端の配列が不明であるサンプルの例として、T 細胞受容体の RNA 配列を用いた。1つの T 細胞から簡易な方法で受容体の RNA 配列を増幅することに成功した。

3. 今後の展開

(i) DNA 分子バーコード法の改良と新機能の開発

本技術の開発自身は、論文として報告したことで一段落した。今後、様々な応用研究でバーコード法を使用していく場合、本技術が基盤となる。

(ii) 新規腸内細菌叢解析の開発

本手法を用いて、腸内のいろいろな位置での測定を行い、まずはマウス腸内で細菌叢がどのように変化しているのかを理解する。その後、細菌叢の変化をモデル化できるか、予測できるか、コントロールできるか、などを検討していく。これらの知見を用いて、細菌叢をコントロールする道を拓き、医科学へ貢献したい。

(iii) 5' 端の配列に依存しない RNA 配列簡易的増幅法の開発

本技術は計測の簡易化やハイスループット化に利用できる。学术界や企業で行われている関連技術開発の進展を注視しながら、今後の研究を展開する。

4. 評価

(1) 自己評価

計画していた3項目でそれぞれ成果を得ることができており、そのうち、分子バーコード法については論文として報告した。他の2項目も技術開発は達成していると考えており、T 細胞受容体の増幅法と細菌叢解析法については、投稿準備中である。このように、期間中に異動や研究室の立ち上げがあったことを忘れてよいぐらいの相応の成果が得られていると考えている。

社会への波及効果としては、特許出願に言及したい。1細胞解析に関わる技術について、2件を国際特許出願し、そのうちの1件が企業とのライセンス契約に至っている点は、独自技術により社会に貢献しうるものと考えている。

分子バーコードに関する開発の成果は、これまでの分子バーコード法に少しの工夫を加えるだけで実装できる。したがって、分子バーコード法そのものが広く利用されているように、本技術も広く利用されていくことが期待される。

細菌叢をより正確に定量して細菌同士の関連を調べていく方向性は、学术界ではすでに注目されている。しばらく時間がかかるかもしれないが、本研究で開発した方法も広く利用されていくと期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

ランダムバーコード法を精度高く使って 10^4 個以上の single cell 毎の遺伝子発現レベルの定量的解析法を確立しました。DNA バーコードは多くの研究者が使い始めていますが、その有効性を十分に活かしていきれていない事例も多数発表されているのが現状です。城口研究者は腸内細菌叢の解析に用いる手法や、1つの T 細胞からワンステップで T 細胞受容体の RNA 配列を解析する手法などを開発することなどによって、DNA バーコードのユニークな使用法を開発し、その有効性を示しています。今後もより有用な応用法の開発によって、用途が拡大し、より広い分野にも展開されることが期待されます。キーとなるテクノロジーには特許も出願しており、大いに評価できる成果を出しています。ただし、16sRNA を用いた stain レベルの解析など以外に、この手法を用いないと解析が不能な応用例を示すなど、より新しさをアピールすることができればと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Taisaku Ogawa, Kirill Kryukov, Tadashi Imanishi & Katsuyuki Shiroguchi, "The efficacy and further functional advantages of random-base molecular barcodes for absolute and digital quantification of nucleic acid molecules.", Scientific Reports, 2017, 7,13576
2. Mari Tenno, Katsuyuki Shiroguchi, Sawako Muroi, Eiryo Kawakami, Keita Koseki, Kirill Kryukov, Tadashi Imanishi, Florent Ginhoux, Ichiro Taniuchi, "Cbf β 2 deficiency preserves Langerhans cell precursors by lack of selective TGF β receptor signaling.", Journal of Experimental Medicine, 2017, 214, 2933-2946
3. Mari Tenno, Satoshi Kojo, Divine-Fondzenyuy Lawir, Isabell Hess, Katsuyuki Shiroguchi, Takaho Endo, Sawako Muroi, Rumi Sato, Hiroshi Kawamoto, Thomas Boehm and Ichiro Taniuchi, "The Cbfb splice variant Cbfb2 confers thymic-homing capacity to pre-thymic progenitors", Journal of Experimental Medicine, 2018, 215, 595-610
4. Wataru Ise, Kentaro Fujii, Katsuyuki Shiroguchi, Ayako Ito, Kohei Kometani, Kiyoshi Takeda, Eiryo Kawakami, Kazuo Yamashita, Kazuhiro Suzuki, Takaharu Okada and Tomohiro

Kurosaki, "T follicular helper cell-germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling GC cell fate", Immunity, 2018, 48, 702-715

(2)特許出願

研究期間累積件数:5件(公開前の出願件名については件数のみ記載)
非公開 1件

出願1

発明者: 城口 克之
発明の名称: ワンステップ逆転写テンプレートスイッチ PCR
出願人: 理化学研究所
出願日: 2016/6/23
出願番号: JP2016-125007
PCT/JP2017/023254

出願2

発明者: 城口 克之
発明の名称: ワンステップ逆転写テンプレートスイッチ PCR
出願人: 理化学研究所
出願日: 2017/7/23
出願番号: PCT/JP2017/023254

出願3

発明者: 城口 克之
発明の名称: METHOD FOR SEQUENCING AND ANALYSIS OF NUCLEIC ACID
出願人: 理化学研究所
出願日: 2017/6/23
出願番号: US 62/523,857

出願4

発明者: 城口 克之
発明の名称: METHOD FOR SEQUENCING AND ANALYSIS OF NUCLEIC ACID
出願人: 理化学研究所
出願日: 2018/6/22
出願番号: PCT/JP2018/ 023778

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<学会発表>

Katsuyuki Shiroguchi, "Single Molecule & Single Cell Analysis", BIT's 8th Annual Congress of Molecular & Cell Biology-2018 Fukuoka

Katsuyuki Shiroguchi, "A novel quantification method for bacterial microbiota analysis with high dynamic range cell barcoding", IFPT' 10&IWSC'11 Nanjing, China



<著作物>

城口克之、小川泰策 “次世代シーケンサーを用いた DNA, RNA の網羅的デジタル計測”,
現代化学 2016 年 9 月号 (No. 546) p47-50

城口克之 “1細胞、1分子における核酸配列決定・定量技術の現状と展望”, 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社 V50 No.5 p526-531 (2018)

Katsuyuki Shiroguchi, “Distinguishing and Searching for Minority Cells: Small in Number, But Large in Effect”, Minorities and Small Numbers from Molecules to Organisms in Biology (Springer) p39-44.

<プレスリリース>

城口克之 「DNA 分子バーコード法の新機能」
理化学研究所、科学技術振興機構 2017 年 10 月 19 日

研究報告書

「組織 3D 染色による細胞の網羅的解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015(H27)年 10 月～2019(H31)年 3 月

研究者: 洲崎 悦生

1. 研究のねらい

本研究課題では、研究代表者が構築を進めていた臓器全体・全身の組織を光学的に透明化する新技術「CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body imaging Cocktails and Computational analysis)」技術を活用・拡張し、3次元的に全ての細胞を1細胞解像度で観察するためのパイプライン「セルオミクスパイプライン」を構築すること、および組織学的染色技術を中心としたさまざまな細胞ラベリング系と組み合わせて医学生物学的課題への適応を進めることを主要課題とした。具体的に以下のサブテーマを設定し研究を推進した。

サブテーマ1: 臓器スケール・細胞解像度の3次元観察・解析パイプラインの構築

セルオミクスの実現に必須である、臓器全体を細胞解像度で高速に観察する技術の確立のため、世界最高性能の観察用顕微鏡システム、及び基本的な画像処理システムの構築を目指した。

サブテーマ2: CUBICの医学生物学的应用を目指す実証例の蓄積

CUBICによる3次元観察技術を具体的な医学生物学的課題に適応し社会実装を進めるため、臓器全体の網羅的イメージングを用いた研究プロジェクトの実施を目指した。ヒト病理組織を用いた検証実験を計画し、「3次元病理学」実現への可能性を検討した。

サブテーマ3: 染色剤・抗体の3次元組織内への浸透原理解明と高効率3次元染色プロトコル構築

3次元染色技術との組み合わせによるセルオミクス確立のため、マウス全脳やヒト組織ブロック等 (cmオーダー) の染色理論の確立と染色プロトコル構築を目指した。さらに、構築したプロトコルを用いて実際に臓器スケールの定量的1細胞解析を実証することを目指した。

以上の項目を強力に推進すると同時に、CUBIC 技術を含む光学的 3 次元観察技術の普及・発展のためのさまざまな活動を行うことも主要な実施項目とした。

2. 研究成果

(1) 概要

サブテーマ 1: 臓器スケール・細胞解像度の 3 次元観察・解析パイプラインの構築

セルオミクスの実現に必須である、臓器全体を細胞解像度で高速に観察する技術の確立を目指し、我々はマウス全脳の細胞解像度イメージを最速 10 分強で取得可能な世界最高性能のライトシート顕微鏡システム「GEMINI」の構築および運用体制の確立に成功した。さらに、取得した画像の基本的な前処理や検出された細胞をコンピューター上で検出し位置情報とするための一連の解析プログラムを整備した。

サブテーマ 2: CUBIC の医学生物学的応用を目指す実証例の蓄積

CUBIC による 3 次元観察技術を具体的な医学生物学的課題に適応し社会実装を進めるため、睡眠研究へ応用しマウス全脳の活動状態遷移のモニタリング例を示した。また、マウス脾臓、トリ胚、マーモセット全脳などを用いた共同研究プロジェクトへ貢献した。さらに、我々はヒト病理組織を用いた検証実験を大阪大学病理学教室との共同研究で推進し、「3 次元病理学」の実証例を論文化して発表した。

サブテーマ 3: 染色剤・抗体の 3 次元組織内への浸透原理解明と高効率 3 次元染色プロトコル構築

3 次元染色技術との組み合わせによるセルオミクス確立のため、マウス全脳やヒト組織ブロック等 (cm オーダー) の染色理論の確立と染色プロトコル構築を目指した。大型 3 次元組織への抗体や染色剤の浸透原理が不明であったため、我々はマテリアル化学の手法に基づく一連の実験を施行し、組織の化学的性質を明らかにし浸透条件を原理的に探索してプロトコルを構築した。本プロトコルを用いて、さまざまな抗体や染色剤で臓器スケールの染色および細胞解像度での観察が可能であることを実証した。

以上の実施項目に加え、CUBIC 技術を含む光学的 3 次元観察技術の普及・発展のための英文総説、日本語総説、日本語書籍等の執筆、国内外の学会やトレーニングコースでの講演及び講師、一般向けの啓蒙活動を多数行った。また、具体的な生物学的課題への適用を希望する研究者らと共同研究を進めた。

(2) 詳細

本研究課題では、臓器全体・全身の組織を光学的に透明化する新技術「CUBIC (Clear, Unobstructed Brain/Body imaging Cocktails and Computational analysis)」技術を活用・拡張し、3 次元的に全ての細胞を 1 細胞解像度で観察するためのパイプライン「セルオミクスパイプライン(図 1)」を構築すること、および組織学的染色技術を中心としたさまざまな細胞ラベリング系と組み合わせて医学生物学的課題への適応を進めることを目指す研究開発を推進した。

サブテーマ 1: 臓器スケール・細胞解像度の 3 次元観察・解析パイプラインの構築

セルオミクスの実現に必須である、臓器全体を細胞解像度で高速に観察する技術の確立を目指し、我々はマウス全脳の細胞解像度イメージを最速 10 分強で取得可能な世界最高性能のライトシート顕微鏡システム「GEMINI」の構築および運用体制の確立に成功した(図 2A)。「GEMINI」は前後 2 軸のマクロズーム顕微鏡による観察系と左右 2 軸からのライトシート照明系を組み合わせた 2 x 2 軸マクロライトシート顕微鏡であり、照明面・観察面の深部を補完しながら撮影することが可能である。サンプル全体をライトシート最薄部でカバーするため、照明光はフォーカス位置を任意の幅で移動させながら撮影することが可能である。さらに、サンプルを上部から吊るす機構を採用し、高速なステージと組み合わせることで、最大 2.5 fps (6.7 分/1000 枚) の高速画像取得を実現した。以上の機構を実装することで、マウス全脳のラフスキ

ヤンを最速 13 分程度、約 9 x 9 x 9 um voxel サイズの精細な細胞解像度画像を 45 分程度で撮影することが可能となった。

さらに、取得した画像の基本的な前処理や検出された細胞をコンピューター上で検出し位置情報とするための一連の解析プログラムを整備した。本顕微鏡では細胞解像度の等方的画像 (xyz の幅がほぼ同じで、正立方体の voxel となっている画像) を撮像することが可能であり、比較的シンプルな細胞検出アルゴリズムを適応することでラベルされた細胞を良い精度で検出できることがわかった。本研究成果は現在投稿論文として発表準備中である。

サブテーマ 2: CUBIC の医学生物学的応用を目指す実証例の蓄積

CUBIC による 3 次元観察技術を具体的な医学生物学的課題に適応し社会実装を進めることを目指し、CUBIC と post in situ hybridization による検証系を睡眠研究へ応用した。神経活動を遺伝学的にラベルすることができる Arc-dVenus トランスジェニックマウスを用い、NMDA レセプター受容体阻害剤投与下におけるマウス全脳の活動状態モニタリングを CUBIC を使って行うとともに、活動神経細胞の細胞種を同定するために高感度な in situ hybridization 系を導入し CUBIC により得られたデータの検証を行うプロジェクトを推進した。本成果は CUBIC による大規模な細胞ネットワーク解析例として論文発表した (Tatsuki et al. Neuron 2016, 本研究者 co-first)。また、実際の生物学的課題に対する適応のための共同研究プロジェクトを推進し、マウス臍臓、トリ胚、マーモセット全脳などを用いた CUBIC の実証例を発表した (Yamamoto et al. Nature communications 2017; Watanabe et al. Developmental Biology 2018; Tainaka et al. Cell Reports 2018)。さらに、我々はヒト病理組織を用いた検証実験を大阪大学病理学教室との共同研究で推進した。本プロジェクトでは実際のヒト固定組織を用いた透明化の検証を行うとともにパラフィン包埋法によりアーカイブされた臨床病理検体にも透明化および 3 次元観察法を適応し、CUBIC が従来の病理検査手法とコンパチブルであることを示した。また、3 次元観察によりリンパ節内の微小ながん転移を 100% の感度で検出できることを示した。本研究成果は「3 次元病理学」の実証例として論文化し発表した (Nojima et al. Scientific Reports 2017)。

サブテーマ 3: 染色剤・抗体の 3 次元組織内への浸透原理解明と高効率 3 次元染色プロトコル構築

3 次元染色技術との組み合わせによるセルオミクス確立のため、これまで極めて困難と考えられてきたマウス全脳やヒト組織ブロック等 (cm オーダー) を抗体や染色剤で組織学的に染色するための理論の確立と染色プロトコルの構築を目指した。大型 3 次元組織への抗体や染色剤の浸透原理が不明であったため、我々はまず東京大学物性研究所の柴山充弘教授の研究グループと共同でマテリアル化学の手法に基づく一連の実験を施行し、組織の化学的性質を詳細に明らかにした。解明された組織のマテリアルとしての性質をもとに、染色剤や抗体の高浸透条件を原理的に探索してプロトコルを構築した。本プロトコルを用いて、神経・グリア等の各細胞種マーカー、神経突起や血管などの構造マーカー、c-Fos や Arc などの神経活動マーカーなどの多種類の抗体を用いた成体マウス全脳の染色に成功した。本研究成果は現在論文発表準備中である。

以上のサブテーマ実施に加え、CUBIC 技術を含む光学的 3 次元観察技術の普及・発展のための英文総説(Susaki and Ueda. Cell Chemical Biology 2016; Tsujino et al. J Physiological Sciences 2015)、日本語総説(計 11 報)、日本語書籍等の執筆、国内外の学会やトレーニングコースでの講演及び講師(オーストラリア light sheet microscopy workshop 2017, ドイツ EMBO light sheet practical course 2018 など)、一般向けの啓蒙活動を多数行った。また、領域内の共同研究のほか、神経科学分野での適用を目指すため、東京大学東原研究室(宮道和成博士)やシンガポール AStar(Dr. Yu Fu)との共同研究を進めた。



図1:セルオミクスパイプラインの概略図

臓器全体や全身の細胞を様々なラベリング法で可視化し、高度な組織透明化・3次元光学イメージング・画像解析による生物学的情報取得をつないだ一連のフローにより、臓器全体や全身の網羅的細胞観察・解析技術が実現できると考えた。Susaki and Ueda, Cell Chemical Biology (Review article) 2016 より改変。

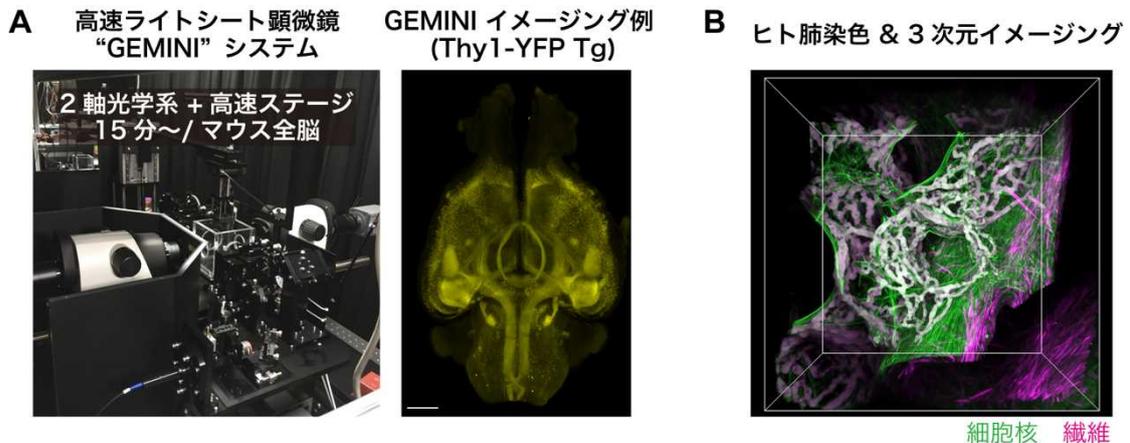


図2:(A)世界最高性能をもつ高速 3 次元透明化組織画像取得システム GEMINI(2 軸光学系 x2 軸照明系マクロライトシート顕微鏡)。(B) 3D 病理学的応用の例。ヒト肺の 3 次元染色・観

察例。Nojima et al. Scientific Reports 2017 より抜粋。

3. 今後の展開

本研究課題で取り組んだセルオミクスパイプラインの完成により、全臓器スケールの網羅的細胞解析や細胞回路解析が実現されると見込まれ、神経科学をはじめとする生命科学の手法に大きな変革をもたらすと期待される。また、本研究課題中に示したように、3次元観察技術は臨床病理学への応用にも有用である。このため、今後より客観的で高感度な診断確度を元に、広範な臨床病理学の現場での利用、標準的な診断法としての普及が期待できると考える。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究課題では、セルオミクスパイプラインの構築、3次元組織学プロトコルの構築など極めて挑戦的な課題に取り組み、総体として当初の目的を達成できた。また、多数の外部発表や共同研究体制の構築など、予想以上の成果を収めた部分もあった。研究実施においては適切かつ計画に基づいた予算執行に務めた。CUBICをベースとした本技術はすでに透明化試薬の販売など社会実装が進んでおり、今後臨床病理学への適用を始めとして社会的な波及効果をもたらすと期待している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

CUBIC法の活用を進めるため、マウス全脳の細胞解像度イメージを最速10分強で取得できる高性能のライトシート顕微鏡システムと、取得した画像から各々の細胞をコンピューター上で検出し位置情報とする解析プログラムを開発し、マウス全脳の活動状態の遷移のモニタリングすることに成功しました。また、ヒト病理組織を用いた「3次元病理学」を大阪大学と推進し、実証例を論文発表しました。さらに、CUBIC法での透明化脳の基本物性をヒドロゲルとして理解し、この観点を活かして、10種類以上の抗体を用いた全脳イメージングに成功し、関連プロトコルを整備しました。成果は、着実に論文化されおり、さきがけ内外との共同研究も活発に進めていることを含めて、優れた成果を高く評価をします。

さきがけ領域会議で幅広い知識を背景とした積極的なコメントで、領域内の討論を積極的また刺激的にリードしました。この領域の研究者同士が、積極的に前向きな議論をする風土醸成への貢献に対し、「特別賞」を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tainaka K*, Murakami TC*, Susaki EA, Shimizu C, Saito R, Takahashi K, Hayashi-Takagi A,

Sekiya H, Arima Y, Nojima S, Ikemura M, Ushiku T, Shimizu Y, Murakami M, Tanaka KF, Iino M, Kasai H, Sasaoka T, Kobayashi K, Miyazono K, Morii E, Isa T, Fukayama M, Kakita A, Ueda HR. Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell reports* 24(8): 2196–2210.e9, 2018. *co-first

2. Nojima S, Susaki EA, Yoshida K, Takemoto H, Tsujimura N, Iijima S, Takachi K, Nakahara Y, Tahara S, Ohshima K, Kurashige M, Hori Y, Wada N, Ikeda JI, Kumanogoh A, Morii E, Ueda HR. CUBIC pathology: three-dimensional imaging for pathological diagnosis. *Scientific reports* 7(1): 9269, 2017.

3. Tatsuki F,* Sunagawa GA*, Shi S*, Susaki EA*, Yukinaga H*, Perrin D*, Sumiyama K, Ukai-Tadenuma M, Fujishima H, Ohno RI, Tone D, Ode KL, Matsumoto K, Ueda HR. Involvement of Ca²⁺-Dependent Hyperpolarization in Sleep Duration in Mammals. *Neuron* 90(1): 70–85, 2016. *co-first

4. Susaki EA, Ueda HR. Whole-body and Whole-Organ Clearing and Imaging Techniques with Single-Cell Resolution: Toward Organism-Level Systems Biology in Mammals. *Cell Chemical Biology* 23(1): 137–157, 2016. (Review article)

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(主要な講演)

1. Tissue clearing and 3D imaging: basics and applications. Etsuo A. Susaki. EMBO practical course on light sheet microscopy, Max Planck Institute of Molecular Biology and Genetics, Aug. 2nd, 2018.
2. CUBIC-HistoVIsion: a pipeline for 3D whole-organ/body staining and imaging with single-cell resolution based on chemical properties of tissue gel. Etsuo A. Susaki. SBIC seminar, A*STAR, Singapore, Jul. 9th, 2018. (Host: Dr. Yu Fu)
3. CUBIC: a whole-organ/body cell-omics pipeline with tissue clearing, 3D imaging and informatics. Etsuo A. Susaki. SIGN Immunology Seminar, A*STAR, Singapore. (Host: Dr. LaiGuan Ng)
4. CUBIC: A Platform for Cell-Omics Analysis Toward the Organism-Level Systems Biology. Etsuo A. Susaki, NUS-JST(PRESTO) joint workshop, Singapore, Dec. 9th, 2016.

(受賞等)

2017年4月 文部科学省 平成29年度科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞「個体レベルのシステム生物学実現を目指す技術開発の研究」

研究報告書

「摂動と計測による個体のエネルギーフローの1細胞分解能解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 鈴木 団

1. 研究のねらい

細胞間のばらつきは個体に至る生物の階層でどのように統合され、高次生体機能を実現するのだろうか。その理解は、オミクスの生物学的な究極目標の一つである。本研究では光学顕微鏡を用いて、動物個体系と細胞集団系で、エネルギーの流れを1細胞の分解能で解析する基盤技術を開発することをねらった。階層をまたぐ物理パラメータを1細胞の分解能で計測して、階層を越えた統合的な理解と、細胞が個体に統合される仕組みの理解を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

生物の階層構造を縦断する研究の展開が本さきがけ研究では必要であったことから(図1)、階層構造を大きく3つに分ける研究テーマを設定して、研究を遂行した。最も小さなスケールの階層では、研究テーマA「生きた細胞の熱応答の計測」を設定し、1細胞未満のスケールで加熱するための技術開発と、開発した新規技術で熱刺激した細胞で見られる熱応答の解析を行った。次に大きなスケールの階層として研究テーマB「スフェロイドにおける温度と熱シグナルの1細胞解析」を設定し、1細胞から細胞集合体に至るスケールを対象に、細胞から放出された熱が細胞集合体でどのようにふるまうのかの検証を目指した研究を実施した。最後に最も大きなスケールの階層では研究テーマC「個体における温度と熱シグナルの1細胞解析」を設定し、動物個体における1細胞未満の空間分解能を持った温度イメージング技術の開発と、細胞の熱産生が個体で利用される過程の理解を目指した。

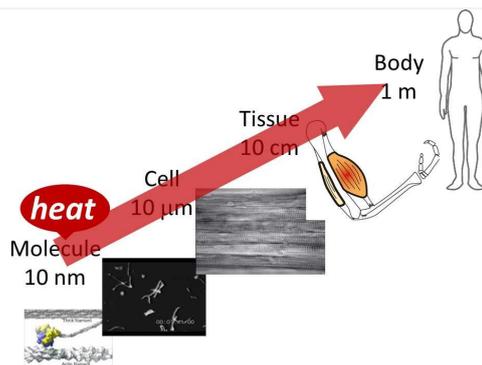


図1. エネルギー代謝によりタンパク質分子レベルで放出される熱が、分子集合体、細胞、細胞集合体を経て生物個体に至り、生命のインフラとして機能する様子を可視化して、ときには外部から熱刺激して、外部から摂取したエネルギーが生物の階層構造を縦断するしかけを理解する。熱は、周囲に拡散して体温を維持する以外に、局所的な酵素反応場の制御や分子の離合集散の制御といった、シグナルとしての役割も持つ可能性(「熱シグナル仮説」)について、検証する。

(2) 詳細

研究テーマA「生きた細胞の熱応答の計測」

生細胞内の任意の部位へ、一本鎖アビジンにビオチン化 DBCO と細胞内クリック反応を介して、アジド化した蛍光 Ca^{2+} 指示薬 fura-2 をラベルする手法を開発し、細胞質および ER の細胞質側で選択的に Ca^{2+} 濃度を計測する新規技術として論文発表した[Y. Hou, et al., Focal

calcium monitoring with targeted nanosensors at the cytosolic side of endoplasmic reticulum. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 17, 293-299 (2016)]. ■近赤外レーザー光を C2C12 由来筋管へ取り込まれた金ナノ材料へ照射して細胞内の微小熱源とし、生じた温度上昇によって骨格筋を Ca^{2+} 非依存的に、非接触に収縮できることを確かめ、新規手法として開発することに成功した。細胞内温度変化を、代表者らが開発した細胞内温度計で直接計測して定量化したほか、熱刺激がヒートショックタンパク質の発現の促進やミトコンドリア発生を促す遺伝子の発現を促進することを確かめた[論文2]。■さらにこの熱による収縮誘導を精製タンパク質系で確認する目的で研究を進める過程で、光ピンセットを用いたタンパク質 1 分子顕微計測系における新たな力計測の方法を新規に開発することに成功した[論文5]。■この新規顕微計測系を利用して、筋収縮制御系タンパク質の点変異に由来する心筋症の発症メカニズムについて、タンパク質分子による力発生様式の違いとして精製タンパク質系で検証できることを見いだした[S. Ishii, *et al.*, *Biophys. Physicobiol.*, *in press*]

研究テーマB「スフェロイドにおける温度と熱シグナルの 1 細胞解析」

薬剤刺激により活性化した、ヒトおよびマウス由来の褐色脂肪細胞からの熱産生を、1 細胞でイメージングする技術を新規に開発した[論文3]。■活性化した褐色脂肪細胞のミトコンドリアと ER において生じる pH と Ca^{2+} 濃度の変化を計測した。さらに上述の新規技術を応用して、熱産生との時間的相関を解析した。その結果、褐色脂肪細胞において、他の細胞種よりも多くの放熱が可能となるメカニズムが提案でき、論文発表した[論文4]。■研究開始当初から検討していたスフェロイドの調製が上手く進まない一方で、項目Cとして進めている臓器、個体での観察で進捗があるため、期間の中ほどに項目 A,C へ重点を移した。

研究テーマC「個体における温度と熱シグナルの 1 細胞解析」

筋肉からの熱産生は主要な熱産生手段として多くの生物で共通するが、産生した熱の個体への影響を評価するため、体積に占める割合の大きい飛翔筋を持つ甲虫をモデルとし、その微細構造について光学顕微鏡による計測と SPring-8 施設でのシンクロトロンX線回折実験との組み合わせた解析の実施、ならびに *in vivo* 1 細胞温度イメージング技術の新規開発を行い、それぞれ論文発表した[論文1; Ferdinandus, *et al.*, Facilely fabricated luminescent nanoparticle thermosensor for real-time microthermography in living animals. *ACS Sens.* 1, 1222-1227 (2016)]。

3. 今後の展開

本さがけ研究では、局所熱刺激(摂動)と局所温度計測(計測)の技術を開発・発展させ、様々な生物実験系への応用を加速的に拡大することができた。また筋肉を対象とした一連の研究成果は、本さがけ研究での検証を目的とした「熱シグナル」仮説を部分的に裏付けるものであった。

今後は、基礎研究を進めるとともに、より応用志向の協同プロジェクトへの展開も広げる。上記「2*. 非公開の研究成果」で述べた各プロジェクトを完遂するとともに、扱う生物学的課題を広げることで、当該仮説の一般性について検討を進める。またそれぞれの技術項目は単独

モジュールとして様々な目的に適用可能である。ナノ粒子を利用する温熱療法や高熱変換材料を利用した細胞分化誘導の研究といったバイオエンジニアリング分野のプロジェクトとの協同へと展開する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

4. 評価

(1) 自己評価

研究目的の達成状況、研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)、研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)について、以下に各項目ごと述べる。

・研究目的の達成状況

熱シグナル仮説の検証と、各プロジェクト固有の研究目的が、当初に計画した研究目的である。このうち、スフェロイドを用いたものは途中で取りやめたが、その分の時間と研究費を別プロジェクトへ回した。それらが非常に良く進展したことから、優れていたものとして評価する。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

研究実施体制は、必要な時に必要な能力を持つ人材を最低限確保でき、当初に計画した以上の成果に結びついたことから、優れていたと評価する。また人件費の一部を設備・備品費に充当でき、本さきがけ研究のコア技術の一つである光学顕微鏡系を充実させることができた。結果として、開発した技術を広い生物実験系で評価することが可能となった。また期間中に所属機関の異動が生じたため、研究費の一部は遅れての執行にならざるを得なかった。しかし期間後半より進めた新たな技術開発(「2*. 非公開の研究成果」の#5)とタイミングが揃ったことで、当初の予定を超える展開となったことから、結果として優れていたと評価する。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本さきがけ研究により、本さきがけ研究で開発した技術を利用する国内外の共同研究を広く呼び込むことに成功したことから、研究成果の科学技術への波及効果は高いと評価する。いっぽうで社会・経済への波及効果は、今後の見込みとして「3*. 非公開の今後の展開(参考情報)」に述べた範囲においては、期待できると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

熱という物理量を、生細胞内の細胞質やERなどの特定の細胞内器官から、組織・個体まで広いスケールにおいて精密に計測・解析する基礎技術の確立やプローブの開発することに成功しています。さらに、金ナノ粒子を細胞に取り込ませて、細胞内の熱分布を操作する技術を確立し、生体の筋管細胞が Ca^{2+} の変動なしに熱によって収縮することを確かめ、さらにこの熱

による収縮誘導を光ピンセットを用いたタンパク質1分子顕微計測系における新たな力計測によって確認しました。この時の細胞内温度変化を細胞内温度計で直接計測して定量化したほか、この熱刺激がヒートショックタンパク質の発現の促進やミトコンドリア発生を促す遺伝子の発現を促進することを確認しています。これらの成果は生命科学に新しい視点をもたらす可能性があり、高く評価できます。

この他の研究成果も含め、研究成果は順調に論文発表されており、プレス発表も実施しています。確立した技術の応用展開も進んでいるようです。是非、細胞での熱伝導率の実測までぜひ達成して欲しいと期待しています。

5. 主な研究成果リスト

記入要領に従い、本研究課題に関連して研究者主導で得られた成果について、代表的なものを中心に各項目5つ程度を記載する。

(1) 論文(原著論文)発表

1. Toshiki Shimomura, Hiroyuki Iwamoto, Tat Thang Vo Doan, Shin'ichi Ishiwata, Hiroataka Sato, Madoka Suzuki. A beetle flight muscle displays leg muscle microstructure. *Biophysical Journal*. 2016, 111, 1295-1303
2. Attilio Marino*, Satoshi Arai, Yanyan Hou, Andrea Degl'Innocenti, Barbara Mazzolai, Young-Tae Chang, Virgilio Mattoli, Madoka Suzuki*, Gianni Ciofani* (*Corresponding authors). Gold nanoshell-mediated remote myotube activation. *ACS Nano*. 2017, 11(3), 2494-2508, *Nature Nanotechnology* でハイライト。早稲田大学よりプレスリリース。日経産業新聞で紹介(2017年3月30日)。
3. Rókus Kriszt, Satoshi Arai, Hideki Itoh, Michelle H. Lee, Anna G. Goralczyk, Xiu Min Ang, Aaron M. Cypess, Andrew P. White, Farnaz Shamzi, Ruidan Xue, Jung Yeol Lee, Sung-Chan Lee, Yanyan Hou, Tetsuya Kitaguchi, Thankiah Sudhakaran, Shin'ichi Ishiwata, E. Birgitte Lane, Young-Tae Chang, Yu-Hua Tseng*, Madoka Suzuki* and Michael Raghunath* (*Corresponding authors). Optical visualisation of thermogenesis in stimulated single-cell brown adipocytes. *Scientific Reports*. 2017, 7, 1383
4. Yanyan Hou, Tetsuya Kitaguchi, Rókus Kriszt, Yu-Hua Tseng, Michael Raghunath, Madoka Suzuki. Ca^{2+} -associated triphasic pH changes in mitochondria during brown adipocyte activation. *Molecular Metabolism*. 2017, 6(8), 797-808
5. Shuya Ishii, Masataka Kawai, Shin'ichi Ishiwata, Madoka Suzuki. Estimation of actomyosin active force maintained by tropomyosin and troponin complex under vertical forces in the in vitro motility assay system. *PLoS ONE*. 2018, 13(2), e0192558, *PLOS Collections of Editor's Picks: Cell Biology - Cell Motility and Migration* でハイライト。

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)(代表的なもの)

学会招待講演

1. Imaging of heat production and heat-mediated contraction in single muscle cells. Biophysical Society the 62th Annual Meeting, San Francisco, California, February 17-21, 2018
2. Single-cell thermometry under optical microscope for the physiology of thermogenesis. 第95回日本生理学会大会、高松、2018年3月28-30日

著作物、総説

3. 鈴木団、新井敏, 1 細胞の温度がなんだというのか, バイオマテリアル—生体材料—, **34(3)**, 216-223 (2016)
4. 鈴木団 細胞の熱産生イメージングのための温度プローブ 生体の科学, **68(5)**, 456-457 (2017)
5. Arai, S. and Suzuki, M. Nano-sized optical thermometers. In *Smart nanoparticles for biomedicine*. (ed. by G. Ciofani), Elsevier, 199-217 (2018)

研究報告書

「脳深部微小神経回路を構成する細胞個性の機能的・分子的解読と情動制御への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 竹本 さやか(木村 さやか)

1. 研究のねらい

感情を生み出す脳は、外界からの様々な刺激を受け、生体の内的状態に応じて生存や種の保存にとって有利なように行動や生体反応を変化させる。感情の障害は種々の精神障害においても観察され、その分子神経基盤の解明は喫緊の課題である。本研究では、シングルセルおよび少数細胞を対象とする解析技術を用いて、刺激に応じて様々な情動が生起する際に、脳内の個々の神経細胞でどのような神経活動が生じているのか、また、そういった神経活動の変化はどのような分子メカニズムで生じているのか、情動変容に関わる分子神経基盤の解明を目指した。

特に、本研究では、扁桃体や分界条床核という脳深部の存在する非常に小さな脳領域に注目した。不安や恐怖といった特にネガティブな情動制御に関与することが示唆され、注目される脳深部に存在する領域である。この領域は機能が異なる小さな神経核(垂核)の集合体であり、複数の細胞種が複雑に混在し構成されるため、多数の細胞を平均化して解析するようなこれまでの方法では、一つ一つの神経細胞の活動制御に関わる分子基盤を明らかとすることは困難であり、この状況を打開するには、微小領域におけるシングルセルあるいは少数細胞レベルでの解析技術を用いることが有効であると考えた。

そのために、独自の分子マーカー知見を手掛かりに、これらの微小領域の神経垂核の特定細胞種を標識することで、

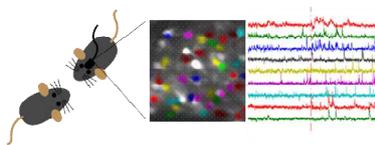
「生きた脳内における細胞ごとにことなる神経活動＝機能的個性」と、「少数細胞の発現機能分子＝分子的個性」の情動制御における役割を、同じ微小神経回路で解明する方法の確立を目指した。これら手法を用いることで、これまで解明が困難であった、情動変化に関わる新たな神経基盤とそれを支える分子メカニズムの解明を推進することが、本研究のねらいである。

情動制御に重要な脳深部微小領域(扁桃体および分界条床核)

課題①: 分子マーカー知見を活用した少数細胞の標識

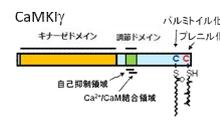
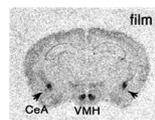
回路機能の解明

微小領域機能分子の同定



課題②: 経時的シングルセル活動計測法の開発

課題③: 少数細胞の情動制御における機能解明



課題④: 少数細胞機能分子の同定

(図1) 本研究のねらい

情動の制御に重要な扁桃体および分界条床核は、異なる小さな神経核(垂核)の集合体であり、多数の細胞を平均化して解析するようなこれまでの方法では、一つ一つの神経細胞の活動制御に関わる分子基盤を明らかとすることは困難である。本研究では独自の分子マーカー知見をいかし、情動変化に関わる全く新たな神経基盤とそれを支える分子メカニズムの解明を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

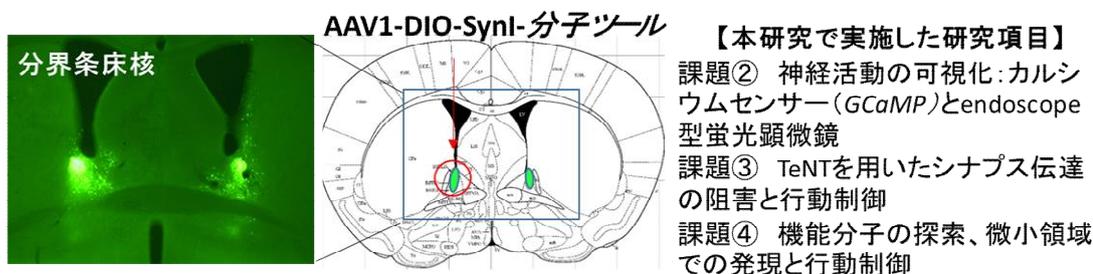
脳の深部には、扁桃体や分界条床核といった、情動制御に関与する、小さな領域が存在する。これらの微小領域において、異なる情動を引き起こす刺激は、個々の神経細胞でどのように情報処理されているのか？また、情動が変化するとき、個々の神経細胞ではどのような分子的な変化が生じるのか？本研究課題では、これらの疑問に答えるため、シングルセルあるいは少数細胞レベルでの解析技術を駆使し研究を推進し、新たな分子神経基盤を見出した。

第一にこれらの微小領域における研究を可能とするために、微小領域の標識が可能な分子マーカーの同定を推進した(課題①)。次に、見出された分子マーカーを用いて、微小領域である扁桃体中心核の特定細胞を対象とし、自由行動下においてシングルセルの解像度で神経活動を計測する、脳深部神経活動イメージング手法の確立を行った。この手法を用いて、様々な情動性刺激を与えた際の神経細胞の活動パターンを観察したところ、個々の情動性刺激によって異なる細胞応答を示すことが分かった(課題②)。また、同定した分子マーカーを発現する少数細胞の機能を解明するために、シナプス伝達の抑制による情動行動(恐怖記憶試験)の変化を検討し、分界条床核において恐怖記憶の成立に寄与する新たな細胞群を同定した(課題③)。更に、扁桃体における情動制御において重要であることを見出した少数細胞に発現する機能分子を同定するため、候補遺伝子の過剰発現による情動行動変化を検討し、過剰発現によって社会性行動が変化することが分かった(課題④)。それぞれの課題について、詳細を以下に記す。

(2) 詳細

課題① : 分子マーカー知見を活用した少数細胞の標識

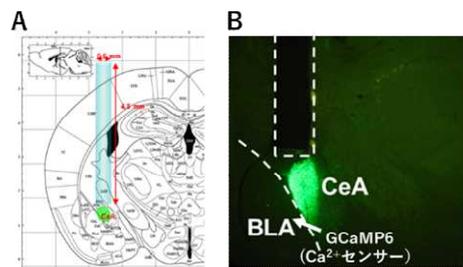
これまでの研究で、自らクローニングし機能解明を行ってきた CaMKI γ 分子が、扁桃体および分界条床核の特定神経垂核の細胞分子マーカーであることを見出し、この発見を契機に他の分子マーカーを探索した。その結果、分界条床核の特定垂核における複数の分子マーカーの同定に成功した。更に、見出した分子マーカー陽性細胞で cre リコンビナーゼを発現する遺伝子改変マウス(cre ドライバー系統)を入手・整備し、cre 依存的な発現カセットを有するアデノ随伴ウイルスの脳内局所投与やレポーター系統を用いた交配により、cre リコンビナーゼ系統の評価を実施、扁桃体および分界条床核の少数細胞の標識が可能であることを確認した。



(図2) 分子マーカーの同定と cre ドライバー系統を用いた微小領域の標識
cre 依存的なカセットを有するアデノ随伴ウイルスを cre ドライバー系統の脳内局所に感染させることで、微小領域(垂核)の特定神経細胞において目的のたんぱく質を発現する。

課題②: 経時的シングルセル活動計測法の開発

自由行動中のマウス脳深部領域より、シングルセルの解像度でカルシウムイメージングを実施する技術を用いて神経活動計測を行った。具体的には、小型統合型蛍光顕微鏡 (inscopix 社) と細長い GRIN レンズを用い、蛋白性 Ca^{2+} プローブ (GCaMP6) を発現させた脳深部神経活動を可視化する手法である。課題①で確立した方法を用いて、扁桃体中心核微小領域の特定神経細胞において、蛋白性カルシウムセンサー (GCaMP6) を発現させカルシウムイメージングを実施した。様々な情動性刺激を与えた際の扁桃体中心核の神経活動を、自由行動下において計測することに成功し、これまでに報告のない活動パターンを見出した。



(図 3) 小型蛍光顕微鏡を用いた扁桃体神経活動計測法の確立

A: 扁桃体中心核は脳深部に存在するため、グリーンレンズを用いて蛍光イメージングを実施した。B: 遺伝子改変動物の脳内に GCaMP6 を発現させ、実際に神経活動観察を行った扁桃体中心核 (緑色) と観察に用いたグリーンレンズ (水色) の概略図。

課題③: 少数細胞の情動制御における機能解明

分界条床核において新たに見出された分子マーカーを発現する少数細胞の、情動制御における機能解明を推進した。分子マーカーの cre ドライバー系統に cre 依存的アデノ随伴ウイルスを用いて、テタヌトキシン (TeNT) を発現させ、本細胞群のシナプス伝達を阻害した際の恐怖条件付け記憶を測定した。その結果、テタヌトキシンを発現した個体では恐怖条件付け記憶が減弱し、この細胞群のシナプス伝達は恐怖記憶の成立に必要なことが分かった。分界条床核の垂核および細胞腫ごとの機能は未だ不明な点が多く、本結果によりその一端が明らかとなった (Fujiwara et al. 未発表)。

課題④: 少数細胞機能分子の同定

各分子マーカーを発現する少数細胞において機能し情動制御に関わる機能分子の同定を推進した。

④-1: 候補遺伝子の情動制御における機能

CaMKI γ は、扁桃体中心核および分界条床核の微小領域に発現し、その様々な生化学的な特性からシナプス機能を制御し、情動制御においても重要な役割を果たす可能性が示唆されている。既にノックアウトマウスにおける情動行動変化を見出していたため、本研究では、CaMKI γ を扁桃体中心核の少数細胞において過剰発現させた際の行動変化を検討した。その結果、本酵素を扁桃体中心核の少数細胞において過剰発現させると、細胞腫選択的に情動性行動に変化をもたらすことが判明した (Takemoto-Kimura et al. 投稿準備中)。

④-2: 新規遺伝子の探索

扁桃体や分界条床核の微小領域の少数細胞で機能する新規遺伝子の探索のため、課題①で同定した分子マーカーの cre ドライバー系統と蛍光レポーター系統を交配することで、微小領域の蛍光標識を行った。その後、蛍光標識を手掛かりに、微小領域を採取し遺伝子発現解析を実施することで、これらの領域間で発現の変動を示し、情動制御において重要な役割を有することが推測される新たな候補遺伝子の探索を推進した。

3. 今後の展開

本研究課題では、扁桃体や分界条床核の微小領域に焦点を当て、シングルセルあるいは少数細胞の解析技術を駆使して、神経活動計測ならびに機能分子の同定を目指した研究を推進した。各微小領域(亜核)あるいは細胞腫を限定した解析を行うことで、これまで埋もれてしまっていた神経活動や遺伝子発現変化を見出し、これまで未解明である情動制御に寄与する新たな分子神経機構の同定に繋がると考える。また、少数細胞を対象に、両側面からの研究を推進する技術を確立したことで、今後はこれらを組み合わせることが可能となり(情動変化に繋がる神経活動変化をもたらす分子機構の解明や、逆に情動に影響する遺伝子がどのような神経活動変化を引き起こすかなど)、これまでの研究を補完し情動制御についての分子神経基盤の理解が一層深まることが期待される。また、カルシウムセンサーを用いた神経活動計測についても、次々と改良されたセンサーの開発が進んでおり、これらを活用することでより詳細な神経活動計測が可能となることが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

研究目的の達成状況: 個々の技術の確立を進めると同時に、情動制御の新規分子神経機構を見出し、研究目的は達成しつつある。見出された知見について早急に結論を得て論文報告を行うとともに、今回の研究によって派生した結果を発展させ、情動制御を多面的に理解することが重要と考える。

研究実施体制: 2年度目から技術補佐員を雇用し、効率的な研究推進が実現した。

研究費執行: 年度ごとに当初予算を執行しており計画的な執行であった。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果: 先駆的研究技術を用いることで、これまで埋もれていた、情動制御の分子機構を見出すことが期待され、それにより、精神疾患の生理的病態生理的理解を深め、治療法開発の可能性の提示に繋がるなど、社会的な波及効果が期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

脳深部に存在する分界条床核や扁桃体などの微小領域に焦点を当て、遺伝子工学および蛍光標識技術を駆使することで、マウス脳の微小領域を標識し、重要な役割を果たす分子を同定し、その機能解明を推進してきました。更に、マウス個体レベルで情動の変化をもたらす様々な刺激を与えた際の脳深部の細胞応答を単一細胞レベルで可視化することによって、分界条床核と扁桃体の重複した分子実体と機能を明らかにすることに成功しつつあり、これらの成果は高く評価できます。本研究に新たな解析技術を加え、さらに発展させてゆくことで、生物個体レベルでの情動の理解が1細胞の分解能で進展し、様々な要因によって生じる情動異常の病態解明や治療へと繋がることが期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kamijo S, Ishii Y, Horigane SI, Suzuki K, Ohkura M, Nakai J, Fujii H, **Takemoto-Kimura S**, Bito H. A Critical Neurodevelopmental Role for L-Type Voltage-Gated Calcium Channels in Neurite Extension and Radial Migration. **J Neurosci**. 2018, 38(24):5551-5566.
2. Nishiguchi KM, Fujita K, Tokashiki N, Komamura H, **Takemoto-Kimura S**, Okuno H, Bito H, Nakazawa T. Retained Plasticity and Substantial Recovery of Rod-Mediated Visual Acuity at the Visual Cortex in Blind Adult Mice with Retinal Dystrophy. **Mol Ther**. 2018, 26(10):2397-2406.
3. Inoue M, Takeuchi A, Manita S, Horigane S, Sakamoto M, Kawakami R, Yamaguchi K, Otomo K, Yokoyama H, Kim R, Yokoyama T, **Takemoto-Kimura S**, Abe M, Okamura M, Kondo Y, Quirin S, Ramakrishnan C, Imamura T, Sakimura K, Nemoto T, Kano M, Fujii H, Deisseroth K, Kitamura K and Bito H. Rational engineering of XCaMPs, a multicolor GECI suite for in vivo imaging of complex brain circuit dynamics. **Cell**. Accepted in principle.

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・論文(総説)発表

1. **Takemoto-Kimura S**, Suzuki K, Horigane S, Kamijo S, Inoue M, Sakamoto M, Fujii H, Bito H. Calmodulin kinases: essential regulators in health and disease. **J Neurochemistry**. 2016, 141(6):808-818.
2. **Takemoto-Kimura S** and Horigane S. Exploring the function of calcium-dependent phosphorylation in neuronal morphogenesis and circuit formation. **Jpn. J. Neuropsychopharmacol.** .2017, 37:163-16.

・学会発表(シンポジウム講演)

1. **竹本さやか**。神経細胞形態制御を担うカルシウム依存性リン酸化経路の神経機能解明。
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会・福島県郡山市ビッグパレットふくしま,
2016 年 3 月 29 日
2. **竹本さやか**、遠藤俊裕、金亮、鈴木敢三、藤井哉、尾藤晴彦。扁桃体神経回路におけるカルシウム依存的リン酸化経路と情動行動。第 46 回日本神経精神薬理学会年会(韓国、ソウル), 2016 年 7 月 2 日
3. **Takemoto-Kimura S**, Ueda S, Bito H. Calcium-dependent phosphorylation signaling in emotional and social amygdala circuits. 第 41 回日本神経科学大会(神戸), 2018 年 7 月 27 日
4. **Takemoto-Kimura S**, Ueda S, Bito H. Exploring molecular pathways involved in central amygdala-dependent control of emotional behaviors. 第 61 回日本神経化学学会大会(神戸), 2018 年 9 月 7 日

研究報告書

「1細胞内多階層オミックス動態の連関性」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 谷口 雄一

1. 研究のねらい

近年オミックス解析技術が発達し、1細胞レベルの微量なサンプルからでもゲノムやトランスクリプトームなどのオミックス解析ができるようになってきた。しかしながら、それぞれのオミックス階層毎の生命理解は飛躍的に進んできているものの、複数の階層を統合して理解するための解析法・理論の構築はあまり進んでいない。本研究では、各オミックス階層間の連関性を明らかにすることを目指して、2つの技術を軸に研究開発を行う。

1つ目の技術は、精密なゲノム3次元構造の解析技術である(課題1)。ゲノムの構造状態は、オミックス階層のうち最上流の階層の一つに位置づけられ、トランスクリプトーム・プロテオームの制御に密接に関連している。これまで我々は、ゲノム構造の最小単位であるヌクレオソームの分解能において、ゲノムの3次元構造を解析する新たな手法の開発を進めてきた(当時論文投稿中)。そこで本研究では、当該技術を完成させると共に、同技術を用いて様々な培養条件下で解析を行うことにより、特徴的な構造変化を示すゲノム領域を網羅的に探索し、エピゲノム階層、並びに下流のオミックス階層との連関性を明らかにすることを旨とする。加えて、感度を向上させる方法についても検討し、1細胞レベルでの解析の実現を追求する。

2つ目の技術は、真核細胞内における遺伝子発現量を網羅的に捉えることを目指した、ハイスループット3次元1分子蛍光イメージング技術である(課題2)。一般的に1分子蛍光イメージングはエバネッセント顕微鏡を用いて行われてきたが、ガラス基板上数百ナノメートルの領域しか観察ができないという欠点があり、真核細胞全体の定量化が行えない。そこで我々は、光シート顕微鏡を改良し、ガラス基板上数百マイクロメートルまでの領域の1分子観察をハイスループットに行うことができる顕微鏡(PISA 顕微鏡)の開発を進めてきた(当時特願2013-079956)。本研究では、当該顕微鏡を誰もが使えるレベルにまで完成させ、さらに同技術を用いて、以前に我々が行った1細胞内の遺伝子発現の網羅的計測(Taniguchi et al., Science, 2010)と同様の定量化を真核細胞において行うことを旨とする。

2. 研究成果

(1) 概要

課題1のゲノム3次元構造解析技術においては、予期せぬトラブルはあったものの、最終的には想定よりも分解能が高い技術を開発でき、インパクト誌(Cell)に論文掲載の運びとなった。当初目指していたのはヌクレオソーム分解能のゲノム構造解析技術であったが、さきがけ申請の直後(2015年8月)にほぼ同内容の論文が他研究室から報告された(Hsieh et al., Cell, 2015)。しかしその後、より分解能の高い、ヌクレオソームの配向性を加味した「サブヌクレオソーム分解能」の解析を我々の方法では行うことができることを見つけ、実証した。また、同論文

では3次元構造の構築までには手法が至っていなかったが、我々は計算機科学を専門とする理化学研究所の安藤格士研究員(当時)と協力し、分子動力学計算を新たに最適化計算に用いることでこれを実現した。そして、様々な条件で測定を行うことで、エピゲノム・トランスクリプトーム状態との相関性を明らかにすると同時に、ヌクレオソームの3次元配列構造を規定する基本構造を見出すことに成功した。さきがけ期間内においては、当該技術の論文(論文1)に加えて、ヌクレオソームレベル研究の重要性を示したレビュー論文(論文4)の報告を行った。

課題2の3次元1分子イメージング技術については、想定した成果が得られたのと同時に、さらなる研究の発展につながる重要な結果が得られた。我々が開発したプロトタイプ顕微鏡は、安定性が悪く頻繁に光軸調整が必要であり、開発を行っていた研究員が抜けた以降は扱える人間がいなかった。そこで我々は顕微鏡の構造を根本から見直し、特に市販の顕微鏡をベースとしていた測定部を、3次元CADを用いて最適に設計した金属筐体に置き換えることで、安定性を著しく向上させることに成功した。さらに、本顕微鏡を用いてゲル・液体内の1分子蛍光を非常に明瞭に3次元観察できることが確認できたことから、遺伝子発現の測定の方式を、遺伝子組み換えを行った細胞を直接計測する方式から、細胞内のタンパク質をゲル上に展開したものを計測する方式に転換した。そして、生体試料内の単一種類のタンパク質を aM(10^{-18} M)レベルで検出すること、並びに1細胞内のタンパク質約 20~40 種類の発現量の定量化を行うことに成功した。さきがけ期間内では、ハイスループット計測用のゲルデバイスの論文(論文2)、細胞内の全タンパク質を蛍光ラベル化する論文(論文3、5)とその他論文1本を報告したのに加え、特許3件を出願した。

(2) 詳細

課題1: 超高分解能3次元ゲノム構造解析技術の開発

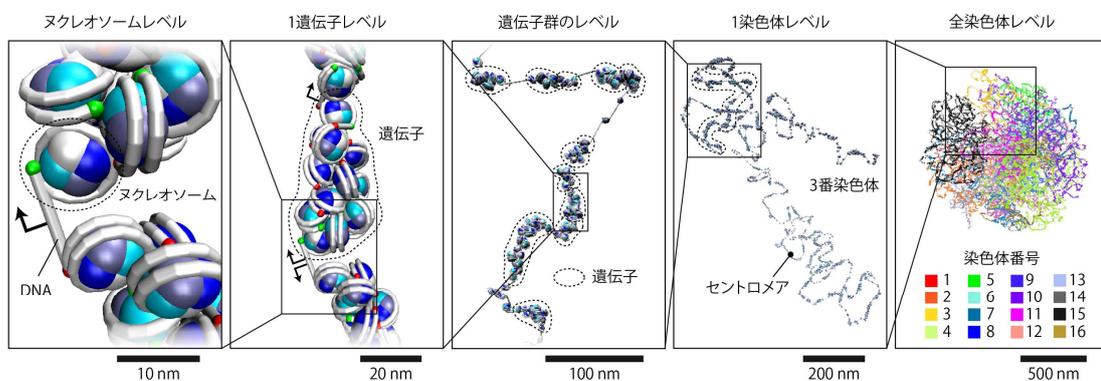
ゲノム3次元構造の代表的な解析法としては、2009年に開発された High-throughput chromosome conformation capture(Hi-C)法が挙げられる(Lieberman-Aiden et al., Science, 2009)。この手法では、空間的に近い距離にあるゲノムDNA同士を連結させ、連結されたDNA領域の周辺を次世代シーケンサーを用いて解読するという方法を用いる。これにより、ゲノム上のどの領域間が空間的に近接関係にあるかを、連結が起こった頻度から網羅的に解析することが可能となり、その情報からゲノムの3次元構造を導くことができる。しかし、従来のHi-C法では、数十から数千ヌクレオソームの分解能でしか3次元構造が得られない。また、最近の技術開発により単一ヌクレオソームレベルで連結頻度を解析する技術が開発されたが、不純物が大量に生じるために定量性が低く、3次元構造の導出には至っていない(Hsieh et al., Cell, 2015)。

そこで我々は、まず不純物をきれいに取り除く実験手順の開発を行った。この手順のうち一つの重要なステップは、ゲノムの連結を、特定のアダプターDNA配列を介して行うことである。このアダプターDNAに結合したビオチンを用いて連結産物の精製を行うことにより、またシーケンス解析の際にアダプターDNA配列が無いリードを除くことにより、不純物をほぼ完全に除去することに成功した。さらには、連結産物の配列からゲノム上の位置を探す際に、配列の向きに注目して解析を行うことで、ヌクレオソーム内のDNA巻き付き開始・終了点を見分けて連結頻度を解析する方法を考案し、これにより、各ヌクレオソームの位置だけでなく、それぞれの

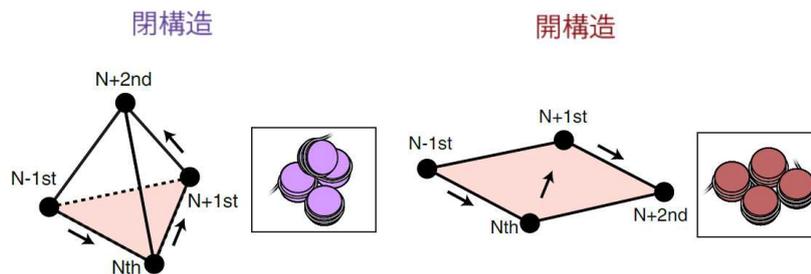
配向性を含めて解析することが可能となった。こうした理由から、本法を”Hi-C” with nucleosome “O”rientation の略から Hi-CO 法と名付けており、日本語の「配向」と同じ読み名にしている(論文1)。

さらには、得られた連結頻度のデータから3次元構造を得るための計算的手法の開発を行った。従来構造計算は数学的な手法を用いて行われてきた。これに対し我々は、分子動力学シミュレーションを新しく活用し、物理的に合理的な形でヌクレオソームを揺らがせながら、それぞれの連結頻度のデータを最も良く満たす各ヌクレオソームの配置と配向を探索するという方法を取ることで、ヌクレオソームレベルの3次元構造を得ることができるようになった。

さらには、この構造計算をスーパーコンピューターを用いて大規模に行うことで、全ゲノムスケールの構造が一度に得られるようになった(下図)。ゲノムの3次元構造を、単一ヌクレオソームから全ゲノムに至るまでのスケールで表現したのは世界初となる。得られた構造から、ヌクレオソームが不規則に配列しながら約 20-30nm の太さのファイバーを形成していることが分かる。



さらに、不規則なヌクレオソームの3次元配置構造の中に一定の法則性があることを発見した。ゲノム DNA 上で隣り合う4つのヌクレオソームの位置座標に注目したところ、正四面体で配置するグループ(閉構造)と、ひし形で配置するグループ(開構造)の2タイプに大別されることが分かった(下図)。つまり、ヌクレオソームの配置構造には、2種類の基本構造が存在しており、これらが切り替わることによってゲノム構造による細胞状態の制御が行われていることが明らかになった。



今回の研究により、ゲノムの3次元構造を世界最高分解能であるヌクレオソームのレベルで決定する方法が開発され、さらにその構造が細胞の制御状態と連動していることが示された(論文1)。ヌクレオソームレベルでの構造は、エピゲノム制御に関連する分子の結合等の影響を直接反映すると考えられ、今後分子レベルでのエピゲノム制御のメカニズムの解明に貢献することが期待できる(論文4にレビューを掲載)。また、高分解能のゲノム構造データのク

ラストリングを行う手法を最近開発しており(論文投稿中)、上記のメカニズムの理解をより統計的に行うことができると期待している。また現在、本解析を1細胞内で行うためのプロトコル開発を続けており、もし実現すれば1細胞トランスクリプトーム解析などと組み合わせることで、細胞内のエピゲノム制御の仕組みがさらに詳しく明らかになると期待できる。

課題2: 3次元1分子イメージング技術の開発

近年開発された光シート顕微鏡は、励起光による光ダメージを最小化できるだけでなく、高感度・高速イメージングを達成できる等、様々な顕微鏡の長所を併せ持つ手法として注目を集めている(Huisken et al., Science, 2004)。光シート顕微鏡の大きな弱点は、観察の際に柱型のアガロースゲルに細胞試料を埋める必要がある等、応用できる生物試料や測定スループットが限定されていることである。これに対して我々は、光シート顕微鏡の唯一の欠点である試料の制約性を大幅に緩和した、一般的なカバーガラス型試料に対して測定を行える新たな顕微鏡(PISA 顕微鏡)を開発し、特許を出願した。本顕微鏡では試料の深さ 0.2mm までの1分子イメージングが可能であり、エバネッセント顕微鏡では不可能だった3次元空間内の1分子検出を実現することができる。

しかしながら、研究開始当時はまだプロトタイプの段階であり、測定には毎回長時間の光軸合わせを必要とし、機械振動や熱ドリフトなどのため安定した測定を行うことができなかった。そこで我々は、PISA 顕微鏡の測定を安定化すべく、対物レンズ等の主要な光学素子を一体型の金属フレームに据え付けた顕微鏡筐体を3D CAD を用いて設計し、製作を行った。その結果、毎回必要だった光軸合わせは不要となり、機械振動や熱ドリフトの問題は大幅に改善され、顕微鏡を専門としない研究者・学生が容易に使うことができるレベルになった。そして、従来は行うことが極めて難しかったマルチウェル内の複数試料の観察も問題無く行えるようになり、ハイスループットイメージングを光シート顕微鏡において実現することに成功した。

当初は本顕微鏡を用いて、我々が以前に大腸菌細胞において行ったのと同様に(Taniguchi et al. Science, 2010)、蛍光タンパク質のコード配列を各遺伝子に挿入した細胞株ライブラリを出芽酵母において作製し、各々の細胞株をマルチウェル内でハイスループットに測定することを計画し、そのためのマルチウェルデバイスの開発を行っていた(論文2)。しかしながら、出芽酵母やヒト細胞などの真核細胞の持つ自家蛍光は予想以上に強く、細胞内にある全ての蛍光タンパク質を1分子レベルで捉え、計数を行うのは非常に困難を極めた。一方で、アガロースゲルや粘性のある液体内の蛍光分子の観察は、0.2mm 以上の深部であっても非常に明瞭に行えることが確認できた。このため、ゲノムに蛍光タンパク質を挿入して細胞そのものを測定する方針から、細胞を一旦ゲルに溶解して、その中で任意のタンパク質、または分離された複数のタンパク質を蛍光抗体または色素でラベル化して測定する方針に転換した。

この場合、細胞中のタンパク質分子をどれくらいの割合で蛍光標識できるかというのは非常に重要な問題になる。そこで我々は、細胞内の1種類、または複数種類のタンパク質分子に対して、蛍光標識されたタンパク質の割合を求めめるアッセイ法を開発した(論文3)。この方法を用いて、細胞内の各タンパク質を、アミノ基をターゲットとする形で蛍光ラベル化した時のラベル化率を調べたところ、50-90%と求められ、蛍光スポットの数からのタンパク質数の評価が可能であることが実証できた。

これらの結果を元に、1細胞内の複数タンパク質の定量化を行う実験系の開発系を進め、

現在は 20-40 種類のタンパク質の定量化が行えるようになってきている。また別の方向性として、PISA 顕微鏡を様々な生化学分析器の検出系として利用することにより、様々な分析・分子診断を1分子感度化することができるのではないかと考えた。PISA 顕微鏡では一般的なピペットマンでも扱えるマイクロリットルスケールの液体内にある全ての分子を数えることができ、一般的な分光光度計と比較して感度を一万から一億倍程度改善できる。これにより、例えば血液診断において希少にしか存在しない病原性分子を検出したり、弱反応性の抗体を用いたり、検体量の大幅削減を行ったりすることが可能になると期待している。

3. 今後の展開

課題1: 超高分解能3次元ゲノム構造解析技術の開発

Hi-CO 法は、ゲノムの3次元構造を分子レベルで解き明かすことのできる非常に強力な手法であり、様々な生物種・変異株・培養株で測定を行うことで、エピゲノム制御の分子メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。また、Hi-CO 法の技術的課題としては、1細胞レベルでの測定、並びにヒトなどのゲノムサイズの大きな生物への技術の適用が主なものとして挙げられ、我々もさらなる技術開発を進めていく予定である。さらには、Hi-CO 法で得られた構造が他の実験系でも同様に得られるかは今後検証していく必要があり、山下隼人さきがけ研究者の協力の下で高速 AFM を用いた実験を行っていくのと同時に、クライオ電子顕微鏡による検証実験も進めていくことを予定している。

課題2: 3次元1分子イメージング技術の開発

PISA 顕微鏡を用いた1細胞プロテオーム解析については、現在分離検出できている種類の数(20~40種類)を、さらに増やしていくための技術開発を行うことを予定している。特に、川井隆之さきがけ研究者と協力し、キャピラリー電気泳動等の分析化学技術への1分子検出系の導入を進めていく予定である。さらには、実際に多数の1細胞を解析することで、1細胞トランスクリプトームとの相関性、並びに性質の違いを明らかにしたいと考えている。一方で単一種類のタンパク質をハイスループット・高感度検出できるプラットフォームの開発も進めていく予定であり、様々な分子診断を1分子レベルで行う”1分子分析化学”の実現に向けて、技術開発・産学連携・医療応用の三方面から取り組みを進める予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

本テーマにおいて開発した Hi-CO 法、並びに PISA 顕微鏡は、世界においても独自性の高い、また極めて有益性の高い技術であり、優れた成果を挙げたと考えている。Hi-CO 法はクロマチン分野のみならず、システム生物学分野、医療分析分野、薬剤開発分野への波及効果が期待できる。また PISA 顕微鏡はバイオイメージング分野だけでなく、分析化学分野、医療診断分野への応用性が大いに期待できる。本テーマでは、想定していたよりも十分に大きな成果が得られており、究極目標である「1細胞内多階層オミックス動態の連関性」の解明に本質的に貢献しうる新しいアプローチ法の開発が達成できたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

ヌクレオソームの配向性をも加味した「サブヌクレオソーム分解能」をもつ精密なゲノム3次元構造解析手法「Hi-CO 法」を開発し、酵母において実証しました。さらにヌクレオソームの3次元配列構造を規定する2つのヌクレオソーム4量体の基本構造を見出し、その成果を Cell 誌に発表しました。これらは、染色体の構造や遺伝子の発現制御の解明、特に分子レベルでのエピゲノム制御のメカニズムの解明に大きな貢献をすると期待されます。

また、本研究者は、光シート顕微鏡の大きな欠点である試料の制約を除いて一般的なカバーガラス型試料に対して測定を行える「PISA 顕微鏡」を開発しました。さきがけ研究では測定系の安定化のために各種の改良を行い、改良された顕微鏡を様々な生化学分析器の検出系として利用して、様々な分析・分子診断を1分子感度で実現することにも成功しつつあり、今後の展開を楽しみにしています。

ゲノム構造の解析という基礎的な研究から PISA 顕微鏡とその応用的な研究まで傑出した業績をあげています。これらの業績に対し、さきがけ1細胞領域ではさきがけ2期生に対するライジング・スター賞を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Masae Ohno, Tadashi Ando, David G. Priest, Vipin Kimar, Yamato Yoshida, Yuichi Taniguchi : Sub-nucleosomal genome structure reveals distinct nucleosome folding motifs. Cell. Accepted |
| 2. David G. Priest, Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka, Yuichi Taniguchi : Micro-patterned agarose gel devices for single-cell high-throughput microscopy of E. coli cells. Scientific Reports 7, 17750 (2017) |
| 3. Simon Leclerc, Youri Arntz, Yuichi Taniguchi : Extending Single Molecule Imaging to Proteome Analysis by Quantitation of Fluorescent Labeling Homogeneity in Complex Protein Samples. Bioconjugate Chemistry. 29, 2541-2549 (2018) |
| 4. Masae Ohno, David G. Priest, Yuichi Taniguchi : Nucleosome-level 3D organization of the genome. Biochemical Society Transactions. 46, 491-501 (2018) |
| 5. Simon Leclerc, Youri Arntz, Yuichi Taniguchi : Proteome-wide quantification of labeling homogeneity at the single molecule level. JoVE, accepted |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件(非公開)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (国際学会発表) Gordon Research Conference: Genome Architecture in Cell Fate & Disease、Hongkong、2017年7月4日
2. (受賞) 第1回理研産業連携貢献賞、2016年10月18日
3. (プレスリリース) 世界最高分解能でゲノムの3次元構造を解明、2019年1月16日
4. (プレスリリース) 細胞中のタンパク質を全部光らせる、2018年7月
5. (著作物) 化学同人 定量生物学、第1章: 遺伝子発現の定量生物学、2018年7月31日

研究報告書

「細胞膜分子動態1分子解析による細胞の個性の解読」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 坂内 博子

1. 研究のねらい

細胞を取り囲む細胞膜は細胞同士が接触・相互作用する場所であり、他の細胞からの情報を最初に受け取る場である。すなわち、細胞膜は細胞自身の個性を提示し、他の細胞の特性を認識する場と捉えることが可能である。本研究のねらいは、細胞膜に提示された個々の細胞の特性(=個性)を、非破壊・低侵襲で解読するための新技術を開発することである。

細胞膜は脂質二重層とモザイク状に入り混じったタンパク質により構成されている。これらの細胞膜構成要素は流体としての性質を持ち、細胞膜の中で2次的にブラウン運動をしている。先行研究や応募者のこれまでの研究により、「細胞膜分子の動き」は細胞の分化状態や病態など、様々な細胞の個性を反映することがわかってきた。この発見を発展させ、「細胞膜分子の動き」に込められた分子情報を解読することにより個々の細胞の特性を記述する、というのが本研究提案の戦略である。

本研究提案では「病態」という細胞の個性に着目し、膜分子の動きからその個性を読み解く技術を開発する。脳神経疾患モデル動物由来の生細胞を用いて、私がこれまで開発・改良に関わって来た膜分子の動態解析技術「量子ドット1分子イメージング法」を基盤に、疾患と関連して細胞膜に現れる「異常」な分子動態を網羅的に検出する技術「ハイスループット1分子イメージング法」の確立を行う。同一種の細胞から複数の膜分子の動きの情報をナノスケールかつハイスピードで検出し、脳神経疾患に関連する特徴を記述できる新たに指標を創成する。将来臨床で役立つ疾患発症前診断法の基盤となることを見通し、神経細胞に分化誘導したヒト脳神経疾患患者由来のiPS細胞においても疾患特有の分子動態特性を見いだす。

2. 研究成果

(1) 概要

膜分子動態から細胞の個性を読み解くために、本研究では A「培養細胞を用いたハイスループット1分子イメージング法の確立」、B「脳神経疾患モデル動物由来培養神経細胞の1分子病態解析」、C「疾患由来 iPS 細胞を用いた1分子病態解析」を行なった。

A「培養細胞を用いたハイスループット1分子イメージング法の確立」では、22種類の膜分子の1分子解析プロトコルを確立した。B「脳神経疾患モデル動物由来培養神経細胞の1分子病態解析」ではアルツハイマー病のモデル細胞で11種類の膜分子動態解析を行った結果、いくつかの膜分子動態が野生型と異なることを発見した。C「疾患由来 iPS 細胞を用いた1分子病態解析」では、難治性てんかんを持つ患者から樹立した iPS 細胞を神経細胞に分化させ1分子解析を行い、神経伝達物質受容体の拡散運動に異常を見出した。

また、1分子解析を、タンパク質の新規機能の発見に新展開した。一見顕著な表現系を持たないタウタンパク質欠損マウスの神経細胞を用いて、D「膜分子動態1分子解析による生理的タウタンパク質の新規機能の発見」という、期待以上の成果を得た。生理的なタウタンパク質は、従来知られていた微小管構造と軸索輸送の安定化という役割に加えて、樹状突起において神経伝達物質の側方拡散運動を制御する役割があることを明らかにした。

さらに、てんかんモデル動物神経細胞の膜分子動態を解析する過程で、細胞内 Ca²⁺濃度の上昇「Ca²⁺シグナル」の由来が、膜分子動態制御の方向性を決める重要なファクターであることが明らかになった。そこで、E「Ca²⁺シグナルの由来を特定する新規解析法の開発」を行なった。細胞体小胞体や細胞膜に遺伝子コード型 Ca²⁺センサーを標的することにより、Ca²⁺シグナ

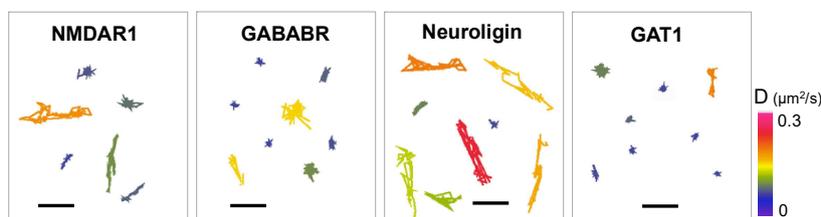
ルの発生点を正確に特定するという新しい解析法を確立した。

(2) 詳細

A 「培養細胞を用いたハイスループット1分子イメージング法の確立」

従来の1分子イメージング研究では技術的な制限から2~3種類の分子の動態に焦点を絞って解析せざるを得なかった。この問題を克服するため、細胞膜上の神経機能に関わる膜タンパク質(神経伝達物質受容体、Gタンパク質共役型受容体、細胞接着因子、トランスポーター、リガンド受容体)を量子ドットでラベルする方法を確立した。これにより、20種類以上の膜タンパク質動態を観察できるプロトコールが完成した(図1)。また、量子ドットの画像解析プログラムを改良し(早稲田大・井上貴文教授との共同研究)、分子動態の解析やパラメータの可視化の機能を強化した。以上の結果は、Springer NEUROMETHODS series “Single Molecular Microscopy”, (Eds. N. Yamamoto and Y. Okada) に寄稿しており、現在査読中である。

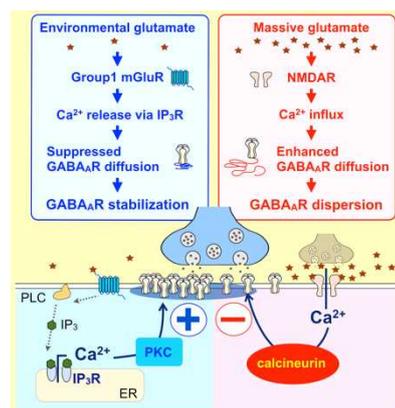
図1: 複数の膜分子に対する1分子動態解析の結果。1.5秒間の膜分子の側方拡散軌跡を表す。暖色は速い拡散運動を、寒色は遅い拡散運動を示す。*Bannai H, Inoue T, Hirose M, Niwa F, Mikoshiba M “Synaptic function and neuropathological disease revealed by quantum-dot single particle tracking.”(査読中) より。



B 「脳神経疾患モデル動物由来培養神経細胞の1分子病態解析」

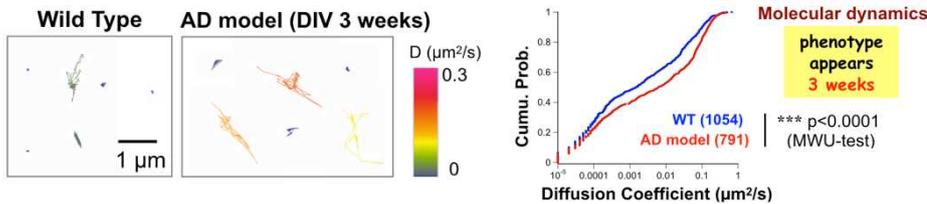
1) 生後9日にてんかん様症状を発症するIP₃受容体タイプ1ノックアウトマウス由来の神経細胞で膜分子動態1分子解析を行なったところ、抑制性神経伝達物質受容体 GABA_A受容体(GABA_AR)の側方拡散が増大していることを見出した(Bannai & Niwa et al. Cell Reports 2015)。この結果は、IP₃受容体を介した細胞内Ca²⁺貯蔵庫小胞体からの恒常的なCa²⁺放出が、細胞表面のGABA_ARの動態を制御していることを意味している。さらに細胞内Ca²⁺貯蔵庫からの「Ca²⁺放出」(図2左)と細胞外からの「Ca²⁺流入」(図2右)がそれぞれ異なる下流シグナルを活性化し、GABA_ARの側方拡散に対して「抑制」と「促進」という正反対の役割を持つことが明らかになった。膜分子動態が細胞内Ca²⁺シグナルを使い分けることにより巧妙に制御されていることが示された結果である。

図2: てんかんモデル細胞の1分子解析により、Ca²⁺シグナルの由来(右:放出、左:流入)によって、膜分子動態制御の方向性(+:安定化、-:不安定化)が決まることがわかった



2) 生後4ヶ月という早期にアミロイドβ (Aβ)の蓄積を起こすアルツハイマー病モデルマウス(理研・西道隆臣研究室より提供)由来の神経細胞において、複数の膜分子動態を解析した。培養後3週間目のこの神経細胞を用いて、10種類以上の膜分子の動態情報を1分子イメージングにより取得したところ、ある神経伝達物質受容体の動きが、アルツハイマー病モデル細胞において増加することを見出した(図3)。

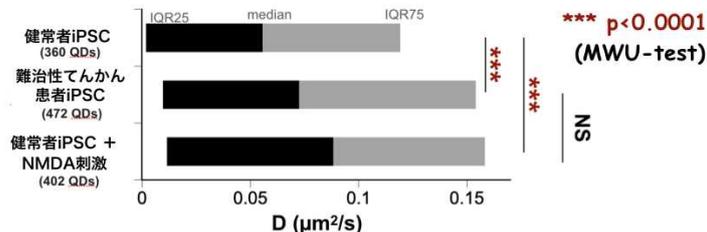
図3: 3週間培養したアルツハイマー病モデルマウス(AD model)由来神経細胞で見出された、受容体の拡散運動の増加(左: 受容体運動の軌跡; 右: 拡散係数)



C 「疾患由来 iPS 細胞を用いた1分子病態解析」

慶應義塾大学の岡野栄之教授・前田純宏講師と共同研究で、ヒト iPS 細胞(iPSC)における1分子イメージングに成功した。(iPSC における1分子イメージングは、今の所世界で報告はない)。健常者由来 iPSC を神経細胞に分化させた細胞を用いて、1分子動態解析の技術を確立した。確立した1分子動態解析技術を用いて、ヒト iPSC 由来神経細胞でも、てんかん発作を模した神経興奮の増大により、受容体の側方拡散運動が増加することを示した(図4: 健常者 iPSC + NMDA 刺激)。これは、過去げっ歯類で存在が示された「神経活動依存的な受容体側方拡散運動の制御」(Bannai et al. Neuron 2009)が、ヒト神経細胞にも共通して存在することを意味する結果である。また、難治性てんかん患者から樹立した iPSC 由来神経細胞でも、NMDA 刺激時と同様、受容体の側方拡散が増加することがわかった(図4: 難治性てんかん患者 iPSC)。

図4: 神経細胞に誘導後2ヶ月培養したヒト iPSC における、受容体側方拡散運動解析。神経興奮を誘導した iPSC、難治性てんかん患者から樹立した iPSC において、受容体拡散運動の増加が観察された。



D 「膜分子動態1分子解析による生理的タウタンパク質の新規機能の発見」

リン酸化タウの異常蓄積がアルツハイマー病をはじめとするタウオパチーの原因であることはよく知られているが、正常な神経細胞に発現する微小管結合たんぱく質タウが神経機能に果たす役割についてはあまり知られていない。タウの生理的役割を明らかにするために本研究では、タウ欠損マウス由来の神経細胞の細胞膜分子動態に現れる異常を、量子ドット1分子イメージング法を用いて解析した(学習院大学・高島明彦教授との共同研究、学生1名)。タウ欠損神経細胞の樹状突起・細胞体において、抑制性シナプス受容体、興奮性受容体ともに、受容体の動態に以上がおこることが明らかになった(図5)。

タウたんぱく質は、正常な細胞では樹状突起よりも軸索に密集している。本研究の結果は、少ないながらも樹状突起に存在するタウが、興奮性・抑制性神経伝達物質受容体の動態制

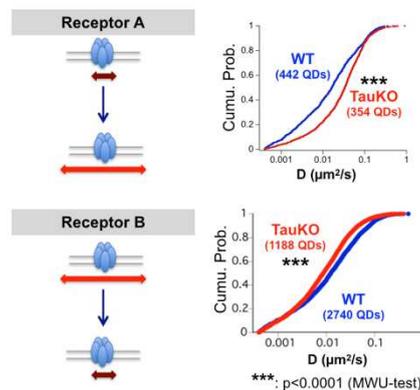


図4: タウ欠損マウス(TauKO)における興奮性シナプス受容体と抑制性受容体の拡散運動の異常

御という、これまで知られていなかった機能を持つことを明らかにしたものである。

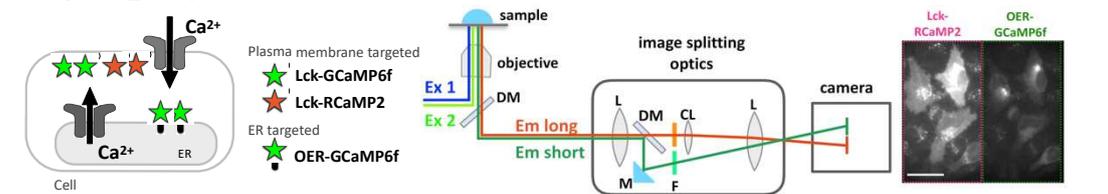
E 「Ca²⁺シグナルの由来を特定する新規解析法の開発」

上記 B の研究で我々は、てんかんの予防／発症に関わる GABA_A 受容体の動態制御が、Ca²⁺シグナルの由来に依存することを見いだした(Bannai & Niwa et al. *Cell Reports* 2015)。既存のイメージング技術には、Ca²⁺シグナルの由来を捉える時空間解像度を兼ね備えたものはないが、本研究にとって今後必要不可欠な技術となる。したがって、本研究では「Ca²⁺シグナルの由来」まで検出できる新規 Ca²⁺イメージング法の確立を行った。

この目的のために、Ca²⁺ストアである細胞内小胞体(ER)膜の細胞質側に遺伝子コード型 Ca²⁺センサー(GECI)を標的した「ER 標的型センサー」を新たに作成した(Niwa et al. BBRC 2016)(図6)。この「ER 標的型センサー」は、既存の Ca²⁺センサーに比べて、より高感度で時間解像度良く Ca²⁺放出を検出できることが分かった。また、生きた線虫個体内でも、「ER 標的型センサー」を用いた1細胞レベルの Ca²⁺イメージングが可能であった。さらに、グリア細胞アストロサイトの自発的 Ca²⁺シグナルを調べたところ、「細胞膜標的型センサー(Lck-GCaMP6f)」の方が「ER 標的型センサー(OER-GCaMP6f)」より高頻度で Ca²⁺シグナルを検出することがわかった。この結果は、アストロサイトの Ca²⁺シグナルは従来の予測に反して、Ca²⁺流入成分が多い可能性を示している。

Lck-GCaMP6f, OER-GCaMP6f を使い分けることにより、アストロサイト(Sakuragi et al. BBRC 2017)・HEK293 細胞 (Vervliet et al. *Biochem. Pharmacol.* 2017)において、それぞれ Ca²⁺流入・Ca²⁺流入を極めて感度良く認識できることも示された。さらに、同一細胞で細胞膜近傍とER膜近傍の Ca²⁺変化を同時に計測するためのシステムを確立した(Bannai et al. *JoVE, In Press*)。

図6: Ca²⁺シグナルの由来を特定するための膜標的型 GECI(右)と、細胞膜・ER膜の Ca²⁺シグナル変化を同時に測定するシステム(左)



3. 今後の展開

本研究により、膜分子動態が細胞の状態を表す大変感度の高い指標であることが明らかになった。例えば、タウ欠損マウスは、個体レベルでも神経細胞レベルでも一見異常がない動物であるが、膜分子動態には明確な異常があった。今後は、統合失調症やうつ病などの細胞においても、膜分子動態の異常があるかを検討していきたい。これらの病気は、現在目に見える病態が同定されておらず発症メカニズムも不明な疾患であるが、本研究を展開していくことにより、明確な病態を定義できる可能性がある。動態異常を引き起こすタンパク質やシグナル経路を追求することにより、従来の研究とは異なる方向性から精神疾患の発症メカニズムが明らかになると期待される。

アルツハイマー病モデルマウスの神経細胞も、個体で最初の表現系アミロイドベータの蓄積が見られる時期(4ヶ月)よりはるかに早く(3週間)に、膜分子動態の異常があらわれていた。今回膜分子動態を解析したモデルマウスは、アミロイドベータの蓄積が特に早期におこる系統である。他のアルツハイマー病モデルの動物でも検証する必要がある。さらに、加齢にともなって発症するアルツハイマー病のモデルを構築する必要がある。現在、初代培養ニューロンに凝集しやすい変異を持ったヒトのタウをアデノ随伴ウイルス(AAV)強制発現させる系は立ち上がっている。このタウ強制発現系を「加齢に伴うアルツハイマーモデル」のタタキ台として、今後改良を重ねていきたい。

さらに今後は、アルツハイマー病モデル動物細胞で見出された膜分子動態異常と、その後の

シナプス脱落や神経細胞死といった神経変性の中に因果関係があるかを調べていく必要がある。この膜分子動態異常を阻害してその後の神経変性おこらなくなれば、両者の間の因果関係が考えられる。もし因果関係が認められた場合は、膜分子動態を指標としてアルツハイマー病治療のための薬剤スクリーニング系を構築する。

4. 評価

(1) 自己評価

・研究目的の達成状況

膜分子の網羅的解析技術がある程度立ち上がったこと、さらに疾患モデル細胞や遺伝子欠損細胞で膜分子動態異常を見出すことができたことから、本研究は概ね達成できたと考えている。研究遂行の過程で、新たな優先度の高い課題が浮上してきたが、それも解決できた。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

あまり多くのマンパワーが確保できない体制の中、本研究では領域内外の素晴らしい研究者たちとの出会いと連携のおかげで、研究開始時に予想していたより多くのことを達成できた。特に、さきがけ領域内の研究者の皆様は、本研究に必要な知識や材料を快くご提供いただき、大変感謝している。一番行き詰まった2017年に、研究集会で出会った高島明彦先生、岡野栄之先生に、タウノックアウト動物や各種タウの遺伝子、疾患モデルヒトiPS細胞を快くご提供をいただけたことが、本研究にとって大変重要な転機であった。また、さきがけ研究者の研究にインスパイアされて着想した機械学習についても、川上玲先生という専門家と出会う機会に恵まれ、実現することができた。研究費執行状況については、おおむね計画どおり実行された。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

これまで10年間神経細胞の1分子イメージング研究を行っており、この分野の変遷をずっと注視してきた。その中でも、膜分子動態1分子解析を、脳神経疾患の診断に使うという着想は世界的にみても大変独創的なものである。研究開始時にはまだ夢物語であったこの着想が、本さきがけ研究の3年半で大幅に実現性が増したと思う。もしこの計画が達成され、日本発の診断技術(例えばアルツハイマー病やALSなど、現在は発症前に診断が難しい疾患)の発症前診断技術が確立できれば、社会・経済への波及効果は大きいと考えられる。

・その他領域独自の評価項目

領域会議では、これまですべての研究者のアドバイスシートに必ず質問やコメントを記入するように心がけてきた。研究者の皆様実際に役立ったかどうかはともかく、このことが私自身の成長を促した。全く他分野の研究を自分ごととして真剣に考えて発表を聞くことで、新たな着想を得ることができ、自分一人では解決不可能な課題の解決にむけて重要な手がかりを得ることができた。また、さきがけ研究者間の連携ができないかを常に考え、実際5名の先生とサンプルのやりとりを含めた共同研究、3名の先生と実験技術の情報交換をしてきた。このさきがけ1細胞領域のポテンシャルをうまく活用でき、異分野融合に少しは貢献できたと思う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

最大20種類以上の膜タンパク質動態を量子ドットでラベルし観察することができる研究プロトコルを完成しました。これらを利用して脳神経疾患モデル動物やてんかん患者由来のiPS細胞を観察し、てんかんのモデルであるIP₃受容体タイプ1ノックアウトマウス由来の神経細胞では、抑制性神経伝達物質受容体GABA_A受容体の側方拡散の増大が、一方、てんかん患者由来のiPS細胞由来神経細胞では、受容体拡散運動の増加を観察しました。更に細胞内貯留庫由来と細胞外由来の細胞内Ca変動を測りわけける手法を確立し、それぞれ異なる下流シグナルを活性化し、GABA_ARの側方拡散に対して「抑制」と「促進」という正反対の役割を持つ

ことも明らかにしました。また、タウ欠損神経細胞の樹状突起・細胞体において、抑制性シナプス受容体、興奮性受容体の動態とともに異常がおこることを示し、これはタウ分子の生理的役割の解明につながる成果と期待されます。多くの共同研究によって、確立した技術の応用展開も広がっているようです。是非、これらの分子の動態を制御機構や生理機能に迫り、大きな論文発表へと繋げて欲しいと期待しています。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. Bannai H 1, Niwa F1, Sherwood MW, Shrivastava AN, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Lévi S, Triller A*, Mikoshiba K*. (1: co-first author) “Bidirectional Control of Synaptic GABAAR Clustering by Glutamate and Calcium”
<i>Cell Reports</i> , 13: 2768–2780 (2015) |
| 2. Niwa F, Sakuragi S, Kobayashi A, Takagi S, Oda Y, Bannai H* , Mikoshiba K*.
“Dissection of local Ca(2+) signals inside cytosol by ER-targeted Ca(2+) indicator.”
<i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 479:67–73 (2016) |
| 3. Sakuragi S, Niwa F, Oda Y, Mikoshiba K*, Bannai H* .
“Astroglial Ca ²⁺ signaling is generated by the coordination of IP ₃ R and store-operated Ca ²⁺ channels”
<i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 486:879–885 (2017) |
| 4. *Bannai H
“Molecular membrane dynamics: Insights into synaptic function and neuropathological disease” (Review Article) <i>Neurosci Res</i> . 129, 47–56 (2018) |
| 5. *Bannai H , Hirose M, Niwa F, Mikoshiba K. “Dissection of local Ca ²⁺ signals in cultured cells by membrane-targeted Ca ²⁺ indicators” <i>JoVE</i> , (2018/12/19 Accepted) |

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 第 14 回 日本学術振興会賞 (2018 年)
- “Physiology and pathology of brains revealed by single molecule imaging” Keynote lecture in OIST Joint Minisymposium with The 16th International Membrane Research Forum Okinawa, March 18–20, 2019 予定
- “Approach to role of physiological Tau protein by single molecule analysis of membrane molecule dynamics” *12th International Symposium on NanoMedicine*, Yamaguchi, December 8, 2018
- “Approach to the brain function by imaging single molecule behavior” Invited lecture in Neuroscience Seminar in *University of Düsseldorf*, Düsseldorf, Germany, June 27, 2017
- 2つのシグナル物質の使い分けによる正反対の神経制御 — 新たな抑制性シナプス伝達制御メカニズムの発見 — (2015年12月18日) http://www.riken.jp/pr/press/2015/20151218_2/

○ だいた。

研究報告書

「組織内の細胞多様性を明らかにする超並列ゲノム解析技術の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 細川 正人

1. 研究のねらい

遺伝子解析技術の進歩により、生体を構成する細胞の遺伝的多様性が明らかにされ、種・個体間の遺伝的差異と形質に関する理解が進んだ。さらに、細胞多様性を1細胞単位でゲノムレベルから調べることが可能になれば、複雑な生体組織中に存在する希少な細胞や難培養性の微生物の本質を捉えることができ、細胞多様性・不均質性の実態に迫ることができる。しかし、たった1つの細胞から全ゲノム配列情報を解読するのは容易ではない。ゲノム配列の決定には、同じ配列を何度も繰り返し読み取り、精度を保証する必要がある。このために、非常に僅かなシングルセルゲノムを精度よく複製して何万倍にも増やさねばならない。これには、細胞1つずつに微量な試薬を加えて反応を行う操作が必要である。また、細胞多様性の評価には少なくとも数百個の1細胞の分析が求められ、試料調製から分析に至る操作の大規模化・並列化が鍵となる。従来のライフサイエンス実験機器には、このような超並列的な微量生体分子解析を実現するものがなく、1細胞の正確なゲノム配列情報を大量に取得することは不可能であった。

本研究では、従来の限界を打破する新技術を創出することを目的とし、微量液体・生体分子を高密度・高精度に制御することができる「マイクロ流体技術」を駆使して、何万個もの細胞を1つずつ小さな液滴で制御し、数万のシングルセルゲノムを対象とした生化学反応を並列進行させるプラットフォーム開発を目指した。この超並列的なゲノム解析試料調製技術を確立したのち、並列取得される多様なゲノム配列情報から増幅時に生じたエラーを補正し、完全長に近いゲノム配列を未培養微生物から取得するためのデータ解析パイプラインの開発も進めた。これらの技術確立をもとに、腫瘍や神経などの組織中の個々の細胞だけでなく、1細胞解析の応用がまだ広がっていない環境微生物までを対象とし、ゲノムの一斉解析とその多様性の理解を実現する「超並列1細胞ゲノム解析法」の開発に取り組んだ。

2. 研究成果

(1) 概要

生体組織内の細胞階層や多様な環境微生物の有り様を知るには、細胞1つずつの個性を計測する分析技術が必要である。ゲノムは細胞の個性を説明する基礎情報であるが、細胞1つからゲノム配列を解読するのは容易ではなく、わずかなゲノム DNA を精度よく複製して何万倍にも増やしてから正確に読み取りを行う必要がある。本研究では、研究者が着想した反応機構を基礎として従来の技術課題を克服し、細胞1個から全ゲノム情報を網羅的に解読する技術を確立した(図1)。

本法では、マイクロ流体デバイスを用いて直径数十 μm の液滴を秒速千個もの速度で作成し、その内部に細胞を1つずつ閉じ込める。その後、液滴内部の細胞を薬剤で溶かし、

内部に DNA を保持したまま酵素反応により複製する。液滴融合により、試薬導入を繰り返して実行できるようにし、連続多段階の反応を実現した。液滴内の複製 DNA を次世代シーケンサーで解析することで、動物細胞や微生物 1 個のゲノムを高精度に解読できる。

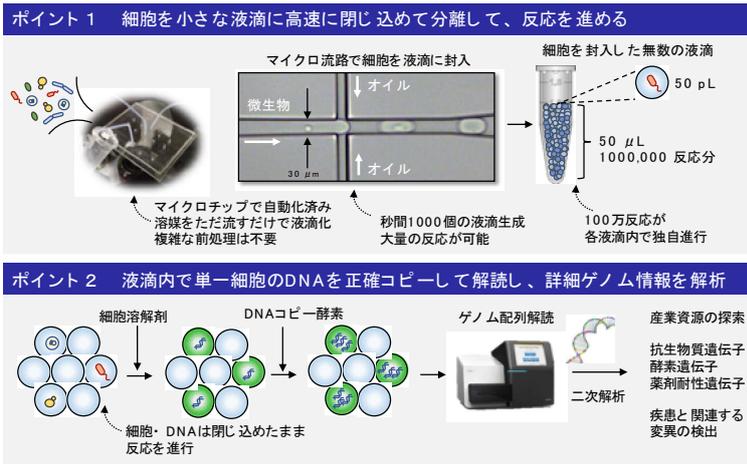


図 1. 本研究で開発したシングルセルゲノム解析プラットフォーム

従来の DNA 複製反応

では、反応容積が細胞 1 個に対して過度に大きく、空気中の埃や実験者の DNA の混入によってデータの過半数以上が汚染されることが頻繁にあった。本技術では、細胞 1 個サイズの小さく閉じられた液滴内で全反応を行うため、複製 DNA の 99%以上が標的生物由来となる世界最高精度を持つ。また、均質サイズの液滴を用いて試験管 1 本の中で数十万個の細胞から一斉に DNA 複製ができる。DNA 配列解読については、独自の計算プログラムにより、多種の細胞の準完全長ゲノム配列を一斉に獲得する機能を開発した (Sci. Rep. 2017、2018 にて報告)。本技術を用いれば、わずか数日のうちに土壌微生物や腸内微生物のゲノム情報を百種類以上も新規決定でき、高等動物の 1 細胞解析にも応用可能である。

本技術は、世界で初めて、微生物のゲノム多様性を一挙に明らかにできる実用性の高い計測手法である。本成果を元に、微生物を対象とした世界初のシングルセルゲノム解析サービスを提供する研究成果活用ベンチャー bitBiome 株式会社を 2018 年 11 月に設立した。

(2) 詳細

研究テーマ A「シングルセルゲノム並列増幅のための微小液滴制御システムの開発」

本研究では、ピコリットル容量の液滴を 1 細胞反応場として利用し、液滴制御を担う各種機構をモジュール式に組み合わせ、細胞封入、溶解、ゲノム増幅、を経てシーケン斯拉イブラリを構築するシステムを組み上げた。開発した全ゲノム増幅法 single droplet multiple displacement amplification (sd-MDA) 法では、細胞と細胞溶解液をマイクロ流体デバイスで合流させ、単一細胞を封入した微小液滴を作成する。続いて、回収した微小液滴内の細胞を溶解した後に、もう一つのマイクロ流体デバイスに通し、各液滴に MDA 反応液滴を融合させる処理を行う。この液滴をインキュベートすることで、各液滴内でゲノム増幅反応が行われ、数万のシングルセル増幅ゲノムが超並列的に取得される。大腸菌および枯草菌を用いた実証実験では、クロスコンタミネーションがなく、各液滴が個別のゲノム増幅反応場として機能している事を示した。(図 2A)

本手法の利点として、高いスループット性はもちろんのことながら、目的外 DNA 増幅の抑制効果大きいことが挙げられる。全ゲノム増幅反応では反応環境に実験環境中のエアロゾルや実験者由来の DNA がコンタミネーションすれば、それらの DNA も同様に増幅されるため、取得配列情報が意図しない物に置き換わってしまう恐れがある。本法では、ピコリット

ル容量の液滴を反応場とすることで、反応空間への非標的分子の混入リスクが抑えられ、従来のマイクロチューブ反応と比べてコンタミネーションの極めて少ないゲノム増幅産物が取得されている。(図1B)また、1細胞当たりの反応空間を小さくしたことによって、MDA反応に必要な試薬コストも100分の1未満にまで減少している。本手法により、従来のシングルセル解析の課題であった試料調製スループットとコンタミネーションの課題解決に至った。本成果は Sci. Rep.にて2017年に報告した。

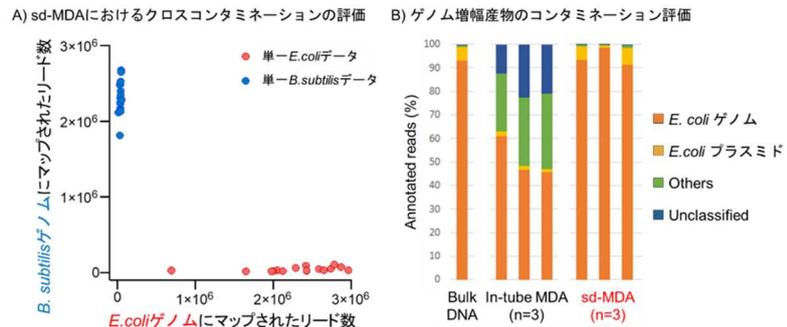


図 2. sd-MDA 法を用いた大腸菌・枯草菌シングルセルゲノムのシーケンス

あった試料調製スループットとコンタミネーションの課題解決に至った。本成果は Sci. Rep.にて2017年に報告した。

研究テーマB「シングルセルゲノム配列データの高精度化パイプラインの開発」

シングルセル増幅ゲノムの過程ではキメラ配列などの本来存在し得ない人工的な配列断片が生じ、その配列はシーケンスデータ中にも含まれる。環境微生物のようなゲノム未知サンプルの場合、エラー配列を正しく判定し除去することは非常に困難であった。そこで、リファレンスの無い未培養微生物からもエラーを除いた高精度なシングルセルゲノムデータを獲得できる技術開発を目指し、シーケンスデータのエラー除去・統合を自動化したシングルセルゲノムアセンブリパイプライン ccSAG (cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes) を開発した。本ツールでは、同一種由来の複数のシングルセルに由来するデジタル配列データを *in silico* で相互に比較することで、ゲノム増幅時にランダムに生じた増幅エラー配列および非ゲノム配列をデータ間の非共通性から検知し、その配列を除去する。続いて、クリーニングした複数のデジタル配列データを統合してアセンブリする。枯草菌のシングルセルデータを用いたツールの性能評価では、データ中に含まれる増幅エラー配列を17.2%から0.2%にまで減少させることができた(図3A)。シングルセルデータをクリーニングしてからアセンブリすることによって、アセンブリ時のエラーが生じにくく、エラーがなくゲノムカバー率の高い高精度なドラフトゲノム配列を獲得できる。特に、8個程度のシングルセルデータを統合すれば、多細胞集団を用いた場合と同等以上の高質なドラフトゲノムの取得が達成される(図3B)。

本法は、先述したsd-MDA法と組み合わせることで、コンタミネーションの無いデータの相互参照を実行できるため、アセンブリ精度の向上効果がより一層大きく得られる(図

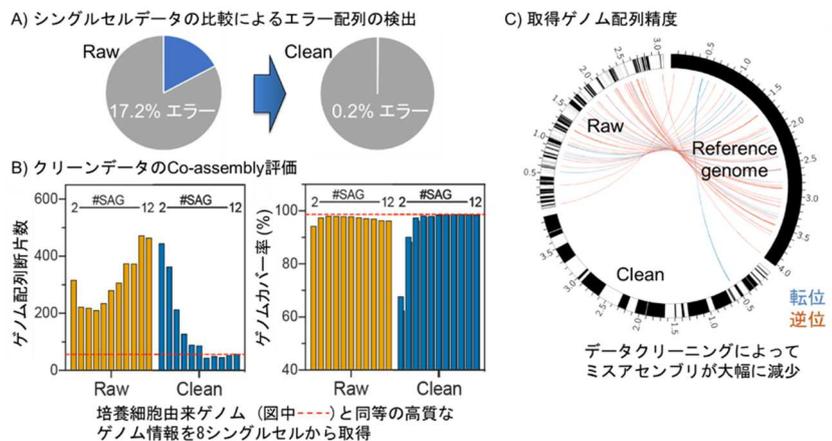


図 3. ccSAG を用いた高精度枯草菌シングルセルゲノムシーケンスデータの高精度化

3C)。マウスの腸内細菌を用いた実証実験において、sd-MDA 法を用いて取得した約 70 個のシングルセルデータをもとに ccSAG 処理を行った結果、2 種類のメジャー種から新規 *Prevotella* 様細菌のハイクオリティドラフトゲノム(97%以上のカバレッジ)が得られた。このゲノム配列を詳細解析することで、これらの未培養細菌の特定遺伝子上の SNP を 1 細胞レベルで検出できることを実証している。以上より、従来のシングルセル解析の課題であったキメラ配列、アセンブリ後のゲノム配列精度の問題の課題解決に至った。本成果は Sci. Rep.にて 2018 年に報告した。

研究テーマ C「未培養微生物大規模シングルセルゲノムシーケンスの実証」

sd-MDA と ccSAG を組み合わせたシングルセルゲノム解析は様々なサンプルへの応用が可能であり、未培養微生物のゲノム情報の蓄積に大きく貢献できると期待される。さきがけ研究実施期間中の研究領域の動向として、マイクロバイーム領域からシングルセルゲノム解析技術要求が強まり、多くの共同研究提案を受けたため、未培養微生物を対象としたゲノム解析の応用に注力し研究開発を進めた。

これまでの応用例として、ヒト・マウス由来腸内細菌、サンゴ・カイメン・昆虫共生細菌、土壌(土漠・海泥・根圏)細菌、海洋性細菌、空中浮遊細菌などがあり、現在データの解析中である。ここでは、特に大規模なシングルセルゲノム解析を実施した2例の成果を紹介する。

(1)食餌に伴う腸内細菌叢の変動メカニズムをシングルセルゲノムから説明する

腸内細菌の発酵基質として知られるイヌリンをマウスの食餌に添加し2週間の給餌試験を行った。従来の菌叢解析法である 16S rRNA 遺伝子を対象とした腸内細菌叢組成の解析から、イヌリン給餌群において *Bacteroides* 属細菌が有意に増加することが確認された。また、腸管の短鎖脂肪酸の解析から、イヌリン給餌群において、コハク酸と酪酸の有意な産生増加が認められた。従来の腸内細菌叢解析では、ここまでのデータしか得られずイヌリン給餌への応答が示唆される *Bacteroides* 属細菌の特徴・応答メカニズムは不明である。そこで、給餌試験前後の糞便サンプルからシングルセルゲノムを 400 個超解析し、優占細菌種のゲノム取得を行った。比較ゲノム解析の結果、イヌリン給餌により有意に増加した2種の *Bacteroides* ゲノム上にも、イヌリン分解能を有する遺伝子クラスター(Polysaccharide Utilization Loci)が確認された。これらの *Bacteroides* ゲノムにはコハク酸産性に関わる代謝関連遺伝子パスウェイの存在も確認でき、イヌリン摂食マウスで短鎖脂肪酸産生量が増加する結果とも合致した。このように、シングルセルゲノム解析によって、従来のメタ 16S 解析解析での推定の範囲を超え、菌叢変動のメカニズム解明に繋がる知見を得られることを実証した。本成果については、現在、論文投稿の準備を進めている。

(2)海外での多様な環境からのオンサイト細菌サンプリングとシングルセルゲノム解析

サウジアラビア KAUST アブドラ王立科学技術大学 の五條堀孝 教授のラボにシングルセルゲノム解析プラットフォームを移送し、現地でオンサイト細菌サンプリングとシングルセルゲノム解析を行った。土漠、紅海の水・海泥、マングローブ群生域の土壌などでサンプリングを行い、各サンプルから単離した微生物画分を上記プラットフォームで約 2,000 のシングルセルゲノムサンプルを調製し、内半数から細菌・アーキア由来のゲノムシーケンスデータを獲得した。その多様性は 34 門に渡り、現在個々の環境と細菌種の代謝能との関連などをゲノムから解析している。過去のシングルセル細菌解析例と比べても、最も大規模に環境

細菌のデータを取得した研究例となる見込みで、現在論文投稿の準備を進めている。

3. 今後の展開

従来の(特に微生物を対象とした)シングルセルゲノム解析技術は、ゲノム解読につながるまでの工程に課題が多く残され、精度・速度面でユーザーのニーズを満足させる物がなかった。幅広い微生物種に適応可能で、一般実験室でも実行できるような簡易で効果的な方法の開発が求められてきた。本研究で開発したシングルセル解析プラットフォームは研究者が独自に着想・開発し、短期間で実用化レベルまで完成させたもので、これらのニーズに応えることができる。マイクロ流体技術を扱う微細加工技術、分子生物学的実験手法、バイオインフォマティクスを組み合わせ、世界初の多段階反応と高度情報処理が実現されている。従来技術と比較して、ゲノム解析の規模と精度が格段に向上し、さらに操作が極めて簡易になり、一連の計測の再現性・速度が大幅に改善された。これを利用することで、腫瘍・神経・皮膚疾患などの生体組織から、土壌・海洋・腸内由来の環境微生物まで多岐にわたる多様な生物のゲノムを一斉に解析できる基盤が確立された。

現在は、外部の研究機関から試料分析の依頼を数多く受け付けて応用段階に移行しており、社会実装の母体として、研究者が中心となり研究成果活用ベンチャーbitBiome 株式会社を設立した。本技術を介して、様々な疾患メカニズムの解明に迫り、次世代の診断治療・創薬分野の開拓ができると考えている。たとえば、極小のがん組織サンプルから遺伝子変異情報を調べれば(研究成果 Sci. rep.にて 2017 年に報告)、適切な分子標的薬の投与指針を得ることができる。また、海洋や土壌などの環境やヒトマイクロバイオームの微生物ゲノム情報を本技術で圧倒的な速度で収集できるため、これを情報資源とすれば新規の産業用酵素や抗生物質の発見、マイクロバイオームの機能理解につながり、国内産業の発展への貢献が期待できる。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、当初は哺乳類細胞を標的としたシングルセルゲノム解析を想定したが、マイクロバイオーム領域から技術要求が強まり、多くの共同研究提案を受けたため、未培養微生物を対象とした応用に注力した。研究費は装置・試薬の購入などに効果的に活用し、マイクロ流体デバイスを基礎としたプラットフォーム開発と、特にコストが嵩むシーケンス解析を滞りなく実施することができ、スピード感を持って技術開発を進めることができた。さきがけ内での共同研究 FS も複数件実施し、共同研究で得られた情報が本研究にも生かされた。この結果、従来困難とされてきた微生物シングルセルゲノム解析に必要な技術要素の段階的な開発が進み、当初の想定を超える成果が得られ、その要素技術を論文報告に結びつけることができた。研究成果を総説・解説・招待講演等で紹介する機会も増え、illumina 社や QIAGEN 社の広報誌などに取り上げられ、海外からも共同研究依頼が複数件届くなど、微生物シングルセルゲノム解析のパイオニアとして着実に認知を深められたと考えている。今後は国内外の研究者との共同応用研究を発信できる見込みである。なりよりも、成果蓄積の結果、研究者が中心となって研究成果活用ベンチャーを設立するに至ったことが大きな成果であり、社会実装への次のステップの土台

を築くことができた。ビジネス上の資金調達・チームビルディングも順調に経過しており、さががけ発ベンチャーとしての発展を目標に、今後数年間で飛躍的な事業成長を目指し研究成果を広範な分野に活用して社会還元を進める。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

マイクロ流路を用いて直径数十 μm の液滴内に細胞を一個ずつ封じ込めた液滴を秒速千個もの速度で作出し、その液滴を上手く利用して、1細胞のDNAを読み取り可能な量まで個別・並列に増幅し、細胞1つ1つの遺伝情報を決定する手法を、かなり完成度の高いレベルで確立しました。本手法によって、これまで未知であった微生物のゲノムを1細胞単位で一挙に解読できることを実証しました。これは、機能や存在がほとんどわかっていない土壌細菌・腸内細菌の解析において非常に有効な技術となると期待されます。将来は、ヒトの健康を増進する共生微生物を特定することや、抗生物質や産業用酵素を作り出す新規微生物を探索し、利活用につなげるなどの発見がなされることも期待されます。

コア技術は論文化や特許出願がなされており、これらの技術を軸に、微生物を対象とした世界初のシングルセルゲノム解析サービスを提供する研究成果活用ベンチャーbitBiome 株式会社を設立しています。すでに、海外研究機関を含めた共同研究も進めています。さががけ研究で得た技術の社会実装化・普及を積極的に進めている点も高く評価されます。

これらの傑出した成果に対し、本領域からは「イノベーション賞」を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- 1.Kogawa M, Hosokawa M, Nishikawa Y, Mori K, Takeyama H. Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes. Scientific reports 8(1) 2059 2018 年
- 2.Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. Scientific reports 7(1) 5199 2017 年
3. Yoda T, Hosokawa M, Takahashi K, Sakanashi C, Takeyama H, Kambara H. Site-specific gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system. Scientific reports 7(1) 4325 2017 年

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(非公開)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招待講演

- (1) Masahito Hosokawa “Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by single-cell genome sequencing” FRONTIERS OF GENOME SCIENCE, The University of Tokyo, 2019/1/10
- (2) 細川正人 “微小試料からの機能ゲノム解析—組織から 1 細胞, 微生物まで—” 第 69 回生物工学会 シンポジウム「若手研究者が切り拓く, 1 細胞解析技術の最先端」、早稲田大学、2017/9/14

受賞

- (1) 細川正人 日本化学会第 96 春季年会 優秀講演賞(学術) “Droplet microfluidics for massively parallel and accurate single-cell genome amplification” 2016/5/13

解説・総説

- (1) 細川正人、丸山徹、西川洋平、竹山春子、実験医学別冊 シングルセル解析プロトコール “微生物のシングルセルゲノム解析”の項、羊土社、2017 年

新聞報道

- (1) 2016年11月25日掲載、日経産業新聞[先端技術面]、「DNA を高速コピー 早大など水滴に細胞閉じ込め 3時間で数万個に」

研究報告書

「がん幹細胞の生物学的機能を解明する1細胞解析技術の創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 10 月～平成 31 年 3 月

研究者: 松崎 典弥

1. 研究のねらい

がんは過去 30 年間日本人の死因の第一位であり、未だに完治が困難な疾患の代表である。がん治療が困難な理由の一つとして、「ヘテロな集合体」であることがあげられる。固形腫瘍の場合、分化度(成熟度)の異なるがん細胞の集合体が線維芽細胞やコラーゲンで構成される間質に埋もれて存在し、毛細血管や毛細リンパ管網が間質に存在している。また、がん幹細胞と呼ばれる腫瘍形成を司る最も重要な細胞が内部に存在し、通常は増殖しない(静止期)が、抗がん剤処理後に生き延びて増殖と分化を開始し、腫瘍を再形成することが知られている。さらに、患者によって腫瘍内部のがん細胞の分化度や間質量、血管形成、がん幹細胞の有無などが異なるため、一つの抗がん剤がすべてのがんの効果を示すことは無く、化学療法と分子標的薬、放射線療法など様々な治療法を組み合わせることが一般的に必要である。そこで近年、「個別化医療(Personalized medicine)」が注目されている。患者一人一人の腫瘍の構成と程度に最適な治療法を提供するという内容であるが、そのためには患者の腫瘍を検査し、遺伝情報や細胞構成などを一人一人明らかにする必要がある。現在、患者のがんを超免疫不全マウスに移植した PDX が用いられているが、高額であるだけでなく、低い腫瘍定着率、低い生存率、マウス細胞の混入など課題も多い。そこで、患者由来がん細胞を効率よく培養でき、腫瘍を形成可能な *in vitro* モデルを構築できれば、PDX マウスに代わり個別化医療を実現する有力なシステムになると期待される。

そこで、本研究提案では、生体外で腫瘍の三次元微小環境を再現した革新的な *in vitro* 腫瘍モデルの構築を目標とした。既存のがんスフェロイドとは異なり毛細血管だけでなく間質組織も導入することで、より実際の固形腫瘍に近い構造と機能を再現できると期待される。また、腫瘍内部のがん細胞の性質をがん幹細胞マーカーにより解析することで、分化度を明らかにする。さらに、*in vivo* で形成した腫瘍と RNA シーケンスで比較することで、*in vitro* 腫瘍モデルとしての可能性を見出す。また、腫瘍モデル内部のがん細胞の配置を精密に制御可能な新規技術を考案し、がん細胞と血管の距離が遊走にどのように影響するか明らかにする。

本研究提案の腫瘍モデルの実現により PDX マウスの代替が可能となれば、個別化医療への多大なる貢献が期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、まず、*in vivo* 腫瘍の微小環境を再現した腫瘍モデルの構築に取り組んだ。*In vivo* 腫瘍は、高濃度の間質(コラーゲン)を有しており、既存の方法では同量のコラーゲンを含む腫瘍モデルを構築することは困難であった。そこで、コラーゲン濃度を自在に制御して均一な 3 次元組織体を形成可能な「沈殿培養法」を新たに考案した。本手法により、*in vivo* 腫瘍

と同様の高濃度コラーゲンと線維芽細胞、がん細胞、毛細血管網を有する *in vitro* 腫瘍モデルの構築に初めて成功した。

作製した腫瘍モデルのがん細胞の機能を評価するため、がん幹細胞の表面マーカーの発現量を解析した。その結果、腫瘍モデルではマーカー陽性細胞が2次元の平面培養と比較して2倍以上増加することを見出した。また、*in vivo* 腫瘍と比較した結果、腫瘍モデルと同様の傾向を示した。これは、*in vitro* 腫瘍モデルが *in vivo* 腫瘍に類似のがん微小環境を有しているため、*in vivo* と同様のがん細胞機能を示したと考えられる。現在、RNA シーケンス解析により、遺伝子発現レベルで機能を比較している。

また、腫瘍モデルの抗がん剤抵抗性を検討した結果、平面培養より高い抵抗性を示した。本結果も、腫瘍モデルが *in vivo* 腫瘍類似のがん微小環境を有することを示唆したと考えている。

腫瘍モデル内の細胞間相互作用を詳細に理解するためには、細胞間距離を1細胞レベルで配置制御可能な新規技術の開発が重要となる。そこで、細胞間をつなぎとめる「細胞アンカ一分子」を新規合成することで、バイオプリンターを用いて百個レベルの細胞クラスターを数百・m 間隔でプリント制御可能であった。これにより、がん細胞と血管内皮細胞が遊走する距離を初めて見出した。

(2) 詳細

研究テーマ①「3次元がん微小環境を再現した腫瘍モデルの構築」

In vivo 腫瘍の間質(コラーゲン)量の定量は、これまで報告例が無かった。そこで、ヒト大腸がん細胞株 HT29 をマウス皮下に移植し、1ヶ月かけて成熟させた腫瘍を回収し、ヒドロキシプロリンの定量法によりコラーゲン量を定量した。その結果、17-23 wt%と非常に高濃度であることが分かった。コラーゲンの水溶液への溶解性は乏しく、酸性溶液にも 1-2 wt%しか溶解しない。従って、既存の方法では同量のコラーゲンを含む三次元組織体を構築することは困難と考えられた。

そこで、細胞とコラーゲンを一緒に沈殿して培養する「沈殿培養法」を考案した。具体的には、コラーゲンを溶解させるのではなく、細胞と同レベルのマイクロメートルレベルに解繊して細胞と一緒に分散・沈殿して培養することで、高濃度化と均一な間質構造を同時に実現可能であった(Fig. 1)。本手法により、20-30 wt%のコラーゲンと線維芽細胞で構成される間質を有し、がん細胞と毛細血管網を有する *in vitro* 腫瘍モデルの構築に初めて成功した。

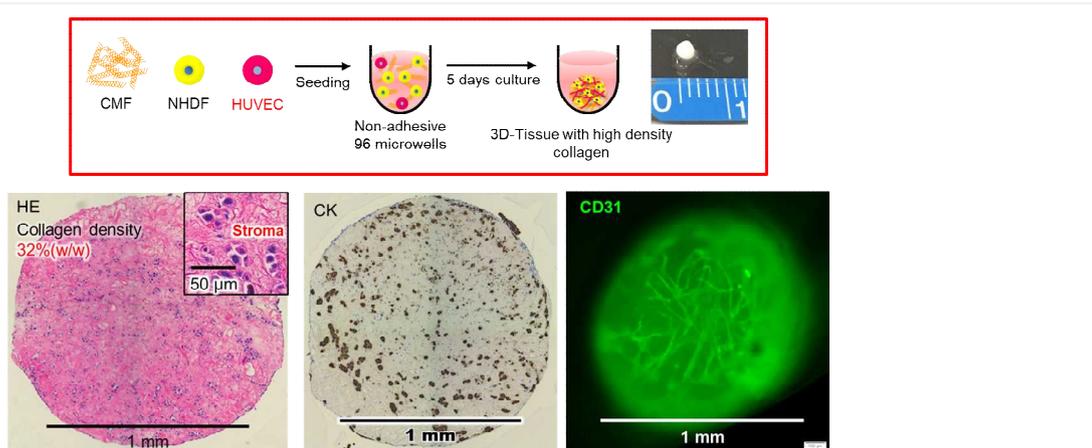


Fig. 1. 沈殿培養法のイメージ図(上)と作製した *in vitro* 腫瘍モデルのヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色像(左)、サイトケラチン免疫染色像(中央)、CD31 免疫染色像(右)。

研究テーマ②「腫瘍モデルがん細胞の機能評価」

作製した高濃度コラーゲンを有する *in vitro* 腫瘍モデル内部のがん細胞がどのような性質を有しているか明らかにするため、がん幹細胞の表面マーカーとして知られる CD44 および CD44v9 の発現量をフローサイトメトリーで解析した。その結果、腫瘍モデルでは両マーカー陽性細胞の割合が 2 次元の平面培養と比較して 2 倍以上に増加していた。この結果が *in vivo* 腫瘍と同じであるか確認するため、同じ HT29 がん細胞をヌードマウス皮下に移植し、同じ期間後に回収して同様の解析を行った。その結果、腫瘍モデルと同様に両マーカー陽性細胞が増加していた (Fig. 2)。これは、間質を定量的に *in vivo* 腫瘍に近づけることで、腫瘍モデルが生体に近いがん微小環境を再現できたためと推察される。現在、RNA シーケンス解析による遺伝子発現でこれら 3 者を比較している。

In vivo 腫瘍には、抗がん剤に対する耐性を有するがん細胞が存在することが知られている。そこで、腫瘍モデルの抗がん剤耐性を平面培養と比較して検討した。抗がん剤としてドキソルビシンやスタウロスポリンを用い、1 週間暴露後の細胞生存率を評価した。腫瘍モデルも平面培養も濃度依存的に生存率は減少をしたが、腫瘍モデルが全般的に高い生存率を示した。また、最も高濃度で抵抗性を示した細胞の中で CD44 陽性細胞の割合を解析した結果、腫瘍モデルは平面培養より 6-7 倍高い割合を示した。本結果も、腫瘍モデルが *in vivo* 腫瘍類似のがん微小環境を有することに起因すると考えられる。

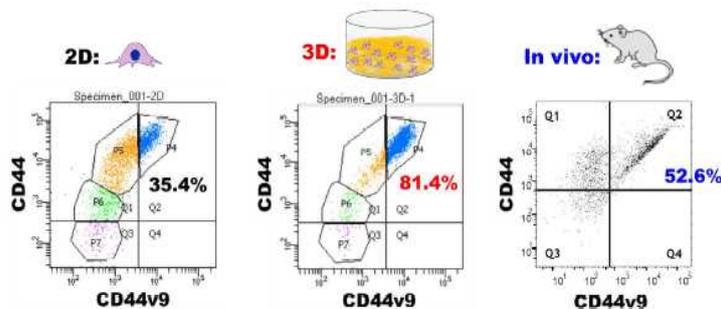


Fig. 2. フローサイトメトリーによる表面マーカーの発現解析。

研究テーマ③「1 細胞レベルでの細胞配置制御技術の開発」

腫瘍モデル内のがん細胞と血管、がん細胞と線維芽細胞など、細胞-細胞間の相互作用を理解するためには、3次元組織内部の細胞-細胞間距離を1細胞レベルで配置制御可能な新規技術の開発が重要となる。距離を制御するためにはバイオプリント技術必要となるが、3次元を実現するためには、細胞表面で細胞をパターンニングする必要がある。これまで、細胞表面での細胞パターンニングに関する報告はほとんどない。そこで、細胞間をつなぎとめるアンカー分子の新規合成を試みた。細胞膜侵入効果が知られている脂肪酸の中で最も侵入効果が高い分子をスクリーニングした結果、エイコサペンタエン酸(EPA)が最も優れた侵入効果を示すことを見出した。そこで、EPAを末端に修飾した多分岐ポリエチレングリコール(PEG)をアンカー分子として合成した。分岐数や分子量を最適化した結果、4分岐PEG-EPAが最も高いアンカー効果を示した。本分子を表面に吸着させた細胞をディスペンサーでプリントすることで、残念ながら1細胞レベルには至っていないが、百個レベルの細胞クラスターを数百・m間隔で細胞表面にプリント制御可能であった(Fig. 3)。また、本技術を応用してがん細胞と血管内皮細胞クラスター間の距離を変えて培養した結果、ある特定の距離以下で高い遊走効果を示すことを見出した。

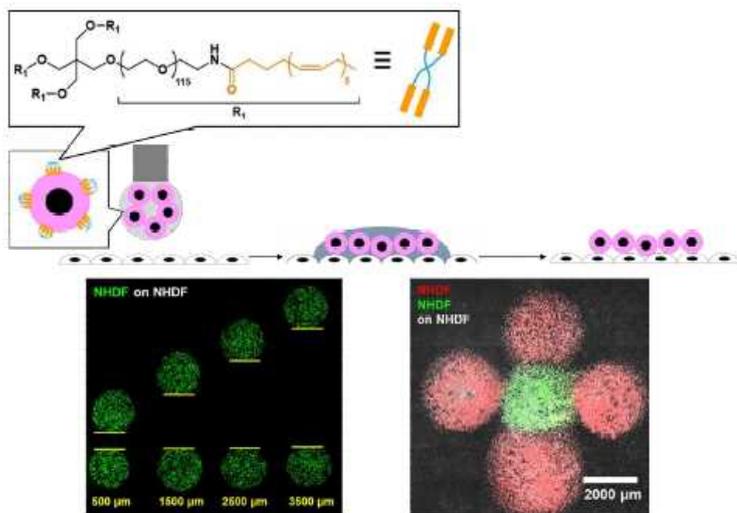


Fig. 3. 細胞間アンカー分子の構造(上)と、バイオプリントを用いて細胞クラスター間の距離制御した蛍光顕微鏡写真(下)。

以上より、本研究では、独創的な沈殿培養法を考案することで、*in vivo* 腫瘍に類似した間質構造とがん細胞機能を有する *in vitro* 腫瘍モデルを構築した。また、細胞間アンカー分子を合成することで、細胞表面で細胞の配置を制御することが可能であった。本研究で見出された腫瘍モデルは、PDX マウスの代替として応用が期待される。

3. 今後の展開

本さがけ研究で考案した沈殿培養法で構築した *in vitro* 腫瘍モデルは、間質構造や毛細血管など *in vivo* 腫瘍と類似の構造と機能を有することが確認された。また、がん細胞の性質

も、2次元の平面培養より *in vivo* 腫瘍に近いことが確認された。現在、RNAシーケンス解析により遺伝子発現レベルで *in vivo* 腫瘍との相関性を明らかにする。これにより、本腫瘍モデルの有用性が明らかとなり、社会実装につながる可能性を示すことができると考えられる。その後は、製薬企業と共同で検討を進める必要がある。

また、本沈殿培養法は、腫瘍モデル以外の組織・臓器モデルの構築に有用である。本さがけ事業の国際強化支援を受けて行った、National University of Singapore (現:POSTECH) の Prof. Young-Tae Chang との共同研究では、平滑筋細胞の3次元モデルへ応用し、研究成果を得ることができた (Y.-T. Chang and M. Matsusaki et al., *Chem*, **4** (5), 1128-1138 (2018))。さらに、成熟脂肪細胞の3次元組織の構築と長期間培養が可能であり、*in vitro* 脂肪モデルにも展開している (M. Matsusaki et al., *Acta Biomaterialia*, *in press*)。従って、今後は、本手法を他の組織・臓器構造の作製に応用展開する予定である。さらに、本さがけ研究で見出したバイオプリンターを用いた細胞クラスター配置制御技術と複合化することで、より複雑な組織体の構築に取り組みたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

本さがけ研究は予定通り研究を達成できただけでなく、様々な予想を超えた研究成果を得ることができた。さらに、様々な大学・企業と共同研究を開始することができた。

研究開始当初はがん株化細胞を用いた検討までを見込んでいたが、共同研究により臨床がん細胞を用いた評価まで展開できたことは予想を超えた内容であり、それに伴う研究成果が得られたことは非常に大きな研究成果であった。これにより、社会実装の実現がより具体性を増したことは間違いない事実である。

また、シンガポールでの NUS-JST シンポジウムに参加することで国際共同研究がスタートしたことも予想を超えた展開であり、共著論文を発表することができたのは大きな成果であった。さらに、本事業で考案した沈殿培養法が腫瘍モデル以外の様々な組織体の構築に有用であり、それに伴う研究成果・共同研究が得られたことも予想外の成果であった。

以上より、本さがけ研究で得られた研究成果は、社会実装が期待される内容であるため、社会・経済への多大なる波及効果が期待される。また、研究実施体制および研究費執行は当初の計画通り進めることができたと考えている。

(2) 研究総括評価 (本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での

評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

従来のコラーゲンを用いるのではなく、均一に分散できるようにマイクロ化したコラーゲンを用いることで、ヌードマウスに移植したがん組織と同等の高い濃度の細胞外マトリックス (ECM) を有するがん組織モデルの作成を可能にし、この方法で、実際のがん組織と同等の ECM 密度やがん細胞、血管網を持つ生体外がん組織の3Dモデルの生体外再構築に成功しました。生体外3Dがん組織モデルは、普通の培養皿で培養した時と比べ、腫瘍幹細胞もマーカーCD44、CD44wの発現や、抗がん剤への抵抗性が高くなるなど、ヌードマウスに移植したがん組織によく似た性質を持っていることを実証するなど、着実な研究成果をあげており、そ

の論文も着々と進んでいます。将来的には、このような手法を利用したヒトがん組織モデルが抗がん剤等の開発に使われることによって、動物実験を無くすだけでなく、実際のがん組織に近いモデルでの薬剤評価をすることによって、より有効な薬剤の開発につながる事が期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Fiona Louis, Shiro Kitano, Joao F. Mano, Michiya Matsusaki* , 3D Collagen Microfiber-Tissues Stimulate The Functionality of Both Pre and Mature Adipocytes in Long-Term Culture, <i>Acta Biomaterialia</i> , accepted (Nov. 28, 2018).
2. Akihiro Nishiguchi, Michiya Matsusaki , Mitsunobu R. Kano, Hiroshi Nishihara, Daisuke Okano, Yoshiya Asano, Hiroshi Shimoda, Satoko Kishimoto, Soichi Iwai, Mitsuru Akashi, <i>In vitro</i> 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis, <i>Biomaterials</i> 179 , 144-155 (2018).
3. Dongdong Su, Chai Lean Teoh, Sung-Jin Park, Jong-Jin Kim, Animesh Samanta, Renzhe Bi, U. S. Dinish Malini Olivo, Marie Piantino, Fiona Louis, Michiya Matsusaki , Seong Soon Kim, Young-Tae Chang, Seeing Elastin: A Near-Infrared Zwitterionic Fluorescent Probe for <i>In vivo</i> Elastin Imaging, <i>Chem</i> , 4 (5), 1128-1138 (2018). Impact Factor 2017: 14.104
4. Sarah Bertlein, Daichi Hikimoto, Gernot Hochleitner, Julia Hueimmer, Tomasz Juengst, Michiya Matsusaki , Mitsuru Akashi, Juergen Groll, Development of Endothelial Cell Networks in 3D-Tissues by Combination of Melt Electrospinning Writing with Cell-accumulation Technology, <i>Small</i> , 14 (2), (2018). Elected as a back cover image
5. Michiya Matsusaki , Misaki Komeda, Simona Mura, Hiroyoshi Tanaka, Mitsunobu R. Kano, Patrick Couvreur, and Mitsuru Akashi, Desmoplastic Reaction in 3D-Pancreatic Cancer Tissues Suppresses Molecular Permeability, <i>Adv. Healthcare Mater.</i> 6 (15), 1700057 (2017). Highlighted in Advanced Science News.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 16 件(非公開 9 件)

国内特許 1.

発明者: 塚本 圭・入江新司・松崎典弥

発明の名称: スフェロイド形成促進方法

出願人: 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社

出願日: 2016年2月22日

出願番号: 特願2016-031159

外国出願1

発明者: 塚本 圭・入江新司・松崎典弥

発明の名称: スフェロイド形成促進方法

出願人: 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社

出願日: 2016年2月22日

出願番号: 特願2016-031159

国内出願2

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 立体的細胞組織の製造方法
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： 2016年2月22日
出願番号： 特願2016-030916

外国出願2

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 立体的細胞組織の製造方法
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： 2017年2月22日
出願番号： PCT/JP2017/006691

国内出願3

発明者： 松崎典弥
発明の名称： 脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： 2016年2月16日
出願番号： 特願2016-030916

外国出願3

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 脈管系構造を有する三次元組織の製造方法、および脈管系構造のゲルを含む三次元組織
出願人： 国立大学法人大阪大学
出願日： PCT/JP2017/003368
出願番号： 特願2016-030916

国内出願4

発明者： 松崎典弥・入江新司・北野史朗
発明の名称： 三次元組織体及びその製造方法、並びに、三次元組織体の形成剤
出願人： 国立大学法人大阪大学・凸版印刷株式会社
出願日： 2017年1月31日
出願番号： 特願 2017-15958

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 平成30年5月 高分子学会広報委員会パブリシティ賞 受賞



2. 平成 28 年 5 月 The Award for Young Investigator of Japanese Society for Biomaterials
3. 平成 27 年 12 月 「3D プリンター 人工臓器の製造・開発の支援に有効」, Medical Tribune24-25 面
4. 平成 27 年 11 月 Best Paper Award in 2015 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2015)
5. 平成 27 年 11 月 平成 27 年度日本バイオマテリアル学会科学奨励賞 受賞

研究報告書

「トランスクリプトームとメチロームの統合1細胞解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 三浦 史仁

1. 研究のねらい

シングルセルを対象とした全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)によるメチローム解析は2014年に実現されたものの、そのゲノム網羅性とリードのマッピング効率は1～2割程度と貧弱であった。現時点では、シングルセルメチローム解析をはじめとする微量サンプルに対するWGBSの適用にはPost-bisulfite adaptor tagging(PBAT)戦略が必要不可欠である。PBATはバイサルファイト(BS)処理によるDNAの切断に起因するライブラリー構造の喪失を回避することでより多くのBS処理DNA(BS-DNA)をライブラリーへと変換することを目的に開発され、上記シングルセルメチローム解析でも利用されている。しかし、従来のPBAT法のプロトコールは、1本鎖DNAであるBS-DNAへのアダプター配列の連結を2回のランダムプライミング反応で行っていた。このことが原理的に①インサート長の短縮、②GCコンテンツ依存的なゲノム領域毎のサンプリングバイアス、③反応副産物の生成、の原因となり、特に微量サンプルを対象とした解析ではゲノム網羅性とリードのマッピング効率を低下させる原因となっていた。そこで本研究ではランダムプライミングに起因するこれらの問題を根本的に解決するため、実用的に高効率な1本鎖DNAへのアダプター連結技術を開発することを主な目的とした。つまり、高効率な1本鎖DNAライゲーション技術を基にしたWGBSのライブラリー調製プロトコールを確立したうえで、単一の細胞からRNAとDNAの双方を分離回収しトランスクリプトームとメチロームの同時取得を目指すことにした。

2. 研究成果

(1)概要

T4 DNA リガーゼを利用することが可能な2本鎖DNA同士の連結反応とは異なり、1本鎖DNA同士の連結は単独で実用的に十分な効率を示す酵素が見いだされていない。そこで本研究では2つの新しい1本鎖DNAライゲーションのための反応原理を考案し、それぞれの実現を試みた。

1つ目の反応は3'アジド化リボヌクレオチドアナログのターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)による取り込みと、このアジド化標識DNAに対する5'エチニルアダプターのカップリング反応を組み合わせたもので、TCSライゲーションと命名した。モデルDNAを用いた検討ではTCSライゲーションは30%程度の連結効率を示したものの、生体由来の長鎖DNAへの適用では触媒となる銅イオンによるDNA切断が起こり、最終的なライブラリー収量の低下が起こることが判明し、実用性に乏しいことが判明した。

2つ目の反応はTdTによるリボヌクレオチドの標的DNAへの取り込みによる3'末端のRNA化とRNAリガーゼによる5'リン酸化アダプターの連結反応を用いたものでTACSライゲーション

んと命名した。最適化の結果、モデルDNAを用いた場合のTACSライゲーションの収率は90%程度と非常に高かった。そこで、BS-DNAへのアダプター連結にTACSライゲーションの適用を試みた。しかし、BS-DNAの3'末端はTACSライゲーションどころかTdTによる反応そのものを受け付けないことが判明し、BS-DNAの3'末端の改質技術を開発する必要があることが明らかとなった。この技術の開発には時間がかかることが予想されたので、TACSライゲーションとランダムプライミングを組み合わせた改良型PBATの開発を並行して行った。

従来のPBAT法のプロトコール(rPBAT)では2回のランダムプライミング反応でアダプター配列をBS-DNAへ連結する。ランダムプライミングには原理的弱点があり、ランダムプライミングを繰り返して行うrPBAT法はその弱点を強く体現していた。そこでrPBAT法の2回のランダムプライミング反応のうち1つをTACSライゲーションで置換することでランダムプライミングの弱点を低減することを試みた。BS-DNAを鋳型としてランダムプライミングを行った伸長反応産物に対してTACSライゲーションでアダプターを連結するプロトコール(tpBAT)を確立した結果、得られたライブラリーはインサートの伸長と反応副産物の低減によるリードのマッピング率向上の2つの改善が確認された。これらの改善はWGBSのコスト低減とシーケンサーの出力向上に効果があった。

(2) 詳細

成果1 TCSライゲーションの考案・実現とライブラリー調製への応用

これまで1本鎖DNA同士の連結を単独の酵素を用いて高効率に実現する反応は見いだされていない。そこで酵素反応と化学反応を組み合わせた新しい手法(TCSライゲーション)を考案した。クリック反応は温和な条件下、銅を触媒としてアジド基とエチニル基をもつ化合物同士を連結することが出来る。そこで、クリック反応を用いてアダプターを連結した1本鎖DNAを次世代シーケンサーのためのライブラリーとして利用することを考えた。3'末端がアジド化されたヌクレオチドアナログの3リン酸体が市場で入手可能であったことから、TdTを用いて標的DNAの3'末端にこのアジド化アナログを取り込ませ、得られた3'アジド化DNAに対して5'エチニルオリゴヌクレオチド(磯部寛之教授、藤野智子助教(東北大学・当時)の協力により合成)の連結を試みた。その結果、カップリング反応は最大30%の効率で進行することが判明した。次にTCSライゲーションを次世代シーケンサーのライブラリー調製へ応用することを試みた。しかし、実サンプル由来の長鎖DNAでは銅触媒による分解の影響が大きかった。つまり、TCSライゲーションは短い1本鎖DNAからのライブラリー調製のみに応用可能であることが明らかとなった。このような制約があるもののTCSライゲーションは化学反応と酵素反応を組み合わせたChemo-Enzymaticなライブラリー調製法の基本反応としてユニークである点が評価され、Nucleic Acids Research誌に論文が採択された(Miura F., et al. (2018), Nucleic Acids Research, **46**, e95)。

成果2 TACSライゲーション法の考案・実現

上記TCSライゲーション法に加えて酵素反応のみに依存した新しい1本鎖DNAライゲーション反応を考案した。TdTはデオキシリボヌクレオチド3リン酸を基質とした場合、標的1本鎖DNAの3'末端に際限なく塩基を連結する反応を触媒する。このように付加されたホモポリマ

一は配列決定の障害になる。一方でリボヌクレオチド3リン酸を基質とした場合、TdTによる付加反応は数塩基の伸長で自律的に停止することが知られていた。この反応(リボテイリング)の信頼性は非常に高く、ほぼ100%の標的DNAが3'末端にリボヌクレオチドが付加されることが知られていた。ここで得られる反応産物の3'末端は短いながらも紛れもないRNAであるため、RNAリガーゼの格好の標的となり、5'末端がリン酸化されたアダプター配列を高効率に連結することが可能になるのではないかと考えられた。そこで、この手法をTACSライゲーションと命名し、その実現を試みた。市販のいくつかのRNAリガーゼを用いた検討の結果、リボテイリングは入手可能な全てのRNAリガーゼに対して1本鎖DNA同士のライゲーション反応を増強する効果があることが判明した。TACSライゲーションは最適条件下では80%以上の高効率で安定に1本鎖DNA同士のライゲーションを実現できた。

成果3 Taq DNA ポリメラーゼの短鎖RNAの逆転写活性の発見

TACSライゲーションの反応産物は内部にRNAを含む。つまりTACSライゲーション産物の相補鎖合成には逆転写活性が要求される。しかし、一般に逆転写酵素は耐熱性が低く、最高でも55°C程度までしか活性を維持することが出来ない。この温度ではアダプターに対するプライマーのアニーリングの厳密性を維持することが困難であると考えられた。そこで、耐熱性DNAポリメラーゼを対象に数塩基のRNAに対する相補鎖合成活性を持つ酵素をスクリーニングした。その結果、Taq DNAポリメラーゼとこの酵素から派生した変異体群にはその活性があることが判明した。この発見によって、TACSライゲーションの反応産物を次世代シーケンサーのライブラリーへ変換するための現実的な操作手順が確立できた。

成果4 tPBAT法の実現によるインサート長とリードのマッピング率の改善

検討の結果、BS-DNAの3'末端に直接TACSライゲーションでアダプターを連結することは困難であった。そこで次善の策として従来のPBAT法(rPBAT法)で採用されている2回のランダムプライミング反応のうち1つをTACSライゲーションで置換することを試みた。BS-DNAを鋳型にしたランダムプライミング反応で伸長・合成された産物の3'末端に対してTACSライゲーションでアダプターを付加するプロトコル(tPBAT法)を確立した結果、rPBAT法では150塩基程度だったインサート長が、tPBAT法では250塩基程度にまで改善されていた。また、rPBAT法では開始DNA量が1ng以下になるとリードのマッピング率が開始DNA量に応じて低下する現象が確認されていたが、tPBAT法ではこういった現象が軽減されていることが明らかとなった。

tPBAT実現によるインサート長の伸長はPBATによるメチローム解析の実用性を高める効果をもたらした。WGBSではゲノムの全域を重厚に配列決定する必要があり、そのためには高出力かつ低コストな最新のシーケンサーを用いる必要がある。これらのシーケンサーでは150×2のペアエンドシーケンシングが標準であり、このスペックを有効利用するためには300塩基以上のインサートを持つライブラリーが必要であった。tPBATではインサート長が250塩基に改善されたため、これらシーケンサーの配列決定能力をより有効活用出来るようになった。この結果、従来1サンプル当たり70万円~100万円の配列決定コストを要していたrPBATによるメチローム解析がtPBATでは15万円以下のコストで実現可能となり、微量サン

プルを対象とした多サンプル間の比較メチローム解析のコストが実用レベルに到達した。この成果を受けて、現在臨床サンプルも含めた様々な多サンプル間比較メチローム解析が tPBAT を用いて実施されるに至っている。なお、TACS ライゲーションの開発から tPBAT の確立に至るまでの研究成果は現在論文投稿中(リバイス中)である。

3. 今後の展開

高効率な1本鎖 DNA ライゲーション技術である TACS ライゲーション法が確立できたことにより、従来法より格段に収量とインサート長が改善された WGBS のライブラリー調製プロトコルが実現出来た。この tPBAT 法の実現により新型シーケンサーのスペックをより有効利用できるようになり、同時に配列決定コストの大幅な圧縮が実現された。その結果、従来法では困難だった微量サンプルを対象とした多サンプル間の比較メチローム解析が低コストで実現可能になった。現に、tPBAT を用いたメチローム解析は既に十数例同時並行で進行しており、メチローム解析における tPBAT 法に対する期待が高まっていることがわかる。

本研究では TACS ライゲーションを WGBS のライブラリー調製技術の改良に利用した。しかし、TACS ライゲーションは基本的なライゲーション反応として様々な応用が想定される。特に1本鎖 DNA が大量に含まれてことが想像される ChIP-Seq や DNase-Seq などのエピゲノム解析、短鎖の血中セルフリーDNA、化石由来 DNA の配列決定など、従来の2本鎖 DNA を対象としたライゲーション技術ではライブラリー調製が困難だったサンプルに対する基本反応として TACS ライゲーションが採用されていくことが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究の最終目標はより網羅的なシングルセルメチローム解析技術を確立し、その技術に立脚して同一細胞からメチロームとトランスクリプトームの双方のデータを取得するというものだった。しかし、本研究が始まった直後の2015年に貧弱なデータながらもメチロームとトランスクリプトームの同時取得の報告があり、この分野におけるフラッグシップ争いは決着がついた。そこで、私自身はメチロームとトランスクリプトームの同時取得に対するこだわりを捨て、本研究において最も重要な技術開発である TACS ライゲーションの確立に集中することにした。その結果、これまでの分子生物学の実験技術の中は実現が困難だった高効率な1本鎖 DNA 同士のライゲーション技術が確立できたことは、研究コミュニティに対してユニークかつ相当程度のインパクトを与えることが出来たものと考えている。また、ランダムプライミングの負の影響を低減した tPBAT 法を確立することにより、従来よりも低コストかつ高品質なメチロームデータの取得が実現できた事実はエピゲノム研究のコミュニティに徐々に受け入れられつつあり、本さきがけ研究の最終年度になって多くの共同研究開始につながっている。PBAT のランダムプライミング非依存化については道半ばであるが、そのための技術開発も進んでおり、近い将来実現できるものと考えられる。以上から、本研究課題は当初の目標は失ったものの、その実現と同等あるいはそれ以上の成果を残して期間を全うできたものと考えられる。

- (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

これまでの DNA 中のシトシンのメチル化状態をゲノム網羅的に決定する技術である全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)では、バイサルファイト処理によって1本鎖した DNA の両端にアダプター配列を効率よく連結する技術がなく、次世代シーケンサー用のライブラリー生成効率が低く、インサート長も短いことが問題でした。本さきがけ研究では1本鎖 DNA 同士を連結する2つの方法、TCS ライゲーション法と TACS ライゲーション法の開発に成功しました。特に後者の反応効率と実用性は優れており、本法を用いた tPBAT は従来のランダムプライマーを用いる rPBAT 法と比べて収量とインサート長が格段に改善されたシーケンサー用ライブラリーを調製できることを実証しました。実際に tPBAT 法で解析を行い、WGBS の解析効率がどこまで向上したのか、およびそれによる色々なサンプルでの single cell メチローム解析の結果を楽しみにしています。

tPBAT 技術によって WGBS が更に普及し、エピゲノム研究が大きく進展することを期待します。また、これらのライゲーション技術の様々な応用法を考案・発展させ、多くの研究者が使える技術として広がる努力を重ねて欲しいと考えます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Fumihito Miura, Tomoko Fujino, Kanako Kogashi, Yukiko Shibata, Miki Miura, Hiroyuki Isobe, Takashi Ito; Triazole linking for preparation of a next-generation sequencing library from single-stranded DNA, Nucleic Acids Research, 2018, Volume 46, e95

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 三浦史仁、伊藤隆司、新しい1本鎖DNA の連結反応を用いたPBAT 法、第10回日本エピジェネティクス研究会年会(日本、大阪)
2. Fumihito Miura, Takashi Ito, An efficient method for NGS library preparation from single-stranded DNA, IHEC Annual Meeting 2015 (Belgium, Brussels)
3. Fumihito Miura Methylome analysis based on enhanced single strand DNA ligation, France Japan Epigenetics Workshop 2017
4. 三浦史仁、柴田由希子、三月田祐平、三浦美希、伊藤隆司、改良型 PBAT 法による高品質で低コストなメチロームシーケンシング、第11回日本エピジェネティクス研究会年会(日本、札幌)
5. 三浦史仁、柴田由希子、三浦美希、三月田祐平、久野修、荒木啓充、伊藤隆司、1本鎖 DNA ライゲーション技術に基づく PBAT と両鎖混合ライブラリー法による高品質で低コストなメチローム解析、第41回 日本分子生物学会年会(横浜、2018年11月30日)

研究報告書

「生細胞膜分子動態を観る極限時空間分解能 AFM の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 山下 隼人

1. 研究のねらい

細胞が機能し、環境と相互に作用するためには、細胞を覆う細胞膜中の膜タンパク質分子が働くことが必須であり、それぞれの細胞の多様な機能の多くは膜タンパク質が担っている。このことから「個々の生細胞における膜タンパク質分子を、網羅的に極限の精度と時空間分解能で直接観る技術」があれば、1 細胞内の多様な膜タンパク質の構造・動態・相互作用が同時に分かり、1 細胞レベルの表現系・機能・個性の理解が格段に進むと考えられる。

現在の 1 細胞イメージングでは、電子顕微鏡のように細胞表面の「構造を詳細に観る」技術や蛍光顕微鏡のように膜分子の「ダイナミクスを高速で観る」技術を用いて研究が行われているが、このような「高い空間分解能」と「高い時間分解能」を同時に満たす技術はこれまでなかった。一方、高速原子間力顕微鏡(高速 AFM)は溶液中において生体分子の動態をナノメートルかつ数十ミリ秒の時空間分解能で直接可視化可能な顕微鏡として、これまで細胞から精製した様々なタンパク質の機能する様子を捉える事に成功してきた。このことは、高速 AFM が前記の 2 つの技術の橋渡しとなり、生細胞中の膜分子動態を捉えることができる有力な技術となりうる可能性を示していると考えられるが、一方で課題も存在する。細胞は柔らかい構造をしているため、AFM でその表面構造を正確にトレースするのは困難であることに加えて、精製タンパク質に対して細胞は非常に大きく、細胞と分子のスケールギャップが AFM の時空間分解能を制限している。

そこで本研究では、高速 AFM を用いて 1 細胞膜分子動態のイメージングを実現するため、細胞イメージングにおける極限の時空間分解能を持つ AFM 技術の開発を行うことで、生きた 1 細胞における表面膜タンパク質分子の構造と動態プロセスをナノレベルの空間分解能、数十～数百ミリ秒オーダーの時間分解能で可視化する新しい 1 細胞計測手法を創成することが本研究のねらいである。

2. 研究成果

(1) 概要

生きた細胞上の膜分子を高解像度に可視化するための AFM 技術の開発を行った。その中で、新しい構造の AFM スキャナーを開発することで、細胞膜表面観察における時空間分解能を向上させ、生きたバクテリア細胞上で、個々の分子構造を可視化することに成功した(特許出願済)。そこで、バクテリア細胞イメージングの応用として、抗菌薬の作用過程の観察を行い、殺菌過程の初期における細胞膜のマクロな構造変化が、膜中の微小な分子集合体の欠陥によって引き起こされることを明らかにした(論文準備中)。また、動物細胞の表面分子観察に向けて、AFM 技術開発を進めた。

さきがけ期間中に、同領域内において、理化学研究所の谷口博士とクロマチン 3 次元構造

の高分解能構造解析に関する共同研究、名古屋大学の樫田准教授と SNA および 6 重鎖構造の高速 AFM 解析、および東京大学の山口講師と光応答性細胞固定化剤修飾基板の表面構造評価に関する共同研究を行い、1 報の論文を出版、2 報の論文を現在準備中である。

以下にそれぞれの研究成果について詳細を説明する。

(2) 詳細

研究テーマ 1 「細胞上膜分子を可視化するための原子間力顕微鏡技術の開発」

高速 AFM は現在、精製タンパク質のイメージングで応用され、様々な成果が上がっているが、一方で細胞イメージングでは、細胞表面の静止構造や、細胞全体もしくはマクロな膜表面のダイナミクスの計測は行われているが、細胞上膜分子の計測は、ほとんど行われていない。AFM による精製タンパク質の分子イメージングと細胞イメージングの大きな違いの一つに、細胞全体のサイズと分子のサイズにスケールギャップが存在することである。マイクロメートルオーダーのサイズを持つ細胞全体構造とナノメートルオーダーの膜タンパク質分子を AFM で機械走査(スキャン)する際、このスケールギャップが時空間分解能を制限しているため、細胞上では分子を観察することが困難となっていた。AFM スキャナーの走査性能を向上させ、細胞表面での膜分子動態をナノメートルかつミリ秒オーダーの時空間分解能で撮影可能にするため、細胞全体を撮影する広域走査と注目する表面膜分子領域のみを高速高解像に撮影する狭域走査とを合わせ持った複合型のスキャナーシステムの開発を行った。その走査性能の評価を行った結果、広域走査は最大走査範囲 4~6 μm 、最高約 1.0sec/frame で走査でき、狭域走査は 0.7~1.5 μm 、約 30msec/frame で走査可能な特性が得られた。このことから、広域を低速、狭域を高速高精度に走査可能なスキャナーを実現できたことが分かった(国内・PCT 特許出願済)。また、X,Y 走査だけでなく、Z 走査においても広域と狭域を分担した機械構造の開発を行い、広域は約 2 倍の走査範囲を確保し、狭域は約 2 倍の走査帯域を実現した。またこの複合型スキャナーの実際のイメージングにおける性能評価として、まず、天然由来の精製紫膜の観察を行った。従来の細胞観察スキャナーでは高速走査において紫膜中のバクテリオロドプシン(bR)の分子構造を識別できなかったが、新開発の複合型スキャナーでは、1 分子構造を明瞭に可視化することができた。さらに溶液中における生きた細胞イメージングにおける性能評価として、バクテリア細胞の細胞表面イメージングを行った。磁性細菌の細胞表面の外膜には膜貫通型タンパク質であるポーリンが多量に存在していることが分かっていたが、従来の高速 AFM スキャナーではそれらの細胞上での分子配置を明らかに出来ていなかった。一方、本研究にて開発したスキャナーを用いた結果、培養液中の生きた磁性細菌細胞上でポーリンと考えられる 3 量体分子が部分的に規則正しく配列している様子を可視化でき、細胞上での膜分子構造を明らかにすることが出来た。また同じグラム陰性細菌である紅色細菌でも細胞観察を行った結果、外膜表面に多数のポーリンと考えられる 3 量体分子が密集して存在し、膜中で揺らいでいる様子を 1.0sec/frame の走査

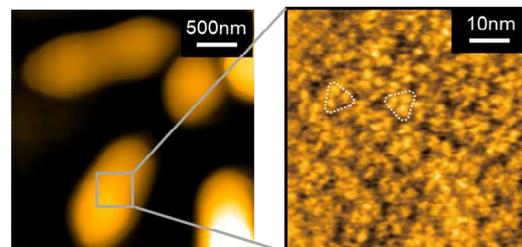


図 1: バクテリア細胞の高速 AFM 像
(左:細胞全体像、右:細胞表面拡大像)

速度、3nm以下の空間分解能で観察することに成功した(図1)。この時空間分解能は、AFMによる生きた細胞上での分子観察として世界最高であり、これらの成果は現在、論文投稿準備中である。

研究テーマ2「バクテリア細胞上の分子動態観察と薬剤に対する応答プロセスのナノ計測」

生細胞表面の膜分子を1分子レベルの解像度で可視化するためのAFM技術として研究テーマ1で開発した複合型AFMスキャナーを用いて、バクテリア細胞における膜分子動態イメージングへの応用に取り組んだ。グラム陰性細菌では、最外層である外膜にポーリンと呼ばれる膜貫通型のタンパク質が存在し、細胞外のイオンなどを取り込む際の透過障壁となっており、この分子に変異が起きることで、細菌が薬剤耐性を持つことが知られている。そのため細菌の多剤耐性の研究においても非常に重要なタンパク質である。本研究では、磁性細菌、紅色細菌や大腸菌などのグラム陰性細菌の細胞表面の観察を行い、ポーリンと考えられる多数の3量体分子を観察することが出来た。一方、最近の研究で、大腸菌の外膜では外膜タンパク質が膜タンパクアイランドと呼ばれる分子集合体を形成することが明らかにされた(P. Rassam, (2015) *Nature*)が、アイランド内での分子配置の詳細は明らかにはなっていなかった。本研究にて、大腸菌外膜を観察したところ、アイランドと考えられるクラスター構造を観察することに成功し、クラスター内と比べクラスター周辺では分子拡散が大きいことが分かった。しかしながら、それらの拡散は、複数のクラスターからなる膜タンパク質の密集環境により、非常に限局していることも明らかとなった。また、これら外膜タンパク質の分子種の同定とその局在を調べるため、大腸菌の外膜で発現していることが知られている膜タンパク質 OmpF の抗体を投与した結果、細胞表面分子に結合する様子を観察することが出来た。このことから、抗体を用いることによりAFMで観察している細胞膜タンパク質の分子種を同定することも可能であることを示せた。

次に、バクテリア細胞イメージングへのさらなる応用として、抗菌薬による殺菌過程のナノスケール観察を行った。細胞表面観察中にポリペプチド系の抗生物質を投与したところ、時間とともに細胞表面に数nm程度の球状構造体が幾つも出現する様子が観察された。その後、細胞表面全体にわたって数十nm程度のこぶのようなラフな起伏に構造変化し、やがて細胞全体の構造が崩れ溶菌したことから、抗菌薬投与後、初期過程において膜分子が細胞外へ脱離し、幾つもの欠損が生じることにより細胞膜表層に大きな構造変化が生じたと考えられる。これまでの研究で細胞膜のマクロな変化は観測されていたが、その変化が生じるミクロなプロセスは明らかになっていなかった。これらの計測により、本研究で開発した技術が、薬剤に対する細胞のナノスケールでの応答過程をイメージングするツールとして有用であることを示せた。

研究テーマ3「動物細胞のAFM観察のための技術開発」

動物細胞に対する生細胞膜分子イメージングのモデルターゲットとして水チャネルであるアキュアポリン4(AQP4)を、培養細胞COS7細胞で発現させ、AFMで観察を試みた。AQP4のアイソフォームであるM23は、脳グリア細胞中で、特徴的な分子集合であるアレイ構造を形成し、自己免疫疾患である視神経脊髄炎に関与している。また、培養細胞中でもこのAQP4に特徴的なアレイ集合を形成することが知られている。そこで、まずAFM装置に、新たに蛍光観察シ

システムを組み込み、eGFP fusion AQP4(M23)を発現した COS7 細胞のイメージングを行った。AQP4 分子が発現していることを蛍光像で確認し、その特定の 1 細胞に AFM 探針をアプローチしてイメージングできるシステムを構築した。この観察において蛍光が輝点として観察されたことから、AQP4 が細胞で分子集合していると考えられ、その輝点付近に探針をアプローチして AFM イメージングを行ったところ、AQP4 の分子構造の観察は出来なかったが、自己免疫疾患の原因となる抗 AQP4 抗体を細胞観察中に投与し、イメージングを行った結果、抗体と考えられる分子の結合が観察された。さらに、免疫反応の次の過程である抗体に補体が結合する過程を観察するため、補体の投与を行ったが、大きな変化が見られなかった。細胞上における生理過程の観察には、環境温度が重要なファクターとなることから、AFM 観察溶液の温度を制御するためのチャンバーの作製に取り組んだ。これにより哺乳動物細胞観察に最適な 37°C の培養液環境下で AFM イメージングが可能となった。

動物細胞は、バクテリア細胞などに比べると、細胞表面構造が非常に柔らかく、物理的に表面をトレースして構造を可視化する AFM では、その表面を正確にトレースすることが難しい。そこで、柔らかい細胞表面を探針で正確かつ高速にトレースするため、従来のカンチレバーに比べて軟らかい(バネ定数の小さい)カンチレバーの開発を推進した。電子線露光によりフォトマスクを作製し、エッチングプロセスでカンチレバーを加工することにより、試作として市販品よりも約 10 倍軟らかいカンチレバーを目指して開発を行ったが、カンチレバーのサイズが非常に小さく薄いため、作成は非常に困難であった。しかしながら、従来の約 2 倍軟らかい構造のカンチレバー試作品が作製できることが確認できた。また、このカンチレバーをイメージングで使用するためには、裏面から変位検出のためのレーザーを照射する必要があるため、TEM 観察に用いられる Si_3N_4 薄膜基板を用いて薄膜窓部分にカンチレバーを作成後、中央で 2 つに割ることで、Si 深堀加工を省いたプロセスの導入を行った。これらの開発はまだ途上であり、将来的に実用化に向けて、現在も改良を進めている。

また、従来の高速 AFM のフィードバック制御はアナログシステムであるため、操作が複雑で、細胞生物研究者が一般的に用いている光学(蛍光)顕微鏡と比べ、操作が難しい。加えて、回路系の変更・増設が容易ではなく、装置も大型である。そこで、FPGA を用いた制御技術を導入することでシステムのデジタル化を試みた。既存の AFM システムの中でアナログ制御を行っていた差動増幅・振幅計測・PID 制御など主要な回路を FPGA で作製することに成功し、デジタルシステムとして使用できることを確認した。一方で、実機において高速イメージングで使用するには高速 AD/DA 変換可能なデバイスの導入が必要であることが分かり、今後も継続して改良を進める予定である。

研究テーマ 4「高速 AFM の様々な生体分子・生体材料計測への応用」

さきがけ 1 細胞領域内での共同研究として、Hi-CO 法によるゲノム構造解析を推進する理化学研究所・谷口博士と、高速 AFM を用いて生理溶液中で高解像度 3 次元ゲノム構造解析を行った。これにより、Mg 存在下・非存在下でヌクレオソームアレイの凝集構造に優位な差があることを定量的に解析することに成功し、ゲノム構造と生理学的機能との相関を明らかにできた。また、名古屋大学・樫田先生と 6 重鎖構造の高速 AFM による溶液中での構造解析を行い、粒径を定量解析することに成功し、その結果を論文報告した。さらに、光応答性細胞固定化剤基板を用いた応用研究を推進している東京大学・山口先生との共同研究で、細胞膜裏

打ち構造を高速 AFM で計測するため山口先生の PEG 脂質修飾基板技術を導入した。現在、AFM ステージ上に PEG 脂質修飾基板を用いて作製した細胞シートをのせ、細胞膜裏側構造の AFM 計測を行っているところであり、細胞内分子動態の超解像計測へ向けた新たな技術展開に繋がることが期待される。

3. 今後の展開

本さがけにて開発した AFM 技術が、バクテリア細胞イメージングにて効果を発揮することを示せたことから、今後は様々なバクテリア細胞の研究へ応用展開していく。細胞膜タンパク質の分子レベルでの構造変化や生理作用に伴う細胞膜分子の拡散挙動の変化などの具体的な分子スケールの現象解明に取り組む。そのためには、各分野の専門家との共同研究が不可欠であることから、さがけを通じて構築した研究の連携関係を深めていくとともに、本さがけにより得られた研究成果を積極的に外部発信していく。また、動物細胞のイメージング技術に関しては開発途上であることから、引き続き改良を行うとともに、モデル細胞系でのイメージングを通して、突破口を見出す。

4. 評価

(1) 自己評価

研究目的の達成状況に関しては、当初の目的である細胞上の分子をナノメートル解像度で可視化するための技術開発は概ね達成することができ、バクテリア細胞に対して、分子解像度のイメージングを実現することが出来た。また、動物細胞のイメージングでは、まだ十分目的を達成できているとは言えないが、今後に繋がる知見を取得することが出来た。研究実施体制としては、研究開始段階では技術の土台となる高速 AFM 装置はあったが、細胞イメージングや試料準備のための環境・設備・装置がなかったため、研究期間前半は細胞イメージングを実施するための装置構築や細胞試料調整環境の導入・整備などに予算を執行し、これらテーマを研究室学生に教育指導するとともに、技術開発を行い、研究期間後半は、新規 AFM 技術開発とバイオイメージングを平行して推進することができた。細胞のライブイメージングは現在、蛍光顕微鏡技術を用いた手法が主流である一方で、更なる解像度の向上が求められている。そういった中で、本研究にて開発を進める AFM 技術は当該分野に将来ブレークスルーをもたらすポテンシャルを持つ有力な技術として期待できる。1細胞領域は様々な技術やターゲットサンプルを持つヘテロな専門家の集団であったことから、積極的に共同研究を推進することで、これまでの自分自身の研究だけでは到達しえない、技術の応用先を広げ、発展させることが出来た。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

時空間分解能が向上した新しい構造の高速・広領域 AFM スキャナーを開発し、世界で初めて生きたバクテリアにおける細胞膜タンパク質の分子構造とその動きを可視化することに成功しました。この高速 AFM を用いて、抗菌薬を投与後、細胞膜から膜分子が脱落し、それによ

て膜表面の構造が大きく変化し、溶菌に至る過程をリアルタイムに観察することができました。生細胞におけるナノスケールの動的なプロセスを観察する際に、本研究で開発した AFM 技術が非常に有効であることを示すものです。また、細胞だけでなく生体分子やバイオ材料のイメージングでも成果が得られています。これらの技術は特許も出願されており、今後さらなる応用と発展が期待されます。まとまった大きな論文発表につながり、この技術を世界にアピールすることを期待します。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. D. Katsube, H. Yamashita, S. Abo, and M. Abe, “Combined pulsed laser deposition and non-contact atomic force microscopy system for studies of insulator metal oxide thin films”, *Beilstein Journal of Nanotechnology*, (2018) 9, 686–692.
2. H. Kashida, Y. Hattori, K. Tazoe, T. Inoue, K. Nishikawa, K. Ishii, S. Uchiyama, H. Yamashita, M. Abe, Y. Kamiya, H. Asanuma, “Bifacial nucleobases for hexaplex formation in aqueous solution”, *Journal of the American Chemical Society*, (2018) 4, 8456–8462
3. M.Hashimoto, T.Ogawa, S.Kitaoka, S.Muto, M.Furuya, H.Kanetaka, M.Abe, H.Yamashita, “Control of surface potential and hydroxyapatite formation on TiO₂scales containing nitrogen-related defects”, *Acta Materialia*, (2018) 155, 15, 379–385

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 2 件

1.
発明者: 山下隼人、阿部真之
発明の名称: スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡
出願人: 大阪大学
出願日: 2017/1/10
出願番号: 特願 2017-002183

2.
発明者: 山下隼人、阿部真之
発明の名称: スキャナ及び走査型プローブ顕微鏡
出願人: 大阪大学
出願日: 2017/12/7
出願番号: PCT/JP2017/044060

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. 山下隼人、「高速原子間力顕微鏡によるナノメートル世界の動的観察」、平成 28 年度・「物質・材料科学研究推進機構」講演会、大阪大学、2017 年 1 月 26 日

【学会発表】

1. 山下隼人, 田岡東, 福森義宏, 阿部真之、「生細胞膜分子イメージングのための高速 AFM スキャナーの開発」、第 78 回応用物理学会秋季学術講演会、福岡国際会議場、2017 年 9 月 5 日～8 日
2. H. Yamashita, A. Taoka, Y. Fukumori, M. Abe, “Molecular imaging on living bacterial cell surface by high speed AFM”, 第 55 回日本生物物理学会年会、熊本大学、2017 年 9 月 19 日～21 日
3. H. Yamashita, A. Taoka and M. Abe, “Molecular imaging of dynamic process on bacterial cell surface by high speed AFM”, 第 56 回日本生物物理学会年会、岡山大学、2018 年 9 月 15 日～17 日

【総説】

1. 山下隼人、「ナノスケールの動的プロセスを可視化する高速 AFM」、生産と技術、2017,Vol.69, No.4, 18-26

研究報告書

「単一細胞プロテオミクスが拓く細胞証分析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 27 年 10 月～31 年 3 月

研究者: 若林 真樹

1. 研究のねらい

本研究は、試料ロスのない前処理法の開発と、超高感度かつ超高分離な液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)の開発を通じて単一細胞プロテオーム解析手法の確立を目指すものである。真に網羅的な単一細胞プロテオーム解析の実現をかわきりに、特定分子の精密解析手法と網羅的解析手法のリンクが現実のものとなる。つまり、細胞の状態や特性を顕著にあらわす分子によって選別した単一細胞を捕捉後、本手法によって網羅的に解析することで、その細胞の状態をタンパク質発現マップとして記録することができる。細胞の状態、特性、時空間的情報を付与したプロテオーム情報をデータベース化することで、細胞の個性やその変化、創発性を生み出す機序をタンパク質ネットワークの動態として理解可能となる。

以下に、単一細胞プロテオーム解析の実現に向けて必要不可欠な要素技術を記す。

A. LC-MS に直接接続可能な試料前処理用キャピラリーカラム(試料ロスの最小化)

B. 超高分離かつ超高感度な LC-MS システム(検出感度の大幅な向上)

本技術を確立することができれば、項目 A の前処理用キャピラリーカラム内への試料導入方法をアレンジすることで、顕微鏡下の細胞、組織内細胞、FACS により分取した細胞、極微量組織など、様々な試料、装置とリンクすることが可能な汎用的手法となる。蛍光顕微技術をはじめとする既存の超高感度解析手法とプロテオーム情報をリンクさせることで得られるタンパク質ネットワークの動態情報を詳細に理解することで、細胞の個性やその変化、創発性を生み出す機序の理解に大きく近づくことがねらいである。

2. 研究成果

(1)概要

単一細胞プロテオーム解析手法の開発に向けて、試料ロスのない前処理法の開発と、超高感度かつ超高分離な液体クロマトグラフィー-質量分析計(LC-MS)システムの開発を行った。

まず、試料ロスを最小化するために、LC-MS に直接接続可能な試料前処理用キャピラリーカラムの開発を進めた。先端にフリットを形成させたガラスキャピラリーにタンパク質消化用のトリプシンを固定化したビーズと消化後のペプチドを回収するための C18 修飾ビーズを充填し、このキャピラリー内へタンパク質試料を直接導入することで、還元アルキル化や消化を含むすべての前処理を完了させる手法を確立した。本手法を用いて HeLa 細胞 500 個の分析を行ったところ、従来法でのタンパク質同定数 90 に対して 236 タンパク質が同定された。本手法は、抽出物や分泌タンパク質など、タンパク質懸濁液として調製可能な試料に対して極めて有効であるものの、細胞そのものを導入した際には一定の確率で詰まりを生じることがわかった。そこで、より空隙の大きいモノリス型キャピラリーカラムにトリプシン、C18 をそれぞれ修飾

し、同様の前処理を試みたところ、詰まりを概ね回避可能であった。このモノリス型前処理カラムを用いることで、HeLa 細胞 100 個を初期試料量として 383 タンパク質の同定に成功した。

次に、超高分離かつ超高感度な LC-MS システムの構築のため、小内径モノリス型カラムの作製を進めた。小内径カラムを用いて低流量化することによる検出感度向上と、メートル長モノリス型カラムを用いることによる超高分離の達成により、タンパク質同定数の大幅な向上が期待される。一般的なカラムの約 1/4 の内径となる 25・ μ m のキャピラリーで安定して作製可能な手法を確立し、前述の前処理カラムと統合したシステムを用いて微量試料の分析を行ったところ、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片 (1mm 角 x 5・ μ m 厚) 1/20 枚から 4000 以上のタンパク質が同定可能であり、従来法で同定された 700 タンパク質と比較して大幅に向上した。現在、本手法を用いて極微量臨床試料の大規模解析を進めている。

また、キャピラリーカラム内前処理手法をリン酸化ペプチド濃縮へと応用することで、1・g の細胞消化物から 1200 以上のリン酸化ペプチドを同定することに成功した (従来法では 88 ペプチド)。さらに、超高感度 LC-MS システムと組み合わせることで極微量試料の大規模翻訳後修飾解析へと展開する予定である。また、さらなる高感度化を進めることで 1 細胞解析への適用を推進する。

(2) 詳細

研究テーマ①「LC-MS に直接接続可能な試料前処理用キャピラリーカラムの開発」

まず、先端にフリットを形成させたガラスキャピラリーにタンパク質消化用のトリプシンを固定化したビーズと消化後のペプチドを回収するための C18 修飾ビーズを充填したカラムを作製した (図 1)。

このキャピラリー内へタンパク質試料を直接導入し、タンパク質抽出、還元アルキル化、消化を

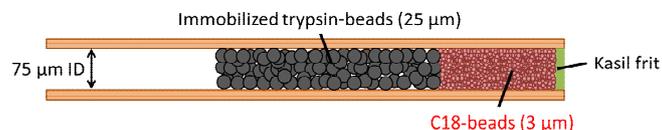


図 1. タンパク質前処理用カラム

含むすべての前処理を完了させる手法を確立した。本手法を適用して HeLa 細胞 500 個の分析を行ったところ、従来法でのタンパク質同定数 90 に対して 236 タンパク質が同定された。さらに、低流量化 (小内径化) した高感度 LC-MS システムと接続するために、粒子径 3・ μ m のトリプシン固定化ビーズを合成し、内径 25・ μ m のキャピラリーに充填することで同様の前処理カラムを作製した。しかしながら、粒子径 3・ μ m のトリプシン固定化ビーズは粘度・背圧ともに非常に高く、細胞試料を導入した際に一定の確率でカラム詰まりを生じることが分かった。そこで、低流量化に向けて、より空隙が大きく背圧も低いモノリス型キャピラリーカラムを用いることとした。シリカモノリスに対してそれぞれトリプシン、C18 で修飾したカラムを直列に接続することで、同様の前処理カラムを構成可能であった (図 2)。



図 2. モノリス型前処理用カラム

このモノリス型前処理カラムを用いることで、詰まりは回避可能となった。さらに、低流量化した高感度 LC-MS システムと接続することで、HeLa 細胞 100 個の分析により 383 タンパク質が

同定可能であった。従来法での同定数は 45 タンパク質であったことから、分析システムとして 8 倍以上の高感度化を達成した。また、本手法の応用として、リン酸化ペプチド濃縮用の TiO_2 粒子を充填したカラムを作製し、キャピラリー内でリン酸化ペプチド濃縮を試み、分析を行ったところ、1・g の細胞消化物から 1200 以上のリン酸化ペプチドを同定可能であった（従来法では 88 ペプチド）。

研究テーマ②「超高分離かつ超高感度な LC-MS システムの開発」

超高分離かつ超高感度な LC-MS 測定系の構築のため、小内径モノリス型カラムの作製を進めた。小内径カラムを用いて低流量化することによる検出感度向上と、メートル長モノリス型カラムを用いることによる超高分離の達成により、タンパク質同定数の大幅な向上が見込まれる。内径 10, 15・ μm のキャピラリーではまれに壊れたモノリス構造や壁面からのはがれが観察されたため、作製プロトコルの改善が必要だが、内径 25・ μm のキャピラリーでは安定して作製可能な手法を確立した。

また、有機溶媒のポストカラムミキシングによるイオン化効率の改善・検出感度の向上を試みた。インフュージョン法により牛血清アルブミン消化物を分析した際には、アセトニトリル濃度を 5% から 40% へ変化させることで、MS での検出感度が 3~10 倍程度改善された。しかしながら、LC-MS システムの場合、ポストカラムでの分離の解消によるピーク幅の増大が見られるため、タンパク質同定数の向上にはつながらないことが明らかとなった。

テーマ①②を統合し、超高感度解析システムとして極微量試料の解析を試みた。最も大きい臨床試料アーカイブを形成しているホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織への適用を鑑み、マウス心・肝臓組織を用いて検討を進めたところ、1mm 角 x 5・ μm 厚の切片 1/20 量から 4000 以上のタンパク質を同定・定量可能であった。現在のところ、哺乳類細胞の 1 細胞プロテオーム解析が可能な分析感度を達成するには至っていないが、極微量試料の解析手法として世界最高レベルのシステムを構築した。本手法を用いて極微量臨床試料の解析、極微量分泌タンパク質の解析などを進めている。

3. 今後の展開

極微量試料の解析手法として大きく展開可能であると考え。その適用範囲は広く、例えば FFPE 薄切切片からマイクロダイセクションにより採取したごく少数の細胞、FACS や MACS によって分取した希少な細胞、分泌タンパク質などが挙げられる。少量であるが均一な試料のプロテオーム解析を進めることで、組織全体や混合試料の解析では埋もれていた新しい知見を導くことが可能となる。また、LC-MS システムの分離能、感度をさらに向上させることで、1 細胞解析へと発展させることが必要不可欠な課題である。

4. 評価

(1) 自己評価

研究の期間全体を通して、継続的に十分な実施体制を整えられなかったことが反省すべき

点である。異動による研究室立ち上げや、大阪北部地震による主要機器の破損、破棄などにうまく対応しきれなかったこともあり、研究費執行を一部予定通り進めることができなかった。

期間全体の研究成果としては、哺乳類細胞の1細胞プロテオーム解析が可能な分析感度を達成するには至らなかったが、極微量試料の解析手法として世界最高レベルのシステムを構築した。1細胞解析の実現に向けて引き続き高感度化を進めなければならないが、現在までに構築したシステムでも分析ニーズは非常に多く、現在進めているアプリケーションにも大きな価値を見出している。特に、これまでは手をつけられなかった稀少臨床試料のプロテオーム解析が実現可能となったことにより、多くの疾患に関して新規診断マーカーや創薬候補の探索に一石を投じることを可能とした。今後、本手法を活用することで、上述のような医療分野への還元を推進するとともに、基礎医学分野でも極微量分析システムとして様々なアプリケーションへと適用範囲を拡大したい。最終的に1細胞解析技術へと発展させるための土台は完成した。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

細胞1つから採取可能なタンパク質は極めて微量であるため、従来技術では1細胞プロテオームの網羅的解析は困難でした。本研究では、①細胞をキャピラリー内で分解することにより、細胞からタンパク質を効率よく回収する、②カラムを小型化し、回収タンパク質を分離過程で失うことなく測定機器に導入する、③測定機器での検出効率を向上する技術を開発し、従来法と比べて25倍以上の検出感度を達成し、100個程度の細胞を集めることで、十分な種類のタンパク質の同定・定量が可能としました。既に大型の細胞からは1細胞プロテオームを実現しています。近い将来、この技術のさらなる発展によって色々な種類の細胞において、1細胞レベルでのトランスクリプトームとプロテオームの対応づけができるようになり、また、1つ1つの細胞の営みや、個性を解き明かされてゆくことが期待されます。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Sugiyama N, Miyake S, Lin MH, Wakabayashi M, Marusawa H, Nishiumi S, Yoshida M, Ishihama Y. Comparative proteomics of *Helicobacter pylori* strains reveals geographical features rather than genomic variations. *Genes to Cells*. in press
2. Miki T, Awa M, Nishikawa Y, Kiyonaka S, Wakabayashi M, Ishihama Y, Hamachi I. A conditional proteomics approach to identify proteins involved in zinc homeostasis. *Nat Methods*. 2016, **13**, 931-937

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 白井 学、錦織 充広、若林 真樹、高橋 篤、大谷 健太郎、土持 裕胤、瀧原 義宏、森崎 隆幸、南野 直人、加齢等のストレスに対する成熟心臓の恒常性維持機構におけるポリコーム遺伝子 Pcgf5 の機能解析、第 41 回分子生物学会年会 (2018)
2. 若林 真樹. 微量試料のプロテオーム解析に資する分析手法の開発と応用. 第 69 回日本細胞生物学会大会 (2017)
3. 若林 真樹. 極微量試料のプロテオーム解析手法の開発～1 細胞解析プラットフォームの構築を目指して～. 日本プロテオーム学会 2016 年大会 (2016)
4. Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama. Single-cell proteome profiling: Innovations in sample preparation. 15th Human Proteome Organization World Congress (HUPO2016) (2016)
5. Masaki Wakabayashi, Yasushi Ishihama. Single cell proteome profiling using highly sensitive LC-MS system and In-capillary sample preparation method. 8th Asia Oceania Human Proteome Organization Congress (2016)

世界最高分解能でゲノムの構造を解析

谷口 雄一（理化学研究所 生命機能科学研究センター・ユニットリーダー）

研究課題名：「1細胞内多階層オミックス動態の連関性」 研究期間：2015.10～2019.03

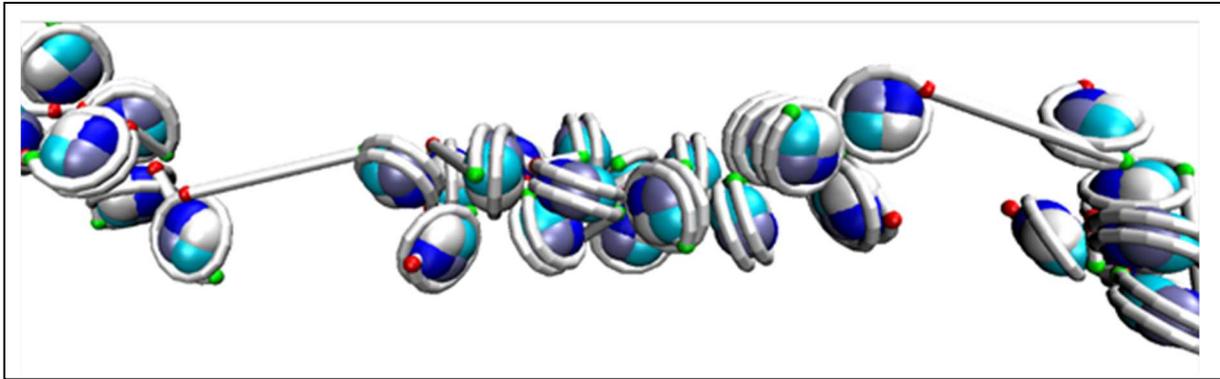


図 超高分解能で導かれたゲノム DNA の 3 次元構造

本研究課題で開発した技術により、DNA 分子がヒストンと呼ばれる分子に一周半ずつ巻き付くことにより形成される、「ヌクレオソーム」と呼ばれる構造単位でのゲノムの3次元構造が解析できるようになりました。白い紐状の物体が DNA、青色・水色・灰色・白色の球体がヒストンに相当しています。赤色・緑色の球体はヒストンに対する DNA の巻き付き開始・終了点に対応しています。

ヒトを含む生命においては、ゲノム DNA の配列が各遺伝子の情報をコードし、またゲノム DNA の構造と遺伝子の発現が連動する形で、分化や代謝などを初めとする様々な生命機能の制御が実現されています。本研究課題では、ゲノム DNA の 3 次元構造を、その最小構成単位であるヌクレオソーム構造の分解能で決定する方法を世界に先駆けて開発しました（上図参照。論文 1、4）。そして、4 つの隣り合ったヌクレオソーム同士が単位構造を形成しており、それらが開構造と閉構造の 2 種類を切り替えることでゲノムの反応性が制御されることを新たに発見しました。

本研究成果は、細胞内の遺伝子の制御状態を分子レベルで理解し、人為的に制御する為の基盤になるものであり、新規の薬剤デザインの開発や、iPS 細胞や培養臓器の効率的な作製など、医学・生物学の幅広い研究に貢献することが期待できます。

一方で本研究課題では、血液診断などの分子診断における病原性分子の検出を、従来よりもはるかに高い超高感度で行う方法の開発を行いました（論文 2、3、5）。1 分子蛍光イメージング法という手法を用いることで、病原性分子の検出を 1 分子レベルで行えるようになり、分子検出の感度を従来よりも百万倍以上高めることに成功しました。

本技術は、すい臓がんやエイズなど、従来の方法では感度的に検出が難しかった疾病の診断に大きく役立つと考えられます。

>>参考情報

➤ 論文

1. Ohno M., et al., *Cell* 2019 年 1 月掲載予定
2. Priest D. G. et al., *Scientific Reports* 7, 17 750 (2017)
3. Simon L. et al., *Bioconjugate Chemistry* 29, 2541-2549 (2018)
4. Ohno M., et al., *Biochem. Soc. Trans.* 46 491-501 (2018)
5. Simon L. et al., *JoVE* 2019 年掲載予定

➤ 特許出願

1. データ解析装置、プログラム及び記録媒体、並びにデータ解析方法 (2017)
2. 分析装置、プログラム及び記録媒体、並びに分析方法 (2017)

➤ 受賞

1. 「理研産学連携貢献賞」(2017)

➤ プレスリリース

- 「細胞中のタンパク質を全部光らせる」(2018 年 7 月) http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180731_3

たった1つの細胞から全遺伝情報を解読する

細川 正人（早稲田大学 理工学術院総合研究所・次席研究員（研究院講師））

研究課題名：「組織内の細胞多様性を明らかにする超並列ゲノム解析技術の創成」 研究期間：2015.10～2019.3

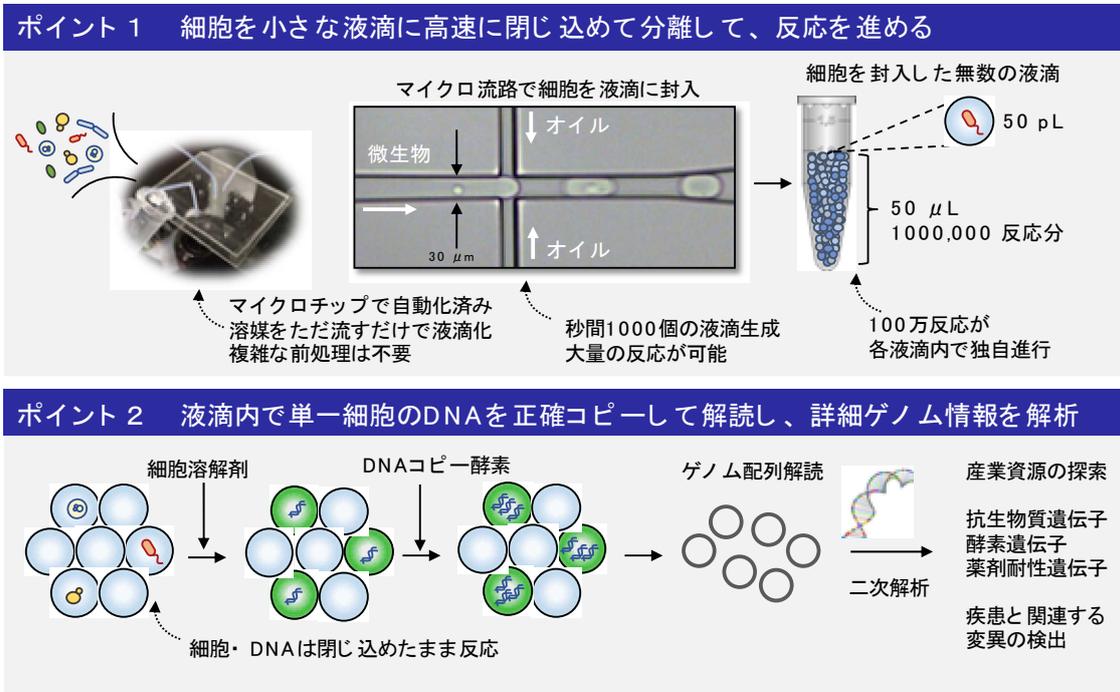


図 単一細胞からの全遺伝情報の解読法

微量液体・生体分子を高密度・高精度に制御することができる「マイクロ流体技術」を駆使し、何万個もの細胞を1つずつ小さな液滴で閉じ込めて反応を進めます。微小な反応環境で、何千・何万の細胞を1個単位で処理して、ゲノムDNAを複製することができます。コピーした大量のDNAを個別に読み取ることで、液滴に閉じ込められた細胞1つ1つの全遺伝情報が決定されます。

ゲノム（全遺伝情報）は細胞の個性を説明する基礎情報です。ゲノム配列を解読することで、遺伝子を同定し、未知の微生物の機能を推定することができます。ところが、従来のゲノム解読技術では、細胞1つからゲノム配列を解読するのは非常に困難でした。ゲノム配列の決定には、同じ配列を何度も繰り返し読み取り、精度を保証する必要があります。このために、非常に僅かにしか存在しない遺伝情報を精度よく複製して何万倍にも増やさねばなりません。この操作には、小さな細胞を1つずつ精度高く扱う必要があります、反応中の小さなエラーも許されません。

本研究では、この高度な単一細胞ゲノム解析を網羅的に実行する新技術を開発しました。本法では、マイクロ流路を用いて直径数十 μm の液滴を秒速千個もの速度で作成し、その内部に細胞を1つずつ閉じ込めます。その後、液滴の内部の細胞を薬剤で溶かし、液滴に保持されたDNAを酵素により複製し、読取り可能な量まで個別・並列に

増幅します。小さな液滴内部で精度高く増幅されたDNAの配列を解読することで、細胞一つ一つの遺伝情報を決定することが可能となりました。本技術を使って、これまで未知であった土壌細菌・腸内細菌のゲノムを1細胞単位で一挙解読できることを実証しており、機能や存在がほとんどわかっていない微生物解析において非常に有効な技術であることが実証されています。将来は、ヒトの健康を増進する共生微生物を特定することや、抗生物質や産業用酵素を作り出す新規微生物を探索し、利活用につなげる発見がなされることが期待されます。

>>参考情報

> 論文

1. Kogawa M, et al. Scientific reports 8(1) 205 9 2018 年
2. Hosokawa M et al. Scientific reports 7(1) 5 199 2017 年