

「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

－2019 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: 12 件

備考: 2015 年度採択の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: <https://www.jst.go.jp/pr/info/info1128/index.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ます。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ます。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します。

- 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まれます。また上記の例以外でも魅力的で独創的なアイデアも求めます。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します。

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4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ました。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			11 件	内 訳	3年型	11 件(0 件)
対象数	152 件	28 件			5年型	0 件(0 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ます。

・福山 真央 研究者(2015 年度採択)

ライフイベントにより研究を一時中断し、2020 年 3 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

2016 年 10 月～2020 年 3 月(2016 年採択研究者の 11 名)

2015 年 10 月～2020 年 3 月(福山真央研究者:2015 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:12 回

CREST/さきがけ合同会議:1 回

・2016 年 11 月 18 日 第 2 回 日本科学未来館 未来館ホール

3 期生成果報告会:1 回

・2019 年 12 月 28 日 第 5 回成果報告会 第 42 回分子生物学会年会・サテライトシンポジウム
博多マリンメッセ

その他:3 回

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 日-30 日 MPIF-JST Joint Workshop on Neuroscience and Single Cell Research

Max Planck Florida Institute for Neuroscience (MPFI) Florida (UAS)

・2018 年 10 月 25 日-11 月 3 日 押し掛け講演 MPFI、University of Texas, Austin, Colombia University, Stanford University

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

- ・2019 年 3 月 4 日-5 日 12th International workshop on approaches to single cell analysis
Uppsala University, Uppsala (Sweden)
- ・2019 年 3 月 1 日-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 (Switzerland)

第 57 回生物物理学会 共催シンポジウム 宮崎シーガイアコンベンションセンター

- ・2019 年 9 月 24 日 生物物理学会にてシンポジウム“さががけ「1 細胞」は何をやっている？ 1 細胞研究の
醍醐味と技術革新”を開催し、6 名のさががけ研究者が研究成果を報告しました。

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いました。

(事後評価の流れ)

- | | |
|------------|-------------|
| 2020 年 1 月 | 評価会開催 |
| 2020 年 3 月 | 研究総括による事後評価 |
| 2020 年 3 月 | 被評価者への結果通知 |

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いました。

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 12 名の研究者がさががけ研究期間を満了しました。外部発表では、論文数 81 件(国際 80 件、国内 1 件)、口頭・ポスター発表 260 件(国際 79 件、国内 181 件)、総説等の著作物 19 件(国際 7 件、国内 12 件)、特許出願 11 件(国内 9 件、外国 2 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 41 件、国内招待講演が 62 件と、国内外からもさががけ「1 細胞解析」領域-3 期生の研究成果が高く評価されていたことが窺えます。今年度さががけ研究を終了した 12 名の内、本さががけ研究期間中に、平林祐介研究者が文部科学大臣賞・若手科学者賞を、他研究者も諸団体から多数の受賞をしています。また、山口哲志研究者は、2019 年度 JST 未来創造事業「共通基盤」領域に、課題「細胞資源を活用する細胞間相互作用の精密創成技術」が採択されており、奥田寛研究者は 2019 年度に CREST「多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出」領域において、さががけ 1 期生の今吉格研究者(京都大学大学院生命科学研究科)、磯部圭佑研究者(理化学研究所光量子工学研究領域)とともに提案した課題「力学場と生化学場の相互作用の計測・操作と予測」が採択されています。これらのことは、研究者の業績を高く認知いただいている証と考えています。

本領域では、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が生まれる場となることを意図しました。この期待に応え、3 期生も、領域の各種催しに積極的に参加し、1 期生、2 期生を交え、異分野の研究者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分かり易く説明することにつとめ、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、各々の研究を磨き合うことができました。さらには、ここで生まれたネットワークから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、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させて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、本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多細胞ダイナミクスを 3 次元的に統合的に記述する汎用三次元パーテックスモデルを開発した奥田寛研究者にライジングスター賞を、画期的な耐光性脂質プローブを開発した多喜正泰研究者にイノベーション賞を、次世代の神経科学分野を拓く技術を開発した平林祐介研究者と三國貴康研究者に特別賞を授与しました。

1) 福山 真央 研究者「自然乳化を利用したマイクロ水滴内単一細胞イムノアッセイ」

単一細胞分泌物の高スループット測定のために、マイクロメートルサイズの油中水滴(マイクロ水滴)内での、単一細胞分泌物のイムノアッセイ法の開発を行い、数十万分子(zeptomole程度)のタンパク質の計測を実現しました。当初は形になるのか不安要素が大きかったテーマですが、多くの試行錯誤を経た結果として、形になってきたことは大いに評価できます。相分離が非常に大きな注目を集めていることからわかるように、テーマ設定の先見性は素晴らしいと考えられます。特許出願も一定の成果と評価されます。今後は本研究で得られた成果を、生物学的課題へと展開することが期待されます。

2) 青木 航 研究者「1 細胞レベルで脳高次機能とニューラルネットワークの関係を網羅的に明らかにするリバースオプトジェネティクス」

仮説フリーに、行動とニューロンの関係を網羅的に解析することができるリバースオプトジェネティックな探索系の構築を線虫において成功したことは、十分に評価に値します。まだ原理実証の段階と考えられますので、今後この手法ならではの生物学的新規知見の発見や、他研究者への技術の普及、他のモデル動物を用いる研究者などへの展開にも期待します。研究リーダーとしての能力は十二分で、領域内の Discussion リーダーとして領域内の議論を盛り上げた功績は大きいと評価します。

3) 遠藤 達郎 研究者「細胞内機能を模倣したポリマー製フォトニック結晶ナノ共振器アレイの創製と 1 細胞代謝産物の非染色検出・定量への応用細胞多様性決定要因の網羅解析技術の開発」

フォトニクス結晶をポリマーで作製し、イオンや抗原抗体、酵素反応など多様なセンシングを可能にした点は評価できます。非標識検出系は、今後、重要度を増してゆくと期待される分野と考えられます。量産も可能とのことですので、本技術ならではの応用に適した生命科学や医療上の課題・ニーズを見つけることが、本技術の発展のキープポイントであると思われます。

4) 奥田 寛 研究者「1細胞動態の統合モデリングによる三次元組織形成の予測制御」

三次元で器官形成現象を予測する三次元バーテックスモデルの構築は先端的で重要な研究であり、眼杯形成機構のモデリング研究はウエットな実際の実験データと組み合わせられて素晴らしいものにまりました。力学、理論生物学の専門家として領域の発展にも十分に貢献しました。今後この基盤技術を拡張しながら、さらなる研究の展開を大いに期待しています。これらの成果に対し、本領域からライジングスター賞を贈りました。

5) 加地 範匡 研究者「1 細胞パルペーションデバイスの創製」

マイクロ流体デバイスを活用して、細胞をひとつずつ触ってそのサイズや硬さを調べる方法を開発しました。細胞の弾性などの機械的なパラメータを、1 細胞レベルで解析する技術は先端的で魅力的であり、マイクロデバイスの専門家としての領域への貢献も高く評価します。硬さと合わせて細胞内部の生体分子の数や種類、構造情報が得られるシステムをつくることができれば、診断などの応用研究だけでなく基礎研究の進展へも大きく寄与すると考えられます。

6) 多喜 正泰 研究者「脂質ダイナミクスの精密解析技術の創出」

脂質代謝を可視化する蛍光プローブおよび STED に用いる超耐光性色素の開発は重要なテーマであり、ミトコンドリアや脂肪滴の超解像イメージングを実現する分子プローブ開発は、期待を上回った成果を達成したと言えます。これまで限定されていた STED の応用範囲が大きく広がるきっかけとなる可能性があり、本領域の発展に大きく貢献したと評価できます。特に生きた 1 細胞でのミトコンドリア微細構造の超解像顕微鏡画像は大きなインパクトがありました。領域会議においても、化学者として視点から貴重なコメントで盛り上げました。本領域から、これらの耐光性プローブの開発と領域への貢献に対し、イノベーション賞を贈りました。

7) 舘野 浩章 研究者「超高感度・非破壊1細胞グライコーム解析技術の開発」

増幅することができない糖鎖の情報を、レクチンを介して DNA 情報に変換して増幅可能にするアイデアを提案し、それを実現しました。iPS 細胞からの内胚葉発生の様子を 1 細胞レベルで解析しており、1 細胞のグリコームと RNA-Seq の同時解析にも成功しています。この技術を使って、様々な細胞系において糖鎖解析に取り組む研究者が大きく増えることを期待します。

8) 平林 祐介 研究者「哺乳類生体内単一ニューロンの微細構造観察法開発」

APEX2-Venus 融合タンパク質を使い、電顕の弱点である広範囲の画像集積、3次元化を大いに進展させました。これまで不可能であった単一ニューロンの詳細構造を調べる相関顕微鏡的な方法論を開発したことは高く評価できます。領域会議でも活発に討議に参加し、領域の発展に大きく貢献しました。これらの領域への貢献に対し、本領域から特別賞を贈りました。

9) 文東 美紀 研究者「脳神経系細胞分画技術を基盤とした体細胞変異の解析」

ヒト死後脳前頭葉組織から神経細胞に続いてオリゴデンドロサイト、活性化型マイクログリア、アストロサイトの細胞核も分画する技術を開発しました。これらの単一細胞核由来のゲノムDNAを用いて、脳組織のいずれの細胞種においても1個の細胞当たり数10ヶ所程度の新規L1Hs挿入が異なる位置に見られることを示しました。さらに統合失調症患者前頭葉の単一神経細胞核DNAの解析によって、統合失調症患者で変異が報告されている遺伝子にL1Hs挿入を検出しました。このような神経細胞の一部で生じているL1Hs挿入が疾患に関与する可能性を示したことは、高く評価されます。

10) 三國 貴康 研究者「脳組織内1細胞での内在性タンパク質の網羅的局在・動態解析」

内在性タンパク質を自由自在に標識する技術はニーズも高く、将来性にも期待が持てる技術です。さきがけ研究開始時にマウス胎児に適用可能な原型はすでに完成していたとはいえ、さきがけ研究期間中に、アデノ随伴ウイルスを用いて成体脳組織でも内在性のタンパク質を自在に標識する技術へと大きな進展させたことは高く評価されます。これにより SLENDR がより汎用性の高いものとなったと言えます。領域内での議論にも積極的に参加しており、領域全体への功績も評価します。これらの傑出した成果と領域活動に対し、本領域からは特別賞を贈りました。

11) 山口 哲志 研究者「光応答性細胞固定化剤表面を用いた1細胞操作技術の開発と応用」。

細胞を基質に結合する過程を ON/OFF できる光反応性化合物の開発は極めて有用なツールであり、1細胞解析のテーマとして十二分に先鋭的かつ魅力的なテーマでした。多くのプロトタイプ化合物を作成し、この手法の可能性を見せています。今後は、具体的なターゲットを有する生物系の研究者とともに実践応用の展開とツールのブラッシュアップが必要であり、その方向の展開が期待されます。領域内で、生命科学研究者や技術開発研究者の両者と積極的に共同研究を進めた点も評価できます。

12) 吉本 敬太郎 研究者「間葉系細胞の機能を制御する核酸アプタマースキャフォールド」

アプタマーを用いた細胞接着の制御法の開発は、今後の発展が見込まれる重要な技術であり、その達成に向けて着実に技術改良を進めたと評価できます。種々アプタマーを迅速に取得する技術は、種々の方面で活用が可能と思われ、基礎研究に寄与するほか、様々な医療・産業にも応用されてい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2020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、2020年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	1	80	81
口 頭・ポスター	181	79	260
その他	12	7	19
合 計	194	166	360

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
9	2	11

(3)受賞等

・福山 真央 研究者

化学とマイクロ・ナノシステム学会 若手優秀賞(2019 年 5 月)

・遠藤 達郎 研究者

5 回ネイチャー・インダストリー・アワード特別賞(2016 年 1 月)

第 46 回(2019 年春季)応用物理学会講演奨励賞(2019 年 9 月)

・奥田 覚 研究者

Poster Award “Biology Prize”(2018 年 1 月)

日本機械学会奨励賞(2017 年 4 月)

Yamaguchi Medal 2017, Asian-Pacific Association for Biomechanics(2017 年 7 月)

2018 JBSE Papers of the Year(2019 年 3 月)

2018 JBSE Graphics of the Year(2019 年 3 月)

・加地 範匡 研究者

第 6 回 IRMAIL サイエンスグラント「シンキー賞」(2019 年 7 月)

・多喜 正泰 研究者

第 36 回とやま賞(2019 年 5 月)

・館野 浩章 研究者

第2回バイオインダストリー奨励賞(2018 年 7 月)

・平林 祐介 研究者

平成 31 技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者(2018 年 4 月)

・文東 美紀 研究者

熊本大学女性研究者賞表彰(2017 年 3 月)

・三國 貴康 研究者

次世代脳プロジェクト若手優秀発表賞(2018 年 12 月)

日本神経科学学会奨励賞(2019 年 7 月)

日本生理学会奨励賞(2017 年 3 月)

・吉本 敬太郎 研究者

第 66 回高分子学会年次大会・優秀ポスター賞(2017 年 5 月 31 日)

日本生物工学会 2017 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー・ポスター賞(2017 年 7 月)

日本分析化学会第 66 年会 RSC Analyst 賞(2017 年 9 月)

(4)招待講演
国際 41 件
国内 71 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(2020年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
福山 真央 (兼任)	自然乳化を利用したマイクロ水滴内単一細胞イムノアッセイ (東北大学多元物質科学研究所)	東北大学多元物質科学研究所助教 (京都工芸繊維大学戦略推進機構グローバルエクセレンス助教)	42
青木 航 (兼任)	1 細胞レベルで脳高次機能とニューラルネットワークの関係を網羅的に明らかにするリバースオプトジェネティクス	京都大学大学院農学研究科 助教 (同上)	41
遠藤 達郎 (兼任)	細胞内機能を模倣したポリマー製フォトニック結晶ナノ共振器アレイの創製と1細胞代謝産物の非染色検出・定量への応用	大阪府立大学大学院工学研究科 准教授 (同上)	45
奥田 覚 (兼任)	1 細胞動態の統合モデリングによる三次元組織形成の予測制御	金沢大学ナノ生命科学研究所 准教授 (理化学研究所多細胞システム形成研究センター基礎特別研究員)	50
加地 範匡 (兼任)	1 細胞パルペーションデバイスの創製	九州大学大学院工学研究院 教授 (名古屋大学大学院工学研究科准教授)	45
多喜 正泰 (兼任)	脂質ダイナミクスの精密解析技術の創出	名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 特任准教授 (同上)	44
舘野 浩章 (兼任)	超高感度・非破壊 1 細胞グライコーム解析技術の開発	産業技術総合研究所創薬基盤研究部門 上級主任研究員 (同上 主任研究員)	41
平林 祐介 (兼任)	哺乳類生体内単一ニューロンの微細構造観察法開発	東京大学大学院工学系研究科 准教授 (コロンビア大学神経科学科 ポストドクトラルフェロー)	54
文東 美紀 (兼任)	脳神経系細胞分画技術を基盤とした体細胞変異の解析	熊本大学大学院生命科学研究部 准教授 (同上)	40
三國 貴康 (兼任)	脳組織内 1 細胞での内在性タンパク質の網羅的局在・動態解析	新潟大学脳研究所 教授 (マックスプランクフロリダ研究所神経情報伝達部門 リサーチフェロー)	44
山口 哲志 (兼任)	光応答性細胞固定化剤表面を用いた1細胞操作技術の開発と応用	東京大学先端科学技術研究センター 准教授 (同上 講師)	42
吉本 敬太郎 (兼任)	間葉系細胞の機能を制御する核酸アプタマースキャフォールド	東京大学大学院総合文化研究科 准教授 (同上)	41

研究報告書

「自然乳化を利用したマイクロ水滴内単一細胞イムノアッセイ」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 福山 真央

1. 研究のねらい

本研究では、単一細胞分泌物の高スループット測定をめざし、マイクロメートルサイズの油中水滴(マイクロ水滴)内での、単一細胞分泌物のイムノアッセイ法の開発を目的とする。これまで、マイクロ水滴は単一細胞の分析場として注目を集めてきたが、細胞の分泌物を測定は困難だった。これは、イムノアッセイで必要となる、分析ターゲットと結合した標識分子と未結合の標識分子の分離(B/F分離)操作を、液滴内で行うことが困難なためである。本研究では自然乳化という油水界面現象をマイクロ水滴内包物の選択的濃縮法を B/F 分離に応用し、マイクロ水滴中の単一細胞イムノアッセイ法を確立することを目的とした。本イムノアッセイ法は、マイクロ水滴外部に界面活性剤を流すだけという、シンプルな操作でイムノアッセイ法の前処理が可能になる。そのため、イムノアッセイ用のシンプルなマイクロ流体デバイスをセルソーターなど既存の単一細胞分析装置に接続するだけで、これまで困難だった高スループットな単一細胞分泌物アッセイが可能になる。

2. 研究成果

(1) 概要

マイクロ水滴内イムノアッセイを実現するためには、自然乳化現象を理解・制御することが重要である。この自然乳化の現象は、19 世紀から知られている現象であるが、未だ不明な点が多くある。そのため、まず自然乳化のメカニズムの解明を目指した。具体的には、マイクロメートルサイズの空間にマイクロ水滴を閉じ込め、自然乳化中に発生するマイクロ水滴-ナノ水滴間の物質輸送を解析することで、Span 80 によって起こる自然乳化のメカニズムを解明し、マイクロ-ナノ水滴間の物質輸送の特性を明らかにした。

次に、細胞培地など高濃度のタンパク質を含むマイクロ水滴を操作するためのポリジメチルシロキサン (PDMS) 製のマイクロ流体デバイスを開発した。細胞培地など高濃度のタンパク質を含む溶液でもマイクロ水滴を作製するために、新たな溶媒応答性の表面処理を開発した。その結果として、高濃度マイクロ水滴を多数同時に作成するデバイスを実現した。

そしてこの結果を踏まえ、界面活性剤種類を最適化し、自然乳化を利用したマイクロ水滴内でのイムノアッセイを確立した。本研究では数十万分子(zeptomolar程度)のタンパク質の計測が可能になった。

(2) 詳細

研究テーマ1. 自然乳化中における分子分配挙動の解析

本研究で着目する Span 80 を用いた自然乳化では、非イオン性界面活性剤である Span 80 を含む有機相に、水相を接触させると、100 nm 程度のサイズのナノ水滴が自発的に生成する。自然乳化時の水相-ナノ水滴間の水および溶質輸送を解析するために、マイクロ流体デバイス中のマイクロ水滴を用いることを着想した。マイクロ水滴は比表面積が高いため自然乳化による微量の物質輸送を観察するのに適している。また、マイクロ流路中の流体はレイノルズ数が低く安定な層流を形成するため、再現性の高い実験を行えると考えた。図 1a のように PDMS 製のマイクロ流体デバイス中に 100 – 200 μm サイズのマイクロ水滴をアレイ状に配置し、マイクロ水滴のサイズ変化および蛍光強度変化などを観察した。その結果、水相からミセルやナノ水滴への水の分配の駆動メカニズムおよび、マイクロ水滴-ナノ水滴間の溶質分配のカイネティクスが明らかになった (図 1b)。また、これらの研究結果をもとに、定倍率濃縮が可能になり、タンパク質定量や分子間相互作用観察を実証した。

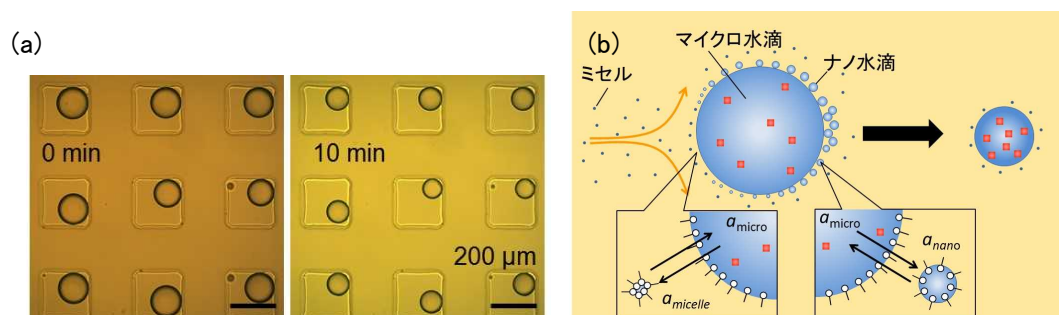


図 1 マイクロ水滴アレイを用いた自然乳化における分子輸送メカニズム解析。

- (a) マイクロ水滴アレイの顕微画像。Span 80 を含むヘキサデカンを連続相として流すと、自然乳化に伴いマイクロ水滴が縮小した。(b) 自然乳化中の水分配メカニズム。

研究テーマ2. 細胞操作用マイクロ流体デバイスの開発

本システムを 1 細胞解析に応用するにあたり、細胞培養のための培地を用いてマイクロ水滴アレイを調整する必要があった。しかし、培地は高濃度のタンパク質を含む水溶液であり、タンパク質が PDMS に吸着し PDMS デバイス壁面を親水化するため、マイクロ水滴アレイの調整が難しかった。そこで本研究ではポリエチレングリコール鎖を PDMS に修飾することで、溶媒応答性界面を持つ PDMS デバイスを初めて開発し、これを用いて培地中の細胞を閉じ込めたマイクロ水滴アレイの作製を実証した (図 2)。

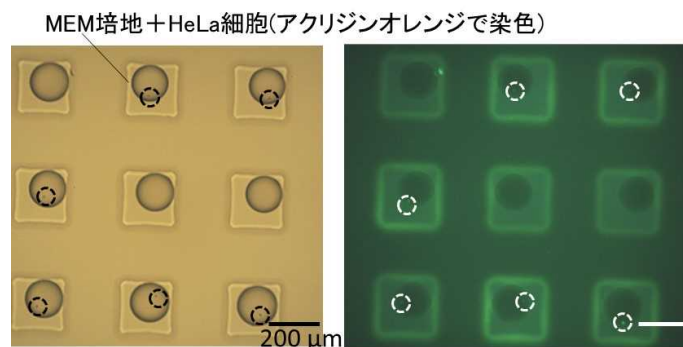


図 2 溶媒応答性界面を持つ PDMS デバイスで調整した 1 細胞入りマイクロ水滴アレイ

研究テーマ3. 1 細胞解析に向けたマイクロ水滴内イムノアッセイ法の確立

本研究以前では、抗体などのタンパク質を自然乳化で生成したナノ水滴に抽出することは難しかった。本研究では界面活性剤種類を検討し、有機相中へのアニオン性界面活性剤の添加により、タンパク質をナノ水滴への抽出しうる条件を見出した。この結果を踏まえ、蛍光色素を修飾した抗体と粒子を修飾した抗体のサンドイッチイムノアッセイ系を用いて、マイクロ水滴中のイムノアッセイを実証した。本手法では、およそ数十万分子の検出を実証した。

3. 今後の展開

本研究では、界面現象に基づく B/F 分離法を利用し、マイクロ水滴内でのイムノアッセイを可能にした。本プロジェクトではタンパク質の定量を実証したが、今後エクソソームなどの分子集合体や核酸などの検出・定量も可能になると考えている。

現在、世界中でマイクロ水滴を用いた 1 細胞解析法が盛んに報告されている。これらの技術ではマイクロ構造を用いたマイクロ水滴操作が必要であり、それによりスループットが決まっている。一方で、本手法マイクロ構造不要の化学操作である。現段階では蛍光検出を用いるため細胞のソーティングにマイクロ構造が必要であるものの、今後、水相/ミセル間の分配機構を適切に調節することで、試薬添加やナノ構造体の除外など、様々な操作を可能とし、マイクロ構造フリーの 1 細胞解析技術を実現したいと考えている。

4. 自己評価

本研究では、細胞の生存率が極めて低い界面活性剤条件ではあるが、マイクロ水滴内でのイムノアッセイを実証した。研究を推進する上で、細胞培養設備およびマイクロファブリケーション設備を整え、更にセルソーターを購入した。また、消耗品としては主に細胞培養用の器具やイムノアッセイ用試薬、界面活性剤を購入した。さらに、研究補助者を雇用し研究の加速を図った。その際も小さな発見を見逃さないように注意を払い、界面活性剤の前処理操作の検討より当初計画にはなかった自然乳化における水輸送メカニズム解明も成し遂げた。また、溶媒応答性 PDMS の調整技術は、タンパク質吸着抑制としての利用目的で問合せが多く、試料提供を行っている。研究者の当初の意図とは違った観点より技術が広がっている。また、本研究により可能となったマイクロ水滴内イムノアッセイは、再生医療分野の細胞の品質管理などに応用されていくと期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mao Fukuyama, Manabu Tokeshi, Mikhail A. Proskurnin, Akihito Hibara

“Dynamic wettability of polyethylene glycol-modified poly(dimethylsiloxane) surfaces in an aqueous/organic two-phase system”

Lab on a Chip, 2018, 18, pp. 356–361.

2. Mao Fukuyama, Akihide Hibara, Yumi Yoshida, Kohji Maeda
“Kinetic Switching of the Concentration/Separation Behavior of Microdroplets”
Analytical Chemistry, 2017, 89 (17) pp. 9279–9283.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

発 明 者: 福山真央、火原彰秀
発明の名称: マイクロ水滴内イムノアッセイ
出 願 人: 東北大学
出 願 日: 2017/5/12
出 願 番 号: 2017-095672

(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(招待講演)

1. 福山真央, 吉田裕美, 前田耕治, 火原彰秀
「ナノ水滴生成を利用したマイクロ水滴内包物の分析前処理操作」
日本分析化学会第 76 回分析化学討論会, 2016 年 5 月.
2. 福山真央
「Sample pretreatments for droplet microfluidics by using nanodroplet formation」
日本化学会第 98 回春季年会, 2018 年 3 月
3. 学会発表(招待講演)
福山真央, 火原彰秀
「自然乳化を利用したマイクロ水滴分析操作の開発」
日本分析化学会第 68 年会, 2019 年 9 月

受賞

1. 平成 30 年度化学とマイクロ・ナノシステム学会若手優秀賞受賞
「界面化学に基づく選択的濃縮法の開発とその応用」
2019 年 5 月

プレスリリース

1. 「細胞一つ一つの個性を解明する分析技術を開発」
2017 年 5 月 社団法人日本分析化学会

研 究 報 告 書

「1 細胞レベルで脳高次機能とニューラルネットワークの関係を網羅的に明らかにするリバースオプトジェネティクス」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 青 木 航

1. 研究のねらい

脳が行動を生み出すメカニズムは、生命科学における最大の謎のひとつである。脳は、感覚ニューロン・介在ニューロン・運動ニューロンが相互に接続しあった複雑なネットワーク構造を形成している。感覚ニューロンにインプットされた情報は、介在ニューロンで計算され、行動という形でアウトプットされるが、その計算プロセスはよくわかっていない。そこで本研究では、仮説フリー・ハイスループット・シングルセル分解能で、ニューロンの機能を網羅的にアノテーションする新規方法論—機能的セロミクス—を確立し、高次機能とニューラルネットワークの関係の解明を試みた。

機能的セロミクスを実装するために、確率的遺伝子発現制御システムであるブレインボウを応用した。ブレインボウとは、Cre/lox 組み換えシステムを利用することで、遺伝子の発現を確率的に制御するものである。我々は、この手法を応用することで、それぞれのニューロンがオプシンで標識されるかどうか 1 細胞ごとに確率的に決定されるシステムを考案した。オプシン標識がランダム化された動物個体ライブラリが得られれば、光照射下で行動実験を行うことで、ノンスタンダードな行動を示す個体が単離できると期待される。さらに、その個体においてどのニューロンがオプシンを発現していたかを同定すれば、各ニューロンの機能を推定できる。このアプローチは、ノンスタンダードな行動を示す動物個体を先に単離し、それに関与するニューロンを後から同定するため仮説フリーである。また、1 度の実験で多数の標識パターンを検証できるため、スループットが高い。さらに、オプシンで標識されるかどうかは 1 細胞ごとに独立して決定されるため、1 細胞分解能である。

本研究により、「この高次機能に重要なニューロンを 1 細胞レベルで網羅的に同定したい」といった要求に確実に応えられる技術基盤を確立し、次世代ニューラルネットワーク解析法におけるデファクトスタンダードを目指す。将来的には、神経ネットワークの構造情報、機能的セロミクスによる網羅的アノテーション、さらに機械学習を組み合わせることで、個体レベルの神経ネットワーク動作モデルの構築が可能になると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

線虫 *Caenorhabditis elegans* は最もシンプルな神経ネットワークを持つモデル生物である。その神経系の構造は既に解明され、302 個のニューロンと約 7000 個のニューロン間結合を持つことがわかっているが、その機能はいまだよくわかっていない。

そこで我々は、各ニューロンが行動に与える機能を網羅的にアノテーションするための新規方法論—機能的セロミクス—を提唱してきた(図 1)。我々は、Cre/lox システムとオプトジェネ

イクスを応用し、ひとつひとつのニューロンに対して光作動性チャネルであるオプシンを制御された確率で標識できる技術を開発した。この技術を用いて、ランダムなパターンでオプシンが発現した線虫ライブラリを構築し、そのライブラリに対して光照射下で行動実験を行い、特徴的な行動を見せた線虫を単離する。さらに、どのニューロンがオプシンで制御されていたかを後から同定することで、ニューロンの機能を1細胞レベルで仮説フリーにアノテーションすることができる。

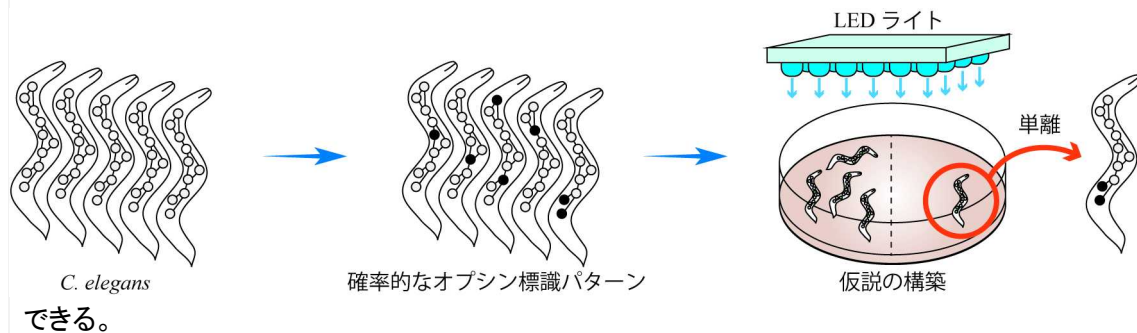


図1:新規方法論「機能的セロミクス」。オプシンを発現するかどうか1細胞ごとに確率的に決定される。オプシン発現パターンがランダム化された線虫ライブラリに対して光照射下で行動を観察することで、行動とニューロンの関係を網羅的に調べることができる。

我々は、機能的セロミクスを線虫に実装し、確率的なオプシン標識を実現した (Sci. Rep., 2018)。また、多数の Cre/lox 変異配列を創出し、自由にオプシン標識率を制御できることを示した (unpublished)。さらに、この方法論を線虫の産卵行動に適用し、ひとつの HSN ニューロンの活性化が産卵行動の十分条件であることを示した (Sci. Rep., 2018)。機能的セロミクスをさまざまな行動系に適用することで、脳の普遍的計算原理を理解できるようになると期待される。

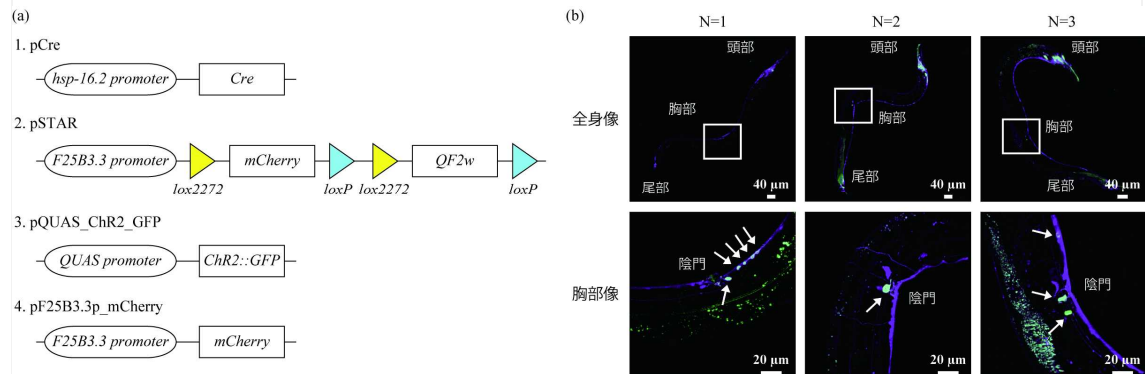
(2) 詳細

研究テーマ A「機能的セロミクスの提唱と線虫 *C. elegans* への実装」

機能的セロミクスを線虫に実装するために、4つのプラスミドを設計した(図2a)。pCre プラスミドは、ヒートショックに応じて Cre リコンビナーゼを発現する。pSTAR プラスミドは、ブレインボウ技術に基づく確率的標識を実現するための核となる要素である。具体的には、全ニューロンで働くプロモーター (*F25B3.3p*) の下流に、2種類の lox 配列 (loxP 配列と lox2272 配列) を交互に配置し、その間に蛍光タンパク質 *mCherry* と転写因子 *QF2^W* を配置した。loxP 配列と lox2272 配列は機能的に直交しており、どちらか片方のみが Cre によって認識されて組み換えられる。pQUAS_ChR2_GFP は、転写因子 *QF2^W* に依存してオプシン (チャネルロドプシン 2、ChR2) と GFP の融合タンパク質 (ChR2-GFP) を発現させる。さらに、Cre が働いた後も *mCherry* の標識を継続させるために、pF25B3.3p_mCherry を構築した。

これらのプラスミドを線虫に導入すると、初期状態では全ニューロンで *mCherry* が発現するが、Cre によって lox2272 間の配列が組み換えられた場合のみに、転写因子 *QF2^W* が発現しはじめる。*QF2^W* が誘導されると、ChR2-GFP が発現し、そのニューロンを光依存的に活性化できるようになる。蛍光タンパク質 GFP が ChR2 と融合しているため、どのニューロンでオプシンが

発現しているかは、蛍光顕微鏡で簡単に同定可能である。実際に、線虫 *C. elegans* の形質転換体を樹立し、ヒートショックを与え、ChR2-GFP が制御された確率で標識されているかどうか



を確認した。独立した3つの個体を観察したところ、ChR2-GFP は各個体において異なるパターンで発現していることがわかった(図 2b)。

図 2: オプシンの確率的標識の実証。(a) 機能的セロミクスを線虫に実装するために、4 つのプラスミドを構築した。pCre は、ヒートショックにより Cre を誘導する。pSTAR は mCherry を全ニューロンで発現するが、*lox2272* 間で組み換えが起きた場合に限り転写因子 QF2^w を発現する。pQUAS_ChR2_GFP は、転写因子 QF2^w に依存してチャネルロドプシン 2 と GFP の融合タンパク質 ChR2-GFP を発現させる。pF25B3.3p_mCherry は、組み換え後も全ニューロンを mCherry で標識する蛍光マーカーである。(b) 4 つのプラスミドを導入した *C. elegans* にヒートショックを与え、12 時間後に蛍光を観察した。その結果、ChR2-GFP を発現するニューロンはランダム化されていた。矢印で示された白い細胞が、ChR2-GFP で標識された細胞である。

研究テーマ B「機能的セロミクスの線虫産卵行動への適用」

機能的セロミクスの概念実証を目指して、我々は線虫の産卵行動に着目した。線虫の産卵行動は、2 つの Hermaphrodite-Specific Neurons (HSNs, HSNR および HSNL) を中心とした比較的シンプルなサブネットワークによって制御されていることが知られている。もし機能的セロミクスを用いて HSNs のリアノテーションを迅速に行うことができれば、機能的セロミクスの概念を実証できると考えた。まず、ChR2-GFP が確率的にラベルされた線虫ライブラリを構築した。次に、その線虫ライブラリに光を照射し、動画で行動を撮影した(図 3ab)。多数の線虫個体を解析したところ、65%の線虫が光依存的な産卵行動を示すことがわかった(図 3c)。ネガティブコントロールとして、オプシンの補因子である all-*trans*-retinal (ATR) を含まない条件で同様の実験を行ったところ、産卵行動は認められなかった。

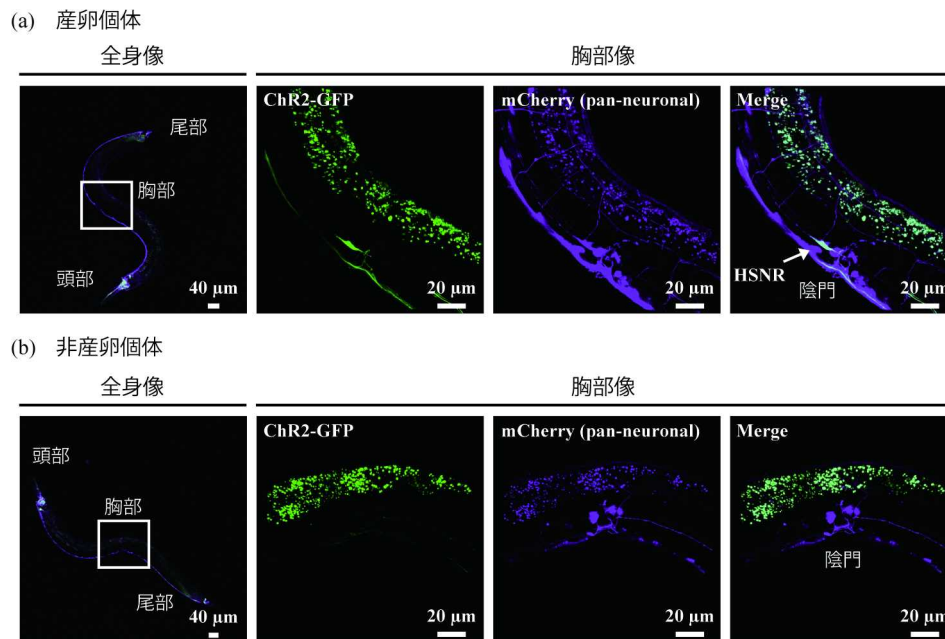


図 4: 共焦点顕微鏡による産卵ニューロンのアノテーション。(a) 産卵個体を共焦点顕微鏡で観察したところ、HSN ニューロンにオブシンが発現していた。ChR2-GFP を発現しているニューロンを矢印で示す。(b) 非産卵個体を共焦点顕微鏡で観察したところ、HSN に ChR2-GFP は発現していなかった。

3. 今後の展開

我々は世界で初めて、仮説フリー・ハイスループット・シングルセル分解能でニューロンの機能を網羅的にアノテーションする新規方法論—機能的セロミクス—のコンセプトを提唱し、その概念を実証した。この方法にはさまざまな強みが存在する。第一に、特別な機器を必要としないため、導入コストが低い。第二に、一匹の遺伝子組み換え体から無数の標識パターンを生み出せるため、仮説フリーかつハイスループットである。第三に、オブシンが発現するかは1細胞ごとに望みの確率で決定されるため、1細胞分解能である。線虫においては、左右対称のニューロン対をプロモーターで区別することは比較的難しいが、機能的セロミクスではそのようなニューロン間でも特異的標識が可能になる。第四に、オブシンに限らずさまざまなエフェクターを利用できるため、拡張性が高い。ニューロンの活性化・抑制・除去・遺伝子発現制御など、さまざまな介入が可能になるだろう。機能的セロミクスは、従来の仮説主導型オプトジェネティクスと相補的な役割を果たすことで神経系の動作原理解明に寄与すると考えられる。将来的には、構造的セロミクスの情報、機能的セロミクスによる網羅的なアノテーション、さらに機械学習を組み合わせることで、個体レベルの神経ネットワーク動作モデルの構築が可能になると期待される。

4. 自己評価

● 研究目的の達成状況

本研究の主要研究項目であった、①機能的セロミクスの実証、②自由自在なオプシン標識効率の制御、③多様なニューロン活性制御ツールの確立、④線虫行動に関する網羅的ネットワーク解析において、当初目的を達成した。①機能的セロミクスの実証においては、線虫をモデルとして、オプシンの確率的標識を実現した。②自由自在なオプシン標識効率の制御においては、網羅的な *lox* 変異体ライブラリを創出し、*S. cerevisiae* を用いて切断効率を網羅的に評価した。さらに、得られた *lox* 変異体を用いることで、自由自在なオプシン標識効率の制御が可能なることを示した。③多様なニューロン活性制御ツールの確立においては、線虫においてさまざまなオプシンやアポトーシス誘導タンパク質など、多様なツールを実装した。④線虫行動に関する網羅的ネットワーク解析においては、線虫産卵行動をモデルとして、2つ存在する HSNs のうち、片方のみの活性化で産卵行動が誘導されることを証明した。また、当初計画が順調に進んだため、1細胞特異的にプロテオーム解析を行うための BONCAT system の実装にも挑戦し、その結果未知 GPCR の同定にも成功している。これらの成果から、当初目標を上回る成果を得られたと考えられる。

● 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、京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻 生体高分子化学分野(植田充美研究室)で実施した。研究代表者である青木が研究プランの策定を行い、大学院生 4 人とともに研究を推進した。また、明治大学の新屋良治講師、中部大学の長谷川浩一准教授と共同研究を推進し、Scientific Reports に論文を発表するとともに、多数の学会で発表を行った。

研究費の執行に関して、微分干渉顕微鏡や実体顕微鏡など、線虫研究を効率的に推進するための設備を整え、また、遺伝子実験やタンパク質実験、線虫行動実験を行うための消耗品を購入した。さらに、研究内容に関する発表および議論を行うための旅費として使用し、そこから有意義な共同研究に至った。

● 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)

本研究において、世界で初めて、仮説フリー・ハイスループット・シングルセル分解能でニューロンの機能を網羅的にアノテーションする新規方法論—機能的セロミクス—のコンセプトを提唱し、その概念を実証した。機能的セロミクスは、従来の仮説主導型オプトジェネティクスと相補的な役割を果たすことで神経系の動作原理解明に寄与すると考えられる。将来的には、構造的セロミクスの情報、機能的セロミクスによる網羅的アノテーション、さらに機械学習を組み合わせることで、個体レベルの神経ネットワーク動作モデルの構築が可能になると期待される。また、自閉症などヒトのさまざまな疾患が、ニューラルネットワークの接続パターンもしくは計算プロセスの変化により生じていることが示唆されつつあり、本研究によるニューラルコンピューティングの基本原則の理解は、それらの疾患がなぜ生じるのかを理解し、創薬に繋げる上で貴重な知見になると期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. **Aoki W**, Matsukura H, Yamauchi Y, Yokoyama H, Hasegawa K, Shinya R, Ueda M. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. *Sci Rep.*, 2018, 8(1), 10380

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

プレスリリース

1. 神経ネットワークの機能を解明する光遺伝学的操作法を開発 ―脳動作原理の解明を目指したバイオテクノロジーの展開― 京都大学プレスリリース.
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2018/180710_1.html

著作物

1. 脳機能の解明を目指した個体レベルの data-driven science の実装. AI 導入によるバイオテクノロジーの発展, シーエムシー出版, 2018.

学会発表

1. Aoki W. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. Max Planck Florida Institute-JST(PRESTO) Joint Workshop on Neuroscience and Single Cell Research, 2018.
2. Aoki W. Cellomics approach for high-throughput functional annotation of *Caenorhabditis elegans* neural network. 12th International workshop on approaches to single cell analysis, 2019.
3. Yamauchi Y, Matsukura H, Aoki W, Ueda M. Analysis of neural networks of *Caenorhabditis elegans* by functional cellomics. ASBMB, 2019.

研 究 報 告 書

「細胞内機能を模倣したポリマー製フォトニック結晶ナノ共振器アレイの創製と 1 細胞代謝産物の非染色検出・定量への応用」

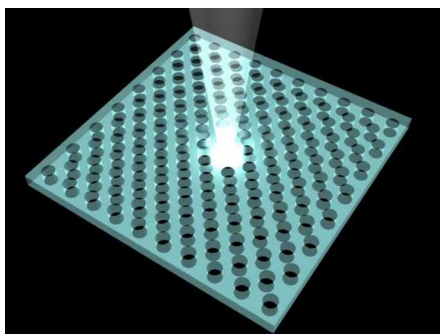
研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年3月

研 究 者: 遠藤 達郎

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、ナノ光学デバイス「フォトニック結晶(Photonic crystal: PhC)ナノ共振器アレイ」(下図)をポリマーを基材として作製し、加えて抗原抗体反応等種々の生化学反応によって誘起される屈折率変化によって観察される PhC ナノ共振器内の光閉じ込め・増幅効率変化を利用し、1 細胞レベルでの代謝産物を非染色にて検出・定量可能なツール(センサ)を開発することにある。



従来、1 細胞レベルでの代謝産物を検出・定量するには蛍光色素等の試薬を用いて染色する必要があった。この染色操作は、煩雑かつ高い技術を要するとともに、検出・定量には高額・大型な観察・検出装置が必要という課題があった。これら課題を解決するために本研究では、前述した PhC ナノ共振器を用いて、①染色が不要で、②安価・簡易な観察・検出装置を用いて、1 細胞レベルでの代謝産物を検出・定量を可能にする。

PhC は、ナノメートルサイズの誘電体が周期的に配列した構造を有する光学素子である。PhC は、この周期構造のサイズ・間隔および PhC 作製に使用する材料の物性(屈折率)を制御することで、任意の波長の光を回折・反射させることが可能である。この光回折・反射特性は、抗原抗体反応や DNA ハイブリダイゼーション等の種々の生化学反応によって誘起される周辺屈折率に対して鋭敏に変化する。加えて、PhC 内へ欠陥を導入すると、欠陥内へ特定波長の光を閉じ込め・増幅させる「ナノ共振器」機能を発現させることが可能である。これは前述した PhC の光回折・反射によって得られる光信号の増幅につながり、細胞代謝産物検出においてさらなる高感度化が実現可能と期待できる。

しかし、PhC ナノ共振器作製には、これまでシリコンやガラス等を基材としたものが報告されているが、作製が煩雑であり、大面積かつ大量に作製するには費用が高額となっていた。そこで本研究ではナノメートルサイズの構造を転写する技術であるナノインプリントリソグラフィーに着目、大量かつ安価に PhC ナノ共振器を作製するとともに、世界で初めて可視光の光を閉じ込め・増

幅可能な PhC ナノ共振器を設計・作製し細胞代謝産物検出・定量へと応用することを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では研究期間内に、①可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討、②ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討、③ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価、④抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出、を実施した。

- ① 可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討では、これまでポリマーという屈折率の低い材料では、可視領域の光閉じ込め・増幅は困難と考えられてきた。しかし本研究では、有限差分時間領域(Finite-difference time-domain: FDTD)法を用いたシミュレーション解析によって、波長 650 nm 近傍の光を閉じ込め、増幅すること可能な PhC ナノ共振器を設計・作製することに成功した。
- ② ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討では、Cyclo Olefin Polymer (COP)をはじめ、poly(vinyl chloride)(PVC)、poly(methyl methacrylate) (PMMA)等種々のポリマーを基材とし、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器を作製することに成功した。加えてポリマー以外にも TiO_2 や Au 等の金属を基材とした場合においても、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器を作製することに成功した。
- ③ ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価では、作製した PhC ナノ共振器を用いて周辺屈折率応答を評価した。加えて、作製した PhC ナノ共振器のセンサ性能評価のため、既存の光学顕微鏡へ搭載可能な光学系の構築を行った。作製した PhC ナノ共振器は、共振器を導入していない PhC と比べ感度を 140 倍高感度化させることに成功した。また、新たに構築した光学系は、市販のファイバー分光器を接続するだけで特性評価が可能である。これは、新たに大型かつ高額な装置を購入することなく、PhC ナノ共振器をセンサとして用いることが可能である。
また PhC ナノ共振器は、作製時に基材中ヘイオノフォアや、リン脂質等分子認識素子を包含させると、イオンセンサや味覚センサへの応用が可能であることを明らかにし、その性能は既存のセンサと比べ 10 倍以上低濃度の測定対象物質を検出可能であることを明らかにした。
- ④ 抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出では、PhC ナノ共振器上へ特定の抗原(測定対象物質)に対して特異的な抗体を固定化し、異なる濃度に調製した抗原溶液を滴下、抗原抗体反応によって誘起される周辺屈折率変化を回折・反射特性変化として観察した。その結果、作製した PhC ナノ共振器は、検出限界 100 fg/ml であった。

(2) 詳細

本研究では研究期間内に、(1)可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討、(2)ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討、(3)ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価、(4)抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出、を実施した。各研究項目の成果詳細を以下に示す。

(1) 可視領域の光を高効率に閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造検討

当該研究項目では、可視光の光を閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器構造を検討した。これまでポリマーという屈折率の低い材料では、可視領域の光閉じ込め・増幅は困難と考えられてきた。しかし本研究では、有限差分時間領域 (Finite-difference time-domain: FDTD)法を用いたシミュレーション解析によって、ポリマーを基材として用いても、波長 650 nm 近傍の光を閉じ込め、増幅すること可能な PhC ナノ共振器 (図 1)を設計・作製することに成功した。

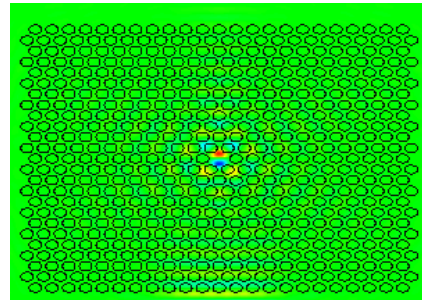


図 1 PhC ナノ共振器内の電界分布

(2) ナノインプリントリソグラフィーを用いた PhC ナノ共振器作製条件の検討

当該研究項目では、Cyclo Olefin Polymer (COP)をはじめ、poly(vinyl chloride)(PVC)、poly(methyl methacrylate) (PMMA)等種々のポリマーを基材とし、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器 (図 2)を作製することに成功した。加えてポリマー以外にも TiO₂ や Au 等の金属を基材とした場合においても、ナノインプリントリソグラフィーを用いて PhC ナノ共振器を作製することに成功した。

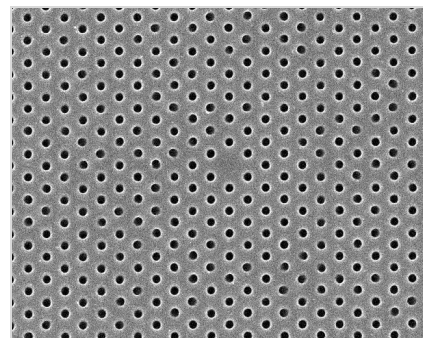


図 2 PhC ナノ共振器内の
走査型電子顕微鏡像

本研究で作製した PhC ナノ共振器は、ナノインプリントリソグラフィーを用いて作製することから鑄型の汚染・破損がない限り同一形状の PhC ナノ共振器を作製することが可能であり、量産が容易であることを明らかにした。

(3) ポリマー製 PhC ナノ共振器を用いたセンサ性能評価

当該研究項目では、作製した PhC ナノ共振器を用いて周辺屈折率応答を評価した。加えて、作製した PhC ナノ共振器のセンサ性能評価のため、既存の光学顕微鏡へ搭載可能な光学系の構築を行った。作製した PhC ナノ共振器は、屈折率応答評価の結果、共振器を導入していない PhC と比べ感度を 140 倍高感度化させることに成功した。また、新たに構築した光学系は、市販のファイバー分光器を接続するだけで特性評価が可能である。これは、新たに大型かつ高額な装置を購入することなく、PhC ナノ共振器をセンサとして用いることが可能であった。

また PhC ナノ共振器は、作製時に基材中ヘイオノフォアや、リン脂質等分子認識素子

を包含させると、イオンセンサや味覚センサへの応用が可能であることを明らかにした。イオンセンサへの応用については、イオノフォアとしてバリノマイシン、味覚センサへの応用にはパルミチン酸を基材中へ包含させることによって作製した。その性能は既存のセンサと比べ 10 倍以上低濃度の測定対象物質を検出可能であることを明らかにした。本成果は、細胞代謝産物の検出・定量に向けた応用だけでなく、本研究で開発した PhC ナノ共振器が食品・農業分野へ応用可能であることを示唆している。

(4) 抗体固定化 PhC ナノ共振器を用いた抗原抗体反応の検出

当該研究項目では、PhC ナノ共振器上へ特定の抗原(測定対象物質)に対して特異的な抗体を固定化し、異なる濃度に調製した抗原溶液を滴下、抗原抗体反応によって誘起される周辺屈折率変化を回折・反射特性変化として観察した。本研究では、アルツハイマー病のマーカー分子として応用が期待されている Amyloid β 、神経損傷マーカーとされている Neuron-specific enolase (NSE)をモデル抗原として抗原抗体反応の検出・定量を行った。その結果、作製した PhC ナノ共振器は、Amyloid β 、NSE とともに検出限界 100 fg/ml であった。この検出限界濃度は、前述した疾病の超早期診断が可能であることを示唆しており、癌や生活習慣病、神経変性疾患など各種疾病の重篤化を未然に防ぐことが期待できる性能であった。

3. 今後の展開

本研究で設計・作製した PhC ナノ共振器は、周辺屈折率変化に対して鋭敏に光学特性変化を示す光学センサとして動作する。これは、抗原抗体反応に限らず、DNA ハイブリダイゼーション等の生化学反応に対しても高感度に検出可能であることを示しており、今後はライフサイエンスだけでなく、医療・創薬・食品衛生・農業等の分野へ展開することで、測定対象物質を高感度かつ簡便・安価に検出・定量可能なセンサ開発が期待できる。これは、医療・創薬においては、疾病の超早期診断・予防、食品衛生においてはアレルギー・食中毒検査、農業においては、感染症の拡大防止が考えられる。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

本研究では、ポリマーという屈折率の低い材料を基材として用い、世界で初めて可視光の光を閉じ込め・増幅可能な PhC ナノ共振器を設計し、実際に 140 倍高感度な光学センサとして応用可能な PhC ナノ共振器を作製することに成功した点が評価できる。加えて作製した PhC ナノ共振器が抗原抗体反応等の生化学反応を fg/ml の極超低濃度の領域で検出・定量することにも成功している。

細胞代謝産物検出・定量においては 1 細胞での検出には至らなかったものの、100 細胞以上の細胞数であれば代謝産物の検出・定量が可能であることを明らかにしている。

・研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究で設計した PhC ナノ共振器は、本さがけ研究に限らず、医療診断等への応用が期待できることから、東京大学医学部附属病院、トロント大学等の研究機関と連携し、応用展開を進めている。加えて、本研究によって得られた成果を基に大阪大学等とも連携し、別

用途への応用も推進している。

・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)

本研究成果は、学会・論文・展示会発表を通じた社会発信、SciFoS (Science For Society) 活動を通じたインタビューにおいて高い評価を得ることができ、企業との連携を現在推進中である。今後はセンサのさらなる高感度化に向けた設計を行うことで、安価かつ簡便に測定対象物質の検出・定量可能なセンサやイメージングデバイスの提供が可能になると期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. S. Aki, K. Sueyohsi, H. Hisamoto, T. Endo Origin of the Optical Response of a Dye-doped Plasticized Poly (Vinyl Chloride)-based Photonic Crystal Ion Sensor, Anal. Sci., 2017 Volume 33, Pages 1247-1251. |
| 2. S. Aki, K. Maeno, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, T. Endo, Development of a polymer/TiO ₂ hybrid two-dimensional photonic crystal for highly sensitive fluorescence-based ion sensing applications, Sens. Actuators B, 2018 Volume 269, Pages 257-263. |
| 3. J. Sun, K. Maeno, S. Aki, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, T. Endo, Micromachines. 2018 Volume 8, Pages 410. |
| 4. Photonic crystals on copolymer film for label-free detection of DNA hybridization, H. Su, X. R. Cheng, T. Endo, K. Kerman, Biosens. Bioelectron. 2018, Volume 103, Pages 158-162. |
| 5. Core-Shell-Structured Gold Nanocone Array for Label-Free DNA Sensing, D. Kawasaki, H. Yamada, K. Maeno, K. Sueyoshi, H. Hisamoto, T. Endo, ACS Appl. Nano Mater., 2019, Volume 2, Pages 4983-4990. |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

(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. 第 5 回ネイチャー・インダストリー・アワード特別賞
2. 第 46 回(2019 年春季)応用物理学会講演奨励賞

研 究 報 告 書

「1細胞動態の統合モデリングによる三次元組織形成の予測制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 奥田 覚

1. 研究のねらい

三次元組織・臓器の形態形成は、構成する個々の細胞の生化学的・力学的な作用によって制御されている。このような多細胞の集団挙動を支配する1細胞の振る舞いは、遺伝子発現・シグナル伝達・細胞骨格モデリングなど、多面的に理解が進んでいる。しかし、この1細胞レベルの多様な動態が、細胞間の多体的な相互作用を介して、三次元組織・臓器レベルの動態を制御する機構については未知なことばかりである。本研究では、この1細胞レベルから組織・臓器レベルまでの動態を包括的に理解するため、細胞の変形・運動・分裂・アポトーシス・遺伝子発現・シグナル伝達など、1細胞レベルの各動態を要素モデル化し、その集合である三次元組織・臓器の現象を予測する三次元バーテックスモデルの開発を目的とした。

本研究計画の実施項目は以下の通りである。

- ① これまで開発した1細胞の変形・運動・分裂・アポトーシス・遺伝子発現・シグナル伝達の各要素モデルを統合し、1細胞の複合的な動態に基づいた三次元組織・臓器の形態形成過程を予測する汎用型三次元バーテックスモデルを構築する。
- ② 実験的に取得した三次元画像データから三次元組織・臓器内部の生化学・力学場を1細胞レベルで抽出し、開発した汎用型三次元バーテックスモデルに導入することにより、実験データに基づいた定量的な数値シミュレーション技術を構築する。
- ③ 開発した定量シミュレーション技術を三次元培養組織のライブイメージングに適用することにより、目標とする形態形成を誘導するために適切な生化学・力学シグナルを予測し、三次元組織・臓器形成の原理解明と人為的な制御を行う。

2. 研究成果

(1)概要

組織・臓器のダイナミクスに関わる研究では、細胞の分化・増殖・力発生など、個々の現象に関わる分子実態の同定が主流であった。一方で、分子レベルの自由度は非常に高く、組織・臓器レベルのダイナミクスを直接的に理解することは容易ではない。これに対し本研究では、細胞の変形、運動、分裂、アポトーシス、遺伝子発現、シグナル伝達、遺伝子発現など、熱力学的・細胞生物学的に既定される1細胞レベルの自由度に基づいて三次元的な多細胞ダイナミクスを統合的に記述する汎用三次元バーテックスモデルを開発した。これにより、1細胞の複合的な挙動に基づいて三次元組織・臓器ダイナミクスをボトムアップに解析する基盤技術を構築した。

開発した汎用型三次元バーテックスモデルは、その高い多用途性により、本研究の対象である神経系組織のみならず、様々な三次元組織・臓器内における多様な1細胞動態に適用できた。そこで、開発した数理モデルを軸として、胚発生や臓器再生、がん浸潤等の機構解明を

目的とする具体度の高い解析, および, 多細胞現象の普遍的な原理解明を目的とする抽象度の高い解析を行った.

(2) 詳細

研究テーマ①「汎用三次元バーテックスモデルの開発」

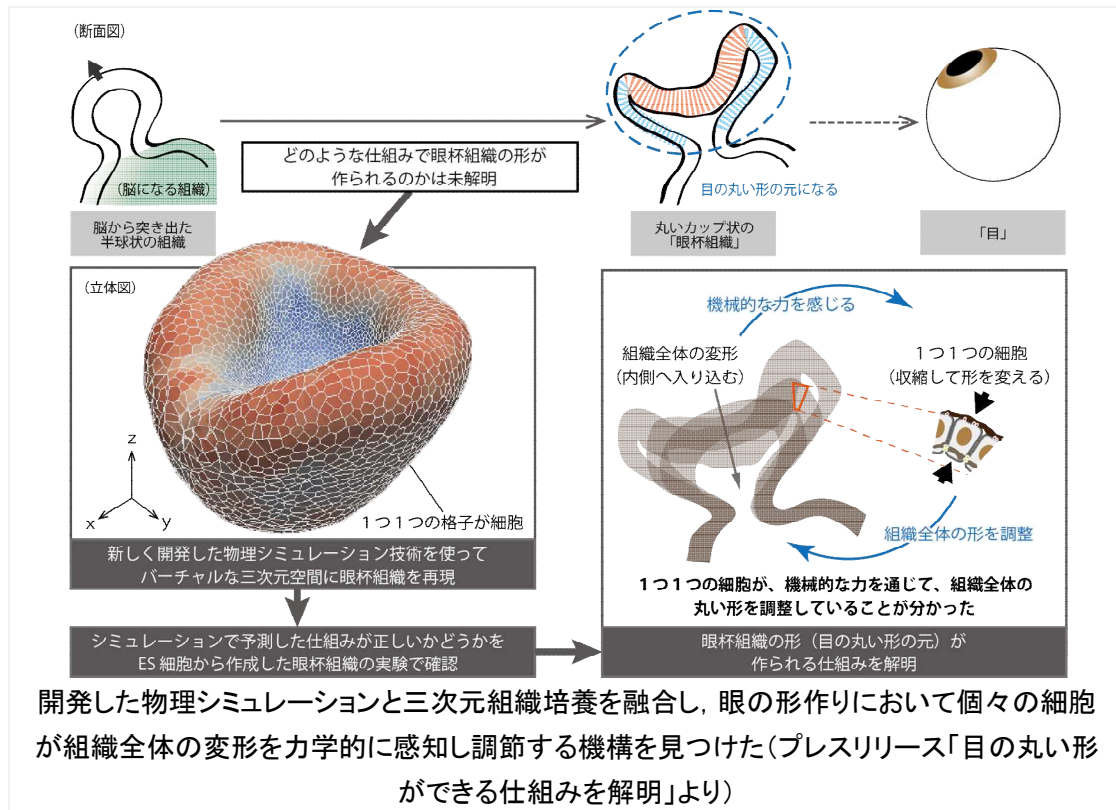
これまでの研究で, 三次元バーテックスモデルを拡張し, 細胞の三次元的な大変形, 粘弾性, 増殖, アポトーシス, シグナル輸送を扱う要素モデルを開発してきた. これらの要素モデルの内, 細胞の大変形時の細胞の配置換え, 分裂, アポトーシスの要素モデルでは, 多面体の頂点と辺を結ぶネットワークの幾何学的なパターン変換を行うためのルールを導入している. 本研究では, このパターン変換におけるネットワークの可逆性と物理量の保存性を考慮して, 各要素モデルを一貫する新しいネットワークの変換ルールを構築し, 多様な細胞挙動を同時に扱える汎用型三次元バーテックスモデルを開発した(J Theor Biol 2018, Sci Rep 2018, Dev Growth Diff 2018, J Biomech Sci Eng 2018, Biophys J 2019).

研究テーマ②「眼杯オルガノイド形成における多細胞動態の定量化」

眼杯組織は, まず, シート状の脳組織の一部が外側へ突き出す. 次に, 突き出たシート状の脳組織の先端が眼杯組織へと分化しながら内側へ入り込み, カップ状の二重構造を作る. さらに, カップの淵の組織が尖ることで, 眼杯組織の丸い形が作られる. 本研究では, ライブイメージングと画像処理を用いて組織の変形量を定量化し, 細胞の平均的な形態と増殖頻度を抽出した. また, 原子間力顕微鏡(AFM)を用いて組織表面の弾性率を計測し, 力学モデルに基づいて細胞表面の弾性率を抽出した. さらに, 過去の文献にあるアポトーシスの領域と頻度のデータとを統合し, 眼杯形成における細胞の力学動態を網羅的に定量化した.

研究テーマ③「眼杯オルガノイド形成における多細胞動態の制御機構の解明」

複雑な眼杯組織の形が作られる仕組みを理解するため, 実験で得た眼杯組織の定量情報を基にしてシミュレーションを行い, 眼杯組織の形態形成に必要な細胞の力発生を予測した. また, 眼杯オルガノイドを用いた力学的・薬理的な摂動実験により, この予測を確かめた. さらにその結果から, 眼杯組織の三次元形態が作られる際には, 一つ一つの細胞が, 眼杯組織全体の変形度合いを感じながら, その形態を微調整していることを見出した(Sci Adv 2018, プレスリリース「目の丸い形ができる仕組みを解明 ―「器官の形作り」の理解から再生医療への貢献に期待―」).



3. 今後の展開

本研究で開発した汎用三次元バーテックスモデルにより、胚発生や疾患などに見られる幅広い多細胞の三次元動態を1細胞レベルから統合的に予測することが可能になった。さらに、開発した数理モデルを眼杯オルガノイドに適用して発見した組織形態の調節機構は、様々な器官の形作りにも共通する可能性がある。したがって、この発見は、基礎生物学における多様な器官の形作りの理解につながり、また、この機構をうまく利用することができれば、試験管内での組織・臓器再生を、より正確に制御できる可能性もある。そこで今後は、発見した組織形態の調節機構の理解をより深めると共に、シミュレーション技術の予測精度を高めることにより、さらに複雑な組織・器官を作成したいと考えている。

4. 自己評価

研究期間において、主の研究目的である「汎用三次元バーテックスモデルの開発」と「眼杯オルガノイド形成における多細胞動態の定量化」を達成し、「眼杯オルガノイド形成における多細胞動態の制御機構の解明」についても顕著な進展があり、最終目的である「三次元多細胞動態のリアルタイム制御」に近づいた。計画に沿った研究実施体制の構築及び研究費の執行を行えた。得られた研究成果は10稿の論文として国際学術誌で発表され、特に、開発したシミュレーション技術により発見した「形態形成の力学的な調節機構」はメディアにも取り上げられ、その波及効果は大きい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Satoru Okuda, Nozomu Takata, Yuiko Hasegawa, Masako Kawada, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai, Mototsugu Eiraku "Strain-triggered mechanical feedback in self-organizing optic cup morphogenesis," Science Advances 4(11): eaau1354 (2018)
2. Satoru Okuda, Erina Kuranaga, Katsuhiko Sato, "Apical junctional fluctuations lead to cell flow while maintaining epithelial integrity," Biophysical Journal 116 (6): 1159-1170 (2019)
3. Satoru Okuda, Takashi Miura, Yasuhiro Inoue, Taiji, Adachi, Mototsugu Eiraku, "Combining Turing and 3D vertex models reproduces autonomous multicellular morphogenesis with undulation, tubulation, and branching," Scientific Reports 8: 2386 (2018)
4. Atsushi Hashimoto, Atsuki Nagao, Satoru Okuda, "Topological graph description of multicellular dynamics based on vertex model," Journal of Theoretical Biology 437: 187-201 (2018)
5. Satoru Okuda, Katsuyuki Unoki, Mototsugu Eiraku, Ken-ichi Tsubota, "Contractile actin belt and mesh structures provide the opposite dependence of epithelial stiffness on the spontaneous curvature of constituent cells," Development, Growth & Differentiation 59(5): 455-464 (2017)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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. プレスリリース「目の丸い形ができる仕組みを解明 ―「器官の形作り」の理解から再生医療への貢献に期待―」, 京都大学, 2018 年 11 月 22 日(日刊工業新聞 2018 年 11 月 22 日 28 面, 毎日新聞 2018 年 11 月 23 日 22 面, 産経新聞 2019 年 1 月 27 日 に掲載)
2. 奥田覚, 永樂元次 (2019). "IV-7 三次元バーテックスモデルによる物理シミュレーションとオルガノイドへの応用," Ed. 佐藤俊朗, 武部貴則, 永樂元次, 実験医学 別冊 決定版 オルガノイド実験スタンダード, 羊土社
3. 奥田覚, 永樂元次 (2017). "眼杯オルガノイド×Computational Biology―in vitro と in silico の相補的アプローチ," 実験医学 35(16): 2683-2688, 羊土社
4. 日本機械学会奨励賞(研究), 奥田覚, Apr. 20 (2017)
5. Young Scientist Award for Presentation at Joint annual meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, Satoru Okuda, Jun. 6 (2018)

研 究 報 告 書

「1 細胞パルペーションデバイスの創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 加地 範匡

1. 研究のねらい

細胞の硬さ・柔らかさといった機械的性質が、正常細胞とがん細胞では異なるなど、細胞を構成する分子的要素を統合した細胞全体としての表現型が細胞の「健康状態」をはじめ、幹細胞の分化能や分化状態、がん細胞の浸潤能・転移能といったある時間における細胞の診断指標となることが期待されている。本さきがけ領域が目指す 1 細胞の表現型・機能・個性を本質的に理解するためには、生体物質・分子情報、およびそれら物質間の相互作用に関する情報を、定量的・網羅的に極限の精度と分解能で解析するアプローチと同時に、これらの分子的要素を統合した結果として表れる「細胞の表現型」を解析するアプローチも必須である。

そこで本研究では、「細胞の表現型」のひとつである細胞の変形能 (cell deformability) に着目し、研究実施者がこれまでに開発してきたマイクロ・ナノ粒子の電流・光学同時計測システム (PCT/JP2016/061225、特願 2015-243615、PCT/JP2015/079532、特願 2014-214090) をもとに、これまでバイオマーカーに基づいた染色や標識を用いて行われてきた生化学的な細胞診断とは一線を画し、AFM や光ピンセット等によるロースループットの方法とも異なる「細胞のパルペーション(触診)」技術を確立し、最終的には「細胞の表現型」に基づいて細胞を分取して生化学分析へ提供できるマイクロデバイスを構築することをねらいとする。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞の性質は、これまで蛍光物質を化学的に標識したり、蛍光タンパク質を生化学的に発現したりすることで、研究されてきた。しかしながら、これらの手法は細胞に細工を施した状態で観察しているため、「真の」細胞の姿を見ているとは言えない。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスを活用することで、細胞をひとつずつ触って調べる方法を開発した。細胞の大きさは、直径が 10～20 μm 程度なので、細胞の大きさより少し大きな 1 段目のマイクロ流路と少し小さな 2 段目のマイクロ流路を連続的に配置することで、細胞の大きさを測定した後に細胞の変形しやすさを調べることができるデバイスを基本とし、細胞を生きたままひとつひとつ触診できるデバイスを構築した。この結果、がん細胞の悪性度や幹細胞の分化状態などを簡便に調べることを可能とした。

(2) 詳細

本研究は、主に下記の三つの項目に分けて実施し、それぞれ研究目的を定めて推進した。

1. デバイス構造最適化と取得シグナルの正確な解釈: 細胞の変形能を計測する際の流路形状、サイズ、そして材質の最適化過程で、得られるシグナル(電流・光学)の蓄積と理論的裏付けを行う。
2. 細胞膜表面・細胞内部構造に起因する細胞変形能の解析: 狭窄流路での物理的相互作用と化学的相互作用を判別することにより、細胞の変形能について分子論的理解を進める。
3. 細胞ソーティング機構の構築: 特定の機械的性質を有する細胞を計測後に再回収し、生化学的アッセイを行える機構を構築する。

以下、それぞれのテーマの達成状況を説明する。

1. デバイス構造最適化と取得シグナルの正確な解釈

電流・光学同時計測部のマイクロ流路形状を、単純なストレート型のものから、細胞が通過する際に変形しなければ通過できない程度の幅を有する狭窄流路を設けたものを用意した。細胞がこの狭窄流路を通過する際に計測される電流値変化(イオン電流の遮断により生じる電流値の減少)とその継続時間から、細胞の変形能を評価できる計測システムを構築し、流路形状・サイズ、電流計測系、光学観察系の最適化を総合的に検討し、細胞を触診するためのマイクロデバイスとしての基本性能を確立した。

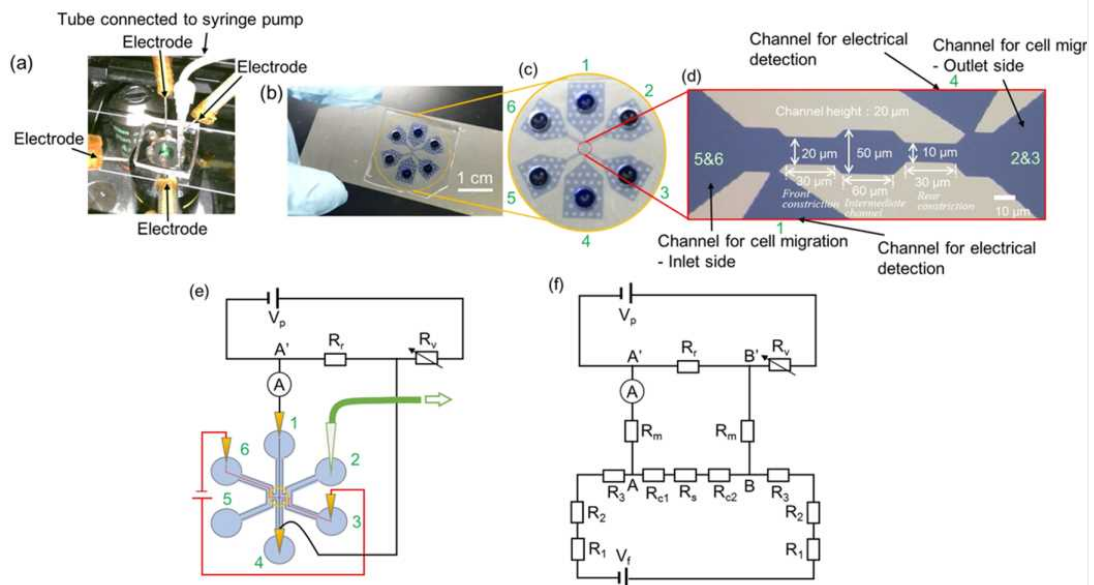


図 1. 作製した 1 細胞パルペーションデバイスとその実験系回路図。細胞の大きさを測定する幅 $20\ \mu\text{m}$ のマイクロ流路と、細胞を変形させてその変形能を調べる幅 $10\ \mu\text{m}$ のマイクロ流路を連続的に配置することにより、細胞の粘弾性などの物理的・機械的パラメータを数十ミリ秒の時間で計測することができる。

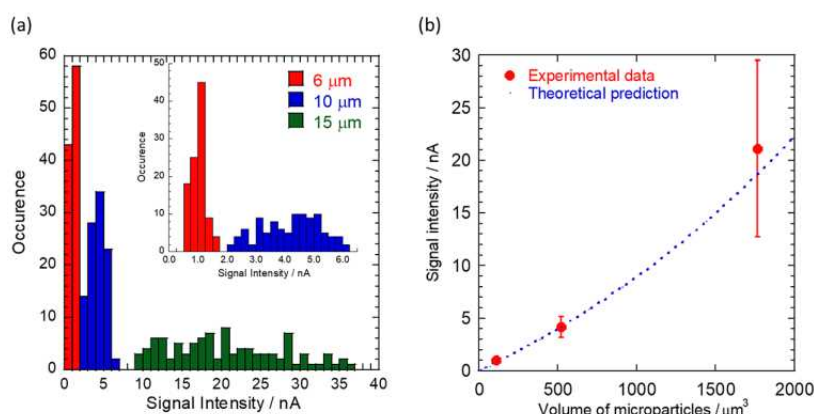


図 2. マイクロビーズを用いた電流計測システムの精度検証結果。

2. 細胞膜表面・細胞内部構造に起因する細胞変形能の解析

構築したマイクロデバイスを用い、狭窄流路内に PEG や PEG 脂質、PLL、細胞接着性ペプチド(RGD)、抗体などを固定化することで、細胞が狭窄流路内を変形して通過する際の滞在時間を検討することを目的とした。これは、細胞が通過する際に発生する細胞膜表面と狭窄流路表面との物理的摩擦や化学的分子間相互作用により影響を受けることから、細胞の変形能というマクロな視点の機械的性質とは異なる、細胞膜表面の膜タンパク質やリン脂質二重膜の状態など、よりミクロな視点での性質が反映されたデータが取得できると期待できたからである。しかしながら、PDMS 表面のケミストリーを一から構築する必要があったため、東京大学山口先生と共同で PDMS 表面の化学修飾法を開発することとし、現在も検討を進めている。

このような細胞膜表面や細胞膜そのものに着目した検討と同時に、細胞骨格もしくは核膜内膜の裏打ち構造に影響を与えるような処置 (Latrunculin A や Paclitaxel などの薬物) を施した後に変形能の計測を行い、細胞内部の分子的状态が細胞の変形能にどのような影響を与えているのかについても検討し、細胞の変形能を細胞内部の分子的状态に基づいて議論できるデータを取得することに成功した。また、脂肪細胞由来幹細胞の分化能を、細胞変形能測定に基づいて判定することにも可能であることを明らかにした。

3. 細胞ソーティング機構の構築

これまでに 1 細胞レベルで細胞の変形能を計測する様々な手法が開発されてきたが、いずれの手法も計測後の細胞を再回収して遺伝子発現情報を取得するといった生化学的解析を行うことは極めて困難であった。本研究で用いるマイクロデバイスは、他の手法と比べて細胞の再回収機構を組み込みやすいという利点がある。そこで、狭窄流路を用いた電流計測系だけではなく、その下流に細胞のソーティング機構を組み込み、目的とする細胞を再回収できるデバイスを構築することを目的とした。しかしながら、現在市販されているセルソーターの性能は数 kHz を優に超えていること、また、同じさがけ領域内でも完成度の高いセルソーターを開発しておられる研究者がおられることから、自前での開発は行わず、共同研究もしくは市販の製品を拝借することとした。

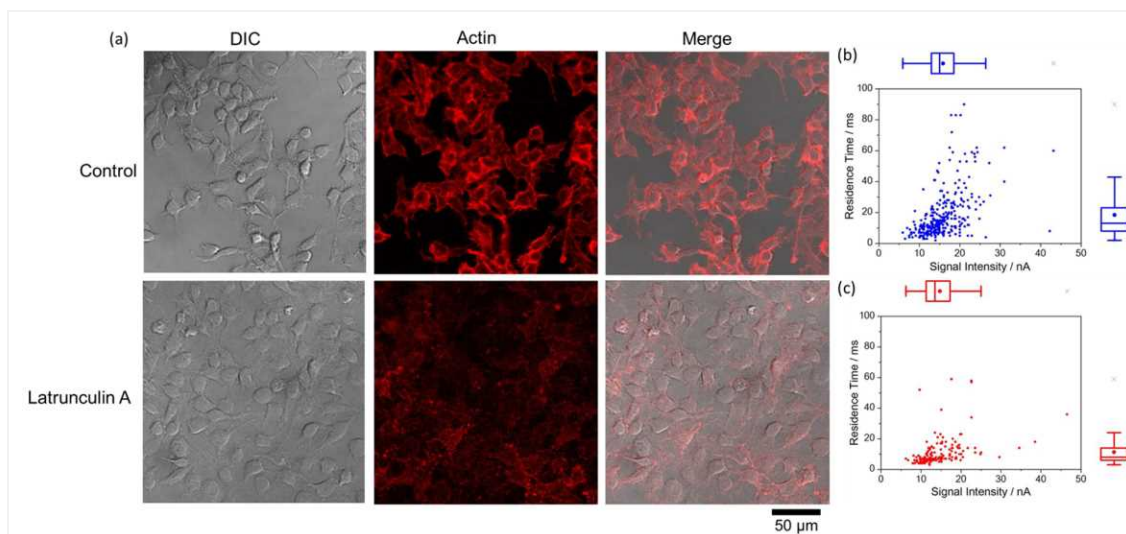


図 3. Latrunculin A を作用させた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡写真と、細胞変形能計測の結果。アクチン繊維の合成が阻害されるため、同じ大きさの細胞でも変形能に大きな差が見られるようになった。

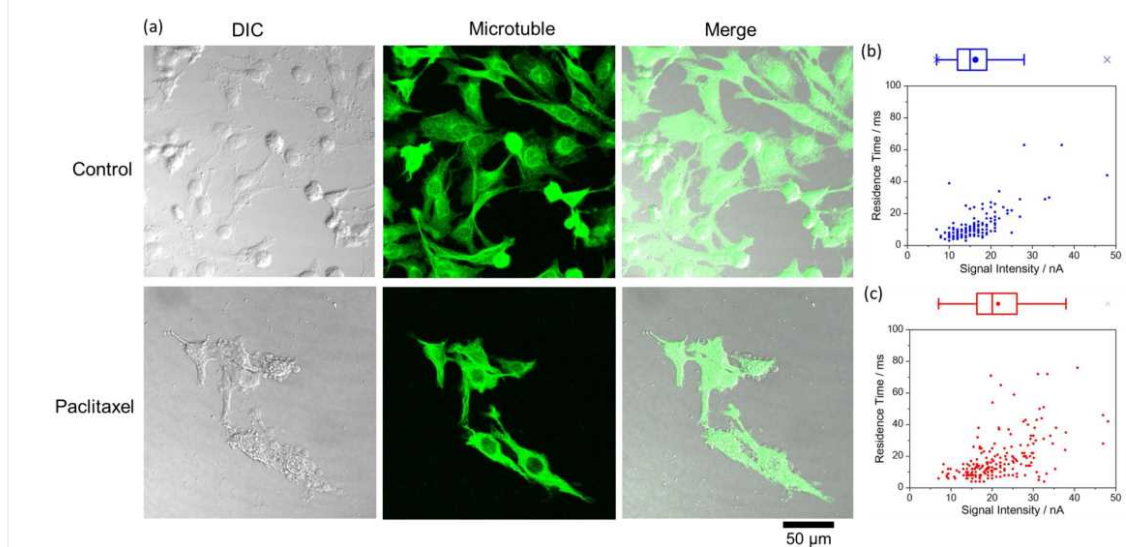


図 4. Paclitaxel を作用させた HeLa 細胞の蛍光顕微鏡写真と、細胞変形能計測の結果。微小管の脱重合を阻害する Paclitaxel は、細胞全体の機械的強度には大きく影響を与えないことが分かった。

3. 今後の展開

単一細胞を非標識で診断できる技術は、細胞の真の姿に迫るために必須の技術であり、特に分析後に再回収・再利用が必要とされる貴重細胞種の研究や細胞医療での移植細胞の事前診断といった分野への適用を考えている。

4. 自己評価

本研究の最大の研究成果は、化学的・生化学的な標識を行わず、非標識で単一細胞レベルで細胞を診断する技術を構築したことである。本技術を用いると、幹細胞をはじめとした貴重な細胞を廃棄することなく、再利用または細胞医療へ診断後に応用することが可能となることから、細胞生物学・再生医療などへ大きな波及効果が期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Sano, M.; Kaji, N.; Rowat, A. C.; Yasaki, H.; Shao, L.; Odaka, H.; Yasui, T.; Higashiyama, T.; Baba, Y., Microfluidic Mechanotyping of a Single Cell with Two Consecutive Constrictions of Different Sizes and an Electrical Detection System. *Anal. Chem.* **2019**, *in press*
2. Hattori, Y.; Shimada, T.; Yasui, T.; Kaji, N.; Baba, Y., Micro- and Nanopillar Chips for Continuous Separation of Extracellular Vesicles. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (10), 6514–6521.
3. Yasaki, H.; Shimada, T.; Yasui, T.; Yanagida, T.; Kaji, N.; Kanai, M.; Nagashima, K.; Kawai, T.; Baba, Y., Robust Ionic Current Sensor for Bacterial Cell Size Detection. *Acs Sensors* **2018**, *3* (3), 574–579.
4. Sano, M.; Kaji, N.; Wu, Q.; Naito, T.; Yasui, T.; Taniguchi, M.; Kawai, T.; Baba, Y., Quantitative Evaluation of Dielectric Breakdown of Silicon Micro- and Nanofluidic Devices for Electrophoretic Transport of a Single DNA Molecule. *Micromachines (Basel)* **2018**, *9* (4).
5. Yasaki, H.; Yasui, T.; Yanagida, T.; Kaji, N.; Kanai, M.; Nagashima, K.; Kawai, T.; Baba, Y., Substantial Expansion of Detectable Size Range in Ionic Current Sensing through Pores by Using a Microfluidic Bridge Circuit. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (40), 14137–14142.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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. N. Kaji, Micro and nano-sensing techniques for the diagnosis of bacteria and cells
International Conference on Nanomaterials and Nanotechnology, London, UK,
2018/10/29
2. N. Kaji, An assessment of mesenchymal stem cell properties by ionic current detection
system in microfluidic devices RSC Tokyo International Conference 2018
~Future of Single Cell Analysis~ International Conference Session, JASIS Conference,
Makuhari, Japan, 2018/7/23
3. Kaji, N.; Yasui, T.; Baba, Y., Single-cell deformability analysis by a microfluidic chip High

Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2017 Jeju),
2017/11/6

4. Kaji, N.; Sano, M.; Ito, S.; Yasaki, H.; Yasui, T.; Yukawa, H.; Baba, Y., Single-cell analysis by a microfluidic chip 17th Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE 2017 Shanghai), 2017/11/11
5. Kaji, N.; Baba, Y., Single Cell and Bacterium Analysis by Microfluidic Chips Workshop on Biomedical Engineering in collaboration of Nagoya University and North Carolina State University, 2017/11/3

研 究 報 告 書

「脂質ダイナミクスの精密解析技術の創出」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 多喜 正泰

1. 研究のねらい

個々の細胞の機能や個性を網羅的に解析することは、細胞生物学における大きなゴールの一つである。1細胞という極めて微小な空間内に含まれる情報を精密に読み出すために、高い時間分解能と空間分解能を併せもつ蛍光イメージング法は有用である。蛍光タンパク質や有機小分子蛍光プローブを用いた生体分子の挙動解析は生命科学研究の発展に大きく寄与してきた。しかし、細胞機能の網羅的解析を達成するためには、既存の技術では困難な生体関連物質を対象にした研究展開も必要である。

本研究では、無数にある細胞機能の中でも脂質代謝に着目した。生体膜脂質は細胞の個性を決める重要な要素であり、その合成経路は様々な要因によって調整されている。例えば、細胞内脂肪滴は脂質調整の場として知られており、リン脂質が不足している場合には脂肪滴近傍で脂質合成酵素の活性化が誘導され、ホスファチジルコリン(PC)合成を高めるという機構が存在する。そのため、周辺の脂質濃度に応じて脂肪滴の大きさが敏感に変化するなど、脂肪滴の形態や機能は多様性に富んでいる。このように脂質代謝は細胞活動を維持するために必須の機能であるが、代謝機構に関する研究はそれほど進展しているとはいえない。これは、今の研究手法が脂質代謝に関与するタンパク質の構造や発現変化などについて検証する、いわば分子生物学的手法が主流となっていることが主な要因である。すなわち、脂質研究を飛躍的に進展させるためには、脂質ダイナミクスを直接観察するための新しい技術を創出し、その解析手法を開発することが必要不可欠であった。

本研究においては、脂質ダイナミクスを超解像レベルで精密解析可能な新技術の創出を目指し、“マルチカラーイメージングによる脂肪滴代謝機構の解明(研究テーマ A)”と“超解像ライブイメージングによるリン脂質代謝解析(研究テーマ B)”を実施課題として定めた。研究テーマ A では、脂肪滴特異的な染色を可能にする超耐光性蛍光プローブを開発し、超解像レベルでの脂肪滴動態追跡技術を確立する。併せて、蛍光性の長鎖脂肪酸を開発し、細胞内で代謝される様子を高精度に解析することも目標とした。研究テーマ B では、コリンアナログの代謝標識技術を活用した超耐光性色素によるリン脂質のラベル化を実施し、超解像イメージングによる代謝解析技術の創出を目指す。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では、細胞内で起こる脂質代謝を高精度で解析するための新規なケミカルツールの開発、およびこれらを活用したイメージング技術の創出に取り組んだ。研究テーマ A では、脂肪滴を可視化する蛍光プローブとして、①光照射に対して極めて高い安定性を有する脂肪滴染色剤 LAQ1、および②環境応答性蛍光色素を連結した長鎖脂肪酸 AP-C12 を開発した。LAQ1

は環境応答性を有しており、高極性溶媒中では蛍光が抑制されているが、脂肪滴などの低極性環境下では強い蛍光を発する。そのため、バックグラウンドシグナルが低く、極微小な脂肪滴も検出できることがわかった。また超耐光性とも形容できる圧倒的な光安定性を示すことから、脂肪代謝過程を長時間に渡り観測することも可能になった。実際、フォルスコリン処理によって細胞内 cAMP 濃度を高めたところ、脂肪滴が加水分解を伴って縮小し、同時に分解生成した脂肪酸が再び代謝されて、新たな脂肪滴が形成される様子が観測された。蛍光性長鎖脂肪酸 AP-C12 については、細胞内で速やかに代謝され、脂肪酸代謝に関与する様々なオルガネラに取り込まれることを見出した。AP-C12 の代謝物はオルガネラの極性に応じて蛍光波長が変化する特徴をもつため、代謝物の局在を蛍光特性の違いとしてイメージングすることができる。この特性により、リポファジーによる脂肪酸代謝を検出することが可能になった。一方、研究テーマ B では当初のコリンアナログを用いたリン脂質標識から一部変更し、新たなオルガネラ膜標識技術の構築を目指した。まず、超耐光性蛍光色素 MitoPB Yellow を開発し、超解像 STED 顕微鏡で観察することによって、ミトコンドリア内膜のみを特異的に可視化できることを見出した。生きた細胞内で、内膜の折りたたみ構造であるクリステを約 60 nm の空間分解能で明瞭に捉えることができる。超耐光性を活かすことで、ミトコンドリア膨潤時の内膜動態をタイムラプス STED イメージングによって精微に追跡することに成功した。また別の耐光性色素として、リンオキンドで架橋されたローダミン誘導体 PREX 710 を開発した。700 nm を超える近赤外領域に吸収および蛍光極大を示すことに加え、既存の近赤外蛍光色素に比べても圧倒的に優れた耐光性を有していることが明らかとなった。脂質からタンパク質に至る様々な生体分子を標識することができ、1分子イメージング用プローブとしても有用であることを実証した。

(2) 詳細

研究テーマ A「マルチカラーイメージングによる脂肪滴代謝機構の解明」

脂肪滴はトリアシルグリセリド (TAG) がリン脂質単分子層で囲まれた構造をもつオルガネラである。以前は細胞内にある余剰脂肪の貯蔵庫として認識されていたが、近年では脂質代謝において中心的な役割を果たすオルガネラとして注目されるようになった。脂質代謝異常は糖尿病、動脈硬化症、肝臓・胆嚢疾患を含む様々な疾病とも深い関連性があることから、その形成機構や機能の解明が強く望まれている。従来の分子生物学的な手法では、TAG が主成分である脂肪滴を直接観測することができないため、これを可視化するための新たな分子ツールの開発が必要であった。本研究では、①超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1、および②環境応答性蛍光脂肪酸 AP-C12 をそれぞれ開発し、脂質代謝研究における有用性を実証した。

まず、光照射に対して極めて高い安定性を示す「超耐光性蛍光色素」の開発において、近年我々が提唱した「平面固定化による π 共役骨格の構造強化」の概念に基づき、リンあるいは硫黄原子で平面固定化した蛍光色素骨格を種々合成した。この骨格に対して電子供与基であるジフェニルアミノ基を導入することにより、環境応答性を有する一連の色素群を得た。脂肪細胞を用いて検証した結果、図 1a に示す LAQ1 が、脂肪適に対する高い選択性、超耐光性、低い細胞毒性、励起・蛍光波長の点において、最も優れた脂肪滴染色能を有していることがわかった。実際、LAQ1 を用いて染色した脂肪細胞に対してフォルスコリンおよび IBMX で処理し、タイムラプスイメージングにより脂肪分解反応を追跡したところ、分解反応に伴って脂肪滴サイズ

が小さくなる一方、小胞体付近から新たな微小脂肪滴が形成される様子が観察された(図 1 b)。これは、TAG の分解によって生じた脂肪酸が細胞外で補足されず、再び細胞内に取り込まれて代謝されたことによる。このとき形成した脂肪滴を超解像 STED 顕微鏡で捉えることに成功した(図 1c)。

次に、図 1d に示す環境応答性蛍光脂肪酸 AP-C12 について検証した。アザピレン(AP)は、分子量が 300 以下の小さい蛍光団でありながら可視光で励起可能であり、さらに溶媒の極性が高くなるほど短波長シフトする負の溶媒効果を示す。AP-C12 を含む培地中で脂肪細胞、HepG2, Huh7 などそれぞれ培養したところ、いずれの場合も様々なオルガネラに分布した蛍光シグナルが得られた(図 1e)。このことは、AP-C12 が脂肪酸として細胞内に取り込まれた後、脂肪酸代謝経路に従って各オルガネラに分布されたことを表しており、それぞれ脂肪酸アシル CoA, リン脂質, TAG に変換されていることが示唆された。さらに解析を進めると、アミノ酸飢餓状態で 6 時間培養した HepG2 細胞に AP-C12 を取り込ませた場合、AP-C12 の代謝物がミトコンドリアに著しく集積する様子が認められた。AP-C12 がエネルギー源として利用され、ミトコンドリアで β 酸化が進行していることによるものと考えられる。実際、 β 酸化によって炭素鎖長が短くなった AP-C12 の代謝物が質量分析によって検出されたことから本結果は裏付けられる。最後に、リポファジー過程の可視化について検証した。リポファジーは脂肪滴が関与するオートファジーの一種であり、脂質代謝において重要なプロセスである。1% FBSを含む HBSS 培地中で HepG2 細胞を 12 時間培養後、AP-C12 でさらに 1 時間培養すると膜で囲まれたいくつかの構造体が脂肪滴近傍に確認された(図 1f)。興味深いことに、膜内部の極性環境が脂溶性のものと水溶性ものが存在している。AP-C12 の特性から、前者が隔離膜によって取り囲まれたオートファゴソーム、後者がリソソームと結合したオートリソソームであると示唆された。実際、これらの構造体はオートファジーマーカーである LC3 に発現させた GFP のシグナルと良い一致を示すことから、リポファジーによる代謝が進行していることが支持された。

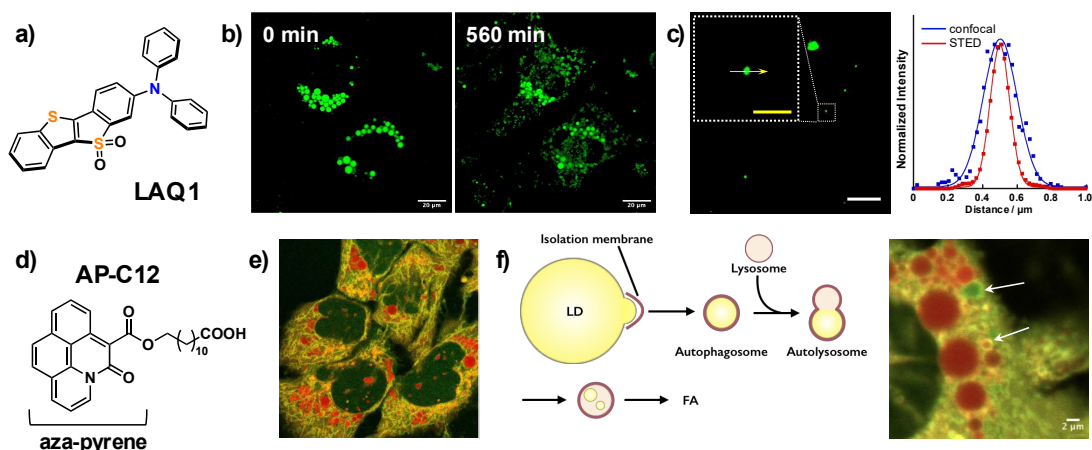


図1. a) 超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1. b) LAQ1 で染色した脂肪細胞をフォルスコリンおよび IBMX で処理すると、脂肪滴の分解と形成が同時に観測される。c) 極微小脂肪滴の超解像画像。共焦点顕微鏡に比べて格段に高い分解能を有している。d) 環境応答性蛍光脂肪酸 AP-C12. e) HepG2 細胞における AP-C12 代謝物のマルチカラーイメージング。f) リポファジー過程と AP-C12 によって検出されたオートファゴソーム

以上の結果から、LAQ1 および AP-C12 は脂肪滴の代謝解析を行う上で有用な分子ツールであることが実証された。すなわち、脂肪滴染色プローブに環境応答性を付与することにより、脂肪滴動態をより精密に追跡することが可能になった。本成果についてそれぞれ論文投稿の準備を進めている。

研究テーマ B「超解像ライブイメージングによるリン脂質代謝解析」

アジドやアルキンを有するコリン誘導体が細胞内で代謝されることを利用し、ホスファチジルコリン(PC)のヘッドグループへのこれら官能基の導入、およびクリックケミストリーによる超耐光性蛍光色素の標識を狙った。これにより、リン脂質の代謝過程を超解像レベルでタイムラプス解析することが可能になる。しかし、研究を遂行していく過程において、環境応答性を有する超耐光性色素骨格(図 2a)が特定のオルガネラ膜を選択的に染色できることを見出したため、観察対象をリン脂質からオルガネラ膜に変更し、オルガネラ膜ダイナミクスの超解像追跡とした。細胞内の脂質代謝過程には複数のオルガネラが関与し、相互に協同しながら細胞機能を維持していることが知られている。したがって、これらのオルガネラ動態を精微に解析することは脂質ダイナミクスの解明にも繋がってくる。

まず、ミトコンドリア膜構造の超解像ライブセルイメージングを指向したプローブ開発に着手した。脂溶性環境で強い蛍光を示す超耐光性蛍光色素骨格に対し、ミトコンドリアへの膜電位依存的な集積を志向した TPP、およびタンパク質結合部位として EP を導入した MitoPB Yellow を設計した(図 2a)。MitoPB Yellow は高いミトコンドリア選択性を示し、染色した細胞を固定してもミトコンドリアからのシグナルは観察されたことから、設計通りミトコンドリア膜タンパク質と結合していることが示唆された。次に、生細胞中におけるミトコンドリアの STED イメージングを行った。その結果、共焦点顕微鏡では観察することができなかったミトコンドリアの内膜構造(クリステ)を約 60 nm の空間分解能で明瞭に可視化することに成功した(図 2b)。内膜選択性は外膜タンパク質 TOMM20 との共染色によって確認し、同時にマルチカラーSTED への有用性も示すことができた。さらに、核様体欠損細胞において、同心円状に再構築されたクリステ(図 2c)や、アミノ酸飢餓条件で培養した細胞においては、クリステがより密になっている状態(図 2d)もライブセルで捉えることに成功した。また、超耐光性という特異な性質を活かし、ミトコンドリア内膜動態の STED タイムラプス計測を実施したところ、ミトコンドリアが膨潤し、クリステ同士が融合する様子が可視化された。

MitoPB Yellow と超解像顕微鏡を併せた本技術は、様々な細胞機能に関与するミトコンドリアの動態を解析する上で強力なツールである。本成果は、原著論文として Proc. Natl. Acad. Sci. USA に発表した。その後、国内外の多くの研究者から問い合わせがあり、共同研究を進めている。

このように細胞機能を高分解能で長時間にわたって計測する技術を確立することは、非常に重要な課題である。とくに光毒性の観点からは、細胞機能に対する影響が小さい近赤外領域の光は利用価値が高いが、耐光性に優れた近赤外蛍光色素はそれほど多くない。これに対し、本研究ではリンオキシドをローダミン色素の9位に導入した蛍光色素 PERX 710 を開発した(図 2d)。PERX 710 は 712 nm と 740 nm にそれぞれ吸収および蛍光極大波長を有し、水中においても蛍光量子収率 0.13 を示した。PERX 710 の光安定性を一分子レベルで評価したとこ

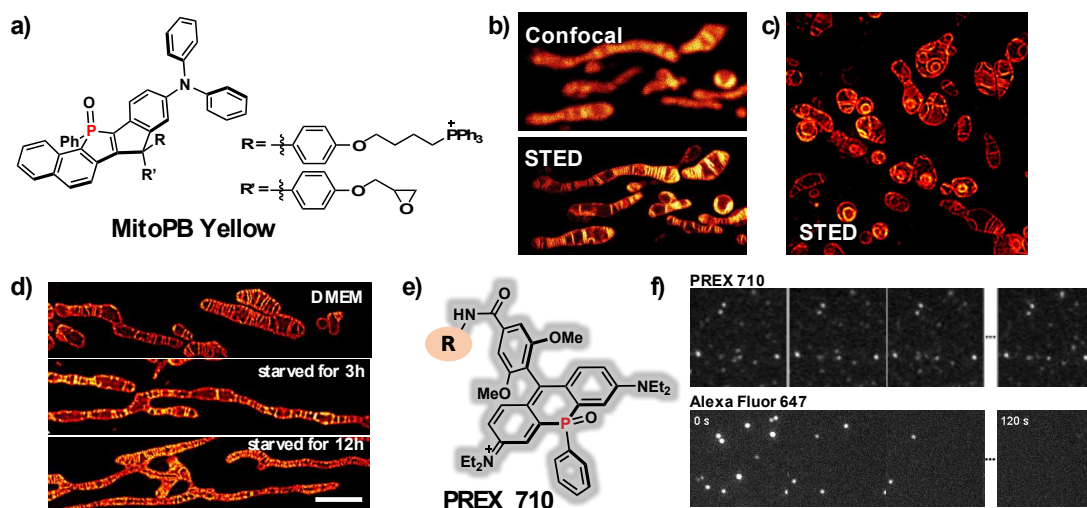


図2. a) MitoPB Yellow の構造. b) MitoPB Yellow で染色したミトコンドリア内膜の共焦点画像と超解像画像の比較. $\lambda_{\text{STED}} = 660 \text{ nm}$. c) DNA 合成阻害剤であるジデオキシシチジン (ddC) で処理し、核様体が消失されたミトコンドリアの超解像画像. d) 細胞を HBSS 飢餓状態で培養するとミトコンドリアが細長くなり、かつクリステの密度が経時的に増えていく. e) 耐光性近赤外蛍光色素 PREX 710 の構造. f) PREX 710 と Alexa Fluor 647 の1分子レベルでの光安定性評価. 前者は 2 分以上光り続けるのに対し、後者は数秒程度でシグナルが消失する.

ろ、シアニン系色素 Alexa Fluor 647 では数秒で褪色する条件でも、PREX 710 では 2 分経過後でも 8 割以上が発光し続けていることがわかった。またブリンキングもほぼ認められなかったことから、一分子イメージング用プローブとして優れた物性を有しているものと思われる。本色素はタンパク質のみならず、リン脂質や様々なオルガネラも標識することができる。本成果は、原著論文として Angew. Chem. Int. Ed.に採択された。

3. 今後の展開

研究テーマ A で開発した超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1 は、動物細胞のみならず、植物細胞など多様な細胞腫に対して適用できることを示した。従来の脂肪滴染色剤とは一線を画す超耐光性は、脂質代謝機構をライブで捉えるうえで特に重要な要素である。特に、昨今の肥満問題解消に向けた創薬開発においては、薬剤探索のケミカルツールとして利用価値が高い。また、医学分野においては、脂肪滴動態と疾病との関連性が多数報告されていることから、本プローブによって生物学的知見が得られることが期待される。一方、さらなるプローブ開発の観点からは、 π 拡張やヘテロ原子の導入による長波長化を達成することにより、in vivo での応用も視野に入る。蛍光性脂肪酸 AP-C12 に関しては、脂肪酸の代謝が追跡できるため、阻害剤や活性化剤を定量的に評価、さらにはケミカルスクリーニングによる創薬探索への応用が期待される。特にリポファジーは最近の脂質代謝研究においても hot topic の一つであり、本分子には高い期待が寄せられている。AP-C12 の耐光性の面では、従来の蛍光色素と同程度であるが、超耐光性を付与することができれば、長時間にわたって脂肪酸動態を追跡することが可能になり、さらなる発展が見込まれる。

研究テーマBではミトコンドリア内膜染色剤 MitoPB Yellow を開発した。すでに多くの研究者から問い合わせがあったことから本色素の期待値はかなり高い。脂質代謝はもちろん、細胞のストレス応答や疾病など、ミトコンドリアの形態と機能の関連性は深い。これまで電子顕微鏡で観察されてきた内膜構造を、ライブセルで観察し、かつ動態追跡もできることから、多くの生物学的知見が得られることが期待される。一方、MitoPB Yellow が抱える重大な課題がミトコンドリアの光毒性である。より長波長領域で利用できるミトコンドリア染色剤を開発することにより、非侵襲イメージングやマルチカラーイメージングも可能になる。PREX 710 も組み合わせることにより、「オルガネラ相互作用」における膜ダイナミクスの解明に繋げていきたい。

4. 自己評価

・研究目的の達成状況

研究テーマAは研究目標を十分に達成したと考えている。当初の研究計画にあった超耐光性脂肪滴染色剤 LAQ1 の開発に成功し、脂肪滴動態の経時的な変化を追跡することが可能になった。環境応答性をもつ LAQ1 は非特異的吸着に伴うバックグラウンド蛍光も小さいため、極微量の脂肪滴も検出することが可能であり、超解像顕微鏡による観察も達成している。学会等で問い合わせがあった国内外の研究者とは共同研究も始めている。一方、蛍光脂肪酸 AP-C12 は本研究期間で考案したものであり、リポファジーを含む脂肪酸代謝の可視化など、予想を上回る成果を得た。

研究テーマBでは、当初の研究計画を変更し、より野心的な課題であるオルガネラ膜ダイナミクスの可視化に挑んだ。ミトコンドリアは脂質代謝のみならず、その構造と機能に関する研究は世界中で繰り広げられている。本研究で開発したミトコンドリア内膜染色剤 MitoPB Yellow を用いることにより、既存のミトコンドリアプローブとは一線を画す画像を得ることができた。また本色素骨格は拡張性が高く、多方面への応用展開も可能である。論文での発表直後から多くの共同研究の申込みもあったことから、反響の高さも窺える。また耐光性近赤外蛍光色素 PREX 710 も標識剤としてのポテンシャルが高く、多くの共同研究も展開中である。以上の結果から、当初研究計画とは異なるが、予想を上回る成果が得られたものとする。

・研究の進め方

本研究は、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所の山口茂弘教授研究室で実施し、代表者が研究を総括した。研究室に所属する外国人博士研究員2名および大学院学生2名と共に実施した。超解像STEDイメージングは、本研究科のライブイメージングセンターで行った。尚、ミトコンドリア外膜との多重染色および1分子レベルでの耐光性評価は、理研BDRの岡田康志先生(1細胞CREST代表者)、PREX 710による脳血管深部イメージングは愛媛大学医学研究科 今村健志先生・川上良介先生との共同研究による成果である。研究費は予算計画を一部変更して、細胞イメージングを実施するための装置構築に充て、本計画研究の加速に繋がった。

・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

開発した各種蛍光プローブはすでに市販化の見通しがたっており、科学技術への高い波及効果が期待される。また、共同研究を幅広く展開し、結果をフィードバックしてもらうことで新

たな色素開発にも繋がり、基盤技術開発における「正のスパイラル」が生み出されるものと期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Wang, C., Taki, M.*, Sato, Y., Tamura, Y., Yaginuma, H., Okada, Y., Yamaguchi, S.* A photostable fluorescent marker for the super-resolution live imaging of the dynamic structure of the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2019, 116, 15817–15822. (責任著者論文)
2. Grzybowski, M., Taki, M.*, Senda, K., Sato, Y., Ariyoshi, T., Okada, Y., Kawakami, R., Imamura, T., Yamaguchi, S.* A Highly Photostable Near-Infrared Labeling Agent Based on a Phospha-rhodamine for Long-Term and Deep Imaging *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, 57, 10137–10141 (責任著者論文)
3. Ogasawara, H., Grzybowski, M., Hosokawa, R., Sato, Y., Taki, M.*, Yamaguchi, S.* A far-red fluorescent probe based on a phospha-fluorescein scaffold for cytosolic calcium imaging. *Chem. Commun.*, 2018, 54, 299–302 (責任著者論文)
4. Griesbeck, S., Michail, E., Wang, C., Ogasawara H., Lorenzen, S., Gerstner, L., Zang, T., Nitsch, J., Sato, Y., Bertermann, R., Taki, M., Lambert, C., Yamaguchi, S.*, Marder, T. B.* Tuning the π -Bridge of Quadrupolar Triarylborane Chromophores for One- and Two-Photon Excited Fluorescence Imaging of Lysosomes in Live Cells. *Chem. Sci.*, 2019, 10, 5405–5422.
5. Griesbeck, S., Ferger, M., Czernetzki, C., Wang, C., Bertermann, R., Friedrich, A., Haehnel, M., Sieh, D., Taki, M., Yamaguchi, S.*, Marder T. B.* Optimization of Aqueous Stability vs. π -Conjugation in Tetracationic Bis(triarylborane) Chromophores: Applications in Live-Cell Fluorescence Imaging. *Chem. Eur. J.*, 2019, 25, 7679–7688.

(2)特許出願

研究期間累積件数:4 件

国際出願 1.

発 明 者: 多喜正泰, 山口茂弘, 梶原啓司

発明の名称: 縮環チオフェン化合物及びそれを用いた油滴染色剤

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2018/3/2

出 願 番 号: PCT/JP2018/008178

国際出願 2.

発 明 者: 多喜正泰, 山口茂弘, 大崎博司

発明の名称: アザピレン化合物又はその塩

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2018/3/2

出 願 番 号: PCT/JP2018/008179

国際出願 3.

発 明 者: 多喜正泰, 山口茂弘, 中愛子, マレクガージボウスキーグジャゴツシュ

発明の名称: ホスファローダミン化合物若しくはその塩、並びにそれを用いた蛍光色素



出 願 人: 名古屋大学
出 願 日: 2017/8/30
出 願 番 号: PCT/JP2017/031203

国際出願 4.

発 明 者: 多喜正泰, 山口茂弘, マレクガージボウスキーグジャゴツシュ
発明の名称: ホスファロドール化合物若しくはその塩、並びにそれを用いた蛍光色素
出 願 人: 名古屋大学
出 願 日: 2018/3/28
出 願 番 号: PCT/JP2018/012880

(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. 多喜正泰 「超耐光性蛍光色素が可能にする先端バイオイメージング」 生命科学 4 プラットフォーム 説明会・成果シンポジウム, 2018 年 6 月 5 日, 一橋講堂 学術総合センター (招待講演, パネリスト) <http://platform.umin.jp/event/201806.html>
2. 多喜正泰 「リン含有蛍光色素による革新的生体イメージング技術」 日本化学会第 99 春季年会化学会 特別企画講演, 2019 年 3 月 19 日, 甲南大学 (招待講演)

受賞

1. 第 36 回とやま賞 (2019) 「細胞機能の精密イメージングを実現する革新的蛍光色素の創出」

著作物

1. 多喜正泰, 佐藤良勝 「化学・生物学の融合研究により開発された最新のアグリバイオ蛍光分子群」 アグリバイオ, 2019 年 1 月号, 北隆館/ニュー・サイエンス社
2. 多喜正泰, 山口茂弘 「耐光性近赤外蛍光色素が招く蛍光イメージング技術」 現代化学, 2018 年 11 月号, 株式会社東京化学同人
3. 多喜正泰 「退色に強い蛍光標識剤と超解像イメージング」 光アライアンス, 29 (5), 26-30 (2018), 日本工業出版

プレスリリース

1. 細胞が生きたままミトコンドリアの内膜構造が鮮明に見えた～ミトコンドリアの形態制御異常がもたらす神経変性疾患の診断技術や創薬開発ツールとして期待～ (2019 年 7 月)
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190723/index.html>
2. 長時間蛍光イメージングを可能にする近赤外蛍光標識剤を開発～蛍光1分子追跡から生体深部イメージングまで生命科学・医療分野に幅広く応用可能～ (2018 年 7 月)
<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20180709/index.html>

研 究 報 告 書

「超高感度・非破壊1細胞糖タンパク質解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 舘野 浩章

1. 研究のねらい

申請者はこれまで、数十種の糖結合タンパク質(レクチン)を用いた糖鎖プロファイリング技術としてレクチンマイクロアレイの応用開発を行い、再生医療や創薬に貢献する実用的な技術を開発してきた。レクチンマイクロアレイでは解析対象となる細胞や組織から糖タンパク質を抽出し、蛍光標識後にレクチンマイクロアレイに供して解析する。しかしレクチンマイクロアレイでは、細胞や組織を破壊して解析する必要があるため、本来の生きた状態の細胞の糖タンパク質を取得できないという課題があった。こうした課題を解決すべく、申請者は生きた細胞に蛍光色素を導入して、そのままレクチンマイクロアレイで解析する手法も開発した。しかし数 μm の直径をもつ大きな細胞をマイクロアレイに反応させることは難しく、得られたデータにバラつきが生じてしまうなどの課題があった。また通常のレクチンマイクロアレイでは 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 程度の濃度のタンパク質分画を反応させて解析する必要があるが、単一細胞での解析はできなかった。一方、製薬企業や医療機関との共同で膵がんの特異的に発現する複合糖質に対する抗体医薬品の開発を進めてきた。薬剤耐性がん細胞をがん幹細胞と定義し、本細胞に特異的に発現する糖タンパク質をレクチンマイクロアレイで同定する。この際、組織切片の癌部・非癌部をレーザーマイクロディセクションで切り出し、糖タンパク質を抽出後、蛍光標識化してレクチンマイクロアレイで比較解析するという流れになる。しかし直径 1.5 mm もの組織切片が解析に必要となり、組織を切り出すために多大な時間と労力が必要となる。単一細胞の糖タンパク質を、非破壊で生きたまま解析する技術を開発できれば、現在のレクチンマイクロアレイの抱える課題を克服した、次世代の糖タンパク質解析技術へと発展できるはずである。

本研究ではレクチンマイクロアレイとは全く逆の反応系を採用する。すなわち、生きた細胞を壊さずに、そのまま各種レクチンを反応させる。それぞれのレクチンにはDNAバーコードを修飾しておき、レクチンシグナルをPCR増幅する。増幅したDNAバーコードをNGSで解析することにより、超高感度かつ定量的に単一細胞の糖タンパク質を取得する。本技術を開発することで、生体システムを構成する細胞集団の不均一性と個別性を明らかにするとともに、新たな医療技術の開発へと展開する。

2. 研究成果

(1)概要

本研究では我々がこれまで開発してきた組換えレクチンライブラリーを用いて、単一細胞(シングルセル)の糖タンパク質を生きたまま、非破壊で解析するための革新的な技術を開発することを目的としている。本技術を開発することができれば、これまで細胞集団の平均的な糖タンパク質情報のみが取得可能であったが、これまで観察不可能であった単一細胞の糖

イコーム情報の取得が世界で初めて可能となる。そのため、糖鎖の新たな生物学的意義を明らかにすることが可能となるだけでなく、希少な細胞の検出・同定・分離技術の開発、それを標的とした各種疾患の診断薬や治療薬の開発、再生医療に用いる細胞の品質管理技術等を開発することが可能となると強く期待できる。そこで本研究では、①DNAバーコード化組換えレクチンライブラリーの構築、②細胞や組織切片への反応プロトコルの構築、③PCR、NGSを用いた検出技術の構築、④各種生体試料を用いたプロトコルの検証の研究項目を実施した。各種のレクチンの DNA バーコード化方法を検討し、クリック反応で高効率に修飾する方法を確立した。DNA バーコード修飾後にレクチンを精製し、最終的に約 40 種の DNA バーコード化レクチンを作製した。そして各種哺乳細胞への反応プロトコル（反応時間、反応温度、洗浄方法、ブロッキング方法等）を最適化するとともに、DNA バーコードの回収法、PCR 増幅条件、qPCR/NGS 解析のプロトコルを構築した。構築した方法でまず1万個の細胞のグライコーム情報を取得する技術を確立し、得られたデータがフローサイトメトリーで得られたデータと相関することを確認した。次に単一細胞に分離し、それぞれのグライコーム情報を取得する方法を確立した。最終的にヒト iPS 細胞のグライコームの多様性をシングルセルで取得するとともに、分化誘導後のグライコーム変化をシングルセルで解析し、追跡することに成功した。

（2）詳細

研究テーマ1「DNAバーコード化組換えレクチンライブラリーの構築」

レクチンライブラリーにオリゴ DNA を結合させるための各種方法を検討し、最終的にクリック反応を用いて効率的に導入する方法を構築した。さらに、オリゴ DNA に光応答性のリンカーを導入し、UV 照射で切り離し、PCR 増幅する方法を構築した。レクチンにオリゴ DNA を結合させた後、余剰のオリゴ DNA を除くために糖を固定化したアフィニティークロマトグラフィーで DNA バーコード化レクチンを精製した。さらにレクチンに導入されたオリゴ DNA 量を測定する方法を確立した。最終的に様々な糖結合特異性を有する約 40 種のレクチン-DNA バーコードライブラリーを構築した。オリゴ DNA 修飾レクチンと、未修飾のレクチンの反応性に違いがないことをフローサイトメトリーで確認した。

研究テーマ2「細胞や組織切片への反応プロトコルの構築」

レクチン-DNA バーコードライブラリーを細胞に反応させるための細胞濃度、バッファーの種類や濃度、ブロッキング剤、反応時間、反応温度等の各種パラメーターを最適化した。更にその後、オリゴ DNA を回収する条件を最適化した。また、1細胞分離装置を用いてシングルセルに分離する方法について最適化した。

研究テーマ3「NGS を用いた解析技術の構築」

まず 1 万個の細胞をリアルタイム PCR で解析する技術を構築し、フローサイトメーターで得られた結果と相関することを確認した。次に1万個の細胞に反応させたレクチン-DNA バーコードライブラリーをNGSで解析するための一連のプロトコルを構築した。そして、得られた結果がフローサイトメトリーで得られたデータと相関することを確認した。そして、DNA バーコードをカウントするためのバーコードカウントシステムを開発した。さらに1細胞分離装置で分離し

たシングルセルを解析するプロトコルを構築した。

研究テーマ4「各種生体試料を用いたプロトコルの検証」

構築したプロトコルを用いて、まず1万個の未分化なヒト iPS 細胞と分化したヒト皮膚線維芽細胞の2種の全く異なる細胞のグライコーム解析を行った。この2種の細胞の糖鎖構造情報は以前我々の研究によって明らかにしている。得られた結果をクラスター解析すると、予想通り細胞の種類で明確にグループ化された。さらにフローサイトメトリーで得られたデータと関連することを確認した。このことは、構築した技術を用いることで、ヒト iPS 細胞とヒト皮膚線維芽細胞のグライコームの違いを解析できていることを示している。次にヒト iPS 細胞とヒト皮膚線維芽細胞のグライコームをシングルセルで解析し、ヒト iPS 細胞グライコームの多様性を明らかにするとともに、明らかに異なるグライコームを持つ希少なヒト iPS 細胞が存在することがわかった。最終的にはヒト iPS 細胞を外胚葉に分化させる過程におけるグライコーム変化を1万個の細胞とシングルセルで解析した。1万個の細胞の解析において、分化過程で糖鎖プロファイルが分化日数に依存して変化していることがわかった。シングルセル解析を行うと、細胞集団の不均一は糖鎖発現を明らかにすることができた。

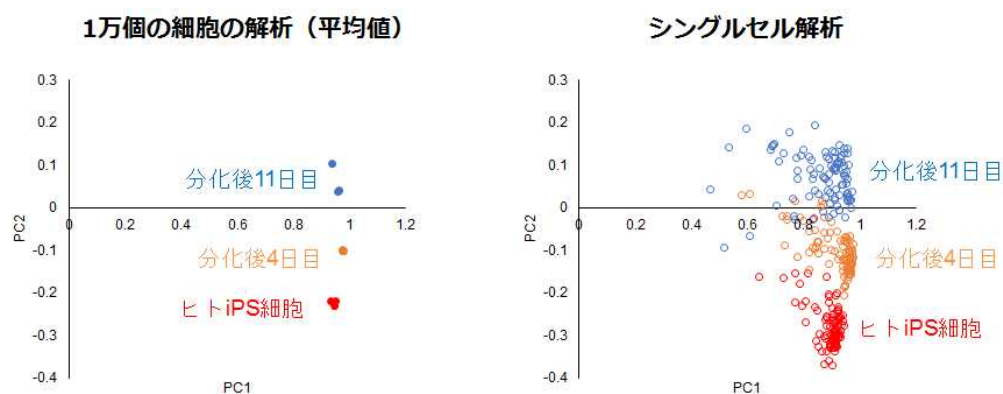


図 ヒト iPS 細胞の分化過程の糖鎖を 1 細胞粒度で見る

ヒト iPS 細胞の外胚葉への分化過程を1万個(左)とシングルセル(右)で解析した。不均一な糖鎖発現状態を可視化できた。

3. 今後の展開

開発した技術を用いて、単一細胞のグライコーム情報を取得し、グライコームの多様性を明らかにしていく。そして、細胞集団中に存在する希な細胞、例えば残存未分化細胞、がん幹細胞、組織幹細胞、逸脱細胞など、の同定や分離などに応用するとともに、それを標的とした試薬や医薬品候補の開発に展開する。また、本技術を用いて微生物叢の解析に展開し、微生物叢のグライコーム解析にも発展させる。

4. 自己評価

本研究では、単一細胞のグライコームを生きたまま、非破壊で解析するための技術を開発することを目的とした。最終的にNGSを用いて、高スループットに単一細胞のグライコームを生きたまま解析する技術を確立し、ヒト iPS 細胞やその分化過程におけるグライコームの多様性をシ

グルセルで可視化することに成功した。本技術は世界で初めてシングルセルでのグライコーム解析を実現するものであり、希少な細胞の糖鎖構造や機能解明のみならず、各種疾患の新たな診断・治療技術の開発や、未知な微生物叢グライコームへの展開等が強く期待できる。本研究成果は世界初の技術であることから科学技術への波及効果はもちろんのこと、新たな医療技術へと応用できることから社会・経済への波及効果も期待される。そのため、本プロジェクトで目標としていた内容を予定通り達成できたと自己評価する。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Oriented immobilization of rBC2LCN lectin for highly sensitive detection of human pluripotent stem cells using cell culture supernatants. *Tateno H(CA), Hiemori K, Minoshima F, Kiyoi K, Matoba K, Katayama J, Kumada Y. J Biosci Bioeng. 129 215-222 (2020)
2. Human Stem Cell Glycome: From Structural Elucidation to Social Implementation. Tateno H. Trends in Glycoscience and Glycotechnology 31 (181), SE83-SE84 (2019)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

<総説>

館野浩章、新たなモダリティとしてのレクチン-薬剤複合体の創出 医学のあゆみ 269(9)、659-667(2019)

<発表>

館野浩章、「TIA レクチン利用技術研究会活動報告とレクチン工学の未来」、平成 29 年度先導技術交流会・シンポジウム、機械振興会館ホール、2018/2/5

Hiroaki Tateno、「Lectin microarray: from glycan analysis to quality control of stem cells」、5th TERMIS World Congress、2018/9/6

Hiroaki Tateno、「Glycome of stem cells and application to regenerative medicine」、JAACT2018、Tsukuba International Congress Center、2018/11/5

<受賞>

2018年7月18日

第2回バイオインダストリー奨励賞

糖鎖プロファイリング技術の開発と再生医療・創薬への応用

研 究 報 告 書

「哺乳類生体内単一ニューロンの微細構造観察法開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 平林 祐介

1. 研究のねらい

脳神経系は多くのニューロンやその機能を支えるグリア細胞が協調して働き高度な情報処理を行うことで我々の知能を司っている。脳における情報処理は、「入力、情報処理、出力」という単一のニューロンによって行われる一連の素過程の集合に他ならず、「個々の」ニューロンの投射先やそれぞれのニューロンが持つシナプスの種類、空間配置などの 1 細胞単位での解析は脳神経系を理解するために必須である。しかしながら、脳を構成する細胞数の多さや、種類の多様性、それら多様な細胞が作り出す樹状突起と軸索の複雑な分岐、それぞれのシナプス終末の微細さにより、脳内における 1ニューロン単位での解析は非常に難しい。

樹状突起、軸索の形態や、そこで形成されるシナプスの性質、空間配置などについて、それぞれのニューロンは独特の個性を持っていると考えられている。このような個々のニューロンの個性を明らかにする上での大きな障害の一つは、他の細胞に比べてニューロンが特に大きいことにある。ニューロンは比較的小さいマウスのニューロンを例にとっても大脳内に投射するニューロンで数ミリメートル、大脳から脊髄に投射するニューロンの場合には数センチメートルもの軸索を伸ばし、非常に広範囲に多くの細胞とネットワークを作る。一方で脳の中では多くの細胞の軸索が束になったり、交差したりする中でナノメートルレベルのシナプス構造を作る。従って、単一ニューロンの投射パターンの全体像を把握すると同時に末端で作られるネットワークを追うことはナノメートル立方からセンチメートル立方レベルの大きなダイナミックレンジを持つ 3 次元的観察手法が必要となる困難なチャレンジである。このチャレンジは霊長類などの大きな脳を解析する際には指数関数的に困難なものとなり、これまでの解析の速度を高速化することによる解決では到底目的を達成できない。そこで我々はこのスケールの問題を解決するための新しい方法論を開発することにした。

我々は発生時期での遺伝子導入法を応用し大脳皮質全体の中で数個のニューロンのみをラベルすることで、単一ニューロンの三次元的投射パターンを蛍光顕微鏡下で観察することに成功した。さらに、DAB 染色を手掛かりとして蛍光顕微鏡で観察にした細胞を同定しその末端の構造を電子顕微鏡下で観察することに世界で初めて成功した。本研究ではこの革新的な技術を基盤としてより生物的な意味を明らかにするための手法を確立することを目的とした。そして実際に開発した技術を用いて、脳組織の中の特定の単一ニューロンについて、細胞体、樹状突起から軸索の先端まで投射パターンを蛍光顕微鏡により追い、さらにそのニューロンの内部構造、シナプス結合について電子顕微鏡レベルでの解析を目指した。

加えて、研究の後半では、行動中マウスを用いた蛍光顕微鏡観察で観察されたニューロンについて、その内部の微細構造を明らかにするという挑戦的な課題にも着手し、神経科学における重要な課題を明らかにすることをも目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

脳機能の解明を困難にしている理由の一つは脳の情報伝達を担う細胞であるニューロンは非常に大きな細胞であることである。細胞内の局所的な微細構造がその機能に重要であることから、微細構造を観察しつつ大きな細胞全体も観察しなくてはならない。本研究では蛍光タンパク質と同時に発現した peroxidase により触媒される 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) 染色を手掛かりとして、3次元電子顕微鏡観察法により取得した数千枚の組織連続切片画像の中から蛍光顕微鏡で観察した細胞を同定し、その末端

の3次元構造を電子顕微鏡下で観察することに世界で初めて成功した。この方法を用い、脳組織の中の特定の単一ニューロンについて、細胞全体を蛍光顕微鏡で観察した上で同定した樹状突起上のスパインや軸索、ニューロンの内部構造(核構造やオルガネラ構造)などの微細構造を、電子顕微鏡下でさらに詳しく解析した。これによりこれまで非常に困難であった特定のスパイン、軸索の構造の解析を可能にし、この技術の開発を Scientific Reports 誌に報告した(図 1、2、Hirabayashi et al., *Scientific Reports*, 2018 より改変)。本研究によって開発された技術は今後の脳機能の解明において重要なステップになる。

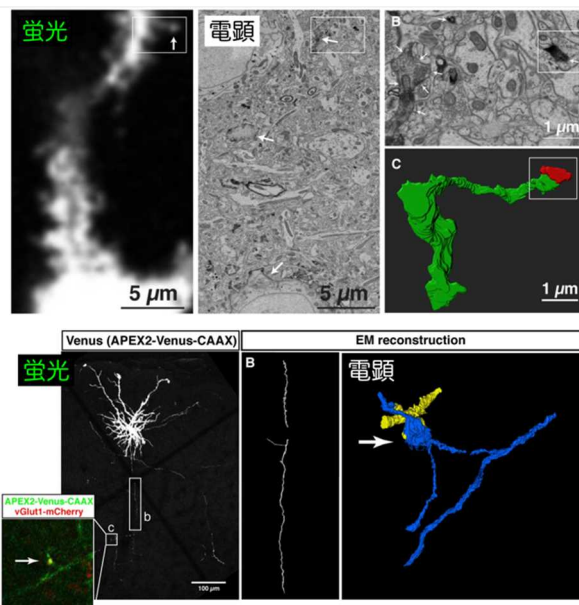


図1 蛍光顕微鏡画像と電子顕微鏡画像の相関観察

蛍光顕微鏡で観察したマウス大脳皮質ニューロンの樹状突起(上段)および軸索(下段)を電子顕微鏡で再度観察して構造を3次元再構築した。

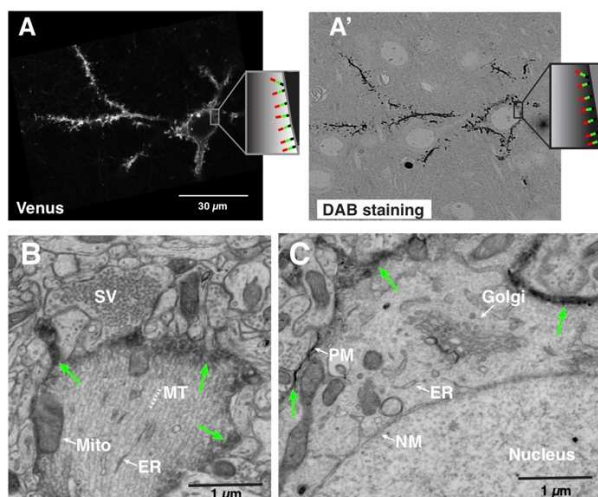


図2 (a) 共焦点顕微鏡によるニューロンの蛍光画像。(a') (a) に示したニューロンの電子顕微鏡による画像 (DAB 染色により認識する)。(b、c) 細胞膜が黒くラベルされた細胞の内部構造。SV-シナプス小胞, Mito-ミトコンドリア, ER-小胞体, MT-微小管, PM-細胞膜, Golgi -ゴルジ体, NM-核膜。

(2) 詳細

研究テーマ 1. 発現させるタンパク質、及びサンプル作成法の最適化

本研究では、蛍光—電子相関顕微鏡技術を可能にするために遺伝子コードされたタグを発現する方法をとった。その為に、タグの最適化を行った。まず、細胞膜の内部をラベルすることを目的として図3(A)に示すタグを開発した。このタグは鮮明に細胞膜をラベルするため、細胞の同定に非常に有用であり、同時に細胞内の観察も観察であったため、研究期間の前半においてはこのタグを用いて実験を行なった。サンプルの作成に際しては、細胞の膜構造を保つための固定の強さとタグのラベルの染色強度とがtrade offの関係にあることが分かり、最も膜構造が保たれたままタグによる染色が出来る条件を探した(図3B)。その結果、図3(B)に太字で示した条件が最適な条件であることが明らかになった。一方で、このタグを用いるとスパインやシナプス前終末のような細かい構造では細胞内構造がマスクされてしまったので、核局在タグの作成などを行なった。核局在タグは非常に強く細胞をラベルしたため、細胞固定を強くすることが可能になり、このタグも有用であることが分かった。

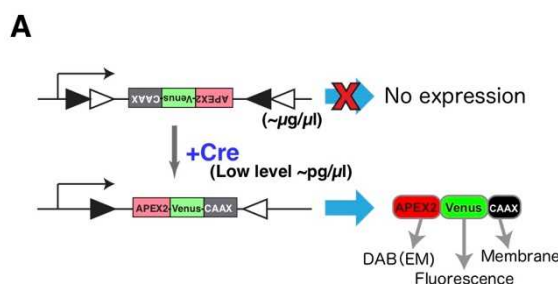


図3 (A) 蛍光—電子相関顕微鏡技術を可能にするために設計し発現した遺伝子の模式図。APEX2-Venus-CAAX プラスミドと Cre プラスミドが共に導入された場合にのみ、タンパク質が発現する。(B) 蛍光—電子相関顕微鏡を可能にするための最適化の結果。

B

Parameter	Values
Plasmid (AVC) Concentration	0.2, 0.4, 1 μg
Glutaraldehyde Concentration	0.25, 0.7 , 1.25, 2.5%
Thickness of vibratome section	50, 100 μm
Mounting solution for confocal imaging	75% Glycerol , VECTASHIELD
Substrate for APEX2	DAB , DAB with cobalt enhancer
DAB pretreatment	5, 20, 30 , 60 minutes
H ₂ O ₂ incubation time	5, 7, 15, 30 minutes
Temperature	On ice, Room temperature

2. 特定のシナプスの電子顕微鏡観察

これまで行われてきたシナプスの観察はランダムなシナプスの観察に過ぎなかったが、本研究では特定のニューロンの特定のシナプスを観察することを目的にした。これまでも蛍光

顕微鏡で観察したシナプスを観察する試みは行われて来たが、非常に効率が悪く、また偶然周囲に血管などのランドマークがある場合にしか特定のシナプスの観察は出来なかった。本研究で開発した蛍光—電子相関顕微鏡技術を用いたところ、図1に示すように蛍光顕微鏡を用い同定した特定の大脳皮質2層由来興奮性ニューロンの樹状突起状のスパインや、軸索の構造や投射先スパインの構造を明らかにすることに成功した。

2. 特定の単一ニューロンにおけるオルガネラ構造の電子顕微鏡観察

オルガネラ構造はナノメートル単位の構造であり、電子顕微鏡による観察が必要であったが、神経細胞におけるオルガネラ構造の研究は電子顕微鏡のレベルではあまり行われていなかった。そこで、本研究では特定のニューロンの特定の部位のオルガネラ構造を解析した。その結果、特定の単一大脳皮質興奮性ニューロンの細胞体や樹状突起におけるミトコンドリアの3次元再構築を効率よく行うことが出来た(図4)。また、大脳皮質興奮性ニューロンのゴルジ体や小胞体などの構造も観察することが出来た(図2)。

A

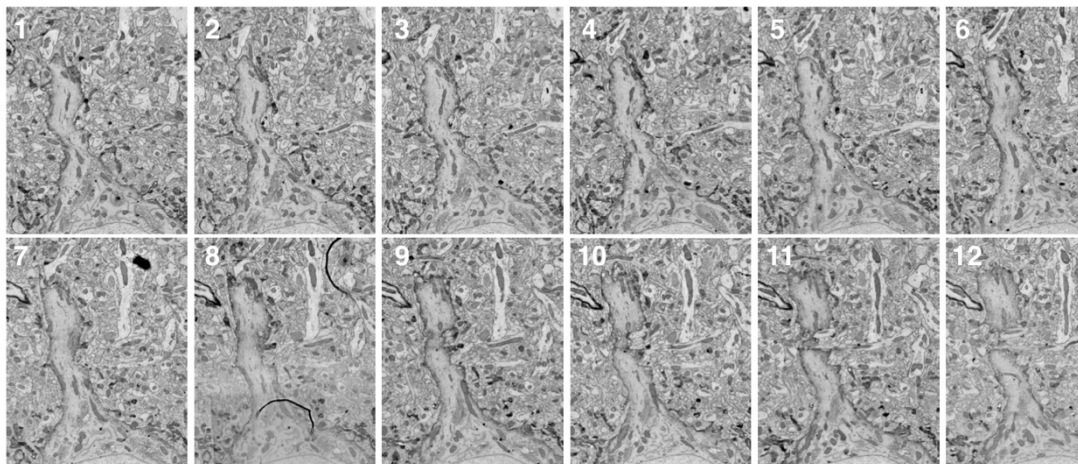
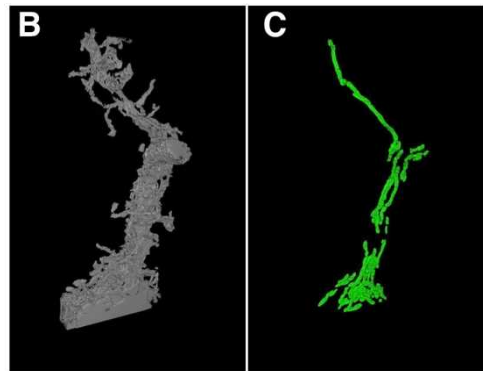


図4 (A) 蛍光—電子相関顕微鏡技術用のタグを発現した大脳皮質興奮性ニューロンの連続切片電子顕微鏡画像。(B、C) A の連続切片電子顕微鏡画像からラベルされたニューロンの細胞膜(B)ニューロン内のミトコンドリア(C)を3次元再構築した。



3. 今後の展開

本研究によって開発した技術を元に、我々は国立研究開発法人日本医療研究開発機構の革新脳プロジェクトにおいて遠距離に投射するニューロンのシナプス構造、及び内部構造の解析プロジェクトを行うことになった。これは本研究結果が今後広く展開していく可能性を示す良い例であると考えている。様々な蛍光顕微鏡を用いた神経系、非神経系細胞の観察と電子顕微鏡観察を

結びつけることによって様々な新規の発見が期待できる。

4. 自己評価

本さがけ研究で目標としていた研究のうち、効率的に一細胞の光学—電子相関顕微鏡観察を行う技術の開発に関しては、高いレベルで達成できたと考えている。その応用としてより高度な蛍光顕微鏡観察を用いた光学—電子相関顕微鏡観察も目標としていたが、こちらは2019年度中の達成を目指し現在取り組んでいる。研究費のうち多くは東京大学での研究室の立ち上げに際しての物品や試薬の購入に投じたが、その結果コロンビア大学での研究と遜色のない実験系を立ち上げることが出来た。

本さがけ開始前から光学—電子相関顕微鏡技術は多くの研究者にとって、実現可能性を感じるものの実際に個々の研究者の研究に取り込むことに関してはハードルが高い技術であった。本研究計画で実際の研究への光学—電子相関顕微鏡技術の導入可能性を示したことは、光学—電子相関顕微鏡技術にとって大きな進歩であったと考えている。今後は光学—電子相関顕微鏡技術が細胞生物学分野での標準的な技術となり、本研究が細胞生物学研究の標準を一段階引き上げるきっかけとなることが出来たのではないかと考えている。特に疾患の原因を明らかにするためには、疾患の原因となっている細胞に絞って微細構造を明らかにすることが重要であり、本研究により開発された技術が疾患の原因解明の一助となる可能性が大いにある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yusuke Hirabayashi, Juan Carlos Tapia, and Franck Polleux
Correlated Light-Serial Scanning Electron Microscopy (CoLSSEM) for ultrastructural visualization of single neurons in vivo **Scientific Reports** 2018, 8;14491
2. *Yusuke Hirabayashi, *Seok-Kyu Kwon, Hunki Paek, Wolfgang M. Pernice, Maëla A. Paul, Jinoh Lee, Parsa Erfani, Ashleigh Raczowski, Donald S. Petrey, Liza A. Pon and Franck Polleux
ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca^{2+} dynamics in mammalian neurons **Science** 2017, Nov 3;358(6363): 623-630 (Research Article) * Equal contribution
3. Fan Shi, Fuun Kawano, Seon-hye Emily Park, Shinji Komazaki, Yusuke Hirabayashi, Franck Polleux and Masayuki Yazawa
Optogenetic control of endoplasmic reticulum-mitochondria tethering neurons **ACS Synthetic Biology** 2018, 7(1), pp 2-9
4. *Annie. Lee, *Yusuke. Hirabayashi, *Seok-Kyu Kwon, *Tommy L. Lewis, Franck Polleux
Emerging roles of mitochondria in synaptic transmission and neurodegeneration **Current Opinion in Physiology** 2018, Vol. 3;82-93 * Equal contribution
5. George Mountoufaris, Weisheng Victor Chen, Yusuke Hirabayashi, Sean O'Keeffe, Maxime Chevee, Chiamaka Nwakeze, Franck Polleux, Tom Maniatis
Multi-cluster Pcdh diversity is required for neural circuit assembly **Science** 2017, ;356(6336): 411-414

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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 30 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

招待講演(国際学会)

20th International Neuroscience Winter Conference (Solden, Austria) 2018 年 4 月 12 日

The 16th International Membrane Research Forum (Onna-son, Okinawa) 2019 年 3 月 18 日

研究報告書

「脳神経系細胞分画技術を基盤とした体細胞変異の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 文東 美紀

1. 研究のねらい

従来の生物学では、同一個体内のすべての細胞や組織は、免疫系細胞など一部の例外を除いて、同一のゲノム配列を持つと考えられてきた。しかし近年のゲノム解析技術の急速な進展により、ゲノム配列はすべての細胞において同一ではなく、一塩基変異(SNV)やコピー数変異(CNV)など、様々な種類の体細胞変異を含んでいることが明らかになりつつある。脳神経系細胞のゲノム DNA ではこれらに加えて染色体異数性やレトロトランスポソンの新規挿入など、脳神経特異的な体細胞変異が生じることが知られており、高次脳機能や精神神経疾患の病因・病態と密接に関連していると考えられている。これらの現象は稀な頻度で、かつ単一細胞レベルで生じると考えられることから、体細胞変異の研究には単一細胞ゲノム解析が必須である。しかし脳組織では、1) 機能・構造・形態の異なる多様な神経系細胞、グリア系細胞が混在していること、また、2) 脳神経系細胞に特化した高精度の単一細胞ゲノム解析技術が存在しないこと、の 2 点の制約から特殊な例を除き詳細はほとんど明らかにされていない。本課題では、これらの問題を克服する技術開発に取り組み、脳神経系単一細胞ゲノム解析のための基盤技術の確立を行い、生理条件下のさまざまな脳細胞種における体細胞変異のランドスケープを明らかにすることを目指した。

また我々は統合失調症患者の神経細胞において、レトロトランスポソンの一種である LINE-1 のゲノムコピー数が健常者より増大していること、患者脳における LINE-1 の新規挿入部位はシナプス関連遺伝子など、神経機能に重要な遺伝子の近傍に多いことを見出している。本成果は脳神経系における体細胞変異と統合失調症との関連を初めて示したものである。この結果は多数の細胞を使用して得られたものであったが、単一神経細胞ゲノム解析による詳細な解析を行うことにより、細胞種ごとに細胞の形態・機能を変化させるゲノム変異を同定することが可能になり、統合失調症の病因・病態理解のための新たな視点を示すことができると考える。本課題では、確立した脳神経系単一細胞ゲノム解析技術をもとに、統合失調症患者のさまざまな脳細胞における LINE-1 新規挿入部位の決定を行い、疾患との関連について詳細に明らかにすることを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

ヒトの脳組織を構成しているさまざまな種類の細胞から、シングルセルレベルのゲノム解析を可能にするため、ヒト死後脳前頭葉組織から神経細胞・オリゴデンドロサイト・活性化型マイクログリア・アストロサイト由来のそれぞれの細胞核を分画する手法の確立を行った。

単一細胞核に含まれる DNA は超微量であるため、ゲノム解析を行うためには DNA を増幅する必要がある。そこで上記の方法で得られたヒト脳由来の単一細胞核から、均一な全ゲノ

ム増幅を行うための条件の最適化を行った。

健常者前頭葉由来の単一神経細胞核から、上記の方法で全ゲノム増幅した DNA を使用し、次世代シーケンサーを使用して全ゲノムシーケンスを行い、体細胞一塩基変異(SNV)の検出を行った。その結果、ヒトの単一神経細胞核から、1500-3000 個程度の体細胞 SNV が検出された。これらの変異は細胞腫・部位特異的であり、神経細胞分画に数 10%程度の頻度で検出されたが、ほかの細胞種や位置が離れた組織片では検出されなかった。

また増幅した単一脳細胞核由来の全ゲノム増幅 DNA を用いて、ヒト特異的な LINE-1 である L1Hs の新規挿入位置を決定するための技術である L1Hs-seq 法の開発を行った。健常者前頭葉の神経細胞・オリゴデンドロサイト・マイクログリア由来の単一細胞核から L1Hs-seq を行い、新規 L1Hs 挿入位置の解析を行った。その結果、どの細胞種においても 1 個の細胞当たり数 10ヶ所程度の新規 L1Hs 挿入が見られ、細胞ごとに挿入位置は異なっていた。このように、健常者の脳細胞でも、さまざまな体細胞変異が検出されており、ゲノム配列は 1 細胞ごとにわずかに異なっていることが示された。

このような体細胞変異が統合失調症の病因に関与している可能性を検討するため、統合失調症患者前頭葉の単一神経細胞核 DNA を用いて、L1Hs 新規挿入の位置の解析を行った。その結果、これまで統合失調症患者で変異が報告されている遺伝子に L1Hs 挿入が検出された。このような神経細胞の一部で生じている L1Hs 挿入が疾患に関与する可能性が示された。

(2) 詳細

1. 健常者死後脳を用いた多種細胞核の分画技術の確立

ヒト死後脳組織からさまざまな細胞腫由来の細胞核を調製する方法の確立を行った。前頭葉組織をホモジナイズし、パーコール密度遠心勾配法を用いて粗細胞核画分を生化学的に調製したのち、神経細胞・オリゴデンドロサイト・活性化型マイクログリア・アストロサイトの細胞核に特異的に発現しているマーカー分子に対する抗体で蛍光染色を行い、セルソーターで分画を行った。その結果、それぞれの陽性画分の細胞核を安定して得ることが可能になった (Fig.1)。

2. ヒト死後脳由来の単一神経細胞からの全ゲノム増幅

単一細胞核に含まれる DNA は超微量であるため、ゲノム解析を行うためには全ゲノム増幅 (Whole Genome Amplification; WGA) する必要があるが、単一細胞からの全ゲノム増幅では、2 つのアレルのうち 1 つのアレルが増幅しないアレルドロップアウトと呼ばれる現象など、不均一な増幅が起きやすい問題が指摘されている。そのため均一な全ゲノム増幅を行うための条件の最適化を行った。マイクロ流路デバイスであるフリューダ임社の C1 装置を使用し、単一細胞核から全ゲノム増幅を行った。その結果、単一細胞核に含まれる約 6 pg の DNA を約 100 ng に増幅することが可能になった。得られた全ゲノム増幅産物について、96 カ所の SNP のタイピングを行い、ヘテロ SNP のコール率からアレルドロップアウト率の算定を行い、均一に増幅している産物を得ることが可能になった。

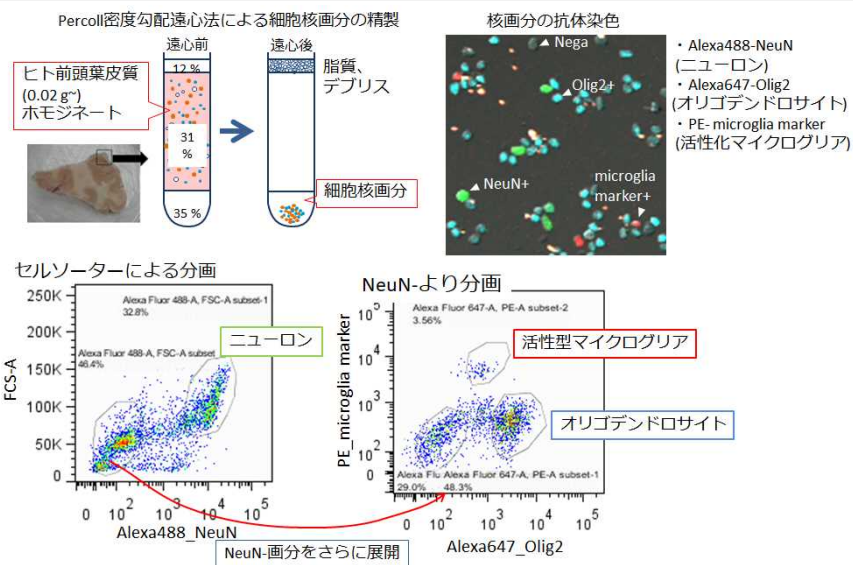


Fig.1 ヒト脳組織からのさまざまな細胞種由来の細胞核分画の例

3. 健常者前頭葉由来単一細胞核の全ゲノムシーケンス

健常者死後脳由来の単一神経細胞核から全ゲノム増幅した DNA を使用し、次世代シーケンサーNovaSeq を使用して全ゲノムシーケンスを行い、体細胞一塩基変異(SNV)の検出のパイプラインの構築などを行った。その結果、ヒトの単一神経細胞核において、1500-3000 個程度の体細胞 SNV が検出された。元の組織片由来 DNA における変異頻度を調べたところ、これらの変異は細胞腫・部位特異的であり、神経細胞分画のみで 13-64%の頻度で変異が検出され、ほかの細胞種や組織では検出されなかった。これらの変異は神経細胞に分化する前駆細胞の段階で生じていることが予測された。

4. 健常者・統合失調症患者前頭葉単一細胞の LINE-1 新規挿入部位の決定

単一脳細胞核由来の全ゲノム増幅産物を用いて、ヒト特異的な LINE-1 である L1Hs の新規挿入位置を決定するための技術である L1Hs-seq の開発を行った。健常者前頭葉の神経細胞・オリゴデンドロサイト・マクログリア由来の単一細胞核から L1Hs-seq を行い、新規 L1Hs 挿入位置の解析を行った。その結果、どの細胞種においても、1 個の細胞当たり 40-60 個程度の新規 L1Hs 挿入が見られ、細胞ごとに挿入位置は異なっていた。またいずれの細胞種においても、神経関連遺伝子の近傍に新規挿入が多く検出された (Fig.2)。

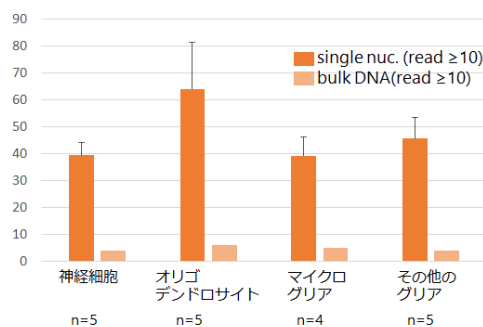


Fig.2 単一脳細胞における新規挿入L1Hsの数

精神神経疾患患者ではない日本人(93歳、女性)の死後脳前頭葉から、神経細胞、オリゴデンドロサイト、マイクログリア、その他のグリアの単一細胞核から増幅したDNA、それぞれの細胞種核画分バルクDNAを使用してL1Hs-seq法で解析を行なった。ヒトリファレンス配列 hg38・既存LINE-1データベースにないL1Hsを新規挿入とした。

このような体細胞変異が統合失調症の病因に関与している可能性を検討するため、統合失調症患者前頭葉 (n=1)の単一神経細胞核由来 DNA (n=6)を用いて、L1Hs が新規挿入したゲノム領域の同定を行った。その結果、1 つの神経細胞において、統合失調症患者で変異が報告されている遺伝子の 3' UTR に L1Hs 新規挿入が検出された。この神経細胞ではこの遺伝子の発現などに異常があったと考えられ、神経細胞の機能や形態が変化していた可能性がある。このような神経細胞の一部で生じている L1Hs 挿入が、疾患の発症に寄与する可能性が示された。

3. 今後の展開

今回の研究において、ヒト前頭葉の単一細胞からさまざまな体細胞変異が検出され、これらの変異の一部が脳神経疾患の病因に関与している可能性が示された。しかし今回の解析では、脳組織片をホモジナイズして細胞核を調製しているため、組織内における細胞の位置情報を失ってしまっている。脳神経疾患の病因解明においては、体細胞変異が生じた細胞の位置情報は重要であり、変異を持つ細胞が含まれる神経回路を同定することが必要になると考えられる。今後は、脳組織内における細胞の位置関係を保ったまま、体細胞変異解析を可能にするための技術開発を検討し、疾患に関与する神経回路の同定などにつなげていきたい。

4. 自己評価

脳組織由来のさまざまな種類の単一細胞核から一塩基変異や LINE-1 挿入などの体細胞変異を検出する手法の開発、その技術を使用した健常者・統合失調症患者由来脳細胞の体細胞変異解析など、当初予定していた研究計画について一通りの結果が得られた。研究実施体制についても当初の計画通りであり、研究費執行も適切に行った。今回開発した手法は、脳神経疾患に限らず、体細胞変異の関与が疑われている他の疾患（例えばがんなど）の病因解明に寄与する可能性があり、将来の医療に貢献するものとする。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Yoshikawa A, Nishimura F, Sasaki T, Kakiuchi C, Kato T, Iwamoto K. Identification of somatic mutations in monozygotic twins discordant for psychiatric disorders. npj Schizophrenia, 2018, volume 4, Article number: 7
2. Nishioka M, Bundo M, Ueda J, Katsuoka F, Sato Y, Kuroki Y, Ishii T, Ukai W, Murayama S, Hashimoto E, Nagasaki M, Yasuda J, Kasai K, Kato T, Iwamoto K. Identification of somatic mutations in postmortem human brains by whole genome sequencing and their implications for psychiatric disorders. Psychiatry and Clinical Neurosciences, 2018, 72: 280–294
3. Nishioka M, Bundo M, Iwamoto K, Kato T. Somatic mutations in the human brain: implications for psychiatric research. Molecular Psychiatry, 2019, 24: 839–856

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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)

主要な学会発表:Miki Bundo, Tadafumi Kato, Kazuya Iwamoto “LINE-1 copy number analysis of schizophrenic patients” More Epigenetics in Clinical Medicine (スウェーデン、ストックホルム、2017/4/28)

受賞:平成 28 年度 熊本大学女性研究者賞表彰「精神疾患患者における脳特異的なゲノム変異の解析」

著作物:Miki Bundo, Tadafumi Kato, Kazuya Iwamoto “Estimation of LINE-1 Copy Number in the Brain Tissue and Isolated Neuronal Nuclei Genomic Mosaicism in Neurons and Other Cell Types” Neuromethods, 2017, vol. 131, 209–217

文東美紀、岩本和也 「ヒト死後脳のさまざまな細胞種におけるゲノム・エピゲノム研究」, バイオイノベーションに向けて, 2019, シーエムシー出版, p223–229

研 究 報 告 書

「脳組織内1細胞での内在性タンパク質の網羅的局在・動態解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 三國 貴康

1. 研究のねらい

脳の機能を分子レベルで理解するためには、脳の最小の機能単位である脳細胞の機能を、タンパク質レベルで記述する必要がある。脳細胞は、機能的にも形態的にも、高度に（マイクロからナノメートルレベルで）細胞内でコンパートメント化されているため、脳細胞の機能をタンパク質レベルで記述するには、タンパク質の細胞内局在と動態を高精度に観察しなければならない。脳組織は、複雑な突起を伸ばし合う多種多様な細胞が密に詰まっている組織なので、脳組織内でタンパク質の細胞内局在と動態を高精度に観察するには、1 細胞でのタンパク質の可視化が必須である。さらに、脳細胞の機能発現に関わるタンパク質は数多くあるので、タンパク質の細胞内局在と動態を網羅的に同定する方法が必要である。

本研究では、哺乳類の脳組織内の 1 細胞でゲノム編集を行い、任意の内在性タンパク質を任意のタグで標識し解析することができる、これまでにない汎用的かつ網羅的な技術「SLENDR2.0」を開発することを目指した。この技術により、脳組織内の 1 細胞において、内在性タンパク質を、様々なアプローチを用いて網羅的に解析できるようになる。これにより、脳の機能を細胞・分子レベルで統合的に理解するための新たなプラットフォームが確立する。

具体的には、まず、研究実施者が既に開発した SLENDR 法 (Mikuni et al., Cell, 2016) のゲノム編集の効率と標識タンパク質の検出感度を向上させることにより、発現量の低いタンパク質でさえもその局在を可視化できるようにする。これにより、マウスの脳組織内の 1 細胞において、内在性タンパク質の細胞内局在および動態を、高精度かつ網羅的に解析するための決定的な方法「SLENDR2.0」を確立する。そのうえで、SLENDR2.0 を用いて、記憶や学習に重要とされる細胞レベルの現象「シナプス可塑性」を分子レベルで記述するためのアプローチを構築する。

これまでにない汎用性とゲノムワイドな拡張性、および迅速性と低コスト性を実現する SLENDR2.0 は、将来、脳神経科学での幅広い応用が見込まれる。これにより、様々な脳領域の様々な 1 細胞でのプロテオームやインタラクトームの高精度データベースができるので、脳機能の生理および病態を分子レベルで記述し理解するための研究が、飛躍的に発展すると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本さがけ研究の中で、まず、生体脳内でのゲノム編集効率を向上させることに成功した。また、ゲノム編集効率の向上により、サイズに関わらず様々な種類のタグでタンパク質を標識できるようになったので、タンパク質の高感度イメージングが可能になった。これらの技術開発により、「シナプス可塑性」に関わる数多くのタンパク質の細胞内局在・動態のイメージングを行った。

具体的には、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術とアデノ随伴ウイルスベクターを組み合わせることで、胎児期から成熟期のあらゆる時期で相同組み換え修復によるゲノム編集を適用できるようになり、相同組換え修復の効率も約 5%から最大 30%まで大幅に向上し、あらゆる脳領域、細胞集団を標的できるようになった(vSLENDR 法、Nishiyama*, Mikuni* et al., Neuron 2017)。また一方で、従来の子宮内電気穿孔法を使用した SLENDR 法の効率の大幅な改善にも成功した(rSLENDR 法、未発表)。SLENDR 法、vSLENDR 法、rSLENDR 法の長所・短所を踏まえたうえで、実験ごとに最適な方法を使用することを「SLENDR2.0」とした。

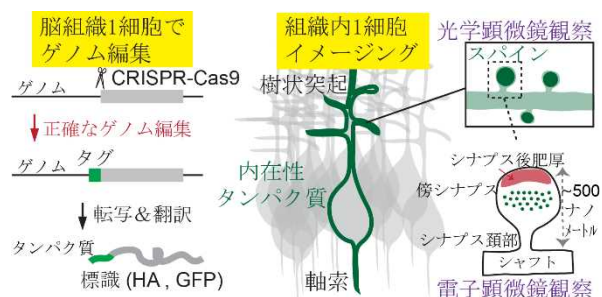
ゲノム編集効率の向上により、これまで難しかったサイズの大きなタグ配列の挿入もできるようになった。これにより、エピトープを 10 個含むスキファールドタグである Spaghetti-monster の配列を目的遺伝子座に挿入することが可能になった。これにより、シナプス可塑性に関わる様々な内在性タンパク質を Spaghetti-monster タグにより高感度にイメージングすることに成功している(未発表)。

(2) 詳細

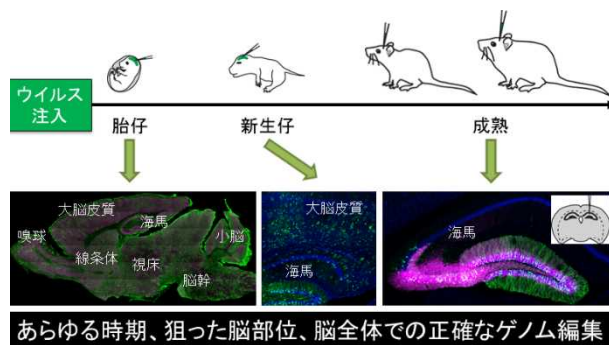
研究テーマ A:「SLENDR2.0 の開発」

研究実施者は、SLENDR 法 (single-cell labeling of endogenous proteins by CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair; 図 1)を開発し、哺乳類の生体脳内の 1 細胞で、内在性タンパク質を特異的に標識し観察することに成功していた(Mikuni et al., Cell, 2016 in press)。SLENDR 法は、脳の一部の細胞で正確なゲノム編集を行うことで目的遺伝子に標識配列を挿入し、その遺伝子産物であるタンパク質を特異的に標識できる世界初のオリジナルな技術である。この方法により、脳組織内の 1 細胞で、内在性タンパク質の局在を、迅速かつ特異的に観察できる。しかしながら、SLENDR 法のゲノム編集の効率と標識タンパク質の検出感度では、発現量の低いタンパク質の検出は難しい。ゆえに、脳組織内の 1 細胞で、内在性タンパク質の局在と動態を高精度かつ網羅的にマッピングする方法は、依然として存在していなかった。

そこで本研究では、哺乳類の脳組織内の 1 細胞でゲノム編集を行い、任意の内在性タンパク質を任意のタグで標識し解析することができる、これまでにない汎用的かつ網羅的な技術「SLENDR2.0」を開発した。まず、生体脳内でのゲノム編集効率を向上させることに成功した。このゲノム編集効率の向上により、サイズに関わらず様々な種類のタグでタンパク質を標識できるようになったので、タンパク質の高感度イメージングが可能になった。



生体脳内でのゲノム編集効率を向上させるために、まず、vSLENDR 法を開発した。細胞分裂を行わない細胞ではゲノム編集の効率が極めて低く、遺伝子配列の相同組み換えを通じて正確にゲノム配列を編集することは困難と考えられてきた。生後の脳では、殆どの神経細胞は細胞分裂を行わない



ため、脳神経科学の研究分野においては、ゲノム編集技術の応用は著しく限られてきた。本研究では、アデノ随伴ウイルスが遺伝子配列の相同組み換え効率を高める性質に注目した。アデノ随伴ウイルスを用いて、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集に必要な分子をマウス個体に導入することで、分裂を行わない成熟した神経細胞でも遺伝子配列の相同組み換えを起こすことに成功した。相同組換え修復の効率も約 5%から最大 30%まで大幅に向上した。この方法「vSLENDR」を用いることで、胎生期から成熟期まであらゆる発達段階において、生きたマウス個体の脳内の様々な細胞種、領域で遺伝子配列の組み換えを正確に起こすことに世界ではじめて成功した(図 2、Nishiyama*, Mikuni* et al., Neuron 2017)。

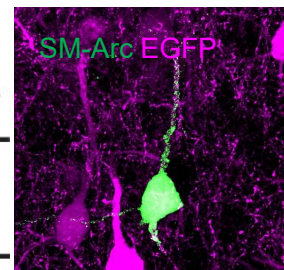
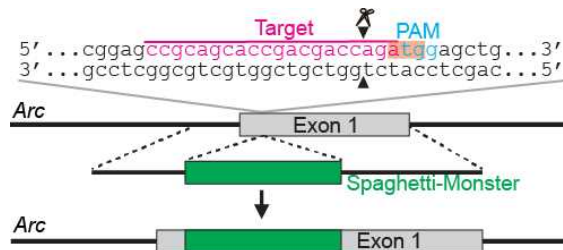
さらに本研究では、従来の子宮内電気穿孔法に基づく SLENDR 法(Mikuni et al., Cell 2016)を改良し、ゲノム編集の効率を上げることに成功した(rSLENDR 法、未発表)。SLENDR 法、vSLENDR 法、rSLENDR 法のそれぞれに長所・短所があるので、実験ごとに最適な方法を使用することをもって「SLENDR2.0」の確立とした。

ゲノム編集効率の向上により、これまで難しかったサイズの大きなタグ配列の挿入もできるようになったので、個々のタンパク質の高感度イメージングが可能になった。

研究テーマ B:「SLENDR2.0 の応用」

SLENDR2.0 により、様々なタンパク質をコードする遺伝子座に様々なタグ配列を迅速かつ高効率に挿入できるようになった。個々のタンパク質の高感度イメージングのために、本研究では、エピトープを 10 個含むスキヤフォールドタグである Spaghetti-monster の配列を目的遺伝子座に挿入できるようにした。これにより、シナプス可塑性に関わる様々な内在性タンパク質を Spaghetti-monster タグにより高感度にイメージングすることに成功した(未発表)。SLENDR2.0 でターゲットした遺伝子は数十種類にのぼり、シナプス分子を中心に、転写因子や細胞骨格

分子、シグナル伝達分子や神経伝達物質受容体、イオンチャネル分子などを脳組織内 1 細胞でイメージングした。



このプラットフォームを使って、脳組織内 1 細胞での機能分子のライブイメージングも行った。これは、脳スライスのみならず、個体の脳でのイメージングも行った(未発表)。

3. 今後の展開

これまでにない汎用性とゲノムワイドな拡張性、および迅速性と低コスト性を実現する SLEND R2.0 を使って、研究者はこれから、学習・記憶をタンパク質の挙動で説明することを目指す。SLEND R2.0 とこれまでに習得してきた電気生理学、分子生物学、光遺伝学、イメージングの手法等を駆使することで、シナプス可塑性に重要なタンパク質の細胞内局在のハイスループット解析を行う。学習・記憶の細胞レベルの現象「シナプス可塑性」に重要なタンパク質は百種類以上知られているが、神経細胞内の局在が不明なものが未だ数多く存在している。とりわけ、イオンチャネルや GPCR などの局在は、その重要性にも関わらずよくわかっていない。研究者は、従来の方法ではアプローチが難しかったこのようなタンパク質の局在を、SLEND R2.0 を用いて迅速かつ高精度に同定する。さらに、実際に学習・記憶を行っている動物の脳で、タンパク質の動態をライブイメージングする。まず、Ca²⁺イメージングと組み合わせることで、細胞活動と分子動態の相関を解析する。次に、記憶痕跡細胞 (memory engram cell) を遺伝子工学的に同定し、痕跡細胞と非痕跡細胞の分子動態を比較する。

学習・記憶をタンパク質の挙動で説明することで、私たちのアイデンティティの源である学習・記憶の理解が深まる。また、記憶できない病態の理解と治療法の開発につながる。

4. 自己評価

SLEND R2.0、とくに vSLEND R 法の開発により、難しいとされていた生後の脳でも正確なゲノム編集を効率よく行うことを実現し、脳神経科学分野で広くゲノム編集技術を応用できるようになった (Nishiyama*, Mikuni* et al., *Neuron* 2017)。この技術開発により、あらゆる時期の任意の脳領域・細胞種でタンパク質の局在や動態を網羅的に解析するための新たな技術基盤ができ、本研究の目的は十分に達成されたと考える。これらの研究成果は、脳神経科学における研究手法のブレイクスルーであり、分子細胞神経科学の分野の発展に貢献すると期待できる。研究者は、さがけ期間中に米国から帰国し新しく研究室を立ち上げたが、そのなかで研究費を有効に使用し研究を大きく中断することなく進めることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Nishiyama J*, Mikuni T*†, Yasuda R†. Virus-mediated genome editing via homology-directed repair in mitotic and postmitotic cells in mammalian brain. *Neuron*. 2017; 96(4):755–68. *Co-first authors †Corresponding authors
2. Mikuni T. Genome editing-based approaches for imaging protein localization and dynamics in the mammalian brain. *Neurosci Res*. 2019 in press

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(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)

2017 年 日本生理学会奨励賞

2017 年 プレスリリース「あらゆる発達段階のマウス脳内で狙った細胞の正確なゲノム編集に成功」 <https://www.jst.go.jp/pr/info/info1289/index.html>

2019 年 日本神経科学学会奨励賞

研究報告書

「光応答性細胞固定化剤表面を用いた 1 細胞操作技術の開発と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研究者: 山口 哲志

1. 研究のねらい

細胞は、周囲の細胞や細胞外マトリクスといった環境と相互作用することによって表現型を変化させる。この表現型は細胞内の複雑な遺伝子ネットワークによって応答・発現するため、限られた数のマーカー分子の増減を指標にしたスクリーニングでは正確に識別できないものも多い。そこで、注目する細胞の機能や振る舞いといった表現型自体を、イメージング技術を用いて一細胞ずつ直接定量化し、その数値を指標に正確に選別することが未知の生命システム・疾患メカニズムの解明や有用な機能性細胞の獲得に重要である。

環境と相互作用する一細胞をその表現型に応じて網羅的に選別するには、任意の生物学的な表面に精緻に細胞を配置し、表現型の解析後に望みの単一細胞を回収しなくてはならない。そのためには、外部刺激によって細胞を自由自在に接着したり取り外したりする技術が必要である。一細胞レベルの空間的精度で自由に与えられる刺激としては、光刺激が最適である。光は高速で伝搬するため時間的精度も極めて高い。また、波長さえ選べば、細胞への影響も極めて少ないことがこれまでのイメージング研究などで広く実証されている。しかし、光刺激を用いて望みの場所に細胞を接着する技術や、光刺激を用いて細胞を取り外す技術はそれぞれ単独で幾つか報告されているが、任意の細胞の接着と脱離の両方を光刺激によって同時に実現できる技術は未だ存在しない。

本研究では、光応答性の分子ツールを用いて、任意の一細胞を基板上の望みの位置に望みのタイミングで瞬時に固定したり、取り外したりすることができる技術を開発する。この一細胞光操作技術を用いて、細胞の高精度な高速ソーティングを行う。近年、細胞生物学の基礎研究から再生医療までの幅広い分野において、一細胞レベルで細胞を正確に高速選別する技術が求められている。求められる技術も様々であり、数 10%程度ずつ含まれる数種類の細胞を全て分取しないといけない場合もあれば、数万個に一個程度の「レア」な細胞を少数確実に選別する場合まである。本研究で開発する技術を用いれば、光を用いて細胞を並べ、表現型を多角的に解析することによって正確に識別後、並列光照射によって少数でも多数でも目的の細胞のみを迅速に回収できる。また、この一細胞光操作技術を用いれば、選択的に目的の表現型の細胞のみを逆に固定化することも出来、「レア」な細胞の基板表面上への選別と培養、さらには、解析後の光回収を行うこともできる。さらに、光操作技術を用いて異種細胞を隣接させて並べれば、細胞間相互作用を人為的に誘起した状態で網羅的に解析することができ、細胞間で適切な相互作用を示した細胞のみを選択的に高速光回収することもできると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究によって、単一細胞を自由自在に固定化したりリリースしたりすることができる一細胞光操作技術に不可欠な二種類の新しい材料を開発した。まず、マイクロ流路内で単一細胞を確実に捕捉できる、固定化力の強い光分解性細胞固定化剤の開発に成功し、マイクロ流路内に精緻な一細胞アレイを構築できた。また、一定の流速下で光を照射することにより、この材料で固定した細胞をリリースすることも出来、現在、目的細胞の高速ソーティング技術に資する材料として応用研究を進めている。次に、光を照射して細胞を望みの位置に固定化後、別の波長の光を照射してリリースできる光スイッチ型の細胞固定化剤の開発にも成功した。紫外光による固定と、可視光によるリリースを繰り返して行うことが出来、望みの配置で培養後に目的の機能を有する細胞のみを回収するツールとしての応用が期待される。また、詳細を記載しないが、これらの技術を用いて作成した一細胞アレイ上で、特定の GPCR の局在変化を追跡し、細胞間でのトラフィッキングのばらつきを定量評価したり、匂いセンサー細胞をアレイ化して匂いに応答する蛍光ディスプレイを構築したり、一細胞光操作技術の有用性を示す応用研究においても成果を得ることができた。さらに、マイクロ流路内に固定化した細胞のリリース条件の検討中に、マイクロ流体を用いて固定化した細胞を瞬時に破砕できることを発見し、細胞膜の裏側の分子システムを一細胞レベルで定量解析できるユニークな技術へと発展させることができた。以上のように、本研究を通じて、今後幅広い応用が期待される一細胞光操作技術の基盤を構築でき、応用研究や発展研究も実施できた。

(2) 詳細

研究テーマ A「細胞固定化力の高い光分解性細胞固定化剤の開発」

任意の表面に一細胞アレイを調製でき、並べた細胞から光照射によって目的の細胞を回収することもできる光分解性細胞固定化剤の開発を行った。ポリエチレングリコール (PEG) と脂質とからなる高分子材料 (PEG 脂質) を基板に修飾すると、基板表面に提示された脂質部分と細胞膜とが相互作用し、細胞が自発的に固定化される。また、PEG と脂質との間に光分解性リンカー (photocleavable linker: PL) を挿入した分子 (光分解性 PEG 脂質) を合成し、この分子を修飾した基板に光を照射すると、リンカーの分解に伴って脂質がはずれ、細胞と非接着性の PEG が露出する。従って、この分子で基板表面を被覆し、細胞を固定化したい場所以外に光を照射すると、非照射領域のみに細胞が固定化される (図 1A)。さらに、固定化した細胞は、細胞膜と相互作用している脂質部分を光照射によって切り離すことにより、基板表面から取り外すこともできる (図 1A)。この光分解性 PEG 脂質を用いて、マイクロ流路内に並べた細胞から目的の細胞のみを光照射によって高速で選別するシステムの構築を目指して研究を行った。この目標を達成するには、光照射前はマイクロ流体のせん断応力を上回る固定化力で細胞を捕捉し、光照射後はその細胞固定化力がせん断応力を下回って細胞をリリースする必要がある。プロトタイプ的光分解性 PEG 脂質 (PEG-PL-oleyl) は、PL を挿入していない PEG 脂質 (PEG-oleyl) と比較して細胞固定化力が弱く、光照射後に細胞をリリースさせるのに必要な流速下 (1 mL/min) では、細胞を安定に保持し続けることが困難であった。そこで、細胞膜と相互作用する脂質部分 (oleyl 基) と PL との間の分子構造 (図 1B, X) を最適化し、細胞固定化力の向上を

目指した。その結果、oleyl 基と PL との間にオリゴエチレングリコール構造を挿入すると、細胞固定化力が向上し、5 mL/min の流速下でも 80%以上の細胞が底面に残存することが示された(図 1C)。また、オリゴエチレングリコールの長さを最適化した結果、8 回繰り返し構造が最適で、細胞残存率は 90%を超えた。さらに、固定化した細胞に光を照射したところ、光依存的なリリースが確認され、3 J/cm² 以上の照射により、ほぼ全ての細胞がリリースされた。本研究成果は、特許出願し、現在論文投稿中である。本成果をもとに、企業と共同で細胞ソーティング装置の開発を実施している。

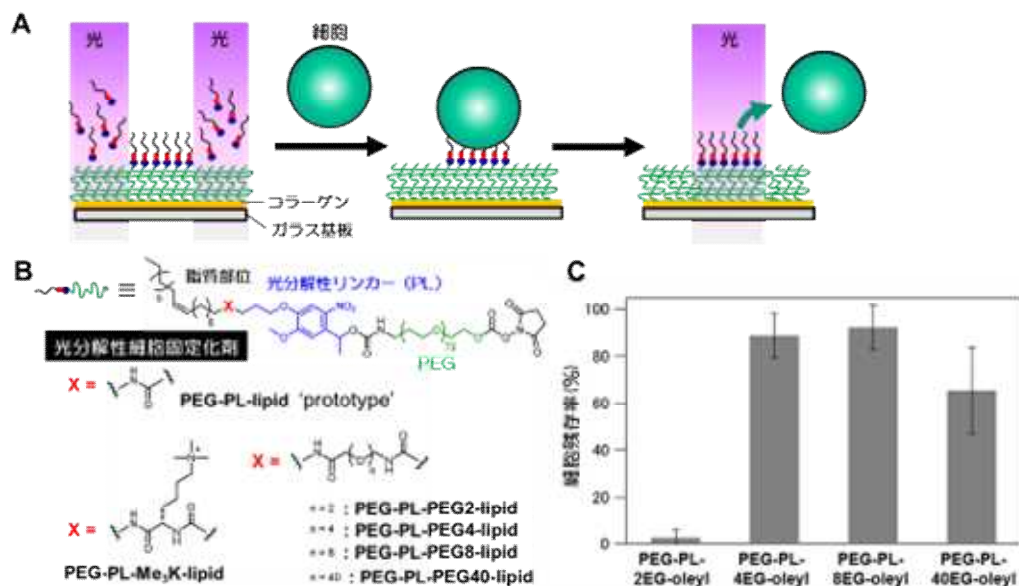


図 1 細胞固定化力の高い光分解性細胞固定化剤の概念図(A)と構造式(B)、細胞固定化時の細胞残存率(流速 5 mL/min 下)

研究テーマ B「光スイッチ型細胞固定化剤の開発」

上記の「研究のねらい」で書いたとおり、細胞の固定化とリリースのどちらか一方を光誘起する材料は多く報告されているが、異なる二波長の光を用いて脱離と固定のどちらも誘起できる光スイッチ型の細胞固定化剤はほとんど報告されていない。特に、細胞の接着性を利用せず、任意の細胞に応用可能な技術は皆無である。そこで、PEG 脂質骨格を用い、任意の細胞と基材表面との相互作用を光によってスイッチできる化合物の開発を試みた。我々は、これまでの研究の中で、脂質部位の疎水性が高過ぎると PEG 脂質修飾表面に細胞を固定化できないことに気が付いていた。そこで、脂質部分の疎水性を光照射に応じて可逆的に変えることにより、光スイッチ型の PEG 脂質修飾表面が開発できると考えた。ここで、光異性化に伴って疎水性が変化するスピロピランに注目した。スピロピランは、紫外光を照射すると開環して疎水性の低いメロシアン(MC)構造をとり、可視光を照射すると再度閉環して疎水性の高いスピロピラン(SP)構造に戻る。PEG 脂質の脂質部位にスピロピランを導入すれば、疎水性の高い SP 構造時に細胞を固定化しないが、MC 構造に変換すると固定化するようになると思った(図 2A)。

まず、PEG と oleyl 基との間に分岐リンカーを介して、スピロピランを導入したプロトタイプの化合物(図 2B、[0Sp2]-NHS)を設計・合成した。この化合物を基板表面に修飾し、紫外光(360 nm)または可視光(520 nm)を照射後、細胞を作用させ、表面に捕捉された細胞の数を定量し

た。その結果、固定化力を「オフ」にするはずの可視光照射によっても細胞が固定された(図 2C)。これより、プロトタイプでは、「オフ」の SP 構造時の疎水性の高さが不十分であると考え、より疎水性の高い 5 つの化合物を合成して同様の実験に供した。その結果、スピロピランをつなぐリンカーを長くすることによって疎水性を強めた化合物の 1 つ ([0Sp6]-NHS) が、望み通りのきれいなオンオフ制御を示した(図 2C)。この分子を修飾した表面を用いて空間的な制御を試みたところ、紫外光照射領域のみへの選択的な固定や(図 2E 左)、可視光照射領域のみからの選択的な脱離が可能であった(図 2E 右)。また、本手法を用いて細胞を固定・脱着させた細胞の生存率を調べたところ、未処理の細胞と全く同じであった。さらに、紫外光と可視光とを交互に照射して細胞の固定と脱着を繰り返し行ってみた。その結果、10 回程度のオンオフ制御に成功した(図 2D)。本研究結果は、特許出願後、ACS Applied Bio Materials 誌に掲載された。

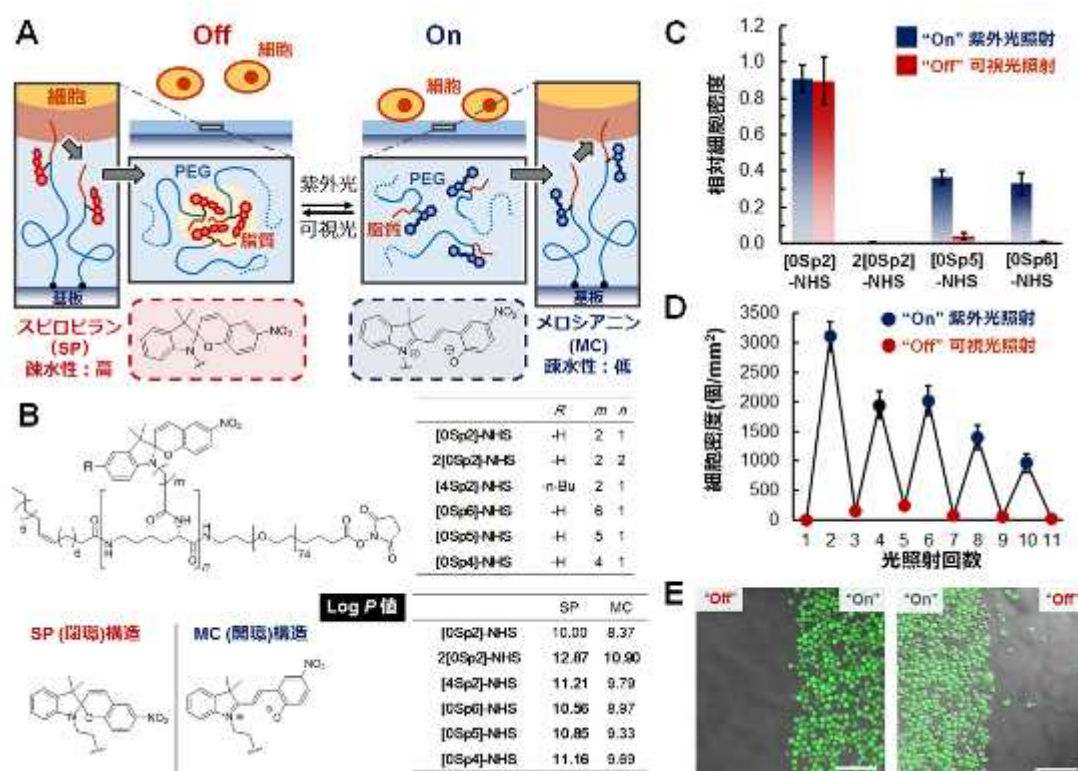


図 2 光スイッチ型 PEG 脂質による細胞固定化の概念図(A)と構造式(B)、細胞固定化時の細胞固定化密度の光依存性(C)(D)、光に応じた固定化またはリリース後の顕微鏡画像(E)。

研究テーマ C「細胞膜の裏側観察技術の開発」

細胞膜の細胞質側表面近傍にはシグナル伝達の鍵となる因子が多く存在しており、その分子ネットワークの解明は、細胞生物学の基礎研究や創薬における重要な研究課題である。しかし、細胞膜の選択的な透過性により、細胞外から細胞膜の細胞質側表面上の因子に分子デバイスをアクセスさせることが制限される。従って、細胞表層の分子と同じように、抗体や合成阻害剤ライブラリーを作用させ、可視化したり機能制御したりするのは困難である。そこで、本研究では、細胞膜内面に簡単にアクセスする方法として、マイクロ流体の剪断応力を用いて瞬時に細胞を破碎し、直前まで生きていた細胞の細胞膜内面を観察する方法を開発した(図 3a)。マイクロ流路の底面に PEG 脂質を用いて細胞を固定化した後、マイクロ流路に種々の流

速で層流を1分間流し、その前後で底面を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、流速の増加に伴い、基板上にシート状の細胞膜だけが残ることを確認した。この細胞膜シート上に、細胞膜内面が露出しているかを確認するために、予め細胞質側だけにタグ配列を導入した膜タンパク質を発現させておき、タグ配列に対する抗体を作用させたところ、高速の層流を流した場合のみ抗体染色が見られた(図 3c)。また、この細胞膜シートを電子顕微鏡で観察したところ、細胞側面で切断されている像が得られた(図 3b)。また、シート表面に繊維状や球状の構造体が残存していることも観察された。さらに、この細胞膜シート上で、細胞破碎直前にリガンド刺激をした受容体の細胞内ドメインのリン酸化を一細胞レベルで可視化・解析することにも成功した。以上の結果より、本技術を用いて直前まで生きていた細胞の細胞質側の分子システムを観察できることが確認された。本研究成果は、*Scientific Reports* 誌に掲載された。

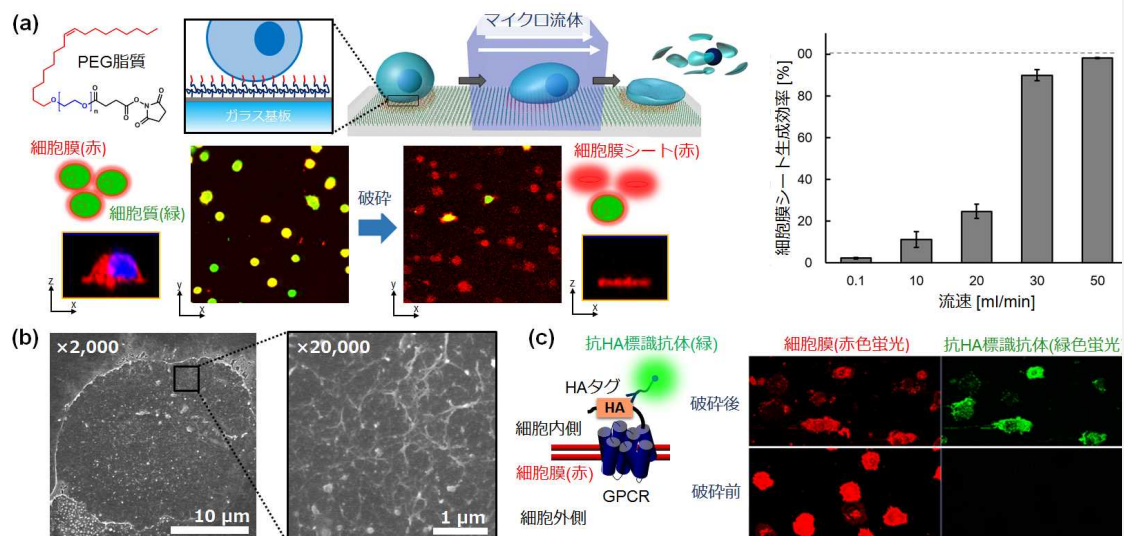


図 3 細胞膜の裏側解析技術の概念図と破碎前後の細胞の蛍光顕微鏡像および細胞膜シートの生成率(a)、細胞膜裏側の電子顕微鏡像(b)、裏側の GPCR のドメイン染色(c)。

3. 今後の展開

今後は、本研究で開発した一細胞光操作技術を基盤として、精緻に配置した細胞アレイ上で継時的なイメージングを指標にして識別した細胞を、高速かつ正確に選別できる技術や装置を開発する。このような装置を使って、従来法では選別出来なかった疾患関連の細胞を正確に単離して調べ、新しい薬剤標的の探索や疾患の分子メカニズムの解明に応用する。また、疾患の悪性度や治療効果に直結する表現型を指標にして細胞を選別し、確度の高い細胞診断や治療効果の高い細胞療法の実現に資することを示す。このように、創薬や診断、治療を支援する新しいプラットフォーム技術として、一細胞光操作技術の社会実装を実現したい。

4. 自己評価

任意の一細胞を基板上の望みの位置に望みのタイミングで瞬時に固定化したり、リリースしたりすることができる技術を開発するという本研究目的は、固定化力の高い光分解性細胞固定化剤や光スイッチ型細胞固定化剤の開発により、当初の計画とは異なる方法ではあるが、達成できたと言える。また、当初計画した方法でも開発を進めており、上記の成果とは異なるメリットを

有する技術が開発できる目途は立った。研究実施体制や研究費執行状況についても、概ね計画通りに進行し、研究の遂行に必要な人員の確保と最低限の機器の整備が行えた。一方で、高速細胞操作を可能とする精密な光照射装置については、予算内では当初想定していた能力の装置が購入できず、応用研究の面で小規模な原理の証明までしか達成できなかった要因の一つとなった。しかし、今回開発した一細胞光操作技術を基盤として、単一細胞の光ソーティングや、異種細胞間相互作用の人為的な創出・解析についての萌芽的な技術が構築できた。この成果は、従来法では単離できなかった疾患関連細胞や治療用細胞を選別でき、難治性疾患の創薬標的の探索や確度の高い次世代診断・治療技術の実用化に大きく貢献できる。このような創薬や診断、治療を支援する新しい技術は、手術の要らない投薬による在宅治療の拡充や、正確なコンパニオン診断による効果的な初期治療、超早期診断による未病治療などを通じて、高齢化社会の医療費問題を解決できると考えられる。さらに、健康寿命を延ばすことにより、国民全員が生涯現役で働き続けられる健康で豊かな未来社会の創造にも貢献できると考えられる。

また、本「統一細胞」領域では、実験計画に過度に捕らわれない柔軟な研究の遂行が理解され、条件検討の過程で偶々見つけた細胞破碎現象から、細胞膜の裏側解析システムを創出するに当たり、細胞膜の裏側を高解像度で観察する技術の提供や想定される応用分野についての多くのアドバイスを頂いた。加えて、我々の要素技術を活用する共同研究も5件実施しており、領域内の異分野の研究者との人的交流を積極的に行った成果の一つであると自負している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Shin Izuta, Satoshi Yamaguchi, Akimitsu Okamoto. Reversible and photoresponsive immobilization of nonadherent cells by spiropyran-conjugated PEG-lipids. *ACS Applied Bio Materials*. 2019, **2**, 33–38.
2. Shin Izuta, Satoshi Yamaguchi, Ryuji Misawa, Shinya Yamahira, Modong Tan, Masahiro Kawahara, Tomoko Suzuki, Tomoko Takagi, Kae Sato, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune, Akimitsu Okamoto. Microfluidic preparation of anchored cell membrane sheets for in vitro analyses and manipulation of the cytoplasmic face. *Scientific Reports*. 2017, **7**, 14962.
3. Mondong Tan, Satoshi Yamaguchi, Shinya Yamahira, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune. Quantitative image cytometry for analyzing intracellular trafficking of G protein-coupled receptors on a chemically trapping single cell array. *Lab on a Chip*. 2017, **17**, 1933–1938.
4. Mondong Tan, Satoshi Yamaguchi, Motonao Nakamura, Teruyuki Nagamune. Real-time monitoring of pH-dependent intracellular trafficking of ovarian cancer G protein-coupled receptor 1 in living leukocytes. *Journal of Bioscience Bioengineering*. 2018, **126**, 363–370.

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

公開済み 1 件

1.

発 明 者:山口 哲志, 岡本 晃充, ナタリア・テレサ・ヤジェンブス, 泉田 森, 山平 真也,
長棟 輝行

発明の名称 :光分解性細胞固定化剤

出 願 人:国立大学法人東京大学

出 願 日:2017/11/7

出 願 番 号 :2017-214107

(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. 山口 哲志,

光応答性分子ツールを用いた細胞操作および解析,

化学とマイクロ・ナノシステム学会第 36 回研究会, 群馬, 桐生市民文化会館, 10 月 2017 年.

2. Satoshi Yamaguchi,

Chemical tools working at bio-interfaces for Bioengineering,

Asian Engineering Dean's Forum, Singapore, March 2017.

(国際学会口頭発表)

3. Satoshi Yamaguchi, Shin Izuta, Shinya Yamahira, Teruyuki Nagamune, Akimitsu Okamoto,

Photo-responsive cell immobilizing reagents for single-cell manipulation,

The 18th International Biotechnology Symposium and Exhibition (IBS2018), Montréal, Canada,

August 2018.

(著作物)

4. 細金 剛, 山口 哲志, 岡本 晃充,

光応答性分子を用いた 1 細胞解析・選別技術,

化学とマイクロ・ナノシステム学会誌, 17, 2017.

研 究 報 告 書

「間葉系細胞の機能を制御する核酸アプタマースキャフォールド」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 吉本 敬太郎

1. 研究のねらい

本研究課題では、核酸アプタマーを基盤とする、接着・増殖・分化などの細胞の機能を人工的に制御する新規液性因子やスキャフォールドの開発を目的とした。本目的を達成するため、まずは改良型核酸アプタマー選抜法 (SELEX) に取り組み、次世代シーケンサーのビッグデータを効率良く解析する手法の導入や、キャピラリー電気泳動法を活用した独自の SELEX 法を確立するところから研究を開始した。

2. 研究成果

(1) 概要

次世代シーケンサーのビッグデータを効率良く解析する手法の導入、さらにキャピラリー電気泳動法を導入した独自の SELEX 法を確立するとともに、VEGF 様な血管新生機能を有する液性因子アプタマーの獲得、ならびに上皮系細胞の選択的な接着・培養を可能とする核酸アプタマースキャフォールドの開発に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ①「核酸アプタマー選抜法の改良」

「化学抗体」と称されるアプタマーは Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) という手法によって人工的に獲得が可能である。しかし、SELEX 法におけるアプタマー選抜工程の長期化や非常に低い成功率が課題となっている。i

SELEX 法の基本工程は、(1)核酸ライブラリーと標的分子の混合、(2)結合性の核酸の分離、(3)PCR による増幅、(4)一本鎖化による核酸ライブラリーの再構築、(5)シーケンス、に大別され、この一連の操作を繰り返すことで目的の核酸アプタマー候補分子を濃縮するものである。本研究では、まず、5 のシーケンスの工程に次世代シーケンサーを導入し、さらに、次世代シーケンサーから得られるビッグデータを効率良く解析するソフトウェアを用いて、核酸アプタマーの獲得率の上昇を目指した。その結果、N-cadherin、E-cadherin、VEGFR に結合する核酸アプタマー群を 6 ラウンドで獲得することに成功した。

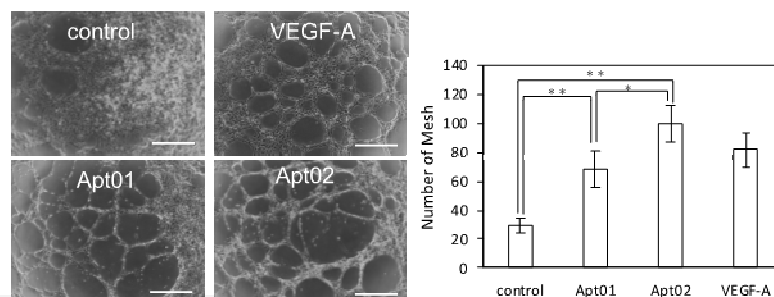
また、SELEX の (2) の工程におけるアプタマー/標的分子複合体の分離効率は SELEX の成功を左右する因子であり、高い分離性能を誇るキャピラリー電気泳動を用いる Capillary Electrophoresis-SELEX (CE-SELEX) は、最も高速な核酸アプタマーの取得法の一つである。しかし、検出感度の限界によりアプタマー/標的分子複合体の CE 分取が不確実、アプタマーとの結合時に十分な CE 移動度シフトを起こす標的分子に限られるといった課題があったため、本研究では、CE-SELEX の課題である「複合体の正確な検出」と「複合体形成時の大きな CE 移動度シフト」を同時に満たす、高親和性アプタマーの高速選抜法「マイクロ粒子支援型

キャピラリー電気泳動 SELEX (microbeads-assisted capillary electrophoresis SELEX; MACE-SELEX)』を確立した(*Mol. Ther. Nucleic Acids*, 16, 348–359, 2019. *Anal. Sci.*, 35(5), 585, 2019.)。その結果、トロンビンや TNF- α に結合するアプタマー群を 3–4 ラウンドで獲得することに成功し、獲得したアプタマーの結合能と薬効は既報のアプタマーの性能を上回るものであった。

研究テーマ②「液性因子・スキャホールドとして機能する核酸アプタマーの選抜と機能評価」

細胞培養の添加因子や足場材料には、タンパク質を利用するのが一般的な手法であるが、タンパク質は保存性が悪く高価、さらに作製した時期や場所、個体の差で大きなロット差が発生することから、長期間同質のものを提供することが困難である。再現性の良い細胞実験を遂行するためには、本課題を解決する新たな分子の利用が必要不可欠である。本研究では、核酸アプタマーの利用を着想した。核酸アプタマーは標的分子に特異的に結合するだけでなく、化学合成が可能であるため安価で常に均一の質の物質を提供でき、物質としての保存性も非常に高い。

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、既存の血管から分岐して新たな血管を形成する血管新生や、初期の胚形成時に新たに血管を形成する脈管形成において重要な因子であり、VEGF がその受容体 (VEGFR) に結合することで活性を示す。また、最近では、VEGF-A が iPS 細胞の内皮細胞への分化に重要な因子であることが報告されている。本研究では、VEGF-A に似た核酸アプタマーを獲得するために、試験管選択法 (SELEX 法) を VEGFR-1 と VEGFR-2 の両ターゲットに対し交互に 3 ラウンド行った。各ラウンドで得られた PCR サンプルを次世代シーケンサーで解析後、ラウンド数が上昇するに従って存在割合が上昇する配列を独自に開発した解析用ソフトウェアを用いて抽出した(研究テーマ①で開発した改良 SELEX 法の一つ)。得られた候補配列の結合能を、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーを用いて評価した結果、VEGFR-1 と VEGFR-2 の両ターゲットに結合する核酸アプタマー群の獲得に成功した。円偏光二色性 (CD) スペクトル (Fig.2) と融解温度 (T_m) (Fig.3) の結果から、Apt01 という配列はステムループ構造を形成し、VEGFR-1 に対して 3.3 nM、VEGFR-2 に対しては 100 nM の K_d 値を示すことが明らかとなった。また、四重鎖構造をもつ Apt02 は VEGFR-1 に対して 1.5 nM、VEGFR-2 に対して 32 nM の K_d 値であることが明らかとなった。マトリゲル上に播種した HUVEC2 細胞は、通常 18 時間で血管網を形成するが、血管網形成促進効果が知られている VEGF-A を添加すると、4 時間で血管網を形成する。興味深いことに、獲得したアプタマーのうち、Apt02 は 4 時間で VEGF-A と同程度の血管網を形成させる効果があることが明らかとなった(下図)。つまり、VEGF-A 様の新しい人工サイトカインとして機能することが明らかとなった(*Anal. Sci.*, 35(1), 113, 2019. 他、現在 revise 中)。



E-cadherin は、細胞間接着を担う細胞膜表面受容体存在するタンパク質である。上述した VEGFR に結合するアプタマーを獲得した時と同様、各ラウンドサンプルの次世代シーケンスデータ解析を利用する改良 SELEX 法により、3 段の平行型 4 重鎖構造をもつ E-cadherin 結合型アプタマー (EBA) の獲得に成功した。EBA の細胞接着能を確認するため、EBA をストレプトアビジン-ビオチン相互作用によって基板に修飾し、細胞足場を作製した。EBA 修飾基板に E-cadherin を多く発現している上皮細胞を播種したところ、細胞の接着が確認された。興味深いことに、EBA 修飾基板上の細胞は EDTA 処理後も剥離が起らず、二価の金属イオンに非依存的な細胞-DNA 間の新しい細胞接着様式をとることが示唆された。EBA 修飾基板上の細胞接着を免疫染色によって評価した結果、二価の金属イオン依存的な細胞接着様式である細胞-細胞外マトリクス (Extracellular matrix, ECM) 間接着と同様の接着斑が確認された。以上の結果から、EBA 修飾基板上における細胞接着は、細胞-ECM 間接着と細胞-DNA 間接着が混在した結合様式であることが示唆された。このような細胞接着特性を有する EBA の細胞選択性を確認したところ、間葉系の細胞には接着を示さず、上皮系細胞を選択的に接着・増殖する機能を有する事が明らかとなった (現在、論文投稿準備中)。

3. 今後の展開

EBA 固定化表面上に播種された細胞の網羅的遺伝子発現解析を mRNA seq などを用いて解析し、アプタマーが選択的に誘起する遺伝子発現現象を明らかにする。さらに、本研究で開発した改良 SELEX 法を駆使し、新たな標的分子に対するアプタマー群の獲得を継続して進め、新しい機能をもつ核酸アプタマースキャフォールドを開発する予定である。

4. 自己評価

獲得した核酸アプタマースキャフォールドは、上皮系細胞に対して選択的に接着を示す足場材料であった。当初の目標であった間葉系細胞の接着は研究機関内に実現できなかったが、選択的な細胞分離や培養を可能とする核酸アプタマーを資源とする足場材料を世界で初めて開発し、着想したアイデアが実現可能なものであることを明らかとした点は評価される点である。また、本研究の過程で確立された改良 SELEX 法は非常に効率よく、優れた結合能を有するアプタマー群を獲得することができる。本法は、アプタマー製剤をスクリーニングする際にも有益な技術となりえるはずである。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文 (原著論文) 発表

1. Wakui, K., Abe, A., Yoshitomi, T., Furusho, H., Yoshimoto, K., "High Enrichment of Nucleobase-Modified Aptamers in Early Selection Rounds by Microbeads-Assisted Capillary Electrophoresis SELEX" *Analytical Sciences*, 35(5), 585 (2019).

2. Wakui, K., Yoshitomi, T., Yamaguchi, A., Tsuchida, M., Saito, S., Shibukawa, M., Furusho, H., Yoshimoto, K., “Rapidly Neutralizable and High Anticoagulant Thrombin-Binding DNA Aptamer Discovered by Microbeads-Assisted Capillary Electrophoresis (MACE) SELEX” *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 16, 348–359 (2019).
3. Yoshitomi, T., Wayama, F., Kimura, K., Wakui, K., Furusho, H., Yoshimoto, K., “Screening of DNA signaling aptamer from multiple candidates obtained from SELEX with next-generation sequencing” *Analytical Sciences*, 35(1), 113 (2019).
4. Maruyama, R., Makino, K., Yoshitomi, T., Yui, H., Furusho, H., Yoshimoto, K., “Estimation of G-Quartet-Forming Guanines in Parallel-Type G-Quadruplexes by Optical Spectroscopy Measurements of Their Single-Nucleobase Substitution Sequences” *Analyst*, 143, 4022–4026 (2018).
5. Furuhashi, Y., Yoshitomi, T., Kikuchi, Y., Sakao, M., Yoshimoto, K., “Osteogenic Lineage Commitment of Adipose-Derived Stem Cells is Predetermined by Three-Dimensional Cell Accumulation on Micropatterned Surface”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9 (11), 9339–9347 (2017).

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(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) 吉本敬太郎, “toehold 導入型核酸アプタマーによる中和制御可能な抗凝固製剤”, 日本薬学会第 139 年会 一般シンポジウム “生体分子骨格リデザインで挑む次世代創薬研究”, 2019 年 3 月 22 日, (幕張メッセ, 幕張, 千葉).
- (2) Keitaro Yoshimoto, “Functions of DNA aptamers discovered by improved SELEX”, 3rd International symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology, March 8th 2019 (NIMS, Tsukuba, Ibaraki).
- (3) 吉本敬太郎, “DNA アプタマー選抜における分離・洗浄工程の重要性:微粒子導入型キャピラリー電気泳動の導入効果”, 日本分析化学会第 67 年会, 2018 年 9 月 13 日(東北大学, 仙台, 宮城)
- (4) 吉本敬太郎, “細胞接着性核酸アプタマーを利用する細胞分離・分析用足場材料の提案”, 日本分析化学会 66 年会, 2017 年 9 月 10 日(東京理科大学, 葛飾, 東京).

数理モデルで器官の形作りを予測する

奥田 覚（金沢大学 ナノ生命科学研究所・准教授）

研究課題名：「1細胞動態の統合モデリングによる三次元組織形成の予測制御」 研究期間：2016.10～2020.3

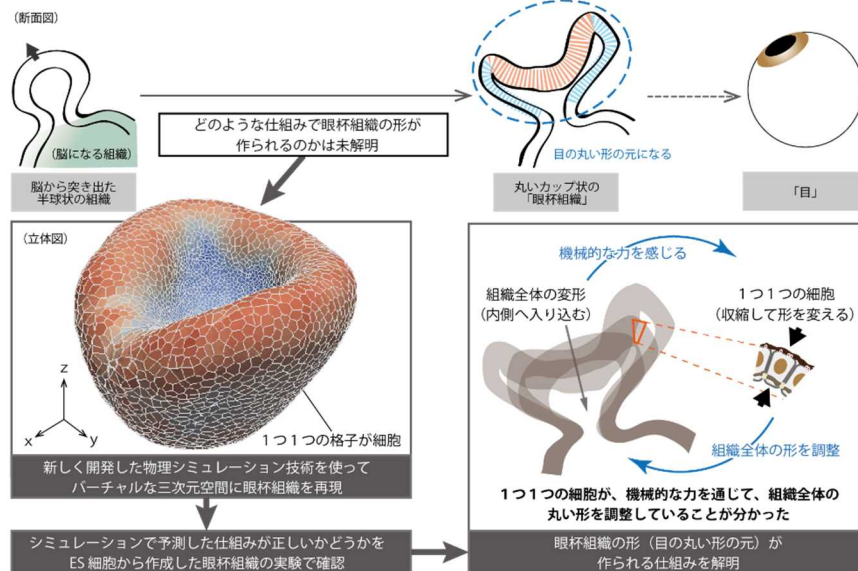


図 物理シミュレーションで明らかにした目の丸い形ができる仕組み

身体の形はどのような仕組みでできるのか？本研究では、物理学に基づくコンピューターシミュレーションと幹細胞を用いた組織培養実験を組み合わせ、目の丸い形が作られる仕組みを明らかにした。

生物の形作りは、人の身体の発生や疾患などの様々な生命現象に関わるため、基礎研究と医療の両方にとって重要です。特に、試験管の中での「器官の形作り」を理解し操作することは、今後の再生医療に使用する組織の立体形状を制御するためには重要だと考えられています。

本研究ではまず、複雑な眼杯組織の形が作られる仕組みを理解するため、実験で得た眼杯組織の情報を基にしてコンピューターシミュレーションを行いました。そして、眼杯組織の丸い形を作るためには、組織の場所ごとに細胞が異なる力を生み出す必要があると予測しました。また、マウスの胚性幹細胞を培養して作製した眼杯組織を使って、この予測を確かめました。

さらにその結果から、眼杯組織の丸い形が作られる際には、1つ1つの細胞が、眼杯組織全体の変形度合いを感じながら、その丸い形を微調整していることが分かりました。これらの発見は、「器官の形作り」に対する機械的な力の新しい役割を示しており、今後の再生医療に必要となる、試験管内での複雑な組織・器官の作製に役立ちます。

>>参考情報

論文

1. Satoru Okuda, Nozomu Takata, Yuiko Hasegawa, Masako Kawada, Yasuhiro Inoue, Taiji Adachi, Yoshiki Sasai, Mototsugu Eiraku "Strain-triggered mechanical feedback in self-organizing optic cup morphogenesis," Science Advances 4(11): eaau1354 (2018)
2. Satoru Okuda, Erina Kuranaga, Katsuhiko Sato, "Apical junctional fluctuations lead to cell flow while maintaining epithelial integrity," Biophysical Journal 116 (6): 1159-1170 (2019)

プレスリリース

1. 「目の丸い形ができる仕組みを解明 ―「器官の形作り」の理解から再生医療への貢献に期待―」（2018年11月）

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20181122/index.html>

ミトコンドリアの内膜構造が生きた細胞中で鮮明に見えた

多喜 正泰（名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任准教授）

研究課題名：「脂質ダイナミクスの精密解析技術の創出」 研究期間：2016.10～2020.3

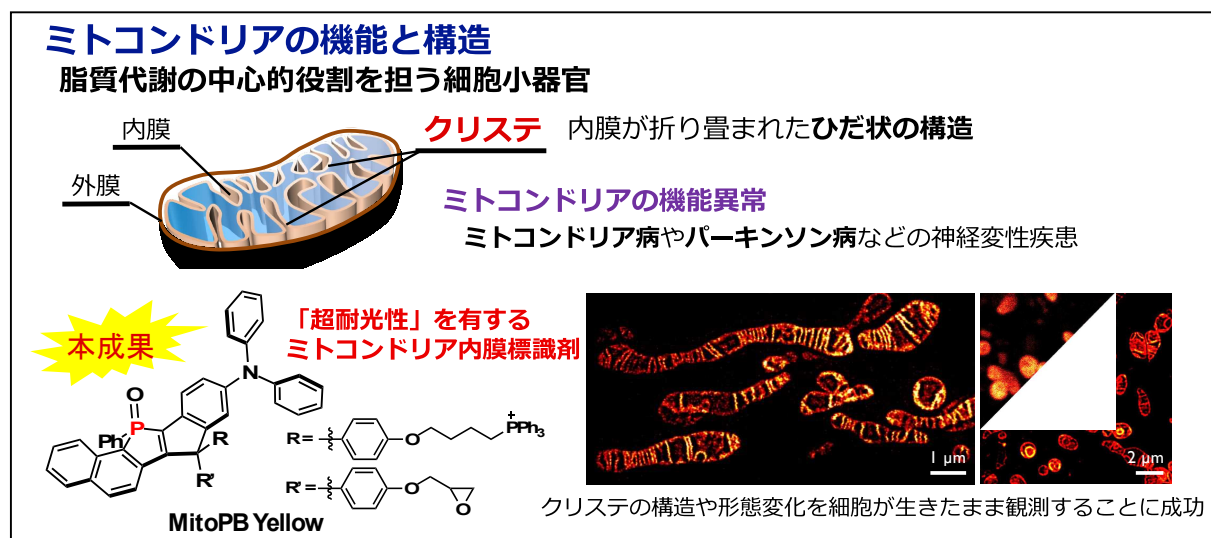


図 ミトコンドリア内膜構造を可視化する新技術

ミトコンドリアは脂質代謝で中心的な役割を担っている細胞小器官です。内膜と外膜から構成されていますが、内膜は「クリステ」と呼ばれる折りたたみ構造をとっており、細胞機能と深く関連します。本研究では、強いレーザー光の照射下でも褪色しないミトコンドリア内膜標識剤 MitoPB Yellow を開発し、超解像イメージングによって生きた細胞中のクリステ構造を鮮明に捉えることができました。

細胞内での脂質代謝には様々な細胞小器官（オルガネラ）が関与しています。これらが協奏的に働くことによって細胞機能が維持されていますが、その機構についてはまだ多くの不明な点が残されています。本研究では、脂質代謝に関わるオルガネラの機能や動態の解明に向けて、新技術の開発を目指してきました。

オルガネラの中でもミトコンドリアは、生命活動に必要なエネルギー生産の場であり、脂質代謝においても中心的な役割を担っています。内膜と外膜に囲まれた二重膜構造になっていますが、中でも内膜は「クリステ」と呼ばれる内側に折り畳まれたひだ状の構造をとっていることが特徴です。クリステ構造の観察には、透過型電子顕微鏡注を用いる手法が一般的ですが、生きた細胞には適用できません。生きた細胞中で観察するためには、強力なレーザー光照射を必要とする超解像顕微鏡に耐えうる蛍光色素、すなわち「超耐光性」を有するミトコンドリア内膜標識剤の開発が必要でした。

本研究では、極めて高い光安定性をもつ超耐光性ミトコンドリア蛍光標識剤「MitoPB Yellow」の開発に

成功しました。MitoPB Yellow は、ミトコンドリア内膜に存在するタンパク質と結合し、強く発光するという性質をもっています。超解像顕微鏡の一つであるSTED 顕微鏡技術とあわせることにより、細胞が生きたままの状態でのクリステ動態を鮮明に捉えることに成功しました。ミトコンドリアの形態は、細胞のエネルギー代謝のみならず、パーキンソン病やミトコンドリア病などの神経変性疾患とも深く関連することから、診断薬としての応用や治療薬開発ツールとしての利用が期待されます。

>>参考情報

論文

1. C. Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116 (32), 15817–15822.
2. M. Grzybowski et al., *Angew. Chem. Int. E d.*, 57 (32), 10137–10141.

プレスリリース

1. 「細胞が生きたままミトコンドリアの内膜構造が鮮明に見えた」(2019年7月)

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20190723/index.html>

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 研究総括：浜地 格（京都大学 大学院工学系研究科・教授）

一細胞レベルの蛍光-電子顕微鏡関連技術でニューロンの超微細構造が見えた

平林 祐介（東京大学 大学院工学系研究科・准教授）

研究課題名：「哺乳類生体内単一ニューロンの微細構造観察法開発」 研究期間：2016.10～2020.3

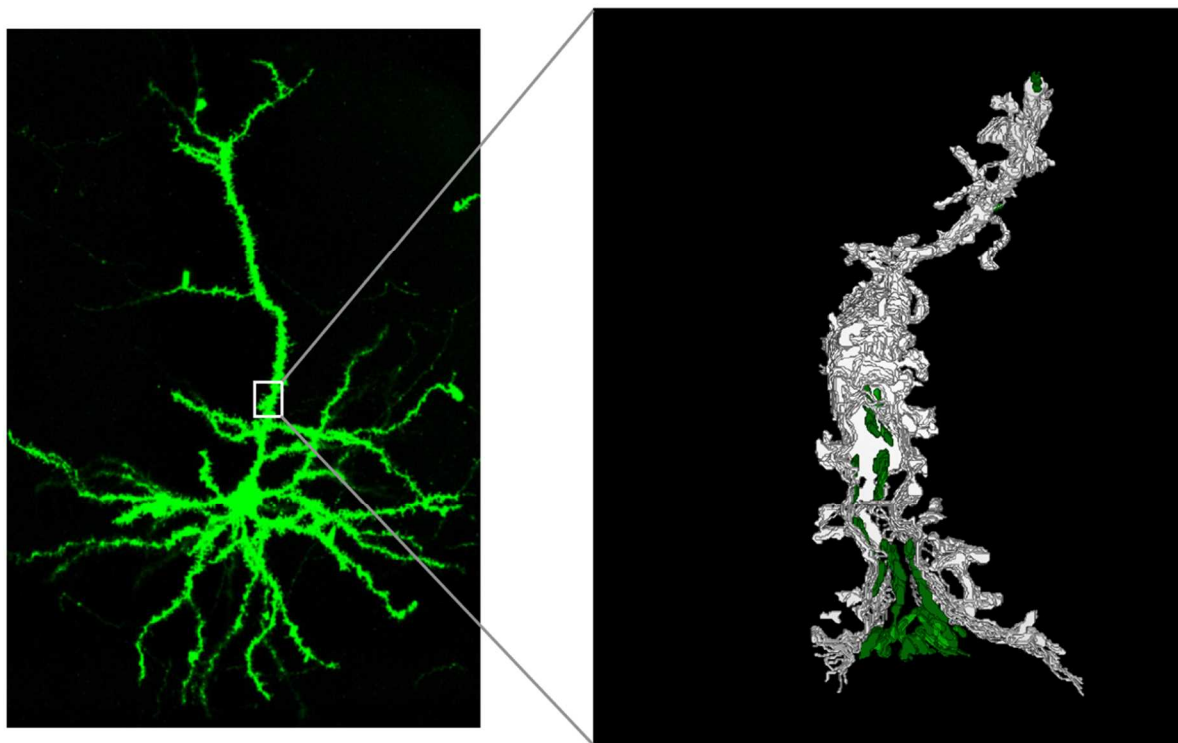


図 脳の中から選んだ特定のニューロンの電子顕微鏡による微細構造解析

哺乳類大脳皮質に存在する数十億から数千億個のニューロンの中から特定のニューロンにだけ蛍光タンパク質を導入することで調べたいニューロンを脳の中で見つけることが出来る(図左)。本研究で開発した技術により、その調べたいニューロンの超微細構造(図右)を電子顕微鏡を用いて観察することが出来るようになった。

従来ニューロンの電子顕微鏡による観察は「脳の中のランダムに選ばれたニューロン」の観察を意味していました。しかし、例えば疾患を持つ脳において異常なニューロンはごく一部なので、ランダムに選んだニューロンではなくてまさにその異常なニューロンについて調べなくてはなりません。本研究では、蛍光-電子顕微鏡関連技術を開発し、蛍光顕微鏡を用いて選んだ「特定のニューロン」について電子顕微鏡観察可能にしました。この技術を応用すれば、病気によって異常になったニューロンのオルガネラ(細胞の内臓)に異常があるかどうかや、病気のニューロンと他のニュー

ロンとの情報交換にどのような異常があるか、などを解明することが出来るようになります。

>>参考情報

➤ 論文

Yusuke Hirabayashi, Juan Carlos Tapia, and Franck Polleux
Correlated Light-Serial Scanning Electron Microscopy (CoLSSEM) for ultrastructural visualization of single neurons in vivo **Scientific Reports** 2018, 8;14491

➤ 受賞

「文部科学大臣表彰 若手科学者賞」(2018)

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 研究総括：浜地 格（京都大学 大学院工学研究科・教授）

生体脳内での自在なゲノム編集で内在性タンパク質を見た

三國 貴康（新潟大学 脳研究所・教授）

研究課題名：「脳組織内1細胞での内在性タンパク質の網羅的局在・動態解析」 研究期間：2016.10～2020.03

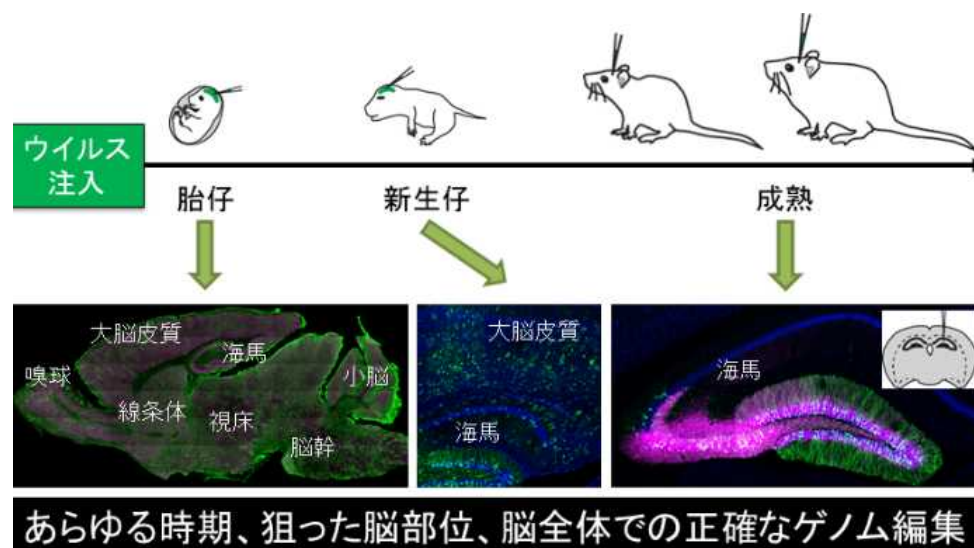


図 vSLENDR：生体脳内ゲノム編集と分子イメージング

任意の発達段階、狙った脳領域、脳全体で正確にゲノム編集を行い、内在性分子の標識とイメージングを行う技術を開発した。ゲノム編集により特定のタンパク質を緑色で標識している。任意の時期の脳にウイルスを注入することで、生後2週～2ヶ月の脳全体でβアクチン(左)、大脳皮質と海馬でERK2(中)、海馬でCaMKIIα(右)を効率良く標識している。

近年のゲノム編集技術のめざましい進歩は、ヒトや動物の生理および病態の解明に役立っています。一方で、細胞分裂を行わない細胞では、遺伝子配列の組み換えを通じて正確にゲノム配列を編集することは困難と考えられてきました。生後の脳では、殆どの神経細胞は細胞分裂を行わないため、脳神経科学の研究分野においては、ゲノム編集技術の応用は限られていました。

本研究では、アデノ随伴ウイルスが遺伝子配列の組み換え効率を高める性質に着目し、アデノ随伴ウイルスを用いてCRISPR-Cas9をマウス個体に導入することで、成熟した神経細胞でも遺伝子配列を効率的に組み換えることに成功しました。この方法「vSLENDR」を用いることで、あらゆる発達段階において、生きたマウス個体の脳内の様々な細胞種、脳領域で遺伝子配列の組み換えを正確に起こすことに成功しました。

本研究では主にマウスを使用しましたが、本研究で用いた方法は、他の様々な哺乳類に適用できると考

えられます。脳精神疾患モデルマウスに適用することで病態の解明や治療法の開発が飛躍的に進み、将来的には疾患の遺伝子治療につながることも期待されます。

>>参考情報

論文

1. Nishiyama J*, Mikuni T*†, Yasuda R†. *Neuron*. 2017; 96(4):755-68. *Co-first authors † Corresponding authors
2. Mikuni T. *Neurosci Res*. 2019 in press

受賞

1. 「日本生理学会奨励賞」(2017)
2. 「日本神経科学学会奨励賞」(2019)

プレスリリース

1. 「あらゆる発達段階のマウス脳内で狙った細胞の正確なゲノム編集に成功」(2017年10月)
<https://www.jst.go.jp/pr/info/info1289/index.html>