

令和元年6月17日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00413

研究課題名(和文) 超解像分子動態解析による薬効スクリーニングロボット顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of drug screening robot microscope by super resolution molecular dynamics analysis

研究代表者

小塚 淳(KOZUKA, Jun)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：10432501

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞1分子スクリーニング手法を実証するために、3つの哺乳動物の免疫活動に関連した1細胞・1分子計測系を立ち上げた。TLR4-TIRAPシグナル伝達計測系、S1P走化性-分子動態相関計測系、IL6刺激-形質細胞分化*in vitro*実験系がこれにあたる。そのうち、TLR4-TIRAPシグナル伝達計測系の1分子応答関連の論文が受理された。また、1分子計測の効率化を実現する2つのロボット顕微鏡の試作を行った。1つは、二焦点同時計測により計測効率を向上させる正倒立型顕微鏡、もう一つは、長時間タイムラプス観測を可能にするインキュベーション型顕微鏡である。加えて、開発した顕微システムの論文が受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工知能支援顕微鏡法に基づき生細胞分析のために開発された自動単一分子イメージングシステムは、系統的な細胞シグナル伝達分析のための自動化単一分子イメージングが実行可能であり、単一分子スクリーニングに適用することができる。また、本研究課題において構築された哺乳動物の免疫活動に関連した1細胞・1分子計測系は、人間の疾病と直接関係が深いので、自己免疫疾患等の薬剤スクリーニングの実証系としても活用できる。したがって生物学的および薬理学的研究への広い貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In order to demonstrate a single-cell and single-molecule screening method, we established a single-cell and single-molecule measurement system related to the immune activity of mammals. These include TLR4-TIRAP signal transduction measurement system, S1P chemotaxis-molecular dynamics correlation measurement system, and IL6 stimulation-plasma cell differentiation *in vitro* experimental system. And then, a paper related to single molecule response of the TLR4-TIRAP signal transduction measurement system was accepted by JACS. In addition, I constructed two robot microscopes to develop single molecule measurement of single-cell. One is an upright and inverted microscope that improves measurement efficiency by simultaneous measurement of two focal points, and the other is an incubation microscope that enables long time-lapse observation. In addition, the report of the developed microscopic system was accepted by Nat Commun.

研究分野：生物物理

キーワード：1分子計測 ロボット 超解像

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、高速ゲノムシーケンス技術の発展に伴い、個人相違・疾病原因を決定する遺伝子、ゲノム多型 (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) に関係する情報が急速に蓄積され、遺伝子間ネットワークの全容が明らかにされつつある。ゲノム情報に基づいたテーラーメイド医療に幅広い期待が寄せられる中、遺伝子配列 (ジェノタイプ) レベルでの診断はもとより、長期的には、ジェノタイプレベルで遺伝子の転写・翻訳活性をコントロールする薬剤を探索することも数多くある目標の1つになると考えられている。しかし、ゲノム情報に基づいて得られた標的遺伝子発現に影響を与える薬剤 (ペプチドや核酸などの薬剤も含む) の設計ならびに評価、また、ジェノタイプから表現系 (フェノタイプ) の反応を予測する事は未だ容易ではない。薬剤候補化合物ライブラリ構築の困難さもその要因の1つではあるが、最大の障壁は、小分子を含むこれらの薬剤が細胞内で及ぼす影響を定量的かつ高速に検出する手法が確立されていないことである。更に、SNPs は薬剤に対する細胞応答に微妙な差異 (たとえば、細胞膜受容体に対する薬剤の結合時間の変化等) をもたらす事が予想され、ヒト遺伝子ならびに SNPs 解析がほぼ完了しつつある今、ポストシーケンス時代へ向けた創薬研究の重大なテーマは、薬剤に対する細胞応答の微妙な差異を検出する新しい概念に準拠したハイスループットスクリーニング手法の確立である。現在では、標的 (ターゲット) で修飾したセンサ表面の計測に表面プラズモン共鳴を利用する手法 (BIACORE, GE Healthcare) や薬剤 (リガンド) で修飾したナノ磁性微粒子を使ってターゲットをふるいにかける手法 (Target Angler 96, 多摩川精機) 等により定量されるターゲット - リガンド相互作用の特異性、結合・解離速度、親和性、濃度等の物理量を指標に薬剤スクリーニングを行う事が一般的である。これらの手法は、ターゲットの精製物を用いるため、個々のターゲットの性質を高精度で定量できる反面、ターゲットの多量体化のような分子間相互作用や細胞自体の応答計測には適用できない。一方、細胞レベルで薬剤応答を定量する手法として、反応指示薬の発光・蛍光強度測定から細胞内カルシウム濃度、膜電位、イオンチャネル透過電流等を定量する手法も存在する (IMACS、浜松ホトニクス / CV6000、横河電機)。医薬品の薬理効果の約 70% が膜タンパク質受容体 (レセプター) との相互作用によってもたらされ、また医薬品の吸収・臓器分布・排泄にはトランスポーターと呼ばれる膜タンパク質が関与していることから、膜タンパク質の機能 SNPs 解析や阻害剤などの機能分子のスクリーニングは創薬に直結する重要なテーマとなっている。細胞膜上では雑多な生体分子 (タンパク質、核酸、脂質等) が相互作用し、複雑な反応ネットワークを形成している事を考えると、可視光計測による解像限界を打ち破る超解像蛍光計測を用いて細胞内の膜タンパク質ダイナミクスを定量する手法は、次世代スクリーニング手法の有力候補である。個々の分子の反応は時空間的に制御され、1分子レベルのダイナミクス (拡散、構造変化等) が細胞の応答を制御する重要なファクターとなりうる。

## 2. 研究の目的

現代の生命科学において、各種疾病のメカニズムの解明など生命現象の根本的な理解には分子レベルでの研究アプローチが必須であることは共通した認識であり、1分子の動態や機能、構造を分析し、細胞 / 組織 / 個体の各階層で見られる現象の理解を目指す研究が近年広く行われるようになってきている。現在までの研究成果を踏まえると、今後、創薬における薬剤スクリーニングやゲノム多型における表現型解析、疾病の診断において生体分子 1 個レベルで定量される値を基に種々の判断を下し、分子メカニズムに即した詳細かつ正確、分析的な新しい医療技術へと発展させることが期待される。しかしながら、1分子イメージングが生命科学全般において現時点で必ずしも主要な研究手法となり得ていない要因に、顕微鏡での観察や計測、データの解析といった一連の高速化や効率化が難しいことが挙げられる。また、解析から得られた情報を創薬や医療に活用するための各種指標の判断基準も定まっていない。現代の生命科学において、各種疾病のメカニズムの解明など生命現象の根本的な理解には分子レベルでの研究アプローチが必須であり、超解像技術を駆使し、生体分子 1 個の動態や機能、構造を分析し、細胞 / 組織 / 個体の各階層で見られる現象の理解を目指す研究が近年広く行われている。今後、創薬における薬剤スクリーニングやゲノム多型における表現型解析、疾病の診断において生体分子の動態から定量される値を基に種々の判断を下し、分子メカニズムに即した詳細かつ正確、分析的な新しい医療技術へと発展させることが期待される。しかし、生体分子動態の物理・化学パラメータを高精度・高効率で求めるには技術的ブレークスルーが必要である。そこで本研究では、分子動態変化から薬効評価を行うハイスループットロボット顕微鏡を開発する。

### 3. 研究の方法

本研究では、超解像分子動態解析（細胞膜上のレセプター分子1個の動態（拡散や構造変化等）計測からレセプターの状態分布やその遷移レート、レセプター分子と下流のアダプター分子の動態相関など、様々な物理・化学パラメータを定量する手法）により定量される細胞内情報伝達や遺伝子発現、内在化、適応といった細胞機能の薬剤応答を指標とした新規スクリーニングシステムの構築を行う。具体的には、申請者らがこれまでに開発した細胞内1分子スクリーニング装置にロボット技術、マイクロ流体デバイス技術等を導入し、ハイスループット化を行う。次に、人工知能等を用いたビックデータ解析による薬剤やタンパク質変異体のスクリーニングを通して新規スクリーニング法（細胞内1分子スクリーニング法）を確立する。

これまでの細胞内1分子スクリーニング装置開発の経験から、計測のハイスループット化には、撮像視野の拡大や複数条件を同時に計測可能な流路集積型マイクロ流体デバイス等を計測システムに導入する事が効果的であると考えられる。そこで、本研究課題では、1) 1分子計測に対応したマイクロ流路を集積し、複数条件の並列計測が可能なマイクロ流体デバイスを開発する。次に、2) 高画素カメラ等を用いた視野の拡大や正立と倒立顕微鏡を組み合わせ（顕微鏡の正倒立化）、1回の計測で観測する細胞数、計測条件を増加させる等で計測のハイスループット化を行う。

### 4. 研究成果

本研究で提唱する1細胞1分子スクリーニング手法を実証するために、3つの1細胞・1分子計測系を立ち上げた。自然免疫反応を惹起するTLR4-TIRAPシグナル伝達計測系、自己免疫疾患と関係が深いS1P走化性-分子動態相関計測系、サイトカイン伝達計であるIL6刺激-形質細胞分化*in vitro*実験系がこれにあたる。そのうち、TLR4-TIRAPシグナル伝達計測系の1分子応答関連の論文が受理された（R. Sato, et al, "Intracellular protein-labeling probes for multicolor single-molecule imaging of immune receptor-adaptor molecular dynamics," J Am Chem Soc, 2017）。

1分子計測の効率化を実現する2つのロボット顕微鏡の試作を行った。1つは、二焦点同時計測により計測効率を向上させる正倒立型顕微鏡、もう一つは、長時間タイムラプス観測を可能にするインキュベーション型顕微鏡である。また、前記顕微鏡組込用の複数流路集積型のマイクロ流体デバイスの試作を行った。次に、開発した顕微システムの論文発表を行った（M. Yasui, et al, "Automated single-molecule imaging in living cells," Nat Commun, 2018）。人工知能支援顕微鏡法に基づき生細胞分析のために開発された自動単一分子イメージングシステムは系統的な細胞シグナル伝達分析のための自動化単一分子イメージングが実行可能であり、単一分子スクリーニングに適用することができる。したがって生物学および薬理学的研究への広い貢献が期待できる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) M. Yasui, M. Hiroshima, J. Kozuka, Y. Sako, and M. Ueda, "Automated single-molecule imaging in living cells," Nat Commun, vol. 9, p. 3061, Aug 3 2018. 査読有
- 2) R. Sato, J. Kozuka, M. Ueda, R. Mishima, Y. Kumagai, A. Yoshimura, M. Minoshima, S. Mizukami, and K. Kikuchi, "Intracellular protein-labeling probes for multicolor single-molecule imaging of immune receptor-adaptor molecular dynamics," J Am Chem Soc, Nov 09 2017. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 1 件）

名称：光学顕微鏡システムおよびスクリーニング装置  
発明者：小塚 淳，柳田 敏雄，上田 昌宏，佐甲 靖志，廣島 通夫  
権利者：国立研究開発法人理化学研究所  
種類：特許  
番号：6395251  
取得年：2018/09/07  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://www.riken.jp/research/labs/bdr/cell\\_signal\\_dyn/](http://www.riken.jp/research/labs/bdr/cell_signal_dyn/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。