

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687022

研究課題名(和文) 高次生物における1細胞内全遺伝子発現の網羅的1分子計測

研究課題名(英文) High-throughput analysis of single-cell gene expression in higher organisms

研究代表者

谷口 雄一 (Taniguchi, Yuichi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：90556276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高次生物における遺伝子発現の確率的ダイナミクスの理解を目指して、単一細胞における1分子レベルでの遺伝子発現の挙動をリアルタイムに、かつハイスループットに解析するシステムの開発を行った。その実現のため、単一細胞の全体積における単一分子計測をハイスループットに行うための新規ライトシート顕微鏡を開発した(特願2013-79956)。加えて、1分子レベルでのmRNA・タンパク質発現を測定するためのプローブ技術の開発を行った。開発した技術を用いてモデル生物(出芽酵母)の複数遺伝子における発現プロファイルを計測し、遺伝子発現反応の共通様式を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have carried out developments for technological tools to investigate single-molecule gene expression dynamics in single cells of higher organisms in a high-throughput manner. To realize this, we have developed a light-sheet illumination fluorescence microscopy that enables 3D volumetric imaging within the whole volume of thick cells set on a multi-well plate. In addition, we have developed a probing technique to detect mRNA and protein expressions at single molecule levels. Through analysis of gene expression dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* cells for multiple gene targets, we have found a common feature in mechanisms on gene expression noise.

研究分野：生物学

キーワード：1分子・1細胞生物学 生物物理学 システム生物学 超高感度顕微鏡技術 微細加工技術 生命反応の物理

## 1. 研究開始当初の背景

生物は、内在するゲノムから数千から数万にわたる種類のタンパク質を生み出すことによって生命活動を行っている。近年、これらの膨大な生物情報を網羅的に取得し、生物を包括的に理解しようとする研究が急速に進展している。2003年にヒトゲノムが完全解読され、現在ではゲノム解読の高速化・低価格化が注目を集める一方で、より直接的に機能レベルの情報を取得する手法として、ゲノム(DNA)の発現産物であるmRNAやタンパク質の発現量を網羅的に調べるトランスクリプトミクスやプロテオミクスに関する研究開発に関心が集まっている。近年のcDNAマイクロアレイ法やRNA-seq法、質量分析法などの技術開発によって、発現産物の量をより高感度に探ることが可能となってきた。しかし、これらの既存の技術は、多くの数の細胞をまとめて解析しなければシグナルが得られないほどの感度しかなく、一つ一つの細胞の状態の違いを決定できない。また、解析を行うには細胞を分解する必要があり、細胞が生きたままの状態を解析を続けることは不可能である。そこで代表者は、1分子計測法を応用することにより、生きた単一細胞内の全遺伝子の発現の動態を、単一分子検出レベルの超高感度で定量化するための技術の確立を目指した。

代表者は、これを実現するための第一歩として、最も単純なモデル生物の一つである大腸菌において、単一細胞における全プロテオーム、トランスクリプトームを、単一分子感度で定量化することに世界で初めて成功した

(Taniguchi et al., Science, 2010)。これを実現するために、代表者は、大腸菌

(*Escherichia coli*)の持つほぼ全ての遺伝子について、ゲノム内の遺伝子のコード領域のC末端に、蛍光タンパク質遺伝子を挿入した細胞株のライブラリーを構築した。こうすれば、注目したタンパク質が1回発現するのに同期して、蛍光タンパク質が1分子発現される。1分子蛍光イメージング法を用いて細胞内の蛍光分子の総量を計測すれば、タンパク質発現量をまさに1分子感度で定量化することが可能となる。さらに、中間産物として生じるmRNA内の蛍光タンパク質のコード領域に、別の色で蛍光標識した合成ヌクレオチドを特異的にハイブリッド結合させてその局在を捉えれば、内在するmRNAの個数計測も同時に行うことが可能となる。代表者は、マイクロ流体チップを用いて、多数のライブラリ株に対するmRNA・タンパク質発現の計測を一挙に、かつ全自動で行うことにより、全ゲノムを対象にした網羅的な解析を実現した。この技術の実現により、生命現象に伴う1細胞内における遺伝子発現の変化を、1分子レベルの超高感度で、かつシステムワイドの網羅性を持って定量化することが可能となった。しかし、この技術を分化・老化・がんなどの高次生命現象の理解にすぐに応用できるかという点、そうではない。現在の技術は、計測系の性質上、大腸菌などの微生物にしか適用不可能であるためである。このため代表者は、酵母・ヒトなどの高次生物の持つ生命現象にも適用可能な、対象生物を選ばない1分子・1細胞オミックス解析技術を開発したいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、高次生物における1分子・1細胞オミックス解析技術を確立し、1細胞における遺伝

子発現動態の確率的ダイナミクスの様式を理解することを目指す。その実現のため、まず、①高次生物(出芽酵母・ヒト細胞)において遺伝子発現の1分子・1細胞計測を行うための、レーザー顕微鏡技術・プローブ技術の開発を行う。その後、②開発した遺伝子発現計測技術を、複数遺伝子に対する網羅的計測に拡張するための、ハイスループット測定システムの開発を行う。そして、③モデル生物(出芽酵母)において複数遺伝子における発現プロファイルを計測することで、遺伝子発現反応のゲノム共通性を明らかにし、モデル化する。

【本研究の学術的な特色・独創的な点】

●1分子生物学とシステム生物学をつなぐ  
本研究で開発・応用を行う1分子・1細胞遺伝子発現解析技術は、代表者が独自に開発した世界でも唯一の技術であり、きわめて独創性が高い。従来の網羅的解析技術(cDNAマイクロアレイ、質量分析など)とは違い、代表者の技術は、プロテオームとトランスクリプトームの両方を対象として、生きた単一細胞内における発現量と局在を、単一分子感度で定量化できる。さらに、生きた細胞の解析も可能であることから、細胞の表現型変化などに同期した遺伝子発現状態の変化を追跡する研究にも応用できる。また、各遺伝子の解析につき数千オーダーの細胞を一度に測定できるため、遺伝子発現量の細胞集団内におけるばらつきと確率分布が定量化できるだけでなく、細胞集団内にわずかな割合で存在する異常細胞も発見できる。複雑な細胞のシステムを、素子である1分子のレベルから記述することを可能とする本解析技術は、分子・細胞相互の階層からの包括的な生物理解に貢献し、「1分子・1細胞生物学とシステム生物学とをつなぐ架け橋」となることが期待されている(Evanko, Nature Methods, 2010)。

●高次生命現象の解明に向けた新たなアプローチ  
複数のファクターが絡み合っていると推測される複雑な高次生命現象の解明には、従来の分子生物学的な一遺伝子の理解だけでなく、1つ1つの細胞を、膨大な数の遺伝子からなる一つのシステムとして捉えた、システム論的な見方が必要であると近年考えられている。本研究では、単一分子感度と単一細胞分解能の両方を有する超高度な網羅的細胞システム解析技術を用いて、システムとしての細胞状態理解に挑戦する。細胞個性をシステムエラーとして理解し、新たな視点での診断法、治療法、予防法を見出すことを最終目標とする。本研究で得られる知見と方法論は、他の生命現象・疾病にも応用できる。

## 3. 研究の方法

(1) 高次生物における遺伝子発現の1分子・1細胞計測法の開発  
本課題を実現するため、(a)細胞内の遺伝子発現産物の絶対個数を定量化するためのレーザー顕微鏡技術の構築と、(b)遺伝子発現(mRNA・タンパク質発現)を再現性良く可視化するためのプローブ法の最適化を行う。計測対象としては、出芽酵母・ヒト細胞を選択する。

(a) 高次生物の中に含まれる遺伝子発現産物(蛍光タンパク質の数)の数を定量化するため、本研究ではシート照明顕微鏡(Ritter et

al., PLoS One, 2010)を用いる。シート照明顕微鏡は、顕微鏡の焦点面だけをレーザー照射するため、焦点面以外の蛍光退色を大幅に抑えることができる。従って、5~20ミクロン程度の厚みを持つ高次細胞をスキャン計測した場合でも、退色の影響を気にすること無く、細胞内の蛍光タンパク質の個数を正確に計数できる。

(b) 高次生物は、一般的に強い自家蛍光を有しており、測定値に影響を与える可能性が懸念される。代表者は、この問題に対して3通りの対応策を考えている。1つ目の解決策は、プローブの蛍光強度を強めることである。プローブの蛍光強度を高める方法として、蛍光タンパク質をタンデムにする方法 (Golding et al., Cell, 2005) 等、複数の方法が報告されているため、代表者はこれらの系を実際に構築して、最も適した手法を見つける。2つ目の解決策としては、自家蛍光そのものを弱める方法が考えられる。このため、培養に用いる培地の組成・温度等をいろいろと変えて、最適化を行う。3つ目の解決策としては、前もって蛍光タンパク質の無いコントロールを計っておいて、後から解析的に自家蛍光の影響を差し引く方法が考えられる

(Taniguchi et al., Science, 2010)。他の手法よりも実現可能性が高いが、計測エラーが大きくなるため、1、2つ目の方法が失敗した場合にこの方法を用いる。

#### (2) 多数遺伝子発現計測への拡張

本課題を実現するため、(a) 複数遺伝子を可視化するための蛍光タンパク質融合細胞株の構築と、(b) 細胞株を並列的に培養しながら、同時に顕微鏡解析を行うためのマイクロ流体チップの開発を行う。以降の計測は、モデル生物である出芽酵母を用いる。

(a) 全遺伝子の発現を可視化するため、出芽酵母の持つ複数の遺伝子それぞれについて、ゲノム内の遺伝子配列のC末端に蛍光タンパク質のコード配列を挿入した細胞株を構築する。一般的に複数の細胞株の構築は手間を要するが、代表者が大腸菌で行った方法 (Taniguchi et al., Science, 2010) と同様の戦略で、作製済みのC末端タグ融合ライブラリー (Huh et al., Nature, 2002) を利用することにより、少人数でも容易にライブラリーの構築を行うことができる。

(b) 代表者が大腸菌の計測の際に開発したマイクロ流体チップの原理を応用して、構築した細胞株全てに対して1分子遺伝子発現観測を行うためのマイクロ流体チップを構築する。そして、コンピューター制御により、全自動で遺伝子発現計測の一連のプロセス (画像取得・解析等) を行う計測プラットフォームを開発する。

#### (3) 遺伝子発現ゆらぎの一般則の解明とモデル化

開発した計測系を用いて、単一生細胞におけるmRNAと、それに共役したタンパク質の発現をリアルタイムでモニターし、真核生物における遺伝子発現反応のゲノム共通の一般則を明らかにする。マスター方程式を用いた理論モデル (Paulsson, Nature, 2004) を基礎として、データの解析・解釈を行い、遺伝子発現の様式をモデル化する。

#### 4. 研究成果

##### 【平成24年度】

1分子レベルでの遺伝子発現 (mRNA・タンパク質発現) を再現性良く可視化するためのプローブ法の最適化を行った。mRNAを可視化するため、我々はウィルスのキャプシドタンパク質の

を持っている。PP7を蛍光タンパク質と融合させた状態で発現させておき、一方で、注目する遺伝子の転写領域にPP7の結合配列をタンデムに繰り返したものを挿入しておけば、mRNAの発現と同時に多数のPP7が集まって強い蛍光スポットを生じるため、その数をカウントすればmRNAの計測を行える。我々は実験系のテストのために、大腸菌にこのシステムを組み込んで、mRNAとタンパク質の同時発現計測を行った。計測からmRNAの分解時間は数分と求まり、タグ配列挿入の有無で分解時間は変わらないことが分かった。また、mRNAの発現と同期して、複数のタンパク質が突発的に発現する様子が観察された。

##### 【平成25年度】

細胞内の遺伝子発現産物の絶対個数を定量化するためのレーザー顕微鏡技術の構築を行った。一般的に1分子観察に用いられる広視野型の蛍光顕微鏡で観察する場合、焦点面外から高い背景光が発生して正確な分子数の定量化が行えなくなるといった問題がある。一方で厚みがある細胞でも低い背景光で観察できる顕微鏡にシート照明顕微鏡があるが、一般的にこの顕微鏡は、生物試料をゲル中に埋めなければ観察が行えないため、ライブセル観察を行うのが難しいという欠点があった。我々は、光学系を改良することにより、一般的に細胞観察に用いられるシャーレ上の細胞に対してでもシート照明による観察を適用することができる、新しいシート照明顕微鏡を開発した。我々は実験系のテストのために、複数の生物試料に対して観察を行った。まず酵母に光励起型の蛍光タンパク質であるmEos3.1を発現させ、微弱なUV励起光を用いて観察を行ったところ、蛍光タンパク質1分子による明瞭な蛍光スポットを観察することができた。さらに、微小管・ヒストンと蛍光タンパク質を融合させた線虫株の初期胚の観察を行い、実際にゲル中ではなく水溶液中でも胚発生の様子が観察できることを確認した。一方で、蛍光ビーズを計測してシート照明の厚みを測定したところ、2.5ミクロンと求められ、十分に背景光が低くなっていることが確認できた。

##### 【平成26年度】

本年度においては、膨大な数の遺伝子を一挙に解析できるハイスループット測定システムの開発、並びに培養条件下で細胞の測定を行うための温度チャンバーの導入を行った。ハイスループット化を行うにあたり、代表者はレーザー加工機を用いてマルチウェルデバイスを設計・構築し、結果、数十遺伝子の発現動態を逐次的に解析する実験系を構築することに成功した。さらに温度調節チャンバーの導入により、高次生物の遺伝子発現の確率的ダイナミクスをリアルタイムに測定できるようになった。

代表者はさらに、モデル生物である出芽酵母の十数個の遺伝子をピックアップし、これらの発現過程を開発したシステムを用いて追跡を試みた。タンパク質の発現測定は、蛍光タンパク質であるVenusの配列をゲノムDNA内の注目する遺伝子のコード領域に挿入し、タンパク質発現と同期して行われる蛍光タンパク質の発現を顕微鏡で捉えることにより行った。そして一定時間ごとに各ウェルを巡回してタイムラプス観測を行うことにより、遺伝子発現のダイナミクスの定量化を目指した。

常に観察試料とライトシート光、観察対物レンズの間には熱ドリフトが生じており、これらの位置ずれを抑制する、またはフィードバック制御するシステムが必要となることが課題点として見えてきた。

#### 【平成27年度】

本年度においては、1分子レベルでのタンパク質発現の動的挙動を安定して長時間捉えるための測定システムの開発を行った。検証の結果、長時間に渡ってライトシート顕微鏡による観察を安定して行うには、観察試料とライトシート光、観察対物レンズの位置関係の自動修正を定期的に行う必要があることが判明した。そこで我々はライトシート光を構成する対物レンズと観察対物レンズの座標を3次元的に制御する機構を導入し、さらにこれらの位置ずれを対物レンズの座標にフィードバックさせる機構を導入した。また、培養条件下での細胞の測定を行うための温度チャンバーを対物レンズ系と干渉しないようにさらに導入することで、熱ドリフトの影響を最小化し、長時間の測定を安定して行うことができるようになった。

代表者はさらに、開発したシステムを用いて出芽酵母の十数個の遺伝子におけるタンパク質発現の動態を追跡した。結果、多くの遺伝子において複数個のタンパク質の発現が一举に起こるバースト現象が観察され、各細胞におけるタンパク質の発現量はヘテロになっていることが確認された。これに対し、mRNAの発現量は各細胞で一様になっていることが別実験で観察されたことから、翻訳過程のゆらぎが全体のヘテロ性をコントロールしていることが分かってきた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計8件)

- (1) Taniguchi, Y., Genome-wide analysis on protein and mRNA copy numbers in single Escherichia coli cells with single-molecule sensitivity, *Methods in Molecular Biology*, 査読有、Vol. 1346、2015、pp. 55-67  
DOI:10.1007/978-1-4939-2987-0\_5
- (2) 谷口雄一、1分子蛍光顕微鏡による1細胞内遺伝子発現の可視化、顕微鏡、査読有、Vol. 50、2015、pp. 81-85
- (3) 谷口雄一、1細胞遺伝子発現動態のゲノムワイド解析とモデル化、細胞工学、査読有、Vol. 34、2015、pp. 251-257
- (4) Ohno, M., Karagiannis, P., Taniguchi, Y., Protein expression analyses at the single cell level, *Molecules*, 査読有、Vol. 19、2014、pp. 13932-13947、  
DOI:10.3390/molecules190913932
- (5) 谷口雄一、細菌の意思決定、パリティ、査読有、Vol. 29、2014、pp. 12-21
- (6) 谷口雄一、1細胞遺伝子発現解析、生体の化学、査読有、Vol. 65、2014、pp. 410-411
- (7) 谷口雄一、単一細胞レベルでの遺伝子発現の多様性、査読有、日本微生物生態学会誌、Vol. 29、2014、pp. 3-8
- (8) 谷口雄一、遺伝子発現のロバストネス、査読有、細胞工学、Vol. 33、2014、pp. 13-18

〔学会発表〕 (計21件)

- (1) 谷口雄一、1細胞内オミックス動態の生命動態の分子メカニズムと数理  
セラトホテル広島  
(広島市)、2016年3月26日 (招待講演)
- (2) 谷口雄一、1細胞内多階層オミックス動態  
連関性、大阪大学・生命機能数理モデル検討会  
大阪大学 (吹田市)、2016年3月9日 (招待講演)
- (3) 谷口雄一、単一細胞における1分子レベル  
mRNA・タンパク質発現ゆらぎの動態観察、第3  
日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド  
(神戸市)、2015年12月2日 (招待講演)
- (4) 谷口雄一、1細胞内多階層オミックス動態  
連関性の解明に向けて、RCAST計測・計算・  
生命科学ワークショップ、東京大学 (目黒区)  
2015年8月7日 (招待講演)
- (5) 谷口雄一、ライトシート顕微鏡による1分  
遺伝子発現イメージング、QBiC-CDB  
Quantitative Developmental Biology Worksh  
理化学研究所 (吹田市)、2015年4月14日  
(招待講演)
- (6) 谷口雄一、1細胞遺伝子発現動態のゲノム  
ワイド解析とモデル化、物性談話会、  
名古屋大学 (名古屋市)、2015年1月23日  
(招待講演)
- (7) 谷口雄一、単一大腸菌細胞における遺伝子  
発現のゆらぎ・ばらつきの定量化、日本顕微鏡  
学会超微形態解析研究部会主催研究会、  
平成帝京大学 (豊島区)、2014年11月22日  
(招待講演)
- (8) 谷口雄一、全ゲノムスケールでの遺伝子  
発現ノイズ・動態の1分子レベルでの定量化、  
第87回日本生化学会年会、国立京都国際会館  
(京都市)、2014年10月15日 (招待講演)
- (9) Taniguchi, Y., Mining genome-wide  
of single-cell gene expressions at  
datasets single-molecule resolution,  
52th Annual Meeting of the Biophysical  
Society of Japan, Sapporo convention  
center (Sapporo, Japan)、September 27,  
2014 (招待講演)
- (10) 谷口雄一、遺伝子発現の確率性と記憶性、  
第36回日本分子生物学会、神戸ポート  
アイランド (神戸市)、2013年12月4日  
(招待講演)
- (11) 谷口雄一、単一細胞レベルでの遺伝子  
発現の多様性、第29回日本微生物生態学会、  
鹿児島大学 (鹿児島市)、2013年11月25日  
(招待講演)
- (12) Taniguchi, Y., Quantifying gene  
expression heterogeneity in single live  
cells, Single cell science - from  
technologies to the future medicine, RIKE  
Yokohama Campus (Yokohama, Japan)、  
November 13, 2013 (招待講演)
- (13) Taniguchi, Y., Information dynamics in  
gene expression processes, 51th Annual  
Meeting of the Biophysical Society of  
Japan, Kyoto International Conference  
Center (Kyoto, Japan)、October 28, 2013  
(招待講演)

(14) 谷口雄一、遺伝子発現過程のシステムバイオロジー、日本顕微鏡学会第69回学術講演会、大阪エキスポパーク（吹田市）、2013年5月22日（招待講演）

(15) Taniguchi, Y., Towards understanding heterogeneous gene expressions at single cell levels, RNAi, MicroRNAs & Single Cell Biology - 2013 Meeting, Hilton Garden Inn Boston-Waltham (Waltham, Massachusetts, USA), May 2, 2013（招待講演）

(16) 谷口雄一、単一細胞レベルでの遺伝子発現のばらつきの法則性、第7回日本ゲノム微生物学会、長浜バイオ大学（長浜市）、2013年3月9日（招待講演）

(17) 谷口雄一、単一細胞レベルでの遺伝子発現のばらつきの法則性、定量オミックスワークショップ、大阪大学（吹田市）、2013年1月22日（招待講演）

(18) Taniguchi, Y., Quantifying the E. coli proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells, 6th AYRCOB (Shenzhen, China), December 19, 2012（基調講演）

(19) 谷口雄一、小川泰、城村雅恵、西村和哉、1細胞スケールでの遺伝子発現の複雑性を理解する、日本分子生物学会第35回年会、福岡国際会議場（福岡市）、2012年12月11日（招待講演）

(20) 谷口雄一、遺伝子発現のノイズ性の起源、超階層シグナル伝達研究の新展開シンポジウム、生理学研究所（岡崎市）、2012年10月1日（招待講演）

(21) Taniguchi, Y., Ogawa, Y., Johmura, M., Examining origins of noise in gene expression, 50th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (Nagoya, Japan), September 23, 2012（招待講演）

〔図書〕（計1件）

(1) 谷口雄一、転写翻訳1細胞定量測定、1分子ナノバイオ計測（化学同人）、2014、pp. 170-179

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：顕微鏡、焦準器具、及び試料台保持器具

発明者：谷口雄一、西村和哉

権利者：国立研究開発法人理化学研究所

種類：特許

番号：特願2013-79956・PCT/JP2014/059883

出願年月日：2013年4月5日

国内外の別：国内・国外

○取得状況（計0件）

特に無し

〔その他〕

特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 雄一 (TANIGUCHI YUICHI)

理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：90556276

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし