

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650055

研究課題名(和文) 真核細胞における遺伝子発現ノイズの制御機構

研究課題名(英文) Exploring mechanism of gene expression noise in eukaryotic cells

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現は確率的反応過程であり、例えば遺伝子レベルで同等な細胞が多数存在する場合でも、それぞれの細胞で行われる遺伝子発現の量にはばらつきが生じる。本研究では、真核細胞(出芽酵母)における遺伝子発現の諸過程を1分子レベルで追跡する手法を確立し、真核細胞特有の遺伝子発現ノイズの制御メカニズムの解析を行った。その結果、mRNAからタンパク質を生み出す翻訳の過程がノイズを生み出す主要因になっていることが分かってきた。

研究成果の概要(英文)：Gene expression is a stochastic process. Due to this, gene expression levels in single cells are inherently heterogeneous even among a genetically identical cell population. In this work, we challenged to develop a method to visualize single-molecule mRNA and protein productions in single eukaryotic cells. The results suggest that the protein translation process is a major source to regulate gene expression noise.

研究分野：生物物理学

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

単一細胞のレベルでは、内在する mRNA 数とタンパク質数とがたえず乱雑に変動している。このため、ひとつひとつの細胞は、たとえ同じゲノムを持っていても、それぞれが個性的な振る舞いを示す (Elowitz et al., Science, 2002)。こうした乱雑さは生物の大きな特徴であり、これを利用する事で細胞の分化や異質性を誘導したり、環境変化に対する生物種の適応度を高めたりしていると考えられている (Eldar et al., Nature, 2010)。申請者は最近、原核生物である大腸菌 (*Escherichia coli*) において、1つ1つの細胞内で起こる遺伝子発現のわずかなばらつきを、単一分子感度で正確に定量化する技術を開発した。そして、大腸菌の全遺伝子をターゲットとして網羅的に遺伝子発現のばらつきを解析した結果、遺伝子発現の乱雑さの中に含まれる秩序性・法則性と、その形成メカニズムを見つけ出すことに成功した (Taniguchi et al., Science, 2010)。申請者が決定したノイズモデルを用いることで、一つ一つの細胞の遺伝子発現状態の確率的变化を予測することが可能となる。

2. 研究の目的

本研究では、真核・動物細胞におけるノイズ形成の原理を解明することをテーマとして設定した。真核細胞は、原核細胞と比較すると遺伝子発現のばらつきが極めて低く制御されていることが知られている。これは、真核細胞の遺伝子発現のばらつきが、mRNA の核外輸送等の過程を経て緩和されているためであると考えられる。そこで申請者は、遺伝子発現の中間産物である mRNA の発現・修飾・輸送を、タンパク質の発現と同時に、1分子レベルで、かつリアルタイムに捉えることにより、真核細胞におけるノイズ制御が遺伝子発現のどの過程で行われているのかを明らかにすることを目標とした。

本研究では、真核細胞における mRNA・タンパク質の同時観察を実現するために、細胞内の mRNA・タンパク質発現を可視化するためのプローブ法の開発と、単一細胞全域に存在する mRNA とタンパク質分子を計数するための顕微鏡システムの開発を行う。さらに、これらの技術を用いて 転写・翻訳各過程におけるノイズ量の変化を捉えて、ノイズ制御に関わるプロセスを特定する。従来の研究で行った原核細胞の遺伝子発現ノイズ解析 (Taniguchi et al., Science, 2010) を、真核細胞にまで拡張し、一般的な遺伝子発現現象のメカニズムを理解することを目指すものである。

【本研究の学術的な特色・独創的な点】

真核細胞特有のゆらぎの低い遺伝子発現機構を理解する

真核細胞における遺伝子発現のばらつきは、原核細胞に比べてかなり小さいことが示唆されている。我々が過去に行った大腸菌 (*Escherichia coli*) におけるプロテオーム解析によると、全ての遺伝子において少なくとも、 $\pm 30\%$ のタンパク質発現のばらつきがあることが明らかとなった。一方、真核細胞である出芽酵母では、大腸菌よりもかなり抑えられ、 $\pm 10\%$ 程度に収まっている (Newman et al., Nature, 2006)。つまり、出芽酵母では、大腸菌と異なり遺伝子発現の過程で、ノイズを緩和する仕組みが備わっていることが示唆される。

このような遺伝子発現のノイズの違いはどのように生み出されているのかは、今のところ明らかになっていない。ただ、真核細胞の場合は、原核細胞と同様な確率的な転写の後、mRNA は核膜を通過し、細胞質に移動して初めて翻訳される。このため申請者は、転写によって発生するノイズが、核から細胞質への移動の際にかなり緩和されるのではないかと考えている。そこで本研究では、生細胞内で mRNA 転写から翻訳までの流れを全て可視化して、転写・翻訳過程におけるノイズの変化を捉えることで発現ノイズの制御機構に迫ることに着想した。現在、遺伝子発現ノイズの研究は盛んに進められているが、そのすべてが、mRNA またはタンパク質のいずれかのみ注目したものに限られている。遺伝子発現ノイズの発生原因として、これまでに複数の仮説 (mRNA ポリメラーゼ・リボソームによる転写・翻訳効率のバラつき、mRNA の分解時間と局在性等々) が提案されているが、実際にこれらを証明したものはまだない。本研究で行う mRNA とタンパク質の生細胞内での動態を同時観察する手法は、遺伝子発現の一連の過程におけるノイズ発生を全て可視化し、ノイズの変化を一律的に定量化することにより遺伝子発現ノイズの制御機構を明らかにするという、今までにない手法であり独創性は高い。

1 細胞の状態性を厳密に定義する独自技術のさらなる発展

本研究は、申請者が独自に開発した単一生細胞レベル遺伝子発現定量化技術 (Taniguchi et al., Science, 2010) の測定対象を、翻訳過程から転写・翻訳の両過程に、さらには原核生物から真核細胞に広げ、がん・分化等の一般的な病理現象の分子的理解を進めるための足がかりとなるものである。申請者の開発した独自技術は世界からも注目されており、報告した論文の一つは、「1細胞解析の分野で 2010 年に報告された論文中、世界トップの引用件数を持つ論文」として科学雑誌に紹介されている (Nature biotechnology, 2012)。2010 年の Nature Methods 誌においては、「1分子生物学とシステム生物学とをつなげる初めて技術である (“Single molecules meet systems biology”)」として評価されて

おり、複雑な階層性をもつ生命の仕組みを、分子・細胞相互のスケールから理解できる手法として国際的にも期待されている。また、真核細胞における mRNA の成熟プロセスと核外輸送メカニズムは非常に複雑であり、他分野からは敷居が高いためか、ほとんどの研究ではよりシンプルな原核細胞をモデル生物に用いている。真核細胞における遺伝子発現ノイズの抑制メカニズムの研究は、従来の mRNA プロセッシング研究、遺伝子発現ノイズ研究の両分野を繋ぐ新たな分野開拓を行うものであり、学術的にも独創性が高い。また、高等生物においては、確率的な細胞分化などの遺伝子発現ノイズを積極的に制御する生命現象が存在するが、ノイズ制御機構を操作することができれば、技術的に分化させることが難しかった細胞種への分化や、特定細胞種への分化効率を飛躍的に向上させる技術など、本研究からの医学などへの二次的な波及効果が期待できる。

3. 研究の方法

mRNA・タンパク質を可視化するプローブ系の確立

生細胞における mRNA を可視化するために、特定配列の mRNA を結合できる性質を持つウイルスのキャプシドタンパク質を利用する (Golding et al., Cell, 2005)。まず、ゲノム上の注目する遺伝子の mRNA 転写領域内の 3' 非翻訳領域に、キャプシドタンパク質 (PP7) の認識配列のリピートを挿入する。さらに、プラスミドで PP7 と蛍光タンパク質の融合タンパク質 (PP7-RFP) を発現させておく。こうしておく、目的遺伝子が転写されると同時に PP7-RFP が mRNA に多数結合し、mRNA を RFP のドットとして可視化することができる。

一方で、タンパク質の可視化は、注目する遺伝子の C 末端に異なる色の蛍光タンパク質 (YFP) を融合させることにより行う。こうすることで、注目するタンパク質が細胞質に輸送され、翻訳された後、目的タンパク質の発現と同時に YFP 蛍光が発現されるようになり、蛍光顕微鏡による観察が可能となる。申請者は、原核細胞である大腸菌において、PP7 による mRNA・タンパク質の同時観察をすでに実現している。しかし、今回のシステムは大腸菌内ではうまく機能したが、出芽酵母でも同様に機能するとは限らない。実際に、別の RNA 結合タンパク質である MS2 を大腸菌内で用いると細胞毒性が問題となった。そこで今回、出芽酵母に導入するにあたって PP7、MS2、N ペプチドの 3 種類の RNA 結合タンパク質を準備している。また、今回の実験では、核内の転写後からの mRNA を解析するため、PP7-RFP が細胞質と核内にバランス良く行き届いていないとされない。そこで、NLS(核局在化シグナル)と NES(核外移行シグナル)の個数を調整することにより核と細胞質の局

在バランスを細かく調整する方法をとる。

細胞全域にある蛍光プローブを計数するシステムの開発

1つ1つの細胞内に含まれる mRNA・タンパク質の個数を決定するため、細胞内に含まれる全ての蛍光点を正確に計数する測定システムを開発する。

申請者はこれまでに、細胞内の任意の焦点面で 1 分子レベルでの蛍光観察を行うための顕微鏡の開発を進めてきた。従来の 1 分子蛍光顕微鏡の光学系において、シート状のレーザー光を顕微鏡の焦点面に入射させることにより、核のような細胞深部に至るまで任意の焦点面で蛍光 1 分子観察が可能となる。従来の同様のシート照明顕微鏡では、試料をアガロースに包埋するなどの前処理が必要であったために実用上の困難があった (Huisken et al., Science, 2004) が、申請者はこの問題を解決し、一般的なシャーレ上の試料細胞を観察することができるシステムを開発した (特願 2013-79956)。

本研究では、申請者が開発した 1 分子検出顕微鏡システムに、細胞を 3 次元的にスキャンするための高速スキャナと画像解析システムを導入することで、1 細胞内の全分子の 3 次元マッピングを実現する。細胞内での実際の蛍光タンパク質の拡散速度を考慮したところ、1 kHz のカメラレートで撮像を行いながら、0.5 マイクロメートル/msec のスピードで Z 軸方向の焦点移動を行えば十分に定量化に耐えうるとの試算を得た。本研究ではこれを実現すべく、高速ピエゾステージを顕微鏡に搭載し、高速・超高感度カメラと同期させて連続撮像を行うシステムを構築する。また出芽酵母は、大腸菌と比較して強い自家蛍光を持っているため、蛍光がバックグラウンドの自家蛍光で打ち消されてしまう可能性がある。mRNA の検出には、理論上数十個の蛍光タンパク質のスポットが生じるため十分な蛍光量が確保できている。一方、タンパク質の検出は、1 個の蛍光タンパク質しか目的タンパク質に融合していないため、感度が足りない可能性がある。このため、蛍光タンパクを 2~3 個程度タンデムに融合する等の方法を検討する予定である。

転写・翻訳の各プロセスにおけるノイズ量分布の解析

開発した技術を用いて、mRNA が転写され、核内を拡散し、核膜孔を通過し、細胞質に移動し、タンパク質が翻訳され、mRNA が分解されるまでの 6 つのステップに注目して、mRNA 及びタンパク質の発現量分布の変化を解析し、どのステップでノイズが増加・減少しているのかを明らかにする。必要であれば、核膜孔やリボソームの数、核膜・細胞膜の形状やゲノム凝集状態等について蛍光ラベルを用いて可視化し、mRNA・タンパク質のノイズ量との関連性を解析する。

さらに得られた結果から、1細胞レベルでの遺伝子発現の確率性とダイナミクスを予測するための数理モデルを構築する。申請者は過去の研究で、原核細胞である大腸菌の遺伝子発現がガンマ分布則に従うことを発見し、遺伝子発現の確率性の予測モデルの構築に成功した(Taniguchi et al., Science, 2010)。同様の解析法を応用することにより、真核細胞のノイズ生成原理を追求する。

4. 研究成果

【平成 26 年度】

本年度においては、遺伝子発現の中間産物である mRNA、並びに最終産物であるタンパク質の発現を細胞内において可視化するプローブ系の確立を行った。タンパク質発現の解析を行うにあたり、細胞内のゲノム DNA 内の特定遺伝子のコード領域に、蛍光タンパク質である Venus の配列の挿入を行った。挿入によりタンパク質の発現と共役して蛍光タンパク質が発現されるようになるため、その数を 1 分子蛍光顕微鏡を用いて捉えることでタンパク質発現数の定量化が可能となる。一方で mRNA 発現の解析を行うにあたり、同じ遺伝子の mRNA の 3' 非翻訳領域に PP7 タンパク質の結合配列のリピートを挿入すると共に、PP7 タンパク質と赤色蛍光タンパク質の融合体を恒常的に発現するカセットの挿入を行った。これにより、mRNA の発現と共役して複数の蛍光タンパク質からなる蛍光スポットが発生するようになり、それをカウントすることで mRNA 発現数の定量化が可能となる。並列して、細胞内の蛍光スポットの数を定量化するための測定・解析システムの開発も進めた。代表者はライトシート型蛍光顕微鏡に、ピエゾステージを基盤とした高速 3 次元スキャンシステムの導入を試み、細胞の任意の焦点面において蛍光スポットが観察できることを確認した。

【平成 27 年度】

本年度においては、1つ1つの細胞内に含まれる mRNA・タンパク質の個数を決定することを目的として、細胞内に含まれる全ての蛍光点を正確に計数する測定システムの開発を行った。一般的な 1 分子蛍光顕微鏡の光学系においては、レーザー光をカバーガラス面で全反射させた時に生じる薄い染み出し光を蛍光の励起光源として利用するため、細胞の底面膜表面でしか 1 分子観察を行えない。一方で最近開発されたライトシート光学系では、シート状のレーザー光を顕微鏡の焦点面に入射させることにより、核のような細胞深部に至るまで任意の焦点面で蛍光 1 分子観察が可能となるが、試料をアガロースに包埋するなどの前処理が必要であるために実用上の困難がある。これに対して代表者は、独自の手法を用いることによりライトシート顕微鏡

特有の試料の制約性を解消する新しいライトシート顕微鏡システムを開発してきた(特願 2013-79956)。本年度においては、この顕微鏡に細胞を 3 次的にスキャンするための高速スキャナと画像解析システムを導入することで、1細胞内の全分子の 3 次元マッピングを行うシステムを開発した。1 kHz のカメラレートで撮像を行いながら、0.5 マイクロメートル/ミリ秒以上のスピードで Z 軸方向の焦点移動を行えば十分に定量化に耐えうるとの試算を得ており、本研究ではこれを実現すべく、高速ピエゾステージを顕微鏡に搭載し、高速・超高感度カメラと同期させて連続撮像を行いシステムを構築した。

【平成 28 年度】

本年度においては、遺伝子発現の中間産物である mRNA、並びに最終産物であるタンパク質の発現のライブセルイメージング解析を行った。ライトシート型蛍光顕微鏡を定量測定に用いるにあたり、毎回試料をセットする際に生じる光学系のずれや微小な振動、熱ドリフトが問題となったが、代表者は顕微鏡の機械設計を最適化することによりそれを解消することに成功した。一方で、今回測定に用いる出芽酵母は、大腸菌と比較して強い自家蛍光を持っているため、蛍光がバックグラウンドの自家蛍光で打ち消されてしまう現象が確認された。このため代表者は、自家蛍光を最小化するための培養条件を確立するとともに、蛍光タンパクを 2~3 個程度タンデムに融合したものをプローブとして用いることによって、1 分子の mRNA・タンパク質を細胞内において可視化することに成功した。この際、得られた画像にノイズ処理フィルターを適用することにより、微弱なスポットを明確に捉えることができるようになった。得られた動画からは、mRNA が転写され、核内を拡散し、核膜孔を通過し、細胞質に移動し、タンパク質が翻訳され、mRNA が分解される過程を観察することができる。各ステップに注目して、mRNA 及びタンパク質の発現量分布の変化を解析したところ、翻訳の過程においてノイズが大きく変化していることが分かってきた。本研究の結果は、真核細胞のノイズ生成原理の理解、並びに 1 細胞動態の定式化・予測に大きく貢献するものであると期待できる。

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

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、パリテイ、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14件)

(1)谷口雄一、超高解像度3次元ゲノム構造解析、よこはまNMR研究会、理化学研究所(横浜市)、2017年3月3日(招待講演)

(2)Taniguchi, Y.、Towards understanding the linkage between multiple omics layers、シングルセルサーベイヤー研究会、東京大学(文京区)、2016年11月17日(招待講演)

(3)Taniguchi, Y.、High-resolution 3D chromosome structure analysis、CDBリポート、南淡路口イザルホテル(神戸市)、2016年9月29日(招待講演)

(4)Taniguchi, Y.、Genome-wide analysis of nucleosome-level 3D chromatin structure、RIKEN seminar、理化学研究所(横浜市)、2016年9月12日(招待講演)

(5)谷口雄一、細胞の個性を定量化する~自動化イメージング装置を用いた細胞個性の網羅的評価、山口大学助教会セミナー、山口大学(宇部市)、2016年5月27日(招待講演)

(6)谷口雄一、1細胞内オミックス動態の連関性、生命動態の分子メカニズムと数理、シェラトンホテル広島(広島市)、2016年3月26日(招待講演)

(7)谷口雄一、1細胞内多階層オミックス動態の連関性、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)

(8)谷口雄一、単一細胞における1分子レベルでのmRNA・タンパク質発現ゆらぎの動態観察、第38回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)

(9)谷口雄一、1細胞内多階層オミックス動態の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)

(10)谷口雄一、ライトシート顕微鏡による1分子遺伝子発現イメージング、QBiC-CDB Quantitative Developmental Biology

Workshop、理化学研究所(吹田市)、2015年4月14日(招待講演)

(11)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)

(12)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)

(13)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)

(14)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)

〔図書〕(計2件)

(1)谷口雄一、少数性生物学(永井健治、富樫祐一著)少数により成り立つ細胞社会、日本評論社、2017年

(2)谷口雄一、1分子ナノバイオ計測(野地博行著)13章:転写翻訳1細胞定量測定、化学同人、2014年

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

(1)Taniguchi, Y.、Nishimura, K. Microscope, focusing unit, fluid holding unit, and optical unit、PCT/JP2014/059883、2014年4月3日

取得状況(計1件)

(1)谷口雄一、西村和哉、顕微鏡、焦準器具、流体保持器具、及び光学ユニット、特許第6086366号、2017年3月1日

〔その他〕

特に無し

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし