

## 3次元1分子蛍光イメージング技術の開発

京都大学高等研究院教授／理化学研究所チームリーダー 谷口 雄一

### 概要

近年の技術の発展によって、生体内にごく微量しか存在しないウイルスや病原性タンパク質などのさまざまな分子を高感度に検出し、疾病の診断や生命現象の分析などに用いることが可能になりつつあります。私たちはこうした微量分析技術の究極型ともいえる、1分子レベルで試料内の分子の空間的な分布を解析する技術を開発しました。同技術を用いることで、分析に必要な分子の数を、従来の数百万個レベルから1~数個レベルにまで大幅に下げることが可能になります。体内から採取した細胞組織や血液内に存在する希少分子の検出や定量化に応用が可能であり、将来の医療診断や生命の分子メカニズムの解明に大いに寄与することが見込まれます。

### 1. 3次元1分子蛍光顕微鏡の製品化

近年の医学・生命科学の発展に伴い、生体試料に含まれるコロナウイルスや病原性タンパク質などの希少分子を鋭敏に検出できる技術の開発が求められています。その中でも最近注目されているのが、2014年のノーベル化学賞の対象にもなった、1分子蛍光顕微鏡技術です。この顕微鏡では試料内に含まれる蛍光標識した生体分子を1つ1つのレベルで可視化することができます。しかしながら一般的な1分子蛍光顕微鏡には、カバーガラスの表面のごく近傍、数百ナノメートルの領域でしか観察が行えないという欠点があり、このため実際の生物・医学試料への応用が妨げられていました。これに対して私たちは、カバーガラスの近傍数百マイクロメートルに渡って良好な1分子レベルでの観察を行うことができる新しい1分子蛍光顕微鏡 (PISA 顕微鏡) を発明しました (特許6086366号) (図1)。このPISAという名称は、Planar Illumination microscopy for Single-molecule Analysisの頭文字をとったものであり、また顕微鏡の筐体構造がピサの斜塔に似ていることから名付けました (図1右)

PISA 顕微鏡の開発においては、最先端の顕微鏡法の一つである光シート顕微鏡

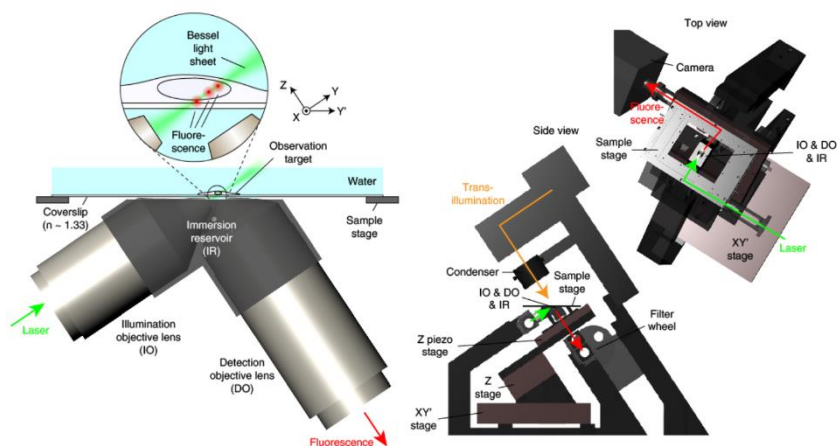


図1. 3次元1分子イメージング顕微鏡 (PISA 顕微鏡) の測定部の構造 (左) と概観図 (右)

(Huisken et al., Science, 2004) の原理を利用しました。光シート顕微鏡は、観察軸の横側からごく薄いシート状にした光を照射して、観察面内だけで選択的に蛍光を励起して観察を行う蛍光イメージング法です。観察面外からの背景光を最小化するとともに、試料への光ダメージを最小化し、高速かつ高感度で蛍光観察が行える特徴を有していることから、生物の観察における最も理想的な方法の一つと考えられています。2014年には、ノーベル賞科学者である Eric Betzig 教授らのグループが、格子状にした光シートを用いることで、光の回折限界を超える超高分解能での観察を行うことに成功しました (Chen et al., Science, 2014)。しかしながら一般的に光シート顕微鏡には、横側からの光照射を実現するために、試料を柱状のアガロースの中に封入する等の特殊な処理を行う必要があり、一般的なカバーガラスに載せた試料を制約なく測ることができないという欠点がありました。そこで私たちは、カバーガラスの斜め下側からシート光を照射し、斜めに傾けた対物レンズを用いて蛍光を受光するというユニークな顕微鏡構造を考案することで、通常のカバーガラスに載せた試料を光シートで観察することを初めて可能にしました (図1左)。これによって、培養ディッシュ上の細胞や、マルチウェルプレート、マイクロ流体デバイスなど、多岐にわたる生物・医学試料の光シート観察が可能になりました (図2)。

PISA 顕微鏡を用いることで、典型的に十数マイクロメートルの大きさを有するヒト細胞や、数百マイクロメートルの厚みを有する組織切片の全域に渡って明瞭な 1 分子レベルでの観察を適用することが新たに可能になりました。この発明に関して私たちは、ドイツの顕微鏡メーカーである Carl ZEISS 社と独占ライセンス契約を締結するとともに、2020年には製品化を実現し、現在は全世界への普及を進めています (図3)。製品は Lattice Lightsheet7 と名付けられ、Eric Betzig 氏の格子光シート照明による高分解能化技術も組み込まれたものとなっています。従来の生物用の一般的な顕微鏡と比べて、高い感度と空間・時間分解能、低い侵襲性

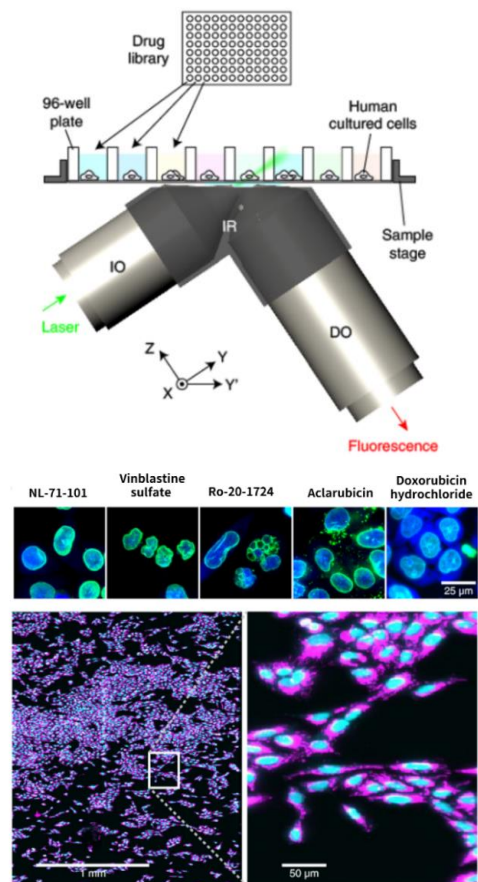


図2. PISA 顕微鏡による 96 ウェルプレートの光シート観察



図3. ZEISS 社により製品化された光シート顕微鏡 Lattice Lightsheet 7

などのアドバンテージを併せ持っているのが大きな特徴であり、将来的にさまざまな顕微鏡に置き換わる可能性を有しています。さらには、液体内のさまざまなタンパク質や RNA の量を測定する生化学分析を、PISA 顕微鏡を用いて 1 つ 1 つの分子レベルで行うことで、100 万倍程度の感度の向上が行えることを私たちは明らかにしました（特願 2017-177070, 2017-252438）。よって PISA 顕微鏡は、医療診断や薬理解析、生命のメカニズムの解析など、将来の医学・生命科学の研究や分析に幅広い寄与をもたらすものと期待できます。

## 2. 単一細胞における遺伝子発現動態の基本的性質の解明

生命を構成する 1 つ 1 つの細胞では、内在するゲノムからの遺伝子発現が確率的に行われており、そのため細胞内にあるタンパク質や mRNA の量には常にばらつきやゆらぎが存在しています。生命の複雑な振る舞いのメカニズムを理解するには、こうした 1 つ 1 つの細胞における遺伝子発現の確率的な性質を精密に捉え、その法則性や機能性を理解することが重要であると考えられます。そこで私たちは、試料内の分子を 1 つ 1 つのレベルで可視化する 1 分子蛍光顕微鏡を利用して、単一の細胞で起こるタンパク質と mRNA の発現動態を、1 分子レベルで可視化する実験系を初めて開発しました（図 4）（Taniguchi et al., Science, 2010）。さらには、こうした測定をハイスループットに行うシステムを開発し、1,000 以上の遺伝子に対して単一細胞の遺伝子発現動態の解析を網羅的に実施することに成功し、1 細胞遺伝子発現のさまざまな一般的性質と法則性を明らかにいたしました。

解析を通じて明らかになったことの 하나가、mRNA 数とタンパク質数の非相関性です。同一細胞内に含まれる mRNA 数とタンパク質数の相関プロットを解析しましたところ、面白いことに、解析したすべての高発現遺伝子において、両者の間に有意な相関性が観察されませんでした（相関係数は 0.1 以下）。この結果は一見奇妙に映りますが、実は 1 細胞内では RNA の合成と分解が極めて頻繁に起こっており、一方でタンパク質はその中で長い時間スケールをかけて蓄積していくためにこのような非相関の結果が得られたものと考えられます。この結果は Science 誌に取り上げられ、当時開発されて間もない段階だった 1 細胞トランスクリプトーム解析に一つの警告を与えるものであり、同時に 1 細胞プロテオーム解析の必要性を示唆したものであると、1 細胞解析の分野で大きな話題になりました。その後ヒトを含む他の生物種で検証が行われ、同様の結論が一定割合の遺伝子においても導かれています。本研究は現在の生命科学における一つの主流となりつつある 1 細胞解析分野において、その基礎的知見を与えるものとして世界的に大きく評価されています。

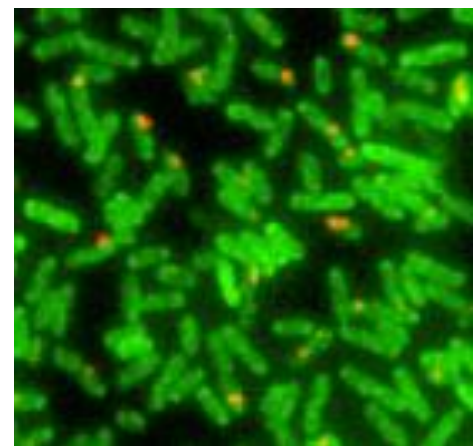


図 4.1 細胞内における 1 分子レベルでの RNA (赤)・タンパク質 (緑) の発現計測

### 3. ゲノムの3次元分子構造の解明

細胞内における遺伝子発現の土台となるゲノム分子は、160~200塩基対ごとにヒストンタンパク質に巻き付いて形成する「ヌクレオソーム」構造を単位として細胞内に存在しています。しかしながら、これらのヌクレオソームがどのような3次元的な配列構造をとって細胞内に存在するのかはよく分かっておらず、生命科学における未解明の重要問題の一つとされてきました。

この問題の解決に向けて私たちは、蛍光イメージングを応用した最先端の分析システムの一つである次世代DNAシーケンサーを用いた解析法に注目しました。この方法では、細胞内で近接するゲノム領域同士の連結反応を行わせ、連結産物の配列を次世代DNAシーケンサーで網羅的に解読することで、ゲノムのそれぞれの領域がどのような近接関係にあるかを網羅的に解析することができます。従来の方法ではヌクレオソーム十数個から数千個分の分解能でしか解析が行えませんでした。私たちは実験法の抜本的改良を行い、単一ヌクレオソーム(160~200塩基対)の分解能で解析を行えるようにすることに成功しました。さらに私たちは、得られた実験データを基にスーパーコンピュータ上で物理計算を行うことにより、ゲノムの全領域における各ヌクレオソームの3次元配列構造を導出することに成功しました(Ohno et al., Cell, 2019)(図5)。

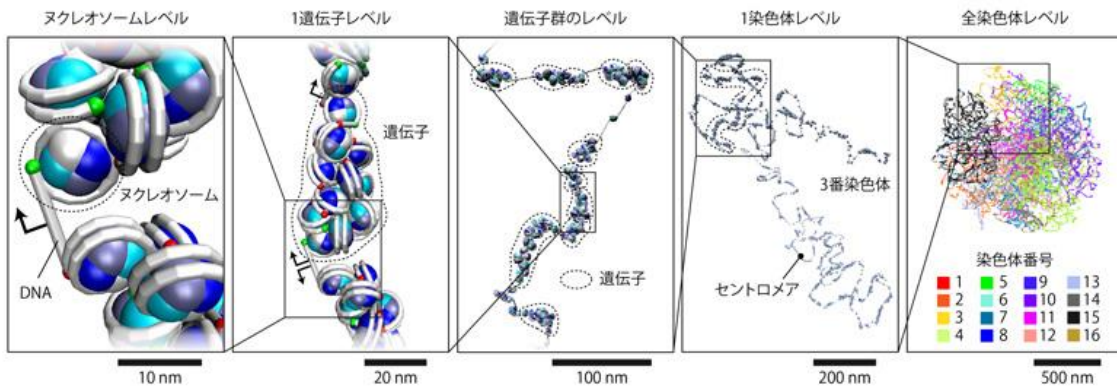


図5. 導出したゲノムの3次元分子構造

出芽酵母ゲノムの解析を行った結果、ヌクレオソームの配列構造が、ゲノムの場所ごとに大きく異なっており、さらに遺伝子の制御状態に応じてダイナミックに変化していることが明らかとなりました。これまでの研究では、一般的な生命科学の教科書でも描かれているように、すべての領域がジグザグやソレノイドの形で規則的かつ一様に並んでいると信じられてきましたが、私たちの結果はそれに反するものであり、論文を掲載した科学誌の表紙としても取り上げられました(Cell, 2019年1月号)。この結果は、ゲノムの構造性と遺伝子の制御状態が共役していることを表しており、ゲノムによる生命の制御の仕組みを知るうえで極めて重要な発見といえます。ゲノムによる生命の成り立ちの理解や、疾患や細胞分化のメカニズムの理解、薬剤の開発などに本質的な寄与をもたらすものと期待できます。