

1 分子蛍光顕微鏡による 1 細胞内遺伝子発現の可視化

Visualization of Gene Expression Dynamics in Single Living Cells Using Single-Molecule Fluorescence Microscopy

谷 口 雄 一

Yuichi Taniguchi

理化学研究所生命システム研究センター

要 旨 1つ1つの細胞で行われる遺伝子発現は確率的であるため、各細胞に存在する遺伝子発現産物の量は、例えゲノムが等しくても不均一となり、さらに時々刻々と変動する。しかしながら、低コピー数のタンパク質の発現や、発現量の微小なばらつき・ゆらぎなどを測定することは、一般的な遺伝子発現の測定手法では感度面において難しい。このため筆者らは、1分子イメージング技術を応用し、1細胞の遺伝子発現の動態を定量的に解析する方法論の開発を進めている。モデル生物である大腸菌 (*Escherichia coli*) を用いて1,018遺伝子に対して網羅的に解析を行ったところ、各細胞のタンパク質発現量の分布はほぼどの遺伝子においてもガンマ分布で記述でき、さらにその形状は転写・翻訳速度による影響を受けて決定されることが分かった。さらに、1細胞内における mRNA とタンパク質の発現量を同時に測定した結果、両者の量の間には相関性が無いことが分かった。

キーワード：1分子・1細胞イメージング、遺伝子発現ノイズ、ゲノムワイド解析、大規模データ解析、微細加工技術

1. はじめに

一つ一つの細胞では、内在するゲノム DNA から無作為に遺伝子発現が行われ、細胞間の性質の違いが生み出されている^{1,2)}。最近の研究により、こうした細胞毎の遺伝子発現量のばらつき、すなわち遺伝子発現ノイズが、表現型変化や環境適応など、様々な生命プロセスに深く関わることが分かってきた³⁾。このため、1つ1つの細胞で起こる遺伝子発現を個別に定量化する“1細胞解析”が近年の生命科学において注目を集めるようになり、次世代シーケンサーや質量分析等を基盤とした技術の開発が盛んに行われている。しかしながら、これらの技術のほとんどは、細胞を破碎し、内容物を抽出して解析を行うため、ダイナミックな遺伝子発現量の変化を捉えることは難しい。また、1細胞内に含まれる内容物の量は極めて少ないため、低コピー数の遺伝子の発現の検出や、発現量の微小なばらつき、ゆらぎを捉えることは感度的に厳しいものとなっている。

そこで筆者らは、近年開発された超高感度分子検出技術である1分子蛍光イメージング技術⁴⁾を応用し、各細胞の遺伝子発現を生きたまま、リアルタイムに、かつ1分子の感度で定量化する手法の開発を行ってきた^{5,6)}。本法では、1つ1つの mRNA やタンパク質の発現を、ゲノム DNA 上への蛍光プ

ローブ配列の導入によって可視化し、1分子蛍光顕微鏡を用いて数や局在を捉えることで、各細胞の遺伝子発現の定量化を行う。識別できる蛍光タンパク質の種類の数の上、試料内で同時に測定できる遺伝子の数は3~4程度に限定されているが、細胞株ライブラリ⁷⁾を用いることにより、全遺伝子に対して網羅的に解析を行うことも可能である。本稿では、技術の概要、並びに1分子レベルでの遺伝子発現ダイナミクスの特徴的性質について解説する。

2. 1 分子蛍光顕微鏡法

1分子蛍光顕微鏡は、蛍光顕微鏡の検出感度を高めることにより、カバーガラス上、もしくは細胞内に存在する蛍光ラベル化された分子を1分子のレベルで観察する測定手法であり、近年の生命科学において幅広く応用がなされている。技術が開発された当初は、モータータンパク質の運動を *in vitro* の環境下で1分子レベルで観察する等の用途に用いられていたが⁸⁾、最近では細胞内の分子の可視化にも用いられており、転写因子のゲノム DNA への結合・解離や、膜タンパク質の拡散運動などの様子が1分子レベルで観察されている⁹⁾。また最近では、ゲノムシーケンサーにも技術が応用されており、断片化した1分子の DNA から非増幅で配列を解析できるようになってきている。

1分子顕微鏡の光学系として代表的なものとしては、エバネッセント照明光学系(図1A)が挙げられる¹⁰⁾。この光学系では、試料を載せたカバーガラスの界面でレーザー光を全反射させ、反射面の界面に生じる約二百ナノメートル程度の

〒565-0874 大阪府吹田市古江台6-2-3
TEL: 06-6155-0114; FAX: 06-6155-0112
E-mail: taniguchi@riken.jp
2015年5月28日受付

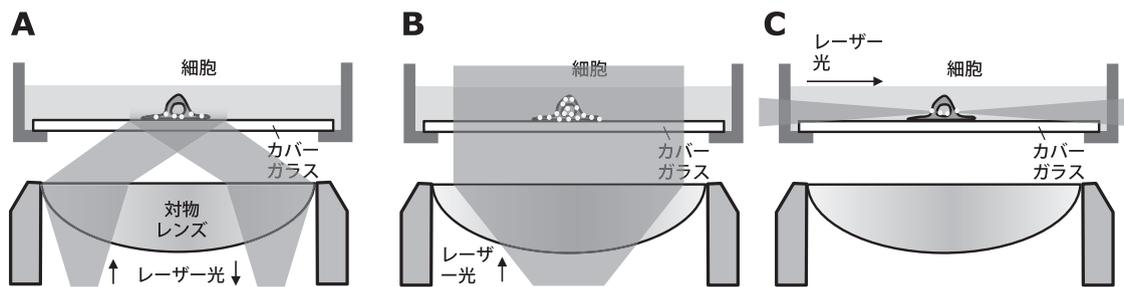


図1 1分子蛍光イメージングの光学系

A, エパネッセント照明光学系. B, 広視野照明光学系. C, シート照明光学系.

厚さの染み出し光を用いて試料内の蛍光を励起し、観察を行う。レーザーを試料全体に透過させないため、バックグラウンドを大幅に下げることが可能であり、非常に明瞭な1分子のスポットを観察することができる。この他、最近では広視野照明光学系(図1B)やシート照明光学系(図1C)が1分子観察に用いられている。広視野照明光学系では、レーザーを試料内の全深度領域に当てて観察を行う。全焦点面の蛍光分子が励起されるためバックグラウンドが高くなるが、厚みの薄い大腸菌などの試料においては十分に1分子を観察できる⁵⁾。これに対しシート照明光学系では、薄いシート状の光を試料の横側から当て、観察焦点面にある蛍光分子だけを選択的に蛍光励起して観察を行う。試料のいずれの深度で観察を行う際にもバックグラウンドが低減化されるため、動物培養細胞などの厚みのある細胞の全領域において1分子を観察することができる^{9,11)}。

蛍光の励起光源としては、一般的に 1 W/mm^2 以上の高い強度のレーザー光が用いられる。典型的に蛍光分子は、退色するまでに合計で数万個から数十万個の光子を放出することが知られているが、高い強度のレーザーを用いて1回の露光時間でかなりの割合の光子を一度に放出させることで、1分子からでも解析に十分なシグナルを得ることができる。また、この強度の値は太陽光の値よりも約数千倍高いものであり、生体試料へのダメージも懸念されるが、露光時間を数百ミリ秒に抑える等の工夫を行うことにより、細胞が生きた状態での連続観察を行うこともできる。一方で蛍光の検出には、高開口数の対物レンズ、並びにEM-CCDなどの超高感度カメラが一般的に用いられる。カバーガラスは超音波またはプラズマ洗浄を行ったものが主に用いられ、細胞は自家蛍光が極力少なくなるように最小培地等で培養したものが用いられる。

3. 遺伝子発現過程の蛍光プローブ法

遺伝子発現の過程においては、遺伝情報をコードしたゲノムDNAから、転写の過程を通じてmRNA、翻訳の過程を通じてタンパク質の発現が行われる。タンパク質発現数の正確な測定を行う方法としては、注目するタンパク質に蛍光タンパク質を融合させるやり方が一般的である¹⁾。細胞内のゲノムDNA内の注目する遺伝子のコード領域に蛍光タンパク質の配列を挿入することで、注目遺伝子の発現と蛍光タンパク質

の発現が同期して行われるようになり、これを1分子蛍光顕微鏡で捉えることで1分子感度でのタンパク質発現の観察が可能になる⁵⁾。一般的に蛍光イメージングでよく用いられる蛍光抗体を用いてラベル化する方法とは違い、発現したほぼ全てのタンパク質が蛍光を発する上、非特異結合によるバックグラウンドも生じないため、正確にタンパク質発現量の測定を行うことが可能になる。また、蛍光タンパク質が蛍光を発するまでのタイムラグは、Venusなどの成熟時間の短い蛍光タンパク質を利用することにより最小化することができる¹²⁾。

図2C-Eには、本法を用いて生きた大腸菌におけるタンパク質発現の可視化を行った際の画像を示した⁶⁾。CはAdk(アデニル酸キナーゼ)遺伝子、DはAtpD(ATP合成酵素F1部位 β サブユニット)遺伝子、EはYjiE(推定転写因子の一つ)遺伝子の発現の様子を表しており、Eの画像の一つ一つのスポットが1分子のタンパク質発現を表す。各細胞におけるタンパク質の発現個数は、各細胞で内在する蛍光強度を積算し、その値を1分子の蛍光分子による値で割り算することにより求めることが可能である。

一方で、生きた細胞内でのmRNAの発現数を測定する方法としては、MS2ウィルスのキャプシドタンパク質を利用する方法がある¹³⁾。このMS2タンパク質はステムループ構造を有する特定のRNA配列と強く結合する性質を持っている。注目する遺伝子のmRNAにMS2タンパク質結合配列の繰り返しを挿入し、同時に蛍光タンパク質とMS2タンパク質の融合体を細胞内で恒常的に発現させておくことで、mRNAの発現と共役した蛍光スポットを細胞内で観察できるようになる。また、ダイナミクスの測定を要しない場合には、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いて、注目する遺伝子が発現するmRNAに蛍光オリゴヌクレオチドをプローブする方法が簡便である^{14,15)}。

4. ゲノムワイド解析

先述したように、蛍光イメージング法では一度に識別できる色の数が限られており、従って蛍光を利用する本法では、生物の持つ数千から数万オーダーの数の遺伝子のうち、数種類の遺伝子しか同時に解析を行うことはできない。筆者らはこれを補う方法として、膨大な数の遺伝子の解析を逐次的に行うハイスループット解析プラットフォームを開発した。

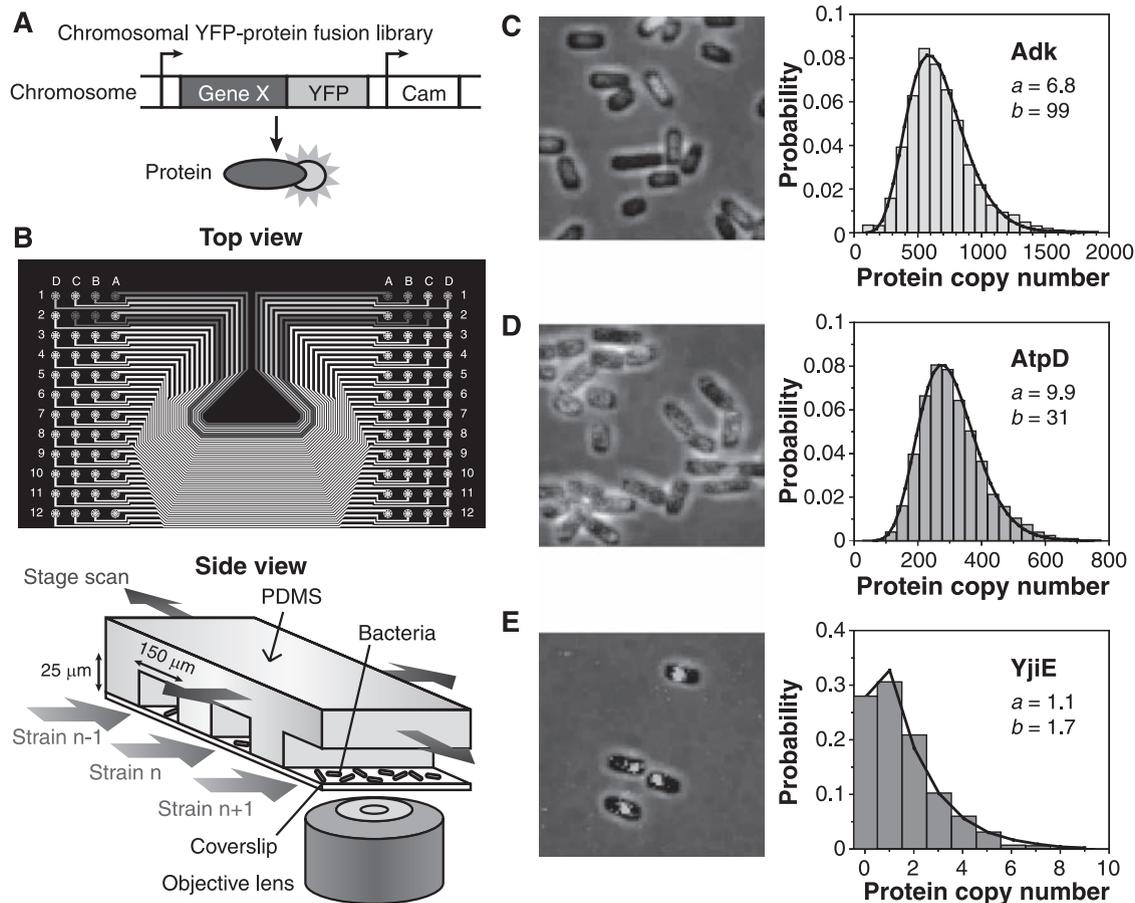


図2 1細胞内タンパク質発現量の定量化 (文献6より転載)

A, 蛍光タンパク質 (Venus) 融合大腸菌株ライブラリ. B, ハイスループット計測用マイクロチップ. C-E, 実際に得られる測定データの代表例 (Adk, AtpD, YjiE). 左の画像は, 細胞の位相差像 (グレースケール) に, 1分子蛍光像 (黄色) を重ねたもの. 右のグラフは, 1細胞に含まれるタンパク質コピー数の分布を示す.

多数の遺伝子の発現を解析するためには, まずゲノム DNA 上のそれぞれの遺伝子に蛍光タンパク質配列を挿入したものを用意する必要がある. 筆者らは, 過去に報告されたモデル生物である大腸菌 (*E. coli*) の各タンパク質の精製のために開発された細胞株コレクション⁷⁾を利用してこうした細胞株のコレクションを網羅的に構築した (図2A). 用いたコレクションは, ゲノム上の各遺伝子のC末端にタンパク質精製タグである SPA (Sequential affinity tag) を挿入したものであり, 筆者らは相同置換法¹⁶⁾を用いて, このタグを蛍光タンパク質配列に置き換える作業を各細胞株に対して行うことでコレクションの構築を行った. 現在筆者らは, 大腸菌全遺伝子の約1/4に相当する1,018遺伝子に対応する細胞株の構築に成功しており, 構築した細胞株は Coli Genetic Stock Center (<http://cgsc.biology.yale.edu>) において提供を行っている.

しかし, これらの細胞株を一つ一つ顕微鏡で計っていくのでは, 全ゲノムレベルでの網羅的な解析を行うのに非常に手間がかかる. このため筆者らは, 膨大な数の細胞株に対して一挙に自動解析を行うハイスループット測定システムを開発した (図2B). 本システムでは, 多数の細胞株をマイクロデバイス上に集約して搭載し, 自動ステージを用いてこれらを

逐次的に蛍光イメージングしていくことで, 多数株の測定を行う. そして測定したデータは画像処理システムに送られ, 各細胞におけるタンパク質数や局在, 分布などの統計情報が自動的に生成される. このシステムでは, 1チップ96サンプルの測定が約30分で終了し, この際各サンプル当たり平均約4,000細胞の解析を行うことができる.

5. タンパク質発現量の分布性

筆者らはこのプラットフォームを用いて, まず各細胞に存在するタンパク質の個数が細胞集団内でどのように分布しているか, ライブラリの構築を行った1,018遺伝子に対して解析を行った. その結果, AdkやAtpDなどの高コピー数タンパク質においては典型的にピークを持った分布, YjiEなどの低コピー数タンパク質においては典型的に単調減少型の分布が観察された (図2). 筆者らは, これらの分布を一様に記述できる関数があるのではないかと考え, 様々な関数を用いてフィッティングを行ったところ, 測定した1,018遺伝子の分布のうち, 1,009遺伝子の分布がガンマ分布

$$p(x) = \frac{x^{a-1} e^{-x/b}}{\Gamma(a) b^a}$$

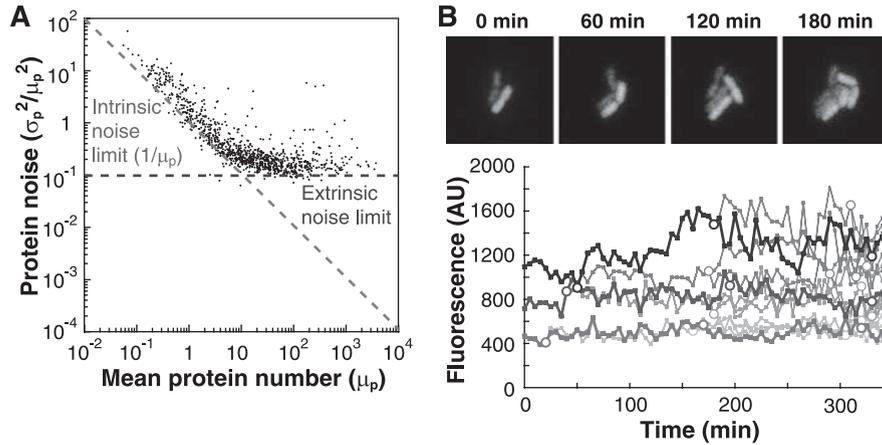
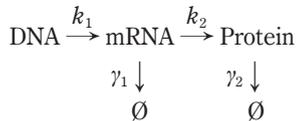


図3 タンパク質発現ノイズの性質 (文献6より転載)

A, ノイズ量と平均発現量の関係性. ポアソンノイズによる極限を赤色の線で, 全遺伝子に共通して働くノイズによる極限を青色の線で表す. B, タンパク質発現量の時間的推移. 上図, 各時刻におけるタンパク質発現量の変化. 下図, 発現量の時系列変化. 異なる細胞のデータを異なる色で表している. 丸印は細胞分裂が行われたことを表す.

により記述できることを見つけた. ここで x はタンパク質の個数, $\Gamma(\cdot)$ はガンマ関数, a , b はガンマ分布の2つの可変パラメータを表す.

このガンマ分布は, mRNA・タンパク質の合成・分解がそれぞれランダムに起こることを仮定したキネティックスキーム:



と等価の関係にあることが, 過去の理論的研究により示唆されている¹⁷⁾. この等価性が成り立つ場合, a の値は mRNA の合成速度からタンパク質の分解速度を割り算したものに等しくなり, b の値はタンパク質の合成速度から mRNA の分解速度を割り算したものに等しくなるはずである. 筆者らは実際にこれらの値を測定したところ, そこで得られる値は実際に a , b の値と等しくなることを見つけた. これはつまり, 細胞集団レベルでのタンパク質のコピー数分布が, 遺伝子発現の各過程の速度定数により決定づけられていることを表している.

さらに筆者らは, 分布の広がり具合がプロテオーム全体においてどのような傾向をもっているかを調べた. 筆者らは, 分布の広がり具合であるノイズ量¹⁾ (分布の標準偏差を2乗したものから平均値の2乗を割り算したものとして定義される) を各遺伝子に対して求め, 横軸にタンパク質の平均発現量を取ってプロットを行った (図3A). その結果, タンパク質数のノイズには, 発現数の大小に応じた2種類の下限値が存在することが確認された. 平均発現量が10コピー/細胞以下の低発現の領域では, 下限値の値は発現量に反比例しており, その値はポアソンノイズ, すなわち遺伝子発現ノイズが純粋にランダムに行われた場合のノイズ量と等しくなることが分かった. 一方, 10コピー/細胞以上の高発現の領域では, 下限値の値は発現量に依存せず, 30%のところまで一定

をとることが分かった. 全ての遺伝子が一樣にこのノイズの影響を受けていることから, 全遺伝子に一樣に影響を与える因子, 例えば, RNAポリメラーゼやリボソームの数の, 細胞毎のばらつきなどが, このノイズの決定因子になっていることが示唆される.

6. タンパク質発現量の時間変化

次に筆者らは, タンパク質の発現量の時間変化に注目した. これを調べるため, 筆者らは十数個の遺伝子をランダムに選択し, 一定の時間間隔をおきながら発現量をタイムラプス観測することにより, 発現量の時間変化の測定を行った. 結果, 低発現のタンパク質では, mRNAの発現・分解と共役する形で, 複数のタンパク質が突発的に発現される様子が観察された. 一方で高発現のタンパク質では, こうした急激な変化はさほどみられず, 一定量のタンパク質発現が常に行われている様子が観測された (図3B). これは, 1つ1つのタンパク質発現イベントが数的に積算されているためであると考えられる. さらに, 細胞毎の発現量のばらつきにも注目したところ, 時間的なゆらぎよりもむしろ, 細胞間のばらつきの方が優勢を占めることが分かった. これはつまり, 何世代にもわたって記憶されるようなエピソード的な細胞状態がそれぞれの大腸菌細胞に存在しており, そのばらつきが高発現タンパク質におけるノイズの決定因子になっていることを表している.

7. mRNA・タンパク質発現の同時測定

さらに筆者らは, 各細胞内における mRNA とタンパク質のコピー数を同時に計測し, 両者の量の相関性について解析を行った. 筆者らは, 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて, 赤色蛍光オリゴヌクレオチドを mRNA 上の Venus コード領域にハイブリダイゼーションし, 1分子顕微鏡を用いて同一細胞内の黄色蛍光, 並びに赤色蛍光の数を数

えることによって、mRNA数、タンパク質数の決定をそれぞれ行った(図4)。

各細胞におけるmRNA数とタンパク質数の相関プロットを解析したところ、面白いことに、測定した137の遺伝子のどれにおいても、両者の数の間には相関性が無いという結果が得られた。遺伝子発現の上流と下流の関係に相当するmRNAとタンパク質のコピー数の間に相関性がないことを示す今回の結果は、一見奇妙に思えるかもしれない。しかし実は今回の結果は、mRNAとタンパク質の分解時間の違いを考慮することによりうまく説明することができる。大腸菌におけるmRNAの分解時間は、mRNAシーケンシングを用いて調べると数分程度であったのに対し、タンパク質の分解時間は数時間から数日のオーダーであることが知られている。これはつまり、観察されたmRNAの数は過去数分以内に起こった遺伝子発現の量を反映するのに対し、タンパク質の数は、細胞分裂の長い時間スケールの中に積算された遺伝子発現の量を反映することになる。このように考えると、mRNAとタンパク質のコピー数の間に相関性がないことはある意味当然の帰結であるということができるとは思いますが、一方で今回の結果は、将来行われるであろう1細胞レベルでのトランスクリプトーム解析に対してひとつの警告を与えるものであり、同時に、プロテオーム解析の必要性を表しているということができる。

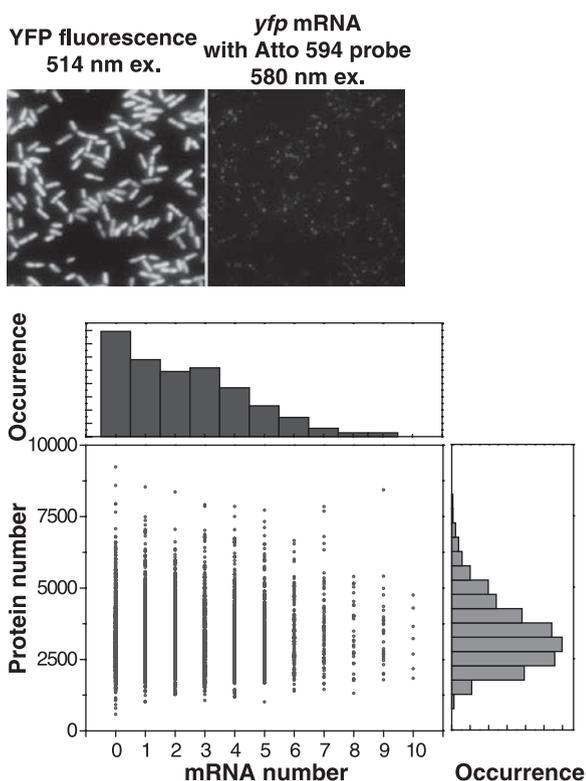


図4 mRNA・タンパク質発現量の相関性(文献6より転載) 上図、同一細胞におけるタンパク質(左)とmRNA(右)の発現の可視化。下図、1細胞内におけるtufA遺伝子のmRNAとタンパク質の発現量の相関プロット。

8. おわりに

蛍光1分子イメージング法を応用した本技術は、一つ一つの細胞における遺伝子発現の微小なゆらぎやばらつきを1分子レベルで定量的に評価することを可能にするものである。筆者らは、モデル生物である大腸菌の持つ千を超える遺伝子に対して発現量のばらつきを評価し、全ゲノムレベルでの共通性・一般法則を探索することにより、遺伝子発現ノイズの素反応モデルを導くことに成功した。今回の解説では大腸菌の測定結果について述べてきたが、筆者らは現在、出芽酵母やヒト培養細胞などといった真核細胞についても同様の測定を行うためのシステムの開発を行っており、実際にこれらの細胞の計測も可能になりつつある。この結果については、近い将来にどこかの機会に報告したいと考えている。

文 献

- 1) Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D. and Swain, P.S.: *Science*, **297**, 1183–1186 (2002)
- 2) Rao, C.V., Wolf, D.M. and Arkin, A.P.: *Nature*, **420**, 231–237 (2002)
- 3) Eldar, A. and Elowitz, M.B.: *Nature*, **467**, 167–173 (2010)
- 4) Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. and Yanagida, T.: *Nature*, **374**, 555–559 (1995)
- 5) Yu, J., Xiao, J., Ren, X., Lao, K. and Xie, X.S.: *Science*, **311**, 1600–1603 (2006)
- 6) Taniguchi, Y., Choi, P.J., Li, G.W., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A. and Xie, X.S.: *Science*, **329**, 533–538 (2010)
- 7) Butland, G., Peregrin-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., Davey, M., Parkinson, J., Greenblatt, J. and Emili, A.: *Nature*, **433**, 531–537 (2005)
- 8) Vale, R.D., Funatsu, T., Pierce, D.W., Romberg, L., Harada, Y. and Yanagida, T.: *Nature*, **380**, 451–453 (1996)
- 9) Chen, B.C., Legant, W.R., Wang, K., Shao, L., Milkie, D.E., Davidson, M.W., Janetopoulos, C., Wu, X.S., Hammer, J.A. 3rd, Liu, Z., English, B.P., Mimori-Kiyosue, Y., Romero, D.P., Ritter, A.T., Lippincott-Schwartz, J., Fritz-Laylin, L., Mullins, R.D., Mitchell, D.M., Bembenek, J.N., Reymann, A.C., Böhme, R., Grill, S.W., Wang, J.T., Seydoux, G., Tulu, U.S., Kiehart, D.P. and Betzig, E.: *Science*, **346**, 1257998 (2014)
- 10) Tokunaga, M., Kitamura, K., Saito, K., Iwane, A.H. and Yanagida, T.: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **235**, 47–53 (1997)
- 11) Ritter, J.G., Veith, R., Veenendaal, A., Siebrasse, J.P. and Kubitschek, U.: *PLoS One*, **5**, e11639 (2010)
- 12) Nagai, T., Ibata, K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A.: *Nature Biotechnology*, **20**, 87–90 (2002)
- 13) Golding, I., Paulsson, J., Zawilski, S.M. and Cox, E.C.: *Cell*, **123**, 1025–1036 (2005)
- 14) Zenklusen, D., Larson, D.R. and Singer, R.H.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 1263–1271 (2008)
- 15) Raj, A., Peskin, C.S., Tranchina, D., Vargas, D.Y. and Tyagi, S.: *PLoS Biol.*, **4**, e309 (2006)
- 16) Yu, D., Ellis, H.M., Lee, E., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Court, D.L.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 5978–5983 (2000)
- 17) Friedman, N., Cai, L. and Xie, X.S.: *Physical review letters*, **97**, 168302 (2006)