

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22310080

研究課題名（和文）シングルセル解析を目指したゲノムDNA単分子操作・解析マイクロデバイス開発

研究課題名（英文）Development of a micro-device for manipulation and analysis of single genomic DNA molecules toward single cell analysis

研究代表者

小穴 英廣（OANA HIDEHIRO）

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：20314172

研究成果の概要（和文）：本研究において、我々は個々の細胞からクロマチンファイバーを単離し、解析するための新たな手法を開発した。即ち、上記を実現するため、マイクロ流体デバイスおよびクロマチンファイバー操作技術を新たに開発した。ここで開発した手法は、個々の細胞中のクロマチンファイバーの後天的修飾について直接調べる手法への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a new methodology for investigation of individual, intact chromatin fibers isolated from individual cells, utilizing a custom-designed microfluidic device and a novel technique for handling individual chromatin fibers by fluorescence microscopy. The method developed here has potential application for direct investigation of the epigenetic profile of intact chromatin fibers at individual cell level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：DNA、ゲノム、ナノバイオ、マイクロ・ナノデバイス

1. 研究開始当初の背景

現在の一般的なゲノムDNA解析（遺伝子存在部位の特定、エピジェネティクス解析など）は、PCR やゲル電気泳動などの伝統的

化学実験法を組み合わせた種々の解析法により行われているが、これらの実験操作は断片化したDNA分子集団を対象とした解析法であり、得られる情報は平均化されたものとな

っている。これに対し、細胞からのゲノム DNA 取り出し、DNA 上での変異部位やタンパクとの相互作用部位の直接検出などの生化学実験操作を顕微鏡下で狙った1個の細胞に対して迅速に行える技術が実現すれば、従来法では得られなかった、個々の分子についての情報が得られることとなり、ライフサイエンス・産業の両分野において、強力なツールとなることが期待される。ここでゲノム DNA 単分子解析を行う場合、細胞内でコンパクトに折り畳まれているゲノム DNA を細胞から取り出し、所望の空間分解能が得られる程度までに解きほぐして展開さねばならないが、真核生物のゲノム DNA の全長は mm³ cm のオーダーにも及ぶ。このような長大なゲノム DNA を、高々百数十 μm 四方の顕微鏡の視野下で断片化させずに扱う技術は未確立であり、上記のようなゲノム DNA 単分子解析手法は実現していない。本研究提案のように顕微鏡下で細胞から取り出したゲノム DNA を損うことなく取り扱い、逐時的に単分子解析を行うことを目指しているグループは国内外に見あらず、他に類を見ない研究となっている。本申請者らはこれまでに、顕微鏡下で細胞からゲノム DNA を単離する手法の研究や、マイクロ流体デバイス内で生化学実験を行うための要素技術の研究を、原核生物や酵母細胞を用いて行ってきた。本申請課題では対象をゲノムサイズが大きい真核生物の細胞に絞り、これまでの研究をさらに発展させることを狙っている。

2. 研究の目的

個々の細胞に対するエピジェネティクス解析技術構築を見据えた、空間分解能を有する単分子レベル免疫染色をマイクロ流路内で行う技術を確立することを目的とする。この目的達成のため、マイクロ流路内におけるゲノム DNA 高次構造制御、免疫染色反応時間や反応効率について、微小空間であることの効果や流路の表面状態がどの程度影響しているのかを検討し、ゲノム DNA 高次構造制御や免疫染色実験操作を微細流路内でおこなうための最適な流路デザイン、流路表面処理や試薬を流すタイミングなどを決定する。次いで、細胞から単離した個々のゲノム DNA に対し、高次構造を制御し、引き続き免疫染色を行うという実証実験を行う。そして構築した技術をまとめ、細胞1個（シングルセル）から取り出したゲノム DNA に対して断片化させずにマイクロ流路内で一連の実験操作・解析を行うというこれまでにない新しい単分子解析手法・技術を確立する。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイス中における細胞からの DNA 取り出し及び DNA 展開技術確立

① マイクロ流体デバイス開発

光学顕微鏡下、狙った細胞からゲノム DNA を傷つけずに取り出し、溶媒環境を精度良く制御しながら DNA を解きほぐし、基板上に展開・固定させる事ができるマイクロ流体デバイスを開発する。デバイスは、ソフトリソグラフィ技術によりシリコンゴムで形成したパーツとガラス基板を貼り合わせて作製する。また、細胞や DNA を観察しつつデバイスの実験・観察領域場の溶媒組成に勾配をつけたり溶液置換を行うために、実験・観察領域場に通じる複数の微細流路中の試料溶液の流れを独立に精度良く制御できる仕様とする。試料には高等真核生物のモデル細胞として知られる分裂酵母を用いる。

② マイクロ流体デバイス中における単離 DNA の高次構造制御技術確立

細胞から取り出した DNA の高次の折り畳み構造を制御する溶液条件のパラメータを同定し、顕微鏡下で空間分解能を高めた単分子解析を行うための、ゲノム DNA 形態制御技術を確認する。DNA に対し、塩濃度を変えた溶液を作用させ、クロマチンファイバー高次構造変化と溶液塩濃度との相関を明らかにする。ここで、微細流路中で DNA クロマチンファイバーを観察し続けるには DNA を固定することが必要であるため、これまでの研究で開発しているマイクロピラーによる固定を採用する。

(2) エピジェネティクス解析用マイクロ流体デバイス開発

① マイクロ流体デバイス中での単分子免疫染色実験

マイクロ流体デバイス中、顕微鏡下で展開した個々のクロマチンファイバーに対して、蛍光ラベルした抗体により蛍光顕微鏡下で可視化する実験を行い、顕微鏡下での個々のゲノム DNA 分子に対する免疫染色技術を構築する。

4. 研究成果

(1)-① マイクロ流体デバイス開発

蛍光顕微鏡下、細胞からの DNA 取り出しから DNA 展開、抗体染色までを逐次的に行える仕様のマイクロ流体デバイスを設計・作製した(図1)。ここでは、ソフトリソグラフィ技術を用い、PDMS(シリコンゴム)で作製した流路とカバーガラスを貼り合わせてデバイスを組み立てた。主流路の側壁にマイクロポケットを配置し、このマイクロポケット内で細胞からのクロマチンファイバー単離など、各種生化学実験を行えるようになっていく。また、主流路内に設けたマイクロピラーは、単離したクロマチンファイバーを引っ掛

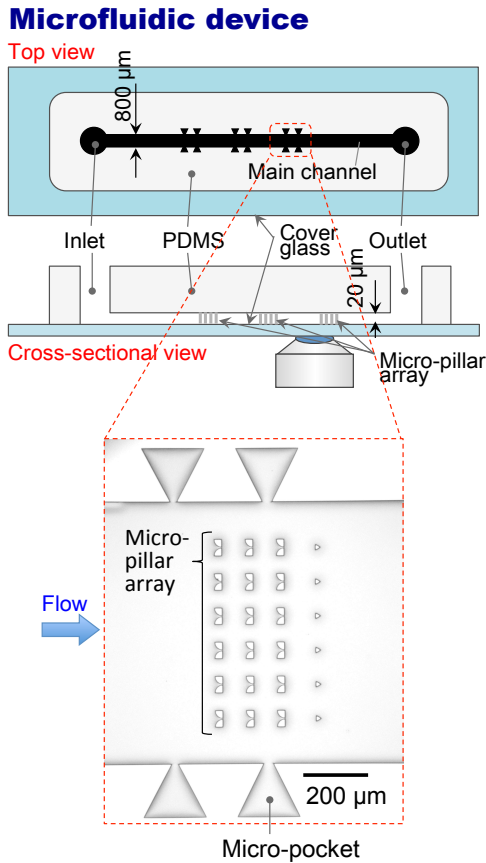
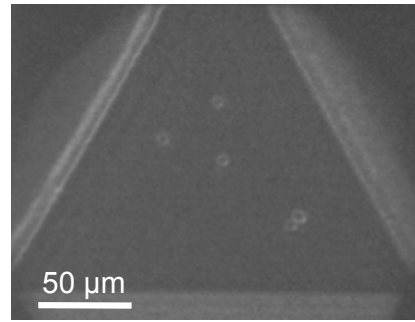


図 1：マイクロ流体デバイス概略図。

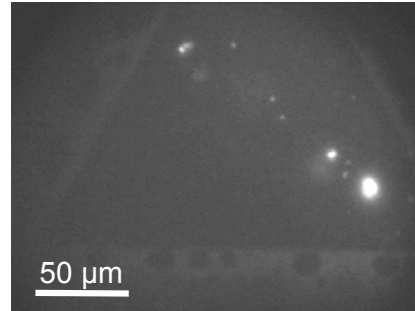
けて固定するために設置した。流体の制御は、溶液排出口に接続したマイクロピペットによる吸引操作で行った。このデバイスを用い、分裂酵母スフェロプラストから浸透圧ショックによってクロマチンファイバーを単離し、光ピンセットによって搬送可能であることを確認した（図 2）。

(1)-② マイクロ流体デバイス中における単離 DNA の高次構造制御

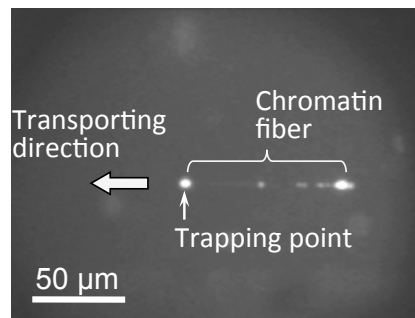
マイクロチャンバー内でクロマチンファイバーを展開・固定するための微小構造体としてマイクロピラーを設け、個々のクロマチンファイバーを展開・固定する事を実現した。ここでは、クロマチンファイバーを捕捉・操作する光駆動マイクロツールとして、クロマチンファイバーに対する抗体を修飾したマイクロビーズを作製して用いた。マイクロ流路内で一端を固定して保持されているクロマチンファイバーを高塩濃度環境場に曝すと、ヒストンが脱離して解きほぐされた DNA ファイバーが得られる様子が観察された（図 3）。またこれと並行して、抗体染色による空間的位置情報検出の際に併用することが可能な、任意の塩基配列を検出・捕捉する新奇



Phase contrast image of cells.



Burst cells visualized by DAPI.



Isolated chromatin fiber visualized by DAPI.

図 2：分裂酵母細胞スフェロプラストからのクロマチンファイバー単離。上段：マイクロポケット中に搬送された分裂酵母細胞スフェロプラスト。中段：浸透圧ショックによる細胞バーストで単離されたクロマチンファイバー。下段：光ピンセットによって捕捉・搬送されているクロマチンファイバー。

プローブに開発について研究をおこなった。これは、一本鎖 DNA (ssDNA) が相補的な配列の検索・結合をする際、この反応を促進することが期待される相同組換えタンパク (RecA) を援用したプローブであり、ssDNA-RecA 複合体をマイクロビーズに修飾して作製した。このプローブは光ピンセット操作が可能であり、標的となる DNA とプローブの相互作用の強さを、その場で直接調べることが可能となっている。実験の結果、特異

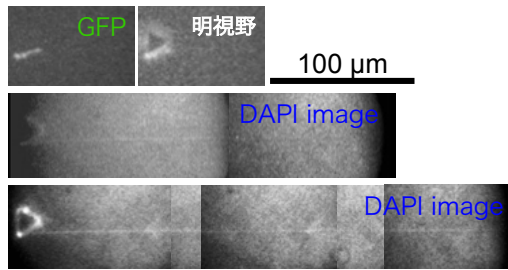


図 3：塩濃度とクロマチンファイバー高次構造との相関。上段：0 mM NaCl, 中段：1 M NaCl, 下段：2 M NaCl。

結合/非特異吸着の区別をする事が容易であることを示唆する結果が得られた。

(2)-①マイクロ流体デバイス中での単分子免疫染色実験

マイクロ流体デバイス内に展開・固定した個々のクロマチンファイバーに対する免疫染色実験を行い、クロマチンファイバー上の GFP に対する免疫染色が可能であることを確認することができた (図 4)。一方、マイクロ流体デバイス中における局所的な環境場の形成・制御への応用が期待される、新奇ジャイアントベシクル形成についても研究を行い、この、マイクロ流体デバイス内で形成されるジャイアントベシクルは、ユニラメラ構造を持つという知見を得た。この研究結果は、Soft Matter 誌において発表した。

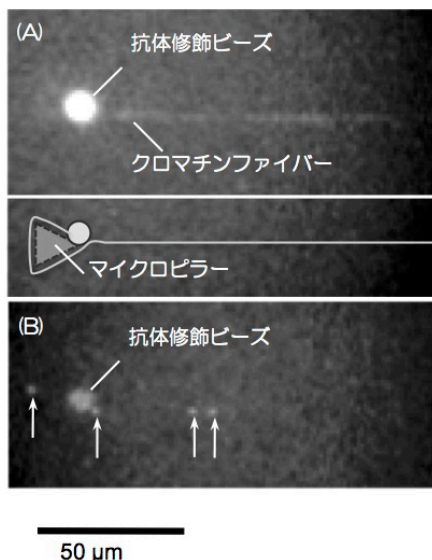


図 4：クロマチンファイバー上のタンパク質 (GFP) に対する免疫染色実験例。A) マイクロ流体デバイス中に伸張固定したクロマチンファイバーの蛍光顕微鏡像。B) GFP を免疫染色した蛍光顕微鏡像。白矢印が、染色された輝点。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Yuji Kimura, Yuya Goto, Hidehiro Oana, Masao Washizu: "Optical Sequence Probing with the Homologous Recombination Protein RecA," Journal of Biotechnology, 164, 254-259 (2012).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.006>

2) Hidehiro Oana, Mutsuki Morinaga, Akihiro Kishimura, Kazunori Kataoka, Masao Washizu: "Direct Formation of Giant Unilamellar Vesicles from Microparticles of Polyion Complexes and Investigation of Their Properties Using a Microfluidic Chamber," Soft Matter, 9, 5448-5458 (2013).
 DOI: 10.1039/c3sm00089c

[学会発表] (計 7 件)

1) 西川香里, 片岡正典, 永田麗子, 喜多山篤, 手老龍吾, 鷺津正夫, 小穴英廣: 基板上に伸張固定した DNA の塩基修飾反応とその検出: 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (2010.06.10、東京都文京区)

2) Hidehiro Oana, Takuya Saito, Takahiro Sakaue, Daiji Kaneko, Masao Washizu: "Folding Dynamics of Large DNA Molecules under Steady Strong Flow": The fifth Pacific Rim Conference on Rheology (PRCR5) (2010.08.05、札幌市)

3) K. Nishikawa, M. Kataoka, R. Nagata, A. Kitayama, R. Tero, M. Washizu and H. Oana: "EXTENSION, IMMOBILIZATION AND CHEMICAL MODIFICATION OF DOUBLE-STRANDED DNA ON A SOLID SURFACE -TOWARD DIRECT SEQUENCING WITH MICROSCOPY-": 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010) (2010.10.04, フローニンゲン、オランダ)

4) Hidehiro Oana, Mutsuki Morinaga, Akihiro Kishimura, Murat Gel, Kazunori Kataoka, and Masao Washizu: "Formation of Polymer Vesicles from Microdroplets of Polyion Complex and Examination of Their Physicochemical Properties in Microfluidic Chamber": 15th International Conference on Miniaturized Systems for

Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2011) (2011.10.05, シアトル、アメリカ合衆国)

5) Hidehiro Oana, Mutsuki Morinaga, Akihiro Kishimura, Murat Gel, Kazunori Kataoka, and Masao Washizu: “Formation of Polymer Vesicles from Microdroplets of Polyion Complex in a Microfluidic Chamber” : MicRO Alliance Meeting 2011 (2011.10.09, アナーバー、アメリカ合衆国)

6) 小穴英廣, 志野達弥, 西川香里, 鷺津正夫: 相同組換えタンパクを用いた特定塩基配列探索技術の開発: 第25回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (2012年5月18日、熊本市)

7) Hidehiro Oana, Tatsuya Shino, Kaori Nishikawa, Masao Washizu: “REAL-TIME FISH USING OPTICALLY-DRIVEN MICROSPHERES FUNCTIONALIZED BY THE HOMOLOGOUS RECOMBINATION PROTEIN, RecA ” : 16th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2012) (2012.10.29, 宜野湾市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bnt1.t.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小穴英廣 (OANA HDIEHIRO)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号: 20314172

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鷺津正夫 (WASHIZU MASAO)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 10201162

ゲル ムラト (GEL MURAT)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号: 90456153