

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25286035

研究課題名(和文)「その場」実験マイクロデバイスによるシングルセル・エピジェネティクス解析技術開発

研究課題名(英文) Development of a method for the epigenetic analysis of single cells under a microfluidic device

研究代表者

小穴 英廣(Oana, Hidehiro)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20314172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

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染色体/クロマチンを単離し、エピゲノム解析するための新たな手法を開発した。即ち、顕微鏡下で細胞から染色体/クロマチンを断片化させずに単離し、溶液条件を制御することで染色体/クロマチンを解きほぐしてクロマチンファイバーとし、これを展開して直線状の形態を取らせる事のできるマイクロ流体デバイスを開発した。このマイクロデバイス内では、取り出した染色体/クロマチンに対する免疫蛍光染色が可能となっている。ここで開発した手法は、個々の細胞中のゲノムに対する後天的修飾について直接調べるといふ1細胞エピゲノム解析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 analysis of individual intact chromosomes/chromatins isolated from single cells. We developed a custom-designed microfluidic device for isolation, control of the higher order structure of individual chromosome/chromatin by changing solution conditions under a fluorescence microscope. This device is also able to perform immunofluorescence staining. The method developed here has a potential application for direct investigation of the epigenetic profile of intact chromatin fibers at individual cell level.

研究分野：ナノバイオテクノロジー，ソフトマター物理学

キーワード：ゲノム DNA マイクロ流体デバイス

## 1. 研究開始当初の背景

現在のエピジェネティクス研究は、クロマチン免疫沈降法や PCR 法、DNA シーケンスなどの生化学実験法を組み合わせた種々の解析法を駆使して進められているが、これら解析法は細胞集団から抽出したクロマチン（紐状の DNA-タンパク質複合体）の集団を扱って行うため、得られる情報は平均化されたものとなっている。また、細胞からクロマチンを抽出する際にクロマチンの断片化が起こるため、得られた情報のゲノム DNA 鎖上での位置情報決定に手間を要する。これに対し、顕微鏡下で狙った 1 個の細胞からクロマチンファイバーを断片化させずに取り出し、その場でヒストンが修飾されている位置や、興味あるタンパク質と相互作用している位置を直接検出する実験手法が実現すれば、従来法では得られなかった、個々の細胞についての空間分解能の高いエピジェネティックな情報が得られることとなる。しかしながら、動物細胞のインタクトなクロマチンファイバーは、1 本の長さが数 mm にも及ぶほど長大であり、またそれが細胞内にコンパクトに折り畳まれて格納されている。そのため、顕微鏡視野下でクロマチンファイバーを断片化させずに細胞から取り出し、個別に取り扱い、所望の空間分解能が得られる程度までに解きほぐすことは非常に困難であり、上記のような、シングルセルレベルでのクロマチンファイバーエピジェネティクス解析手法は実現されていない。

## 2. 研究の目的

動物細胞から単離したクロマチンファイバーについて、高次構造と周囲の溶液組成との相関を明らかにし、得られた知見を基に、顕微鏡下・マイクロ流体デバイス内で動物細胞の長大なクロマチンファイバーを断片化させずに個別に取り扱う技術をデバイス開発も含めて構築する。次いで、開発したマイクロ流体デバイス中の実験・観察場に試薬溶液を逐次導入することで、細胞から単離した個々のクロマチンファイバーに対する単分子レベル蛍光抗体染色が行えることを実証する。これにより、『顕微鏡下・マイクロ流体デバイス内の「その場」で、狙った 1 個の細胞（シングルセル）から取り出したクロマチンファイバーに対し、断片化させずに一連の実験操作・解析を連続的に行う』というこれまでにない新しい単分子エピジェネティクス解析手法の有用性を実証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイス内における動物細胞からのクロマチンファイバー取り出しおよび固定・展開技術確立

① 動物細胞由来クロマチンファイバーハンドリング用マイクロ流体デバイス設計・製作

これまでに本報告者が取り組んできた酵母細胞由来のクロマチンファイバー（1 本の平均長さ数百  $\mu\text{m}$  程度）操作技術開発における成果を改良・発展させ、より長大な動物細胞由来クロマチンファイバーを単離・操作可能なマイクロ流体デバイスを開発する。このデバイスは、ソフトリソグラフィ技術によりシリコンポリマーで作製する。実験試料にはマウス由来の繊維芽細胞を用い（1 個の細胞内にクロマチンファイバー 40 本、1 本の平均長さ数  $\mu\text{m}$ ）、細胞周期 M 期の細胞を用いる（クロマチンファイバーは高度に凝縮した染色体構造を取っており、解きほぐす前の段階における個別操作が容易であるため）。ここで、単離した染色体を個別操作するためのマイクロツールとしては、抗ヒストン抗体を修飾したマイクロピエゾを利用する。

② マイクロ流体デバイス内における単離染色体の高次構造および形態制御技術確立

マイクロ流体デバイス内で細胞から単離した染色体に対し、デバイス内で逐次的に塩濃度を変えた溶液や酵素溶液を作用させる実験を行い、染色体を解きほぐしてクロマチンファイバーを得る（高次構造制御）ための溶液条件を同定する。得られた知見を基に、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、クロマチンファイバー形態制御技術を確認する。ここでは、マイクロ流路内でクロマチンファイバーを流失させず、尚かつ高次構造制御や免疫染色を行う際の立体障害を無くすため、クロマチンファイバーを基板から浮かせた状態で固定することが必要である。そこで、これまでの研究で開発している、マイクロピエゾによる固定を採用する。

(2) 「その場」シングルセル・エピジェネティクス解析技術確立と有用性の確認

① マイクロ流体デバイスを用いた、個々の動物細胞由来クロマチンファイバーに対するエピジェネティクス解析技術確立

上記 (1) で開発したデバイスならびクロマチンファイバー操作・高次構造制御技術により、顕微鏡下で展開・固定した個々のクロマチンファイバーに対し、修飾を受けているヒストンと特異的に結合する蛍光ラベル抗体（市販品）を用いた免疫染色をマイクロ流体デバイス内で行い、クロマチンファイバー上に於ける標的タンパク質の局在を、蛍光顕微鏡法により可視化する実験を行う。細胞は、マウス由来繊維芽細胞を用いると共に、これまでにクロマチン取り扱いのノウハウが蓄積されてきている分裂酵母細胞も使用する。

## 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、動物細胞からの染色体取り出しから染色体の展開、免疫蛍光染色までを

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(シリコーンゴム)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る。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。このデバイスは、これまでに開発していた分裂酵母実験用のマイクロ流体デバイスをベースにして設計した。マイクロポケットのサイズ、流路の高さを数10~100 μmとすることで、分裂酵母よりもサイズが大きな動物細胞に対応出来るようになっている。このデバイスを用い、細胞から浸透圧ショックによって染色体を単離し、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)。

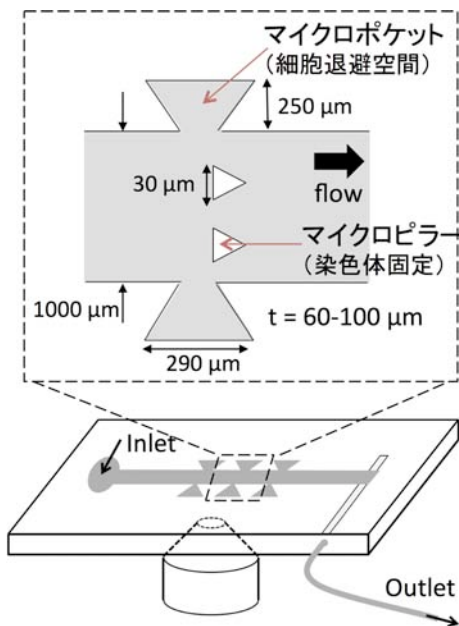


図1: マイクロ流体デバイス概略図。

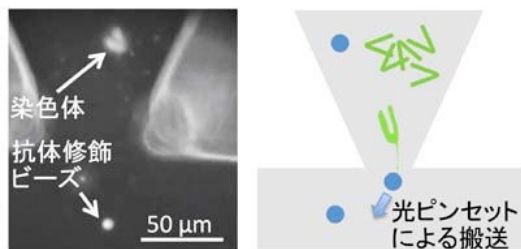


図2: マウス繊維芽細胞から単離した染色体を抗体修飾マイクロビーズで捕捉して光ピンセットにより搬送している例。左: マイクロポケット内で捕捉した染色体を、マイクロピラーが設けられている主流路へ搬送しているところ。右: 実験のイラスト。

(1)-② マイクロ流体デバイス内における単離染色体の高次構造および形態制御技術確立

マイクロピラーに染色体を固定した後、塩濃度の高い溶液に染色体を曝すと、高次構造変化が起こり、染色体が徐々に解きほぐされ、クロマチンファイバーが得られた(図3)。塩濃度1 Mの条件下では、セントロメア領域の蛍光強度が他の領域よりも強い様子が観察され、凝縮構造が比較的維持されることが示唆された。塩濃度を2 Mに上げると、クロマチンファイバーは更に伸展した。クロマチンを構成しているヒストンが、塩濃度上昇に伴う静電相互作用の低下によって更に脱離していくからであると解釈できる。

塩濃度2 Mの環境下でも、抗ヒストン抗体修飾マイクロビーズを介したクロマチンのマイクロピラーへの固定は維持されていた。一般に、ヒストンは塩濃度2 Mの環境下では、DNAから外れるとされているが、このクロマチンファイバー固定条件下では、マイクロビーズ上の多数の抗ヒストン抗体がクロマチンファイバー内のヒストンに結合しており、ヒストンがDNAから脱離するのを抑制しているためであると考えられる。

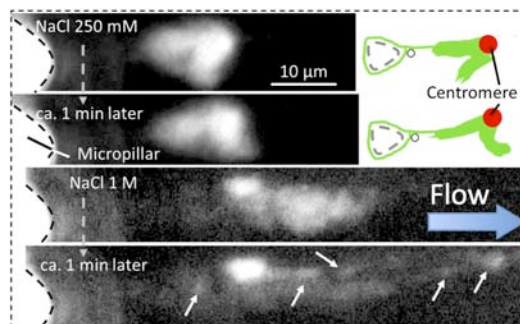


図3: マウス染色体の高次構造制御。染色体の一方のテロメア付近を捕捉し、マイクロピラーに固定した。ここで250 mM NaCl溶液をマイクロ流路に導入すると、染色体は少し膨潤し、特に長腕部分の蛍光強度が低下した。次いで1M NaCl溶液を導入すると、染色体は更に膨潤し、流れによって解きほぐされ摩く様子が観察された。

(2) 「その場」シングルセル・エピジェネティクス解析技術確立と有用性の確認

(2)-① マイクロ流体デバイスを用いた、個々の動物細胞由来クロマチンファイバーに対するエピジェネティクス解析技術確立

顕微鏡下・マイクロ流体デバイス内における、クロマチンファイバーに対する、エピジェネティック解析の例として、ヘテロクロマチン構成タンパク質 Swi6 に対する免疫蛍光染色を行った。クロマチンファイバーに沿って、クロマチンの凝縮が分布しているのに対応して、抗体によって免疫染色した部分の蛍光

輝度が高いことが確認された(図4)。図5に、マウス由来繊維芽細胞のクロマチンファイバー上におけるメチル化DNA結合タンパク質(MBD)-赤色蛍光タンパク質(RFP)の分布を蛍光可視化したものを示す。これらの実験を通じて、クロマチンファイバー上における、標的タンパク質の結合は確認できたが、結合位置がゲノム上の、どの塩基配列部分に対応しているかの特定には至らなかった。今後、クロマチンファイバーに対して塩基配列特異的に結合するプローブの開発に取り組み、この問題の解決を図る予定である。

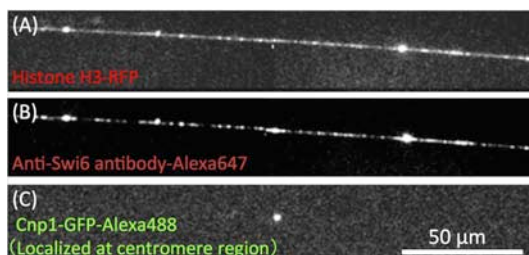


図4：分裂酵母由来クロマチンファイバーに対する免疫蛍光染色の例。(A) ヒストン-RFP 蛍光像。(B) 蛍光ラベル抗 Swi6 蛍光像。(C) 蛍光ラベル抗 Cnp1 蛍光像。Cnp1 はセントロメアに局在するタンパク質。

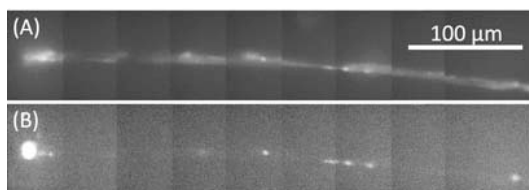


図5：マウス由来クロマチンファイバーの蛍光顕微鏡像。(A) YO-PRO-1 による DNA の蛍光像。(B) MBD-RFP の蛍光像。左端の丸い輝点は、抗体修飾ビーズの自家蛍光。

## 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3件)

1) Hiroki Mori, Kennedy Omondi Okeyo, Masao Washizu, Hidehiro Oana, “MAPPING POSITIONAL DISTRIBUTION OF HIGHER-ORDER STRUCTURES ALONG UNFRAGMENTED NATIVE CHROMATIN FIBERS ISOLATED FROM SINGLE CELLS IN A MICROCHANNEL,” Proc. 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS2015), 1259-1261 (2015).

2) H. Oana, K. Nishikawa, H. Matsuhara, A. Yamamoto, T. G. Yamamoto, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, and M. Washizu, “Non-destructive handling of individual chromatin fibers

isolated from single cells in a microfluidic device utilizing an optically driven microtool,”

Lab on a Chip, 14, 696-704 (2014).

DOI: 10.1039/c3lc51111a

3) H. Oana, K. Nishikawa, H. Matsuhara, A. Yamamoto, T. G. Yamamoto, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, and M. Washizu, “NON-INVASIVE HANDLING OF CHROMATIN FIBERS ISOLATED FROM INDIVIDUAL CELLS IN A MICROCHANNEL UTILIZING AN OPTICALLY DRIVEN MICROTOOL – TOWARD DIRECT EPIGENETIC ANALYSIS BY MICROSCOPY –,” Proc. 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2013), 1995-1997 (2013).

[学会発表] (計20件)

1) 高橋 智博, オケヨ ケネディ, 鷺津 正夫, 小穴 英廣: マイクロ流体デバイスを用いた動物細胞染色体の凝縮構造安定性の解析:

化学とマイクロ・ナノシステム学会 第33回研究会 (33rd CHEMINAS)

2016年4月25日, 東京大学生産技術研究所 (東京都, 目黒区)

2) Hidehiro Oana, Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo and Masao Washizu, “A MICROFLUIDIC PLATFORM FOR ANALYSIS OF SINGLE CHROMATIN FIBERS: TOWARD SINGLE CELL EPIGENETIC STUDY,” The Eighth International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB 2016), 2016.04.20, 大韓民国 (ソウル)

3) Hidehiro Oana, Hiroki Mori, Kennedy O. Okeyo and Masao Washizu, “Development of a Method for Investigation of Individual Intact Chromatin Fibers Isolated from Single Cells in a Microfluidic Channel,” SELECTBIO Conference, Single Molecule & Single Cell Analysis (SMSCA2016), 2016.03.15, スペイン王国 (マドリッド)

4) 森 裕貴, オケヨ ケネディ, オモンディ, 鷺津 正夫, 小穴 英廣: マイクロ流路を用いたクロマチン展開挙動の計測法の開発: 日本機械学会第28回バイオエンジニアリング講演会, 2016.01.10, 東京工業大学 大岡山キャンパス, 東京都 (目黒区)

5) Hidehiro Oana, “Non-destructive Handling of Individual Intact Chromatin Fibers Isolated from Single Cells in a Microfluidic Device- Toward Single Cell Epigenetic Study by Microscopy,” 15<sup>th</sup> Asia-Pacific International Symposium on Microscale Separations and Analysis (APCE 2015), 2015.11.17, Taiwan (Tainan).

6) Hidehiro Oana, “Immunofluorescence Staining and Extending of Individual Intact Chromatin Fibers Isolated from Single Cells utilizing a Microfluidic Device,” The 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2014.09.11, Kenya (Nairobi)

7) 伊藤哲久, ケネディ オケヨ, 鷲津正夫, 小穴英廣: マイクロ流体デバイスを用いた動物細胞のクロマチンファイバー単離・伸長手法の研究: 第 29 回化学とマイクロ・ナノシステム学会 (29<sup>th</sup> CHEMINAS), 2014 年 5 月 23 日, 東京都 (文京区)

8) 東郷智之, ケネディ オケヨ, 小穴英廣, 鷲津正夫: 相同組換えタンパクをプローブに用いた標的塩基配列の顕微鏡下リアルタイム探索: 第 29 回化学とマイクロ・ナノシステム学会 (29<sup>th</sup> CHEMINAS), 2014 年 5 月 23 日, 東京都 (文京区)

9) Hidehiro Oana, “Development of an Optically Driven Microtool for Micromanipulation and Investigation of Individual Chromatin Fibers in a Microfluidic Device,” Advances in Microfluidics & Nanofluidics 2014 (AMN2014), 2014.05.21, 中華民国 (台北市)

10) 小穴英廣: 微細加工・微細操作技術のシングルセルベースゲノム研究への応用: 次世代マイクロ化学チップコンソーシアム第 26 回研究会, 2013.10.22, 東京都 (文京区)

11) 小穴英廣: 微細操作技術のシングルセル・エピゲノム解析への応用: 第 2 回イノバイオ研究会セミナー, 2013.10.21, 東京都 (文京区)

12) 若林貴之, 西川香里, 小穴英廣, オケヨ ケネディ, 鷲津正夫: 抗体修飾マイクロビーズを用いたゲノム DNA・蛋白質複合体の単分子操作技術の開発: 第 27 回化学とマイクロ・ナノシステム学会, 2013 年 5 月 24 日, 宮城県 (仙台市)

[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

鷲津正夫 (WASHIZU, MASAO)

東京大学・大学院工学系研究科・教授

研究者番号: 10201162

オケヨ ケネディ (OKEYO, KENNEDY)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号: 10634652

[謝辞]

本研究を遂行するにあたっては、静岡大学理学部 山本歩博士より遺伝子組換え分裂酵母株を、中部大学実験動物教育研究センター 上田潤博士より *MethylRO* 由来のマウス胚性繊維芽細胞をご提供頂きました。ここに深く感謝申し上げます。