

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02753

研究課題名(和文) エピゲノム動態解明を目指した1細胞・クロマチン解析マイクロデバイスの開発

研究課題名(英文) Development of a microdevice for single cell/chromatin analysis to elucidate epigenomic dynamics

研究代表者

小穴 英廣 (Hidhiro, Oana)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：20314172

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、顕微鏡下・マイクロ流体デバイス内で、狙った1個のほ乳類由来の細胞から染色体を単離し、穏やかに解きほぐして流れ場の中で展開させる技術を開発した。この技術をマウス由来の未分化細胞(ES細胞)および分化細胞(繊維芽細胞)に適用し、未分化細胞由来の染色体の方が、より解き解れやすいことを見出した。また、細胞から取り出した染色体の番号を識別する事を目的とし、蛍光ラベルdCas9タンパクをプローブとした、マイクロ流体デバイス内における染色体上の特定塩基配列可視化に取り組み、選択した標的配列によっては可視化することを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、個々の細胞から染色体および断片化していないクロマチンファイバーを取り出し、これを試料として1分子レベル生化学実験を行うという手法の開発に取り組み実現した。今後、本手法を更に発展させ、マイクロ流体デバイス内で溶液環境を変化させながらクロマチン折り畳みの動態を調べる事で、エピジェネティクスについての理解が深まり、新たな知見に基づいた再生医療やがん治療法が生まれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a technique for isolating chromosomes from mammalian single cells under a microscope in a microfluidic device, unfolding them, and stretching them in a gentle flow. By applying this technique to mouse-derived undifferentiated cells (ES cells) and differentiated cells (fibroblasts), we found that undifferentiated cell-derived chromosomes were easier to unfold. In addition, for the purpose of determining chromosome numbers, we worked on visualization of specific DNA sequences on the chromosomes in the microfluidic device using the fluorescence-labeled dCas9 protein as a probe. Depending on the target sequence selected, the visualization was achieved.

研究分野：バイオナノテクノロジー

キーワード：マイクロ流体デバイス 1細胞解析 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピゲノムとは、DNA塩基配列の変化を伴わない後天的な作用(DNAやヒストンの化学修飾)を含んだゲノム情報のことである。エピゲノムの変化は、細胞の分化/初期化やがん化と密接に関わっているため、多くの研究者がエピゲノム動態の理解に取り組んでいる。現在のエピゲノム研究は、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鎖上での位置情報同定に手間を要する。これに対し、顕微鏡下で狙った1個の細胞から染色体/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解析手法が実現すれば、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テナ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、上記のようなクロマチンファイバーに対する1細胞レベルの高分解能な単分子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個々の染色体について、クロマチンファイバーへと解きほぐして空間分解能の高い解析を行うため、染色体の凝縮の安定性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染色体を解きほぐして長大なクロマチンファイバーを取得し、これ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免疫蛍光染色を行い、単分子レベル・エピゲノム解析が行えることを実証する。そして「顕微鏡下・その場」で狙った1個の細胞から染色体を取り出して解きほぐし、断片化させずにゲノムワイドなエピジェネティクス解析を行うという、これまでにない1細胞・エピゲノム動態解析手法を可能とするマイクロ流体デバイスを実現することを最終目的とする。

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染色体取り出し及び配置・固定・解きほぐし技術確立

①動物細胞由来の染色体/クロマチンハンドリング用マイクロ流体デバイス開発

これまで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単離・操作技術開発における成果を応用・発展させ、より長大な動物細胞由来染色体/クロマチンを単離・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ー技術によりシリコーンポリマーで作製する。実験試料にはマウス胚性繊維芽細胞(MEF)及びマウスES細胞(1個の細胞内に染色体40本、総延長で酵母細胞の200倍程度の長さのDNAを持つ)を用い、細胞周期M期の細胞を用いる(M期においてクロマチン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に捕捉・操作するためのマイクロツールとしては、クロマチン結合性タンパクに対する抗体を修飾したマイクロビーズを用い、これを光ピンセット操作する。捕捉した染色体のマイクロ流体デバイス内での配置・固定には、上記抗体修飾マイクロビーズと共に、これまでの研究で開発している、基板上に設けた微細構造(マイクロピラー)による方法を利用する。この固定法は、マイクロ流路内で染色体/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(解きほぐし)を行う際の立体障害を避けるため、染色体/クロマチンファイバーを基板から浮かせた状態で保持できるようになっている。

②マイクロ流体デバイス中における単離染色体解きほぐし・形態制御技術開発

微小構造体に固定した染色体に対し、マイクロ流路内で段階的に塩濃度を変えた溶液を作用させる実験を行い、染色体を解きほぐす(クロマチンファイバー化)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立する。

③マイクロ流体デバイス中における単離染色体の識別技術開発

エピゲノム解析のためには、解析対象の各々が何番染色体であるか知る必要がある。そこで、標的塩基配列と相補的な1本鎖ガイドRNAと蛍光ラベルdCas9タンパク質から成る複合体を作製して蛍光プローブとして用い、マウスES細胞から単離した染色体に対し、何番染色体なのかを識別する技術を確立する。

(2) 単離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の開発

①細胞の分化度合いとエピジェネティクス情報との相関の解析

分化細胞であるマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) と未分化細胞であるマウス ES 細胞のそれぞれから単離した染色体に対し、染色体を解きほぐす (クロマチンファイバー化) 実験を行い、解き解れ方や解き解れ度合いに違いがあるか検証することを通じ、本手法がエピジェネティクス解析手法として有用であることを実証する。

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上)。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染色体単離など、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、単離した染色体を流れ場の中で係留できるように設置した。係留した染色体/クロマチンが基板表面に接触するのを抑えるため、このマイクロピラーは、土台部分を持つ構造とした。流体の制御は、溶液排出口に接続したマイクロピペット又は圧力制御式のポンプによる吸引操作で行った。このデバイスを用い、MEF 及びマウス ES 細胞から浸透圧ショックによって染色体を単離し、抗体修飾マイクロビーズを援用して光ピンセットによって搬送し、マイクロピラーに係留することを実現した (図1下)。

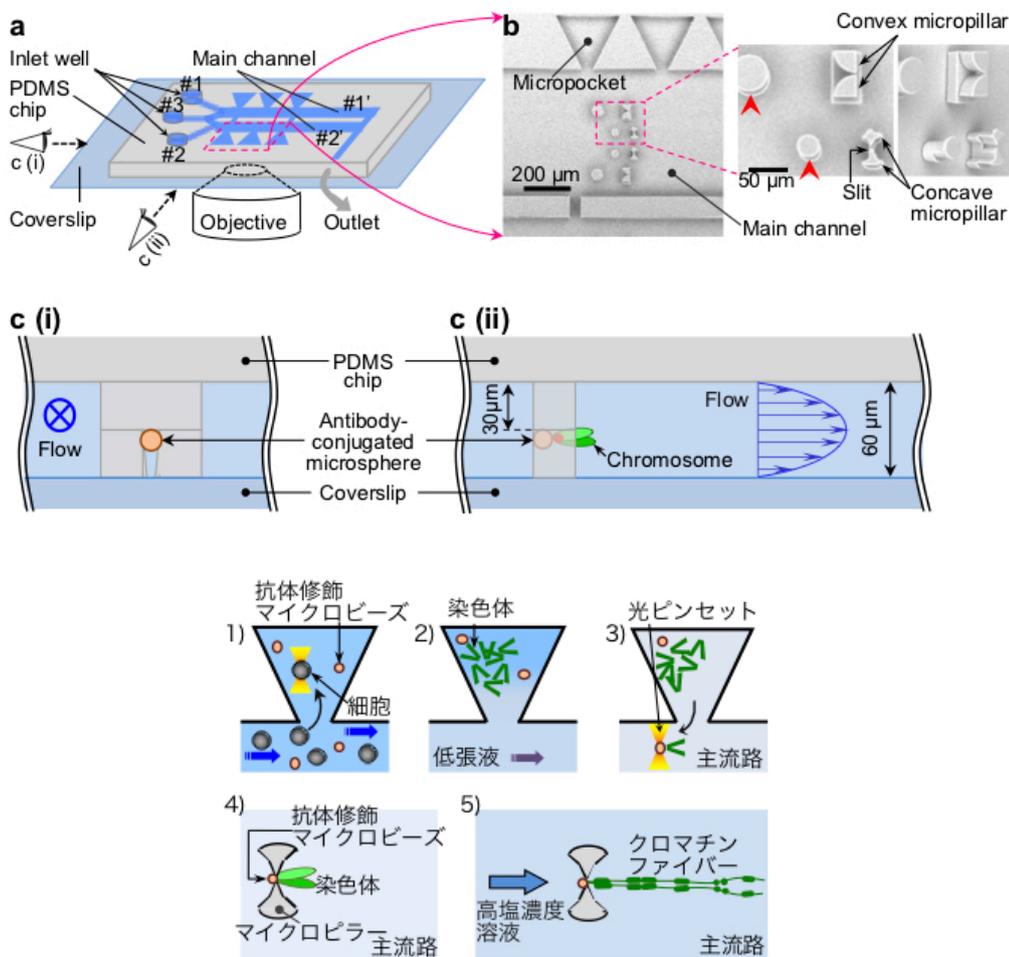


図1：マイクロ流体デバイス概略図 (上)。実験手順の概略図 (下)。染色体と結合させた抗体修飾マイクロビーズをマイクロピラー間に挟むことにより、染色体を流れ場中で係留する。

(1) -②マイクロ流体デバイス中における単離染色体解きほぐし・形態制御

マイクロピラーに染色体を係留した後、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2)。塩濃度 1.5 M の条件下において、見かけの全長が 600 μm を超えるクロマチンファイバーを得ることもできた。ここで、クロマチンファイバー上には輝度の高い部分と低い部分とが観察されたことから、安定的に凝縮している部分と、より解けている部分とが共存・分布している事が示唆された。

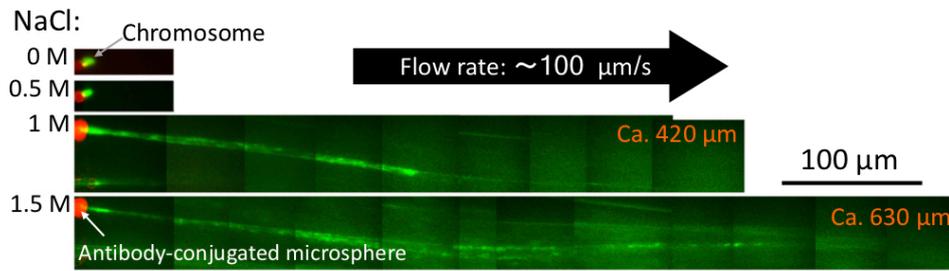


図2：MEF由来の染色体の解きほぐし。マイクロ流路に流す溶液の塩濃度を段階的に上げていくと染色体は解れはじめ、1.5 M NaCl 溶液下では、数百 μm 以上になるものも観察された。

(1) -③マイクロ流体デバイス中における単離染色体の識別

ここでは、GFP がラベルされた dCas9 タンパク質（市販品）を用いた。蛍光可視化する標的塩基配列として、まずはテロメア配列を選び、蛍光可視化が出来ることを確認した上で、次いで8番染色体及びX染色体上の繰り返し配列部の可視化にそれぞれ取り組んだ。実験手順としては、マイクロ流体デバイス内で細胞から染色体を単離した後、マイクロ流体デバイス内のマイクロポケット内で、蛍光ラベル dCas9 による染色-洗い-蛍光可視化を行った。溶液条件検討の結果、特異的と見なせる蛍光輝点を8番染色体ラベル実験時、X染色体ラベル実験時共に、確認することができた(図3)。しかしながら、蛍光輝点を確認できる歩留まりは2割程度であった。

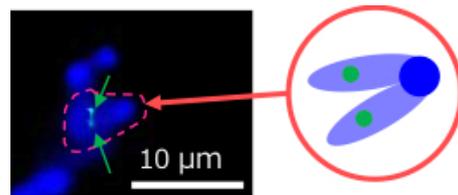


図3：8番染色体上の繰り返し配列部を標的にした、蛍光ラベル dCas9 をプローブとした特定塩基配列部の可視化。

テロメア配列を標的にした蛍光ラベル dCas9 によるラベリングは再現性良く行えることから、蛍光ラベル dCas9 による特定塩基配列部の蛍光可視化のためには、標的配列の繰り返し数や標的配列に相補的な sgRNA の配列の選び方についての更なる検討が必要であると考えられる。

(2) -①細胞の分化度合いとエピジェネティクス情報との相関

MEF由来の染色体は、塩濃度 0.5 M の溶液に曝しても形態の変化が殆ど見られず、0.75 M の塩濃度溶液に曝すと徐々に解れて展開し、部分的に凝縮したクロマチンファイバーが得られた(図4上)。一方、ES細胞由来の染色体は、塩濃度 0.5 M の溶液に曝すと速やかに解き解れはじめ、0.75 M の塩濃度中では、MEF由来の染色体の場合と比較して、蛍光強度が比較的一様なバンドル状のクロマチンファイバーとなった(図4下)。ES細胞はクロマチンの凝縮安定性が全ゲノム領域に渡って比較的低く、多様な細胞への分化が可能になっている一方で、MEFでは局所的に存在する安定なクロマチン凝縮構造が、いったん定まった遺伝子発現パターン維持に寄与している事を示唆する結果が、生細胞の核内クロマチン動態の観察により報告されている。分化度の異なる細胞間におけるクロマチン凝縮構造安定性の違いが、分裂期の染色体においても保存されている事が、本研究課題で開発した1細胞・1染色体レベル生化学実験マイクロデバイスを用いて確かめられた。

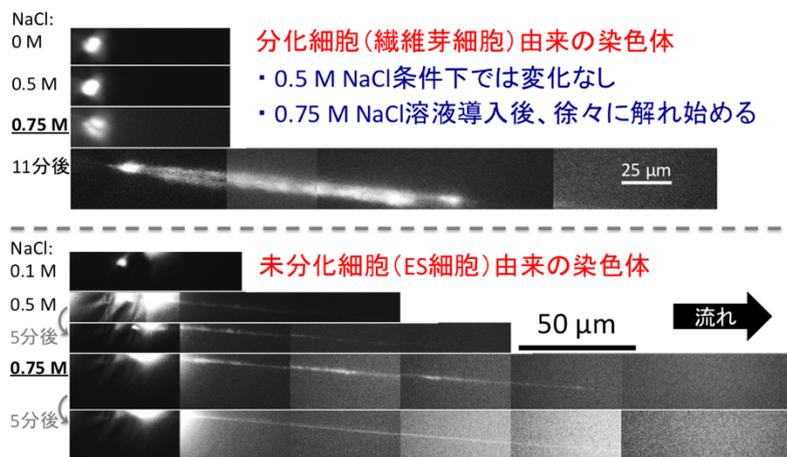


図4：塩濃度を段階的に上げていった際の、MEF由来染色体の解きほぐし(上)とES細胞由来染色体の解きほぐし(下)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Takahashi, K. O. Okeyo, J. Ueda, K. Yamagata, M. Washizu, H. Oana	4. 巻 8
2. 論文標題 A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-31975-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 H. Mori, K. O. Okeyo, M. Washizu, H. Oana	4. 巻 13
2. 論文標題 Nucleosomes Exhibit Non-uniform Unwrapping Along Native Chromatin Fibers with Increasing Salt Concentration as Revealed by Direct Imaging in a Microfluidic Channel	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/biot.201700245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 村山航，鷲津正夫，小穴英廣
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた1細胞由来染色体の番号識別技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第39回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小穴英廣
2. 発表標題 Isolation, Discrimination and Transportation of Individual Specific Chromosomes From Single Mammalian Cells in a Microfluidic Channel
3. 学会等名 Lab-on-a-Chip & Microfluidics World Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidehiro Oana, Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Hiroshi Ochiai, Masao Washizu
2. 発表標題 Direct acquisition of individual target chromosomes isolated from single mammalian cells in a microfluidic channel for single cell/chromosome epigenetic analyses
3. 学会等名 SELECTBIO Single Cell Analysis Summit 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小穴英廣
2. 発表標題 Developing a microfluidic device for direct observation-based single cell/chromosome epigenetic analyses
3. 学会等名 Mini-symposium of Single Cell Sequencing, Biosensing and Biomicrofluidics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋智博・オケヨ ケネディ・上田潤・鷲津正夫・小穴英廣
2. 発表標題 細胞・染色体単離技術に基づいた細胞の分化度と染色体構造安定性との相関の解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八尋 啓・オケヨ ケネディ・鷲津 正夫・小穴 英廣
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた1細胞由来の染色体単離・ソーティング技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Oana, T. Takahashi, K. O. Okeyo, J. Ueda, M. Washizu
2. 発表標題 Direct Observation-based Analysis of Compaction Stability of Individual Chromosomes Isolated from Single Mammalian Cells
3. 学会等名 21th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hidehiro Oana
2. 発表標題 Direct Observation of Folding Stability of Individual Chromosomes Isolated From Single Mammalian Cells in a Microfluidic Channel
3. 学会等名 Lab-on-a-Chip & Microfluidics, Point-of-Care Diagnostics & Global Health Asia 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小穴英廣・高橋智博・オケヨ ケネディ・上田潤・山縣一夫・鷺津正夫
2. 発表標題 マイクロ流路を用いた細胞の分化度と染色体構造安定性との相関のリアルタイム解析技術開発
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	上田 潤 (Ueda Jun)	旭川医科大学・教育研究推進センター・准教授	本研究を遂行するにあたり、MethylRO由来のマウス胚性繊維芽細胞およびES細胞をご提供頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山縣 一夫 (Yamagata Kazuo)	近畿大学・大学院生物理工学研究科・准教授	本研究を遂行するにあたり、Methy1R0由来のマウス胚性繊維芽細胞およびES細胞をご提供頂きました。ここに深く感謝申し上げます。
研究協力者	落合 博 (Ochiai Hiroshi)	広島大学・大学院統合生命科学研究科・講師	本研究を遂行するにあたり、dCas9-RFP発現マウスES細胞をご提供頂きました。ここに深く感謝申し上げます。