

令和元年6月13日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14667

研究課題名(和文) マイクロカプセルを用いた単一細胞解像度bisulfite法の確立

研究課題名(英文) Establishment of bisulfite conversion method in microcapsules for single-cell analysis.

研究代表者

幸田 尚 (KOHDA, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：60211893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メチルシトシンの解析技術であるbisulfite法は標準的な手法としてエピゲノム研究において必須の実験技術である。しかしこの反応は酸性条件下高温の反応を必要とするため、変換反応と同時にDNA切断が起きるため、微量の材料からの解析は困難であった。本研究では微量のDNAや細胞をアルギン酸マイクロカプセルに封入し、そのままbisulfite処理とその後のPCR増幅を行う実験系を確立した。これによってこれまで困難だった微量サンプルのbisulfite処理のハンドリングを格段に容易かつ確実にを行うことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類のエピゲノム制御において、DNAのシトシンメチル化はヒストン修飾とともに主要な役割を果たしている。しかしメチルシトシン解析のためのbisulfite法は微量サンプルからの解析にいくつかの困難が伴ってきた。本研究によってDNA 1分子単位でbisulfite処理をマイクロカプセル中で実現しモニターすることが可能となった。この技術はbisulfite法の1細胞レベルでの解析技術開発のための重要なマイルストーンとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The bisulfite method, which is an analytical technique for methyl cytosine, is an essential experimental method in epigenetics. However, since this reaction requires a high temperature reaction under acidic conditions, DNA cleavage occurs simultaneously with the conversion reaction. Therefore, analysis from a small amount of material was difficult. In this study, an experimental system was established in which a small amount of DNA or cells were encapsulated in alginate microcapsules, bisulfite treatment and subsequent PCR amplification were performed. This method makes it possible to handle the bisulfite treatment of trace amounts of samples much more easily and reliably, that has been previously difficult.

研究分野：分子生物学

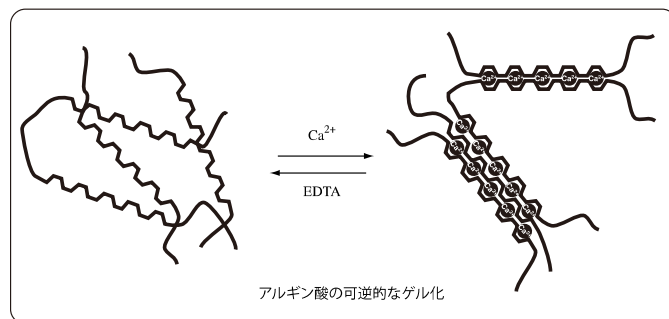
キーワード：メチルシトシン エピゲノム バイサルファイト反応 マイクロカプセル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のエピゲノム制御において、DNA のシトシンメチル化はヒストン修飾とともに主要な役割を果たしている。そのため、シトシンメチル化の解析技術はエピゲノム研究において必須である。特に、1塩基解像度での解析が可能である bisulfite 法は標準的な手法として広く用いられてきた。Bisulfite 法はシトシンをウラシルに化学的に変換する sodium bisulfite 溶液による処理が必要であるが、この反応は酸性条件下高温の反応を必要とするため、変換反応と同時に DNA 切断が起きるため、微量の材料からの解析は困難である。実際これまで bisulfite 法によるメチルシトシン(mC)の解析は、DNA の切断によって元のサンプルに含まれる DNA のうちごくわずかしが解析できていないにもかかわらず、実際には PCR で増幅した単一分子由来の DNA を何分子もシークエンスして、そのことに気づかない場合がしばしば認められた。特に微量のサンプルからの解析ではこのような complexity の低下は大きな誤りの原因となる。また単一細胞からの RNA-seq や ATAC-seq などの次世代シークエンサーを用いた解析の手法が急速に普及しているのに対し、bisulfite 法は DNA 切断の問題があるため単一細胞解析への適用が困難な状態に留まっている。このような状況を改善しようと、bisulfite 反応の反応液組成、温度、時間、様々な添加物などを検討することで変換効率が十分高く DNA 切断が少ない手法を開発しようとする努力も様々試みられているが、何分子が変換され、何分子が切断されて解析が不能となっているのかを正確に見積もること自身が困難であった。さらに、単一細胞からの解析を行おうとした場合、分子数が少ないために bisulfite 反応後のアルカリ処理の段階での溶液交換時において DNA を失ってしまうことも技術的に困難な点である。単一細胞からの DNA の精製と bisulfite 処理において回収率や DNA の切断の問題を回避するために、細胞をアガロースビーズに埋め込んで bisulfite 処理をすることで1細胞からの解析効率を向上するという手法(Olek A. et al. Nucl. Acid. Res. 1996 24(24) 5064-5066)が提案され、受精卵の解析などに用いられているが、bisulfite 処理後の PCR を行うことは熱に対する安定性がないアガロースビーズ中では不可能であり、反応効率の厳密な検定は困難である。

一方、アルギン酸は藻類などから得られる多糖でナトリウム塩などは水に可溶であるが、カルシウムやバリウムなどの2価カチオンを加えるとすみやかにゲル化しマイクロカプセルを生成することができる。人造イクラなどにも使われるが、これを用いたマイクロカプセルは、種々の低分子をはじめとして PCR



酵素やプライマーは透過する一方、PCR 産物などのある程度以上の長さの DNA は透過しないという性質を有しているとされていた。アガロースなどと違って温度に対する安定性もあり、実際にアルギン酸マイクロカプセル中で PCR が可能であることが示されている(Walser M. et al. Nucl. Acid. Res. 2009 37(8) e57)。また2価カチオンをキレートすることで直ちに可溶化できるところから、マイクロカプセル中の DNA を温和な条件で回収することも容易である。

2. 研究の目的

本研究の目的は単一細胞のようなごく微量サンプルからの bisulfite 法を可能とするための基礎となる技術として、マイクロカプセル中に細胞や DNA を封入し、この中で bisulfite による変換反応を行い、さらにそのまま PCR によって変換された DNA を増幅することのできる実験系を確立することである。また、これらの反応の間に数回の溶液交換の必要が生ずるが、これに際してマイクロビーズを失うことなく容易に溶液交換が可能な技術も合わせて開発する。これらを達成することで、微量サンプルから bisulfite 反応を行なってそのまま PCR 増幅を行うことで、何分子の DNA が変換され、何分子が切断されて解析が不能となったのかを直接確認することが可能なる。したがって、これらの一連の反応を同一のマイクロカプセル中で行うことができるようになれば、DNA 1分子単位で効率的な bisulfite 反応の条件を見出すことが可能となると期待される。

3. 研究の方法

(1) アルギン酸ビーズの調製

DNA または細胞を微小なアルギン酸マイクロカプセルに封入する手法は Maeda らの手法(Maeda K. et al. Adv Mater. 2012;24(10):1340-6.)に従って遠心機を用いてマイクロチューブの中に入れた塩化カルシウム溶液にアルギン酸溶液を滴下する手法での調製を試みた。しかしながらこの方法の場合生成したマイクロビーズの大きさを自由にコントロールすることが困難であったことから、アルギン酸溶液の滴下についてはインクジェットプリンターに用いられる液滴の微量吐出用のデバイス(Microjet 社, Pipejet PJK-200H)を用いての検討も行なった。

(2) マイクロカプセルの溶液置換

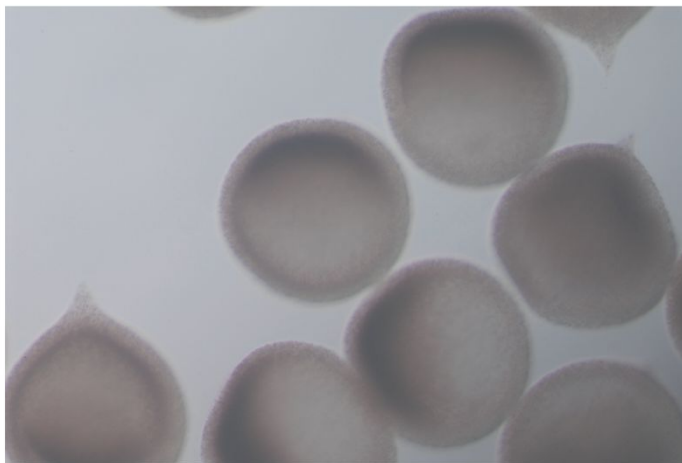
アルギン酸マイクロカプセルは、懸濁されている溶液中との間で低分子性の溶質は速やかに移

動できる。このため溶液置換自身は容易であるが、ピペッティングの際に微小なマイクロカプセルを失わないように溶液交換を行うことは困難が伴う。そこでマイクロカプセル中に磁気ビーズを同時に封入し、磁石を使ってマイクロカプセルを保持することで容易に溶液置換を行える系の実現を試みた。

4. 研究成果

本研究では bisulfite 反応と PCR を同一のアルギン酸マイクロカプセルで行うことを目的としている。このため実際にアルギン酸マイクロカプセル中で PCR が可能であることが必須である。これまでの先行研究でアルギン酸マイクロカプセル中での PCR の報告があるが、実際に PCR 反応液中にアルギン酸を加えて反応を行うと強い反応の阻害が認められることが明らかとなった。そのため、アルギン酸中の不純物の除去の方法を複数検討した結果、アルギン酸ナトリウム(Sigma)溶液に2倍容のエタノールを加えることでアルギン酸を沈殿させることができ、同時に低分子性と考えられる PCR 反応阻害活性を除去できることを見出した。また、このようにして粗精製したアルギン酸は 0.5 % まで PCR 反応液 (ExTaq, TaKaRa) 中に加えても反応を阻害しないこと、0.5 % でも十分にマイクロカプセルを生成できることを確認できた。

アルギン酸マイクロカプセルの生成については Maeda らの手法に従って遠心機を用いてマイクロチューブの中に入れた塩化カルシウム溶液にアルギン酸溶液を滴下する手法での調製を試みた。結果として安定的にマイクロカプセルの作成が可能であったが、マイクロカプセルの大きさを自由に調節することが困難であった。そこで微量吐出用のデバイスを用いてマイクロカプセルの作成を試みたところ、液滴の滴下は可能なものの塩化カルシウム溶液の中に液滴が単独で浸漬せず、望む形でのマイクロカプセル化はできなかった。そこで、様々な条件検討を行った結果、アルギン酸溶液の中に磁気ビーズを懸濁し、これを磁気スタンドに立てたマイクロチューブに入れた塩化カルシウム溶液に滴下することで、良好なマイクロカプセルを生成する条件を見出した。また、用いた微量吐出用のデバイス PJK-200H は 10 nL 程度から 80 nL 程度までほぼ自在に吐出量を調製することが可能であるため、マイクロカプセルの大きさのコントロールが可能となった。さらに、磁気ビーズを DNA と同時にマイクロカプセルに封入することで、マイクロカプセルの溶液交換も磁気スタンドを用いて容易に行うことが可能である。



生成した磁気ビーズを含む 80 nL のアルギン酸マイクロカプセル

さらに、上述の 0.5 % アルギン酸溶液で作成したマイクロカプセルは標準的な bisulfite 反応の条件 (幸田尚、実験医学 24(12), 1793-7, 2006) でも形状を保持できること、100 bp 以上の 2 本鎖 DNA は 30 サイクルの PCR 条件で温度を上下させても形状を保持し、また DNA の漏出もないことが確認できた。また、実際ゲノム DNA をマイクロカプセルに封入し、bisulfite 変換、PCR による増幅が可能であることを明らかにした。また、これらの反応後に EGTA などのキレート剤を使ってマイクロカプセルを温和な条件で溶解し、DNA を回収することも容易であることを確認できた。

以上のように、アルギン酸マイクロカプセルに DNA を封入し、bisulfite 反応とそれに続いて PCR をマイクロカプセル中で行うことができる実験系を確立することができた。これによって 1 分子単位で bisulfite 反応の反応条件を詳細に検討するための基礎的な条件が整ったと言える。また、比較的容易に単一細胞をマイクロカプセルに封入し、DNA を失うことなく bisulfite 反応を行うことができるため、アガロースビーズへの封入より容易に単一細胞の bisulfite 処理を行うことが可能となった。

現在、主要な研究成果について論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~tkoda/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。