

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14745

研究課題名(和文)細胞が組織に占める位置情報を保持したままエピゲノム情報を可視化する方法の開発

研究課題名(英文)in situ Visualization of Chromatin State

研究代表者

佐々木 保典(Sasaki, Yasunori)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：30312242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、個々の細胞のエピゲノム情報を、それらが組織に占める位置情報を保持したまま可視化する方法の開発を行った。特定の遺伝子座(NEAT1)上で形成される核内構造体の構成タンパク質とNEAT1転写開始上流域との相互作用の検出に成功した。一方、標的ゲノムとそのゲノム領域に結合するタンパク質との相互作用の検出では、オリゴDNAプローブによる標的ゲノム認識法が開発途上で、最終的な目標である1分子対1分子の相互作用を検出するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：in situ Visualization of Chromatin States, is a method with which chromatin immunoprecipitation data of choice are faithfully mapped onto its original location on the tissue source with a single-cell resolution. As a proof-of-principle we detected a protein-DNA interaction between a nuclear protein NONO and the upstream region of NEAT1 loci. NONO is an essential component of nuclear bodies built on the NEAT1 loci, therefore the above result is quite acceptable.

We applied the method to determine the type of epigenetic modification of a protein bound to a genomic region of interest. We yet have reached an ultimate goal to detect such an interaction between single molecules, because we are still unable to steadily specify a target genomic region with oligonucleotide probes. Another improvement program is currently underway.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピゲノム情報 遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞において、遺伝子発現はその遺伝子発現制御領域のエピゲノム状態で規定される。そのため「標準エピゲノムマップ」が整備されてきた。マッピングは、クロマチン免疫沈降(ChIP)法などによる。これらのデータは、大部分の細胞に共通するエピゲノム状態が平均化されたもので、個々の細胞の状態を忠実に再現しているわけではない。実際に、生体組織はエピゲノムの観点からみてヘテロな細胞集団から成り、プロモーター近傍のクロマチン修飾を調べると、隣接する細胞核間で頻りに差異が認められる。申請者も、アフリカツメガエルの神経管発生においてその例に直面し新規方法論開発の必要性を痛感した。

2. 研究の目的

(1) 初期胚では、ごく少数の細胞がエピゲノム動態に影響を及ぼし発生・分化が進行する。細胞間の機能的多様性を生み出す機構を理解するには、形態を保持した組織上で個々の細胞のエピゲノム動態を可視化する1細胞解析が有効と考え、その方法を開発する。すなわち、遺伝子の発現制御領域と特異的結合蛋白質との相互作用の有無を、細胞核ごとにマップする作業を、多種多様な相互作用について繰り返す方法論、in situ Visualization of Chromatin State(iViChS)法を開発する。

(2) 標的 DNA 領域と結合蛋白質の相互作用を同定する際に、ChIP 法では細胞を破碎しクロマチンを断片化するので、組織形態と核内空間の情報が失われる。iViChS 法では、形態情報を保持した細胞・組織サンプルにおいて、標的 DNA 領域と結合蛋白質を別々に抗体で認識し、抗体ペアが近傍にある時だけ検出し、核内に占める位置をマップする。その方法は既存技術の転用で、新技術開発に要する時間と労力を大幅に省く。それ故コンセプト実証後、速やかに様々な発生学上の問題解決に活用できる。本研究の提案する方法論の真骨頂は誰でも導入可能な簡便さにある。複数の抗体ペアを同時に検出する方法論と試薬開発は本研究の次のフェーズで、じっくり時間を

かけて行う。

3. 研究の方法

iViChS 法は、次の3つのステップからなる。

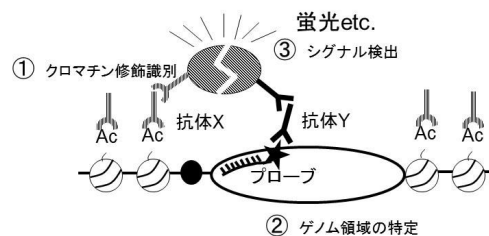
クロマチン修飾あるいはDNA結合因子が結合したゲノム領域の認識

標的ゲノム領域の限定

Coincidence detection: との部位が近接している場合に限定したシグナル増感・検出

それぞれのステップについて試薬や反応条件等を最適化し、iViChS 法の方法論を確立する。

下図を用いて、iViChS 法を、標的プロモーター近傍のクロマチンが活性化状態にある例で説明する。



Coincidence detection: 以下の条件を満たした場合のみシグナル生成。
→クロマチン修飾を識別する抗体Xと、ゲノム領域を特定する抗体Yとが、ごく近傍にある。

アセチル化ヒストン修飾を、ウサギ ChIP 用抗体 X で認識する。続いて標的プロモーター領域に対して、ハプテン標識プローブを用いた DNA ハイブリダイゼーションを行い、マウス抗ハプテン抗体 Y で限定する。こうして、ゲノム上にはウサギ抗体 X が複数箇所に、マウス抗体 Y がプロモーターに対応する2箇所だけに結合する。最後に二種類の二次抗体(抗ウサギ抗体、抗マウス抗体)によって、ウサギ抗体 X とマウス抗体 Y とをそれぞれ認識する。異なる二次抗体が近傍にある場合のみシグナルを生成するように工夫して、標的部位のエピゲノム状態のみを核内に高い S/N 比でマップする。この要請を満たす試薬として Olink 社の DUO Link PLA Kit を見出した。これを使うと、二次抗体同士が 50 nm 以内にある部位に限局してシグナル増幅反応が進み、蛍光物質が蓄積されることが期待される。

4. 研究成果

以下、研究の方法で述べた iViChS 法の 3 つのステップ番号 ~ に対応して、研究結果を述べる。概念実証実験など順次検討を加えたので、必ずしも番号順にはなっていない。

Coincidence detection の概念実証実験
標的ゲノム領域-結合蛋白質相互作用検出用に coincidence detection 条件を最適化する
クロマチン修飾あるいは DNA 結合因子が結合したゲノム領域と 標的ゲノム領域の部位が近接している場合に限定したシグナル増感・検出が本法の最も重要な点である。まずこれが既存の製品で達成可能であるかを検証した。

核内 DNA・RNA 結合蛋白質 SFPQ、NONO は共に核内構造体パラスペックルの構成因子とし知られており、構造体中でヘテロダイマーを形成する。ウサギ抗 SFPQ 抗体とマウス抗 NONO 抗体を用いて DUO LINK PLA キットの有効性を確認できた。通常の蛍光抗体二重染色では、両タンパク質のシグナルが核質全体に分布すると同時に、明瞭な輝点(パラスペックル)において共局在することが示される。一方、coincidence detection によりごく近傍にあるタンパク質のみを検出すると、それらのシグナルは両タンパク質が共局在するパラスペックルに局限し、核質からは全く検出されなかった。なお、一次抗体のうち抗 NONO 抗体を欠くコントロール実験では、シグナルは全く検出されなかった。

この結果は単色光で両蛋白質の共局在性を示すことができることに加え、共免疫沈降法の結果を細胞核内にマップしたと言え、生化学データと組織学データの統合を端的に示している。加えて、画像の S/N 比が良く、自動読取り解析によるデータの大規模集積に適する。従ってハイスループット化への移行が容易である。これらの coincidence detection の特性は、エピゲノム状態マッピングに転用可能である。

標的ゲノム領域を限定する方法(プローブ)の検討

標的ゲノムの特定と Coincidence

detection の組み合わせ

複数のタンパク質同士の相互作用を検出する条件が設定されたのをうけ、核酸とタンパク質との間の相互作用検出について検討した。ここでは核内構造体パラスペックルの構成 RNA である NEAT1 ノンコーディング RNA と NEAT1 に直接結合するタンパク質 NONO との相互作用検出を試みた。RNA の検出は一般的な蛍光 insitu ハイブリダイゼーション法で行う。これは、RNA に相補的な RNA プローブをジゴキシゲニン(DIG)で標識し、標的 NEAT1 RNA とハイブリッドを形成後、最終的には抗 DIG 抗体を用いてそのハイブリッドを検出する方法である。従って、相互作用の片方が核酸に代わっても、すでに決定した条件がそのまま使えると考えた。実際、問題なく NONO タンパク質と NEAT1 RNA との間の相互作用をみることができ、パラスペックル上に相互作用を示すシグナルを検出できた。

標的ゲノムの特定と Coincidence detection の組み合わせ(続き)

これまで、タンパク質間相互作用とタンパク質-RNA 間相互作用の coincidence detection に成功したが、これらはいずれも多分子対多分子の相互作用であり、1分子と1分子の相互作用を検出する場合と比べて、抗体の認識反応やその後の複合体形成、検出反応にきわめて有利な条件といえる。そこで、標的ゲノムとそこに結合するタンパク質との1分子と1分子の相互作用を検出する前に、ゲノム1箇所と複数のタンパク質との間の相互作用検出を試みた。パラスペックルは、NEAT1 座位から nascent NEAT1RNA が転写されると、その場で NONO をはじめとする構成タンパク質と複合体形成を行い、NEAT1 座位上に構築されることが知られている。そこで、NEAT1 座位を認識する 500bp の DIG 標識プローブと NONO との間の相互作用検出を試み、成功した。ただし、このプローブは十数個の DIG 分子で標識されており、相当する数の抗 DIG 抗体が結合すると考えられるので、厳密には1分子と多分子の相互作用とは言えない。

標的ゲノムの特定と Coincidence

detection の組み合わせ (続き)

ある特定ゲノム領域に結合するヒストンのエピゲノム修飾を決定するためには標的ゲノム領域を可能な限り狭める、クロマチン 1 個分 140 ~ 170bp 程度の解像度で識別できることが肝要であると考え、オリゴ DNA プローブ、実際には Locked Nucleic Acid(LNA) プローブに切り替えて標的ゲノム領域の特定を試みた。NEAT1 座位と NONO との間の相互作用を示すシグナルは本来であれば、核当たり 2 箇所であるはずが、10 箇所前後検出された。抗 NONO 抗体の認識箇所は核全体にわたり、無数にあることを考慮すると、LNA プローブによってシグナルの数が規定されているのだろう。本来の NEAT1 座位に由来するシグナルに加えて、非特異的認識によるものが余剰シグナルとしてカウントされている。あるいは、NEAT1 座位以外において、これまで知られていない LNA プローブで認識されるゲノム領域と NONO との相互作用があるのかもしれない。その可能性としては、NONO が DNA 結合因子としてプロモーターに結合している可能性。また、条件検討に用いた HeLa 細胞において、しばしばパラスペックルが小さく分割して核内に 10 個以上存在する、その状態を反映した結果である可能性がある。

今回使用した LNA プローブの長さは 21mer で、同じ長さの DNA プローブよりむしろ高い特異性を有する。プローブの 5' 末端に DIG が共有結合しており、プローブ分子を抗 DIG 抗体一分子が認識し、PLA キットにより十分にシグナルが増幅されていることは今後期待をもたせる。

このことから、問題は LNA プローブを用いたハイブリダイゼーションによる標的ゲノム特定の段階そのものにあると考えられるので、ここを重点的にさらなる条件検討を行っている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] なし

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 保典 (SASAKI, Yasunori)

産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号 : 30312242

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

()