

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03084

研究課題名（和文）単一細胞・ゲノムアレイによるエピゲノム解析

研究課題名（英文）Epigenome analysis on an array device for single cell / genome

研究代表者

栗田 僚二（KURITA, RYOJI）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：50415676

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：DNA中に含まれるシトシン5位の化学修飾（エピジェネティクス）を迅速に計測可能な手法と材料、デバイスを開発した。ナイトロジェンマスタード骨格を有するリンカー剤を創成し、DNAを滴下するだけで簡便、かつ、強固な固定を可能にした。マイクロ流体デバイスや微小集積化アレイデバイスを合わせて開発し、微量DNAに含まれるシトシンバリエーション（シトシンのメチル化、ヒドロキシメチル化、ホルミル化、カルボシ化）の迅速かつ網羅的解析に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題により、単一ゲノムレベルでDNA中に含まれるシトシン塩基の様々な化学修飾の計測が可能になってきた。多数の正常メチル化細胞集団の中に僅かに含まれる異常メチル化細胞の検出や、CTC検出などの早期がん診断、単一細胞レベルでのリプログラミングや分化誘導評価などにも寄与できると考えており、今後の展開を模索したい。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method, materials, and devices that enable rapid measurement of chemical modification at the 5-position of cytosine contained in DNA (epigenetics). Linker molecules with a nitrogen mustard were developed in order to perform simple and robust immobilization simply by dropping DNA sample. A microfluidic device and a micro-integrated array device were also developed, we succeeded in rapid and comprehensive analysis of cytosine variants (methylation, hydroxy methylation, formylation, carboxylation) contained in small amounts of DNA sample.

研究分野：分析化学

キーワード：エピジェネティクス マイクロデバイス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA 中に含まれるシトシン 5 位のメチル化による後天的遺伝子発現の変化 (エピジェネティクス) がガン、精神疾患、生活習慣病等の多くの疾病に関与していることが明らかになり、詳細な解析が進められている。エピジェネティックな遺伝情報に関するデータベースは構築されつつあるものの、その制御機構について細胞ごとに違いがあるのか、また何らかの規則性があるのか等、その実態は未だ不明のままである。このメカニズムを解明するためには、個々の細胞・ゲノムレベルでの網羅的解析を行う必要がある。

これまでエピジェネティクス解析に用いられてきたメチル化特異的 PCR やパイロシーケンシング法では、 10^6 個程度の細胞集団として平均化されたシトシンのメチル化率が測定されてきた。このため、例えば正常なメチル化細胞集団の中に、メチル化率が異常に高い (或いは低い) 細胞が僅かに存在していたとしても、多数の正常細胞に平均化されてしまいメチル化異常を検出することは困難である。一方、細胞個別の定性的なメチル化解析としては、バイサルファイトーシーケンシング法が知られている。これは、測定対象 DNA をバイサルファイト処理後に、解析対象領域を PCR 増幅し、クローニングしてシーケンス解析を行う方法である。しかしながら、クローニング作業の繁雑さ (制限酵素処理、ライゲーション、大腸菌への形質転換、コロニー形成、インサートチェック、培養、プラスミド精製) から、既報論文では 10 個程度のクローンで議論されているものが多く、網羅的解析にはほど遠い。クローニングによる細胞解析を数千~数万細胞レベルで行うのは現実的でなく、加えて、PCR の増幅率や形質転換効率がメチル化状態によりバイアスがかかっている可能性も否めない。そこで本研究課題では、DNA 中に含まれるシトシン塩基の様々な化学修飾を、単一ゲノムレベルでハイスループット検出する基盤技術の開発を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、単一ゲノムレベルの DNA の化学修飾を一括計測可能な分析手法・材料、デバイス提案し、細胞集団内のエピジェネティックな揺らぎを明らかにすると共にメチル化異常を有する単一細胞検出に資する技術開発を行うことである。細胞から抽出したゲノム DNA からシトシンのメチル化とヒドロキシメチル化の免疫化学的計測までをすべて室温、中性溶液で行うことでインタクトなゲノム DNA の情報を得る。これによりクローニングすることなく、個々の細胞のメチル化情報を数千~数万細胞単位で一括計測することが可能になる。さらに統計解析によって、エピジェネティックなデータから多数の正常細胞に含まれる僅かな異常メチル化細胞を検出につなげる。

本申請課題の免疫化学的なエピゲノム解析の最大の長所として、クローニングとバイサルファイト反応不要である事が挙げられる。バイサルファイト反応は、シトシンはウラシルに変換されるがメチルシトシンは変換されないという特徴を利用するものである。短所として、バイサルファイト反応ではその過激な反応条件 (低 pH と高温) からインプット DNA の 99% 以上が分解されていることが RT-PCR 法により確認されており、微量ゲノムへの適用には根本的な問題がある。本申請課題で提唱する免疫化学的アプローチでは、温和な条件 (中性、室温~37°C) ですべての反応が完結する。そのためゲノム DNA へのダメージを抑えることができ、単一細胞レベルでのエピゲノム検出も可能になると考えられる。

3. 研究の方法

室温、中性溶液中で速やかに基板上へゲノム DNA を捕捉可能なリンカーとして、マスタードガス骨格を有する分子について検討を行う。マスタードガスは、DNA 中に含まれるグアニンのアルキル化剤として知られ、抗がん剤などへの応用も研究されている。しかしながら、強毒性で水溶性に乏しいため、マスタード構造そのままでは DNA リンカーとして用いるには不向きである。そこで、硫黄を窒素に置換したナイトロジェンマスタード構造について検討を行う。配列特異性に依存するハイブリダイゼーションを用いることなく、化学的に DNA を基板に固定化する本試薬の開発は、ゲノム DNA の解析に不可欠である。

図 1 に本課題で合成、検討するリンカー構造について示す。リンカーは、DNA 中のグアニンと結合する架橋部位 (ナイトロジェンマスタード, NM) と金基板への固定化部位 (環状ジスルフィド)、これらを繋ぐ親水性リンカー (トリエチレングリコール) を有する。DNA 中に存在するグアニンの N-7 位は求核性が高く、ナイトロジェンマスタードが結合、さらにグアニン同士を架橋し安定化する。このようなナイトロジェンマスタード骨格リンカーをトリエチレングリコールを介して金基板へ固定化する。なお、金基板への結合部位に関し、汎用されるチオールではなく、ジチオール構造を採用する。ジチオールと金との結合は、従来のチオールとの結合に比べ安定性が 200 倍以上であることが報告され、ゲノム DNA の安定的な固定化に適していると考えた。

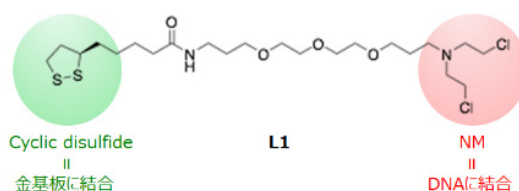


図 1 DNA を金基板上へ固相化する、新規合成するリンカー構造

新規リンカー剤を介して DNA を固定化した後、シトシンの化学修飾に対応する抗体を導入し、その抗体の結合量から DNA 中に含まれる化学修飾の量を表面プラズモン共鳴法や蛍光顕微鏡で計測することを計画した。

4. 研究成果

まず、ゲノム DNA を基板上へ効率的に捕捉するために、図 1 に示すナイトロジェンマスタード骨格を有するリンカー剤を合成した (*Chemical Communications*, 2017, 53, 8308)。オリゴ DNA とリンカー分子を中性溶液中で混合し、変性ポリアクリルアミド電気泳動で評価した結果、95%以上の二本鎖 DNA がリンカー分子に架橋されたことを確認した (図 2)。次に、表面プラズモン共鳴測定装置 (Biacore) を用いて架橋オリゴ DNA の固定化を行った結果、架橋オリゴ DNA を速やかに基板上へ固定化することに成功した (図 3)。本申請課題の固定化技術によって、DNA を基板上へ送液するという単純操作で速やかに固定化可能である。有機溶媒が不要であり、かつ、室温で固定化できることは、容易な分析手技に繋がる。また、マイクロ流路などの強いせん断応力によっても外れることがないことを確認した。これは、我々の固定化が共有結合によって安定に行われているためである。

メチル化率の異なる短鎖オリゴ DNA を固定化し、さらに抗メチルシトシン抗体を送液したところ、固定化 DNA のメチル化率に比例して抗体の結合量が増加することを明らかにした (図 4)。同様の実験を λ DNA を用いて行った結果、リンカー分子による架橋・送液による DNA の固定化・抗体によるメチルシトシンの検出がすべて可能であった。シーケンスに依存せず、速やかに固定化であることを実証した。

本研究課題で開発したリンカー修飾基板を用いることで、メチル化のみではなく、様々なシトシン 5 位の化学修飾をシーケンシャル検出することが出来る。マイクロ流体デバイス内に DNA を固定化後、抗メチル化-、抗ヒドロキシメチル化-、抗ホルミル化-、抗カルボキシ化-シトシン抗体を導入することで、各々の修飾量を定量可能であった。メチルシトシンを酸化し、脱メチル化に関与すると考えられている TET1 酵素により、徐々にメチルシトシンの酸化が進行することを確認することも出来た (図 5)。アルカリ洗浄によっても脱離することなく、強固に DNA を固定化することが出来るため、同一 DNA を対象にシーケンシャルな繰り返し計測を実現した (*Analytical Chemistry*, 2019, 91, 13933)。

上述したフルイディクス解析のみでなく、DNA をアレイ状に固定化した蛍光・吸光アレイ解析へ展開した。市販 96 ウエルアレイ、及び、微細加工技術によるオリジナルの微小集積化チップを創成し、抽出したゲノム DNA を滴下するだけでゲノム DNA アレイを構築した。その後、抗 DNA 抗体や抗メチルシトシン抗体によるメチル化解析を行った (*Analytica Chimica Acta*, 2018, 1043, 107)。ゲノム DNA の検出に関して、まずはゲノム全長が均一な λ DNA をモデル試料として用い、DAPI などの蛍光染色や蛍光色素を標識した抗メチルシトシン抗体、さらには抗ヒドロキシメチルシトシン抗体での多重染色を行い、落射型正立蛍光顕微鏡観察により、単一ゲノム DNA が捕捉される条件を求めた。その結果、金基板上に単一ゲノムレベルで蛍光顕微鏡観察できることを確認することができ、さらに抗メチルシトシン抗体で染色することによって単一ゲノムでのメチル/非メチルゲノムを見分けることに成功した。本結果は、単一細胞由来のゲノム DNA の化学修飾を一括計測可能な分析手法として重要な基盤技術となる。

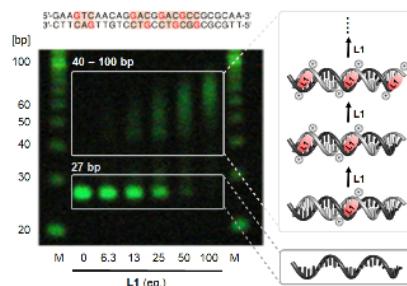


図 2 リンカー剤と DNA の反応性確認結果

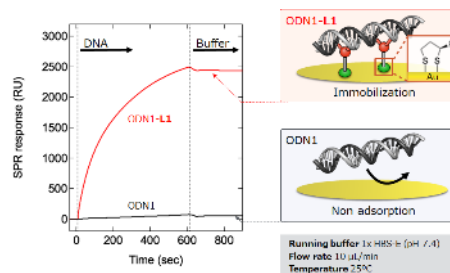


図 3 合成したリンカーを用いた DNA の基板上への捕捉。中性溶液、室温で速やかに固定可能。

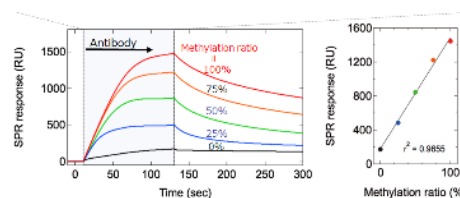


図 4 抗メチルシトシン抗体によるメチル化率の計測結果

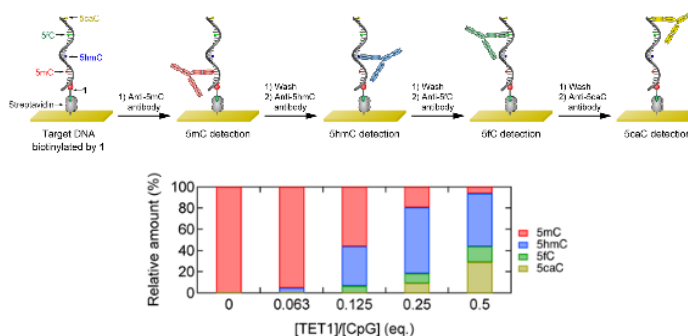


図 5 各抗体と洗浄液を交互に導入するだけで、全シトシンバリエーションを計測可能

さらに、微細加工技術により金薄膜で形成されたマイクロアレイチップを構築した(図6)。リンカー剤を介して当該チップ上へゲノム DNA を滴下することで、ゲノム DNA アレイを数十 μm ピッチで簡便に作成できることを確認し、さらに蛍光標識した抗 DNA 抗体/抗メチルシトシン抗体/抗ヒドロキシメチルシトシン抗体での多重染色を行い、蛍光顕微鏡観察により固定化された DNA の観察を行った。

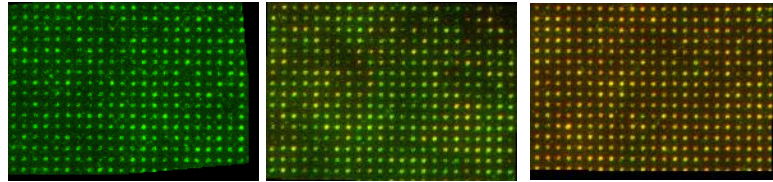


図6 λ DNA を金アレイ基板上へ固定化し、その後、蛍光標識した抗メチルシトシン抗体でアレイ一括計測した例。左；非メチル化、右；メチル化、中央；50%メチル化(0%と100%の混合)。

異なるメチル化率を有するオリゴ DNA, λ DNA において、メチル化の差異を明瞭に観察することができ、エピジェネティックな化学修飾の変化の一括計測を実現した(図6, 7)。メチル化率のみならず、ヒドロキシメチル化率においても、良好に識別可能であることも実証できた(図8)マウスから抽出したゲノム DNA を計測したところ、脳におけるヒドロキシメチル化率が高値であることも確認でき、その有効性を実証することが出来た(図9)。

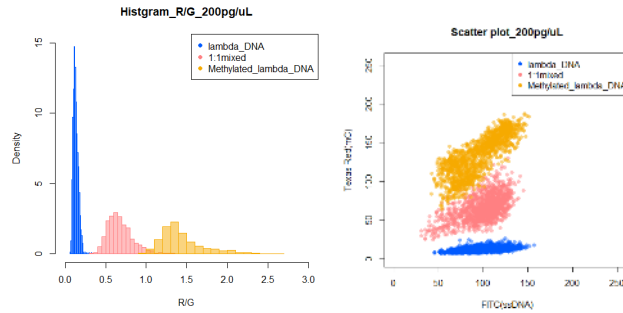


図7 図6の結果をヒストグラム解析した結果。メチル、非メチルを判別可能であることが判る。

総括として、本申請課題で開発した技術はエピゲノムのハイスループット解析を実現するために、バイサルファイト反応不要、かつ、クローニング不要であることの寄与が大きい。単一ゲノムのバイサルファイト反応は技術上困難なため、我々は免疫化学的なアプローチを選択している。ゲノム DNA の分解を最小限に留めることが出来るため、極微量のエピゲノム解析に有効である。本申請課題により、単一ゲノムレベルでのシトシンの様々な化学修飾の計測が可能になってきた。多数の正常メチル化細胞集団の中に僅かに含まれる異常メチル化細胞の検出や、CTC 検出などの早期診断、単一細胞レベルでのリプログラミングや分化誘導評価などにも寄与できると考えており、今後の展開を模索したい。

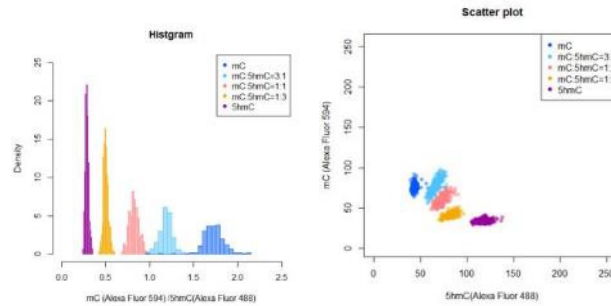


図8 抗メチルシトシン抗体、抗ヒドロキシメチル抗体による二重染色による計測結果

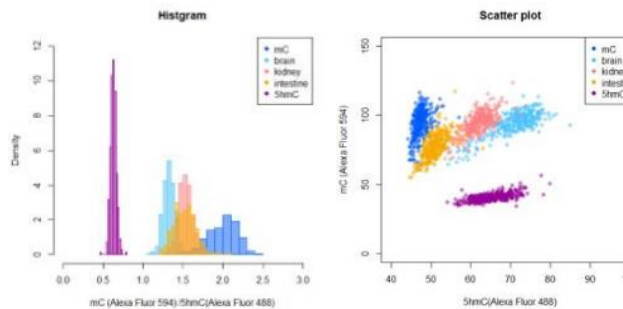


図9 マウスの脳、腎、小腸細胞由来のゲノムを用いて、メチル化率、ヒドロキシメチル化率を求めた結果。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sugai Hiroka, Tomita Shunsuke, Ishihara Sayaka, Kurita Ryoji | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 One-Component Array Based on a Dansyl-Modified Polylysine: Generation of Differential Fluorescent Signatures for the Discrimination of Human Cells | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ACS Sensors | 6. 最初と最後の頁 827 ~ 831 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssensors.9b00247 | 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 - |
| 1. 著者名 Tomita Shunsuke, Ishihara Sayaka, Kurita Ryoji | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Biomimicry Recognition of Proteins and Cells Using a Small Array of Block Copolymers Appended with Amino Acids and Fluorophores | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces | 6. 最初と最後の頁 6751 ~ 6758 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsam.8b18118 | 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 - |
| 1. 著者名 Kojima Naoshi, Suda Tomomi, Kurinomaru Takaaki, Kurita Ryoji | 4. 巻 1043 |
| 2. 論文標題 Immobilization of DNA with nitrogen mustard?biotin conjugate for global epigenetic analysis | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta | 6. 最初と最後の頁 107 ~ 114 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2018.09.008 | 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 - |
| 1. 著者名 Yoshioka Kyoko, Kurita Ryoji | 4. 巻 90 |
| 2. 論文標題 N6-Methylation Assessment in Escherichia coli 23S rRNA Utilizing a Bulge Loop in an RNA?DNA Hybrid | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Chemistry | 6. 最初と最後の頁 7578 ~ 7582 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.8b01223 | 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 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Kurinomaru Takaaki、Kojima Naoshi、Kurita Ryoji | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 An alkylating immobilization linker for immunochemical epigenetic assessment | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Chemical Communications | 6. 最初と最後の頁 8308 ~ 8311 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CC02883K | 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 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Kurinomaru Takaaki、Kojima Naoshi、Kurita Ryoji | 4. 巻 77 |
| 2. 論文標題 Immobilization of DNA on Biosensing Devices with Nitrogen Mustard?Modified Linkers | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry | 6. 最初と最後の頁 e85 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpnc.85 | 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12件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件)

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 栗田僚二 |
| 2. 発表標題 マイクロデバイスによるメチル化DNAの迅速分析 |
| 3. 学会等名 CBI学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 栗田僚二 |
| 2. 発表標題 マイクロデバイスによるDNAの化学修飾分析 |
| 3. 学会等名 高分子学会有機エレクトロニクス研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 やわらかさを活かした生体分子計測 |
| 3. 学会等名 つくばソフトマター研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takaaki Kurinomaru, Naoshi Kojima, Ryoji Kurita |
| 2. 発表標題 Immunochemical Sensing of Epigenomic Modification Using An Alkylating Immobilization Linker |
| 3. 学会等名 The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry / The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗田 僚二, 栗之丸 隆章, 小島 直 |
| 2. 発表標題 エピゲノムのオンチップ分析に向けたアルキル化リンカーの創成 |
| 3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第36回研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ryoji Kurita |
| 2. 発表標題 Electrochemical Assessment of Cytosine Methylation using a Carbon Film Electrode |
| 3. 学会等名 The Sixteenth International Symposium on Electroanalytical Chemistry (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小島 直、須田 友美、栗之丸 隆章、栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 Immunochemical Assessment of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine Using Nitrogen Mustard Modified Linkers |
| 3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, The 3rd Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 Development of New Material and Device for Biomolecular Analysis |
| 3. 学会等名 4th International Conference on Nutraceuticals and Chronic Diseases (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 エピゲノムの迅速分析に向けた材料創成とマイクロデバイス化 |
| 3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 Electrochemiluminescence derived from Surface Accumulable Co-reactant for Biomolecular Determinations |
| 3. 学会等名 17th ISEAC & 3rd ECL (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 栗田 僚二 |
| 2. 発表標題 特異 / 非特異プローブによるマイクロフルイディクスでの生体分子検出 |
| 3. 学会等名 JASISカンファレンス (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Benediktus Nixon Hapsianto, 小島 直、栗田 僚二、Hitoshi Yamagata, Hiroyuki Fujita, Teruo Fujii, Soo Hyeon Kim |
| 2. 発表標題 NITROGEN-MUSTARD COATED MAGNETIC BEADS FOR HYBRIDIZATION AND ELUTION-FREE CIRCULATING TUMOR DNA DETECTION |
| 3. 学会等名 MicroTAS 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>ナノバイオデバイス研究グループ https://unit.aist.go.jp/bmd/biomed-nbd/</p> |
|---|

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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 小島 直 (Kojima Naoshi) (30356985) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626) | |

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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 吉岡 恭子 (Yoshioka Kyoko) (50358321) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626) | |
| 研究分担者 | 富田 峻介 (Tomita Shunsuke) (50726817) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626) | |
| 研究分担者 | 栗之丸 隆章 (Kurinomaru Takaaki) (50769693) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 員 (82626) | |