

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02591

研究課題名（和文）エピゲノム理解を目指した1分子レベル・クロマチン凝縮プロファイル動態解析技術開発

研究課題名（英文）Development of technology to analyze dynamics of chromatin folding profiles at the single molecule level for understanding epigenome

研究代表者

小穴 英廣 (Oana, Hidehiro)

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） 13,900,000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て穏やかに解きほぐし、マイクロ流路中に設けた微細構造に解きほぐした染色体の両端を固定する技術を開発した。この技術をマウス由来のES細胞に適用し、染色体の脱凝縮はクロマチンに沿って一様には起こらず、解けやすい領域と解けにくい部分が共存していることを確認した。次いで、この部分的に解き解れた染色体に対して、ヒストン化学修飾に対する免疫蛍光染色を行った。そして、転写開始領域に集積している化学修飾部と染色体が脱凝縮している部分とが一致している領域があることを蛍光顕微鏡を用いた1分子観察により確認した。

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を取り出し、これを解きほぐして張力が均一な直線状の形態に保持する事を実現した。これにより、クロマチン折り畳みの動態やヒストン化学修飾の分布を精度良く光マッピングすることが可能となる。本技術を用いたクロマチン解析を更に進めて画像データ蓄積・解析する事によりエピジェネティクスについての理解が深まり、病気の診断や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 developed a technique to isolate and unfold chromosomes from a single targeted mammalian-derived cell under a microscope in a microfluidic device, and fix the ends of the unfolded chromosomes to microstructures in microfluidic channels. This technique was applied to mouse-derived ES cells, and it was confirmed that chromosome unfolding does not occur uniformly along the chromatin, and that regions of easy unraveling and regions of difficult unraveling coexist. The partially unfolded chromosomes were then subjected to immunofluorescence staining for histone chemical modifications. The coincidence of one of the modifications accumulated in the transcription start region and the unfolded region of chromosome was visualized by single-molecule observation using a fluorescence microscope.

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 クロマチン 染色体 エピジェネティクス

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。この後天的な作用によって、ヒトの場合、約 2 万あるといわれている遺伝子の内の一部だけが働くように調整され、特定の機能を持った約 200 種類の細胞へと分化している。エピゲノム情報 (即ち、どの遺伝子が読み出されるかに係わる、DNA やヒストンの化学修飾のパターンの情報) 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、化学修飾を受けた DNA やヒストンのゲノム DNA 上での分布情報を取得する一般的な手法においては、試料細胞から取り出したゲノム DNA を数百 bp 程度以下の長さに断片化してからそれらの塩基配列を読み取ることで達成されている。従って、元の長さが数十 Mb 以上にもなる DNA において顕在化する DNA の凝縮/脱凝縮 (転写を行う RNA ポリメラーゼのアクセシビリティに関わる重要なエピジェネティック情報のひとつ) 部分の分布や、そのダイナミックな変化についての情報を得ることは、原理的に困難である。つまり、細胞内のゲノム DNA が本来持っている高次の折り畳み構造に関する情報取得が可能なエピジェネティクス解析法は、まだ発展段階にあり、化学修飾と高次構造との相関については、十分理解されていないのが現状である。従って、1 細胞レベルで個々のゲノム DNA について調べる技術が実現すれば、「DNA 凝縮/脱凝縮の分布とその溶液条件に対応した動態、およびの DNA/ヒストンの化学修飾の分布との相関はどうなっているのか。そしてそれらはエピゲノム制御とどのように関係しているのか」といったエピゲノム制御機構についての理解が深まり、細胞の分化/脱分化やがんの研究に幅広く貢献できると考えられる。これが、本研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

溶液の塩濃度を生理的塩濃度よりも少し高くすると (数百 mM 程度)、静電相互作用が弱められた結果、染色体を構成しているタンパクの一部が解離をはじめ、染色体が穏やかに解きほぐれてくることが知られている。本研究においては、この染色体が穏やかに解きほぐれた際に観察される、クロマチンファイバーに沿った凝縮/脱凝縮部分の分布及びその動態とヒストンタンパクの化学修飾の分布との相関を 1 細胞・1 分子レベルで解析する手法の確立を目指す。そして、「DNA 凝縮/脱凝縮の分布とその溶液条件に対応した動態、およびの DNA/ヒストンの化学修飾の分布との相関はどうなっているのか。そしてそれらはエピゲノム制御とどのように関係しているのか」という問いに答えるための知見を得る。

3. 研究の方法

新奇マイクロ流体デバイス開発を通じた 1 細胞・1 分子レベル実験/リアルタイム観察により、染色体の周囲の「場 (溶液条件)」を変化させたときの、部分的に脱凝縮した染色体 (クロマチンファイバー) 上における凝縮部/脱凝縮部の分布とその動態を明らかにする。ここでは、同一のクロマチンに対して引き続きヒストンの化学修飾の分布についても調べる技術を構築し、クロマチンの高次構造とヒストンの化学修飾との相関についても明らかにする。以上を通じて本研究の目的達成を目指す。以下に、この実験の概略を示す (図 1)。

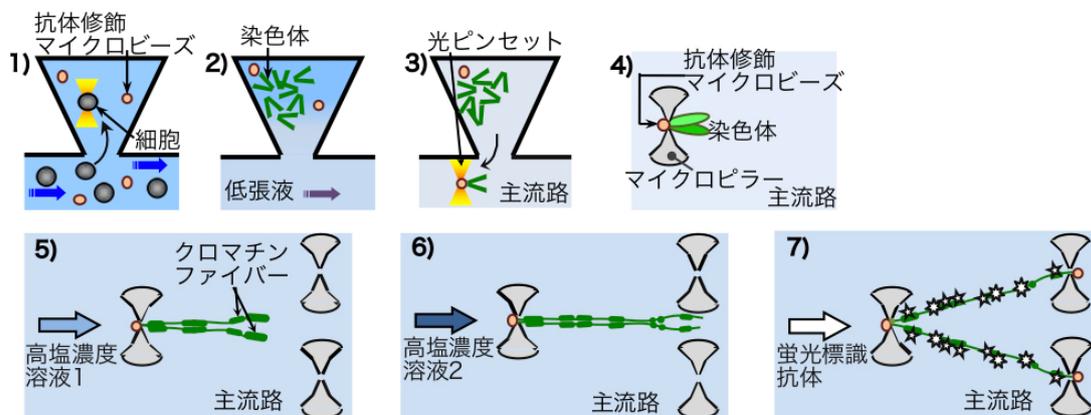


図 1: 実験概略図 (デバイスを上面から見たときの実験手順概略図)。1) マイクロポケットへの細胞導入。2) 低張液導入による細胞の破裂と染色体の放出・単離。3) 光ピンセットで抗体修飾ビーズを操作することによる染色体の捕捉と搬送。4) 主流路中のマイクロピラーのスリット間にビーズを挟むことによる染色体の係留。5, 6) 塩濃度を段階的に上げながら、凝縮/脱凝縮部分の動態観察。7) クロマチンファイバーの両端固定後、免疫蛍光染色により、特定の化学修飾を受けているヒストンの分布情報を取得する。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体デバイス開発

図2に、開発したマイクロ流体デバイスを示す。このデバイスは、主流路中に複数のマイクロピラーが設けられており、染色体の両端を固定可能な仕様となっている。これにより、張力が均一な条件下で直線状の形態のクロマチンファイバーを得られるため、クロマチンファイバーに沿った凝縮部/脱凝縮部や化学修飾を受けたヒストンの空間的位置情報を精度良く得られることが出来る。また、主流路中に導入する溶液の条件によって両端固定した染色体が解きほぐされて展開し、クロマチンファイバーが撓んでしまった場合には、下流側のクロマチン端部の固定位置を移動させ、再び張力が均一な直線状の形態を取らせることができる仕様となっている。実験の結果、下流側のマイクロピラースリット間に一旦固定したクロマチンファイバーの端部を、光ピンセット操作によって再び捕捉し、更に下流側のマイクロピラースリット間に移動させて再配置できることを実証した。

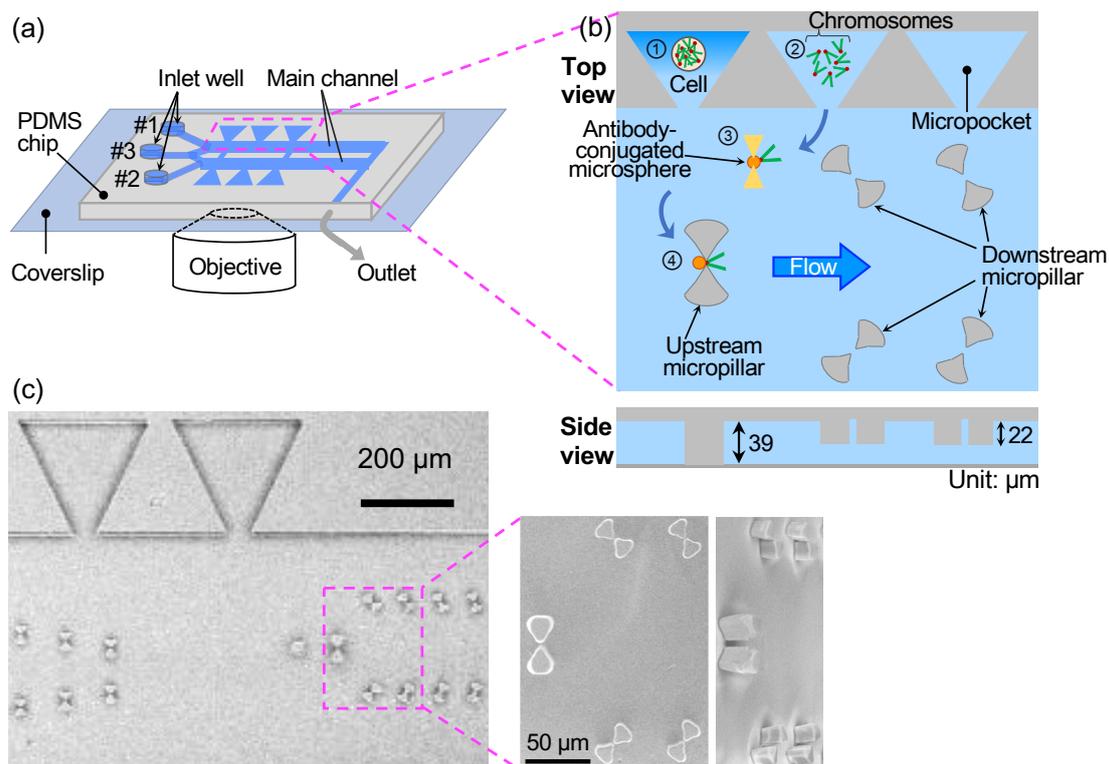


図2：実験デバイス概略およびマイクロ流路内のSEM画像。上流側のマイクロピラーに染色体の一端を係留し、下流側のマイクロピラーのいずれかに他端を係留し、基板から浮かせた直線状の形態でクロマチンを保持するという仕様になっている。

(2) DNA凝縮/脱凝縮の分布とその溶液条件に対応した動態

染色体を解きほぐして得た、断片化されておらず且つ部分的に凝縮した状態のクロマチンファイバーについて、凝縮部/脱凝縮部の分布が変化するかどうかを調べた。その結果、クロマチンはファイバーに沿って一様に解けるのではなく、解けやすい部分と解けにくい部分が共存しているという結果が得られた。この結果は、報告者等が分裂酵母由来のクロマチンファイバーを用いて行った実験の結果と共通している。本研究結果は、国際会議にて発表すると共に、ジャーナル論文に投稿中である。

(3) 染色体上のヒストンの化学修飾部に対する免疫蛍光染色

図3に、ヒストンH3のK27のアセチル化(H3K27ac)に対する抗体を用いた免疫蛍光染色の例を示す。抗H3K27ac抗体が集積している部分は、大部分がクロマチンが凝縮している部分であることが、DNAに対する蛍光色素(YO-PRO-1)の蛍光分布と比較することで確認された。その一方で、一部の抗H3K27ac抗体集積部分においては、DNAの凝縮度合いが低かった(図3下：赤色矢印)。

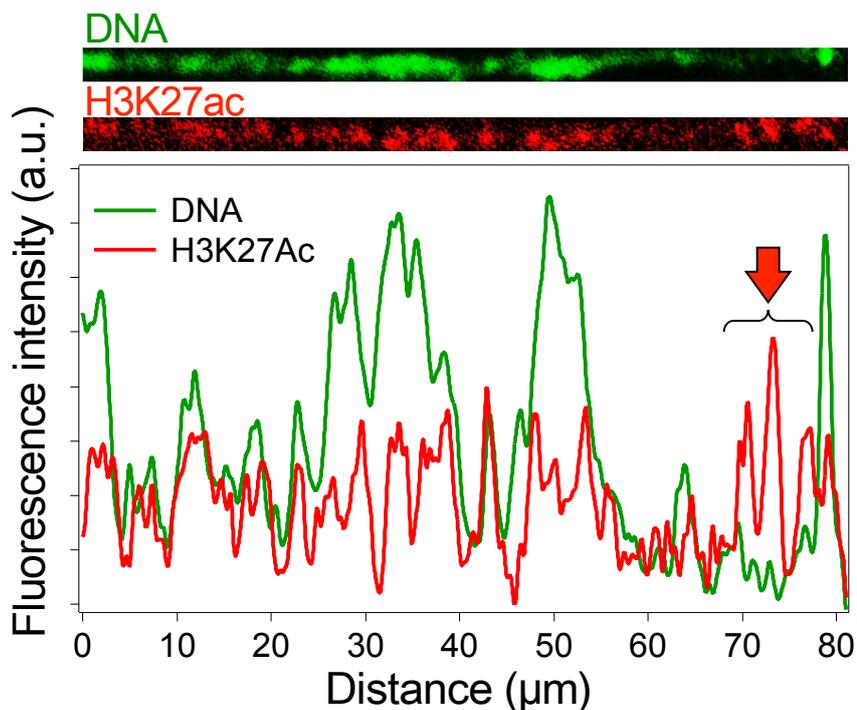


図3: クロマチンファイバーに対する免疫蛍光染色の例。上図: 免疫蛍光染色したクロマチンファイバーの蛍光顕微鏡像。下図: DNA (緑) 及び蛍光ラベル抗体 (赤) の蛍光強度プロファイル。

(4) 染色体の伸びと張力との関係

我々が構築した実験システムは、光ピンセットを用いてクロマチンファイバーの端部を操作する事から、操作時のクロマチンファイバーにかかっている張力を求めることができる。図4に、クロマチンファイバーを引き伸ばしているときのクロマチンファイバーの長さ、張力との関係を示す。引き伸ばし時の張力が単調に増加するのではなく、所々で増加に停滞が現れることを見出した (図4右)。この張力増加の停滞は、ヌクレオソーム構造ひとつ分の破壊よりも1桁以上大きな長さスケールの構造の破壊を示唆していると考えている。この停滞現象の理解は、染色体/クロマチンの折り畳み高次構造の詳細理解に貢献するものと考えられるため、現在、この停滞現象の詳細な解析に取り組んでいる。近年、染色体の構築・折り畳みに関わっているタンパクが幾つかの遺伝性疾患の原因遺伝子であることが明らかになっている。従って、染色体高次構造/形成機構の理解が進めば、病気の治療に役立つことも期待される。

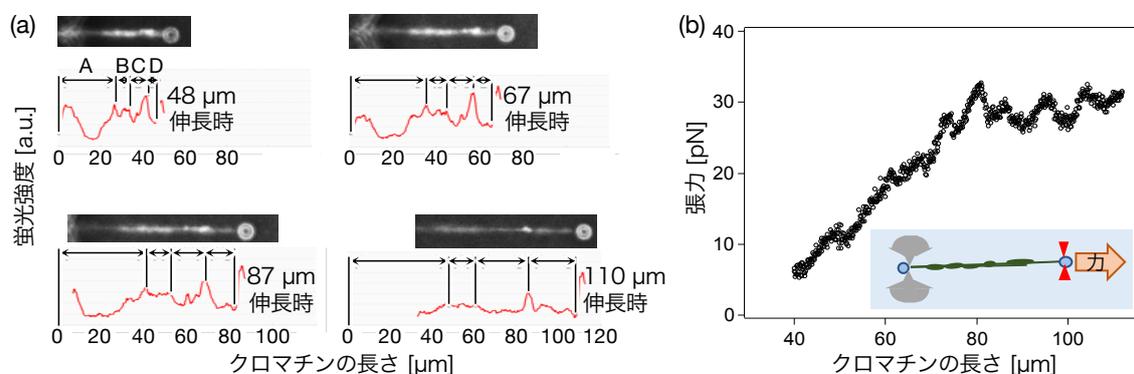


図4: クロマチンファイバー引張時の DNA 蛍光像と、その蛍光強度分布 (a)、およびクロマチンの長さ、張力との関係 (b)。挿入図はクロマチン引張実験の概略図。クロマチンの一端をマイクロピラー間に固定し、他端を抗体修飾マイクロビーズを介して光ピンセットで引張る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Y. Ma, Y. Yoshikawa, H. Oana, K. Yoshikawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Marked Difference in the Conformational Transition of DNA Caused by Propanol Isomer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 1607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym12071607	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 小穴英廣, 野田清敬	4. 巻 10
2. 論文標題 エピゲノム動態解明を目指した1細胞クロマチン解析・物性計測マイクロ流体デバイスの開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 41-44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 野田清敬, 小穴英廣
2. 発表標題 細胞由来クロマチンファイバーの両端固定デバイス開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第43 回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田清敬, 小穴英廣
2. 発表標題 クロマチンファイバー凝縮部およびヒストン化学修飾部の分布計測技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44 回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田清敬, 小穴英廣
2. 発表標題 MOORING BOTH ENDS OF INTACT CHROMATIN FIBERS TO MICROSTRUCTURES IN A MICROFLUIDIC DEVICE FOR ACQUISITION OF EPIGENETIC INFORMATION BASED ON FLUORESCENCE MICROSCOPY
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro TAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田清敬, 小穴英廣
2. 発表標題 インタクトな染色体由来クロマチンファイバーの凝縮部およびヒストン化学修飾部の分布計測
3. 学会等名 第39回 染色体ワークショップ・第19回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢崎佑磨, 小穴英廣
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた染色体特定塩基配列部の可視化
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第45回研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidehiro Oana
2. 発表標題 A Microfluidic Device for Direct Observation-based Single Cell Epigenetic Analysis
3. 学会等名 2022 Japan-Taiwan Precision Medicine, Biomedical Technology and Smart Services Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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・医学部・准教授	本研究を遂行するにあたり、Methy1R0マウス由来のES細胞をご提供頂くと共に、当該細胞の培養につきまして数々の重要なご助言を頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------