

細胞から染色体 1 本を取り出して解きほぐす技術を開発

～基礎生命科学から、がん／再生医療まで幅広い研究分野への貢献に期待～

1. 発表者：

高橋 智博（東京大学 大学院工学系研究科 機械工学専攻 修士課程 2 年生 [研究当時]）

オケヨ ケネディ（東京大学 大学院工学系研究科 機械工学専攻 助教 [研究当時] /

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 講師 [現在]）

上田 潤（旭川医科大学 教育研究推進センター 准教授）

山縣 一夫（近畿大学 生物理工学部 准教授）

鷺津 正夫（東京大学 大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻 教授）

小穴 英廣（東京大学 大学院工学系研究科 機械工学専攻 准教授）

2. 発表のポイント：

◆顕微鏡のステージ上に設置したマイクロ流体デバイス（注 1）内で、リアルタイム観察しながら、狙った 1 個の動物細胞を破碎して染色体（注 2）を取り出し、次いでマイクロ流体デバイス内の溶液条件を制御することによって染色体の折り畳み度合いを低下させて解きほぐし、クロマチンファイバー（注 3）へと展開する技術を開発しました。

◆未分化度の高い細胞由来の染色体ほど、折り畳み構造の安定性（注 4）が低いということ、1 細胞・1 分子レベルのリアルタイム観察実験により初めて直接的に明らかにしました。

◆細胞分化／未分化状態の制御・維持機構解明や、がん／再生医療といったエピジェネティクス（注 5）研究のための実験を 1 細胞レベルで行うために、非常に有用な手法となる事が期待されます。

3. 発表概要：

東京大学大学院工学系研究科の高橋智博大学院生（研究当時）、小穴英廣准教授らの研究グループは、旭川医科大学の上田潤准教授、近畿大学の山縣一夫准教授との共同研究により、顕微鏡のステージ上、マイクロ流体デバイス内で、狙った 1 個の動物細胞を破碎して染色体を取り出し、マイクロ流体デバイス内の溶液条件を制御することによって「顕微鏡下・その場」で染色体の折り畳み度合い変化のリアルタイム観察および解きほぐしを行い、クロマチンファイバーへと展開する技術を開発しました。この手法を用い、分化細胞由来と未分化細胞由来の染色体の折り畳み構造の安定性をそれぞれ調べて比較した結果、未分化細胞由来の染色体の方が、折り畳み構造の安定性が低いことを初めて直接明らかにしました。本実験手法は、細胞分化／未分化状態の制御・維持機構解明や、がん／再生医療と関わりの深いエピジェネティクス研究を「1 細胞・1 染色体レベル」で行うための非常に有用な手法となる事が期待されます。

4. 発表内容：

現在のエピジェネティクス研究は、種々のクロマチン（紐状の DNA-タンパク質複合体）解析法を駆使して進められていますが、これら解析法は一般に、細胞集団から抽出したクロマチンの（多分子）集団に対して行うため、得られる情報や値は集団平均となっています。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、解析で得られた情

報がゲノム DNA 鎖上のどの位置由来の情報なのか、位置情報同定には既存のゲノムデータベースとの比較などの手間を要します。もし、顕微鏡下で狙った 1 個の細胞から染色体を取り出し、その場で断片化させずにクロマチンファイバーへと展開させて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観察により同定するという解析手法が実現すれば、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簡便に得られるようになります。しかし、動物細胞のクロマチンファイバーは、解きほぐしたときの 1 本の長さが数 mm 以上にも及ぶほど長大です。そのため、顕微鏡視野下で細胞から染色体を取り出して個別に取り扱い、断片化を抑えつつ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、1 細胞由来の個々のクロマチンファイバーに対する、直接観察に基づいたエピジェネティック解析手法は実用化されていません。

そこで本研究グループは、マイクロ流体デバイス技術 (図 1) と光ピンセット (注 6) 技術を応用し、狙った 1 個の細胞から染色体を取り出し、「顕微鏡下・その場」で断片化を抑えて染色体を展開させる技術の開発に取り組みました (図 2)。ここでは、本手法の有用性を示すため、実験試料として未分化細胞と分化細胞を用い、それぞれの細胞から取り出した染色体の折り畳み構造の安定性を 1 細胞・1 分子レベルで調べることと共に、細胞の分化度と染色体の折り畳み構造の安定性との間に相関があるかどうか調べることに取り組みました。その結果、ほ乳類 (マウス) 細胞から染色体を取り出し (図 3)、マイクロ流体デバイス内の所定の位置へ搬送・係留し (図 4)、マイクロ流体デバイス内の溶液条件を制御して「顕微鏡下・その場」で染色体を解きほぐしてクロマチンファイバーへと展開する事に成功しました (図 5)。ここでは、未分化細胞由来の染色体の方が、折り畳み構造の安定性が低いことについても初めて直接明らかにしました。

これまでにない 1 細胞を起点とした染色体及びクロマチンの単分子操作・解析技術が実現すれば、細胞分化/未分化状態の制御・維持機構解明とその応用を目的としたエピゲノム研究における強力な実験ツールとして利用され、基礎生命科学分野のみならず再生医療やバイオ産業の発展に大きく貢献する事が期待されます。今後は、取り出した染色体の染色体番号識別やクロマチンファイバー上での特定塩基配列部の可視化技術を開発し、1 細胞・1 分子レベルのエピジェネティック解析技術開発を進めていく予定です。

5. 発表雑誌:

雑誌名: Scientific Reports

(オンライン版: 9 月 12 日 18:00 (日本時間) 掲載予定 [英国夏時間 10:00 掲載予定])

論文タイトル: A microfluidic device for isolating intact chromosomes from single mammalian cells and probing their folding stability by controlling solution conditions

著者: Tomohiro Takahashi, Kennedy O. Okeyo, Jun Ueda, Kazuo Yamagata, Masao Washizu, and Hidehiro Oana*

DOI 番号: 10.1038/s41598-018-31975-5

アブストラクト URL: www.nature.com/articles/s41598-018-31975-5

7. 問い合わせ先：

東京大学 大学院工学系研究科 機械工学専攻
准教授 小穴 英廣（おあな ひでひろ）

8. 用語解説：

（注1）マイクロ流体デバイス

フォトリソグラフィ技術などの微細加工技術を利用して作製した、微小流路や微小反応容器などで構成されたマイクロデバイス。微小流路に種々の溶液を導入することで、溶液の混合、反応、分離、精製、検出などさまざまな化学実験操作を行うことが可能である。このデバイスを顕微鏡のステージ上に設置することで、生化学反応をリアルタイム観察する事も可能。

（注2）染色体

DNA（直径約2ナノメートル）とヒストンなどのタンパクとの複合体をクロマチンと呼ぶ。このクロマチンが更に高度に秩序良く折り畳まれた、細胞分裂中期（M期）に形成される構造体を染色体と呼ぶ。染色体においては、数センチメートル程度の長さのDNAがタンパクと複合体を形成し、数ミクロン程度の構造体へと折り畳まれている。

（注3）クロマチンファイバー

ファイバー（繊維）状のクロマチンのこと。

（注4）折り畳み構造の安定性

染色体はクロマチンが高度に折り畳まれた構造体であるが、周囲の塩濃度に依存して、折り畳み構造が安定的に維持されたり、染色体を構成しているタンパク質が外れるなどして折り畳み度合いが低下し、解けたりすることが知られている。

（注5）エピジェネティクス

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）による発現の変化や分化等の制御機構、およびこれらを研究する学問。ヒストンタンパク質のテール部分のメチル化やアセチル化修飾等は、クロマチンファイバーの折り畳み構造の安定性変化を誘起し、遺伝子を活性化あるいは不活性化する事が知られており、細胞のガン化や初期化／分化の制御機構と密接に関わっている。エピゲノムとは、上記後天的作用を含んだゲノム情報のことを指す。

（注6）光ピンセット

レンズを通して集光したレーザー光の焦点に、周囲の媒質よりも誘電率の大きい物質が引き寄せられる現象を利用した非接触操作技術。マイクロ流路中の細胞やマイクロビーズなどの微小物体を捕捉する事ができ、更に、レーザーの光軸や顕微鏡のステージを動かすことで、捕捉した物体を移動させることができる。

9. 添付資料：

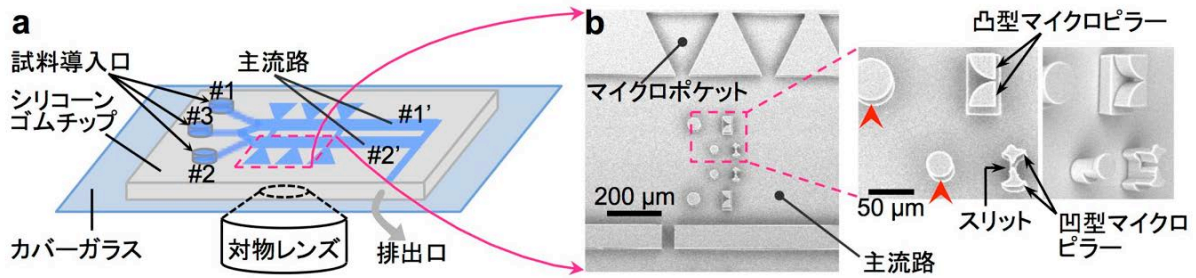


図1：マイクロ流体デバイス。(a) マイクロ流体デバイス概略図。微細加工によって溝を形成したシリコンゴム板とカバーガラスとを貼り合わせ、流体を流すことのできるマイクロ流路が作られている。試料導入口は、シリコンゴムに空けられた貫通穴でマイクロ流路部分を通しており、この穴を通して主流路（マイクロ流路）内に細胞懸濁液等の試料を導入する。(b) シリコンゴム板上に形成した主流路部の拡大写真（透過型電子顕微鏡像）。マイクロポケットは、細胞から染色体を取り出すマイクロチャンバーとして用いる。マイクロピラーは、取り出した染色体を係留するために形成したマイクロ構造体。

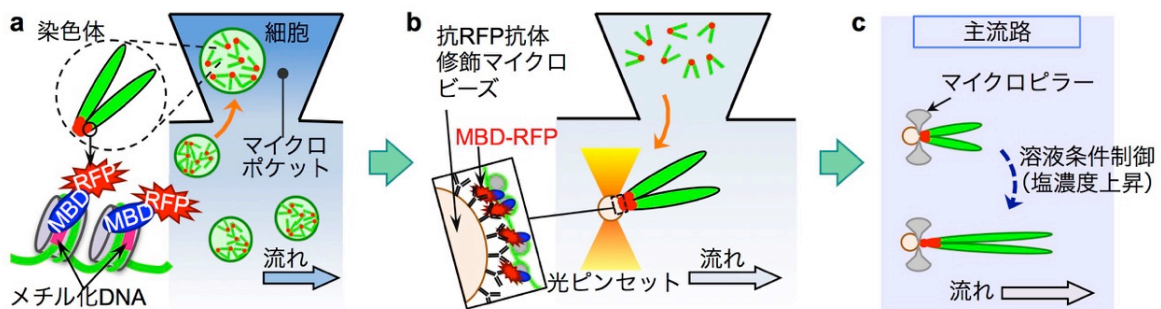
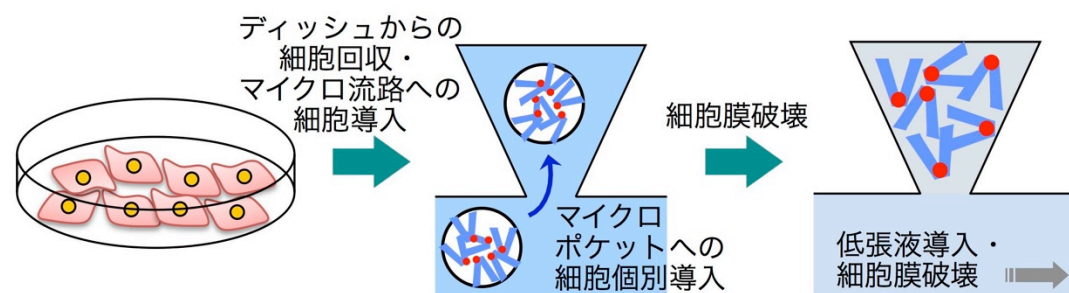


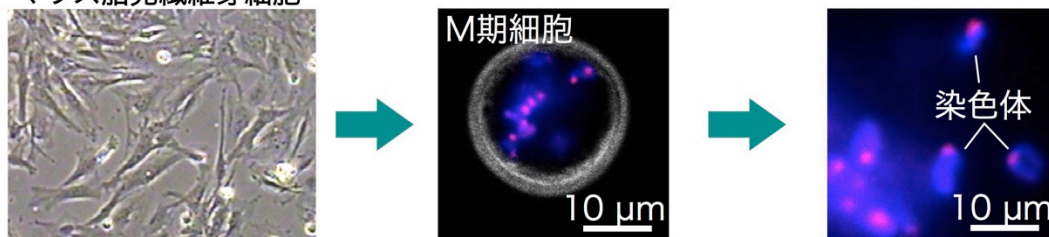
図2：実験概略図。(a) 分裂期のマウス胎児繊維芽細胞／マウス胚性幹細胞（ES細胞）を光ピンセットを用いてマイクロポケット内へ運び込む（各ポケットあたり1個）。この細胞は、遺伝子組換えマウス（メチロー*）由来の細胞で、メチル化DNA結合タンパク質（MBD）に赤色蛍光タンパク（RFP）が発現している。(b) 浸透圧ショックで細胞を破壊して染色体を得る。その後、抗RFP抗体修飾マイクロビーズによって染色体を捕捉し、この抗RFP抗体修飾マイクロビーズを光ピンセット操作することによって染色体を搬送する。(c) 抗RFP抗体修飾マイクロビーズをマイクロピラーのスリット部に挟み込むことにより、流れの中で染色体を係留する。マイクロ流路内の溶液条件を変え、染色体折り畳み構造変化／解きほぐしの「顕微鏡下・その場」リアルタイム観察をおこなう。

*メチロー：メチル化したDNAを認識して結合するMBD1（Methyl-CpG Binding Domain protein 1）タンパクのMBDドメインに赤色蛍光タンパクを融合した蛍光プローブを全身で発現する遺伝子組換えマウス。作製者である上田潤氏、山縣一夫氏によりメチロー

（MethylRO：Methylation probe in *ROSA26* locus）と命名された[Ueda, J. *et al. Stem Cell Rep.* **2**, 910–924 (2014)]. DNAのメチル化は、4種のDNA塩基、アデニン、シトシン、グアニン、チミンのうち、シトシンがメチル化される化学修飾であり、エピジェネティクスに関わっている。



マウス胎児繊維芽細胞



マウスES細胞コロニー

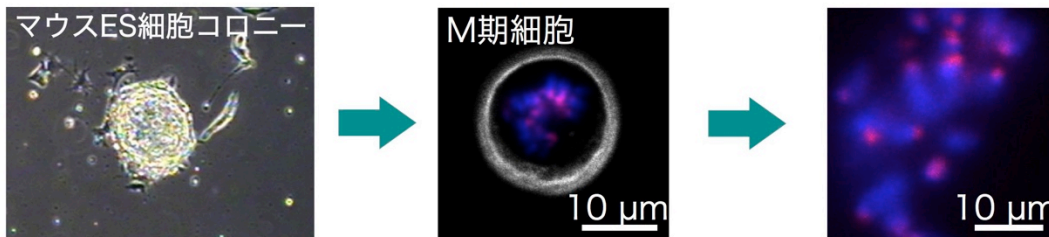


図3：メチローマウス由来細胞からの染色体取り出し。ディッシュ上で培養した細胞（左上図）を回収し、マイクロ流体デバイス主流路の側壁部に設けてあるマイクロポケット内に細胞を導入した後（中央上図）、浸透圧ショックで細胞を破壊すると、マイクロポケット内に浮遊している状態の染色体を得ることができた（右上図）。中段はメチローマウス胎児繊維芽細胞からの染色体取り出し。下段はメチローマウス ES 細胞からの染色体取り出し。

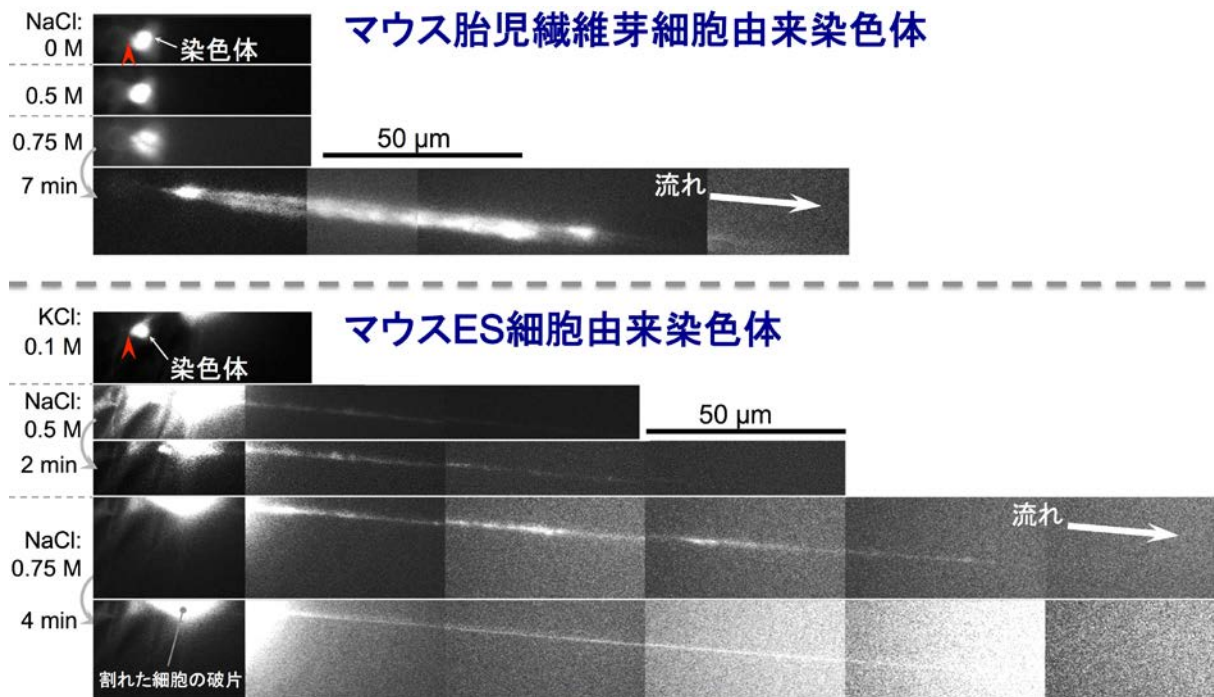


図5：マイクロピラーに係留した染色体の周囲の塩濃度を変えたときの染色体の形態変化。上図：マウス胎児繊維芽細胞（分化細胞）由来染色体の構造変化。濃度 0.5 モル／リットル (M)の塩化ナトリウム (NaCl) 溶液中では顕著な形態変化は見られないが、0.75 M NaCl 溶液に曝（さら）すと膨潤し始め、次第に解き解れてくる様子が観察された。下図：マウス ES 細胞（未分化細胞）由来染色体の構造変化。0.5 M NaCl 溶液に曝（さら）すと直ちに解き解れ始め、0.75 M NaCl 溶液に曝（さら）すと、さらに解けて伸長する様子が観察された。以上から、未分化細胞由来の染色体の方が、折り畳みの安定性が低いことが 1 細胞・1 染色体レベルで直接的に示された。