

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域
「統合 1 細胞解析のための革新的技術基盤」
研究課題
「細胞ポテンシャル測定システムの開発」

研究終了報告書

研究期間 2016年10月～2022年3月

研究代表者:大川 恭行
(九州大学生体防御医学研究所、
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究グループでは、1 細胞レベルのエピゲノム解析技術 ChIL 法の開発を行った。ChIL 法の開発により、単一細胞レベルでのエピゲノム解析技術の開発に成功した(Nature Cell Biol., 2019, 2021 年特許取得)。論文発表後、国内外の大学等の多くの研究機関に対してプロトコルの配布、トレーニングを行った。また、NPO 法人による試薬提供を行うことで、企業への技術移転を可能にし、国内外の複数の会社にライセンスし商用化を達成した。新たに、複数のエピゲノム情報を同時に取得するマルチ ChIL の開発を行っており、2020 年に論文発表し、2021 年に複数社にライセンス供与を行った。本法により、転写因子の結合、ヒストン修飾等の遺伝子制御情報から、活性化 RNA ポリメラーゼ II の結合を指標とした発現情報までを同一サンプルで解析することが可能とした(Nature Protocols, 2020)。これら ChILseq の高深度解析力を活かしたがん等の病理切片を用いたエピゲノム解析技術を開発した。がん組織における細胞組成や予後予測を可能にするモデル化手法を確立し、細胞解析による全細胞運命トラッキングシステム tsChIL として公開した。(論文査読中; bioRxiv 2020.12.18.423434)。研究の順調な進捗を受け 2019 年に新たにロードマップを策定し、落合グループ(広島大学)が新たに加えた空間オミクスの開発を進めた。2021 年に光単離化学法を開発し、世界最高解像度の空間トランスクリプトーム技術開発に成功した(Nat Commun., 2021, 特許出願済)。

本研究開発では、研究代表の大川がソフトウェア開発を含めたゲノミクス部分、分担の胡桃坂グループが生化学部分、木村グループがイメージング部分並びに抗体開発を分担してチームとして開発することにより、高額なデバイスを必要としない低コストで汎用性の高い技術開発を進めた(J. Cell Sci, 2020)。本チームは、細胞ポテンシャルを規定するエピゲノム状態に関する基礎的な知見を取得することにより、より実践的な細胞ポテンシャル測定システムの開発を行う基礎研究と技術開発を連動させた。

各種インフラ整備および共有、予備実験の結果に基づくロードマップ策定や修正を適時行ない研究グループ間の円滑な連携を図った。研究開発グループ間では常時 web 会議等により情報共有した上で、代表者グループと分担者グループとの直接会合を行った。緊密な連携の結果、グループ間の開発に伴う特許申請、ハイインパクトな国際査読誌への論文発表を数多く達成した。

特に、研究開始より求められたクロマチンを構成する構造生物学的解析とエピゲノム解析の双方について注力して研究を進めた。結果、胡桃坂グループが主導したヘテロクロマチンの構造の解明の結果、ChIL 法によるトランスポゼースがヘテロクロマチンに反応可能であることが構造レベルで実証された(Open Biol, 2019; Mol Cell, 2018)。更に大川・胡桃坂グループにより転写活性を司る新たなクロマチン構造、オーバーラッピングヌクレオソームをエピゲノム解析ならびに構造解析により解明に成功している(Science, 2017)。更に、大川・胡桃坂・木村グループにより骨格筋再生に必要な新規ヒストン H3mm7 と H3mm7 により構成される特異的なクロマチン構造を発見した(Nature Commun., 2018)。開発部分の多くを早期達成した胡桃坂グループはこれら卓越した成果により、JST-ERATO に採択され、2020 年より離脱し、マテリアル提供部分と継続的な構造解析について鯨井智也が主たる共同研究者として継続的に担当した。鯨井グループは Tn5 の酵素特性の解明と継続的な提供を進め、また、継続して構造学的な知見の獲得を進めた(Science, 2018, Science, 2020)。落合グループを中心とした領域内での単一細胞解析の共同研究により、成果を上げた(Sci. Adv., 2020)。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 「クロマチン挿入標識(Chromatin Integration Labeling: ChIL)法」の開発

概要:

本研究では、極めて少数の細胞を用いてエピゲノム情報を取得できる「クロマチン挿入標識(Chromatin Integration Labeling: ChIL)法」を開発した。本手法により、遺伝子発現を制御する

転写因子の結合位置やヒストン修飾を単一の細胞で測定することが世界で初めて可能になった。エピゲノム解析は、少なくとも数千個の細胞を必要とする従来の手法では不可能であった幹細胞など生体内に僅かにしか存在しない細胞への適用が実現した。

2. 「マルチクロマチン挿入標識(multiChromatin Integration Labeling: mtChIL)」法の開発

概要:

単一細胞を用いたマルチオミクス解析は、個々の細胞状態の理解に非常に重要である。これまでに単一細胞のヒストン修飾解析を可能にする ChIL-seq 技術を開発してきたが、今年度は複数のヒストン修飾や転写因子の局在を同時に解析するための新規手法 mtChIL-seq を開発した。異なるインデックスを持つオリゴ DNA を結合した二つの抗体で同時に少数細胞サンプルを染色し、ChIL 反応を進め、塩基配列の決定後に情報処理により分離することで、2種類のタンパク質や修飾の分布を明らかにすることができた。

3. 光照射を用いた超高解像度な遺伝子解析技術の開発

概要:

光単離化学法(Photo-Isolation Chemistry:PIC)を開発し、非常に小さな細胞集団や細胞の中の微小構造体で機能する遺伝子を光照射により検出することに成功した。ヒトやその他の多細胞生物は少なくとも100種類以上の細胞タイプから構成され、空間的な配置や場所によってさらに細分化された機能や特性を持つ。一方で、これらの細胞を臓器や組織から取り出すと本来の特性を失うため、組織を破壊することなく特定の細胞のみを解析する必要がある。PICにより、脳の微細領域や細胞内の1000分の1ミリ以下の微小構造体からも遺伝子の網羅的な検出を可能にした。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. DNA結合タンパク質の結合領域の近傍に所望のDNA断片を挿入する方法

(PCT/JP2017/019309 特願、ライセンシング済み)

概要:

ChIL 法の開発により、胚発生や細胞分化の制御機構など生命現象を制御する分子機構の解明に極めて有用であるとともに、がん研究・再生医療の従来得られなかったデータの集積が今後活性化することが見込まれる。ChIL 法は少数細胞イメージングとエピゲノム情報の複合解析が可能であることから、エピゲノム創薬の低コスト化、ハイスループット化が可能となり創薬分野への応用が大きく期待される。

2. 核酸断片及びその使用(multi-ChILseq)

(PCT/JP2021/025468 特願など、ライセンシング済み)

概要:

本研究開発により、複数のエピゲノム状態を同時に解析することが可能になった。multi-ChIL-seq は DNA 結合タンパク質であればプローブとして利用できることから、dCas9/sgRNA 系を用いることでゲノムの変異情報とエピゲノム情報の同時取得が可能である。ChIL の特色である少数細胞での解析が可能な利点を生かし、コホート研究等のヒトを対象とした研究において、同一の細胞でゲノムとエピゲノムの解析が可能である。今後、ゲノム変異がもたらすエピゲノム異常のメカニズム解明が期待でき、がんや遺伝性疾患の解明、そして創薬や診断が劇的に進むことが期待できる。

3. 光単離化学法

(PCT/JP2019/094216 特願など、ライセンシング済み)

概要:

臓器や、組織の特定の細胞を単一細胞レベルでオミクス解析を行うには、目的の細胞のみを高精度に単離する必要がある。本法は、組織切片等上の任意の領域に光照射することで、

発現情報を取り出す技術(Photo-isolation Chemistry:PIC)を開発した。PIC は特別なデバイスが必要とせず、従来技術では不可能であった高解像度での空間オミクス解析を可能とする。複数企業へのライセンス行い、臨床検査への実装を進めている。

<代表的な論文>

1. “A chromatin integration labelling method enables epigenomic profiling with lower input ”, *Harada A, *Maehara K, *Handa T, Arimura Y, Nogami J, Hayashi-Takanaka Y, Shirahige K, Kurumizaka H, *Kimura H, *Ohkawa Y, *Nat Cell Biol*, 2018.

概要:

クロマチンは遺伝子の制御に重要な役割を果たしており、クロマチン免疫沈降法とそのシーケンス法(ChIP-seq)は、全ゲノムにわたるタンパク質-DNA 相互作用を調べるための標準的な手法となっている。本研究では、細胞溶解前に標的分子と密接に関連したゲノム配列を増幅することで、免疫沈降を伴わないエピゲノムプロファイリング手法「クロマチン統合ラベリング(ChIL)」を確立した。ChIL-seq は、ChIP-seq に代わる手法として、少数の細胞、特に培養プレートに付着した細胞や免疫蛍光後の細胞を用いたエピゲノムプロファイリングに有効である。

2. “Chromatin integration labeling for mapping DNA-binding proteins and modifications with low input”, *Handa T, *Maehara K, *Harada A, Sato S, Nakao M, Goto N, Kurumizaka H, *Ohkawa Y, *Kimura H, *Nat Protocols*, 2020 15(10):3334-3360.

概要:

ChIL-seq(Chromatin Integration Labeling)は、細胞を溶解する前に標的ゲノム配列を増幅するため、低入力サンプルや単一細胞のエピゲノムプロファイリングに特に有効であることが実証されている。そこで複数のターゲットを対象とした解析(マルチターゲット ChIL-seq)について公開した。今回発表したプロトコルにより、貴重なサンプルを解析するための ChIL 技術がより広く利用できるようになり、さらなる応用の促進が期待できる。

3. “High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry”, *Honda M, Oki S, Kimura R, Harada A, Maehara K, Tanaka K, Meno C, *Ohkawa Y, *Nat Commun*. 2021 12(1):4416.

概要:

我々は、光照射した領域から特異的に発現プロファイルを決定することができる、光分離化学(PIC)と組み合わせたトランスクリプトームプロファイリング法を確立した。PIC によるトランスクリプトーム解析では、マウス胚の小さな領域で特異的に発現する遺伝子を検出することができる。単一細胞に光照射したところ、約 8,000 の遺伝子が検出された。さらに、PIC のトランスクリプトーム解析は、細胞内や核内の微細構造(それぞれストレスグラニュール、核スペckル)にも適用でき、数百の遺伝子が特異的に局在していることが検出された。

§2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

① 大川グループ

研究代表者:大川 恭行(九州大学生体防御医学研究所 教授)

研究項目

・1細胞エピゲノム解析技術の開発と基盤解析

② 胡桃坂グループ

主たる共同研究者:胡桃坂 仁志 (東京大学定量生命科学研究所 教授)

→主たる共同研究者鯨井 智也に変更(胡桃坂 仁志 JST-ERATO 採択に伴うプロジェクト離脱のため)

研究項目

・1細胞エピゲノム解析技術の基盤研究およびマテリアル開発

③ 木村グループ

主たる共同研究者: 木村 宏 (東京工業大学科学技術創成研究院 教授)

研究項目

・1細胞エピゲノム解析技術の基盤研究およびマテリアル開発

④ 落合グループ

主たる共同研究者: 落合 博 (広島大学大学院統合生命科学研究科 准教授)

研究項目

・1細胞エピゲノム解析技術の開発と基盤解析

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

臨床研究との連携: 九州大学内の連携によるヒト臨床検体の解析

国内基礎研究機関との連携状況 (共同研究者の希望により機関のみ名称開示を含む):



産業界との連携: 海外大手試薬メーカー (秘密保持契約のため開示しない) 2社、国内メーカー3社