

研究報告書

「1細胞内多階層オミックス動態の連関性」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 谷口 雄一

1. 研究のねらい

近年オミックス解析技術が発達し、1細胞レベルの微量なサンプルからでもゲノムやトランスクリプトームなどのオミックス解析ができるようになってきた。しかしながら、それぞれのオミックス階層毎の生命理解は飛躍的に進んできているものの、複数の階層を統合して理解するための解析法・理論の構築はあまり進んでいない。本研究では、各オミックス階層間の連関性を明らかにすることを目指して、2つの技術を軸に研究開発を行う。

1つ目の技術は、精密なゲノム3次元構造の解析技術である(課題1)。ゲノムの構造状態は、オミックス階層のうち最上流の階層の一つに位置づけられ、トランスクリプトーム・プロテオームの制御に密接に関連している。これまで我々は、ゲノム構造の最小単位であるヌクレオソームの分解能において、ゲノムの3次元構造を解析する新たな手法の開発を進めてきた(当時論文投稿中)。そこで本研究では、当該技術を完成させると共に、同技術を用いて様々な培養条件下で解析を行うことにより、特徴的な構造変化を示すゲノム領域を網羅的に探索し、エピゲノム階層、並びに下流のオミックス階層との連関性を明らかにすることを旨とする。加えて、感度を向上させる方法についても検討し、1細胞レベルでの解析の実現を追求する。

2つ目の技術は、真核細胞内における遺伝子発現量を網羅的に捉えることを目指した、ハイスループット3次元1分子蛍光イメージング技術である(課題2)。一般的に1分子蛍光イメージングはエバネッセント顕微鏡を用いて行われてきたが、ガラス基板上数百ナノメートルの領域しか観察ができないという欠点があり、真核細胞全体の定量化が行えない。そこで我々は、光シート顕微鏡を改良し、ガラス基板上数百マイクロメートルまでの領域の1分子観察をハイスループットに行うことができる顕微鏡(PISA 顕微鏡)の開発を進めてきた(当時特願2013-079956)。本研究では、当該顕微鏡を誰もが使えるレベルにまで完成させ、さらに同技術を用いて、以前に我々が行った1細胞内の遺伝子発現の網羅的計測(Taniguchi et al., Science, 2010)と同様の定量化を真核細胞において行うことを旨とする。

2. 研究成果

(1) 概要

課題1のゲノム3次元構造解析技術においては、予期せぬトラブルはあったものの、最終的には想定よりも分解能が高い技術を開発でき、インパクト誌(Cell)に論文掲載の運びとなった。当初目指していたのはヌクレオソーム分解能のゲノム構造解析技術であったが、さきがけ申請の直後(2015年8月)にほぼ同内容の論文が他研究室から報告された(Hsieh et al., Cell, 2015)。しかしその後、より分解能の高い、ヌクレオソームの配向性を加味した「サブヌクレオソーム分解能」の解析を我々の方法では行うことができることを見つけ、実証した。また、同論文

では3次元構造の構築までには手法が至っていなかったが、我々は計算機科学を専門とする理化学研究所の安藤格士研究員(当時)と協力し、分子動力学計算を新たに最適化計算に用いることでこれを実現した。そして、様々な条件で測定を行うことで、エピゲノム・トランスクリプトーム状態との相関性を明らかにすると同時に、ヌクレオソームの3次元配列構造を規定する基本構造を見出すことに成功した。さきがけ期間内においては、当該技術の論文(論文1)に加えて、ヌクレオソームレベル研究の重要性を示したレビュー論文(論文4)の報告を行った。

課題2の3次元1分子イメージング技術については、想定した成果が得られたのと同時に、さらなる研究の発展につながる重要な結果が得られた。我々が開発したプロトタイプの顕微鏡は、安定性が悪く頻繁に光軸調整が必要であり、開発を行っていた研究員が抜けた以降は扱える人間がいなかった。そこで我々は顕微鏡の構造を根本から見直し、特に市販の顕微鏡をベースとしていた測定部を、3次元CADを用いて最適に設計した金属筐体に置き換えることで、安定性を著しく向上させることに成功した。さらに、本顕微鏡を用いてゲル・液体内の1分子蛍光を非常に明瞭に3次元観察できることが確認できたことから、遺伝子発現の測定の方式を、遺伝子組み換えを行った細胞を直接計測する方式から、細胞内のタンパク質をゲル上に展開したものを計測する方式に転換した。そして、生体試料内の単一種類のタンパク質を aM(10^{-18} M)レベルで検出すること、並びに1細胞内のタンパク質約 20~40 種類の発現量の定量化を行うことに成功した。さきがけ期間内では、ハイスループット計測用のゲルデバイスの論文(論文2)、細胞内の全タンパク質を蛍光ラベル化する論文(論文3、5)とその他論文1本を報告したのに加え、特許3件を出願した。

(2) 詳細

課題1: 超高分解能3次元ゲノム構造解析技術の開発

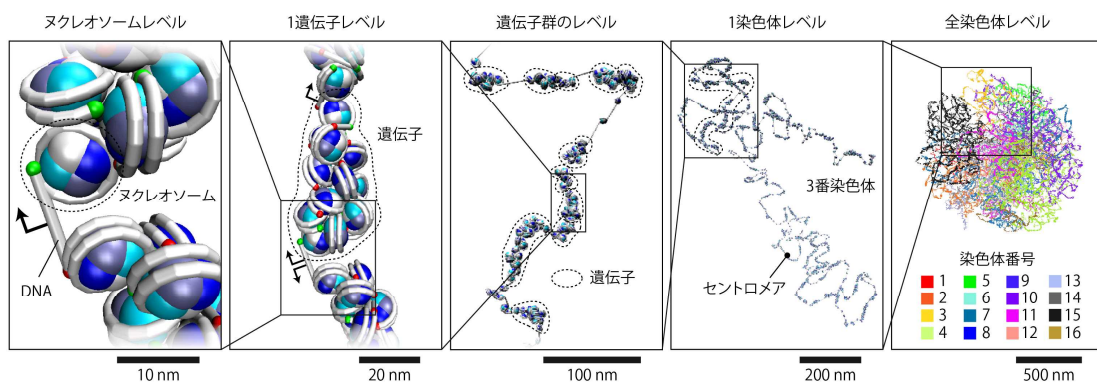
ゲノム3次元構造の代表的な解析法としては、2009年に開発された High-throughput chromosome conformation capture(Hi-C)法が挙げられる(Lieberman-Aiden et al., Science, 2009)。この手法では、空間的に近い距離にあるゲノムDNA同士を連結させ、連結されたDNA領域の周辺を次世代シーケンサーを用いて解読するという方法を用いる。これにより、ゲノム上のどの領域間が空間的に近接関係にあるかを、連結が起こった頻度から網羅的に解析することが可能となり、その情報からゲノムの3次元構造を導くことができる。しかし、従来のHi-C法では、数十から数千ヌクレオソームの分解能でしか3次元構造が得られない。また、最近の技術開発により単一ヌクレオソームレベルで連結頻度を解析する技術が開発されたが、不純物が大量に生じるために定量性が低く、3次元構造の導出には至っていない(Hsieh et al., Cell, 2015)。

そこで我々は、まず不純物をきれいに取り除く実験手順の開発を行った。この手順のうち一つの重要なステップは、ゲノムの連結を、特定のアダプターDNA配列を介して行うことである。このアダプターDNAに結合したビオチンを用いて連結産物の精製を行うことにより、またシーケンス解析の際にアダプターDNA配列が無いリードを除くことにより、不純物をほぼ完全に除去することに成功した。さらには、連結産物の配列からゲノム上の位置を探す際に、配列の向きに注目して解析を行うことで、ヌクレオソーム内のDNA巻き付き開始・終了点を見分けて連結頻度を解析する方法を考案し、これにより、各ヌクレオソームの位置だけでなく、それぞれの

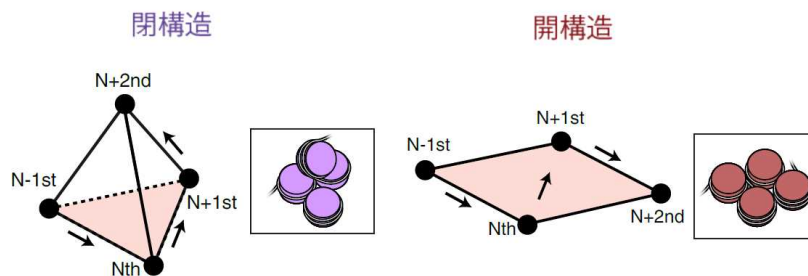
配向性を含めて解析することが可能となった。こうした理由から、本法を”Hi-C” with nucleosome “O”rientation の略から Hi-CO 法と名付けており、日本語の「配向」と同じ読み名にしている(論文1)。

さらには、得られた連結頻度のデータから3次元構造を得るための計算的手法の開発を行った。従来構造計算は数学的な手法を用いて行われてきた。これに対し我々は、分子動力学シミュレーションを新しく活用し、物理的に合理的な形でヌクレオソームを揺らがせながら、それぞれの連結頻度のデータを最も良く満たす各ヌクレオソームの配置と配向を探索するという方法を取ることで、ヌクレオソームレベルの3次元構造を得ることができるようになった。

さらには、この構造計算をスーパーコンピューターを用いて大規模に行うことで、全ゲノムスケールの構造が一度に得られるようになった(下図)。ゲノムの3次元構造を、単一ヌクレオソームから全ゲノムに至るまでのスケールで表現したのは世界初となる。得られた構造から、ヌクレオソームが不規則に配列しながら約 20-30nm の太さのファイバーを形成していることが分かる。



さらに、不規則なヌクレオソームの3次元配置構造の中に一定の法則性があることを発見した。ゲノム DNA 上で隣り合う4つのヌクレオソームの位置座標に注目したところ、正四面体で配置するグループ(閉構造)と、ひし形で配置するグループ(開構造)の2タイプに大別されることが分かった(下図)。つまり、ヌクレオソームの配置構造には、2種類の基本構造が存在しており、これらが切り替わることによってゲノム構造による細胞状態の制御が行われていることが明らかになった。



今回の研究により、ゲノムの3次元構造を世界最高分解能であるヌクレオソームのレベルで決定する方法が開発され、さらにその構造が細胞の制御状態と連動していることが示された(論文1)。ヌクレオソームレベルでの構造は、エピゲノム制御に関連する分子の結合等の影響を直接反映すると考えられ、今後分子レベルでのエピゲノム制御のメカニズムの解明に貢献することが期待できる(論文4にレビューを掲載)。また、高分解能のゲノム構造データのク

ラストリングを行う手法を最近開発しており(論文投稿中)、上記のメカニズムの理解をより統計的に行うことができると期待している。また現在、本解析を1細胞内で行うためのプロトコル開発を続けており、もし実現すれば1細胞トランスクリプトーム解析などと組み合わせることで、細胞内のエピゲノム制御の仕組みがさらに詳しく明らかになると期待できる。

課題2: 3次元1分子イメージング技術の開発

近年開発された光シート顕微鏡は、励起光による光ダメージを最小化できるだけでなく、高感度・高速イメージングを達成できる等、様々な顕微鏡の長所を併せ持つ手法として注目を集めている(Huisken et al., Science, 2004)。光シート顕微鏡の大きな弱点は、観察の際に柱型のアガロースゲルに細胞試料を埋める必要がある等、応用できる生物試料や測定スループットが限定されていることである。これに対して我々は、光シート顕微鏡の唯一の欠点である試料の制約性を大幅に緩和した、一般的なカバーガラス型試料に対して測定を行える新たな顕微鏡(PISA 顕微鏡)を開発し、特許を出願した。本顕微鏡では試料の深さ 0.2mm までの1分子イメージングが可能であり、エバネッセント顕微鏡では不可能だった3次元空間内の1分子検出を実現することができる。

しかしながら、研究開始当時はまだプロトタイプの段階であり、測定には毎回長時間の光軸合わせを必要とし、機械振動や熱ドリフトなどのため安定した測定を行うことができなかった。そこで我々は、PISA 顕微鏡の測定を安定化すべく、対物レンズ等の主要な光学素子を一体型の金属フレームに据え付けた顕微鏡筐体を3D CAD を用いて設計し、製作を行った。その結果、毎回必要だった光軸合わせは不要となり、機械振動や熱ドリフトの問題は大幅に改善され、顕微鏡を専門としない研究者・学生が容易に使うことができるレベルになった。そして、従来は行うことが極めて難しかったマルチウェル内の複数試料の観察も問題無く行えるようになり、ハイスループットイメージングを光シート顕微鏡において実現することに成功した。

当初は本顕微鏡を用いて、我々が以前に大腸菌細胞において行ったのと同様に(Taniguchi et al. Science, 2010)、蛍光タンパク質のコード配列を各遺伝子に挿入した細胞株ライブラリを出芽酵母において作製し、各々の細胞株をマルチウェル内でハイスループットに測定することを計画し、そのためのマルチウェルデバイスの開発を行っていた(論文2)。しかしながら、出芽酵母やヒト細胞などの真核細胞の持つ自家蛍光は予想以上に強く、細胞内にある全ての蛍光タンパク質を1分子レベルで捉え、計数を行うのは非常に困難を極めた。一方で、アガロースゲルや粘性のある液体内の蛍光分子の観察は、0.2mm 以上の深部であっても非常に明瞭に行えることが確認できた。このため、ゲノムに蛍光タンパク質を挿入して細胞そのものを測定する方針から、細胞を一旦ゲルに溶解して、その中で任意のタンパク質、または分離された複数のタンパク質を蛍光抗体または色素でラベル化して測定する方針に転換した。

この場合、細胞中のタンパク質分子をどれくらいの割合で蛍光標識できるかというのは非常に重要な問題になる。そこで我々は、細胞内の1種類、または複数種類のタンパク質分子に対して、蛍光標識されたタンパク質の割合を求めめるアッセイ法を開発した(論文3)。この方法を用いて、細胞内の各タンパク質を、アミノ基をターゲットとする形で蛍光ラベル化した時のラベル化率を調べたところ、50-90%と求められ、蛍光スポットの数からのタンパク質数の評価が可能であることが実証できた。

これらの結果を元に、1細胞内の複数タンパク質の定量化を行う実験系の開発系を進め、

現在は 20-40 種類のタンパク質の定量化が行えるようになってきている。また別の方向性として、PISA 顕微鏡を様々な生化学分析器の検出系として利用することにより、様々な分析・分子診断を1分子感度化することができるのではないかと考えた。PISA 顕微鏡では一般的なピペットマンでも扱えるマイクロリットルスケールの液体内にある全ての分子を数えることができ、一般的な分光光度計と比較して感度を一万から一億倍程度改善できる。これにより、例えば血液診断において希少にしか存在しない病原性分子を検出したり、弱反応性の抗体を用いたり、検体量の大幅削減を行ったりすることが可能になると期待している。

3. 今後の展開

課題1: 超高分解能3次元ゲノム構造解析技術の開発

Hi-CO 法は、ゲノムの3次元構造を分子レベルで解き明かすことのできる非常に強力な手法であり、様々な生物種・変異株・培養株で測定を行うことで、エピゲノム制御の分子メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。また、Hi-CO 法の技術的課題としては、1細胞レベルでの測定、並びにヒトなどのゲノムサイズの大きな生物への技術の適用が主なものとして挙げられ、我々もさらなる技術開発を進めていく予定である。さらには、Hi-CO 法で得られた構造が他の実験系でも同様に得られるかは今後検証していく必要があり、山下隼人さきがけ研究者の協力の下で高速 AFM を用いた実験を行っていくのと同時に、クライオ電子顕微鏡による検証実験も進めていくことを予定している。

課題2: 3次元1分子イメージング技術の開発

PISA 顕微鏡を用いた1細胞プロテオーム解析については、現在分離検出できている種類の数(20~40種類)を、さらに増やしていくための技術開発を行うことを予定している。特に、川井隆之さきがけ研究者と協力し、キャピラリー電気泳動等の分析化学技術への1分子検出系の導入を進めていく予定である。さらには、実際に多数の1細胞を解析することで、1細胞トランスクリプトームとの相関性、並びに性質の違いを明らかにしたいと考えている。一方で単一種類のタンパク質をハイスループット・高感度検出できるプラットフォームの開発も進めていく予定であり、様々な分子診断を1分子レベルで行う”1分子分析化学”の実現に向けて、技術開発・産学連携・医療応用の三方面から取り組みを進める予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

本テーマにおいて開発した Hi-CO 法、並びに PISA 顕微鏡は、世界においても独自性の高い、また極めて有益性の高い技術であり、優れた成果を挙げたと考えている。Hi-CO 法はクロマチン分野のみならず、システム生物学分野、医療分析分野、薬剤開発分野への波及効果が期待できる。また PISA 顕微鏡はバイオイメージング分野だけでなく、分析化学分野、医療診断分野への応用性が大いに期待できる。本テーマでは、想定していたよりも十分に大きな成果が得られており、究極目標である「1細胞内多階層オミックス動態の連関性」の解明に本質的に貢献しうる新しいアプローチ法の開発が達成できたと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

ヌクレオソームの配向性をも加味した「サブヌクレオソーム分解能」をもつ精密なゲノム3次元構造解析手法「Hi-CO 法」を開発し、酵母において実証しました。さらにヌクレオソームの3次元配列構造を規定する2つのヌクレオソーム4量体の基本構造を見出し、その成果を Cell 誌に発表しました。これらは、染色体の構造や遺伝子の発現制御の解明、特に分子レベルでのエピゲノム制御のメカニズムの解明に大きな貢献をすると期待されます。

また、本研究者は、光シート顕微鏡の大きな欠点である試料の制約を除いて一般的なカバーガラス型試料に対して測定を行える「PISA 顕微鏡」を開発しました。さきがけ研究では測定系の安定化のために各種の改良を行い、改良された顕微鏡を様々な生化学分析器の検出系として利用して、様々な分析・分子診断を1分子感度で実現することにも成功しつつあり、今後の展開を楽しみにしています。

ゲノム構造の解析という基礎的な研究から PISA 顕微鏡とその応用的な研究まで傑出した業績をあげています。これらの業績に対し、さきがけ1細胞領域ではさきがけ 2 期生に対するライジング・スター賞を贈りました。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Masae Ohno, Tadashi Ando, David G. Priest, Vipin Kimar, Yamato Yoshida, Yuichi Taniguchi : Sub-nucleosomal genome structure reveals distinct nucleosome folding motifs. Cell. Accepted |
| 2. David G. Priest, Nobuyuki Tanaka, Yo Tanaka, Yuichi Taniguchi : Micro-patterned agarose gel devices for single-cell high-throughput microscopy of E. coli cells. Scientific Reports 7, 17750 (2017) |
| 3. Simon Leclerc, Youri Arntz, Yuichi Taniguchi : Extending Single Molecule Imaging to Proteome Analysis by Quantitation of Fluorescent Labeling Homogeneity in Complex Protein Samples. Bioconjugate Chemistry. 29, 2541-2549 (2018) |
| 4. Masae Ohno, David G. Priest, Yuichi Taniguchi : Nucleosome-level 3D organization of the genome. Biochemical Society Transactions. 46, 491-501 (2018) |
| 5. Simon Leclerc, Youri Arntz, Yuichi Taniguchi : Proteome-wide quantification of labeling homogeneity at the single molecule level. JoVE, accepted |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件(非公開)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (国際学会発表) Gordon Research Conference: Genome Architecture in Cell Fate & Disease、Hongkong、2017年7月4日
2. (受賞) 第1回理研産業連携貢献賞、2016年10月18日
3. (プレスリリース) 世界最高分解能でゲノムの3次元構造を解明、2019年1月16日
4. (プレスリリース) 細胞中のタンパク質を全部光らせる、2018年7月
5. (著作物) 化学同人 定量生物学、第1章: 遺伝子発現の定量生物学、2018年7月31日