

## 研究終了報告書

### 「位置情報レコーディングによる多細胞システム解析」

研究期間: 2019年10月~2023年3月

研究者: 沖 真弥

#### 1. 研究のねらい

臓器、器官や個体などの多細胞システムを対象とした各種オミクス解析をおこなう場合、目的の細胞集団を高い純度で「分取」しなければならない。分取のためには laser microdissection (LMD) 法や fluorescence-activated cell sorting (FACS) 法が汎用されるが、LMD では数  $\mu\text{m}$  以下の微小な細胞集団を物理的に切り取ることは難しい。いっぽう FACS では酵素処理による細胞懸濁過程で位置情報が失われてしまうだけでなく、細胞へのダメージが計り知れない。本研究はそのような「分取」とはまったく異なる、「位置情報レコーディング技術」によって特定の多細胞集団のオミクス情報に迫る。これは光開裂型の化学修飾を施した caged オリゴ DNA を組織切片に滴下し、関心領域 (ROI) に特定波長の光を照射後、常法どおり RNA-seq をおこなうと、ROI だけの遺伝子発現情報が得られる。本手法は少数細胞に特化した既存のゲノミクス手法をベースとしており、また原理上、光照射の分解能は光学限界 (サブミクロン) レベルに達するため、感度と空間分解能に優れた技術となりうると期待される。

上記の手法を開発するために本研究開発者はまず、single cell RNA-seq 法のひとつ CEL-seq2 法で用いられる逆転写用プライマーに、特定波長の光で開裂する化学修飾を付加した。これを用いて常法どおりに逆転写反応と 2nd strand 合成まで進めると、光照射なしには T7 promoter が二本鎖 DNA になり得ず、その後の in vitro transcription (IVT) によるライブラリ増幅が成立しないような設計になっている。実際、この caged オリゴ DNA を凍結切片に滴下して逆転写反応したのち、光を照射した場合のみ IVT が成立し、シーケンスライブラリが合成された。また、検出感度も非常に高く、光照射を数十個の細胞に制限してもシーケンスライブラリが合成されている。したがって、顕微鏡下で ROI だけに光を照射すれば、興味の細胞集団だけの遺伝子発現情報を取得できると期待される。また、同様のアイデアはオープンクロマチン解析技術 (ATAC-seq) や、少数細胞におけるタンパク質-DNA 相互作用をゲノムワイドに検出する ChIL-seq 法にも適用可能である。

そこで本研究では光照射領域に限定可能な RNA-seq に加え、このケミストリーを ATAC-seq と ChIL-seq 法にも実装し、局所領域のトランスクリプトームとレギュローム情報が取得可能な技術の開発をめざす。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

「位置情報レコーディング技術」の反応系を Photo-Isolation Chemistry (PIC) と名づけ、光照射領域特異的なトランスクリプトーム解析手法を構築した。PIC RNA-seq による検出感度を検討すべく、少数の NIH3T3 細胞に UV 照射して RNA-seq したところ、単一細胞からでも平均 8,349 個の遺伝子が検出され、10 細胞以上では約 15,000 遺伝子が検出された。つぎに、E14.5 マウス胚の神経管の dorsal, medial, ventral 側のいずれかの箇所に直径約  $75\ \mu\text{m}$  のスポット状の UV を照射して PIC RNA-seq 解析したところ、約 200 個の遺伝子が各照射部位で特異的に検

出され、*in situ* hybridization による組織染色で領域特異的な発現パターンが実証された。また、成体マウスの脳を摘出し、海馬の CA1、CA3、または歯状回に対し、DMD で UV 照射して PIC RNA-seq をおこなったところ、三群比較で 1,070 個の差次的発現遺伝子 (DEG) が検出され、既報の発現パターンとの一致が見られた。さらにサブミクロンレベルの極小領域のトランスクリプトームに挑戦すべく、核スペckルに対する PIC RNA-seq をおこなったところ、核スペckルの主要な構成 RNA である MALATI 転写産物の他にも局材が未知の遺伝子 (AKRTIC2) が検出され、FISH によって局在証明された。PIC RNA-seq 解析技術における透過処理を検討した結果、新鮮凍結切片のみならず、PFA 固定した凍結またはパラフィン切片にも適用できたため、病理サンプルへの応用性が期待される。PIC の反応系を、少数細胞のタンパク質-クロマチン相互作用をゲノムワイドに調べることができる手法 (ChIL-seq) に実装した。その結果、マウス肝臓切片における H3K27ac の結合分布が光照射依存的に検出された。また PIC の反応系を、オープンクロマチン領域をゲノムワイドに解析する技術 (ATAC-seq) にも実装し、少数細胞のオープンクロマチン情報を光照射によって検出することに成功した。本研究開発により、組織の局所領域におけるトランスクリプトームとレギュローム情報を光照射によって抽出する技術が開発された。

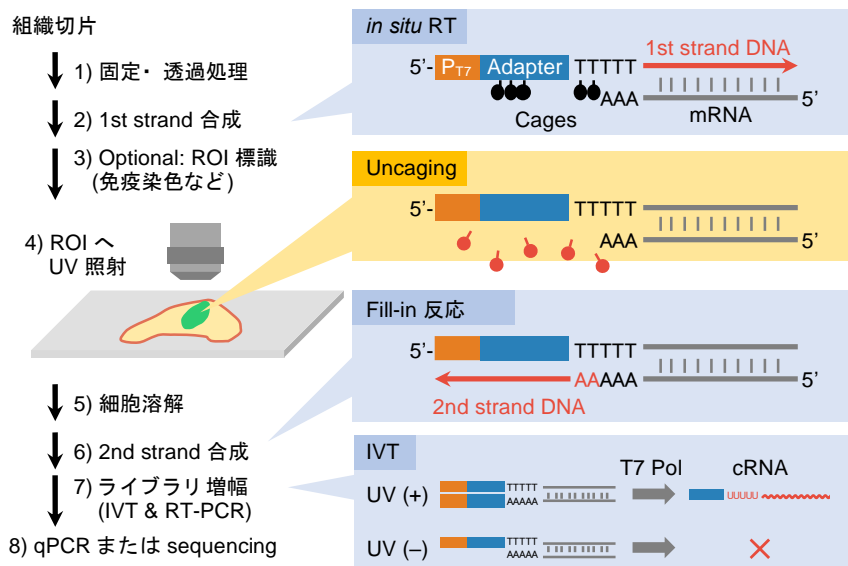
## (2) 詳細

### 研究テーマ A「PIC によるトランスクリプトーム解析技術の開発」

「位置情報レコーディング技術」の反応系を Photo-Isolation Chemistry (PIC) と名づけ、光照射領域特異的なトランスクリプトーム解析手法を構築した。最適化の結果、以下のステップからなる手法を開発した(下図)。

- 1) 組織切片の固定・透過処理
- 2) Poly T 配列を含み、光開裂型のブロッカーで修飾したオリゴ DNA を逆転写酵素とともに切片へ滴下し、*in situ* で逆転写反応
- 3) 任意:免疫染色をおこなうことで関心領域(ROI)を厳密に標識
- 4) ROI へ 365nm 付近の光を照射
- 5) Protease で細胞を融解し、チューブに集める
- 6) 2nd strand DNA 合成。これにより、光照射でブロッカーが外れたものだけ、末端の T7promoter までが fill-in される
- 7) *In vitro* transcription (IVT) 反応。これにより光照射でブロッカーが外れたものだけから cRNA が合成され、その後の RT-PCR でさらに増幅される

8) 増幅された cDNA をシーケンスし、光照射した ROI の転写産物が検出される



PIC RNA-seq による検出感度を検討すべく、1, 10, 100, または 1,000 個の NIH3T3 細胞に UV 照射して RNA-seq した。光照射には、デジタルミラーデバイス (DMD; Mightex Polygon1000) とフル電動の正立蛍光顕微鏡 (Leica DM6B) を使用した。その結果、単一細胞からでも平均 8,349 個の遺伝子が検出された。また 10 細胞以上では約 15,000 遺伝子が検出されたため、10 細胞以上あれば定量的な解析ができることが示唆された。

つぎに、E14.5 マウス胚の神経管の dorsal, medial, ventral 側のいずれかの箇所直径約 75  $\mu\text{m}$  のスポット状の UV を照射し、それぞれのドメインで特異的な遺伝子発現プロファイルが得られるかどうかについて検討した。その結果、約 200 個の遺伝子が照射部位による優位な違いを認めた。そのうち、dorsal 側で高発現すると検出された *Zic1* や *Hoxb8* 遺伝子を *in situ* hybridization で調べたところ、予想通り神経管の背側で強い染色を認めた。これらの実験により、光照射領域で特異的に発現する遺伝子を検出するための実験系が確立できた。

また、成体マウスの脳を摘出し、海馬の CA1, CA3, または歯状回 (DG) に対し、DMD で UV 照射して PIC RNA-seq をおこなったところ、三群比較で 1,070 個の差次的発現遺伝子 (DEG) が検出された。海馬の遺伝子発現を RNA-seq と組織染色で網羅的に解析した論文 (Cembrowski, et al, eLife 2016) では、CA1/CA3 特異的遺伝子として *Wfs1*, *Ociad2*, *Dkk3*, DG 特異的遺伝子として *Prox1* と *Pdzd2* が図示されているが、それら全てについて一致する結果となっていたため、PIC の結果の信頼性をサポートすることができた。

次に、サブミクロンレベルの極小領域のトランスクリプトームに挑戦すべく、核内に存在する核スペックルマーカ (SC35) で染色し、陽性または陰性エリアに UV 照射して PIC を行った。その結果、両者間で 1,990 個の遺伝子に有意な発現差が検出された (FDR = 0.1)。その中には核スペックルの主要な構成 RNA である *MALAT1* 転写産物が含まれていた。また他にも局材が未知の遺伝子が多く含まれていたため、fluorescent *in situ* hybridization を行ったところ、核スペックルやその周縁における局在が確認された (*AKRT1C2*) ことから、PIC で得られた結果をイメージングで裏付けることができた。以上の成果は学術論文として報告された (Honda, et al., Nat Commun 2021)。

これまで、PIC RNA-seq 解析技術は新鮮凍結切片を対象として開発された。この実験で最もクリティカルなステップが、*in situ* 逆転写反応前に行う透過処理である。これまでに 0.1N HCl に組織切片を 10 分間浸漬することで逆転写効率を 100 倍近く向上できていたが、PFA で固定した組織に対してはほとんど効果がなかった。そこで、*in situ* 逆転写反応をおこなう他の技術の論文を参考にしたところ、切片を Tris-EDTA に浸漬して 70 度で 1 時間加熱することでも逆転写効率を数十倍も向上できることに成功した。そこでこのスペックを確認するため、マウス海馬領域の新鮮凍結切片と、PFA 固定した凍結またはパラフィン切片を作製し、CA1, CA3, 歯状回のいずれかに光照射して PIC RNA-seq 解析をおこなった。その結果、検出される UMI 数や遺伝子数は新鮮凍結切片が最も優れてはいたが、PFA 固定した凍結またはパラフィン切片においても各領域マーカーが統計学的に有意な特異的発現遺伝子として検出された。これらの結果より、PIC は未固定だけでなくホルマリン固定したサンプルでも局所的トランスクリプトーム解析ができるため、臨床サンプルの解析への応用性が示唆された。以上の結果は学術論文として報告された (Honda, *et al.*, STAR Protoc 2021)。

#### 研究テーマ B「局所領域におけるレギュローム解析技術の開発」

ChIL-seq は九州大学の 大川 恭行 教授らのグループが開発した技術で、ChIP-seq よりもはるかに少ない細胞でタンパク質-クロマチン相互作用をゲノムワイドに調べることができる。また ATAC-seq はオープンクロマチン領域をゲノムワイドに解析できる技術である。本研究開発により、PIC のケミストリーを ChIL-seq と ATAC-seq に実装し、光照射された細胞におけるヒストン修飾やオープンクロマチン情報の取得に成功した。

今後、PIC ATAC-seq や ChIL-seq 技術によってマウス胚や病理組織において、細胞タイプ特異的なエンハンサー領域や転写因子結合を予測するため、これまでに開発していた ChIP-seq データベース (ChIP-Atlas) のデータを更新した。この 3 年間で約 10 万件もの ChIP-seq データを収集して再解析し、のべ 20 億件のゲノム-タンパク質相互作用を公開した。また、約 6 万件の ATAC-seq と 5 万件の Bisulfite-seq データも同様に再解析して、のべ 10 億件ものオープンクロマチン領域や高・低メチル化領域を特定し、公開した。これらの成果は論文として報告し (Zou, *et al.*, Nucleic Acids Res 2022)、さらに薬剤の作用機序の解明に活用した (Zou, *et al.*, BMC Bioinform 2022)。

### 3. 今後の展開

現在の PIC RNA-seq 法は、mRNA の poly-A 末端付近しか検出できない。今後は、非 poly-A RNA をも含む、RNA 全長を検出できるような技術を開発する。また、現在の PIC 法では一光子励起で脱ケージさせるため、焦点面の上下にも光が当たり、コンタミとして検出されてしまう。今後は二光子励起によって脱ケージ可能な PIC 技術を開発する。また、臨床サンプルの解析もすでに始めており、病変細胞の新規マーカー遺伝子やゲノム変異の同定するための技術として普及させる。

### 4. 自己評価

本研究開発により、当初の目標はほぼ全て達成することができた。今後はこれらの技術を学術

論文として発表する。PIC RNA-seq による共同研究をすでに 30 件以上進めており、腎臓、心筋、膵臓、脳、血管、骨格筋、前立腺、網膜、オルガノイド、再生芽、ウイルス感染細胞、などにおける微小領域のトランスクリプトーム情報の抽出に成功している。さらに、健常と病変組織の比較や、加齢に伴う変化なども解析することに成功している。本さきがけ研究の成果が認められ、学会での招待講演が増え、空間トランスクリプトーム分野のトップランナーの一人として注目されるようになった。また、本さきがけ研究の成果により、JST ERATO「有田リポドームアトラスプロジェクト」にサブグループリーダーとして参画し、また AMED PRIME「根本的な老化メカニズムの理解と破綻に伴う疾患機序解明」領域の研究代表者として採択された。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:15件

1. Honda, M. <sup>#</sup> , Oki, S. <sup>*,</sup> Kimura, R., Harada, A., Maehara, K., Tanaka, K., Meno, C., Ohkawa, Y.* High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. Nat Commun. 12(1), 4416, 2021. ( <sup>#</sup> Co-first, *Corresponding authors)
PIC RNA-seq の初出論文。PIC の原理証明実験により、光照射された領域のみのトランスクリプトーム情報が取得できることを示した。本技術を活用し、マウス胚の神経管、マウス成体脳の海馬領域、HeLa 細胞の核スペックルとストレス顆粒における空間トランスクリプトーム情報の取得に成功した。
2. Honda, M., Kimura, R., Harada, A., Maehara, K., Tanaka, K., Ohkawa, Y.*, Oki, S.* Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections. STAR Protoc. 3(2), 101346, 2022. (*Corresponding authors)
PIC RNA-seq のプロトコル論文。本技術の詳細なプロトコルを示すと共に、ホルマリン固定した凍結およびパラフィン切片の解析方法を新たに追加した。
3. Zou, Z., Ohta, T., Miura, F., Oki, S.* ChIP-Atlas 2021 update: a data-mining suite for exploring epigenomic landscapes by fully integrating ChIP-seq, ATAC-seq and Bisulfite-seq data. Nucleic Acids Res. 50(W1), W175-W182, 2022. (*Corresponding author)
ChIP-seq データベース(ChIP-Atlas)のデータを更新し、この3年間で約 10 万件の ChIP-seq データを収集して再解析し、のべ 20 億件のゲノム-タンパク質相互作用を公開した。また、約 6 万件の ATAC-seq と 5 万件の Bisulfite-seq データも同様に再解析して、のべ 10 億件ものオープンクロマチン領域や高・低メチル化領域を特定し、公開した。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:0 件(特許公開前のもも含む)

### (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)

#### 学会発表(招待)

沖 真弥. Data-driven and technical approaches to understand spatial gene regulation. 第 43 回日本分子生物学会年会. 2020/12/3.

沖 真弥. Photo-isolation chemistry による局所的高深度トランスクリプトーム解析. 第 127

回日本解剖学会. 2022/3/27.

**著作物**

沖 真弥, 大川恭行. 概論:空間トランスクリプトーム技術の最前線. 実験医学. 39(14), 2021.

Oki, S., Ohta, T. ChIP-Atlas. Practical Guide to Life Science Databases. 2021.

**プレスリリース**

JST, 九州大学, 京都大学. 光照射を用いた超高解像度な遺伝子解析技術の開発に成功. 2021/07/21.