

研究終了報告書

「化学的手法を用いて空間的な発現制御を解明する」

研究期間: 2020 年 10 月～2023 年 3 月

研究者: 本田 瑞季

加速フェーズ期間: 2023 年 4 月～2024 年 3 月

1. 研究のねらい

脳は時空間的に厳密に定められた遺伝子発現やその制御システムに従って形成されるため、その仕組みを正確に理解するためには、空間情報に紐づくプロファイリング技術が必要である。そこで、本研究では、空間的な遺伝子発現制御の仕組みを理解するため、光学と光開裂型のケージド化合物を上手く活用し、組織切片上の光照射した領域だけのトランスクリプトームやレギュローム情報の抽出が可能な化学的手法（光単離化学, Photo-Isolation Chemistry; PIC）を開発する。さらに、本技術を活用し脳領域固有のゲノミクスプロファイルを作成することで、脳領域特異的な遺伝子発現とその制御機構の解明も目指す。また、加速フェーズでは、PIC のマルチプレックス化を目的とした新たな PIC レギュローム解析技術の開発を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

多細胞システムの空間的な相互作用の理解において、空間情報にひもづくプロファイリング技術が必要である。空間オミクス技術の発展により、空間情報に基づくトランスクリプトーム情報は取得できるが、その発現制御のしくみは解明できない。そこで、本研究では光照射したエリアのみのレギュローム情報を引き出すことが可能な新技術、光単離化学（PIC）-レギュローム解析法をする。そのため、既存の ATAC-seq や WGBS、ChIL-seq などのレギュローム解析技術に、光開裂性の化合物を含んだ caged オリゴ DNA を組み込むことで、光照射依存的にライブラリ増幅が可能な技術基盤を構築する（図1）。また、この反応系を脳の組織切片に適用し、各脳領域に光照射することで、領域固有の遺伝子発現とレギュローム情報を取得する。これにより脳の空間的な遺伝子発現だけでなく、その発現制御のしくみを理解する。

2020 年度は、組織切片にさまざまな前処理を施すことにより切片上で ATAC-seq（オープンクロマチン解析）や WGBS（全ゲノム DNA メチル化解析）ができる実験系を確立した。また、切片上の微小領域に正確に光照射するため、デジタルミラーデバイスを用いた光照射システムを構築した（Honda *et al.* *Nat. Commun.* 2021）。

2021 年度は、固定された臓器や組織から空間的なトランスクリプトーム情報を取得できる実験系を構築した（Honda *et al.* *STAR protoc.* 2022）。また、PIC を ATAC-seq や WGBS に加え、ChIL-seq（転写因子のゲノム領域への結合やクロマチン修飾状態の測定技術）にも実装することに成功した（未発表）。

組織切片上の光照射領域に限定したレギュローム解析技術 (PIC-regulomics) の確立

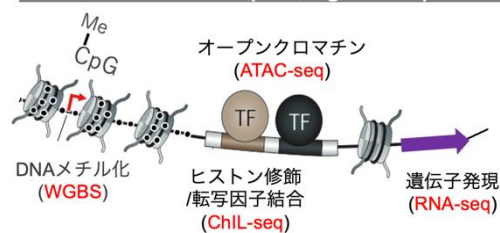


図1. 本研究提案で開発する技術

2022年度は、PICレギュローム解析技術の高度化を進め、1細胞レベルでのライブラリ合成に成功し、高解像度かつ高感度の解析技術を構築した。

加速フェーズ(2023年度)では、PIC ChIL-seq のマルチプレックス化を進め、複数の抗体を同時使用した PIC multi-ChIL-seq の技術基盤を構築した。

(2) 詳細

● 光照射システムの超高解像度化

PIC の解像度は光照射領域に依存するため、関心領域により正確に光照射できるシステムが必要である。これまでの開発では、正立顕微鏡の対物レンズと蛍光視野絞りを活用し、最小で直径 $15\ \mu\text{m}$ のスポット状の光照射により PIC を行ってきた。しかし、脳の空間的な発現制御を解明するには、さらに小さい領域、かつ、任意の形状の関心領域 (ROI) の光照射が求められる。そこで、デジタルミラーデバイス (DMD) を用いた光照射システムを構築した。これにより、成体マウス脳の海馬領域などのマクロ領域から核内構造体などのミクロな領域にまで絞った光照射が可能となった (図2)。

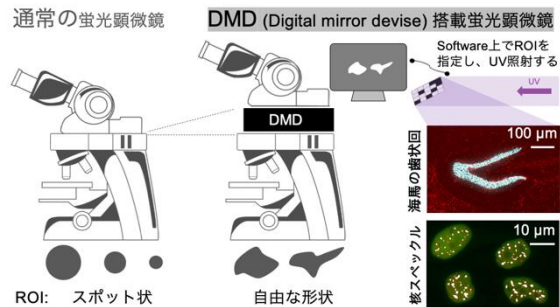


図2: DMDを用いた光照射システムの構築

図3: 成体マウス海馬領域 (CA1, CA3, 歯状回) における PIC RNA-seq

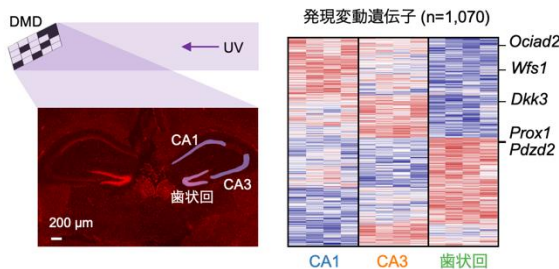
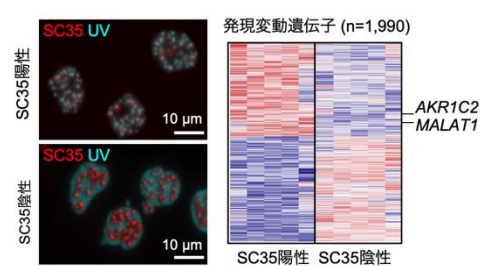


図4: 核スペckル (HeLa 細胞) における PIC RNA-seq



そこで、DMD によるマイクロパターン照明を用いて成体マウス脳の海馬領域 CA1、CA3、歯状回のいずれかに UV 照射し、PIC RNA-seq を行なった。その結果、三群間比較より 1,070 個の発現変動遺伝子 (DEG) を検出することに成功した (図3)。また、ここで抽出した領域特異的な遺伝子発現プロファイルは、海馬の各領域の遺伝子発現を RNA-seq で調べた既報論文 (Cembrowski *et al.*, *eLife* 2016) と比較しても、リーズナブルな結果であることが示された。上記実験に加え核内構造体の一つである核スペckル (SC35 陽性) や核スペckル以外の核内領域 (SC35 陰性) だけに光照射を限局した PIC RNA-seq も実施した。両者間の比較解析から 1,990 個の DEG が検出され、その中には、核スペckルの主要な構成 RNA である *MALAT1* も含まれていた (図4)。この他にも局在が未知の遺伝子が多数確認されたため、その中でも特に発現が高かった *AKR1C2* を RNA-FISH を用いて確認したところ、核スペckルやその周縁に局在することを確認した。以上より、数百 nm の極小領域でも光照射を厳密に制御できることが示された。

●PIC ATAC-seq のための基盤技術の確立

ATAC-seq 法は、オープンクロマチン領域を同定できる技術である。この手法は、オリゴ DNA が Tn5 トランスポゼースによってオープンクロマチン領域に選択的に挿入される性質を利用するため、Tn5 で挿入されるオリゴ DNA に光開裂型のケージド化合物を挿入することに

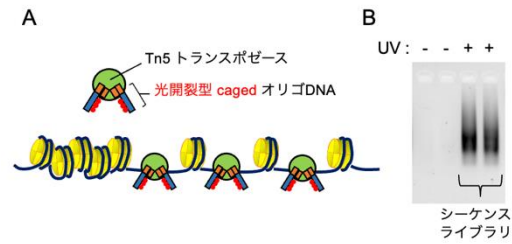


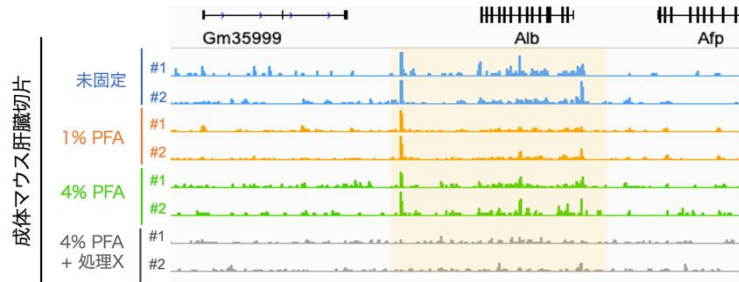
図 5: UV照射依存的なATAC-seqライブラリ合成

した(図5A)。これを組織切片に導入し、切片全体に UV 照射したところ、UV 照射依存的にライブラリ合成できることが確認できた(図5B)。しかし、核抽出したサンプル(通常の ATAC-seq)に比べ、ホルマリン固定した組織切片や細胞では、Tn5 トランスポゼースのゲノムへの挿入効率が悪く、検出感度に問題があることが判明した。そこで、オリゴ DNA 配列をわずかに改変することで、ライブラリ合成効率を最大限にまで引き上げることが可能な実験系を確立した。これによりホルマリン固定や透過処理を施した組織切片においてもライブラリ量を数百倍に増幅することが可能となり、少数細胞からでも十分なシーケンスライブラリを得ることに成功した。また、これらのライブラリをシーケンス解析したところ、固定濃度や固定の有無にかかわらず同様のオープンクロマチン情報を得ることができた(図6 ; 青, オレンジ, 緑)。

●PIC WGBS の開発

図6. PIC ATAC-seq / WGBSのための切片に対する前処理とタグメンテーション効率の評価

WGBS の場合もオリゴ DNA を Tn5 トランスポゼースによってゲノム DNA に挿入するが、ATAC-seq とは異なり、オープンクロマチン領域だけでなく閉じた



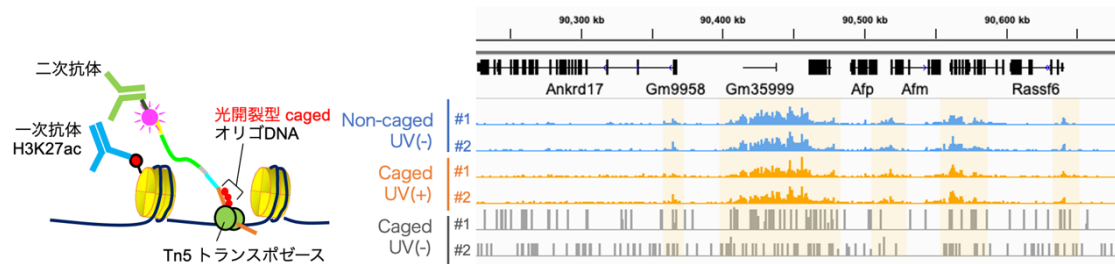
領域にも満遍なく挿入する必要がある。そこで、固定した組織切片にある Permeabilization 処理 (処理 X) を施すことでクロマチンの高次構造を緩め、その後に Tn5 トランスポゼースを用いたタグメンテーションを行うことにした。これらをシーケンスしたところ、リード数やマップ率は未処理のものと変わらないものの、アライメントがゲノム全体に均一化されることを確認した(図6; 灰色)。したがって、処理 X によりオープンクロマチン領域に偏らないアンバイアスなタグメンテーションが可能であることが示唆された。

●PIC ChIL-seq の開発

ChIL-seq は、1細胞レベルでのヒストン修飾解析が可能な ChIP-seq に変わる技術である。この手法もまた、ATAC-seq や WGBS と同様、Tn5 トランスポゼースを用いて、抗体に連結されたオリゴ DNA (ChIL プローブ) をゲノムに挿入するため、光開裂型のケージド化合物を付加した ChIL-probe を作製した。これを用いて成体マウス肝臓切片における H3K27ac の PIC ChIL-seq を行ったところ、光照射なしでは、得られたリード数も少なくスパースな分布が認められた(図7 ; 灰色)。一方、光照射ありの場合(図7 ; オレンジ)では、通常の ChIL-seq(図7 ; 青)とほぼ同様の分布が認められた。以上の結果より、光照射依存的に ChIL-seq の反応を制御できることが

示された。

図7: 成体マウス肝臓切片における H3K27ac の PIC ChIL-seq の結果



●PIC RNA-seq の改良

ホルマリン固定した組織切片に対し、さまざまな前処理条件を検討し、Tris-EDTA buffer (pH8)による加熱反応を行うことで、固定した凍結切片やパラフィン切片においても、効率よくPIC RNA-seq ライブラリが合成できることを発見した(図8: 上段)。原理証明実験として、空間オミクスで良くベンチマークテストとして行われている、マウス海馬の CA1、CA3、歯状回領域に限定した PIC RNA-seq 解析を実施した。これらのデータのクラスタリング解析より、未固定凍結切片と同様、ホルマリン固定した凍結切片やパラフィン切片においても、領域ごとに分離できていることが確認できた(図8: 下段)。また、領域特異的なマーカー遺伝子の検出にも成功した。以上の結果より、ホルマリン固定した切片やパラフィン切片においても PIC RNA-seq 解析可能であることを実証した。

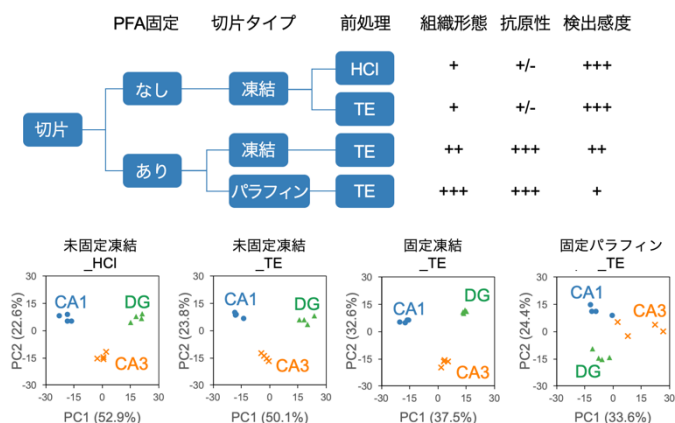


図8. 未固定凍結、固定凍結、固定パラフィン切片の海馬領域における PIC RNA-seq 解析

●PIC-レギュローム解析技術の高感度化

Permeabilization 処理の条件やライブラリ合成条件の検討を行い、1細胞からNGS解析に十分なライブラリ量を合成することに成功した。また、NGS解析により、NIH3T3細胞を用いたH3K27acに対するPIC ChIL-seqの検出スペックを評価したところ、1細胞から検出できることを確認した(図9)。

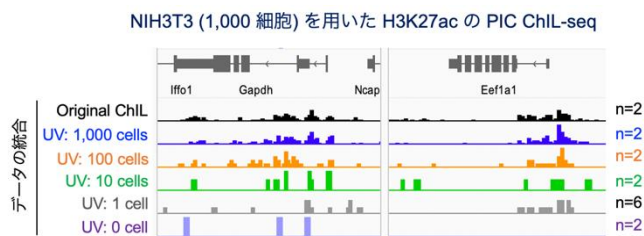
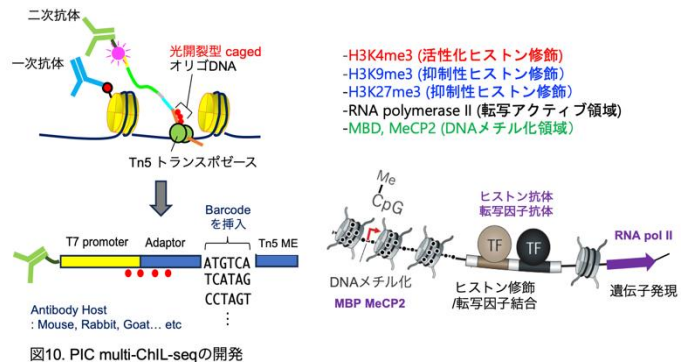


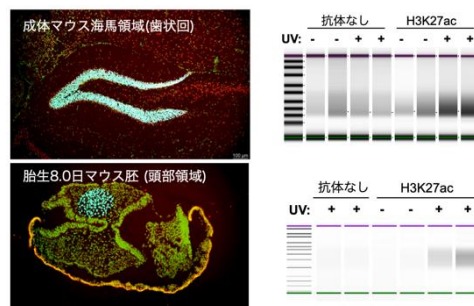
図9. PIC-レギュローム解析の高感度化 (1細胞から解析可能)

●PIC multi ChIL-seq 法の確立(加速フェーズの成果)

遺伝子発現と複数のクロマチン修飾を同時検出できるシステムを構築するため、異なるホスト（マウス、ウサギ、ヤギなど）の NPOM ChIL probe に異なるバーコード配列を挿入した ChIL probe (PIC multi-ChIL probe) を作製した(図 10)。また、H3K27ac 抗体で一次抗体反応した成体マウス脳切片に対し、この PIC



multi-ChIL probe を用いて二次抗体反応を行った後、海馬の歯状回に光照射し、ライブラリ合成を行った。その結果、UV 照射依存的なライブラリが合成できることを確認した(図 11:上段)。さらに、この probe を胎生 8.0 日のマウス胚で反応させ、頭部領域(約 80 細胞)に限定した光照射を行ったところ、マウス胚においても UV 照射に依存したライブラリが合成できることを確認した(図 11:下段)。これらのバーコードは、シーケンスによ



って識別可能であるため、転写中の遺伝子近傍に結合する RNA polymerase II 抗体とヒストン修飾抗体を同時使用することが可能である。したがって、転写中の遺伝子発現とクロマチン修飾を同時にプロファイリングできることが期待できる。

3. 今後の展開

本領域にて、光学と光開裂性の化合物をシーケンスライブラリ増幅反応に活用するという独創的なアイデアで、空間情報に基づいたトランスクリプトームだけでなく、レギュローム情報の取得も可能な技術、PIC-レギュローム法を開発した。この技術の肝となるのが、光開裂性ケージド化合物を付加したオリゴ DNA である。また、PIC の特徴は、免疫染色により照射領域や細胞タイプを厳密に定義できることである。これにより、組織学的解析後に興味のある細胞だけを標的とした解析ができる。さらに、DMD による光照射システムを用いることで、好きな形状の ROI や、回折限界のサブミクロンオーダーの ROI の解析ができる。そのため、複数の細胞タイプが混在する脳のような組織においても狙った細胞に限定した解析ができることも本技術の強みである。

しかし、現行の PIC 技術は Z 軸方向の分解能に乏しく、焦点面の上下からのコンタミが避けられない。特に、本研究課題でも解析対象としている脳組織では、神経細胞やグリア細胞、血管などが密なコミュニケーションをとっている。そのため、脳切片上の特定の細胞タイプのみを対象とした解析を実施するには光照射時の上下のコンタミを防ぐ必要がある。そこで、今後は二光子励起によって開裂できるケージド化合物を付加したオリゴ DNA を用い、**Z 軸分解能を向上した二光子 PIC の開発**にも挑戦する。また、これが達成できれば、三次元的な光照射も原理上可能である。したがって、立体的な組織、例えばマウス胚丸ごとやオルガノイド、また透明化技術と組み合わせることで、生体組織の三次元的な空間プロファイリングも可能である。このように、自身の使命として自由な発想で多様なニーズに応える新技術の開発をしていきたい。

4. 自己評価

初年度(2020 年度)に当初の達成目標である光照射領域に限定したエピゲノム解析法、PIC ATAC-seq(オープンクロマチン解析)や WGBS (DNA メチル化解析)の基盤技術を確立した。そこで、2021 年度のチャレンジ支援により、ATAC-seq や WGBS 技術に加え、転写因子のゲノムへの結合状態やクロマチン修飾状態が測定可能な ChIL-seq への応用にもチャレンジした。PIC 法では、光開裂性のブロッカーNPOM のオリゴ DNA への挿入箇所や挿入数が重要であるため、NPOM 挿入 ChIL プローブを複数合成し、PIC ChIL-seq に最適な NPOM 挿入オリゴを決定することに成功した。また、当初の計画では、1,000 細胞くらいの検出力を目標に PIC ChIL-seq の開発を進めていたが、1細胞でもシーケンスに十分なライブラリを合成できることが判明した。そこで、2022 年度のチャレンジ支援により、追加のシーケンス代を計上し、NGS 解析により検出スペックの評価を行なった。その結果、1細胞からでも H3K27ac に対する PIC ChIL-seq が可能であることを実証できた。以上により、高解像度かつ高感度に空間的な遺伝子発現やその制御機構を解明できる新技術を開発することに成功した。これに加え、**2023 年度の加速フェーズ**では、PIC ChIL-seq のさらなる改良を行い、複数のヒストン修飾と遺伝子発現を同時検出できる基盤技術を構築した。

また、本技術では光開裂性のケージド化合物を付加したオリゴ DNA が必要となるが、これら技術はすべて既存法をベースに開発しているため、技術導入のためのハードルはきわめて低い。したがって、生物学的研究だけにとどまらず、例えば、COVID-19による炎症組織や、腫瘍病理組織の解析なども誰でも簡単に行うことができるため、国際的な普及が見込まれる。

実際に PIC RNA-seq を開発して以降、60 名以上の研究者(海外を含む)や臨床医と PIC に関する共同研究を進め、脳・脊髄、腎臓、膵臓、筋肉、大動脈、心筋細胞、眼球、組織オルガノイド、がん細胞、ニューロン軸索の特定部位などを対象とした RNA-seq 解析の実績を積むことができた。今後は、本領域で開発した PIC-レギュローム解析の支援も積極的に行い、技術のさらなるブラッシュアップとバイオロジー研究への応用を行なっていきたい。

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: 3件

1. **Mizuki Honda**, Ryuichi Kimura, Shinya Oki, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Kaori Tanaka, Chikara Meno, Yasuyuki Ohkawa. High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nature Communications* (2021), 12(1):4416.

組織切片上の光照射した領域に限定可能な高深度かつ高解像度な新たな空間トランスクリプトーム法、光単離化学(Photo-Isolation Chemistry;PIC)を開発した。これを用い、神経管や海馬の特定領域、さらには細胞核内の数百 nm ほどの核スペックルに含まれる mRNA の高深度解析に成功した。

2. Sayako Katada, Jun Takouda, Takumi Nakagawa, **Mizuki Honda**, Katsuhide Igarashi, Takuya Imamura, Yasuyuki Ohkawa, Shoko Sato, Hitoshi Kurumizaka, Kinichi Nakashima. Neural

stem/precursor cells dynamically change their epigenetic landscape to differentially respond to BMP signaling for fate switching during brain development. *Genes & Development* (2021), 35(21-22):1431-1444.

脳形成において神経幹細胞は適切なタイミングで決まった細胞タイプを産生する必要があるが、この発生時期固有の分化転換機構は不明であった。そこで、異なる発生時期の神経幹細胞を単離し、さまざまなオミクス解析を実施した。その結果、神経幹細胞が発生時期に応じて、クロマチン構造を適切に変化させ、また時期依存的に異なる転写因子とパートナーになることで、産生する細胞種を時空間的に厳密に制御することを明らかにした。

3. Mizuki Honda, Ryuichi Kimura, Akihito Harada, Kazumitsu Maehara, Kaori Tanaka, Yasuyuki Ohkawa, Shinya Oki. Photo-isolation chemistry for high-resolution and deep spatial transcriptome with mouse tissue sections. *STAR Protocols* (2022), 3(2):101346.

2021 年に *Nature Communications* 誌で公開した従来の PIC 法は、培養細胞と未固定新鮮凍結切片のみの適応であった。そこで、切片に対する新たな透過処理などの改良を進め、ホルマリン固定した凍結・パラフィン切片にも適応可能な技術として発展させた。

(2) 特許出願

該当なし

(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)

【招待講演】

1. 本田 瑞季 「光照射した領域に限定した高深度空間トランスクリプトーム法の開発」

早稲田大学講演会, 2021 年 2 月

2. 本田 瑞季 「光照射した領域に限定した高深度空間トランスクリプトーム法の開発」

第 64 回日本神経化学学会大会 シンポジウム, 2021 年 12 月

3. 本田 瑞季 「Photo-Isolation Chemistry による高解像度かつ高深度空間トランスクリプトーム解析」, 名古屋市立大学 第 14 回 IBS セミナー, 2021 年 12 月

4. 本田 瑞季 「ミクロ組織を踏まえた空間的トランスクリプトーム」

第 39 回 日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2023 年 1 月

【招待講演: 加速フェーズ実施の成果】

1. 本田 瑞季 「ミクロ組織を踏まえた高深度空間トランスクリプトーム技術」

広島大学 統合生命科学研究科セミナー, 2023 年 4 月

2. 本田 瑞季 「光の魔法: 光で分子情報を PICK UP」

Scienc-ome, 2023 年 7 月

3. 本田 瑞季 「マイクロ組織を踏まえた 高深度空間トランスクリプトミクス」
日本プロテオーム学会 2023 年大会, 2023 年 7 月
4. Mizuki Honda 「High-resolution and deep Spatial transcriptomics based on microstructure」
IRCMS Symposium, 2023 年 9 月
5. 本田 瑞季 「マイクロ組織を踏まえた高深度空間トランスクリプトミクス」
第 96 回 日本生化学会大会, 2023 年 11 月
6. 本田 瑞季 「マイクロ組織を踏まえた高解像度かつ 高深度空間トランスクリプトーム技術」
第 6 回 医薬品毒性機序研究会, 2023 年 12 月
7. 本田 瑞季 「Photo-Isolation Chemistry を活用した組織内遺伝子発現の空間的定量解析」 定量生物学の会 第 11 回年会, 2024 年 1 月
8. 本田 瑞季 「マイクロ組織を踏まえた 高深度空間レギュロミクス」
日本薬学会第 144 年会, 2024 年 3 月

【著作物】

1. 本田 瑞季, 沖 真弥 「Photo-Isolation Chemistry : 光照射による高解像度かつ高感度なトランスクリプトーム技術」 実験医学 39(14), 2021 年 9 月号
2. 本田 瑞季, 沖 真弥 「空間トランスクリプトミクス」 生物工学会誌 第 100 巻 創立 100 周年特別企画・若手研究者が拓くこれからの生物工学(後編), 2022 年 6 月号
3. 本田 瑞季, 沖 真弥 「空間トランスクリプトーム技術」 月刊細胞 第 100 巻 55(7)(8-11), 特集 1 細胞解析技術, (2023) 6 月号, 加速フェーズ実施の成果