

抗体をエンドエフェクタとした光ピンセットによる クロマチンファイバーの高次構造解析

Analysis of higher-order structure of chromatin fiber
using optically driven beads conjugated with antibody end effector

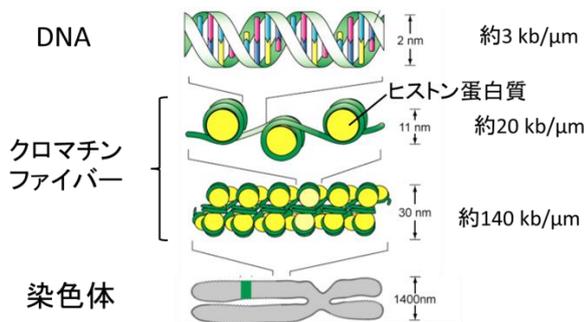
学籍番号 37-126844 氏名 若林 貴之

指導教員 鷲津 正夫 教授

概要: 本研究の目的は、1細胞から取り出した単分子クロマチンファイバーを観察し続け、クロマチンファイバー周囲の溶液条件を変更する事による、クロマチンファイバー高次構造の変化についての知見を得る事である。今回、1細胞から取り出したクロマチンファイバーを、顕微鏡下、マイクロ流路内で光ピンセット操作するための、抗体をエンドエフェクタとした抗体修飾マイクロビーズを提案・作製し、そのビーズを操作してクロマチンファイバーをマイクロ流路内の観察場まで移動させた上で、クロマチンファイバー周囲の塩濃度条件を変更することによる高次構造変化を観察した。結果、塩濃度を0.2 M→0.5 M→1 Mと変化させた時、1細胞から取り出したクロマチンファイバーが、0.5 M→1 Mの塩濃度変化に応答して伸長する挙動を、リアルタイムに観察出来た。

1. 背景・研究目的

遺伝情報の担い手である DNA は、ヒストン蛋白質と複合体を形成して核内に収められている。この複合体の構成単位をヌクレオソームと呼ぶ。ヌクレオソームはファイバー状のクロマチン構造を形成し、染色体内で1分子として連なっている。1分子として連なっているクロマチンファイバー周囲の溶液条件を変更する事による、クロマチンファイバー高次構造変化について、その階層性についてのモデルは提唱されているものの、階層間の転移挙動については十分に理解されていない (図1)。



溶液条件・修飾が、各階層に与える影響は十分に理解されていない

図1 クロマチン高次構造の階層性

クロマチンファイバー高次構造変化を調べるためには、まず、細胞からクロマチンファイバーを無侵襲に細胞から露出させ、扱う必要がある。従来の試験管を用いたクロマチンファイバー取り出し法では、そのプロトコル中のピペット操作により、クロマチンファイバーが断片化してしまい、1分子での高次構造変化観察は出来ないという課題がある (図2)。

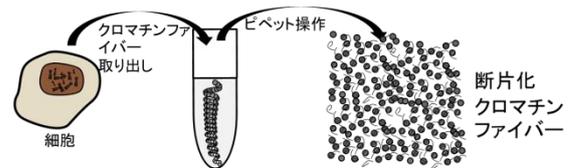


図2 試験管を用いたクロマチンファイバー取り出し

上記課題解決のため、当研究室では、過去に、微細加工技術を用いて作製した、ポケット付きマイクロ流体デバイスを用いて、細胞からクロマチンファイバーを断片化することなく取り出す手法を提案した^[1]。マイクロ流路に退避構造(ポケット)を設け、等張液下でポケット内に細胞を導入する。その後、メインの流路に低張液を導入することで、ポケット内の細胞が流失することなくポケット内部の浸透圧を下げる事が出来るため、断片化していないクロマチンファイバーを得ることが出来た (図3)。

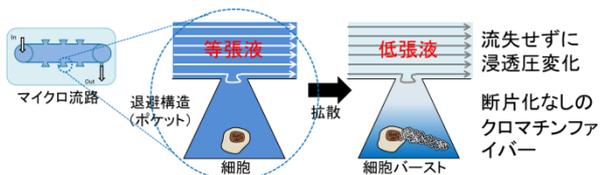


図3 退避構造付きマイクロ流路を用いたクロマチンファイバー取り出し

先行研究の手法で得られたクロマチンファイバーについて、ポケット内部でのランダムコイルの状態では、その高次構造観察は難しく、メインの流路内において弱い流れがある状態で、直鎖状に展開させて観察する必要がある。そのためには、ポケット内部からメインの流路内までクロマチンファイバーを搬送し、流路上に固定出来なければならない(図4)。

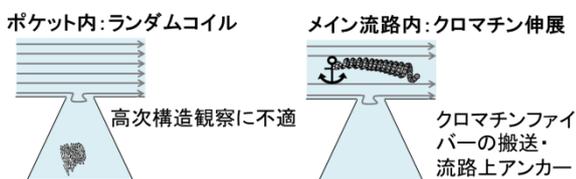


図4 クロマチンファイバー観察方法

ところが、光ピンセット法で、クロマチンファイバーを直に捕捉することは難しかった。そのため先行研究では、ポケット部分で得られたクロマチンファイバーを活用出来ず、マイクロ流路内にバーストさせた細胞を導入し、流路内に設置されたピラーに偶然引っかかった細胞複数個分のクロマチンファイバーを観察することとした。クロマチンファイバー周囲の塩濃度を上げると、プラスチャージのヒストンと、マイナスチャージのDNAとの静電相互作用が弱まり、クロマチンファイバーが解れる。先行研究において、塩濃度を1Mから2Mに変化させると、クロマチンファイバーからヒストン蛋白質が外れて伸長する現象を定性的に観察することが出来た^[4]。

先行研究の課題は、ポケット部分で得られた1細胞分のクロマチンファイバーを、流れのあるマイクロ流路内まで個別に搬送・固定出来なかったことにより、溶液条件変更時における1細胞分のクロマチンファイバー高次構造変化を解析出来なかったことである。

本研究では、周囲の溶液条件を制御しながら、個々のクロマチンファイバー高次構造変化を単分子レベ

ルで観察・解析するという目的に向け、先行研究の手法で得られたポケット部分での1細胞分のクロマチンファイバーを、流れのあるマイクロ流路内まで個別に搬送・固定するためのマイクロツールを提案し、塩濃度変更によるクロマチンファイバー高次構造変化についての知見を得ることとする。

2. 実験原理・手法

A. クロマチンファイバー取出・観察用デバイス

ソフトリソグラフィー技術を用いて、クロマチンファイバーを細胞から取り出し、弱い流れがある状態で観察するためのPDMS製マイクロ流体デバイスを作製した(図5)。

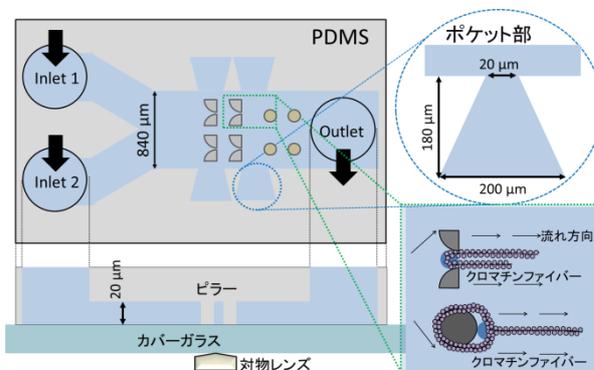


図5 クロマチンファイバー取り出し・観察用デバイス

このデバイスは主に2つの特徴からなる。1つ目は、先行研究と同手法を用いたクロマチンファイバー取り出しのためのポケット部分である。2つ目は、クロマチンファイバー高次構造観察のためのメインの流路内に設けられたピラー部分である。ポケット部分からピラー部分までのクロマチンファイバーの搬送・固定は、クロマチンファイバーと特異的に結合するマイクロビーズを光ピンセット操作することによって行う。ピラーは2種類あり、扇形のもの、円形または三角形のものがある。扇形のは、クロマチンファイバーが搬送時に比較的解れておらず短い場合の引っ掛けることによる固定用、円形または三角形のは、クロマチンファイバーが搬送時に比較的解れておらず長い場合の巻き付けることによる固定用である。クロマチンファイバーを固定した状態で、流す溶液組成を変更し、クロマチンファイバー周囲の溶液条件を変更可能なデバイスとなっている。

B. 抗体修飾マイクロビーズ

A で用いるための、クロマチンファイバーと特異的に結合するマイクロビーズについて述べる。本研究では、クロマチンファイバー上のヒストン蛋白質を抗原とする抗ヒストン抗体、または、クロマチンファイバーのテロメア部(末端)・セントロメア部(中央)のヒストン蛋白質に局在する Swi 6 蛋白質を抗原とする抗 Swi 6 抗体をエンドエフェクタとした、抗体修飾ビーズを提案する。抗体修飾ビーズを光ピンセット移動させ、ポケット内でランダムコイル状態のクロマチンファイバーを抗原抗体反応により捕捉し、メインの流路内に設置されたピラー部分まで搬送した上で、引っ掛ける、または、巻き付けることで、そのメインの流路内への固定が可能となる(図 6)。

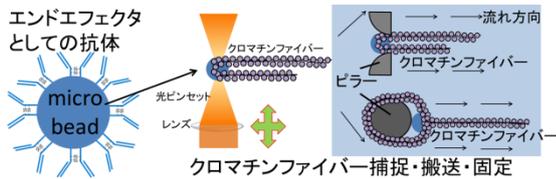


図 6 抗体修飾マイクロビーズとその使用法

C. 実験試料

本研究では、遺伝子組み換え分裂酵母 (3.5, 4.6, 5.7 Mb の 3 本の DNA を持つ) を用いた(図 7)。

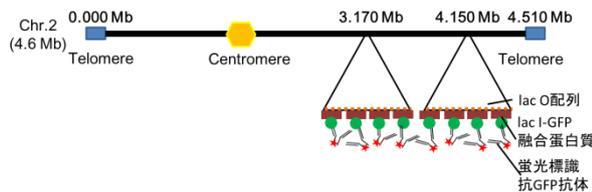


図 7 組換え分裂酵母(5.7 Mb, 4.6 Mb, 3.5 Mb)

この分裂酵母株は、2 番染色体の特定 2 箇所に lac O 配列が挿入されており、lac I-GFP が結合することで lac O 部分が可視化される^[2]。lac I-GFP 蛍光は、蛍光標識された抗 GFP 抗体で免疫染色させて蛍光を十分に明るくした上で観察を行うこととした。

可視化された lac O 部分が存在することで、固定されているクロマチンファイバーが、全体のどの部分かの目安を知ることが可能であるとともに、塩濃度変化時にクロマチンファイバーがどの程度解れたかの定量評価のための基準点ともなり得る。

3. 実験手順

2 で述べた実験原理・手法を用いた、クロマチンファイバー周囲の塩濃度変更による高次構造変化観察の実験手順を示す(図 8)。

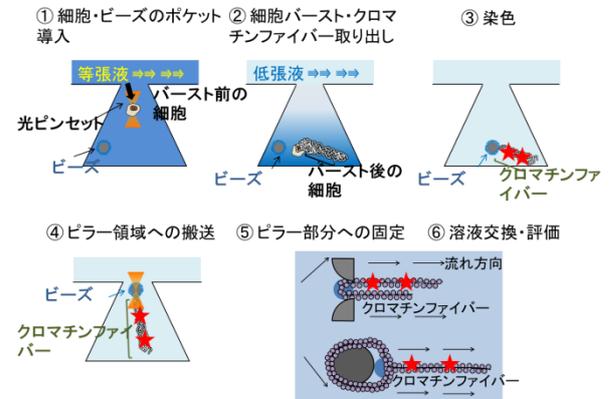


図 8 実験手順

まず、等張液下で、細胞壁除去済み(スフェロプラスト化)の分裂酵母細胞と、抗体修飾ビーズを、それぞれ光ピンセットを用いて流路のポケット部分に搬送させる(図 8 ①)。次に、メインの流路に低張液を導入し、細胞やビーズを流失させることなく、ポケット内を低張にして細胞をバーストさせる(図 8 ②)。さらに、メインの流路に DNA の染色色素や、蛍光標識された抗 GFP 抗体が含まれた溶液を導入し、DNA の可視化や lac I-GFP の蛍光輝度強化を行う(図 8 ③)。そして、メインの流路の流速を限りなくゆっくり一定に保った上で、抗体修飾ビーズを光ピンセット操作し、クロマチンファイバーを捕捉し、メインの流路内に設けられたピラー部分まで搬送する(図 8 ④)。その次に、クロマチンファイバーを、扇形ピラーに引っ掛ける、または、円形や三角形ピラーに巻き付けることで、流路上に固定する(図 8 ⑤)。その状態で、溶液を交換してクロマチンファイバー周囲の塩濃度を変更し、ピラー部分やビーズ部分、lac O 部分を基準点としながら、その位置変化を計測することで、クロマチンファイバー高次構造変化を評価する(図 8 ⑥)。

4. 実験結果・考察

マイクロ流体デバイス内において、提案した抗体修飾ビーズを光ピンセット操作することで、クロマチンファイバーを捕捉、およびピラー部分への搬送

が可能であることを確認した(図9).

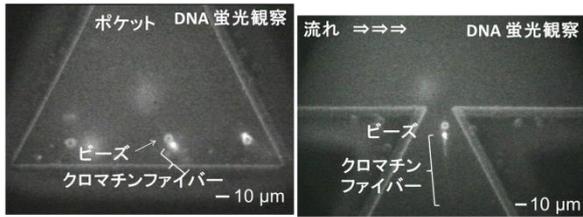


図9(a) 抗体修飾ビーズによるクロマチンファイバー捕捉
図9(b) 抗体修飾ビーズの光ピンセット操作によるクロマチンファイバー搬送

主流部のピラーにクロマチンファイバーを捕捉した抗体修飾ビーズを固定し、流れにより伸長したクロマチンファイバーを観察出来た。

クロマチンファイバーをメインの流路内で固定した状態で、弱い流れ(流速 $\approx 10^1 \mu\text{m/s}$)により伸長させた。この条件の下、流路の塩濃度を $0.2 \text{ M} \rightarrow 0.5 \text{ M} \rightarrow 1 \text{ M}$ と変化させた時の、クロマチンファイバー高次構造変化の実験例を示す(図10)。

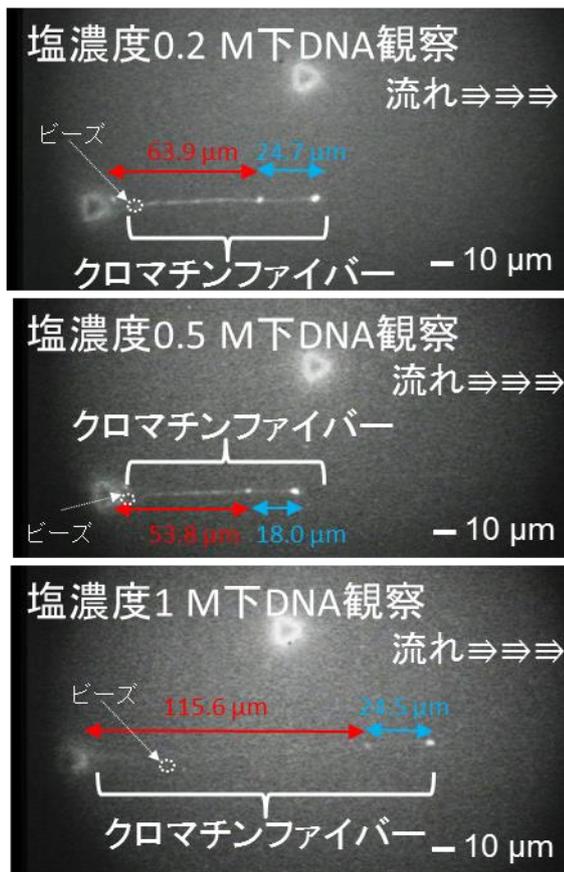


図10 塩濃度変化によるクロマチンファイバー高次構造変化の実験例

図10に示す実験例においては、塩濃度 $0.2 \text{ M} \rightarrow 0.5 \text{ M}$ の変化において、クロマチンファイバーの全長にほぼ変化はなかったが、塩濃度 $0.5 \text{ M} \rightarrow 1 \text{ M}$ の変化に

応答して、クロマチンファイバーの全長が伸びる挙動をリアルタイムで観察出来た。他の実験例においてもこの傾向は変わらず、塩濃度 $0.2 \text{ M} \rightarrow 0.5 \text{ M}$ よりも、塩濃度 $0.5 \text{ M} \rightarrow 1 \text{ M}$ の方が、クロマチンファイバーの伸長率は大きかった。

本実験例においては、図10に示すDNAの蛍光のうち、青矢印の両端付近の一際明るく光っている2点部分に、lac Oの位置を示す蛍光が確認されたが、蛍光輝度が弱い。他の実験例においても、lac Oの位置を示す蛍光の蛍光輝度は弱いまたは観察されず、lac O部分の可視化およびlac I-GFPの免疫染色による蛍光輝度強化については再現性が低い。

本実験例においては、図10の赤矢印部分の長さを変化したが、他の実験例においては青矢印部分の長さも変化する事もあった。これは、ビーズによるクロマチンファイバーの捕捉場所を、クロマチンファイバー上の同じ場所に出来ないためと考えられる。

多くの実験例において、塩濃度 1 M 以上ではクロマチンファイバーがビーズから外れて流失した。流速が十分小さい場合、ビーズとクロマチンファイバーの結合部分にかかる流れによる力は弱く、抗Swi6抗体の抗原抗体反応の結合力は強いことから、Swi6蛋白質とヒストン蛋白質との結合が、塩濃度上昇により弱くなり切れたと考えられる。

5. 結論

抗体をエンドエフェクタとしたマイクロビーズを光ピンセット操作することで、1細胞分のクロマチンファイバーの捕捉・搬送・流路内への固定を達成した。周囲の塩濃度を $0.2 \text{ M} \rightarrow 0.5 \text{ M} \rightarrow 1 \text{ M}$ と変化させた時、1細胞から取り出したクロマチンファイバーが、 $0.5 \text{ M} \rightarrow 1 \text{ M}$ の塩濃度変化に応答して伸長する挙動を、顕微鏡下でリアルタイムに観察出来た。

6. 今後の展望

塩濃度変化時に、クロマチンファイバーのどの遺伝子座部分の高次構造が変化するかを解明出来れば、クロマチン高次構造の階層間の転移挙動についての知見が得られる。

参考文献

- [1] 川畑健介, "微細流路を用いたクロマチンファイバー高次構造変化の計測", 東京大学, 学士論文, (2012)
- [2] Ding et al., The Journal of Cell Biology, 174(4), 499-508, (2006)