

プログラム名：セレンディピティの計画的創出による新価値創造

PM名：合田 圭介

プロジェクト名：一細胞トランスクリプトーム前処理技術の開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 27 年度

研究開発課題名：

一細胞トランスクリプトーム前処理技術の開発

研究開発機関名：

京都大学

研究開発責任者

新宅 博文

## I 当該年度における計画と成果

### 1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

当該年度の目標は一細胞の破砕，mRNA の抽出，mRNA の固定化，cDNA への逆転写を実施する前処理技術を開発し，シーケンサーと融合することである。以下に各要素技術に対する詳細な目標および計画を記す。

#### 1. 一細胞破砕・RNA 抽出技術と表面反応による mRNA の固定化

細胞の破砕から mRNA 固定化までの全てを集積化するマイクロ流体デバイスを試作し，現状の固定化効率を明らかにするとともに，関係する種々の物理定数を計測する。またバッファおよび種々の条件変更により効率および品質の向上を図る。

#### 2. 共濃縮による反応効率の向上

一細胞の破砕から mRNA の固定化までを 30 分程度に完了する方法を確立する。

#### 3. mRNA 収率の定量技術および遺伝子発現解析技術の確立

本年度は，mRNA 全体あるいは house keeping gene にターゲットを限定した定量化技術を確立する。また，一細胞の破砕から逆転写反応まで含めて約 2 時間で完了するマイクロ流体システムを構築する。

#### 4. シーケンサーとの融合(固定した mRNA の逆転写反応)

シーケンサーとの融合時に生じる問題点を洗い出し，課題解決に着手する。

### 2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

#### 2-1 進捗状況

#### 1. 一細胞破砕・RNA 抽出技術と表面反応による mRNA の固定化

マイクロ流体デバイスの設計・製作を行い，mRNA 抽出法と基板への mRNA 固定化を融合した。mRNA の品質を維持しつつ，高効率で mRNA を固定化するためのバッファを開発した。

#### 2. 共濃縮による反応効率の向上

あらかじめ基板上に修飾した poly(dT)オリゴに対して一細胞から抽出した mRNA の poly(A) tail を結合させる方法を開発した。

#### 3. mRNA 収率の定量技術および遺伝子発現解析技術の確立

mRNA 固定化効率の定量方法として，インターカレータを用いた方法を検討した。具体的には mRNA を固定化後 cDNA に逆転写し，cDNA:mRNA ハイブッドをインターカレータで蛍光染色して計測した。

#### 4. シーケンサーとの融合(固定した mRNA の逆転写反応)

シーケンサーと融合した試作デバイスの製作と実験を実施した。

#### 2-2 成果

#### 1. 一細胞破砕・RNA 抽出技術と表面反応による mRNA の固定化

K562 を用いて開発した抽出技術を評価したところ一細胞あたり約 12pg の RNA を抽出できることがわかった。また，ミドリムシに対しても本方法が適用可能であることがわかった。本

抽出技術に関して特許出願を行った。

2. 共濃縮による反応効率の向上

基板上へ mRNA を導入する際の流動により基板上における mRNA 分子の分布および効率が制御できることがわかった。

3. mRNA 収率の定量技術および遺伝子発現解析技術の確立

インターカレータを用いて cDNA:mRNA ハイブリットを可視化し、その輝点数から収率を検討したところ、その数が一細胞の mRNA 数と同程度であることがわかった。

4. シークエンサーとの融合(固定した mRNA の逆転写反応)

項目 3 において記述した通り、インターカレータを用いて蛍光標識できたことから逆転写反応により cDNA を形成できたと考えられる。一方で基板上における cDNA の分布が不均一であることがわかった。

2-3 新たな課題など

項目 4 において観察された cDNA の不均一な分布を一様にするために、基板上へ mRNA を導入する際の精密な流動制御が必要であると考えられる。

3. アウトリーチ活動報告

該当なし。