

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： 細胞解析技術開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 28 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：

国立大学法人京都大学

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

A. 一細胞破碎・RNA抽出技術と表面反応による mRNA の固定化

H27 年度において mRNA の固定化および cDNA への逆転写法を開発する。H28 年度では効率の向上を目的として、流路構造、逆転写反応、および流動制御の最適化を行う。H27 に確立した抽出技術の効率向上を目指して、マイクロ流路の表面処理、バッファの条件、電圧の条件、ハイブリダイゼーション条件を検討し、収率 20%以上を達成する。(なお競合技術の Drop-seq は 12.8%)

B. mRNA の逆転写効率の向上と収率の定量

H27 年度において mRNA 固定化効率の定量方法として、主にインターカレータを用いた方法を検討する。H28 年度では cDNA に相補的な蛍光 DNA oligo を用いてより詳細な定量を行う。H28 年度は、spike-in および house keeping gene をターゲットにした定量化技術を確立し、詳細な収率の定量およびその向上を図る。また逆転写条件を検討し、収率 15%以上を達成する。(なお競合技術の Drop-seq は 10.7%)

C. シークエンサーとの融合

H27 年度はシークエンサーと融合した試作デバイスを製作し、それを用いて実験を実施する。H28 年度はシークエンス読み出しの際に生じるバックグラウンドノイズを低減する方法を考案する。H28 年度に開発した前処理装置(ver.1)における改善点としてシークエンサーとの融合時に生じるバックグラウンドノイズの低減が最も重要である。H28 はこれを解決する前処理方法を考案し実験によりその有効性を実証する。

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

A. 一細胞破碎・RNA抽出技術と表面反応による mRNA の固定化

一細胞前処理用マイクロ流路とシークエンスフローセルの接続部形状および流入方法について検討し、流入と待機を繰り返す Stop flow 法を考案した。Stop flow 法による mRNA のハイブリダイゼーション効率に関して数値解析および実験により検討した。数値解析では流動、分子拡散、およびハイブリダイゼーションそれぞれの時間スケールをスケージング解析により考察し、シークエンスフローセル深さ方向の分子拡散の時間がハイブリダイゼーションを支配することがわかった。本知見に基づき、抽出 mRNA の流入方法の詳細について数値解析および実験により検討した。

B. mRNA の逆転写効率の向上と収率の定量

H28 年度において house keeping gene (GAPDH) および ERCC spike-in をターゲットにして、逆転写効率に関して検討を行なった。House keeping gene に関しては既知の配列をターゲットにして逆転写により形成した cDNA の配列に相補的な配列を有する蛍光標識 DNA 分子を cDNA にハイブリダイゼーションさせて、フローセル内部に形成された cDNA 量を定量する実験を行なった。またこれに加えて ERCC spike-in を mRNA として利用し、ハイブリダイゼーション、テンプレートスイッチング法による逆転写反応を行なった。形成した cDNA の定量にはテンプレートスイッチングにより形成された cDNA 中の配列に相補的な配列を有する蛍光標識 DNA をハイブリダイゼーションさせ、一分子蛍光観察により定量した。

C. シークエンサーとの融合

バックグラウンドノイズを低減する方法としてテンプレートスイッチングを用いた方法を検討した。テンプレートスイッチング法を用いて cDNA の 3'末端にテンプレートスイッチングオリゴと相補的な配列を形成し、これを起点として配列の読み出しを試みた。

2-2 成果

A. 一細胞破碎・RNA 抽出技術と表面反応による mRNA の固定化

スケーリング解析によりフローセル深さ方向の分子拡散およびハイブリダイゼーションの時間スケールがそれぞれおよそ 10 s および 1 s であることがわかった。また、数値解析により拡散時間 10 s から、流入と 36 s の待機を繰り返す Stop flow 法が 92.6%のハイブリダイゼーション効率を達成することが明らかになった。また実験により Stop flow 法を検討し、従来の流入方法で得られた効率を 29%から 54%に向上できることを示した。

B. mRNA の逆転写効率の向上と収率の定量

テンプレートスイッチングにより形成した cDNA に対して蛍光標識した DNA プローブをハイブリダイゼーションさせることで cDNA の形成が確認できた。しかしながら、蛍光標識 DNA プローブの非特異吸着が生じており、バックグラウンドの蛍光が十分に抑えきれなかったため、逆転写効率に関して定量的な評価には至らなかった。

C. シークエンサーとの融合

テンプレートスイッチングを用いた前処理法を用いてシークエンサーとの融合を図った。Off-chip および On-chip で作製した cDNA サンプルを用いて配列の読み出しを実施したが、前者の検討から PCR による増幅操作が不可欠であることが分かった。On-chip の方法にもいても 1st strand を作製しただけでは読み出しが困難であることが分かった。

2-3 新たな課題など

シークエンサーとの融合については mRNA から cDNA への逆転写、それに続く読み出しの過程に未解決の課題があり、それにより正確に配列の読み出しができないことが分かった。

3. アウトリーチ活動報告

特になし