

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：統合システム開発

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成 29 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

H28年度までに開発したマイクロ流体プレートを統合したセレンディピター（一細胞遺伝子発現解析システム）を実現することを目指す。統合システムを用いた遺伝子発現解析の再現性について検討する。

統合システムにおいては選別した細胞を濃縮して回収する方法として、中空糸を用いた方法や遠心を用いた方法等を検討する。方針決定後は、リアルタイム PCR 等を用いて夾雑物の有無、検出感度に関して検討する。

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

セレンディピターの統合実験に対してマイクロ流体プレートを安定供給するために、生産技術の効率化を図った。具体的には、新たにスケールアップしたマイクロ流体プレートの金型を製作し、一度に生産できるマイクロ流路の数を3から8に増加させることを試みた。

セレンディピターから排出した細胞の回収方法として遠心による方法を採用した。本方法で回収する細胞の遺伝子発現解析を想定して、セレンディピターの統合実験において用いられている細胞サンプルを対象として、リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現解析を実施した。本細胞は1.5%ホルムアルデヒドで固定したものであり、固定方法が PCR に及ぼす影響についても検討した。また、同時にシース液の混入が PCR に及ぼす影響についても検討した。

以上に加えてマイクロ流体プレートの RNA 抽出効率、細胞質 RNA と核 RNA の分画精度を再評価するために、市販の PARIS キット (Thermo Fisher Scientific) と比較した。比較方法としては、バルクの細胞サンプルからスタートして、PARIS キットにより細胞質成分と核に分画した。分画後の核は洗浄を行った後、細胞培養ディッシュに広げ、顕微鏡下で一つ一つ回収して Smart-seq 2 プロトコルで核 RNA から cDNA サンプルを作製した。これらのサンプルを Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて short read の DNA シークエンシングライブラリを作成し、MiSeq (Illumina) により解析した。MiSeq を用いた解析では、マイクロ流体プレートにより回収した核を用いて作製した DNA シークエンシングライブラリも同時に解析し、PARIS キットと我々の方法の分画精度の優劣を比較検討した。

2-2 成果

マイクロ流路の生産数を増加させた結果、当初ウェル間距離の寸法精度が不十分であることが明らかとなったが、樹脂の重合方法を調整して目的の寸法精度内に収めることに成功した。

リアルタイム PCR を用いた解析では、いずれの細胞サンプルも期待した増幅効率を示さないことが明らかとなった。セレンディピターから排出されるシース液の混入が逆転写あるいは増幅反応を阻害した可能性を検討するために、人工 RNA である ERCC (Thermo Fisher Scientific) をシース液で希釈したサンプルを用いて同様の検討を行なったが、通常通りの増幅反応が得られた。このことから、1.5%ホルムアルデヒドによる細胞固定が増幅反応を阻害した可能性が疑われた。そこで1.5%ホルムアルデヒドによる細胞固

定に代わる新たな細胞固定法として、dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP) (Thermo Fisher Scientific)を用いた方法について検討した。DSPを用いた方法では、細胞固定による反応の阻害が確認されず、再現性の高い実験を実施できた。さらに細胞保存溶液に Sucrose をおよそ 9%添加することで細胞膜の integrity を長期間維持でき、細胞内部の微小分子を漏出することなく保存できることがわかった。この細胞固定方法とマイクロ流体プレートを用いた RNA 抽出法も整合性が高く、リアルタイム PCR による解析、RNA-seq による解析に十分耐えうる性能を有していることが明らかとなった。

PARIS キットとマイクロ流体プレートを用いて作製した核 RNA-seq データを比較することで、マイクロ流体プレートを用いる方法の方が細胞質 RNA の抽出量が多く、核 RNA-seq に夾雑する細胞質由来の RNA 量をおよそ 10 分の 1 程度に低減できることが明らかとなった。この結果は細胞質に主に存在するミトコンドリア遺伝子の定量から得られた結果である。一方で、核に通常局在する RNA 群は両者ともに発現量が類似しており、このことからマイクロ流体プレートを用いた方法において核 RNA の漏れ出しはほぼ無いと結論づけた。以上の結果から、マイクロ流体プレートを用いた方法は細胞質 RNA と核 RNA の分画を高精度で行える方法であると結論した。

2-3 新たな課題など

マイクロ流体プレートの生産性を高めることに成功した一方で、マイクロ流路入り口の寸法精度が再度問題になった。金型を新たに製作したことに由来すると考えられるが、原因は未だ明らかではなく、継続して検討と進める。

新たに採用を決めた DSP による細胞固定は、実施例が少ないためセレンディピター統合実験で用いている細胞を用いて実施例を増やしたい。DSP を用いた方法はメタノールあるいはエタノールを用いた細胞固定と比較するとマイクロ流体プレートを用いた RNA 抽出法と整合性が高いが、その抽出効率は未だ検討の余地がある。具体的には RNA 抽出直前に実施する重合解除条件、抽出時の印加電圧、抽出用バッファの組成などを最適化して効率の向上に務めたい。

マイクロ流体プレートを用いて一細胞の細胞質 RNA と核を分離し、それらの RNA-seq を並列で実施する方法、Single-cell integrated nuclear and cytoplasmic 法(SINC-seq 法)を開発した。SINC-seq 法は一細胞の細胞質 RNA と核 RNA を個別かつ同時に RNA-seq を可能にする唯一の方法であるがスループットの面で改善の余地が残る。本課題について検討を進めたいと考えている。

3. アウトリーチ活動報告

なし。