

「統合1 細胞解析のための革新的技術基盤」
平成28年度採択研究代表者

H29年度 実績報告書

二階堂 愛

理化学研究所情報基盤センター
ユニットリーダー

臓器・組織内未知細胞の命運・機能の1細胞オミクス同時計測

§ 1. 研究実施体制

(1)「二階堂」グループ

- ① 研究代表者: 二階堂 愛 (理化学研究所情報基盤センター ユニットリーダー)
- ② 研究項目
 - ・1細胞の長期追跡とマルチオミクス計測法の開発

(2)「上野」グループ

- ① 主たる共同研究者: 上野 博夫 (関西医科大学医学部 教授)
- ② 研究項目
 - ・超多色蛍光コーディング法開発

§ 2. 研究実施の概要

臓器・組織は、そこに含まれる幹細胞の増殖や死、分化により、細胞が置き換わり、機能が維持される。しかし、臓器によっては、幹細胞の発見や機能解析が進んでいない。そこで、本課題は、臓器・組織の細胞へ1細胞ずつ異なる目印をつけて、その命運を追跡しつつ、同時に細胞機能を計測する技術を開発する。これにより様々な臓器から未知幹細胞を同定し、その機能を知ること、健康な臓器を誰もが維持できる社会を目指す。

(二階堂 G)

本年度は、幹細胞の1細胞レベルの長期追跡を可能とするため、(1)高出力1細胞RNA-seq法開発、(2)1細胞長期追跡法の開発を、昨年度に続き実施した。また、上野グループとの連携をさらに深めるため、上野グループへの1細胞採取技術の移転と、二階堂グループでの1細胞RNA-seqの実施を進めた(3)。

(1)については、マルチウェルプレートを利用したハイスループット型1細胞RNA-seq法の開発を進めた。本課題では、主に、ほかのハイスループット型1細胞RNA-seq法と比較を実施した。既報の手法比較論文と同じ種・株の細胞を入手し、開発した1細胞RNA-seq法で数千細胞のデータを取得した。そのデータを元に、検出遺伝子数や実験間のばらつきなどの比較解析を実施した。その結果、我々の手法が、市販のハイスループット1細胞RNA-seq法と比較して、同等のコストでありながら、2.6倍の検出遺伝子数が得られることを示した。この方法について論文を出版した(Sasagawa Y. et al. *Genome Biol.* 2018)。また、世界初の1細胞完全長total RNA-seqを開発し論文を出版した(Hayashi T. et al., *Nature Communications*, 2018)。本プロジェクトでは、実験者の違いによる方法の安定性の評価と、転写活性と遺伝子発現の1細胞同時計測の達成の部分で貢献した。

(2)については、遺伝子組み換え技術を用いて、細胞を長期に標識する方法の開発を進めるため、ベクターの設計や作製を引き続き実施した。

(3)については、昨年度96ウェルプレートベースの1細胞ソーティング法を上野Gから上野Gへ移転したが、今年度は384ウェルプレートベースの1細胞ソーティング技術を移転した。さらに上野Gで作製した複数種類の臓器由来オルガノイドを、上野Gで1細胞ソーティング後に、二階堂Gへ輸送後1細胞RNA-seqを実施した。これにより連携可能であることを示した。これらの結果の一部は、論文を投稿し現在査読中である。

1. Yohei Sasagawa, Hiroki Danno, Hitomi Takada, Masashi Ebisawa, Tetsutaro Hayashi, Akira Kurisaki, **Itoshi Nikaido**. Quartz-Seq2: a high-throughput single-cell RNA-sequencing method that effectively uses limited sequence reads. **Genome Biology**. 2018.
2. Tetsutaro Hayashi, Haruka Ozaki, Yohei Sasagawa, Mana Umeda, Hiroki Danno and **Itoshi Nikaido**. Single-cell full-length total RNA sequencing uncovers dynamics of recursive splicing and enhancer RNAs. **Nature**

Communications. 2018.

(上野 G)

本年度は、臓器・組織の細胞へ 1 細胞ずつ異なる目印をつけて、その命運を追跡するための超多色蛍光コーディングマウスの開発を実施した。

蛍光コードとする蛍光タンパク質 cDNA を複数作製し、MDCK 細胞に transfection して発現蛍光タンパク質の発現を確かめることで、使用可能な組み合わせを選定した。また、二階堂 G による 1 細胞 RNA-seq により同定可能なバーコード配列をそれぞれの融合タンパク質 cDNA 内に組み込んだ。これにより、イメージングと RNA-seq のいずれの方法でも蛍光コードを読み出すことが可能になると期待される。この、バーコード配列付き融合タンパク質 cDNA 配列を用いて、蛍光コーディングマウス作出のためのターゲティングベクターの構築を進めている。

また、上記を用いて成体幹細胞を同定する研究の予備的検討として、いくつかの成体幹細胞について多色細胞系譜追跡法および 1 細胞 RNA-seq を用いた解析により、より厳密な幹細胞集団の同定、およびその特異的マーカーの選定が可能か検討している。また、同様の方法にて大腸がんのがん幹細胞の存在を検証した。