

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22121

研究課題名(和文)1細胞RNA輸送ダイナミクス

研究課題名(英文)The dynamics of RNA transport in single cells

研究代表者

新宅 博文(Shintaku, Hirofumi)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・理研白眉研究チームリーダー

研究者番号：80448050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：SINC-seq法を発展させて、ナノポアシーケンサーと組み合わせたNanoSINC-seq法を開発した。そしてトランスクリプト量のゆらぎが核と細胞質でどの程度変化しているか1細胞解像度で定量的に評価した(Sci Adv 2021)。  
SINC-seq法の細胞質成分の抽出におけるRNA分子の流動現象について考察し、RNA分子の長さに依存しない均一な抽出を実現する上で有利であることを示した。(Anal Chem 2020)  
SINC-seq法の適用範囲を拡大するため、マイクロ流路の設計を工夫し、植物細胞塊の一部の細胞から選択的に細胞質分子を抽出する方法を開発した。(Analyst 2021)

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物では核においてRNAが転写され、細胞質においてタンパク質が翻訳される。転写から翻訳までのRNA発現量制御の詳細について世界で初めて1細胞解像度かつアイソフォーム解像度で明らかになった。  
SINC-seq法では電気泳動を用いた細胞質RNAの抽出を行うが、RNA分子の長さが抽出の所要時間に与える影響など不明な点が多くあった。本研究により電気泳動時のRNA分子の流動が詳細に明らかになり、網羅的遺伝子発現解析に適した抽出方法であることが示された。  
これまでSINC-seq法の適用範囲は哺乳類の細胞に限定されていたが、本研究により細胞壁を有する植物細胞への応用できる方法に拡張された。

研究成果の概要(英文)：We developed an approach that dissects the expression of the RNA isoforms in cytoplasm and nuclei at single-cell resolution coupling a nanopore-based sequencing and single-cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-seq (SINC-seq), dubbed NanoSINC-seq. To multiplex the nanopore-based sequencing, our approach synthesized full-length complementary DNA (cDNA) with a sample barcode by amplifying cDNA with barcoded primers. NanoSINC-seq revealed that the usage of nuclear transcripts was notably more diverse than that of cytoplasmic transcripts.  
We developed color-coded hydrogel beads to multiplex the SINC-seq approach. We leveraged a microfluidic water-in-oil system to generate the uniform-sized hydrogel beads.  
We immobilized DNA barcodes with poly(T) sequences on the hydrogel beads to synthesize cDNA with a unique bead-ID sequence. We also developed a fluorescence microscopy approach to decode the bead-ID sequence.

研究分野：マイクロ流体工学

キーワード：1細胞 RNA 次世代シーケンス解析 マイクロ流体 分子バーコード ナノポアシーケンサー 転写後制御 トランスクリプト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の1細胞解析分野の技術革新はまさに日進月歩である。2000年初頭からその重要性が認識され始め、2012年にFluidigm社が96細胞を並列で処理する集積化マイクロ流体システムC1を上市したことにより1細胞RNA-seqが一気に広まった。そして、2015年に1細胞解析のスループットを大幅に向上するDrop-seq法およびinDrop RNA-seq法がHarvard大学の研究グループから報告され(本方法もマイクロ流体技術を応用)、2017年にはマイクロ流体技術を使わないコンビナトリアルindexing法がWashington大の研究グループから報告された。これら技術革新により、数千個あるいは数万個の1細胞データを現実的な費用で取得できるようになった。例えばHuman Cell Atlasなどの国際プロジェクトでは、上記技術を活用してヒトの体に存在する全細胞種の遺伝子発現パターンをカタログ化する研究活動が進められている。

多くの1細胞RNA-seqデータを集積することで、例えば細胞分化の経路を遺伝子発現変動の経路として記述することができる。ただし、1細胞から得られるRNA発現情報は細胞を溶解した時刻におけるスナップショットを表しているにすぎず、1細胞のダイナミクス情報を全く含んでいない。そのため、仮想的な時間(pseudotime)を活用して遺伝子発現変動の経路を推定する試みが成されているが、真の実時間情報は従来の1細胞RNA-seqからは得られない。

この状況を背景として、我々は核-細胞質のRNA発現から細胞のダイナミクス情報を計測するアイデアを得た。すなわち、核内におけるRNA発現変動が細胞質へ輸送・伝搬していく過程で生じる時間差からダイナミクス情報を抽出しようとするものである。そして、我々はSINC-seq(single cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing)法と呼ばれる1細胞の細胞質RNAと核RNAの発現を独立で計量する独自の手法を開発し、そのRNA発現データから1細胞の細胞質RNAと核RNAの発現パターンに存在する相関性と生命現象の関係を世界で初めて明らかにした(Abdelmoez et al. Genome Biol 2018)。この研究では86個の一細胞すなわち172個のRNA発現データを取得して解析を進めたが、我々が真に追い求めたい問い“核RNAと細胞質RNAの発現パターンの差は細胞のダイナミクスを表現するか”について、統計的優位な結論を得られなかった。また、従来のSINC-seqでは費用の観点から解析する細胞数を増やすことが困難であり、新たな技術的ブレイクスルーが必要であった。

### 2. 研究の目的

以上の背景から本研究では、以下に示す新たな取り組みにより、1細胞の細胞質と核のRNA発現に注目し、それらの差異から細胞のダイナミクス情報を抽出する方法論の創成を目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 従来の次世代シーケンス解析では、RNAから逆転写反応により作製したcDNAを断片化する工程が必須であり、解析データからアイソフォームを特定することが困難であった。本研究では、cDNAの断片化を経る事なくシーケンス解析が可能なナノポアシーケンサーを活用して、細胞質RNAと核RNAをアイソフォーム解像度で定量し、その定量結果から真核生物における転写後制御の様式を考察した。
- (2) SINC-seq法のスループットを向上させることを目的として、DNAバーコードを活用した実験システムを開発した。本研究では要素技術としてカラーコードを付与できるハイドロゲルビーズを開発した。

#### 4. 研究成果

##### (1) NanoSINC-seq 法 (Oguchi et al. Sci Adv 2021)

SINC-seq 法を発展させて、ナノポアシーケンサーと組み合わせた NanoSINC-seq 法を開発した。NanoSINC-seq 法は RNA 分子から逆転写により作製した相補的 DNA 鎖を鎖長の短い DNA 断片にすることなく、全長のまま塩基配列を読み出す方式であるため、トランスクリプト解像度で RNA 分子を特定できる。これを活用することで、トランスクリプト量のゆらぎが核と細胞質でどの程度変化しているか定量的に評価した。その結果、例えば、翻訳に関わるリボソームを構成するタンパク質に関連する遺伝子ファミリーでは細胞質でゆらぎが大きくなっている一方で、RNA スプライシングに関連する遺伝子ファミリーではそれが減衰していることが明らかとなり、核-細胞質の RNA 輸送を含む転写後制御の全体像を遺伝子網羅的に俯瞰することに成功した。

##### (2) カラーコードマイクロビーズの開発

1 細胞 RNA-sequencing に実時間軸の概念を導入することを目指し、High-throughput single-cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing (HT-SINC-seq)の要素技術であるバーコード配列を有するマイクロビーズの開発した。このマイクロビーズはカラーコードと DNA バーコードが対応したものであり、最終的に画像による検出と次世代シーケンス解析を接続することを可能にする。マイクロ流路を用いた water-in-oil システムを活用し、10-20  $\mu\text{m}$  の直径かつ分散の非常に小さなマイクロビーズの生産を達成した。カラーコードを付与する手順において化学耐性の課題が生じたが、複数の試薬を検討して課題を解決できた。開発したマイクロビーズを用いて 1 細胞および精製 RNA サンプルの RNA-sequencing 解析を実施し、マイクロビーズ等が逆転写や PCR 増幅反応に対して何ら悪影響を及ぼさないことを確認できた。また、カラーコードの読み出しを行う蛍光顕微鏡システムを構築し、画像解析による読み出しを試みた。蛍光顕微鏡システムは共焦点撮影を採用し空間解像度の向上を図った。当初計測のダイナミックレンジが不十分であるという課題が生じたが、撮影条件の最適化と画像解析アルゴリズムの改善により、最終的にフローサイトメーターと同様の蛍光計測を可能にした。

##### (3) マイクロ電気穿孔による細胞質 RNA 抽出の流動解析 (Abdelmoez et al. Anal Chem 2020)

SINC-seq 法の細胞質成分の抽出における RNA 分子の流動現象について力学的観点から考察した。ここでは慢性白血病由来の K562 細胞株を用いて抽出過程における RNA 分子の挙動を観察した。細胞質から抽出された RNA 分子は主に溶液中に分散した状態と、粒子状に凝集した状態の二状態が観察され、この二種が異なる流動現象を示すことがわかった。具体的には分散状態の RNA 分子は粒子状のそれと比較して短時間で細胞外へ抽出され、その抽出過程は単調かつ再現性の高いものであった。一方で粒子状に凝集した RNA 分子は間欠的な抽出過程を示し、細胞ごとにばらつきを示した。この抽出過程に観察された細胞ごとのばらつきの由来を明らかにするため、細胞の顕微鏡画像から取得した形態情報と抽出の時定数を相関解析し、粒子状の RNA 分子はミトコンドリア由来の RNA 分子であり、それらの局在状態が抽出過程を左右することがわかった。さらに RNA 分子の流動現象を数値計算により解析した。解析から RNA 分子の抽出過程は電気泳動に支配されており、分子拡散による影響は相対的に小さいことがわかった。自由溶液中における RNA 分子の電気泳動移動度がその長さに依存しない一方で拡散係数は長さの増加に伴って減少することを勘案すると、数値解析結果は本方法が RNA 分子の長さに依存しない均一な抽出を実現する上で有利であることを示唆している。

##### (4) SINC-seq 法の適用範囲拡大 (Analyst 2021)

SINC-seq 法の適用範囲を拡大するため、マイクロ流路の設計を工夫し、植物細胞塊の一部の細胞から選択的に細胞質分子を抽出する方法を開発した。この方法では、植物細胞塊を配置するマ

マイクロ流路構造を大きく設計することで、対象細胞と非対称細胞それぞれに与えられる電場強度に大きな違いを与えた。また、短時間のパルス状電場と直流電場の組み合わせにより選択的に対象細胞の細胞壁の分子透過性を上昇させる方法を確立した。本方法を活用することで、細胞壁を保持した状態の植物細胞から直接細胞質 RNA を抽出することに成功し、RT-PCR 法を用いた定量も可能であることを示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Abdelmoez Mahmoud N., Oguchi Yusuke, Ozaki Yuka, Yokokawa Ryuji, Kotera Hidetoshi, Shintaku Hirofumi	4. 巻 92
2. 論文標題 Distinct Kinetics in Electrophoretic Extraction of Cytoplasmic RNA from Single Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 1485 ~ 1492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b04739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko Taikopaul, Furuta Ken'ya, Oiwa Kazuhiro, Shintaku Hirofumi, Kotera Hidetoshi, Yokokawa Ryuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Different motilities of microtubules driven by kinesin-1 and kinesin-14 motors patterned on nanopillars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaax7413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aax7413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Farhana Tamanna Ishrat, Nakagawa Tomohiro, Ohara Shumpei, Shintaku Hirofumi, Kotera Hidetoshi, Yokokawa Ryuji	4. 巻 35
2. 論文標題 Spatial Patterning of Kinesin-1 and Dynein Motor Proteins in an In Vitro Assay using Aqueous Two-Phase Systems (ATPS)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 13003 ~ 13010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.9b01411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaneko Taikopaul, Ando Suguru, Furuta Ken'ya, Oiwa Kazuhiro, Shintaku Hirofumi, Kotera Hidetoshi, Yokokawa Ryuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Transport of microtubules according to the number and spacing of kinesin motors on gold nanopillars	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 9879 ~ 9887
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9NR01324E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Oguchi Yusuke, Ozaki Yuka, Abdelmoez Mahmoud N., Shintaku Hirofumi	4. 巻 7
2. 論文標題 NanoSINC-seq dissects the isoform diversity in subcellular compartments of single cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabe0317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abe0317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Subramanian Parimalam Sangamithirai, Abdelmoez Mahmoud Nady, Tsuchida Arata, Sotta Naoyuki, Tanaka Mayuki, Kuromori Takashi, Fujiwara Toru, Hirai Masami Yokota, Yokokawa Ryuji, Oguchi Yusuke, Shintaku Hirofumi	4. 巻 146
2. 論文標題 Targeted permeabilization of the cell wall and extraction of charged molecules from single cells in intact plant clusters using a focused electric field	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 1604 ~ 1611
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0AN02163F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計20件(うち招待講演 7件/うち国際学会 11件)

1. 発表者名 Mahmoud N. Abdelmoez, Yusuke Oguchi, Yuka Ozaki, Ryuji Yokokawa, Hidetoshi Kotera and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Length bias-free extraction of cytoplasmic RNA from single cells by electrical lysis and electrophoresis
3. 学会等名 30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sangamithirai Subramanian Parimalam, Naoyuki Sotta, Takashi Kuromori, Toru Fujiwara, Masami Yokota Hirai, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Extraction of RNA from an intact single plant cell with cell wall using focused electric field
3. 学会等名 30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arata Tsuchida, Ryuji Yokokawa and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Integration of on-chip electrophoretic analysis on cytoplasmic RNA of single cells and high-throughput RNA-sequencing
3. 学会等名 ASME - JSME - KSME Joint Fluids Engineering Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 SINC-seq: Microfluidic approach that enables correlation analyses of cytoplasmic and nuclear RNA expression of single cells
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Physics and Chemistry of Microfluidics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mahmoud N. Abdelmoez, Yusuke Oguchi, Yuka Ozaki, Ryuji Yokokawa, Hidetoshi Kotera, Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Dynamics of RNA extraction from single cells under focused electric field
3. 学会等名 EMBO Workshop on Single Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sangamithirai Subramanian Parimalam, Naoyuki Sotta, Toru Fujiwara, Masami Y. Hirai, Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Selective and direct extraction of cytoplasmic RNA from single plant cell in an intact tissue via focused electric field
3. 学会等名 EMBO Workshop on Single Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 On-chip electrokinetics dissects subcellular gene expression
3. 学会等名 The SPIRITS International Symposium Shaping Self-Assembled Mesoscale (Bio)Materials with Microengineering (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 微細構造によるマイクロスケール流れと電場制御 - 1細胞分析への応用
3. 学会等名 第12回 技能継承フォーラム「ものづくり技能継承の現状と展望」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 1細胞の細胞質-核の高精度分画とRNAシーケンシング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (MBSJ2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 1細胞オンチップ電気泳動による細胞質-核の高精度分画
3. 学会等名 第39回 キャピラリー電気泳動シンポジウム, (招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 On-chip electrophoretic cytometry integrated with next-generation sequencing
3. 学会等名 International Symposium for Intelligent Ultra-precision Optics Manufacturing Technology (IUOMT 2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新宅博文
2. 発表標題 オンチップ電気泳動を活用した1細胞多階層解析
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田 新, 横川 隆司, 新宅 博文
2. 発表標題 1細胞解析のためのオンチップ電気泳動システムの開発
3. 学会等名 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mahmoud N. Abdelmoez, Yusuke Oguchi, Yuka Ozaki, Ryuji Yokokawa, Hidetoshi Kotera, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Dynamics of RNA in single cells under focused electric field
3. 学会等名 日本機械学会 2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土田 新, 横川 隆司, 新宅 博文
2. 発表標題 オンチップ電気泳動を用いた1細胞解析システムの開発
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Electrophoretic fractionation of subcellular components of single cells for multi-omics analyses
3. 学会等名 Microfluidics 2020, EMBL conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taikopaul Kaneko, Kaori Nishikawa, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Development of optically decodable beads by defined number of fluorophores with DNA barcode
3. 学会等名 Serendipity Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Oguchi, Yuka Ozaki, Mahmoud N. Abdelmoez, and Hirofumi Shintaku
2. 発表標題 Transcriptional diversity explored by nanopore-sequencing leveraged SINC-seq
3. 学会等名 Serendipity Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小口祐伴, 尾崎由佳, Mahmoud N. Abdelmoez, 新宅博文
2. 発表標題 ナノポアシーケンスによる1細胞細胞質および核トランスクリプト発現解析
3. 学会等名 CHEMINAS42 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土田 新, マハムド ナディ アブディルモエズ, 横川 隆司, 新宅 博文
2. 発表標題 オンチップ電気泳動を用いた1細胞多階層相関解析
3. 学会等名 日本機械学会 2020 年度年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡辺 亮, 鈴木 穰 編集 (新宅博文, 小口祐伴, 飯田慶)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 219(pp.3533-3538)
3. 書名 シングルセルゲノミクス (SINC-seq法による1細胞多階層解析)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>RIKEN Microfluidics Laboratory  <a href="https://www.hshintaku.com/">https://www.hshintaku.com/</a>          新たな1細胞RNA分画解読法の開発に成功 - ナノポアシーケンサーを用いた高精度解析を実現 -  <a href="https://www.riken.jp/press/2021/20210408_1/index.html">https://www.riken.jp/press/2021/20210408_1/index.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------