

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651085

研究課題名（和文）一個の細胞における遺伝子発現を解析できる新規技術の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of a novel technique that allows analysis on the gene expression of a single cell.

研究代表者

野島 博（NOJIMA HIROSHI）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：30156195

研究成果の概要（和文）：

Chum-RNA 増幅法とはPCRを用いずに1個相当のヒト細胞から高品質な cDNAライブラリー作製可能にする技術である。T7RNAポリメラーゼによる線形増幅により膨大な遺伝子群を包括的に偏在無く増幅できる。本課題は、Chum-RNA 増幅効果を実用的な分野への応用研究を展開することにある。マイクロアレイ解析法、リアルタイム PCR 解析法、および微生物の高感度検出 RT-PCR 法へ Chum-RNA を適応して増幅効果を認めることができた。

研究成果の概要（英文）：

Preparation of high-quality cDNA is needed for functional analysis of gene function. However, reverse transcription PCR, an exponential amplification method causes a bias to majority of RNA molecules, because the reaction rate of enzymatic reaction depends on the concentration of the substrates. We developed a novel method for amplification of ultralow amount RNA by addition of dummy substrate RNA (Chum-RNA) into *in vitro* transcription and RT reaction system. Chum-RNA increases virtual concentration of substrate in the system, and the enzymes can catalyze the reaction for a very small number of RNA molecules. This novel technology enabled us to construct a high-quality cDNA library which reflects the original distribution of mRNA molecules from a single cell amount of RNA. Here, we report that this technology can be applied to Microarray analysis and Real time PCR method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：5805

キーワード：PCR、Chum-RNA、線形増幅、mRNA 増幅、センス鎖

1. 研究開始当初の背景

我々が独自開発した Chum-RNA 増幅法は PCR 法を全く採用せず1個のヒト細胞から高品質な cDNA ライブラリーを作製できる革新的

な技術である。これまで1個のヒト細胞由来の極微量 mRNA から cDNA ライブラリーを作製できるまで増幅する技術は国内・国外におい

て幾つか発表されてきたが、そのいずれもが PCR 法に代表される指数関数的な増幅ステップを含んでいる。

2. 研究の目的

Chum-RNA 増幅法は T7RNA ポリメラーゼを利用した線形増幅のみを用いるため、膨大な遺伝子群を包括的に偏在無く増幅させることができる。Chum-RNA 増幅法を応用すれば、1 個のヒト細胞における網羅的な遺伝子群の発現パターン解析ができる。本研究計画では Chum-RNA 増幅法を基盤として、マイクロアレイ解析法、リアルタイム PCR 法および RT-PCR 法など実用的分野への応用研究を展開する。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ解析への応用：

DNA マイクロアレイ解析法について Chum-RNA 増幅効果の応用を検討した。極微量 RNA を検出する精度の向上を検討するため Chum-RNA を反応液に加えた場合と加えない場合の増幅された相補鎖 RNA シグナル強度を比較することで、Chum-RNA 増幅効果を検討した。Chum-RNA 添加した極微量 RNA (5ng RNA+ChumRNA) は添加しないスタンダードな RNA (500ng) よりも膨大な増幅効果を発揮した (図 1 参照)。

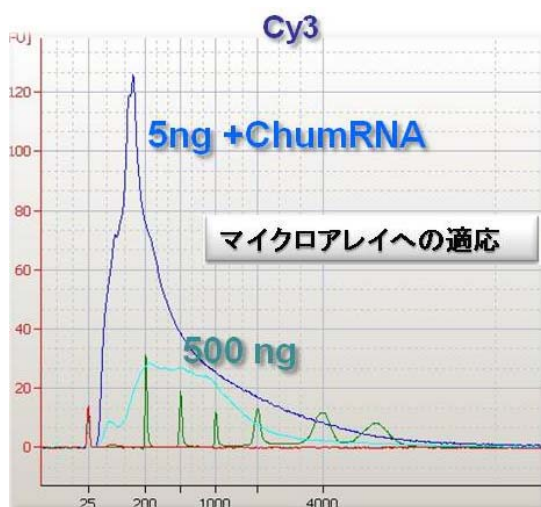


図 1 : Chum-RNA による微量 RNA の増幅効果を極微量分光光度計で測定した。

まず対照実験として、500ng の全 RNA を用いて Chum-RNA (3 μ M) 無添加でオリゴ dT プライマーと RTase により逆転写を行い、T7 RNA ポリメラーゼにより Cy ラベル化相補鎖 RNA を増幅させ、そのサイズを極微量分光光度計 (ハイアライザー) で測定し、幅広いサイズ分布を示す (RNA は壊れていない) ことを確認した (図 1 ; 水色曲線)。次いで、5ng の全 RNA を用い、反応液に Chum-RNA (3 μ M) を添加して同様に逆転写したところ、全サイズに亘って幅広いサイズ分布を示すことが確認された (図 1 ; 青色曲線)。Chum-RNA 添加によりやや短いサイズにピークがシフトしているが、これは反応液に残存した大量の Chum-RNA の背景効果 (バックグラウンド) と考えられる。

(2) リアルタイム PCR への応用：

次にリアルタイム PCR による Chum-RNA の検出向上効果の検討を行った。Chum-RNA 開発時のプロトコールはポリ A を持つ mRNA をターゲットに増幅が可能かどうかを評価した。実際にはポリ A 鎖を持たない RNA も存在する。リアルタイム PCR ではランダムプライマーによって cDNA 化を行うことにより、ポリ A を持たない RNA に対しても Chum-RNA の増幅効果を検証した。反応液に加えた 5ng の全 RNA に Chum-RNA を添加しリアルタイム PCR を行った。すると早いサイクルで蛍光量が立ち上がった (図 2)。

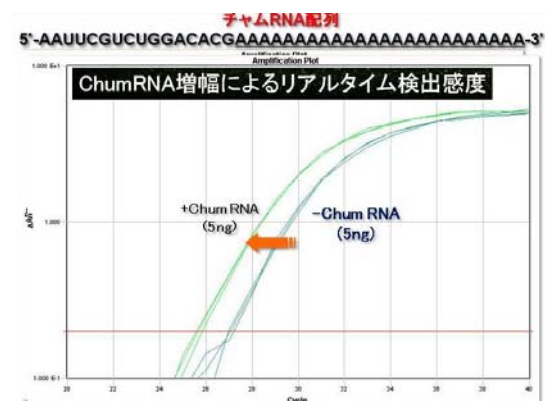
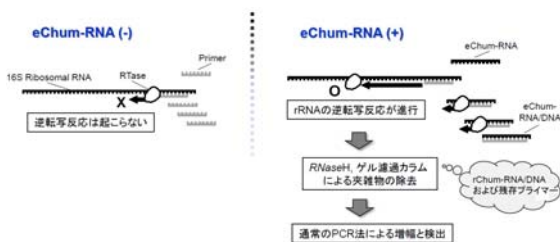


図2: Chum-RNAによるリアルタイムPCRにおける増幅効果の測定

(3) 微生物の高感度検出法への応用:

RT-PCR法を基盤とした微生物の種特異的高感度検出法の開発にあたり、大腸菌 BL21株の検出系の構築を行った。当該細菌の16SリボソームRNA (rRNA) を鋳型として逆転写PCR反応 (RT-PCR)を行う。この際に新規に開発した低分子量RNA (eChum-RNA) を反応系に加えることで通常では酵素反応の進行が困難であるごく微量のrRNAに対して増幅反応を起こし検出する。本手法は汎用される細胞中に1分子しか存在しないゲノムDNAを鋳型にする手法と異なり、細胞に数千~数万分子存在するrRNAを鋳型に用いるため少数の細胞からも十分量の鋳型分子を確保できる。eChum-RNAはrRNAの逆転写プライマーDNAのアニール領域に相同な低分子量RNAで逆転写反応に多量に添加することで、反応系中の見かけの鋳型濃度を増大させる。これにより反応活性が反応系中の基質分子濃度に依存する酵素反応において活性が上昇することで微量の鋳型rRNAから、PCR反応で増幅可能な逆転写産物を得る (図1)。

図1. eChum-RNAの原理



はじめに細菌一細胞に含まれるrRNA量を見積もるため、大腸菌 BL21株の各増殖期における全RNA収量を計測した。対数増殖初期に一細胞当たり 65.0 ± 11.0 fgのRNAを有し、増殖静止期にかけて減少することを確認した。大腸菌の全RNAの約8割がrRNAに由来することから鋳型となる一細胞当たりの

rRNA分子は二万~二千個となった。次にBL21株の極微量全RNAを鋳型としてeChum-RNAの添加による目的DNA断片の増幅効率を検討した。eChum-RNAを添加せずにRT-PCRを行った場合は1pgの全RNAに対してまでしか増幅が得られなかったのに対して、eChum-RNAを添加することで1fgの全RNAに対しても増幅が確認された。この結果はeChum-RNAの添加によりより少量の鋳型rRNAに対しても逆転写反応が進んだことを意味すると同時に、一細胞未満の鋳型rRNAを増幅できたことを意味し、本手法の有用性を示すものである (図2)。

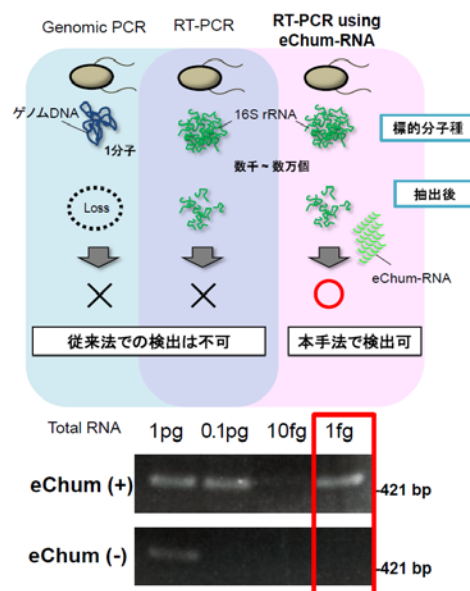


図2 eChum-RNAによる高感度検出の概念図(上)と微量rRNAの検出(下)

4. 研究成果

(1) DNAマイクロアレイ解析への応用:

長鎖サイズの相補鎖RNAも対照と比較して遜色なく増幅されている。対照の100分の1量である5ngで幅広いサイズに亘って増幅できることはChum-RNA添加が極微量のRNAを用いたDNAマイクロアレイにも有用であることを強く示唆する結果である。

(2) リアルタイムPCRへの応用:

Chum-RNAはmRNAを増幅するため3プライム末端にポリAをデザインしているが、全RNA

を標的としたランダムプライマーを用いた逆転写反応でさえ Chum-RNA の増幅効果を発揮できた。

(3) 微生物の高感度検出法への応用：

従来と全く同様の反応系に eChum-RNA を添加するだけで、一細胞未満の高感度な標的 RNA 分子の増幅・検出を可能にするので、ウイルス由来 RNA など他の RNA 分子種にも広く適用可能である。基礎研究のみならず微生物感染症やそれに係る自己免疫疾患等の疾病の早期診断等の臨床応用も期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Okuzaki D., Fukushima T, Tougan T, Ishii T, Kobayashi S, Yoshizaki K, Akita T, and Nojima H. GenopalTM: a novel hollow fiber array for focused microarray analysis. *DN A Res.*, 2010 Dec;17(6):369-79. 【査読あり】

[学会発表] (計 6 件)

- (1) 鳥形 康輔、奥崎 大介、野島 博、rChum, A Novel RNA Molecule to Aid PCR Amplification and Detection of Ultralow Amount of Nucleic Acids、AP-VAS2012 (アジア太平洋血管炎・ANCA 国際会議)、平成 24 年 3 月 28~31 日、東京都品川区
- (2) 奥崎 大介、野島 博、A novel Diagnostic markers for Takayasu Arteritis obtained by GenopalTM focused microarray based on Spearman rank correlation、第 33 回日本分子生物学会大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド
- (3) 奥崎 大介、野島 博、A novel Diagnostic markers for Takayasu Arteritis obtained by Genopal focused microarray based on Spearman rank correlation、第 10 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、平成 22 年 9 月 8 日、淡路夢舞台国際会議場
- (4) 奥崎 大介、野島 博、細胞生物学者の視点でみるマイクロアレイと次世代シーケンス、第 62 回日本細胞生物学会、平成 22 年 5 月 19 日、大阪国際会議場
- (5) 奥崎 大介、野島 博、DETECT システ

ムの開発、第 82 回生化学会 平成 21 年 10 月 21 日、神戸ポートアイランド(兵庫県)

- (6) 奥崎 大介、野島 博、GenopalTM; a novel device for focused microarray equipped with hollow fiber array、第 9 回あわじしま感染症・免疫フォーラム、平成 21 年 9 月 10 日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県)

[図書] (計 1 件)

- (1) Nojima H., Tougan T. Preparation of a high-quality cDNA library from a single-cell quantity of mRNA using Chum-RNA. *In* cDNA Libraries (Ed. By L. Chaofu, Browse J, Wallis JG). Humana Press (Springer Science), pp15-35, 2011.

[産業財産]

○出願状況 (計 1 件)

名称：白血球タンパク質の回収方法および回収装置

発明者：野島博、藪田紀一、奥崎大介

権利者：大阪大学

種類：特許

番号：K2009-0042

出願年月日：平成 21 年 10 月 26 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 3 件)

(1) 名称：ヒト腫瘍関連遺伝子とタンパク質

発明者：渡邊雅文、野島 博、玉井克之

権利者：(株) 医学生物学研究所 (MBL)

種類：特許

番号：特許第 4567140 号

取得年月日：平成 22 年 8 月 13 日

国内外の別：国内

(2) 名称：全身性エリテマトーデス患者血液細胞で発現亢進している遺伝子群、およびその利用

発明者：野島 博、恩田弘明、佐伯行彦

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4471803 号

取得年月日：平成 22 年 3 月 12 日

国内外の別：国内

(3) 名称：コネキシン 26 阻害剤およびそれを用いた癌転移抑制剤

発明者：野島 博、伊藤彰彦、北 泰行

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特許第 4331115 号
取得年月日：平成 21 年 6 月 26 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.biken.osaka-u.ac.jp/lab/molgenet/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 博 (NOJIMA HIROSHI)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：3 0 1 5 6 1 9 5

(2) 研究分担者

奥崎 大介 (OKUZAKI DAISUKE)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：0 0 3 4 6 1 3 1