

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：92615

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22120008

研究課題名（和文）植物組織を対象とした1細胞計測技術の開発

研究課題名（英文）Development of a single-cell analysis technique for plant cells

研究代表者

神原 秀記（Kambara, Hideki）

株式会社日立製作所（研究開発グループ）・その他部局等・その他

研究者番号：20397011

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 60,200,000円

研究成果の概要（和文）：植物や動物などの多細胞生物が、生活を営み、生長するしくみを理解する手段として、生体内の臓器や組織の遺伝子発現解析は重要なアプローチです。そこで我々は、植物体内の遺伝子発現分布を、詳細に解析する技術を開発しました。生きたままの植物体から、興味のある部分の微小組織片（約0.1mm）を、微細なニードルを用いて正確に採取し、その微小組織片の遺伝子発現を網羅的に解析することが可能です。我々は、モデル植物であるシロイヌナズナの4日齢の若芽について、その生長点（茎頂）部分を50µm間隔で解析し、生長点周辺の遺伝子空間分布を調べることに成功しました。

研究成果の概要（英文）：Cell and tissue-specific gene expression profiles are important for understanding how multicellular organisms function and develop. We report a novel, highly reliable position-specific gene expression profiling method developed for plants. It consists of an automatically dissecting system with a narrow, sharpened needle coupled with an optimized protocol to synthesize a high-quality cDNA library on magnetic beads using a single micro-sample. Using this method, gene expression patterning and clustering at successive 50-µm intervals was demonstrated in the shoot apex of a 4-day-old Arabidopsis seedling.

研究分野：DNA等生体関連物質計測

キーワード：単一細胞解析 遺伝子発現 遺伝子定量 植物組織 組織採取 cDNAライブラリー

1. 研究開始当初の背景

(1)基礎医学やバイオテクノロジー分野において、生命体の最小単位である細胞を1つの生命システムと捉え、個々の活動や、その集団的な動態などを把握する事により、これまでの「平均量での評価」では解明できなかった新しい現象・機能を解明する試みが活発化していた。また、個々の細胞の遺伝子状態を、1細胞レベルで解析し、細胞の状態や細胞間相互作用の理解に活用するニーズが高まっていた。

(2)我々は、1細胞に分離したヒト細胞を用いた高効率の cDNA ライブラリー合成技術を確立していた (文献①)。

(3)植物を対象に、組織ごとに分離した遺伝子発現解析が試みられていた (文献②)。しかし、植物の遺伝子解析は、以下の課題が存在する。

①細胞が細胞壁により結合しているため、1細胞化が難しい。

②細胞壁が遺伝子抽出の障害となり、遺伝子回収率が低下する。

③細胞内の液胞に遺伝子分解酵素が多量に存在し、破壊的刺激により液胞が破裂すると、分解酵素が細胞内に染み出す。そのため、細胞内の遺伝子 (mRNA) が分解されやすい。

2. 研究の目的

(1)植物体の組織ごとに分離した遺伝子発現解析を、高感度に解析するためには、以下の技術が必要である。

①分解能として、数十細胞レベルの微小組織片を、確実に植物体より採取する技術。

②採取した組織片より、高効率で遺伝子を抽出する技術。

③液胞内の遺伝子分解酵素の影響で生じてしまう遺伝子分解を抑制し、高感度に遺伝子解析を行う技術。

これらの技術を統合し、植物体の遺伝子発現分布解析技術の確立を目的とした。

(2)さらに、開発した技術を、植物生理学研究に応用し、植物の環境感覚を解明する共同研究を実施することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)植物体からの微小組織の採取では、採取時の刺激で遺伝子分解が開始されるため、迅速な採取と分解酵素の失活が必要である。そこで、以下の技術を開発した。

①内径 0.13mm の組織採取用ニードルを用いる微小組織片採取技術を開発した。ニードルによる組織の採取は、目的の部位について、迅速に操作できることが特徴である。組織片が確実に採取できる先端形状を検討すると共に、顕微鏡観察で目的の部位から正確に組織片が採取できる装置を試作した。

②組織の破碎と遺伝子回収時に、遺伝子分解

や損失が極力少ない cDNA 合成プロトコルを開発した。

③得られた cDNA を鋳型とする一括増幅技術と、大規模シーケンサーを利用し、微小組織片の網羅的遺伝子発現解析プロトコルを確立した。

4. 研究成果

(1)開発した微小組織片採取ニードルを図1に示す。ニードルは、サイズ：外径 0.26mm、内径 0.13mm で、4つの突端を有することが特徴である。ポンチの様な円筒状の先端では、ニードル貫入時に植物体が裂けることが多く、組織片の採取成功率が低い。一方、この4つの突端を有するニードルでは、ニードル貫入時に4点で同時に切断が開始されるため、組織片が確実にニードル内に採取される。これにより、約 130 μ m の微小組織片を、確実に採取することが可能となる。シロイヌナズナの子葉を用いた評価では、得られる組織片の大きさのバラつきは、約 9.7% (標準偏差) であった。

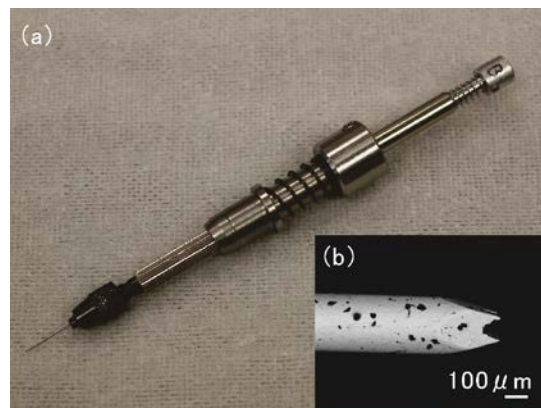


図1. 組織採取ニードル

(2)植物体を顕微鏡観察し、部位を選択して採取する微小組織採取装置を試作した。図2は、装置外観写真である。

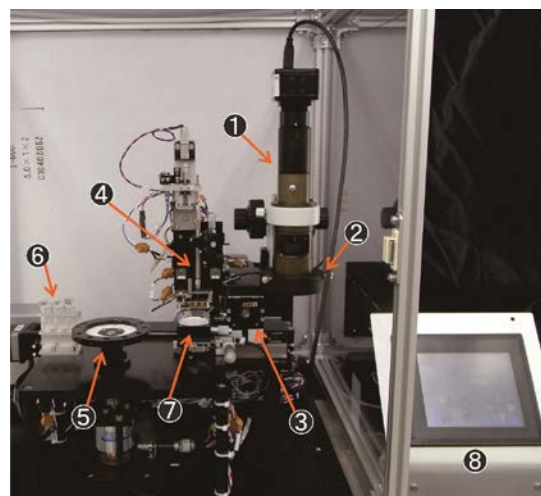


図2. 微小組織採取装置

装置は、ビデオマイクロスコップ①、波長 510nm の単色 LED リング照明②、X-Y ステージ③

ジ③、切片採取用ニードル④、組織片回収用チューブホルダ⑤、洗浄液ホルダ⑥、組織採取ステージ⑦、および制御コントローラー⑧で構成される。植物体を組織採取ステージ⑦に乗せ、ビデオマイクロスコープ①で確認した後、制御コントローラー⑧で採取実行命令を選択すると、採取ニードルが自動で動作して、組織片の採取とチューブへの回収を自動的に実行する。採取後のニードルは、洗浄液で洗浄することで、キャリーオーバーによるコンタミを防止する。図3は、試料として4日齢のシロイヌナズナの若芽を用いて、その茎頂部分の組織採取を行った例である。この採取装置は、組織採取から回収までを、約15秒で完了させることが可能であり、遺伝子の分解を最小限に抑えることが可能である。また、採取場所の誤差は、約10 μ mであった。

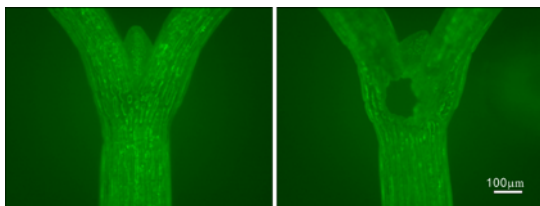


図3. 組織採取例 (左: 採取前、右採取後)

(3)採取した組織片より mRNA を回収し、cDNA ライブラリー合成を行うプロトコルを開発した。試料処理工程の概略図を、図4に示す。手順は、以下の通りである。植物体の任意の部分より組織片を採取し①、PCR チューブに回収する②。回収の際、チューブ内に予め用意した核酸分解酵素抑制試薬 (Buffer RLC, Qiagen) の液滴に回収する。その後、液滴を液体窒素で凍結し、ペッスルで完全に破碎する③。その後、ペッスルに付着した試料を、遠心器によりチューブ内に再回収する④。回収した試料を、PCR チューブ内で cDNA 合成すれば、cDNA ライブラリーを得られる⑤。なお、cDNA ライブラリー合成は、文献①の技術を用いた。

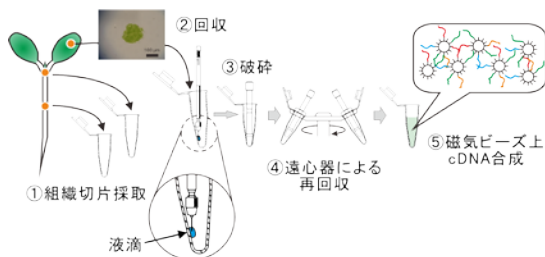


図4. 試料処理工程の説明図

我々の技術では、採取から液滴に回収して凍結するまで、15秒で完了する。そこで、シロイヌナズナの子葉を用いて、採取から凍結までの時間を変化させて、cDNA として得られる遺伝子量 (代表として、TUB2 (AT5G62690)) を比較する実験を行った (図5)。これより、組織片採取時の刺激によって遺伝子分解が誘引されること、およびその分解により、

cDNA 量が指数関数的に減少することが明らかとなった。

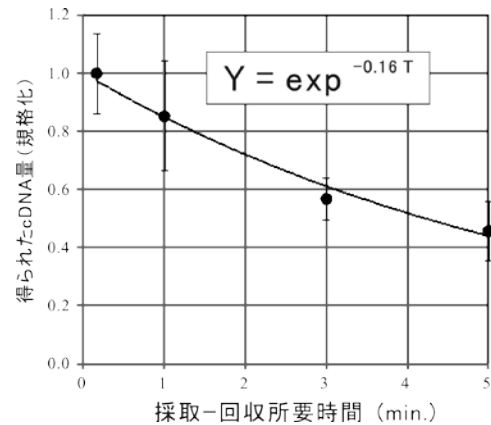


図5. 遺伝子分解の影響

(4)得られた cDNA ライブラリーを鋳型とし、一括増幅を行うことにより、大規模シーケンサー解析用サンプルを得る。一括増幅は、文献③, ④の技術を応用した。そこで、以下の応用研究を行った。光や温度の生活環境が、植物の生育に及ぼす影響を解析することは、本学術の主要なターゲットである。また、植物の生育は、その生長点である茎頂分裂組織が重要な組織となる。そこで、開発した技術を用いて、茎頂組織付近の遺伝子状態を空間的に解析する実験を行った。4日齢のシロイヌナズナは、直径約0.2mm程度の若芽であるが、生長著しい時期に相当する。また、若いため、個体差が小さく、比較しやすい。そこで、図6に示す様に、茎頂部分において、鉛直方向に50 μ m毎ずらした採取位置を設定して、組織片を採取し、得られた組織片の網羅的遺伝子発現解析を行った。図中、位置(3)が、茎頂分裂組織が存在すると想定される位置である。なお、4日齢のシロイヌナズナにおける茎頂分裂細胞組織の大きさは、約70~130 μ mと報告されている。また、茎頂以外の組織として、胚軸(7)、および子葉中心(8)の組織も同時に比較した。

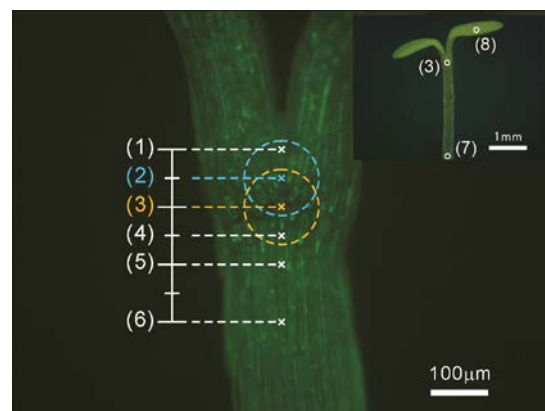


図6. 茎頂分裂細胞付近の採取位置

茎頂部分6ヶ所、及び胚軸と子葉中央の合計8ヶ所の微小組織片について、網羅的遺伝子発現解析を行い、場所ごとの遺伝子発現分布

を比較した。その結果、8ヶ所の組織片の何れかで、発現量の平均値が 20RPKM 以上で且つ変動係数(CV)が 0.4 以下の遺伝子は、3,795 個存在した。図 7 は、3,795 個の遺伝子について、クラスタリング解析を行った結果である(6 クラスタ)。クラスタ解析は、gCLUTO (文献⑤) を用いた。まず、クラスタ 3 は、茎頂の上部、すなわち葉原基に特異的な遺伝子群である。また、クラスタ 1 および 4 は胚軸、クラスタ 2 は子葉に、それぞれ特異的な遺伝子群である。一方、茎頂組織に特異的な遺伝子群は、クラスタ 5 に分類された。これより、茎頂分裂組織に関与する可能性のある複数の遺伝子を抽出することが出来た。

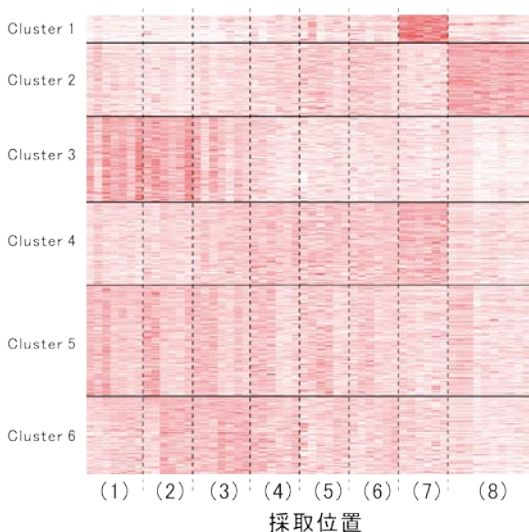


図 7. 発現遺伝子のクラスタ解析

また、この 8 種の組織片について、遺伝子発現パターンから試料の相同性を評価した結果が図 8 である。P1~P6 は、発現パターンが近い組織片が構成する山であり、2 つの山の距離はそれらの山の相同性を示している。また、各山を構成している遺伝子の内訳を、旗で示した。例えば、P2 の山は、位置(3)の組織片の 4/7 と、位置(1)の 1/6 および位置 2 の 2/6 で構成されていることを示している。

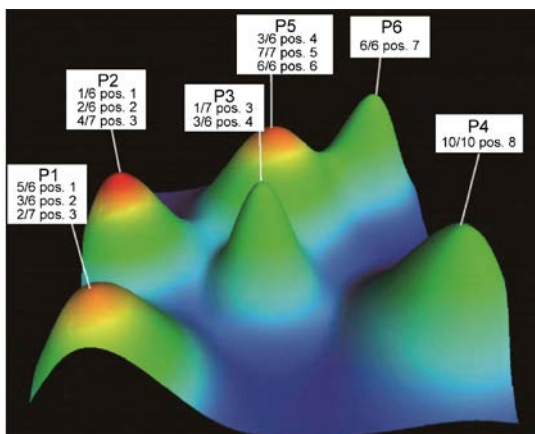


図 8. 発現パターンによる相同性評価

この結果、位置(3)の組織片の過半数は P2 の山に属するため、P2 の山の遺伝子発現パターンは茎頂に特徴的であると推定されるが、位置(1)および位置(2)の組織片の一部も、そのパターンに近い遺伝子発現分布を示したことがわかる。逆に、P1 の山の遺伝子パターンは、位置(1)および位置(2)に特徴的な発現パターンを有しているが、位置(3)のうち 2/7 は近い発現パターンを示したことがわかる。本学術研究で開発した解析方法を用いることにより、遺伝子発現の空間分布解析や、その発現パターンのクラスタリング解析が可能である。今後、生活環境の異なる植物間での比較や、刺激に対する遺伝子発現応答の組織及び場所による違いなどを、比較解析することが可能であり、応答メカニズムの解明に大いに役立つと考えている。現在、いくつかの共同研究を推進しており、その成果として、文献⑥および⑦を報告している。

<引用文献>

- ①Taniguchi, K., Kajiyama, T. and Kambara, H. (2009) Quantitative analysis of gene expression in a single cell by qPCR. *Nat. Methods* 6: 503-506.
- ②Jost, R., Berkowitz, O. and Masle, J. (2007) Magnetic quantitative reverse transcription PCR: A high-throughput method for mRNA extraction and quantitative reverse transcription PCR. *BioTechniques* 43: 206-211.
- ③Huang, H., Goto, M., Tsunoda, H., Sun, L., Taniguchi, K., Matsunaga, H. et al., (2014) Non-biased and efficient global amplification of a single-cell cDNA library. *Nucleic Acids Res.* 42: e12.
- ④Matsunaga, H., Goto, M., Arikawa, K., Shirai, M., Tsunoda, H., Huang, H. et al., (2015) A highly sensitive and accurate gene expression analysis by sequencing ("bead-seq") for a single-cell. *Anal. Biochem.* 471: 9-16.
- ⑤Rasmussen, M. and Karypis, G., (2004) gCLUTO - An interactive clustering, visualization, and analysis system. CSE/UMN Tech. Report TR04-021.
- ⑥Ohnishi, M., Kadohama, N., Suzuki, Y., Kajiyama, T. Schichijo, C., Ishizaki, K. et al. (2015) Involvement of Ca²⁺ in vacuole degradation caused by a rapid temperature decrease in *Saintpaulia* palisade cells: A case of gene expression analysis in a specialized small tissue. *Plant Cell Physiol.* in press.
- ⑦Nito, K., Kajiyama, T., Unten-Kobayashi, J., Fujii, A., Mochizuki, N., Kambara, H. et al. (2015) Spatial regulation of the gene expression response to shade in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Physiol.* in press.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Tomoharu Kajiyama, Akihiko Fujii, Kouji Arikawa, Toru Habu, Nobuyoshi Mochizuki, Akira Nagatani, and Hideki Kambara, Position-specific gene expression analysis using a micro-gram dissection method combined with on-bead cDNA library construction, Plant Cell Physiol., 査読有、7月号 (2015) 掲載予定

[学会発表] (計 7 件)

- ① 梶山 智晴、Development of a gene expression analysis technique for a small plant tissue, The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2015年3月13日、東京都・江東区
- ② 梶山 智晴、少数細胞を対象とした遺伝子発現解析技術の開発、第55回日本植物生理学会、2014年3月18日、富山県・富山市
- ③ 梶山 智晴、Development of single-cell analysis technology for plant cells, Frontiers of Single Cell Analysis, 2013年9月5日、Stanford (米国)
- ④ 梶山 智晴、Development of a single-cell analysis technique for plant cells, International Joint Symposium on Single-Cell Analysis, 2012年11月27日、京都府・京都市
- ⑤ 梶山 智晴、Development of a single-cell analysis technique for plant cells, The 1st International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2012年3月19日、奈良県・奈良市
- ⑥ 梶山 智晴、Development of a single-cell analysis technique for plant cells, 第53回日本植物生理学会、2012年3月18日、京都府・京都市
- ⑦ 梶山 智晴、Development of single-cell analysis technology intended for plant cells, 第52回日本植物生理学会、2011年3月20日、宮城県・仙台市

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

- ① 名称：細胞組織の遺伝子空間分布解析システム方法
発明者：梶山 智晴、他
権利者：日立
種類：特許
番号：PPCT/JP2013/069239
出願年月日：2013年7月16日
国内外の別：PCT
- ② 名称：植物組織採取方法及び植物遺伝子解析方法
発明者：梶山 智晴、他
権利者：日立
種類：特許
番号：P2014-500882, PPCT/JP2012/082732

出願年月日：2012年12月18日

国内外の別：PCT

③ 名称：洗浄装置

発明者：梶山 智晴、他

権利者：日立

種類：特許

番号：P2013-117401

出願年月日：2011年12月1日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神原 秀記 (KAMBARA, Hideki)

株式会社日立製作所・研開・フェロー

研究者番号：20397011

(2) 研究分担者

梶山 智晴 (KAJIYAMA, Tomoharu)

株式会社日立製作所・中研・主任研究員

研究者番号：50573044