

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02072

研究課題名(和文) マイクロ流体分画技術を用いた1細胞内構造体の泳動解析

研究課題名(英文) Electrophoretic analysis on cytoplasmic molecules and organelles in single cells using microfluidic fractionation

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では我々の開発した電場を使った1細胞前処理技術であるSINC-seq法(Single-cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA sequencing)を発展させ、1細胞に含まれる細胞内小器官および顆粒を“そのまま”の状態抽出し、その物理化学的物性解析と構成分子網羅解析を実現するマイクロ流体システムの構築を目指した。細胞質成分の抽出と電気泳動解析を並列化するマイクロ流体システムの開発し、48細胞の細胞質抽出成分の電気泳動図を再構成する方法を開発した。また、電気泳動解析と網羅遺伝子発現解析を統合するカラーコードハイドロゲルビーズを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究グループが独自に開発した細胞質-核分画技術におけるRNA流動を詳細に調べることで電気泳動がRNA長さに非依存的な抽出を実現する上で有利であることを明らかにした。このことは、電気泳動を活用した前処理技術が網羅遺伝子発現解析を実施する上で優位性を有することを意味している。また、新しいマイクロ流体システムの開発過程においてカラーコードハイドロゲルビーズ等、広範な用途への応用が期待できる要素技術の創出も達成することができた。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to develop a microfluidic system that extracts granules and cellular organelles with the native states from single cells and analyzes the physicochemical characteristics by electrophoresis and the molecular components in the subcellular structures via high-throughput sequencing by extending the SINC-seq (single-cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing). To this end, we developed a new microfluidic system that parallelized the 48 channels for the on-chip electrophoretic analyses and color-coded hydrogel beads for integrating the on-chip analyses and off-chip high-throughput sequencing.

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 電気泳動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内にはミトコンドリアや核等の膜構造を有する細胞内小器官に加えて、それを有さない細胞内構造体(顆粒)の存在が知られている。代表的なものとして、細胞質のストレス顆粒、核内の核小体やカハール体等がある。それら顆粒の大きさはおよそ0.1から4 μm 程度である。顆粒は特定の分子群、具体的にはタンパク質やRNAなどの核酸から構成されているが、顆粒内部では分子が拡散等により輸送されることが知られており、凝集体でありながら液相状の特徴も有している。これら顆粒の存在は古くから知られていたが、その形成機構と生理機能に関する研究は近年までそれほど進んでいなかった。その理由として膜構造を有さない顆粒を単離する方法が成熟していなかったことが挙げられる。細胞内における顆粒の形成過程は可逆的かつ動的である、顆粒はプロテアーゼ等により分解されやすい、溶解度が低い等の特徴から細胞内のそのままの状態を維持して解析することは非常に困難であった。そこで研究代表者のグループが開発したマイクロ流路における電場制御を用いて細胞質分子、細胞内小器官および顆粒の電気泳動解析および網羅遺伝子発現解析を統合する並列化マイクロ流体システムの開発を目指した。

2. 研究の目的

我々の研究グループが開発した1細胞の細胞膜破砕および荷電粒子の高速抽出は電場を使った完全物理的手法であり、一般的な細胞前処理で使われる界面活性剤を必要としない。また、細胞膜の破砕から細胞の内容物の抽出に至るまでの処理時間がおおよそ10秒と非常に短時間である。これらの特徴から我々の開発した1細胞前処理技術は細胞内の顆粒を“そのまま”の状態に抽出するのに適している。この特徴を生かして1細胞に含まれる顆粒の物理化学的物性解析と構成分子網羅解析を実現するマイクロ流体システムの創造を目指した。

3. 研究の方法

(1) 集中電場を用いた電気穿孔および等速電気泳動による細胞質成分の抽出

我々の研究グループが開発した細胞質と核の分画技術は、マイクロ流路に作製した狭窄構造において解析対象の1細胞を捕捉し、外部電場の印加により狭窄構造部において発生する集中電場を用いて細胞膜を選択的に破砕、そして細胞質成分を電気泳動で抽出する。まず、この一連の過程におけるRNA分子の流動現象について光学顕微鏡観察、数値流体力学および次世代シーケンス解析を活用して考察した。光学顕微鏡観察においては、RNA分子を得意的に染色する蛍光分子を探索し、SYBRGreen II (TakaraBio), Pyronin Y (Sigma-Aldrich)およびSYTO RNA Select (ThermoFisher Scientific)から流動性に与える影響および特異性を勘案してSYTO RNA Selectを選定した。そして、白血病細胞株K562細胞を用いてRNA分子の抽出過程を可視化した。抽出過程におけるRNAの流動現象を理解するために、数値流体力学による解析を行った。電場により細胞膜が破砕する過程(1 μs)と細胞質成分が抽出される過程(1s)それぞれの時定数に大きな乖離があることから、それぞれの過程をasymptotic Smoluchowski式とNernst-Planck式でモデル化した。さらに、光学顕微鏡観察と数値流体力学解析から同定された抽出の時定数を参考にして抽出時間を調整し、核分画に残留したRNA鎖の長さ分布からRNA鎖の長さとの抽出時間の関係性を実験的に明らかにした。

(2) 1細胞の細胞質分子を電気泳動解析する並列化マイクロ流体システムの開発

1細胞の細胞質成分の抽出と電気泳動解析を並列化するマイクロ流体システムの開発を行った。開発したシステムは、1細胞ずつ操作する既報のマイクロ流路と異なり、細胞導入用のマイクロ流路から並列に48本の電気泳動用流路が枝分かれする形状をしている。並列する48本の電気泳動用流路全てを蛍光顕微鏡で観察するため、電動ステージで微小マイクロ流体システム全体を巡回しながら高感度カメラ(Orca Flash 2.8, Hamamatsu Photonics)で撮影した。取得した画像は1視野あたり815 μm x 815 μm であり、同一座標で撮影した連続フレーム間の相互相関係数から蛍光分子の移動距離を算出し、それを元に電気泳動図を再構成する方法を開発した。

(3) 電気泳動解析と遺伝子発現解析を統合するカラーコードハイドロゲルビーズの開発

微小マイクロ流体システムから得られる細胞画像および電気泳動図と遺伝子発現データを統合するためのカラーコードハイドロゲルビーズを開発した。カラーコードハイドロゲルビーズは、DNAバーコードを表面に修飾した微小ハイドロゲルビーズであり、DNAシーケンス解析あるいは蛍光計測によりその配列を特定できる。蛍光計測でバーコード配列を特定する仕掛けとして、一部にDNAバーコードの相補配列を含むブリッジDNAを介して蛍光修飾付きのDNAフラグメントを微小ハイドロゲルビーズに付与し、四色の蛍光の明暗で16通りのDNAバーコードを読み出す方法を開発した。さらに、特定できる細胞数を増加させる方法として、あらかじめ細胞に導入した別のDNAバーコードとカラーハイドロゲルビーズ上のDNAバーコードの連結DNAバーコードを活用する方法を考案した。具体的には、あらかじめ解析対象の細胞に対して四色の蛍光の明暗を付与すると同時に、それと対応した16種DNAバーコードを細胞に導入し、細胞の形態観察の後に細胞内のmRNAとDNAバーコードをカラーハイドロゲルビーズで捕捉、その後DNAバーコードのライブラリを作製して読み出すという方法である。この方法により、カラーコードハ

イドロゲルビーズと細胞の DNA バーコードの組み合わせから最大で 256 通りの特定が可能である。

4. 研究成果

(1) 集中電場を用いた電気穿孔および等速電気泳動による細胞質成分の抽出

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(図 1)。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 分子は間欠的な流動を示し、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流動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。これらの解析結果について Analytical Chemistry 誌において公表した。

(2) 1 細胞の細胞質分子を電気泳動解析する並列化マイクロ流体システムの開発

開発した並列化微小マイクロ流体システムを評価するために、Calcein AM で染色した K562 細胞を用いて電気泳動を解析した。生細胞はエンドサイトーシスによって Calcein AM を取り込み、細胞質のエステラーゼによりアセトキシメチル(AM) エステルを切断することによって蛍光物質 Calcein を蓄積する。エステラーゼは主に脂質の代謝を担う分解酵素であり、Calcein の輝度値はエステラーゼの代謝能を反映する。得られた細胞の蛍光画像と電気泳動図から細胞の形態や Calcein の蛍光強度が 1 細胞ごとに異なり、また電気泳動図も同様に細胞ごとに異なる様相を示すことがわかった。また、細胞画像と電気泳動における輝度値の積分値を比較すると正の相関が見られた。以上から、開発した並列化マイクロ流体システムの動作が確認できた。

(3) 電気泳動解析と遺伝子発現解析を統合するカラーコードハイドロゲルビーズの開発

カラーコードハイドロゲルビーズおよび細胞の蛍光情報から DNA バーコードを特定する方法として、機械学習を用いた画像解析アルゴリズムを開発し、概ね 95%以上の精度で分類できることを実証した。また、DNA バーコードと mRNA のシーケンスライブラリの作製を同時に行えることを確認できた。これらの基本的技術開発に関して、投稿論文として報告するために、継続して実験データの収集を行なっている。

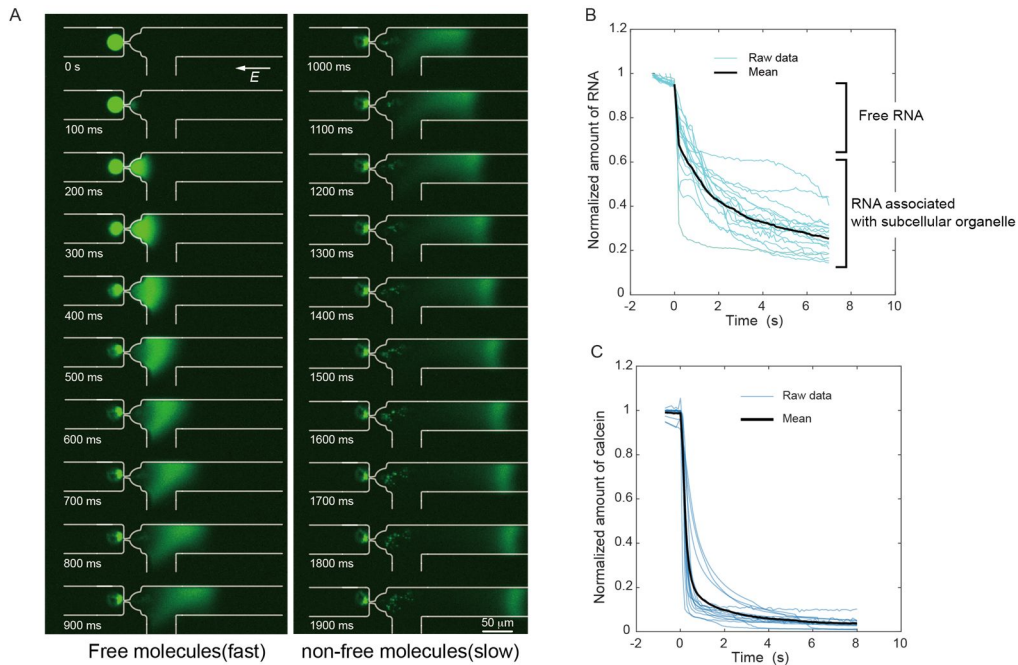


図 1 電場による RNA 分子抽出のダイナミクス。A) 可視化した連続写真。0-900 ms では浮遊した分子が主に抽出され、1000-1900 ms では顆粒状物体が抽出される。B) RNA の抽出ダイナミクス。特に細胞内構造体と相互作用する RNA 分子の流動において 1 細胞多様性が観察される。そのばらつきは対照実験として実施した calcein 分子(C)で観察されるばらつきと比較しても顕著である。

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 1件）

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 -
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 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 2020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, 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, 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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 9件)

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 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

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: Microfluidics 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（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

〔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 (第3章8. SINC-seq法による1細胞多階層解析)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

RIKEN Microfluidics Laboratory https://www.hshintaku.com/

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
---------	---------