

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05544・20K20457

研究課題名（和文）1細胞解像度を有したプラナリア全RNAアトラスの創出

研究課題名（英文）Construction of a Planarian Total RNA Atlas by using a novel single-cell total RNA sequencing technology

研究代表者

林 哲太郎 (Hayashi, Tetsutaro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・技師

研究者番号：70745413

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000 円

研究成果の概要（和文）：プラナリアの再生能力を司る全能性幹細胞の分子制御メカニズムの全貌は明らかになっていない。特に非翻訳RNAを含む非ポリA型RNAの解析は手付かすのみである。そこで、本研究では、プラナリア全RNAアトラスの構築及び全能性幹細胞の維持・分化制御機構に関与する非ポリA型長鎖非翻訳RNAの遺伝子ネットワークの解明を目指し、新規に1細胞方向性全長トータルRNA-seq法の開発を行った。その結果、既存のどの手法よりも高感度なShin-RamDA-seq法の開発に成功した。Shin-RamDA-seq法を用いてプラナリア細胞を解析したところ、全能性幹細胞に特異的に発現する新規転写物の検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発したShin-RamDA-seq法は、モデル生物だけでなく非モデル生物にも応用できる手法であるため、1細胞RNA-seq技術として大きなブレイクスルーとなっただけでなく、様々な生物の全RNAアトラスの創出に貢献できると期待される。非モデル生物の全RNAアトラスは個々の生物の基礎研究への寄与のみならず、生物固有のRNA配列情報からRNAを標的とした創薬や新規マーカーによる診断などに繋がるのが期待される。また、プラナリアで初めての非ポリA型長鎖非翻訳RNAの網羅的解析が実現したことで、今後、その幹細胞制御メカニズムが明らかになれば、再生医療への貢献も期待される。

研究成果の概要（英文）：The complete molecular control mechanism of the pluripotent stem cells that govern the regenerative ability of planarians is not yet fully understood. In particular, the analysis of non-poly-A RNAs, including noncoding RNAs, remains unresolved. Therefore, in this study, we aimed to elucidate the gene regulatory network of non-poly-A long noncoding RNAs involved in the maintenance and differentiation mechanism of pluripotent stem cells and to construct a total RNA atlas of planarians.

We succeeded in developing a novel single-cell full-length stranded total RNA-seq method, Shin-RamDA-seq, which was more sensitive than any existing method. By analyzing planarian cells using the Shin-RamDA-seq method, we successfully detected novel transcripts specifically expressed in pluripotent stem cells at single-cell resolution.

研究分野：分子生物学、発生生物学

キーワード：1細胞RNAシーケンス プラナリア 全能性幹細胞 非ポリA型RNA 全RNAアトラス トータルRNAシーケンス rRNA除去

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラナリア (*Dugesia japonica*) は再生能力が旺盛な生物として知られている。特に成体内に全能性幹細胞を恒常的に維持し、適切なタイミングで適切な場所に細胞分化、組織再生を可能とする能力はヒトやマウスをはじめとする高等生物にはない。プラナリア全能性幹細胞 (neoblast) の分化制御には、PIWI タンパク質をコードする *piwi* 遺伝子が関与していることが報告されているが、未だにその全貌は明らかになっていない (Reddien et al. *Science* 2005, Shibata et al. *Dev. Cell* 2016)。

近年、ヒトやマウスなどの RNA シーケンス (RNA-seq) を用いた包括的な解析から、タンパク質をコードするポリ A 型の mRNA だけでなく、ポリ A 配列の付かない非ポリ A 型の長鎖非翻訳 RNA (lncRNA) が様々な組織や細胞種において大量にゲノムから転写されていることが分かってきた (Hon et al. *Nature* 2017)。それらは、転写、翻訳、エピジェネティクスなど多くの役割を担っており、幹細胞で特異的に発現し多能性に関与する lncRNA も報告されている (Fort et al. *Nat Genet.* 2014, Fort et al. *Cell Cycle* 2015)。しかしながら、プラナリアにおいては、これまで、lncRNA を含む非ポリ A 型 RNA の包括的な解析がなされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、プラナリア非ポリ A 型 RNA を含む全ての RNA を細胞種ごとにカタログ化 (全 RNA アトラスの構築) し、全能性幹細胞の維持・分化制御機構に関与する非ポリ A 型 lncRNA の遺伝子ネットワークの解明を目的とする。プラナリアをはじめとする非モデル生物では細胞種ごとにサンプルを取り分ける術を有していない場合が多く、通常のパルク RNA-seq では細胞種が混在しているため細胞種特異的な RNA を決めることができない。このため、本研究ではプラナリアなど非モデル生物にも対応した 1 細胞方向性全長トータル RNA-seq 法を新たに開発する。

本研究において創出されるプラナリア全 RNA アトラスは、発生生物学の基礎分野だけでなく、再生医療や臨床研究においても非常に有用な知見となることが期待される。また、本研究において開発される 1 細胞方向性全長トータル RNA-seq 法は、モデル生物、非モデル生物を問わず、生物学研究において有用な解析ツールとなることが期待される。

3. 研究の方法

(1) これまでに林らが開発した 1 細胞全長トータル RNA-seq 法、RamDA-seq 法 (Hayashi et al. *Nat Commun.* 2018) は、転写方向情報の取得については未達であった。そこで、本研究では、RamDA-seq 法をベースに、deoxy-UTP (dUTP) 法 (Parkhomchuk et al. *Nucleic Acids Res.* 2009) と Tn5 トランスポゼースを用いたタグメンテーション法を組み合わせることで転写方向性の取得を試みた。

(2) 非ポリ A 型 RNA や RNA の全長を捉えるには、ランダムプライミングによる逆転写が必須である。しかしながら、ランダムプライミングを用いると細胞内で発現している RNA の 9 割を占める rRNA が cDNA に変換されてしまう。このため、rRNA 除去技術が必要となる。しかし、一般的な rRNA 除去法は非モデル生物に対応していないだけでなく、RNA のロスや操作の煩雑性から 1 細胞 RNA-seq には使用することができない。RamDA-seq では Not-so-random (NSR) primer を用いることで rRNA 由来のシーケンスリードを低減させることに成功したが、対応しているのはヒト、マウスのみである。このため、新たにプラナリア (*Dugesia japonica*) 用 NSR (djNSR) の検討を行った。さらに N6 ランダムプライマーでも対応できるように rRNA 配列非依存的な除去方法を検討した。

(3) 1 細胞 RNA シーケンスでは 1 細胞懸濁液を生存率良く調整することが重要である。このためプラナリアの 1 細胞化条件の検討を行った。

(4) 1-3 を組み合わせて、プラナリアの成体 10 匹を用いた 1 細胞方向性全長トータル RNA-seq 解析を実施した。384 ウェルプレートにセルソーターを用いて 1 細胞を回収し Shin-RamDA-seq ライブラリ作製を行った。作製したシーケンスライブラリは、NextSeq500 を用いて Paired-end 76 サイクルでシーケンスを実施した。

4. 研究成果

(1) 転写方向情報の取得のため、様々なリンカーオリゴと Tn5 トランスポゼースをアセンブリしてタグメンテーション法を試した結果、RT-RamDA 法で増幅させた二本鎖 cDNA に Y 型アダプターを付与することに成功した (図 1)。この方法を用いることで、一般的なライゲーション方式と異なり、アダプター挿入後の DNA 精製が不要となったため、ライブラリ作製のスループット及び成功率が大きく改善した。さらに非接触型の微量分注機を用いることで、試薬コストの大幅な削減も達成した。最終的には、384 ウェルプレートフォーマットを用いて、1 細胞ソーティングからライブラリ増幅までを DNA 精製なしの一気通貫で実施できるようになった。

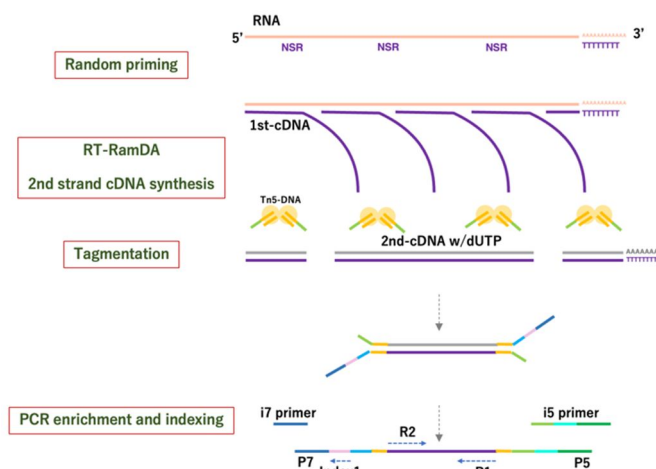


図1 Shin-RamDA-seq 法のパイプライン

の増幅を抑制させることに成功した。この方法を用いることで、rRNA 由来リードの混入率を 10% 以下に削減することに成功し遺伝子検出感度も向上させることができた。この新規 1 細胞方向性全長トータル RNA-seq 法を Shin-RamDA-seq 法と命名し、ヒト培養細胞 (HEK293T、K562) を用いて性能評価したところ、既存のどの手法よりも高精度・高感度な手法であることが分かった。(3)細胞生存率の向上のため、従来法の Trypsin をベースとした 1 細胞懸濁液調整から Cold-active protease をベースとした方法にすることで、細胞生存率が 39.6% から 53.1% と 10% 超向上させることに成功した。

(4)上記の成果を組み合わせることで、プラナリア細胞を用いた世界初の 1 細胞方向性全長トータル RNA-seq 解析に挑戦した。プラナリアの成体 10 匹を 1 細胞化し、MoFloAstrios セルソーターを用いて 1 細胞ソーティングを行い、384 ウェルプレート 4 枚分の Shin-RamDA-seq 解析を実施した。プラナリア用に改変した全長 RNA-seq 用の一次解析パイプライン Ramdaq を用いて QC 解析を実施し、遺伝子リードカバレッジとゲノムマップ率を指標にしてデータクリーニングを行った。その結果、1,103 細胞分のデータが二次解析に有効であることが分かった。1 細胞あたりの検出遺伝子数は全細胞平均で 8,445 遺伝子、rRNA の混入率は 10.4%、ストランド率は 92.3% という良好な結果を得た。

1 細胞 RNA-seq の二次解析用の R パッケージ、Seurat を用いてクラスタリングと UMAP で次元削減を実施したところ、プラナリア全能性幹細胞 (neoblast1) クラスタをはじめとする 12 の細胞クラスターを得ることができた(図 2)。各クラスターのアノテーションは、ハイスループット型のポリ A 型 3' 末端 RNA-seq 法である Split-seq を用いた先行研究(Castro et al. *Genome Biology* 2021)を参考に実施したところ、neoblast1-3 が 28.3%(312/1103 細胞)、epidermis が 23.5% (259/1103)、neuron が 18.0% (198/1103)であることが分かった。これは、これまでの知見と一致していた。また、非再生固体を用いたにも関わらず、neoblast1 から各分化細胞クラスターへの放射状の分化経路を

確認することができた。次に neoblast1 のクラスター特異的なマーカー遺伝子を探したところ、2,790 遺伝子もの特異的なマーカーを得ることができた。Castro らの SPLiT-seq 法の結果と比べると、およそ 270 倍ものマーカー遺伝子数となり、Shin-RamDA-seq 法の感度と精度の高さが実証された。neoblast1 マーカーの Top20 遺伝子の中には、非ポリ A 型 RNA であるヒストン遺伝子や、これまでプラナリアの neoblast マーカーとして知られていないレクチン遺伝子、さらには、ヒトやマウスのがん抑制遺伝子と相同性を示す新規遺伝子が含まれていた。また、遺伝子モデルにとらわれずにリードマッピングベースで解析が行える 1 細胞ゲノムブラウザ Millefy (Ozaki et al. *BMC Genomics* 2020) を用いて遺伝子モデルにない新規転写領域を探索したところ、neoblast1 や、神経幹細胞の neoblast3 と neurons クラスタに特異的に発現している未知の転写領域を発見した(図 3)。これらの転写領域は、これまでのポリ A 型 RNA を対象とした解析では未発見な転写物であるため、新規非ポリ A 型 lncRNA である可能性が高い。

(2)ランダムヘキサマーの 4,096 種類の配列からプラナリアの rRNA の相補鎖配列を除くことで、712 種類の配列を得た。これをプラナリア NSR (djNSR) としてオリゴ合成した。これまでは、NSR オリゴの精製グレードをカラム精製としていたが、作製したライブラリの平均長が安定しないことが判明した。そこで、脱塩グレードに変更することで、安定して良好な結果が得られることが分かった。これにより、NSR を合成するコストも大幅に削減することができ、より手軽に生物種特異的な NSR の作製が行えるようになった。さらに NSR を用いずに rRNA をテンプレート RNA から除くために、エキソヌクレアーゼと RT-RamDA 反応組成中に添加物を入れる事で、rRNA 由来 cDNA

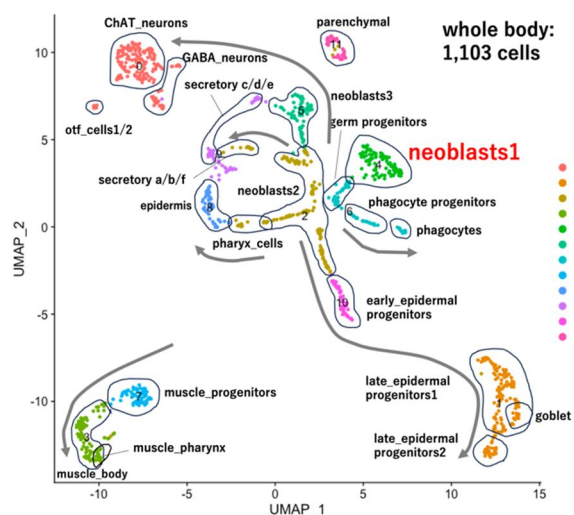


図2 プラナリア 1,103 細胞のクラスタリングと UMAP の結果

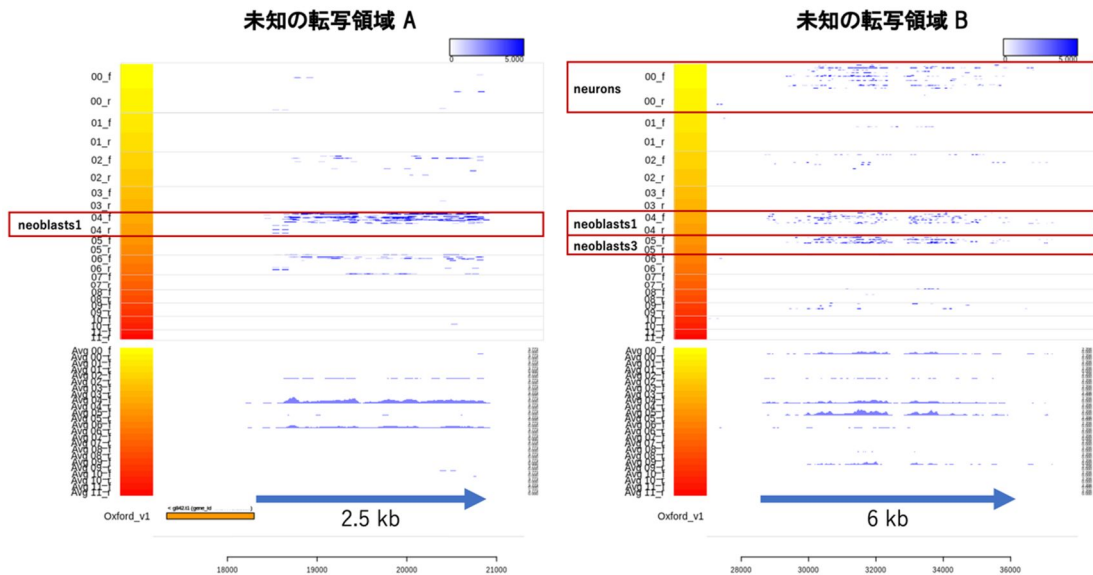


図3 neoblast1 と neoblast3-neurons に特異的な新規転写領域の Millefy プロット

まとめると、本研究では、RamDA-seq 法を改良し転写方向性の取得と非モデル生物の rRNA 由来リードの抑制を達成した Shin-RamDA-seq 法の開発に成功した。Shin-RamDA-seq 法を用いることで、プラナリアにおいて世界初の 1 細胞方向性全長トータル RNA-seq 解析を達成することができた。さらに neoblast 特異的な新規遺伝子や非ポリ A 型 RNA と想定される新規転写領域を同定できたことは大きな成果と言える。

一方で、今回の解析は非再生固体を用いているため、再生特異的発現を示す遺伝子が捉えられていない可能性が高い。今後は再生時系列個体を用いたさらなる 1 細胞解析や新規遺伝子の機能解析が必要となるだろう。また本研究では、プラナリア全 RNA アトラスの構築までには至らなかった。その理由の 1 つとして、*Dugesia japonica* のリファレンスゲノムの不完全性が挙げられる。現状では 10 万断片以上にゲノム配列が分断されており、その為、本解析でもゲノムマップ率が 70%程度と、ヒトやマウスの 90%以上と比べると大きく劣っていた。より完全なリファレンスゲノムがプラナリア全 RNA アトラス構築に必須であり今後の喫緊の課題である。また、本研究では Shin-RamDA-seq 法を開発する過程で、磁性ビーズを使って微量核酸をハイスループットに精製するための磁気デバイス、BiT-Mag96 や BiT-Mag384 を開発した。これらは、それぞれ 2019 年、2023 年にサンプラテック社から上市され社会実装することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Lee Hayoung, Hikasa Kanon, Umesono Yoshihiko, Hayashi Tetsutaro, Agata Kiyokazu, Shibata Norito	4. 巻 149
2. 論文標題 Loss of plac8 expression rapidly leads pluripotent stem cells to enter active state during planarian regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.199449	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 Mori Masato, Narahashi Maria, Hayashi Tetsutaro, Ishida Miyuki, Kumagai Nobuyoshi, Sato Yuki, Bagherzadeh Reza, Agata Kiyokazu, Inoue Takeshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Calcium ions in the aquatic environment drive planarians to food	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-019-0147-x	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 Miyamoto Mai, Hattori Miki, Hosoda Kazutaka, Sawamoto Mika, Motoishi Minako, Hayashi Tetsutaro, Inoue Takeshi, Umesono Yoshihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 The pharyngeal nervous system orchestrates feeding behavior in planarians	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aaz0882	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林哲太郎	
2. 発表標題 新規1細胞 total RNAシーケンス法を用いたプラナリアの全RNAアトラス構築への挑戦と展望	
3. 学会等名 第56回日本発生生物学会（招待講演）	
4. 発表年 2023年	

1. 発表者名 林哲太郎
2. 発表標題 バイオ「実験」DXで挑む1細胞オミクス技術開発
3. 学会等名 NGS EXPO 2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林哲太郎，久世真理子，二階堂愛
2. 発表標題 1 細胞から様々な転写ダイナミクスを読み解く技術の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林哲太郎，久世真理子，二階堂愛
2. 発表標題 1 細胞中の全ての転写産物を漏れなく全長シーケンスする技術への挑戦
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林哲太郎，久世真理子，二階堂愛
2. 発表標題 新規1細胞トータルRNAシーケンス法を用いたプラナリア全RNAアトラス計画
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン 米子大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 哲太郎
2. 発表標題 Development of a single-cell full-length total RNA sequencing for non-model organisms.
3. 学会等名 日本発生物学会第53回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 林 哲太郎
2. 発表標題 1 細胞RNA-seqの手法開発者が磁性ビーズ用のマグネットプレートを自作してみた
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 林哲太郎，二階堂愛	4. 発行年 2024年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 323
3. 書名 実験デザインからわかるシングルセル研究実践テキスト	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 リボソームRNA由来の逆転写の抑制	発明者 武田貴成，林哲太郎， 二階堂愛	権利者 理化学研究所、 東洋紡株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-010502	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 改良されたライブラリー調製方法	発明者 山越 奈々，林哲太 郎，二階堂愛	権利者 理化学研究所、 東洋紡株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2021-183612	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 時間延長による増幅率向上	発明者 武田貴成，林哲太郎， 二階堂愛	権利者 理化学研究所、 東洋紡株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、2021-144972	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 非特異的な核酸増幅を抑制する方法	発明者 山越 奈々、山崎 友 実、林 哲太郎、二階 堂 愛	権利者 東洋紡株式会 社、理化学研究 所
産業財産権の種類、番号 特許、2019-176436	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

マグネットプレート BiT-Mag96の上市 https://www.sanplatec.co.jp/product.php?id=1492&fbclid=IwAR1luMU5C13qcDygnkLSyWM-i3a-eBVCFPiPQlAaXgrqVg3_pekgw2Cv3Sk

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