

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651218

研究課題名(和文)多数の1細胞から定量性のある網羅的遺伝子発現情報を取り出すための基盤技術の開発

研究課題名(英文)Technical development for novel Single-cell RNA-seq

研究代表者

笹川 洋平 (Sasagawa, Yohei)

独立行政法人理化学研究所・情報基盤センター・上級センター研究員

研究者番号：10404344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞RNA-seq法は、様々な生理条件で観察される1細胞間に現れるRNA量の不均一性を検出する重要な方法である。1細胞RNA-seq法では、定量性を保ったまま多数の1細胞を解析するスループット性能が重要である。1細胞RNA-seq法は、1細胞からのcDNAの増幅と、その後の増幅cDNAから超並列型シーケンサー用のライブラリDNAへの変換の2つの過程からなる。本申請課題では、両方の過程のスループット性能を上昇させた他、極めて優れた効率を持つシーケンスライブラリDNA作製方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Single-cell RNA-seq is powerful tool to detect gene expression heterogeneity in various developmental processes. Ideal single-cell RNA-seq represents high-throughput performance with high-quantitative performance. In this program, I assessed and developed high-throughput single-cell RNA-seq method based on Quartz-Seq.

研究分野：バイオテクノロジー

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：バイオテクノロジー 単一細胞 トランスクリプトーム 1細胞

1. 研究開始当初の背景

発生過程や様々な生理条件における細胞集団では、各1細胞のゲノム情報は同じであるが、1細胞間にRNAやタンパク質の発現量の不均一性が観察される。不均一性と細胞機能の関連が示唆されており、網羅的にRNA量の不均一性を捉えることは、発生や分化また薬剤・環境応答のメカニズムを解明する重要な手段となる。1細胞から網羅的な遺伝子発現情報を得るための技術として、1細胞RNA-seq法が研究開始当初既に報告されていたが、技術的にいくつか問題があった。

典型的な1細胞には約10 pgのtotal RNAが含まれており、そこには約0.1 pgのmRNAが含まれている。一方検出機器である超並列型シーケンサーのスタートリアルには、100 ng以上のtotal RNAが必要である。1細胞RNA-seq法では、この差を埋めるために、mRNAからcDNAを増幅すること、またその後増幅cDNAを超並列型シーケンサー用のシーケンスライブラリDNAに変換することが必須である。しかしcDNA増幅時のバイアスが高く定量性が低いことや、cDNA増幅法やシーケンスライブラリ作製方法が簡便でなくスループットが低いことが1細胞RNA-seqの問題点としてあった。また1細胞RNA-seq解析は多数の細胞を解析することが非常に重要である。これまでに申請者は、非常に高感度で高い定量性を持つ1細胞RNA-seq法Quartz-Seqを開発し、定量性の問題を解決してきた。Quartz-SeqのcDNA増幅は、一つのPCRチューブ内ですべての反応が完了するよう方法が簡素化されている。一方で、一つのPCRチューブごとに処理しているため、スループット性能の問題は残っており、定量性を担保しつつ、スループットを上昇させる技術開発が必要であった。

2. 研究の目的

1細胞RNA-seqのためには高い定量性をもった網羅的なcDNAの増幅方法とその後のシーケンスライブラリ作製が必要である。次にcDNA増幅法とシーケンスライブラリ作製の簡便化を通じたハイスループット化が求められる。本研究では、1細胞からのcDNA増幅法とその後のシーケンスライブラリ作製法の定量性の向上とスループット向上を目指した。特に、これまで申請者が開発してきたQuartz-Seq法(開発時SP1)をベースに増幅法に手を加え、定量性を担保しつつハイスループット化された方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 増幅方法の高度化

～逆転写反応の改善～

cDNA増幅では、mRNAを逆転写反応によりcDNAにした後、増幅可能な形に変換し、その後PCRにより増幅する。逆転写反応が失敗するとその後の増幅がおこらない。逆転写反応の効率

は、cDNA増幅方法の効率に直結する。Quartz-Seqの条件で、1細胞レベルであるmouse ES細胞由来10 pg total RNAを用いて逆転写反応した後、qPCRにより逆転写反応の効率を検出した。Zip nucleic acid: ZNA修飾されたoligo-dT primerを用いた場合と非修飾のoligo-dTを用いた場合の逆転写反応の効率を比較した。

(2) 増幅方法のハイスループット化

～処理方式のハイスループット化～

Quartz-Seqでは、シングルPCRチューブ単位でcDNAの増幅を進め、試薬の分注において各チューブごとに上から加える形で処理していた。それでは、最初に分注したPCRチューブと最後に分注したPCRチューブでタイムラグができる他、チューブ間のクロスコンタミネーションが問題になる。そこで、8連PCRチューブおよび96穴PCRプレートの蓋に試薬を分注し、5000Gで1分遠心することで一気に分注し、増幅できるか調べた。

(3) ライブラリ作製の高度化

～ライブラリDNA変換効率の上昇～

Quartz-Seqでは、増幅cDNAを超音波により断片化し、平均長50-200bpほどの二本鎖DNAを作製し、両端にY型シーケンスアダプターをDNAライゲーションによって付与することでシーケンスライブラリDNAに変換する。ライブラリ作製の効率を上昇させることで、cDNA増幅におけるPCR増幅のサイクル数を下げることができる。ライブラリ作製方法の条件を改善し、既存の方法(Nat Methods 2009 6(4):291)と改善法を用いて、ライブラリ作製効率を計測した。10 ngの断片化mouse genomic DNAを人工サンプルに、Y型シーケンスアダプターが付与された有効ライブラリDNAの比率をqPCRにより計測した。

(4) ライブラリDNA作製のハイスループット化

～増幅後の産物をRNAにする方式～

Quartz cDNA増幅方法では、約20サイクルのPCR増幅し最終産物が二本鎖cDNAとなる。その後のシーケンスライブラリDNA作製の前に、超音波破碎による断片化が必要である。断片化作業をするための機器および消耗品は高価で、かつ一つ一つ処理するためスループットが低い。一方で、最終産物がaRNAの場合、Mgイオンなどのカチオンで簡単にかつハイスループットに断片化を行うことができると考えられた。最終産物をaRNAにするためにcDNA増幅でPCR増幅とIVT増幅を組み合わせる条件を探索した。その後シーケンスライブラリが作製可能を確認した。

(5) ライブラリDNA作製のハイスループット化

～Tn5トランスポゼースを使った方式～

cDNAの断片化を必要としないTn5トランスポゼース方式を用いた Nextera XT システムの評価をおこなった。Quartz-Seq で得られた、200 pg, 100 pg, 50 pgの増幅cDNAを用いてシーケンスライブラリを作製した。その後、シーケンスで評価した。

(6) その他

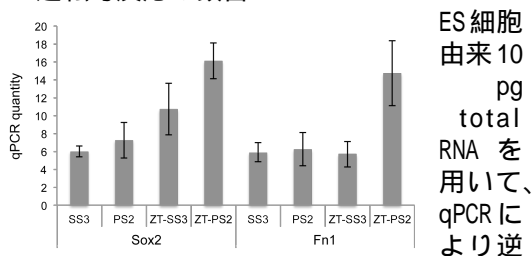
～non-poly-A RNA-seq～

Quartz-Seqを含む、全ての1細胞RNA-seq法では、poly-A RNAの検出を対象としている。そのため、poly-Aの付与されていないnon-poly-A RNAを検出する方法は報告されていない。1細胞RNA-seq技術の大きな方向性として、精度、スループットに加えて、non-poly-A RNAを検出する方法の評価・開発が急務となってきている。そこで既存のキットやキットの改変、またオリジナルのnon-poly-A RNAを検出する方法の開発を行い、評価を試みた。

4. 研究成果

(1) 増幅方法の高度化

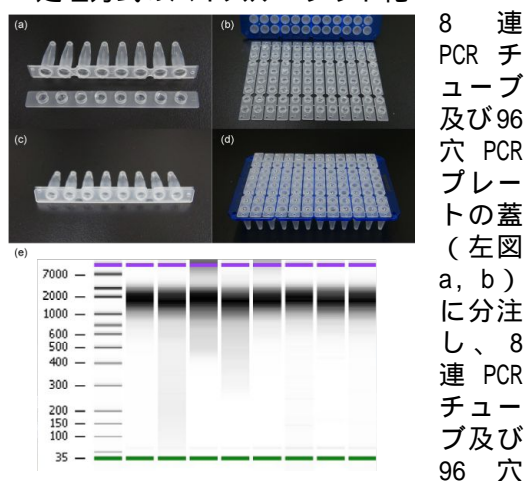
～逆転写反応の改善～



ES細胞由来10 pg total RNAを用いて、qPCRにより逆転写反応の効率を計測した結果、ZNA修飾したoligo-dT primer (ZT)を用いた場合に、優位に効率が上昇した。特にTaKaRa社のPrimeScript逆転写酵素との組み合わせで顕著な効率上昇が観察された。

(2) 増幅方法のハイスループット化

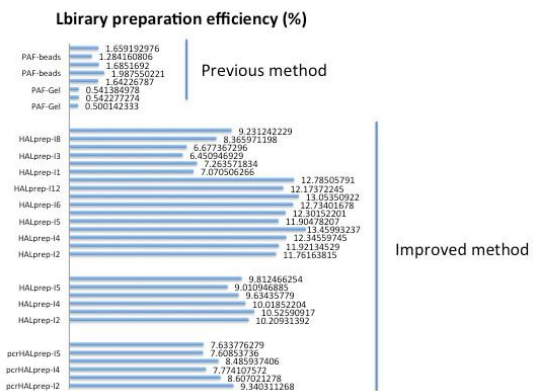
～処理方式のハイスループット化～



PCRプレートと組み合わせることで(c, d)一気に分注することに成功し、cDNAの増幅にも問題なく使えることがわかった(e)。処理方式のハイスループット化に成功した。

(3) ライブラリ作製の高度化

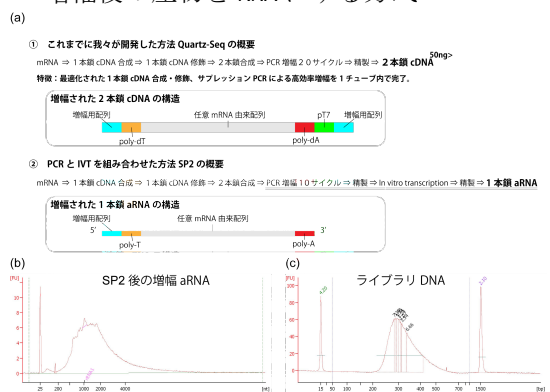
～ライブラリDNA変換効率の上昇～



Y型シーケンスアダプターを構成するプライマーの5'側にリン酸基をつけて合成した後、T4 Polynucleotide Kinaseで酵素的にさらにリン酸基付与した。これらのプライマーをもちいてY型アダプターを作製した。またライブラリ作製で用いる磁気ビーズのロスが効率の低下を招いていたため、強力な磁気ビーズスタンドを作製した。またDNA末端を修復する温度条件を変更した。これらの改善により、既存法ではスタート材料の1%がライブラリDNAに変換されることを10%変換できるまでに改善した。一方で、いくつかのアダプターで10%まで到達しないものがあり、アダプター合成により大きく効率が依存することも分かった。将来的に10%から100%にさらに上昇させることも可能だと考えられ、100%になれば様々なシーケンスライブラリ作製方法に適用できインパクトが大きい技術となる可能性が高い。将来的に100%を目指して開発を進める予定である。

(4) ライブラリDNA作製のハイスループット化

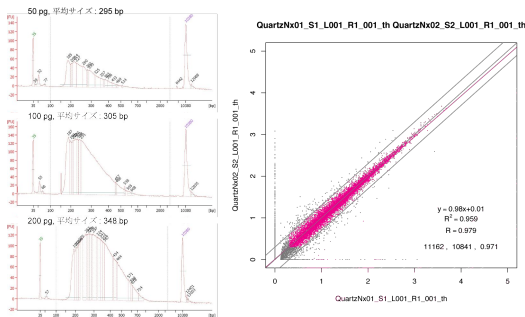
～増幅後の産物をRNAにする方式～



Quartz-Seqの条件を元に、10サイクルPCR増幅を行った後、精製しIVT増幅した(上図a)。十分量のaRNAを得ることに成功した。カチオンにより同時に96穴単位でライブラリDNAに変換することが可能であった。一方で、RNA-seq用ライブラリDNA作製には、1細胞あたりのコストが約10,000円かかる。処理自体はハイスループット化できたが、コストの問題が残った。

(5) ライブラリ DNA 作製のハイスループット化

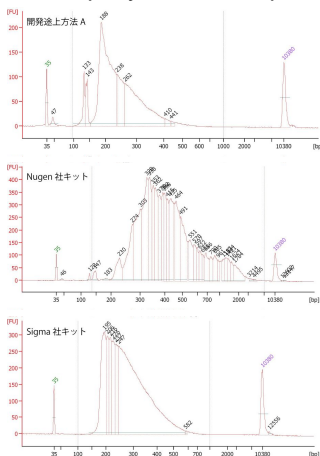
～Tn5 トランスポゼースを使った方式～



Tn5 トランスポゼースを使用する Nextera XT と増幅 cDNA の関係を調べた。スタートマテリアルとして 50-100 pg 使用した場合、シーケンスライブラリ DNA のサイズ長はおおよそ 300bp と安定していた。一方、200 pg の場合、サイズが大きくなった。できるだけ、増幅した cDNA から断片化によりインサートを回収する目的で 100 pg 以下の条件を選んだ。シーケンス解析によるチェックの結果、10,000 以上のトランスクリプトが検出でき、十分に高い性能を発揮することがわかった。スループットに優れるほか、1 回あたり 3,000 円とコスト面でも優れていた。また通常の 1/5 のボリュームでうまくいくことが確認できた。スタートマテリアルとして 20 pg の増幅 cDNA がライブラリ DNA に必要で、600 円と大幅にコストダウンできた。これにより総合的に、スループットを改善することに成功した。

(6) その他

～non-poly-A RNA-seq～



ES 細胞由来 10 pg total RNA と Universal mouse reference RNA 10 pg をスタートマテリアルとして、random primer をベースとする方法で増幅した。rRNA と結合しうる配列をのぞいた Not so random primer 混合液を作製し、逆転写反応に使用した。その後、二本鎖 cDNA を合成した。合成後全量、Nextera XT キットでライブラリ DNA を作製した。結果、十分量のライブラリ DNA を得ることに成功した。シーケンスアダプター由来だと考えられるサイズのライブラリ DNA が現れる問題があり、さらなる微調整が必要である。比較対象として、Nugen 社キット、Sigma 社キットを使用し、増幅し、ライブラリ DNA を作製した。シーケンス解析を行い、1 サンプルあたり 20M reads

以上のデータを得た。現在、データ解析を進めている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 件)

(1) 笹川洋平、1 細胞 RNA-seq をはじめるにあたって、“よくわかる次世代シーケンサー解析”～最先端トランスクリプトーム解析～、2014 年 3 月 17 日、九州大学馬出キャンパス

(2) 笹川洋平、細胞の不均一性を高精度に判別する 1 細胞 Quartz-Seq 法の紹介、日本学術振興会ゲノムテクノロジー第 164 委員会第 41 回研究会、2013 年 11 月 8 日、東京

(3) 笹川洋平、細胞集団の不均一性を判別する 1 細胞 Quartz-Seq 法の紹介、東京大学 GCOE ゲノム情報ビックバンから読み解く生命圏第 44 回 GCOE 談話会、2013 年 11 月 8 日、東京

(4) 笹川洋平、1 細胞 Quartz-Seq 法誕生までの開発の道のりと今後の展開、NGS 現場の会第 3 回研究会、2013 年 9 月 4 日、神戸市

(5) 二階堂愛、笹川洋平、0.1 pg の mRNA をシーケンスする高精度な RNA-seq 法: Quartz-Seq、イルミナウェビナー、2013 年 6 月 4 日、東京

〔図書〕(計 1 件)

笹川洋平、二階堂愛、上田泰己

株式会社羊土社

1 細胞 RNA-Seq 法の最前線と今後の展開 (実験医学 Vol.31 No.15)

2013 年

7 ページ

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://bit.accc.riken.jp/protocols/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹川 洋平 (Yohei SASAGAWA)
独立行政法人理化学研究所・情報基盤センター・上級センター研究員

研究者番号：10404344

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：