

1 細胞 RNA 分画解読法の開発に成功

—細胞生物学の研究を加速—

理化学研究所（理研）開拓研究本部新宅マイクロ流体工学理研白眉研究チームの新宅博文理研白眉研究チームリーダー、マハメッド・ナディ・アブデルモエズ研修生、東京大学大学院理学系研究科の小口祐伴特任助教、上村想太郎教授、京都大学大学院医学研究科飯田慶特定助教らの共同研究グループ^{*}は、一つの細胞から核 RNA^[1]と細胞質 RNA^[1]を分画して、それぞれの遺伝子発現を解析できるマイクロ流体技術を基盤とする「1 細胞 RNA 分画解読法（SINC-seq 法^{注1)}」を開発しました。

本研究成果は、遺伝子発現制御の理解を通じて細胞生物学の研究を加速し、将来的には、遺伝子治療や創薬、微生物産業などへの応用展開が期待できます。

近年、細胞の多様性を理解するために「1 細胞 RNA-seq 法^[2]」が用いられています。RNA は核内で発現した後、細胞質に移動してタンパク質に翻訳されるまでにさまざまな修飾を受けますが、これまで、1 細胞から核 RNA と細胞質 RNA に分離して、網羅的に遺伝子発現を解析する技術はありませんでした。

共同研究グループは、マイクロ流路における電場と流れを制御して、1 細胞から核 RNA と細胞質 RNA を分離して並列に解読解析する SINC-seq 法を開発しました。そして、本手法を用いて一つの細胞内の RNA の局在や遺伝子発現の相関を解析できることを実証しました。さらに、これらが、細胞周期^[3]や RNA スプライシング^[4]などの生命機能と密接に関わっていることを示しました。

本研究成果は、英国の科学雑誌『*Genome Biology*』のオンライン版（6 月 6 日付け：日本時間 6 月 6 日）に掲載されました。

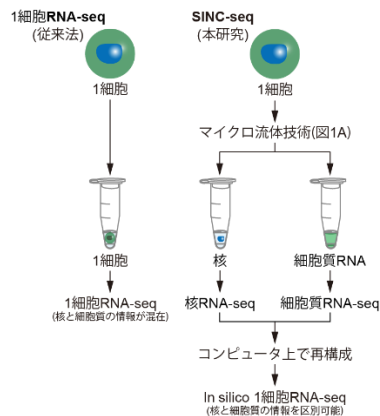


図 SINC-seq 法の概要

※共同研究グループ

理化学研究所 新宅マイクロ流体工学理研白眉研究チーム

理研白眉研究チームリーダー 新宅 博文 (しんたく ひろふみ)

研修生 マハメッド・ナディ・アブデルモエズ
(Mahmoud Nady Abdelmoez)

(京都大学大学院工学研究科博士後期課程)

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻

特任助教 小口 祐伴 (おぐち ゆうすけ)

教授 上村 想太郎 (うえむら そうたろう)

京都大学大学院医学研究科

特定助教 飯田 慶 (いいだ けい)

筑波大学医学医療系血液内科

准教授 錦井 秀和 (にしきい ひでかず)

スタンフォード大学

教授 ワン・ジー・サンティアゴ (Juan G. Santiago)

京都大学大学院工学研究科

准教授 横川 隆司 (よこかわ りゅうじ)

教授 小寺 秀俊 (こてら ひでとし)

※研究支援

本研究は、内閣府革新的研究開発推進プログラム (ImPACT) 「セレンディピティの計画的創出による新価値創造 (合田圭介プログラム・マネージャー)」の支援を受けて行われました。また、本研究の一部は日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金 挑戦的萌芽研究「単一細胞の RNA および DNA 同時抽出・解析技術の開発 (研究代表者：新宅博文)」および基盤研究 (B) 「マイクロ・ナノ電気穿孔法による細胞核への分子導入法の開発 (研究代表者：新宅博文)」の支援を受けて行われました。

注 1) Single cell Integrated Nuclear and Cytoplasmic RNA-seq 法

1. 背景

近年、「1 細胞 RNA-seq 法」により一つの細胞の中に存在する RNA を網羅的に計数することが可能になり、細胞ごとの遺伝子発現を詳細に理解できるようになりました。しかし、1 細胞 RNA-seq 法では、解析対象となる 1 細胞を単離することが必要不可欠であるため、単離が難しい脳神経細胞などでは、細胞の代わりに単離した核を用いる「核 RNA-seq 法」が使われ始めています。

核 RNA と細胞質 RNA は、RNA の局在などにより異なる発現パターンを持つ可能性が複数の細胞を利用した解析から知られています。そのため、核 RNA-seq 法を 1 細胞 RNA-seq 法の代用として利用する方法の妥当性は不明でした。また、核 RNA と細胞質 RNA の発現を 1 細胞レベルかつ網羅的に比較することで、RNA スプライシングなどの遺伝子発現調節機構に関して新たな知見が得られると期待されていました。

しかしこれまで、1 細胞から核 RNA と細胞質 RNA を分離して網羅的に遺伝子発現を解析する技術はありませんでした。加えて、1 細胞に含まれる RNA 量は

10 ピコグラム (pg, 1pg は 1 兆分の 1 グラム) 程度と非常に少量であることも、核 RNA と細胞質 RNA を分離して別々に解析するための技術的障壁の一つでした。

2. 研究手法と成果

共同研究グループは、マイクロ流体力学と生命科学の融合により、核と細胞質分子を正確に分離するシステムを構築し^{注 2)}、一つの細胞から核 RNA と細胞質 RNA を並列に解析解析することを可能にしました (図 1)。

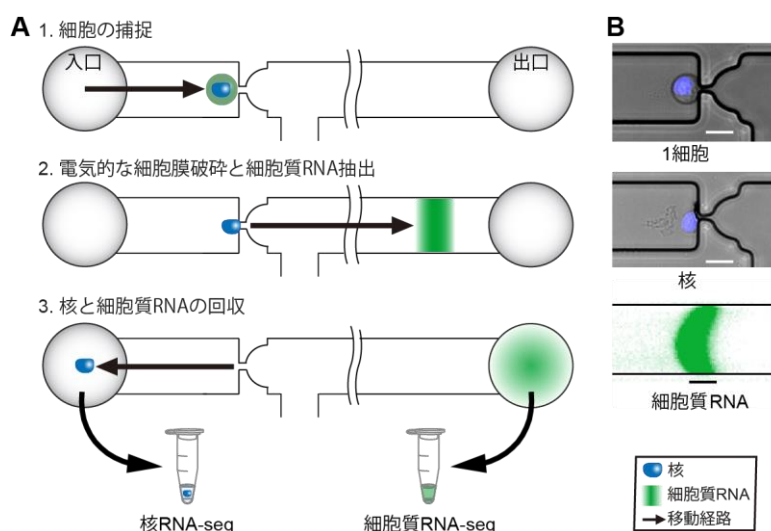


図 1 SINC-seq 法の概要

- A) 本研究で開発した SINC-seq の概要。マイクロ流体技術で 1 細胞を核と細胞質 RNA に分画し、それぞれを RNA-seq で解析。マイクロ流路 (幅 50 マイクロメートル (μm), $1\mu\text{m}$ は 100 万分の 1m)、深さ 25 μm) に設けたオリフィス構造に細胞を捕捉し、電気的な細胞膜の破碎と細胞質 RNA の抽出、核との分画を可能にする。分画後はそれぞれのサンプルを回収してさまざまな分析に利用できる。
- B) 上から順に、オリフィスに捕捉した 1 細胞、細胞質 RNA 抽出後の核、等速電気泳動法により抽出された細胞質 RNA。スケールバーは 20 μm 。

注 2) 新宅博文, 藁谷卓哉, 上村想太郎, 小口祐伴, 生体高分子分画用チップ、それを用いた生体高分子の分画方法、および生体高分子の分析方法, 特許第 6338262 号

このマイクロ流体システムは、マイクロ流路内に 1 細胞を捕捉するオリフィス構造 (流体を流す小さな穴) を持っています。細胞補足後に外部電場を加えることで、オリフィス構造の近くに形成される集中電場により細胞膜が選択的に破碎され、細胞質 RNA が効率的に抽出され、核と細胞質 RNA が正確に分画されます。本手法は新宅理研白眉研究チームリーダーが 2014 年に開発した手法^{注 3, 4)}と比較すると、加える電圧をおよそ 20 分の 1 程度に下げることができます。このことにより、装置の簡略化、電気伝導性の高い細胞懸濁液の使用などの選択肢が広がりました。また、分離した核と細胞質 RNA はマイクロ流体システムから別々に回収し、これらを独立した分析にかけ、遺伝子の局在を網羅的に知るこ

とができます (図 2A)。

さらに、1 例として核 RNA と細胞質 RNA の並列解読解析を実施し、それぞれの遺伝子発現パターンに見られる相関性の全貌を 1 細胞レベルで調べました。その結果、遺伝子発現データから、核 RNA と細胞質 RNA の発現はおおむね相関しており、核 RNA-seq 法による 1 細胞解析の妥当性が示されました。さらに、相関性が比較的高い群は細胞周期に関わる遺伝子を多く含むことが分かりました。一方で、明確な相関性が観察されない、あるいは逆相関する遺伝子群も一定数存在し、それらが RNA スプライシングなどの特徴的な機能を持つ可能性が示されました (図 2B)。

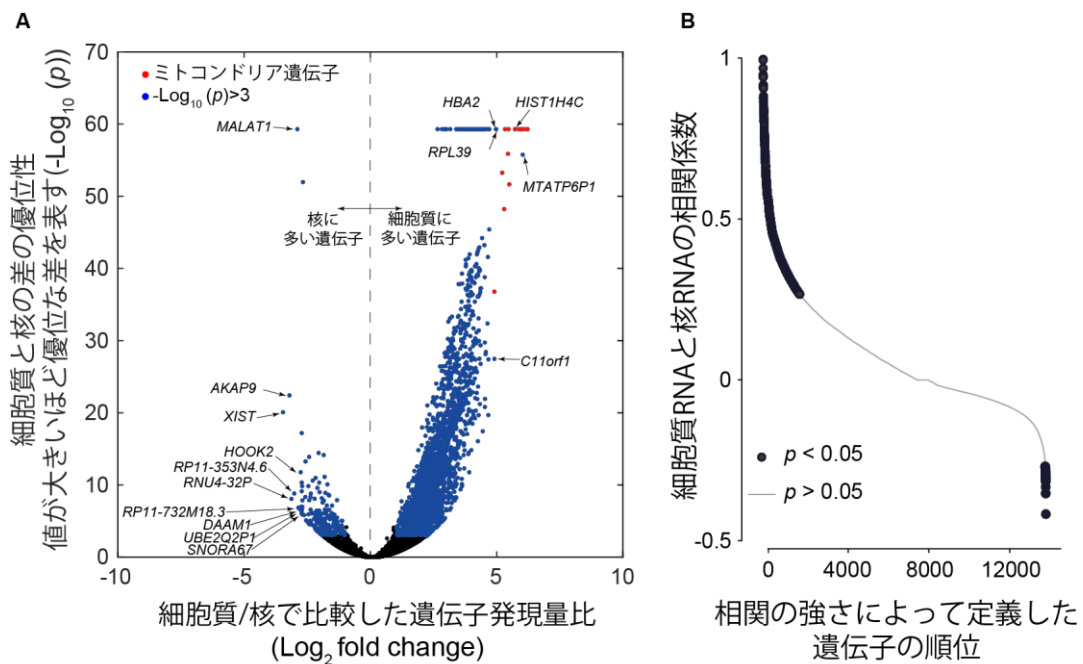


図 2 SINC-seq 法により得られた並列 RNA-seq の結果の 1 例

- A) 核 (左) と細胞質 (右) における遺伝子局在解析。ミトコンドリア遺伝子群は細胞質に局在していることから、分画が成功していることを示している。
- B) 核と細胞質における遺伝子発現変動の相関解析。相関の強さによって遺伝子を並び替え (順位を Gene rank として表記)、相関の強い遺伝子群 (縦軸 1~0.3) と逆相関の強い遺伝子群 (-0.4~ -0.3) を抽出した。p は帰無仮説の有位確率。多くの遺伝子で相関係数が正であることから核 RNA と細胞質 RNA の発現がおおむね相関していることが分かる。

注 3) Juan G. Santiago, Hirofumi Shintaku, Simultaneous Extraction and Separation of RNA and DNA from Single Cells Using Electrophoretic Techniques, US 14/593,925 (2015/1/9), PCT/US2015/010884(2016/4/7)

注 4) Hirofumi Shintaku, Hidekazu Nishikii, Lewis A. Marshall, Hidetoshi Kotera, and Juan G. Santiago, On-Chip Separation and Analysis of RNA and DNA from Single Cells, *Analytical Chemistry*, Vol. 86, No. 4 (2014), pp 1953-1957.

3. 今後の期待

従来の 1 細胞 RNA-seq 法に加えて今回開発した SINC-seq 法を利用すること

により、核と細胞質間での RNA 輸送を含む遺伝子発現の転写後制御の理解が進み、将来的には、それらの知見をもとに遺伝子発現を効果的に制御することで、遺伝子治療や創薬、微生物産業などへ応用展開されることが期待できます（図3）。また、本技術による分離対象の必要要件は、溶液中で電荷を持つことだけであるため、細胞内の RNA 以外の分子や細胞内小器官の分離・分析技術の基盤となる可能性があります。

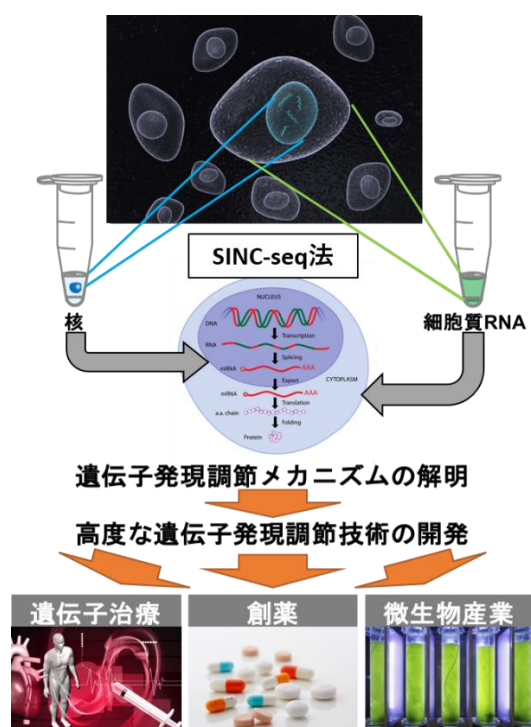


図3 SINC-seq 法に利用による今後の進展

遺伝子発現制御の理解を通じて細胞生物学の研究を加速し、将来的には、遺伝子治療や創薬、微生物産業などへの応用展開が期待できる。

4. 合田圭介プログラム・マネージャーのコメント



本成果は、ImPACT「セレンディピティの計画的創出による新価値創造」に参画する新宅チームによるものです。本チームでは、膨大な細胞集団から分取した目的の細胞一つ一つを、より詳細に解析するための技術を開発しています。今回の成果は、世界で初めて、一つの細胞を複数の分画に分けて遺伝子発現を解析することに成功したものです。本技術は、1細胞を捉えて細胞内の機能、特に遺伝子の発現制御メカニズムを理解するための新たな情報を得ることができるため、本プログラムが目指す希少で貴重な細胞の分取と解析において大きな役割を果たすものと期待されます。

5. 論文情報

<タイトル>

SINC-seq: correlation of transient gene expressions between nucleus and cytoplasm reflects single-cell physiology

<著者名>

Mahmoud N. Abdelmoez, Kei Iida, Yusuke Oguchi, Hidekazu Nishikii, Ryuji Yokokawa, Hidetoshi Kotera, Sotaro Uemura, Juan G. Santiago, and Hirofumi Shintaku

<雑誌>

Genome Biology

<DOI>

10.1186/s13059-018-1446-9

6. 補足説明

[1] RNA

ゲノムは細胞が持つ全遺伝情報であり、DNA（デオキシリボ核酸）という生体高分子に4種類の塩基の配列として記録されている。ゲノムの中の遺伝情報が記録（コード）された領域が遺伝子である。遺伝子領域の情報は、DNAを鋳型としてRNA（リボ核酸）が合成（転写）されることで読み出される。

[2] 1細胞RNA-seq法

1細胞中に含まれるRNAを、ハイスループットDNAシーケンサーを用いて解読（塩基配列決定）し、網羅的かつ定量的にその量や種類を決定する方法。

[3] 細胞周期

細胞は、分裂を繰り返して増殖するが、この細胞分裂のサイクルを細胞周期と呼ぶ。細胞周期は、間期とM期に分けられる。分裂が起こるM（Mitosis）期と、DNAの複製が起こるS（Synthesis）期、それぞれの間をつなぐG1（Gap1）期、G2（Gap2）期からなり、サイクルはG1→S→G2→M→G1→…の順に進む。

[4] RNA スプライシング

ゲノム上の遺伝子をメッセンジャーRNA（mRNA）に転写する過程の一つ。ゲノム上の遺伝子はエクソンとイントロンからなるが、mRNAが形成される過程でイントロン配列が削除され、エクソン配列のみがmRNAとして残る。