

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業  
(創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業)

2. 補助事業課題名：超微量 RNA シーケンス技術の支援と高度化

3. 研究開発代表者：

国立研究開発法人理化学研究所 情報基盤センター

バイオインフォマティクス研究開発ユニット ユニットリーダー 二階堂愛

4. 研究開発の成果

### 【支援】超微量 RNA シーケンス法の支援

平成26年度は、1から100細胞に相当する10 pg-1 ngまでの微量RNAシーケンスを安定に支援するために、微量細胞のサンプル受け渡しや超微量RNAの高効率の抽出法、サンプル受け入れ時の品質管理項目について調査し、支援の仕様を策定した。具体的には細胞あたりのRNA量が2-20pg、細胞サイズが10 μm前後、1細胞化のプロトコルが確立されていること、用意できる細胞数が1条件あたり5万細胞であること、などの仕様を策定した。

これらの仕様のもと、96ウェルフォーマットでの増幅反応を自動分注装置NGS Workstation (Agilent社)と自作の強力なマグネットスタンド(日本ジェネティクス社との共同開発)を利用することで自動化できた。また96ウェルプレートに、タイムラグなく全ウェルに分注するため、プレート蓋に試薬を分注し、遠心機で分注するスピンドウン法を用いることで、効率的に正確な増幅を達成できた。またライブラリ作製は、ライゲーションに基づくライブラリ作製法から、トランスポゼースを利用したタグメンテーションに変更することで簡便化した。これらの開発により、96ウェルプレートでの増幅が一度に4枚分を1日で実施できる実験ラインが完成できた。

この結果、96ウェルプレートフォーマットで1細胞Quartz-Seqを実施できるようになった。今年度は試験運用の予定であったが、先行して12件の本番の支援を実施できた。また、既存のRNA-Seq試薬を利用して、安定して1-10 ng程度のRNAをシーケンスできるプロトコルを機能ゲノミクスAへ技術移転した。これはillumina社のTruSeq kitの逆転写部分をSuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies)に置き換えた方法である。

平成 27 年度は、高度化によって、より高精度な超微量シーケンス法 RamDA 法の開発に成功したため、H28年度に予定していた計画を前倒して、RamDA 法の実験ライン化を進めた。その際に開発した装置・プログラムを企業と連携し上市した。これを用いて 3 件 (3,000 細胞)の支援を達成した。データ解析をクラウドコンピュータ上で自動化し、96 ウェルプレート 4 枚分 (約 350-360 個の 1 細胞に相当)のデータ解析が自動的に 2 日で終了できるようになった。

### 【高度化】新規 RNA 増幅法による超微量 RNA シーケンス法の高度化

既存の超微量 RNA シーケンス法では、低発現遺伝子が実験回によって、検出されない問題がある。そこで、以下の 3 点について改善し、新しい高精度な超微量 RNA シーケンス法を開発した。

#### ① 捉えられるRNA分子種の拡大

準無作為核酸プライマーの設計と合成を行った。まず、rRNA/tRNAを捉えないが、それ以外のRNAはすべ

て捉える準無作為核酸を合成し、RNAをcDNAへ変換した。rRNAが増幅しないことを定量PCRで確かめた。またヒストンmRNAなど既知の非ポリA-RNAが捉えられたことを定量PCRで確認できた。

## ② RNAを鋳型とした鎖置換活性による新規cDNA増幅法の開発

RNAを鋳型とした鎖置換活性による新規cDNA増幅法により、1細胞相当の10 pgのRNAを増幅した。RNAの増幅に最適な酵素条件を探索した。その結果2つの酵素で最適な温度・濃度条件を設定することができた。1細胞相当の10 pg Total RNAをn=7でqPCRを行い、通常の1 ng のqPCRと比較した結果、低発現領域の遺伝子の捉え漏らしを20%から3%へと減少させることができた。この反応が、細胞でも実施できることを示すため、マウス胚性幹細胞と分化細胞(原始内胚葉細胞)を用いて1細胞RNAシーケンスを行ったところ、Quartz-Seq Nextの1.5倍以上、市販の試薬に比べて2.8倍以上の遺伝子検出精度が得られた。またこの反応のPCT特許出願を行った。

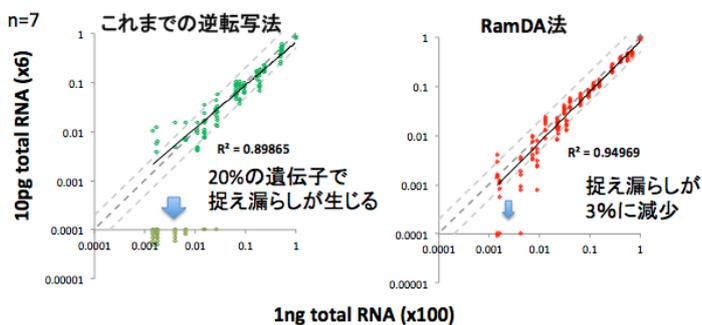


図 1. RNA 鋳型鎖置換活性による 1 細胞 qPCR

## ③ DNA捕捉効率向上による超微量DNAのシーケンスライブラリ作製技術の開発

3-10%の効率でDNAを捕捉する系を安定化させた。さらに今年度の目標を越える30%までの上昇を達成した。まず、ライゲーション酵素のスクリーニングにより、KAPA Hyper Prep Kit (KAPA BIOSYSTEMS)に付属する酵素効率が高いことが明らかになった。そこで、反応液量を減少させ、アダプター量を調整することで30%程度のライゲーション効率を達成することができた。異なるインデックスアダプターごとのライゲーション効率を比較したところ、均一に30%程度の増幅を確認できた。

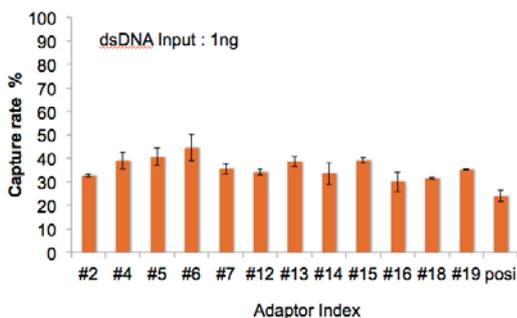


図 2. インデックスごとのライゲーション効率の違い

以上の3つの技術を組み合わせ、既存の1細胞RNA-seq法の性能を越える手法の開発に成功したため、H28年度に予定していたRamDA法による支援を前倒しで実施した。