

Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit と GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents を用いた単一細胞マイクロアレイ解析法

江角 重行、玉巻 伸章

熊本大学大学院 医学薬学研究部 脳回路構造学

■ 単一神経細胞のプロファイリング解析の必要性

脳神経系や免疫系のように高度に多様化した細胞集団から成り立つ組織においては、近接して存在し形態が似通った細胞ですら異なった遺伝子発現パターンを持つことが知られている。中でも哺乳類の中樞神経系組織は、他に類を見ないほどに多様な細胞により構成され、神経回路が形成され、神経活動が営まれている。多様化した神経回路の成り立ちや機能を調べるためには、個々の単一中樞神経細胞の発現遺伝子プロファイルを調べるのが重要である。これまでも単一細胞より得た cDNA を増幅して発現遺伝子プロファイリングを行った例は幾つか報告されているが^{1, 2, 3, 4}、それらの報告にある方法のプロセスは難しく、分子生物学者でも再現性を持って繰り返し実施できず、他分野の研究者であれば分子生物学者の助けなくして利用できる技術ではなかった。我々は、他分野の研究者が技術の修練なく短期間で再現性を持って単一細胞発現遺伝子プロファイリングを行える方法を確立すべく、研究を重ねてきた。現在までに、Clontech 社の Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit とアフィメトリクス社の GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents を組み合わせ、単一細胞に含まれる mRNA を歪曲が生じないように PCR サイクルを最小限に抑えて増幅させ、アフィメトリクス社の GeneChip® 4 枚程度の実験を行うのに十分な量の biotin 標識が入った cRNA まで増幅することに成功した⁵。さらに我々は胎生 18 日～生後 0 日目 (E18-P0) の GAD67-GFP ノックインマウス⁶の脳室下帯より単一の GFP 陽性細胞を単離し、単一細胞マイクロアレイ法を用いて GABA 神経前駆細胞の発現プロファイルの解析を行った。

■ 単一細胞マイクロアレイ法の精度

増幅の再現性、信頼度を確かめるため、GABA 神経細胞が GFP により蛍光ラベルされている GAD67-GFP ノックインマウスを使用した。GAD67-GFP ノックインヘテロマウス (E18-P0) の脳室下帯より、GFP 陽性細胞をセルソーターにより分離して得た 1 μg の total RNA からアフィメトリクス社のプロトコルに従ってマイクロアレイ解析を行った場合と、同 total RNA を 10 万倍希釈し、単一細胞レベルの total RNA 量と考えられる 10 pg から Super SMART™ キット (図 1) とアフィメトリクス社の One-Cycle Target

Labeling and Control Reagents による増幅を行ってマイクロアレイ解析を行った場合で、サンプル間のシグナル強度を比較した (図 2)。

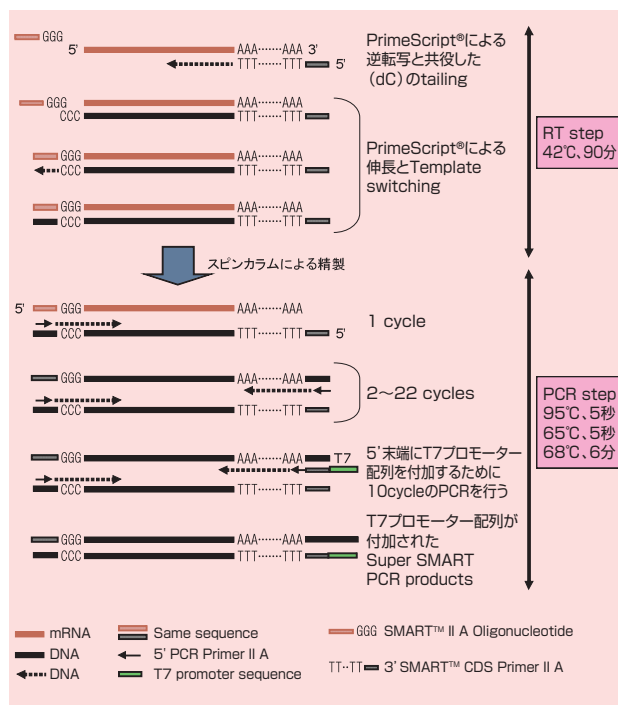


図 1 Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit を用いた mRNA の増幅と T7 プロモーター配列の付加

その結果、1 μg の total RNA を初発材料としたサンプルで発現が統計的に有意であると判断されて Present call が付いた遺伝子の約 55 % に、10 pg から増幅したサンプルにおいても再び Present call が付き、その 90 % の遺伝子の相対的シグナル値が 5 倍以内で再現されることがわかった (図 2C-1)。これは、10 万個の細胞から採取した total RNA で確認された発現遺伝子の 55 % が単一細胞でも確認でき、mRNA の発現量に 10 倍以上の変化があった場合には 90 % 以上の確率で検出できることを意味している。次に、GABA 神経細胞で実際に発現することがわかっている遺伝子のシグナル強度をプロットしたところ、そのシグナル強度は 5 倍以内に収まっていた (図 2C-2)。これらの遺伝子ごとのシグナル値は、実際に細胞内での相対的発現量を示していると考えられる。最後に、希釈したサンプル間でのばらつきと再現性を調べるため、別々に増幅したサ

サンプル間でシグナル強度の比較を行ったところ、85%以上の遺伝子が5倍以内で再現されることから、高い再現性で増幅が行われていることがわかった(図2D)。

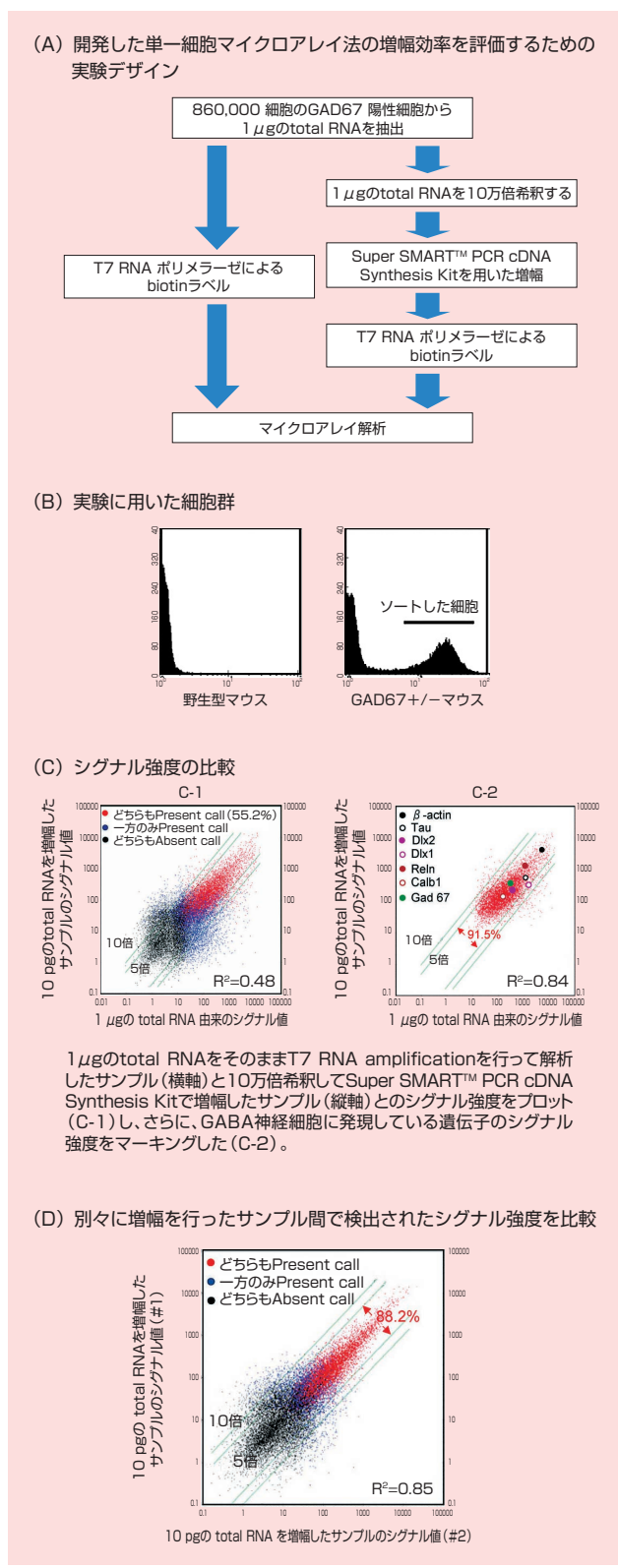


図2 単一細胞マイクロアレイ法の増幅効率の評価
 我々の開発した方法ではPCRによる増幅後にも約55%の遺伝子の発現を確認することができ、その90%の相対的発現量が5倍以内で再現されることがわかった。これは、単一細胞の発現遺伝子の55%を確認でき、発現量に10倍以上の変化があった場合には、90%以上の確率で検出できることを意味している。

■ 大脳皮質 GABA 神経前駆細胞の単一細胞マイクロアレイ解析

上記の方法を用いて、GAD67-GFP ノックインヘテロマウス (E18-P0) の大脳皮質の脳室下帯から分離した GFP 陽性細胞の、単一神経細胞マイクロアレイ解析を行った。実験のフローチャートを図3に示す。まず、胎生18日～生後0日目の大脳皮質から脳室下帯を切り出し、トリプシンを用いて組織を dissociate した。バラバラになった細胞を蛍光倒立顕微鏡下で観察し GFP 陽性細胞をピックアップしてチューブに移し、Super SMART™キットを用いて逆転写を行った(図1)後、スピンカラムでcDNAを精製し、引き続いてPCR反応を22サイクル行った。次に、T7プロモーター配列を含むプライマーをサンプルに加え、10サイクルのPCRを行った(このサンプルを以降 Super SMART PCR Products と呼ぶ)。単一細胞を由来とする Super SMART PCR Products の一部をテンプレートとして、β-actin (ハウスキーピング遺伝子)、β III-tubulin (初期の神経細胞マーカー)、GAD67 (GABA 神経細胞のマーカー) をPCRで確認し、増幅が認められたサンプルのみを次の工程に進めた。選別された Super SMART PCR Products をカラム精製し、アフィメトリクス社の GeneChip® One-Cycle Target Labeling and Control Reagents を用いて biotin ラベルされた cRNA とし、マイクロアレイにハイブリダイズさせた後、計測・解析を行った。このような工程を経ることは、高価なアレイを無駄に使用することがないという利点がある。

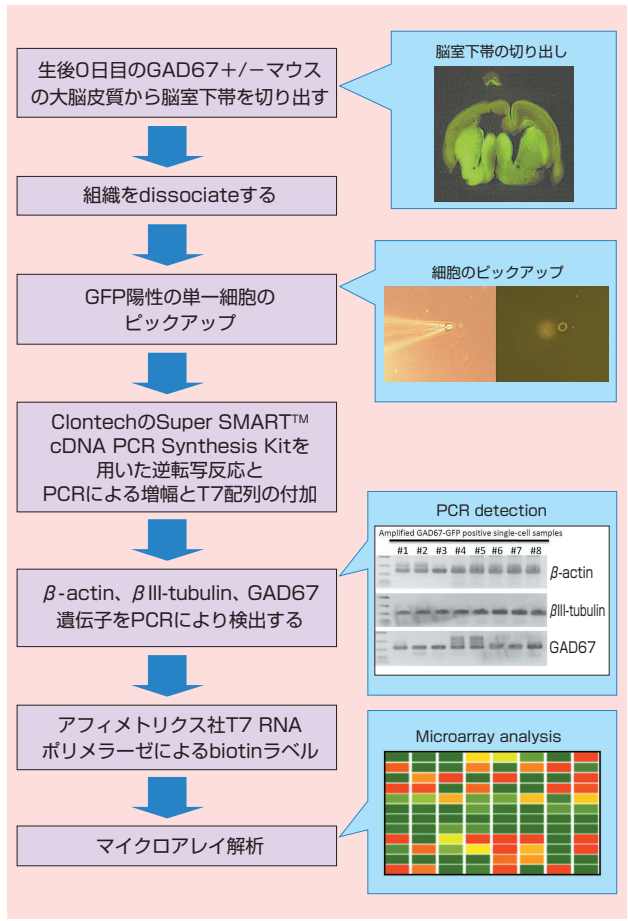
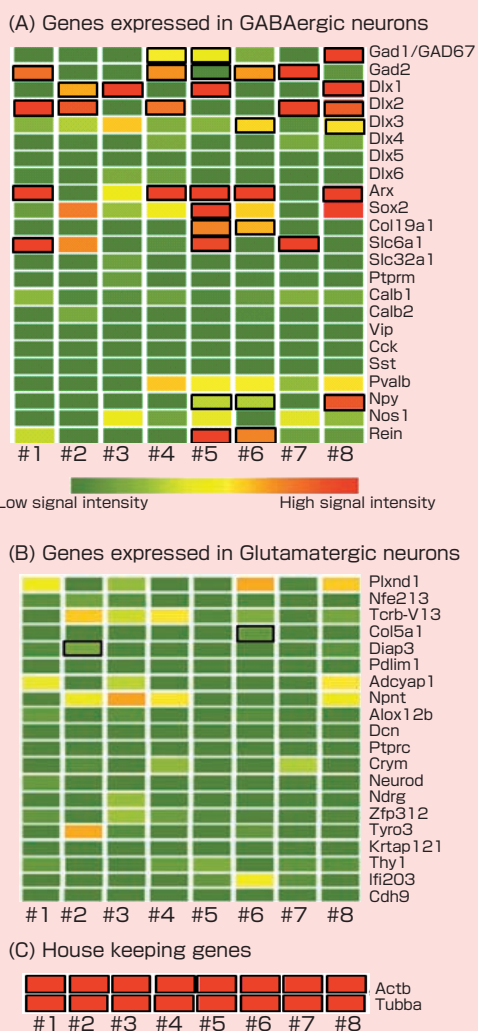


図3 単一細胞マイクロアレイ解析のフローチャート

この実験系を用いて行った、GABA神経前駆細胞を用いた単一細胞マイクロアレイ解析の結果を示したのが図4である。解析した8つの細胞において、それぞれの細胞ごとに異なった発現プロファイリングを得ることができた。また、個々の細胞において成熟したGABAニューロンに特徴的な遺伝子⁷⁾を発現していることが確認できたが、成熟したグルタミン酸ニューロンに特徴的な遺伝子の発現⁷⁾はほとんど確認できなかった。一方、ハウスキーピング遺伝子の発現は全ての細胞において確認することができた。また、#8細胞でのNPYや、#5と#6細胞でReelin (Reln)といったGABAニューロンのサブタイプに特徴的な発現が確認できた。これらの結果から、取得した単一神経細胞発現プロファイリングは解析した細胞の性質を反映したものであると考えることができる。

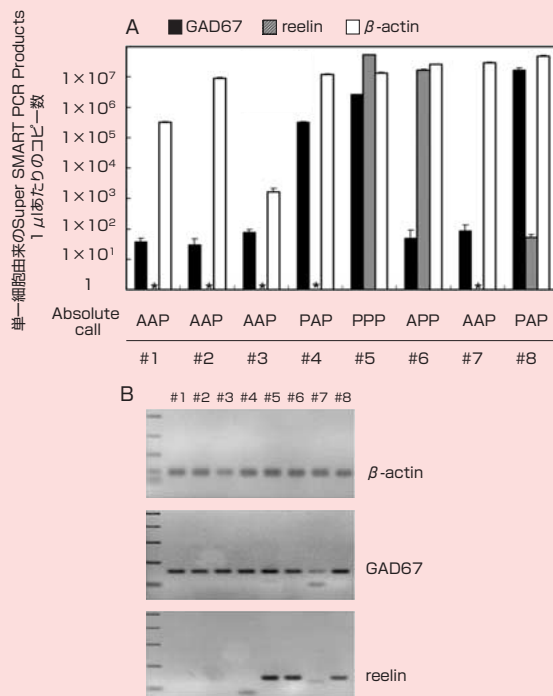


A: GABA神経細胞に特徴的な遺伝子群における単一細胞マイクロアレイ解析の結果。
 B: グルタミン酸神経細胞に特徴的な遺伝子群における単一細胞マイクロアレイ解析の結果。
 C: ハウスキーピング遺伝子における単一神経細胞マイクロアレイ解析の結果。
 A、B、C共に、シグナル強度の黒い囲みは Present call が付いたことを示す。

図4 GABA神経前駆細胞を用いた単一神経細胞マイクロアレイ解析結果

■ 単一細胞マイクロアレイ解析の結果とリアルタイムPCR解析の結果は一致する

本解析では、単一細胞マイクロアレイ解析を行った全てのサンプルでβ-actin、β III-tubulin、GAD67の発現をPCRにより確認しているが、図4(A)のGAD67の解析結果に注目すると、8細胞のうち3細胞でしかGAD67遺伝子においてPresent callは得られず、結果に矛盾が生じた。そこで、マイクロアレイのシグナル値とSuper SMART PCR Productsに含まれるコピー数を調べるためにリアルタイムPCRを用いてコピー数を定量した(図5)。その結果、Present callが得られた#4、#5、#8のサンプルでは1μあたり1×10⁵コピー以上のGAD67のcDNAが含まれており、Absent callが付いた他のサンプルでも少なくとも、50コピー以上のcDNAが含まれていることがわかった。Reelin (Reln)の場合は#5、#6、#8でcDNAが検出されたが、1μあたり1×10⁷コピー以上のコピーがあった#5、#6ではPresent callが付いたが、80コピーであった#8のサンプルはAbsent callが付いた。一方、全てのサンプルにおいてPresent callであったβ-actinでは、全て1×10⁵以上のcDNAを検出することができた。このことから、単一細胞マイクロアレイ解析のシグナル値とSuper SMART PCR Productsに含まれるコピー数は相対的に一致していることがわかった。さらに、これまでにPresent callが示された遺伝子の発現をsingle-cell RT-PCRや免疫組織化学法で調べてみたところ、いずれかの方法で全て検出できたという経験から、false negativeは頻発するがfalse positiveは起きないことが示唆されている。false positiveが起きないことは、実験方法として非常に重要である。



A: 単一細胞由来のSuper SMART PCR Products 1μあたりのコピー数。PはPresent call、AはAbsent callを示す。
 B: リアルタイムPCR産物の電気泳動の結果

図5 リアルタイムPCRによるSuper SMART PCR Productsのコピー数の定量

■ おわりに

近年、幾つかのグループから単一細胞レベルのマイクロアレイ解析によって、多様化した神経細胞の性質を探ろうとした研究が報告されている^{5, 8, 9, 10}。我々の確立した単一細胞マイクロアレイ法は簡便ではあるが、精度においては今までに報告のあった手法と比べても劣らない単一細胞のプロファイリングを得ることができている。この方法は、今後、これまでは見つけることができなかった現象やメカニズムを捉えることができる有効な手段となると考えている。

■ 補足

本稿に用いている Super SMART™ cDNA PCR Synthesis Kitは7回分であるが、我々が行った条件検討では、さらに実験回数を増やすことも可能であった。

本プロトコルの詳細については、我々の研究室のホームページよりダウンロードできる。

<http://www.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/morneuro/microarray.html>

【参考文献】

- 1) Tietjen, L., Rihel, JM., Cao, Y., Koentges, G., Zakhary, L., Dulac, C., :Single-cell transcriptional analysis of neuronal progenitors. (2003) *Neuron*, **38**, 161-175.
- 2) Kamme, F., Salunga, R., Yu, J., Tran, DT., Zhu, J., Luo, L., Bittner, A., Guo, HQ., Miller, N., Wan, J., Erlander, M.,:Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. (2003) *J. Neurosci*, **23**, 3607-3615.
- 3) Iscove, NN., Barbara, M., Gu, M., Gibson, M., Modi, C., Winegarden, N., :Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. (2002) *Nat. Biotechnol.*, **20** (9), 940-943.
- 4) Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Saitou, M.,:Global single-cell cDNA amplification to provide a template for representative high-density oligonucleotide microarray analysis. (2007) *Nat. Protoc.*, **2**, 739-752.
- 5) Esumi, S., Wu, SX., Yanagawa, Y., Obata, K., Sugimoto, Y., Tamamaki, N.,:Method for single-cell microarray analysis and application to gene-expression profiling of GABAergic neuron progenitors. (2008) *Neurosci. Res.*, **60** (4), 439-445.
- 6) Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J., Obata, K., Kaneko, T.,:Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. (2003) *J. Comp. Neurol.*, **467**, 60-79.
- 7) Sugino, K., Hempel, CM., Miller, MN., Hattox, AM., Shapiro, P., Wu, C., Huang, ZJ., Nelson, SB.,:Molecular taxonomy of major neuronal classes in the adult mouse forebrain. (2006) *Nat. Neurosci.*, **9**, 99-107.
- 8) Kawaguchi, A., Ikawa, T., Kasukawa, T., Ueda, HR., Kurimoto, K., Saitou, M., Matsuzaki, F.,:Single-cell gene profiling defines differential progenitor subclasses in mammalian neurogenesis. (2008) *Development*, **135** (18), 3113-3124.
- 9) Trimarchi, JM., Stadler, MB., Roska, B., Billings, N., Sun, B., Bartch, B., Cepko, CL.,:Molecular heterogeneity of developing retinal ganglion and amacrine cells revealed through single cell gene expression profiling. (2007) *J. Comp. Neurol.*, **502**, 1047-1065.
- 10) Gustincich, S., Contini, M., Gariboldi, M., Puopolo, M., Kadota, K., Bono, H., LeMieux, J., Walsh, P., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., Raviola, E.,:Gene discovery in genetically labeled single dopaminergic neurons of the retina. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **101** (14), 5069-5074.

■ 本稿でご使用いただいた製品

- Super SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit
製品コード 635000 7回 ¥190,000
 - PrimeScript® Reverse Transcriptase
製品コード 2680A 10,000 U ¥28,000
 - Advantage® 2 Polymerase Mix
製品コード 639201 100回 ¥34,000
- または
- Advantage® 2 PCR Kit
製品コード 639207 30回 ¥19,000

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は47ページをご覧ください。

[12](#) [23](#) [27](#) [30](#) [37](#)