

PIC (Photo-Isolation-Chemistry) 空間/領域特異的 トランスクリプトーム受託解析サービス Vol.1

～凍結組織切片の領域特異的発現解析～

特長

[特異的]

光照射した領域特異的に遺伝子発現解析を可能とします。

[高検出感度]

直径数十μm の範囲、数細胞～十数細胞から次世代シーケンサー用のライブラリーを調製できます。

[低コスト]

分子生物学的実験を行うラボにある一般的な設備でライブラリーを調製できます。

はじめに

組織中の特定の細胞集団における遺伝子の発現を検証することはその生物学的特徴や医学研究によって非常に有用な研究手法です。特定の細胞集団の遺伝子発現を調べるためによく利用される手法として、目的の細胞・組織を顕微鏡で観察・確認しながら特定の領域のみをレーザーで切り出して回収するレーザーマイクロダイセクションや、細胞集団から細胞を分離するセルソーティングがあります。

しかしながらレーザーマイクロダイセクションは、「組織および核酸への物理的なダメージ」、セルソーティングは、「位置情報が失われる。細胞懸濁時のダメージがある」と言った欠点があります。

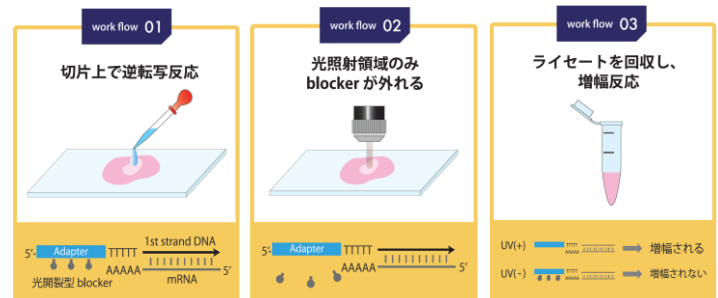
これらの問題を解決し最小化した技術が、PIC (Photo Isolation Chemistry) です。光開裂型ブロックがついた PIC 用オリゴを用いることで、組織切片上で UV 光照射した特定領域のみの遺伝子発現情報を取得することができます。

株式会社 Rhelixa は、この PIC 技術を用いた空間/領域特異的トランスクリプトーム受託解析サービスを提供しています。

テクノロジー

PIC は、Photo Isolation Chemistry という技術名称の頭文字です。オリゴ dT に次世代シーケンサー用のアダプターと光開裂型ブロックと呼ばれる修飾をつけたオリゴを新鮮組織ブロックから作製した切片に添加し、切片上で逆転写反応を行います。解析対象の領域に UV 照射を行うことで、その領域にある逆転写産物から光開裂型ブロックが外れます。ブロックの開裂により、2nd strand 合成後に行う RNA の in vitro 転写反応の阻害が無くなり、UV 照射領域のみにおいて RNA 増幅を可能とします。

PIC ワークフロー



検証実験

正常マウス腎臓組織を用いて、PIC の検証実験を実施しました。組織切片を作製し、照射範囲、100μm、22μm の 2 条件で UV 照射を行いました。以降は、通常のプロトコルに従いライブラリー調製し、リード 1 およびリード 2 合計で 3000 万リードのシーケンスを行いました。分子バーコードを用いて、ユニークリードと重複リードの比率を算出しました(図1)。30～60%の割合でユニークリードを得ることができました。

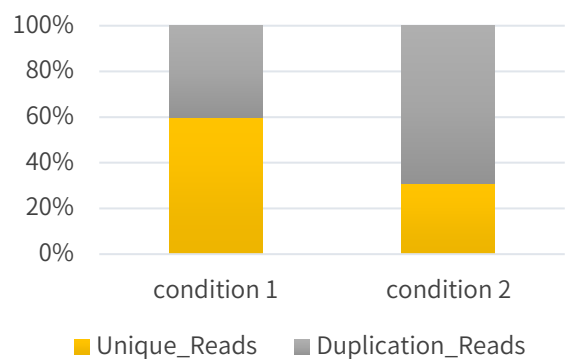


図1 照射範囲ごとのユニークリード率

※ 照射範囲の条件: condition 1:100μm、condition 2:22μm

次に得られたユニークリードをレファレンスゲノムにマッピングし、マッピングされたリードの割合を求めました。Condition1 および2ともに 85%以上のマッピング率が得られ、発現解析に足りうる十分なリードがマッピングされていることがわかりました(図2)。

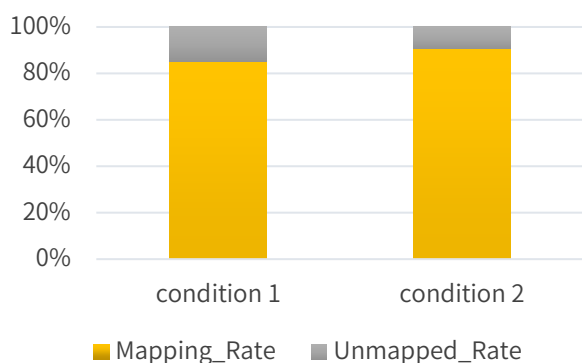


図2 照射範囲ごとのマッピング率

次に、マッピングされたリードが、既知の遺伝子に割り当てられた比率を算出しました。遺伝子発現としてカウントされた Assigned リードは、全体の 40~50%程度でした(図 3)。

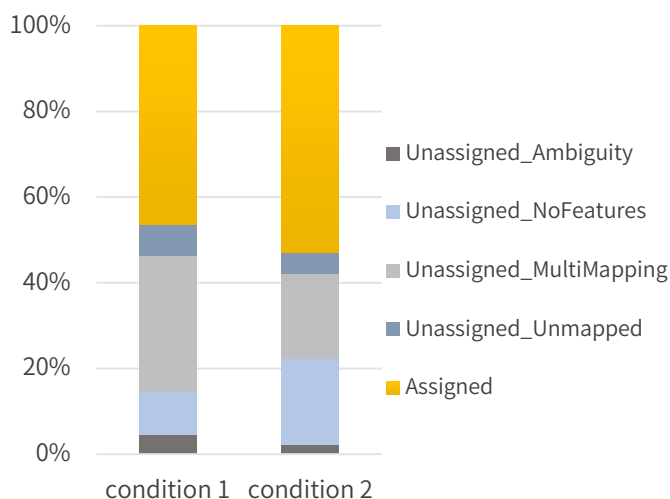


図3 マッピングされたリードが遺伝子に割り当てられた比率

検出された遺伝子数は、条件 1 で 14,067、条件 2 で 12,978 となりました(図4)。UV 照射範囲が、condition1 で 100 μ m、condition2 で 22 μ m と、微小なスケールであったにもかかわらず、12,000 を超える遺伝子を検出することができました。

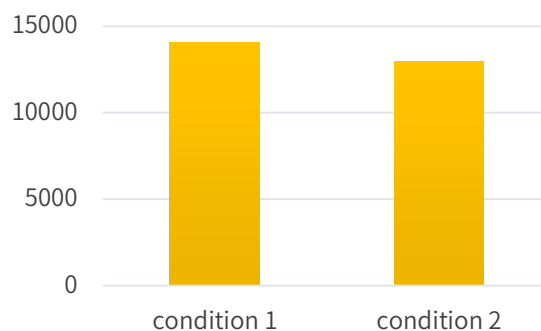


図4 検出された遺伝子数

シングルセル解析においては 3,000~5,000 程度の発現遺伝子を用いて、細胞集団の特徴付けを行います。PIC では微小 RNA をスタートとする実験系であるにも関わらず、位置情報を保持したまま、その数倍に当たる遺伝子発現を検出することができました。condition1 および condition2 において、マウスの腎臓より検出されたマーカー遺伝子の一例を以下に示します。

表1 検出された腎臓のマーカー遺伝子

Aqp1	Cdh16	Cdh1
Umod (THP)	Podxl	Nphs1
Pax2	Lrp2	

まとめ

シングルセル技術では、個々細胞の遺伝子発現プロファイリングが可能ですが、細胞を分離しなければいけません。しかしながら、眼球、肺、皮膚などのような組織は細胞間接着因子に富むため調製が難しく、生細胞の場合は細胞を分離することによる人口的な影響が出る可能性もあります。しかしながら、PIC では、新鮮凍結切片にできる組織であれば適用可能なため、細胞分離の難しい組織の遺伝子変動解析に活用できます。

例えば、この技術の適用により、多種多様な細胞で構成される腎臓において、壊死した部位と正常部位の遺伝子発現の違いを、同時に観察することが可能となります。また、がん病変における部位ごとの発現変動遺伝子の検出にも適用できると考えられます。

(参考文献) Honda M et al. 2020 doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.20.000984>

※本製品の使用目的は研究用途に限定されます

株式会社 Rhelixa

〒101-0061 東京都千代田区 神田三崎町 2-2-14 BRICK GATE 水道橋 2 階

E-mail: customer-service@rhelixa.com

Web: <https://www.rhelixa.com/>

電話:03-6240-9330 Fax:03-6240-9331

代理店