

京都大学	博士 (工学)	氏名	Subramanian Parimalam Sangamithirai
論文題目	Dissecting gene expression of single cells with reduced perturbation (摂動を抑えた1細胞の遺伝子発現解析)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、1細胞遺伝子発現解析ライブラリの作製過程において生じる発現摂動を低減する方法について動物細胞および植物細胞それぞれに対して提案し、マイクロ流体デバイスを用いた細胞質抽出および次世代RNAシーケンス解析でその提案方法の有効性を示したものであり、4章から構成されている。</p> <p>第1章は序論であり、研究の背景および目的、提案した研究方法および論文全体の構成について述べている。</p> <p>複雑な生命現象を理解する上で1細胞の解像度を有する解析方法、すなわち1細胞解析が重要であることに言及している。従来の生化学分析は複数の細胞の平均量を計測する方法が一般的であるが、計測対象の細胞集団が性質の異なる亜集団を含む場合や、細胞の状態が多様である場合には、生命現象の機序解明が困難である。その場合、個々の細胞の状態を分析し考察する1細胞解析が有力な研究手法になる。</p> <p>1細胞生物学分野の黎明期は、DNAあるいはRNAといった核酸を対象にした計測が主流であったが、近年はタンパクや代謝物を対象にした研究例も報告されている。さらには、トランスクリプトーム解析とプロテオーム解析、エピゲノム解析とトランスクリプトーム解析等、複数種の対象分子を同時に解析対象とするマルチオミックス解析も近年報告されている。その中でも、SINC-seq(single cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing)と呼ばれる手法はマイクロ流路における電場制御により、1細胞の細胞膜を選択的に破碎すると共に電気泳動により細胞質RNAと核を物理的に分離し、細胞質RNAと核RNAの並列解析を可能にするユニークな方法である。しかし、マイクロ流路で細胞を処理する段階で細胞の遺伝子発現に摂動を与える可能性があり、その影響を抑える工夫が必要とされていた。1細胞解析に至るまでの処理過程における遺伝子発現の摂動の低減は、1細胞解析全般において重要な研究課題であり、本博士論文ではSINC-seq法を題材として前処理における遺伝子発現摂動の低減方法について提案している。具体的には、動物細胞を対象として可逆的細胞固定を活用した摂動低減方法、および細胞壁を有する植物細胞を対象として電場集中効果を活用した細胞壁の分子透過性向上による直接的な細胞質分子の抽出方法を提案している。第1章の最後に、第2章および第3章で報告している研究成果を概説し、本博士論文全体の構成について述べている。</p> <p>第2章では、可逆的架橋固定が可能なdithiobis(succinimidyl propionate)(DSP)を活用した動物細胞を対象とした遺伝子発現摂動の低減方法に関して報告している。DSPによる細胞固定は、細胞内のタンパク等を架橋することで、内在性分子の長期保存を可能にする。また、DSPはdithiothreitol(DTT)等の還元剤により架橋部位が切断されるという特徴を有しており、この特徴を活かして固定細胞に対してSINC-seq法を適用可能にした。具体的には、DSPで固定した1細胞をマイクロ流路に導入し、マイクロ流路内でDTTを含むバッファ溶液に暴露することで架橋を解除し、その後外部電場を印加することで、細胞膜の選択的破碎と細胞質分子の抽出を実現した。</p> <p>これに加えて、固定細胞の保存溶液にスクロースを添加し、固定細胞からの微小分子の流出を低減する方法を提案した。スクロースを添加した保存溶液を用いた場合、1細胞解析では計測ノイズとして寄与するcell-free RNA(細胞外の溶液中に浮遊するRNA)を低減すると共に、固定細胞に含まれるRNA分子の量および状態を最大で2日間保持できることを示した。</p> <p>さらに、DSP固定したK562細胞(ヒト慢性骨髄性白血病由来細胞株)から細胞質RNAを抽出し、RNAシーケンス解析を実施した。DSP固定細胞の細胞質RNAシーケンス解析は生細胞のそれと比較すると、検出遺伝子数が低下しており、抽出が完全で無い可能</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	Subramanian Parimalam Sangamithirai
<p>性が示唆された。また、遺伝子発現パターンの相関を生細胞間、DSP 固定細胞間、生細胞と DSP 固定細胞間の 3 通りで解析したところ、DSP 固定細胞間において高い相関が観察されたものの、生細胞間と比較して相関の低下が観察された。一方で、核側分画に残留した RNA を対象にした RNA シーケンス解析においては、検出遺伝子数や相関の低下は確認されなかった。このことから、DSP 架橋により細胞質 RNA の抽出が不完全である可能性が高いと結論付けた。さらに、遺伝子発現変動解析を援用して生細胞と DSP 固定細胞それぞれから抽出した細胞質 RNA において、抽出量が顕著に異なる遺伝子を探索した。その上で、RNA 分子の長さについて整理したところ、1 kb 以上の長さを持つ RNA が 1 kb 以下の長さを持つ RNA よりも比較的多く核側の分画に残留していることが観察された。これは、架橋解除が不十分である場合、長い RNA 分子ほど抽出を阻害された可能性を示唆していると考えられた。また、複数の DSP 固定細胞の細胞質 RNA シーケンスを平均した遺伝子発現パターンは、生細胞と高い相関（相関係数 0.91）を示すことから、生細胞の遺伝子発現状態と整合することが認められた。</p> <p>第 3 章では SINC-seq 法を拡張し、細胞壁を持つ植物細胞への適用を可能にした。植物細胞は通常細胞壁に覆われているため、1 細胞解析を適用するにあたり、酵素処理により細胞壁を除去し、プロトプラストとして単離する前処理が必要不可欠である。プロトプラストに対しては、動物細胞で用いられる前処理方法をそのまま利用できる一方で、細胞壁除去の酵素処理による遺伝子発現の摂動が課題である。そこで本研究では、酵素処理を経ることなく植物細胞から直接細胞質分子を抽出する新しいマイクロ流体技術を開発した。開発技術は三次元的な集中電場を用いて細胞壁の分子透過性を上昇させ、電気泳動により細胞質分子を抽出する方法である。また、細胞凝集塊中の標的とした少数細胞から選択的に細胞質分子を抽出するため、電場に関する数値解析によりマイクロ流路の構造を最適化し、一部の細胞のみを集中電場に暴露する構造を設計した。さらに、パルス状の高電場と直流電場を組み合わせることで抽出の選択性を高めた。</p> <p>開発した方法の有効性を示すため、細胞凝集塊の形状が大きく異なる二種のモデル植物細胞、Deep 細胞 (<i>Arabidopsis</i> の根由来) および Tobacco BY-2 細胞 (<i>Nicotiana tabacum</i> 由来) を用いて評価した。まず、三次元集中電場の効果を示すため、fluorescein diacetate (FDA) で生細胞を染色し、蛍光顕微鏡観察を用いて FDA が抽出される様子を観察した。本研究で設計したマイクロ流路では、細胞塊の導入領域は細胞塊に対して十分に大きく、また、集中電場の発生領域が限局されるように構造が最適化されているため、細胞塊中の 1 細胞から選択的に FDA を抽出できることが観察された。この集中電場の効果は Deep 細胞および BY-2 細胞の両者に対して有効であることが観察された。さらに、細胞壁を有さない動物細胞塊に対しても同様に適用が可能であり、動物細胞である K562 細胞塊の 1 細胞から calcein 分子を選択的に抽出できることも観察された。一方で、ここで用いた電場では植物細胞から再現性良く細胞質 RNA を抽出できなかった。</p> <p>そこで、細胞質 RNA の抽出を可能とするため、強度の高いパルス状集中電場と直流電場を用いた抽出方法を開発した。この方法では 500 kV/m および 0.1 s 程度のパルス状集中電場を用いて選択的に細胞壁の分子透過性を上昇させ、その後直流電場により細胞質 RNA を抽出する方法である。電場強度とパルス幅が RNA 抽出結果に及ぼす影響を考察した。また、抽出した細胞質分画を回収し、そこに含まれる細胞質 RNA 分子を Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (<i>GAPCI</i>) を対象にした定量逆転写 DNA ポリメラーゼ反応により計測することで、電場強度およびパルス幅の上昇と共に抽出量が増加することを確認した。</p> <p>第 4 章は結論であり、研究成果とその意義について総括すると共に、今後の研究課題について述べている。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は1細胞の細胞質 RNA をマイクロ流路の電場制御で抽出し、細胞質 RNA と核 RNA を並列解析する single cell integrated nuclear and cytoplasmic RNA-sequencing (SINC-seq) 法を拡張し、遺伝子発現摂動を抑えた細胞質 RNA 解析法を提案した。動物細胞および植物細胞それぞれに対して有効な方法を提案し、その性能評価と応用例を示した。得られた主な成果は次の通りである。

1. 可逆的架橋固定が可能な dithiobis(succinimidyl propionate) (DSP) を活用して、遺伝子発現摂動を低減した SINC-seq 法を開発した。具体的には、DSP で固定した1細胞をマイクロ流路に導入し、マイクロ流路内で dithiothreitol を含むバッファ溶液に暴露することで架橋を解除し、その後外部電場を印加することで、細胞膜の選択的破碎と細胞質分子の抽出を実現した。
2. DSP 固定細胞の保存溶液にスクロースを添加し、固定細胞からの微小分子の流出を低減する方法を提案した。スクロースを添加した保存溶液を用いた場合、1細胞解析で計測ノイズとして寄与する cell-free RNA (細胞外の溶液中に浮遊する RNA) を低減すると共に、固定細胞に含まれる RNA 分子の量および状態を最大で2日間保持できることを示した。
3. DSP 固定細胞を用いた SINC-seq 法における細胞質 RNA シーケンスは生細胞のそれと高い整合性があり、平均の遺伝子発現パターンを比較すると相関係数として 0.91 が得られた。
4. SINC-seq 法を拡張し、細胞壁を持つ植物細胞への適用を可能にした。本研究では、酵素処理を経ることなく直接植物細胞から細胞質分子を抽出するため、三次元的な集中電場を用いて細胞壁の分子透過性を上昇させ、電気泳動により細胞質分子を抽出する方法を開発した。また、細胞塊中の少数細胞から選択的に細胞質分子を抽出するため、電場に関する数値解析によりマイクロ流路の構造を最適化し、一部の細胞のみを集中電場に暴露する構造を設計した。さらに、パルス状の高電場を組み合わせて抽出の選択性を高めた。
5. 開発した方法を細胞凝集塊の形状が大きく異なる二種のモデル植物細胞、Deep 細胞 (*Arabidopsis* の根由来) および Tobacco BY-2 細胞 (*Nicotiana tabacum* 由来) に適用し、細胞塊中から1細胞分解能で細胞質の小分子を抽出できることを示した。
6. 細胞壁を有する植物細胞の細胞質 RNA の抽出を可能とするため、強度の高いパルス状集中電場と直流電場を用いた抽出方法を開発した。この方法では 500 kV/m および 0.1 s 程度のパルス状集中電場を用いて選択的に細胞壁の分子透過性を上昇させ、その後直流電場により細胞質 RNA を抽出する方法である。様々な電場強度とパルス幅で実験を実施し、両パラメータが抽出量に及ぼす影響を考察した。また、抽出した細胞質分画を回収し、そこに含まれる細胞質 RNA 分子を Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 (*GAPCI*) を対象にした定量逆転写 DNA ポリメラーゼ反応により計測し、電場強度およびパルス幅の上昇と共に、抽出量が増加することを示した。

以上のように、本論文は学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。

また、令和3年1月21日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行い、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。