

次世代シーケンサーを用いた 1 細胞遺伝子発現解析の現状と展望

～植物細胞のリプログラミング機構の解明に向けて～

久保 稔

奈良先端科学技術大学院大学 研究推進機構

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

Minoru Kubo

Single cell transcriptome analysis using next generation sequencers: Toward studying mechanisms of reprogramming in plant cells

Key words: next generation sequencer, reprogramming, single cell, totipotency, transcriptome

Division for Research Initiative, Nara Institute of Science and Technology

8916-5 Takayama, Ikoma, Nara, 630-0192 Japan

1. はじめに

近年の生物学では、mRNA を中心とした転写産物の蓄積量を測定することが、遺伝子の働き具合を調べる研究手法の一つとして定着している。当初は個体や器官、組織から集めた数 μg から数十 μg の total RNA を使った RNA ゲルブロット（ノーザンブロット）法により、1 から数個の遺伝子について遺伝子発現量の測定が行われていた。その後、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法の普及に伴い、リアルタイム定量 PCR（real time qPCR）法が開発され、より微量の 10 -100 ng 程度の RNA からでも遺伝子発現量の測定が可能となり、今日でも広く用いられている。1990 年代に入ると、ガラス基盤上に DNA 断片を高密度にスポットしたり、基板上で合成したりしたマイクロアレイやジーンチップが登場した。これらを用いる事により、何千、何万個もの遺伝子について遺伝子発現量を一度に解析する、網羅的遺伝子発現解析が可能となった。しかし、生物種ごとにマイクロアレイやジーンチップを準備したり、新しい情報を取り入れて改定したりするためには多大なコストがかかるという難点があった。それに変わって網羅的な遺伝子発現解析法として普及したのが、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq（RNA-Sequencing）である。この手法では数千万から数十億個もの短い DNA 断片を一度に解読する次世代シーケンサーの特性を生かして、RNA を鋳型に逆転写反応によって合成された DNA 断片の配列決定を行い、遺伝子モデル上にマップされた DNA 断片の数を RNA 量として見積もる。そのため、RNA さえ準備でき、ゲノムや転写物情報さえあれば、生物種を問わず遺伝子発現解析が可能となった。さらに、0.5-1 ng の total RNA があれば通常の RNA-Seq による解析を行う事ができ、最近では total RNA がわずか 5-100 pg しか含まれない 1 細胞での RNA-Seq も行われるようになった。本稿では、初めに今やその解析に欠く事のできない次世代シーケンサーについて簡単に説明し、続いて、遺伝子発現解析の最終形態の一つと言える 1 細胞遺伝子発現解析について、その歩み、技術開発、そこから得ら

れた新しい知見について述べる。その後、植物細胞における 1 細胞遺伝子発現解析、我々がやっている植物細胞のリプログラミング機構の解明に向けた 1 細胞遺伝子発現解析について紹介したい。

2. 次世代シーケンサー

次世代シーケンサーの開発はヒトゲノム計画が完了した翌年の 2004 年に、1 人当りのゲノム解析に 1000 万ドルかかっていたコストを 1000 ドルにすることを目的とした「Advanced Sequencing Technology Awards」(通称:1000 ドルゲノムプログラム)が中心となって推進された (Schloss 2008, 宋ら 2010)。米国立ヒトゲノム研究所 (NHGRI) 主体で開始されたこのプログラムでは、毎年数千万ドルの助成金が拠出され、これらの獲得をめざし、バイオ・医療系、化学系、工学系の研究グループのみならず、メジャー、ベンチャーを含めたバイオ・IT 企業も参加し、次世代シーケンサー開発に向けた様々な技術提案がなされた。その成果は 2005 年に市販された世界初の次世代シーケンサーである 454 GS20 (後継機種 GS FLX+: ロシュ社)、翌年に発売された Solexa/illumina シーケンサー (現行機種 HiSeq, NextSeq, MiSeq: イルミナ社)、2007 年に発売された SOLiD (ライフテクノロジーズ社: 現サーモフィッシャー社)、2010 年発売の Ion Torrent PGM (ライフテクノロジーズ社: 現サーモフィッシャー社) に生かされている。また、最近では 1 分子シーケンサーとして、PacBio RSII, Sequel (パシフィックバイオサイエンス社)、MinION (オックスフォードナノポアテクノロジーズ社) 等の新しい次世代シーケンサーも開発され、これらは前出の次世代シーケンサーでは難しい数 kb から十数 kb もの長い塩基配列決定が可能になった。ここで述べた次世代シーケンサーの開発競争は、「2 年で性能は 2 倍になる \approx 2 年でコストは半分になる」という IT 技術の進捗予測で知られる“ムーアの法則”を超える勢いでシーケンスにかかるコスト削減を達成した (Hayden 2014)。2014 年に HiSeq X Ten (イルミナ社) により「1000 ドルゲノム」の達成が宣言され、この年には「1000 ドルゲノムプログラム」は終了したが、このプロジェクトは最も成功した政策主導による革新的な科学技術開発の一つと言えるだろう。

次世代シーケンサーでは、解析された DNA 断片をリード (read) と呼び、リード数と 1 リードあたりで決定される塩基数 (リード長) の積が 1 回のランあたりの出力データ (総読み取り塩基数) となる。現在最も普及しているイルミナ社の次世代シーケンサーは、DNA 断片の片側の配列を決定するシングルリード (SR) でのランの場合、リード長 50 bp から 300 bp の DNA 断片を MiSeq で 2500 万個、NextSeq500 で 4 億個、HiSeq2500 で 20 億個も同時に塩基配列決定する能力を有し、このときそれぞれ最大で 7.5 Gb, 60 Gb, 500 Gb ものデータを出力する。次世代シーケンサーを使って網羅的遺伝子発現解析を行う場合、リファレンスとなるゲノム・遺伝子モデルを認識できればリード長は 50 bp でも十分で、それよりも 1 サンプルあたりどれだけのリード数を利用できるかということが、遺伝子発現の定量性を担保するために重要である。転写物の全領域をカバーする RNA-Seq においては 1 サンプルあたり 2000 万 - 4000 万前後のリード数があれば、網羅的な遺伝子発現解析が可能であると言われている (Sims et al. 2014)。また、1 転写産物から 1 断片だけを取り出し遺伝子発現解析を行う Digital Gene Expression (DGE; de Klerk et al. 2014, Nishiyama et al. 2012) や Cap Analysis of Gene Expression (CAGE; Takahashi et al. 2012) においては、500 万-600 万タグ前後 (1 転写物について 1 リードだけ解析する場合、リードの代わりにタグ (tag)

と呼ばれる単位を使うことが多い)が、定量に必要と言われている (Xue et al. 2014)。MiSeq, NextSeq500, HiSeq2500 の各シーケンサーの出力リード数と網羅的遺伝子発現解析に必要なリード数を考えると、2000 万リードを使う RNA-Seq の場合、それぞれ 1, 20, 100 サンプル分、DGE や CAGE の場合、それぞれ 5, 80, 400 サンプル分の解析が理論上、1 回のランで可能である。このとき、サンプルごとにシーケンスデータを抽出し解析するためには、インデックスと呼ばれる 6 から 8 塩基の配列をサンプルごとの目印として導入する必要がある。イルミナ社では 96 種類のインデックスが準備されており、HiSeq2500 を使う場合、インデックスの種類が足りないように思われるが、HiSeq2500 の高出力モードで使用されるフローセルは 8 レーンに区切られており、それぞれのレーンの独立性が保たれている。RNA-Seq の場合、1 レーンにあたり 12 サンプル、DGE や CAGE の場合、50 サンプルの解析を行えることを考えればインデックスの種類は十分であると考えられる。

RNA-Seq を行うためには、単離した RNA サンプルから、1) mRNA の精製またはリボゾーム RNA の除去、2) RNA の断片化 (*必要としない手法もある)、3) cDNA 合成、4) 二本鎖 cDNA 末端の平滑化、5) アダプター配列の付加、6) ライブラリーの増幅等、一連の作業が必要である。次世代シーケンサーを有するイルミナ社を始め、多くの試薬メーカーが様々な種類の NGS (次世代シーケンシング) ライブラリー作製キットを販売しており、詳しい情報は、渡辺らの総説を参考にされたい (渡辺ら, 2014)。さらにサンプル調整のハイスループット化、簡便化を進めた Bravo (アジレントテクノロジー社)、Sciclone NGS (パーキンエルマー社)、Biomek Fxp (ベックマン コールター社)、Neoprep (イルミナ社) 等、NGS ライブラリー作製が自動化された装置も販売されている。また、RNA を準備すれば、NGS の受託解析を請負う企業も多数あり、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析については、多くの研究者が行える状況になっていると言えよう。

3. 1 細胞遺伝子発現解析の歩み

1 細胞における遺伝子発現解析は、1990 年代の始めに DNA ゲルブロットを応用した定量的な解析が行われ始め (Eberwine et al. 1992)、それに続き、RT-PCR を用いた解析が行われた (Sucher & Deitcher 1995)。さらに 1998 年には、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) を用いた解析により、1 細胞での mRNA 数が計測され、現在も利用されている (Femino et al. 1998)。網羅的な 1 細胞遺伝子発現解析は、当初、マイクロアレイを用いて行われており (Kamme et al. 2003)、その後、1 細胞からの cDNA 合成効率が飛躍的に改善された方法が報告され (Kurimoto et al. 2006)、この手法をベースに 2009 年には次世代シーケンサーを用いた最初の 1 細胞 RNA-Seq 法が報告された (Tang et al. 2009)。これを発端として網羅的な 1 細胞遺伝子発現解析を利用した研究が急速に広まった。

4. 1 細胞遺伝子発現解析手法の開発

これまでに NGS を利用した様々な 1 細胞遺伝子発現解析のための手法が開発されてきたが、それは 2 つの大きな技術的な問題点を克服することに焦点がおかれていた (Kolodziejczyk et al. 2015)。一つはどのように 1 細胞を単離するか、もう一つは微量の RNA からどのように定量性

を維持した cDNA を合成するからである。

1 細胞の単離方法は、1) ガラスピペット、マイクロキャピラリーによるマイクロマニピュレーション、2) レーザー顕微鏡を用いたレーザーマイクロダイセクション (LMD, LCM) 法、最も広く用いられている方法として、3) セルソーターを用いて細胞特異的のマーカにより細胞を分取する (Fluorescence-Activated Cell Sorting: FACS) 方法がある。コストやスループット、解析対象となる細胞の種々の条件により、使い分けがなされているのが現状である。また最近では、3の方法と組み合わせて、油中で微小な水滴を作るエマルジョンを用いて液滴 (droplet) 内に 1 細胞を封じ込める系や、それらを効率よく行う微小流路 (microfluidics) を用いた系も開発された (Streets et al. 2014)。1 細胞を取得後、当初は PCR チューブや 96 穴プレートで cDNA 作製の作業を行うためにその反応液が数 μl から数十 μl 必要であったが、液滴や微小流路を用いることで 0.1-数 nl の反応液での cDNA 作製が可能となった。最近では、C1 システム (フリューダイン社) という一度に 96 個の細胞を微小流路内に 1 細胞ずつトラップし、cDNA 合成までのステップを自動化した装置が開発され、精度の高い 1 細胞遺伝子発現解析用サンプルの提供に貢献している (Shalek et al. 2014, Trapnell et al. 2014, Treutlein et al. 2014)。ただこの実験系を用いるためには、細胞が始めから単細胞の状態で存在するか、組織内にあっても酵素処理などでバラバラに単離できること、流路内を移動できる大きさであることが前提となる。そのため今後は多種多様な細胞からなる組織内に存在し、バラバラに単離できない細胞を 1 細胞遺伝子発現解析するための技術開発が必要であろう。

もう一つの問題点である微量の RNA からどのように定量性を維持した cDNA を取得するかについても様々な方法が取り組まれてきた (Kolodziejczyk et al. 2015)。1 細胞に含まれる total RNA は 5-100 pg と見積もられており、そのうちポリ A の付いた mRNA は 1-2% と言われている。そのようなごく微量の RNA から次世代シーケンサーを用いて発現量の解析するためには、mRNA を cDNA に逆転写し、二本鎖 DNA にしたのち、増幅する必要がある。最も初期に報告された Tang らの方法では PCR を用いて cDNA 増幅が行われていたが、増幅効率は良いものの、増幅時にプライマーによるバイプロダクトの生成が起これ、それが次世代シーケンサーによる解析に影響を与えることがわかった。そこで、このバイプロダクトが生成しないサプレッション PCR を用いた Quartz-Seq が開発された (Sasagawa et al. 2013)。これらの方法はポリ A を付加すること (polyA tailing) により、増幅用アダプターを取り込むために、5'側が欠損した mRNA も cDNA に変換され、3'端に偏った cDNA が生成される。そこで、完全長 cDNA を解析対象にしたテンプレートスイッチング法を利用した SMART-Seq (Ramsköld et al. 2012) や STRT-Seq (Islam et al. 2011, 2012) が開発された。一方で、PCR では cDNA の塩基配列によって、増幅効率に偏りがあることが指摘されていたため (Aird et al. 2011)、塩基配列に依存した増幅バイアスが少ないと考えられている in vitro 転写 (IVT) を用いた CEL-Seq (Hashimshony et al. 2012) や MARS-Seq (Jaitin et al. 2014)、 $\phi 29$ ポリメラーゼを用いた Multiple Displacement Amplification (MDA) 法 (Pan et al. 2013)、Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycle (MALBAC) 法 (Chapman et al. 2015) を用いた RNA-Seq も報告されている。

上記の 1 細胞 RNA-Seq は増幅法を工夫することでそれによって生じる cDNA 増幅バイアスを減少させることを狙ったものであるが、2012 年、次世代シーケンサーの特性と情報処理技術を駆

使して cDNA 増幅バイアスを減少させる手法が報告された (Kivioja et al. 2012)。まず初めに逆転写時にランダムな塩基配列 (Unique Molecular Identifier: UMI) を cDNA 末端に付加し、cDNA を増幅する。その後、次世代シーケンサーで cDNA 配列に加えて UMI 配列を決定し、同じ UMI 配列をもった同じ cDNA 配列は一つとして数える。ちなみに 10 塩基からなる UMI 配列は 4 の 10 乗 (4^{10}) 種類、すなわち 100 万種類以上あることになる。1 細胞における mRNA の数が数万分子から 100 万分子程度と考えると、理論上、ある遺伝子から転写された別の mRNA に同じ UMI 配列が導入される確率はほぼ皆無であることから、異なる UMI を持つリードは別コピーの mRNA 由来とみなすことができ、UMI が何種類あるか数えることによって、mRNA のコピー数、すなわち遺伝子発現量を正確に数えることができる。この UMI を導入することで 1 細胞遺伝子発現解析における技術的なノイズが著しく低減した。さらに cDNA 増幅の前に UMI を導入することさえできれば、様々な 1 細胞遺伝子発現解析法において応用が可能であることから、上記で紹介した UMI が採用されている MARS-Seq 以外にも、STRT-Seq (Islam et al. 2014)、CEL-Seq (Grün et al. 2014) において新たに UMI を採用した手法が報告されている。

どの手法にも一長一短があり、1 細胞遺伝子発現解析で何が知りたいか、解析したい研究で利用可能かということをよく検討してから実行することが重要である。さらに上述のウェットな実験系に加えて、取得した NGS データの品質管理 (quality control: QC)、技術由来のばらつき (technical noise) の除去・補正、遺伝子発現量に基づいた多変量解析法などドライな実験系の検討も重要である。これまでに一般的な RNA-Seq で利用されている様々なプログラムや R を利用したパッケージ等に対応できるものに加えて、1 細胞遺伝子発現解析に特化した計算方法も報告されており、今後も新しい知見を伴う様々な解析手法が開発されるであろう (Stegle et al. 2015)。

5. 1 細胞遺伝子発現解析でわかってきたこと

1 細胞遺伝子発現解析で期待されることの一つに細胞種のカテゴリ、それらの目印となるマーカー遺伝子の同定が挙げられる。生体内における組織や器官においては、様々な種類の細胞が含まれており、それぞれの役割に応じた特異的な遺伝子発現を示していると考えられる。希少な細胞の場合、それ自身を集めることが困難である場合が多いため、マーカー遺伝子の同定も難しい。そこで希少細胞を含む細胞集団から何百、何千個もの細胞をランダムに採取し、それぞれについて 1 細胞遺伝子発現解析を行い、その遺伝子発現データを元に細胞集団を分画し、希少細胞が含まれる亜集団 (subpopulation) を特定する手法が開発された (Grün et al. 2015, Buettner et al. 2015) これらにより、“希少細胞の単離が先か、マーカーの同定が先か” という問題は克服され、1 細胞遺伝子発現解析を元に様々な種類の細胞、細胞特異的マーカー遺伝子の同定が進むことが期待される。

現状では 1 細胞につき、ある状況下における 1 点の遺伝子発現プロファイルを取得することしかできないが、多数の 1 細胞を時系列に基づいてサンプリングすることで、各細胞の細胞分化や細胞応答の過程を推定することができるようになった。受精卵から桑状胚の胚発生 (Deng et al. 2014) や骨格筋分化誘導の過程 (Trapnell et al. 2014) においては、細胞の遷移状態が段階的に進行することや、異なる発生過程に進む細胞の存在が報告されている。病原体由来のエンドトキシ

ン処理により誘導される免疫応答においては、初期にはごく一部の早発性細胞が応答し、その後、それらの細胞による分泌性シグナルを介して全免疫細胞へ応答反応が広がることを示された (Shalek et al. 2014)。今後これらのように、時系列に基づいた細胞集団における 1 細胞遺伝子発現解析とシミュレーションなどの計算科学を駆使することによって、これまでスナップショットでしか観察ができなかった継時的な生命現象の流れが明らかにされると考えられる。

1 細胞 RNA-Seq では個々の細胞の遺伝子発現量のみならず、集団内におけるそれらのばらつき (variance) を計測することで、遺伝子発現の不均一性 (heterogeneity) や、ゆらぎ (fluctuation) といった生命現象が明らかになってきた。これらは先に述べた集団内における異なる細胞種の混在だけでなく、個々の細胞における RNA の転写速度、細胞周期、サーカディアンリズム等に由来する生命活動のばらつき (biological noise) が原因と考えられる (Kolodziejczyk et al. 2015)。今後はこれらによる遺伝子発現の不均一性を考慮することで、より高い精度で遺伝子発現解析を行うことが可能となり、これまで知られていなかった生命現象が解明されていくことが期待される。

6. 植物研究における 1 細胞遺伝子発現解析

植物においても 1 細胞レベルの遺伝子発現解析が報告されている。これまでに、マイクロキャピラリーで細胞液を抽出し遺伝子発現解析を行った報告がある (Brandt et al. 1999)。また最近、プロトプラストにしたシロイヌナズナの根の細胞を特定の細胞マーカーを用いてセルソーターで単離し、1 細胞遺伝子発現解析を行った研究が報告された (Efroni et al. 2015)。しかし植物の場合、1) 細胞壁により仕切られた細胞をバラバラにすることが困難な場合があること、2) 細胞壁や多糖類、二次代謝物など RNA の単離に阻害的に作用する物質が多く存在すること、3) 細胞内にある大きな液泡に蓄積された RNase による RNA の分解が懸念されることなど (Wilkins & Smart 1996)、動物細胞に比べて 1 細胞遺伝子発現解析を行うためのハードルは高いと考えられ、これらを克服した解析法の開発が今後必要である。

7. 植物細胞のプログラミング機構の解明に向けた 1 細胞遺伝子発現解析

野菜や樹木、生花などの栽培植物は、種子で増やす代わりに挿し木、葉挿しや種イモなど、植物体の一部を切り出し、それを育てることでまた元の植物体を生み出すことができる。1950 年代には小さなニンジンのかげらから、1970 年代にはたった 1 細胞から完全な植物体を再生できることが報告されており、植物細胞の持つ分化全能性 (totipotency) を明らかにする多くの研究が行われてきた (Sugiyama 2015)。被子植物の場合、分化した葉肉細胞などから再生するとき、細胞の脱分化と呼ばれる過程を経てカルス (細胞塊) を形成する。この過程においては、体細胞が幹細胞に変化する現象、リプログラミング (幹細胞化) がおこっていると考えられる。この後、ランダムに分裂を繰り返したカルス内の一部の細胞が再分化し、茎頂や根などの器官形成を行うが、どの細胞がいつリプログラミングして再分化するかを特定することは困難である。そこで我々は、コケ植物であるヒメツリガネゴケを用いて植物細胞のリプログラミング機構の解明を目指した研究を行っている。ヒメツリガネゴケは最初に陸上に進出した植物から最も初期に分岐した基部陸上植物の一種で、ゲノムを含めた遺伝子情報が公開されており、シロイヌナズナやイネ等の被子植物と比較して形態形成に関わる遺伝子の 84% が保存されていることが明らかとなっている

(Rensing et al. 2008, Banks et al. 2011)。また、相同組換えを利用した遺伝子ターゲティングも可能であり、誘導的遺伝子発現系など分子生物学を利用した解析手法が充実している (Quatrano et al. 2007, Kubo et al. 2013)。さらに、被子植物に比べて形態がシンプルな構造をしており、茎葉体における葉は一層の細胞層からなる。興味深いことに、ヒメツリガネゴケの茎葉体から葉を切り出すと、切断した切り口に面した葉細胞（体細胞）が細胞分裂を経て、原糸体頂端細胞（幹細胞）、原糸体次頂端細胞（体細胞）に同調的に変化する (Ishikawa et al. 2011, 石川 2015)。この過程は 1 細胞レベルで全ての細胞について追跡することができ、かつサンプリングなどの操作が適時可能である。これまでに、この実験系を用いてヒメツリガネゴケ切断葉を継時的にサンプリングし、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析が行われた (Nishiyama et al. 2012)。その結果、約 4000 個の遺伝子が切断後から 24 時間目までに有意に変動していることが分かった。しかし、用いた切断葉にはリプログラミングする細胞としない細胞が混在しているため、得られた遺伝子発現プロファイルはそれらの積算となり、どの細胞由来であるかを特定することは困難であった。

そこで我々は、ヒメツリガネゴケ切断葉からリプログラミングする細胞としない細胞を個別にサンプリングし、1 細胞レベルでの遺伝子発現プロファイルを取得する方法の開発に取り組んできた (図 1)。1 細胞を取得する方法は、マイクロキャピラリーで細胞液を直接抽出する方法を選択した。これは、ヒメツリガネゴケの葉細胞は酵素処理等で細胞をバラバラにすることが現時点で困難であること、細胞間の相互作用が幹細胞化に影響を与えているかどうかを検証するために細胞の位置情報の取得が重要であることが理由にあげられる。次に、抽出細胞液からの cDNA 調整法を検討した結果、UMI を導入した polyA tailing を用いた NGS ライブラリー作製法が適していることが分かった (図 1; Kubo et al. in preparation)。今後この手法により、継時的にヒメツリガネゴケ切断葉における葉細胞について 1 細胞遺伝子発現解析を行い、リプログラミング関連因子の同定と、リプログラミング過程における隣接する細胞間相互作用の有無について明らかにしていく予定である。

8. 今後の展望

これまで 1 細胞遺伝子発現解析を用いて多くの生命現象が明らかになってきたが、今後はさらに 2 つの生体情報を取り込んだ解析法が広まると考えられる。一つは上記で述べたように、細胞の位置情報を加味した 1 細胞遺伝子発現解析である (Crosetto et al. 2015)。現状では解像度、感度、解析遺伝子数などで問題はあがるが *in situ* での RNA-Seq 法 (Lee et al. 2014) や、光活性化 polyA オリゴを組織内の細胞に導入し、レーザーを照射した細胞からのみ polyA オリゴと結合した mRNA を単離することで位置情報を持った RNA-Seq を行う方法 (TIVA; Lovatt et al. 2014) が報告されている。細胞の位置情報と 1 細胞遺伝子発現解析の結果から、隣接する細胞において遺伝子発現量の相関を計測することにより、細胞間相互作用の情報が得られると考えられ、多細胞体における高次な組織構築の理解が進むと考えられる。

もう一つは別の網羅的解析 (オミクス) を組み合わせた 1 細胞遺伝子発現解析である。ガン細胞では DNA 配列の変化した細胞が混在していることが知られており、1 細胞において DNA と RNA を同時に調べることで、ガン細胞の系譜、増殖率、悪性度など多面的な性質を特定することが可能となり、効果的な治療法の開発に繋がることが期待される。これまでに 1 細胞で DNA 配

また私たちは、植物細胞の解析に対応したマイクロキャピラリーを用いた1細胞遺伝子発現解析法を利用して透明細胞と葉緑細胞が規則正しく配置された葉をもつオオミズゴケにおいて透明細胞だけを単離し、1細胞遺伝子発現解析を行うことで透明細胞分化に関わる遺伝子の探索も行っている (Terada et al. in preparation)。今後は、この技術を生かし様々な植物において細胞分化、環境応答について、これまで困難であった1細胞レベルの解析を行うことで、未知の機能や仕組みを明らかにしていきたい。

謝辞

本稿を作成するにあたり、貴重な助言を頂いた倉田哲也博士 (東北大)、石川雅樹博士 (基礎生物学研究所)、西山智明博士 (金沢大) に感謝したい。研究内容の一部については、ERATO 長谷部分全能性進化プロジェクト (JST)、頭脳循環を活性化する若手研究者海外派遣プログラム (JSPS)、FRIAS visiting scientist program (フライブルク大学)、新学術領域「植物発生ロジック」(MEXT)、ヒューマノフィリック科学技術創出研究推進事業 (NAIST)、ビッグデータプロジェクト (NAIST) の助成を受けて行われたものである。

引用文献

- Aird, D., Ross, M.G., Chen, W.S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D.B., Nusbaum, C., & Gnirke, A. 2011. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 12: R18.
- Banks, J.A. et al. 2011. The Selaginella genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960-963.
- Brandt, S., Kehr, J., Walz, C., Imlau, A., Willmitzer, L., & Fisahn, J. 1999. Technical Advance: A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal mesophyll and companion cells of intact leaves. *Plant J.* 20: 245-250.
- Buettner, F., Natarajan, K.N., Casale, F.P., Proserpio, V., Scialdone, A., Theis, F.J., Teichmann, S.A., Marioni, J.C., & Stegle, O. 2015. Computational analysis of cell-to-cell heterogeneity in single-cell RNA-sequencing data reveals hidden subpopulations of cells. *Nat. Biotechnol.* 33: 155-160.
- Chapman, A.R., He, Z., Lu, S., Yong, J., Tan, L., Tang, F., & Xie, X.S. 2015. Single cell transcriptome amplification with MALBAC. *PLoS One.* 10: e0120889.
- Crosetto, N., Bienko, M., & van Oudenaarden, A. 2015. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev. Genet.* 16: 57-66.
- Deng, Q., Ramsköld, D., Reinius, B., & Sandberg, R. 2014. Single-cell RNA-seq reveals dynamic random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343: 193-196.
- de Klerk, E., den Dunnen, J.T., & 't Hoen, P.A. 2014. RNA sequencing: from tag-based profiling to resolving complete transcript structure. *Cell Mol. Life Sci.* 71: 3537-3551.
- Dey, S.S., Kester, L., Spanjaard, B., Bienko, M., & van Oudenaarden, A. 2015. Integrated genome and transcriptome sequencing of the same cell. *Nat. Biotechnol.* 33: 285-289.
- Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnell, R., Zettel, M., & Coleman, P. 1992. Analy-

- sis of gene expression in single live neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3010-3014.
- Efroni, I., Ip, P.L., Nawy, T., Mello, A., & Birnbaum, K.D. 2015. Quantification of cell identity from single-cell gene expression profiles. *Genome Biol.* 16: 9.
- Femino, A.M., Fay, F.S., Fogarty, K., & Singer, R.H. 1998. Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science* 280: 585-590.
- Grün, D., Kester, L., & van Oudenaarden, A. 2014. Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat. Methods.* 11: 637-640.
- Grün, D., Lyubimova, A., Kester, L., Wiebrands, K., Basak, O., Sasaki, N., Clevers, H., & van Oudenaarden, A. 2015. Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature* 525: 251-255.
- Hashimshony, T., Wagner, F., Sher, N., & Yanai, I. 2012. CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep.* 2: 666-673.
- Hayden, E.C. 2014. The \$1000 genome. *Nature* 57: 294-295.
- Ishikawa, M., Murata, T., Sato, Y., Nishiyama, T., Hiwatashi, Y., Imai, A., Kimura, M., Sugimoto, N., Akita, A., Oguri, Y., Friedman, W.E., Hasebe, M., & Kubo, M. 2011. *Physcomitrella* cyclin-dependent kinase A links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell* 23: 2924-2938.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.B., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. 2011. Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res.* 21: 1160-1167.
- Islam, S., Kjällquist, U., Moliner, A., Zajac, P., Fan, J.B., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. 2012. Highly multiplexed and strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing. *Nat Protoc.* 7: 813-828.
- Islam, S., Zeisel, A., Joost, S., La Manno, G., Zajac, P., Kasper, M., Lönnerberg, P., & Linnarsson, S. 2014. Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat. Methods* 11: 163-166.
- Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren-Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretsky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A., & Amit, I. 2014. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* 343: 776-779.
- Kamme, F., Salunga, R., Yu, J., Tran, D.T., Zhu, J., Luo, L., Bittner, A., Guo, H.Q., Miller, N., Wan, J., & Erlander, M. 2003. Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J. Neurosci.* 23: 3607-3615.
- Kivioja, T., Vähärautio, A., Karlsson, K., Bonke, M., Enge, M., Linnarsson, S., & Taipale, J. 2012. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat. Methods* 9: 72-74.
- Kolodziejczyk, A.A., Kim, J.K., Svensson, V., Marioni, J.C., & Teichmann, S.A. 2015. The technology and biology of single-cell RNA sequencing. *Mol. Cell* 58: 610-620.
- Kubo, M., Imai, A., Nishiyama, T., Ishikawa, M., Sato, Y., Kurata, T., Hiwatashi, Y., Reski, R., & Hasebe, M. 2013. System for stable β -estradiol-inducible gene expression in the moss *Physcomitrella patens*. *PLoS One.* 8: e77356.

- Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Ono, Y., Uno, K.D., Yamada, R.G., Ueda, H.R., & Saitou, M. 2006. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* 34: e42.
- Lee, J.H., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Yang, J.L., Ferrante, T.C., Terry, R., Jeanty, S.S., Li, C., Amamoto, R., Peters, D.T., Turczyk, B.M., Marblestone, A.H., Inverso, S.A., Bernard, A., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G.M. 2014. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing *in situ*. *Science* 343: 1360-1363.
- Lovatt, D., Ruble, B.K., Lee, J., Dueck, H., Kim, T.K., Fisher, S., Francis, C., Spaethling, J.M., Wolf, J.A., Grady, M.S., Ulyanova, A.V., Yeldell, S.B., Gripenburg, J.C., Buckley, P.T., Kim, J., Sul, J.Y., Dmochowski, I.J., & Eberwine, J. 2014. Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat. Methods* 11: 190-196.
- Macaulay, I.C., Haerty, W., Kumar, P., Li, Y.I., Hu, T.X., Teng, M.J., Goolam, M., Saurat, N., Coupland, P., Shirley, L.M., Smith, M., Van der Aa, N., Banerjee, R., Ellis, P.D., Quail, M.A., Swerdlow, H.P., Zernicka-Goetz, M., Livesey, F.J., Ponting, C.P., & Voet, T. 2015. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat. Methods* 12: 519-522.
- Nishiyama, T., Miyawaki, K., Ohshima, M., Thompson, K., Nagashima, A., Hasebe, M., & Kurata, T. 2012. Digital gene expression profiling by 5'-end sequencing of cDNAs during reprogramming in the moss *Physcomitrella patens*. *PLoS One*. 7: e36471.
- Pan, X., Durrett, R.E., Zhu, H., Tanaka, Y., Li, Y., Zi, X., Marjani, S.L., Euskirchen, G., Ma, C., Lamotte, R.H., Park, I.H., Snyder, M.P., Mason, C.E., & Weissman, S.M. 2013. Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 594-599.
- Quatrano, R.S., McDaniel, S.F., Khandelwal, A., Perroud, P.F., & Cove, D.J. 2007. *Physcomitrella patens*: mosses enter the genomic age. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 182-189.
- Ramsköld, D., Luo, S., Wang, Y. C., Li, R., Deng, Q., Faridani, O.R., Daniels, G.A., Khrebtkova, I., Loring, J.F., Laurent, L.C., Schroth, G.P., & Sandberg, R. 2012. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat. Biotechnol.* 30: 777-782.
- Rensing *et al.* 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Sasagawa, Y., Nikaido, I., Hayashi, T., Danno, H., Uno, K.D., Imai, T., & Ueda, H.R. 2013. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA-Seq reveals non-genetic gene expression heterogeneity. *Genome Biol.* 14: R31.
- Schloss, J.A. 2008. How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nat. Biotechnol.* 26: 1113-1115.
- Shalek, A.K., Satija, R., Shuga, J., Trombetta, J.J., Gennert, D., Lu, D., Chen, P., Gertner, R.S., Gaublomme, J.T., Yosef, N., Schwartz, S., Fowler, B., Weaver, S., Wang, J., Wang, X., Ding, R., Raychowdhury, R., Friedman, N., Hacohen, N., Park, H., May, A.P., & Regev, A. 2014. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510: 363-369.
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N.E., Heger, A., & Ponting, C.P. 2014. Sequencing depth and coverage: key

- considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 15: 121-132.
- Stegle, O., Teichmann, S.A., & Marioni, J.C. 2015. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 16: 133-145.
- Streets, A.M., Zhang, X., Cao, C., Pang, Y., Wu, X., Xiong, L., Yang, L., Fu, Y., Zhao, L., Tang, F., & Huang, Y. 2014. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 7048-7053.
- Sucher, N.J. & Deitcher, D.L. 1995. PCR and patch-clamp analysis of single neurons. *Neuron* 14: 1095-1100.
- Sugiyama, M. 2015. Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *J. Plant Res.* 128: 349-359.
- Takahashi, H., Lassmann, T., Murata, M., & Carninci, P. 2012. 5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing. *Nat. Protoc.* 7: 542-561.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., Lao, K., & Surani, M.A. 2009. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat. Methods* 6: 377-382.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N.J., Livak, K.J., Mikkelsen, T.S., & Rinn, J.L. 2014. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat. Biotechnol.* 32: 381-386.
- Treutlein, B., Brownfield, D.G., Wu, A.R., Neff, N.F., Mantalas, G.L., Espinoza, F.H., Desai, T. J., Krasnow, M.A., & Quake, S.R. 2014. Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509: 371-375.
- Wang, Y. & Navin, N.E. 2015. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Mol. Cell* 58: 598-609.
- Xue, S., Liu, Y., Zhang, Y., Sun, Y., Geng, X., & Sun, J. 2013. Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection. *PLoS One.* 8: e76718.
- Wilkins, T. & Smart, L. 1996. Isolation of RNA from Plant Tissue. In: Krieg, P.A. (eds.). *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis.* pp. 21-41. Willy-Liss, Inc. New York.
- 石川雅樹 2015. ヒメツリガネゴケの幹細胞誘導機構. *BSJ-Review* 6: 41.
- 宋碩林, 一戸敦子, 菅野純夫 2010. Series 次ⁿ世代シーケンス技術がもたらす「津波」～世界のゲノムプロジェクトと Personalized Medicine. 第1回 シーケンス技術開発の歴史といま, そして未来. *実験医学.* 28: 1442-1448.
- 渡辺亮, 田中梓, 北野優子, 桑原順子 2014. NGS の試薬選択ガイド. 二階堂愛 (編) *実験医学別冊. 次世代シーケンス解析スタンダード.* pp. 18-30. 羊土社. 東京.