

平成 26 年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究期間 平成 26 年度～平成 27 年度
5. 課題番号

2	6	1	1	3	5	1	4
---	---	---	---	---	---	---	---
6. 研究課題名 一細胞遺伝子発現解析を用いたステム・ニッチ形成機構の解明

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 3 4 2 7 7 8	クボ ミノル 久保 稔	学内共同利用施設等	准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

本研究課題では植物の持つ高い再生能力の仕組みを明らかにするために、分化した細胞から幹（ステム）細胞を生じるリプログラミング過程において一細胞ごとの遺伝子発現解析を行うことを目的としている。そのために平成26年度は、切断した葉が容易に幹細胞にリプログラミングし、陸上植物と80%以上の発生過程に関わる遺伝子が保存されているヒメツリガネゴケを用いて1. 生きた葉細胞からのマイクロキャピラリーを用いた細胞液抽出法の確立、2. 微量植物サンプルからのcDNAライブラリーの作成法の検討、3. 次世代シーケンサーによる一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析という3つの課題について研究を行った。1については細胞核を可視化することで効率よく1細胞のRNAを抽出することが可能となった。2についてはcDNAを増幅する酵素の種類と不要な副産物の除去法を検討した。3については1細胞相当のRNAから次世代シーケンサーによる解析を行い、すでに1葉細胞からのサンプリングも進めている。それぞれの課題について全て順当な成果が得られ、次年度以降に行う一細胞遺伝子発現解析を用いたステム形成因子の同定とリプログラミング過程におけるステム・ニッチ相互作用の解析のための十分な準備ができた。

10. キーワード

- | | | | |
|-----------|--------------|----------------|----------------|
| (1) 一細胞解析 | (2) リプログラミング | (3) 次世代シーケンシング | (4) トランスクリプトーム |
| (5) 幹細胞 | (6) 分化転換 | (7) 細胞間相互作用 | (8) |

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

平成26年度の研究計画で掲げた3つの課題について研究を遂行した。

1. 生きた葉細胞からのマイクロキャピラリーを用いた細胞液抽出法の確立：一細胞遺伝子発現解析の材料であるヒメツリガネゴケ茎葉体の育成とリプログラミング実験における切断葉の培養を新規購入した温度・光量・湿度調整機能付き人工気象器で行うことで、再現性の高い条件を設定することができた。マイクロキャピラリーを用いて効率的に細胞液を抽出する条件の検討を行い、適切な実験条件が設定できた。
2. 微量植物サンプルからのcDNAライブラリーの作成法の検討：次世代シーケンサーを用いて一細胞遺伝子発現解析に適したcDNAライブラリー作成に必要な実験の新規導入と条件検討を行い、全ての検証点において理想的な条件を確立した。
3. 次世代シーケンサーによる一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析：ヒメツリガネゴケ原系体から調整したRNAを用いて一細胞含有量相当に希釈したサンプルからcDNAを合成し、次世代シーケンサーによる配列決定を行った。得られた配列情報を一細胞遺伝子発現解析に適したデータ量に変換する手法を確立した。この結果を元に遺伝子発現解析系の評価を行った。さらにヒメツリガネゴケ切断葉において切断直後(0h)と24時間後(24h)の一細胞から葉細胞液を抽出し、cDNAライブラリーの調整を行った。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

ヒメツリガネゴケ切断葉の切断直後(0h)と24時間後(24h)の一細胞サンプルにおいて次世代シーケンシングを行い、統計処理、階層クラスタリングや主成分分析を行うことにより、一細胞遺伝子発現解析手法を確立する。また、孤立化させた一葉細胞リプログラミング系を用いたステム形成因子の同定、切断葉リプログラミング過程におけるステム・ニッチ相互作用の解析を随時行う。

13.研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

(学会発表) 計(3)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名		発表標題	
Minoru Kubo, Tomoaki Nishiyama, Daniel Lang, Olaf Faustmann, Taku Demura, Ralf Reski, Mitsuyasu Hasebe		Establishment of single cell transcriptome analysis in <i>P. patens</i> leaves	
学会等名	発表年月日	発表場所	
The 17th Annual Moss International Conference Moss2014	2014年09月25日～2014年09月28日	Beijing (China)	

発表者名		発表標題	
寺田 志織, Bo Xu, 佐野 亮輔, 坂本 智昭, 倉田 哲也, 浦崎 直也, 野村 俊尚, 大谷 美沙都, 米田 新, 加藤 晃, 久保 稔, 出村 拓		オオミズゴケの透明細胞分化に関わる分子メカニズムの解明	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本植物学会第78回大会	2014年09月12日～2014年09月14日	明治大学(神奈川県川崎市)	

発表者名		発表標題	
久保 稔, 西山 智明, ダニエル ラング, 出村 拓, ラルフ レスキー, 長谷部 光泰		植物リプログラミング研究に向けたヒメツリガネゴケ葉細胞における一細胞遺伝子発現解析系の確立	
学会等名	発表年月日	発表場所	
第56回日本植物生理学会年会	2015年03月16日～2015年03月18日	東京農業大学(東京都世田谷区)	

〔図書〕計(0)件

著者名		出版社		
書名		発行年	総ページ数	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--