

Application Note

やさしく細胞をソーティングすることによるdorsal raphe *Pet1* マウスニューロンにおけるシングルセルトランスクリプトーム解析の改善

Summary of Okaty, B. W., Sturrock, N., et al. eLife 2020;9:e55523.

This application note was produced under the licence of Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Introduction

蛍光活性化セルソーターを用いた標的細胞集団の単離技術は、遺伝子発現解析のような非常に感度の高い下流アプリケーションにとって重要なステップです。従来の静電液滴方式のセルソーターは、ソーティング時の細胞に与えるダメージにより、しばしば遺伝子発現の変化・細胞損傷・細胞死を引き起こし遺伝子発現アーテファクトとなったり、外来RNA汚染の原因となったりします。その結果、誤った遺伝子発現プロファイリングを引き起こす可能性があります。この問題を克服するために、マイクロ流路チップ型セルソーター「On-chip® Sort」は、壊れやすく敏感な細胞のダメージフリーソーティングが可能であり、効果的に下流のシングルセル解析を可能にします。本研究では、マウスのdorsal raphe (DR) *Pet1*ニューロンをOn-chip® Sortで純化し、その後シングルセルRNAシーケンシング (scRNA-seq) で解析することにより、その分子の多様性を高スループットかつ高分解能で特徴付けました。本研究の結果は、神経科学分野への理解を深め、標的とする治療法の開発に貢献する可能性があります。

Methods

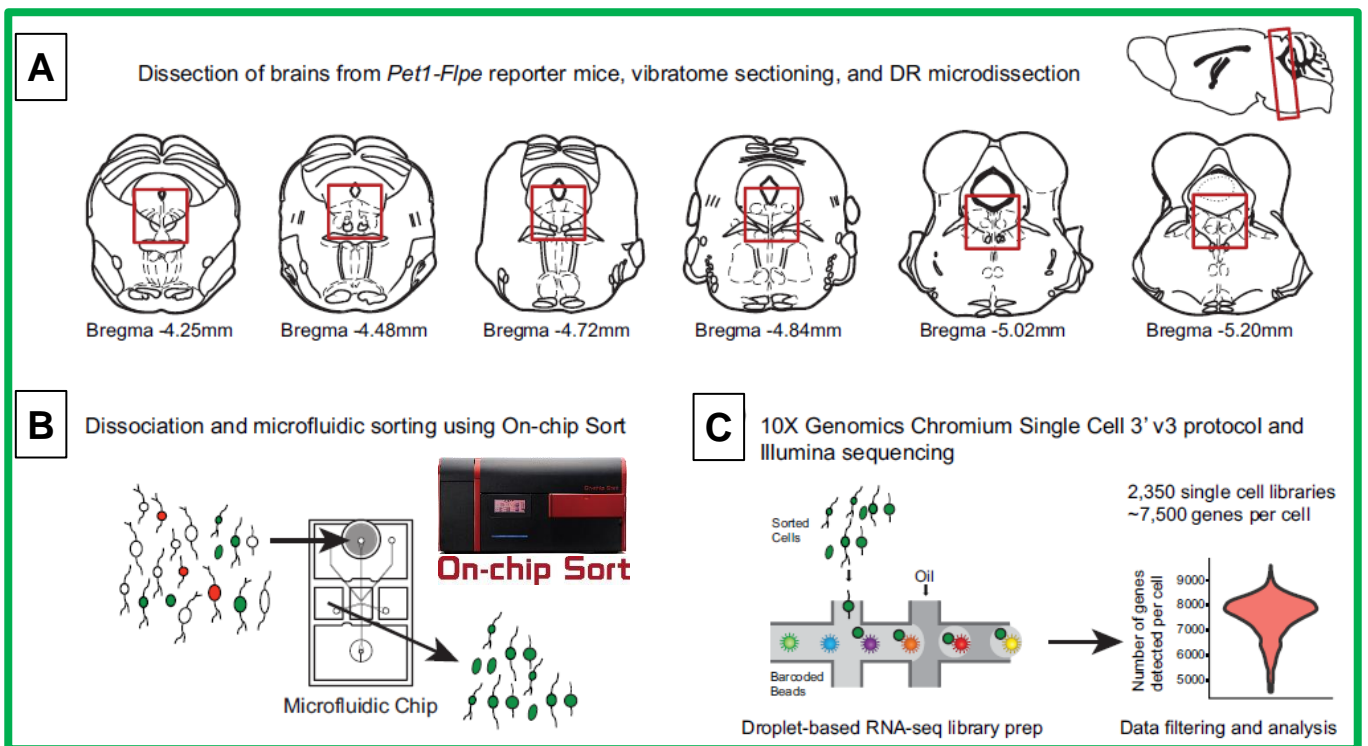


図1. 実験ワークフローの模式図。(A)マウス脳の解剖、(B)DR細胞の単離とOn-chip® Sortを用いた蛍光標識ソーティング、(C)10Xゲノミクスを用いたライブラリー調製とIlluminaシーケンシングを用いたscRNA-seqおよびRパッケージSeuratを用いたデータ解析。

図1に実験の流れを示しました。2つの遺伝子型から6～10週齢のマウスの脳を解剖し(図1A)、DR細胞を単離、EGFP発現でマークされたDR-*Pet1*細胞をOn-chip® Sortで純化しました(図1B)。ソーティングしたニューロンを用いて、10X Genomics Chromium Single Cell 3' v3プロトコルで処理して、Illumina NextSeq 500でシーケンシングしました(図1C)。シングルセルRNA-seqデータの解析は、RパッケージSeuratを用いて行いました。データフィルタリングおよび解析の後、2,350個のシングルセルライブラリーを更に解析しました(図1C)。

Application Note

Results

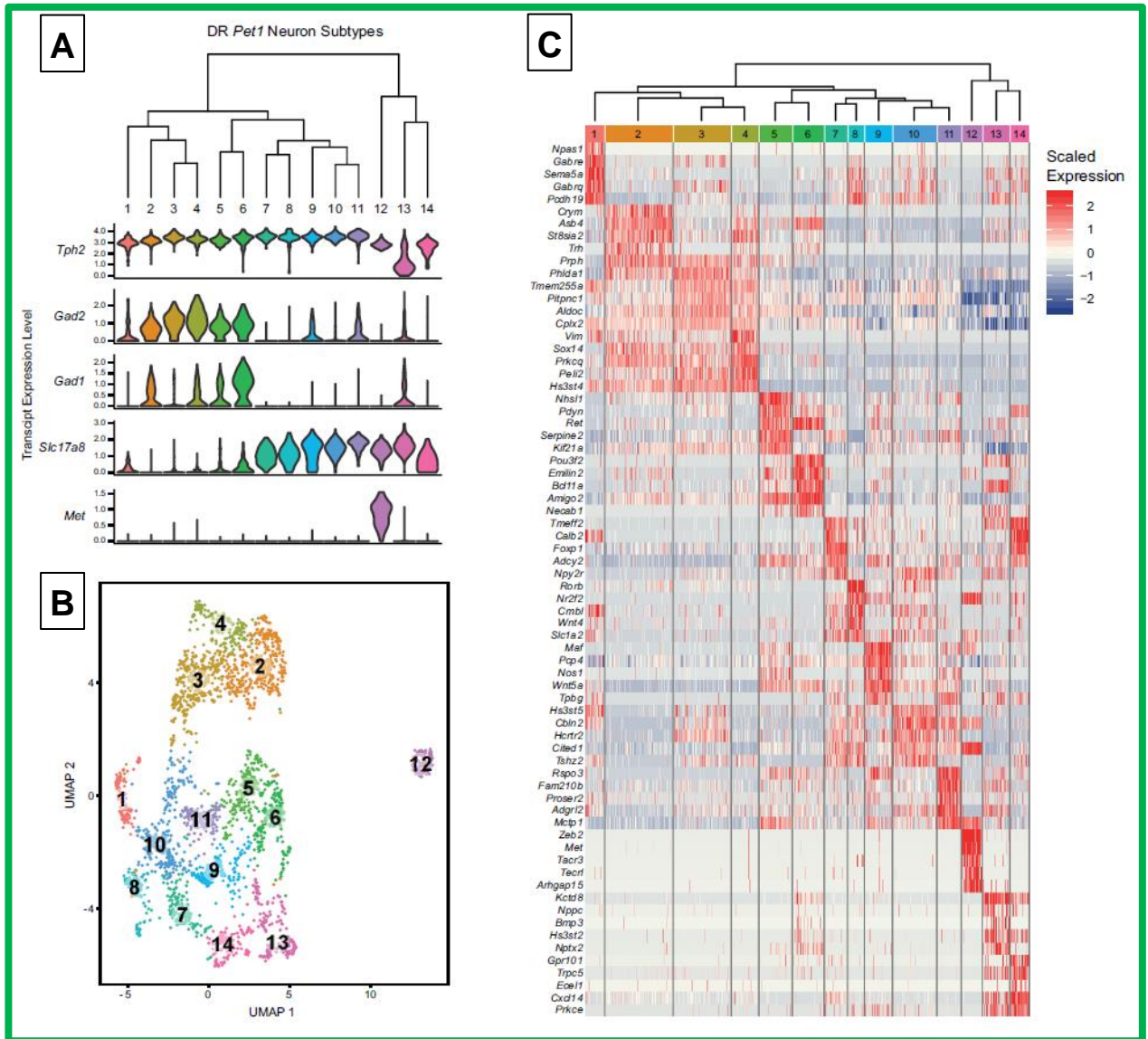


図2. クラスタリング解析による単一DRニューロンの分子多様性の特性評価。(A) ルーヴァン・クラスタリングによって同定されたDR-Pet1ニューロンのサブタイプ (クラスター) の階層的クラスタリング、共通の遺伝子セットの対数正規化された発現に対するバイオリンプロット。(B) 単一ニューロンのトランスクリプトームにおけるコミュニティ/相似構造のUMAP可視化。各色は離散的なクラスターを示し、(A) で使用したクラスタリングパラメータを使用している。(C) 各クラスターの上位5つのマーカー遺伝子の発現をスケールしたヒートマップ。

On-chip® Sortによって分取されたDRニューロンの多くは、生存可能な状態であることが観察され、そのプロセスが無傷であることから、On-chip® Sortにおいて穏やかな (やさしく) 選別することが可能であることが示されました。DR-Pet1ニューロンの分子的多様性を特徴づけるために、単一のニューロン間で転写産物の発現が有意に異なる遺伝子を同定し、これらの遺伝子発現の違いに基づいて、図2A-Cに示すクラスタリング解析において、マウスのDR-Pet1ニューロンに14の異なる分子的サブタイプを分類しました。On-chip® Sortを用いたDRニューロンのジェントルソーティング (gentle sorting) は、単一細胞トランスクリプトームの結果を確実に提供するためのscRNA-seqの上流作業として重要な予備ステップとなります。