

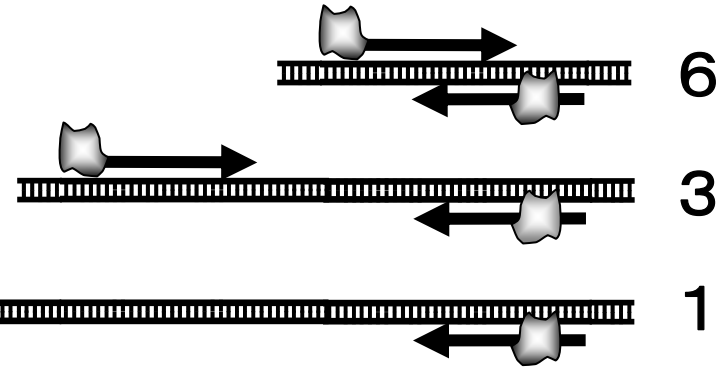
# チャムRNA (Chum-RNA)

チャムRNA (Chum-RNA)は  
酵素の反応速度を亢進する  
ダミー基質(dummy substrate)  
として働き、反応液に加えるだけで  
PCR増幅をすることなく  
1個のヒト細胞から 高品質なcDNA ライブラリー  
を作製する手助けをする。

PCRでは増幅時間(回数)が  
基質の長さに依存する

➡ 存在量に偏りが生じる

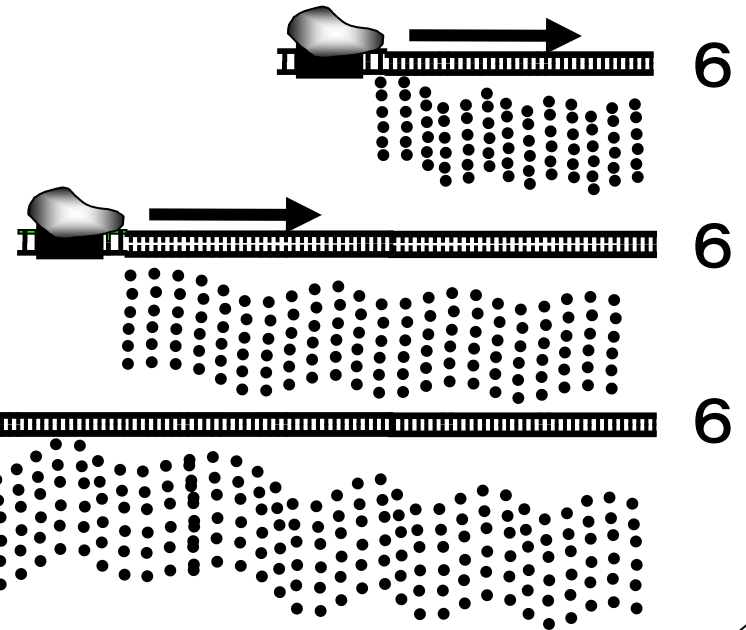
指数関数的増幅: PCR



T7 RNA Polymeraseを用いると増幅時間(回数)は基質の長さに依存しない

➡ 存在量に偏りは生じにくい

線形増幅: Chum-RNA



高品質な cDNA ライブラリーを作製するためには10 $\mu$ g (1 x 10<sup>-6</sup>g)必要。

Chum-RNA-1

1個のヒト細胞に存在する全RNA量は15pg、全mRNA量は1pg。

高品質な cDNA ライブラリーを作製するために15マイクログラムの全RNA量を手に入れるためには、100万個以上の細胞が必要。

mRNA(あるいは cDNA)を増幅する技術として

ポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase Chain Reaction: PCR)は

1回の増幅に往復のDNA伸長反応を行う事で指数関数的な増幅が進むので、膨大な種類数の mRNA が混在するcDNA ライブラリー全体を増幅する場合などにおいては、サイズの短いmRNAや、もともと数の多いmRNAが優先的に増幅されるので、mRNA 数の分布が偏って増幅される。

一方、T7 RNAポリメラーゼを用いて増幅すると、プロモーターからの同じ方向への線形増幅が進むため、偏って増幅されるという問題は生じない。その代わりに、極微量の mRNA を出発物質とした場合には、反応が全く進まないという別の難問が新たに立ちはだかってくる。

その理由は、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素やDNAリガーゼなどの cDNA ライブラリー作製に使われる酵素の至適基質濃度(Km値)が $1\mu\text{M} \sim 1\text{mM}$ と高いからである。

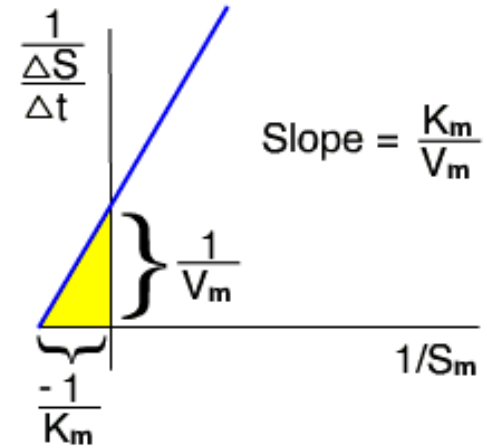
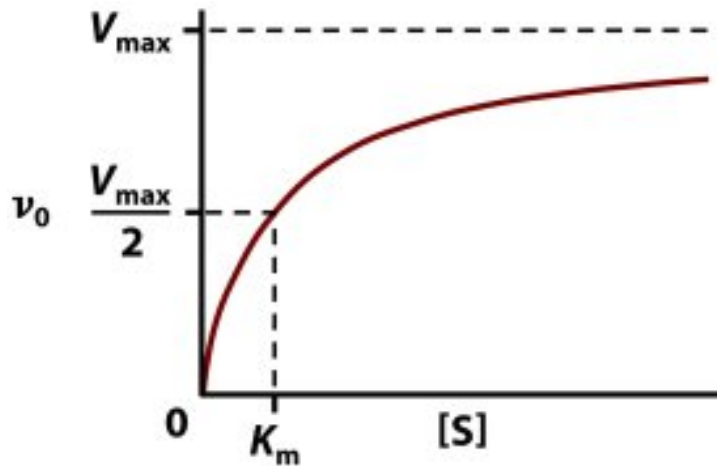
ここに、1個のヒト細胞から採取できる1pgのmRNA(上述)を $10\mu\text{l} (=10 \times 10^{-6} \text{ l})$ の反応液に溶かした場合の mRNA 濃度を計算すると、 $1\text{pg}/(3.7 \times 10^5 \times 10 \times 10^{-6}) = 0.27 \text{ pM}$  という低い濃度と計算できる。

ここに生じる100万倍以上の落差をどのように埋めるかは大きな難問としてだれも解決できないで残っていた。

# ミカエリス・メンテンの式



$$v_1 = \frac{V_{\max}[S]}{\{K_m + [S]\}}$$



Michaelis-Menten kinetics  
according to Lineweaver-Burke



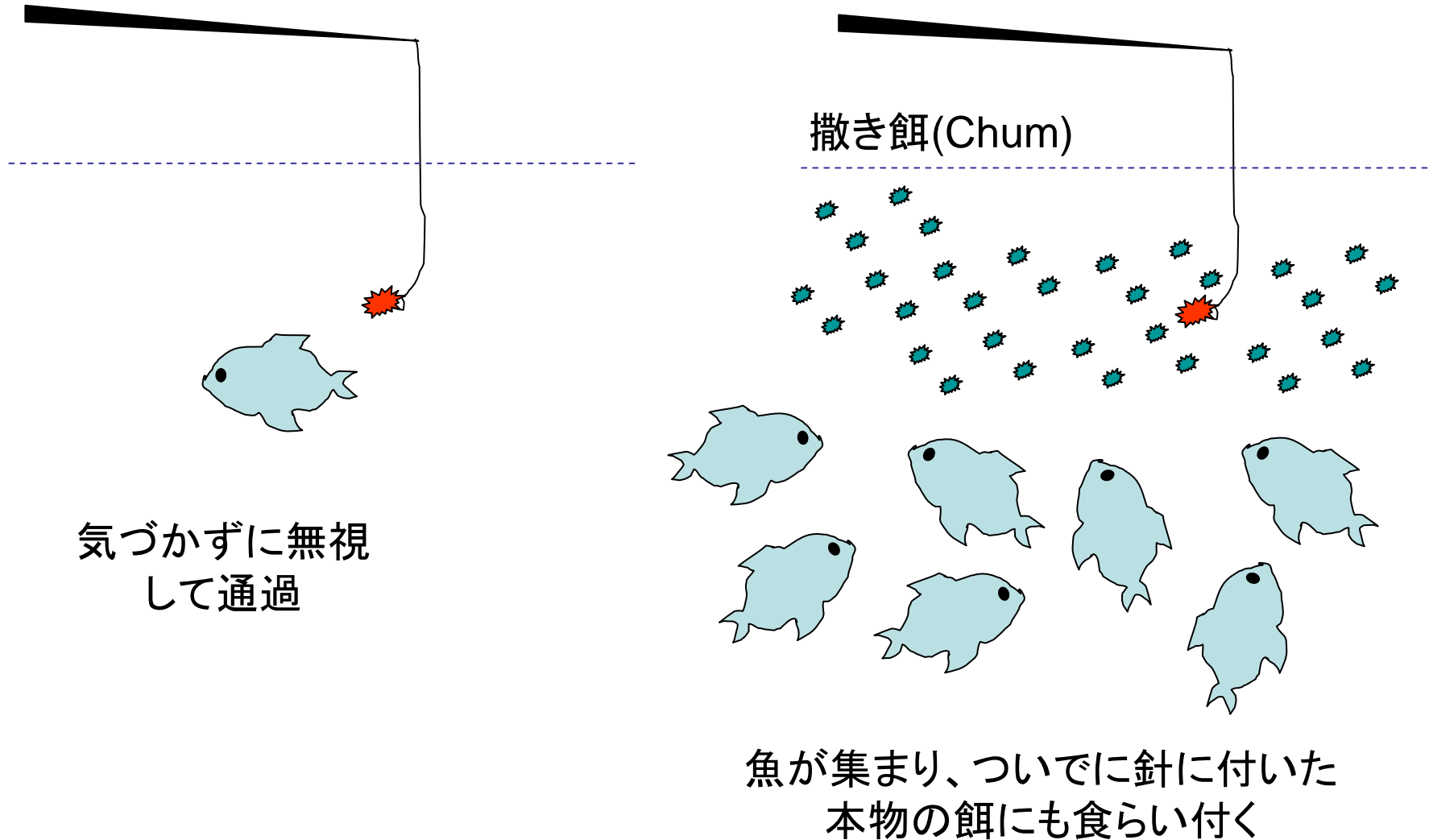
Leonor Michaelis  
1875-1949



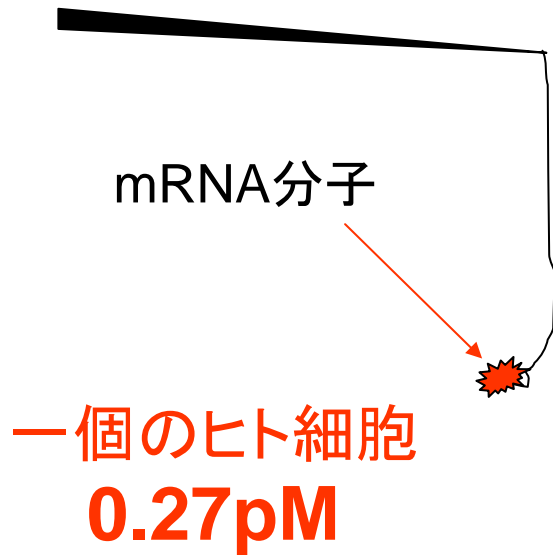
Maud Menten  
1879-1960

出発点となるmRNA(基質)の濃度が低いと酵素反応速度は遅くなる。  
現実的には殆ど反応は進まない状態となる。

# チャムRNA (Chum-RNA)技術の原理

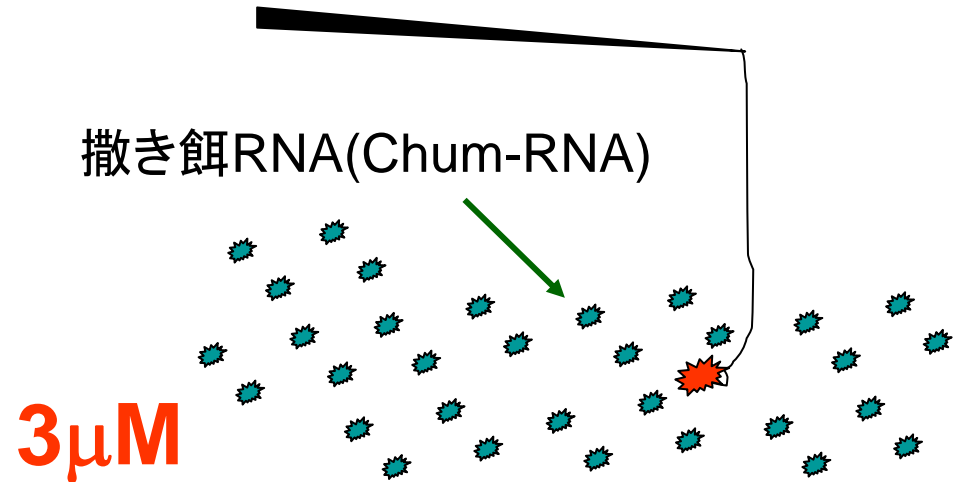


# チャムRNA (Chum-RNA)技術の原理



逆転写酵素は  
無視して通過

至適濃度~ $\mu\text{M}$



5'-AAUUCGUCUGGACACGA<sub>25</sub>-3'

逆転写酵素が集まって反応を開始し、  
ついでにmRNAの反応も開始する。

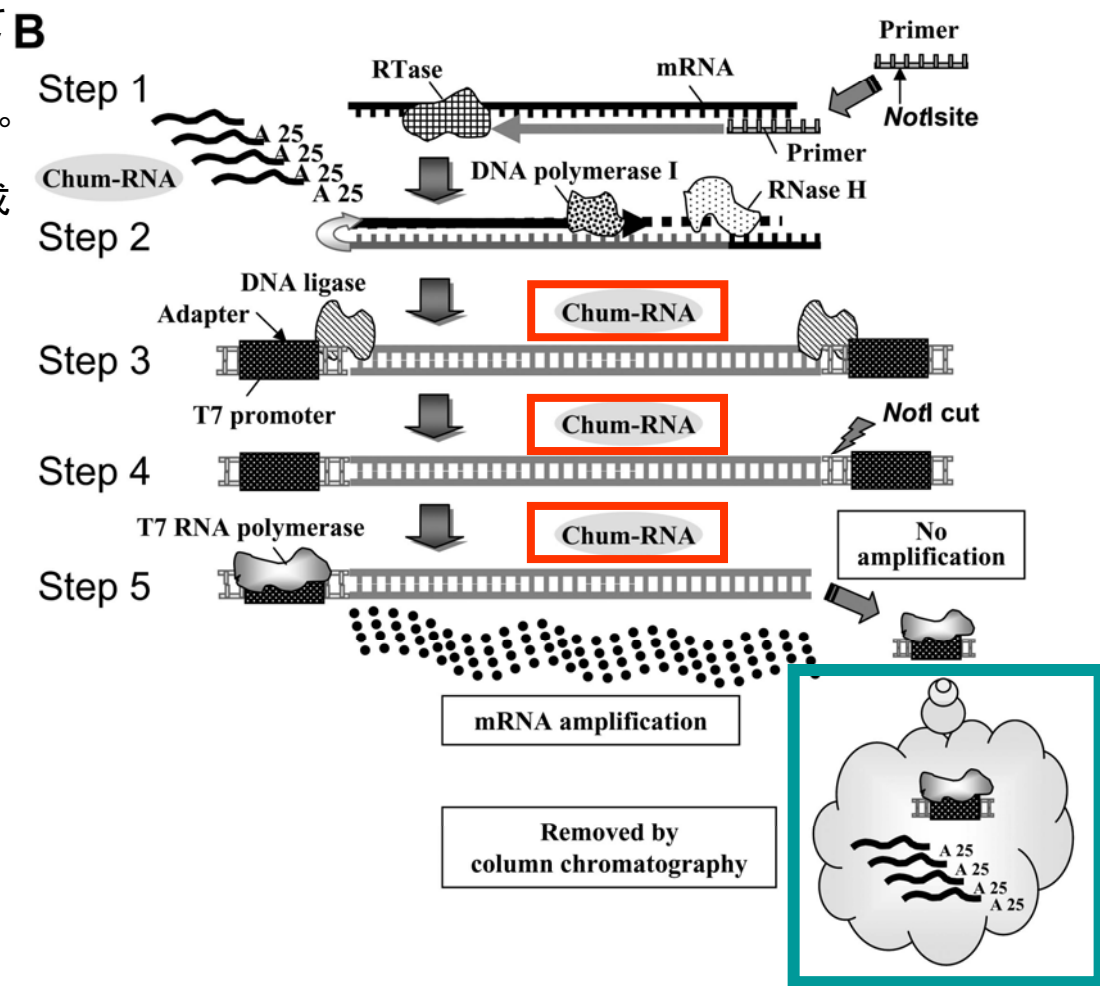
**A** (i) 5'-AAUUCGUCUGGACACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

(ii) 5'-AAUCUGUCGCGGCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'

図1: Chum-RNAの構造と、高品質cDNA ライブラリー作製のためのプロトコルの図解。

(A) 2種類のChum-RNAの塩基配列。主として (i)を用いたが、NotIサイトの挿入されたChum-RNAを用いた場合でも同様の効果が得られる。

(B) mRNA を基質として二本鎖cDNAを生合成し、それをT7RNAポリメラーゼによって線形に増幅する際の各ステップとChum-RNAを加えるタイミングの図解。

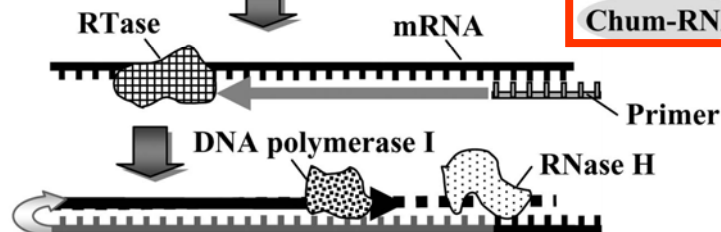


C

Step 6



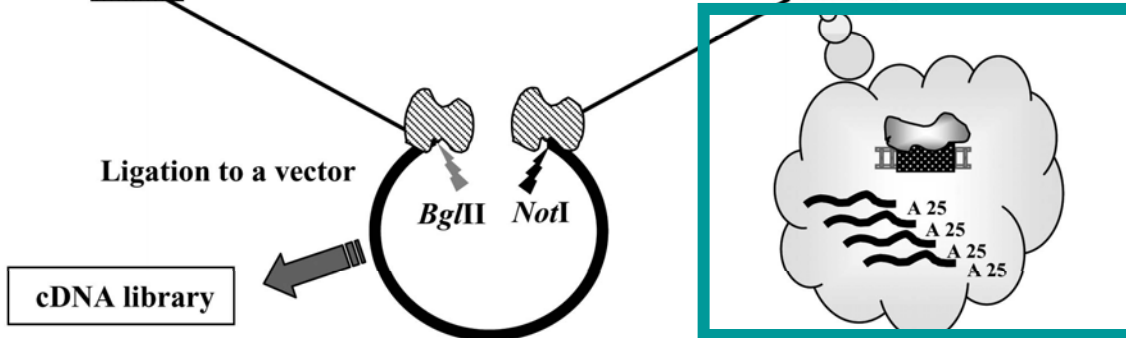
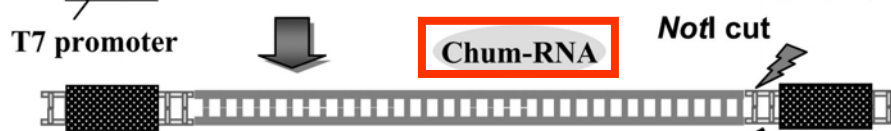
Step 7



Step 8



Step 9



cDNA library

図1: Chum-RNAの構造と、高品質cDNA ライブラリー作製のためのプロトコールの図解。

(C) 増幅したmRNA を基質として二本鎖cDNA を生合成したのち cDNA ライブラリー作製のためにベクターへ挿入する各ステップとChum-RNA を加えるタイミングの図解。

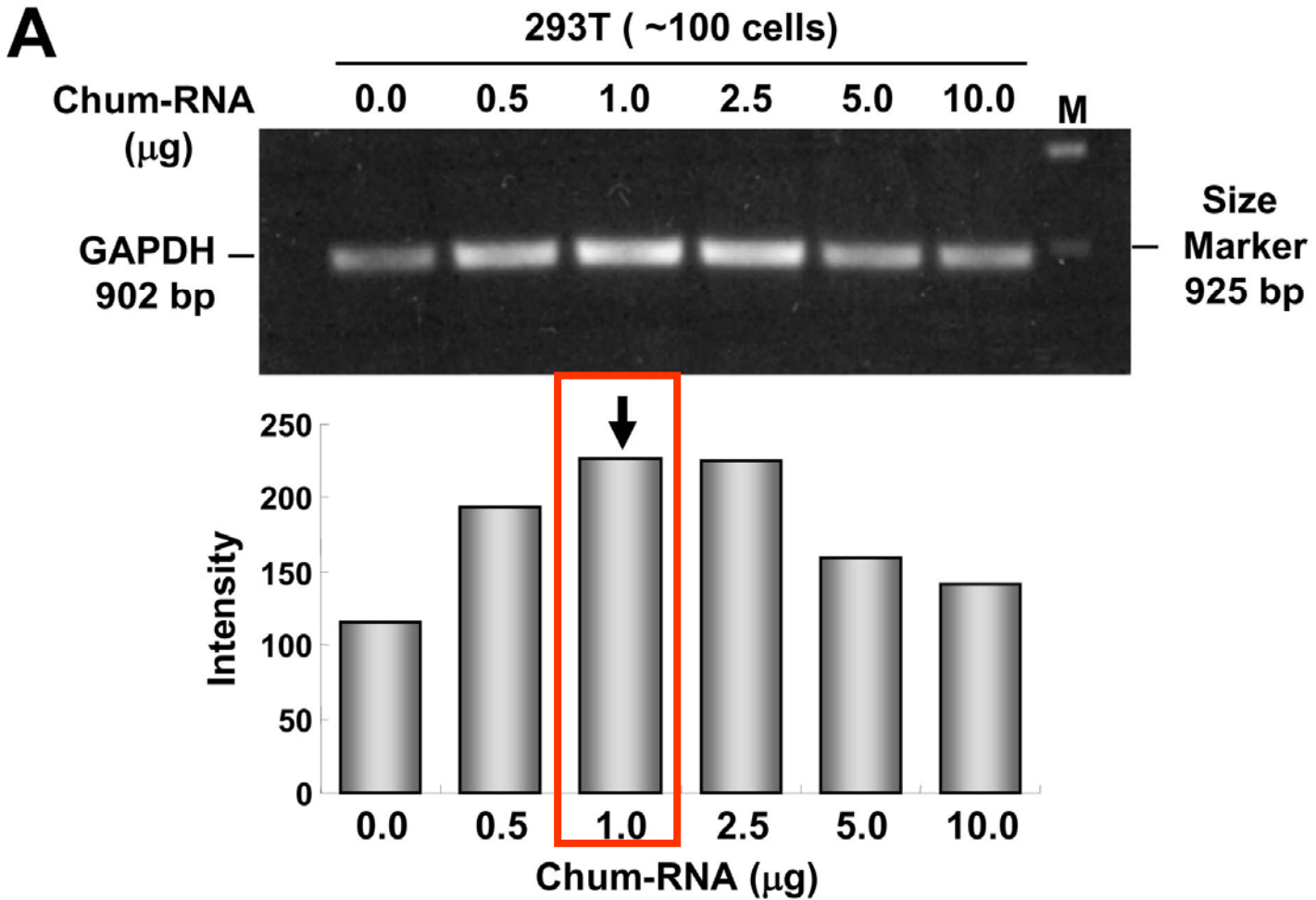


図2: Chum-RNAを加えれば、極微量の mRNA を基質に対しても逆転写酵素反応を開始させる事ができる。

(A) mRNA を cDNA 化する際の逆転写酵素の反応液に加えるChum-RNAの至適濃度は3 μ Mである。

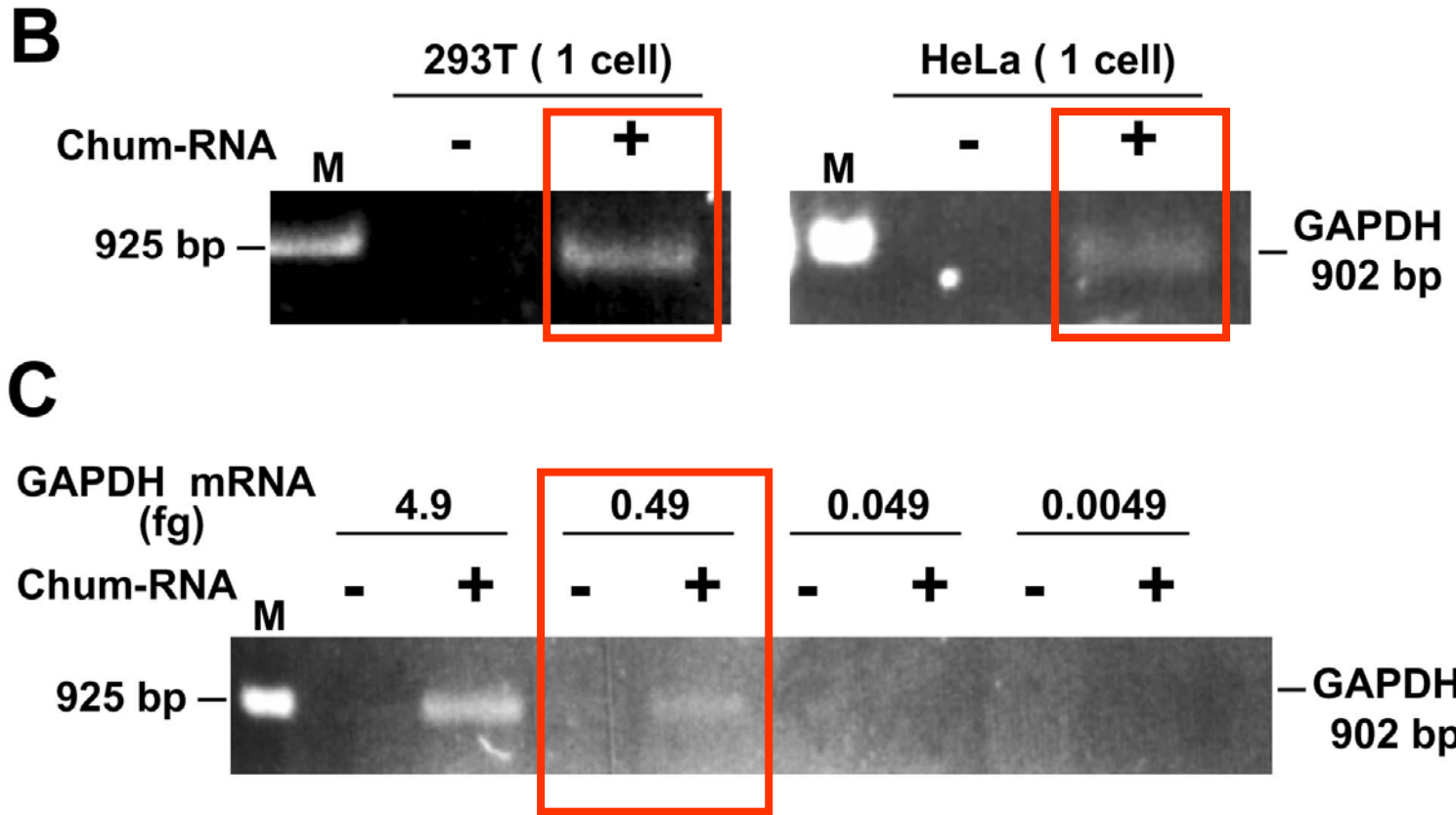
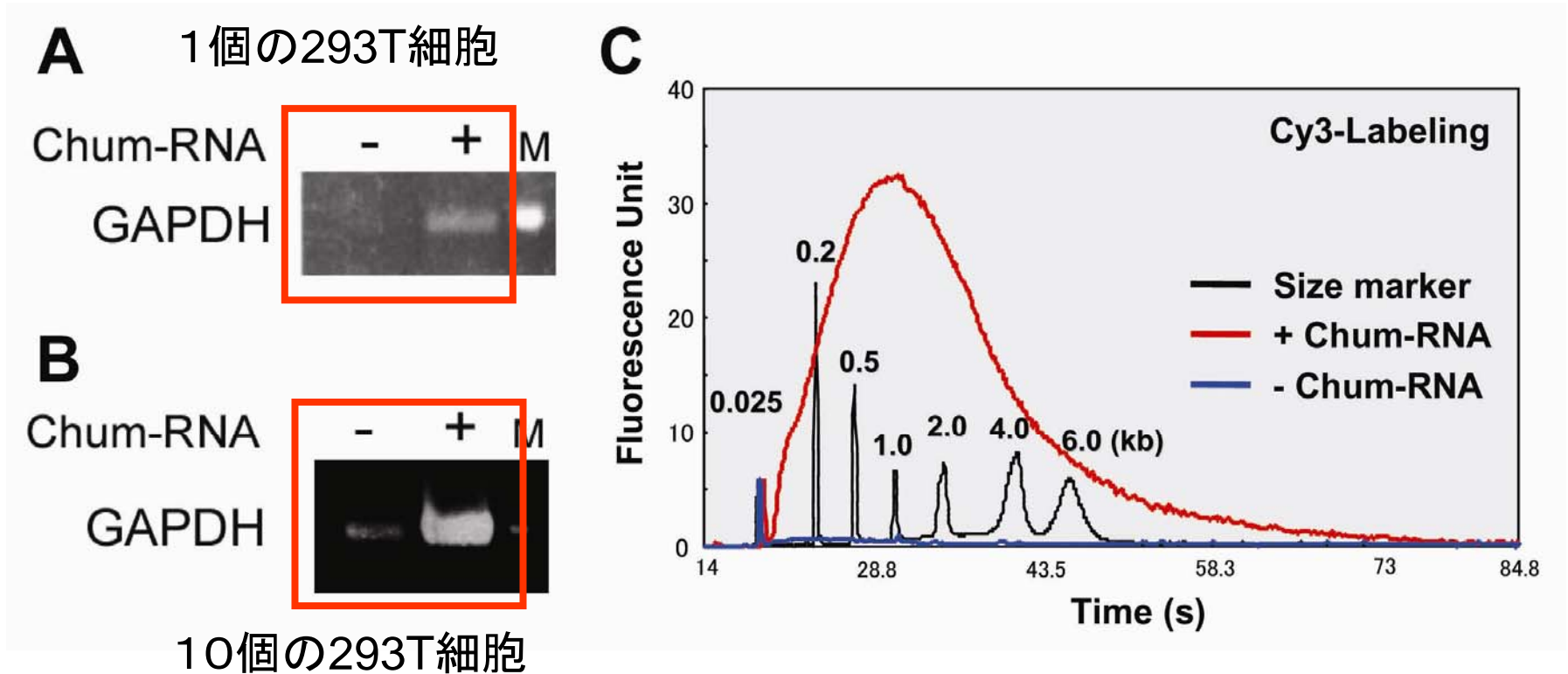


図2: Chum-RNAを加えれば、極微量の mRNA を基質に対しても逆転写酵素反応を開始させる事ができる。

(B) Chum-RNAを加えれば、1個相当のヒトがん細胞(293TあるいはHeLa)由来の mRNA 量を出発点としてさえ逆転写酵素反応を開始させる事ができる。

(C) Chum-RNAを加えれば、わずか0.47 フェムトグラム(730分子数)のGAPDH mRNAに対してさえ逆転写酵素反応が開始する

一回の線形増幅過程で約30倍増幅される



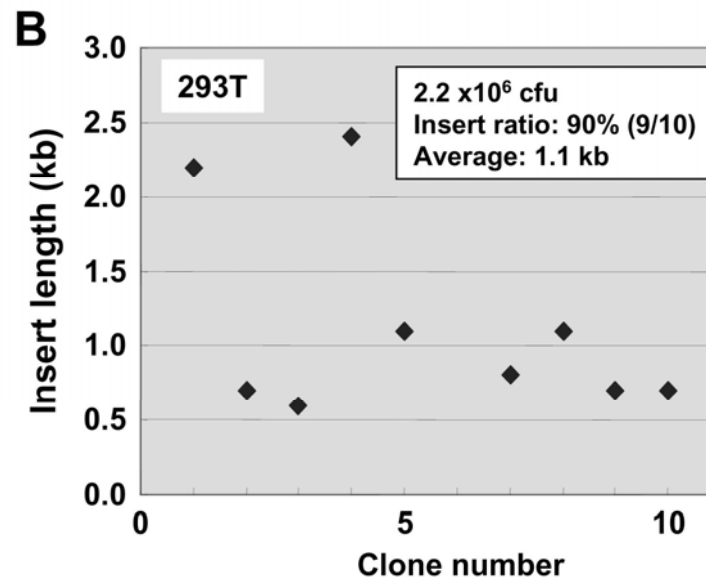
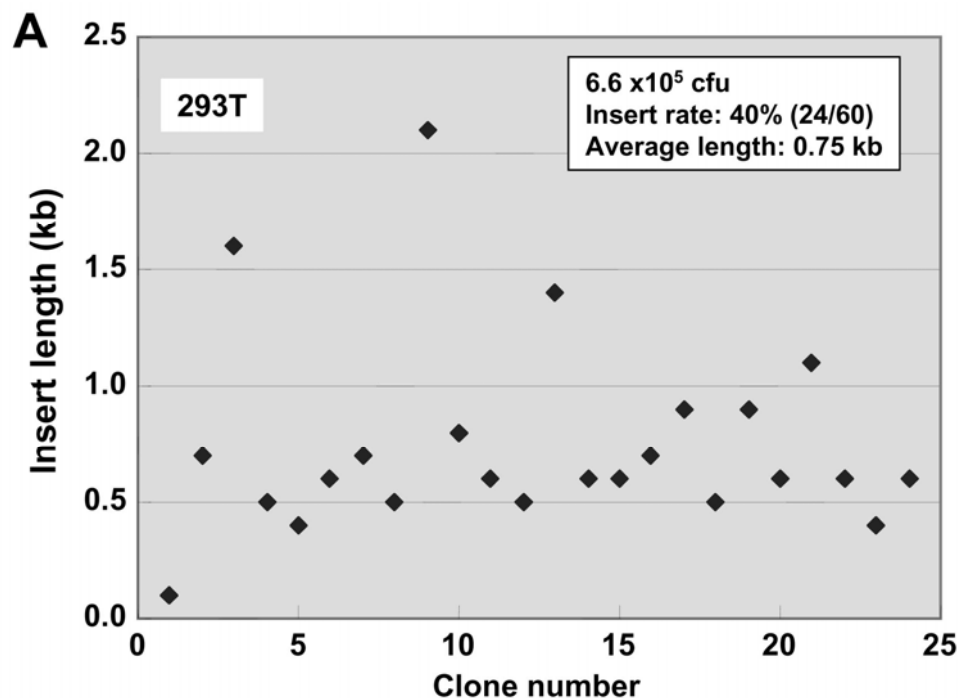
増幅された mRNA は偏在の無い  
幅広い分布を示す

図3: Chum-RNA存在下でT7RNAポリメラーゼにより増幅しながら蛍光試薬(Cy3)で標識したmRNAのサイズ分布。

図4: 1個相当のヒトがん細胞(293T)由来の mRNA 量を出発点としてChum-RNAを加えながら作製したcDNA ライブラリーの挿入 cDNA のサイズ分布。

1個の293T細胞由来の  
極微量 mRNA を出発点とした

100万個の293T細胞由来の  
大量 mRNA を出発点とした



**Table S1. Contents of the single-cell cDNA library.** Sixty clones randomly selected from the 293T single-cell cDNA library amplified using chum-RNA were subjected to a homology search using the BLASTN algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Of 60 clones analyzed, 23 were found to harbor cDNA inserts longer than 100 bp. Among them, 14 clones (s293T-1 to -14) included distinct human cDNA.

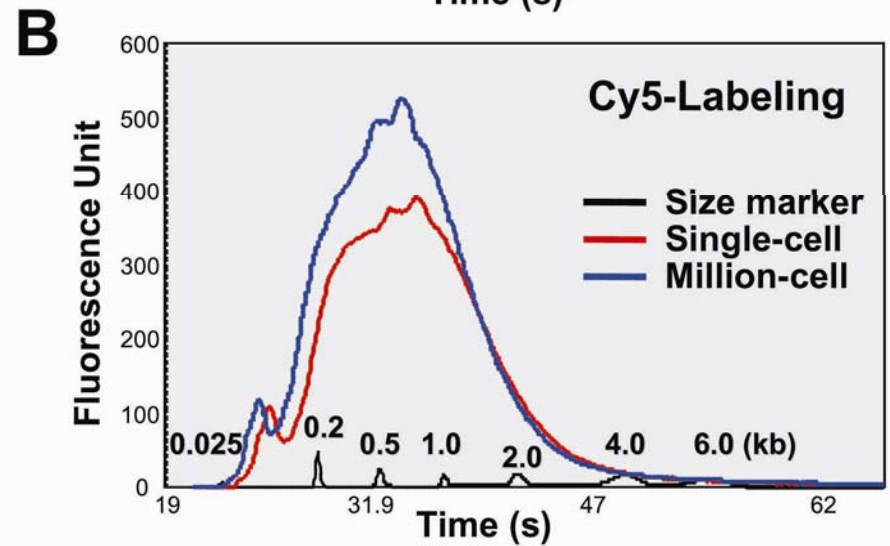
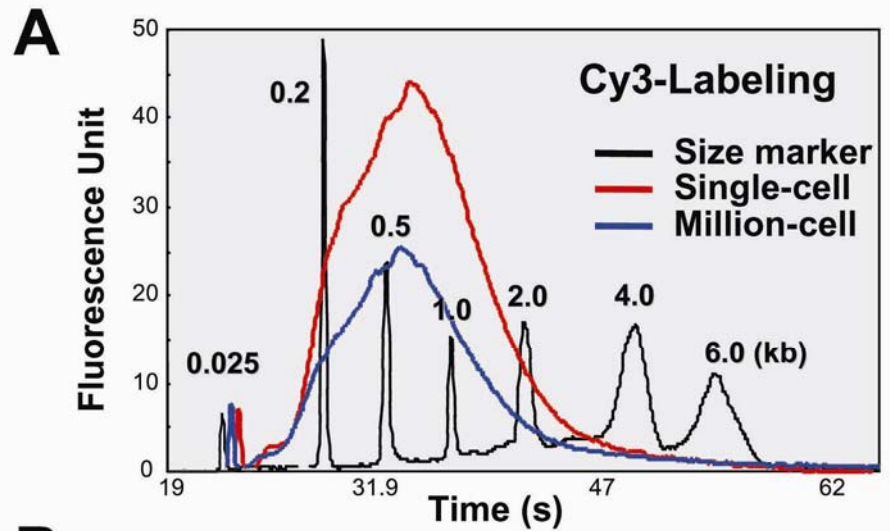
Name	Accession #	Description
s293T-1	NM_021103	Thymosin, beta 10 (TMSB10)
s293T-2	NM_021104	Ribosomal protein L41 (RPL41)
s293T-3	NM_170784	McKusick-Kaufman syndrome (MKKS), transcript variant 2
s293T-4	NM_001009	Ribosomal protein S5 (RPS5)
s293T-5 (IMAGE:4128923)	BC007845	Lysosomal-associated membrane protein 1
s293T-6	NM_001042465	Prosaposin (PSAP)
s293T-7	NM_079423	Myosin light polypeptide 6 (MYL6)
s293T-8	NM_002291	Laminin, beta 1 (LAMB1)
s293T-9	NM_007173	Protease, serine, 23 (PRSS23)
s293T-10	NM_032937	Chromosome 9 open reading frame 37 (C9orf37)
s293T-11 (EIF3S2)	NM_003757	Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta
s293T-12	NM_002018	Flightless I homolog (Drosophila) (FLII)
s293T-13	NM_003589	Cullin 4A (CUL4A)
s293T-14	NM_018462	Chromosome 3 open reading frame 10 (C3orf10)

**Table S2. Contents of the million-cell cDNA library.** Ten clones randomly selected from the 293T million-cell cDNA library (unamplified) were subjected to a homology search using the BLASTN algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Of the 10 clones analyzed, 9 harbored distinct human cDNA inserts longer than 100 bp.

<u>Name</u>	<u>Accession #</u>	<u>Description</u>
m293T-1	NM_013986	Ewing sarcoma breakpoint region 1 (EWSR1)
m293T-2	NM_005520	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (HNRPH1)
m293T-3	NM_001757	Carbonyl reductase 1 (CBR1)
m293T-4	BC052958	Phosphoserine phosphatase
m293T-5	NM_025075	THO complex 7 homolog (Drosophila) (THOC7)
m293T-6	NM_182491	Zinc finger, AN1-type domain 2A (ZFAND2A)
m293T-7	NM_003072	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4 (SMARCA4)
m293T-8	NM_002137	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 (HNRPA2B1)
m293T-9	NM_001016	Ribosomal protein S12 (RPS12)

図5: 1個(赤: Cy3)あるいは100万個(青: Cy5)相当のヒトがん細胞(293T)由来の cDNA ライブラリーは同程度に高品質である。

(A, B) これらの cDNA ライブラリーより抽出した cDNA を基質とし、T7RNAポリメラーゼを用いて蛍光試薬(Cy3/Cy5)で標識しながら *in vitro* で生合成した mRNA のサイズ分布。



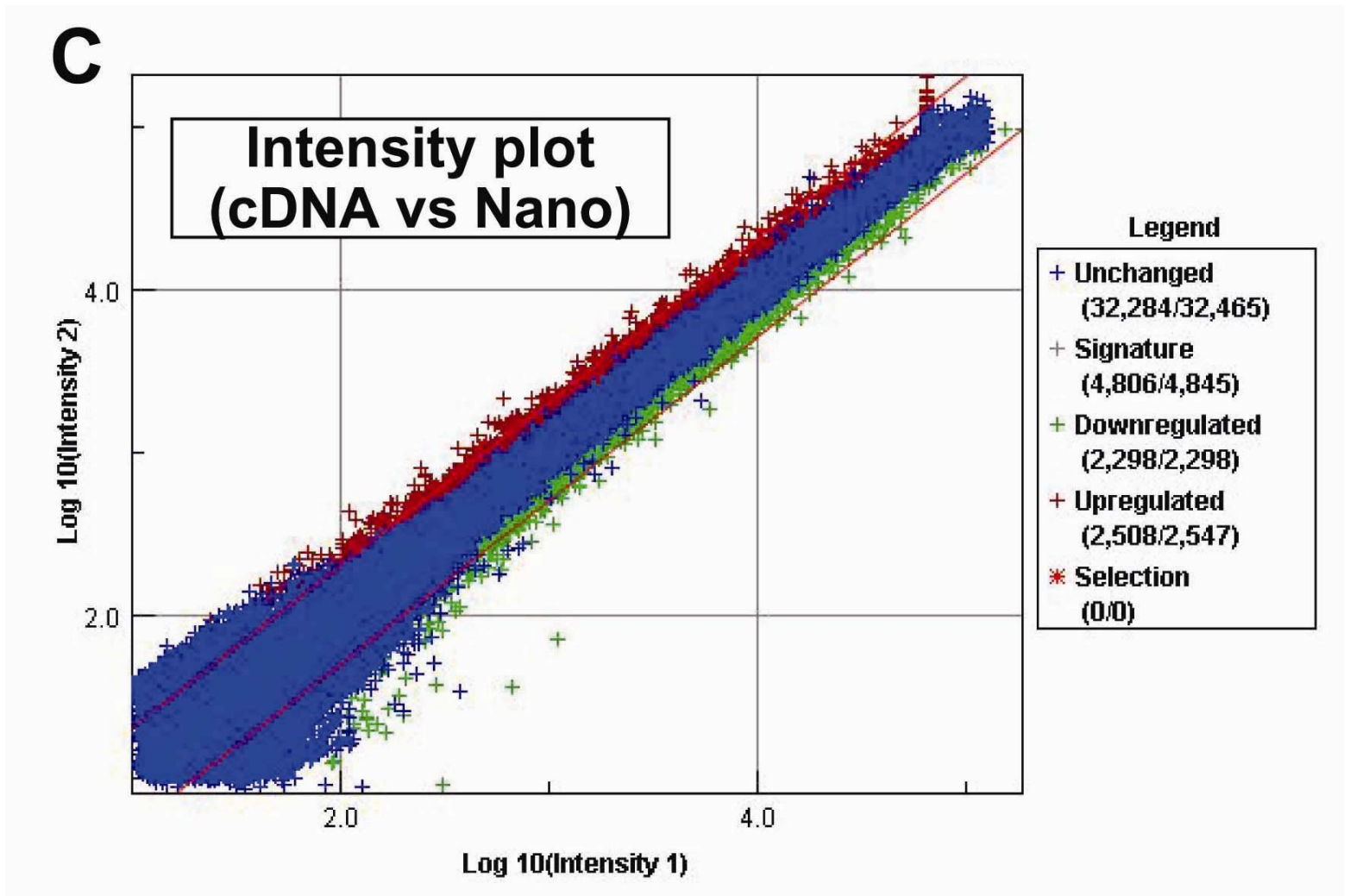


図5: 1個(赤: Cy3)あるいは100万個(青: Cy5)相当のヒトがん細胞(293T)由来の cDNA ライブラリーは同程度に高品質である。

(C) 両者をAgilentのDNA マイクロアレイ(Hu44K)を用いて2色法にてスクリーニングした結果の強度プロット。青で示される両者が合致する部分の面積が広いのと、両者の違いを示す赤または緑の面積が狭く解離が少ない事は、両者の挿入 cDNAの種類に偏りが少ない事を示す。