

## 統合脳支援班課題「簡便に使える Single-cell microarray analysis 法の開発と普及」による技術講習会について

生体の全ての組織は、多種多様な細胞種の集団により構成されています。中でも哺乳類の中樞神経系組織は、他に類を見ないほどに多様な細胞により構成され、神経回路が形成され、神経活動が営まれています。それ故、神経回路の成り立ちや機能を調べるためには、個々の単一中枢神経系細胞（主に神経細胞）の発現遺伝子プロファイルを調べることは非常に重要と思われまます。

そのような必要性から、これまでも単一細胞より得た cDNA を PCR 増幅して発現遺伝子プロファイリングを行った例は、幾つか報告されています。しかしそれらの報告にある方法のプロセスは難しく、分子生物学者でも再現性を持って繰り返し実施できず、他分野の研究者であれば分子生物学者の助けなくして利用できる技術ではありませんでした。そこで我々は、他分野の研究者が技術修練無く短期間で再現性を持って単一細胞発現遺伝子プロファイリングを行えるようにする方法を確立すべく、研究を重ねてきました。

現在までに、タカラ・クローンテック社の Super Smart cDNA PCR amplification kit と Affymetrix 社の One cycle RNA labeling kit を組み合わせて、単一細胞に含まれる mRNA を 2-3 枚の microarray にハイブリダイズするのに十分な量の biotin 標識の入った cRNA まで増幅することに成功しました。次に増幅の再現性、信頼度を確かめるために、E18-P0 の GAD67-GFP ノックインマウスの脳室下帯より GFP 陽性細胞をセルソーターにより分離して得た 1 µg の totalRNA から通常の方法で array analysis を行なった場合と、同 totalRNA を 10 万倍希釈してから Super Smart cDNA PCR amplification kit と Affymetrix 社の One cycle RNA labeling kit による増幅を行なって array analysis した場合を比較しました。その結果、希釈して増幅した場合は、プレゼントコールが 56%まで減少してしまうことが分かりました。しかしプレゼントコールが示された遺伝子の発現を single-cell RT-PCR や免疫組織化学法で調べてみたところ、これまでは全て検出できたという経験から、false negative は頻発するが false positive はほとんど起きないことが示唆されました。false negative は頻発しても false positive は起きないことは、実験方法として確立する上で非常に重要です。

方法の概略はホームページに記載しました。

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/morneuro/microarray.html>

このホームページにある方法が、自分たちの研究に適しているかどうかを十分に検討して、適すると判断された場合に参加申し込みをされるようにお願いします。申し込み

が定員を上回った場合は、応用を想定している実験課題の適切性、同じ研究所からの複数の申し込み、などの点を検討して選考させていただくことになります。

判断するポイントは、

- 1) 遺伝子発現プロファイリングをする細胞が GFP の発現などで確認できるか。
- 2) 蛋白分解して細胞を分散したときに十分量の標識細胞が見つかるかどうか。
- 3) 他の細胞の突起などが混入しないような調整法があるか。
- 4) 着目している細胞を特徴付ける遺伝子発現があるか。

などの点を検討させていただきます。

## 講習会

日時：3月10日（月）—12日（水）の2泊3日

初日は11時に始まり、最終日は16時には終了し、大阪、名古屋、東京からの始発で到着して、大阪、名古屋、東京への最終飛行便に間に合うように計画しております。その間昼夜兼行で実験を進めますので、その点もご了承ください。

場所：熊本大学遺伝子実験施設及び大学院医学薬学研究部脳回路構造学実験室

募集定員：18名（18研究室）

宿泊：近隣のビジネスホテルを各自で確保してください。

費用：講習費は無料ですが、交通費宿泊費は自己負担となります。

講師：江角重行 脳回路構造学助教  
武 勝昔 中国第4軍医大学教授  
渡辺啓介 脳回路構造学助教

文責： 熊本大学大学院医学薬学研究部脳回路構造学・教授  
玉巻伸章

統合脳支援班課題「簡便に使える **Single-cell microarray analysis** 法の開発と普及」による技術講習会の申込書

申込者所属氏名：

e-mail address：

統合脳班員所属氏名：

班員署名：

送り先：（Faxにて同申込書を送付してください）

熊本大学大学院医学薬学研究部脳回路構造学・玉巻伸章

Fax: 096-373-5300

Single-cell microarray analysis を応用する対象の細胞やその細胞のラベル法、集めた際の密度、他の細胞断片の混入の恐れなどの点についてどの様に解決するか等の計画を簡単にお書きください。申請書は機密書類として厳重に扱います。