

明 細 書

発明の名称：相補DNA鎖を増幅する方法

技術分野

[0001] 本発明は、微量mRNAから高感度にcDNAを増幅することを可能にする、相補DNA鎖を増幅する方法に関する。

背景技術

[0002] 昨今、個々の1細胞など、微量サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析が行われるようになってきている。このような技術は数千～数十万の単位の間々の細胞の性質を網羅的に捉えるsingle-cell RNA-seq解析（scRNA-seq解析）を可能とし、細胞集団内の多様性の有無や、新たな細胞亜集団の同定、病態と関連した特殊な細胞集団の同定につながり、ヒトにおける1細胞レベルのアトラスを作ろうとする国際プロジェクトが2016年よりスタートしている（非特許文献1）など、これまでにない解像度での生物学の理解を推し進める原動力となっている。

[0003] scRNA-seq解析は病態における複雑な免疫機構を解明するのに特に有用で、その代表的な微量サンプルとしては、たとえば、がん患者の診断目的で採取される原発巣・転移巣のバイオプシー検体に含まれる腫瘍浸潤T細胞や、ウイルスやそれらに対するワクチンに特異的に反応するB細胞が挙げられる。抗PD-1抗体などの免疫療法の本質である細胞障害性T細胞（Cytotoxic T Lymphocyte; CTL）の実態がCD8⁺ T細胞という観点から、がん抗原特異的な認識能を有するCD8⁺ T細胞がどの程度誘導されているかを測定する方法に注目が集まっている（非特許文献2）。また、2019年からのSARS-CoV2のパンデミック、それらに対する効果的なワクチン開発において、ウイルスに対して強い中和活性を有する抗体産生能の高いB細胞や、抗原特異的に反応するCD4/CD8 T細胞の性質を調べることに注目が集まっている。それらの測定方法の一つとして、T細胞上のT細胞受容体（T Cell Receptor; TCR）や、B細胞上のB細胞受容体（B Cell Receptor; BCR）の配列を解析して、TCR/BCRレパトア（クローンの種類

と各クローンの存在頻度)を決定するとともに、同時にscRNA-seq解析を行うことで、抗原特異的なクローンの応答とその細胞の性質の差異を論じるもの(scTCR/BCR/RNA-seq)があり、実際にTCRレパトア変動と抗CD4抗体のがんに対する治療効果が相関することや、SARS-CoV2に対する複数回のワクチン接種に伴いT細胞の種類が変化することも報告されている(非特許文献3, 4)。しかしながら、こうした免疫応答を司る各細胞種の遺伝子発現が同レベルで議論されるためには、細胞のmRNA量が同等に得られることが理想であるものの、T/B細胞の含有mRNA量は、上皮細胞や腫瘍細胞、マクロファージなどと比べて大きく少ない。それゆえ、それら細胞の高解像度なscTCR/BCR/RNA-seq解析のための、検体由来の個々の1細胞由来mRNAを高感度に増幅する方法の開発の重要性はいや増している。

[0004] 微量サンプルからのcDNA増幅法には種々の技術が知られている。mRNAの捕捉及びcDNA合成が固相上で行われるか否かでcDNA増幅法を分類すると、固相ビーズ上に固定化したmRNA捕捉オリゴにより、微小ウェル又は微小液滴中でmRNAを捕捉しcDNA合成する固相系の例としては、微小ウェルを有するプレートを用いたBeckton Dickinson社のBD Rhapsodyシステム(特許文献3)、Seq-wellシステム(非特許文献12)、及びNx1-seqシステム(特許文献5、非特許文献14)や、微小液滴中でmRNAを捕捉するDrop-seq法(非特許文献13)及びDolomite Bio社のNadiaシステムが挙げられる。固相に結合していない遊離のmRNA捕捉オリゴにより、微小ウェル又は微小液滴中でmRNAを捕捉しcDNA合成する液相系の例としては、mRNA捕捉オリゴが封入されたハイドロゲルビーズと1細胞を微小液滴中に封入し、微小液滴中でハイドロゲルの融解及び細胞溶解を実施し、遊離したmRNA捕捉オリゴでmRNAを捕捉する10X Genomics社の10X Chromiumシステム(特許文献4)や、96 wellプレートに個々の細胞や微量mRNAを分注して増幅を行うSmart-Seq2(非特許文献15)が挙げられる。液相系の解析技術のさらなる例として、固定した細胞を細胞膜透過試薬及びmRNA捕捉オリゴが含まれる溶液中に懸濁し、固定細胞内でmRNAをmRNA捕捉オリゴ上に捕捉するsci-RNA-seq3などのcombinatorial indexingが挙げら

れる。

- [0005] また、第2鎖合成反応などの反応様式に着目して微量サンプルからのcDNA増幅法を分類すると、mRNAからcDNAを合成する際に、テンプレートスイッチングオリゴと呼ばれる、その3'末端に[グアノシン]-[グアノシン]-[グアノシン]等の塩基配列を含む数十塩基対のプライマーを添加することにより、cDNA末端に所望の塩基配列を付加するとともに第2鎖合成を行うテンプレートスイッチング(TS)法や(特許文献1、非特許文献5、非特許文献6)、合成したcDNA末端に同一塩基で構成されるポリヌクレオチド配列をターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)により付加した上で、当該ポリヌクレオチドに対し相補的な配列を3'末端に有し、既知のアダプター配列を5'末端に有するプライマーを用いて第2鎖合成を行うTdT法がある(非特許文献7～9)。
- [0006] TS法は反応ステップ数が少ないため、精製に伴うcDNAのロスが少ないというメリットの他、TS反応が主に5'キャップ構造を有するmRNAで生じるという性質上完全長cDNAが生成されやすいという長所がある。一方で、TS反応の効率がmRNAの末端構造により大きく依存し、末端塩基がG>A>C>Uの順で効率が低下する、5'末端にキャップ構造を有する完全長cDNAでは効率が比較的高い(約20%-60%の範囲)が、キャップ構造を有しない不完全長mRNAやimmature mRNA、部分的に分解したmRNA等は効率が低い(数%-40%の範囲)など、不均一な効率が増幅バイアスをもたらす(非特許文献6)、さらにTdT法におけるポリヌクレオチド付加効率(92-95%, 非特許文献10)よりも効率が低い、という欠点がある。
- [0007] 一方TdT法はTS法とくらべて効率が良いが、TdTの反応制御が困難、ステップ数が多い、また1本鎖DNAを鋳型とした場合、その末端が高次構造を形成し陥没末端となってしまうと効率が大きく低下しうするため(非特許文献10)、高次構造をより形成しやすい長鎖の完全長cDNAがTS反応よりも合成されにくいという欠点がある。
- [0008] TdT法におけるTdTの反応制御の困難さを解決した技術として、本願発明者

らが過去に開発したTAS-Seq法がある（特許文献2、非特許文献11）。TAS-Seq法は、固相上に標的核酸を捕捉してcDNAを合成する固相系のcDNA増幅法であり、TdT反応系に一定量の連鎖停止ヌクレオチド三リン酸を添加し、確率論的にTdT反応を制御することにより、多様な条件下でもTdT反応によるヌクレオチドホモポリマー付加反応が一定範囲内となるよう制御される。結果として、TAS-Seq法は発現遺伝子の検出感度や細胞組成の定量に優れており、従来技術では検出が困難な細胞間コミュニケーションもより確実に検出することができる技術である。

先行技術文献

特許文献

- [0009] 特許文献1：WO 2015/027135 A1
特許文献2：WO 2021/006353 A1
特許文献3：US 2018/0258500 A1
特許文献4：WO 2015/200893 A2
特許文献5：WO 2015/166768 A1

非特許文献

- [0010] 非特許文献1：Regev A., et al. The Human Cell Atlas. eLife 2017;e27041.
非特許文献2：Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. N Engl J Med 2016;375:819-2.
非特許文献3：Aoki H., et al. TCR Repertoire Analysis Reveals Mobilization of Novel CD8+ T Cell Clones Into the Cancer-Immunity Cycle Following Anti-CD4 Antibody Administration. Front Immunol. 2019 Jan; 9(3185).
非特許文献4：Aoki H., et al.. T cell responses induced by SARS-CoV-2 mRNA vaccination are associated with clonal replacement bioRxiv. 2022 Aug.

非特許文献5: Picelli S., et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat Protoc. 2014 Jan;9(1):171-81.

非特許文献6: Wulf MG., et al. Non-templated addition and template switching by Moloney murine leukemia virus (MMLV)-based reverse transcriptases co-occur and compete with each other. J Biol. Chem. 2019 Nov;294(48):18220-18231.

非特許文献7: Matsunaga H, Goto M, Arikawa K, et al. A highly sensitive and accurate gene expression analysis by sequencing ("bead-seq") for a single cell. Anal Biochem 2015;471:9-16.

非特許文献8: Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno, K. D., Imai T., Ueda H. R., Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. Genome Biol 2013 Apr;14(4)

非特許文献9: Tang F, Barbacioru C, Wang Y, et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. Nat Methods 2009, 6(5):377-382

非特許文献10: Deng G, Wu R. An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3' termini of DNA. Nucleic Acid Res 1981, 9(16):4173-4188.

非特許文献11: Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, et al. TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for bead-based scRNA-seq. Commun Biol. 5:602-602, 2022.

非特許文献12: Gierahn TM et al. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. Nat Methods 2017;14(4):395-398.

非特許文献13: Macosko EZ et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. Cell 2015;161(5):1202-1214.

非特許文献14: Hashimoto et al. Scientific Reports 2017 Oct 27;7(1):14

225. doi: 10.1038/s41598-017-14676-3.

非特許文献15: Picelli S., et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat Protoc. 2014 Jan;9(1):171-81.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 様々な検体由来の個々の1細胞由来mRNAを高感度かつバイアス低く増幅する方法は、より高度かつ精度の高い1細胞アトラスの構築や、腫瘍反応性T細胞の捕捉、ワクチン応答性の高いB細胞の捕捉などの観点で重要な課題である。しかしながら、既存のTS法やTdT法は、上述したようにそれぞれ固有の長所・短所を抱えており、すべての長所を網羅することのできる高感度なcDNA増幅法は未だ存在しない。本願発明者らが過去に開発したTAS-Seq法にも、一定量のターミネーターヌクレオチドを添加する性質上、第2鎖合成に用いるプライマーと安定的な相補鎖を形成するのに必要なだけの長さのポリヌクレオチドが付加されないcDNAが一定量出てしまう、という問題点が存在する。TAS-Seq法はTdT法的一种であるから、TS法と比べてステップ数が多い、長鎖の完全長cDNAがTS反応よりも合成されにくいという点は一般的なTS法と同様である。また、公知のTAS-Seq法は固相系のcDNA増幅法であり、液相系への応用は知られていない。

[0012] 本発明は、ごく微量の細胞サンプルからもmRNAを高い効率かつ低いバイアスで網羅的に増幅できるcDNA増幅方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] TS法とTdT法を組み合わせた場合、反応ステップ数が少ないことによるcDNA収量の増加というTS法の長所が打ち消されること、またTS法のテンプレートスイッチング反応中にcDNAの3'端が露出することで、末端構造がTdT反応にとって好ましい突出末端でなくなりうることにより、TdT法の反応効率の良さという長所が打ち消されることが予想される。また、液相系TS法では通常、精製過程における産物の減少を避けるため、cDNAの合成後、未反応の(標的を捕捉していない)標的RNA捕捉オリゴの除去は実施されない(非特許文献15)

。つまり、液相系TS法において、cDNA合成後に未反応の標的RNA捕捉オリゴを除去する精製工程を実施した場合には、cDNA産物が減少して最終的なcDNA増幅効率の低下を招くという技術常識が存在する。一方で、この技術常識に従い、TS法を実施した産物に対し未反応の標的RNA捕捉オリゴを除去するステップを行わずにそのままTdT法を適用した場合には、cDNA産物よりもはるかに多く存在する未反応の標的RNA捕捉オリゴやテンプレートスイッチングオリゴがTdT法により優先的に増幅され、cDNA増幅効率が大きく低下することが予想される。したがって、TS法とTdT法を組み合わせた手法は見当たらず、長所を打ち消す以上の大きな利点が見られることを期待できる根拠も見当たらない。

[0014] しかしながら、本願発明者らがあえて、TS反応を実施した産物に対し、液相系においても未反応の標的RNA捕捉オリゴとともに未反応のテンプレートスイッチングオリゴを除去する工程を実施した上でTdT法をさらに適用して検討したところ、驚くべきことに、それぞれ単体の反応よりもcDNA収量を大幅に増加させられること、TdT反応単体よりも合成される長鎖cDNAの量が増加すること、TS反応単体よりも合成される短鎖cDNAの量が増加することを見出した。

[0015] さらに、本願発明者らは、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を用いて、TS反応を組み合わせずにTAS-Seqのステップ（TdT法）を実施した場合には、cDNA末端へのCCC等の塩基が付加されることでホモポリマー一部分（特にポリC）が短すぎるものの割合を低下させ、固相を用いない液相系でもTAS-Seq法を効率よく実施できることを見出した。

[0016] 以上の鋭意検討により完成した本願発明は、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を用いて液相系又は固相系で標的RNA捕捉及び相補DNA鎖合成を行い、相補DNA鎖末端にCCC等の塩基を付加した後、連鎖停止ヌクレオチド三リン酸共存下でのTdT反応によりホモポリマーテーリングを実施するステップを含む相補DNA鎖増幅方法であり、テンプレートスイッチングオリゴを用いたTS反応をさらに組み合わせることにより高い効率かつ低いバイアスで相補DNA鎖を増幅することができる技術であり、以下の態様を包含する。

[0017] [1] 標的捕捉部を含む標的RNA捕捉オリゴにより、標的RNAを捕捉する、標的RNA捕捉工程；

ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を用いて逆転写反応を行うことにより、捕捉したRNAと相補的な配列の相補DNA鎖を合成し、少なくとも一部の相補DNAの3'末端に任意の数塩基からなる付加配列を付加する、相補鎖合成工程；

標的RNAを捕捉していない標的RNA捕捉オリゴを除去する、未反応オリゴ除去工程；

RNA分解酵素によりRNAを分解する、RNA分解工程；

dATP、dTTP、dCTP又はdGTPと連鎖停止ヌクレオチド三リン酸との存在下でターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによる反応を行い、前記相補DNA鎖の3'末端にヌクレオチドホモポリマーを付加する、ホモポリマー付加工程；

前記ヌクレオチドホモポリマーに対し相補的な配列の相補的ホモポリマー部分を含むプライマーを含む第2鎖合成用プライマーを用いて、前記相補DNA鎖に対し第2鎖合成を行い、相補DNA鎖及び第2鎖で構成されるDNA二本鎖を生成する、第2鎖合成工程；及び

前記DNA二本鎖を鋳型として核酸増幅反応を行う、核酸増幅工程を含む、相補DNA鎖を増幅する方法。

[2] 標的RNA捕捉オリゴが、標的捕捉部の5'側に第1のアダプター部分を含み、第2鎖合成用プライマーが、相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むロングプライマーを含み、核酸増幅工程において、第1のアダプターを標的とするプライマーと、第2のアダプターを標的とするプライマーとを用いて核酸増幅反応を行う、[1]記載の方法。

[3] 第2鎖合成用プライマーが、相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むロングプライマーを含み、核酸増幅工程において、第2のアダプターを標的とするプライマーと、相補DNA鎖中の所望の領域を標的とするプライマーとを用いて核酸増幅反応を行う、[1]記載の方法。

[4] ロングプライマーが、第2のアダプター部分と相補的ホモポリマー部分の間にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含む、[2]又は[3]記載の方法。

[5] ロングプライマーの相補的ホモポリマー部分の鎖長が6～15塩基である、[2]～[4]のいずれか1項に記載の方法。

[6] 標的RNA捕捉オリゴが、固相担体に結合していない遊離のオリゴであり、未反応オリゴ除去工程が核酸サイズ分画により行われる、[1]～[5]のいずれか1項に記載の方法。

[7] 標的RNA捕捉オリゴが、5'側から3'側に向かって、第1のアダプター部分、細胞識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含む、[6]記載の方法。

[8] 標的RNA捕捉オリゴが、固相担体に結合した固相化オリゴであり、未反応オリゴ除去工程がエキソヌクレアーゼ処理により行われる、[1]～[5]のいずれか1項に記載の方法。

[9] 前記固相担体がビーズであり、標的RNA捕捉オリゴが、5'側から3'側に向かって、第1のアダプター部分、ビーズ識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含む、[8]記載の方法。

[10] 前記固相担体がプレートであり、標的RNA捕捉オリゴが、プレートの複数箇所の区画に固定化され、5'側から3'側に向かって第1のアダプター部分、区画識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含む、[8]記載の方法。

[11] 標的RNA捕捉オリゴが、標的捕捉部としてポリT部分を含む標的ポリA RNA捕捉オリゴを含み、標的RNAがポリA RNAを含む、[1]～[10]のいずれか1項に記載の方法。

[12] 相補鎖合成工程において、前記付加配列とハイブリダイズ可能な配列を3'末端に含み、かつ、該配列の5'側にスイッチング配列を含むテンプレートスイッチングオリゴの共存下で逆転写反応が行われ、前記付加配列が付加された相補DNA鎖にテンプレートスイッチングオリゴをハイブリダイズさせ、該相補DNA鎖の3'末端にスイッチング配列と相補的な配列をさらに付加する、[11]記載の方法。

[13] テンプレートスイッチングオリゴが、前記付加配列とハイブリダイズ可能な配列としてGGG、GUG又はNGG（G及びUはリボヌクレオチドの塩基、NはA、U、G及びCから選択されるいずれかのリボヌクレオチドの塩基であり、1個以上のヌクレオチドアナログを含んでいてもよい）を3'末端に含むオリゴヌクレオチドを含み、スイッチング配列が第2のアダプター部分を含む、[12]記載の方法。

[14] スwitchング配列が、第2のアダプター部分の3'側にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含む、[13]記載の方法。

[15] 標的RNA捕捉オリゴが、固相担体に結合していない遊離のオリゴであり、未反応オリゴ除去工程が、標的RNAを捕捉していない標的RNA捕捉オリゴ及び相補DNA鎖にハイブリダイズしていないテンプレートスイッチングオリゴの核酸サイズ分画による除去を含む、[12]～[14]のいずれか1項に記載の方法。

[16] 第2鎖合成用プライマーが、相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むロングプライマーと、相補的ホモポリマー部分を含まず、第2のアダプター部分をその3'側に含むショートプライマーとを含む、[11]～[15]のいずれか1項に記載の方法。

[17] ロングプライマーが、第2のアダプター部分と相補的ホモポリマー部分の間にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含む、[16]記載の方法。

[18] 相補鎖合成工程において、前記テンプレートスイッチングオリゴの共存下で、鎖置換活性をさらに有する逆転写酵素を用いて逆転写反応が行われ、テンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズした相補DNA鎖に対する第2鎖合成が行われる、[12]～[17]のいずれか1項に記載の方法。

[19] 連鎖停止ヌクレオチド三リン酸が、ddNTP、ddNTPの誘導体、3'-dNTP、又は3'-デオキシ-5-メチルウリジン-5'-三リン酸である、[1]～[18]のいずれか1項に記載の方法。

[20] ddNTPの誘導体が、OH基を有しない原子団で3'位が修飾されたddNTPで

ある、[19]記載の方法。

[21] 連鎖停止ヌクレオチド三リン酸がddNTPである、[19]記載の方法。

[22] ホモポリマー付加工程において、dCTP及び連鎖停止CTPを添加してポリC付加を行う、[1]～[21]のいずれか1項に記載の方法。

[23] RNA分解工程とホモポリマー付加工程が同時に実施される、[1]～[22]のいずれか1項に記載の方法。

発明の効果

[0018] 本発明によれば、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を用いることにより、従来のTAS-Seq法（特許文献2、非特許文献11）よりもさらに高い効率かつ低いバイアスで、ごく微量のサンプルからもmRNAを網羅的に増幅でき、固相を用いない液相系でもTAS-Seq法を効率よく実施することができる。TS反応を組み合わせた場合には、長鎖cDNA及び短鎖cDNAのどちらも収量を大幅に増加できる。とりわけ液相系のTS法においては、従来の技術常識より、cDNA合成後に未反応オリゴを除去する精製工程を実施する場合、実施しない場合のどちらにもcDNA増幅効率が低下するという問題が予想されるところであるが、この予想に反し、高い効率と低いバイアスを達成でき、長鎖cDNA及び短鎖cDNAのどちらも収量を大幅に増加できる。本発明の方法によれば、例えば、発現解析やTCR解析を利用した治療効果判定の精度や、scRNA-seq解析による希少細胞（例えばがん細胞）の分離同定を従来法よりもさらに大幅に向上できるので、医療資源の浪費の抑制などにより一層貢献できる。

図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の1態様である、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を用いた液相系nonTS/TAS-Seq法のステップの概略である。

[図2]本発明の1態様である、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有するが鎖置換活性を持たない逆転写酵素を用いた固相系のTS/TAS-Seq法のステップの概略である。

[図3]本発明の1態様である、ターミナルトランスフェラーゼ活性および鎖置

換活性を有する逆転写酵素を用いた固相系のTS/TAS-Seq法のステップの概略である。

[図4]本発明の1態様である、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有するが鎖置換活性を持たない逆転写酵素を用いた液相系のTS/TAS-Seq法のステップの概略である。

[図5]本発明の1態様である、ターミナルトランスフェラーゼ活性および鎖置換活性を有する逆転写酵素を用いた液相系のTS/TAS-Seq法のステップの概略である。

[図6]固相系 (BD Rhapsodyシングルセル解析システム) における、TdT法及びtemplate-switch + TdT法による全cDNA増幅産物の収量の比較。template-switch + TdT法のほうが有意に全cDNA収量が多い。

[図7]固相系 (BD Rhapsodyシングルセル解析システム) における、TdT法及びtemplate-switch + TdT法による全cDNA増幅産物のサイズ分布の比較。template-switch + TdT法のほうが、長鎖cDNAの収量が多い。

[図8]液相系 (10X Chromiumシングルセル解析システム) における、TdT法及びtemplate-switch + TdT法による全cDNA増幅産物の収量及びサイズ分布の比較。template-switch + TdT法のほうが、cDNA収量が多く、また長鎖cDNAの収量が多い。

[図9]液相系 (Smart-seq2法) における、template-switch法及びtemplate-switch + TdT法による全cDNA増幅産物の収量の比較。template-switch + TdT法のほうが、cDNA収量が有意に多い。

[図10]液相系 (Smart-seq2法) における、template-switch法及びtemplate-switch + TdT法による全cDNA増幅産物のサイズ分布の比較。template-switch + TdT法のほうが、鎖長の短いcDNAのcDNA全体に占める割合が大きい。

[図11]固相系 (BD Rhapsodyシングルセル解析システム) における、TdT法、random priming法及びtemplate-switch + TdT法による1細胞RNAシーケンス解析データの、各細胞における検出遺伝子数およびリード数の比較。細胞あたりのリード数分布が同様の条件にて、template-switch + TdT法が最も多くの

遺伝子を検出できている。

[図12]液相系（10X Chromiumシングルセル解析システム）における、template-switch法及びtemplate-switch + TdT法による1細胞RNAシーケンス解析データの、各細胞における検出遺伝子数およびリード数の比較。細胞あたりのリード数分布が同様の条件にて、template-switch + TdT法の方がより多くの遺伝子を検出できている。

[図13]液相系（10X Chromiumシングルセル解析システム）における、template-switch法及びtemplate-switch + TdT法による1細胞RNAシーケンス解析データの、1細胞クラスタリング解析の結果。template-switch + TdT法のほうが細胞集団の分離能が向上している。

[図14]液相系（10X Chromiumシングルセル解析システム）における、template-switch法及びtemplate-switch + TdT法による1細胞RNAシーケンス解析データの、各細胞サブセットにおける、リード数を変化させた際の検出遺伝子数の比較。全ての細胞集団で、template-switch + TdT法の方がより多くの遺伝子を検出できている。

発明を実施するための形態

[0020] 本発明において、標的RNA捕捉オリゴ、テンプレートスイッチングオリゴ、プライマー、アダプター、ヌクレオチドホモポリマー等の塩基配列を構成するA、T、G、Cには、DNAを構成するデオキシリボヌクレオチド（DNAのA、T、G、C）のみならず、RNAを構成するリボヌクレオチド（RNAのA、T、G、C）も含まれ、さらには、対応するヌクレオチドアナログ（例えば、LNA, ENA, PNAなどの架橋化核酸（bridged nucleic acid）や、Super T（5-hydroxybutynl-2'-deoxyuridine）、Super G（8-aza-7-deazaguanosine）、deoxyinosine、5-methyl dC、deoxyuridine、2,6-diaminopurine、2-aminopurine、2-Amino-dATPなどの修飾塩基など）も包含される。すなわち、標的RNA捕捉オリゴ（例えば、標的捕捉部、第1のアダプター部分、バーコード部分、及びこれら以外の部分のうちのいずれかの部分）、テンプレートスイッチングオリゴ（付加配列とハイブリダイズ可能な3'末端部分、第2のアダプター部分、バーコー

ド部分、及びこれら以外の部分のうちのいずれかの部分)、ヌクレオチドホモポリマー、第2鎖合成用プライマー(例えば、相補的ホモポリマー部分、第2のアダプター部分、バーコード部分、及びこれら以外のうちのいずれかの部分)、並びに、核酸増幅工程において使用する各プライマーには、リボヌクレオチド及びヌクレオチドアナログから選択される1個以上(例えば1～15個程度、1～12個程度、又は1～数個程度)のモノマーが含まれていてもよい。

- [0021] 本発明において、数個とは2～9個の複数を意味する。1～数個は、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個、又は1～2個であり得る。
- [0022] 本発明において、ある領域Xを標的とするプライマーといった場合、この領域X又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズするプライマーを意味する。領域Xを標的とするプライマーには、領域Xと同一の配列又はこれと相補的な配列を含むプライマーが包含される。領域Xに設定したプライマーという語も同様であり、領域X又はその相補鎖に特異的にハイブリダイズするプライマーを意味し、領域Xと同一の配列又はこれと相補的な配列を含むプライマーが包含される。
- [0023] 本発明において、相補DNA鎖、及びcDNAという語は、標的RNAと相補的な塩基配列からなるDNA鎖を意味し、mRNAと相補的な配列からなるDNA鎖には限定されない。
- [0024] 本発明において、オリゴヌクレオチド又はオリゴという語は、比較的鎖長の短い一本鎖のポリヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドの鎖長は、典型的には数十塩基～200塩基程度、例えば50塩基～150塩基程度であるが、これに限定されない。
- [0025] 本発明において、ターミナルトランスフェラーゼ活性という語は、terminal deoxynucleotidyl transferaseが有する、ヌクレオチド鎖の3'末端に鋳型非依存的にヌクレオチドを付加する活性を意味する。1本鎖ヌクレオチドの3'末端、2本鎖ヌクレオチドの3'突出末端、及び2本鎖ヌクレオチドの平滑末

端のうちの3'末端が、ターミナルトランスフェラーゼ活性によるヌクレオチド付加のターゲットとなる。

[0026] 本発明において、標的RNAには、ポリA RNAをはじめとする様々なRNAが包含される。ポリA RNAは、3'末にポリAテールを有するRNAであり、最も典型的な例がmRNAである。標的RNAが由来する細胞は特に限定されず、例えば、マウス個体由来の細胞、各種培養細胞、健常人由来の細胞、がん患者由来の細胞、各種疾患患者由来の細胞など、種々の細胞が対象となる。がん患者由来の細胞は、がん免疫療法を受けているがん患者に由来する細胞であってもよい。健常人や患者に由来する細胞は、末梢血や病変部（例えば腫瘍）から採取された細胞であってもよい。本発明の増幅法をトランスクリプトーム解析等の解析法に利用する場合には、細胞をサンプルとして用いてもよいし、種々の細胞より単離した細胞核をサンプルとして用いてもよい。

[0027] 本発明の相補DNA鎖増幅法は、標的RNA捕捉工程、相補鎖合成工程、未反応オリゴ除去工程、RNA分解工程、ホモポリマー付加工程、第2鎖合成工程、及び核酸増幅工程を含む。本発明の増幅法には、相補鎖合成工程において、テンプレートスイッチングオリゴの共存下で逆転写反応が実施され、テンプレートスイッチング（TS）反応が行われる態様と、テンプレートスイッチングオリゴの非存在下で逆転写反応を行う態様とが包含される。以下、便宜的に前者の態様をTS/TAS-Seq法、後者の態様をnonTS/TAS-Seq法と呼ぶ。本発明の増幅法の態様としては、TS/TAS-Seq法がより好ましい。nonTS/TAS-Seq法は、TS反応により著しく望ましくない産物（たとえばテンプレートスイッチングオリゴによるstrand invasion産物、合成されたcDNAへのミスプライミングに由来するcDNA逆相補鎖産物等）が生成される場合に好ましい。TS/TAS-Seq法、nonTS/TAS-Seq法いずれも、標的RNA捕捉工程において、ビーズ等の固相に結合した標的RNA捕捉オリゴにより標的RNAを捕捉する固相系、及び、固相に結合していない遊離の標的RNA捕捉オリゴにより標的RNAを捕捉する液相系が包含される。図1は、液相系のnonTS/TAS-Seq法の概略である。図2～5がTS/TAS-Seq法の概略であり、図2及び図3が固相系、図4及び図5が液相系である。

。

[0028] 以下、適宜図面を参照しながら、固相系TS/TAS-Seq法、液相系TS/TAS-Seq法、及びnonTS/TAS-Seq法の順に各工程を説明する。

[0029] A. 固相系TS/TAS-Seq法

A-1. 標的RNA捕捉工程（図2、図3のStep 1）

固相系TS/TAS-Seq法の標的RNA捕捉工程では、固相担体上に結合した標的RNA捕捉オリゴにより標的RNAを捕捉する。標的RNAは、標的RNA捕捉オリゴを介して固相担体上に捕捉される。後述するとおり、標的RNA捕捉工程は、微小ウェル若しくは微小液滴中で、又はこれらに該当しない溶液中で実施される。

[0030] 固相担体は、ビーズでもよいし、スライドガラス等のプレートでもよい。ビーズ固相担体を用いた単一細胞解析システムとしては、例えば、微小ウェルを有するプレートを用いたBeckton Dickinson社のBD Rhapsodyシステム（特許文献3）、Seq-wellシステム（非特許文献12）、及びNx1-seqシステム（特許文献5、非特許文献14）や、微小液滴中でmRNAを捕捉するDrop-seq法（非特許文献13）及びDolomite Bio社のNadiaシステムが知られている。また、固相担体としてプレートを用いたシステムとして、標的捕捉オリゴを整列固定化したプレート上で組織サンプルを透過処理し、組織サンプルの各細胞より出てきたmRNAをプレート上の捕捉オリゴにて捕捉する、空間トランスクリプトーム法のプラットフォームも知られており、例えば、Stereo-seqシステム(Chen et al, Cell 2022 185, 1777-1792, doi: 10.1016/j.cell.2022.04.003.)がある。固相系TS/TAS-Seq法は、このような公知技術のいずれにも適用可能である。

[0031] ビーズの材質は特に限定されず、核酸解析キットの核酸捕捉担体やイムノアッセイキットの固相粒子担体に用いられる種々の材質を採用できる。ビーズの材質の例として、ポリスチレン、ポリプロピレン等の樹脂製のビーズ等の有機ポリマー製ビーズ、セレン化カドミウム（CdSe）、硫化亜鉛（ZnS）、硫化カドミウム（CdS）、セレン化亜鉛（ZnSe）、酸化亜鉛（ZnO）等の半導体材料でできた量子ドット（半導体ナノ粒子）等の半導体製ビーズ、金等の

金属製ビーズ、シリカ製ビーズなどの重合体ビーズ等を挙げることができる。具体例として、セルロース、セルロース誘導体、アクリル樹脂、ガラス、シリカゲル、ポリスチレン、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、ビニルおよびアクリルアミドの共重合体、ジビニルベンゼン架橋ポリスチレン等（*Merri field Biochemistry* 1964, 3, 1385-1390参照）、ポリアクリルアミド、ラテックスゲル、ポリスチレン、デキストラン、ゴム、シリコン、プラスチック、ニトロセルロース、セルロース、天然海綿、シリカゲル、ガラス、金属プラスチック、セルロース、架橋デキストラン（例えばSephadex(商品名)）およびアガロースゲル（Sephrose(商品名)）等の材質のビーズを挙げることができる。非磁性体、磁性体のいずれでも良いが、取扱いがより容易な磁性ビーズを好ましく用いることができる。

[0032] プレーートの材質も特に限定されず、例えば、マイクロアレイの基板に用いられる種々の材質を採用できる。使用可能な材質の代表的な例としてガラスが挙げられるが、その他、シリコン、プラスチック等も使用できる。プレートである固相担体には、微小ウェルが整列配置されたマイクロウェルプレート、マイクロアレイ等の基板として用いられるプレート、シーケンサーのフローセルなど、表面が平坦な又は凹凸のあるプレート状の様々な固相担体が包含される。固相担体がプレートの場合、標的RNA捕捉オリゴは、通常、プレート上の複数箇所の区画に固定化（典型的には、スポット状に整列固定化）される。

[0033] 固相系における標的RNA捕捉工程の実施態様の1つとして、固相ビーズを用いたscRNA-seq解析プラットフォームを用いて、微小ウェルや微小液滴中で個々の1細胞からRNAを抽出し、標的RNA捕捉オリゴが結合したビーズ担体と接触させることにより、微小ウェル又は微小液滴中でビーズ上に標的RNAとしてのポリA RNAないしmRNAを捕捉する態様を挙げることができる。微小ウェル、微小液滴という用語における「微小」という語は、典型的にはボリュームが5〜100pL程度であることを意味する。固相ビーズを用いたscRNA-seq解析プラットフォームの一般的な手法の一例は上述の通りであり、微小ウェルを有す

るプレートを用いたBeckton Dickinson社のBD Rhapsodyシステム（特許文献3）、Seq-wellシステム（非特許文献12）、及びNx1-seqシステム（特許文献5、非特許文献14）や、微小液滴中でmRNAを捕捉するDrop-seq法（非特許文献13）及びDolomite Bio社のNadiaシステムを挙げることができ、本発明においてはこれらの一般的手法を好ましく用いることができる。

[0034] 固相系における標的RNA捕捉工程の別の実施態様として、空間トランスクリプトーム法のプラットフォームを用いて、標的RNA捕捉オリゴを整列固定化したプレート上で組織サンプルを透過処理し、組織サンプルの各細胞より溶出したポリA RNAないしmRNAをプレート上の捕捉オリゴにて捕捉する態様を挙げることができる。例えば、Stereo-seqシステム(Chen et al. Cell 2022 185, 1777-1792, doi: 10.1016/j.cell.2022.04.003.)がある。ボリウムが上記した微小の定義に当てはまらない溶液中にて、標的RNAの捕捉が行われる態様である。

[0035] 固相系における標的RNA捕捉工程の実施態様のさらに別の態様として、病変部組織検体や細胞懸濁液等の細胞試料よりポリA RNA試料ないしmRNA試料を調製し、ポリA RNA捕捉オリゴが結合した固相担体とポリA RNA試料ないしmRNA試料とを接触させることにより、固相担体上にポリA RNAを捕捉する態様を挙げることができる。ボリウムが上記した微小の定義に当てはまらない溶液中にて、標的RNAの捕捉が行われる態様である。この態様において、ポリA RNA試料ないしmRNA試料の調製は、まず細胞試料よりtotal RNAを抽出してからポリA RNAないしmRNAの抽出を行ってもよいし、細胞試料からtotal RNAの抽出を経ず直接的にポリA RNAないしmRNAを抽出してもよい。

[0036] TS/TAS-Seq法における標的RNAには、ポリA RNAが含まれる。ポリA RNAのみを標的としてもよいし、ポリA RNA以外のRNAも併せて標的としてもよい。すなわち、TS/TAS-Seq法では、標的RNA捕捉オリゴは、標的ポリA RNA捕捉オリゴを含み、ポリA RNA以外のRNAを捕捉する標的RNA捕捉オリゴも含んでいてよい。また、標的RNA捕捉オリゴに加えて、RNA以外の核酸分子を標的として捕捉する標的捕捉オリゴをさらに含んでいてもよい。固相上には、1種類又は

2種類以上の標的RNA捕捉オリゴが固定化されていてよいし、RNA以外の核酸分子を捕捉する標的捕捉オリゴがさらに固定化されていてもよい。RNA以外の核酸分子を捕捉する標的捕捉オリゴの例としては、BioLegend社のTotalSeqのような、オリゴDNA標識抗体を併用したscRNA-seq解析技術における、標識オリゴDNAを捕捉するオリゴヌクレオチドを挙げることができる。このようなオリゴDNA標識抗体とTdT法を組み合わせた技術も公知である（特許文献2）。また、RNA以外の核酸分子を捕捉する標的捕捉オリゴの別の例として、Tn5 transposaseを併用した1細胞クロマチン構造解析技術における、Tn5 transposaseにより組み替えられたDNA断片を捕捉するオリゴヌクレオチドを挙げることができる。複数種類の捕捉オリゴを組み合わせる態様では、固相がビーズである場合、1個のビーズ上に複数種類の捕捉オリゴが固定化されていてもよいし、複数種類の捕捉オリゴがそれぞれ異なるビーズ上に固定化されていてもよい。固相がプレートの場合には、1つの区画に複数種類の捕捉オリゴが固定化されていてもよいし、複数種類の捕捉オリゴがそれぞれ異なる区画に固定化されていてもよい。

[0037] 標的ポリA RNA捕捉オリゴの典型例は、標的捕捉部としてポリT部分を含むオリゴヌクレオチドであり、標的RNAのポリA部分を捕捉する。ポリA以外の部位を捕捉する標的RNA捕捉オリゴの例としては、6～15塩基のランダムな配列を標的捕捉部として含むオリゴヌクレオチドや、特定のRNA配列中の所望の領域（例えば、T細胞受容体定常領域、B細胞受容体定常領域、RNAの5'末端近傍領域など）に対して相補的な配列を標的捕捉部として含むオリゴヌクレオチドが挙げられる。

[0038] 標的RNA捕捉オリゴは、5'末端が固相担体に直接又は間接的に結合しており、3'末端に標的捕捉部を有する。該オリゴは、標的捕捉部の5'側、すなわち固相担体側に第1のアダプター部分を含んでいてよい。図2、図3中でUniversalとして示されている部分が第1のアダプター部分である。第1のアダプター部分は、核酸増幅工程においてプライマーの一方を設定する領域となる。

[0039] また、標的RNA捕捉オリゴは、第1のアダプター部分と標的捕捉部の間に、個々の固相担体ないしは固相担体上の位置を識別するためのバーコード部分を含んでいてよい。このバーコード部分とは、固相担体がビーズである場合にはビーズ識別バーコードであり、固相担体がプレートである場合には、プレート上のどの区画に固定化されているかを識別するための区画識別バーコードである。すなわち、標的RNA捕捉オリゴは、5'側から3'側に向かって、第1のアダプター部分、ビーズ又は区画識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含んでいてよい。そのようなバーコード部分を含む態様においては、核酸増幅工程で増幅される相補DNA鎖には、識別バーコード部分に由来するバーコード配列が含まれることになる。ビーズ識別バーコード部分は、同一のビーズ上では同一の配列であり、ビーズごとに異なる配列を有する。これにより、同じビーズ上に捕捉されたmRNAに由来するcDNAを、他のビーズ上に捕捉されたmRNAに由来するcDNAと区別することができる。scRNA-seq解析においては、同じ細胞に由来するcDNAを、他の細胞に由来するcDNAと区別することができる。そのようなビーズ識別バーコード部分を含む、固相化されたポリA RNA捕捉オリゴは、公知の方法で調製することができる（例えば、WO 2015/166768 A1など参照）。また、区画識別バーコード部分は、プレート上の同一の区画（スポット）内では同一の配列であり、区画（スポット）ごとに異なる配列を有する。これにより、例えばサンプルが組織標本である場合に、組織のどの部位でどのようなmRNAが発現しているかを把握することができる。

[0040] 1つのビーズ上、ないし1つの区画内には、通常、多数の標的RNA捕捉オリゴ分子が固定化される。図2、図3には、固相がビーズであり、標的RNA捕捉オリゴが標的捕捉部としてポリT部分を含む標的ポリA RNA捕捉オリゴであり、標的ポリA RNAとしてmRNAを捕捉する態様を示している（図中、捕捉オリゴのポリT部分は一部省略）。便宜的に、1個のビーズ担体上に1分子のmRNAを捕捉した様子が示されているが、実際には1個のビーズ担体上に多数のmRNA分子が捕捉される。5'キャップ構造を有する完全長mRNAだけではなく、キャップ構造を有しない不完全長mRNAやimmature mRNA、部分的に分解したmRNA等

の「完全長ではないmRNA」も、ポリAを有していれば、標的ポリA RNA捕捉オリゴにより固相上に捕捉される。

[0041] A-2. 相補鎖合成工程（図2、図3のStep 2）

標的RNA捕捉工程の後、固相担体を洗浄し、固相担体上に標的RNAが捕捉された状態で相補鎖合成工程を実施する。TS/TAS-Seqにおける相補鎖合成工程では、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を使用し、テンプレートスイッチングオリゴの共存下で逆転写反応を行うことにより、逆転写反応とテンプレートスイッチング反応を同時に（ワンステップで）実施する。反応系内にテンプレートスイッチングオリゴを添加するタイミングは特に限定されず、逆転写反応の開始前、開始と同時、又は開始後であってよく、逆転写反応中一定時間が経過したあと添加してもよい。逆転写反応及びテンプレートスイッチング反応自体は常法通りに行うことができる。

[0042] ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素は広く知られており、種々のものが市販されている。代表的な例として、野生型MMLV RTのほか、Thermo Fisher Scientific社SuperScript II, SuperScript IV, Maxima H minus reverse transcriptase, Takara Bio社 SmartScribe reverse transcriptase, New England Biolabs社template switching RT等を挙げることができる。

[0043] 逆転写反応により、固相担体上に捕捉された標的RNAから、これと相補的な配列のDNA鎖（相補DNA鎖、第1鎖）が合成される。次いで、逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性により、合成された相補DNAのうちの少なくとも一部の3'末端に、任意の数塩基からなる付加配列が付加される。ターミナルトランスフェラーゼ活性による3'末端への鋳型非依存の塩基付加反応では、付加される塩基数は一般に1～5塩基の範囲内であり、3塩基付加されることが多いこと、鋳型となるRNAが5'末端にキャップ構造を有する完全長mRNAの場合には、cDNAの3'末端にCCCが付加されやすいことが知られている。テンプレートスイッチングオリゴは、この付加配列とハイブリダイズ可能な配列をその3'末端に含んでおり、かつ、該配列の5'側にスイッチング配列を含

むオリゴヌクレオチドである。そのため、この工程では、付加配列が追加された相補DNA鎖にテンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズし、テンプレートスイッチングオリゴの5'末端まで相補DNA鎖が伸長することにより、相補DNAの3'末端にさらにスイッチング配列の相補鎖が付加される。

- [0044] テンプレートスイッチングオリゴは、付加配列とハイブリダイズ可能な配列としてGGG、GUG又はNGG（G及びUはリボヌクレオチドの塩基、NはA、U、G及びCから選択されるいずれかのリボヌクレオチドの塩基であり、1個以上のヌクレオチドアナログを含んでもよい）を3'末端に含むオリゴヌクレオチドを含んでいることが好ましい。図2、図3では、当該ハイブリダイズ可能な3'末端配列がリボヌクレオチド塩基のGGGである例を示している。当該3'末端配列が異なる2種以上のテンプレートスイッチングオリゴを混合して使用してもよい。
- [0045] スwitchング配列は、第2のアダプター部分を含んでいてよい。図中にUniversal 2として示した部分が第2のアダプター部分である。第2のアダプター部分は、後の核酸増幅工程においてプライマーの一方を設定する領域となる。
- [0046] スwitchング配列は、第2のアダプター部分の3'側（テンプレートスイッチングオリゴにおいて、第2のアダプター部分と上記3'末端配列との間）にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含んでいてよい。後の核酸増幅工程で増幅されたDNA分子は、同一の2本鎖cDNAに由来するDNAであれば同一の分子バーコードを有し、別の2本鎖cDNAに由来するDNAであれば互いに異なる分子バーコードを有することになる。異なる分子バーコードを有するDNAのみを数えることで、出発時のcDNA分子数の推定や、異なるcDNA間のPCR増幅効率の差の補正が可能となる。分子バーコードの鎖長は特に限定されないが、典型的には12塩基～30塩基程度である。分子バーコードは、シーケンスエラーに耐性を持たせるため、ランダム塩基配列中に特定の固定配列が挿入された構成にしてもよい。後述するとおり、第2鎖合成工程で第2鎖合成用プライマーとして用いるロングプライマーも、同様の分子バーコード部分を含

み得る。

- [0047] スイッチング配列の5'末端や3'末端（いずれか一方、又は両方）には、テンプレートスイッチングオリゴの重合を防止するための化学修飾や塩基、例えばアミノ修飾、ビオチン修飾、C3スペーサー修飾などを含んでいてもよい。
- [0048] 図2、図3のStep 2の1段目に示すように、完全長mRNAを捕捉した標的RNA捕捉オリゴ上で、mRNAの全長に対してcDNAが合成されると、cDNAの3'末端には、逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性により高い確率でCCCが付加される。このCCC部分に、3'末端配列がGGGであるテンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズした場合には、逆転写酵素が有するDNA依存的DNAポリメラーゼ活性により、cDNAの3'末端のCCCに連続してスイッチング配列の相補鎖が合成される（テンプレートスイッチされたcDNA）。図示した例では、第2のアダプターであるUniversal 2の相補鎖が合成されているが、テンプレートスイッチングオリゴのUniversal 2とrGrGrGの間に分子バーコードが含まれている場合には、cDNAの3'末端のCCCに続けて分子バーコード相補鎖+ Universal 2相補鎖が合成される。スイッチング配列の相補鎖が合成される結果、mRNA-cDNAハイブリッドの末端が平滑になるので、cDNA鎖の3'末端には、逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性によりさらに任意の数塩基（図中ではNNNで示す）が付加され得る（付加しない場合もある）。
- [0049] 完全長mRNAの全長に対してcDNAが合成され、3'末端にCCCが付加された後に、テンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズしなかったもの、あるいは3'末端にテンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズしない他の塩基が付加されたものは、テンプレートスイッチング反応を受けなかったcDNAとして固相上に残る（Step 2の2段目、non-switched cDNA）。
- [0050] 完全長ではないmRNAを捕捉した標的RNA捕捉オリゴ上では、合成されたcDNA末端にCCC以外の任意の数塩基（NNN）が付加されやすい（付加しない場合もある）ので、このようなcDNAもテンプレートスイッチング反応を受けなかったcDNAとして固相上に残る（Step 2の3段目、non-switched cDNA）。

[0051] 完全長mRNAを捕捉しても、cDNA合成が途中でとまった場合には、mRNA-cDNAハイブリッドのcDNA末端が陥没末端となる。この場合、cDNA末端への塩基付加は起こらないため、テンプレートスイッチング反応を受けずに固相上に残る（Step 2の4段目、non-switched cDNA）。

[0052] 相補鎖合成工程において、ターミナルトランスフェラーゼ活性に加え、鎖置換活性をさらに有する逆転写酵素を用いることも可能である。この場合、図3のStep 2に示すように、テンプレートスイッチされたcDNAとmRNAのハイブリッド二本鎖では、逆転写酵素の鎖置換活性により、mRNAをcDNAから剥がしながら第2鎖合成が進む。

[0053] ターミナルトランスフェラーゼ活性及び鎖置換活性を有する逆転写酵素も公知であり、種々のものが市販されている。代表的な例として、野生型MLLV RTのほか、Thermo Fisher Scientific社SuperScript II, SuperScript IV, Maxima H minus reverse transcriptase, Takara Bio社 SmartScribe reverse transcriptase, New England Biolabs社template switching RTを挙げることができる。

[0054] A-3. 未反応オリゴ除去工程（図2、図3のStep 3）

相補鎖合成工程の後、固相担体を洗浄して未反応オリゴ除去工程に進む。本工程では、固相上に残存する、標的RNAを捕捉していない標的RNA捕捉オリゴ（未反応の捕捉オリゴ）を除去する。固相系では、反応液中に残存する、相補DNA鎖にハイブリダイズしていないテンプレートスイッチングオリゴ（未反応のテンプレートスイッチングオリゴ）は固相の洗浄により除去されるので、固相上の未反応の捕捉オリゴをエキソヌクレアーゼ処理により分解除去する。一本鎖DNAを特異的に分解する一般的なエキソヌクレアーゼの例として、Exonuclease IやExonuclease Tを挙げることができる。本発明ではそのような一般的なエキソヌクレアーゼの少なくとも1種を用いることができる。エキソヌクレアーゼ処理後、固相担体を洗浄して次の工程に進む。

[0055] A-4. RNA分解工程（図2、図3のStep 4）

RNA分解工程では、固相担体上に結合しているmRNA-cDNAハイブリッドのmRN

AをRNA分解酵素で分解する。テンプレートスイッチングオリゴの3'末端配列がリボヌクレオチド塩基の場合、当該3'末端部分も分解される。本工程では、RNase Hなどの一般的なRNA分解酵素を利用できるし、NaOH溶液、KOH溶液などによるアルカリ処理も利用できる。RNAの分解後は、固相担体を洗浄、回収してからホモポリマー付加工程に進んでもよいし、洗浄せずにそのままホモポリマー付加工程に進んでもよい。後述するように、RNA分解工程とホモポリマー付加工程を同時に行なうこともできる。

[0056] A-5. ホモポリマー付加工程（図2、図3のStep 4）

ホモポリマー付加工程では、dATP、dTTP、dCTP、又はdGTPと連鎖停止ヌクレオチド三リン酸（連鎖停止NTP）との存在下でターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ（TdT）による反応を行ない、固相上に合成された相補DNA鎖の3'末端にヌクレオチドホモポリマーを付加する（図2、図3のStep 4; 図にはポリCの例を示す）。テンプレートスイッチされたcDNA、及びスイッチされなかったcDNAの両者に対し、ヌクレオチドホモポリマーが付加される。連鎖停止NTP（連鎖停止ATP、連鎖停止TTP、連鎖停止CTP、又は連鎖停止GTP）とは、この分野で周知の通り、ヌクレオチドの3'位のOH基が、他のヌクレオチド分子の5'-リン酸部分との間でリン酸エステル結合を形成できないように修飾ないし改変されたヌクレオチドであり、3'位のOH基を有しない（3'位に結合する原子団にOH基を含まない）ヌクレオチド三リン酸ともいうことができる。本発明においても使用可能な一般的な連鎖停止NTPの具体例として、ジデオキシヌクレオチド三リン酸（ddNTP）（ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, ddUTP）、ddNTPの誘導体（典型的には、OH基を有しない原子団で3'位が修飾されたddNTPであり、例えば、3'-Azido-ddATP, 3'-Azido-ddCTP, 3'-Azido-ddGTP, 3'-Azido-ddTTP, 3'-Azido-ddUTP, 3'-Amino-ddATP, 3'-Amino-ddCTP, 3'-Amino-ddGTP, 3'-Amino-ddTTP等の、アジド基若しくはアミノ基で3'位が修飾されたddNTP）、3'-デオキシヌクレオチド三リン酸（3'-dNTP）（3'-dATP, 3'-dCTP, 3'-dGTP, 3'-dTTP, 3'-dUTP）、3'-デオキシ-5-メチルウリジン-5'-三リン酸が挙げられ、例えばddNTP、又はアジド基で3'位が修飾され

たddNTP、特にddNTPであってよいが、これらに限定されない。使用する連鎖停止NTP及びホモポリマーを形成する基質（dNTP）は、両者の塩基鎖を揃えることが望ましい。第2鎖合成反応に必要な最低ホモポリマー長、第2鎖合成に用いるプライマーの3'末端ホモポリマー部分の必要長、フリープライマー由来副産物の鎖長を特に望ましく抑えられることから、例えばddCTP等の連鎖停止CTP+dCTP、又はddGTP等の連鎖停止GTP+dGTPの組み合わせにより、ポリC付加又はポリG付加を行なうことが好ましい。TS反応を併用するTS/TAS-Seq法では、TS反応時に完全長mRNAに対するcDNA鎖の3'末端に付加されるシトシン塩基もホモポリマー部位として数えることができることから、連鎖停止CTP+dCTPの組み合わせによりポリC付加を行うことが特に好ましい。

[0057] 連鎖停止NTPの添加量は、例えばddNTPを用いる場合、dNTP（dATP、dTTP、dCTP、又はdGTP）に対する比率でddNTP:dNTP=1:10~1:100程度であればよく、例えば1:10~1:80、1:10~1:60、1:10~1:40、1:15~1:80、1:15~1:60、又は1:15~1:40の比率で用いることができる。他の連鎖停止NTPもこの比率に準じて使用量を設定できる。連鎖停止NTPの非共存下でTdT反応を行なう従来のTdT法の場合、ホモポリマーの鎖長を制御するために、酵素のロット間の活性の違いや、プライマーやcDNAなど基質の量の差異に応じて反応時間を厳密に制御する必要がある。一方、本願発明者らが開発したTAS-Seq法では、連鎖停止NTPの共存下でTdTによるホモポリマー付加反応を行なうことにより、確率論的に連鎖停止NTPが取り込まれてホモポリマー伸長反応が停止するので、TdTによる反応時間の差異や酵素活性の差異に対する許容量が大幅に増大する。

[0058] TdTによるホモポリマー付加反応は、一般に、2価カチオンの存在下で行なわれる。使用可能な2価カチオンとしては、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} などの2価金属カチオンが挙げられ、例えば Co^{2+} 、 Mn^{2+} 又は Mg^{2+} であってよいが、これらに限定されない。

[0059] 連鎖停止NTP添加により、TdTによる反応時間等の差異に対する許容量が大幅に増大するため、TdT反応液にRNase Hを添加してRNA分解反応とホモポリマ

一付加反応を同時に行うことができる。従って、本発明の1つの態様において、RNA分解工程とホモポリマー付加工程は同時に実施される。

[0060] A-6. 第2鎖合成工程（図2、図3のStep 5）

ホモポリマー付加反応の後、固相担体を洗浄して第2鎖合成工程に進む。TS/TAS-Seq法の第2鎖合成工程で使用する第2鎖合成用プライマーは、相補DNA第1鎖の末端に付加されたヌクレオチドホモポリマーに対し相補的な配列の相補的ホモポリマー部分を含み、かつ、該相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むプライマー（以下、ロングプライマー）と、相補的ホモポリマー部分を含まず、第2のアダプター部分をその3'側に含むプライマー（以下、ショートプライマー）とを含む。完全長mRNAに由来するテンプレートスイッチされたcDNAには、テンプレートスイッチングオリゴに由来する第2のアダプター（Universal 2）の相補鎖が含まれているので、ロングプライマー及びショートプライマーの両者がハイブリダイズ可能である。一般に、内側にあるプライマーの方が伸長しやすいため、図にはショートプライマーから伸長する様子を示している。スイッチされなかった相補DNA鎖にはロングプライマーがハイブリダイズし、第2鎖が伸長合成される。第2鎖合成により、固相上には、相補DNA（第1鎖）及び第2鎖で構成されるDNA二本鎖が形成される。テンプレートスイッチングオリゴに分子バーコードが含まれていた場合には、テンプレートスイッチされたcDNA第1鎖に対して本工程で合成される第2鎖に分子バーコードが組み込まれる。

[0061] 相補的ホモポリマー部分は、ロングプライマーの3'末端側に存在する。相補的ホモポリマー部分の鎖長は、相補DNA第1鎖に付加されたホモポリマーテイルがポリC又はポリGである場合には通常6～15塩基程度、例えば7～13塩基程度であり、ホモポリマーテイルがポリA又はポリTである場合には通常15～30塩基程度、例えば18～25塩基程度である。また、相補的ホモポリマー部分は、その3'末端に1～2塩基程度のアンカー配列が付加されていてもよい。アンカー配列を付加することで、TdTによりcDNAに付加されたホモポリマーテイルの開始点にロングプライマーがアニーリングする確率を高めることができる。

。アンカー配列は、相補的ホモポリマー部分がポリGの場合はHまたはHN (H = A, T又はC; N = any base (A, T, C又はG))、ポリCの場合はDまたはDN (D = A, T又はG; N = any base (A, T, C又はG))、ポリAの場合はBまたはBN (B = T, G又はC; N = any base (A, T, C又はG))、ポリTの場合はVまたはVN (V = A, G又はC; N = any base (A, T, C又はG))を用いることができる。

[0062] ロングプライマー及びショートプライマーに含まれる第2のアダプターは、テンプレートスイッチングオリゴに含まれる第2のアダプターと同じであり、後の核酸増幅工程においてプライマーの一方を設定する領域となる。

[0063] ロングプライマーは、テンプレートスイッチングオリゴと同様に、ランダムな配列からなる分子バーコード部分を含んでいてよい。ロングプライマーにおいては、第2のアダプター部分と相補的ホモポリマー部分の間に分子バーコードが含まれうる。テンプレートスイッチされたcDNAに由来する増幅産物においては、テンプレートスイッチングオリゴのスイッチング配列内に含まれる分子バーコードが機能する。スイッチされなかったcDNAに由来する増幅産物においては、ロングプライマーに持たせた分子バーコードが機能する。

[0064] 第2鎖合成工程で使用するポリメラーゼは、通常のPCRに使用されるTaqポリメラーゼのような一般的なポリメラーゼでもよいし、高正確性PCR酵素として知られているポリメラーゼやBst DNA polymerase等の鎖置換活性のあるポリメラーゼを使用してもよい。

[0065] 第2鎖合成工程では、必要に応じて熱変性後、第2鎖合成用プライマーのアニーリングと伸長反応を1サイクルのみ実施してもよいし、サーマルサイクリング反応によりサイクル実施してもよい。また、1サイクル又は複数サイクルの反応を実施したのち、Bst DNA polymerase等の鎖置換活性のあるポリメラーゼにより後追い反応を実施してもよい。

[0066] A-7. 核酸増幅工程 (図2、図3のStep 6)

第2鎖合成後、固相担体を洗浄して、又は洗浄せずに核酸増幅工程に進む。核酸増幅工程では、固相担体上に合成されたDNA 2本鎖を鋳型として核酸増

幅反応を行なう（図2、図3のStep 6）。この核酸増幅反応では高い正確性が求められるため、一般に高正確性PCR酵素として知られているポリメラーゼを用いることが望ましい。高正確性PCR酵素は種々のものが市販されている。本工程では、固相担体を洗浄せずに核酸増幅反応液を追加添加することにより、そのまま核酸増幅反応を実施してもよい。

[0067] 第1のアダプターと第2のアダプターを採用する態様では、それらのアダプターに設定したプライマーのセットで核酸増幅反応を行なうことができる。scRNA-seq解析の場合は各細胞中で発現しているmRNAを網羅的に逆転写して増幅するので、第1及び第2のアダプターを標的とするプライマーセットで全cDNA増幅を行なうのが一般的である。この場合のプライマーセットは、典型的には、第1のアダプター配列からなるプライマーと、第2のアダプター配列からなるプライマーとのセットであるが、5'側に任意の付加配列やビオチン等による修飾を含んでいても差し支えない。

[0068] あるいは、第1のアダプターを標的とするプライマーに代えて、相補DNA鎖中の所望の領域を標的とするプライマーを用いて核酸増幅反応を実施してもよい。T細胞受容体（TCR）レパトア解析におけるTCR可変領域ライブラリーの調製のように、固相担体上で合成された相補DNA分子のうちで特定の領域のみを増幅できればよい場合には、第2のアダプターを標的とするプライマーと、相補DNA鎖中の所望の領域を標的とするプライマー（例えば、TCR定常領域を標的とするプライマー）とを用いて核酸増幅反応を実施することができる。

核酸増幅反応自体は常法通りにPCRを実施すればよい。所望により、1段階又は2段階以上のPCR反応を実施してよい。例えば、第1及び第2のアダプターを標的とするプライマーセットを使用して数サイクルの1st PCRを行い、増副産物のサイズセレクション及び精製を行ったのち、同じ部位を標的とするプライマーセット、又は、第2のアダプターを標的とするプライマーと、第1のアダプターよりも内側の部分領域を標的とするプライマーとのセットを用いて数十サイクルの2nd PCRを行い、増副産物のサイズセレクション及び精

製を再度行うことにより、全cDNAの増副産物を得ることができる。2nd PCRでは、両プライマーの5'末端にビオチンやアミン等のスペーサーを結合させたものを使用してもよく、これにより、配列解析対象のDNA断片の回収が容易になる。

[0069] B. 液相系TS/TAS-Seq法

B-1. 標的RNA捕捉工程（図4、図5のStep 1）

液相系TS/TAS-Seq法の標的RNA捕捉工程では、固相担体上に結合していない遊離の標的RNA捕捉オリゴにより標的RNAを捕捉する。液相系においても、標的RNA捕捉工程は、微小ウェル若しくは微小液滴中で、又はこれらに該当しない溶液中で実施できる。

[0070] 液相系の解析技術としては、例えば、mRNA捕捉オリゴが封入されたハイドロゲルビーズと1細胞を微小液滴中に封入し、微小液滴中でハイドロゲルの融解及び細胞溶解を実施し、遊離したmRNA捕捉オリゴでmRNAを捕捉する10X Genomics社の10X Chromiumシステム（特許文献4）、96 wellプレートに個々の細胞や微量mRNAを分注して増幅を行うSmart-Seq2（非特許文献15）、固定した細胞を細胞膜透過試薬及びmRNA捕捉オリゴが含まれる溶液中に懸濁し、固定細胞内でmRNAをmRNA捕捉オリゴ上に捕捉するsci-RNA-seq3などが知られている。液相系TS/TAS-Seq法は、このような公知のトランスクリプトーム解析技術のいずれにも適用可能である。

[0071] 液相系における標的RNA捕捉工程の実施態様の1つとして、室温などの穏やかな条件で融解可能な材料（ハイドロゲルなど）でできたビーズ内に標的RNA捕捉オリゴを封入し、該ビーズと細胞を1：1で微小液滴中に封入又は微小ウェル内に添加し、微小液滴中又は微小ウェル内でビーズ融解と細胞溶解を実施してmRNA等の標的RNAを標的RNA捕捉オリゴ上に捕捉する態様を挙げることができる。

[0072] 別の実施態様として、細胞溶解物ないし細胞から抽出したRNAを含む溶液中に標的RNA捕捉オリゴを添加し、溶液中でmRNA等の標的RNAを捕捉オリゴ上に捕捉する態様を挙げることができる。この態様には、個々の細胞又はこれよ

り抽出したmRNAを微小ウェルに分注し、微小ウェル内で標的RNA捕捉オリゴ上にmRNA等の標的RNAを捕捉する方法や、個々の細胞を微小液滴中にトラップし、微小液滴中で標的RNA捕捉オリゴ上に標的RNAを捕捉する方法、さらには、微小ボリュームに該当しない溶液中で標的RNA捕捉オリゴ上に標的RNAを捕捉する方法が包含される。

[0073] さらに別の実施態様として、細胞膜透過試薬及び標的RNA捕捉オリゴが含まれる溶液中に固定した細胞を懸濁し、固定細胞内でmRNA等の標的RNAを標的RNA捕捉オリゴ上に捕捉する態様を挙げることができる。

[0074] 固相系で説明したとおり、液相系のTS/TAS-Seq法においても、標的RNAにはポリA RNAが含まれる。ポリA RNAのみを標的としてもよいし、ポリA RNA以外のRNAも併せて標的としてもよい。すなわち、TS/TAS-Seq法では、標的RNA捕捉オリゴは、標的ポリA RNA捕捉オリゴを含み、ポリA RNA以外のRNAを捕捉する標的RNA捕捉オリゴも含んでいてよい。また、標的RNA捕捉オリゴに加えて、RNA以外の核酸分子を標的として捕捉する標的捕捉オリゴをさらに含んでいてもよい。微小ウェル又は微小液滴中で標的RNAを捕捉する場合には、1個の微小ウェル又は微小液滴中に複数種類の捕捉オリゴが含まれていてもよいし、複数種類の捕捉オリゴがそれぞれ異なる微小ウェル又は微小液滴中に含まれていてもよい。

[0075] 標的ポリA RNA捕捉オリゴの典型例、ポリA以外の部位を捕捉する標的RNA捕捉オリゴの例は、固相系TS/TAS-Seq法と同様である。図4、図5のStep 1に示すように、5' キャップ構造を有する完全長mRNAだけではなく、キャップ構造を有しない不完全長mRNAやimmature mRNA、部分的に分解したmRNA等の「完全長ではないmRNA」も、ポリAを有していれば、標的捕捉部としておりT部分を有する標的ポリA RNA捕捉オリゴにより捕捉される。

[0076] 標的RNA捕捉オリゴは、3' 末端に標的捕捉部を有する。標的捕捉部の5' 側には、核酸増幅工程においてプライマー設定領域として利用できる第1のアダプター部分（図4、図5中ではUniversal 1として示す）が含まれていてよく、第1のアダプター部分と標的捕捉部との間に、標的RNAが由来する個々の細

胞を識別するための細胞識別バーコード部分を含んでいてよい。この細胞識別バーコードは、固相系におけるビーズ識別バーコード部分及び区画識別バーコード部分に相当するバーコードである。同一の微小ウェル又は微小液滴中に1細胞と共に封入されることになる標的RNA捕捉オリゴは、同一配列の細胞識別バーコードを有しており、微小ウェルごと又は微小液滴ごとに細胞識別バーコードの配列が異なる。これにより、同じ微小ウェル又は微小液滴中で捕捉オリゴにより捕捉されたmRNAに由来するcDNAを、別の微小ウェル又は微小液滴中で捕捉されたmRNAに由来するcDNAと区別することができ、ひいては、同じ細胞に由来するcDNAを他の細胞に由来するcDNAと区別することができる。

[0077] B-2. 相補鎖合成工程（図4、図5のStep 2）

液相系では、標的RNA捕捉工程の後、精製等を行わずそのまま続けて相補鎖合成工程に進む。標的RNA捕捉後の反応液に、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素及びテンプレートスイッチングオリゴを添加し、逆転写反応及びTS反応をワンステップで実施する。

[0078] 本工程の詳細、テンプレートスイッチングオリゴの構造は、固相系TS/TAS-Seqと同じである。図4、図5のStep 2の1段目が、テンプレートスイッチされたcDNAである。完全長mRNAの全長に対して合成されたが、テンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズしなかったcDNA（図4、図5のStep 2の2段目）、完全長ではないmRNAの全長に対して合成され、テンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズしなかったcDNA（Step 2の3段目）、及び途中で合成がとまったcDNA（Step 2の4段目）は、テンプレートスイッチング反応を受けなかったcDNAとして反応液中に残る。

[0079] ターミナルトランスフェラーゼ活性に加え、鎖置換活性をさらに有する逆転写酵素を用いた場合には、図5のStep 2に示すように、テンプレートスイッチされたcDNAとmRNAのハイブリッド二本鎖において、逆転写酵素の鎖置換活性により、mRNAをcDNAから剥がしながら第2鎖合成が進む。固相系と異なる点として、合成された第2鎖の3'末端とcDNA鎖の5'末端が平滑になるので

、第2鎖の3'末端にも逆転写酵素のターミナルトランスフェラーゼ活性により塩基が付加され得る（付加しない場合もある）。

[0080] B-3. 未反応オリゴ除去工程（図4、図5のStep 3）

液相系の場合、相補鎖合成が終了した反応液を核酸サイズ分画により精製することで、鎖長がごく短い未反応の標的RNA捕捉オリゴを、相補DNA鎖（mRNA-cDNAハイブリッド）から分離除去できる。未反応のテンプレートスイッチングオリゴも、未反応の捕捉オリゴと同時にワンステップで除去できる。核酸サイズ分画による精製法は周知であり、シリカメンブレンカラムによる精製や、DNAが結合する磁気ビーズを用いた精製など、常法どおりに実施できる。当該工程では、核酸サイズ分画にエキソヌクレアーゼによる除去を組み合わせてもよく、これにより未反応オリゴの除去効率をより一層高めることができる。一本鎖DNAを特異的に分解する一般的なエキソヌクレアーゼを使用することができる。その例として、Exonuclease IやExonuclease Tを挙げることができる。相補鎖合成が終了した反応液中にエキソヌクレアーゼを添加して反応後、核酸サイズ分画による精製を行うことで、エキソヌクレアーゼも同時に除去することができる。

[0081] B-4. RNA分解工程（図4、図5のStep 4）

サイズ分画による精製後の反応液にRNA分解酵素を添加し、反応液中のmRNA-cDNAハイブリッドのmRNA、及びテンプレートスイッチングオリゴの3'末端配列（当該配列がリボヌクレオチド塩基である場合）を分解する。

[0082] RNA分解酵素を添加してRNAを分解した後、dNTP、連鎖停止NTP及びTdT等の試薬を反応液に添加して次のホモポリマー付加工程を実施してもよいが、RNA分解酵素とこれらの試薬を同時に又は順次に反応液に添加し、RNA分解とホモポリマー付加を同時に実施することが好ましい。RNA分解工程にNaOH、KOH等のアルカリ溶液を用いた場合は、アルカリ溶液による分解反応後に反応液を中和してからTdT反応を実施する。

[0083] B-5. ホモポリマー付加工程（図4、図5のStep 4）

dATP、dTTP、dCTP、又はdGTPと連鎖停止NTPとの存在下でTdTによる反応を

行い、相補DNA鎖の3'末端にヌクレオチドホモポリマーを付加する（図4、図5のStep 4; 図にはポリCの例を示す）。連鎖停止NTPの好ましい例、dNTPと連鎖停止NTPの添加比率等、本工程の詳細は、以下に記載した点の他は固相系TS/TAS-Seqと同じである。

[0084] 図5は、相補鎖合成工程で使用する逆転写酵素が鎖置換活性をさらに有する場合の態様である。この態様では、相補鎖合成工程において、テンプレートスイッチされたcDNAに対する第2鎖（Step 4のアスタリスクで示したストランド）が合成されるため、ホモポリマー付加工程の開始時にcDNA第1鎖及び第2鎖で構成されるDNA二本鎖が反応液中に存在し、このDNA二本鎖は両末端が平滑末端又は3'突出末端となっている（図5、Step 2の1段目参照）。そのため、該DNA二本鎖においては、テンプレートスイッチされたcDNA第1鎖の3'末端だけではなく、第2鎖の3'末端にもホモポリマーが付加されうる。

[0085] B-6. 第2鎖合成工程（図4、図5のStep 5）

RNA分解及びホモポリマー付加後の反応液を精製してRNA分解酵素及びTdT等の試薬を除去し、第2鎖合成工程に進む。液相系TS/TAS-Seqの第2鎖合成工程は、固相系と同様に、ロングプライマー及びショートプライマーを含む第2鎖合成用プライマーを用いて実施する。各プライマーの構成及び好ましい条件、本工程の詳細は、以下に記載した点の他は固相系TS/TAS-Seqと同じである。

[0086] 固相系と異なる点として、図5に示した鎖置換活性をさらに有する逆転写酵素を用いる場合の態様では、テンプレートスイッチされたcDNAに対し相補鎖合成工程で合成された第2鎖（アスタリスクのストランド）も3'末端にホモポリマーを有しうるため、Step 5に破線囲みで示した様に、このストランドのホモポリマーにロングプライマーがハイブリダイズして伸長する反応も起こりうる。この伸長反応により生じたDNA鎖は、その5'末端側にPCR増幅に必要なアダプター配列を含まないため、次の核酸増幅工程で第1及び第2のアダプターを標的とするプライマーを使用した場合は当該DNA鎖は増幅されない。

[0087] B-7. 核酸増幅工程（図4、図5のStep 6）

第2鎖合成後、必要に応じて反応液を精製して過剰プライマー及びポリメラーゼ等の試薬を除去し、核酸増幅工程に進む。液相系における本工程は、固相系TS/TAS-Seqと同様に実施することができる。

[0088] C. nonTS/TAS-Seq法（図1）

図1には液相系の例を示したが、固相系でも実施可能である。相補鎖合成工程において、テンプレートスイッチングオリゴの非存在下で逆転写反応を行うこと、逆転写酵素としてターミナルトランスフェラーゼ活性を有するものを使用し、鎖置換活性は不要であること以外は、TS/TAS-Seq法と同様に実施できる。以下、TS/TAS-Seq法と異なる点を中心にnonTS/TAS-Seq法の各工程を説明する。

[0089] C-1. 標的RNA捕捉工程（図1のStep 1）

nonTS/TAS-Seq法でも、主たる標的RNAはポリA RNAであるmRNAであり、標的RNA捕捉オリゴが標的ポリA RNA捕捉オリゴを含むことが一般に好ましい。もっとも、完全長mRNAに対するcDNAへのCCC付加を利用したTS反応を併用しないため、非ポリA RNAのみを対象としてnonTS/TAS-Seqを実施した場合にも本方法の効果を得ることができる。従って、nonTS/TAS-Seq法では、標的RNA捕捉オリゴが標的ポリA RNA捕捉オリゴを含むことは必須的ではない。

[0090] C-2. 相補鎖合成工程（図1のStep 2）

相補鎖合成工程では、ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を使用し、テンプレートスイッチングオリゴの非存在下で逆転写反応を行う。これにより、固相化された又は遊離の標的RNA捕捉オリゴに捕捉されたmRNAに対する相補DNA鎖が合成され、少なくとも一部の相補DNA鎖の3'末端に任意の数塩基が付加される。

[0091] C-3. 未反応オリゴ除去工程（図1のStep 3）

固相系の場合はA-3と同様にして、液相系の場合はB-3と同様にして実施できる。

[0092] C-4. RNA分解工程（図1のStep 4）

固相系の場合はA-4と同様にして、液相系の場合はB-4と同様にして実施できる。

[0093] C-5. ホモポリマー付加工程（図1のStep 4）

固相系の場合はA-5と同様にして、液相系の場合はB-5と同様にして実施できる。nonTS/TAS-Seq法においても、RNA分解後にホモポリマー付加工程を実施してもよいし、RNA分解とホモポリマー付加を同時に実施してもよい。

[0094] C-6. 第2鎖合成工程（図1のStep 5）

第2鎖合成用プライマーは、ロングプライマーを含むものを使用する。ショートプライマーは不要である。

[0095] C-7. 核酸増幅工程（図1のStep 6）

液相系及び固相系のTS/TAS-Seq法における核酸増幅反応と同様にして実施できる。

[0096] nonTS/TAS-Seq及びTS/TAS-Seqを包含する本発明の方法により増幅した相補DNA鎖は、次世代シーケンサーによるシーケンシングに供するために、断片化、末端修復、A-tailing、シーケンス用アダプターの付加等の加工を行ってよい。これらの加工により、シーケンス用コンストラクトに加工されたcDNAのライブラリーが得られる。断片化手段としては、超音波や酵素を用いることができる。シーケンス用コンストラクトの作成は、一般的に用いられる試薬を用いることができ、酵素法の代表的なものとしてはNew England Biolabs社のNEBNext UltraII FS kitや、KAPA Biosystems社のKAPA HyperPlus kit、超音波断片化装置としてはCovarisやBioruptorなどの機械を用いることができるが、その他の同等品でも使用可能である。シーケンス用アダプターは、使用する次世代シーケンサーに応じて適当なアダプターを用いればよい。

[0097] ライブラリーのシーケンシングは、一般に次世代シーケンサーと呼ばれるシーケンサーを用いて実施すればよい。好ましく使用できる次世代シーケンサーの具体例としては、イルミナ社のNovaseq 6000システム、Novaseq Xシステム、Hiseqシステム、Nextseqシステム、Nextseq2000システム、Ne

xtseq3000システム、及びMiSeqシステム；MGI社のDNBseq T7システム、DNBseq G400システム、及びDNBseq G40システム；サーモフィッシャーサイエンティフィック社のIon S5/Ion S5 XLシステム等が挙げられる。

実施例

[0098] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0099] 1. 固相担体を用いたscRNA-seq解析系でのTdT法（TAS-Seq法）と本発明cDNA増幅法との比較（図6、図7）

BD Rhapsodyシステム（Beckton Dickinson）により調製した、固相ビーズ上にトラップされたシングルセルトランスクリプトームライブラリーを、TdT法（TAS-Seq法、特許文献2及び非特許文献11）及び本発明によるcDNA増幅法（Template-switch + TdT法、又はTemplate-switch + TAS-Seq法）によりそれぞれ増幅した。使用したプライマーの配列は下記表1に示す。

[0100] ヒト末梢血単核球（PBMC）はLONZA社より調整後凍結保存したものを入手して用いた。凍結ヒトPBMCを37℃のウォーターバスで速やかに解凍し、懸濁液に対し9 mlの予め温めたRPMI1640/5%FBSを添加し転倒混和、遠心後上清を除去し、再度RPMI1640/5%FBSで洗浄した。フローサイトメーターで細胞数を計測し、Rhapsodyの仕様書に従いマイクロウェルカートリッジに適切な密度で細胞・ビーズをロードし、細胞を溶解、各々1つの細胞由来mRNAを1つのビーズ上（ポリA RNA捕捉オリゴとして、Rhapsody universal adapterを含む）でトラップした（標的RNA捕捉工程）。なお、ビーズ上に固相化されたRhapsody universal adapterは、下記の構造を有するDNAであり、CLS1（cell label section 1）～CLS3には、9塩基からなる各96種の既知固有配列、合計288種が採用されており、全体で約90万通りのビーズ識別バーコード部分を構成している。配列表の配列番号1には、CLS1～CLS3をNNNNNNNNNとして示す。

＜Rhapsody universal adapterの構造＞

ACACGACGCTCTCCGATCT-[none or A or GT or TCA]-(CLS1)-GTGA-(CLS2)-GACA-(CLS3)-NNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT（配列番号1）

- [0101] mRNAをトラップしたビーズ4本をそれぞれ2つに分け(合計8本)、4つはTAS-Seq法により、残り4つは本発明cDNA増幅法により逆転写～cDNA増幅を実施した。
- [0102] TAS-Seq法は、上記のポリA RNA捕捉ビーズをメーカー推奨の通りに逆転写反応を行ない(相補鎖合成工程、ターミナルトランスフェラーゼ活性及び鎖置換活性を有する逆転写酵素を使用)、その後、Exonuclease I処理により、ビーズ上の未反応のポリA RNA捕捉オリゴを除去した(未反応オリゴ除去工程)。dCTPおよびターミネーターとしてddCTPを用い、RNaseHによるmRNA分解と、TdTによるホモポリマー付加反応を20分間同時に実施した。ビーズを洗浄後、第2鎖合成反応をuniversal 2アダプター配列の3'末端にグアニンホモポリマーを有するプライマー及び高正確DNAポリメラーゼを用いて実施した。反応液に対し、universal 1及びuniversal 2配列に対するプライマー(universal oligo-long, 5' BDWTA_v2)を用いたPCRにて全cDNAを9サイクル増幅した。AmPure XPビーズを用いたサイズセクション後、5サイクルのPCRにより追加で増幅した。最終的なcDNA量をQubit fluorometerまたはnanodrop分光光度計(サーモフィッシャーサイエンティフィック)により、またcDNAのサイズ分布をMultiNAシステム(島津製作所)により測定した。
- [0103] 本発明cDNA増幅法は、上記のポリA RNA捕捉ビーズをメーカー提供試薬等を用いて42℃30分逆転写反応を行ない、その後テンプレートスイッチングオリゴ(5' BDWTA_v2-TS0)及びMgCl₂を添加しさらに42℃30分逆転写及びテンプレートスイッチング反応を実施した(相補鎖合成工程)、その後、Exonuclease I処理により、ビーズ上の未反応のポリA RNA捕捉オリゴを除去した(未反応オリゴ除去工程)。dCTPおよびターミネーターとしてddCTPを用い、RNaseHによるmRNA分解と、TdTによるホモポリマー付加反応を20分間同時に実施した。ビーズを洗浄後、第2鎖合成反応をuniversal 2アダプター配列の3'末端にグアニンホモポリマーを有するプライマー及び高正確DNAポリメラーゼを用いて実施した。反応液に対し、universal 1及びuniversal 2配列に対するプライマー(universal oligo-long, 5' BDWTA_v2)を用いたPCRにて全cDNAを9サイクル増幅

した。AmPure XPビーズ(Beckman Coulter)を用いたサイズセレクション後、5サイクルのPCRにより追加で増幅した。最終的なcDNA量をQubit fluorometerまたはnanodrop分光光度計(Thermo Fisher Scientific)により、またcDNAのサイズ分布をMultiNAシステム(島津製作所)により測定した。

- [0104] cDNA収量の比較結果を図6に示す。TdT反応のみ実施する従来のTdT法(TAS-Seq法)よりも、TS/TdT反応の両者を実施する本発明cDNA増幅法では有意により多くのcDNAが得られていた。
- [0105] cDNAサイズ分布の比較結果を図7に示す。TdT反応のみ実施する従来のTdT法(TAS-Seq法)よりも、TS/TdT反応の両者を実施する本発明cDNA増幅法では、1000-2000塩基対(bp)におけるピークが高くなっており、長い完全長cDNAがより多く合成されていることが示唆される。

[0106] [表1]

Primer name	Sequence (5'→3')	配列番号
universal oligo-long	NH2(C6)/ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	2
5'BDWTA _v 2-TSO	NH2(C6)/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGG	3
5'BDWTA _v 2	NH2(C6)/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	4

NH2(C6): 5'のアミノ基修飾、炭素スペーサー6原子含む
5'BDWTA_v2-TSOの下線部のGGGは、[RNAのグアニン]—[RNAのグアニン]—[RNAのグアニン]とした。

- [0107] 2. 液相系scRNA-seq解析系でのTdT法と本発明cDNA増幅法との比較(図8)
- ヒトPBMC検体を上記1.と同様の手法で取得し、細胞をカウント後、10X Genomics社Chromium v3.1試薬を用いてChromiumの仕様書に従いマイクロ流路系に適切な密度で細胞をロードし、各細胞とハイドロゲルビーズを微小液滴中に封入した。なお、Chromiumへの細胞ロードの際に、細胞溶解試薬および逆転写試薬等を含むcDNA合成試薬(逆転写酵素はターミナルトランスフェラーゼ活性及び鎖置換活性を有するものを使用)を同時にロードするが、比較のためにテンプレートスイッチングオリゴ(10X Chromium-TSO)を入れた検体と入れない検体を用意した。細胞を溶解後、各々1つの細胞由来mRNAをハイドロゲルより遊離したポリA RNA捕捉オリゴ(10X Chromium adapter)にトラッ

プシ（標的RNA捕捉工程）、そのまま微小液滴内で逆転写反応、または逆転写反応およびTS反応を37℃または53℃で1時間実施した（相補鎖合成工程）。相補鎖合成工程終了後、微小液滴を構成するエマルジョンを10X社推奨の手法にて壊し、核酸サイズ分画によりcDNAを精製することで未反応のポリA RNA捕捉オリゴおよびテンプレートスイッチングオリゴを除去した（未反応オリゴ除去工程）。なお、10X Chromium adapterは、下記の構造を有するDNAであり、CBは、16塩基からなる約90万通りの既知の識別バーコードである。配列表の配列番号5には、CBをNNNNNNNNNNNNNNNNとして示す。

<10X Chromium adapterの構造>

CTACACGACGCTCTTCCGATCT- (CB) NNNNNNNNNNNNTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTVN (配列番号5)

[0108] 得られたcDNA溶液をもとに、dCTPおよびターミネーターとしてddCTPを用い、RNaseHによるmRNA分解と、TdTによるホモポリマー付加反応を20分間同時に実施した。TdT反応液を精製後、第2鎖合成反応をuniversal 2アダプター配列の3'末端にグアニンホモポリマーを有するプライマー及び高正確DNAポリメラーゼを用いて実施した。反応液に対し、universal 1 及びuniversal 2配列に対するプライマー(universal oligo-long, 5' BDWTA_v2)を用いたPCRにて全cDNAを9サイクル増幅した。AmPure XPビーズ(Beckman Coulter)を用いたサイズセクション後、得られたcDNAをさらに5サイクルのPCRにより追加で増幅した。最終的なcDNA量をnanodrop分光光度計により、またcDNAのサイズ分布をMultiNAシステムにより測定した。

[0109] cDNA収量およびサイズ分布の比較結果を図8に示す。TdT反応のみ実施する従来のTdT法よりも、TS/TdT反応の両者を実施する本発明cDNA増幅法ではより多くのcDNAが得られ、また1000-2000塩基対(bp)におけるピークが高くなっており、長い完全長cDNAがより多く合成されていることが示唆される。

[0110]

[表2]

Primer name	Sequence (5'→3')	配列番号
universal oligo-long	NH2 (C6) /ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	2
10X Chromium-TSO	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGG	6
5'BDWTA v2	NH2 (C6) /AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	4

NH2(C6): 5'のアミノ基修飾、炭素スパーサー6原子含む
10X Chromium-TSOの下線部のGGGは、[RNAのグアニン]ー[RNAのグアニン]ー[RNAのグアニン]とした。

[0111] 3. 液相系cDNA増幅系でのTS法と本発明cDNA増幅法との比較 (図9、図10)

NIH3T3細胞を培養し、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いてtotal RNAを抽出した。Total RNA 10ng(6検体)を用い、ポリA RNA捕捉オリゴ(BioEcoP-dT25-adapter)を加え(標的RNA捕捉工程)、Smart-seq2法(Picelli S., et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. N at Protoc. 2014 Jan;9(1):171-81.)を用いて逆転写反応およびTS反応を42℃で1時間実施した(相補鎖合成工程、ターミナルトランスフェラーゼ活性及び鎖置換活性を有する逆転写酵素を使用)。相補鎖合成工程終了後、Pronex beads(Promega)を用いて核酸サイズ分画によりcDNAを精製した(未反応オリゴ除去工程)。3検体はそのまま全cDNAを11サイクルのPCRにより、5' BDWTA v2および3' WTA primerを用いて増幅し、AmPure XPにより精製した。残りの3検体は、dCTPおよびターミネーターとしてddCTPを用い、RNaseHによるmRNA分解と、TdTによるホモポリマー付加反応を20分間同時に実施した。TdT反応液を精製後、第2鎖合成反応をuniversal 2アダプター配列の3'末端にグアニンホモポリマーを有するプライマー及び高正確DNAポリメラーゼを用いて実施した。反応液に対し、universal 1 及びuniversal 2配列に対するプライマー(5' BDWTA v2および3' WTA primer)を用いたPCRにて全cDNAを11サイクル増幅し、AmPure XPにより精製した。最終的なcDNA量をQubit Fluorometerにより、またcDNA中のActb, Rps3遺伝子の相対的な含有量につき定量リアルタイムPCR(qPCR)で、またcDNAのサイズ分布をMultiNAシステムにより測定した。

[0112] cDNA収量の比較結果を図9に示す。TS法(Smart-seq2法)のみでの増幅よりも、TS/TdT反応の両者を実施する本発明cDNA増幅法では、有意に全cDNA収量が約3倍、Rps3、Actb遺伝子の収量が増加しており、cDNA合成効率が大幅に上昇していることが示唆される。

[0113] 代表的なcDNA分布の比較結果を図10に示す。TS法(Smart-seq2法)のみでの増幅よりも、TS/TdT反応の両者を実施する本発明cDNA増幅法では、300-700 bpのサイズの小さいcDNAの全体に占める割合が増加していることが認められ、逆転写がmRNAの途中で停止したcDNAや、immatureなmRNA、部分的に分解したmRNAなどのTS反応がかかりにくい核酸が本発明cDNA増幅法では捉えられている可能性が示唆される。

[0114] [表3]

Primer name	Sequence (5'→3')	配列番号
BioEcoP-dT25-adapter	5BiotinTEG/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTTT	7
Smart-seq2 TSO	biosg/AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGG	8
5'BDWTA _{v2}	NH2 (C6) /AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG	4
3'WTA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	9

5BiotinTEG: 5'のビオチントリエチレングリコール修飾
biosg: 5'のビオチン修飾
Smart-seq2 TSOの下線部のGGGは、[RNAのグアニン]ー[RNAのグアニン]ー[LNAのグアニン]とした。

[0115] 4. 固相担体を用いたscRNA-seq解析でのTdT法、random priming法と本発明cDNA増幅法との検出遺伝子数の比較 (図11)

8週齢のマウス脾臓を摘出し、赤血球溶血バッファー(3 ml ACK buffer (15 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)を満たした6-wellプレートの上においた70 μmストレーナーの上で優しく脾臓をすりつぶし、細胞懸濁液を回収した。懸濁液に対し7 mlのDMEM/5%FBSを添加し転倒混和、遠心後上清を除去し、再度DMEM/5%FBSで洗浄した。取得した細胞を用い、TdT法 (TAS-Seq法)、本発明cDNA増幅法、およびBD Rhapsodyキット付属のrandom primingによるcDNA増幅を実施した。逆転写酵素はターミナルトランスフェラーゼ活性及び鎖

置換活性を有するものを使用した。得られたcDNAよりシーケンスライブラリを作成後、Illumina Novaseq 6000にてシーケンスを実施した。シーケンスライブラリ作成に用いたプライマー配列を表4に示す。得られたシーケンスデータをリファレンス配列(GRCm38-101)にマッピングし、細胞毎の遺伝子発現データを得た。また比較のために、公共データベースよりマウス脾臓細胞の10X Chromium v3.1で取得したデータ(TS法、accession ID: GSE192930)をダウンロードした。得られたデータにつき、細胞あたりのリード数の中央値が均一となるようにシーケンスデータをダウンサンプリングし、再度リファレンス配列(GRCm38-101)にマッピングし、細胞毎の遺伝子発現データを得た。

[0116]

[表4]

Primer name	Sequence (Illumina adapter 以外は 5'→3')	配列 番号
Illumina adapter	5' -Phos-GATCGGAAGAGCACAGTCGTGAAGTGGAGTCAC-/3AmMO-/3'	10
	3' -T*CTAGCCTTCTCG-5'	11
ILMN_15_UDI0065	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGATCCATATACACTGTTTCGGTACACG*A*C	12
ILMN_15_UDI0066	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGGTTGGGCACACTGTTTCGGTACACG*A*C	13
ILMN_15_UDI0067	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACACAATGTTACACTGTTTCGGTACACG*A*C	14
ILMN_15_UDI0071	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGATTGGAACACACTGTTTCGGTACACG*A*C	15
ILMN_15_UDI0072	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGCCAAGGTACACTGTTTCGGTACACG*A*C	16
ILMN_15_UDI0073	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGCGAGATATACACTGTTTCGGTACACG*A*C	17
ILMN_15_UDI0094	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGTTGAGAATACACTGTTTCGGTACACG*A*C	18
ILMN_15_UDI0095	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACACACGAGTACACTGTTTCGGTACACG*A*C	19
ILMN_15_UDI0096	AATGATACGGCGACGACCGAGATCTACAGGTGTAGACACACTGTTTCGGTACACG*A*C	20
ILMN_17_UDI0065	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTTAGTGTGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	21
ILMN_17_UDI0066	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCGGACACGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	22
ILMN_17_UDI0067	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAACAGGAAGTGAAGTTCAGACGT*G*T	23
ILMN_17_UDI0071	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACAGAGTGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	24
ILMN_17_UDI0072	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGTAGACGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	25
ILMN_17_UDI0073	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTTAATTGGTGAAGTTCAGACGT*G*T	26
ILMN_17_UDI0094	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGCAGACGGTGAAGTTCAGACGT*G*T	27
ILMN_17_UDI0095	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGATATCGAGTGAAGTTCAGACGT*G*T	28
ILMN_17_UDI0096	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCGTAGGTGAAGTTCAGACGT*G*T	29

* はホスホロチオエート結合を示す。
Illumina adapter は相補的な2つのプライマーをアニーリングさせたもの。
Phos: 5'のリン酸化、3AmMO: 3'の NH₂ 化
各プライマーは以下の組み合わせで使用した。
ILMN_15_UDI0065 and ILMN_17_UDI0065
ILMN_15_UDI0066 and ILMN_17_UDI0066
ILMN_15_UDI0067 and ILMN_17_UDI0067
ILMN_15_UDI0071 and ILMN_17_UDI0071
ILMN_15_UDI0072 and ILMN_17_UDI0072
ILMN_15_UDI0073 and ILMN_17_UDI0073
ILMN_15_UDI0094 and ILMN_17_UDI0094
ILMN_15_UDI0095 and ILMN_17_UDI0095
ILMN_15_UDI0096 and ILMN_17_UDI0096

[0117] 検出遺伝子数およびリード数の比較結果を図 1 1 に示す。本発明cDNA増幅法で得られたデータ(TAS-Seq2)では、他の手法と比較してより多くの遺伝子が検出されることが見出された。これより、本発明の増幅法の、固相系シングルセルトランスクリプトーム解析における有用性が示された。

[0118] 5. 液相系を用いたscRNA-seq解析でのTS法と本発明cDNA増幅法との検出遺伝子数の比較（図12－図14）

ヒトPBMC検体（3検体）を上記1.と同様の手法で取得し、細胞をカウント後、10X Genomics社Chromium v3.1試薬を用いてChromiumの仕様書に従いマイクロ流路系に適切な密度で細胞をロードし、各細胞とハイドロゲルビーズを微小液滴中に封入した。1検体につき、2ライブラリーを作成した。細胞を溶解後、各々1つの細胞由来mRNAをハイドロゲルより遊離したポリA RNA捕捉オリゴ(10X Chromium adapter)にトラップし（標的RNA捕捉工程）、そのまま微小液滴内で逆転写反応およびTS反応を53℃で1時間実施した（相補鎖合成工程、ターミナルトランスフェラーゼ活性及び鎖置換活性を有する逆転写酵素を使用）。相補鎖合成工程終了後、微小液滴を構成するエマルジョンを10X社推奨の手法にて壊し、核酸サイズ分画によりcDNAを精製することで未反応のポリA RNA捕捉オリゴおよびテンプレートスイッチングオリゴを除去した（未反応オリゴ除去工程）。得られたcDNA溶液をもとに、3検体それぞれ由来のライブラリーのうちの1つはそのままuniversal 1及びuniversal 2配列に対するプライマー(universal oligo-long, 5' BDWTA_v2)を用いたPCRにて全cDNAを9サイクル増幅した。AmPure XPビーズ(Beckman Coulter)を用いたサイズセクション後、得られたcDNAをさらに5サイクルのPCRにより追加で増幅した。残りの3検体それぞれ由来のライブラリーのうちのもう1つに関しては、dCTPおよびターミネーターとしてddCTPを用い、RNaseHによるmRNA分解と、TdTによるホモポリマー付加反応を20分間同時に実施した。TdT反応液を精製後、第2鎖合成反応をuniversal 2アダプター配列の3'末端にグアニンホモポリマーを有するプライマー及び高正確DNAポリメラーゼを用いて実施した。反応液に対し、universal 1 及びuniversal 2配列に対するプライマー(universal oligo-long, 5' BDWTA_v2)を用いたPCRにて全cDNAを9サイクル増幅した。AmPure XPビーズ(Beckman Coulter)を用いたサイズセクション後、得られたcDNAをさらに5サイクルのPCRにより追加で増幅した。

[0119] 得られたcDNAよりシーケンスライブラリーを作成後、Illumina Novaseq 6000

にてシーケンスを実施した。シーケンスライブラリ作成に用いたプライマー配列を表5に示す。得られたシーケンスデータをヒトリファレンス配列に10X社Cell rangerソフトウェアを用いてマッピングし、細胞毎の遺伝子発現データを得た。得られたデータにつき、細胞あたりのリード数の中央値が均一となるようにシーケンスデータをダウンサンプリングし、再度ヒトリファレンス配列にマッピングし、細胞毎の遺伝子発現データを得た。

[0120] [表5]

Primer name	Sequence (Illumina adapter 以外は 5'→3')	配列番号
Illumina adapter	5' -Phos-GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCGAGTCAC-/AmMO/-3'	10
	3' -T*CTAGGCTTCTCG-5'	11
ILMN_I5_UDI0020	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTCTCGGAACACTCTTTCCGTACAGG*A*C	30
ILMN_I5_UDI0021	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAAGACGTCACACTCTTTCCGTACAGG*A*C	31
ILMN_I5_UDI0022	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGAGTACTACACTCTTTCCGTACAGG*A*C	32
ILMN_I5_UDI0061	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCACTACGAACACTCTTTCCGTACAGG*A*C	33
ILMN_I5_UDI0062	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTGTGCTAGACACTCTTTCCGTACAGG*A*C	34
ILMN_I5_UDI0063	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACACCACTTAACACTCTTTCCGTACAGG*A*C	35
ILMN_I7_UDI0020	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTCGGTGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	36
ILMN_I7_UDI0021	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAAGGTACCGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	37
ILMN_I7_UDI0022	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGAACGTTGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	38
ILMN_I7_UDI0061	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGAGTTCCGGTGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	39
ILMN_I7_UDI0062	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTGACCTTAGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	40
ILMN_I7_UDI0063	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGGCAAGTGACTGGAGTTCAGACGT*G*T	41

*はホスホロチオエート結合を示す。
Illumina adapter は相補的な2つのプライマーをアニーリングさせたもの。
Phos: 5'のリン酸化、3AmMO: 3'の NH₂ 化
各プライマーは以下の組み合わせで使用した。
ILMN_I5_UDI0061 and ILMN_I7_UDI0061
ILMN_I5_UDI0062 and ILMN_I7_UDI0062
ILMN_I5_UDI0063 and ILMN_I7_UDI0063
ILMN_I5_UDI0020 and ILMN_I7_UDI0020
ILMN_I5_UDI0021 and ILMN_I7_UDI0021
ILMN_I5_UDI0022 and ILMN_I7_UDI0022

[0121] 検出遺伝子数およびリード数の比較結果を図12に示す。本発明cDNA増幅法で得られたデータ(10XTAS-Seq2)では、TS法のみデータ(10X)と比較して、各由来が同一の3サンプルそれぞれにおいて、より多くの遺伝子が検出されることが見出された。

- [0122] 細胞のクラスタリング結果を図 1 3 に示す。本発明cDNA増幅法で得られたデータ(10X+TAS-Seq2)では、TS法のみデータ(10X)と比較して、UMAP空間上における、異なった性質を有する各種細胞集団の分離が向上していることが見出された。
- [0123] 細胞のクラスタリング結果に基づいた、各種細胞集団中における、検出遺伝子数とリード数の比較を図 1 4 に示す。検出されたすべての細胞集団において、本発明cDNA増幅法で得られたデータ(10X+TAS-Seq2)では、TS法のみデータ(10X)と比較して、細胞あたり検出遺伝子数が増加していることが見出された。シングルセルトランスクリプトーム解析の大きな用途の一つは、細胞集団の分離同定とその性質の解明であることから、本発明の、液相系シングルセルトランスクリプトーム解析を用いた細胞集団の分離同定と性質の解明における有用性が示された。
- [0124] また、本発明によれば、解析費用が同額の場合、1細胞当たりの情報量を、従来法に比べて1.5-2倍に増大できる。その一方、従来法と同程度の1細胞あたりの情報量を得る場合には、必要とされるシーケンス分析費用を1/2-1/3倍とすることができる(図 1 4)。とくに昨今scRNA-seq解析では解析細胞数が従来の数万から数十万へと、細胞スループットが大きく増大しつつあるものの、1細胞あたりに必要とされるシーケンス解析量は変化がないので、今後シーケンス分析費用がscRNA-seq解析のボトルネックとなることが予想される。本発明は、近い将来scRNA-seq解析費用の大部分を占めると予想されるシーケンス解析費用を1/2-1/3倍に削減でき、費用対効果を上昇させ、産業上の利用に関して大きく寄与するものと考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] 標的捕捉部を含む標的RNA捕捉オリゴにより、標的RNAを捕捉する、標的RNA捕捉工程；
- ターミナルトランスフェラーゼ活性を有する逆転写酵素を用いて逆転写反応を行うことにより、捕捉したRNAと相補的な配列の相補DNA鎖を合成し、少なくとも一部の相補DNAの3'末端に任意の数塩基からなる付加配列を付加する、相補鎖合成工程；
- 標的RNAを捕捉していない標的RNA捕捉オリゴを除去する、未反応オリゴ除去工程；
- RNA分解酵素によりRNAを分解する、RNA分解工程；
- dATP、dTTP、dCTP又はdGTPと連鎖停止ヌクレオチド三リン酸との存在下でターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼによる反応を行い、前記相補DNA鎖の3'末端にヌクレオチドホモポリマーを付加する、ホモポリマー付加工程；
- 前記ヌクレオチドホモポリマーに対し相補的な配列の相補的ホモポリマー部分を含むプライマーを含む第2鎖合成用プライマーを用いて、前記相補DNA鎖に対し第2鎖合成を行い、相補DNA鎖及び第2鎖で構成されるDNA二本鎖を生成する、第2鎖合成工程；及び
- 前記DNA二本鎖を鋳型として核酸増幅反応を行う、核酸増幅工程を含む、相補DNA鎖を増幅する方法。
- [請求項2] 標的RNA捕捉オリゴが、標的捕捉部の5'側に第1のアダプター部分を含み、第2鎖合成用プライマーが、相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むロングプライマーを含み、核酸増幅工程において、第1のアダプターを標的とするプライマーと、第2のアダプターを標的とするプライマーとを用いて核酸増幅反応を行う、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 第2鎖合成用プライマーが、相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むロングプライマーを含み、核酸増幅工程にお

いて、第2のアダプターを標的とするプライマーと、相補DNA鎖中の所望の領域を標的とするプライマーとを用いて核酸増幅反応を行う、請求項1記載の方法。

[請求項4] ロングプライマーが、第2のアダプター部分と相補的ホモポリマー部分の間にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含む、請求項2又は3記載の方法。

[請求項5] ロングプライマーの相補的ホモポリマー部分の鎖長が6～15塩基である、請求項2又は3記載の方法。

[請求項6] 標的RNA捕捉オリゴが、固相担体に結合していない遊離のオリゴであり、未反応オリゴ除去工程が核酸サイズ分画により行われる、請求項1記載の方法。

[請求項7] 標的RNA捕捉オリゴが、5'側から3'側に向かって、第1のアダプター部分、細胞識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含む、請求項6記載の方法。

[請求項8] 標的RNA捕捉オリゴが、固相担体に結合した固相化オリゴであり、未反応オリゴ除去工程がエキソヌクレアーゼ処理により行われる、請求項1記載の方法。

[請求項9] 前記固相担体がビーズであり、標的RNA捕捉オリゴが、5'側から3'側に向かって、第1のアダプター部分、ビーズ識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含む、請求項8記載の方法。

[請求項10] 前記固相担体がプレートであり、標的RNA捕捉オリゴが、プレートの複数箇所の区画に固定化され、5'側から3'側に向かって第1のアダプター部分、区画識別バーコード部分、及び標的捕捉部を含む、請求項8記載の方法。

[請求項11] 標的RNA捕捉オリゴが、標的捕捉部としてポリT部分を含む標的ポリA RNA捕捉オリゴを含み、標的RNAがポリA RNAを含む、請求項1記載の方法。

[請求項12] 相補鎖合成工程において、前記付加配列とハイブリダイズ可能な配

列を3'末端に含み、かつ、該配列の5'側にスイッチング配列を含むテンプレートスイッチングオリゴの共存下で逆転写反応が行われ、前記付加配列が付加された相補DNA鎖にテンプレートスイッチングオリゴをハイブリダイズさせ、該相補DNA鎖の3'末端にスイッチング配列と相補的な配列をさらに付加する、請求項11記載の方法。

[請求項13] テンプレートスイッチングオリゴが、前記付加配列とハイブリダイズ可能な配列としてGGG、GUG又はNGG（G及びUはリボヌクレオチドの塩基、NはA、U、G及びCから選択されるいずれかのリボヌクレオチドの塩基であり、1個以上のヌクレオチドアナログを含んでいてもよい）を3'末端に含むオリゴヌクレオチドを含み、スイッチング配列が第2のアダプター部分を含む、請求項12記載の方法。

[請求項14] スイッチング配列が、第2のアダプター部分の3'側にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含む、請求項13記載の方法。

[請求項15] 標的RNA捕捉オリゴが、固相担体に結合していない遊離のオリゴであり、未反応オリゴ除去工程が、標的RNAを捕捉していない標的RNA捕捉オリゴ及び相補DNA鎖にハイブリダイズしていないテンプレートスイッチングオリゴの核酸サイズ分画による除去を含む、請求項12記載の方法。

[請求項16] 第2鎖合成用プライマーが、相補的ホモポリマー部分の5'側に第2のアダプター部分を含むロングプライマーと、相補的ホモポリマー部分を含まず、第2のアダプター部分をその3'側に含むショートプライマーとを含む、請求項12記載の方法。

[請求項17] ロングプライマーが、第2のアダプター部分と相補的ホモポリマー部分の間にランダムな配列からなる分子バーコード部分を含む、請求項16記載の方法。

[請求項18] 相補鎖合成工程において、前記テンプレートスイッチングオリゴの共存下で、鎖置換活性をさらに有する逆転写酵素を用いて逆転写反応が行われ、テンプレートスイッチングオリゴがハイブリダイズした相

補DNA鎖に対する第2鎖合成が行われる、請求項12記載の方法。

- [請求項19] 連鎖停止ヌクレオチド三リン酸が、ddNTP、ddNTPの誘導体、3'-dNTP、又は3'-デオキシ-5-メチルウリジン-5'-三リン酸である、請求項1記載の方法。
- [請求項20] ddNTPの誘導体が、OH基を有しない原子団で3'位が修飾されたddNTPである、請求項19記載の方法。
- [請求項21] 連鎖停止ヌクレオチド三リン酸がddNTPである、請求項19記載の方法。
- [請求項22] ホモポリマー付加工程において、dCTP及び連鎖停止CTPを添加してポリC付加を行う、請求項1記載の方法。
- [請求項23] RNA分解工程とホモポリマー付加工程が同時に実施される、請求項1記載の方法。