

# 研究報告書

## 「組織内の細胞多様性を明らかにする超並列ゲノム解析技術の創成」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015年10月～2019年3月

研究者: 細川 正人

### 1. 研究のねらい

遺伝子解析技術の進歩により、生体を構成する細胞の遺伝的多様性が明らかにされ、種・個体間の遺伝的差異と形質に関する理解が進んだ。さらに、細胞多様性を1細胞単位でゲノムレベルから調べることが可能になれば、複雑な生体組織中に存在する希少な細胞や難培養性の微生物の本質を捉えることができ、細胞多様性・不均質性の実態に迫ることができる。しかし、たった1つの細胞から全ゲノム配列情報を解読するのは容易ではない。ゲノム配列の決定には、同じ配列を何度も繰り返し読み取り、精度を保証する必要がある。このために、非常に僅かなシングルセルゲノムを精度よく複製して何万倍にも増やさねばならない。これには、細胞1つずつに微量な試薬を加えて反応を行う操作が必要である。また、細胞多様性の評価には少なくとも数百個の1細胞の分析が求められ、試料調製から分析に至る操作の大規模化・並列化が鍵となる。従来のライフサイエンス実験機器には、このような超並列的な微量生体分子解析を実現するものがなく、1細胞の正確なゲノム配列情報を大量に取得することは不可能であった。

本研究では、従来の限界を打破する新技術を創出することを目的とし、微量液体・生体分子を高密度・高精度に制御することができる「マイクロ流体技術」を駆使して、何万個もの細胞を1つずつ小さな液滴で制御し、数万のシングルセルゲノムを対象とした生化学反応を並列進行させるプラットフォーム開発を目指した。この超並列的なゲノム解析試料調製技術を確立したのち、並列取得される多様なゲノム配列情報から増幅時に生じたエラーを補正し、完全長に近いゲノム配列を未培養微生物から取得するためのデータ解析パイプラインの開発も進めた。これらの技術確立をもとに、腫瘍や神経などの組織中の個々の細胞だけでなく、1細胞解析の応用がまだ広がっていない環境微生物までを対象とし、ゲノムの一斉解析とその多様性の理解を実現する「超並列1細胞ゲノム解析法」の開発に取り組んだ。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

生体組織内の細胞階層や多様な環境微生物の有り様を知るには、細胞1つずつの個性を計測する分析技術が必要である。ゲノムは細胞の個性を説明する基礎情報であるが、細胞1つからゲノム配列を解読するのは容易ではなく、わずかなゲノム DNA を精度よく複製して何万倍にも増やしてから正確に読み取りを行う必要がある。本研究では、研究者が着想した反応機構を基礎として従来の技術課題を克服し、細胞1個から全ゲノム情報を網羅的に解読する技術を確立した(図1)。

本法では、マイクロ流体デバイスを用いて直径数十 $\mu\text{m}$ の液滴を秒速千個もの速度で作成し、その内部に細胞を1つずつ閉じ込める。その後、液滴内部の細胞を薬剤で溶かし、

内部に DNA を保持したまま酵素反応により複製する。液滴融合により、試薬導入を繰り返して実行できるようにし、連続多段階の反応を実現した。液滴内の複製 DNA を次世代シーケンサーで解析することで、動物細胞や微生物 1 個のゲノムを高精度に解読できる。

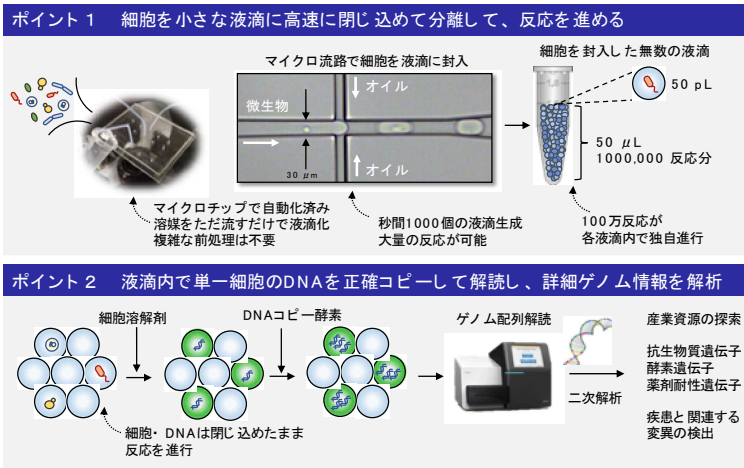


図 1. 本研究で開発したシングルセルゲノム解析プラットフォーム

### 従来の DNA 複製反応

では、反応容積が細胞 1 個に対して過度に大きく、空気中の埃や実験者の DNA の混入によってデータの過半数以上が汚染されることが頻繁にあった。本技術では、細胞 1 個サイズの小さく閉じられた液滴内で全反応を行うため、複製 DNA の 99%以上が標的生物由来となる世界最高精度を持つ。また、均質サイズの液滴を用いて試験管 1 本の中で数十万個の細胞から一斉に DNA 複製ができる。DNA 配列解読については、独自の計算プログラムにより、多種の細胞の準完全長ゲノム配列を一斉に獲得する機能を開発した(Sci. Rep. 2017、2018 にて報告)。本技術を用いれば、わずか数日のうちに土壌微生物や腸内微生物のゲノム情報を百種類以上も新規決定でき、高等動物の 1 細胞解析にも応用可能である。

本技術は、世界で初めて、微生物のゲノム多様性を一挙に明らかにできる実用性の高い計測手法である。本成果を元に、微生物を対象とした世界初のシングルセルゲノム解析サービスを提供する研究成果活用ベンチャー bitBiome 株式会社を 2018 年 11 月に設立した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A「シングルセルゲノム並列増幅のための微小液滴制御システムの開発」

本研究では、ピコリットル容量の液滴を 1 細胞反応場として利用し、液滴制御を担う各種機構をモジュール式に組み合わせ、細胞封入、溶解、ゲノム増幅、を経てシーケン斯拉イブラリを構築するシステムを組み上げた。開発した全ゲノム増幅法 single droplet multiple displacement amplification (sd-MDA)法では、細胞と細胞溶解液をマイクロ流体デバイスで合流させ、単一細胞を封入した微小液滴を作成する。続いて、回収した微小液滴内の細胞を溶解した後に、もう一つのマイクロ流体デバイスに通し、各液滴に MDA 反応液滴を融合させる処理を行う。この液滴をインキュベートすることで、各液滴内でゲノム増幅反応が行われ、数万のシングルセル増幅ゲノムが超並列的に取得される。大腸菌および枯草菌を用いた実証実験では、クロスコンタミネーションがなく、各液滴が個別のゲノム増幅反応場として機能している事を示した。(図 2A)

本手法の利点として、高いスループット性はもちろんのことながら、目的外 DNA 増幅の抑制効果が大きいことが挙げられる。全ゲノム増幅反応では反応環境に実験環境中のエアロゾルや実験者由来の DNA がコンタミネーションすれば、それらの DNA も同様に増幅されるため、取得配列情報が意図しない物に置き換わってしまう恐れがある。本法では、ピコリット

ル容量の液滴を反応場とすることで、反応空間への非標的分子の混入リスクが抑えられ、従来のマイクロチューブ反応と比べてコンタミネーションの極めて少ないゲノム増幅産物が取得されている。(図1B)また、1細胞当たりの反応空間を小さくしたことによって、MDA反応に必要な試薬コストも100分の1未満にまで減少している。本手法により、従来のシングルセル解析の課題であった試料調製スループットとコンタミネーションの課題解決に至った。本成果は Sci. Rep.にて2017年に報告した。

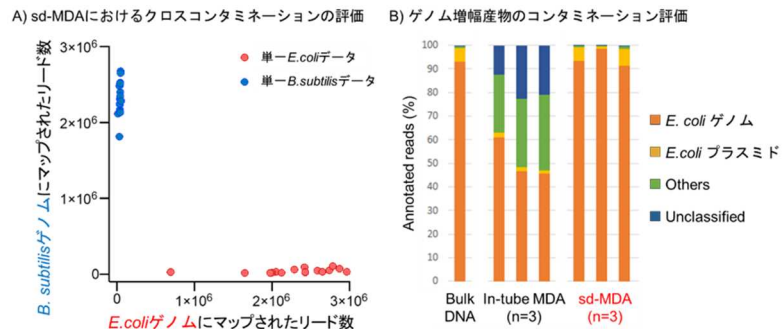


図 2. sd-MDA 法を用いた大腸菌・枯草菌シングルセルゲノムのシーケンス

あった試料調製スループットとコンタミネーションの課題解決に至った。本成果は Sci. Rep.にて2017年に報告した。

### 研究テーマB「シングルセルゲノム配列データの高精度化パイプラインの開発」

シングルセル増幅ゲノムの過程ではキメラ配列などの本来存在し得ない人工的な配列断片が生じ、その配列はシーケンスデータ中にも含まれる。環境微生物のようなゲノム未知サンプルの場合、エラー配列を正しく判定し除去することは非常に困難であった。そこで、リファレンスの無い未培養微生物からもエラーを除いた高精度なシングルセルゲノムデータを獲得できる技術開発を目指し、シーケンスデータのエラー除去・統合を自動化したシングルセルゲノムアセンブリパイプライン ccSAG (cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes) を開発した。本ツールでは、同一種由来の複数のシングルセルに由来するデジタル配列データを *in silico* で相互に比較することで、ゲノム増幅時にランダムに生じた増幅エラー配列および非ゲノム配列をデータ間の非共通性から検出し、その配列を除去する。続いて、クリーニングした複数のデジタル配列データを統合してアセンブリする。枯草菌のシングルセルデータを用いたツールの性能評価では、データ中に含まれる増幅エラー配列を17.2%から0.2%にまで減少させることができた(図3A)。シングルセルデータをクリーニングしてからアセンブリすることによって、アセンブリ時のエラーが生じにくく、エラーがなくゲノムカバー率の高い高精度なドラフトゲノム配列を獲得できる。特に、8個程度のシングルセルデータを統合すれば、多細胞集団を用いた場合と同等以上の高質なドラフトゲノムの取得が達成される(図3B)。

本法は、先述したsd-MDA法と組み合わせることで、コンタミネーションの無いデータの相互参照を実行できるため、アセンブリ精度の向上効果がより一層大きく得られる(図

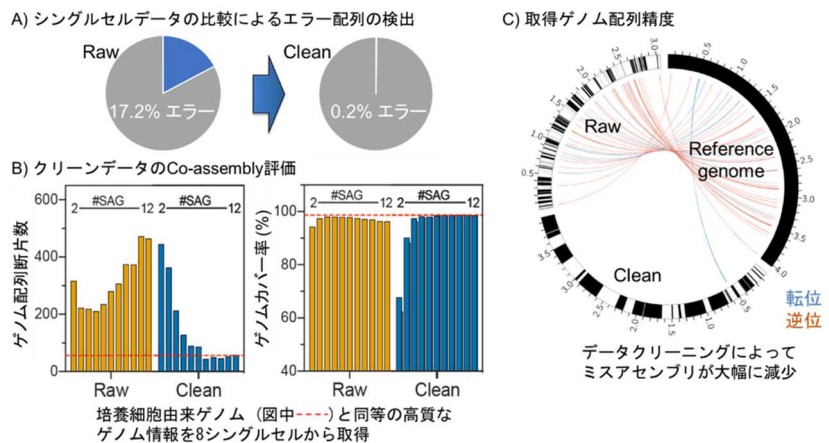


図 3. ccSAG を用いた高精度枯草菌シングルセルゲノムシーケンスデータの高精度化

3C)。マウスの腸内細菌を用いた実証実験において、sd-MDA 法を用いて取得した約 70 個のシングルセルデータをもとに ccSAG 処理を行った結果、2 種類のメジャー種から新規 *Prevotella* 様細菌のハイクオリティドラフトゲノム(97%以上のカバーレッジ)が得られた。このゲノム配列を詳細解析することで、これらの未培養細菌の特定遺伝子上の SNP を 1 細胞レベルで検出できることを実証している。以上より、従来のシングルセル解析の課題であったキメラ配列、アセンブリ後のゲノム配列精度の問題の課題解決に至った。本成果は Sci. Rep.にて 2018 年に報告した。

### 研究テーマ C「未培養微生物大規模シングルセルゲノムシーケンスの実証」

sd-MDA と ccSAG を組み合わせたシングルセルゲノム解析は様々なサンプルへの応用が可能であり、未培養微生物のゲノム情報の蓄積に大きく貢献できると期待される。さきがけ研究実施期間中の研究領域の動向として、マイクロバイーム領域からシングルセルゲノム解析技術要求が強まり、多くの共同研究提案を受けたため、未培養微生物を対象としたゲノム解析の応用に注力し研究開発を進めた。

これまでの応用例として、ヒト・マウス由来腸内細菌、サンゴ・カイメン・昆虫共生細菌、土壌(土漠・海泥・根圏)細菌、海洋性細菌、空中浮遊細菌などがあり、現在データの解析中である。ここでは、特に大規模なシングルセルゲノム解析を実施した2例の成果を紹介する。

#### (1)食餌に伴う腸内細菌叢の変動メカニズムをシングルセルゲノムから説明する

腸内細菌の発酵基質として知られるイヌリンをマウスの食餌に添加し2週間の給餌試験を行った。従来の菌叢解析法である 16S rRNA 遺伝子を対象とした腸内細菌叢組成の解析から、イヌリン給餌群において *Bacteroides* 属細菌が有意に増加することが確認された。また、腸管の短鎖脂肪酸の解析から、イヌリン給餌群において、コハク酸と酪酸の有意な産生増加が認められた。従来の腸内細菌叢解析では、ここまでのデータしか得られずイヌリン給餌への応答が示唆される *Bacteroides* 属細菌の特徴・応答メカニズムは不明である。そこで、給餌試験前後の糞便サンプルからシングルセルゲノムを 400 個超解析し、優占細菌種のゲノム取得を行った。比較ゲノム解析の結果、イヌリン給餌により有意に増加した2種の *Bacteroides* ゲノム上にも、イヌリン分解能を有する遺伝子クラスター(Polysaccharide Utilization Loci)が確認された。これらの *Bacteroides* ゲノムにはコハク酸産性に関わる代謝関連遺伝子パスウェイの存在も確認でき、イヌリン摂食マウスで短鎖脂肪酸産生量が増加する結果とも合致した。このように、シングルセルゲノム解析によって、従来のメタ 16S 解析解析での推定の範囲を超え、菌叢変動のメカニズム解明に繋がる知見を得られることを実証した。本成果については、現在、論文投稿の準備を進めている。

#### (2)海外での多様な環境からのオンサイト細菌サンプリングとシングルセルゲノム解析

サウジアラビア KAUST アブドラ王立科学技術大学 の五條堀孝 教授のラボにシングルセルゲノム解析プラットフォームを移送し、現地でオンサイト細菌サンプリングとシングルセルゲノム解析を行った。土漠、紅海の水・海泥、マングローブ群生域の土壌などでサンプリングを行い、各サンプルから単離した微生物画分を上記プラットフォームで約 2,000 のシングルセルゲノムサンプルを調製し、内半数から細菌・アーキア由来のゲノムシーケンスデータを獲得した。その多様性は 34 門に渡り、現在個々の環境と細菌種の代謝能との関連などをゲノムから解析している。過去のシングルセル細菌解析例と比べても、最も大規模に環境

細菌のデータを取得した研究例となる見込みで、現在論文投稿の準備を進めている。

### 3. 今後の展開

従来の(特に微生物を対象とした)シングルセルゲノム解析技術は、ゲノム解読につながるまでの工程に課題が多く残され、精度・速度面でユーザーのニーズを満足させる物がなかった。幅広い微生物種に適応可能で、一般実験室でも実行できるような簡易で効果的な方法の開発が求められてきた。本研究で開発したシングルセル解析プラットフォームは研究者が独自に着想・開発し、短期間で実用化レベルまで完成させたもので、これらのニーズに応えることができる。マイクロ流体技術を扱う微細加工技術、分子生物学的実験手法、バイオインフォマティクスを組み合わせ、世界初の多段階反応と高度情報処理が実現されている。従来技術と比較して、ゲノム解析の規模と精度が格段に向上し、さらに操作が極めて簡易になり、一連の計測の再現性・速度が大幅に改善された。これを利用することで、腫瘍・神経・皮膚疾患などの生体組織から、土壌・海洋・腸内由来の環境微生物まで多岐にわたる多様な生物のゲノムを一斉に解析できる基盤が確立された。

現在は、外部の研究機関から試料分析の依頼を数多く受け付けて応用段階に移行しており、社会実装の母体として、研究者が中心となり研究成果活用ベンチャーbitBiome 株式会社を設立した。本技術を介して、様々な疾患メカニズムの解明に迫り、次世代の診断治療・創薬分野の開拓ができると考えている。たとえば、極小のがん組織サンプルから遺伝子変異情報を調べれば(研究成果 Sci. rep.にて 2017 年に報告)、適切な分子標的薬の投与指針を得ることができる。また、海洋や土壌などの環境やヒトマイクロバイオームの微生物ゲノム情報を本技術で圧倒的な速度で収集できるため、これを情報資源とすれば新規の産業用酵素や抗生物質の発見、マイクロバイオームの機能理解につながり、国内産業の発展への貢献が期待できる。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究では、当初は哺乳類細胞を標的としたシングルセルゲノム解析を想定したが、マイクロバイオーム領域から技術要求が強まり、多くの共同研究提案を受けたため、未培養微生物を対象とした応用に注力した。研究費は装置・試薬の購入などに効果的に活用し、マイクロ流体デバイスを基礎としたプラットフォーム開発と、特にコストが嵩むシーケンス解析を滞りなく実施することができ、スピード感を持って技術開発を進めることができた。さきがけ内での共同研究 FS も複数件実施し、共同研究で得られた情報が本研究にも生かされた。この結果、従来困難とされてきた微生物シングルセルゲノム解析に必要な技術要素の段階的な開発が進み、当初の想定を超える成果が得られ、その要素技術を論文報告に結びつけることができた。研究成果を総説・解説・招待講演等で紹介する機会も増え、illumina 社や QIAGEN 社の広報誌などに取り上げられ、海外からも共同研究依頼が複数件届くなど、微生物シングルセルゲノム解析のパイオニアとして着実に認知を深められたと考えている。今後は国内外の研究者との共同応用研究を発信できる見込みである。なりよりも、成果蓄積の結果、研究者が中心となって研究成果活用ベンチャーを設立するに至ったことが大きな成果であり、社会実装への次のステップの土台

を築くことができた。ビジネス上の資金調達・チームビルディングも順調に経過しており、さきがけ発ベンチャーとしての発展を目標に、今後数年間で飛躍的な事業成長を目指し研究成果を広範な分野に活用して社会還元を進める。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

マイクロ流路を用いて直径数十  $\mu\text{m}$  の液滴内に細胞を一個ずつ封じ込めた液滴を秒速千個もの速度で作出し、その液滴を上手く利用して、1細胞のDNAを読み取り可能な量まで個別・並列に増幅し、細胞1つ1つの遺伝情報を決定する手法を、かなり完成度の高いレベルで確立しました。本手法によって、これまで未知であった微生物のゲノムを1細胞単位で一挙に解読できることを実証しました。これは、機能や存在がほとんどわかっていない土壌細菌・腸内細菌の解析において非常に有効な技術となると期待されます。将来は、ヒトの健康を増進する共生微生物を特定することや、抗生物質や産業用酵素を作り出す新規微生物を探索し、利活用につなげるなどの発見がなされることも期待されます。

コア技術は論文化や特許出願がなされており、これらの技術を軸に、微生物を対象とした世界初のシングルセルゲノム解析サービスを提供する研究成果活用ベンチャーbitBiome 株式会社を設立しています。すでに、海外研究機関を含めた共同研究も進めています。さきがけ研究で得た技術の社会実装化・普及を積極的に進めている点も高く評価されます。

これらの傑出した成果に対し、本領域からは「イノベーション賞」を贈りました。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- 1.Kogawa M, Hosokawa M, Nishikawa Y, Mori K, Takeyama H. Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes. Scientific reports 8(1) 2059 2018 年
- 2.Hosokawa M, Nishikawa Y, Kogawa M, Takeyama H. Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics. Scientific reports 7(1) 5199 2017 年
3. Yoda T, Hosokawa M, Takahashi K, Sakanashi C, Takeyama H, Kambara H. Site-specific gene expression analysis using an automated tissue micro-dissection punching system. Scientific reports 7(1) 4325 2017 年

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(非公開)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な招待講演

- (1) Masahito Hosokawa “Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by single-cell genome sequencing” FRONTIERS OF GENOME SCIENCE, The University of Tokyo, 2019/1/10
- (2) 細川正人 “微小試料からの機能ゲノム解析—組織から 1 細胞, 微生物まで—” 第 69 回生物工学会 シンポジウム「若手研究者が切り拓く, 1 細胞解析技術の最先端」、早稲田大学、2017/9/14

受賞

- (1) 細川正人 日本化学会第 96 春季年会 優秀講演賞(学術) “Droplet microfluidics for massively parallel and accurate single-cell genome amplification” 2016/5/13

解説・総説

- (1) 細川正人、丸山徹、西川洋平、竹山春子、実験医学別冊 シングルセル解析プロトコール “微生物のシングルセルゲノム解析”の項、羊土社、2017 年

新聞報道

- (1) 2016年11月25日掲載、日経産業新聞[先端技術面]、「DNA を高速コピー 早大など水滴に細胞閉じ込め 3時間で数万個に」