

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14907

研究課題名(和文) 網羅的シングルセルゲノミクスの技術基盤構築-究極の環境微生物解析ツールを目指す-

研究課題名(英文) Development of procedure for single cell genomics of sedimentary microbial cells

研究代表者

星野 辰彦 (HOSHINO, Tatsuhiko)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・主任研究員

研究者番号：30386619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：単一細胞のゲノムDNAを解読するシングルセルゲノミクスは、微生物の系統および機能に関する情報を網羅的に得ることができるため、環境中の微生物生態を解析する上で非常に有効なツールである。しかし、微生物細胞一つに含まれるDNAは非常に微量でありそこから遺伝子解析をするために十分な量のDNAを増幅することは容易ではなく、海底下深部堆積物に生息する微生物への適用は限られている。本研究では、新たにタンパク質分解酵素を用いた溶菌プロセス、メタルプレートを用いた遺伝子増幅反応を取り入れることで、コンタミネーションを排除するとともに効率的に海底下堆積物中の単一細胞から遺伝子を増幅する新たな方法論を確立した。

研究成果の概要(英文)：Single cell genomics is an effective tool for understanding microbial ecology in the natural environment because it can provide comprehensive information on microbial phylogeny and metabolic function. However, application of single cell genomics to microbial cells in subseafloor environment is hampered by the fact that DNA content in a single cells is very little to be amplified to enough amount for sequencing. In this study, we developed a procedure where proteinase K is used for lysis of cells and a metal plate is used for multiple displacement amplification of genomic DNA. As a result, we successfully amplified genomic DNA from sorted single cells isolated from subseafloor sediment.

研究分野：環境微生物学

キーワード：微生物 DNA増幅 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

地球表面の7割を覆う海底の下に広がる堆積物環境には生命は存在しないと長きにわたって思われてきた。しかし、1990年代に行われた調査により海底下堆積物には実は膨大な数の微生物が存在することが明らかとなった。その後もODPおよびIODPをはじめとした科学掘削航海がその全容を明らかにしてきており、海底下に棲息する微生物の存在量は炭素量に換算して地球上の全生物量の1-30% (Parkes *et al.*, 1994; Kallmeyer *et al.*, 2012)と見積もられている。

海底下に棲息する微生物は殆どが単離・培養することができない未知のものである。そこで、16S rRNAをPCRで増幅しシーケンスを行うことで、微生物群集構造、すなわち「誰がいるのか」の解析が行われ、徐々にその姿が明らかになってきている。一方で、16S rRNA遺伝子による解析では、微生物の代謝機能に関する情報を得ることができないため、微生物が海底下で「何をしているのか」については殆ど分かっていない。

この疑問に応えることのできるアプローチの1つがメタゲノミクスであり、近年、土壌や海洋など様々な自然環境にも応用されている。今まで未知だった自然環境中での微生物の役割が明らかになってきている。メタゲノミクスでは、微生物群集から抽出してきたDNAを断片化し、それらの遺伝子配列を全て読んでしまう方法である。この方法では、ある環境試料に内包される微生物の機能、種類の情報をバルクとして得ることができる。また、得られるデータのクオリティが高ければそこから微生物の個々のゲノムを*in silico*で再構築することも可能である。何れにしても、個々の微生物の機能を明らかにすることは困難である。また、海底下の堆積物はバイオマスが極端に少なく、得られるDNA量がメタゲノムを行うのに十分でないことが殆どである。そこで、海底下微生物の機能に迫るためには、微生物細胞1つからゲノムを決定するシングルセルゲノミクス (Kashtan *et al.*, 2014) が有効であると考えられる。シングルセルゲノミクスでは、細胞内の1分子のゲノムDNAをMultiple Displacement Amplification (MDA)等で増幅することによりゲノム解読を実現するが、技術的なハードルが高い。すなわち、夾雑物の中から標的細胞1分子を分取する技術、1分子のDNAからゲノミクスを行える量までの増幅、コンタミネーションフリーの実験環境の構築、効率的な細胞の溶解方法などの技術的課題を解決する必要があり、国内はもとより海外においても、その方法論は殆ど確立されていない。

2. 研究の目的

環境微生物、特に地下深部微生物のシング

ルセルゲノミクス、すなわち環境中の微生物の量・多様性・生理機能についての情報を全て同時に得ることのできる究極の分析ツールの技術基盤の確立を目指し、基礎的な知見の収集を行う。

具体的には、クリーンルーム内に配置されたセルソーターもしくはレーザーマイクロダイセクションを用いて、堆積物から微生物細胞1つ1つをコンタミネーションフリーの環境でウェルプレート等に分離、溶菌、MDAによるDNA増幅を行い、次世代シーケンサーにより個々の細胞のゲノム解読に繋げるための一連の方法論を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の分取方法の検討

現在のシングルセルゲノミクスで主流となっているのはセルソーターで細胞を分取する方法であり、この方法論はある程度確立されているがセルソーターで分取するためには、堆積物から細胞を剥離し分散などの前処理が必要である。一方で、このような分散処理を経ずに、顕微鏡で見た細胞をそのまま分取することを可能にするのがレーザーマイクロダイセクション (LMD) である。そこで、*P.denitrificans* および *P.stutzeri* などの純粋菌株を培養し、4% PFAで一晩固定したのち、LMD用フォイル付きスライドに滴下し、顕微鏡下 (MMI社 CellCutPlus) での分取を試みた。

また、セルソーターによる細胞の分取に関しては、堆積物サンプルから細胞を剥離し、ストレイナーに通したのちDNAを染色し、ベックマンコールター社のMoFlo XDPにより細胞を分取した (Morono *et al.*, 2013)。全ての作業は、コンタミネーションを避けるため海洋研究開発機構高知コア研究所のシングルセルラボ内 (図1) で行った。



図1 高知コア研究所シングルセルラボ
レーザーマイクロダイセクション、セルソーター、分注機などがクリーンルーム内に配置されている。

(2) 細胞の溶解方法の検討

分取した細胞に含まれるゲノムDNAを増幅するためには、細胞壁を溶解する必要がある。通常は水酸化カリウム溶液などの強アルカリ溶液とともに加熱することにより細胞壁を溶解するが、この方法を用いると溶解

後に中和する操作ステップを加える必要が有るため、コンタミネーションのリスクが増すと同時に、生じた塩がその後の反応を阻害することにも繋がる。そのため本研究では、プロテナーゼ K により細胞壁を溶解させる方法を採用した。

(3) ゲノム DNA 増幅

DNA は Multiple Displacement Amplification (WGA) で増幅した。シングルセルゲノムの増幅に際しては、試薬からの DNA の持ち込みも防ぐ必要が有る。そのため、本研究においては内因性のコンタミネーション DNA を除去した phi29 DNA polymerase (関東化学) を用いた。またプライマーダイマーの生成を防ぐため通常の DNA プライマーではなく結合をホスホロチオエート (S 化) RNA のランダムヘキサマーを用いた (Takahashi *et al.*, 2009)。

4. 研究成果

(1) 細胞の分取

LMD を用いて、フォイル上に塗布した細胞サンプルからの分取を行った結果、テストした純粋菌株に関してはシングルセルを分取することが可能であった。ただし、サンプルを乾燥させる必要が有るため、著しい蛍光の退色が認められた。そこで、SYBR Green I, SYTOX, SYTO84, プロビジウムイオダイドなど様々な蛍光色素による染色をテストしたが、乾燥条件下で十分な蛍光が得られなかった。そのため、夾雑物中の細胞を切り出す必要のある堆積物サンプルでは LMD の適用が困難であり、今後さらなる検討が必要であることがわかった。

セルソーターによる分取に際しては、一般的にソートに用いるプラスチック製のウェルプレートから生じる静電気が細胞をウェル外に飛ばしてしまうことが問題であった。そこで本研究では、静電気を発生しないステンレス製のウェルプレートを作成した (図 2)。

作成した金属プレートを用いたソーティング実験を行ったところ、静電気による影響

を排除することが可能であり正確に細胞をウェル内部にソートできることが確認された。

(2) 細胞の溶解方法の検討

細胞の溶解にプロテナーゼ K を用いることは DNA 抽出では一般的である。しかしながら、プロテナーゼ K は生体由来の酵素なので、これをシングルセルゲノムからの DNA 増幅に適用するためには、前述の phi29 DNA polymerase と同様、内因性のコンタミネーションを除去する必要がある。本研究では、HL-dsDNase (ArcticZymes) でプロテナーゼ K を処理することで内因性コンタミネーション DNA の除去を行った。プロテナーゼ K、DNase を混合し、pUC18 DNA を室温で 2 時間処理した結果、DNA の分解が確認され、DNase はプロテナーゼ K により分解されないことが示された。さらに、DNase を失活させた後再度、pUC18 DNA を加えたところ分解が確認されなかったため、このプロテナーゼ K はシングルセルからの遺伝子増幅の前処理に適用可能であることがわかった。国内外におけるこれまでのシングルセルゲノミクスでは、アルカリ処理による溶菌のみが行われてきた。しかしながら、この方法単独ではゲノムの増幅が確認されない細胞が多く存在し、ゲノム増幅の成功率が非常に低くなってしまいうケースが多かった。本研究の成果により、シングルセルからのゲノム増幅の最初の反応ステップである溶菌に、プロテナーゼ K による処理という新たな選択肢を加えることができ、今後、シングルセルゲノミクスの適用の幅が広がることが期待される。

(3) MDA によるゲノム DNA 増幅

メタルプレートにシングルセルを分取後、プロテナーゼ K で溶菌、MDA を行う一連のプロセスを行った。メタルプレート内での MDA の際は溶液の蒸発を防ぐために、ミネラルオイルを重層し、反応後、ウェル底から増幅産物を回収する。平底のメタルプレート (図 2(A)) では、反応後の溶液の回収率が 50% を切る 경우가多く、増幅効率も低くなることが判明した。そこで、この問題点を解決するため丸底のメタルプレートを新たに設計した。さらに、ウェル内に導入した反応溶液が金属表面に広がるのがロスに繋がっていることがわかったため、水溶液の接触角を増大させる目的で金属の表面をシリコンコートした。その結果、反応後の溶液の回収率は 90% 程度に改善された。

丸底のメタルプレートを用いて実サンプルによるテストを行った。サンプルは、平成 22 年度および 24 年度海洋調査船「なつしま」により行われた NT10-16 および NT12-13 航海により、与那国海丘および上越沖から得ら



図2 ステンレス製ウェルプレート (A)平底 (B)丸底

れた堆積物試料を用いた。試料から細胞を分取し、メタルプレートにソートした後ゲノム増幅を試みた結果、10 および 100 細胞を分取したウェルからは 100% 増幅が確認された。さらに、1 細胞ずつ分取したウェルからの増幅成功率は 10% 以上となり、これまでの堆積物へのシングルセルゲノム増幅適用例に匹敵する成功率を達成した。

増幅された MDA 産物を希釈後、16S rRNA 遺伝子を増幅し、シーケンスを行ったところ全て単一細胞由来の増幅産物であることが確認され、本研究で行った一連の方法論の有効性が示された。

< 引用文献 >

Parkes RJ, Cragg BA, Bale SJ, Getliff JM, Goodman K, Rochelle PA, Fry JC, Weightman AJ, Harvey SM. 1994. Deep Bacterial Biosphere in Pacific-Ocean Sediments. *Nature* 371:410-413.

Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S. 2012. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:16213-16216.

Kashtan N, Roggensack SE, Rodrigue S, Thompson JW, Biller SJ, Coe A, Ding H, Marttinen P, Malmstrom RR, Stocker R, Follows MJ, Stepanauskas R, Chisholm SW. 2014. Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science* 344:416-420.

Morono Y, Terada T, Kallmeyer J, Inagaki F. 2013. An improved cell separation technique for marine subsurface sediments: applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting. *Environ Microbiol* 15:2841-2849.

Takahashi H, Yamamoto K, Ohtani T, Sugiyama S. 2009. Cell-free cloning using multiply-primed rolling circle amplification with modified RNA primers. *Biotechniques* 47:609-615.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Tatsuhiko Hoshino and Yohei Hamada, Estimation of the influence of equencing errors and distribution of random-sequence tags on quantitative sequencing, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, accepted, (査読有り),

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.04.003

Tatsuhiko Hoshino and Fumio Inagaki, Distribution of anaerobic carbon monoxide genes in deep subseafloor sediments, *Letters in Applied Microbiology*, vol. 64, 2017, 355-363, (査読有り), DOI: 10.1111/lam.12727

Tatsuhiko Hoshino and Fumio Inagaki, Application of stochastic labeling with random-sequence barcodes for simultaneous quantification and sequencing of environmental 16S rRNA genes, *PLoS One*, vol. 12, 2017, (査読有り), DOI: 10.1371/journal.pone.0169431

[学会発表] (計 9 件)

Tatsuhiko Hoshino, Lars Woemer, Bernhard Viehweger, Xiao Nan, Yuki Morono, Kai-U Hinrichs, Fumio Inagaki, Global distribution pattern of aerobic and anaerobic communities in deep subseafloor sediments. *Goldschmidt 2016*, 26 June – 1 July., 2016, Pacifico Yokohama, Kanagawa, Japan

星野辰彦、諸野祐樹、稲垣史生、海底下微生物圏の解明を目指した技術開発、環境バイオテクノロジー学会 2016 年度大会 (招待講演) 2016 年 6 月 14 日、サテライトキャンパスひろしま、広島県広島市

星野辰彦、土岐知弘、井尻暁、諸野祐樹、町山栄章、芦寿一郎、稲垣史生、海底下泥火山から水圏への海底下微生物群集の拡散、日本地球惑星科学連合 2016 年度大会、2016 年 5 月 24 日、幕張メッセ、千葉県千葉市

星野辰彦、諸野祐樹、稲垣史生、海底下生命のセンサス：海底下微生物群集の空間的分布と地球環境との相互作用の解明、2015 年 11 月 7 日、東京海洋大学、東京都港区

星野辰彦、地下深部微生物群集構造解析、第 4 回 NGS 現場の会、2015 年 7 月 2 日、エポカルつくば、茨城県つくば市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 辰彦 (HOSHINO, Tatsuhiko)
国立研究開発法人海洋研究開発機構研究・高知コア研究所・主任研究員
研究者番号：30386619