

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14656

研究課題名(和文) ロングリードを指向した1細胞ゲノム配列決定のための鋳型調製法

研究課題名(英文) A library preparation method for single cell genomic sequencing with long-read sequencers

研究代表者

三浦 史仁 (Miura, Fumihito)

九州大学・医学研究院・講師

研究者番号：50447348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： ニッキングエンドヌクレアーゼで消化することにより2本鎖DNAのフォワード鎖とリバース鎖のそれぞれの鎖に対し上下互い違いに切断を導入する。このDNAを加熱変性して1本鎖にした後、独自の1本鎖DNA同士のライゲーション技術によりアダプターを付加するとフォワード鎖とリバース鎖のそれぞれで読み出し開始位置の異なるライブラリーが調製可能となる。本開発ではこのようなユニークな特性をもつライブラリー調製法の開発を進めた。これまでにイルミナ社のシークエンサーで読み出し可能なライブラリーの調製を実現できている。今後、本手法をロングリードタイプのシークエンサーへ応用する予定である。

研究成果の概要(英文)： Using nicking endonucleases, DNA fragments with different cut sites in the top and bottom strands of double-stranded DNA can be prepared. Therefore, if a highly efficient method for adaptor tagging to single-stranded DNA is available, a sequencing library of DNA fragments with differential structures between the top and bottom strands of DNA may be prepared. In this project, we tried to establish such a protocol, based on a highly efficient single-stranded DNA ligation technology developed by us. The established protocol has been applied to sequencing using short-read sequencers like that from Illumina. In the future, we expect its application in long-read sequencers like that from Oxford Nanopore Technologies.

研究分野：ゲノムサイエンス

キーワード：ゲノム配列決定 1本鎖DNA ニッキングエンドヌクレアーゼ TACSライゲーション

### 1. 研究開始当初の背景

パシフィックバイオサイエンス社やオクスフォードナノポア社のシーケンサーは、現時点では読み出し可能なリード数こそ少ないものの、従来不可能だった数千塩基もの連続した配列の決定が可能である点に大きな特徴がある。この結果、多くのリピート配列はその境界を越えて配列決定されるため、ゲノムアセンブルの際にリピート配列の存在の影響を受けにくく、より長いコンティグを得ることが出来る。こういったロングリード型のシーケンサーで DNA の塩基配列を読み出すためには、まず、より長く断片化した DNA 分子に対して効率的に人工合成アダプターを連結する必要がある。

近年 1 細胞解析に代表されるような、より微量なサンプルからの DNA 塩基配列決定が実現され始めているが、ロングリード型シーケンサーのリードの長さを生かしつつ、限られた DNA をより有効に配列決定することが可能な鋳型調製技術の実現には多くの課題が残っている。その 1 つが DNA 断片化の際の切断点の位置に関するものである。一般的なライブラリー調製テクニックでは、DNA を切断した後、末端修復反応を行い、上下の鎖で同じゲノム位置まで末端位置を揃えた上で DNA リガーゼによってアダプター配列を連結する。この場合上下の鎖から得られるゲノム配列情報は上下同じ場所で切断されたものとなる。同じ配列の DNA 分子が多数得られる場合は何ら問題が無い。しかし 1 コピーしか存在しない 1 細胞解析を想定した場合、隣り合う DNA 断片の連続性を補償するデータが得られないことになり、その結果大きな情報の損失を伴うことが予想される (図 1)。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来技術を用いた 1 細胞ゲノム解析のライブラリー調製の際に起こりうるゲノム配列情報の連続性の喪失を補うライブラリー調製法を確立する。つまり、ニッキングエンドヌクレアーゼを用いると上下の鎖が互い違いに切断されるという特徴を生かし、上下の鎖から異なるゲノム上の切断点を持ったテンプレート分子を構築するための手法を確立する。

### 3. 研究の方法

ライブラリー調製の概略を図 2 に示す。まず、ニッキングエンドヌクレアーゼによって消化された DNA 断片を熱変性する。この消化断片に対して、申請者が独自に開発した TACS ライゲーション法 (図 3) 等を組み合わせてオリゴヌクレオチドアダプターを付加する方法を開発する。

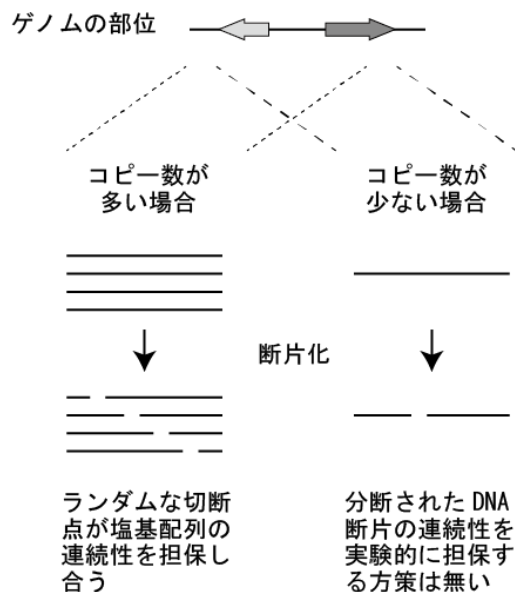


図 1 コピー数が限られている場合のライブラリー調製プロトコールの問題点

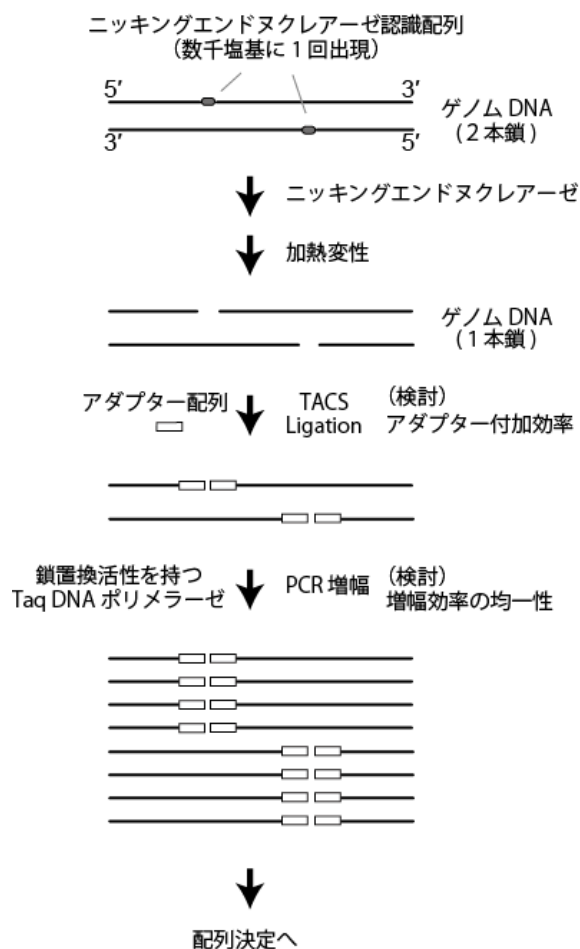


図 2 ニッキングエンドヌクレアーゼを用いると、2 本鎖 DNA から 2 種類の切断点を持った鋳型を調製することが出来る

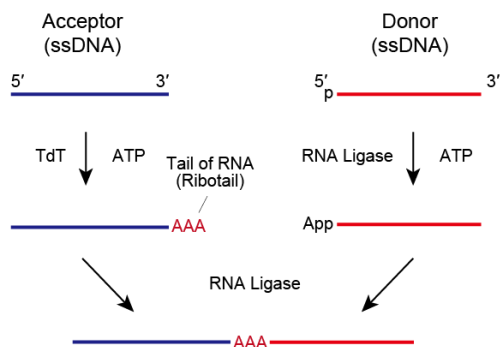


図 3 TACS ライゲーション法

標的の 1 本鎖 DNA に対して TdT を用いて予め短い RNA を付加することによってアダプター付加効率を飛躍的に増強することが可能となる

#### 4. 研究成果

##### 検討項目 1 高効率な RNA リガーゼの調製法の確立

TACS ライゲーションは様々な RNA リガーゼに対してその 1 本鎖 DNA 同士の連結効率を増強する効果があることが判っている。しかし、最終的な効率はやはり使用する RNA リガーゼの特性に大きく依存することも判っていた。それまでの検討からは T4 RNA リガーゼより耐熱性の RNA リガーゼが高い連結効率を示すことが明らかになっていた。特に RM378 RNA リガーゼや TS2126 RNA リガーゼは高い活性を示したが、これらの酵素は国内では供給体制が整っておらず、安定入手が困難であった。将来的に TACS ライゲーション法を広く利用してもらうためには安定供給されている市販の RNA リガーゼを用いた系を確立することが有効であると考えられ、そういった視点では Epicentre 社の CirLigase II が活性の高さ供給体制共に優れていた。しかし、本酵素は非常に高額で、研究費を圧迫する結果になった。そこで開発に用いる RNA リガーゼは自前で大量に調製し、反応条件を最適化した上で市販の酵素を適用するという戦略を採用した。クロマトグラフィーシステムを新規に導入し、いくつかのベクター系を用いた検討の結果、精製度の高い高活性の RNA リガーゼを安定に生産出来る条件を見いだすことが出来た。以降の検討は自前で調製した TS2126 RNA リガーゼを用いて進めた。

##### 検討項目 2 長鎖 DNA に対する TACS ライゲーションの適用可否の検討と最適化

ニックングエンドヌクレアーゼ処理した DNA 断片は数百から数千塩基のサイズとなる。これまで TACS ライゲーションは～100 塩基程度のオリゴ DNA 断片に対するアダプター付加

反応にしか適用された実績が無かった。そこで、より長い DNA に対してアダプター配列を連結することが可能かどうかを検討した。平均 500 塩基の 1 本鎖 DNA のモデルとしてバイサルファイト処理されたゲノム DNA を用い、3' 末端に蛍光標識したアダプター DNA が付加可能かどうかを検討したところ、標的 DNA に対して十分な蛍光シグナルの取込みが認められたことから、TACS ライゲーションは長鎖 DNA 断片に対しても適用可能であることが明らかになった (図 4)。

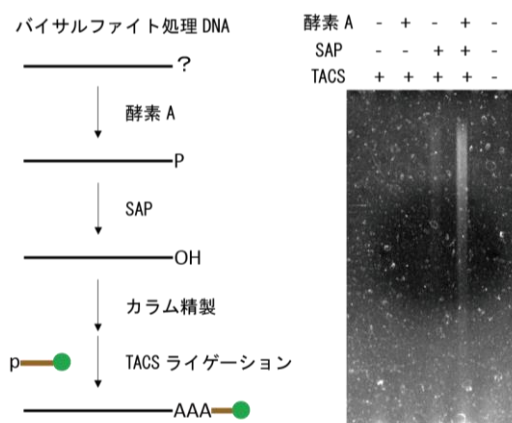


図 4 長い 1 本鎖 DNA に対する TACS ライゲーションによるアダプター付加効率の検討

バイサルファイト処理された DNA をモデルに TACS ライゲーションの効率を検証した例バイサルファイト処理の 3' 末端は特殊な構造をしているため、予め酵素処理により 3' OH 構造に変換する必要があります

##### 検討項目 3 ライブラリー調製スキームの選定と最適化

まず、TACS ライゲーションを用いた基本的なライブラリー調製の方針を決定した。いくつかのスキームが考えられ、それぞれを試したものの、最終的には TACS-Taq-T4 方式 (図 5) とよぶスキームが最も実用的であると判断した。

TACS-Taq-T4 方式では TACS ライゲーションによる標的 DNA の 3' 末端に対するアダプター付加反応の後、当該アダプターに対する相補鎖をプライマーとして用いて Taq DNA ポリメラーゼを用いて標的 DNA を 2 本鎖化する。2 本鎖化された DNA のもう一方の末端に対して T4 DNA リガーゼで 2 本鎖のアダプターを連結することにより両端にアダプター配列が連結された DNA 断片を得る。

TACS ライゲーションで用いるリガーゼを含む酵素開発や反応条件の最適化等で、モデルを用いた実験では最大 50%の効率で両端にアダプター配列が連結された分子を得ることが可能だった。

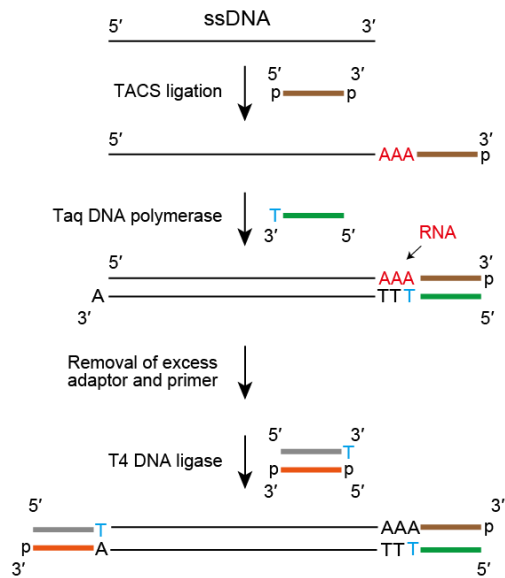


図 5 TACS-Taq-T4 スキーム

検討項目 4 ニッキングエンドヌクレアーゼで処理した DNA 断片を用いた鋳型調製

上記の最適化された TACS-Taq-T4 方式により、ニッキングエンドヌクレアーゼで消化されたヒトゲノム DNA からのライブラリー調製を実施した。その結果、アダプター配列に対するプライマーを用いて増幅可能なライブラリーが得られ、その配列決定が可能であることが確認された。得られた配列情報は実験原理から想定される構造と矛盾のないものであったことから、開発されたプロトコルが正しく動作していることが確認出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1, Miura, F., Ito, T., , Post-Bisulfite Adaptor Tagging for PCR-Free Whole-Genome Bisulfite Sequencing, *Methods Mol. Biol.*, 1708, 123-136, 2017 年, 査読無  
DOI: 10.1007/978-1-4939-7481-8\_7

[学会発表] (計 2 件)

1, Fumihito Miura., Methylome analysis based on enhanced single strand DNA ligation, France Japan Epigenetics Workshop, 2017 年

2, 三浦史仁、三浦美希、柴田由希子、伊藤隆司, 新しい 1 本鎖 DNA アダプターの連結反応を用いた高効率な WGBS のライブラリー調製法, 2017 年度生命科学系学会合同年次大

会, 2017 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 史仁 (MIURA, Fumihito)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 50447348