

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 22 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820365

研究課題名(和文) 微小反応場を利用した難培養微生物のシングルセルゲノム増幅法の開発

研究課題名(英文) Development of single-cell whole genome amplification method for uncultivable bacteria using droplet microfluidics

研究代表者

細川 正人 (Masahito, Hosokawa)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・助教

研究者番号：60722981

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)：本研究では、シングルセルゲノミクスの高精度化・ハイスループット化に向け、コンタミネーションと増幅バイアスの最小化を実現した全ゲノム増幅法を開発することを目的とした。微生物シングルセルまたはそのDNAをピコリットル容量の微小液滴内に網羅的に封入し、全ゲノム増幅反応を行うことで、増幅精度を大幅に改善することに成功した。本手法は難培養微生物の網羅的なゲノム解析に向けて、解析精度の向上と解析コストの削減に有効なツールとなり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a microfluidic droplet-based whole genome amplification method for single bacterial cells. We developed a microfluidic device for generation of picoliter-sized droplet for compartmentalized reaction environment. Single bacterial cells or their genome DNA fragments were encapsulated into each droplet. By compartmenting genome fragments into individual droplets, DNA fragments are amplified uniformly, that minimizes amplification bias and the effect of contaminating DNA. Our results demonstrated the potential of microfluidic generated droplets as an efficient tool for the analysis of single cell genome along with great reduction in the cost and labor investment required for the investigation of genome diversity of uncultivable bacteria.

研究分野：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：シングルセル 全ゲノム増幅 マイクロ流体デバイス 1細胞解析

1. 研究開始当初の背景

環境に存在する微生物の 99% 以上は難培養微生物であり、生物圏におけるダークマターと例えられる。微生物ダークマターの包括的な理解に向け、環境中微生物の単離・培養を経ることなく、ゲノム配列を直接解析するメタゲノミクスが活発に行われてきた。しかしながら、様々な微生物から得られたメタゲノムの情報から特定の微生物ゲノムを再構成することは非常に困難であり、個々の微生物の実態を明らかにするには、シングルセルから完全なゲノム配列を解読する“シングルセルゲノミクス”の技術が必要不可欠である。近年では、Multiple Displacement Amplification (MDA) 法に代表される全ゲノム増幅法により、単一微生物を対象としたゲノム解析が可能となりつつある。しかし、シングルセル全ゲノム増幅では、反応時に生じる増幅のバイアスや、コンタミネーション DNA に由来する目的外の増幅により、精度の低い不完全なシーケンスデータが得られることが多く、技術的課題が残っていた。

2. 研究の目的

本研究では、従来の全ゲノム増幅法の問題点であったコンタミネーションリスクと増幅バイアスの最小化の実現を目指し、シングルセルゲノミクスの高精度化・ハイスループット化に向けた新たな全ゲノム増幅手法の開発を目的とした。本手法では、全ゲノム増幅の反応場として、マイクロ流体デバイスにより作製するピコリットル容量の微小液滴を利用し、微生物シングルセルまたはその DNA を液滴内に網羅的に封入し、全ゲノム増幅反応を同時多並行に行う。反応場をピコリットル容量までに微小化することにより、標的外の DNA 断片との増幅競合および増幅バイアスの低減が期待される。本研究では、はじめにシングルセルの液滴への封入、および全ゲノム増幅反応場生成のためのデバイス設計・開発を行った。その後、液滴内でのゲノム増幅にて得られた増幅産物の配列解析を行うことによって、本手法の精度を評価した。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流体デバイスによる微小液滴の連続生成

PDMS (Poly(dimethylsiloxane)) を用いて、内部に液滴形成用の十字構造を配したマイクロ流体デバイスを作製した。デバイス内に導入する液滴成分および分散媒であるオイルの流速を制御し、液滴が連続生成される条件を設定した。また、液滴生成に利用するオイルの組成やデバイス表面の改質剤について最適化を行い、液滴サイズの均一化と液滴生成の安定性の評価を行った。

(2) 微小液滴を利用した全ゲノム増幅

λ DNA をモデルサンプルとして全ゲノム増幅反応液を調製した。反応液をマイクロ流体

デバイスに導入して液滴を生成し、続いて 30°C の温度条件で全ゲノム増幅反応を行った。DNA 結合蛍光色素を反応液に加えることにより、液滴内での DNA 増幅を蛍光検出可能とした。 λ DNA 濃度は 1 copy および 5 copies/droplet に調製し、DNA 増幅による蛍光強度増加をモニタリングした。

(3) 微小液滴を反応場としたシングルセル全ゲノム増幅

セルソーターを用いて分取した大腸菌 K12 株 (1 cell, 10 cells) を溶菌し、溶菌液を全ゲノム増幅反応液と混合した。マイクロ流体デバイスを用いて、全ゲノム増幅反応液 (10 μ L) を約 10^5 個の液滴に変換した。ゲノム増幅反応後、液滴を壊して増幅産物をまとめて回収し、大腸菌のゲノム上に存在する 10 個の遺伝子について qPCR を用いてコピー数を算出した。また、次世代シーケンサー (Miseq) を用いて増幅産物に含まれる塩基配列を取得し、増幅バイアス、およびゲノムカバー率についての評価を行った。

(4) シングルセルの並列全ゲノム増幅

2 種の液滴を融合する流路機構を作製し、大腸菌 1 細胞を封入した液滴と、全ゲノム増幅試薬を含む液滴を連続的に融合した。全ゲノム増幅反応後、DNA 結合色素に由来する緑色の蛍光を呈する液滴をマイクロディスペンサーを用いて 1 つずつ分取した。得られた液滴に対して PCR チューブ内での再増幅を行った後、Miseq を用いて塩基配列を取得し、増幅産物のゲノムカバー率について評価を行った。

4. 研究成果

(1) 微小液滴生成条件の最適化

水溶液とオイルの流速比を 3:3 μ L/min に設定することにより、粒径 $50.4 \pm 1.3 \mu$ m (67 pL) の微小液滴を毎秒約 700 個の速度で連続生成するシステムを開発した (Fig. 1)。また、液滴作製に使用する各溶液の流量条件を変化させることで、液滴の粒径を 30-140 μ m (14 pL- 1.4 nL) の範囲で制御可能とした。

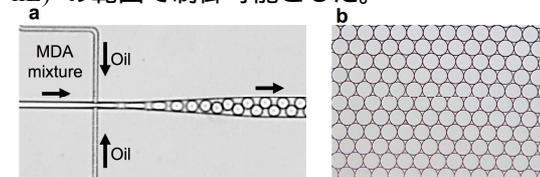


Fig. 1 単分散な微小液滴の連続生成

- (a) 十字構造部での液滴生成
(b) 回収後の液滴の顕微鏡画像

(2) 1 分子 DNA の増幅と液滴内増幅検出

λ DNA を 1 copy および 5 copies/droplet の濃度で封入して全ゲノム増幅を行った。その結果、DNA 結合色素由来の蛍光の経時的な増強が観察され、個々の液滴内部にて 1 分子レベルの DNA から全ゲノム増幅が可能であることが示唆された (Fig. 2)。

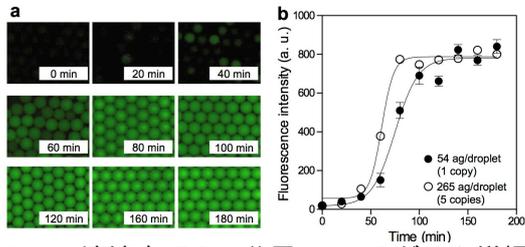


Fig. 2 液滴内での1分子DNAのゲノム増幅
(a) 微小液滴内でのDNA増幅の検出
(b) 蛍光強度の経時変化

(3) コンタミネーションDNAの増幅抑制効果の評価

大腸菌DNAを含む全ゲノム増幅反応液を液滴に変換し、個々のDNA断片を 10^5 個以上の液滴に分配し個別に増幅した(Droplet MDA)。反応後のDNA収量を従来のチューブでの反応系(in-tube MDA)と比較した結果、コンタミネーションDNAに由来する目的外のDNA増幅量が約1500分の1に抑制されることが明らかとなった(Fig. 3)。微小液滴により反応場を区画化することにより、コンタミネーションDNAの過剰増幅が抑制された結果であると考えられる。

また、qPCRを用いてシングルセル由来のゲノム増幅産物に含まれる遺伝子コピー数を複数の遺伝子について評価した結果、従来法と比べて本法では遺伝子間のコピー数の偏りが改善された結果が得られた。

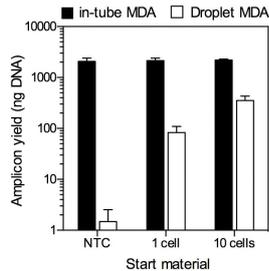


Fig. 3 全ゲノム増幅反応後のDNA収量比較 (NTC: No template controlを表す)

(4) 増幅バイアスの抑制効果の評価

次に、次世代シーケンサーから得られたシーケンスリードをリファレンスゲノムに対してマッピングし、ゲノムの各領域に対してリードがマッピングされた回数(カバレッジ)を求めた。カバレッジの平均値は、従来法では 17 ± 25 回であったのに対し、本法では 48 ± 48 回となった。この結果から、本法で得られる増幅産物では、広範囲のゲノム領域にわたって均一増幅されており、従来法と比べて増幅バイアスが改善されていることが明らかとなった(Fig. 4)。

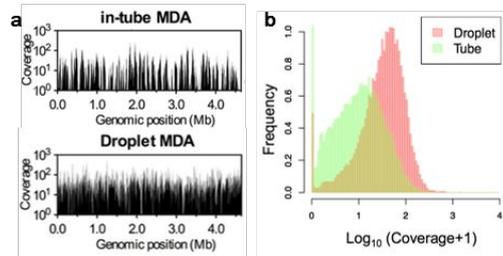


Fig. 4 シングルセルゲノム増幅産物中の増幅バイアスの評価

(a) リファレンスゲノムへのマッピング結果
(b) カバレッジ値の分布比較

(5) Droplet MDA産物から得られるシーケンスリードのde novoアセンブリ

シーケンスリードからゲノムカバー率を算出した結果、従来法に比べ20%以上高く、約95%に達した(Fig. 5a)。また、増幅バイアスの低減効果により、従来法の約40%のシーケンスデータ量で十分なカバー率が得られることが明らかとなった。また、de novo assemblyによりコンティグを生成しゲノムのカバー率を比較した。この結果、本手法においては20%以上のカバー率向上が確認された(Fig. 5b)。この結果から、本手法は従来法と比べてカバー率が高く、高精度なゲノムデータを獲得できることが示された。本特徴は、未知の難培養微生物のシングルセルゲノム解析時の全ゲノム増幅法として有効であると考えられる。

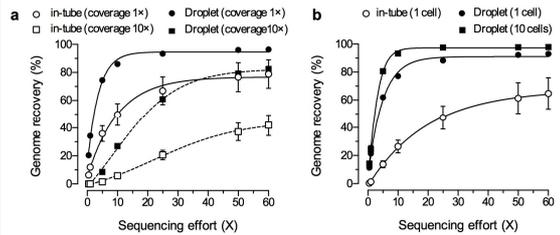


Fig. 5 大腸菌シングルセルゲノム増幅産物のゲノムカバー率

(a) 生リードを用いたゲノムカバー率比較
(b) コンティグを用いたゲノムカバー率比較
○: 本法、●: 従来法

(6) シングルセル全ゲノム増幅の超並列化

微小液滴内に連続封入したシングルセルに対して、並列的に全ゲノム増幅を行うため、2種の液滴を高速に融合させるマイクロ流体デバイスを開発した。溶液の流速およびオイル中の界面活性剤濃度を調整することで、毎秒200個、融合効率90%以上の液滴融合を可能とした。大腸菌K12株を0.1 cell/dropletの割合で包埋した液滴を作製した。液滴作製時に、細胞懸濁液を細胞溶解溶液と混合させた。液滴融合デバイスを用いて、シングルセル溶解物を含む液滴と増幅試薬液滴とを融合させ、全ゲノム増幅反応を行った。増幅反応後にDNA結合色素由来の蛍光を示す液滴の割合を測定した結果、8.3%の液滴が蛍光を示した(理論値:9.5%)。さらに、増幅産物のシーケン

スを行った結果、単一液滴成分から 80%以上のゲノムカバー率を有するゲノム増幅産物を得ることが出来た。

本システムを応用することにより、理論的には 10 万個以上のシングルセルを対象としたゲノム増幅が可能である。環境微生物への応用に向けては、溶菌操作などの検討が課題として残るが、本技術は多様な環境微生物を対象としたゲノム解析のハイスループット化に貢献できると考えられる。

図引用 doi: e0138733, (2015)

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 2 件)

Nishikawa Y., Hosokawa M., Maruyama T., Yamagishi K., Mori T., Takeyama H., Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification, PLOS ONE, 10(9), doi: e0138733, (2015)

Hosokawa M., Hoshino Y., Nishikawa Y., Hirose T., Yoon DH, Mori T., Sekiguchi T., Shoji S., Takeyama H., Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes., Biosensors and Bioelectronics, 67, 379-385, (2015)

〔学会発表〕(計 14 件)

Masahito Hosokawa, Nishikawa Yohei, Masato Kogawa, Haruko Takeyama, Droplet microfluidics for massively parallel and accurate single-cell genome amplification, 日本化学会第 96 春季年会, 2016/3/27, 同志社大学(京都府・京田辺市)

細川正人, シングルセル解析を支援する超並列ゲノム解析技術の開発, 早稲田大学ナノテクノロジーフォーラム第 1 回分科会ワークショップ「健康・医療分野」, 健康・医療分野研究の現状と今後, 2016/3/14, 早稲田大学(東京都・新宿区)

細川正人, シングルセル解析で拓く環境微生物の遺伝子資源の利活用、発酵と代謝研究会 未利用微生物による有用物質生産への挑戦 ~ 難培養微生物、シングルセル解析技術、ゲノム編集・改変技術の利用 ~、2016/2/29, 東京大学・中島董一郎記念ホール(東京都・文京区)

Masahito Hosokawa, Nishikawa Yohei, Haruko Takeyama, Droplet-based cell manipulation for analyzing environmental microbes at single-cell resolution, Pacificchem 2015, 2015/12/18, Hawaii, USA

Nishikawa Yohei, Masahito Hosokawa, Haruko Takeyama, Picoliter-sized droplets for low bias whole genome amplification of

single cell genome, Pacificchem 2015, 2015/12/18, Hawaii, USA

細川正人, 西川洋平, 小川雅人, 竹山春子, 微小液滴を用いた単一細胞のハイスループットな全ゲノム増幅法の開発, 第 67 回日本生物工学会大会, 2015/10/26, 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

細川正人, 西川洋平, 小川雅人, 竹山春子, 微小液滴によるシングルセルの超並列ゲノム増幅, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 2015/9/10, 熊本大学(熊本県・熊本市)

西川洋平, 細川正人, 竹山春子, 単一細胞ゲノム解析に向けた Droplet-based multiple displacement amplification 法の開発, 日本化学会第 95 春季年会, 2015/3/27, 日本大学薬学部キャンパス(千葉県・船橋市)

細川正人, 西川洋平, 川井聡子, 横田(恒次)恭子, 竹山春子, マイクロドロプレットを反応場とした 1 分子 DNA 増幅法の応用, 電気化学学会第 82 回大会, 2015/3/15, 横浜国立大学(神奈川県・横浜市)

Masahito Hosokawa, Yuri Hoshino, Yohei Nishikawa, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Mori, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Haruko Takeyama, Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomics library, EMNT2014, 2014/11/06, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Yohei Nishikawa, Masahito Hosokawa, Haruko Takeyama, Droplet-based multiple displacement amplification method for single-cell genomics using microfluidics, EMNT2014, 2014/11/06, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

西川洋平, 細川正人, 竹山春子, シングルセルゲノミクスに向けた Droplet-based Multiple Displacement Amplification 法の開発, 第 4 回 CSJ 化学フェスタ 2014, 2014/10/15, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Masahito Hosokawa, Yohei Nishikawa, Haruko Takeyama, Dropelt-based microfluidics for single-cell analysis, The 8th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2014/09/10, Nairobi, Kenya

Masahito Hosokawa, Yuri Hoshino Yohei Nishikawa, Tomotada Hirose, Dong Hyun, Tetsushi Mori, Tetsushi Sekiguchi, Shuichi Shoji, Haruko Takeyama, Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of metagenomic library, Biosensors 2014, 2014/5/28, Melbourne, Australia

〔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 なし

6．研究組織

(1)研究代表者

細川正人（HOSOKAWA, Masahito）

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構

次席研究員（研究院助教）

研究者番号： 60722981