

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06195

研究課題名(和文)1細胞非増幅シーケンスを可能にするライブラリ調製法の開発

研究課題名(英文)Development of a method of sequence library preparation for the amplification-free single-cell sequencing

研究代表者

小口 祐伴(Oguchi, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：40599370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は本研究遂行者が独自に開発を進めている非増幅シーケンサーにおいて、シーケンスライブラリ(サンプル)のシーケンスフローセルへの新規捕捉手法を開発した。従来の方法では捕捉プローブ(サンプルを捕捉するためのもの)をシーケンスフローセルに共有結合を介し固定していた。本研究では非共有結合であるビオチン-アビジン相互作用を介して捕捉プローブを固定し、かつ、共有結合によるそれと同程度のシーケンス性能を得ることに成功した。これによりフローセル外にてあらかじめ捕捉プローブとサンプルを結合することが可能となり、1細胞から抽出される微量なサンプルを高効率に捕捉することにも寄与するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この直近の10年において次世代シーケンサーというDNA配列を解読する装置の性能向上に伴い、生命科学・医学分野において遺伝子の発現解析が盛んに行われるようになった。市販される次世代シーケンサーは一般に、解析するサンプルをPCRによって増幅する必要がある。しかし、PCRによる増幅は、配列依存的に増幅の程度が異なり、すべてのサンプルを均一に増幅することは難しい。このような状況に対して、本研究における非増幅シーケンサーはそもそもPCRによる増幅を必要としないため、市販の大多数の装置とは一線を画す解析が可能となる。本研究成果によって、この非増幅シーケンサーの活用の幅を広げることに繋がった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed a novel method of capturing a sequence library (sample) for our amplification-free sequencing system. In the conventional method, a capture probe for capturing samples is fixed to the sequence flow cell via a covalent bond. Whereas to this, we succeeded in obtaining the same level of sequencing performance as that of the covalent method, even though the capture probe was fixed via the non-covalent biotin-avidin interaction. This enables the sample to be captured by the capture probe in advance outside the flow cell, which could be advantageous for the preparation of minute amount samples such as extracted from a single cell.

研究分野：生物物理学

キーワード：シーケンス技術開発 1細胞トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、次世代シーケンサーの発展・普及により、1細胞レベルでの遺伝子発現解析も比較的容易に実施可能となっていたものの、依然として定量性という点において注意が必要な状況にあった。一般に、市販されるシーケンサーで解析するためにはサンプルをPCR(Polymerase Chain Reaction)によって増幅する必要がある(図 1a)。しかしPCRの増幅度には配列依存的に偏りがあり、細胞本来の遺伝子発現パターンを維持し、増幅することは難しい。特に1細胞から抽出されるような微量サンプルを対象とする場合、PCRのサイクル数を増加し増幅の程度を高める必要があることから、この増幅バイアスは特に顕著な問題となる。このようなPCRによる増幅バイアスを補正し、定量性の高い発現解析を実現するために、DNAバーコードを導入する方法が考案され、当該分野において主流の方法として受け入れられていた。

他方、本研究の遂行者はこの問題に対し、そもそもPCRを必要としない解析、微量サンプルであっても増幅することなく解析するシーケンサーの開発することで解決を試みた(図 1b)。本研究開始以前、すでに非増幅シーケンス反応(図 1c)を実現するシーケンス装置の開発は済んでいたが、実際に1細胞サンプルを計測には至っておらず、そのサンプルの調製方法を含めた開発・検討が必要な状況にあった。

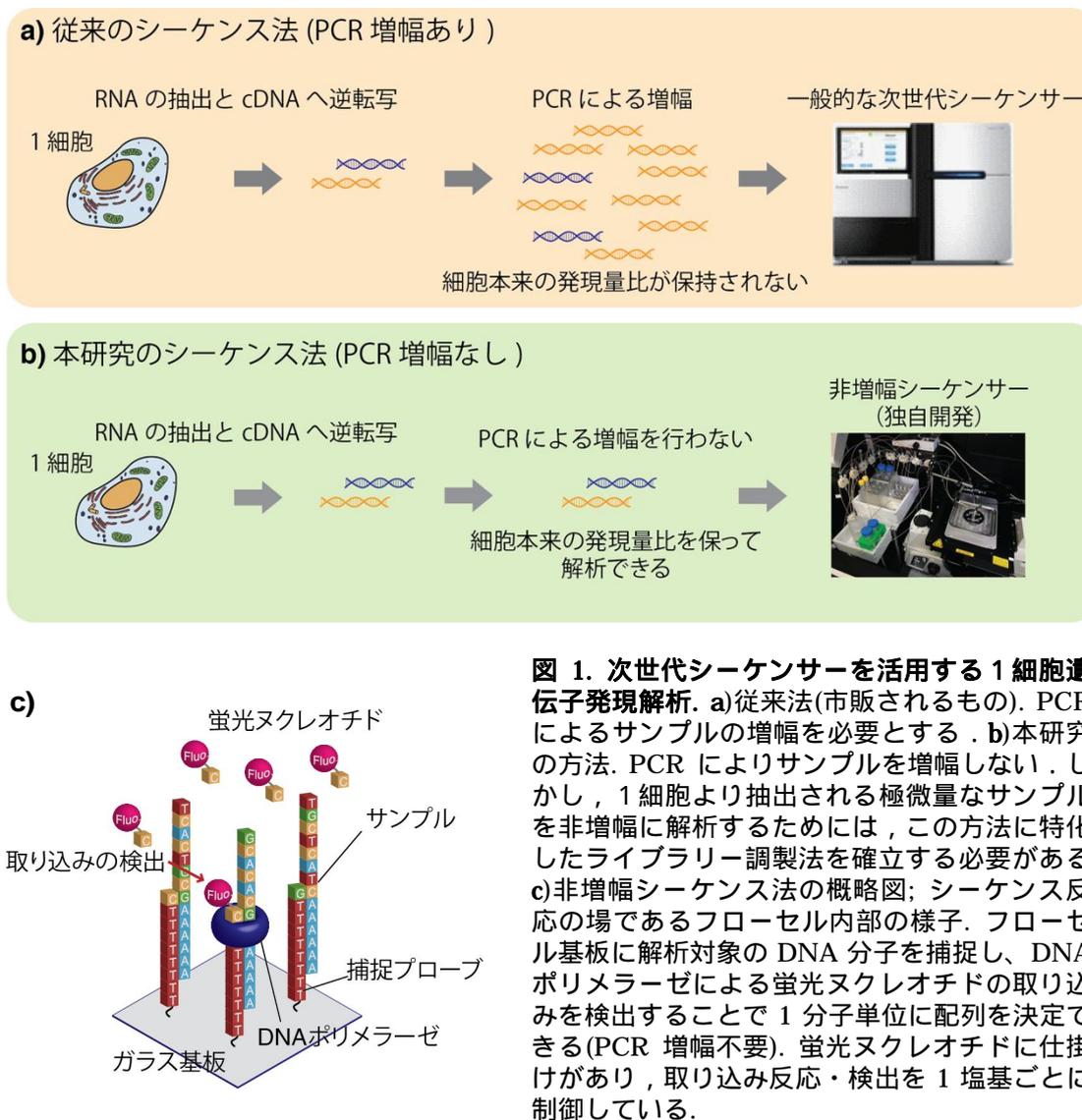


図 1. 次世代シーケンサーを活用する 1細胞遺伝子発現解析. a)従来法(市販されるもの). PCRによるサンプルの増幅を必要とする. b)本研究の方法. PCRによりサンプルを増幅しない. しかし、1細胞より抽出される極微量なサンプルを非増幅に解析するためには、この方法に特化したライブラリー調製法を確立する必要がある. c)非増幅シーケンス法の概略図; シーケンス反応の場であるフローセル内部の様子. フローセル基板に解析対象の DNA 分子を捕捉し、DNAポリメラーゼによる蛍光ヌクレオチドの取り込みを検出することで 1分子単位に配列を決定できる(PCR 増幅不要). 蛍光ヌクレオチドに仕掛けがあり、取り込み反応・検出を 1塩基ごとに制御している.

2. 研究の目的

本研究は、本研究遂行者が独自に開発を進めてきた非増幅シーケンサーに適用可能なシーケンスライブラリーの調製法を確立することを目的とした。特に1細胞に由来するような微量のRNA(~10 pg)から、シーケンスライブラリーをPCRで増幅することなく作成し、これを計測する方法を確立することを目指した。

3. 研究の方法

目的の実現のために、当初2つのアプローチを計画した。一つは非増幅シーケンスのフローセル内部でライブラリの調製を試みる方法(On-chip法(図2上段))と、シーケンスフローセル外部で試みる方法(Off-chip法(図2下段))の2つのアプローチである。どちらのアプローチにしても、最終的に計測対象となるサンプルがシーケンスフローセルを構成するガラス基板表面に捕捉される必要がある(図1c)。これを実現するために、サンプルに対して相補的な配列を持つオリゴヌクレオチド(捕捉プローブと呼ぶ)をガラス基板に固定し、ハイブリダイゼーションを介してサンプルをガラス基板表面に捕捉する。

上記2つのアプローチの特徴的な違いは以下の2つの作業工程、1. 捕捉プローブとガラス基板の結合、2. 捕捉プローブとサンプルのハイブリダイゼーション、の順序にある。On-chip方では1. 2.の順序で作業を済ませ、後段にサンプルの調製工程(cDNA化など)が続く。他方、Off-chipでは2. 1.の順序の作業となる。このためにサンプルは、フローセルの外部において調製することが可能となる。本研究開発以前、捕捉プローブとガラス基板はクリック反応を活用した共有結合によって実現していたために、On-chipの方法のみに限られていた。しかし、On-chipに関する予備検討において、フローセルの外でサンプルを調製することとも検討しなければならぬ状況に面していた。そこで本研究では特に、非共有結合であるbiotin-avidinを活用するoff-chip方の実現を試みた。

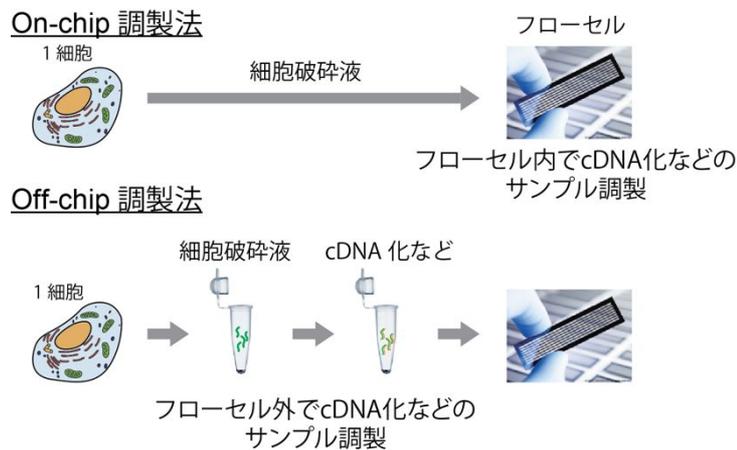


図2. ライブラリ調製法の概要(On-chip vs. Off-chip)

4. 研究成果

(1) 主要な成果

本研究では、捕捉プローブのフローセル表面への固定を、非共有結合であるbiotin-avidin相互作用を活用し、共有結合によるそれと同程度のシーケンス性能を得ることに成功した(図3)。シーケンス反応は比較的長い時間を要する。精度高い配列を出力するために(長いリード長を得るために)、シーケンス反応の間にサンプルのガラス基板からの解離を防ぐことが不可欠である。そのため捕捉プローブとガラス基板は強固に結合される必要があり、従来の方法では共有結合を介して結合することで実現していた。具体的に、捕捉プローブとなるdT₅₀オリゴヌクレオチドの5'末端にはアミノ基を(5' NH₂-dT₅₀)、そして表面にNHS基を有するガラス基板を用いることで共有結合を形成している(図3a)。この共有結合を非共有結合に置き換えることとし、まず、捕捉プローブの5'末端にbiotin分子を1つのみ導入し、ガラス表面にavidin分子を固定した(図3b)。シーケンス性能を示す指標として、塩基配列の決定精度とシーケンスリード長を比較した。塩基の決定精度は、ともに一塩基あたりの決定精度は95%程度と有意な差は認められなかった(決定精度に対して捕捉プローブとガラスの結合様式からの影響は少ない)。一方、シーケンスリード長は共有結合において22.2 ± 11.1 nt(平均 ± S.D.)、1分子のbiotinによる非共有結合によって14.1 ± 7.7 ntと、有意に($p < 2.2 \times 10^{-16}$, u-test)biotin分子1個で形成する非共有結合で短いものとなった(図3b, f&h)。

そこで捕捉プローブと基板との結合がより強固なものとなるよう、5'末端だけでなく、その近傍にも合計で4分子のbiotinを導入した(図3c, g&h)。するとシーケンスリード長は18.6 ± 9.9 ntと1分子のbiotinの場合と比べ有意に長くなった($p < 2.2 \times 10^{-16}$, u-test)。共有結合の値と比較すると4分子のbiotinの場合でもまだ有意に短い結果となっているが、1分子のbiotinの場合と比較すると、十分に実用可能なレベルに達した。また、導入するbiotin分子数をさらに増やすことで、共有結合とほぼ同等の値を得ることも期待される。

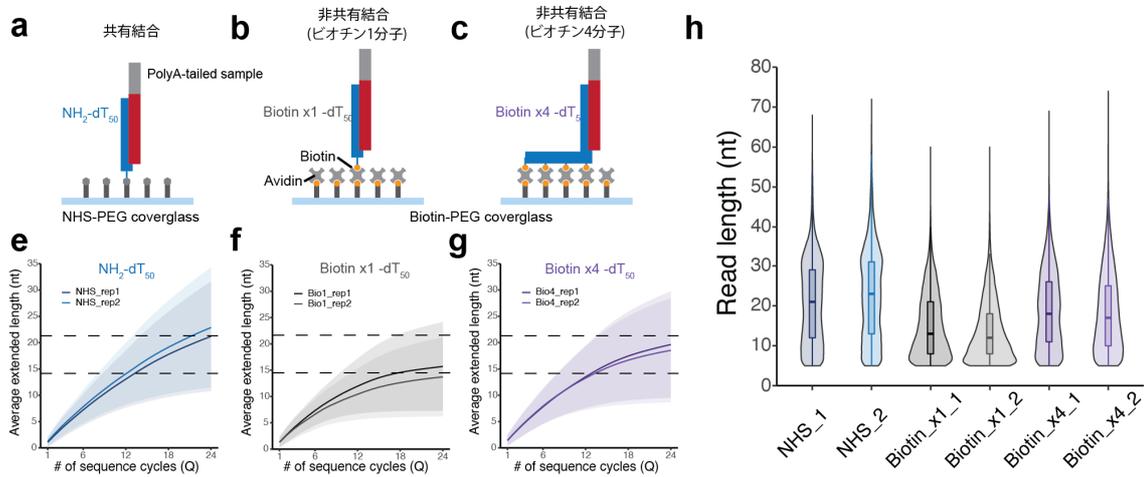


図 3. 捕捉プローブの固定様式によるシーケンス性能への影響. a) 共有結合(NH₂とNHSを介した)による捕捉プローブとシーケンスガラス基板の結合模式図. b&c) 非共有結合(biotin-avidinを介した)による捕捉プローブとシーケンスガラス基板の結合模式図. ただし, 捕捉プローブ 1分子あたりに導入する biotin 分子数は 1 個(b)及び 4 個(c). e-g) シーケンスリードの伸長トレース(観察分子の個々の伸長トレースのすべてを平均化したもの)とシーケンスサイクル回数との関係性. 各条件の試行回数は 2 回. 共有結合の場合と比べ(e), 特に(f)に示す biotin, 1 分子の場合において, 後半のサイクルにおいて伸長の鈍化が見られる. 一方, biotin を 4 分子導入した場合には, 伸長の鈍化が低減し, 共有結合に匹敵する伸長が見られた. 各グラフにおける 2 本の点線, その上部位置するものは共有結合における 24 サイクル(24Q) 終了後のリード長の平均値, 下部に位置するものは biotin, 1 分子における平均値を示している. 平均値は 2 回の試行を併せて算出. h) 各条件におけるシーケンスリード長の分布(24Q 終了後における).

(2) biotin-avidin を介した捕捉プローブとガラス基板の固定によりシーケンス反応を実現したことへの優位性(当初予定していなかった応用に繋がった事例を含む)

従来の共有結合を介した捕捉プローブとガラス基板との固定の場合には, この結合反応を阻害しないよう捕捉プローブ以外にアミノ基を反応溶液中に含まないなど, 反応夾雑物への注意が必要であった. この懸念から, 捕捉プローブとガラス基板のみの状況で反応が実施されることが好ましく, 固定は一連の工程の最初に実施していた. この場合, すでに捕捉プローブがフローセル内にあることとなるため, 自ずと後に続くライブラリーの調整の過程も on-chip での方法に限られ, 工程の工夫も制限を受けることが多かった. 他方, biotin-avidin を活用する off-chip の方式は, 結合の特異性も高く, 多少の夾雑物があっても結合に影響が少ない. またフローセルの外でサンプルの調製を施し, これをフローセル内に導入することでサンプルを捕捉し, かつ配列解析をすることが可能である. 加えて, PCR 非増幅の 1 細胞サンプルの濃度は非常に低いことが予想されることから, 結合速度の速い biotin-avidin をサンプルの捕捉に活用することは, 高効率なサンプルの捕捉に寄与することが期待される. このような有意性を得た.

また biotin-avidin によるサンプル捕捉を実現することで, 従来予定していた非増幅シーケンサーの用途(単なる遺伝子発現の定量解析)を越えて, 遺伝子やタンパク質分子の空間的な発現量解析への応用の可能性を見出すことに繋がった. 近年, タンパク質の発現解析をシーケンサーにより実施するために DNA バーコード標識抗体が活用されている. この DNA バーコード標識抗体を配列情報のみならず, 空間座標を伴って情報取得することに成功した(図 4).

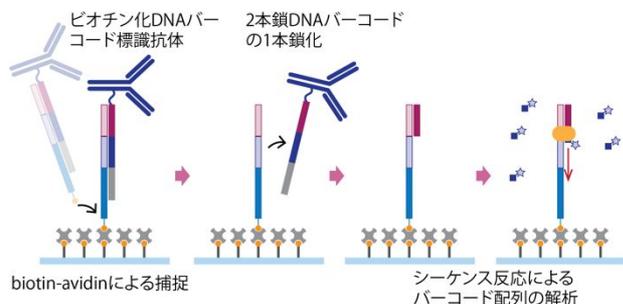


図 4. DNA バーコード標識抗体の非増幅シーケンサーによる検出の模式図

以上の成果を論文として公開した(Y. Oguchi, et al. *Commun. Biol.* 2020). 上記の結果はこの論文の主に Fig.3 と 4 の結果に該当する.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oguchi Yusuke, Shintaku Hirofumi, Uemura Sotaro	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of a sequencing system for spatial decoding of DNA barcode molecules at single-molecule resolution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01499-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡辺 亮、鈴木 穰	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 219
3. 書名 シングルセルゲノミクス	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------