

令和 2 年 11 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07224

研究課題名(和文)一菌体ゲノム解析用ハイドロゲル・マイクロカプセルの開発

研究課題名(英文)Development of Hydrogel Microcapsule for Single Cell Genomics

研究代表者

青木 弘良 (Aoki, Hiroyoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・光量子工学研究センター・研究員

研究者番号：50518636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：1細胞染色体DNA解析(SCG)は、微量試料の遺伝情報を解析でき、生物学や医療など幅広い応用が期待される。しかし微量の染色体DNAを解析のため酵素増幅すると、不均一に増幅され、すべての遺伝情報が得られなかった。そこで寒天の殻と液状の核をもつ、数10 $\mu$ m径、数10 pLのアガロースゲル・マイクロカプセル(AGM)を開発した。AGMは安価な試薬や器具を用い、簡単に、1回に数10万個を作製できる。従来法では全染色体のうち約30%しか得られないが、AGM内での酵素増幅により、約90%以上を解析できた。AGMはSCGを促進し、環境中微生物の解析、がんの早期診断、および再生医療の品質向上等が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1細胞染色体DNAの酵素増幅では、マイクロ流路やエマルジョン(オイル中に懸濁した微小液滴)による均一化は報告されていたが、特殊な機器が必要であり、壊れやすいエマルジョンの単離が困難、などの課題があった。本法は多くの研究者がより簡単に1細胞ゲノム解析を行えるよう、入手しやすい試薬と実験器具で作製でき、安定に単離できるAGMを開発した。学術的には半透過性のAGM内の酵素増幅による、増幅量の増加と均一性向上を示し、社会的には1細胞染色体DNAの酵素増幅の均一性の向上により、高品質の遺伝子情報を提供する手段を提供し、生物、微生物、および医学の発展に寄与した。

研究成果の概要(英文)：Single cell genomics (SCG) analyse genetic information of single cell from trace amount of sample. The SCG is expected to innovate biology, microbiology, and medicine. However, infinitesimal genomic DNA from single cell caused uneven enzymatic DNA amplification for DNA sequencing, which prevented to analyse all genes on the genome. To improve the uniformity of the DNA amplification, agarose gel microcapsule (AGM) is developed. AGM consists of agarose gel shell and alginate sol core with easily preparing using commercially available inexpensive reagents, plasticware, and laboratory equipment. Pico-litre-scale DNA amplification in the AGM core drastically improved the DNA amplification uniformities over 90% compared to conventional method (30%). Thus, AGM will accelerate the SCG especially for analyses of environmental microbiome, early diagnosis of cancer metastasis, and quality control of regenerative medicine.

研究分野：バイオ工学

キーワード：1細胞ゲノム解析 ハイドロゲル・マイクロカプセル 難培養微生物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

1細胞ゲノム解析は、単離した細胞の染色体(ゲノム)DNAを酵素増幅後、塩基配列解析を行い、得られる遺伝情報から細胞の機能を分析する方法である (Fig. 1)。1細胞ゲノム解析は微量試料から遺伝情報を解析でき、血液中の遊離がん細胞、環境中の微生物、および再生医療における培養幹細胞の品質管理など、様々な分野への応用が期待される。しかし増幅時にDNAが混入すると、混入DNAの方が量が多く、優先的に増幅される。またDNAが微量なので、局所的に増幅されやすく(増幅バイアス)、断片的な遺伝情報しか得られない、などの課題があった。

### 2. 研究の目的

様々な研究者が実施できるよう、実用的で高効率な1細胞ゲノム解析を目的とし、市販試薬や器具による、簡便かつ高均一な酵素増幅法の確立を図った。反応液量の微量化による、増幅バイアスの抑制の報告を元に、モデル生物として大腸菌を用いてゲル中での酵素増幅を行った。しかし増幅DNAは大腸菌の周囲に局所的しか増幅されず、生成量が不十分であった。そこでアルギン酸ゲルビーズ中に大腸菌を包埋し、アガロースに添加してシート状にした後、EDTAでアルギン酸を液化した。これを酵素増幅すると、アガロースゲル中でのアルギン酸ビーズ全体の増幅により、生成量が増加した(未発表)。しかしアガロースシートからのアルギン酸液滴の回収は困難なので、単離しやすいよう、アルギン酸コアの周囲にアガロースゲルシェルをもつ、アガロースゲル・マイクロカプセル (AGM) の開発を行った (Fig. 2)。

AGMは内部に細菌や細胞を保持したまま培養すると、栄養分などの低分子は透過するが、細胞などは透過できない。そのためバイオリクターや再生医療における細胞移植などに有用であると考えられる。そこでAGM内での大腸菌の培養を検討した。

AGMは一回に多量のカプセルを作製できるが、多数のAGMから目的のカプセルを単離するには、手作業でピックアップしなくてはならない。この工程の効率向上のため、自動単離装置 (AGMピッカー) の開発を行った。

### 3. 研究の方法

当初アルギン酸ゲルコアの周囲に、微小なアガロースゲルビーズを吸着させ、加熱溶解後、冷却によって、シェルの形成を図ったが、原理的に煩雑で作製困難であった。そこで大腸菌をモデルに用い、アルギン酸およびCaCO<sub>3</sub>と混和後、オイル中に懸濁した。これに酢酸を滴下し、CaCO<sub>3</sub>の溶解による遊離Ca<sup>2+</sup>により、アルギン酸をゲル化した (emulsification/internal gelation法)。オイルには種々の溶媒と混和し、除去も容易なイソステアリルアルコール (ISA) を用いた。大腸菌濃度は、希釈した種々の濃度の<sup>大腸菌</sup>を用いてアルギン酸ゲルコアを作製し、1AGMあたりの大腸菌の数が1個以下になるように、菌体濃度を調整した。

作製したコアは溶かしたアガロースと混和し、オイルに懸濁した後、冷却によりアガロースのゲル化を試みた。しかしアガロース層とオイルは、比重の違いにより容易に2層に分離し、アガロースが凝集する。そこで水とほぼ同じ比重をもつ、ポリグリセリン6-オクタカプリル酸(PGO)を用い、アガロース液滴の沈降防止を検討した。

アガロースをゲル化後、EDTAによってアルギン酸を液化し、AGMを作製した。アルカリ変性による溶菌後、大腸菌ゲノムDNAをREPLI-g UltraFast Mini Kitを用いて増幅した。増幅DNAはSYBR Green Iで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

AGM内の培養は、大腸菌を包埋したAGMをLB培地で終夜培養し、SYBR Green Iにより菌体を蛍光観察した。

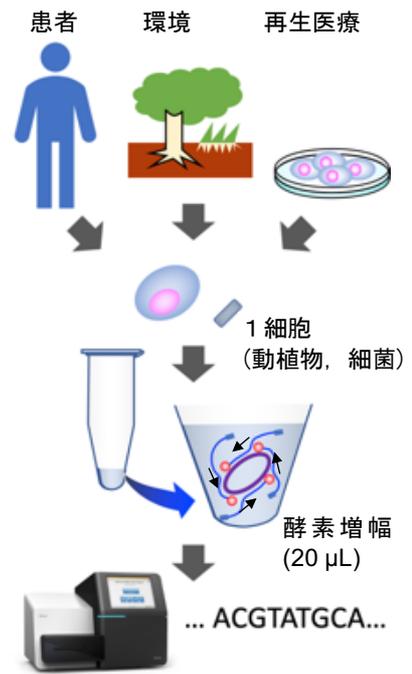


Fig. 1 1細胞ゲノム解析

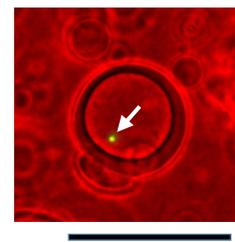


Fig. 2 AGM

赤: 位相差観察.  
緑: SYBR Green I.  
矢印: 大腸菌.  
Bar = 100 μm

#### 4. 研究成果

エマルジョン中、アガロース液滴の沈降を防ぎつつゲル化させるために、オイルの検討を行った。アガロースを PGO (0.997 g/mL) とコントロールの ISA (0.836 g/mL) にエマルジョン化した後、氷冷してゲル化し、洗浄した。ISA を用いると、アガロース液滴が沈降により凝集し、不定形のゲルを形成した。一方 PGO は沈降を防ぎ、アガロース液滴がビーズ状にゲル化し、収量が ISA の 33% から PGO の 87% と、大きく向上した。

そこで PGO を用い、50 mL チューブ内でのエマルジョン作製とゲル化により、 $3 \times 10^8$  個の大腸菌から、大腸菌を包埋する AGM (直径約 46  $\mu\text{m}$ , コア約 24 pL, 約  $5.6 \times 10^5$  個) を、作製した (Fig. 2)。コアの容量は、従来法の約  $1/10^6$  である。これら AGM のうち約 94% が、1 個の大腸菌を含んでいた。アルカリ処理後、REPLI-g UltraFast MiniKit を用いて、大腸菌ゲノム DNA を増幅したところ、約 77% の AGM に増幅が見られた (Fig. 3)。

比較のため、EDTA によりアルギン酸コアを液状化していない AGM、および大腸菌を添加したアガロースビーズを、それぞれ酵素増幅したところ、AGM の増幅量に比べ少なく、AGM 液状コア内での DNA の拡散の、増幅への寄与が示された (Fig. 3)。増幅が見られた AGM をマイクロマニピュレータで単離し、塩基配列解析したところ、従来法に比べ、高い均一性が得られた (論文準備中)。

次に AGM 内での大腸菌の培養を行った。遺伝子解析の場合はエマルジョンオイルである ISA と PGO の除去に、ジエチルエーテルとブタノールを用いたが、これらは細胞を殺す作用がある。そこで培養の場合は、界面活性剤を含んだバッファーで、ISA と PGO を洗浄除去した。その結果、培養による AGM 内の大腸菌の増殖と AGM 内の安定な保持を確認した (Fig. 4)。

数 10 万個の AGM より目的の AGM を自動的に単離するため、自動ピックアップ装置である、AGM ピッカーの開発を行った。AGM ピッカーは、倒立位相差顕微鏡、CMOS カメラ、対物レンズ用電動ステージ、プレートヒーターを設置した自動水平ステージ、自動 3 軸ステージ、ピックアップ用ガラスキャピラリー、キャピラリー用電動シリンジポンプ、等から構成される。クリーンベンチ内の無菌環境でも操作できるように、もっともかさばる光学系を自作して、装置全体を小型化した。不必要な接眼レンズを無くし、検出は高感度の CMOS カメラを使用している。各部位は電動部品を多用し、PC から遠隔操作できるように、自動化を図った (Fig. 5)。また現在基礎設計とほとんどの部材購入は済んでおり、今後装置の組み立てと光学系のテストを行う。また制御、撮影、および画像処理には LabView を用い、ソフトの開発を進めている。

上記研究を通じ、従来ほとんど報告がなかったハイドロゲル・シェルをもつマイクロカプセルである AGM を簡便、安価、かつハイスループットに作製する方法を作製した。AGM は 1 細胞ゲノム解析において、他の DNA の混入を防ぎ、高い均一性をもつ高品質の増幅 DNA を得ることができる。そのため本法は 1 細胞ゲノム解析において、有用であると考えられる。また AGM は菌体培養など培養技術としても使用できることが示され、細胞移植や腸内有用微生物の微生物移植用カプセルとしても、重要である。

AGM は新しい技術なので、単離など既存の技術を直接使用できず、新たに開発する必要がある。そこで自動単離装置である AGM ピッカーの開発を進めている。今後も、一般の研究者が 1 細胞ゲノム解析や培養に AGM を使えるよう、研究開発に取り組みたい。

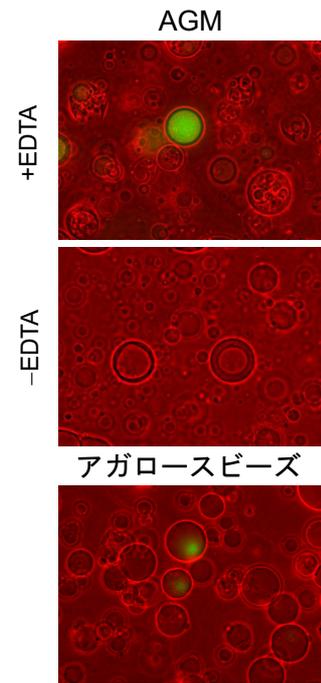


Fig. 3 AGM 内 DNA 酵素増幅  
Fig. 2 と同じ。

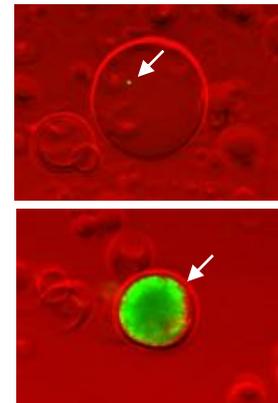


Fig. 4 AGM 内 培養  
上: 培養前. 下: 培養後. 他は Fig. 2 と同じ。



Fig. 5 AGM ピッカー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyoshi Aoki and Yutaka Yamagata
2. 発表標題 Agarose Gel Microcapsule: Pico-liter-scale DNA Amplification Microvessel for Single Cell Genomics
3. 学会等名 2017 Multi-omics for Microbiomes -- EMSL Integration Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木弘良, 山形豊
2. 発表標題 Development of Agarose Gel Microcapsule for Single Cell Genomics and Microbiome Chip
3. 学会等名 第5回 光量子工学研究領域シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyoshi Aoki and Yutaka Yamagata
2. 発表標題 Agarose Gel Microcapsule: Pico-liter-scale DNA Amplification Microvessel for Single Cell Genomics
3. 学会等名 “Biology of Symbiosis” Workshop
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木弘良, 山形豊
2. 発表標題 一菌体解析用アガロースゲルマイクロカプセルの開発
3. 学会等名 第6回 光量子工学研究領域シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroyoshi Aoki and Yutaka Yamagata
2. 発表標題 Agarose Gel Microcapsule: platform for single cell genomics and cultivation
3. 学会等名 Biology-of-Symbiosis and iSYM workshop
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroyoshi Aoki and Yutaka Yamagata
2. 発表標題 garose Gel Microcapsule: Picoliter-scale Reaction Chamber for Cultivation and Next Generation DNA Sequencing
3. 学会等名 第7回 光量子工学研究領域シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ハイドロゲル・マイクロカプセルの製造方法、カプセルを製造するためのキット、およびその利用	発明者 青木弘良, 山形豊	権利者 理化学研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-044925	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
連携研究者	大熊 盛也  (Ohkuma Moriya)  (10270597)	国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソースセンター・室長   (82401)	