

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22089

研究課題名（和文）1細胞ゲノムの非増幅シーケンスによる未培養微生物の完全長ゲノム取得

研究課題名（英文）Obtaining of complete genomes of uncultured microbes by sequencing of single-cell genomes without whole genome amplification

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・その他（招聘研究員）

研究者番号：60722981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：環境に存在する微生物の99%は実験室で培養できない。これら未培養微生物の理解には、ゲノムの直接解析が有用である。特に、細胞1つからゲノム配列を解読する「シングルセルゲノミクス」は、多様な微生物集団から個別のゲノム情報を得られる点で有効だが、従来法ではゲノム解読精度に課題があった。本研究では、従来法では困難であった、細胞1つからゲノムを解読し、その配列情報を1本のコンプライートゲノムへと再構成する技術を開発し、ヒト腸内細菌でその有効性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した技術を用いることで、これまで分析が困難であった難培養性の微生物のゲノム情報を精緻に得られる様になり、長い遺伝子クラスターの存在や遺伝子の欠失・挿入などの情報から、より詳細な微生物機能を知ることができる。具体的には、新種微生物の発見や有用遺伝子の探索などをより詳細に実施可能になる。ゲノム情報から培養化につながる手がかりを掴むことも可能であると考えられ、将来的に微生物を資源とした応用を広げる上で有用な技術である。

研究成果の概要（英文）：More than 99% of the microbes in the environment cannot be cultured in the laboratory. To understand these uncultured microbes, direct analysis of their genomes is practical. In particular, "single-cell genomics," which decodes the genome sequence from a single cell, effectively obtains individual genome information from diverse microbial populations, but the accuracy of genome decoding has been an issue with conventional methods. In this study, we developed a technology to decode the genome from a single cell and reconstruct the sequence information into a complete genome, which was challenging to do with conventional methods and demonstrated its effectiveness in human intestinal bacteria.

研究分野：生物学

キーワード：シングルセル解析 NGS ゲノム

1. 研究開始当初の背景

環境に存在する微生物の99%は実験室で培養できない。これら未培養微生物の系統的な理解は限られており、生物圏のダークマターと呼ばれている(Rinke C. et al. Nature 2013)。メタゲノム解析では、未培養微生物の集団からDNAを抽出して解析を行うが、断片化された遺伝子配列を個々の微生物レベルまで分別して、個々の機能までを推定することには困難が伴う。この未培養微生物の全貌を明らかにする理想的な方法は、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」を高精度・ハイスループット化することである。

通常のシングルセルゲノム解析法では、1細胞からシーケンス可能なDNA量を得るために全ゲノム増幅を行う必要がある。この過程で、コンタミネーションDNAの増幅、過大な増幅バイアス、多量のキメラDNAが発生する事が多い。このため、全ゲノム増幅を経た1細胞シーケンスでは、全データの約50%が非ターゲット増幅物に由来し、対象微生物の全ゲノムの40%程度しか解読できないという報告もある。

こうしたシングルセルゲノム解析での問題を打破するために、研究代表者は、マイクロ流体技術を用いて作製したドロップレットを用いて、シングルセルゲノムを高精度に増幅する手法を開発してきた(Hosokawa et al., Sci. Rep. 2017, Nishikawa et al., PLoS ONE 2015)。さらに、独自のシーケンスデータ解析パイプラインを開発し、微生物1細胞から高品質(96%以上の完全性、1.2%以下のコンタミ率)なゲノム情報を得ることができる世界初の解析ワークフローを完成させた(Kogawa et al. Sci. Rep. 2018)。研究代表者が開発してきた手法は、ピコリットル容量の微小反応環境でゲノム増幅を行うため、コンタミネーションを含まず、純度が極めて高いゲノムデータを取得することができる。また、増幅したゲノムから情報処理を行えば、エラーやキメラをある程度除去できる。しかし、1本のコンプリートゲノムへと再構成することはいまだ困難であり、断片化した数十本の塩基配列へ集約することが限界となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、1細胞からコンプリートゲノムを再構築することを目的として、ゲノムを断片化させることなく抽出し、さらにゲノムを増幅することなくダイレクトシーケンスを行うことでゲノム配列を決定する「究極のシングルセルゲノミクス手法」の開発に取り組んだ。微生物群集から、細胞1つ1つを個別網羅するゲノムデータを取得するため、これまで開発してきた1細胞単離技術とDNAバーコーディングを取り入れ、1細胞ゲノムをダイレクトシーケンスする方法を検討した。シーケンスには、Oxford Nanopore社のロングリードシーケンス技術を用い、微生物が持つゲノム・プラスミドをまるごと1本、シングルセルから読み取れることを可能とすることを目指した(図1)。

3. 研究の方法

本研究では、非増幅1細胞ゲノムシーケンスによる未培養微生物のゲノム取得を目的とし、2年間の研究期間中に、下記の技術開発と実証実験を行った。特に、研究代表者がこれまでに開発した、マイクロ流体デバイスを用いた1細胞ゲノム解析技術をもとに、下記のような解析の流れを想定して技術開発を進めた。

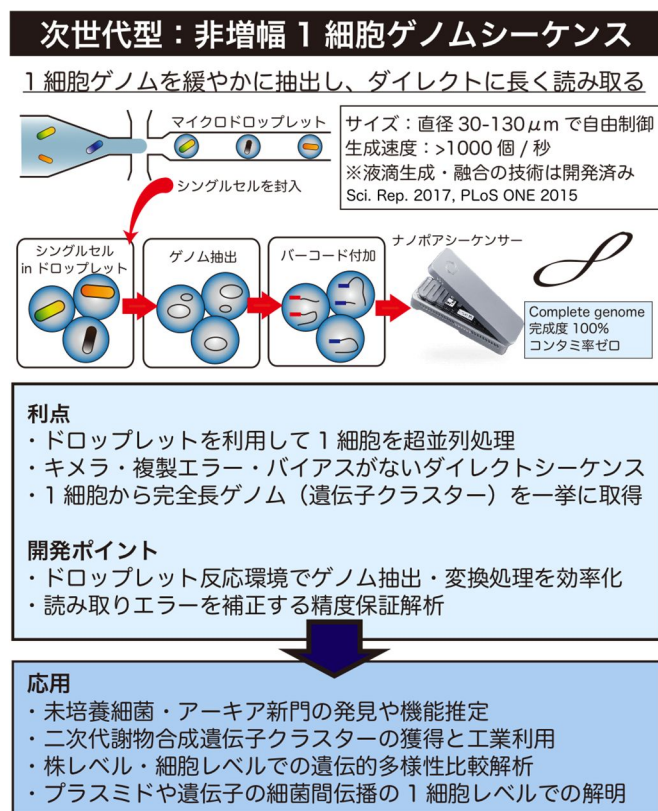


図1 本研究で目指した革新的微生物シングルセルゲノミクスのイメージ

- (1) マイクロ流体デバイスを用いて微生物シングルセルをドロップレットに封入
- (2) ドロップレット中で溶菌を行い、必要に応じゲノムを増幅
- (3) ゲノム毎に異なるDNAバーコードを挿入するなどシーケンス実行可能な形式へ修飾する。
- (4) ナノポアシーケンサーにてロングリードシーケンスを実施。必要に応じ補正用データとして

ショートリードシーケンスを実施。

(5)各シーケンサーより得られた配列情報を処理し、コンプリートゲノムを構築

具体的な項目として、下記を行った。

(1) マイクロ流体デバイスを用いたゲルカプセルの形成とシングルセルの単離・溶菌

サンプルとしては、培養した大腸菌、疑似微生物コミュニティサンプル、ヒト糞便由来微生物を用いた。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て実験に用いた。または、市販のマイクロ液滴精製デバイスおよび制御装置を用いた。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、研究代表者が開発した SAG-gel 法(Chijiwa et al. 2020)にて1細胞を液滴中に封入した。封入した液滴をゲル化させ、分散媒であるオイルを取り除いた後に、溶菌液中にカプセルを浸漬させ、内部に捕捉した微生物を溶菌させた。

(2) ゲルカプセルを用いたシングルセルゲノム増幅およびショートリードシーケンス

REPLI-g Single Cell Kit (QIAGEN)を用いてMDA(multiple displacement amplification)反応液を調製し、全ゲノム増幅を行った。反応終了後、微量遠心機によってゲルビーズを沈降させ遠心洗浄を行い、SYBR Green (Thermo Fisher Scientific)によってゲルビーズを染色した。蛍光ゲルカプセルをBD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences)によって96-well plateに分取し、各ウェル内で二次ゲノム増幅を行うことでシングルセル増幅ゲノム(SAG)を取得した。個々のSAGから、一部のDNAを用いて、illumina社シーケンサーを用いて、従来どおりのショートリードシーケンスを行いデータを取得した。

(3) ロングリードシーケンスとデータ処理

個々のSAGからRapid Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies)を用いてシーケンシングライブラリを調製し、Flow cell R9.4を用いてGridION (Oxford Nanopore Technologies)によるロングリードシーケンスを行った。後述の通り開発した新規アセンブリパイプラインおよび既報のロングリードアセンブラであるCanu、Flyeを用いてドラフトゲノムを構築し、QUAST(Gurevich et al. 2013)を用いてドラフトゲノムの質を評価した。

(4) 1細胞ロングリードシーケンスの独自パイプラインに依るデータ改善処理

全ゲノム増幅に由来する増幅バイアスやキメラ配列を内包する1細胞ロングリードシーケンス(SAG-LR)から高品質ゲノムを構築するため、SAG-LRアセンブリパイプラインの新規開発を行った。本パイプラインではまず、入力SAG-LRから低質ロングリードを除去する。続いてSAG-LRのアセンブリによって、バイアス低減SAG-LR生成に使用する参照コンティグを構築する。本パイプラインにおけるアセンブリはCanu (Koren et al. 2017)によるキメラ配列のトリミングおよびFlye (Kolmogorov et al. 2019)によるキメラ処理後にSAG-LRの*de novo*アセンブリ、というプロセスで実行される。続いて、アセンブリで構築した参照コンティグに対して入力SAG-LRのマッピングを行い、指定の読み取り深度を超えるマッピング配列について余剰リードを除去することで、入力SAG-LRで過剰な読み取り領域を特定し、バイアス低減を行う。バイアス低減SAG-LRを用いて再度アセンブリを行うことで、より広範なゲノム領域をカバーしたドラフトゲノムを構築する。このSAG-LRのバイアス低減およびアセンブリを繰り返すことで、ドラフトゲノムの完全性が最大に近づくとともに、より長鎖なコンティグを構築する。バイアス低減サイクルの過程で得られた複数のプレドラフトゲノムからコンセンサス配列を構築し、別途取得したショートリードシーケンスデータ(SAG-SR)を用いた配列補正を行うことで、最終的なSAG-LRドラフトゲノムを獲得する。

4. 研究成果

(1) ゲルカプセル内容菌を介した非増幅DNAのロングリードシーケンス

はじめに、大腸菌/疑似微生物コミュニティを用いた実証実験を行い、次いで、ヒトの糞便由来腸内細菌サンプルへの適用を試みた。この結果、ドロップレット内で溶菌した細菌のダイレクトロングリードシーケンスの実効性を確認し、長鎖配列の取得が可能であることを確認した。本手順で、最大200kbを超える長鎖配列が得られる傾向があったものの、ロングリードシーケンス実施に高濃度DNAを要求することから、結果的に多数の細胞を一度に処理してメタゲノム解析を行うことと変わらず、1細胞レベルの非増幅シーケンスは現時点では実効性に難ありと判断した。そこで、増幅したシングルセルゲノムから個別の細菌の完全長ゲノムを得る方針とした。

(2) 大腸菌シングルセル増幅ゲノムを用いた新規アセンブリパイプラインの評価

SAG-LRは、全ゲノム増幅に起因する主な課題のうちキメラ配列および増幅バイアスの2つを内包しており、SAG-LRのアセンブリには両者への対処を見据えた解析アルゴリズムが求められ

ることが判明した。既報のアセンブリの特性を評価・比較した結果、いずれのアセンブリにおいても最大ゲノム完全性 87.5%と、多くの配列情報を取りこぼしていることが確認された。ドラフトゲノム中で欠失している配列情報は SAG-LR 中の相対存在量が小さい配列領域に集中していることが示されたため(図 2)、SAG-LR に含まれる配列情報のバイアスの改善によりアセンブリの質が向上すると考え、新規 SAG-LR アセンブリパイプラインの開発に取り組んだ。

開発したパイプラインにおける SAG-LR のバイアス軽減が、ドラフトゲノムのゲノム完全性・コンティグ数に与える効果を評価した。バイアス処理前の SAG-LR から 39 本の配列断片、ゲノム完全性 81.7%のドラフトゲノムが取得されていたのに対して、バイアス低減処理を 1 度行うと、13 本の配列断片、ゲノム完全性 99.3%のドラフトゲノムが構築され、バイアス低減によるドラフトゲノムの完全性向上が確認された。さらに繰り返しバイアス低減処理を行うことでドラフトゲノムの配列断片数は 2 本にまで減少し、最終的に取得されたドラフトゲノムの最大コンティグ長が 4.66 Mbp の完全長大腸菌ゲノム配列の獲得が確認された。もう 1 本のコンティグは、大腸菌が有する F plasmid の配列であった。以上の結果から、バイアス低減処理を繰り返し行うことで、SAG-LR から細菌コンプリートゲノムを構築し得ることが示された。

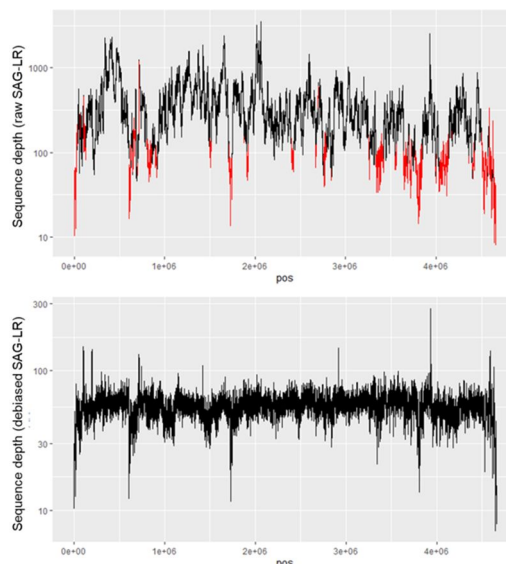


図 2 バイアス低減処理によるゲノム完全性の向上
バイアス低減処理を行った前後の SAG-LR の大腸菌ゲノム領域における読み取り深度を表す(上:処理前、下:処理後)。赤線部は同 SAG-LR のアセンブリで得られたドラフトゲノムに含まれない配列領域。

(3) 腸内細菌におけるシングルセルロングリードシーケンスによるコンプリートゲノムの獲得

開発したアセンブリパイプラインを用いてヒト糞便中細菌のシングルセルゲノム解析を行い、9 株の腸内細菌 *Anaerostipes hadrus* のコンプリート/準コンプリートゲノムを獲得した。獲得した 9 株の *A. hadrus* ゲノムと既知の 52 株の *A. hadrus* ゲノムを用いて株間系統解析を行った結果、コア遺伝子の配列よりも所有遺伝子パターンに強い地域特異性が確認された。また、全 10 株のコンプリート/準コンプリートゲノムの構造多様性を分析したところ(図 3)、ゲノム全域にわたって多様な株特異的配列領域が確認された。同領域の遺伝子機能アノテーションおよび GC 含有率を評価した結果、大規模な構造変異の主原因はファージであることが推測された。またファージ関連遺伝子だけでなく、糖代謝系や薬剤耐性遺伝子など株ごとに所持している機能遺伝子モジュールが異なっており、同一細菌種においても異なる機能を有することが示唆された。これらの株に見られる構造多型は宿主毎に異なる傾向を有しており、プロファージ様配列の特定や細菌亜株の判定、遺伝子伝播関係の推定などに有効であることが示唆された。

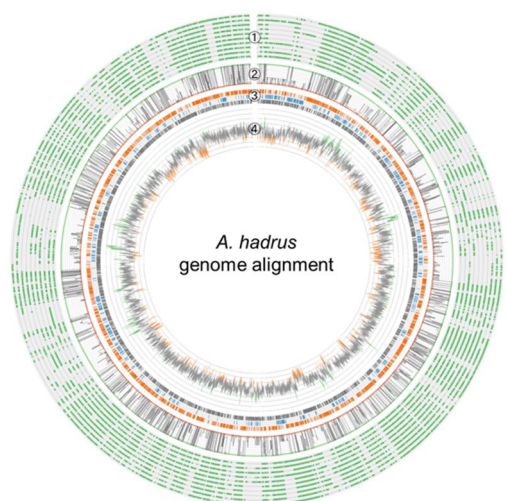


図 3 本研究で獲得した *A. hadrus* のゲノムマップ(9 株+既知株)
株ごとのコード領域(緑)
CDS を有する株数(内 1 10 外)
CDS の機能アノテーション
GC%(内 20% 60%外)

(4) まとめ

当初目的としていた DNA 非増幅ベースの方法論とは異なるが、DNA 増幅ベースのシングルセルゲノム解析方法においてもパイオインフォマティクス解析プロセスの工夫により、ゲノム増幅時に生じるキメラ配列やバイアスを効率的に除去して、コンプリートゲノムを得ることが可能となった。また、DNA 非増幅ベースの方法は、増幅バイアスを与えずに多数の細菌ゲノム構成を評価できる特徴がある。今回検討した技術を応用し、増幅・非増幅それぞれのゲノム配列解析を統合的に利用し、両者の強みを活かした解析も展開が検討できる。本研究で確立した、コンプリートゲノムをシングルセルから得る方法は、難培養性微生物の精緻なゲノムデータベースの拡大に寄与する技術であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Lewaru Muhammad Wahyudin, Nishikawa Yohei, Ide Keigo, Kogawa Masato, Hosokawa Masahito, Samuel Ashok Zachariah, Sumimoto Shinpei, Nuryadi Handung, Suda Shoichiro, Takeyama Haruko	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft Genome Sequence of Okeania sp. Strain KiyG1, Assembled from Single-Amplified Genomes Collected from Cape Kiyau, Okinawa, Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	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） 10.1128/MRA.00837-20	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 -

1. 著者名 Arikawa Koji, Ide Keigo, Kogawa Masato, Saeki Tatusya, Yoda Takuya, Endoh Taruho, Matsuhashi Ayumi, Takeyama Haruko, Hosokawa Masahito	4. 巻 -
2. 論文標題 Recovery of high-quality assembled genomes via metagenome binning guided with single-cell amplified genomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2021.01.11.425816	査読の有無 無
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10件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細川正人
2. 発表標題 シングルセルゲノミクスで未培養細菌ゲノムを網羅解析
3. 学会等名 蛋白研セミナー：オミクス解析における実験と数理の協働（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細川正人
2. 発表標題 シングルセルゲノム解析が変革する海洋微生物研究
3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川正人
2. 発表標題 1 細胞ゲノミクスによるデータ駆動型の生物工学研究
3. 学会等名 生物工学フォーラム「情報解析が切り拓く創薬・生物工学研究の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 雅人、細川 正人、西川 洋平、柳澤 有祐、佐伯 達也、依田 卓也、竹山 春子
2. 発表標題 シングルセルゲノム情報を用いた未培養環境細菌のコンプリートゲノムの獲得
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川 雅人、西川 洋平、細川 正人、松永 茂樹、Piel Joern、竹山 春子
2. 発表標題 シングルセル解析技術を用いた二次代謝産物産生カイメン共生微生物のゲノム解析
3. 学会等名 第14回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柳澤有祐、小川雅人、細川正人、西川洋平、佐伯達也、依田卓也、有川浩司、竹山春子
2. 発表標題 微生物のシングルセルゲノムを用いたcompletegenome構築技術の開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川正人
2. 発表標題 メタゲノムのその先へ-シングルセルゲノム網羅解析-
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細川 正人、西川 洋平、小川 雅人、千々岩 樹佳、井手 圭吾、有川 浩司、竹山 春子
2. 発表標題 大規模シングルセルゲノム解析技術を駆使した環境微生物の多様性の理解
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川正人
2. 発表標題 マイクロバイーム研究への大規模1細胞ゲノムシーケンスの活用
3. 学会等名 京都バイオ計測センター・京都大学ナノハブ拠点連携シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川 正人、西川 洋平、小川 雅人、千々岩 樹佳、井手 圭吾、有川 浩司、竹山 春子
2. 発表標題 シングルセルゲノムレベルでのマイクロバイーム解析
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 竹山 春子、細川 正人	4. 発行年 2020年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 200
3. 書名 シングルセル解析でなにがわかるか	

1. 著者名 菅野 純夫（編集） 細川正人、小川雅人	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 128
3. 書名 医学のあゆみ 1細胞解析-技術と応用 「1細胞ゲノム解析で多様な細菌叢を捉える」	

1. 著者名 細川正人、小川雅人、竹山春子（分担執筆）（渡辺 亮、鈴木 穰 編）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 219
3. 書名 実験医学増刊 Vol.37 No.20 シングルセルゲノミクス	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 単一生物単位の配列情報の新規処理法	発明者 有川浩司、細川正人、竹山春子、小川雅人、井手圭吾	権利者 bitBiome株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6744642号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 単一生物単位の配列情報の新規処理法	発明者 有川浩司、細川正人、竹山春子、小川雅人、井手圭吾	権利者 bitBiome株式会社
産業財産権の種類、番号 特許、特許第6744648号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------	---------