

環境微生物の単一細胞ゲノム解析に向けた  
微小液滴作製技術の開発

Development of droplet microfluidics toward  
single-cell genomics of environmental bacteria

2019 年 2 月

西川 洋平

Yohei NISHIKAWA

環境微生物の単一細胞ゲノム解析に向けた  
微小液滴作製技術の開発

Development of droplet microfluidics toward  
single-cell genomics of environmental bacteria

2019 年 2 月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科  
生命医科学専攻 生命分子工学研究

西川 洋平

Yohei NISHIKAWA

## 目次

第 1 章 緒論 .....	3
1.1 はじめに .....	3
1.2 培養法を用いた環境微生物の解析 .....	4
1.3 メタゲノムを用いた環境微生物の解析 .....	4
1.4 単一細胞由来ゲノムを用いた環境微生物の解析 .....	7
1.5 微小反応場を用いた単一細胞解析技術の特徴と応用例 .....	10
1.6 本研究の目的と意義 .....	15
1.7 参考文献 .....	18
第 2 章 ドロップレット作製技術の開発と単一細胞由来 DNA 断片を封入したドロップレットによる全ゲノム増幅法の開発 .....	25
2.1 緒言 .....	25
2.2 実験方法 .....	27
2.2.1 マイクロ流体デバイスの作製 .....	27
2.2.2 マイクロ流体デバイスを用いたドロップレットの作製 .....	29
2.2.3 ドロップレット内での 1 分子 DNA からの全ゲノム増幅 .....	29
2.2.4 大腸菌を用いた単一細胞由来 DNA からの全ゲノム増幅 .....	31
2.3 結果・考察 .....	34
2.3.1 ドロップレットの粒径および生成速度の測定 .....	34
2.3.2 ドロップレット内での全ゲノム増幅反応の蛍光モニタリング .....	34
2.3.3 増幅産物の定量による目的外 DNA 増幅量の評価 .....	37
2.3.4 次世代シーケンサーを用いた NTC 由来の増幅産物の配列解析 .....	39
2.3.5 qPCR を用いた単一細胞の全ゲノム増幅産物の評価 .....	41
2.3.6 次世代シーケンサーを用いた単一細胞由来増幅産物の配列解析 .....	41
2.5 参考文献 .....	50
第 3 章 ドロップレット融合技術の開発と単一微生物を封入したドロップレツ	

トによる超並列全ゲノム増幅法の開発.....	52
3.1 緒言 .....	52
3.2 実験方法 .....	54
3.2.1. 細胞を封入したドロップレットの作製 .....	54
3.2.2 単一細胞のドロップレット内全ゲノム増幅に向けたマイクロ流体デバイスの作製 .....	54
3.2.3 融合手法を用いたドロップレット内での単一細胞の全ゲノム増幅 ....	56
3.2.4 大腸菌および枯草菌を用いた単一細胞ゲノム増幅.....	60
3.2.5 土壌微生物を用いた単一細胞ゲノム増幅 .....	62
3.3 結果・考察 .....	63
3.3.1 ドロップレット内細胞濃度の測定 .....	63
3.3.2 ドロップレット融合効率の評価 .....	63
3.3.3 大腸菌封入ドロップレットを用いた sd-MDA の性能評価 .....	65
3.3.4 大腸菌封入ドロップレットを用いた単一細胞ゲノム増幅産物の収量評価 .....	70
3.3.5 大腸菌および枯草菌を用いた単一細胞ゲノム増幅産物の配列解析（生リード） .....	72
3.3.6 大腸菌および枯草菌由来の増幅産物を用いた増幅バイアスの評価 ....	78
3.3.7 大腸菌および枯草菌由来の増幅産物を用いた de novo assembly による配列解析（Contig） .....	78
3.3.8 土壌微生物を用いた単一細胞ゲノム増幅産物の評価 .....	79
3.4 結言 .....	87
3.5 参考文献 .....	88
第 4 章 結論 .....	91
4.1 参考文献 .....	94
謝辞 .....	95

## 第1章 緒論

### 1.1 はじめに

微生物とは、我々の肉眼で確認することができない微小な生物のことを指す。これらの微生物は地球上のあらゆる環境に生息しており、自然界における物質循環や地球環境の恒常性の維持において非常に重要な役割を果たしている。我々の身近な環境においても多種多様な微生物が存在しており、1 gの土壌には $10^{10}$ 個以上の微生物が (Torsvik et al., 1990)、1 mLの海水中には $10^6$ 個以上の微生物が含まれていると言われている (Maranger and Bird, 1995)。また、地球上全体に生息する微生物の種類は現在でも正確な値が判明しておらず、2016年の大規模調査では、約 $10^{12}$ 種の微生物が存在していると推測されている。しかしながら、これまでにその存在が明らかにされている微生物種はほんの一部に過ぎず、99.999%の微生物は未だ発見されていないとも言われている (Locey et al., 2016)。一方で、これまでに存在が確認されてきた微生物の特性を調べることにより、我々人類は様々な恩恵を微生物から享受してきた。例えば、味噌やヨーグルトなどの発酵食品は、酵母菌や乳酸菌などの微生物の働きを活用することによって製造されている。また、放線菌や糸状菌が生産する代謝産物を調べることによって、抗生物質をはじめとする様々な生理活性物質が獲得されている (Sanglier et al., 1993) (Berdy, 2005)。この他にも、これまでに多くの有用酵素 (Eller and Frenzel, 2001) や2次代謝産物 (Park et al., 2008) が微生物から発見されており、医療や産業の分野において多くの応用がなされている (Chen et al., 2014)。また近年では、我々の腸内に生息する微生物が、宿主である人間の生理機能や生活習慣病 (Tilg and Kaser, 2011)、精神疾患 (Cryan and O'Mahony, 2011) などに関連していることが明らかとなるなど、環境中の微生物には未だ明らかにされていない様々な機能が存在すると考えられる。

そこで、これらの環境微生物の機能を詳細に解析するための手法が必要となる。微生物研究が始まった当初より、我々人類は環境中の微生物を培養し、その生態や特性を調べることによって様々な利益を享受してきた。また近年では、次世代シーケンサーの開発・発展により、微生物が有するゲノムの情報を迅速かつ大量に獲得することが可能となり、微生物の機能解明に向けた新しい解析技術が急速に発展しつつある。本章ではまず、これまでに行われてきた環境微生物を対象とした解析手法について、それぞれの利点と現状の問題点について述べた後、本論

文で着目する単一細胞レベルでの微生物解析技術を紹介する。最後に、本研究の目的と本論文の構成について述べる。

## 1.2 培養法を用いた環境微生物の解析

環境微生物の機能を解析するための手法として最も古くから行われてきた手法は、環境中より微生物を単離培養し、その生態や代謝物質の機能を解析する手法である (Whittenbury et al., 1970) (Wahler and Reymond, 2001) (Fig. 1.1A)。また、十分量にまで増殖した細胞から DNA を抽出して配列情報を取得することにより、微生物に含まれる遺伝子の情報を獲得することも可能となる。微生物 1 細胞の大きさは、大腸菌の場合で体長おおよそ  $2 \mu\text{m}$ 、体積にして  $0.7 \mu\text{m}^3$  ( $<1 \text{ fL}$ ) 程度であり、単一細胞内に含まれる情報は非常に微量である。そのため、微生物研究における初期段階では、対象となる微生物の培養方法を確立し、十分な細胞数を確保することが研究の第一歩であった。微生物の応用例として紹介した発酵食品や生理活性物質については、これらの培養法が確立された微生物を用いることによって獲得された成果であり、培養された微生物を解析する手法は微生物の機能解明における最もシンプルかつ強力な手法である。そのため、現在においても様々な環境に生息する微生物を対象とした培養法の確立を目指し、新たな培地組成の検討や培養方法の検討が行われている (Kaeberlein et al., 2002) (Jansen et al., 2002) (Valtoukian et al., 2010)。しかしながら、現在の実験室環境下においても環境微生物を単離培養することは非常に難しく、これまでに培養法が確立された微生物は、存在が確認されている微生物全体の 1% に満たないとも言われている (Michael and Colin, 1999)。環境微生物の単離培養が困難である理由として、実験室環境で微生物が生息している環境を再現することが難しい、微生物の生育速度が著しく遅い、生育のために他の微生物との相互作用を必要とするなどの要因が考えられるが、これらの原因はこれまでに培養法が確立された微生物の生態から予測されたものに過ぎず、どの微生物がどのような原因によって培養が不可能であるのかを推測することは非常に困難である。このため、現在でも多くの環境微生物は単離培養法が確立されておらず、これらの難培養微生物の存在は生物界におけるダークマターと例えられるほどである (Rinke et al., 2013)。

## 1.3 メタゲノムを用いた環境微生物の解析

培養法における問題点を解決するための方法として、培養に依存することなく

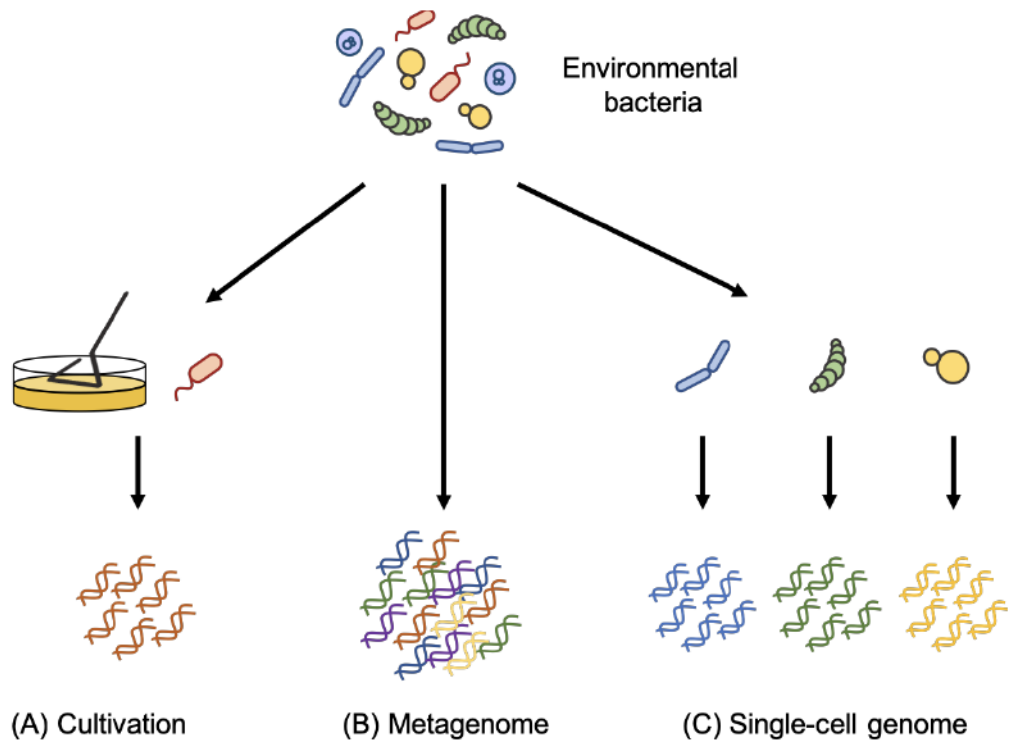


Fig. 1.1 環境微生物の解析方法

- (A) 単離培養を用いた解析
- (B) メタゲノム解析
- (C) 単一細胞ゲノム解析

微生物が有する生体情報を取得する技術が求められる。この技術の一つとして、環境中の微生物集団から DNA をまとめて抽出し、得られたメタゲノム DNA に含まれる遺伝子情報を解析する手法が 2000 年に提案された (Beja et al., 2000) (Fig. 1.1B)。続いて 2004 年には、海洋細菌を対象としたメタゲノム解析によって 120 万個の新規遺伝子が発見され (Venter et al., 2004)、メタゲノムを用いた解析が急速に注目を集めることとなった。近年の次世代シーケンサーの発達により、膨大な量の配列情報を比較的安価かつ迅速に取得することが可能となり、環境サンプルから抽出したメタゲノムを用いて配列解析を行うことにより、対象となる環境中に含まれる DNA の配列情報を網羅的に取得することが可能となった。また、メタゲノム中に含まれる 16S rRNA 遺伝子の配列と割合を調べることにより、対象となる環境中に含まれる微生物の種類 (菌叢) と数を推定することができるようになった。これにより、対象環境にもたらされた様々な刺激に対して、その前後の菌叢とその割合を解析することが可能となり、対象環境において重要な役割を果たす菌種の特定、あるいは微生物間の相互作用などがこれまでに明らかにされてきた (Langille et al., 2013) (Sinckair et al., 2015)。微生物の機能の一例として紹介した腸内細菌と宿主の関係性の解明においては、菌叢解析のデータが広く用いられており、食事や運動が腸内細菌に与える影響などがこれまでに調べられている (Kang et al., 2014)。またその他にも、極限環境を含む地球上の様々な環境を対象としてメタゲノム解析が進められており、これらの大規模な配列解析によって環境微生物の群集構造やその変動、未知の遺伝子情報などがこれまでに明らかにされている (Rondon et al., 2000) (Kennedy et al., 2010)。さらに、メタゲノムを用いた配列解析によって遺伝子情報を取得することにより、培養法の確立されていなかった難培養微生物の培養法を推定し、実際に可培養化に成功した例が報告されている (Kwak et al., 2018)。以上のように、メタゲノムを用いた解析によって、培養法では獲得することのできなかつた様々な新しい知見が獲得されるようになり、近年では新たな可培養化へのアプローチとしてもメタゲノムを対象とした解析技術が注目を集めている。

しかしながらメタゲノム解析では、環境微生物の DNA をまとめて抽出し、次世代シーケンサーによって断片化された配列情報が獲得されるため、得られた配列を用いて、どの微生物がどの遺伝子を有していたかという情報を獲得することが非常に困難であった (Yilmaz and Singh, 2012)。近年では、長鎖の DNA 配列情報が取得できる次世代シーケンサーの開発も進んでいる (Eid et al., 2009) (Jain et



al., 2015) が、個々の微生物のゲノム情報を解析するためには膨大な量の配列データを取得する必要がある、多大な時間とコストが必要であった。また、メタゲノムを用いた配列解析では細胞ごとのゲノム情報を獲得することができないため、細胞間での遺伝子情報の比較を必要とする遺伝子水平伝播の解析や、同一細胞種内での遺伝子突然変異や変異株の検出などの解析を行うことが不可能であった。このように、メタゲノムを用いた解析においても様々な問題点が残されており、個々の環境微生物を対象としたより詳細な解析技術の開発が求められている。

#### 1.4 単一細胞由来ゲノムを用いた環境微生物の解析

メタゲノム解析が抱えるこれらの問題に対し、環境微生物のゲノム情報を単一細胞レベルで解析する手法が近年注目を集めている (Yilmaz and Singh, 2012) (Fig. 1.1C)。単一細胞レベルでゲノム情報を獲得することにより、配列解析によって個々のゲノム情報を再構成することが可能となる。これにより、これまでは不可能であった細胞間でのゲノム情報の比較が可能となるため、個々の微生物についてより詳細な解析が可能になると考えられる。また、従来までは困難であった合成遺伝子クラスターなどのサイズの大きな遺伝子についても情報の取得が可能になると考えられる。さらに単一細胞の解析では、細胞集団中において存在比が少なく、メタゲノムの解析では埋もれていたマイナー微生物のゲノム情報が獲得できる可能性があり、単一細胞を対象としてゲノム解析を行うことによって、メタゲノム解析での問題点を解決できるのではないかと期待が高まっている。このような需要に対し、環境微生物を対象とした単一細胞ゲノム解析技術の確立を目的として、これまでに様々な技術の開発が行われてきた。

環境微生物からの単一細胞ゲノム解析を実現するためには、単一細胞の分離、細胞の溶解、全ゲノム増幅、シーケンスライブラリの調製、次世代シーケンサーを用いた配列情報の取得といった工程を行う必要がある。この内、単一細胞の分離は一連の反応における第一段階であり、効率的かつ高速に単一細胞を分離するための技術開発が活発に進められている (Podgorny, 2013) (Yoshimoto et al., 2013) (Pizon et al., 2013)。従来までの手法では、FACS (Fluorescence activated cell sorting) などに代表されるセルソーターを用いて、単一細胞をマイクロプレートの各ウェルに分取した後、細胞の溶菌操作および全ゲノム増幅反応をプレート上で実施する方法が一般的であった (Lasken, 2007)。セルソーターを用いることにより、個々の細胞の相対的な大きさや形状、内部構造の違いを高速に検出し、単一細胞を分

取することが可能であり、本手法は免疫学や細胞生物学をはじめとする幅広い研究分野において活用されている。しかしながら FACS をはじめとするセルソーターでは、レーザー照射によって得られる散乱光や蛍光を指標として細胞の分取を行うため、標的となる細胞集団の状態によって細胞分取の効率が大きく影響されることが知られている。このため、標的となる細胞のサイズが小さい微生物の分取や、細胞成分以外のゴミや微小粒子が混入しやすい環境サンプルからの細胞分取においては、単一細胞の分取効率および全ゲノム増幅の効率が大きく低下する。これまでに報告されている事例として、海水や泥を含む 9 種類の環境サンプルを対象として、FACS を用いた細胞分取および全ゲノム増幅が行われている (Rinke et al., 2013)。しかしながら本研究においては、全ゲノム増幅反応後に十分な DNA 増幅が確認されたサンプルは全体の約 34% (3300/9600)、その後の品質評価によりシーケンス解析が実施されたサンプルは全体の約 2.1% (201/9600) に留まっている。このように、環境微生物を対象とした単一細胞ゲノム解析では、分取した細胞数に対して、ゲノム情報が獲得できるサンプル数の歩留まりが低いことが問題となっている。

また、単一細胞に含まれる微量な DNA 情報を増幅するための全ゲノム増幅手法についても、1992 年に初めて報告がなされて以降、様々な手法が開発されている (Zhang et al., 1992) (Zong et al., 2012) (Blagodatskikh et al., 2017)。微生物一細胞が有する遺伝子の数は数千個程度であるとされており、これらの遺伝子情報は数 Mb のサイズからなる DNA の塩基配列上に記されている。一方、微生物一細胞あたりに含まれる DNA の重量は、一般的な真正細菌で fg ( $10^{-15}$  g) 程度であり、一般的な動物細胞に比べて 1000 分の 1 程度である。近年の次世代シーケンサーの発展により、現在では 1 ng ( $10^{-9}$  g) の DNA を用いて配列解析を行うことが可能となっている。しかしながら、単一細胞に含まれる DNA 量は 1 ng よりも大幅に少なく、次世代シーケンサーによる解析を行うためには、単一細胞が有するゲノムの情報を解析可能な量にまで増幅する工程 (全ゲノム増幅) が必要となる。代表的な全ゲノム増幅手法として、MDA (Multiple displacement amplification) と呼ばれる手法が挙げられる (Spits et al., 2006)。MDA では、鎖置換活性を有する Phi29 polymerase とランダムプライマーを用いることによって、単一細胞由来の DNA を等温環境下においてマイクログラム ( $10^{-6}$  g) 量にまで増幅することができる。MDA 以外の全ゲノム増幅法として、これまでに MALBAC (Multiple annealing and looping-based amplification cycles) (Zong. et al, 2012) や DOP-PCR (degenerate

oligonucleotide-primed PCR) (Telenius et al., 1992) と呼ばれる手法が開発されている。しかしながら MALBAC では、MDA に比べて作業工程が多くなることから、目的外 DNA の混入リスクが高まることが指摘されており、また増幅時のエラー率も MDA に比べて 10 倍程度高いという報告がなされている (de Bourcy et al., 2014)。また、DOP-PCR においても同様に、増幅時のエラー率が高いことや、増幅産物のゲノムカバー率が MDA に比べて低いことが問題となっている (Navin et al., 2011)。これらの理由により、単一細胞からの全ゲノム増幅手法として、MDA が現在最も一般的に使用されている。

しかしながら、MDA による全ゲノム増幅にも問題点が存在する。第一に、コンタミネーション DNA の混入によって目的外 DNA の増幅が発生することである。MDA で使用されるランダムプライマーはその特性上、反応液中に混入したコンタミネーション DNA に対しても結合が可能であるため、標的細胞の DNA だけでなく環境中から混入した目的外 DNA についても同様に増幅が行われる。一般的な実験室環境で行われる全ゲノム増幅反応 (5  $\mu$ L) においては、50 コピー程度の目的外 DNA 分子が混入するとの報告がなされており (Blainey, 2012)、これらの混入した DNA に起因する目的外の増幅は、キメラ配列の生成などによって全ゲノム増幅の効率を低下させる大きな要因となっている (Lasken and Stockwell, 2007)。特に、微量な DNA を初期テンプレートとする単一微生物からの全ゲノム増幅においては、目的外 DNA の混入は重大な問題である。第二の問題は、増幅されるゲノム領域に偏り (バイアス) が生じることである。MDA を用いたゲノム増幅では、一本鎖 DNA にプライマーが結合することで指数関数的に DNA が増幅される。このため、反応初期のプライマー結合部位に偏りが生じた場合、増幅されるゲノムの領域に大きな偏りが生じることになる。これまでの報告により、プライマーの結合頻度は鋳型 DNA の GC 含有率 (Bredel et al., 2005) や 2 次構造 (Suzuki and Giovannoni, 1996) の影響を受けることが示唆されている。また、単一細胞を対象としたゲノム増幅においては、サンプルの状態や溶菌の程度によってプライマーの結合領域に偏りが生じると考えられる。増幅反応中に生じたこれらの偏りによって、最終的には DNA 断片間での増幅の競合が発生し、一部の配列情報が過剰に増幅され、一部の配列情報が埋もれてしまう状態が生じる。このようにして配列情報に偏りが生じる結果、単一細胞のゲノム解析のためには、ゲノムサイズを大きく上回るデータ量を用いた解析が必要とされる。また、プライマーの結合頻度が低い領域では、適切に増幅が行われず情報が失われるため、結果として

ゲノムカバー率が低下してしまう。

これらの問題を解決するため、これまでに様々な改良が行われてきた。まず、目的外 DNA の増幅を防ぐ手法として、実験に用いる器具やチップ・チューブ類に対する UV 処理が行われている。また、全ての操作をクリーンベンチ内で行うことで、目的外 DNA の混入リスクを抑制することができる (Zhang et al., 2006)。しかしながら、市販されているキット自体にもコンタミネーション DNA が含まれているとの報告がなされており (Blainey et al., 2011)、MDA 反応試薬を研究室で独自に調製する、あるいは MDA 試薬に対して UV 処理を行う (Woyke et al., 2011) などの対策が行われている。2009 年に設立された、微生物の単一細胞ゲノム解析を目的とした研究施設 (SCGC: Single cell genomics center) では、厳重に管理された清浄環境の中で実験操作が行われており、目的外 DNA の混入を抑制して反応を行うことのできる環境は、現在では一部のごく限られた施設内に制限されている。また、増幅バイアスの改善のためには、トレハロース (Ballantyne et al., 2006) や PEG400 (Pan et al., 2008) といった分子クラウディング効果をもつ高分子を MDA 反応液中に添加する手法が報告されている。これにより、DNA 分子とポリメラーゼ間の結合が促進される結果、微量な DNA を鋳型として用いた場合でも低バイアスな DNA の増幅が可能になるとされている。また近年では、単一細胞由来の配列情報の解析に特化したソフトウェアについても開発が進んでいる (Peng et al., 2012) (Nurk et al., 2013) (Tennessen et al., 2015)。これらの取り組みにも関わらず、全ゲノム増幅における目的外 DNA の増幅および増幅バイアスは依然として大きな問題であり、モデル微生物として大腸菌を対象とした配列解析では、ゲノムカバー率は 70%程度に留まっていた (Marcy et al., 2007)。また、培養株を用いた場合に比べて汚染リスクの高い環境微生物を対象とした配列解析では、目的外 DNA 由来の増幅産物やキメラ配列の生成などの影響によって配列情報の精度はさらに低下し、CheckM と呼ばれるソフトウェアを用いて算出されるゲノムの推定補完率 (Completeness) は平均 40%に留まっていた。以上のように、従来法を用いた単一細胞ゲノム解析では、ゲノム情報の獲得のために多大な時間とコストが必要とされており、また得られた配列情報のほとんどが品質の低いものであった。

### 1.5 微小反応場を用いた単一細胞解析技術の特徴と応用例

単一微生物のゲノム解析に向けた様々な技術が開発される一方で、微生物や真

核細胞を含めた単一細胞、あるいは DNA やタンパク質などの微量な生体分子を対象とした解析技術として、Lab on a chip と呼ばれる技術が注目されるようになった。1990 年代以降、MEMS (Microelectromechanical Systems) 等に代表される微細加工技術の発展に伴い、シリコンやガラス製の基板上にマイクロメートルサイズの微小な流路や反応容器を作製し、ナノリットルやピコリットル容量の流体を操作することが可能となった。また、これらの技術を応用することによって、従来までは実験室規模で行われてきた試薬の混合・分離・検出などの種々の反応を、小型のデバイス上で実現することができるようになった (Mark et al., 2010)。これらの技術はマイクロフルイディクス (Microfluidics) と呼ばれており、小型のデバイスを用いて反応を進行させることによって、試薬の削減や反応の迅速化、システムの集積化によるスループットの向上など、様々な利点が得られることがこれまでに報告されている (Andersson and van den Berg, 2003)。また、これらの利点を活用することによって、従来法に比べて迅速かつ高精度・高感度なセンサーが開発されるなど、マイクロフルイディクスの技術は生物・化学分野において幅広く応用がなされている (Kuswandi et al., 2007)。

マイクロフルイディクスを用いた技術の一つとして、フォトリソグラフィ等の MEMS 技術により作製したマイクロ流体デバイスを用いて、nL ( $10^{-9}$  L) から pL ( $10^{-12}$  L) 容量の微小な液滴を連続生成する技術が存在する (ドロップレットマイクロフルイディクス: Droplet microfluidics)。本技術では、微細な流路構造を配したマイクロ流体デバイスに、ドロップレットの構成成分となる水溶液と、分散媒であるキャリアオイルを一定の速度で導入することによって、均質なドロップレットを高速に生成することが可能である。また、キャリアオイルには一定の濃度で界面活性剤が含まれており、作製されたドロップレットは融合することなく形状を保持することが可能である。近年、これらの特徴を応用することによって、ドロップレット作製技術は単一細胞の解析ツールとして注目を集めており、微生物をはじめ、種々の動物細胞 (Chokkalingam et al., 2013) (Mongersun et al., 2016) からウイルス (Chaipan et al., 2017) に至るまで、幅広い種類の細胞・粒子を対象とした単一細胞解析がこれまでに実施されている。例えば、水溶液中に細胞を懸濁してドロップレットを作製することにより、細胞を封入したドロップレットを高速に生成することができる。キャリアオイルとして酸素透過性の高いハイドロフルオロエーテル (HFE) などのフッ素系オイルを使用し、界面活性剤として生体適合性の高い PEG-PFPE などを使用することによって、封入後の単一細胞を生

きたまま観察することが可能になる。これまでに大腸菌などの真正細菌 (Huebner et al., 2009) や微細藻類 (Boedicker et al., 2008)、酵母などの菌類 (Pan et al., 2011) がドロップレット内で培養されており、集団での培養時と同程度の速度で増殖が可能であることが報告されている。また、細胞を懸濁する溶液の種類を変えることによって、微生物の薬剤耐性の評価 (Boedicker et al., 2008) や酵素発現の検出 (Hosokawa et al., 2015) など、様々な反応をドロップレット内で実施することが可能である。

以上のような研究を通じて、微小空間を用いた単一細胞解析は近年急速に発展を遂げた。さらに 2000 年代の後半以降、マイクロチャンバーの作製技術やドロップレット作製技術に代表される微小反応場の作製技術は、単一細胞や DNA 分子を対象とした配列解析技術へと広く応用されてきた。これまでに開発されてきた代表的な技術としては、下記が挙げられる。

#### ① マイクロチャンバーを用いた MDA (Mercy et al., 2007)

マイクロ流体デバイスを用いた全ゲノム増幅手法は、2007 年に Marcy らによって初めて報告された。Marcy らの研究では、空気圧によってバルブの開閉を制御することのできるマイクロ流体デバイスを設計し、細胞の分取、細胞溶菌、全ゲノム増幅をデバイス内で実施可能なシステムが開発された。本技術を用いることによって一細胞の大腸菌から最大 90% のゲノムカバー率が獲得され、微小空間内で全ゲノム増幅反応を進行させることによって増幅の均質性が向上するという結果が報告されている。また、本技術を応用することによって、アンモニア酸化古細菌や精子を対象とした単一細胞ゲノム解析がこれまでに実施されている。一方で、本システムでは 20 個以上のバルブの開閉を制御する必要があり、一度に解析できる細胞数の上限は 96 細胞となっている。

#### ② マイクロチャンバーを用いた MALBAC (Yu et al., 2014)

MALBAC を用いた全ゲノム増幅を可能とするマイクロチャンバーが 2014 年に Yu らによって報告されている。本技術では、2007 年の Marcy らのデバイスと同様、空気圧によって開閉するバルブを制御することによって、一度に 95 個の単一細胞を対象とした全ゲノム増幅を可能としている。個々の反応容積は 500 nL であり、マウス胚性幹細胞 (mES) を用いた検証により、従来法に比べて目的外 DNA の混入リスクの抑制効果が報告されている。また、本技術で使用する MALBAC で

は、MDA とは異なり熱サイクルの印加が必要であるため、マイクロ流体デバイスに対して加温操作が可能な設計となっている。これにより、本システムでは GC% の高い配列に対してより均質なゲノム増幅が可能であるとされている。

#### ③ マイクロウェルを用いた MDA (Gole et al., 2014)

2013 年には、Gole らによってマイクロウェルを用いて単一細胞から全ゲノム増幅を行う手法が開発された (MIDAS)。本技術では、12 nL 容量の微小ウェルが 4,080 個存在するマイクロウェル内に単一細胞を分配することによって、細胞の溶解、全ゲノム増幅、増幅した DNA の回収までを行うことが可能である。本技術では、バルブの制御などが必要とされないため、マイクロチャンバーを用いた MDA 法に比べて、比較的簡便に多数の細胞を対象とした解析が可能となる。大腸菌を用いたシステムの検証では、98% のゲノムカバー率が達成されている。しかしながら、マイクロウェルの使用によって目的外 DNA の混入リスクが高くなるため、本技術の使用には清浄に管理された実験環境が必要とされることが考えられる。このため、本技術の環境サンプルへの適応例は現在のところ報告されていない。

#### ④ In-gel digital MDA (Xu et al., 2016)

2016 年に Xu らによって開発されたシステムでは、ポリエチレングリコール (PEG) 製のゲルを用いて細胞を補足し、細胞溶解および全ゲノム増幅を行うことができる (In-gel digital MDA)。ゲルの孔径を 25 nm に制御することによって、細胞をゲルに補足した状態で、細胞溶解のための酵素および全ゲノム増幅のための試薬を細胞に対して反応させることができる。DNA 結合色素を用いてゲルを染色した後、穴あけパンチを用いて DNA の増幅が確認された領域を選択的に分取することで、単一細胞由来のゲノム増幅産物が獲得される。モデル微生物として大腸菌や黄色ブドウ球菌を用いた検証では、ゲノムカバー率は 30-60% に留まっているが、従来法に比べてキメラ配列の生成率が約 5 分の 1 に抑制されることが報告されている。本技術ではマイクロ流体デバイスを使用しないため、上記の手法に比べて簡便であることが利点として挙げられるが、穴あけパンチによるサンプル回収ではコンタミネーションの発生率が高く、糞便中の細菌を対象としたゲノム解析では、回収されたサンプルの内、実際にゲノム解析が行われたサンプルの割合は 30% 以下となっている。

⑤Single-molecule droplet barcoding (SMDB) (Lan et al., 2016)

DNA 断片をドロップレット内に封入して全ゲノム増幅と断片化処理を行い、バーコード配列を有したプライマーと結合させることによって次世代シーケンサー解析用のライブラリを調製する技術が 2016 年に Lan らによって開発されている。本技術によって、物理的距離が近い DNA 配列が同一のバーコード配列によって標識されるため、出力される配列情報を効率的にアセンブルすることが可能となる。これにより、断片化された DNA の配列情報から 10 kbp 以上の長さの情報を再構築することを可能としている。本技術では、全ゲノム増幅反応、およびバーコード配列の付加をドロップレット内で実施することが可能であるが、配列解析の対象は DNA 断片であり、単一細胞からのゲノム増幅には現在のところ適用されていない。

⑥Single-cell genomic sequencing (SiC-seq) (Lan et al., 2017)

2017 年に Lan らによって報告された SiC-seq (single-cell genomic sequencing) では、単一細胞をゲル製のマイクロドロップレット内に封入し、細胞の溶解、DNA の断片化、およびインデックス配列を用いた DNA 断片のバーコード化とライブラリの調製までの反応をドロップレット内で実施する技術である。SiC-seq では、ドロップレットの高速作製技術を応用することによって、一度に 50,000 個以上の単一細胞を対象としたゲノム解析が可能であり、環境サンプルへの応用例として海水中の微生物を対象としたゲノム解析がすでに実施されている。一方、本技術では、単一細胞由来の DNA に対して全ゲノム増幅を実施しないため、それぞれの細胞から得られるゲノムカバー率は 1%程度と低い。このため、より高精度なゲノム情報を獲得するためには、単一細胞から得られた個々のゲノム情報を統合して解析を行う必要があり、細胞集団中の存在比が少ない細胞については高精度な配列解析が困難となる。また本手法では、ゲノムカバー率が低いことから同一種の細胞間でのゲノム情報の比較が困難であると考えられる。

また、上記に挙げた例の他にも、ドロップレットを用いた様々な単一細胞解析技術が存在する。例えば、ドロップレット作製技術とバーコード配列を有したマイクロビーズを組み合わせることによって、単一細胞の mRNA を対象とした網羅的な遺伝子発現解析を可能とする Drop-seq と呼ばれる技術や、ドロップレット作製



技術とクロマチン免疫沈降を組み合わせることによって、単一細胞レベルでのクロマチン結合領域の検出および核酸とタンパク質の相互作用の解析などを行う技術 (Single-cell ChIP-seq) が存在する。しかしながら、これらのドロップレットを用いた単一細胞解析技術は、主に動物細胞を解析の対象としており、動物細胞に比べて細胞の大きさやゲノムサイズが小さく、また膜構造が特殊な原核細胞には応用が遅れていた。

## 1.6 本研究の目的と意義

以上の背景を踏まえ、本研究では、従来法における単一細胞ゲノム解析の問題点として、標的となる単一細胞に対して反応容積が大きすぎることに着目した。特に全ゲノム増幅の工程では、反応容積が大きいことによって目的外 DNA の混入リスクが高まっており、スループットの抑制にもつながっていることが問題であると考えた。そこで、反応容積を縮小するための手法としてピコリットル容量の微小液滴 (ドロップレット) 作製技術に着目し、全ゲノム増幅の反応場としてドロップレットを利用した、新たな全ゲノム増幅法の開発を行うことを目的とした。

本研究では、単一細胞のゲノム解析を実施する場合において、その目的を2種類に大別した。一方は、解析の対象となる標的細胞がすでに決定しており、標的細胞の分取が可能である場合に、単一細胞から高精度なゲノム情報を獲得することを目的とする場合。もう一方は、多様な環境微生物集団を対象として、多種類の単一細胞のゲノム情報を網羅的に獲得することを目的とする場合である (Fig. 1.2)。それぞれの目的に応じた全ゲノム増幅手法として、第2章では Compartmented droplet MDA (cd-MDA) と呼ばれる全ゲノム増幅手法を、第3章では Single droplet MDA (sd-MDA) と呼ばれる全ゲノム増幅手法をそれぞれ開発し、その有用性を評価した。cd-MDA では、単一細胞由来の DNA 断片をドロップレット内に封入し、ドロップレット内で個々の DNA 断片を個別に増幅する。一方 sd-MDA では、単一細胞をドロップレットに封入し、全ゲノム増幅を含んだドロップレットとの融合を行うことによって、一度に多数の細胞を対象とした全ゲノム増幅を実施する。各章では、それぞれの全ゲノム増幅手法の開発において必要とされるドロップレットの作製・操作技術を開発し、生成速度や融合効率などの評価を行った。また、モデル微生物や環境微生物を対象としたゲノム解析を行うことによって、開発した手法の有用性を評価した。最後に、第4章では、本研究において得られた成果についてまとめ、今後の展望について述べた。本研究に

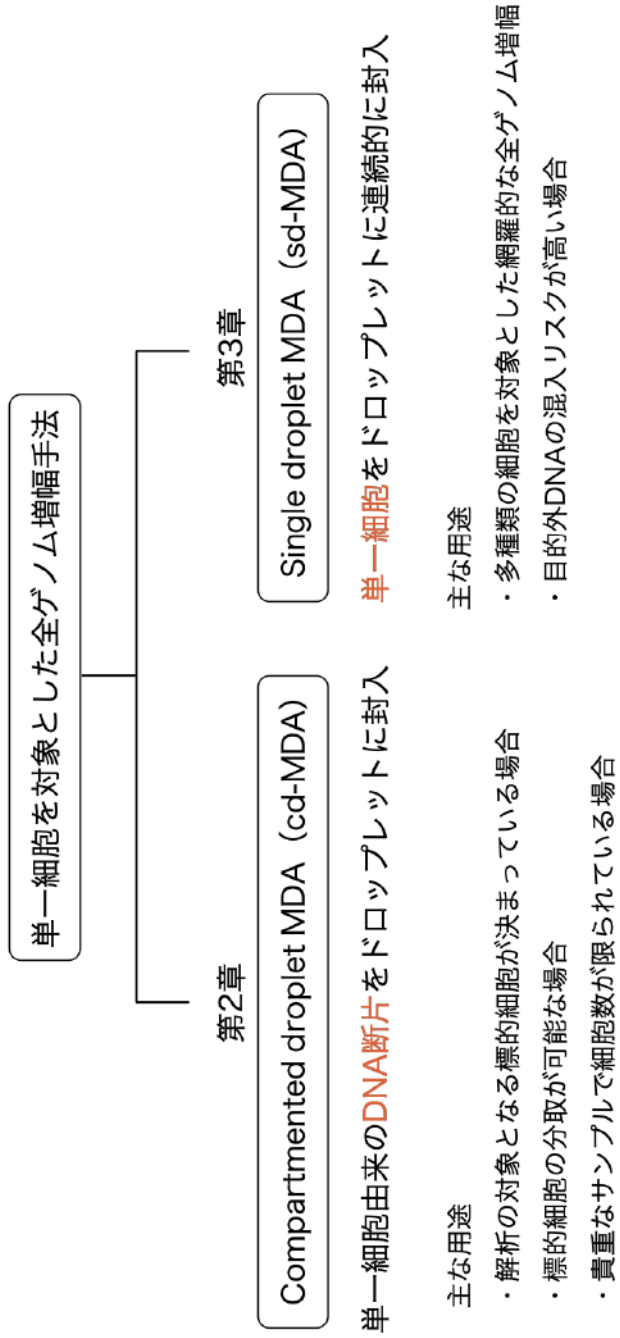


Fig. 1.2 本研究で開発する2種類の全ゲノム増幅手法とその用途

よって開発された全ゲノム増幅手法は、従来法に比べて高精度、またはハイスループットに単一細胞由来のゲノム情報を獲得するために有用であり、様々な環境微生物を対象としたゲノム解析に応用することによって、新規有用遺伝子の探索や微生物の系統学的解析など、新たな知見を創出する可能性があると考えられる。

## 1.7 参考文献

- Andersson, H. and A. van den Berg (2003). 'Microfluidic devices for cellomics: a review.' *Sensors and Actuators B: Chemical* 92(3): 315-325.
- Ballantyne, K. N., R. A. van Oorschot, R. J. Mitchell and I. Koukoulas (2006). 'Molecular crowding increases the amplification success of multiple displacement amplification and short tandem repeat genotyping.' *Anal Biochem* 355(2): 298-303.
- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham, A. D. Prjibelski, A. V. Pyshkin, A. V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M. A. Alekseyev and P. A. Pevzner (2012). 'SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.' *J Comput Biol* 19(5): 455-477.
- Baret, J. C., O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz and A. D. Griffiths (2009). 'Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity.' *Lab Chip* 9(13): 1850-1858.
- Beja, O., M. T. Suzuki, E. V. Koonin, L. Aravind, A. Hadd, L. P. Nguyen, R. Villacorta, M. Amjadi, C. Garrigues, S. B. Jovanovich, R. A. Feldman and E. F. DeLong (2000). 'Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage.' *Environ Microbiol* 2(5): 516-529.
- Berdy, J. (2005). 'Bioactive microbial metabolites.' *J Antibiot (Tokyo)* 58(1): 1-26.
- Blagodatskikh, K. A., V. M. Kramarov, E. V. Barsova, A. V. Garkovenko, D. S. Shcherbo, A. A. Shelenkov, V. V. Ustinova, M. R. Tokarenko, S. C. Baker, T. V. Kramarova and K. B. Ignatov (2017). 'Improved DOP-PCR (iDOP-PCR): A robust and simple WGA method for efficient amplification of low copy number genomic DNA.' *PLoS One* 12(9): e0184507.
- Blainey, P. C. (2013). 'The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea.' *FEMS Microbiol Rev* 37(3): 407-427.
- Blainey, P. C. and S. R. Quake (2011). 'Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination.' *Nucleic Acids Res* 39(4): e19.
- Boedicker, J. Q., L. Li, T. R. Kline and R. F. Ismagilov (2008). 'Detecting bacteria and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics.' *Lab Chip* 8(8): 1265-1272.

- Bredel, M., C. Bredel, D. Juric, Y. Kim, H. Vogel, G. R. Harsh, L. D. Recht, J. R. Pollack and B. I. Sikic (2005). 'Amplification of whole tumor genomes and gene-by-gene mapping of genomic aberrations from limited sources of fresh-frozen and paraffin-embedded DNA.' *J Mol Diagn* 7(2): 171-182.
- Chaipan, C., A. Prysizlak, H. Dean, P. Pognard, V. Benes, A. D. Griffiths and C. A. Merten (2017). 'Single-Virus Droplet Microfluidics for High-Throughput Screening of Neutralizing Epitopes on HIV Particles.' *Cell Chem Biol* 24(6): 751-757 e753.
- Chokkalingam, V., J. Tel, F. Wimmers, X. Liu, S. Semenov, J. Thiele, C. G. Figdor and W. T. Huck (2013). 'Probing cellular heterogeneity in cytokine-secreting immune cells using droplet-based microfluidics.' *Lab Chip* 13(24): 4740-4744.
- Cryan, J. F. and S. M. O'Mahony (2011). 'The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior.' *Neurogastroenterol Motil* 23(3): 187-192.
- de Bourcy, C. F., I. De Vlaminck, J. N. Kanbar, J. Wang, C. Gawad and S. R. Quake (2014). 'A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods.' *PLoS One* 9(8): e105585.
- Eid, J., A. Fehr, J. Gray, K. Luong, J. Lyle, G. Otto, P. Peluso, D. Rank, P. Baybayan, B. Bettman, A. Bibillo, K. Bjornson, B. Chaudhuri, F. Christians, R. Cicero, S. Clark, R. Dalal, A. Dewinter, J. Dixon, M. Foquet, A. Gaertner, P. Hardenbol, C. Heiner, K. Hester, D. Holden, G. Kearns, X. Kong, R. Kuse, Y. Lacroix, S. Lin, P. Lundquist, C. Ma, P. Marks, M. Maxham, D. Murphy, I. Park, T. Pham, M. Phillips, J. Roy, R. Sebra, G. Shen, J. Sorenson, A. Tomaney, K. Travers, M. Trulson, J. Vieceli, J. Wegener, D. Wu, A. Yang, D. Zaccarin, P. Zhao, F. Zhong, J. Korlach and S. Turner (2009). 'Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.' *Science* 323(5910): 133-138.
- Fischbach, M. A. and C. T. Walsh (2009). 'Antibiotics for emerging pathogens.' *Science* 325(5944): 1089-1093.
- Gole, J., A. Gore, A. Richards, Y. J. Chiu, H. L. Fung, D. Bushman, H. I. Chiang, J. Chun, Y. H. Lo and K. Zhang (2013). 'Massively parallel polymerase cloning and genome sequencing of single cells using nanoliter microwells.' *Nat Biotechnol* 31(12): 1126-1132.
- Gurevich, A., V. Saveliev, N. Vyahhi and G. Tesler (2013). 'QUAST: quality assessment

- tool for genome assemblies.' *Bioinformatics* 29(8): 1072-1075.
- Huebner, A., D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A. J. Demello, C. Abell and F. Hollfelder (2009). 'Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays.' *Lab Chip* 9(5): 692-698.
- Jain, M., I. T. Fiddes, K. H. Miga, H. E. Olsen, B. Paten and M. Akeson (2015). 'Improved data analysis for the MinION nanopore sequencer.' *Nat Methods* 12(4): 351-356.
- Janssen, P. H., P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor and M. Sait (2002). 'Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia.' *Applied and Environmental Microbiology* 68(5): 2391-2396.
- Kaeberlein, T., K. Lewis and S. S. Epstein (2002). 'Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment.' *Science* 296(5570): 1127-1129.
- Kang, S. S., P. R. Jeraldo, A. Kurti, M. E. Miller, M. D. Cook, K. Whitlock, N. Goldenfeld, J. A. Woods, B. A. White, N. Chia and J. D. Fryer (2014). 'Diet and exercise orthogonally alter the gut microbiome and reveal independent associations with anxiety and cognition.' *Mol Neurodegener* 9: 36.
- Kennedy, J., B. Flemer, S. A. Jackson, D. P. Lejon, J. P. Morrissey, F. O'Gara and A. D. Dobson (2010). 'Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism.' *Mar Drugs* 8(3): 608-628.
- Kintses, B., L. D. van Vliet, S. R. Devenish and F. Hollfelder (2010). 'Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments.' *Curr Opin Chem Biol* 14(5): 548-555.
- Kuswandi, B., Nuriman, J. Huskens and W. Verboom (2007). 'Optical sensing systems for microfluidic devices: a review.' *Anal Chim Acta* 601(2): 141-155.
- Lan, F., B. Demaree, N. Ahmed and A. R. Abate (2017). 'Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding.' *Nat Biotechnol* 35(7): 640-646.
- Lan, F., J. R. Haliburton, A. Yuan and A. R. Abate (2016). 'Droplet barcoding for massively parallel single-molecule deep sequencing.' *Nat Commun* 7: 11784.

- Langille, M. G., J. Zaneveld, J. G. Caporaso, D. McDonald, D. Knights, J. A. Reyes, J. C. Clemente, D. E. Burkepille, R. L. Vega Thurber, R. Knight, R. G. Beiko and C. Huttenhower (2013). 'Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences.' *Nat Biotechnol* 31(9): 814-821.
- Lasken, R. S. (2007). 'Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification.' *Curr Opin Microbiol* 10(5): 510-516.
- Locey, K. J. and J. T. Lennon (2016). 'Scaling laws predict global microbial diversity.' *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(21): 5970-5975.
- Macosko, E. Z., A. Basu, R. Satija, J. Nemesh, K. Shekhar, M. Goldman, I. Tirosh, A. R. Bialas, N. Kamitaki, E. M. Martersteck, J. J. Trombetta, D. A. Weitz, J. R. Sanes, A. K. Shalek, A. Regev and S. A. McCarroll (2015). 'Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets.' *Cell* 161(5): 1202-1214.
- Maranger, R. and D. F. Bird (1995). 'Viral Abundance in Aquatic Systems - a Comparison between Marine and Fresh-Waters.' *Marine Ecology Progress Series* 121(1-3): 217-226.
- Marcy, Y., T. Ishoey, R. S. Lasken, T. B. Stockwell, B. P. Walenz, A. L. Halpern, K. Y. Beeson, S. M. Goldberg and S. R. Quake (2007). 'Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells.' *PLoS Genet* 3(9): 1702-1708.
- Mark, D., S. Haeberle, G. Roth, F. von Stetten and R. Zengerle (2010). 'Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications.' *Chem Soc Rev* 39(3): 1153-1182.
- Mazutis, L., J. C. Baret and A. D. Griffiths (2009). 'A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion.' *Lab Chip* 9(18): 2665-2672.
- Mongersun, A., I. Smeenk, G. Prax, P. Asuri and P. Abbyad (2016). 'Droplet Microfluidic Platform for the Determination of Single-Cell Lactate Release.' *Anal Chem* 88(6): 3257-3263.
- Navin, N., J. Kendall, J. Troge, P. Andrews, L. Rodgers, J. McIndoo, K. Cook, A. Stepansky, D. Levy, D. Esposito, L. Muthuswamy, A. Krasnitz, W. R. McCombie, J. Hicks and M. Wigler (2011). 'Tumour evolution inferred by single-cell sequencing.' *Nature* 472(7341): 90-94.

- Pan, J., A. L. Stephenson, E. Kazamia, W. T. Huck, J. S. Dennis, A. G. Smith and C. Abell (2011). 'Quantitative tracking of the growth of individual algal cells in microdroplet compartments.' *Integr Biol (Camb)* 3(10): 1043-1051.
- Pan, X., A. E. Urban, D. Palejev, V. Schulz, F. Grubert, Y. Hu, M. Snyder and S. M. Weissman (2008). 'A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification.' *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(40): 15499-15504.
- Pizon, M., D. Zimon, S. Carl, U. Pachmann, K. Pachmann and O. Camara (2013). 'Heterogeneity of circulating epithelial tumour cells from individual patients with respect to expression profiles and clonal growth (sphere formation) in breast cancer.' *Ecancermedicalsecience* 7: 343.
- Podgorny, O. V. (2013). 'Live cell isolation by laser microdissection with gravity transfer.' *J Biomed Opt* 18(5): 55002.
- Raghunathan, A., H. R. Ferguson, Jr., C. J. Bornarth, W. Song, M. Driscoll and R. S. Lasken (2005). 'Genomic DNA amplification from a single bacterium.' *Appl Environ Microbiol* 71(6): 3342-3347.
- Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J. F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan, E. A. Gies, J. A. Dodsworth, B. P. Hedlund, G. Tsiamis, S. M. Sievert, W. T. Liu, J. A. Eisen, S. J. Hallam, N. C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E. M. Rubin, P. Hugenholtz and T. Woyke (2013). 'Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter.' *Nature* 499(7459): 431-437.
- Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman and R. M. Goodman (2000). 'Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms.' *Appl Environ Microbiol* 66(6): 2541-2547.
- Rotem, A., O. Ram, N. Shores, R. A. Sperling, A. Goren, D. A. Weitz and B. E. Bernstein (2015). 'Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state.' *Nat Biotechnol* 33(11): 1165-1172.
- Sanglier, J. J., H. Haag, T. A. Huck and T. Fehr (1993). 'Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992).' *Res Microbiol* 144(8): 633-642.
- Schaerli, Y. and F. Hollfelder (2009). 'The potential of microfluidic water-in-oil droplets



- in experimental biology.' *Mol Biosyst* 5(12): 1392-1404.
- Sinclair, L., O. A. Osman, S. Bertilsson and A. Eiler (2015). 'Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the illumina platform.' *PLoS One* 10(2): e0116955.
- Suzuki, M. T. and S. J. Giovannoni (1996). 'Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR.' *Appl Environ Microbiol* 62(2): 625-630.
- Tennessen, K., E. Andersen, S. Clingenpeel, C. Rinke, D. S. Lundberg, J. Han, J. L. Dangl, N. Ivanova, T. Woyke, N. Kyrpides and A. Pati (2016). 'ProDeGe: a computational protocol for fully automated decontamination of genomes.' *ISME J* 10(1): 269-272.
- Tilg, H. and A. Kaser (2011). 'Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction.' *J Clin Invest* 121(6): 2126-2132.
- Torsvik, V., J. Goksoyr and F. L. Daae (1990). 'High diversity in DNA of soil bacteria.' *Appl Environ Microbiol* 56(3): 782-787.
- Vartoukian, S. R., R. M. Palmer and W. G. Wade (2010). 'Strategies for culture of 'unculturable' bacteria.' *FEMS Microbiol Lett* 309(1): 1-7.
- Venter, J. C., K. Remington, J. F. Heidelberg, A. L. Halpern, D. Rusch, J. A. Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K. E. Nelson, W. Nelson, D. E. Fouts, S. Levy, A. H. Knap, M. W. Lomas, K. Nealson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, Y. H. Rogers and H. O. Smith (2004). 'Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea.' *Science* 304(5667): 66-74.
- Whittenb.R, K. C. Phillips and Wilkinso.Jf (1970). 'Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-Utilizing Bacteria.' *Journal of General Microbiology* 61: 205-&.
- Woyke, T., A. Sczyrba, J. Lee, C. Rinke, D. Tighe, S. Clingenpeel, R. Malmstrom, R. Stepanauskas and J. F. Cheng (2011). 'Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification.' *PLoS One* 6(10): e26161.
- Xu, L., I. L. Brito, E. J. Alm and P. C. Blainey (2016). 'Virtual microfluidics for digital quantification and single-cell sequencing.' *Nat Methods* 13(9): 759-762.
- Yilmaz, S. and A. K. Singh (2012). 'Single cell genome sequencing.' *Curr Opin Biotechnol* 23(3): 437-443.

- Yoshimoto, N., A. Kida, X. Jie, M. Kurokawa, M. Iijima, T. Niimi, A. D. Maturana, I. Nikaido, H. R. Ueda, K. Tatematsu, K. Tanizawa, A. Kondo, I. Fujii and S. Kuroda (2013). 'An automated system for high-throughput single cell-based breeding.' *Sci Rep* 3: 1191.
- Yu, Z., S. Lu and Y. Huang (2014). 'Microfluidic whole genome amplification device for single cell sequencing.' *Anal Chem* 86(19): 9386-9390.
- Zhang, K., A. C. Martiny, N. B. Reppas, K. W. Barry, J. Malek, S. W. Chisholm and G. M. Church (2006). 'Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning.' *Nat Biotechnol* 24(6): 680-686.
- Zhang, L., X. Cui, K. Schmitt, R. Hubert, W. Navidi and N. Arnheim (1992). 'Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis.' *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(13): 5847-5851.
- Zong, C., S. Lu, A. R. Chapman and X. S. Xie (2012). 'Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell.' *Science* 338(6114): 1622-1626.

## 第 2 章 ドロップレット作製技術の開発と単一細胞由来 DNA 断片を封入したドロップレットによる全ゲノム増幅法の開発

本章は、Y. Nishikawa, M. Hosokawa, T. Maruyama, K. Yamagishi, T. Mori and H. Takeyama (2015). ‘Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification.’ PLoS One 10(9): e0138733. で報告された内容を使用して構成されている。

### 2.1 緒言

本章では、解析の対象となる標的細胞が決定しており、また分取が可能である場合に、単一細胞を対象とした高精度なゲノム情報の獲得を可能にする全ゲノム増幅手法の開発を目指す。従来法的全ゲノム増幅において解決すべき問題は、反応時の増幅の偏り（増幅バイアス）（Bredel et al., 2005）（Suzuki and Giovannoni, 1996）とコンタミネーション DNA の混入による目的外 DNA の増幅である（Blainey, 2012）。前述したように、従来の  $\mu\text{L}$  容量の全ゲノム増幅では、プライマーの結合領域によって DNA 断片間での増幅競合が発生し、一部の配列情報が失われてしまうことが問題であった。また、コンタミネーション DNA の混入により、標的細胞以外の DNA 情報が増幅される、あるいは標的細胞由来の DNA とのキメラ配列が生成されることによって、リファレンスとは異なる配列情報が生成されることが問題であった。

そこで本章では、ピコリットル容量のドロップレット作製技術を応用し、新たな全ゲノム増幅手法の開発に取り組んだ（Compartmented droplet MDA）。具体的には、単一細胞由来の DNA 断片を含んだ全ゲノム増幅試薬をドロップレットに変換することにより、それぞれの DNA 断片を 1 分子レベルで個別の微小空間内に分配して全ゲノム増幅を行う手法である。これにより、DNA 断片間での増幅競合が抑制されるため、全ゲノム増幅においてそれぞれの断片が均一に増幅されるのではないかと考えた。また、コンタミネーション DNA が反応液中に混入した場合においても、ドロップレットへの変換を行うことによって個別の微小空間内で増幅が進行するため、標的細胞由来の DNA 断片とのキメラ配列の生成が抑制されると考えた。

本技術の開発に向け、ドロップレット作製のマイクロ流体デバイスの設計と作製を行い、水性溶液およびキャリアオイルを一定の流速で導入した場合に作製されるドロップレットの粒径および生成速度を測定した。次に、 $\lambda\text{DNA}$  を含んだ

全ゲノム増幅試薬を用いてドロップレットを作製し、ドロップレット内で全ゲノム増幅が可能であるかを検証した。さらに、モデル微生物として大腸菌 1 細胞由来の DNA を用いてドロップレット内での全ゲノム増幅を行い、次世代シーケンサーを用いた配列解析などの手法を用いて従来法との比較を行うことによって開発した手法の有用性を評価した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 マイクロ流体デバイスの作製

製図ソフトである AUTOCAD を使用し、ドロップレット作製のマイクロ流体デバイスを設計した。なお、流路構造のデザインは、先行研究 (Mazutis, et al., 2013) にて報告されたデザインを参考とした。マイクロ流体デバイスには、界面活性剤を含んだキャリアオイルを導入するためのインレット (Fig. 2.1A①)、ドロップレットの構成成分である水性溶液を導入するためのインレット (Fig. 2.1A②) が存在し、それぞれのインレットには各溶液の逆流を抑制するための蛇行流路が設けられている (Fig. 2.1A③)。デバイス内に導入された水性溶液は、十字構造部においてキャリアオイルによってせん断され、ドロップレットが形成される (Fig. 2.1A④)。作製後のドロップレットは、チューブを介してアウトレット部から回収される (Fig. 2.1A⑤)。

設計したデザインをもとに、流路が型取りされたソーダガラス製のフォトマスクを外注し (TOYO PRECISION PARTS MFG. Corp.)、ネガ型のレジスト SU-8 3050 (MicroChem Corp.) をコーティングしたガラス基板にパターンを転写することによって、デバイス作製のモールドを作製した。ガラス基板へのレジストのコーティングには、スピンコーター MS-B150 (Mikasa) を使用し、スピンコーターの回転数を制御することにより、モールドの流路高を 50  $\mu\text{m}$  とした。デバイス内部の流路幅は、AUTOCAD での製図時に 100  $\mu\text{m}$  となるように設計し、十字構造部ではキャリアオイル側の流路幅が 17  $\mu\text{m}$ 、水性溶液側の流路幅が 8.5, 17, 34  $\mu\text{m}$  となるように設計を行った。

次に、作製したモールドを用いてマイクロ流体デバイスの作製を行った。デバイスの素材として Poly(dimethylsiloxane) (PDMS; Sylgard 184: Dow Corning Corp.) を使用し、架橋剤とともに 10:1 (w/w) の割合で十分に混合した後、エバポレーターを用いて脱気を行った。脱気後の PDMS をモールドに流し入れ、70°C で 1 時間反応させることで PDMS を硬化させた。硬化後の PDMS をモールドから剥がし、直径 0.75 mm の生検パンチ (World Precision Instruments) を用いてインレットおよびアウトレット部にチューブ接続用の穴を開けた。プラズマ照射機 Plasma Cleaner PDG-32G (Harrick Scientific) を用いて PDMS とガラス基板を接着させた後、70°C で 30 分間反応させた。最後に、シリンジに充填したアクアペル (PPG Industries) を流路内に導入することによって流路表面のコーティングを行い、流路の疎水性処理を行った。

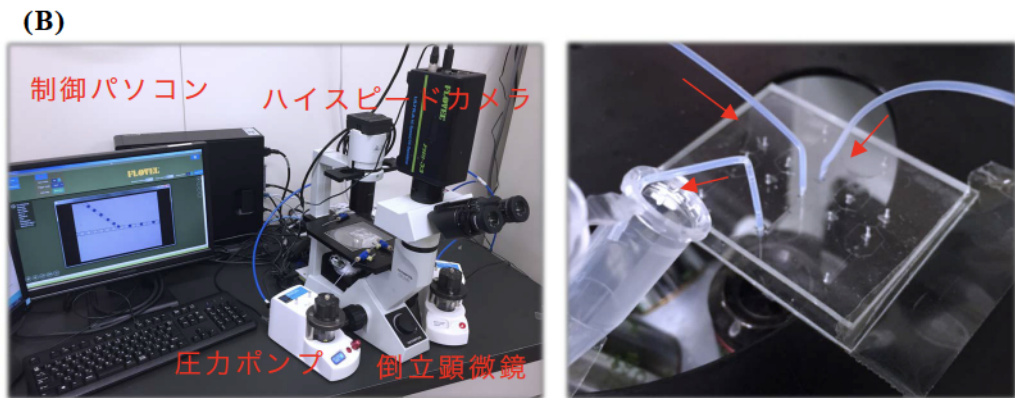
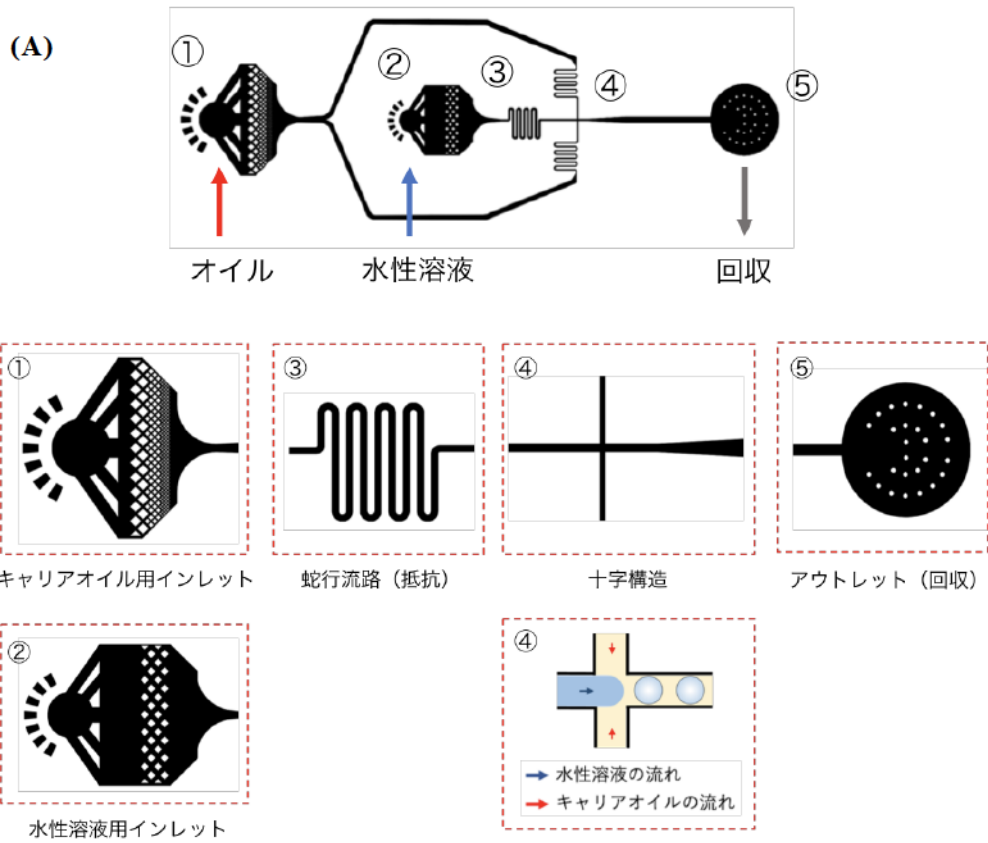


Fig. 2.1 マイクロ流体デバイスを用いたドロップレットの作製

- (A) マイクロ流体デバイスの流路構造  
(B) ドロップレット作製システムの全体図

### **2.2.2 マイクロ流体デバイスを用いたドロップレットの作製**

ドロップレットの構成成分となる水性溶液およびキャリアオイルを、AGW チューブ (Chukoh Chemical Industries) を介してデバイス内に導入した。各溶液の導入には、マイクロシリンジポンプ (KDS Scientific)、もしくは圧力ポンプ (P-pump, Dolomite) を使用した。また、キャリアオイルには、非イオン界面活性剤である Pico-surf1 (Dolomite) を 2% の割合で含んだ Novec7500 (Dolomite) を使用した。倒立顕微鏡のステージ上に固定したデバイスのインレット部にそれぞれの溶液を含んだ AWG チューブを接続し、送液ポンプの流速を制御することによって 2 種類の溶液をデバイス内に一定の速度で導入した。ハイスピードカメラ FHS-33 (Flovel) を用いてドロップレットの生成を確認した後、アウトレット部に AWG チューブを接続し、チューブを介してドロップレットを回収した (Fig. 2.1B)。回収したドロップレットの観察には、中空構造を有する  $\mu$  スライド (ibidi GmbH) を使用し、顕微鏡 BX51 (Olympus) および顕微鏡用デジタルカメラ DP-73 (Olympus) を用いて画像を取得した。また、ドロップレットの粒径測定には、画像解析ソフト Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) を使用した。

### **2.2.3 ドロップレット内での 1 分子 DNA からの全ゲノム増幅**

全ゲノム増幅の試薬として、illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE healthcare) を使用した。1 回の反応につき 10  $\mu$ L の反応液を調製した後 (Table 2.1)、マイクロ流体デバイスを用いて粒径 50  $\mu$ m のドロップレットを作製し、全ゲノム増幅反応液の区画化を行った。illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit のプロトコルに従い、DNA サンプルとキット付属の Sample Buffer を混合した後、95°C で 3 分間の熱反応を行うことによって細胞の溶菌および DNA の変性を行った。ドロップレットの蛍光観察を行う場合には、反応液組成中の Nuclease free water (0.5  $\mu$ L) を 20 $\times$  EvaGreen (Cosmo Bio. Corp.) (0.5 $\mu$ L) に置き換えた。作製後のドロップレットは PCR チューブに回収し、Veriti<sup>®</sup> thermal cycler (Applied Biosystems) を用いて増幅反応を行った (30°C, 4 h)。ドロップレット内での DNA 増幅の観察には、 $\lambda$  DNA (Takara) をテンプレートとして使用した。 $\lambda$  DNA (鎖長:48502 bp) 水溶液の濃度を調整し、ドロップレット内のコピー数が 1 copy/drop (53 ag/droplet)、5 copies/drop (265 ag/droplet) となるような条件でドロップレットを作製した。回収したドロップレットを 30°C の等温環境下で反応させ、20 分毎に蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。取得したドロップレットの蛍光画像に

Table 2.1 cd-MDA における全ゲノム増幅反応液の組成

<b>Amplification Kit</b>	<b>Solution</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit	Nuclease free water (with DNA or sorted cell)	1.9 (1.4)
	Sample Buffer	2.9
	Reaction Buffer	3.8
	Enzyme Mix	0.40
	10% Tween-20	1.0
	20 $\times$ EvaGreen	(0.50)
Total		10.0

DNA 増幅の観察の際には、0.5  $\mu\text{L}$  の nuclease-free water を等量の 20 $\times$  EvaGreen に置換して反応を実施した。



対して Image J を用いた解析を行い、各時間におけるドロップレット内の蛍光強度を測定した。

#### **2.2.4 大腸菌を用いた単一細胞由来 DNA からの全ゲノム増幅**

単一細胞のソーティングには FACS Aria II (BD Bio Sciences) を使用した。LB 培地中で培養した大腸菌 (*Escherichia coli* K12 ATCC10798, ゲノムサイズ:4.6 Mbp) に対して、SYTO9 (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA の染色を行い、SYTO9 の蛍光を指標として1細胞または10細胞を96ウェルプレートに分取した( $n=3$ )。それぞれのサンプルを用いて10  $\mu$ L の MDA 反応液の調製を行った後、ドロップレットの作製を行い、ドロップレット内での全ゲノム増幅を行った (30°C, 4 h) (以下、本手法を cd-MDA (Compartmented droplet MDA) と記す)。また、コントロールのサンプルとして、従来法の10  $\mu$ L の反応容積を用いた MDA 増幅 (以下、In-tube MDA と記す) を同時に実施した。

全ゲノム増幅反応後、1H,1H,2H,2H-perfluoro octanol (Sigma-Aldrich) を加えてドロップレットを壊し、それぞれのドロップレット内で増幅された DNA 産物を回収した。回収した溶液の DNA 濃度を Qubit® 3.0 フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した後、10U/reaction S1 nuclease (Takara) を用いて23°C で15分間反応させ、2本鎖 DNA の末端平滑化を行った。0.5 M EDTA (Thermo Fisher Scientific) を加えて反応を終了させた後、DNA Clean and Concentrator-25 (Zymo Research) を用いて DNA の精製を行った。DNA 濃度の定量を再度行い、DNA 溶液を10 ng/ $\mu$ L に調製して以降の操作で用いた。まず、増幅産物に対して quantitative PCR (qPCR) を行い、全ゲノム増幅時に生じた増幅の偏り (バイアス) について評価を行った。大腸菌ゲノム上に1コピーずつ存在する10個の遺伝子をターゲットとした Primer と Probe (Raghunathan et al., 2005) (Table 2.2) を用いて qPCR を行った。qPCR での定量値と、実際に使用した DNA 濃度 (10 ng/ $\mu$ L) を比較することにより、各遺伝子座におけるコピー数のばらつきを評価し、増幅バイアスの指標とした。次に、Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて1 ng の DNA からライブラリを調製し、次世代シーケンサー Miseq (Illumina) を用いて配列情報を取得した。ラン試薬には Miseq Reagent Kit v3 (Illumina) を使用し、300 bp のペアエンドリードを取得した。各サンプルより得られたリードの数 (データ量) を揃えた後、BWA (Li and Durbin, 2009) を用いてリファレンスゲノム NC\_00913 (*E. coli* substrain MG1655) へのマッピングを行った。また、ゲ

Table 2.2 MDA 産物の qPCR に使用したプライマーとプローブの配列情報

Locus	Probe sequence (5'-3')	Primer sequence (5'-3')
PcnB	ACAGGCGTGCCGGTGGGATA	F, TAGCCCGCTTGTAGCAGTTT R, GCGTTATCCGTCTGATTGGT
HolA	CAAACAACGCACGCAGTGGC	F, CTGCCATACCCGATGCTTAT R, CAGCGAACC GGTTATTTTGT
OmpA	CCCAGGCTCAGCATGCCGTT	F, TGACCGAAACGGTAGGAAAC R, TGAGTACGCGATCACTCCTG
TopA	TGCCACCTGGTCGAGGCTGT	F, TCGATCATTTTCGACCATTCA R, CCCTCTTCCGGATCTTTTTTC
Nth	AGGGCTTCAAGCGCAGCACG	F, CGCCTTTTGAATTGCTGATT R, ACGTTGGCTGTTTTACGACC
EutC	ATCCTGCTGGTGGGCGAACG	F, ATACGTTTCGCCAAATCCAC R, CGCGTGAAGATTGAAGATCA
Exo	CGCATTCATGCCGTTTCAGGG	F, CGTGGCTGTTTCATTTGCTTA R, TCTGGTAAACGCTGATGACG
ExuR	CCTCAAGGCGCTGATTCGCA	F, AAAATGTGGACCCAGCGTAG R, ATAGATAGCGGTCGGCATTG
GlyS	GACGCAGCGCAAACGGGTCT	F, ATACAGACGCACCGCTTCTT R, TGAATGAGCAGTATCAGCCG
CadA	GGCCACCGCTCATACCGCAT	F, GTGAGTGGACTGGGTTTTTCGT R, CAGCACGCTACCATTGCTAA

qPCR を用いた定量のため、Taqman MGB/FAM プローブを設計した。  
MDA 産物中に含まれる遺伝子コピー数の定量のため、大腸菌より抽出した DNA をコントロールとして使用し、検量線を作製した (10, 1, 0.1, 0.01 ng/ $\mu$ L)。

ノムカバー率の算出には SAMtools (Li et al., 2009)、得られたリードからの *de novo* assembly には SPAdes (Bankevich et al., 2012)、作製したコンティグの評価には QUILT (Gurevich et al., 2013) をそれぞれ使用した。なお、本研究にて取得した次世代シーケンサーの配列情報は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession number: DRA003579)。

## 2.3 結果・考察

### 2.3.1 ドロップレットの粒径および生成速度の測定

異なる流速条件下において、マイクロ流体デバイス内の十字構造部にてドロップレットが作製される様子を観察した (Fig. 2.2A)。また、回収後のドロップレットを顕微鏡下で観察し、マイクロ流体デバイスの流路幅および各溶液の流速条件を変えた場合におけるドロップレットの粒径を測定した (Fig. 2.2B)。各条件におけるドロップレット作製には、水性溶液側の流路幅が  $8.5\ \mu\text{m}$  (Fig. 2.2C-1)、 $17\ \mu\text{m}$  (Fig. 2.2C-2,3)、 $34\ \mu\text{m}$  (Fig. 2.2C-4) となるように設計したマイクロ流体デバイスをそれぞれ使用し、各溶液の流速は水性溶液:キャリアオイル = 2:4, 3:3, 3:1, 6:1  $\mu\text{L}/\text{min}$  となるようにそれぞれ設定した。本条件下でドロップレットの作製を行うことにより、平均粒径を  $30\text{-}140\ \mu\text{m}$  ( $14\ \text{pL}\text{-}1.4\ \text{nL}$ ) の範囲で制御可能であることが示された。また、水性溶液とキャリアオイルの流速をともに  $3\ \mu\text{L}/\text{min}$  に設定した条件では、平均粒径  $50.4\pm 1.3\ \mu\text{m}$  (容積:  $67\ \text{pL}$ ) のドロップレットが作製され、生成速度は  $700\ \text{droplets}/\text{sec}$  であることが明らかとなった。以上の結果により、本条件を用いて  $10\ \mu\text{L}$  の MDA 反応液を粒径  $50\ \mu\text{m}$  のドロップレットに変換することにより、 $200$  秒で約  $1.5 \times 10^5$  個の微小空間が作製可能であることが示唆された。

### 2.3.2 ドロップレット内での全ゲノム増幅反応の蛍光モニタリング

$\lambda\text{DNA}$  を含む MDA 反応液を用いてドロップレットを作製し、ドロップレット内の蛍光強度を経時的に観察した。 $30^\circ\text{C}$  での反応により、ドロップレット内に封入された  $\lambda\text{DNA}$  が増幅され、EvaGreen に由来する緑色の蛍光がドロップレット内で確認された (Fig. 2.3A)。また、 $\lambda\text{DNA}$  の濃度が  $1\ \text{copy}/\text{droplet}$  または  $5\ \text{copies}/\text{droplet}$  のそれぞれの条件において、いずれも計測開始  $60$  分からドロップレット内部の蛍光強度の増加が確認され、反応開始  $150$  分後に蛍光強度が閾値に達した (Fig. 2.3B)。また各条件において、ポアソン分布に従い  $63\%$ ,  $99\%$  のドロップレットが蛍光を示すことが確認された。2 つの条件下における蛍光強度の変化を比較すると、DNA 濃度が高い条件 ( $5\ \text{copies}/\text{droplet}$ ) でより急激な蛍光強度の立ち上がりが確認され、ドロップレット間の蛍光強度のばらつきは小さくなった。 $5\ \text{copies}/\text{droplet}$  の条件では、理論上ほぼすべてのドロップレットが複数コピーの DNA 分子を含んでいると考えられるため、蛍光の立ち上がり時間および強度の違いは、ドロップレット内に含まれる  $\lambda\text{DNA}$  のコピー数の違いを示していると考えられる。以上の結果により、ドロップレット内において 1 分子の DNA をテンプレ

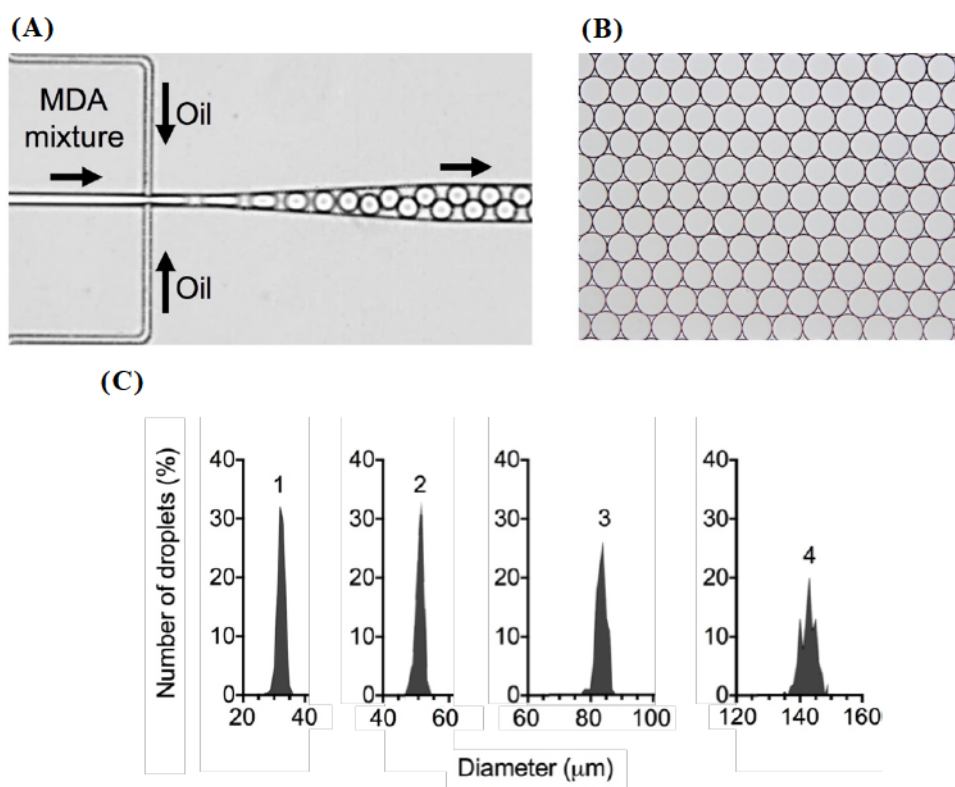


Fig. 2.2 マイクロ流体デバイスを用いたドロップレットの連続生成

(A)MDA 反応液からのドロップレットの生成

(B)回収されたドロップレットの顕微鏡画像

(C)ドロップレットの粒径分布

Fig. 2.2 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PloS one, 10(9), e0138733.

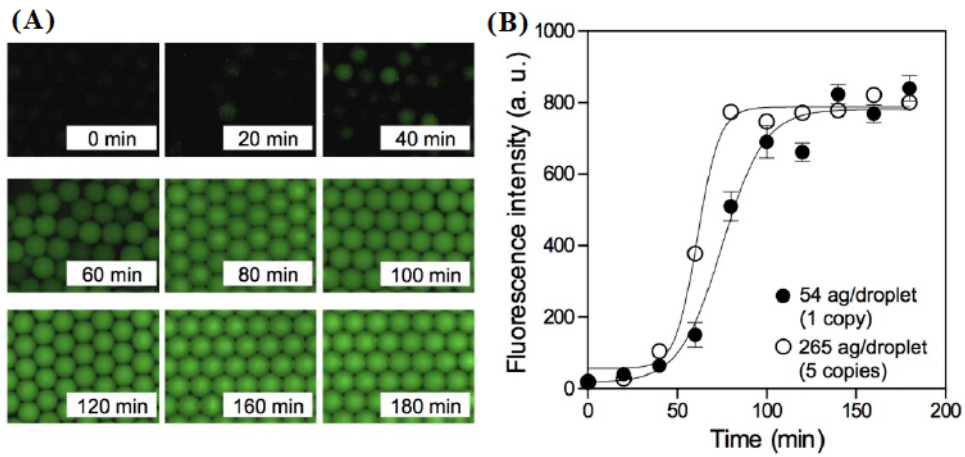


Fig. 2.3  $\lambda$ DNA を用いたドロップレット内全ゲノム増幅の観察

(A)  $\lambda$ DNA を封入したドロップレットの蛍光画像 (5 copies/droplet)

(B) ドロップレット内蛍光強度の経時観察

蛍光強度の測定には Image J を使用し、各計測点において蛍光を示すドロップレット 100 個を対象として蛍光強度の測定を実施した。

Fig. 2.3 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PloS one, 10(9), e0138733.

レートとして MDA による増幅が可能であることが示唆された。また、ドロップレット内で増幅された DNA 分子は漏出することなく、ドロップレット内に保持されることが明らかとなった。さらに、反応環境中のコンタミネーション DNA の検出を目的として、 $\lambda$ DNA を含まない MDA 反応液を調製してドロップレットを作製した結果、蛍光を示すドロップレットの割合は 0.08-0.33% ( $n=3$ ) となった。作製したドロップレットの粒径（容積）および蛍光を示したドロップレットの割合から、ポアソン分布に基づいて 10  $\mu$ L の反応液中に含まれる目的外 DNA 分子の濃度を算出した結果、130-492 copies/10  $\mu$ L（平均: 200 copies/10  $\mu$ L）という値が得られた。この値は、先行研究にて報告された MDA 反応液中に含まれるコンタミネーション DNA の量（平均: 185 copies/10  $\mu$ L）と一致しており（Blainey and Quake, 2011）、本手法を用いることによってゲノム増幅試薬および反応環境中から混入する目的外 DNA の検出が可能であることが明らかとなった。以上の結果により、本手法が実験環境下における DNA のコンタミネーションリスクを評価する手法としても応用が可能であることが示唆された。

### **2.3.3 増幅産物の定量による目的外 DNA 増幅量の評価**

FACS を用いて分取した大腸菌由来の DNA をテンプレートとして全ゲノム増幅を行った。増幅反応後の DNA 濃度を測定した結果、従来法の In-tube MDA を行ったサンプルでは、テンプレートとして用いた大腸菌の細胞数に関わらず、増幅後の収量はほぼ一定の値を示した (Fig. 2.4)。また、細胞を含まないサンプル (No template control (NTC)) においても同様に DNA の増幅が確認され、大腸菌 DNA を用いたサンプルと同程度の収量が得られた (平均: 約 2.1  $\mu$ g)。一方、MDA 反応液調製後にドロップレットへの変換を行ったサンプル (cd-MDA) では、反応後の収量の平均値は 1.4 ng (NTC), 47 ng (1 細胞分取), 350 ng (10 細胞分取) となり、分取した細胞数に応じて収量の増加が確認された。反応後の収量から算出した結果、ドロップレットを用いた全ゲノム増幅において単一細胞由来の DNA は  $10^6$  倍以上に増幅され、シーケンスライブラリの調製に十分量の DNA が得られることが明らかとなった。また、NTC サンプルでは従来法の In-tube MDA と比較して収量が約 1,400 分の 1 に抑制されることが明らかとなった。従来の方法では、反応環境中より混入した目的外の DNA に対して 10  $\mu$ L の反応液全体を用いて増幅が進行するため、増幅反応後には細胞を分取した場合と同量の DNA 増幅が行われると考えられる。一方 cd-MDA では、反応液中に含まれる DNA 断片は個々

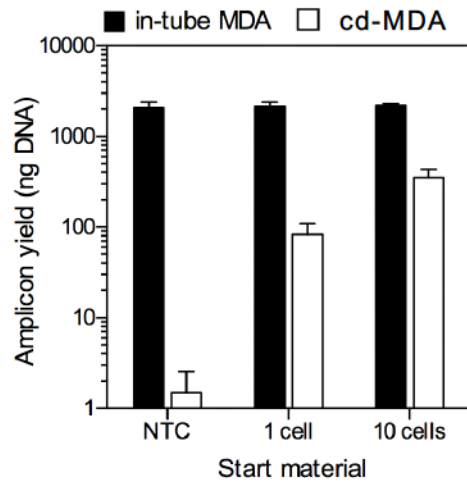


Fig. 2.4 In-tube MDA および cd-MDA における  
全ゲノム増幅反応後の DNA 収量の比較

In-tube MDA および cd-MDA において、10  $\mu$ L の全ゲノム増幅反応液を調製し、MDA を行った。

Fig. 2.4 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PloS one, 10(9), e0138733.



のドロップレット内に分配され、ドロップレット内で個別に増幅が行われる。ドロップレット 1 個の容積は約 67 pL であり、DNA 増幅の反応場は、DNA 断片が含まれる微小空間の容積に制限される。このため、理論上 1 個のドロップレットからは 13-23 pg の増幅産物が得られる計算となる。また、ドロップレットの総数が反応液中に含まれる DNA 断片数よりも十分に多い条件では、DNA 断片数に比例して全ゲノム増幅反応に使用されるドロップレットの割合が増加し、増幅産物量が増加すると考えられる。大腸菌 DNA をテンプレートとして使用した条件において、分取した細胞数に応じて収量の増加が確認されたが、細胞数の増加に従ってテンプレートとなる DNA コピー数が増加し、より多くのドロップレット内で全ゲノム増幅が行われたことが理由として考えられる。また、NTC における DNA の収量および蛍光を示したドロップレットの割合から計算を行った結果、ドロップレット 1 個あたりの収量は 7.5-13 pg となり、理論値 (13-23 pg/droplet) とおおよそ一致することが確認された。さらに、NTC において蛍光を示したドロップレットの割合から、NTC 条件下において DNA 増幅に使用された反応容積を算出した結果、8-33 pL (平均: 約 10 pL) であることが明らかとなった。In-tube MDA と比較した場合の反応容積比は約 1,000 分の 1 となり、DNA 増幅量の差 (約 1,400 分の 1) と概ね一致することが確認された。

#### **2.3.4 次世代シーケンサーを用いた NTC 由来の増幅産物の配列解析**

大腸菌を分取しない条件のサンプル (NTC) より得られた増幅産物について次世代シーケンサーによる配列解析を行い、Contig ( $\geq 500$  bp) の作製を行った。この結果、それぞれの手法から得られた Contig の数および全長は、cd-MDA (34 contigs, 68 kbp), In-tube MDA (584 contigs, 1Mbp) となり、従来法の In-tube MDA においてより多くの目的外 DNA の情報が含まれていることが明らかとなった (Table 2.3)。それぞれの手法によって得られた Contig について BLAST を用いた配列検索を行った結果、どちらの条件においても *Homo sapiens*, *Acidovorax*, *Pseudomonas* などがヒットし、実験室環境で多く確認されるコンタミネーション DNA の配列に由来することが判明した (Woyke et al., 2011)。以上の結果から、ドロップレットを用いて反応液の区画化を行い、個々の DNA 断片を個別に増幅することによって目的外 DNA の増幅が抑制され、従来法に比べてより高精度な標的細胞由来の DNA 情報が獲得できることが示唆された。

Table 2.3 次世代シーケンサーを用いたNTC サンプルの配列解析

	<b>cd-MDA</b>	<b>In-tube</b>
# contigs ( $\geq 500$ bp)	34	584
Largest contig (bp)	17151	27943
Total length (bp)	68448	1064672
N50 (bp)	5311	3356

Table 2.3 was referred from the article:  
 Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PLoS one, 10(9), e0138733.

### 2.3.5 qPCR を用いた単一細胞の全ゲノム増幅産物の評価

全ゲノム増幅反応場の区画化による増幅バイアスの低減効果を評価するため、大腸菌に 1 コピーずつ存在する 10 個の遺伝子座を対象として qPCR を行った。本手法では、各遺伝子座における増幅のバイアスを、qPCR による定量結果の大小により評価することが可能である。大腸菌より抽出した DNA を用いて作製した検量線をもとに増幅産物 1 ng に含まれる遺伝子のコピー数を算出した結果、In-tube MDA での平均値が  $1.2 \times 10^3$  copies/ng であったのに対し、cd-MDA では  $1.2 \times 10^5$  copies/ng となった。In-tube MDA では、1 ng の DNA 中に検出されるコピー数の平均値が cd-MDA に比べて 100 分の 1 量となり、従来法により得られた増幅産物には、コンタミネーション DNA やキメラ配列を含むターゲット配列以外の増幅産物の占める割合が高いことが示唆された。また、各遺伝子座におけるコピー数のばらつきをそれぞれの手法ごとに評価した結果、cd-MDA に比べ In-tube MDA で大きなばらつきが確認された (Fig. 2.5) ( $n=3$ )。ドロップレットによる増幅バイアスの低減効果は、ドロップレット内で PCR を実施した先行研究においても報告がなされており (Hori et al., 2007)、今回得られた結果は、MDA 反応においても同様の効果が得られたことを示唆している。以上の結果により、ドロップレットによる反応液の区画化により DNA 断片間での増幅の競合が抑制される結果、従来法との比較において増幅バイアスが抑制され、標的細胞由来の情報が優先的に増幅されることが実証された。また、本研究の結果をナノリットル容量の反応場を用いた先行研究 (Marcy et al., 2007) と比較した場合においても、cd-MDA による増幅バイアスの抑制効果が確認された。

### 2.3.6 次世代シーケンサーを用いた単一細胞由来増幅産物の配列解析

増幅産物中のバイアスについて詳細な解析を行うため、illumina Miseq を用いた配列解析を行った。得られたリードの情報をもとに、BWA を用いてリファレンスゲノムへのマッピングを行った。マッピングに使用するリード数は、各サンプルにつきリファレンスのゲノムサイズに対して 60 倍の量 (Sequence effort: 60 $\times$ ) となるように調整し、各ゲノム領域においてリードがマップされた回数 (Coverage) を算出した (Fig. 2.6A)。この結果、次世代シーケンサーを用いた解析においても qPCR での定量結果と同様、cd-MDA における増幅バイアスの低減効果が確認された。ゲノムの各領域における Coverage の平均値を算出した結果、cd-MDA では  $48 \pm 48$  となったのに対し、In-tube MDA では  $17 \pm 25$  となった。また、各ゲノム領域

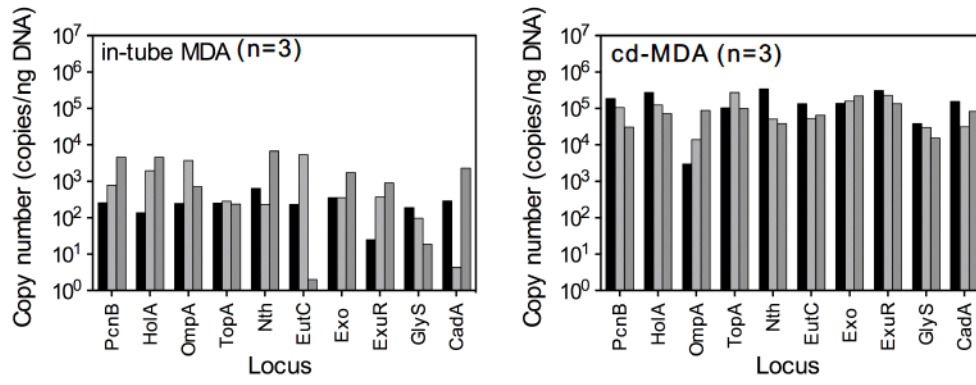


Fig. 2.5 単一細胞由来全ゲノム増幅産物を用いた qPCR による 10 遺伝子座の定量

Fig. 2.5 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). *PloS one*, 10(9), e0138733.

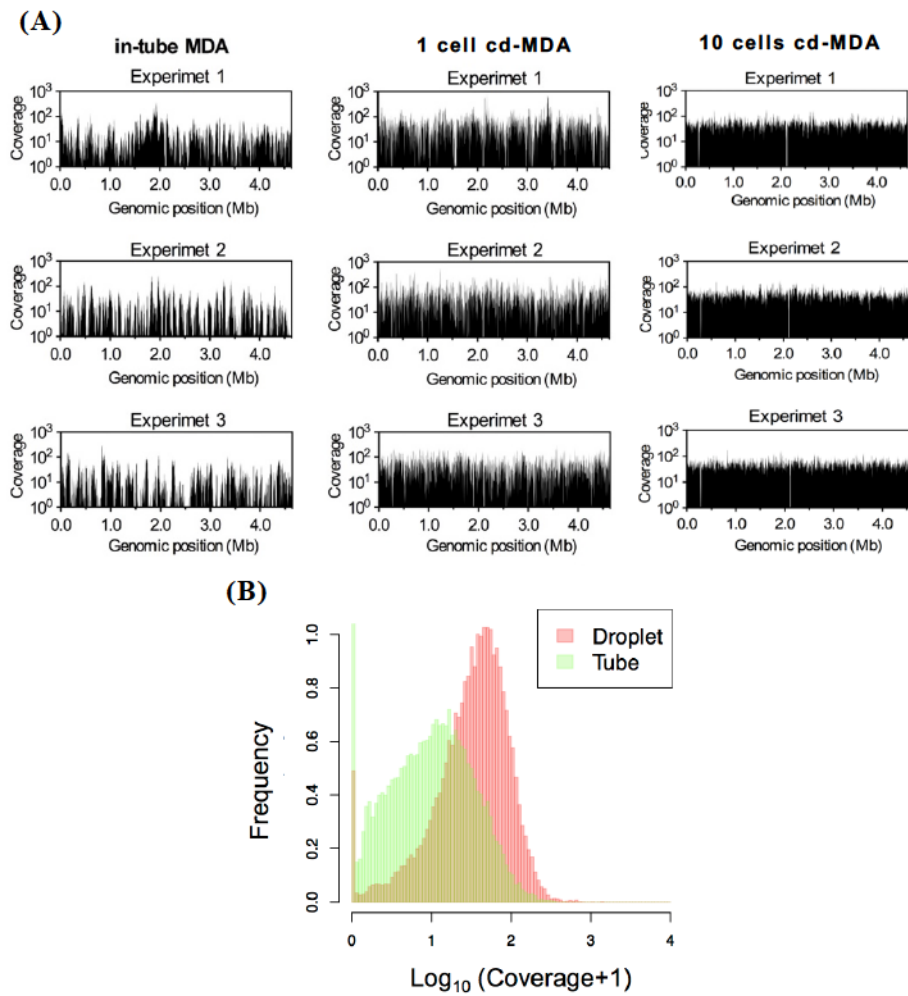


Fig. 2.6 cd-MDA における増幅バイアスの評価

(A) 各ゲノム領域における Coverage

(B) cd-MDA および In-tube MDA における Coverage の分布

Fig. 2.8 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PloS one, 10(9), e0138733.

における Coverage の値の分布を比較したところ、In-tube MDA では Coverage の値のばらつきが大きく、また増幅されていない領域 (Coverage=0) が多く存在することが明らかとなった (Fig. 2.6B)。以上の結果により、cd-MDA によって増幅バイアスが抑制され均質な増幅が可能となる結果、少ないデータ量においても高い Coverage を取得することが可能であることが示唆された。また、10 細胞を分取した場合の cd-MDA の Coverage の平均値は  $51 \pm 20$  となり、1 細胞を分取した場合に比べさらにバイアスの少ない増幅が可能であることが明らかとなった (Fig. 2.6A)。10 細胞を分取することにより、テンプレートとして使用される DNA のコピー数が 10 倍に増加するため、各ゲノム領域における増幅バイアスが抑制されたと考えられる。先行研究においても、あらかじめ培養された複数個の細胞をテンプレートとして全ゲノム増幅を行うことにより、増幅バイアスが抑制されることが確認されており (Fitzsimons et al., 2013)、本研究においても同様の効果が得られたと考えられる。

次に、解析に用いるデータ量を揃えた場合の 2 種の増幅法におけるゲノムカバー率 (Genome recovery) を比較した。この結果、cd-MDA が In-tube MDA に比べて高いゲノムカバー率を示すことが明らかとなった (Fig. 2.7A)。なお、Fig. 2.7A における (Coverage 1×) および (Coverage 10×) の表記は、リファレンスのゲノム領域に対して、リードの情報が 1 回もしくは 10 回以上マップされた領域の割合を表している。また、横軸の Sequence effort (×) は解析に使用したデータ量を示しており、Sequence effort が 60×の条件では、リファレンスとなるゲノム情報 (今回の場合は大腸菌ゲノム: 4.6 Mbp) に対して 60 倍量の配列情報を用いて解析を行ったことを示している。例えば Sequence effort を 60×に設定した場合、cd-MDA では 90%以上のゲノムカバー率 (1×) を示し、In-tube MDA に比べて約 20% 高い値を示すことがわかる。また、Sequence effort を 60×の条件での In-tube MDA および cd-MDA のゲノムカバー率 (10×) はそれぞれ 42%, 83%となり、両者のカバー率に約 40%の差が生じていることがわかる。先行研究において、大腸菌 1 細胞から取得した MDA 産物のゲノムカバー率は 40-67%であると報告されており (Marcy et al., 2007) (de Bourcy et al., 2014)、本研究の In-tube MDA の結果と概ね一致する。これらの結果と比較した場合においても、cd-MDA を用いて得られた増幅産物から高いゲノムカバー率が得られることが明らかとなった。また、cd-MDA では Sequence effort の増加とともにゲノムカバー率が直線的に増加していることが確認され、この結果からも cd-MDA における増幅バイアスの抑制効果が

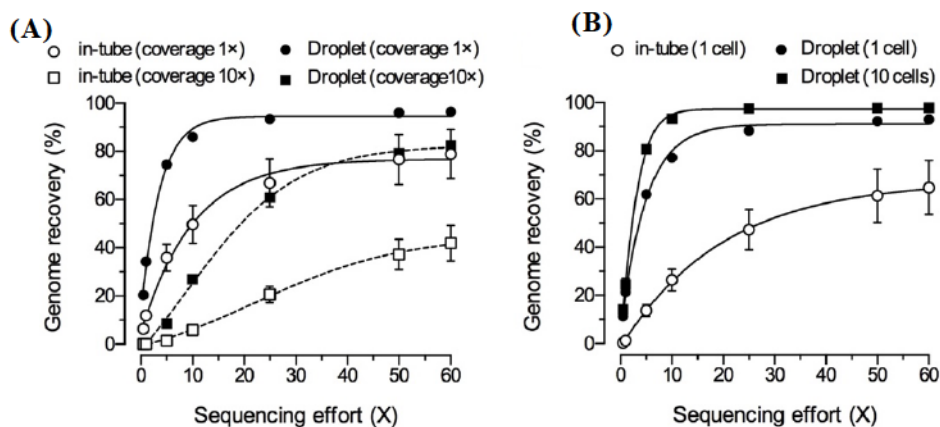


Fig. 2.7 (A)生リードおよび(B)Contig を用いた場合のゲノムカバー率

(Coverage 1×, 10×) の表記は、リファレンスのゲノム領域に対して、リードの情報が 1 回もしくは 10 回以上マップされた領域の割合を表している。  
 Sequence effort (×) は解析に使用したデータ量を示しており、Sequence effort が 60× の条件では、リファレンスとなるゲノム情報 (今回の場合は大腸菌ゲノム: 4.6 Mbp) に対して 60 倍量の配列情報を用いて解析を行ったことを示している。

Fig. 2.7 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PloS one, 10(9), e0138733.

確認された。

次に、得られたリードから Contig を作製しゲノムカバー率の評価を行った。この結果、cd-MDA のゲノムカバー率は 88-91%の値を取り、In-tube MDA に比べて約 30%高い値を示した (Sequence effort : 60×) (Fig. 2.7B)。また、10 細胞をテンプレートとして用いた cd-MDA ではゲノムカバー率は 98%となり、複数の細胞をテンプレートに用いることでより高いカバー率が得られることが示唆された。1 細胞をテンプレートとして cd-MDA を実施した場合、溶菌の過程で断片化された DNA が個々のドロップレット内で増幅されるため、断片の両端の配列情報が失われてしまうことが考えられる。一方で、10 細胞をテンプレートとして用いた場合、DNA のコピー数は 10 倍に増加し、また DNA の断片化は各細胞においてランダムに生じるため、1 細胞からの全ゲノム増幅で失われていた情報が補完され、より高いゲノムカバー率が獲得されたと考えられる。

次に、ゲノムカバー率の算出において、リファレンスゲノムにマップされなかった Contig の総塩基数を算出した。この結果、cd-MDA では 0.77 Mbp であったのに対し In-tube MDA では 3.4 Mbp となり、In-tube MDA では増幅産物全体に占める標的細胞由来の情報量が少ないことが示唆された。In-tube MDA では目的外の DNA の混入および増幅バイアスが生じる結果、標的細胞由来の情報を取得するためには多量のデータを用いて解析を行う必要があった。一方 cd-MDA では、目的外 DNA および増幅バイアスの影響が抑制されるため、データ量が少ない条件でも高いゲノムカバー率を得ることが可能であることが示唆された。次世代シーケンサーを用いた配列解析では、解析を行うサンプル数に応じて出力された配列情報が割り振られるため、cd-MDA を用いて増幅を行うことによって、従来法に比べてより多くのサンプルを一度にまとめて解析することが可能になると考えられる。

さらに、QUAST を用いて Contig の評価を行った結果、In-tube MDA では目的外の増幅産物が多量に生成されることにより、cd-MDA に比べて Contig の数が多くなった。また、Contig の総塩基長は大腸菌のゲノムサイズ (4.6 Mb) よりも大幅に大きい値となった (Table 2.4)。Contig 配列長の加重平均値を表す N50 の値を比較すると、cd-MDA では  $11,287 \pm 2,757$  bp であったのに対し、In-tube MDA では  $3,664 \pm 210$  bp となり、cd-MDA においてより多くのリードが一つの Contig としてアセンブルされたことが明らかとなった。また、10 細胞を分取した場合の cd-MDA では Contig の数は更に減少し、N50 の値は  $123,806 \pm 7,588$  bp となった。さらに、



Table 2.4 大腸菌 1 細胞より得られた全ゲノム増幅産物の *de novo* assembling の評価

	1 cell in-tube MDA (n = 3)	1 cell cd-	10 cells cd-
# contigs ( $\geq 500$ bp)	3045 $\pm$ 313	1400 $\pm$ 243	136 $\pm$ 24
Total length (kbp)	5784 $\pm$ 414	4833 $\pm$ 50	4688 $\pm$ 25
N50 (bp)	3644 $\pm$ 210	11287 $\pm$ 2757	123806 $\pm$ 7588
<b>Statistics with reference genome</b>			
# misassembled contigs	106 $\pm$ 24	34 $\pm$ 3	22 $\pm$ 1
# fully unaligned contigs	1988 $\pm$ 323	500 $\pm$ 120	25 $\pm$ 25
# partially unaligned contigs	279 $\pm$ 68	146 $\pm$ 10	2 $\pm$ 2
# mismatches per 100 kbp	35 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	4 $\pm$ 0.3
# indels per 100 kbp	2.3 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0
Genome fraction (%)	59 $\pm$ 11	89 $\pm$ 2	98 $\pm$ 0

Table 2.4 was referred from the article:

Nishikawa, Y., Hosokawa, M. & Takeyama, H. et al. (2015). PloS one, 10(9), e0138733.

Contig 配列の正確性の指標である Misassembled contigs, Fully unaligned contigs, Mismatches, Indels の割合を評価した結果、すべての項目において cd-MDA が Intube MDA より低い値を示し、cd-MDA によってエラー率の低い高品質なゲノム増幅産物が得られることが明らかとなった。MDA では、DNA 増幅の工程で多くの枝分かれした 1 本鎖 DNA が合成され、これらの複数の配列をまたいで増幅が行われることによって、配列の反転や目的外 DNA の情報を含んだキメラ配列が生成されることが知られている (Lasken and Stockwell, 2007)。cd-MDA では、DNA 断片が個々のドロップレット内で個別に増幅されるため、異なる DNA 断片間でのキメラ配列の生成が抑制されたと考えられる。本研究では分取した細胞の数に関わらず、10  $\mu$ L の MDA 反応液を調製してゲノムの増幅を実施した。このため、1 細胞を分取した条件に比べて 10 細胞を分取した条件では、ドロップレットに封入される DNA 分子数は理論上 10 倍量になると考えられる。cd-MDA では、DNA 分子を個別の微小空間内で増幅することにより増幅バイアスおよびキメラ配列の生成が抑制される。cd-MDA の特性上、より多くの数の細胞を対象とする場合やよりゲノムサイズの大きな細胞を対象とする場合には、ゲノム増幅に用いる MDA 反応液の量を増加するあるいは作製するドロップレットの粒径を小さくすることにより、ドロップレット内の DNA 濃度 (copy/droplet) を低く抑え、複数コピーの DNA が同一のドロップレットに封入されることを抑制することが、高精度なゲノム情報の獲得に必要であると考えられる。

以上の結果から、cd-MDA では目的外 DNA に由来する増幅やキメラ配列の生成が抑制されており、cd-MDA は標的となる細胞由来の DNA をより正確に増幅するための手法として有用であることが実証された。

## 2.4 結言

本章では、マイクロ流体デバイスを用いてピコリットル容量の微小液滴（ドロップレット）を高速に連続生成する技術を開発した。また、DNA を含んだ全ゲノム増幅試薬を用いてドロップレットを作製することにより、ドロップレット内に DNA 分子を個別に封入し、1 分子レベルの DNA から全ゲノム増幅が可能であることを実証した。次に大腸菌 1 細胞をテンプレートとして全ゲノム増幅試薬の調製を行い、ドロップレットを用いて全ゲノム増幅を行うことにより、単一細胞由来の DNA 断片を独立した微小空間内で個別に増幅する技術（cd-MDA）を開発した。DNA 定量、qPCR、次世代シーケンサーによる配列解析などの手法を用いて得られた増幅産物の評価を行った結果、cd-MDA では混入した目的外 DNA の増幅が微小空間内に制限されるため、 $\mu\text{L}$  容量を用いる従来法に比べて目的外 DNA の増幅量を約 1,400 分の 1 に抑制できることが示唆された。また、ドロップレットを用いて全ゲノム増幅を行うことにより、DNA 断片間での増幅の競合が抑制される結果、増幅バイアスを抑制した均質な増幅産物が得られることが明らかとなった。さらに、本手法を用いることによって低バイアスで高品質な配列情報が獲得されるため、従来までの手法に比べて少ないデータ量で高いゲノムカバー率が得られることが明らかとなった。本研究において開発した全ゲノム増幅法と同様の技術が、他の研究グループからも相次いで報告されており（Sidore et al., 2015）（Rhee et al., 2016）、これらの報告では動物細胞を対象としたゲノム増幅にもドロップレットを用いた全ゲノム増幅が有用であることが実証されている。

本手法では、1 分子の DNA をドロップレット内で増幅することによって検出が可能であるため、実験環境下のコンタミネーションリスクを評価するための手法としても応用が可能であると考えられる。また、増幅バイアスの少ない反応環境は、ミニメタゲノムやメタトランスクリプトーム解析において存在比の少ない配列情報の解析にも有用であると考えられる。以上のように本手法は、解析の対象となる標的細胞がすでに決定しており、また分取が可能である場合に、単一細胞からの高精度なゲノム情報の獲得に有用であると考えられる。さらに、cd-MDA では 10 細胞を分取した条件においてより高精度なゲノム情報が獲得されたことから、単一細胞を対象とした解析に留まらず、標的となる細胞が分取可能であるが非常に希少な場合や、培養手法が確立されているが増殖速度が遅く、配列解析のために全ゲノム増幅を必要とする微生物などにも適用が可能であると考えられる。

## 2.5 参考文献

- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham, A. D. Prjibelski, A. V. Pyshkin, A. V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M. A. Alekseyev, and P. A. Pevzner. 2012. 'SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing', *J Comput Biol*, 19: 455-77.
- Blainey, P. C. 2013. 'The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea', *FEMS Microbiol Rev*, 37: 407-27.
- Blainey, P. C., and S. R. Quake. 2011. 'Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination', *Nucleic Acids Res*, 39: e19.
- Bredel, M., C. Bredel, D. Juric, Y. Kim, H. Vogel, G. R. Harsh, L. D. Recht, J. R. Pollack, and B. I. Sikic. 2005. 'Amplification of whole tumor genomes and gene-by-gene mapping of genomic aberrations from limited sources of fresh-frozen and paraffin-embedded DNA', *J Mol Diagn*, 7: 171-82.
- de Bourcy, C. F., I. De Vlaminck, J. N. Kanbar, J. Wang, C. Gawad, and S. R. Quake. 2014. 'A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods', *PLoS One*, 9: e105585.
- Gurevich, A., V. Saveliev, N. Vyahhi, and G. Tesler. 2013. 'QUAST: quality assessment tool for genome assemblies', *Bioinformatics*, 29: 1072-5.
- Lasken, R. S. 2007. 'Single-cell genomic sequencing using Multiple Displacement Amplification', *Curr Opin Microbiol*, 10: 510-6.
- Lasken, R. S., and T. B. Stockwell. 2007. 'Mechanism of chimera formation during the Multiple Displacement Amplification reaction', *BMC Biotechnol*, 7: 19.
- Li, H., and R. Durbin. 2009. 'Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform', *Bioinformatics*, 25: 1754-60.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, and Subgroup Genome Project Data Processing. 2009. 'The Sequence Alignment/Map format and SAMtools', *Bioinformatics*, 25: 2078-9.
- Marcy, Y., T. Isohey, R. S. Lasken, T. B. Stockwell, B. P. Walenz, A. L. Halpern, K. Y. Beeson, S. M. Goldberg, and S. R. Quake. 2007. 'Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells', *PLoS Genet*, 3: 1702-8.

- Mazutis, L., J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and J. A. Heyman. 2013. 'Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics', *Nat Protoc*, 8: 870-91.
- Fitzsimons, M. S., M. Novotny, C. C. Lo, A. E. Dichosa, J. L. Yee-Greenbaum, J. P. Snook, W. Gu, O. Chertkov, K. W. Davenport, K. McMurry, K. G. Reitenga, A. R. Daughton, J. He, S. L. Johnson, C. D. Gleasner, P. L. Wills, B. Parson-Quintana, P. S. Chain, J. C. Detter, R. S. Lasken, and C. S. Han. 2013. 'Nearly finished genomes produced using gel microdroplet culturing reveal substantial intraspecies genomic diversity within the human microbiome', *Genome Res*, 23: 878-88.
- Raghunathan, A., H. R. Ferguson, Jr., C. J. Bornarth, W. Song, M. Driscoll, and R. S. Lasken. 2005. 'Genomic DNA amplification from a single bacterium', *Appl Environ Microbiol*, 71: 3342-7.
- Suzuki, M. T., and S. J. Giovannoni. 1996. 'Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR', *Appl Environ Microbiol*, 62: 625-30.
- Woyke, T., A. Sczyrba, J. Lee, C. Rinke, D. Tighe, S. Clingenpeel, R. Malmstrom, R. Stepanauskas, and J. F. Cheng. 2011. 'Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification', *PLoS One*, 6: e26161.

### 第3章 ドロップレット融合技術の開発と単一微生物を封入したドロップレットによる超並列全ゲノム増幅法の開発

本章は、M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017), ‘Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics.’ *Sci Rep* 7(1): 5199.で報告された内容を使用して構成されている。

#### 3.1 緒言

本章では、多様な環境微生物集団を対象として、多種類の単一細胞のゲノム情報を網羅的に獲得することを可能にする全ゲノム増幅手法の開発を目指す。従来までの単一細胞解析手法では、FACSなどのセルソーターを用いてマイクロウェルプレートに単一細胞を分取した後、個別に反応を進行させることが一般的であった。しかしながら、環境サンプルを対象とした解析では、細胞分取効率および全ゲノム増幅効率の低さによって解析に使用できる細胞数は分取した細胞の数%程度であり、歩留まりが低いことが問題であった (Rinke et al., 2013)。また、目的外 DNA の増幅によって配列情報の精度が低下することが問題であった (Zhang et al., 2006)。

従来法における単一細胞解析の問題点に対し、第2章では単一細胞由来の DNA 断片をドロップレットに封入し、それぞれの DNA 断片を個別に増幅することによってキメラ配列の生成を抑制し、低バイアスな全ゲノム増幅を可能とした (cd-MDA) (Nishikawa et al., 2015)。しかしながら cd-MDA では、ドロップレット作製の前段階として単一細胞由来の DNA を含んだ全ゲノム増幅反応液を調製する必要があるため、従来までの方法と同様、セルソーターなどの細胞分取技術を用いる必要があった。また、分取したサンプルの数に応じてドロップレットを作製する必要があるため、多数の細胞を対象とした解析には応用が困難であった。そこで本章では、ピコリットル容量のドロップレット内に単一細胞を封入し、1個のドロップレット内で単一細胞のゲノムを増幅する手法の開発に取り組んだ (Single droplet MDA (sd-MDA))。マイクロ流体デバイスを用いることにより均質な微小反応場であるドロップレットを高速に作製することが可能であり、解析の対象となる細胞の数に応じたドロップレットを任意に作製することができる。これにより、単一細胞のゲノム解析をハイスループットに実施することができると考えられる。また、一つのドロップレットの容積は非常に微量であるため、1本のチューブ内で  $10^5$  個以上の単一細胞に対して並列的に反応を進行させることが

できる。さらに、微小空間内でゲノム増幅を行うことにより目的外の DNA の混入リスクを大幅に抑制できると考えられる。

本技術の実現のためには、単一細胞の封入や細胞の溶菌、全ゲノム増幅といった複数の反応をドロップレット内で連続して実施する必要がある。近年の MEMS 技術の発展に伴い、ドロップレットの融合 (Mazutis et al., 2009) や分取 (Baret et al., 2009) を含めた様々なドロップレット操作技術がこれまでに報告されており、反応溶液の追加や混合、熱サイクルの印加など、複雑な反応をドロップレット内で完結させることが可能となっている (Kintses et al., 2010)。本章ではこれらの技術を全ゲノム増幅反応に適用し、2 種類のドロップレットを融合させる技術の開発を行うことによって単一細胞からの全ゲノム増幅システムを開発した。次に、大腸菌および枯草菌をモデル微生物として用いた全ゲノム増幅を行い、開発した手法の評価を行った。さらに環境微生物への適用例として、土壌微生物を標的としたゲノム解析を実施した。土壌に含まれる微生物は多様性が非常に高く、また採取場所によって固有の細菌叢を有していることが知られている (Fierer and Jackson, 2006)。また、土壌には様々な不純物や反応阻害物が含まれることが知られており (Miller et al., 1999)、従来までの単一細胞解析において歩留まりが低いサンプルの一つであると考えられる。そこで、土壌微生物を対象としたゲノム解析を実施することによって、開発した手法の環境サンプルに対する適用可能性を検証した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 細胞を封入したドロップレットの作製

大腸菌 (*Escherichia coli* K12 ATCC10798) を Lysogeny Broth (LB) 培地 (1.0% Bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, pH 7.0) を用いて 16 h 培養し、Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Thermo Fisher Scientific) を用いて 3 度の遠心洗浄操作を行った。次に、ペレットとして回収した大腸菌に対してエタノール固定を行った後、Propidium Iodide (PI) (Thermo Fisher Scientific) を用いて細胞染色を行った。DPBS 溶液中に細胞を再度懸濁し、細胞懸濁液を用いてドロップレットを作製した。懸濁液中の細胞濃度を  $1.5 \times 10^4$  cells/ $\mu$ L に調製し、粒径 50  $\mu$ m のドロップレットが作製された場合の細胞濃度を 1 cell/droplet とした。回収後のドロップレットを蛍光顕微鏡下で観察し、ドロップレット内に封入された細胞数を測定した。

### 3.2.2 単一細胞のドロップレット内全ゲノム増幅に向けたマイクロ流体デバイスの作製

製図ソフトである AUTOCAD を使用し、新たに 2 種類のマイクロ流体デバイスの設計を行った。1 つ目は、2 種類の水性溶液を混合したドロップレット作製のマイクロ流体デバイスであり、水性溶液導入用のインレットが 2 箇所、キャリアオイル導入用のインレットが 1 箇所、およびドロップレット回収用のアウトレットが存在する (Fig 3.1A)。本デバイスでは、十字構造部の直前で 2 種類の水性溶液が合流し、ドロップレットが形成される。各水性溶液の流速を等速に調整することにより、2 種類の溶液が一对で混合されたドロップレットが作成される。2 つ目は、2 種類のドロップレットの融合を可能とするマイクロ流体デバイスである (Fig 3.1B)。このデバイスには、水性溶液導入用のインレットが 1 個、あらかじめ作製されたドロップレットを再導入するためのインレットが 1 箇所、キャリアオイル導入用のインレットが 3 箇所、およびドロップレット回収用のアウトレットが存在する。本デバイスは大きく分けて 3 つの部分から構成されている。まず、導入された水性溶液を用いて、デバイス上でドロップレットが作製される。次に、事前に作製されたドロップレットがデバイス内に導入され (Fig 3.1B①)、はじめに作製されたドロップレットの流れに合流することで 2 種類のドロップレットが一对でペアを形成する (Fig 3.1B②)。最後に、ドロップレットが蛇行流路内に進むことで 2 種類のドロップレットが融合する (Fig 3.1B③)。このとき、



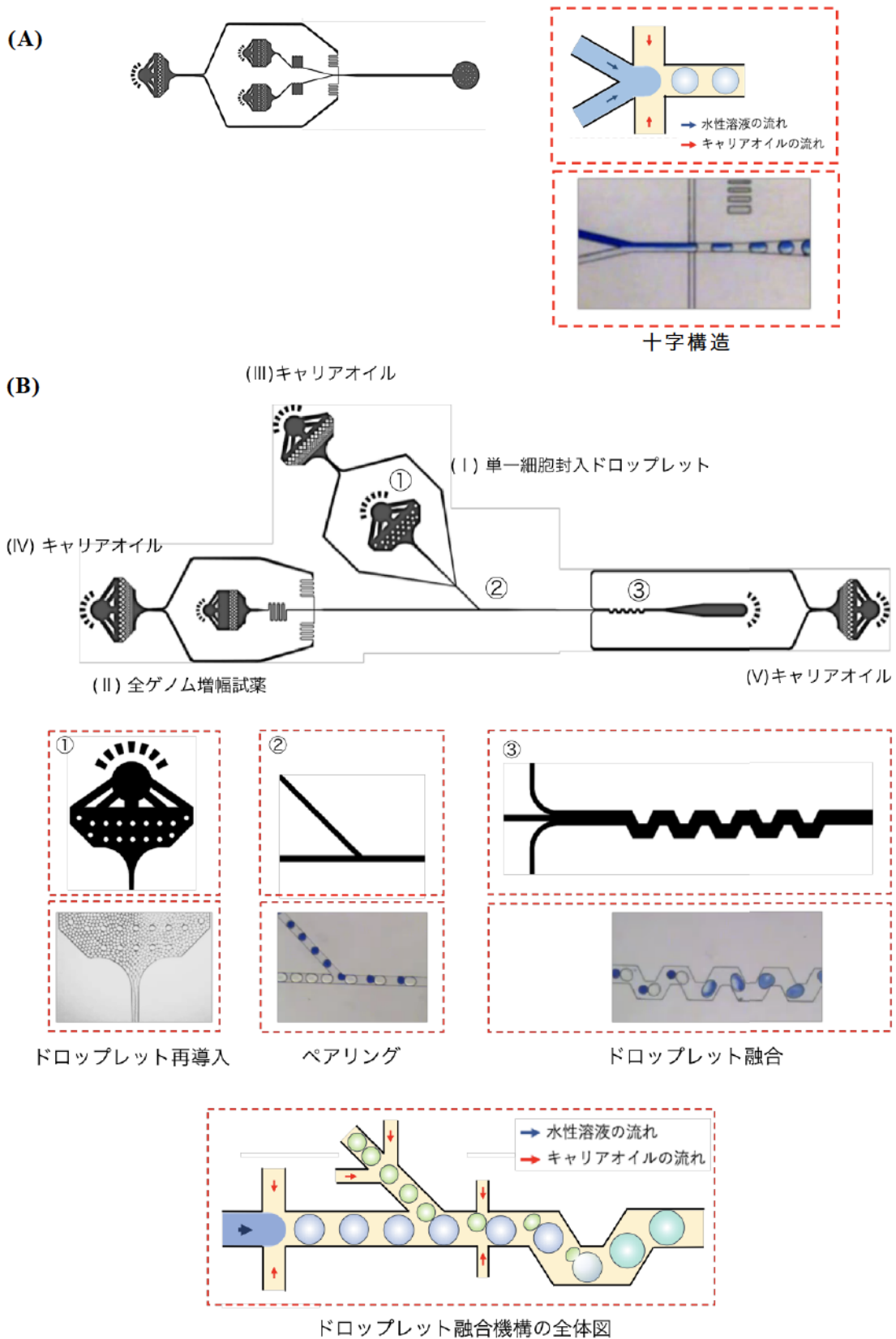


Fig. 3.1 マイクロ流体デバイスのデザイン

- (A) 2種溶液混合ドロップレット作製のマイクロ流体デバイス  
 (B) 2種ドロップレット融合用のマイクロ流体デバイス

蛇行流路の直前でキャリアオイルが追加され、融合後のドロップレットの安定性を高める役割を果たす。なお、流路構造のデザインは先行研究 (Mazutis, et al., 2009) (Mazutis, et al., 2013) にて報告されたデザインを参考とした。また、ドロップレット融合用のデバイスについては全ゲノム増幅試薬を含んだドロップレットを用いて融合反応を行うため、界面活性剤の濃度および流路構造を変えて条件の検討を行い、効率的な融合を可能とする条件を決定した。デバイス内部の流路幅は、AUTOCAD での製図時に 100  $\mu\text{m}$  となるように設計し、ドロップレット融合用のデバイスは、融合部 (Fig 3.1B③) の流路幅を 200  $\mu\text{m}$  に設計した。

次に、2.2.1 と同様の手法を用いてモールドの作製およびマイクロ流体デバイスの作製を行った。作製したマイクロ流体デバイスに対し、圧力制御ポンプ P-pump (Dolomite) を用いて AGW チューブ (Chukoh Chemical Industries) 内に充填した水性溶液およびキャリアオイルを導入した。キャリアオイルには、非イオン界面活性剤である Pico-surf1 (Dolomite) を 2% の割合で含んだ Novec7500 (Dolomite) を使用した。また、ドロップレット融合時には、キャリアオイルとして Novec7500 (Dolomite) または FC-40 (Dolomite) を使用し、Pico-surf1 を 0-3% の割合で混合して使用した。ハイスピードカメラ FHS-33 (Flovel) を用いてドロップレットの生成および融合を観察し、界面活性剤濃度および流速条件を変えた場合の融合効率を評価した。2 種溶液の混合および 2 種類のドロップレットの融合の観察には、5 mM のメチレンブルーを含んだ DPBS (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

### **3.2.3 融合手法を用いたドロップレット内での単一細胞の全ゲノム増幅**

全ゲノム増幅の試薬として、REPLI-g Single Cell Kit (Qiagen) を使用した。まず、細胞を懸濁した DPBS (Table 3.1A) および細胞溶菌用のバッファー (Buffer D2) (Table 3.1B) をそれぞれ AGW チューブに充填し、Fig 3.1A に示した 2 種溶液混合用のマイクロ流体デバイスの 2 箇所のインレットに接続した。ハイスピードカメラを用いてドロップレットの生成を確認した後、AGW チューブを介してアウトレットからドロップレットを回収した (直径 40  $\mu\text{m}$ )。回収したドロップレットは 65°C で 10 分間反応させ、ドロップレット内に封入された細胞の溶菌および DNA の 1 本鎖化を行った。

次に、ドロップレット融合用のデバイスを用いて単一細胞由来の DNA を封入したドロップレットと全ゲノム増幅試薬および中和剤を含んだドロップレットの融合を行った。1 度の反応につき 1×EvaGreen (COSMO BIO CO., LTD.) を含んだ

Table3.1 全ゲノム増幅反応液の組成

Amplification Kit	Solution	Volume ( $\mu\text{L}$ )	
REPLI-g Single Cell Kit	Cell suspended DPBS	15.5	A
	1M DTT	1.2	
	Buffer DLB	13	B
	Nuclease free water	1.3	
	Reaction Buffer	29	
	Stop solution	2.0	
	Enzyme solution	2.0	C
	Nuclease free water	3.2	
	20 $\times$ EvaGreen	1.0	
	10% Tween-20	5.0	
REPLI-g Single Cell Kit	Collected droplet	-	
	DPBS	0.8	
	1M DTT	0.05	
	Buffer DLB	0.55	
	Nuclease free water	0.8 (0.3)	D
	Reaction Buffer	5.8	
	Stop solution	0.6	
	Enzyme solution	0.4	
	20 $\times$ EvaGreen	0 (0.5)	
	10% Tween-20	1.0	

ドロップレット1個あたりの収量を測定する場合においてのみ、0.5  $\mu\text{L}$  の Nuclease free water を同量の 20 $\times$  EvaGreen に置き換えた。

21.5  $\mu\text{L}$  の全ゲノム増幅反応液を調製し (Table 3.1C)、AGW チューブを介してインレットへの接続を行った。一方で、単一細胞由来の DNA を含んだドロップレットは、キャリアオイルを 2.0% (v/v) Pico-Surf1 を含む FC-40 に置換した後、AGW チューブに充填してインレットへの接続を行った。P-pump を起動し、全ゲノム増幅試薬および単一細胞由来の DNA を含んだドロップレットをマイクロ流体デバイスに導入した。導入された全ゲノム増幅試薬は、デバイス内部でキャリアオイルによってせん断され、直径 73  $\mu\text{m}$  のドロップレットが形成される。一方で、単一細胞由来の DNA を含んだドロップレットは、デバイス内でキャリアオイルと合流することによって一定の間隔を空けて流路内に導入され、全ゲノム増幅試薬を含んだドロップレットと一対一のペアを形成する。2 種類のドロップレットはデバイス内の蛇行流路で融合した後 (直径 77  $\mu\text{m}$ )、AGW チューブを介してアウトレットから PCR チューブに回収される。回収したドロップレットのキャリアオイルを 2.0% (v/v) Pico-Surf1 を含んだ HFE7500 に置換し、30°C の等温環境下で反応させることによって全ゲノム増幅を行った (以下、本手法を sd-MDA と記す) (Fig. 3.2)。ドロップレット内での全ゲノム増幅の観察には、モデル微生物として大腸菌 (*Escherichia coli* K12 ATCC10798) を封入したドロップレットを作製し、20 分毎に蛍光顕微鏡を用いて画像を取得することによって蛍光強度の測定を行った。また、ドロップレット内の細胞濃度を 0, 0.02, 0.1, 0.5 cell/droplet に調製してゲノム増幅を行い、全ゲノム増幅後に蛍光を示すドロップレットの割合を測定した。

増幅反応終了後、テーブルコーチ (KOKEN-LTD.) 内に設置した顕微鏡下でドロップレットを観察した。マイクロディスペンサー (Drummond Scientific) を用いて EvaGreen 由来の蛍光を発するドロップレットおよび蛍光を示さないドロップレットをそれぞれ個別に PCR チューブに回収した。次に、回収したドロップレット内に含まれる DNA をテンプレートとして 2 回目の全ゲノム増幅を行った。MDA 試薬には REPLI-g Single Cell Kit を使用し、1 サンプルにつき 10  $\mu\text{L}$  の全ゲノム増幅反応液 (Table 3.1D) を調製した。StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて全ゲノム増幅を行い、蛍光強度を測定した。また、大腸菌より抽出した DNA をテンプレートとしたサンプルを用いて同様に蛍光強度を測定し、各サンプルの Ct 値を比較することによってドロップレット 1 個あたりの DNA 収量を算出した。また、S1000 PCR System (Bio-Rad Laboratories) を用いて全ゲノム増幅を行った (1, 2, 3, 8 時間)。各サンプルの DNA 濃度を Qubit®

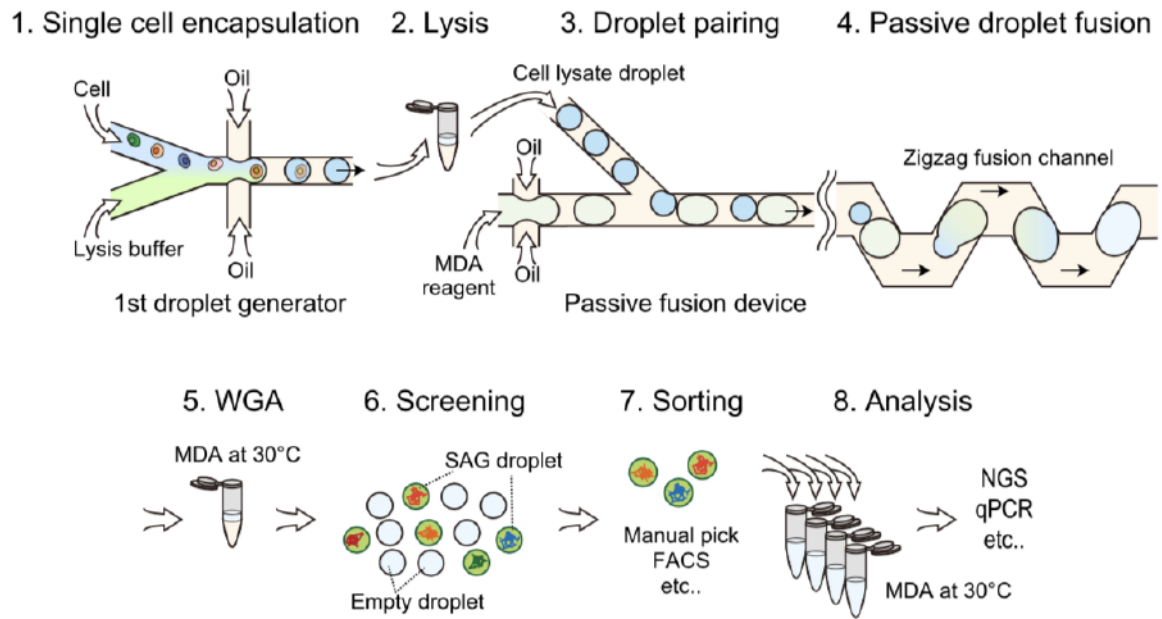


Fig. 3.2 Single droplet MDA (sd-MDA)を用いた単一細胞からのゲノム増幅

Fig. 3.2 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). *Sci Rep* 7(1): 5199.

3.0 フルオロメーター (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、2次増幅後の DNA 収量を測定した。

#### **3.2.4 大腸菌および枯草菌を用いた単一細胞ゲノム増幅**

モデル微生物として大腸菌 (*Escherichia coli* K12 ATCC10798: ゲノムサイズ 4.6 Mbp)、枯草菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633: ゲノムサイズ 4.0 Mbp) を使用した。LB 培地を用いて大腸菌を、Brain Heart Infusion 培地 (ATCC medium 44, Thermo Fisher Scientific) を用いて枯草菌を培養し、DPBS を用いて遠心洗浄を3度繰り返した。それぞれの細胞懸濁液の濃度を測定した後、2種類の微生物を等濃度で混合し、終濃度を  $6.0 \times 10^4$  cells/ $\mu$ L (各細胞の濃度:  $3.0 \times 10^4$  cells/ $\mu$ L) とした。3.2.3 に示した手法を用いて sd-MDA を行い、ドロップレット内で単一細胞からの全ゲノム増幅を実施した (ドロップレット内細胞濃度: 0.1 cell/droplet)。増幅反応終了後、テーブルコーチ内に設置した顕微鏡下でドロップレットを観察した。また、マイクロディスペンサーを用いて EvaGreen 由来の蛍光を発するドロップレットを個別に PCR チューブに回収し、2次増幅を行った。

続いて、2次増幅後の産物を用いて 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った (Table 3.2)。Illumina Miseq system for 16S metagenomics sequencing library preparation のプロトコルに従い、V3-V4 領域を標的とした PCR を行い、得られた増幅産物の配列解析を行った (Fasmac Co., Ltd.)。さらに、Nextera XT DNA sample prep kit (Illumina) または QIASeq FX DNA Library kit (QIAGEN) を用いてライブラリを作製し、2.2.5 に示した手法を用いて配列情報の取得と解析を行った。ゲノムカバー率の評価には、Sequence effort を 1 $\times$ , 5 $\times$ , 10 $\times$ , 20 $\times$ , 40 $\times$ , 60 $\times$  となるようにデータ量を揃えて解析を行った。また、リファレンスゲノムには NC\_00913 (*E. coli* substrain MG1655) および NC\_014479 (*B. subtilis* subsp. spizizenii str. W23) を使用した。本手法のコントロールとして、大腸菌から抽出した DNA (I)、In-tube MDA による大腸菌 1 細胞からの増幅産物 (II)、cd-MDA による大腸菌 1 細胞からの増幅産物 (III)、sd-MDA による大腸菌 1 細胞からの増幅産物 (IV) より取得した配列情報を使用し、Sequence effort を 60 $\times$  に設定して目的外 DNA の混入率および増幅バイアスの評価 (Zong et al., 2012) を行った。さらに、SPAdes (Bankevich et al., 2012) を用いて *de novo assembly* を行い、Contig を用いた場合のゲノムカバー率の算出および QUASt (Gurevich et al., 2013) を用いた Contig の品質評価を行った。また、Contig に含まれる目的外 DNA の割合 (Contamination) を、CheckM

Table 3.2 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR の反応条件

<b>Solution</b>	<b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
Prime star Max (Takara)	6.25
10 $\mu\text{M}$ Primer forward	0.5
10 $\mu\text{M}$ Primer reverse	0.5
DNA solution	0.5
D.W.	3.75
<b>Total</b>	<b>12.5</b>

<b>Temperature (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b>Time</b>	<b>Cycle</b>
98	5 min	
98	10 sec	
51	15 sec	27
72	5 sec	
72	5 min	
4	$\infty$	

<b>Primer</b>	<b>Sequence (<math>5' \rightarrow 3'</math>)</b>
V3V4 forward	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG
V3V4 reverse	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

(Parks et al., 2015) を用いて評価した。なお、本研究にて取得した大腸菌および枯草菌を対象とした次世代シーケンサーの配列情報は、全て DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession number: DRA005326)

### **3.2.5 土壤微生物を用いた単一細胞ゲノム増幅**

早稲田大学 120-5 号館の中庭のケヤキ周辺の土壌を、環境サンプルとして回収した。土壌サンプルに含まれる菌叢を解析するため、ISOIL (Nippon Gene) を用いて 1.5 g の土壌からメタゲノムを抽出した。Illumina のプロトコルに従って 16S Metagenomic Sequencing Library の調製を行い、シーケンス解析を行った。得られた配列をもとに、UPARSE (Edgar, 2013) を用いて OTU (Operational taxonomic unit) クラスタリングを行い、97%以上の相同性を示す配列を一つの OTU としてまとめた。また、RDP classifier (Wang et al., 2007) を用いてそれぞれの OTU の同定を行った。

次に、ドロップレットに封入する微生物画分の調製を行った。15 mL の遠沈管 (Nippon Genetics) に 1.5 g の土壌と 3 mL の DPBS を加えて十分に懸濁した後、氷上で 5 分間静置した。上清を回収した後、200 ×g で 5 分間の遠心を行って大きな粒子を沈殿させた後、再度上清を回収した。回収後の上清を 35 μm 径のナイロンメッシュ (Corning) を用いてろ過した後、13,000 ×g で 20 分間の遠心を行い、微生物画分をペレットとして回収した。DPBS を用いた遠心洗浄をさらに 2 回行い、細胞濃度を測定した後、3.2.3 に示した手法を用いて sd-MDA を行った。3.2.4 に示した手法を用いて DNA の定量および 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR を行った後、ライブラリの作製を行った。また、2.2.4 に示した手法を用いて配列情報の取得と解析を行った。2,000 bp 以下の Contig を除去した後、AMPHORA (Wu and Scott, 2012) を用いてマーカー遺伝子の検出を行った。また、CheckM を用いて各配列情報の推定ゲノム補完率 (Completeness) および目的外 DNA の割合 (Contamination) の値を評価した。なお、本研究にて取得した土壤微生物を対象とした次世代シーケンサーの配列情報は、全て DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した (Accession number: DRA005327)。



### 3.3 結果・考察

#### 3.3.1 ドロップレット内細胞濃度の測定

細胞固定後、Propidium Iodide (PI) を用いて染色した大腸菌をドロップレットに 1 cell/droplet となるような濃度で封入し、ドロップレット内部に封入された細胞数の測定を行った。測定の結果、封入される細胞数の分布はポアソン分布より導かれる理論値に従うことが明らかとなった ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3.3A, B)。これにより、ドロップレット作製に使用する水性溶液中の細胞濃度を調整することにより、ドロップレット内に封入される細胞数の制御が可能であり、単一細胞対象とした解析に本技術が使用可能であることが示唆された。

#### 3.3.2 ドロップレット融合効率の評価

Fig.3.1A に示したデバイスを使用し、一方からは DPBS を、もう一方からはメチレンブルーを用いて着色した DPBS を導入することにより、2 種類の溶液が混合されたドロップレットが作製される様子を観察した。2 種溶液の導入速度を 24  $\mu\text{L}/\text{h}$ 、キャリアオイルの導入速度を 360  $\mu\text{L}/\text{h}$  に設定したところ、マイクロ流体デバイスの十字構造部において 2 液が均一に混合されたドロップレットの生成が確認された。回収したドロップレットの粒径を測定した結果、平均粒径は  $40 \pm 0.75 \mu\text{m}$  (34 pL) となり、生成速度は 21,000 droplets/min と算出された。測定された流速条件を用いてドロップレットの作製および細胞の封入を行うことにより、約 30 分の反応で  $10^5$  個の単一細胞がドロップレット内に封入される計算となり、セルソーター等を用いた細胞分取技術に比べ、十分に高いスループットを有することが示された。

次に、ドロップレット融合用のデバイスを用いて融合効率の評価を行った。ドロップレットの安定性は、ドロップレットの粒径とキャリアオイルに含まれる界面活性剤の濃度に依存する。本研究で開発したドロップレットの融合手法では、デバイス内で作製されるドロップレットと、あらかじめ作製されデバイス内に再導入されるドロップレットの 2 種類が融合する。前者のドロップレットは、粒径が大きく界面活性剤の濃度が低いため、安定性が比較的低い。一方で、後者のドロップレットは粒径が小さく界面活性剤の濃度が高いため、安定性が比較的高い。2 種類のドロップレットの流れに関わる 4 箇所インレット部の導入圧力を制御することにより、これら 2 種類のドロップレットが一对一でペアを形成し、蛇行流路内においてドロップレットが融合する。また、蛇行流路内において界面活性

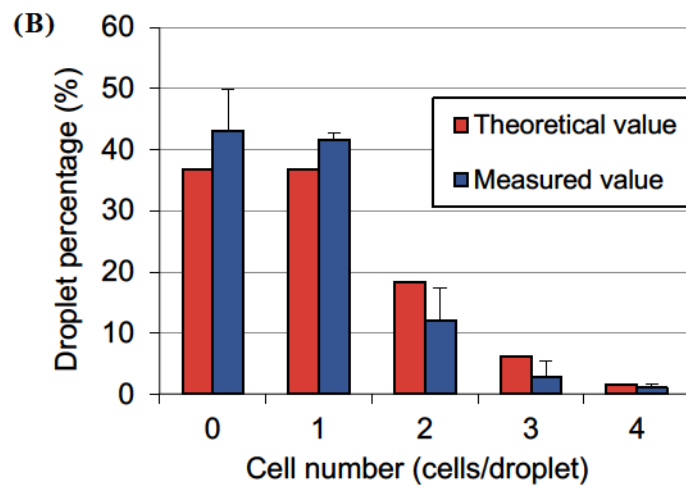
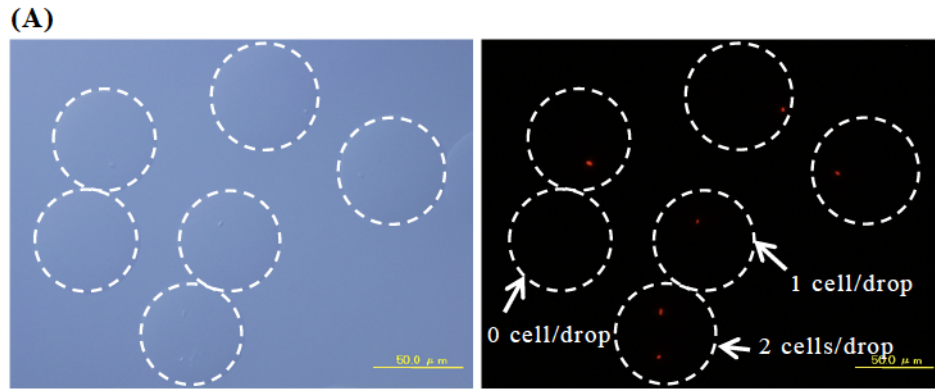


Fig. 3.3 ドロップレット内に封入される細胞数の評価

(A)細胞を封入したドロップレットの顕微鏡画像

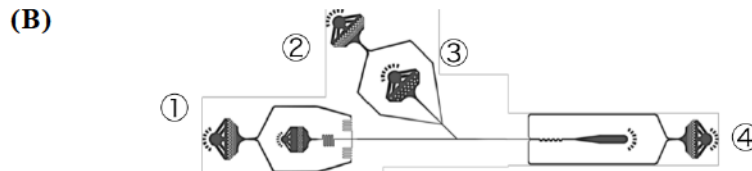
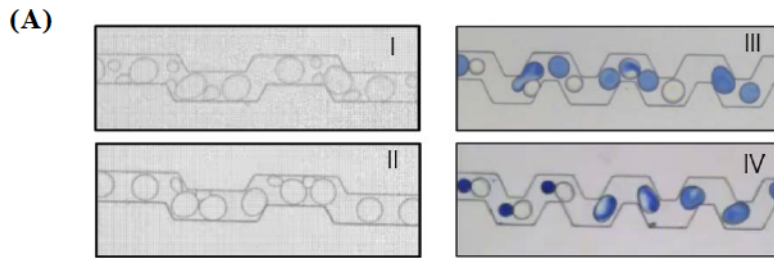
(B)ドロップレット内の細胞数（測定値）とポアソン分布（理論値）の比較

剤濃度の高いキャリアオイルが合流するため、融合後のドロップレットを安定して回収することが可能となる。高効率なドロップレットの融合を達成するため、デバイス内の蛇行流路における蛇行回数、およびデバイスに導入する各溶液の流速、キャリアオイルに含まれる界面活性剤の濃度を調整し、2種類のドロップレットが高効率で対一融合する条件を検討した (Fig 3.4)。まず、参考文献で使用されているデバイスと同様、3回の蛇行構造を有するデバイスを作製してドロップレットの融合効率を測定した。なお、参考文献でのドロップレット融合条件と比較し、本研究で融合させるドロップレットは粒径が大きく、また全ゲノム増幅試薬を含んでいるため水性溶液の組成が異なる。これにより、本研究での目的に応じた条件の最適化が求められる。第一に、ドロップレットの作製に用いられる Novec7500 をキャリアオイルに使用した場合、ドロップレットの安定性が高く融合効率は 2%以下となった (Fig 3.4A-I, B-I)。次に、キャリアオイルとして FC-40 を使用した場合、ドロップレットの融合効率は 26%まで上昇した (Fig 3.4A-II, B-II)。ここで、デバイス内の蛇行流路内においてドロップレットが融合する様子が確認されたため、10回の蛇行構造を有するデバイスを新たに作製して融合効率を測定した。界面活性剤の濃度を調整した結果、最後に導入するオイルに含まれる界面活性剤の濃度が低い条件では、ドロップレット同士の融合が複数回発生することが明らかとなった (Fig 3.4A-III, B-III)。そこで、導入するキャリアオイルの界面活性剤濃度を高めた結果、95%の融合効率が得られた (Fig 3.4A-IV, B-IV)。得られた条件を用いて2種類のドロップレットを融合させ、ハイスピードカメラを用いて融合速度を算出した結果、約 12,000 droplet/min という値が得られた (Fig 3.4C)。

次に、アウトレットから回収されたドロップレットの粒径を測定した結果、平均粒径は  $77 \pm 2.94 \mu\text{m}$  (240 pL) となった。また、ドロップレットの融合効率は 95% であり、回収の工程で 2 回以上の融合が発生したドロップレットは全体の約 3% であることが示唆された (Fig 3.5A)。以上の結果により、開発したデバイスを用いて 2 種ドロップレットの高効率な融合が可能であることが示された。

### **3.3.3 大腸菌封入ドロップレットを用いた sd-MDA の性能評価**

大腸菌を 0.1 cell/droplet となるようにドロップレット内に封入し、全ゲノム増幅を行った。2時間の増幅反応後、ドロップレット内部で DNA に結合した Evagreen 由来の蛍光が確認され、増幅された DNA がドロップレット内で保持されること



Ref.	オイル	界面活性剤 %				粒径 $\mu\text{m}$	蛇行 回数	融合 効率 %
		①	②	③	④			
Ref.	FC-40	0.55	0.55	4.0	2.8	18, 26 <sup>*1</sup>	3	98%
I	HFE-7500*	0.55	0.55	2.0	2.0	40, 73 <sup>*2</sup>	3	<2%
II	FC-40*	0.55	0.55	2.0	0.55	40, 73	3	26%
III	FC-40	0- 0.02	0	2.0	0.55	40, 73	10	複数融合
IV	FC-40	0- 0.02	0	2.0	2.0	40, 73	10	95%

\*1: 3 pL + 12 pL

\*HFE-7500: 2-(Trifluoromethyl)-3-ethoxydodecafluorohexane

\*2: 34 pL + 206 pL

\*FC-40: Perfluoro-tri-n-butylamine

(C)

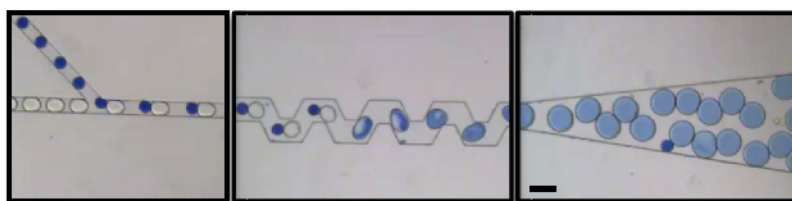


Fig. 3.4 ドロップレット融合機構の開発

(A) ハイスピードカメラを用いたドロップレット融合の観察

(B) 流路構造および界面活性剤濃度の検討

(C) 2種ドロップレットの融合機構

Fig. 3.4(C) was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

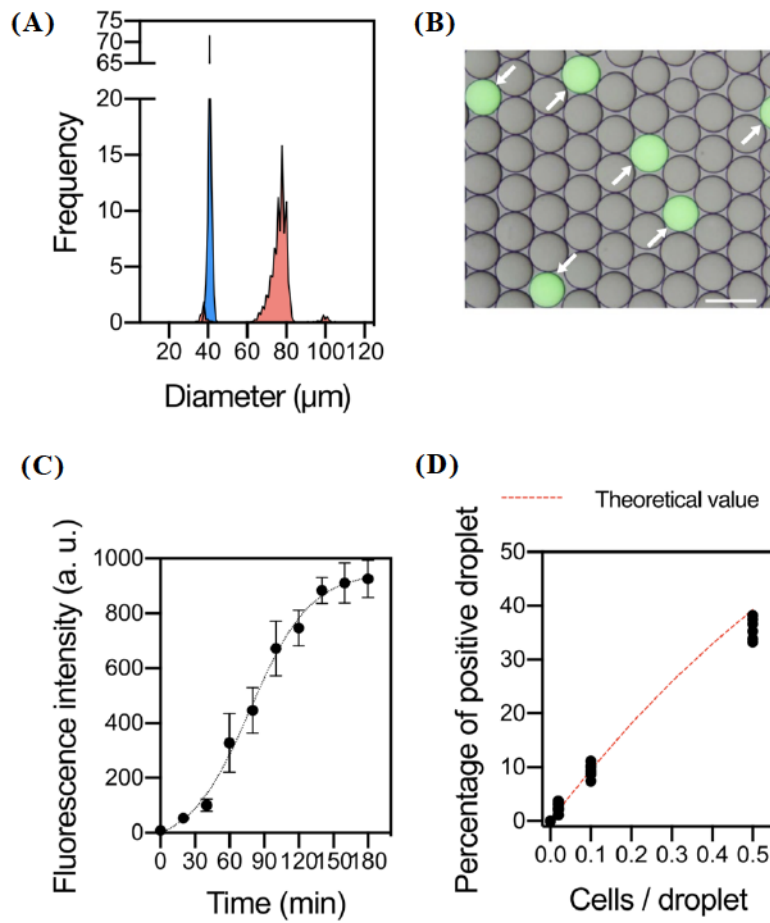


Fig. 3.5 sd-MDAによる単一細胞全ゲノム増幅の性能評価

- (A) 融合前後のドロップレットの粒径（青：融合前、赤：融合後）
- (B) 全ゲノム増幅反応後のドロップレットの顕微鏡画像（Scale: 100  $\mu\text{m}$ ）
- (C) ドロップレット内蛍光強度の経時観察
- (D) 反応後に蛍光を示したドロップレットの割合と理論値との比較

Fig. 3.5 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

が確認された (Fig 3.5B)。また、ドロップレット内の蛍光強度の変化を経時観察した結果、180 分後に蛍光強度が閾値に到達した (Fig 3.5C)。さらに、ドロップレット内の細胞濃度を 0, 0.02, 0.1, 0.5 cell/droplet となるように調製して全ゲノム増幅を行った結果、蛍光を示すドロップレットの割合はポアソン分布から求められる理論値に従って増加した ( $P < 0.05$ ) (Fig 3.5D)。以上の結果により、本研究で開発した sd-MDA によって、単一細胞の封入、溶菌、全ゲノム増幅までの工程をドロップレット内で一貫して行うことが可能であることが示された。また、細胞を含まない条件で sd-MDA を実施した場合、増幅後に蛍光を示すドロップレットの割合は 0.01%以下となり、反応環境中に含まれる目的外 DNA の存在量に概ね一致することが確認された (Blainey, 2013)。以上の結果を踏まえ、3.2.2 以降のゲノム増幅においては、1 個のドロップレット内に複数の細胞が封入される確率を低減するため、細胞濃度を 0.1 cell/droplet としてドロップレットへの封入を行った。本条件で全ゲノム増幅反応を行うことにより、全量約 40  $\mu$ L の MDA 反応液から  $5 \times 10^5$  個の全ゲノム増幅反応場が作製される。また、0.1 cell/drop で細胞を封入することにより、約  $5 \times 10^4$  個の細胞を対象として一度に全ゲノム増幅が可能となる。従来までの FACS を用いた手法では、細胞を分取した後、細胞の溶菌試薬および全ゲノム増幅試薬を各ウェルに分注する必要がある (McLeen et al., 2013)、自動分注器などの大型装置を用いた場合でも一日に処理が可能なサンプル数は  $10^3$  wells (cells) 程度が限界であった (Leung et al., 2016)。また、その他の単一細胞のゲノム解析技術として、細胞の分取から溶菌、全ゲノム増幅までの工程を自動で行うシステム (Fluidigm C1) が挙げられるが、本技術の適用対象は動物細胞に制限されており、また 96 細胞を処理するために 9.5 時間を要することから、スループット性およびコスト面で問題があった (約 10 single-cells/h)。一方 sd-MDA では、あらかじめ調製した細胞懸濁液をマイクロ流体デバイス内に導入することによって全ゲノム増幅までの一連の反応を行うことが可能であり、ドロップレットの特性を利用することによってハイスループットかつ低コストで反応を行うことが可能である。理論上、sd-MDA では 4 時間の反応で 84,000 細胞に対して全ゲノム増幅を実施することが可能であり (21,000 single-cells/h)、1 細胞あたりのコストは約 0.02 円となる。以上の比較により、従来までに報告されている様々な手法に比べ、sd-MDA がハイスループットな単一細胞ゲノム解析として有用であることが示唆された (Table 3.3)。

Table 3.3 sd-MDA とこれまでで報告された単一細胞ゲノム増幅技術との比較

Platform Name	Reaction format	Reaction scale	Number of sample/run	Time	Throughput	Pros	Cons
Conventional FACS-based MDA	Multi-well plate (96 to 384 well)	15 $\mu$ L	~384 cell	24 h	16 cell/h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tool for use with both mammalian cell and bacteria</li> <li>• Combination with liquid dispensing system and multi-well plate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low throughput reaction</li> <li>• Large reaction volume</li> <li>• Low amplification success rate</li> </ul>
Fluidigm C1 WGA	Microfluidic channel circuit	270 nL	~96 cells	9.5 h	10 cells/h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Automated reagent mixing and thermal reaction in microfluidic channel</li> <li>• Small reaction volume</li> <li>• Unbiased and contamination-less amplification</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tool for use with mammalian cell only (5-25 <math>\mu</math>m)</li> <li>• Low throughput reaction</li> </ul>
MIDAS	Microfabricated microwell	12 nL	408 cells	16 h	25.5 cells/h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tool for use with both mammalian cell and bacteria</li> <li>• Small reaction volume</li> <li>• Unbiased and contamination-less amplification</li> <li>• High coverage breadth</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low throughput WGA reaction</li> <li>• Manual reagent injection into microwells</li> <li>• Requirement of 2nd round amplification for subsequent analysis</li> </ul>
in-gel digital MDA	In-gel matrix	60 nL	206 cells	12 h	17 cells/h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simple reaction handling</li> <li>• Small reaction volume</li> <li>• Chimera-less amplification</li> <li>• High coverage breadth</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tool for use with bacteria only</li> <li>• Low throughput reaction</li> <li>• Requirement of 2nd round amplification for subsequent analysis</li> </ul>
cd-MDA (第2章)	Microfluidic droplet	67 pL (total 10 $\mu$ L)	1 cell	3 h	0.3 cells/h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ultra-small reaction volume</li> <li>• Unbiased and contamination-less amplification</li> <li>• High coverage breadth</li> <li>• Tool for use with both mammalian cell and bacteria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tool for use with bacteria only</li> <li>• Low throughput reaction</li> <li>• Requirement for microfluidic operation</li> </ul>
sd-MDA (第3章)	Microfluidic droplet	240 pL	84,000 cells	4 h	21,000 cells/h	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ultra-small reaction volume</li> <li>• High throughput and semi-automated reaction by microfluidic droplet fusion</li> <li>• Contamination-less amplification</li> <li>• High coverage breadth</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requirement of 2nd round amplification for subsequent analysis</li> <li>• Requirement for microfluidic operation</li> </ul>

Table 3.3 was referred from the article:  
M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

### 3.3.4 大腸菌封入ドロップレットを用いた単一細胞ゲノム増幅産物の収量評価

sd-MDA におけるドロップレット内での 1 次増幅、およびドロップレット分取後の PCR チューブ内での 2 次増幅後の DNA の収量を測定した。大腸菌を 0.1cell/droplet となるようにドロップレット内に封入し、全ゲノム増幅を実施した。マイクロピペットを用いて PCR チューブにドロップレットを分取した後、Evagreen を含む全ゲノム増幅反応液を用いて 2 次増幅を行った。各サンプルの蛍光強度からドロップレット内に含まれる DNA の収量を測定した結果、蛍光を示したドロップレット 1 個あたりの DNA 量は  $109 \pm 26.8$  pg ( $n=6$ ) となった (約 450 ng/ $\mu$ L)。一方で、蛍光を示さなかったドロップレットをテンプレートとして用いた条件では、2 時間の増幅反応において蛍光強度の増加が確認されなかった。

次に、Evagreen を含まない全ゲノム増幅反応液を用いて 2 次増幅を行い、30°C での反応時間を 1, 2, 3, 8 時間とした場合の DNA 収量を測定した。定量の結果、蛍光を示したドロップレットおよび大腸菌より抽出した 500 pg の gDNA をテンプレートに用いたサンプルでは、反応開始 3 時間後に DNA 収量が 1  $\mu$ g を上回ることが判明した。一方で、蛍光を示さないドロップレットおよびテンプレート DNA を含まないサンプル (No template control (NTC)) では、反応開始 3 時間後から DNA の増幅が確認され、8 時間後には蛍光を示したドロップレットおよび 500 pg の抽出 DNA を用いたサンプルと同程度の DNA 増幅が確認された (Fig. 3.6)。これらの DNA は、反応環境中より混入した目的外の DNA に由来する増幅産物であると考えられ、長時間の増幅反応によって目的外 DNA 由来の増幅産物量が増加することが示された。以上の結果をもとに本研究では、PCR チューブでの 2 次増幅の時間を 2 時間に設定して以降の操作を行った。これにより、蛍光を示すドロップレット由来の 2 次増幅産物の収量は、1 サンプルにつき 2-5  $\mu$ g (約 200-500 ng/ $\mu$ L) となった。DNA 定量の結果より、2 度の増幅反応によって単一細胞由来のゲノムは  $10^9$  倍以上に増幅されており、ライブラリ調製に十分量の DNA が得られることが明らかとなった。一方で、蛍光を示さないドロップレットを分取して 2 次増幅を実施した結果、DNA 収量は 3 ng 以下となった。以上の結果から、Evagreen の蛍光を指標とすることにより、単一細胞由来の DNA を含んだドロップレットを選択的に分取することが可能であることが示された。また、増幅された個々の DNA は、外部に漏出することなくドロップレット内に保持されることが明らかとなった。



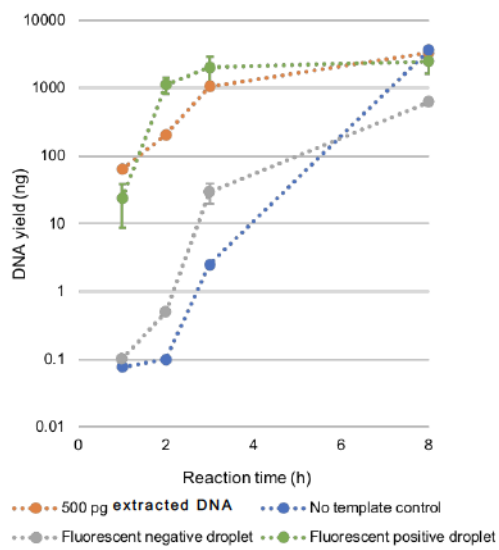


Fig. 3.6 2次増幅の反応時間と DNA 収量

### 3.3.5 大腸菌および枯草菌を用いた単一細胞ゲノム増幅産物の配列解析（生リード）

大腸菌および枯草菌を一对一で混合し、0.1 cell/droplet となるようにドロップレット内に封入して sd-MDA を行った。蛍光を示すドロップレットを無作為に 76 個分取し、PCR チューブ内での 2 次増幅を行った（30°C、2h）。得られた増幅産物をテンプレートとして PCR を行い、16S rRNA 遺伝子の配列解析を行った。分取した 76 個のサンプル中、60 個（79%）で 2 次増幅後に DNA の増幅が確認され、その内 56 個（74%）のサンプルにおいて PCR での増幅が確認された。配列解析の結果、各サンプルより得られた PCR 産物は、大腸菌または枯草菌の 16S rRNA 遺伝子配列に一致した。一方、76 個のサンプル中 16 個のサンプルでは DNA の増幅が確認されなかった。また、増幅が確認されたサンプル中 4 個のサンプルでは、PCR での増幅が確認されたが配列解析において特徴的な配列が検出されなかった。2 次増幅後に DNA の増幅が確認されなかったサンプル（16 個）および PCR 産物の配列解析において特徴的な配列が検出されなかったサンプル（4 個）について、次世代シーケンサーによる配列解析を行った結果、各サンプルより得られたリード数は 30,000 リード以下となった。BLAST を用いた配列解析の結果、これらのリードの大部分は大腸菌または枯草菌にマップされることが確認されたが、データ量が少ないため以降の解析には使用しなかった。

次に、PCR において増幅が確認されたサンプルの内、大腸菌もしくは枯草菌由来であると断定されたサンプルをそれぞれ 16 個ずつ無作為に選抜し、次世代シーケンサーを用いた配列取得を行った（計 32 個）。なおサンプルの選抜は、1 サンプルあたりに取得される配列情報を増やし、以降の解析に十分量の配列情報を獲得する目的で実施した。得られた生リードの配列情報を用いてリファレンスゲノムへのマッピングを行い、各サンプルにおいて大腸菌由来もしくは枯草菌由来と判定される生リードの割合を算出した。マッピングの結果、全 32 サンプルにおいて、94%以上のリードが大腸菌もしくは枯草菌のいずれか一方に選択的にマップされることが明らかとなった（Fig 3.7A）（Table 3.4）。各サンプルにおいてリードがマップされる微生物種は、16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR 産物の配列解析結果と一致しており、増幅された DNA がクロスコンタミネーションすることなくドロップレット内部に保持されていることが明らかとなった。また、全ての生リードを対象として BLAST による配列検索を行った結果、sd-MDA で得られた産物では、目的外 DNA に由来する配列の割合が抽出した DNA を用いた場合と同

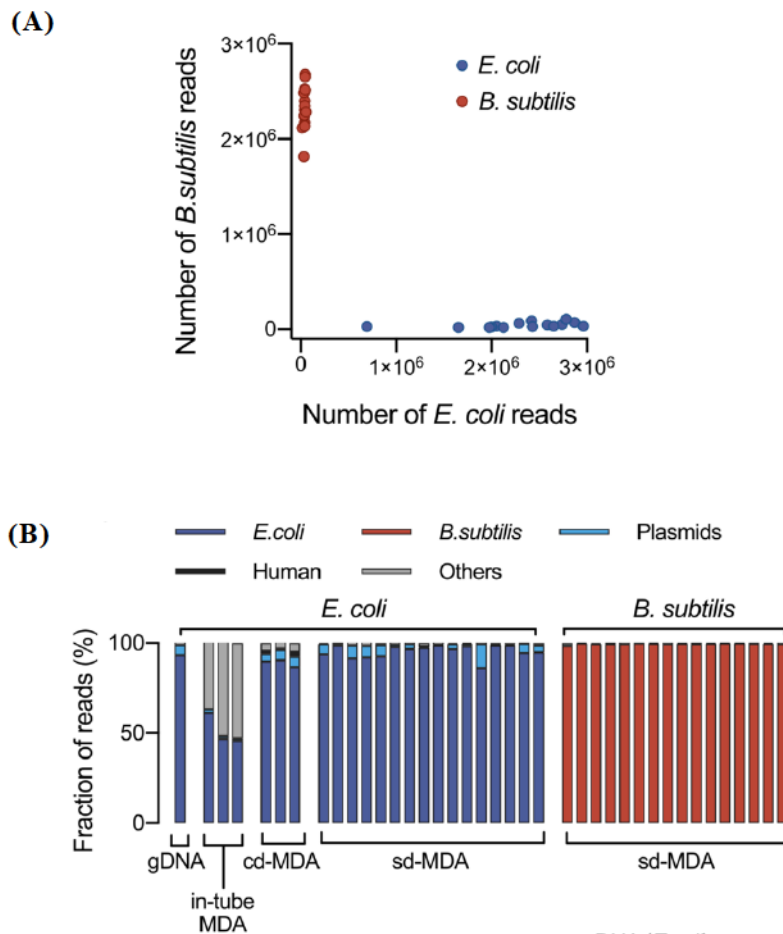


Fig. 3.7 次世代シーケンサーにより得られた生リードの配列解析

(A) sd-MDA 増幅産物のリファレンスゲノムへのマッピング

(B) 各ゲノム増幅手法によって得られたリードの BLAST 検索結果  
*E. coli* および *B. subtilis* の表記は、PCR 増幅産物の配列解析の結果を示す。

Fig. 3.7 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

Table 3.4 大腸菌および枯草菌を用いた sd-MDA での生リード解析結果

Sample Name	16S rRNA sequence	#Raw reads	Mapping to <i>E. coli</i> (%)	Mapping to <i>B. subtilis</i> (%)	Coverage of <i>E. coli</i> genome	Coverage of <i>B. subtilis</i> genome	Percent chimera on <i>E. coli</i> (%)	Percent chimera on <i>B. subtilis</i> (%)
e1	<i>E. coli</i>	1261966	94.32	1.27	63.73	-	7.12	-
e2	<i>E. coli</i>	1162922	98.55	1.17	81.00	-	7.11	-
e3*	<i>E. coli</i>	1144146	92.75	1.23	40.94	-	7.24	-
e4	<i>E. coli</i>	1067261	92.55	0.92	67.60	-	5.95	-
e5	<i>E. coli</i>	1310424	93.59	4.19	80.61	-	6.60	-
e6	<i>E. coli</i>	769260	97.70	1.23	69.76	-	7.66	-
e7*	<i>E. coli</i>	1456037	97.06	1.13	44.38	-	6.89	-
e8*	<i>E. coli</i>	336895	98.90	4.09	49.23	-	7.20	-
eA	<i>E. coli</i>	992218	97.53	1.65	85.53	-	8.85	-
eB	<i>E. coli</i>	1046393	97.03	3.01	78.98	-	9.90	-
eC	<i>E. coli</i>	1038935	98.43	1.03	84.13	-	9.33	-
eD	<i>E. coli</i>	1187796	97.10	3.88	73.39	-	9.22	-
eE	<i>E. coli</i>	961139	99.21	1.18	85.05	-	9.96	-
eF	<i>E. coli</i>	1263083	99.13	2.10	80.45	-	9.88	-
eG	<i>E. coli</i>	1337272	94.74	2.80	75.86	-	9.55	-
eH	<i>E. coli</i>	1164487	95.64	2.10	65.40	-	10.87	-
b1	<i>B. subtilis</i>	1154021	1.84	98.64	-	90.88	-	8.35
b2	<i>B. subtilis</i>	991791	2.03	99.75	-	99.12	-	8.14
b3	<i>B. subtilis</i>	994128	2.62	99.54	-	83.66	-	7.06
b4*	<i>B. subtilis</i>	836875	1.93	99.62	-	41.39	-	8.20
b5	<i>B. subtilis</i>	1176520	1.89	99.78	-	91.69	-	9.16
b6	<i>B. subtilis</i>	1154540	1.99	99.82	-	88.14	-	9.32
b7	<i>B. subtilis</i>	1247368	2.04	99.79	-	88.02	-	9.03
b8	<i>B. subtilis</i>	1224773	1.91	99.73	-	92.06	-	9.43
b9	<i>B. subtilis</i>	1032817	1.80	99.77	-	75.97	-	7.59
b10*	<i>B. subtilis</i>	1081900	0.77	99.79	-	15.53	-	6.49
b11	<i>B. subtilis</i>	1063847	2.15	99.80	-	90.48	-	7.12
b12	<i>B. subtilis</i>	1157936	2.03	99.84	-	80.45	-	8.09
bA	<i>B. subtilis</i>	1061905	1.84	99.78	-	89.96	-	7.03
bB	<i>B. subtilis</i>	1090950	1.49	99.75	-	88.28	-	7.26
bC	<i>B. subtilis</i>	993230	1.96	99.75	-	90.88	-	7.09
bD	<i>B. subtilis</i>	1016159	1.91	99.78	-	88.33	-	7.81
<i>E. coli</i> gDNA	<i>E. coli</i>	2118576	93.75	1.94	99.80	-	0.16	-
In-tube MDA1	<i>E. coli</i>	1196450	63.74	2.10	90.56	-	10.65	-
In-tube MDA2	<i>E. coli</i>	1079884	49.72	1.87	72.61	-	9.57	-
In-tube MDA3	<i>E. coli</i>	1549742	48.42	1.41	73.48	-	11.86	-
cd-MDA1	<i>E. coli</i>	1367906	91.28	0.59	94.84	-	1.98	-
cd-MDA2	<i>E. coli</i>	1438867	91.83	0.54	96.83	-	1.85	-
cd-MDA3	<i>E. coli</i>	1653609	88.71	0.24	97.66	-	1.56	-

Table 3.4 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

程度の低い値を示すことが明らかとなった。sd-MDA における目的外 DNA の割合は大腸菌サンプルで 1.0%、枯草菌サンプルで 0.6%となり、これらの配列の大部分はヒト由来もしくはリファレンスゲノムの存在しない配列から構成されていることが判明した。また、大腸菌サンプルでは配列情報の 3.7%が *E. coli* K-12 株に含まれる f プラスミド由来の配列であった。一方、従来法 (In-tube MDA) で増幅されたサンプル中の目的外 DNA の割合は 47.3%、第 2 章で開発した cd-MDA を用いて増幅されたサンプル中の目的外 DNA の割合は 6.0%と算出された (Fig 3.7B)。cd-MDA では、10  $\mu$ L の反応液中に混入した目的外 DNA についてもドロップレット内で増幅が行われ、反応終了後にまとめて回収されるため、sd-MDA に比べて目的外 DNA の割合が高くなったと考えられる。以上の結果より、sd-MDA では全ゲノム増幅の反応場としてピコリットル容量の微小空間を利用することにより、目的外 DNA の混入を抑制した高精度なゲノム増幅が可能であることが示唆された。特に In-tube MDA においては、得られた配列情報の約半数がリファレンスゲノムにマップされない配列であることが明らかとなった。以上の結果により、リファレンスゲノムが存在しない未知の環境微生物の解析において sd-MDA が有用であることが示唆された。

次に、得られた配列情報を用いてゲノムカバー率の算出を行った。Sequence effort を 60 $\times$ に設定した場合、sd-MDA より得られるゲノムカバー率は大腸菌で 70.4 $\pm$ 14.0%、枯草菌では 80.9 $\pm$ 21.0%となり、従来法でのゲノム増幅によって得られる値とほぼ同等の値を示すことが明らかとなった (Fig. 3.8)。大腸菌に比べ、枯草菌のサンプルにおいてゲノムカバー率が高くなった原因として、枯草菌ゲノムのサイズおよび GC%の低さが要因として考えられる (大腸菌 : GC%: 50.8%, 4.6 Mbp) (枯草菌 : GC%: 43.9%, 4.0Mbp)。また、各 16 個のサンプル中、ゲノムカバー率が著しく低いサンプルが確認され、これらのサンプルでは一部のゲノム情報が優先的に増幅されていることが明らかとなった (Table 3.4, \*印)。単一細胞のゲノム解析においては、細胞周期やアポトーシスなどの細胞の状態によって、ゲノムの増幅効率が大きく影響されることが知られている (Dichosa et al., 2012) (Leung et al., 2015)。sd-MDA では、DPBS 中に懸濁された細胞集団を直接ドロップレット内に封入するため、FACS などの細胞分取技術とは異なり様々な状態の細胞や細胞成分以外の残渣などが同時にドロップレット内に封入される。2 次増幅後に DNA の増幅が確認されなかったサンプルや、PCR 産物の配列解析において特徴的な配列が検出されなかったサンプル、および配列解析において低いゲノ

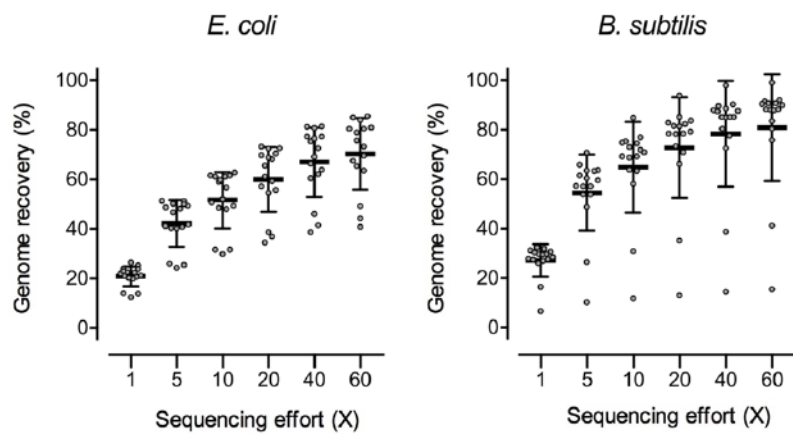


Fig. 3.8 大腸菌および枯草菌を用いた sd-MDA におけるゲノムカバー率の算出

Fig. 3.8 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

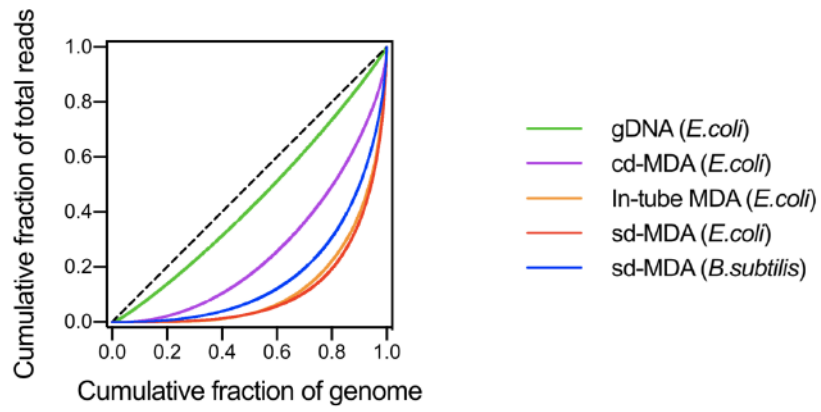


Fig. 3.9 ローレンツ曲線を用いた各全ゲノム増幅手法の増幅バイアスの評価

Fig. 3.9 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). *Sci Rep* 7(1): 5199.

ムカバー率を示したサンプルは、細胞残渣を含んだドロップレットやアルカリ処理において溶菌が不十分であった細胞を含むドロップレット由来の増幅産物である可能性が高いと考えられる。

### **3.3.6 大腸菌および枯草菌由来の増幅産物を用いた増幅バイアスの評価**

全ゲノム増幅時のバイアスを評価するため、sd-MDA、cd-MDA、In-tube MDA によって得られた配列情報を用いてローレンツ曲線の作製を行った (Fig. 3.9)。ローレンツ曲線を用いて増幅バイアスの指標となるジニ係数 (値が 1 に近いほど増幅バイアスが高い) の値を算出した結果、sd-MDA (大腸菌) は  $0.80 \pm 0.064$ 、sd-MDA (枯草菌) は  $0.70 \pm 0.096$ 、cd-MDA (大腸菌) は  $0.49 \pm 0.26$ 、In-tube MDA (大腸菌) は  $0.76 \pm 0.12$  という値を示した。既報論文において、全ゲノム増幅反応をナノリットル容量で実施することにより、増幅バイアスの抑制効果があることが報告されているが (Marcy et al., 2007)、ジニ係数の値の比較により sd-MDA では In-tube MDA と同等の増幅バイアスが生じることが明らかとなった。また、sd-MDA におけるキメラ配列の割合 ( $8.3 \pm 1.5\%$ ) は、In-tube MDA での値 ( $10.7 \pm 0.94\%$ ) に比べやや低い値となった (Table 3.4)。一方で、第 2 章で開発した cd-MDA は、増幅バイアスおよびキメラ配列の生成において In-tube MDA および sd-MDA に比べて高い抑制効果を示すことが明らかとなった。sd-MDA において増幅バイアスが抑制されなかった原因として、ドロップレット内および PCR チューブを用いて合計 2 回の全ゲノム増幅を行っていることが挙げられる。ドロップレット 1 個あたりの DNA 収量は約 100 pg であり、PCR 増幅やライブラリの調製など、複数の反応に増幅産物を使用する場合には、PCR チューブ内での 2 次増幅を行う必要がある。一方で、ドロップレットの融合手法を用いることにより、ドロップレット内でライブラリの調製を行う手法がこれまでに報告されており (Lan et al., 2017)、この技術を応用することによってドロップレット内の増幅産物から直接ライブラリを調製することが可能になると考えられる。

### **3.3.7 大腸菌および枯草菌由来の増幅産物を用いた *de novo assembly* による配列解析 (Contig)**

大腸菌および枯草菌の単一細胞由来のゲノム情報 (SAGs: Single amplified genomes) から得られた生リードの配列を用いて *de novo assembly* を行い、Contig を用いた解析を行った。sd-MDA における大腸菌のゲノムカバー率の平均値は



63%となり、生リードでの解析結果と同様、cd-MDA (90%) よりも低い値となった。しかしながら sd-MDA では、ドロップレット内に単一細胞を封入して超並列的に全ゲノム増幅を行うことにより、一度に多数の全ゲノム増幅産物を獲得することができる。そこで、1個のドロップレットから得られた SAG の情報を統合して *de novo assembly* を行い、再度ゲノムカバー率の算出を行った (Fig. 3.10A) (Clingenpeel et al., 2015)。PCR 産物の配列解析によって大腸菌または枯草菌と特定されたサンプル間でリードを統合して *de novo assembly* を行った結果、どちらの微生物においても 3 個以上の SAGs を統合することによって 90%以上のゲノムカバー率が得られることが明らかとなった (Fig. 3.10B)。また、QUAST および CheckM を用いた解析の結果、sd-MDA における Contamination の値は 0.42%、Fully unaligned contigs の割合は 4.23%となった。この値は、cd-MDA (3.2%、39.8%) および In-tube MDA (28%、72%) にて得られた結果よりも極めて小さい値となった (Fig. 3.11) (Table 3.5)。以上の結果により、sd-MDA で得られた増幅産物では、封入された単一細胞由来のゲノム情報が選択的に増幅されており、目的外 DNA の混入リスクを大幅に低減することが可能であることが示唆された。

### **3.3.8 土壌微生物を用いた単一細胞ゲノム増幅産物の評価**

sd-MDA の環境微生物への応用例として、土壌に含まれる微生物を対象とした全ゲノム増幅を実施した。ドロップレット内での全ゲノム増幅後、蛍光を示したドロップレット 48 個をピックし、2 次増幅を行った。48 個のサンプルの内、37 個 (77%) において十分な DNA 増幅が確認され、大腸菌および枯草菌を用いた検証と同程度の効率で増幅が確認されることが明らかとなった。16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR の結果、11 個のサンプルでは増幅が確認されず、17 個のサンプルでバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子の配列が確認された。また、残りの 9 個のサンプルでは PCR による増幅が確認されたが、配列解析の結果クオリティ値が低く、BLAST での検索においてバクテリア由来の 16S rRNA 遺伝子の配列が確認されなかった。増幅が確認されなかった 11 個のサンプルでは、細胞の溶菌が不十分であったことや増幅バイアスの影響により 16S rRNA 遺伝子が検出されなかった可能性が考えられる。また土壌には、16S rRNA 遺伝子を有する原核生物や古細菌の他にも 18S rRNA 遺伝子を有する真核生物が多く含まれていると考えられるため、今回増幅が見られなかったサンプルではこれらの生物由来の配列情報が含まれている可能性が考えられる。PCR にて増幅の見られた 17 個の

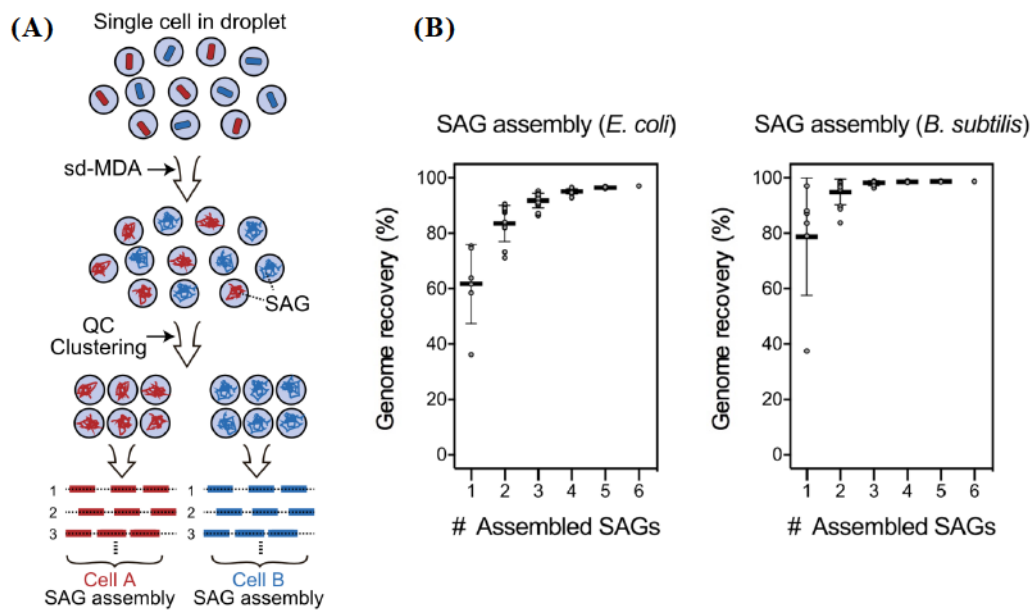


Fig. 3.10 単一細胞由来ゲノム情報の重ね合わせ (SAG assembling)

(A) SAG assembling の概要図

(B) 統合する SAGs の数とゲノムカバー率の関係

Fig. 3.10 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). *Sci Rep* 7(1): 5199.

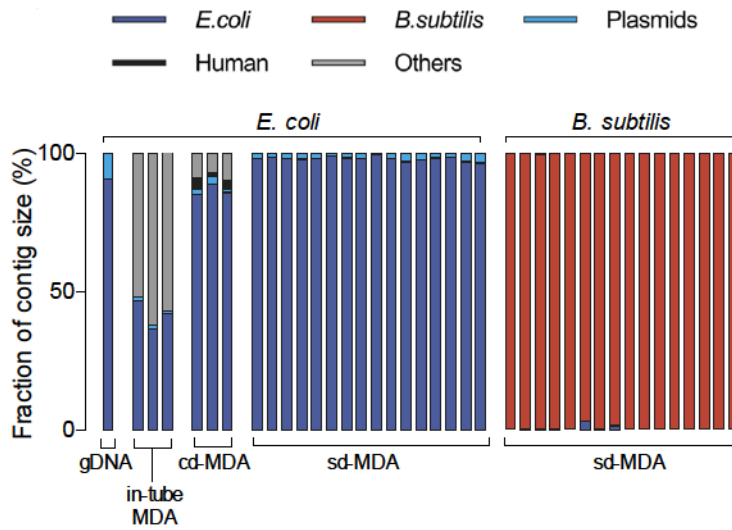


Fig. 3.11 各ゲノム増幅手法によって得られた Contig の BLAST 検索結果

Fig. 3.11 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

Table 3.5 QUAST および CheckM を用いた Contig の評価

	sd-MDA ( <i>E.coli</i> )	cd-MDA	In-tube MDA
# Contig ( $\geq 500$ bp)	835 $\pm$ 127	1194 $\pm$ 160	4082 $\pm$ 280
Total length (kbp)	3064 $\pm$ 580	4903 $\pm$ 81	7584 $\pm$ 441
N50	13000 $\pm$ 1993	13205 $\pm$ 2982	3833 $\pm$ 137
Statistics with reference genome			
Genome recovery (%)	63 $\pm$ 12	90 $\pm$ 1	66 $\pm$ 9
Fully unaligned contig (%)	4.23 $\pm$ 1.29	39.8 $\pm$ 1.95	72.2 $\pm$ 3.05
Contamination (%)	0.42 $\pm$ 0.28	3.2 $\pm$ 0.55	28 $\pm$ 4.4

Table 3.5 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). *Sci Rep* 7(1): 5199.

サンプルについて、次世代シーケンサーを用いて配列を取得し、*de novo assembly* による Contig の作製を行った。また、AMPHORA2 を用いて解析を行い、31 個のバクテリアマーカー遺伝子に基づいて得られたサンプルについて族レベルでの分類を行った。

また、AMPHORA2 を用いて解析を行い、31 個のバクテリアマーカー遺伝子に基づいて得られたサンプルについて族レベルでの分類を行った。解析の結果、17 個全てのサンプルから SAGs (0.4-4.6 Mbp) が獲得された (Table 3.6)。また、17 個中 14 個の SAGs がメタゲノムを用いた菌叢解析において確認された OTU と一致した。得られた SAGs の情報をもとに門レベルでの分類を行った結果、メタゲノム解析における菌叢分布の結果と概ね一致することが明らかとなった (Fig. 3.12)。菌叢解析の結果は、メタゲノム中に含まれる 16S rRNA 遺伝子のコピー数を反映しているのに対し、SAGs の菌叢分布はそれぞれの細胞数を反映している。16S rRNA 遺伝子を用いた菌叢解析の結果と sd-MDA で得られた SAGs の菌叢を比較することにより、本手法を用いて幅広い種類の土壌微生物の単一細胞ゲノムが取得可能であることが示唆された。

次に、CheckM を用いてゲノムの推定補完率 (Completeness) および目的外 DNA の割合 (Contamination) を算出した。CheckM では、これまでに報告されている細菌のゲノム情報に共通して保存されているマーカー遺伝子の配列情報を元に、対象となるサンプルの配列中に含まれる特異的なマーカー遺伝子のセット情報を検出し、その比率によってゲノムの補完率と目的外 DNA の混入量の算出が行われる。計 17 個のサンプルについて CheckM による解析を行った結果、Completeness はおよそ 50-80%、Contamination は <5.2% という値が得られた。また、CheckM を用いて算出された Completeness および Contamination の値を国際基準 Minimum information about a single amplified genome (MISAG) に参照した結果、約 53% (9/17) の SAGs が Medium-quality draft に分類された。従来法を用いて土壌微生物から獲得された SAGs の Completeness は 40-55% であり、また全体の分取数に対する SAGs の獲得効率は <10% であったことから (Rinke et al., 2014)、sd-MDA では土壌微生物を対象としたゲノム解析においても従来法に比べて高効率に高品質なゲノム情報の獲得が可能であることが明らかとなった。一方で、いくつかの SAGs において Completeness の値が低いサンプル (<20%) や Contamination の値が高いサンプル (20-50%) が確認され、これらのサンプルでは異なる族に分類されるマーカー遺伝子が複数確認された。以上の結果は、環境サンプルを用いた単一細胞ゲノム

Table 3.6 土壌サンプルより得られたSAGs

Sample ID	Readcount	# Contig (≥500 bp)	Total contig length (bp)	Largest contig (bp)	NS0	GC%	Phylum (AMPHORA2)	Amphora hitting assigned taxa	CheckM completeness (Phylum)	CheckM contamination (Phylum)	Soil metagenome OTU (Phylum) identified from contigs	Identity (%)
Soil_1_1	1394877	848	4576484	94980	23215	50.25	Bacteroidetes	24 of 24	74.06	1.6	Bacteroidetes (OTU122)	100
Soil_1_2	1359791	567	1898950	39000	11458	39.94	Proteobacteria	28 of 28	81.36	4.2	Proteobacteria (OTU2857)	95
Soil_1_3	829886	475	1966413	81503	17773	48.36	Bacteroidetes	22 of 22	39.02	0.85	Firmicutes (OTU1463)	98
Soil_2_1	904432	268	1395528	49699	12097	40.83	Proteobacteria	24 of 24	68.07	5.12	Proteobacteria (OTU1493)	92
Soil_2_2	794264	250	1060900	60976	11686	44.77	Chlamydiae	17 of 17	62.05	3.79	Chlamydiae (OTU1633)	94
Soil_2_3	691465	482	1197713	33678	8238	55.34	Planctomycetes	3 of 4	20.35	0	-	-
Soil_2_6	1615733	359	562000	37227	3454	35.77	Proteobacteria	3 of 7	16.6	2.94	-	-
Soil_2_7	1771979	494	1337160	20716	5734	35.53	Acidobacteria	1 of 4	6.97	0.36	Candidatus Saccharibacteria (OTU712)	100
Soil_2_11	1710248	1085	3395009	76684	13501	46.99	Proteobacteria	16 of 29	86.55	53.9	Cyanobacteria (OTU4393)	92
Soil_2_12	1126930	148	760861	46732	15617	45.86	Proteobacteria	7 of 27	59.76	2.42	Parcubacteria (OTU2253)	99
Soil_2_13	1879416	1022	2234083	45847	5511	46.29	Proteobacteria	15 of 27	59.31	20.7	Cyanobacteria (OTU4393)	92
Soil_2_14	1266723	419	1937495	54957	13243	39.93	Proteobacteria	6 of 8	58.95	0	Proteobacteria (OTU46)	100
Soil_2_15	1282480	104	695754	60907	28522	34.68	Firmicutes	9 of 27	50.85	2.92	Firmicutes (OTU2828)	74
Soil_2_24	1798897	182	361776	32546	8405	38.82	Proteobacteria	2 of 2	14.5	0.84	-	-
Soil_2_26	1097946	1768	2072888	21604	1275	40.86	Proteobacteria	14 of 26	60.52	32.51	Firmicutes (OTU1195)	91
Soil_2_28	1183943	405	1126304	35624	8108	39.97	Verrucomicrobia	23 of 26	54.79	3.41	Verrucomicrobia (OTU1837)	100
Soil_2_30	1457036	427	1681710	27974	7776	41.36	Chlamydiae	30 of 30	83.82	3.01	Chlamydiae (OTU38)	100

Table 3.6 was referred from the article:  
M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). Sci Rep 7(1): 5199.

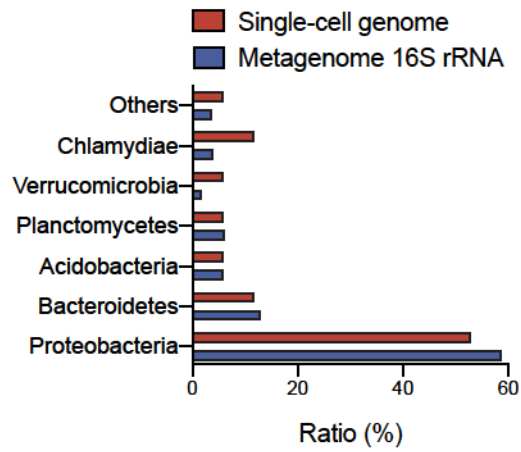


Fig. 3.12 メタゲノムを用いた菌叢解析の結果と sd-MDA より得られた SAGs の比較 (土壌微生物)

Fig. 3.12 was referred from the article:

M. Hosokawa, Y. Nishikawa, M. Kogawa and H. Takeyama (2017). *Sci Rep* 7(1): 5199.

解析が培養株での実験に比べて難易度が高いということを示唆しており、様々な不純物や反応阻害物質が含まれる土壌サンプルでは、細胞の溶菌や DNA の増幅が阻害される可能性が高いことを示唆している。現在の sd-MDA では、細胞の溶菌手法としてアルカリ試薬を用いた処理を行っているが、今後様々な環境サンプルに sd-MDA を適用していく上で、細胞の溶菌効率を高める工夫が必要になると考えられる。一方で、複数の細胞が物理的に結合している状態でドロップレットに封入された場合にも Contamination の値が高くなる可能性が考えられる。sd-MDA を用いて多数の SAGs の情報を獲得することにより、これらの細胞間の相互作用を明らかにすることも可能になると考えられる。



### 3.4 結言

本研究では、2種溶液を混合したドロップレットの作製を可能とするマイクロ流体デバイスと、2種のドロップレットの融合を可能とするマイクロ流体デバイスを作製した。また、界面活性剤の濃度および流路構造を検討することにより、高効率でドロップレットを融合させる条件を検討した。さらに、ドロップレットの融合手法を応用することにより、単一細胞のドロップレット内への封入、細胞溶菌、全ゲノム増幅までの一連の工程を一貫して行う技術を開発した (sd-MDA)。本技術を用いることにより、一度に  $10^5$  個以上の単一細胞に対して、超並列的な全ゲノム増幅が可能となった。また、独立した微小空間内でゲノム増幅を行うことにより、単一細胞由来のゲノム情報をクロスコンタミネーションさせることなく長時間保持させることを可能とした。

モデル微生物を用いた検証では、ピコリットル容量の微小空間で反応を進行させることにより、目的外の DNA の混入が従来法に比べて大幅に抑制されることが明らかとなった。これにより、単一細胞から得られたゲノム情報 (SAGs) を統合して解析する事が可能となり、3 個以上の SAGs を重ね合わせることで高いゲノムカバー率が得られることが示された。一方で、sd-MDA で得られた増幅産物では、従来法と同程度の増幅バイアスが含まれることが明らかとなった。既報論文において、全ゲノム増幅時間および反応液の組成を変えることにより、増幅バイアスの抑制が可能であることが報告されており (Leung et al., 2016)

(Ballantyne et al., 2006)、sd-MDA においてもこれらの条件を最適化することによって、より高精度なゲノム情報が獲得できると考えられる。

環境微生物を用いた検証では、土壌細菌を対象としたゲノム解析を行い、17 個の SAGs を獲得した。また、この内の 53% に相当する 9 個の SAGs において国際基準 MISAG における Medium quality genome に属するドラフトゲノムが取得された。以上の結果により、sd-MDA によって従来法に比べて高精度かつ高効率に単一細胞由来のゲノム情報が獲得できることを実証した。一方で、大腸菌や枯草菌などの培養細胞を用いた検証と比較すると、環境サンプルを用いた場合の全ゲノム増幅効率および PCR 後に増幅が確認されるサンプルの割合は低い値を示した。これらの値は、環境サンプルからの細胞画分の調製方法や細胞溶菌の効率に大きく依存していると考えられ、今後、多様な環境サンプルを対象としたゲノム解析を実施するためには、さらなる検証と手法の改良が必要であると考えられる。

### 3.5 参考文献

- Ballantyne, K. N., R. A. van Oorschot, R. J. Mitchell, and I. Koukoulas. 2006. 'Molecular crowding increases the amplification success of multiple displacement amplification and short tandem repeat genotyping', *Anal Biochem*, 355: 298-303.
- Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin, A. S. Kulikov, V. M. Lesin, S. I. Nikolenko, S. Pham, A. D. Prjibelski, A. V. Pyshkin, A. V. Sirotkin, N. Vyahhi, G. Tesler, M. A. Alekseyev, and P. A. Pevzner. 2012. 'SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing', *J Comput Biol*, 19: 455-77.
- Baret, J. C., O. J. Miller, V. Taly, M. Ryckelynck, A. El-Harrak, L. Frenz, C. Rick, M. L. Samuels, J. B. Hutchison, J. J. Agresti, D. R. Link, D. A. Weitz, and A. D. Griffiths. 2009. 'Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity', *Lab Chip*, 9: 1850-8.
- Blainey, P. C. 2013. 'The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea', *FEMS Microbiol Rev*, 37: 407-27.
- Clingenpeel, S., A. Clum, P. Schwientek, C. Rinke, and T. Woyke. 2014. 'Reconstructing each cell's genome within complex microbial communities-dream or reality?', *Front Microbiol*, 5: 771.
- Dichosa, A. E., M. S. Fitzsimons, C. C. Lo, L. L. Weston, L. G. Preteska, J. P. Snook, X. Zhang, W. Gu, K. McMurry, L. D. Green, P. S. Chain, J. C. Detter, and C. S. Han. 2012. 'Artificial polyploidy improves bacterial single cell genome recovery', *PLoS One*, 7: e37387.
- Fierer, N., and R. B. Jackson. 2006. 'The diversity and biogeography of soil bacterial communities', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 626-31.
- Gurevich, A., V. Saveliev, N. Vyahhi, and G. Tesler. 2013. 'QUAST: quality assessment tool for genome assemblies', *Bioinformatics*, 29: 1072-5.
- Hosokawa, M., Y. Nishikawa, M. Kogawa, and H. Takeyama. 2017. 'Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics', *Sci Rep*, 7: 5199.
- Lan, F., B. Demaree, N. Ahmed, and A. R. Abate. 2017. 'Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding', *Nat Biotechnol*, 35: 640-46.

- Leung, K., A. Klaus, B. K. Lin, E. Laks, J. Biele, D. Lai, A. Bashashati, Y. F. Huang, R. Aniba, M. Moksa, A. Steif, A. M. Mes-Masson, M. Hirst, S. P. Shah, S. Aparicio, and C. L. Hansen. 2016. 'Robust high-performance nanoliter-volume single-cell multiple displacement amplification on planar substrates', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: 8484-9.
- Leung, M. L., Y. Wang, J. Waters, and N. E. Navin. 2015. 'SNES: single nucleus exome sequencing', *Genome Biol*, 16: 55.
- Marcy, Y., T. Ishoey, R. S. Lasken, T. B. Stockwell, B. P. Walenz, A. L. Halpern, K. Y. Beeson, S. M. Goldberg, and S. R. Quake. 2007. 'Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells', *PLoS Genet*, 3: 1702-8.
- Mazutis, L., J. C. Baret, and A. D. Griffiths. 2009. 'A fast and efficient microfluidic system for highly selective one-to-one droplet fusion', *Lab Chip*, 9: 2665-72.
- Mazutis, L., J. Gilbert, W. L. Ung, D. A. Weitz, A. D. Griffiths, and J. A. Heyman. 2013. 'Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics', *Nat Protoc*, 8: 870-91.
- McLean, J. S., M. J. Lombardo, J. H. Badger, A. Edlund, M. Novotny, J. Yee-Greenbaum, N. Vyahhi, A. P. Hall, Y. Yang, C. L. Dupont, M. G. Ziegler, H. Chitsaz, A. E. Allen, S. Yooseph, G. Tesler, P. A. Pevzner, R. M. Friedman, K. H. Neilson, J. C. Venter, and R. S. Lasken. 2013. 'Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: E2390-9.
- Miller, D. N., J. E. Bryant, E. L. Madsen, and W. C. Ghiorse. 1999. 'Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples', *Appl Environ Microbiol*, 65: 4715-24.
- Nishikawa, Y., M. Hosokawa, T. Maruyama, K. Yamagishi, T. Mori, and H. Takeyama. 2015. 'Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification', *PLoS One*, 10: e0138733.
- Parks, D. H., M. Imelfort, C. T. Skennerton, P. Hugenholtz, and G. W. Tyson. 2015. 'CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes', *Genome Res*, 25: 1043-55.

- Rinke, C., J. Lee, N. Nath, D. Goudeau, B. Thompson, N. Poulton, E. Dmitrieff, R. Malmstrom, R. Stepanauskas, and T. Woyke. 2014. 'Obtaining genomes from uncultivated environmental microorganisms using FACS-based single-cell genomics', *Nat Protoc*, 9: 1038-48.
- Rinke, C., P. Schwientek, A. Sczyrba, N. N. Ivanova, I. J. Anderson, J. F. Cheng, A. Darling, S. Malfatti, B. K. Swan, E. A. Gies, J. A. Dodsworth, B. P. Hedlund, G. Tsiamis, S. M. Sievert, W. T. Liu, J. A. Eisen, S. J. Hallam, N. C. Kyrpides, R. Stepanauskas, E. M. Rubin, P. Hugenholtz, and T. Woyke. 2013. 'Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter', *Nature*, 499: 431-7.
- Schaerli, Y., and F. Hollfelder. 2009. 'The potential of microfluidic water-in-oil droplets in experimental biology', *Mol Biosyst*, 5: 1392-404.
- Wang, Q., G. M. Garrity, J. M. Tiedje, and J. R. Cole. 2007. 'Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy', *Appl Environ Microbiol*, 73: 5261-7.
- Zhang, K., A. C. Martiny, N. B. Reppas, K. W. Barry, J. Malek, S. W. Chisholm, and G. M. Church. 2006. 'Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning', *Nat Biotechnol*, 24: 680-6.
- Zong, C., S. Lu, A. R. Chapman, and X. S. Xie. 2012. 'Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell', *Science*, 338: 1622-6.

## 第 4 章 結論

本論文では、ピコリットル容量の微小液滴（ドロップレット）を連続生成する技術を応用し、環境微生物の単一細胞ゲノム解析に向けた全ゲノム増幅法の開発を行った。

第 2 章では、Compartmented droplet MDA (cd-MDA) の開発を行った。本手法ではあらかじめ分取された単一細胞から DNA を抽出し、全ゲノム増幅のための反応液を調製する。その後、調製した反応液を用いてドロップレットを作製し、単一細胞由来の DNA 断片を個別の微小空間に封入する。ドロップレット内で全ゲノム増幅を進行させることによって DNA 断片が個別に増幅される結果、DNA 断片間でのキメラ配列の生成が抑制される。また、それぞれの断片が増幅される空間をピコリットル容量のドロップレット内に制限することにより、一部の DNA のみが過剰に増幅されることを抑制し、増幅バイアスを低減することが可能となる。モデル微生物として大腸菌を使用した検証では、増幅産物の DNA 量を定量することにより、目的外の DNA に由来する増幅産物の量を約 1,400 分の 1 に抑制することができることが明らかとなった。次に、次世代シーケンサーを用いた配列解析を行った結果、増幅バイアスの抑制効果により、cd-MDA では従来までのマイクロリットル容量の反応容積を用いた全ゲノム増幅に比べて約 40%量のデータでゲノム全体の約 90%の領域の情報が獲得されることが明らかとなった。また、目的外の DNA の増幅およびキメラ配列の生成を抑制することにより、エラー率の低い高品質な配列情報が獲得されることが明らかとなった。以上の要因により cd-MDA は、解析の対象となる細胞が希少で、少ないサンプル数から高精度なゲノム情報を獲得する必要がある場合に非常に有用な手法であると考えられる。一方で、cd-MDA では単一細胞をあらかじめ分取する必要があるため、大量の細胞を対象とした解析には適用が困難である。

第 3 章では、Single droplet MDA (sd-MDA) の開発を行った。本手法では、ドロップレットに単一細胞を封入し、ドロップレット内部で全ゲノム増幅の反応を進行させる。本技術の確立に向け、2 種類の溶液を混合したドロップレットの作製を可能とするマイクロ流体デバイス、および 2 種類のドロップレットの融合を可能とするマイクロ流体デバイスを作製し、流速条件の最適化を行った。これにより、単一細胞の封入から細胞の溶菌、全ゲノム増幅までの工程を一貫して行うことが可能となり、4 時間の反応で 84,000 個の単一細胞を対象として網羅的な全ゲ

ノム増幅が可能となった。モデル微生物として大腸菌および枯草菌を用いて全ゲノム増幅を行い、ドロップレット 1 個から得られた DNA の増幅産物を用いて配列解析を行った結果、微小空間内で全ゲノム増幅を行うことによって、目的外の DNA の混入率が大幅に抑制されることが明らかとなった。また、ゲノムカバー率および増幅バイアスは従来法と同程度であったものの、個々の高品質なゲノム情報を重ね合わせることによって 90%以上のゲノムカバー率が得られることが明らかとなった。次に、環境サンプルとして土壤に含まれる微生物を対象として全ゲノム増幅を行い、17 個の単一細胞由来のゲノム情報を獲得した。これにより、sd-MDA によって従来法よりも高精度なゲノム情報を高効率に獲得することが可能であることが示唆された。以上の要因により sd-MDA は、多種多様な微生物が存在する環境サンプルを対象として網羅的な単一細胞ゲノム解析を実施する場合に非常に有用な手法であると考えられる。一方で、sd-MDA では Water in Oil のドロップレット内で全ての反応を完結させるため、ドロップレット内で実施できる溶菌処理方法に制限があり、環境サンプルの一部において溶菌作用が不十分であることを示唆する結果が得られた。また、本研究では増幅が確認されたドロップレットを顕微鏡下で分取する工程が必要であり、sd-MDA のハイスループット性を十分に活用することができなかつた。今後は、これまでに報告されているドロップレットの操作技術を応用することによって、ドロップレット内で複数種類の溶菌の実施を可能とする技術や、ドロップレット 1 個からのライブラリ調製を可能とする技術を開発することによって、sd-MDA の応用性はさらに拡大すると考えられる。これらの特性を用いることによって、sd-MDA は多様な環境微生物のゲノム情報を網羅的に取得するための技術として有用であると考えられる。

以上のように、本研究では cd-MDA おとび sd-MDA と呼ばれる全ゲノム増幅手法を開発し、単一細胞のゲノム解析におけるドロップレットの有用性を実証した。それぞれの手法についてさらなる改良を行うべき点が残されているものの、それぞれの手法を用いて得られる増幅産物は、従来法を用いて得られる増幅産物よりも配列情報の精度が高いことが証明された。今後は、様々な環境サンプルを対象として解析を行うことによって、宿主共在微生物や環境中での存在比が非常に少ない微生物など、これまでゲノム情報が獲得されていなかった未知の微生物に対して解析が進展することが期待される。また、本研究で開発したゲノム解析技術と、メタゲノムを用いたショットガンシーケンス法や近年開発が進んでいるロングリードのシーケンシング技術を組み合わせることによって、環境微生物を対象

とした網羅的かつ高精度な単一細胞ゲノム解析が可能になると考えられる。さらに、単一細胞由来の高精度なゲノム情報が取得できるようになることで、より複合的な解析が可能になると考えられる。例えば、単一細胞由来のゲノム情報とメタゲノムの配列情報、メタトランスクリプトーム情報などを合わせて解析することによって、環境中の微生物の機能を総合的に理解する取り組み（Single cell metagenomics）が2018年に Xu らによって提唱されている（Xu et al., 2018）。また、単一細胞のゲノム情報をもとに、これまで培養が困難であるとされてきた難培養性微生物の培養法を検討する（Kwak et al., 2018）など、微生物の可培養化に向けた新しいアプローチ手法としてもゲノム情報は有用であると考えられる。本研究によって開発された全ゲノム増幅技術を用いて高精度な単一細胞ゲノム情報が蓄積されることにより、今後様々な新しい知見が獲得されることを期待する。

#### 4.1 参考文献

- Kwak, M. J., H. G. Kong, K. Choi, S. K. Kwon, J. Y. Song, J. Lee, P. A. Lee, S. Y. Choi, M. Seo, H. J. Lee, E. J. Jung, H. Park, N. Roy, H. Kim, M. M. Lee, E. M. Rubin, S. W. Lee, and J. F. Kim. 2018. 'Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato', *Nat Biotechnol*.
- Xu, Y., and F. Zhao. 2018. 'Single-cell metagenomics: challenges and applications', *Protein Cell*, 9: 501-10.



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご高配を賜りました、早稲田大学 理工学術院 竹山春子教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、副査をつとめてくださいました早稲田大学 理工学術院 武岡真司教授、常田聡教授に深く感謝いたします。

また、これまでの研究活動に際し、多くのご協力ならびにご助言をいただきました早稲田大学 理工学術院総合研究所 次席研究員（研究院講師） 細川正人博士に深く感謝いたします。

また、本研究にご協力いただきました、  
早稲田大学ナノ・ライフ創新研究機構の坂梨千佳子さん  
早稲田大学竹山研究室 小川雅人くん、高橋海くん  
に深く感謝の意を表します。

最後に、これまでに支えてくれた全ての方々、友人、家族に心より感謝いたします。

本研究は、JST-CREST「シングルセルゲノム情報に基づいた海洋難培養微生物メタオミックス解析による環境リスク数理モデルの構築」と日本学術振興会・特別研究員奨励費の支援を受けて行われました。

平成 31 年 2 月

西川 洋平

## 早稲田大学 博士(工学) 学位申請 研究業績書

氏名 西川 洋平



(2019年 2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者(申請者含む)
【論文】	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes, <i>Sci. Rep.</i>, 8:2059, Feb. 2018, Kogawa M., Hosokawa M., <u>Nishikawa Y.</u>, Mori K., Takeyama H.</li> <li>2. ○Massively parallel whole genome amplification for single-cell sequencing using droplet microfluidics, <i>Sci. Rep.</i>, 7:5199, July 2017, Hosokawa M*, <u>Nishikawa Y.*</u>, Kogawa M., Takeyama H. (*: Equally contributed)</li> <li>3. ○Monodisperse Picoliter Droplets for Low-Bias and Contamination-Free Reactions in Single-Cell Whole Genome Amplification. <i>PLoS One.</i>,10(9):e0138733, Sep. 2015, <u>Nishikawa Y.</u>, Hosokawa M., Maruyama T., Yamagishi K., Mori T., Takeyama H.</li> <li>4. Droplet-based microfluidics for high-throughput screening of a metagenomic library for isolation of microbial enzymes. <i>Biosens. Bioelectron.</i>, 67/379-385, May 2015, Hosokawa M., Hoshino Y., <u>Nishikawa Y.</u>, Hirose T., Yoon DH., Mori T., Sekiguchi T., Shoji S., Takeyama H.</li> </ol>
【講演】	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yohei Nishikawa, Microfluidic droplet-based whole genome amplification toward bacteria single-cell genomics, ADVANCED TECHNIQUES TO STUDY AND EXPLOIT THE SPONGE AND CORAL MICROBIOMES WORKSHOP, 2018年, Oral</li> <li>2. 西川洋平、サンゴ共生微生物の単一細胞ゲノム解析に向けた微小液滴作成技術の応用、第20回マリンバイオテクノロジー学会、2018年、宮崎、口頭</li> <li>3. 西川洋平、Droplet microfluidics toward accurate genome sequencing of environmental bacteria at the single-cell level、日本化学会第98春季年会2018、2018年、千葉、口頭</li> <li>4. Yohei Nishikawa, Droplet microfluidics for massively parallel and accurate whole genome amplification of single-cells, International Symposium for Nano-Biotechnology, Chemical &amp; Medical Biology and Robotics, 2018年, Bonn, Germany, poster</li> <li>5. 西川洋平、微小液滴を用いた単一細胞からの超並列ゲノム解析技術の開発、第69回日本生物工学会大会、2017年、東京、ポスター</li> <li>6. 西川洋平、マイクロドロップレットを用いた高精度な超並列1細胞ゲノム解析技術の開発、第11回バイオ関連化学シンポジウム、2017年、東京、ポスター</li> <li>7. 西川洋平、マイクロ流体デバイスによる高精度な超並列1細胞ゲノム増幅技術の開発、NGS現場の会第5回研究会、2017年、仙台、ポスター</li> <li>8. Yohei Nishikawa, DROPLET MICROFLUIDICS FOR MASSIVELY PARALLEL AND ACCURATE GENOME AMPLIFICATION OF SINGLE CELLS, International Conference on single cell Research 2016, 2016, Tokyo, Poster</li> <li>9. 西川洋平、単一微生物からの高精度な全ゲノム解析に向けたマイクロ流体デバイスの活用、日本生物工学会東日本支部第11回学生発表討論会、2016年、東京、口頭</li> <li>10. 西川洋平、ピコリットル容量の微小液滴を用いた単一微生物からの網羅的な全ゲノム増幅、第68回日本生物工学会大会、2016年、富山、ポスター</li> <li>11. Yohei Nishikawa, Picoliter-sized droplets for low-bias and contamination-free reactions in whole genome amplification of single bacterial cells, Biosensors2016, 2016, Gothenburg Sweden, Poster</li> <li>12. 西川洋平、微小液滴を用いた単一微生物からの低バイアス全ゲノム増幅法の開発、第10回日本ゲノム微生物学会年会、2016年、東京、ポスター</li> <li>13. 西川洋平、マイクロドロップレットによる単一微生物からの効率的な全ゲノム増幅法の開発、第4回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2016年、東京、口頭</li> <li>14. Yohei Nishikawa, Picoliter-sized droplets for low bias whole genome amplification of single</li> </ol>

	<p>cell genome, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015), 2015, Hawaii, America, Poster</p> <p>15. 西川洋平、マイクロ流体デバイスを用いた単一細胞解析に向けた Multiple displacement amplification (MDA)法の開発、第3回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2015年、東京、ポスター</p> <p>16. 西川洋平、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年、千葉、口頭</p> <p>17. 西川洋平、単一細胞レベルでの微生物ゲノム解析に向けた、Droplet-based multiple displacement amplification 法の開発、第17回マリンバイオテクノロジー学会、2015年、東京、ポスター</p> <p>18. Yohei Nishikawa, Droplet-based multiple displacement amplification method for single-cell genomics using microfluidic device, 10th International Symposium on Electrochemical Micro &amp; Nanosystem Technologies (EMNT 2014), 2014, Okinawa/Japan, Poster</p> <p>19. 西川洋平、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年、東京、ポスター</p> <p>20. 西川洋平、単一細胞封入ドロップレットを用いた微生物の薬剤感受性評価、2014年電気化学学会第81回大会、2014年、大阪、口頭</p> <p>21. 西川洋平、マイクロドロップレットを用いた微生物の薬剤感受性評価、第2回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2014年、東京、ポスター</p>
【著書】	<p>1. 細川正人、丸山徹、<u>西川洋平</u>、竹山春子、微生物のシングルセルゲノム解析、実験医学別冊シングルセル解析プロトコルわかる！使える！1細胞特有の実験のコツから最新の応用まで、羊土社、248-258、2017年</p> <p>2. 細川正人、丸山徹、<u>西川洋平</u>、竹山春子、環境微生物のシングルセルゲノム解析に向けた技術基盤、月刊バイオインダストリー、シーエムシー出版、34(6): 16-23、2017年</p> <p>3. 細川正人、<u>西川洋平</u>、竹山春子、難培養微生物を対象としたシングルセルゲノミクスの課題と展望、生体の科学、医学書院、68(2): 150-154、2017年</p> <p>4. 細川正人、<u>西川洋平</u>、竹山春子、ドロップレット・マイクロフルイディクスによる超並列シングルセル解析、化学センサ研究会、182: 159-165、2016年</p>
【その他 (受賞)】	<p>1. 優秀口頭発表賞、第20回マリンバイオテクノロジー学会大会、2018年、宮崎</p> <p>2. 学生講演賞、日本化学会第98春季年会、2018年、千葉</p> <p>3. 第5回生物工学学生優秀賞(飛翔賞)、第68回日本生物工学会大会、2016年、富山</p> <p>4. ポスター賞、第3回日本生物工学会東日本支部コロキウム、2015年、東京</p> <p>5. Best student poster award, 10th International Symposium on Electrochemical Micro &amp; Nanosystem Technologies (EMNT 2014), 2014, Okinawa/Japan</p> <p>6. ポスター発表賞、第4回CSJ化学フェスタ2014、2014年、東京</p>