

# 研究報告書

## 「トランスクリプトームとメチロームの統合1細胞解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 三浦 史仁

### 1. 研究のねらい

シングルセルを対象とした全ゲノムバイサルファイトシーケンシング (WGBS) によるメチローム解析は 2014 年に実現されたものの、そのゲノム網羅性とリードのマッピング効率は1～2割程度と貧弱であった。現時点では、シングルセルメチローム解析をはじめとする微量サンプルに対する WGBS の適用には Post-bisulfite adaptor tagging (PBAT) 戦略が必要不可欠である。PBAT はバイサルファイト (BS) 処理による DNA の切断に起因するライブラリー構造の喪失を回避することでより多くの BS 処理 DNA (BS-DNA) をライブラリーへと変換することを目的に開発され、上記シングルセルメチローム解析でも利用されている。しかし、従来の PBAT 法のプロトコールは、1本鎖 DNA である BS-DNA へのアダプター配列の連結を2回のランダムプライミング反応で行っていた。このことが原理的に①インサート長の短縮、②GC コンテンツ依存的なゲノム領域毎のサンプリングバイアス、③反応副産物の生成、の原因となり、特に微量サンプルを対象とした解析ではゲノム網羅性とリードのマッピング効率を低下させる原因となっていた。そこで本研究ではランダムプライミングに起因するこれらの問題を根本的に解決するため、実用的に高効率な1本鎖 DNA へのアダプター連結技術を開発することを主な目的とした。つまり、高効率な1本鎖 DNA ライゲーション技術を基にした WGBS のライブラリー調製プロトコールを確立したうえで、単一の細胞から RNA と DNA の双方を分離回収しトランスクリプトームとメチロームの同時取得を目指すことにした。

### 2. 研究成果

#### (1)概要

T4 DNA リガーゼを利用することが可能な2本鎖 DNA 同士の連結反応とは異なり、1本鎖 DNA 同士の連結は単独で実用的に十分な効率を示す酵素が見いだされていない。そこで本研究では2つの新しい1本鎖 DNA ライゲーションのための反応原理を考案し、それぞれの実現を試みた。

1つ目の反応は 3'アジド化リボヌクレオチドアナログのターミナルデオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) による取り込みと、このアジド化標識 DNA に対する 5'エチニルアダプターのカップリング反応を組み合わせたもので、TCS ライゲーションと命名した。モデル DNA を用いた検討では TCS ライゲーションは 30%程度の連結効率を示したものの、生体由来の長鎖 DNA への適用では触媒となる銅イオンによる DNA 切断が起こり、最終的なライブラリー収量の低下が起こることが判明し、実用性に乏しいことが判明した。

2つ目の反応は TdT によるリボヌクレオチドの標的 DNA への取り込みによる 3'末端の RNA 化と RNA リガーゼによる 5'リン酸化アダプターの連結反応を用いたもので TACS ライゲーション

ンと命名した。最適化の結果、モデル DNA を用いた場合の TACS ライゲーションの収率は 90% 程度と非常に高かった。そこで、BS-DNA へのアダプター連結に TACS ライゲーションの適用を試みた。しかし、BS-DNA の 3' 末端は TACS ライゲーションどころか TdT による反応そのものを受け付けことが判明し、BS-DNA の 3' 末端の改質技術を開発する必要があることが明らかとなった。この技術の開発には時間がかかることが予想されたので、TACS ライゲーションとランダムプライミングを組み合わせた改良型 PBAT の開発を並行して行った。

従来の PBAT 法のプロトコール(rPBAT)では 2 回のランダムプライミング反応でアダプター配列を BS-DNA へ連結する。ランダムプライミングには原理的弱点があり、ランダムプライミングを繰り返して行う rPBAT 法はその弱点を強く体現していた。そこで rPBAT 法の 2 回のランダムプライミング反応のうち 1 つを TACS ライゲーションで置換することでランダムプライミングの弱点を低減することを試みた。BS-DNA を鋳型としてランダムプライミングを行った伸長反応産物に対して TACS ライゲーションでアダプターを連結するプロトコール(tPBAT)を確立した結果、得られたライブラリーはインサートの伸長と反応副産物の低減によるリードのマッピング率向上の 2 つの改善が確認された。これらの改善は WGBS のコスト低減とシーケンサーの出力向上に効果があった。

## (2) 詳細

### 成果1 TCS ライゲーションの考案・実現とライブラリー調製への応用

これまで 1 本鎖 DNA 同士の連結を単独の酵素を用いて高効率に実現する反応は見いだされていない。そこで酵素反応と化学反応を組み合わせた新しい手法(TCS ライゲーション)を考案した。クリック反応は温和な条件下、銅を触媒としてアジド基とエチニル基をもつ化合物同士を連結することが出来る。そこで、クリック反応を用いてアダプターを連結した 1 本鎖 DNA を次世代シーケンサーのためのライブラリーとして利用することを考えた。3' 末端がアジド化されたヌクレオチドアナログの 3'リン酸体が市場で入手可能であったことから、TdT を用いて標的 DNA の 3' 末端にこのアジド化アナログを取り込ませ、得られた 3' アジド化 DNA に対して 5' エチニルオリゴヌクレオチド(磯部寛之教授、藤野智子助教(東北大学・当時)の協力により合成)の連結を試みた。その結果、カップリング反応は最大 30% の効率で進行することが判明した。次に TCS ライゲーションを次世代シーケンサーのライブラリー調製へ応用することを試みた。しかし、実サンプル由来の長鎖 DNA では銅触媒による分解の影響が大きかった。つまり、TCS ライゲーションは短い 1 本鎖 DNA からのライブラリー調製のみに応用可能であることが明らかとなった。このような制約があるものの TCS ライゲーションは化学反応と酵素反応を組み合わせた Chemo-Enzymatic なライブラリー調製法の基本反応としてユニークである点が評価され、Nucleic Acids Research 誌に論文が採択された(Miura F., et al. (2018), Nucleic Acids Research, **46**, e95)。

### 成果2 TACS ライゲーション法の考案・実現

上記 TCS ライゲーション法に加えて酵素反応のみに依存した新しい 1 本鎖 DNA ライゲーション反応を考案した。TdT はデオキシリボヌクレオチド 3'リン酸を基質とした場合、標的 1 本鎖 DNA の 3' 末端に際限なく塩基を連結する反応を触媒する。このように付加されたホモポリマ

一は配列決定の障害になる。一方でリボヌクレオチド3リン酸を基質とした場合、TdTによる付加反応は数塩基の伸長で自律的に停止することが知られていた。この反応(リボテイリング)の信頼性は非常に高く、ほぼ100%の標的DNAが3'末端にリボヌクレオチドが付加されることが知られていた。ここで得られる反応産物の3'末端は短いながらも紛れもないRNAであるため、RNAリガーゼの格好の標的となり、5'末端がリン酸化されたアダプター配列を高効率に連結することが可能になるのではないかと考えられた。そこで、この手法をTACSライゲーションと命名し、その実現を試みた。市販のいくつかのRNAリガーゼを用いた検討の結果、リボテイリングは入手可能な全てのRNAリガーゼに対して1本鎖DNA同士のライゲーション反応を増強する効果があることが判明した。TACSライゲーションは最適条件下では80%以上の高効率で安定に1本鎖DNA同士のライゲーションを実現できた。

#### 成果3 Taq DNA ポリメラーゼの短鎖 RNA の逆転写活性の発見

TACSライゲーションの反応産物は内部にRNAを含む。つまりTACSライゲーション産物の相補鎖合成には逆転写活性が要求される。しかし、一般に逆転写酵素は耐熱性が低く、最高でも55℃程度までしか活性を維持することが出来ない。この温度ではアダプターに対するプライマーのアニーリングの厳密性を維持することが困難であると考えられた。そこで、耐熱性DNAポリメラーゼを対象に数塩基のRNAに対する相補鎖合成活性を持つ酵素をスクリーニングした。その結果、Taq DNAポリメラーゼとこの酵素から派生した変異体群にはその活性があることが判明した。この発見によって、TACSライゲーションの反応産物を次世代シーケンサーのライブラリーへ変換するための現実的な操作手順が確立できた。

#### 成果4 tPBAT 法の実現によるインサート長とリードのマッピング率の改善

検討の結果、BS-DNAの3'末端に直接TACSライゲーションでアダプターを連結することは困難であった。そこで次善の策として従来のPBAT法(rPBAT法)で採用されている2回のランダムプライミング反応のうちの1つをTACSライゲーションで置換することを試みた。BS-DNAを鋳型にしたランダムプライミング反応で伸長・合成された産物の3'末端に対してTACSライゲーションでアダプターを付加するプロトコル(tPBAT法)を確立した結果、rPBAT法では150塩基程度だったインサート長が、tPBAT法では250塩基程度にまで改善されていた。また、rPBAT法では開始DNA量が1ng以下になるとリードのマッピング率が開始DNA量に応じて低下する現象が確認されていたが、tPBAT法ではこういった現象が軽減されていることが明らかとなった。

tPBAT実現によるインサート長の伸長はPBATによるメチローム解析の実用性を高める効果をもたらした。WGBSではゲノムの全域を重厚に配列決定する必要がある、そのためには高出力かつ低コストな最新のシーケンサーを用いる必要がある。これらのシーケンサーでは150×2のペアエンドシーケンシングが標準であり、このスペックを有効利用するためには300塩基以上のインサートを持つライブラリーが必要であった。tPBATではインサート長が250塩基に改善されたため、これらシーケンサーの配列決定能力をより有効活用出来るようになった。この結果、従来1サンプル当たり70万円~100万円の配列決定コストを要していたrPBATによるメチローム解析がtPBATでは15万円以下のコストで実現可能となり、微量サン

プルを対象とした多サンプル間の比較メチローム解析のコストが実用レベルに到達した。この成果を受けて、現在臨床サンプルも含めた様々な多サンプル間比較メチローム解析が tPBAT を用いて実施されるに至っている。なお、TACS ライゲーションの開発から tPBAT の確立に至るまでの研究成果は現在論文投稿中(リバイス中)である。

### 3. 今後の展開

高効率な1本鎖 DNA ライゲーション技術である TACS ライゲーション法が確立できたことにより、従来法より格段に収量とインサート長が改善された WGBS のライブラリー調製プロトコルが実現出来た。この tPBAT 法の実現により新型シーケンサーのスペックをより有効利用できるようになり、同時に配列決定コストの大幅な圧縮が実現された。その結果、従来法では困難だった微量サンプルを対象とした多サンプル間の比較メチローム解析が低コストで実現可能になった。現に、tPBAT を用いたメチローム解析は既に十数例同時並行で進行しており、メチローム解析における tPBAT 法に対する期待が高まっていることがわかる。

本研究では TACS ライゲーションを WGBS のライブラリー調製技術の改良に利用した。しかし、TACS ライゲーションは基本的なライゲーション反応として様々な応用が想定される。特に1本鎖 DNA が大量に含まれてことが想像される ChIP-Seq や DNase-Seq などのエピゲノム解析、短鎖の血中セルフリーDNA、化石由来 DNA の配列決定など、従来の2本鎖 DNA を対象としたライゲーション技術ではライブラリー調製が困難だったサンプルに対する基本反応として TACS ライゲーションが採用されていくことが期待される。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

本研究の最終目標はより網羅的なシングルセルメチローム解析技術を確立し、その技術に立脚して同一細胞からメチロームとトランスクリプトームの双方のデータを取得するというものだった。しかし、本研究が始まった直後の2015年に貧弱なデータながらもメチロームとトランスクリプトームの同時取得の報告があり、この分野におけるフラッグシップ争いは決着がついた。そこで、私自身はメチロームとトランスクリプトームの同時取得に対するこだわりを捨て、本研究において最も重要な技術開発である TACS ライゲーションの確立に集中することにした。その結果、これまでの分子生物学の実験技術の中は実現が困難だった高効率な1本鎖 DNA 同士のライゲーション技術が確立できたことは、研究コミュニティに対してユニークかつ相当程度のインパクトを与えることが出来たものと考えている。また、ランダムプライミングの負の影響を低減した tPBAT 法を確立することにより、従来よりも低コストかつ高品質なメチロームデータの取得が実現できた事実はエピゲノム研究のコミュニティに徐々に受け入れられつつあり、本さがけ研究の最終年度になって多くの共同研究開始につながっている。PBAT のランダムプライミング非依存化については道半ばであるが、そのための技術開発も進んでおり、近い将来実現できるものと考えられる。以上から、本研究課題は当初の目標は失ったものの、その実現と同等あるいはそれ以上の成果を残して期間を全うできたものと考えられる。



- (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

これまでの DNA 中のシトシンのメチル化状態をゲノム網羅的に決定する技術である全ゲノムバイサルファイトシーケンシング(WGBS)では、バイサルファイト処理によって1本鎖した DNA の両端にアダプター配列を効率よく連結する技術がなく、次世代シーケンサー用のライブラリー生成効率が低く、インサート長も短いことが問題でした。本さがけ研究では1本鎖 DNA 同士を連結する2つの方法、TCS ライゲーション法と TACS ライゲーション法の開発に成功しました。特に後者の反応効率と実用性は優れており、本法を用いた tPBAT は従来のランダムプライマーを用いる rPBAT 法と比べて収量とインサート長が格段に改善されたシーケンサー用ライブラリーを調製できることを実証しました。実際に tPBAT 法で解析を行い、WGBS の解析効率がどこまで向上したのか、およびそれによる色々なサンプルでの single cell メチローム解析の結果を楽しみにしています。

tPBAT 技術によって WGBS が更に普及し、エピゲノム研究が大きく進展することを期待します。また、これらのライゲーション技術の様々な応用法を考案・発展させ、多くの研究者が使える技術として広がる努力を重ねて欲しいと考えます。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Fumihito Miura, Tomoko Fujino, Kanako Kogashi, Yukiko Shibata, Miki Miura, Hiroyuki Isobe, Takashi Ito; Triazole linking for preparation of a next-generation sequencing library from single-stranded DNA, Nucleic Acids Research, 2018, Volume 46, e95

### (2) 特許出願

なし

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 三浦史仁、伊藤隆司、新しい1本鎖 DNA の連結反応を用いた PBAT 法、第10回日本エピジェネティクス研究会年会(日本、大阪)
2. Fumihito Miura, Takashi Ito, An efficient method for NGS library preparation from single-stranded DNA, IHEC Annual Meeting 2015 (Belgium, Brussels)
3. Fumihito Miura Methyloome analysis based on enhanced single strand DNA ligation, France Japan Epigenetics Workshop 2017
4. 三浦史仁、柴田由希子、三月田祐平、三浦美希、伊藤隆司、改良型 PBAT 法による高品質で低コストなメチロームシーケンシング、第11回日本エピジェネティクス研究会年会(日本、札幌)
5. 三浦史仁、柴田由希子、三浦美希、三月田祐平、久野修、荒木啓充、伊藤隆司、1本鎖 DNA ライゲーション技術に基づく PBAT と両鎖混合ライブラリー法による高品質で低コストなメチローム解析、第41回日本分子生物学会年会(横浜、2018年11月30日)