

研 究 報 告 書

「生体システム理解・医科学応用を実現する1細胞核酸計測技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研 究 者: 城口 克之

1. 研究のねらい

<背景>

細胞集団内の heterogeneity が世界的に注目され、1細胞解析法の開発が進んでいる。一度にたくさん(10^7 - 10^9 程度)の(c)DNA配列を決定できる次世代シーケンサの登場により、1細胞からの全ゲノム増幅技術やトランスクリプトーム解析技術などが開発され、一度に 1,000 余りの細胞の計測から、各細胞の違いが記述されてきている。

一方で、たくさん(10^4 以上程度)の細胞を対象にした1細胞定量解析をするための技術開発はあまり進んでいない。腸内細菌叢やT細胞受容体解析などにおいてその heterogeneity を記述するためには、十分な数の細胞の解析が要求される。次世代シーケンサで一度にたくさんの細胞を解析するためには、各細胞毎に異なるタグ(シーケンサで読みだせる DNA 配列: 本研究ではバーコードと呼ぶ)を付加する必要があるが、これまでは1つ1つの細胞に対して手動でタグを付加している場合が多かった。近年に市販されている装置では 1,000 以上の細胞を解析できるようになってきてはいるが、本研究の対象である細菌叢解析では行われておらず、T 細胞受容体解析においても精度の高いハイスループット計測の実現までには、まだ改良が必要である。

<開発技術>

本研究では、まず DNA 分子バーコード法の定量性について解析し、新機能を開発した。この技術をさらに拡張して、多数(10^4 以上)の細菌を対象に、特定の遺伝子の配列を1細胞ごとに解析できる技術を開発し、細菌の種類を高精度で同定して細菌数の正確な定量を実現した。新しい測定法に必須な解析プログラムも開発し、システム全体をパイプライン化した。

また、免疫システムで重要な役割を果たしているT細胞の受容体配列を解析するため、T細胞受容体の配列をRNAから簡易に増幅できる手法を開発した。この技術は、ハイスループット計測へ向けた基盤となる。

<本技術が生み出すイノベーション>

本研究の重要な点は、選んだ細胞ではなく集団内の細胞を網羅的に測る、また、1細胞の分解能で計測しながらも全体も見、ことである。これにより、研究者の趣向に依存しうる見落としをなくし、それぞれの細胞による集団への寄与、細胞集団内の細胞 heterogeneity から生み出される細胞集団の機能発現、そしてそれらが組織、個体へ影響を与えるメカニズムの理解を目指す。これは、heterogeneity が存在するという理解の次へ向かう、1細胞研究における重要なステップだと考えられる。細菌叢において高精度の細菌数定量解析の実現により、細菌叢をコントロールする手がかりを得て、腸内細菌叢と相関が報告されている疾患などの治療に貢献できる可能性がある。さらに、多くのT細胞受容体を解析することで、刺激に対してどの受容体をもつT細胞が、いつ、どれくらい増殖・減少するのかといった免疫システムの理解が得られ、さらには、疾患の状態や進行、治療効果の評価にも貢献できる可能性がある。

2. 研究成果

(1) 概要

(i) DNA 分子バーコード法の改良と新機能の開発

細菌数の定量解析を実現するために、まず、DNA 分子バーコード法の詳細について定量解析した。DNA 分子バーコード法は、学术界や企業において世界的に広く利用されているが、その定量性についての解析が報告されていなかった。本研究では、どの程度の数のランダム塩基を用いたらどの程度の数の分子を定量できるのかを示すことを目標とし、研究を実施した。その結果、例えば、我々が用いた計測システムでは、 10^4 の分子を正確に定量するために 14 個のランダム塩基が必要なことが分かった。我々の研究の途中で、“index switching”という問題が Stanford 大学の研究者らにより報告されたが(*)、我々は、分子バーコードを適切に利用することでこの問題を解決し、その方法も含めて論文で報告した(成果リストの論文発表1、特許出願 3)。

*<https://www.biorxiv.org/content/early/2017/04/09/125724>

(ii) 新規腸内細菌叢解析の開発

16S rRNA の部分配列を対象にした新規細菌叢解析法を開発した。既知の細菌を用いて計測システムを評価し、1度に多くの細菌を定量できることを示した。マウスの腸内細菌叢を解析し、再現性の高い結果を得た(投稿準備中)。

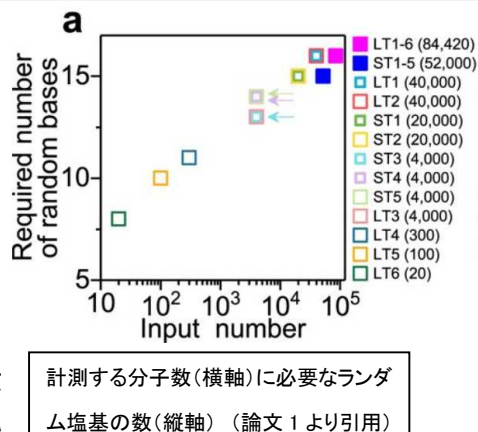
(iii) 5' 端の配列に依存しない RNA 配列簡易的増幅法の開発

T 細胞は基本的に、細胞毎に 5' 端側の配列が異なる受容体を発現しているため、それらの RNA 配列を増幅するためには、5' 端の配列に依存しない方法が必要である。現在、その方法の1つとして、cDNA を合成する(逆転写反応)と同時に 5' 端にアダプター配列を付与できるテンプレートスイッチ法が用いられている。しかしながらこの方法では、増幅反応(PCR)の前にプライマーを加えるなどの実験的操作が必要なため、将来的なハイスループット解析がスムーズに行えない可能性がある。本研究では、これらの問題を解決できる、簡易的な増幅法を開発した(投稿準備中、特許出願 1)。

(2) 詳細

(i) DNA 分子バーコード法の改良と新機能の開発

ランダム塩基を 38 個使用した分子バーコードを中心部分に、PCR 増幅用プライマー配列を両端にデザインした DNA オリゴを設計した。この既知の数の DNA オリゴをチューブに入れて PCR で増幅し、増幅産物の配列を次世代シーケンサで解析した。コンピュータ内でバーコードの長さを短くしていき、どれくらいの数の分子を定量するためにどれくらいの数のランダム塩基が必要かを解析した。また、シーケンスの量もコンピュータ内で少なくしてい



き、どれくらいのシーケンス量が高精度の定量に必要なかを解析した。バーコード部分のランダム塩基の間に固定塩基を挿入して、挿入・欠損エラーが起きた場合にエラー検出をできるようにし、その効果を定量解析した。これらの成果として、 10^4 個以上の分子を定量できることを示し(図)、シーケンサの容量が許せば 10^{15} 個の分子も測定可能であるポテンシャルを示した。さらに、同じ分子バーコードを持つ増幅産物には同じサンプルインデックスが付加される、という原則を利用することで、当分野で課題となっている index switching(上述)を解決する方法を提案した。

(ii) 新規腸内細菌叢解析の開発

細胞の数を計測するために、DNA バーコード技術とドロプレットを用いた。上記で開発した DNA バーコードの機能を活用し、再現性の高い測定結果を得た。現在、マウスの腸内細菌叢の解析を進めている。

(iii) 5' 端の配列に依存しない RNA 配列簡易的増幅法の開発

5' 端の配列が不明であるサンプルの例として、T 細胞受容体の RNA 配列を用いた。1つの T 細胞から簡易な方法で受容体の RNA 配列を増幅することに成功した。

3. 今後の展開

(i) DNA 分子バーコード法の改良と新機能の開発

本技術の開発自身は、論文として報告したことで一段落した。今後、様々な応用研究でバーコード法を使用していく場合、本技術が基盤となる。

(ii) 新規腸内細菌叢解析の開発

本手法を用いて、腸内のいろいろな位置での測定を行い、まずはマウス腸内で細菌叢がどのように変化しているのかを理解する。その後、細菌叢の変化をモデル化できるか、予測できるか、コントロールできるか、などを検討していく。これらの知見を用いて、細菌叢をコントロールする道を拓き、医科学へ貢献したい。

(iii) 5' 端の配列に依存しない RNA 配列簡易的増幅法の開発

本技術は計測の簡易化やハイスループット化に利用できる。学术界や企業で行われている関連技術開発の進展を注視しながら、今後の研究を展開する。

4. 評価

(1) 自己評価

計画していた3項目でそれぞれ成果を得ることができており、そのうち、分子バーコード法については論文として報告した。他の2項目も技術開発は達成していると考えており、T 細胞受容体の増幅法と細菌叢解析法については、投稿準備中である。このように、期間中に異動や研究室の立ち上げがあったことを忘れてよいぐらいの相応の成果が得られていると考えている。

社会への波及効果としては、特許出願に言及したい。1細胞解析に関わる技術について、2件を国際特許出願し、そのうちの1件が企業とのライセンス契約に至っている点は、独自技術により社会に貢献しうるものと考えている。

分子バーコードに関する開発の成果は、これまでの分子バーコード法に少しの工夫を加えるだけで実装できる。したがって、分子バーコード法そのものが広く利用されているように、本技術も広く利用されていくことが期待される。

細菌叢をより正確に定量して細菌同士の関連を調べていく方向性は、学术界ではすでに注目されている。しばらく時間がかかるかもしれないが、本研究で開発した方法も広く利用されていくと期待される。

(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)

ランダムバーコード法を精度高く使って 10^4 個以上の single cell 毎の遺伝子発現レベルの定量的解析法を確立しました。DNA バーコードは多くの研究者が使い始めていますが、その有効性を十分に活かしていない事例も多数発表されているのが現状です。城口研究者は腸内細菌叢の解析に用いる手法や、1つの T 細胞からワンステップで T 細胞受容体の RNA 配列を解析する手法などを開発することなどによって、DNA バーコードのユニークな使用法を開発し、その有効性を示しています。今後もより有用な応用法の開発によって、用途が拡大し、より広い分野にも展開されることが期待されます。キーとなるテクノロジーには特許も出願しており、大いに評価できる成果を出しています。ただし、16sRNA を用いた stain レベルの解析など以外に、この手法を用いないと解析が不能な応用例を示すなど、より新しさをアピールすることができればと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Taisaku Ogawa, Kirill Kryukov, Tadashi Imanishi & Katsuyuki Shiroguchi, "The efficacy and further functional advantages of random-base molecular barcodes for absolute and digital quantification of nucleic acid molecules.", Scientific Reports, 2017, 7,13576
2. Mari Tenno, Katsuyuki Shiroguchi, Sawako Muroi, Eiryo Kawakami, Keita Koseki, Kirill Kryukov, Tadashi Imanishi, Florent Ginhoux, Ichiro Taniuchi, "Cbf β 2 deficiency preserves Langerhans cell precursors by lack of selective TGF β receptor signaling.", Journal of Experimental Medicine, 2017, 214, 2933-2946
3. Mari Tenno, Satoshi Kojo, Divine-Fondzenyuy Lawir, Isabell Hess, Katsuyuki Shiroguchi, Takaho Endo, Sawako Muroi, Rumi Sato, Hiroshi Kawamoto, Thomas Boehm and Ichiro Taniuchi, "The Cbfb splice variant Cbfb2 confers thymic-homing capacity to pre-thymic progenitors", Journal of Experimental Medicine, 2018, 215, 595-610
4. Wataru Ise, Kentaro Fujii, Katsuyuki Shiroguchi, Ayako Ito, Kohei Kometani, Kiyoshi Takeda, Eiryo Kawakami, Kazuo Yamashita, Kazuhiro Suzuki, Takaharu Okada and Tomohiro

Kurosaki, "T follicular helper cell-germinal center B cell interaction strength regulates entry into plasma cell or recycling GC cell fate", Immunity, 2018, 48, 702-715

(2)特許出願

研究期間累積件数:5 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)
非公開 1 件

出願 1

発 明 者: 城口 克之
発明の名称: ワンステップ逆転写テンプレートスイッチ PCR
出 願 人: 理化学研究所
出 願 日: 2016/6/23
出 願 番 号: JP2016-125007
PCT/JP2017/023254

出願2

発 明 者: 城口 克之
発明の名称: ワンステップ逆転写テンプレートスイッチ PCR
出 願 人: 理化学研究所
出 願 日: 2017/7/23
出 願 番 号: PCT/JP2017/023254

出願3

発 明 者: 城口 克之
発明の名称: METHOD FOR SEQUENCING AND ANALYSIS OF NUCLEIC ACID
出 願 人: 理化学研究所
出 願 日: 2017/6/23
出 願 番 号: US 62/523,857

出願4

発 明 者: 城口 克之
発明の名称: METHOD FOR SEQUENCING AND ANALYSIS OF NUCLEIC ACID
出 願 人: 理化学研究所
出 願 日: 2018/6/22
出 願 番 号: PCT/JP2018/ 023778

(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)

<学会発表>

Katsuyuki Shiroguchi, "Single Molecule & Single Cell Analysis", BIT's 8th Annual Congress of Molecular & Cell Biology-2018 Fukuoka

Katsuyuki Shiroguchi, "A novel quantification method for bacterial microbiota analysis with high dynamic range cell barcoding", IFPT' 10&IWSC'11 Nanjing, China

<著作物>

城口克之、小川泰策 “次世代シーケンサーを用いた DNA, RNA の網羅的デジタル計測”,
現代化学 2016 年 9 月号 (No. 546) p47-50

城口克之 “1細胞、1分子における核酸配列決定・定量技術の現状と展望”, 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社 V50 No.5 p526-531 (2018)

Katsuyuki Shiroguchi, “Distinguishing and Searching for Minority Cells: Small in Number, But Large in Effect”, Minorities and Small Numbers from Molecules to Organisms in Biology (Springer) p39-44.

<プレスリリース>

城口克之 「DNA 分子バーコード法の新機能」
理化学研究所、科学技術振興機構 2017 年 10 月 19 日