

## シングルセル解析が開く新しい微生物の世界と応用

(早大先進理工<sup>1</sup>・産総研-早大 CBBDOIL<sup>2</sup>・早大ナノライフ創新研<sup>3</sup>・早大先進生命動態研<sup>4</sup>)

○竹山春子<sup>1,2,3,4</sup>

Exploring the microbiome frontier with single-cell analysis

(<sup>1</sup>Department of Life Science and Medical Bioscience, Waseda University, <sup>2</sup>Computational Bio Big-Data Open Innovation Laboratory, AIST-Waseda University, <sup>3</sup>Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda University, <sup>4</sup>Institute for Advanced Research of Biosystem Dynamics, Waseda University)

○Haruko Takeyama<sup>1,2,3,4</sup>

It has been widely recognized that human microbiomes play important roles in the host. Especially in the gut microbiome, they are closely related to the health and disease of the host. To understand their functions precisely, we have developed a microfluidic droplet-based single-cell genome analysis method and conducted massively parallel single-cell genome sequencing of human gut microbiomes<sup>1</sup>. This method enables us to obtain the genome information of unknown bacteria and to identify genome structural variations including SNPs and functional gene mutations at single-cell resolution.

On the other hand, the diversity of environmental microbiomes is still overwhelming the throughput of single-cell genome sequencing. Therefore, the method for primary screening that detect candidates for beneficial microbiomes is required. In our laboratory, we have adopted the Raman spectroscopy to perform the primary screening of target microbiomes from the populations at the single-cell level. The Raman spectroscopy enables label-free detection of substances at molecular level in microbiomes and gives in-real-time images of cellular molecular distributions. Furthermore, a decomposition spectrum derived from the biomolecules is acquired by using a multivariate curve resolution method (MCR-ALS), and this method enables us to evaluate the productivity of microbial metabolites and to observe various target molecules in microbiomes<sup>2</sup>.

Combining these technologies, we have developed a platform for screening beneficial microbiomes and acquiring genome information at the single-cell level. We have applied this platform to marine sponge *Theonella* sp. and acquired the single-cell draft genome of symbiotic microbiome producing functional secondary metabolites.

Here, the novelties and the latest applications of our developed single-cell genome analysis will be introduced. Furthermore, the potential of single-cell analysis toward the personalized medicines with the data of human microbiomes will be explained.

*Keywords* : Single-cell; Microbiome; Genomics; Droplet microfluidics, Raman Spectroscopy

ヒトの体内には腸内細菌叢を代表に多様な細菌叢（マイクロバイオーーム）が存在しており、細菌-細菌間および細菌-宿主間の相互作用が宿主の健康と密接な関係にあるということが明らかになってきている。近年では、マイクロバイオーームの包括的な機能解析が可能なメタゲノム解析や菌叢中の個々の菌株を解析するシングルセルゲノム解析など、単離培養を必要としない解析手法によって研究が加速している。我々の研究室では、細菌種ごとに高精度なゲノム情報を取得して詳細な解析を可能にするため、微小液滴を用いたシングルセルレベルでの全ゲノム解析技術を開発してきた。本手法を用いることで、ハイスループットなシングルセルゲノム情報の取得が可能となり、腸内細菌叢などの環境サンプルを対象として、高精度なシングルセルゲノム解析が実現できる。これにより、ゲノム情報が明らかになっていない未培養細菌の新規ゲノム情報の取得や、シングルセルレベルでの比較による同一細菌種における特定遺伝子の SNP 検出や機能遺伝子の欠損検出を行ってきた<sup>1)</sup>。

一方で、シングルセルゲノム解析はターゲット特異的なゲノム解析手法としての応用も期待されている。そのため、多様性の高い細菌叢のシングルセルゲノム解析を行うにあたって、まず標的の有用微生物を効率良く選別する手法が求められている。そこで、多様性の高い微生物集団の中から有用微生物候補を効率良く一次スクリーニングする手法として、低侵襲・非染色で微生物の代謝産物を検出可能な技術である顕微ラマン分光法を活用している。本手法により、微生物内の物質の分子構造をラベルフリーで検出することができ、リアルタイムでの代謝産物同定と生産能の評価を可能とした<sup>2)</sup>。さらに、多変量スペクトル分解法(MCR-ALS)を用いて生体分子に由来する分解スペクトルを取得し、各分解スペクトルの強度に基づくラマンイメージングを行うことで、代謝産物の生産能評価および菌体内局在観察を可能とした。これらの基盤技術を融合させることにより、多様な微生物集団の中から有用微生物の候補を効率的にスクリーニングし、シングルセルレベルでのゲノム情報を獲得するプラットフォームを開発した。本手法の応用例として、これまでに *Theonella* 属カイメンの共在細菌叢から二次代謝産物含有菌をスクリーニングし、標的細菌のシングルセルゲノム情報の獲得を行っている。

ここでは、これまで独自に開発してきた新たなシングルセルゲノム解析技術とその応用事例を紹介する。さらに、将来の個別化医療への応用に向けて、ヒト腸内細菌を対象とする本技術の応用戦略について解説する。

1) Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota. R. Chijiwa, M. Hosokawa, M. Kogawa, Y. Nishikawa, K. Ide, C. Sakanashi, K. Takahashi, H. Takeyama, *Microbiome* 2020, 8, 5.

2) Detection of Penicillin G Produced by *Penicillium chrysogenum* with Raman Microspectroscopy and Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares Methods. S. Horii, M. Ando, A. Z. Samuel, A. Take, T. Nakashima, A. Matsumoto, Y. Takahashi, and H. Takeyama, *J. Nat. Prod.* 2020, 83 (11), 3223-3229.