

シングルセル遺伝子 発現およびクロマチン アクセシビリティの 統合

- 10x GenomicsのChromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionを活用し、同一シングルセルからマルチオミックス測定
- NovaSeq™ 6000システム、NextSeq™ 2000システム、NextSeq 1000システムまたはNextSeq 550システムでATAC-Seqライブラリーと3' 遺伝子発現ライブラリーのペアをシーケンス
- シングルセルのトランスクリプトーム結果とエピゲノム結果を関連付け、遺伝子制御の正確な全体像を把握

illumina®

はじめに

シングルセル解析は、細胞型を区別し、動的な細胞状態を明らかにすることで、複雑な細胞集団の不均一性の解明に役立ちます。次世代シーケンサー (NGS) は、数百から数万個の細胞について、シングルセル解像度でゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノムまたはプロテオームを検証する革新的なアッセイを実現します。細胞の表現型をより詳細に理解するために、これらの補完的なマトリクスをマルチオミックスデータセットに統合することができます。

多くのマルチオミックスアプローチは、別々の実験から得られたデータを接続するために、洗練されたアルゴリズムとモダリティ間の相関関係の推論に依存しています。¹ しかし、最近のシングルセルシーケンシングのワークフローでは、同じ細胞内の複数の細胞機能を調べ、オリゴヌクレオチドのバーコードを使って結果をリンクさせることで、マルチオミックスを直接アッセイに組み込んでいます。

本テクニカルノートでは、トランスクリプトーム (3' 遺伝子発現を使用) およびエピゲノム (ATAC-Seq (assay for transposase-accessible chromatin with sequencing) を使用) の同時プロファイリングのプロトコルを概説します。同一細胞のシングルセル遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティを正確に結びつけることで、さまざまな細胞型における遺伝子の発現方法と制御方法を明らかにすることができます。

プロトコル概要

このシングルセルマルチオミックス実験は、ライブラリー調製、シーケンス、解析の簡単なワークフローに従います (図1)。プロトコルは、10x GenomicsのChromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionおよびイルミナの実績あるシーケンサーを使用します。核懸濁液から開始し、Chromium Controllerおよび試薬を使用して、シーケンスに用いることができるバーコード付加した「マルチオーム」ライブラリーを2種類生成します。1つはシングルセルATAC-Seqライブラリー、もう1つはシングルセル遺伝子発現ライブラリーです。² ペアにしたマルチオームライブラリーは、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システムまたはNextSeq 550システムなどのイルミナのハイスループットシーケンスシステムでシーケンスします。Cell Ranger ARCパイプラインを用いたデータ解析では、細胞バーコードを用いて個々の細胞に対するATAC-Seq結果と遺伝子発現結果を関連付けます。Loupe Browserソフトウェアにより、シングルセルマルチオミックスデータを簡単に視覚化し、検索することができます。

サンプル調製

サンプル調製は、細胞培養、初代細胞または新鮮/凍結組織からの核懸濁液を分離することから開始します。本アッセイは、さまざまな細胞株、末梢血単核細胞 (PBMC)、新鮮凍結マウス胎児脳、凍結ヒト脳、凍結リンパ節腫瘍で検証されており、その他のサンプルタイプにも適用することができます。³

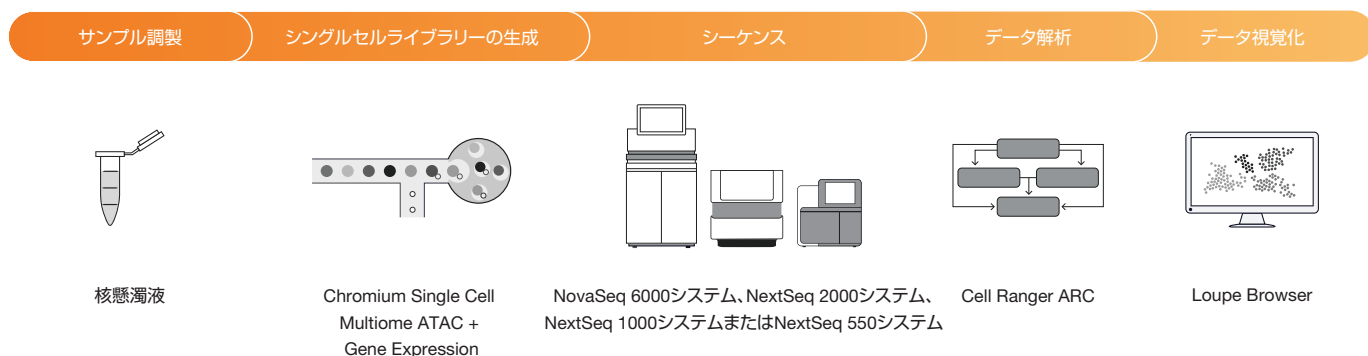


図1: シングルセルマルチオミックス実験のワークフロー: 核懸濁液から開始し、その後Chromium Controllerを用いたマイクロフルイディクスによるシングルセルの分画およびバーコード付加に進みます。イルミナ装置で、2種類のマルチオームライブラリー (1つはシングルセルATAC-Seqライブラリー、もう1つはシングルセル遺伝子発現ライブラリー) をシーケンスします。Cell Ranger ARCおよびLoupe Browserソフトウェアを用いてデータを解析、視覚化します。

良い結果には、高い品質の核が極めて重要です。10x Genomicsサポートウェブサイトでは、さまざまなサンプルタイプから核を分離するためのプロトコルが示されています。⁴ これらのプロトコルは、細胞懸濁液および組織の凍結、DNase処理などの精製方法、蛍光活性化セルソーティング (FACS) による顆粒球細胞の除去およびFACSによる核ソーティングのためのガイドラインが含まれます。³

シングルセルライブラリーの生成

核を分離した後、ライブラリーはChromium NextGEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionキットを用いて調製します (図2)。⁴ 核を高活性型トランスポソーム酵素でバルク処理して切断し、露出したDNAにシーケンスアダプターを挿入します。⁵ トランスポーズ処理した核をマイクロフルイディクスチップにロードし、Chromium Controller (10x Genomics) でランを実施します。このランでは個別の核と固有のバーコードを含むシングルゲルビーズがそれぞれ液滴に分画されます。次にこの液滴、すなわち「GEM」(ゲルビーズエマルジョン) をインキュベートすることで、同一の核のmRNAとトランスポーズ処理したDNA断片の両方にバーコードが付加されます。このステップが、ATAC-Seqおよび遺伝子発現の結果取得につながります。

このインキュベーション後、GEMを壊して、プールした断片を回収して精製します。これらの断片に対して前増幅ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) ステップでギャップを埋め、トランスポーズ処理したバーコード付きDNAとcDNA断片の最大の回収率を確保します。この後、前増幅産物は、ATAC-Seqライブラリー構築用、

および遺伝子発現ライブラリー構築のためのcDNA増幅用の両方のインプットとして使用します。³

得られたバーコード付きシングルセルマルチオーム遺伝子発現ライブラリーとATAC-Seqライブラリーは、これでイルミナNGSシーケンスシステムによるシーケンスが可能になります。

イルミナ装置を用いたシーケンス

このアプリケーションに対して必要となるシーケンス出力に対処するには、ペアにしたマルチオームライブラリーをNovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム*、NextSeq 1000システム*またはNextSeq 550システムでシーケンスすることを推奨します (表1)。リード構成はライブラリーの種類によって異なります (表2)。

* NextSeq 1000システムおよびNextSeq 2000システムで生成したシーケンスデータは、Cell Ranger ARCを用いてBCLファイルから解析する必要があります。NextSeq 1000システムおよびNextSeq 2000システム (Instrument Control Software v1.2.0以上) 内で生成されたFASTQファイルから開始した解析は、Cell Ranger ARC (v1.0.1) との互換性がありません。Cell Ranger ARCソフトウェアとの互換性に関するサポートおよび最新情報については、イルミナサポートチームにお問い合わせください。

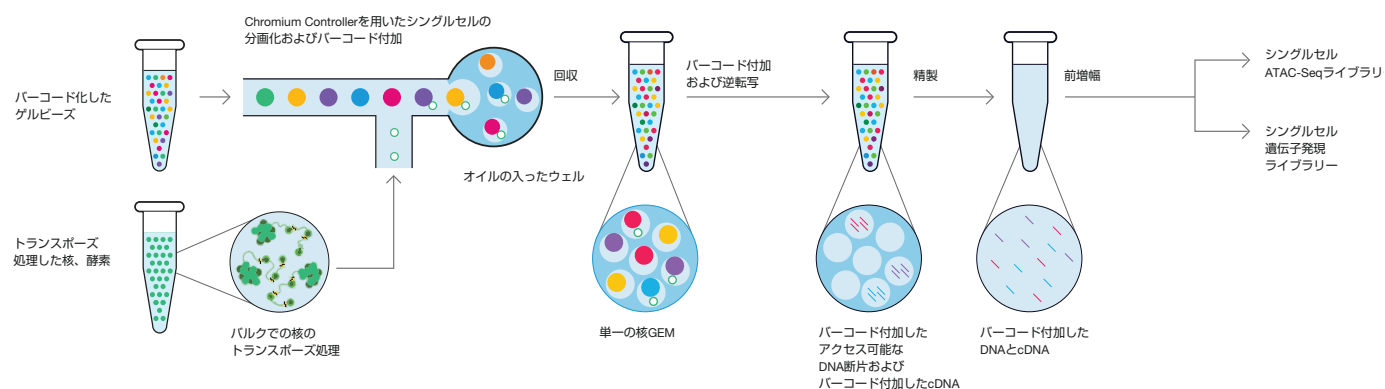


図2: 同一細胞からの3' 遺伝子発現ライブラリーとATAC-Seqライブラリーの生成: 単一核の懸濁液から開始し、トランスポーズ処理はバルクで実施し、その後個々の核はGEMにキャプチャーされます。GEMではDNA断片とmRNAの3' 末端にバーコードを付加します。GEMを壊してプールした後、精製、前増幅、およびライブラリー構築します。これにより、各サンプルから2種類の補完的なライブラリーが生成され、遺伝子発現およびオープンクロマチンのプロファイルを同一細胞に確実に関連付けることができます。²

表1: イルミナシーケンスシステムでのChromium Single Cell Multiomeアッセイに対するサンプルスルーブットの例

ライブラリーの種類	核あたりの 最小リードペア数 ^a	サンプル あたりの核	ランあたりのサンプル数				
			NextSeq 550 システム	NextSeq 2000システム		NovaSeq 6000システム	
			ハイ スルーブット	P2 ^d	P3	SP	S1
マルチオーム3' 遺伝子発現	20,000 ^b	5,000	4	4	11	8	16
マルチオームATAC-Seq	25,000 ^{b,c}	5,000	3	3	8	6	12

a. 最小リード数は10x Genomicsの承諾により提供された推奨値です。⁶

b. 必要な性能またはアプリケーションに応じてシーケンス深度を調節してください。Cell Ranger ARCランサマリーのシーケンス飽和メトリクスおよび曲線を用いて、特異的なサンプルタイプに対してシーケンス深度を最適化することができます。

c. 個別リード50,000。リード1より25,000およびリード2より25,000。

d. NextSeq 1000システムでは、同一のサンプルスルーブットを用いてP2フローセルも利用できます。

表2: Chromium Single Cellマルチオームライブラリーに対する推奨リード構成

	マルチオーム3' 遺伝子発現ライブラリー				マルチオームATAC-Seqライブラリー			
	リード1	i7インデックス	i5インデックス	リード2	リード1	i7インデックス	i5インデックス	リード2
目的	細胞バーコード およびUMI	サンプル インデックス	サンプル インデックス	cDNA インサート	トランス ポーズ処理 したDNA	サンプル インデックス	サンプル インデックス	トランスポーズ 処理したDNA
長さ ^a	28 bp	10 bp	10 bp	90 bp	50 bp ^b	8 bp	24 bp ^c	49 bp ^b

a. 短い転写産物リードは、トランスクリプトームアライメント率の低下につながる可能性があります。細胞バーコード、分子バーコード (UMI) およびサンプルインデックスリードは示した値よりも短い値にしないでください。すべてのリードは推奨値よりも長くなる可能性があります。Cell Ranger ARCは、細胞バーコードまたはUMIリードの追加塩基を自動的に無視します。

b. シーケンス長は使用するシーケンスキットに基づいて調節できますが、30 bpよりも短くならないようにしてください。

c. NextSeq 550システムなどの、24-bp i5インデックスリードに対応しないシーケンサーはカスタムレシピが必要です。⁹

マルチオームATAC-Seqライブラリーについては、PhiX添加の推奨量は1%です。この添加によって適切なシーケンス多様性を確保し、高品質なシーケンスに役立ちます。⁶ 10x Genomicsのサポートウェブサイトでは、シングルセルマルチオーム遺伝子発現ライブラリー⁷とシングルセルマルチオームATAC-Seqライブラリー⁸に対して予測されるシーケンスメトリクスが入手できます。

NextSeq 550システムのカスタムレシピ要件

NextSeq 550システム[†] (NextSeq Control Software v4.0.2以上) の初期設定レシピは、20 bpを超えるi5インデックス長を許容しないため、NextSeq 550システムでマルチオームATAC-Seqライブラリーランを成功させるには、カスタムレシピが必要になります。イルミナは一般的なカスタムレシピの使用についてはサポートしていませんが、イルミナおよび10x Genomicsは連携し、本アッセイのランを成功させるためにカスタムレシピを必要とするお客様のレポートをいたします。⁹ 本アッセイで使用する際のNextSeq 550システム構成に関する最新情報については、10x Genomicsまたはイルミナサポートチームにお問い合わせください。

[†] この推奨事項は、NextSeq 550システムおよびRUOモードでのNextSeq 550 Dxシステムにもあてはまります。

データの解析と視覚化

シーケンス後、Cell Ranger ARC解析パイプライン (10x Genomics) がオープンクロマチン領域を同定し、同時にシングルセルの転写産物数と最大のアクセシビリティを計測します。同一細胞上でATAC-Seqとトランスクリプトームの測定をするため、クロマチンアクセシビリティと遺伝子発現の情報を直接関連付けることができます。

Cell Ranger ARCソフトウェアは、同様のプロファイルを用いて細胞のクラスターも同定します。解析パイプライン出力には、QC情報¹⁰、およびLoupe Browser視覚化ソフトウェア (10x Genomics) またはサードパーティーのRツールまたはPythonツールによる詳細な解析のために使用できるファイルが含まれます。

データの特長

トランスクリプトーム解析とエピゲノミクス解析の関連付けにより、細胞型と細胞の状況に関する詳細な特性評価が可能になります。例えば、同一細胞型の転写因子発現とモチーフアクセシビリティを比較することで、発現差のある遺伝子のドライバーを同定し、制御ネットワークを明らかにすることができます (図3)。² Loupe Browserを用いて近傍の遺伝子発現と関連するオープンクロマチンピーク間の関連を視覚化することもできます (図4)。²

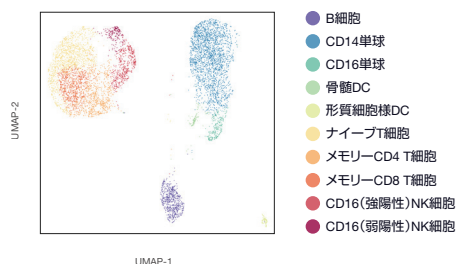
専門家のサポートへのアクセス

Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression ライブラリーのシーケンスについては、イルミナおよび10x Genomicsチームが連携して、ワークフロー全般を完全にサポートします。アッセイおよび解析に関するご質問は10x Genomics サポート (support@10xgenomics.com)、シーケンスに関するご質問はイルミナサポート (techsupport@illumina.com) にお問い合わせください。これらのチームでは、より複雑な問題にも共同で対応しています。

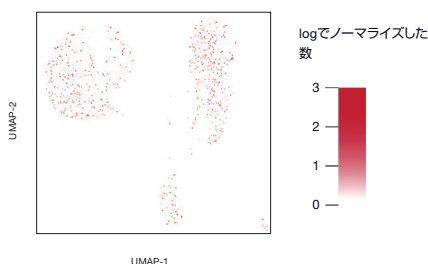
まとめ

シングルセルマルチオミクスプロトコールは、シングルセルからの遺伝子発現およびクロマチンアクセシビリティのプロファイリングを同時に実現します。データセットの統合により、健康時および病態における遺伝子発現の差異を含め、遺伝子制御を誘導する細胞内メカニズムの解明に役立ちます。

A. PBMC遺伝子発現画像



B. NFE2L2遺伝子発現



C. NFE2L2モチーフアクセシビリティ

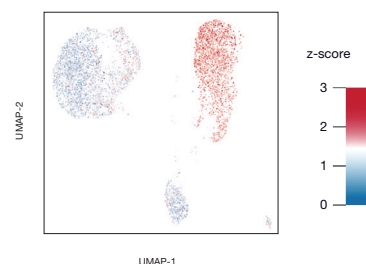


図3: 遺伝子発現およびクロマチン状態に対する補完的なシングルセルデータ: 健康人のPBMCから抽出した核をChromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionで処理し、ライブラリーをNovaSeq 6000システムでシーケンスしました。(A) 遺伝子発現データを用いた7,273個の核で実施したクラスター解析: 細胞集団は確立されたマーカー遺伝子に基づいてアノテーションを実施されました。(B) 転写因子NFE2L2の発現はすべての細胞型において観察されました。(C) しかし、同一細胞のATAC-Seqから得られたNFE2L2モチーフのアクセシビリティは単球集団に限られています。²

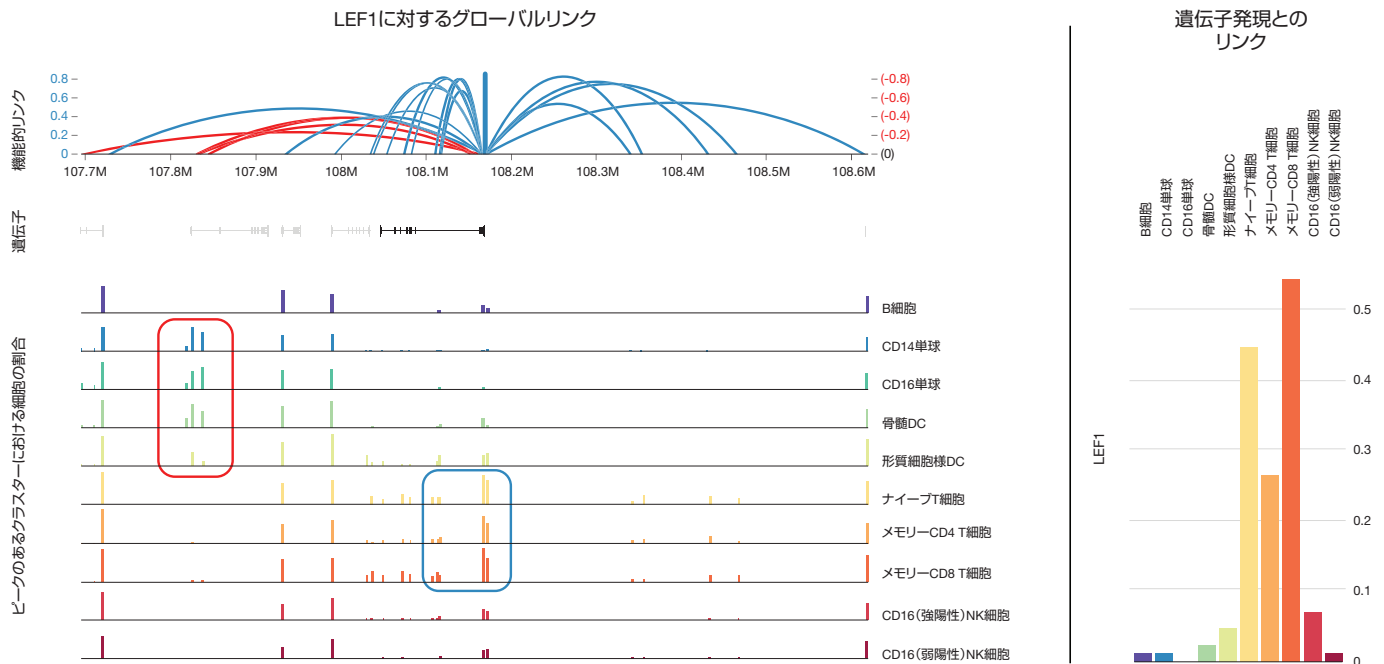


図4：対象遺伝子に直接関連した推定制御エレメントの同定：LEF1に対するグローバルリンクは、図3で認められた7,273個の同一のPBMC核について、1 Mbの範囲内でLEF1遺伝子発現と相関（青色の弧）または逆相関（赤色の弧）するオープンクロマチンピークを示しています。LEF1発現レベルおよびオープンクロマチンピークは細胞型別に色分けされています。LEF1の細胞型特異的発現は、LEF1プロモーター近傍の関連するオープンクロマチン領域と相関し、ナイーブおよびメモリーT細胞で特に豊富に認められます（青色の囲み）。単球や骨髄樹状細胞などのLEF1発現の低い細胞は、数百キロベース離れたオープンクロマチン領域をそれぞれ有しており、抑制状態であることが考えられます（赤色の囲み）。²

詳細はこちら

イルミナシーケンスプラットフォームを用いたシングルセル技術の詳細、およびシングルセルシーケンスeBookのダウンロードは、jp.illumina.com/techniques/sequencing/rna-sequencing/ultra-low-input-single-cell-rna-seq.htmlをご覧ください。

Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionに関する詳細は、10xgenomics.com/products/single-cell-multiome-atac-plus-gene-expressionをご覧ください。

参考文献

1. Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. [Comprehensive Integration of Single-Cell Data](#). *Cell*. 2019;177(7):1888-1902.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.05.031
2. 10x Genomics. [Simultaneous profiling of the transcriptome and epigenome from the same cell](#). Accessed February 25, 2021.
3. 10x Genomics. Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Support. Accessed February 25, 2021. [support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex](#).
4. 10x Genomics. Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Sample Prep Demonstrated Protocols. Accessed February 25, 2021. [support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex/sample-prep](#).
5. Buenrostro J, Wu B, Chang H, Greenleaf W. [ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide](#). *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;109:21.29.1-21.29-9. doi:10.1002/0471142727.mb2129s109
6. 10x Genomics. [Sequencing Requirements for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression](#). Accessed February 25, 2021.
7. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell 3' v3.1 Dual Index Libraries](#). Accessed February 25, 2021.
8. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell Multiome ATAC Libraries](#). Accessed February 25, 2021.
9. 10x Genomics. [Why do I need a custom recipe when sequencing Multiome ATAC libraries on the NextSeq?](#) Accessed February 25, 2021.
10. 10x Genomics. [Interpreting Cell Ranger ARC Web Summary Files for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Assay](#). Accessed February 25, 2021.

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2021 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。

商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。

予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. M-AMR-00006-JPN 18MAY2021

illumina[®]