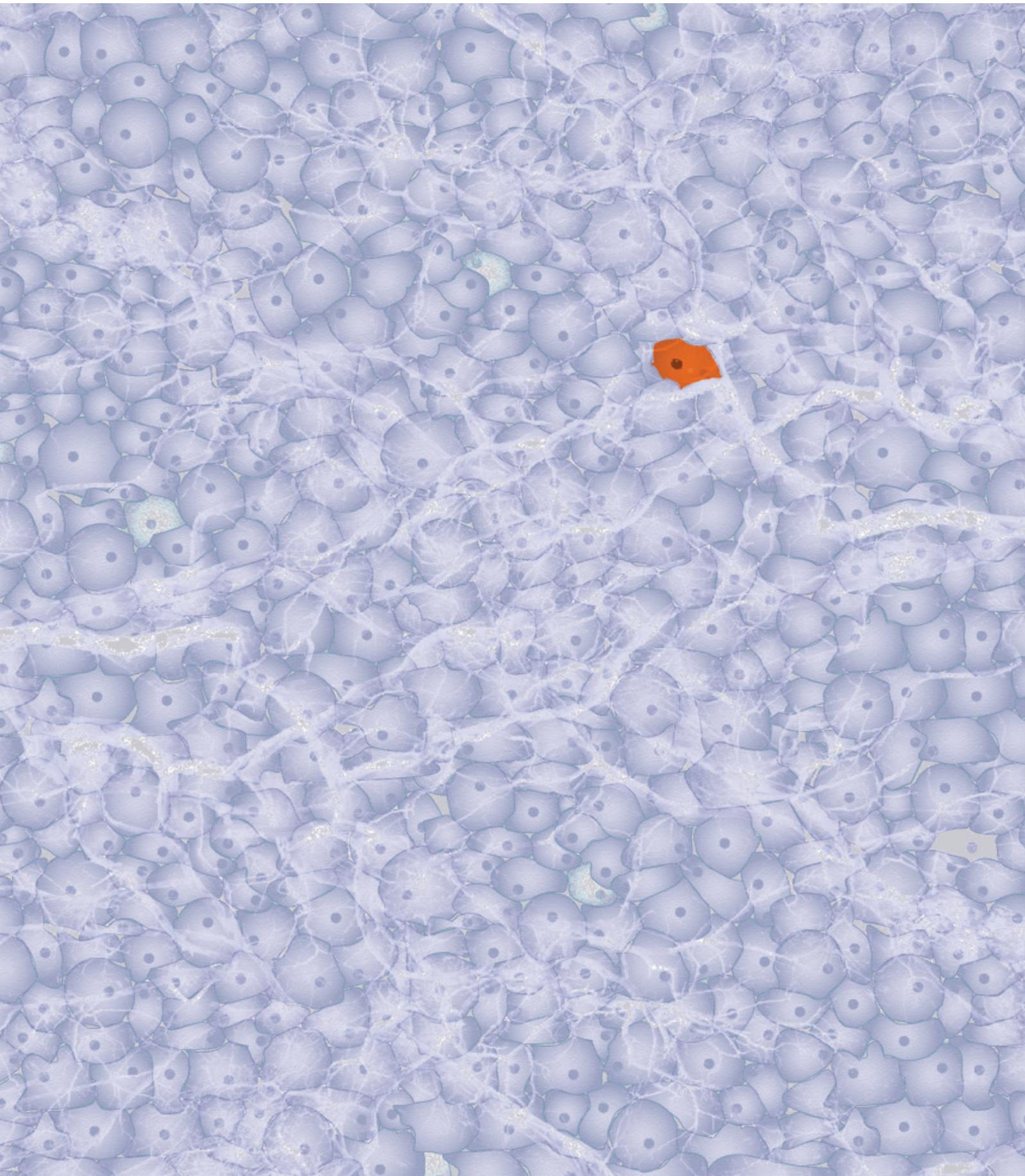


シングルセル研究論文集

イルミナの技術が用いられている最新論文の概説



目次

4 はじめに

6 アプリケーション

がん

メタゲノミクス

幹細胞

免疫学

B細胞レパートリー

T細胞レパートリー

神経学

創薬

生殖医学

共進化

30 サンプル調製

34 データ解析

36 DNAへの応用

単一分子反転プローブ (smMIP)

多置換増幅 (MDA)

多重アニーリングおよびループ化による増幅サイクル法 (MALBAC)

43 エピジェネティクス

バイサルファイトシーケンス (BS-Seq)

Reduced-representation bisulfite sequencing (RRBS-seq)

メチルキャプチャー (MethylCap) シーケンスまたは

メチル結合領域キャプチャー (MBDCap) シーケンス

クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq)

クロマチン構造キャプチャーシーケンス (Hi-C/3C-seq)

50 RNAへの応用

Allele-specific gene expression

デジタルRNAシーケンス

シングルセルの全トランスクリプト増幅 (Quartz-seq)

設計プライマーによるRNAシーケンス (DP-seq)

RNAテンプレートの5' 末端でのスイッチ機構 (Smart-seq)

RNAテンプレートの5' 末端でのスイッチ機構第2版 (Smart-Seq2)

TCRシーケンス

固有分子識別子 (UMI)

線形増幅シーケンスによる細胞発現 (CEL-seq)

シングルセルタグ標識逆転写 (STRT-seq)

67 参考文献一覧

はじめに

腎臓などの生体組織には多数の細胞種が存在します。これらの細胞種はそれぞれに異なる系譜と機能を持ち、組織、器官、そして究極的には生命体を機能させています。細胞がどのようにして相互に反応し、環境に反応するかは、それぞれの細胞の系譜と発生段階によって決まります。組織を細胞レベルで完全に理解するという究極の目標は、依然として困難なものですが、最近のシングルセル解析における進歩によって将来の展望が見えてきました。

シングルセルシーケンスの推進力は、そのほとんどが細胞系譜や残存病変の検出が最重要課題となるがん研究に由来しています。神経発生や免疫系など非常に複雑な生物学的システムの理解を深めるために、同様のアプローチが用いられています。

コミュニティのメンバーの多くが培養不能である複合微生物群集は、シングルセル解析の明確な対象候補です。これまでに数多くの微生物やウイルスが DNA/RNA シーケンスを用いて単離され、その特徴が明らかにされてきました。それらの情報により、環境におけるウイルスの影響範囲および重要性ならびに微生物群集の形成におけるウイルスの役割について新たな事実がわかりました。

驚くべきことに、微生物学において完全な均一性を示す細菌細胞コロニーさえも、複雑な集団的動態を示して周辺環境に適応することができます¹。

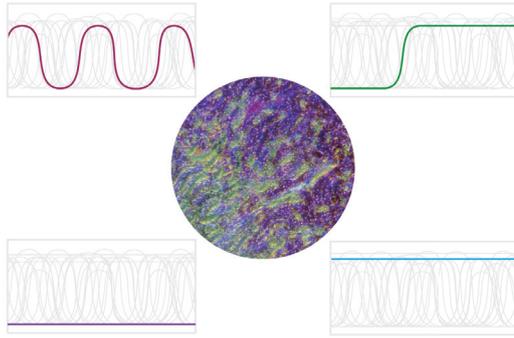
高精度で特異性の高い次世代シーケンスは、シングルセルや少ないインプット量の DNA/RNA シーケンスに非常に適しています。論文等で公表されている多くの手法には、DNA 変異、コピー数変異体 (CNV)、DNA-タンパク質結合、RNA スプライシングの検出および RNA 発現量の測定が含まれます。

本書では、イルミナの技術を使用したシングルセルのシーケンスおよび超微量サンプルの解析に関する最新の論文をクローズアップしています。イルミナのシーケンスおよびマイクロアレイ技術についての詳細は、www.illumina.com をご覧ください。

「シングルセルアプローチによって、
個体の生涯を通して生じるゲノム、
エピゲノムおよびトランスクリプトームの
多様性の規模が明らかにされようとしている。」

Macaulay and Voet 2014

-
1. Cho H., Jonsson H., Campbell K., Melke P., Williams J. W., et al. (2007) Self-organization in high-density bacterial colonies: efficient crowd control. *PLoS Biol* 5: e302
-



同一組織中のさまざまな種類の細胞内では、同じ遺伝子がさまざまな発現レベルで発現し、さまざまな制御メカニズムの影響を受けると考えられます。

総説

Chi K. R. (2014) Singled out for sequencing. *Nat Methods* 11: 13-17

Eberwine J., Sul J. Y., Bartfai T. and Kim J. (2014) The promise of single-cell sequencing. *Nat Methods* 11: 25-27, Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860

Wang L. and Wheeler D. A. (2014) Genomic sequencing for cancer diagnosis and therapy. *Annu Rev Med* 65: 33-48

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

Lovett M. (2013) The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet* 22: R22-26

Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

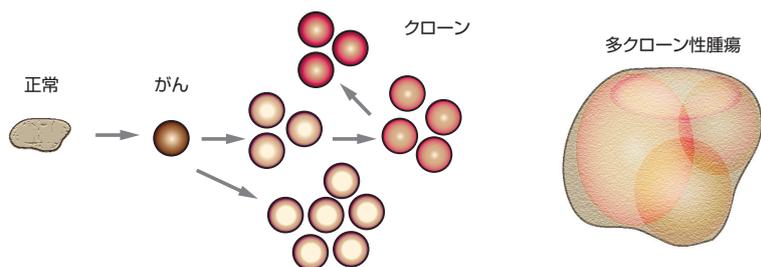
Wu J. and Tzanakakis E. S. (2013) Deconstructing stem cell population heterogeneity: single-cell analysis and modeling approaches. *Biotechnol Adv* 31: 1047-1062

アプリケーション

がん

腫瘍の増殖は、ダーウィン淘汰を経て腫瘍サブクローンの連続的なクローン増殖を生じさせるドライバー変異を通して起こります^{2, 3, 4, 5, 6}。そのため、進行性の腫瘍には多数のクローンが含まれていることがあり、それぞれのクローンが特有の一連の変異、病理および薬物応答を示します^{7, 8, 9}。原発腫瘍の5.1%を占めるに過ぎない1つのサブクローンが、再発後に優勢なクローンとなることがあるため、診断の際にすべてのクローンを精査することが重要です¹⁰。ディープシーケンスでは、細胞集団の1%にしか相当しないサブクローンを検出することができますが、その細胞の特徴を完全に明らかにして、このように稀な細胞集団に対する治療効果を得るためにはシングルセル解析が必要になります^{11, 12}。

循環シングルセルを用いてがんを検出することもできます^{13, 14}。この方法で十分な精度が得られるのは、代表的な血液検体から非常に稀な細胞を採取することができる場合に限定されます¹⁵。細胞を用いずに腫瘍核酸マーカーを検出するという方法で、精度および再現性がより高くなると考えられます^{16, 17}。



腫瘍内の不均一性。体細胞変異が蓄積すると、異質混合性の多クローン性腫瘍となり、腫瘍内のさまざまなクローンが治療に対してそれぞれに異なる反応を示す可能性があります。

「単一細胞が疾患の基本単位であるということ Virchow が発見してから 150 年以上経つにもかかわらず、研究や診断は通常、数千個の細胞を用いて、体内のさまざまな細胞系譜を考慮することなく行われている。」 Speicher MR et al. 2013

- Alexandrov L. B. and Stratton M. R. (2014) Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 52-60
- Van Loo P. and Voet T. (2014) Single cell analysis of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 82-91
- Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., et al. (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472: 90-94
- Stephens P. J., Greenman C. D., Fu B., Yang F., Bignell G. R., et al. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27-40
- Yates L. R. and Campbell P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806
- Gerlinger M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., et al. (2012) Intra-tumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892
- Landau D. A., Carter S. L., Stojanov P., McKenna A., Stevenson K., et al. (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152: 714-726
- Navin N. E. and Hicks J. (2010) Tracing the tumor lineage. *Mol Oncol* 4: 267-283
- Ding L., Ley T. J., Larson D. E., Miller C. A., Koboldt D. C., et al. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481: 506-510
- Navin N. and Hicks J. (2011) Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med* 3: 31
- Hou Y., Song L., Zhu P., Zhang B., Tao Y., et al. (2012) Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* 148: 873-885
- Cann G. M., Gulzar Z. G., Cooper S., Li R., Luo S., et al. (2012) mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One* 7: e49144
- Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782
- Allard W. J., Matera J., Miller M. C., Repollet M., Connelly M. C., et al. (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10: 6897-6904
- Swanton C. (2013) Plasma-derived tumor DNA analysis at whole-genome resolution. *Clin Chem* 59: 6-8
- Newman A. M., Bratman S. V., To J., Wynne J. F., Eclov N. C., et al. (2014) An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20: 548-554

総説

Adalsteinsson V. A. and Love J. C. (2014) Towards Engineered Processes for Sequencing-Based Analysis of Single Circulating Tumor Cells. *Curr Opin Chem Eng* 4: 97-104

Alexandrov L. B. and Stratton M. R. (2014) Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 52-60

Easwaran H., Tsai H. C. and Baylin S. B. (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 54: 716-727

Raphael B. J., Dobson J. R., Oesper L. and Vandin F. (2014) Identifying driver mutations in sequenced cancer genomes: computational approaches to enable precision medicine. *Genome Med* 6: 5

Van Loo P. and Voet T. (2014) Single cell analysis of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 82-91

Wang L. and Wheeler D. A. (2014) Genomic sequencing for cancer diagnosis and therapy. *Annu Rev Med* 65: 33-48

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

Ding L., Raphael B. J., Chen F. and Wendl M. C. (2013) Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Lett* 340: 212-219

Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

Speicher M. R. (2013) Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med* 5: 74

参考文献

Corces-Zimmerman M. R., Hong W. J., Weissman I. L., Medeiros B. C. and Majeti R. (2014) Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2548-2553

がんは、単一の細胞系譜において遺伝子病変が連続的に獲得されることとして、広く特徴付けられます。この研究は、急性骨髄性白血病（AML）の原因となる、造血細胞（HSC）における変異の獲得について検討したものです。著者らは、これらの細胞の変異プロファイルの特徴を明らかにするため、イルミナの HiSeq を用いて全エクソームシーケンスを行いました。そして、「増殖」遺伝子の変異が AML 発生後に生じるのに対し、「landscaping」遺伝子（DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンループ形成などの全般的なクロマチン変化に関する遺伝子）の変異が AML の発生初期に生じることを発見しました。

イルミナ技術：HiSeq

Green M. R., Vicente-Duenas C., Romero-Camarero I., Long Liu C., Dai B., et al. (2014) Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun* 5: 3904

悪性の状態に至る体細胞ゲノム変化を獲得することによってがんが生じるということは、十分に実証されています。しかし、何が引き金となってがんが発生するのかを特定することは困難です。この研究では、3q27.2 の具体的な獲得、およびそのびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）の転帰不良との関連性について検討を行いました。イルミナの Genome Analyzer を用いて、著者らは全ゲノムの配列を決定し、マウス造血前駆細胞（HSPC）の DNA メチル化の特徴を明らかにしました。著者らは、HSPC における BCL6 がん遺伝子発現を同定し、ノックイン発現により、マウス HSPC 内の一過性 Bcl6 発現が成熟 B 細胞リンパ腫への進展を惹起し得ることを明らかにしました。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Melchor L., Brioli A., Wardell C. P., Murison A., Potter N. E., et al. (2014) Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 28: 1705-1715

正常細胞ががん細胞へと形質転換し、その後のがん細胞が腫瘍として進んでいく過程には、一連の遺伝子変化が伴います。ダーウインの自然選択説に従えば、このようながん細胞株の多様化により、腫瘍の進展は一定の分枝パターンを辿ることになります。著者らは、イルミナ技術を駆使した全エクソームシーケンスとシングルセルシーケンスを併用した多発性骨髄腫（MM）患者の解析により、この説を検証しています。著者らは、骨髄腫細胞のサブクローンが治療の過程またはマウスでの生着の過程においてさまざまな生存特性を示すことを明らかにし、クローン多様性が、さまざまな選択圧と組み合わせられて、腫瘍増殖と治療抵抗性に不可欠な基盤を形成すると結論づけています。

イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}

Lohr J. G., Adalsteinsson V. A., Cibulskis K., Choudhury A. D., Rosenberg M., et al. (2014) Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. Nat Biotechnol 32: 479-484

循環腫瘍細胞 (CTC) の解析は、転移性がんの有望かつ新たなモニタリング法および診断法です。この研究は、高い精度で CTC を単離し、確認し、そして全エクソームシーケンスを行うための一連のプロセスを示しています。著者らは、イルミナの MagSweeper を用いて上皮細胞接着分子 (epCAM) 発現 CTC を濃縮しました。個々の細胞を回収し、イルミナの HiSeq でシーケンスを行いました。著者らは、プロセスの性能を明らかにするため、CTC 由来のライブラリーの全ゲノムカバレッジの品質および均一性を評価する方法を開発しました。前立腺がん患者 2 例の転移性 CTC をシーケンスすることによりプロセスがバリデートされ、CTC 変異の 70% がマッチする組織中に存在することが確認されました。

イルミナ技術: HiSeq, MiSeq

Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. Nat Methods 11: 190-196

細胞混合物から抽出した RNA に依存する RNA シーケンス法では、同一組織細胞間での個々の発現のばらつきは明確になりません。本稿において著者らは、シングルセル研究に応用できる *in vivo* トランスクリプトーム解析 (TIVA) について発表しています。イルミナのシーケンス技術を組み合わせて、著者らは培養と *in vivo* の双方でシングルニューロン間のトランスクリプトーム変動を捕らえ、解析しています。しかもこの方法は非侵襲的であり、インタクトな組織に応用できる可能性があります。この方法により、これまで困難とされてきた、複雑な組織の細胞不均質性の詳細な研究が可能となり、*in vivo* 生体機能イメージングとの併用が可能になります。

イルミナ技術: HiSeq

Papaemmanuil E., Rapado I., Li Y., Potter N. E., Wedge D. C., et al. (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. Nat Genet 46: 116-125

急性リンパ性白血病 (ALL) 症例の 4 分の 1 以上が ETV6-RUNX1 融合遺伝子を有しています。この遺伝子融合は ALL に特徴的なものですが、顕性白血病の発症にはさらなる変異が必要となります。この研究では、白血病性形質転換と関連のある二次イベントの特徴を明らかにするために、エクソームシーケンスおよび低カバレッジ全ゲノムシーケンスが用いられました。著者らは、ATF7IP および MGA の 2 つが ALL における新たながん抑制遺伝子であることを突き止めました。著者らは、ETV6-RUNX1 陽性リンパ芽球を白血病へと形質転換する変異プロセスを簡潔に示しています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Picelli S., Faridani O. R., Bjorklund A. K., Winberg G., Sagasser S., et al. (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. Nat Protoc 9: 171-181

組織や大型細胞集団の遺伝子発現解析では、細胞集団の平均値が得られますが、細胞間の生物学的ばらつきを明らかにすることはできません。本稿は、シングルセルトランスクリプトーム解析の新たなプロトコールである Smart-seq2 について発表したもので、これは過去に公表された Smart-seq プロトコールのワークフローを改良したものです。Smart-seq2 には、cDNA 収率を高め、技術上のばらつきを減らすための最適化逆転写 (RT)、テンプレートスイッチおよび前増幅が含まれます。このプロトコールは、完全に市販の試薬で行うことができ、互換性のあるすべてのイルミナのシーケンサー (MiSeq, HiSeq 2000, HiSeq 2500 など) と併用することができます。

イルミナ技術: MiSeq, HiSeq

Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. Nat Methods 11: 41-46

精度を qPCR と定量的に比較しました。市販のシングルセル RNA 増幅法を用いて、マイクロリットルスケールとナノリットルスケールの両方で、ライブラリー調製を行い、イルミナの HiSeq 2000 でシーケンスを行いました。この研究により、シングルセル RNA-Seq で qPCR と定量的に同等の結果が得られることが確認されました。これは、サンプル調製をマイクロfluidics デバイスなどを用いてナノリットルレベルの反応容量で行った場合に特に顕著でした。

イルミナ技術: HiSeq, Nextera DNA Sample Prep

Yu C., Yu J., Yao X., Wu W. K., Lu Y., et al. (2014) Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing. Cell Res 24: 701-712

がんの遺伝的多様性は、効果的な標的療法にとって大きな障害となっています。この研究では、腫瘍細胞集団の一部に独立クローンを見つける目的で、結腸がんサンプルのシングルセルシーケンス解析を行いました。サンプルの全ゲノム増幅 (WGA) に続き、イルミナの技術を用いたエクソームシーケンスを行いました。著者らは、SLC12A5 遺伝子が単一細胞レベルでは高頻度に変異するものの、集団レベルではこの遺伝子の変異の発現率が低いことを発見しました。このことから、発現率の低い変異が個々のクローンにおいて腫瘍形成を促す役割を果たしていると考えられることが示唆されました。

イルミナ技術：シーケンサー (製品名の明記なし)

Battich N., Stoeger T. and Pelkmans L. (2013) Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. Nat Methods 10: 1127-1133

本稿は、自動化単一分子蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (sm-FISH) をヒト組織培養細胞に応用した新たな高スループット画像ベーストランスクリプトミクス法について発表したものです。著者らは、この方法が転写産物数の少ない場合に高い特異性を示し、平均的な発現レベルの RNA-Seq と同等の結果が得られることを実証しています。この方法では、核転写産物の検出に限界があり、RNA-Seq よりもダイナミックレンジが狭いものの、同一サンプル内で測定できるシングルセルの数を増やすことができます。この方法により、数千個もの細胞を網羅した多変量的特徴のマルチプレックス化と定量がいずれも可能になります。

イルミナ技術：HiSeq

Hiatt J. B., Pritchard C. C., Salipante S. J., O' Roak B. J. and Shendure J. (2013) Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. Genome Res 23: 843-854

細胞集団の遺伝的多様性を検出し定量することは、微生物の進化からヒトがん遺伝学に至るさまざまな分野において根本的に重要です。本稿は smMIP について発表したものです。smMIP とは、シングル分子タギング法と分子反転プローブ法を組み合わせたアッセイで、サブクローン遺伝的変異の高度にマルチプレックス化された超高精度の検出と定量を可能にします。このアッセイは、迅速なシーケンスを行うイルミナの MiSeq プラットフォームを基盤としています。著者らは、このアッセイでは、約 0.2% という低頻度でも高度な定量化が可能で、少なくとも 1% の頻度まで高精度かつ特異的に変異を検出できることを示しています。本稿は、smMIP アッセイの迅速なデータ収集に適した実用性、マルチプレックス/スケーリング能力、そしてデスクトップシーケンスとの互換性について記述した初めての論文です。

イルミナ技術：MiSeq、HiSeq

Ni X., Zhuo M., Su Z., Duan J., Gao Y., et al. (2013) Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 21083-21088

CTC の同定と研究に大きな関心が寄せられています。原発腫瘍由来の細胞が血流に入り、転移を播種することがあります。そのような解析にとって主な障壁となるのが、シングルセルから得られる DNA インプット量が少なさと、それに伴うカバレッジの低下です。この研究では、アニーリングとルーピングをベースとする複数の増幅サイクル (MALBAC) を用いて、肺がん患者由来シングル CTC の WGA シーケンスを行いました。著者らは、がんのサブタイプが同じ患者に同一の CNV を同定しました。がんに関するこのような情報は、薬剤耐性やがんのサブタイプを特定するのに役立つ可能性があり、個別治療につながる診断手段となり得ます。

イルミナ技術：MiSeq、HiSeq

Wang Y., Waters J., Leung M. L., Unruh A., Roh W., et al. (2014) Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. Nature 512:155-60

Heitzer E., Ulz P., Belic J., Gutsch S., Quehenberger F., et al. (2013) Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. Genome Med 5: 30

Pan X., Durrett R. E., Zhu H., Tanaka Y., Li Y., et al. (2013) Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 594-599

Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G., et al. (2013) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. Nat Methods 10: 1096-1098

Potter N. E., Ermini L., Papaemmanuil E., Cazzaniga G., Vijayaraghavan G., et al. (2013) Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. Genome Res 23: 2115-2125

Strino F., Parisi F., Micsinai M. and Kluger Y. (2013) TrAp: a tree approach for fingerprinting subclonal tumor composition. Nucleic Acids Res 41: e165

メタゲノミクス

シングルセルの研究により、ポピュレーションシーケンスでは見落とされてしまう可能性のある少量の菌種の同定が可能になり、微生物群集を極限の分解能で研究できるようになります¹⁸。シングルセルシーケンスは、*in vitro*での培養が困難な菌の特徴を明らかにするのに有効なアプローチでもあります。シングルセルシーケンスの進歩により、集団発生、抗生物質耐性株、食品媒介病原菌および環境菌または腸内菌の多様性の検出や解析が向上しました^{19, 20, 21}。

また、個々の細胞から抽出したRNAを解析すれば、あるコミュニティ内の特定の微生物の活動や役割分担が明らかになるはずですが²²。ポピュレーションシーケンスでは、これらのメカニズムを混合的に解明することはできても、どのような転写動態が生じているのかを明確に捉えることはできません²⁴。一方、シングルセルシーケンスでは、シスおよびトランスのメカニズムの個々の役割や、これらの役割と同期周期的な遺伝子活性化との関連性を明らかにすることができます²⁴。シングルセルシーケンスでは、培養不能な微生物を同定できるだけでなく²³、シスおよびトランスの作用メカニズムを介して振動的に作用する転写レベルでの遺伝子活性化を観察することもできます^{20, 21, 24}。



シングルセルシーケンスおよびメタトランスクリプトミクスは、それぞれの微生物が周囲の環境にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにするのに役立つ可能性があります。

「微生物学の歴史の初期段階では、細菌に関する我々の知識は、主に培養で増殖できるとごく一部の種に関するものに限られていた。」 Lasken RS et al. 2012

総説

Bergholz T. M., Moreno Switt A. I. and Wiedmann M. (2014) Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? Trends Microbiol 22: 275-281

Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., Krueger F., Saadeh H., et al. (2014) Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. Nat Methods 11: 817-820

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. Curr Opin Biotechnol 25: 114-123

18. Yilmaz S. and Singh A. K. (2012) Single cell genome sequencing. Curr Opin Biotechnol 23: 437-443
19. Bergholz T. M., Moreno Switt A. I. and Wiedmann M. (2014) Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? Trends Microbiol 22: 275-281
20. Stepanauskas R. (2012) Single cell genomics: an individual look at microbes. Curr Opin Microbiol 15: 613-620
21. Yilmaz S. and Singh A. K. (2012) Single cell genome sequencing. Curr Opin Biotechnol 23: 437-443
22. Islam S., Zeisel A., Joost S., La Manno G., Zajac P., et al. (2014) Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. Nat Methods 11: 163-166
23. Lasken R. S. (2012) Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. Nat Rev Microbiol 10: 631-640
24. Coulon A., Chow C. C., Singer R. H. and Larson D. R. (2013) Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. Nat Rev Genet 14: 572-584

Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427

Bryant J. M. (2013) Culture-free club. *Nat Rev Microbiol* 11: 434

Coulon A., Chow C. C., Singer R. H. and Larson D. R. (2013) Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. *Nat Rev Genet* 14: 572-584

参考文献

Embree M., Nagarajan H., Movahedi N., Chitsaz H. and Zengler K. (2014) Single-cell genome and metatranscriptome sequencing reveal metabolic interactions of an alkane-degrading methanogenic community. *ISME J* 8: 757-767

微生物群の生化学的過程は多様性に富んでいるため、メタゲノミクスアプローチでは、個々の微生物の主たる機能を明らかにすることはほとんどできません。この研究では、まず、イルミナの Genome Analyzer でシングルセルシーケンスを行って、*Smithella* 属に属する優性な細菌メンバーのゲノム配列を明らかにすることにより、微生物群の解析を行いました。*Smithella* のゲノム概要配列を明らかにした後、著者らは少量インプットでメタトランスクリプトミクスを行って、アルカン分解過程において活性である遺伝子を同定しました。その後、著者らは、ゲノムデータとトランスクリプトームデータを統合するためのゲノムスケール代謝モデルを構築しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer, MiSeq

Kaster A. K., Mayer-Blackwell K., Pasarelli B. and Spormann A. M. (2014) Single cell genomic study of Dehalococcoidetes species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *ISME J* 8:1831-42

脱ハロゲン細菌であるクロロフレクサス門 (*Dehalococcoidetes*) は、もともとは還元的脱ハロゲン化を媒介する主要微生物として発見されました。クロロフレクサス門は、さまざまな陸環境における唯一のエネルギー保存様式として、自らの還元的脱ハロゲン酵素 (Rdh) を介して還元的脱ハロゲン化を媒介します。この研究では、ペルー沿岸とその他の太平洋海域から採取したいくつかの深海底堆積物から total DNA を抽出し、PCR 法およびナノリットル qPCR 法により、*Dehalococcoidetes* 16S の rRNA 遺伝子および rdh 遺伝子の有無について解析を行いました。セルソーティングとイルミナの HiSeq システムを用いたシングルセルゲノムシーケンス用に、ペルー沿岸の海溝から採取したサンプルを選択しました。このうち、2 つのシングルセルを現地の *Dehalococcoidetes* 群集に属すると判定し、1.38Mb のゲノムにアセンブルしました。その完全度は約 85% でした。

イルミナ技術: HiSeq

Mason O. U., Scott N. M., Gonzalez A., Robbins-Pianka A., Baelum J., et al. (2014) Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J* 8: 1464-1475

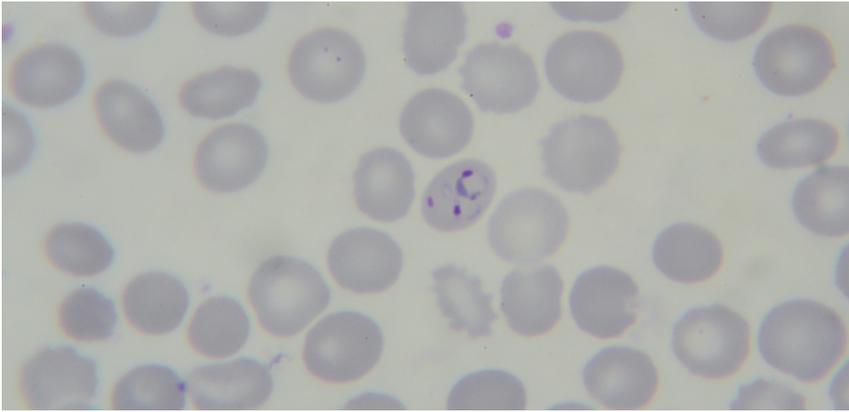
2010 年初期に発生したディープウォーター・ホライズン (DWH) 原油流出事故により、約 410 万バレルの原油がメキシコ湾に流出しました。このうち、22% 以上の原油が未回収のままとなっています。この研究では、流出海域周辺の表面堆積物中に生息する海洋微生物群への影響を、流出前後において検討しました。著者らは、イルミナの HiSeq を用いて、14 サンプルのメタゲノムショットガンシーケンスと、計 64 サンプルの 16S rRNA 遺伝子のターゲットシーケンスを行いました。その結果、原油により最も大きな影響を受けた堆積物が、未培養ガンマプロテオバクテリアおよびコルウェリア種で濃縮されていたことを確認しました。また、この解析により、米国環境保護庁 (EPA) の多環芳香族炭化水素 (PAH) 基準値を超えるサンプルでは、そうでないサンプルに比べて、脱窒経路に関わる多数の遺伝子が増加していることが明らかになりました。

イルミナ技術: HiSeq

Nair S., Nkhoma S. C., Serre D., Zimmerman P. A., Gorena K., et al. (2014) Single-cell genomics for dissection of complex malaria infections. *Genome Res* 24: 1028-1038

治療計画や予防計画の中心となる抗マラリア化学療法は、薬剤耐性によって計画の奏功が大きく阻害されてしまうことがあります。この研究において、著者らは、マラリア感染の宿主内多様性を明らかにする目的で、サンプルのシングルセルシーケンスおよびジェノタイプングを行いました。このアプローチを用いて、著者らは、熱帯熱マラリア原虫感染 MKK2664 内の 4 種類の薬剤耐性ハプロタイプを観察しました。著者らは、三日熱マラリア原虫感染および熱帯熱マラリア原虫感染の複雑性を解明するために、このシングルセルゲノミクスアプローチを用いて、患者の血液から直接、寄生虫ゲノム配列を構築できることを実証しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000



Malaria parasite under microscope (1,000x)

Wang F. P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., et al. (2014) Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. ISME J 8: 1069-1078

メタンの嫌気性酸化 (AOM) を引き起こす微生物について盛んに研究が行われていますが、詳細な機構に関する情報は得られていません。この研究では、イルミナの Genome Analyzer を用いて単一凝集体のシーケンスを行い、メタン酸化古細菌 ANME-2a 優勢の高活性 AOM 濃縮物のゲノムについて検討しました。CO₂ からメタンを生成する 7 つの過程に必要な遺伝子がすべて存在し、活発に発現していることが確認されました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Dodsworth J. A., Blainey P. C., Murugapiran S. K., Swingle W. D., Ross C. A., et al. (2013) Single-cell and metagenomic analyses indicate a fermentative and saccharolytic lifestyle for members of the OP9 lineage. Nat Commun 4: 1854

この研究は、シングルセルシーケンスとメタゲノムシーケンスを組み合わせて、ある新規の細菌種の特徴を明らかにした成功例の 1 つです。OP9 細菌系統は、地熱系、石油貯留層、嫌気性消化装置および汚水処理設備に認められます。この系統発解析により、OP9 は新規の門である Atribacteria であることが示唆されています。この細菌系統の代謝系を再構築することで、熱環境でのセルロース異化を可能にすると考えられる糖発酵に基づいた嫌気性代謝が示唆されます。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Kamke J., Sczyrba A., Ivanova N., Schwientek P., Rinke C., et al. (2013) Single-cell genomics reveals complex carbohydrate degradation patterns in poribacterial symbionts of marine sponges. ISME J 7: 2287-2300

多くの海洋性海綿動物は、これらの動物の細胞外マトリックス中に存在する高密度かつ系統発生的に多様な微生物群の宿主です。シングルセルシーケンスを行って、ほぼ海綿動物にのみ認められる 3 つの系統発生的グループの代表である 5 個のポリバクテリア細胞の代謝能を調べました。

イルミナ技術: HiSeq、Genome Analyzer_{IIx}

McLean J. S., Lombardo M. J., Ziegler M. G., Novotny M., Yee-Greenbaum J., et al. (2013) Genome of the pathogen Porphyromonas gingivalis recovered from a biofilm in a hospital sink using a high-throughput single-cell genomics platform. Genome Res 23: 867-877

捉えどころのない門候補である TM6 は、これまでに培養の成功例がなく、その特徴は明らかにされていません。この研究では、院内バイオフィーム由来の TM6 群集のシーケンスを行いました。著者らは、単一フローでソーティングされた細胞から成る小規模なランダムプールを複数選択して、シーケンスによりミニメタゲノムを作製しました。最近開発されたシングルセルアセンブラーである SPAdes に、コンティグ・ピニング手法を組み合わせることにより、これらのミニメタゲノムからゲノムを再構築することに成功しました。このアプローチをさらにその他の環境に応用すれば、捉えどころのない少量の微生物のゲノムを捕獲・構築できる確率が大いに高まる可能性があります。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

- Fitzsimons M. S., Novotny M., Lo C. C., Dichosa A. E., Yee-Greenbaum J. L., et al. (2013) Nearly finished genomes produced using gel microdroplet culturing reveal substantial intraspecies genomic diversity within the human microbiome. *Genome Res* 23: 878-888
- Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G., Kjeldsen K. U., Lever M. A., et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* 496: 215-218
- Malmstrom R. R., Rodrigue S., Huang K. H., Kelly L., Kern S. E., et al. (2013) Ecology of uncultured *Prochlorococcus* clades revealed through single-cell genomics and biogeographic analysis. *ISME J* 7: 184-198
- McLean J. S., Lombardo M. J., Badger J. H., Edlund A., Novotny M., et al. (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: E2390-2399
- Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A. A., Korobeynikov A., et al. (2013) Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 20: 714-737
- Reyes A., Wu M., McNulty N. P., Rohwer F. L. and Gordon J. I. (2013) Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20236-20241
- Rusch D. B., Lombardo M. J., Yee-Greenbaum J., Novotny M., Brinkac L. M., et al. (2013) Draft Genome Sequence of a Single Cell of SAR86 Clade Subgroup IIIa. *Genome Announc* 1:
- Taghavi Z., Movahedi N. S., Draghici S. and Chitsaz H. (2013) Distilled single-cell genome sequencing and de novo assembly for sparse microbial communities. *Bioinformatics* 29: 2395-2401

幹細胞

生命は1個の細胞から始まり、その後の細胞有糸分裂を通して、人体を構成する細胞集団が形成されていきます²⁵。それぞれの幹細胞が、それぞれの遺伝暗号によって決定づけられている特定の系譜を選択し、それぞれに固有の異種細胞集団を生み出しながら環境に応答しています²⁶。生命の初期段階かつ分化過程にあるこれらの単一幹細胞のシーケンスは、幹細胞がどのように環境に応答し、どのように特定の系譜を選択しているのかを解明するのに役立ってきました^{28, 29, 30, 31}。

単一の細胞が分化して集団を形成すると、これらの細胞は体細胞変異を獲得し、特定の表現型となります²⁷。また、これらの細胞はエピゲノムレベルで大きく異なり²⁸、それによってRNA発現量、そして最終的には細胞表現型が決まります²⁹。シングルセルシーケンスにおける進歩は、特有の表現型を導き出す特定の細胞に特有な遺伝的多様性、エピジェネティクスの多様性、そして表現型の多様性^{30, 31}を解明するのに役立ってきました。

特定の発生段階にある特定の単一細胞種のRNA発現プロファイルが明らかになったことで、組織のリバースエンジニアリングが可能になりました^{27, 31}。発生過程にある単一細胞のRNA-Seqプロファイリングは、系譜の特定化を決定づけるタンパク質発現の変化を明らかにするための手掛かりとなります^{27, 31}。シーケンスを行うことで、発生過程において連続的かつ組織特異的な順序で系譜の特定化を引き起こす転写因子、RNA種、受容体およびリガンドを明らかにし、細胞系譜を特定してそれを遡ることができます^{31, 32}。幹細胞の研究にシングルセルDNA/RNAシーケンスを用いることにより、発生、組織分化、疾患および創薬を理解するための大きな手掛かりが新たに得られつつあります³²。

「シングルセルは、生命の基本単位である。
そのため、シングルセルを解析することは、
単に測定の精度が高まるだけでなく、
生物学に関するより基本的な知識が
決定的かつ飛躍的に深まることにつながる。」

Shapiro E. et al. 2013

25. Speicher M. R. (2013) Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med* 5: 74
26. Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S. L., Marshall J., et al. (2013) Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res* 41: 6119-6138
27. Streets A. M., Zhang X., Cao C., Pang Y., Wu X., et al. (2014) Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7048-7053
28. Guo H., Zhu P., Wu X., Li X., Wen L., et al. (2013) Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* 23: 2126-2135
29. Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597
30. Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126
31. Treutlein B., Brownfield D. G., Wu A. R., Neff N. F., Mantalas G. L., et al. (2014) Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509: 371-375
32. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

総説

Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Maseeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

Speicher M. R. (2013) Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med* 5: 74

参考文献

Behjati S., Huch M., van Boxtel R., Karthaus W., Wedge D. C., et al. (2014) Genome sequencing of normal cells reveals developmental lineages and mutational processes. *Nature* 513: 422-425

胚から成熟動物への発達過程では、起源細胞が分裂し、これらの細胞の遺伝子発現によって特定されるさまざまな組織になります。動物の加齢に伴い、個々の細胞は変異を獲得します。この研究では、健康なマウスのさまざまな組織において獲得された体細胞変異の解析が、発生系譜樹を明らかにするための手掛かりとなり得るかについて検討しました。著者らは、イルミナの MiSeq を用いて、2 匹のマウスから採取した 12 種類の成熟細胞の全ゲノムのシーケンスを行いました。それぞれの細胞によって蓄積された変異の数および種類に差が認められました。これらの差は、細胞分裂数が異なっていること、そしてさまざまな変異過程がそれぞれに異なる影響をもたらしていることを反映していると思われる。

イルミナ技術：MiSeq

Boroviak T., Loos R., Bertone P., Smith A. and Nichols J. (2014) The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* 16: 516-528

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) はマウス内部細胞塊 (ICM) から生じます。ES 細胞は培養下において完全な発生能を保持します。この研究は、*in vivo* における ES 細胞の正確な起源と、これらの ES 細胞の ICM 細胞との関係性を明らかにすることを目的としたものです。著者らは、イルミナの HiSeq シーケンサーを用いて、初期胚細胞発現のプロファイリングをシングルセルレベルで行いました。その結果、胚盤葉上層の形成が、*in vitro* における ERK 非依存的自己複製能と一致しており、また結果的に ES 細胞系として増殖することと一致することが示唆されました。

イルミナ技術：HiSeq 2000

Carter A. C., Davis-Dusenbery B. N., Koszka K., Ichida J. K. and Eggan K. (2014) Nanog-Independent Reprogramming to iPSCs with Canonical Factors. *Stem Cell Reports* 2: 119-126

ES 細胞および人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) における多能性の確立には転写因子 Nanog が不可欠であることが示唆されてきました。しかし、多能性状態に至る経路は多種多様に存在します。この研究では、イルミナの HiSeq を用いた RNA シーケンスにより分化過程における iPS 細胞の特徴を明らかにし、マウス線維芽細胞のリプログラミングに Nanog が必要であるかを検証しました。著者らは、キメラマウスの生殖系列に効果的に貢献する Nanog (-/-) 線維芽細胞から iPS 細胞を再現性良く作製することが可能であることを示しました。著者らは、Nanog は重要なリプログラミングメディエーターであると考えられるものの、マウスにおける多能性の確立には不要であると結論づけました。

イルミナ技術：HiSeq 2500

Corces-Zimmerman M. R., Hong W. J., Weissman I. L., Medeiros B. C. and Majeti R. (2014) Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2548-2553

がんは、単一の細胞系譜において遺伝子病変が連続的に獲得されることとして、広く特徴付けられます。この研究は、AML の原因となる、HSC における変異の獲得について検討したものです。著者らは、これらの細胞の変異プロファイルの特徴を明らかにするため、イルミナの HiSeq を用いた全エクソームシーケンスを行いました。そして、「増殖」遺伝子の変異が AML 発生後期に生じるのに対し、「landscaping」遺伝子 (DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチンループ形成などの全般的なクロマチン変化に関与する遺伝子) の変異が AML の発生初期に生じることを発見しました。

イルミナ技術：HiSeq 2000

Hasemann M. S., Lauridsen F. K., Waage J., Jakobsen J. S., Frank A. K., et al. (2014) C/EBP α is required for long-term self-renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors. *PLoS Genet* 10: e1004079

C/EBP α は、よく知られた骨髄分化誘導因子です。C/EBP α は HSC において低レベルに発現し、HSC において何らかの機能を果たすことが広く議論されています。この研究において、著者らは、C/EBP α が細胞の再生、分化、休止および生存に及ぼす影響について検討しました。著者らは、イルミナの ChIP-Seq を用いて、C/EBP α の発現をエピジェネティックな構成と関連付けました。著者らは、C/EBP α が HSC の機能にとって重要な分子経路に属する遺伝子のエピジェネティックな状態の調節に作用することを示しました。

イルミナ技術：HiSeq 2000 and Genome Analyzer_{IIx}

Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 11: 190-196

細胞混合物から抽出した RNA に依存する RNA シーケンス法では、同一組織細胞間での個々の発現のばらつきは明確になりません。本稿において著者らは、シングルセル研究に応用できる *in vivo* トランスクリプトーム解析 (TIVA) について発表しています。イルミナのシーケンス技術を組み合わせ、著者らは培養と *in vivo* の双方でシングルニューロン間のトランスクリプトーム変動を捕らえ、解析しています。しかもこの方法は非侵襲的であり、インタクトな組織に応用できる可能性があります。この方法により、これまで困難とされてきた、複雑な組織の細胞不均質性の詳細な研究が可能となり、*in vivo* 生体機能イメージングとの併用が可能になります。

イルミナ技術: HiSeq

Shalek A. K., Satija R., Shuga J., Trombetta J. J., Gennert D., et al. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510: 363-369

遺伝子発現は個々の細胞間で大きく異なっている可能性があり、ごく最近、シングルセルの発現を観察するゲノムプロファイリング手法が開発されました。この研究では、イルミナの HiSeq で Smart-Seq シングルセル RNA シーケンスを行って、リポ多糖に対してマウス骨髄由来樹状細胞 (BMDC) の応答が不均一であることについて検討を行いました。著者らは、メッセンジャー RNA の存在量パターンおよびスプライシングパターンに広範囲な二峰性変動が存在することを発見し、その後一部の転写産物について RNA-FISH 法によるバリデーションを行いました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Streets A. M., Zhang X., Cao C., Pang Y., Wu X., et al. (2014) Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7048-7053

シングルセル全トランスクリプトーム解析は、細胞集団における遺伝子発現の多様性を定量化するための強力なツールです。この研究は、シングルセル全トランスクリプトーム解析のためのマイクロフルイディックプラットフォームで行うシングルセル RNA-Seq 法に関する計画を示すものです。このアプローチでは、二本鎖 cDNA を回収し、イルミナの HiSeq 2500 でシーケンスを行います。著者らは、この手法をシングルマウス胚細胞に用い、バルクトランスクリプトームの大多数がわずか 10 個のシングルセルから再構築できることを実証しました。このアプローチを用いて、著者らは、さまざまなマウス胚細胞種間およびこれらの細胞内の多様性を定量化しました。

イルミナ技術: HiSeq 2500

Trapnell C., Cacchiarelli D., Grimsby J., Pokharel P., Li S., et al. (2014) The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 32: 381-386

個々の細胞は、同一組織中でさえも、大きな発現多様性を示します。この研究は、新たな計算ツール、Monocle に関するものです。このツールは、RNA-Seq により分析した個々の細胞の発現プロファイルの時間的秩序をクラスター化し、明らかにするためのものです。著者らは、イルミナの HiSeq 2500 を用いたシングルセルトランスクリプトームシーケンスによる初代ヒト筋芽細胞の分化に独自の手法を応用しました。著者らの解析により、主要調節因子の発現にスイッチ様の変化が生じていることが明らかになりました。このツールを高スループットのシングルセルシーケンスと組み合わせれば、転写調節と遺伝子調節のネットワークを明らかにするための手掛かりが得られる可能性があります。

イルミナ技術: RNA-Seq 用 HiSeq 2500 100 bp ペアエンドリード

Treutlein B., Brownfield D. G., Wu A. R., Neff N. F., Mantalas G. L., et al. (2014) Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509: 371-375

哺乳類肺細胞の前駆細胞は、独特な系譜に沿って発生します。前駆細胞の成熟肺細胞種への分化について調べる目的で、この研究では、発生過程にあるシングルセルから、遺伝子発現についての検討を行いました。著者らは、イルミナのシーケンサーにより、4 つの分化段階にある 198 個の細胞のマイクロ流体シングルセルトランスクリプトーム解析を行いました。著者らは、これらの細胞を発現量に基づいてそれぞれに異なるグループに分類し、肺泡 2 型細胞の系譜の完全な生活環を明らかにしました。

イルミナ技術: Nextera XT, HiSeq

Xia H., Bodempudi V., Benyumov A., Hergert P., Tank D., et al. (2014) Identification of a cell-of-origin for fibroblasts comprising the fibrotic reticulum in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 184: 1369-1383

著者らは、特発性肺線維症 (IPF) 患者の肺に、線維化を媒介する線維芽細胞を起源とする、病的な間葉系前駆細胞が存在することを示しました。これらの線維形成間葉系前駆細胞とその後代は、これまでに探索されていない薬剤標的となります。

イルミナ技術: RNA-Seq 用 HiSeq 2000

Guo H., Zhu P., Wu X., Li X., Wen L., et al. (2013) Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* 23: 2126-2135

DNAメチル化は、遺伝子発現調節における重要な部分であり、同一組織内でも細胞間で異なります。この研究は、塩基解像度でのシングルセルのメチローム解析の手法に関するものです。著者らは、シングルセルRRBS (Reduced-Representation Bisulfite Sequencing) 用ライブラリーを作製して、イルミナのHiSeq 2000によりシーケンスを行いました。マウスES細胞の解析において、著者らは、第一極体のメチロームが、同一配偶子内の第2分裂中期の卵母細胞のメチロームに匹敵することを初めて示しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., et al. (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 14: R31

個々の細胞は、同じゲノムを共有していたとしても、異なった遺伝子発現を示すことがあります。遺伝子発現における個々の細胞について解析を行うには、バイアスが最小限に抑えられた、信頼性の高いプロトコールが必要になります。本稿は、イルミナのシーケンス法をベースとする新規のシングルセルRNA-Seq手法であるQuartz-Seqについて発表したもので、既存の手法に比べ、プロトコールが簡潔で、再現性および精度も高くなっています。著者らは、主に、1) 副産物の生成を抑えられるようにプロトコールを最適化、2) 単一チューブ反応を可能にする信頼性の高いPCR酵素を同定、3) RTおよび第2鎖合成のための最適条件を設定、の3つの点に改良を加えました。

イルミナ技術: TruSeq RNA, HiSeq

Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S. L., Marshall J., et al. (2013) Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res* 41: 6119-6138

DNAの多様性と存在量の研究を目的とする高スループット技術は、高精度解析に一定量の試料のインプットが必要となるため困難とされてきました。本稿において、著者らは、WGA後にシングルセルのペアエンドシーケンス解析を行えば、切断点を正確に描写して、数十キロベースから数メガベースの大きさのDNA CNVを検出できることを実証しています。また、この研究は、ヒト胚由来のシングルセルに基づいて、塩基解像度に対応した染色体間再編成のマッピングを行った最初の解析についても報告しています。

イルミナ技術: HiSeq, Genome Analyzer_{IIx}

Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597

哺乳類の着床前発生の遺伝子調節メカニズムについて、その特徴を明らかにし、このメカニズムを詳しく分析することを目的として、この研究では、シングルセルの全トランスクリプトームシーケンスを用いて、ヒトおよびマウスに由来する初期胚の検討を行いました。著者らは、多型転写産物の重要部分の新たな段階特異的モノアリル発現パターンについて報告しています。種間比較により、ヒトでは段階特異的モジュールの大多数(9個中7個)が保存されたものの、発生の特異性とタイミングはヒトとマウスとの間で異なることが明らかになりました。

イルミナ技術: HiSeq

Eckersley-Maslin M. A., Thybert D., Bergmann J. H., Marioni J. C., Flicek P., et al. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell* 28: 351-365

ランダム常染色体モノアリル遺伝子発現とは、2つの相同アリルのうちの一方に由来する遺伝子の転写を指します。この研究では、イルミナのシーケンサーを用いたアリル特異的RNA-Seqスクリーニングにより、マウス細胞株におけるモノアリル発現メカニズムの検討を行いました。著者らは、モノアリルに発現したランダムな遺伝子を多数同定し、DNAメチル化と核局在のいずれにおいても活性アリルと不活性アリルが区別されないことを発見しました。しかし、著者らは、特定のヒストン修飾の濃縮に相関性が存在することを発見しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer

Shetzer Y., Kagan S., Koifman G., Sarig R., Kogan-Sakin I., et al. (2014) The onset of p53 loss of heterozygosity is differentially induced in various stem cell types and may involve the loss of either allele. *Cell Death Differ* 21: 1419-1431

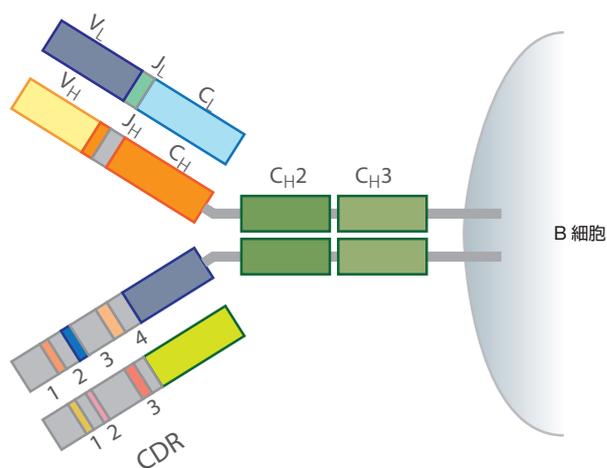
Yan L., Yang M., Guo H., Yang L., Wu J., et al. (2013) Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1131-1139

免疫学

免疫系は多数の細胞種で構成されており、それぞれの細胞種が免疫応答においてそれぞれに特有の役割を果たしています。これらの細胞は、通常、表面特性に基づいて分離されます。分離システムには限界が存在するため、分離された細胞は依然として、さまざまな発生段階または活性段階にある混合集団で構成されています。シングルセルシーケンスでは、細胞が固有の発現パターンを有しているか、またこれらの細胞内の遺伝子が固有のスプライスバリエントを有しているかを判断することができます³³。

B細胞レパートリー

抗体は、発生的に順序付けられた一連の体細胞遺伝子再構成現象によって産生されます。これは発生途中のB細胞だけに起こる現象であり、生命体の生涯を通して続きます。抗体は重鎖と軽鎖で構成されており、これらはジスルフィド結合で結合しています。抗原-リガンド結合の特異性は、重鎖と軽鎖（すなわちVHとVL）両方の可変領域の組合せによって決まります。通常どのB細胞にも、重鎖と軽鎖が固有のペアとなって存在します。これらの重鎖と軽鎖のペアは、ゲノムのさまざまな部分に存在する遺伝子によりコードされます。抗原-リガンド特異性を最も高い確実性で予測するためには、シングルB細胞においてVH遺伝子がVL遺伝子とペアになっている必要があります³⁴。



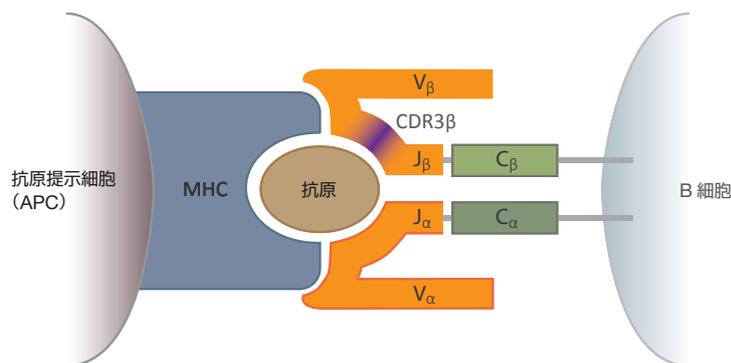
初代抗体重鎖レパートリーは、主に可変遺伝子断片の体細胞再構成によって産生されます。再構成によって重鎖が産生されると、軽鎖の再構成が起こり、H鎖とL鎖のヘテロ二量体ペアリングによって完全な抗体が形成されます³⁵。

「T細胞およびB細胞の抗原受容体をコードする遺伝子座は、ゲノム内で最も高い複雑性を有し、最も深くかつ広くヒトの生物学に關与する遺伝子座である。」 Woodsworth DJ et al. 2013

33. Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublot J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240
34. Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168
35. Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168

T細胞レパートリー

B細胞と同様に、機能性T細胞受容体（TCR）は、 α 鎖と β 鎖から成るヘテロ二量体タンパク質です。どのT細胞にも、 α 鎖と β 鎖が固有の組合せで存在し、これらのペアが、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）によって提示されたペプチドリガンドを特定します^{36, 37}。これまでに、細胞溶解の過程で α 鎖と β 鎖のペアリングが破壊されるのを回避するシングルセルシーケンス手法がいくつか開発されてきました^{38, 39}。



T細胞受容体 - 抗原 - ペプチド - MHC 相互作用と TCR 遺伝子の再構成抗原提示細胞が、MHC に結合したペプチド抗原を提示します。TCR（オレンジ色）は抗原と MHC の両方に結合します。相補性決定領域3（CDR3）を紫色で示しています⁴⁰。

レパートリーシーケンスについての詳細は、TCR シーケンスの項をご参照ください。

総説

Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168

Finn J. A. and Crowe J. E., Jr. (2013) Impact of new sequencing technologies on studies of the human B cell repertoire. *Curr Opin Immunol* 25: 613-618

Robins H. (2013) Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol* 25: 646-652

Warren E. H., Matsen F. A. t. and Chou J. (2013) High-throughput sequencing of B- and T-lymphocyte antigen receptors in hematology. *Blood* 122: 19-22

Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013)

参考文献

Corces-Zimmerman M. R., Hong W. J., Weissman I. L., Medeiros B. C. and Majeti R. (2014) Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2548-2553

がんは、単一の細胞系譜において遺伝子病変が連続的に獲得されることとして、広く特徴付けられます。この研究は、AMLの原因となる、HSCにおける変異の獲得について検討したものです。著者らは、これらの細胞の変異プロファイルの特徴を明らかにするため、イルミナのHiSeqを用いた全エクソームシーケンスを行いました。そして、「増殖」遺伝子の変異がAML発生後期に生じるのに対し、「landscaping」遺伝子（DNAメチル化、ヒストン修飾、クロマチンループ形成などのクロマチン全体の変化に関与する遺伝子）の変異がAMLの発生初期に生じることを発見しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

36. Birnbaum M. E., Mendoza J. L., Sethi D. K., Dong S., Glanville J., et al. (2014) Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* 157: 1073-1087
37. Mandl J. N. and Germain R. N. (2014) Focusing in on T cell cross-reactivity. *Cell* 157: 1006-1008
38. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
39. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515
40. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98

de Almeida P. E., Meyer E. H., Kooreman N. G., Diecke S., Dey D., et al. (2014) Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. Nat Commun 5: 3903

iPS細胞は、臓器修復などの個別治療のための治療用細胞源となる可能性を大いに秘めています。しかし、iPS細胞によって誘発される免疫応答については、ほとんど明らかにされていません。この研究では、移植片免疫応答に関与する諸因子の発現の特徴を明らかにする目的で、イルミナのMiSeqでターゲットシーケンスを行って、iPS細胞移植用マウスモデルにおけるiPS細胞由来内皮細胞の免疫応答を検討しました。著者らは、免疫応答を自家iPS細胞由来内皮細胞と未分化iPS細胞との間で比較し、iPS細胞は分化により免疫原性を失い、耐性が誘発されると結論づけました。

イルミナ技術：MiSeq

Han A., Glanville J., Hansmann L. and Davis M. M. (2014) Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. Nat Biotechnol 32: 684-692

各T細胞に発現するTCRは、体細胞V(D)J再構成により、極めて多様となっています。この研究において、著者らは、個々の細胞に発現したTCRの特徴を明らかにする手法を導入して、その抗原特異性と細胞系譜を特定しています。著者らは、イルミナのMiSeqプラットフォームでターゲットTCRシーケンスを行って、個々のTCR α -TCR β ペアに関する情報を解明しました。このアプローチは、Tリンパ球浸潤性ヒト結腸直腸がんのクローン系譜および分化の研究に応用されました。

イルミナ技術：MiSeq

Obata Y., Furusawa Y., Endo T. A., Sharif J., Takahashi D., et al. (2014) The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. Nat Immunol 15: 571-579

腸内細菌に対する過剰な免疫応答を抑制するには腸内制御性T細胞(Treg細胞)が必要です。この研究では、腸内微生物叢への曝露下でのDNAメチル化の状態および制御について検討を行いました。著者らは、イルミナのHiSeqを用いて、DNAメチル化アダプターであるUhrf1のT細胞特異的欠損を有するマウスを調べました。著者らは、この欠損を有するマウスが腸内制御性T細胞の増殖異常を示し、重度の大腸炎を発症することを発見しました。著者らは、腸内の免疫学的恒常性を維持するエピジェネティックな機序にはUhrf1が必要であると結論づけました。

イルミナ技術：HiSeq 1000

Shugay M., Britanova O. V., Merzlyak E. M., Turchaninova M. A., Mamedov I. Z., et al. (2014) Towards error-free profiling of immune repertoires. Nat Methods 11: 653-655

次世代シーケンスにより、獲得免疫系の研究においてゲノム多様性を解析するという新たな可能性が開かれました。本稿では、MIGECについて発表しています。MIGECは、イルミナのシーケンサーによってTCRレパートリーを明らかにする解析手法に改良を加えたものです。独自のバーコード標識を用いてPCR増幅を2回行うことにより、MIGECは、複雑な免疫レパートリー本来の多様性を完全に保持しながら、ほぼ完璧なエラー修正を可能にしています。

イルミナ技術：MiSeq、HiSeq

DeKosky B. J., Ippolito G. C., Deschner R. P., Lavinder J. J., Wine Y., et al. (2013) High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. Nat Biotechnol 31: 166-169

これまで、B細胞レパートリーが多様なため、VH-VLペアリングはB細胞集団の溶解過程で中断していました。この研究において、著者らは、シングルセルmRNAキャプチャー法、RT、これらのペアリングのエマルジョンVH-VL結合RT-PCRにより増幅を行いました。結合ペアリングのシーケンスにより、健康な末梢血中IgG陽性B細胞、破傷風トキソイドワクチン接種後に単離された末梢血中抗原特異的形質芽球、およびインフルエンザワクチン接種後のメモリーB細胞応答における固有の抗体クロータイプを同定しました。

イルミナ技術：MiSeq 2 x 250 bp

Han A., Newell E. W., Glanville J., Fernandez-Becker N., Khosla C., et al. (2013) Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells and gammadelta T cells in celiac disease. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 13073-13078

セリアック病は、食用グルテン/グルテン特異的なCD4陽性T細胞応答が原因で起こる腸の自己免疫疾患です。グルテン曝露に誘発されて、活性腸内ホーミングCD8陽性 $\alpha\beta$ および $\gamma\delta$ T細胞も末梢血に現れます。シングルセルTCRシーケンス解析の結果は、これらの両細胞集団が高度に集中したTCRレパートリーを有することを示しています。レパートリーがこのように集中的であることから、一般的には、抗原が誘発を引き起こしていることが分かります。

イルミナ技術：MiSeq ペアエンドシーケンス

Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublotme J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. Nature 498: 236-240

遺伝子発現は個々の細胞間で大きく異なっている可能性があり、ごく最近、シングルセルの発現を観察するゲノムプロファイリング手法が開発されました。この研究では、イルミナの HiSeq で Smart-Seq シングルセル RNA シーケンスを行って、リボ多糖に対してマウス BMDc の応答が不均一であることについて検討を行いました。著者らは、メッセンジャー RNA の存在パターンおよびスプライシングパターンに広範囲な二峰性変動が存在することを発見し、その後一部の転写産物について RNA-FISH 法によるバリデーションを行いました。

イルミナ技術: HiSeq

Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. Eur J Immunol 43: 2507-2515

著者らは、シングルセルベースの手法を用いて、 α および β 鎖 mRNA の逆転写、PCR 増幅、およびその後のオーバーラップ伸長法による融合によりエマルジョン液滴内にある天然の $\alpha\beta$ TCR CDR3 鎖ペアを検出することを提案しています。この PCR 抑制技術により、エマルジョン段階後に発生する高レベルノイズの原因となり得る遺伝子ペアのランダムなオーバーラップ伸長の問題が解消されます。著者らは、重鎖と軽鎖のペアで構成される抗体の未変性の可変部を特定するのに、この方法を応用できると提案しています。

イルミナ技術: MiSeq 2 x 150 bp

DeKosky B. J., Ippolito G. C., Deschner R. P., Lavinder J. J., Wine Y., et al. (2013) High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. Nat Biotechnol 31: 166-169

Nagano T., Lubling Y., Stevens T. J., Schoenfelder S., Yaffe E., et al. (2013) Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. Nature 502: 59-64

Pinto S., Michel C., Schmidt-Glenewinkel H., Harder N., Rohr K., et al. (2013) Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 110: E3497-3505

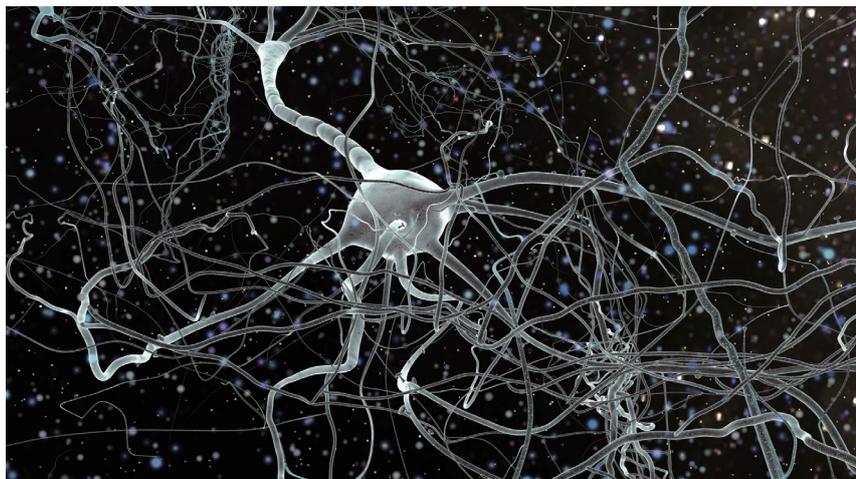
神経学

最近の研究の進歩により、脳の特定期領域を構成する細胞間にも CNV がみられることが明らかとなり、個々のニューロンのゲノムもモザイクであることに注目が集まっています⁴¹。脳内の遺伝的多様性は胎児の発育過程で生じるものの⁴²、このモザイク現象との機能的関連性は明確になっていません。正常な脳におけるモザイク現象の意義を発見するだけでなく、神経疾患や精神障害におけるその役割についても検討することは、興味深いことでしょう^{42, 43, 44, 45}。

細胞間の不均一性がどこに顕著に認められるのかをゲノムレベルで説明する研究は、まだ始まったばかりです。モザイク現象が単一細胞間の遺伝暗号に存在するとすれば⁴⁶、タンパク質発現、エピジェネティックな変化⁴⁷ および RNA アイソフォーム⁴⁸ にも多様性が存在すると考えられます。シングルセルシーケンスを行うことにより、収集したデータをより大きな統合的イメージに変換することができ、モザイク現象が特定の脳領域内の個々の細胞の表現型に及ぼす影響^{43, 44, 45} を明らかにするのに役立ちます。

「神経発達疾患をはじめとするがん以外の疾患において、体細胞変異が次々に同定されている。」

Podouri A et al. 2013



シングルセル RNA-Seq により、ニューロンにおけるモザイク現象の検出が可能になりました⁴¹。

総説

Chi K. R. (2014) Singled out for sequencing. *Nat Methods* 11: 13-17

Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

Poduri A., Evrony G. D., Cai X. and Walsh C. A. (2013) Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* 341: 1237758

41. McConnell M. J., Lindberg M. R., Brennand K. J., Piper J. C., Voet T., et al. (2013) Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* 342: 632-637
42. Iourov I. Y., Vorsanova S. G. and Yurov Y. B. (2012) Single cell genomics of the brain: focus on neuronal diversity and neuropsychiatric diseases. *Curr Genomics* 13: 477-488
43. Evrony G. D., Cai X., Lee E., Hills L. B., Elhosary P. C., et al. (2012) Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell* 151: 483-496
44. Poduri A., Evrony G. D., Cai X. and Walsh C. A. (2013) Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* 341: 1237758
45. Eberwine J. and Bartfai T. (2011) Single cell transcriptomics of hypothalamic warm sensitive neurons that control core body temperature and fever response Signaling asymmetry and an extension of chemical neuroanatomy. *Pharmacol Ther* 129: 241-259
46. Evrony G. D., Cai X., Lee E., Hills L. B., Elhosary P. C., et al. (2012) Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell* 151: 483-496
47. Lister R., Mukamel E. A., Nery J. R., Ulrich M., Puddifoot C. A., et al. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341: 1237905
48. Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

参考文献

Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 11: 190-196

細胞混合物から抽出した RNA に依存する RNA シーケンス法では、同一組織細胞間での個々の発現のばらつきは明確になりません。本稿において著者らは、シングルセル研究に応用できる *in vivo* トランスクリプトーム解析 (TIVA) について発表しています。イルミナのシーケンス技術を組み合わせて、著者らは培養と *in vivo* の双方でシングルニューロン間のトランスクリプトーム変動を捕らえ、解析しています。しかもこの方法は非侵襲的であり、インタクトな組織に応用できる可能性があります。この方法により、これまで困難とされてきた、複雑な組織の細胞不均質性の詳細な研究が可能となり、*in vivo* 生体機能イメージングとの併用が可能になります。

イルミナ技術: HiSeq 1000

Young G. T., Gutteridge A., Fox H. D., Wilbrey A. L., Cao L., et al. (2014) Characterizing Human Stem Cell-derived Sensory Neurons at the Single-cell Level Reveals Their Ion Channel Expression and Utility in Pain Research. *Mol Ther* 22: 1530-1543

痛みの生物学の研究は、感覚ニューロン細胞株が存在しないことから、一般的に動物モデルを用いて行われています。本稿において、著者らは、感覚ニューロン由来のヒト幹細胞について述べ、ポピュレーションシーケンスとシングルセルシーケンスの技術を併用して、詳細な分子的、電気生理学的、および薬理的フェノタイプングを行いました。誘導された分化を6週間にわたって観察し、イルミナの BeadArrays を用いて遺伝子発現の特徴付けを行いました。著者らは、これらの誘導ニューロンが、成熟後根神経節に由来するヒト感覚ニューロンと、分子的にも機能的にも同等であることを示しています。

イルミナ技術: BeadArrays

Lister R., Mukamel E. A., Nery J. R., Urich M., Puddifoot C. A., et al. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341: 1237-1245

DNA メチル化は、哺乳類の脳の発達と、学習および記憶を司る可塑性に関係しています。本稿は、ヒトおよびマウス前頭皮質における、生涯を通じた、DNA メチル化の単一塩基解像度でのゲノムワイドな組成、パターン形成、細胞特異性およびダイナミクスについて報告しています。イルミナの HiSeq を用いた ChIP-Seq と組み合わせて広範囲なメチロームプロファイリングを行い、単一塩基解像度でメチル化プロファイルを明らかにしました。

イルミナ技術: TruSeq RNA, TruSeq DNA, HiSeq

McConnell M. J., Lindberg M. R., Brennand K. J., Piper J. C., Voet T., et al. (2013) Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* 342: 632-637

ある生物種のゲノムは、細胞分裂後にエラーが生じたり、DNA が不均一に分布したりすることにより、個体間のみならず、母細胞および娘細胞間でも異なります。同一個体の体細胞間にそのような遺伝的多様性がどの程度存在するかは、これまで明らかにされていません。シングルセルシーケンスの進歩により、同一組織の細胞内における多様性を調べることが可能になりました。この研究では、イルミナの装置でゲノムワイドなシーケンスを行って、個々の神経細胞における CNV の検討を行いました。著者らは、同一組織の神経細胞間にも多数の CNV が存在することを発見しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}, MiSeq, Nextera DNA Sample Prep Kit

Pan X., Durrett R. E., Zhu H., Tanaka Y., Li Y., et al. (2013) Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 594-599

RNA-Seq による遺伝子発現プロファイリングは、特定の組織の分子活性を理解するための強力なツールです。しかし、組織内の遺伝子発現の多様性を調べるには、シングルセルからの RNA インプット量で実験可能な RNA-Seq 技術が不可欠です。この研究では、Phi29 DNA ポリメラーゼをベースとする mRNA トランスクリプトーム増幅 (PMA) 法と、セミランダムプライムド PCR をベースとする mRNA トランスクリプトーム増幅 (SMA) 法の、2 つの方法を採用しています。いずれの方法でも、イルミナのシーケンスを併用して、少ない RNA インプット量で発現を検出しています。いずれのプロトコールでも、十分なカバレッジでシングルセルからも多くの mRNA を検出出来ました。

イルミナ技術: HiSeq

創薬

標的性の高い薬剤は、対象となる機能細胞の細胞プロセスを調節することが予想されています。あいにく、組織は数多くの細胞種で構成されており、そのために生じる生物学的ノイズによって、対象となる特定の相互作用が打ち消されてしまう可能性があります。サンプルが単一の細胞種で構成されている場合でも、これらの細胞は細胞周期が同一ではなく、それによって微妙な応答や一過性の応答は覆い隠されてしまう可能性があります。さまざまな細胞種が、薬剤標的となり得る300~400もの遺伝子を発現しています。パーキンソン病に侵されたニューロンでは、疾患のさまざまな段階において、推定30~40の遺伝子が選択的に発現していると考えられています⁴⁹。次世代シーケンスを組み合わせたシングルセル解析は、生物学的システムを簡略化して創薬スクリーニングを向上させるためのツールとして大いに有望視されています^{50, 51}。

循環腫瘍細胞の解析も、ゲノム解析、薬理学的感受性評価、転移の可能性についての評価などを含みます⁵²。

微生物群集はジゴキシン⁵³やカンプトセシン⁵⁴などの薬剤の薬物動態を妨げます。微生物叢は可塑的であるため、生細胞療法と小分子の両方の標的となります⁵⁵。シングルセルゲノミクスも、急成長しているこの分野において、重要な役割を果たしています（メタゲノミクスの項参照）。

49. Eberwine J., Sul J. Y., Bartfai T. and Kim J. (2014) The promise of single-cell sequencing. *Nat Methods* 11: 25-27
50. Bartfai T., Buckley P. T. and Eberwine J. (2012) Drug targets: single-cell transcriptomics hastens unbiased discovery. *Trends Pharmacol Sci* 33: 9-16
51. Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123
52. Adalsteinsson V. A. and Love J. C. (2014) Towards Engineered Processes for Sequencing-Based Analysis of Single Circulating Tumor Cells. *Curr Opin Chem Eng* 4: 97-104
53. Haiser H. J., Gootenberg D. B., Chatman K., Sirasani G., Balskus E. P., et al. (2013) Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science* 341: 295-298
54. Wallace B. D., Wang H., Lane K. T., Scott J. E., Orans J., et al. (2010) Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 330: 831-835
55. Morgan X. C. and Huttenhower C. (2014) Meta'omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology* 146: 1437-1448 e1431

「シングルセル研究によって得られる精度および特異性から、薬剤標的となり得る300~400もの遺伝子が、多くの細胞種で発現していることが明らかにされている。」 Eberwine et al. 2014



シングルセルゲノミクスによって、これまでになく効率的な医薬品開発および医薬品設計が可能になると期待されています。

総説

Eberwine J., Sul J. Y., Bartfai T. and Kim J. (2014) The promise of single-cell sequencing. *Nat Methods* 11: 25-27

Love K. R., Bagh S., Choi J. and Love J. C. (2013) Microtools for single-cell analysis in biopharmaceutical development and manufacturing. *Trends Biotechnol* 31: 280-286

Spaethling J. M. and Eberwine J. H. (2013) Single-cell transcriptomics for drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol* 13: 786-790

Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V. E., Zhou S., Diaz L. A., Jr., et al. (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-1558

Wilson M. C. and Piel J. (2013) Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. *Chem Biol* 20: 636-647

参考文献

Albert F. W., Treusch S., Shockley A. H., Bloom J. S. and Kruglyak L. (2014) Genetics of single-cell protein abundance variation in large yeast populations. *Nature* 506: 494-497

個体間における DNA の差は、タンパク質発現の差につながる可能性があります。この研究において、著者らは、タンパク質発現量の多いシングル酵母細胞と少ないシングル酵母細胞を選択し、シングルセルのタンパク質発現量の遺伝的特徴を調べました。その後著者らは、イルミナの HiSeq でシーケンスを行い、全ゲノム DNA 多型を検出しました。この方法により、160 の遺伝子で、1 遺伝子当たりの量的形質遺伝子座 (QTL) を、これまでの研究よりも多数検出しました。ほとんどの遺伝子座は、複数のタンパク質に影響を及ぼす「ホットスポット」に集まっており、一部のホットスポットは、検討を行ったタンパク質の半数以上に影響を及ぼすことがわかりました。

イルミナ技術: HiSeq

Lee E. C., Liang Q., Ali H., Bayliss L., Beasley A., et al. (2014) Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol* 32: 356-363

抗体は、特異性が高く、安全性プロファイルが概して優れているため、今日製造されている医薬品分子のなかで最も急速な成長を遂げています。この研究は、研究・治療用ヒト抗体を産生するための新規のキメラマウスモデルに関するものです。著者らは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべての可変遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスを作製し、イルミナの MiSeq を用いてその配列を確認しました。これらのマウスは、ヒト可変領域とマウス定常領域を併せ持つキメラ抗体を産生します。著者らは、これらのトランスジェニックマウスが生存可能で生殖能を有し、治療用ヒトモノクローナル抗体を発見するための強力なシステムとなることを実証しています。

イルミナ技術: V (D) J ライブラリの 250 bp ペアエンドシーケンス用 MiSeq

Young G. T., Gutteridge A., Fox H. D., Wilbrey A. L., Cao L., et al. (2014) Characterizing Human Stem Cell-derived Sensory Neurons at the Single-cell Level Reveals Their Ion Channel Expression and Utility in Pain Research. *Mol Ther* 22: 1530-1543

痛みの生物学の研究は、感覚ニューロン細胞株が存在しないことから、一般的に動物モデルを用いて行われています。本稿において、著者らは、感覚ニューロン由来のヒト幹細胞について述べ、ポピュレーションシーケンスとシングルセルシーケンスの技術を併用して、詳細な分子的、電気生理学的、および薬理学的フェノタイピングを行いました。誘導された分化を 6 週間にわたって観察し、イルミナの BeadArrays を用いて遺伝子発現の特徴を調べました。著者らは、これらの誘導ニューロンが、成熟後神経節に由来するヒト感覚ニューロンと、分子的にも機能的にも同等であることを示しています。

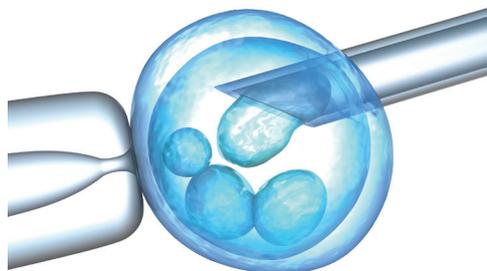
イルミナ技術: BeadArrays

Gundry M., Li W., Maqbool S. B. and Vijg J. (2012) Direct, genome-wide assessment of DNA mutations in single cells. *Nucleic Acids Res* 40: 2032-2040

生殖医学

出生前に胎児または胚の疾患や病態について検査することを出生前診断と言います。先天異常は、有害な染色体異常や DNA 異常を検出することによって診断できます。従来、出生前診断は、羊水穿刺などの侵襲的手技によって行われてきました。非侵襲的出生前検査 (NIPT) は従来の侵襲的検査とは対照的に、採血のみで行います^{56, 57}。無細胞 DNA (cfDNA) シーケンスを利用した NIPT が医療に応用された事例が報告されています⁵⁸。従来の出生前診断に比べ、シーケンスではより高い精度で異常が検出されています^{58, 59}。

着床前に胚のスクリーニングを行って染色体異常について調べる着床前診断法分野においても、シングルセルシーケンスは有用となり得ます^{60, 61, 62}。シーケンスは、研究や妊娠を目的とした、*in vitro* で受精させた配偶子 (IVG) の遺伝子検査を補うことが、研究によって明らかにされています⁶³。シングルセルシーケンスを用いた診断法は、研究を加速し、胚の状態の早期検出する可能性のある技術です^{59, 64}。



胚を遺伝的に検査することにより、命にかかわる疾患につながり得る染色体異常の手掛かりを早期に得ることができます。

総説

Bianchi D. W., Parker R. L., Wentworth J., Madankumar R., Saffer C., et al. (2014) DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 370: 799-808

Chandrasekharan S., Minear M. A., Hung A. and Allyse M. (2014) Noninvasive prenatal testing goes global. *Sci Transl Med* 6: 231fs215

Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

Palacios-Gonzalez C., Harris J. and Testa G. (2014) Multiplex parenting: IVG and the generations to come. *J Med Ethics*

Speicher M. R. (2013) Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med* 5: 74

Van der Aa N., Zamani Esteki M., Vermeesch J. R. and Voet T. (2013) Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med* 5: 71

56. Chandrasekharan S., Minear M. A., Hung A. and Allyse M. (2014) Noninvasive prenatal testing goes global. *Sci Transl Med* 6: 231fs215
57. Speicher M. R. (2013) Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med* 5: 74
58. Bianchi D. W., Parker R. L., Wentworth J., Madankumar R., Saffer C., et al. (2014) DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 370: 799-808
59. Van der Aa N., Zamani Esteki M., Vermeesch J. R. and Voet T. (2013) Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med* 5: 71
60. Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126
61. Yan L., Yang M., Guo H., Yang L., Wu J., et al. (2013) Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1131-1139
62. Wang J., Fan H. C., Behr B. and Quake S. R. (2012) Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell* 150: 402-412
63. Palacios-Gonzalez C., Harris J. and Testa G. (2014) Multiplex parenting: IVG and the generations to come. *J Med Ethics*
64. Ong F. S., Lin J. C., Das K., Grosu D. S. and Fan J. B. (2013) Translational utility of next-generation sequencing. *Genomics* 102: 137-139

参考文献

Kirkness E. F., Grindberg R. V., Yee-Greenbaum J., Marshall C. R., Scherer S. W., et al. (2013) Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome. *Genome Res* 23: 826-832

次世代シーケンスでは、速度および精度が高まり、遺伝子型を高スループットで特定できるようになりました。この研究は、イルミナのシーケンサーを使用して精子の単一細胞のハプロタイプ（ハプロイドの遺伝子型）を特定する方法に関するものです。このアプローチは、精子細胞のハプロイドという性質を利用したもので、ショートリードのプラットフォームでジェノタイピングと低カバレッジシーケンスを組み合わせで行ったものです。染色体の長さのハプロタイプを形成するに加え、このアプローチでは、組換え事象を中央値 100 Kb 未満の解像度で直接同定することができます（染色体当たりの平均数が 1.1）。

イルミナ技術：HumanOmni1-Quad、Genome Analyzer_{IIx}、HiSeq

Yan L., Yang M., Guo H., Yang L., Wu J., et al. (2013) Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1131-1139

ヒトの胚発生の研究において、ヒトの着床前胚と、さまざまな継代段階のヒト ES 細胞に由来する 124 のサンプルについて、シングルセルレベルでのトランスクリプトームシーケンスにより、プロファイリングを行いました。著者らは、母方で発現した遺伝子の特徴を調べ、新規の長いノンコーディング RNA (lncRNAs) を 2,733 個同定しました。これらの多くは、特定の発生段階において発現したものでした。これらの結果から、形態学的に正常なヒト卵母細胞 20 個と初期胚の計 90 個のシングルセルと、ヒト ES 細胞の 34 個のシングルセルのトランスクリプトームのランドスケープについて、その包括的な概観が明らかになりました。

イルミナ技術：HiSeq

Ong F. S., Lin J. C., Das K., Grosu D. S. and Fan J. B. (2013) Translational utility of next-generation sequencing. *Genomics* 102: 137-139

次世代シーケンス技術は、多くの分子病理学領域にまたがる、ゲノムの特徴の解明につながる新たな道を開きました。この総説には、精度、スループット、およびシングルセルシーケンス技術について最も新しく実施された改善が、いかに幅広く臨床的な意思決定に活かされているが述べられています。著者らは、ゲノム医療の発展において重要性が増すことが予想される手法や応用例についてまとめています。

共進化

今日もなお、新たな生物種や新規の生命体が世界中で発見され続けています⁶⁵。未だ発見されていない、より大きな生命体も複数存在しますが、研究者たちは、既存の技術により、選択圧を生み出す進化の動態や宿主および生物種の相互作用を理解することができます。変動する淘汰の動態を明らかにするには、相互に作用する生物種の拮抗的共進化に目を向けることが役立ちます⁶⁶。シングルセルシーケンスにより、生物種の進化につながった環境中の選択と圧力の追跡や、培養不能な集団の高解像度での検出が可能になります^{65, 66, 67}。このような手掛かりは、複雑な生態系とその構成要素である数多くの固有の生命体を理解するのに極めて重要です⁶⁸。シーケンスは、相互に作用する生物種間の急速な進化がいかに環境圧によってもたらされたかということを検証するのを可能にします。また、シーケンスは、このような新たな生物種と、それらの生物種のそれぞれの環境における進化した役割を検出することを可能にします^{69, 70, 71}。



シングルセル解析によって、いかに多種多様な生命体が選択に圧力をかけているかをより効率的に検討し、共生種や宿主 - 病原体の相互作用の進化について研究を進めることが可能になります。

総説

Martiny J. B., Riemann L., Marston M. F. and Middelboe M. (2014) Antagonistic coevolution of marine planktonic viruses and their hosts. *Ann Rev Mar Sci* 6: 393-414

参考文献

Cooper D. A., Jha B. K., Silverman R. H., Hesselberth J. R. and Barton D. J. (2014) Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 42: 5202-5216

リボヌクレアーゼ L (RNase L) が持つ生物学的意義にもかかわらず、この酵素によって切断される RNA はほとんど特定されていません。この研究において、著者らは、宿主およびウイルスの RNA 内に存在する RNase L 切断部位の頻度と部位を明らかにするため、イルミナのシーケンサーを用いました。この方法は、RNase L および RNase A で切断されたウイルス RNA と、感染および非感染 HeLa 細胞に由来する RNA を用いて最適化され、検証されています。著者らは、RNase L やその他の一本鎖特異的エンドリボヌクレアーゼに感受性を示す個々のゲノム領域を同定しました。宿主およびウイルスの RNA 内に存在するこれらの切断部位の頻度と部位を観察することで、これらの酵素が健康と疾患にどのような影響を及ぼしているのかが明らかになる可能性があります。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}, MiSeq

Kashtan N., Roggensack S. E., Rodrigue S., Thompson J. W., Biller S. J., et al. (2014) Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science* 344: 416-420

シアノバクテリアであるプロクロロコッカスは、従来の測定法では単一の生物種として分類されていますが、rRNA 遺伝子の遺伝子間転写スペーサー (ITS) 領域の情報によると定義されるいくつかのグレードに分類することができます。この研究では、1 年間のうちの 3 時点で採取した海水サンプル中の細胞ごとのゲノム多様性について検討を行いました。著者らは、これらのグレードの個々の特徴を明らかにし、各種の ITS 生態型の量の経時変化を測定するために、イルミナの HiSeq 2000 でシングルセルシーケンスを行いました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}, HiSeq

65. Kashtan N., Roggensack S. E., Rodrigue S., Thompson J. W., Biller S. J., et al. (2014) Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science* 344: 416-420
66. Martiny J. B., Riemann L., Marston M. F. and Middelboe M. (2014) Antagonistic coevolution of marine planktonic viruses and their hosts. *Ann Rev Mar Sci* 6: 393-414
67. Lasken R. S. (2012) Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat Rev Microbiol* 10: 631-640
68. Stepanauskas R. (2012) Single cell genomics: an individual look at microbes. *Curr Opin Microbiol* 15: 613-620
69. Kaster A. K., Mayer-Blackwell K., Pasarelli B. and Spormann A. M. (2014) Single cell genomic study of *Dehalococcoides* species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *ISME J* 8:1831-42
70. Wasmund K., Schreiber L., Lloyd K. G., Petersen D. G., Schramm A., et al. (2014) Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface *Dehalococcoidia*, phylum Chloroflexi. *ISME J* 8: 383-397
71. Wang F. P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., et al. (2014) Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. *ISME J* 8: 1069-1078

Kaster A. K., Mayer-Blackwell K., Pasarelli B. and Spormann A. M. (2014) Single cell genomic study of Dehalococcoidetes species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. ISME J 8:1831-42

脱ハロゲン細菌であるクロロフレクサス門 (Dehalococcoidetes) は、もともとは還元的脱ハロゲン化を媒介する主要微生物として発見されました。クロロフレクサス門は、さまざまな陸環境における唯一のエネルギー保存様式として、自らの還元的脱ハロゲン酵素 (Rdh) を介して還元的脱ハロゲン化を媒介します。この研究では、ペルー周辺とその他の太平洋海域から採取したいくつかの深海底堆積物からトータル DNA を抽出し、PCR 法およびナノリットル qPCR 法により、Dehalococcoidetes 16S の rRNA 遺伝子および rdh 遺伝子の有無について解析を行いました。セルソーティングとイルミナの HiSeq システムを用いたシングルセルゲノムシーケンス用に、ペルー周辺の海溝から採取したサンプルを選択しました。このうち 2 つのシングルセルを現地の Dehalococcoidetes 群集に属するものと判定し、1.38 Mb のゲノムにアセンブルしました。完全度は約 85% でした。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}, Nextera DNA Sample Prep, HiSeq

Nair S., Nkhoma S. C., Serre D., Zimmerman P. A., Gorena K., et al. (2014) Single-cell genomics for dissection of complex malaria infections. Genome Res 24: 1028-1038

抗マラリア化学療法は治療・予防戦略の柱を成しているものの、そのような取組みが薬剤耐性によって大きく損なわれてしまうことがあります。この研究において、著者らは、マラリア感染の宿主内多様性を明らかにする目的で、サンプルのシングルセルシーケンスおよびジェノタイプングを行いました。このアプローチを用いて、著者らは、熱帯熱マラリア原虫感染 MKK2664 内の 4 種類の薬剤耐性ハプロタイプを観察しました。著者らは、三日熱マラリア原虫感染および熱帯熱マラリア原虫感染の複雑性を解明するために、このシングルセルゲノムアプローチを用いて、患者の血液から直接、寄生虫ゲノム配列を構築できることを実証しました。

イルミナ技術: HiSeq, VeraCode Custom DASL, BeadXpress



ハマダラカ

Wang F. P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., et al. (2014) Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. ISME J 8: 1069-1078

メタンの嫌氣的酸化 (AOM) を引き起こす微生物について盛んに研究が行われていますが、詳細な機構に関する情報は得られていません。この研究では、メタン酸化古細菌 ANME-2a 優勢の高活性 AOM 濃縮物のゲノムについて、イルミナの Genome Analyzer を用いた単一凝集シーケンスによる検討を行いました。CO₂ からメタンを生成するための 7 つの過程に必要な遺伝子がすべて存在し、盛んに発現していることが確認されました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Wasmund K., Schreiber L., Lloyd K. G., Petersen D. G., Schramm A., et al. (2014) Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface Dehalococcoidia, phylum Chloroflexi. ISME J 8: 383-397

海面下に存在する微生物は、地球の生物地球化学的循環における主要触媒です。緑色非硫黄細菌門、Dehalococcoidia (DEH) 綱の海洋細菌は、その中で広く分布する生物種の一つです。この研究において、著者らは、代謝的多様性を明らかにするため、シングル DEH 細胞からゲノムを解析しました。著者らは、イルミナの HiSeq 2000 でゲノムのシーケンスを行い、全ゲノムの推定 60.8% をアセンブルしました。中核的および補助的な脂肪酸酸化経路の酵素をコードする遺伝子が多数同定されました。不完全な経路がいくつか存在したことから、この生命体は、基質レベルのリン酸化によってアセチル CoA を酢酸に変換することで ATP を合成できることが示唆されました。

イルミナ技術: HiSeq

Kamke J., Sczyrba A., Ivanova N., Schwientek P., Rinke C., et al. (2013) Single-cell genomics reveals complex carbohydrate degradation patterns in poribacterial symbionts of marine sponges. ISME J 7: 2287-2300

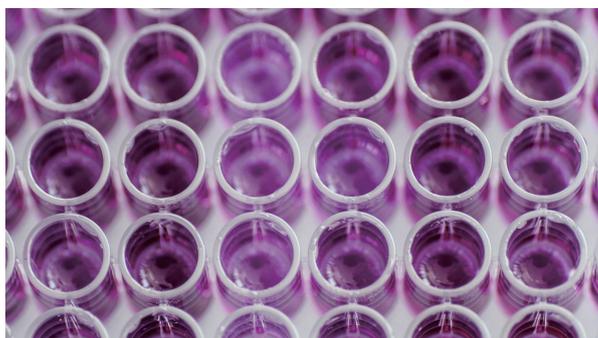
Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G., Kjeldsen K. U., Lever M. A., et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. Nature 496: 215-218

Malmstrom R. R., Rodrigue S., Huang K. H., Kelly L., Kern S. E., et al. (2013) Ecology of uncultured Prochlorococcus clades revealed through single-cell genomics and biogeographic analysis. ISME J 7: 184-198

Reyes A., Wu M., McNulty N. P., Rohwer F. L. and Gordon J. I. (2013) Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 20236-20241

サンプル調製

不均一な細胞集団からシングルセルを単離する方法は数多く存在します⁷²。十分に確立された手法（蛍光標識細胞分取 [FACS]、顕微鏡、細胞分離のための捕獲抗体など）に加え、かつてない高い精度と特異性でシングルセルを単離できる、最新の手法から成る精巧な設備も次々と登場しています^{73, 74}。シングルセル解析において最も重要となるのはサンプル調製で、この過程で不均質な集団から特定の細胞を精確に単離する必要があります⁷⁵。本項では、懸濁液や組織からシングルセルを単離する方法として汎用される技術および新規の技術について取り上げます。



分散組織から単離したシングルセルを、直接 96 ウェルプレートに分類して解析を行います。

-
72. Navin N. and Hicks J. (2011) Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med* 3: 31
 73. Yilmaz S. and Singh A. K. (2012) Single cell genome sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 23: 437-443
 74. Moon S., Kim Y. G., Dong L., Lombardi M., Haeggstrom E., et al. (2011) Drop-on-demand single cell isolation and total RNA analysis. *PLoS One* 6: e17455
 75. Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860
-

手法	サンプルの種類	長所 ^{75,76,79}	短所 ^{75,76,79}
蛍光標識細胞分取 (FACS) ⁷⁷	単離細胞懸濁液	<ul style="list-style-type: none"> 細胞表面マーカーを特異的に免疫タグ標識することが可能。 同時に複数のタグ標識を行うことで、確実に特定の細胞を単離することが可能。 細胞を96または384ウェルプレートにほぼ100%の純度でソーティングすることが可能⁷⁵。 	<ul style="list-style-type: none"> 細胞表面マーカーに特異的な抗体が必要。 大規模なプロジェクトに拡大することが不可能。 大量の出発材料が必要。 低スループット。 回収後の細胞が機械的ストレスにさらされる。 ソーティング前に最適化が必要。
マイクロフルイディクス ⁷⁸	単離細胞懸濁液	<ul style="list-style-type: none"> 少量のサンプルからも培養不能な細胞の単離が可能。 細胞表面マーカーに基づいて特定の細胞を単離することが可能。 希少な循環腫瘍細胞の単離の成功例がある。 	<ul style="list-style-type: none"> コストが高い。 低スループット。
光ピンセット ⁷⁹	単離細胞懸濁液	<ul style="list-style-type: none"> マイクロピペットに比べて、より限定的に、より正確な操作で、細胞を単離できる⁷⁵。 シングルセルの自動ソーティングが可能。 高スループット。 検討対象細胞の蛍光タグ標識が可能⁷⁹。 	<ul style="list-style-type: none"> セットアップ要件が厳しく、ごく一部の特殊な研究室でしか行うことができない⁷⁵。
マイクロマニピュレーション ⁸⁰	単離細胞懸濁液	<ul style="list-style-type: none"> さまざまな発生段階(例:ニューロン)から1個の細胞を単離することが可能。 不均一な集団から細胞を単離することも可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 低スループット。 細胞の特異性は顕微鏡により判断され、単離にはマイクロピペットが用いられるため、精度が低下する恐れがある。 大量の出発材料が必要。
TIVA ⁸¹	組織サンプル	<ul style="list-style-type: none"> 生体組織中のシングルセルの経時的トランスクリプトミクスを調べることが可能⁸¹。 シングルセルから直接mRNAを捕捉するため、微小環境に対する細胞の応答が保持される⁸¹。 非侵襲的なプロトコール。 	<ul style="list-style-type: none"> 低スループット。 一度に1個の組織しか調べることができない。
レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) ⁸²	組織サンプル	<ul style="list-style-type: none"> 自然な環境で丸ごとの組織から細胞を単離するため、単離後の細胞内でRNA完全性が保持される⁷⁵。 検討対象の組織から迅速にシングルセルを単離することが可能。 組織中のシングルセルの経時的トランスクリプトミクスを活かすために顕微鏡手法と組み合わせることが可能。 事前に組織を細胞懸濁液に分解することが不要。 	<ul style="list-style-type: none"> 組織を凍結保存するか固定しなければならない。 マイクロダイセクションに困難が伴うことがある。 小さな細胞は単離が困難となる可能性がある⁸³。 完全性を維持するには適切な組織処理が必要⁸⁴。 細胞を単離し、組織を切断する際に、RNAコンタミネーションが生じる可能性がある⁸¹。

76. Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427

77. Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F., Sprick M. R., Kemper K., et al. (2008) Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13427-13432

78. Hsiao A. P., Barbee K. D. and Huang X. (2010) Microfluidic Device for Capture and Isolation of Single Cells. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng* 7759:

79. Yoshimoto N., Kida A., Jie X., Kurokawa M., Iijima M., et al. (2013) An automated system for high-throughput single cell-based breeding. *Sci Rep* 3: 1191

80. Kupperts R., Zhao M., Hansmann M. L. and Rajewsky K. (1993) Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 12: 4955-4967

81. Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 11: 190-196

82. Suarez-Quian C. A., Goldstein S. R., Pohida T., Smith P. D., Peterson J. I., et al. (1999) Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques* 26: 328-335

83. Fend F. and Raffeld M. (2000) Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 53: 666-672

84. Liu H., McDowell T. L., Hanson N. E., Tang X., Fujimoto J., et al. (2014) Laser capture microdissection for the investigative pathologist. *Vet Pathol* 51: 257-269

総説

Adalsteinsson V. A. and Love J. C. (2014) Towards Engineered Processes for Sequencing-Based Analysis of Single Circulating Tumor Cells. *Curr Opin Chem Eng* 4: 97-104

Baslan T. and Hicks J. (2014) Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev* 26C: 59-65

Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126

Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

Barteneva N. S., Ketman K., Fasler-Kan E., Potashnikova D. and Vorobjev I. A. (2013) Cell sorting in cancer research--diminishing degree of cell heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 1836: 105-122

Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427

Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

参考文献

Lohr J. G., Adalsteinsson V. A., Cibulskis K., Choudhury A. D., Rosenberg M., et al. (2014) Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 32: 479-484

CTCの解析は、転移性がんの有望かつ新たなモニタリング法および診断法です。この研究は、高い精度でCTCを単離し、確認し、そして全エクソームシーケンスを行うための一連のプロセスを示しています。著者らは、イルミナのMagSweeperを用いてepCAM発現CTCを濃縮しました。個々の細胞を回収し、イルミナのHiSeqでシーケンスを行いました。著者らは、プロセスの性能を明らかにするため、CTC由来のライブラリーの全ゲノムカバーレージの品質および均一性を評価する方法を開発しました。前立腺がん患者2例の転移性CTCをシーケンスすることによりプロセスがリポートされ、CTC変異の70%がマッチする組織中に存在することが確認されました。

イルミナ技術: HiSeq, MiSeq

Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 11: 190-196

細胞混合物から抽出したRNAに依存するRNAシーケンス法では、同一組織細胞間での個々の発現のばらつきは明確になりません。本稿において著者らは、シングルセル研究に応用できる*in vivo*トランスクリプトーム解析(TIVA)について発表しています。イルミナのシーケンス技術を組み合わせて、著者らは培養と*in vivo*の双方でシングルニューロン間のトランスクリプトーム変動を捕らえ、解析しています。しかもこの方法は非侵襲的であり、インタクトな組織に応用できる可能性があります。この方法により、これまで困難とされてきた、複雑な組織の細胞不均質性の詳細な研究が可能となり、*in vivo*生体機能イメージングとの併用が可能になります。

イルミナ技術: HiSeq

Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24: 496-510

最近の複数の研究により、遺伝子発現レベルおよび転写制御における細胞間多様性が次々と発見されています。この研究では、個々の細胞間における転写の多様性を明らかにするため、イルミナのHiSeq 2000でSmart-seqシングルセルRNA-seqプロトコルを用いて、リンパ芽球様細胞株GM12878の検討を行いました。著者らは、定量を慎重に行うことにより、発現レベルには、個々の細胞間で技術的なばらつき以上に有意差が認められると判断しました。また、著者らは、30~100個の細胞から成る小規模なプールから得られたトランスクリプトームが、大量のインプット量から得られた同時期のプールRNA-Seq解析の情報量および再現性とほぼ一致していることを示しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. Nat Methods 11: 41-46

この包括的な解析において、著者らはマイクロフルイディクス自動システムを用いてシングルセル RNA-Seq の精度を qPCR と定量的に比較しました。市販のシングルセル RNA 増幅法を用いて、マイクロリットルスケールとナノリットルスケールの両方で、ライブラリー調製を行い、イルミナの HiSeq 2000 でシーケンスを行いました。この研究により、シングルセル RNA-Seq で qPCR と定量的に同等の結果が得られることが確認されました。これは、サンプル調製をマイクロフルイディクスデバイスなどを用いてナノリットルレベルの反応容量で行った場合に特に顕著でした。

イルミナ技術：Nextera DNA Sample Prep、HiSeq

Fraley S. I., Hardick J., Jo Masek B., Athamanolap P., Rothman R. E., et al. (2013) Universal digital high-resolution melt: a novel approach to broad-based profiling of heterogeneous biological samples. Nucleic Acids Res 41: e175

データ解析

シングルセルシーケンスには、データ解析の際の特有の課題が伴います。1個1個の細胞に50,000~300,000個の転写産物が含まれており、発現量には個々の細胞間で有意な差が存在します^{85, 86}。細胞1個当たりmRNAコピー1~30個の範囲内で、数千個の遺伝子が発現する場合には、それぞれのmRNAがcDNAにコピーされ、最終的にライブラリーに均一に再現されることが重要です^{87, 88}。技術上のばらつきと、注目すべき生物学的変動を区別するため、既知の存在量のスパイクイン定量基準⁸⁹により、変動の大部分が生物学的なばらつきによるものであることが明らかにされています⁹⁰。バイアスは分子インデックス化で補正することができ^{91, 92}、新たに開発された種々の自動サンプル処理法により、技術上のばらつきがさらに減少するはず⁹³。

DNAのシングルセルシーケンスでは、このような応用向けに特別に調整されているアルゴリズムによっても、技術上のアーチファクトを減らすことができます⁹⁴。

名称	説明
Monocle	複数の時点で収集したシングルセルのRNA-Seqデータを用いた、トランスクリプトーム動態の時間解像度を高めるための、目的変数なしのアルゴリズム ⁹⁵ 。
PyClone	がんにおけるクローン集団の構造を推測するための統計モデル ⁹⁶ 。
SPAdes	単一細胞および複数細胞の両方のアセンブルのためのシングルセルアセンブラ ⁹⁷ 。

総説

Eckersley-Maslin M. A. and Spector D. L. (2014) Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends Genet* 30: 237-244

Gendrel A. V., Attia M., Chen C. J., Diabangouaya P., Servant N., et al. (2014) Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell* 28: 366-380

Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24: 496-510

Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860

参考文献

Albert F. W., Treusch S., Shockley A. H., Bloom J. S. and Kruglyak L. (2014) Genetics of single-cell protein abundance variation in large yeast populations. *Nature* 506: 494-497

DNAの個体間差によって、タンパク質発現に差が生じる可能性があります。この研究において、著者らは、タンパク質発現量の高いシングル酵母細胞と低いシングル酵母細胞を選択し、シングルセルのタンパク質発現量の遺伝的特徴を調べました。その後、著者らは、イルミナのHiSeqシーケンサーにより、全ゲノムDNAの変異体を検出しました。この方法を160個の遺伝子に用い、遺伝子当たりの量的形質遺伝子座(QTL)を、これまでの研究よりも多数検出しました。ほとんどの遺伝子座は、複数のタンパク質に影響を及ぼす「ホットスポット」に集まっており、一部のホットスポットは、検討を行ったタンパク質の半数以上に影響を及ぼすことがわかりました。

イルミナ技術: HiSeq

85. Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods* 11: 41-46

86. Barlow D. P. (2011) Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu Rev Genet* 45: 379-403

87. Bhargava V., Head S. R., Oroudoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678

88. Grun D., Kester L. and van Oudenaarden A. (2014) Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat Methods* 11: 637-640

89. Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621-628

90. Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24: 496-510

91. Fu G. K., Xu W., Wilhelmy J., Mindrinos M. N., Davis R. W., et al. (2014) Molecular indexing enables quantitative targeted RNA sequencing and reveals poor efficiencies in standard library preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 1891-1896

92. Islam S., Zeisel A., Joost S., La Manno G., Zajac P., et al. (2014) Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods* 11: 163-166

93. Streets A. M., Zhang X., Cao C., Pang Y., Wu X., et al. (2014) Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7048-7053

94. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A. A., Korobeynikov A., et al. (2013) Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 20: 714-737

95. Trapnell C., Cacchiarelli D., Grimsby J., Pokharel P., Li S., et al. (2014) The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 32: 381-386

96. Roth A., Khattra J., Yap D., Wan A., Laks E., et al. (2014) PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods* 11: 396-398

97. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., et al. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19: 455-477

Eckersley-Maslin M. A., Thybert D., Bergmann J. H., Marioni J. C., Flicek P., et al. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell* 28: 351-365

ランダム常染色体モノアリル遺伝子発現とは、2つの相同アリルのうちの一方に由来する遺伝子の転写を指します。この研究では、イルミナのシーケンサーを用いたアリル特異的 RNA-Seq スクリーニングにより、マウス細胞株におけるモノアリル発現メカニズムの検討を行いました。著者らは、モノアリルに発現したランダムな遺伝子を多数同定し、DNAメチル化と核局在のいずれにおいても活性アリルと不活性アリルが区別されないことを発見しました。しかし、著者らは、特定のヒストン修飾の濃縮に相関性が存在することを発見しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24: 496-510

最近の複数の研究により、遺伝子発現レベルおよび転写制御における細胞間多様性が次々と発見されています。この研究では、個々の細胞間における転写の多様性を明らかにするため、イルミナの HiSeq 2000 で Smart-seq シングルセル RNA-seq プロトコルを用いて、リンパ芽球様細胞株 GM12878 の検討を行いました。著者らは、定量を慎重に行うことにより、発現レベルには、個々の細胞間で技術的なばらつき以上に有意差が認められると判断しました。また、著者らは、30~100個の細胞から成る小規模なプールから得られたトランスクリプトームが、大量のインプット量から得られた同時期のプール RNA-Seq 解析の情報量および再現性とほぼ一致していることを示しました。

イルミナ技術: HiSeq, Nextera DNA Sample Prep

Streets A. M., Zhang X., Cao C., Pang Y., Wu X., et al. (2014) Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7048-7053

シングルセル全トランスクリプトーム解析は、細胞集団における遺伝子発現の多様性を定量化するための強力なツールです。この研究は、シングルセル全トランスクリプトーム解析のためのマイクロ流体プラットフォームで行うシングルセル RNA-Seq 法に関するものです。このアプローチを用いて二本鎖 cDNA を回収し、イルミナの HiSeq 2500 でシーケンスを行います。著者らは、この手法をシングルマウス胚細胞に用い、バルクトランスクリプトームの大多数をわずか 10 個のシングルセルから再構築できることを実証しました。このアプローチを用いて、著者らは、さまざまなマウス胚細胞種間およびこれらの細胞内の多様性を定量化しました。

イルミナ技術: HiSeq 2500

Swain Lenz D., Riles L. and Fay J. C. (2014) Heterochronic meiotic misexpression in an interspecific yeast hybrid. *Mol Biol Evol* 31: 1333-1342

種間雑種は、いずれの親の動物種の範囲からも逸脱したレベルで遺伝子を発現します。本稿において、著者らは、減数分裂過程にある無菌の種間酵母雑種の遺伝子発現について検討しました。著者らは、複数の減数分裂段階での RNA シーケンスに、イルミナの HiSeq を用いました。そして、発現レベルの変化はすべての減数分裂段階において雑種と親との間で変わらないものの、雑種では減数分裂プログラムが親よりも早期に開始されることを発見しました。異所性発現のタイミングと一致して、発現の分岐は主にトランス作用性からシス作用性へと変化し、相対するシス作用性からトランス作用性への変化の数が増加しました。

イルミナ技術: HiSeq

Mueller A. A., Cheung T. H. and Rando T. A. (2013) All's well that ends well: alternative polyadenylation and its implications for stem cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 25: 222-232

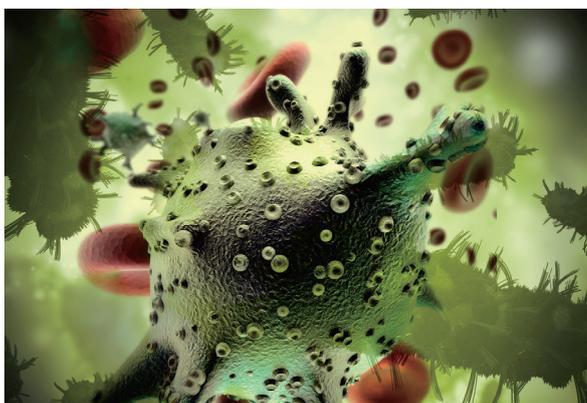
Pan X., Durrett R. E., Zhu H., Tanaka Y., Li Y., et al. (2013) Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 594-599

Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597

DNA への応用

細胞分裂の過程で起こる DNA 複製は完璧ではありません。そのため、次々と細胞が生まれていくうちに固有の体細胞変異が蓄積していきます。その結果、体内に存在するそれぞれの細胞が固有のゲノムシグネチャーを持つようになり、細胞系譜樹が非常に高い正確度で再構築されます⁹⁸。これらの細胞系譜樹から、小さな幹細胞集団の存在を予測することができます。この情報は、多種多様ながんの発生^{99, 100}、着床前診断および遺伝子診断^{101, 102, 103, 104} の分野において重要となります。

シングルセルのシーケンスを行うことにより、獲得された体細胞変異や CNV を特定でき、分化細胞の系譜を遡ることができます¹⁰¹。また、シングルセルシーケンスは、*in vitro* での培養が困難な生命体の特徴を明らかにするための有効なアプローチでもあります。シングルセルシーケンスの進歩により、集団発生、抗生物質耐性株および食品媒介病原菌の診断ならびに腸内環境における微生物の多様性の分類が向上しました^{105, 106, 107}。



シングルセルのゲノミクスは、循環腫瘍細胞や微生物の特徴を明らかにし、これらを同定するのに役立ちます。

総説

Baslan T. and Hicks J. (2014) Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev* 26C: 59-65

Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427

Lovett M. (2013) The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet* 22: R22-26

Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

参考文献

Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S. L., Marshall J., et al. (2013) Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res* 41: 6119-6138

脊椎肋骨異骨症 (SCD) は先天性脊椎欠損の 1 つで、遺伝的病因が不明の常染色体優性型が報告されています。この研究では、ある家族の 2 世代における SCD の原因変異を特定する目的で、全エクソームシーケンスを使用しました。その結果はマウスでのノックアウト研究によって裏付けられ、エクソームシーケンスで得られる検出力が確認されています。

イルミナ技術: TruSeq Exome、Genome Analyzer_{IIx}、HiSeq

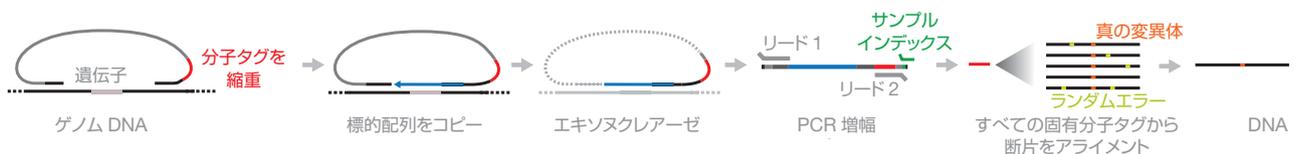
98. Frumkin D., Wasserstrom A., Kaplan S., Feige U. and Shapiro E. (2005) Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biol* 1: e50
99. Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., et al. (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472: 90-94
100. Potter N. E., Ermini L., Papaemmanuil E., Cazzaniga G., Vijayaraghavan G., et al. (2013) Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. *Genome Res* 23: 2115-2125
101. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630
102. Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427
103. Van der Aa N., Zamani Esteki M., Vermeesch J. R. and Voet T. (2013) Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med* 5: 71
104. Hou Y., Fan W., Yan L., Li R., Lian Y., et al. (2013) Genome analyses of single human oocytes. *Cell* 155: 1492-1506
105. Bergholz T. M., Moreno Switt A. I. and Wiedmann M. (2014) Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? *Trends Microbiol* 22: 275-281
106. Stepanauskas R. (2012) Single cell genomics: an individual look at microbes. *Curr Opin Microbiol* 15: 613-620
107. Yilmaz S. and Singh A. K. (2012) Single cell genome sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 23: 437-443

単一分子反転プローブ (smMIP)

単一分子反転プローブ (smMIP) 法は、シングル分子タギング法と分子反転プローブ法を併用して、非常に低頻度に発生する遺伝的変異を検出し定量する手法です¹⁰⁸。この手法では、ゲノム DNA 中の標的を検出するのにプローブを用います。プローブ化された標的がコピーされると、エキソヌクレアーゼが分解されて標的にタグが残るため、これを PCR 増幅し、シーケンスを行います。シーケンスにより、高解像度の配列リードが得られます。深度が増すほど、すべての固有の分子タグのアライメントがより精確に得られます。

108. Hiatt J. B., Pritchard C. C., Salipante S. J., O'Roak B. J. and Shendure J. (2013) Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res* 23: 843-854

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 低頻度のターゲットを検出することが可能。 出発物質が非常に限られているサンプルのシングルセルシーケンスまたはシーケンスを行うことが可能。 	<ul style="list-style-type: none"> PCR増幅エラー。 PCRバイアスにより、GCリッチテンプレートを実際よりも少なく見積もる可能性がある。 PCR時にポリメラーゼによって500 bp未満のターゲットが優先的に増幅される。



参考文献

Hiatt J. B., Pritchard C. C., Salipante S. J., O'Roak B. J. and Shendure J. (2013) Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res* 23: 843-854

本稿は、smMIP アッセイの迅速なデータ収集に適した実用性、マルチプレックス/スケーリング能力、そしてデスクトップシーケンスとの互換性について記述した初めての論文です。著者らは、このアッセイで、8 個の細胞株および 45 の臨床がんサンプルにおける、臨床的に情報価値のある 33 個のがん遺伝子をリシーケンスし、高精度なデータが得られることを実証しました。

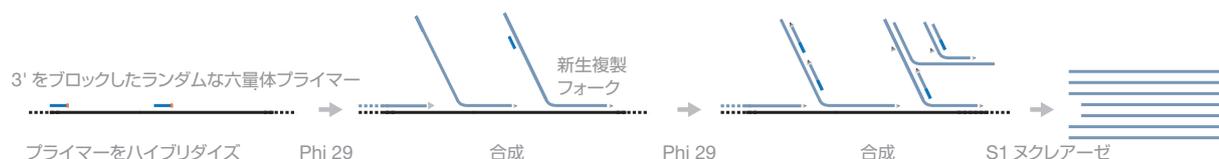
イルミナ技術: MiSeq, HiSeq 2000

多置換増幅 (MDA)

多置換増幅 (MDA) は、0.5 Mbp を超える大きさのテンプレートを増幅できることから、微生物のゲノムのシーケンスに多く用いられている手法です。しかし、それ以外の大きさのゲノムの調査にも用いることができます¹⁰⁹。この手法では、3' をブロックしたランダムな六量体プライマーをテンプレートにハイブリダイズした後、Phi 29 ポリメラーゼで合成します。Phi 29 ポリメラーゼは鎖置換 DNA 合成を行うため、DNA を効率良く急速に増幅することができます。増幅配列のディープシーケンスを行うことにより高精度なリードが得られます。また、ディープシーケンスにより、より正確なアライメントと一致性の高い配列が得られます。

109. Dean F. B., Nelson J. R., Giesler T. L. and Lasken R. S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11: 1095-1099
110. Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., et al. (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472: 90-94
111. Woyke T., Sczyrba A., Lee J., Rinke C., Tighe D., et al. (2011) Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification. *PLoS One* 6: e26161

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> この手法に用いるテンプレートは環状 DNA (プラスミド DNA、細菌) でもよい。 大きなテンプレートのシーケンスが可能。 出発物質が非常に限られているサンプルのシングルセルシーケンスまたはシーケンスを行うことが可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 増幅バイアスが強い。ゲノムカバレッジが約6%と低い¹¹⁰。 PCRバイアスにより、GCリッチテンプレートを実際よりも少なく見積もる可能性がある。 汚染試薬が結果に影響を及ぼす可能性がある¹¹¹。



参考文献

[Embree M., Nagarajan H., Movahedi N., Chitsaz H. and Zengler K. \(2014\) Single-cell genome and metatranscriptome sequencing reveal metabolic interactions of an alkane-degrading methanogenic community. *ISME J* 8: 757-767](#)

微生物群は多くの生化学的過程を持っており、メタゲノミクスアプローチでは多くの場合、個々の微生物の主たる機能を明らかにすることができません。この研究では、まず、イルミナの Genome Analyzer でシングルセルシーケンスアプローチを用いて、*Smithella* 属に属する優性な細菌メンバーのゲノム配列を明らかにすることにより、微生物群の解析を行いました。*Smithella* のドラフトゲノム配列を明らかにした後、著者らは低インプットメタトランスクリプトミクスを用いて、アルカン分解過程において活性である遺伝子を特定しました。その後、著者らは、ゲノムデータとトランスクリプトームデータを統合するためのゲノムスケール代謝モデルを構築しました。

イルミナ技術: Nextera DNA Sample Prep, MiSeq, Genome Analyzer_{IIx}

Kaster A. K., Mayer-Blackwell K., Pasarelli B. and Spormann A. M. (2014) Single cell genomic study of Dehalococcoidetes species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. ISME J 8:1831-42

脱ハロゲン細菌であるクロロフレクサス門 (Dehalococcoidetes) は、もともとは還元的脱ハロゲン化を媒介する主要微生物として発見されました。クロロフレクサス門は、さまざまな陸環境における唯一のエネルギー保存様式として、自らの還元的脱ハロゲン酵素 (Rdh) を介して還元的脱ハロゲン化を媒介します。この研究では、ペルー周辺とその他の太平洋海域から採取したいくつかの深海底堆積物からトータル DNA を抽出し、PCR 法およびナノリットル qPCR 法により、Dehalococcoidetes 16S の rRNA 遺伝子および rdh 遺伝子の有無について解析を行いました。セルソーティングとイルミナの HiSeq システムを用いたシングルセルゲノムシーケンス用に、ペルー周辺の海溝から採取したサンプルを選択しました。このうち 2 つのシングルセルを現地の Dehalococcoidetes 群集に属するものと判定し、1.38 Mb のゲノムにアセンブルされ、その完全度は約 85% でした。

イルミナ技術: HiSeq, Nextera DNA Sample Prep

Tsai I. J., Hunt M., Holroyd N., Huckvale T., Berriman M., et al. (2014) Summarizing specific profiles in Illumina sequencing from whole-genome amplified DNA. DNA Res 21: 243-254

高度に精選されたエレガンス線虫のゲノムをリファレンスとして用いたこの研究では、一連のシーケンス実験を行い、イルミナのライブラリー構築、ライブラリー挿入サイズ、各種 WGA 法および GC バイアスやシンブルリピートコンテンツといったゲノムの特徴に関連するエラーおよびバイアスが特定されました。

イルミナ技術: MiSeq, HiSeq

Wang F. P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., et al. (2014) Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. ISME J 8: 1069-1078

メタンの嫌氣的酸化 (AOM) を引き起こす微生物について盛んに研究が行われていますが、詳細な機構に関する情報は得られていません。この研究では、メタン酸化古細菌 ANME-2a 優勢の高活性 AOM 濃縮物のゲノムについて、イルミナの Genome Analyzer を用いた単一凝集シーケンスによる検討を行いました。CO₂ からメタンを生成するための 7 つの過程に必要な遺伝子がすべて存在し、盛んに発現していることが確認されました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Wasmund K., Schreiber L., Lloyd K. G., Petersen D. G., Schramm A., et al. (2014) Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface Dehalococcoidia, phylum Chloroflexi. ISME J 8: 383-397

海面下に存在する微生物は、地球の生物地球化学的循環における主要触媒です。緑色非硫黄細菌門、Dehalococcoidia (DEH) 綱の海洋細菌は、その中で広く分布する生物種の一つです。この研究において、著者らは、代謝的多様性を明らかにするため、シングル DEH 細胞からゲノム含有量を解析しました。著者らは、イルミナの HiSeq 2000 でゲノムのシーケンスを行い、全ゲノムの推定 60.8% をアセンブルしました。中核的および補助的な脂肪酸酸化経路の酵素をコードする遺伝子が多数同定されました。不完全な経路がいくつか存在したことから、この生命体は、基質レベルのリン酸化によってアセチル CoA を酢酸に変換することで ATP を合成できることが示唆されました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Depew J., Zhou B., McCorrison J. M., Wentworth D. E., Purushe J., et al. (2013) Sequencing viral genomes from a single isolated plaque. Virol J 10: 181

ウイルスおよびバクテリオファージのシーケンスは、十分な量のゲノム物質を得るために、通常、ウイルスストックの作製後、あるいは特異的精製および増幅後に行われます。この研究は、わずか 10 pg の DNA テンプレートからのシーケンスを可能にする新規のシーケンス非依存的単一プライマー増幅 (SISPA) 法に関するものです。

イルミナ技術: HiSeq

Hou Y., Fan W., Yan L., Li R., Lian Y., et al. (2013) Genome analyses of single human oocytes. Cell 155: 1492-1506

卵母細胞には染色体交差が生じ、受精卵で両親の染色体が固有の組合せを形成します。本稿は、ヒト卵母細胞を用いて実証された、シングルセルゲノム解析のプロトコールに関するものです。卵母細胞の交差マップを得るため、著者らは、多重アニーリングおよびルーブ化による増幅サイクル法 (MALBAC) を用いたシーケンスにより、同一女性卵子提供者に由来する卵母細胞の前核から採取した 3 組の第 1 極体と第 2 極体をシーケンスし、これらのゲノムをフェージングしました。この画期的なアッセイは、減数分裂の研究や体外受精の際の胚選択に全ゲノムシーケンスを応用することにつながる重要な前進を象徴しています。

イルミナ技術: HiSeq 2000

McLean J. S., Lombardo M. J., Ziegler M. G., Novotny M., Yee-Greenbaum J., et al. (2013) Genome of the pathogen Porphyromonas gingivalis recovered from a biofilm in a hospital sink using a high-throughput single-cell genomics platform. Genome Res 23: 867-877

シングルセルゲノミクスは、おもに海洋環境および土壌環境中の新規のゲノムを捉える方法として受け入れられつつあります。この研究により、シングルセルゲノミクスは、医療施設内の複合バイオフィームサンプルから検出された病原体における系統変動の比較ゲノム解析も可能にすることが初めて明らかになりました。著者らは、シングルセルアセンブルツールである SPAdes を用いて、新規の歯周病原性細菌株であるシンジパリス菌のほぼ完全なゲノムを提示しています。

イルミナ技術 : Nextera DNA Sample Prep, Genome Analyzer_{IIx}

Seth-Smith H. M., Harris S. R., Skilton R. J., Radebe F. M., Golparian D., et al. (2013) Whole-genome sequences of Chlamydia trachomatis directly from clinical samples without culture. Genome Res 23: 855-866

感染性細菌について調べるための手段としての全ゲノムシーケンスの使用が、臨床的にますます注目されています。これまでは、全ゲノムシーケンス用の DNA を得るのに、クラミジア・トラコマチスの培養が必要不可欠でした。あいにく、クラミジア・トラコマチスの培養には高度な技術と時間が必要となります。本稿は、細菌のゲノムの全ゲノムシーケンスを臨床サンプルから直接行うために免疫磁気ビーズ法 (IMS) と多置換増幅法 (MDA) を組み合わせた新たなアプローチである IMS-MDA に関するものです。

イルミナ技術 : Genome Analyzer_{IIx}, HiSeq 2000

Wang Y., Waters J., Leung M. L., Unruh A., Roh W., et al. (2014) Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. Nature 512:155-60

Fitzsimons M. S., Novotny M., Lo C. C., Dichosa A. E., Yee-Greenbaum J. L., et al. (2013) Nearly finished genomes produced using gel microdroplet culturing reveal substantial intraspecies genomic diversity within the human microbiome. Genome Res 23: 878-888

Kaper F., Swamy S., Klotzle B., Munchel S., Cottrell J., et al. (2013) Whole-genome haplotyping by dilution, amplification, and sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 5552-5557

Kirkness E. F., Grindberg R. V., Yee-Greenbaum J., Marshall C. R., Scherer S. W., et al. (2013) Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome. Genome Res 23: 826-832

Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G., Kjeldsen K. U., Lever M. A., et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. Nature 496: 215-218

McLean J. S., Lombardo M. J., Badger J. H., Edlund A., Novotny M., et al. (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: E2390-2399

Reyes A., Wu M., McNulty N. P., Rohwer F. L. and Gordon J. I. (2013) Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 20236-20241

Taghavi Z., Movahedi N. S., Draghici S. and Chitsaz H. (2013) Distilled single-cell genome sequencing and de novo assembly for sparse microbial communities. Bioinformatics 29: 2395-2401

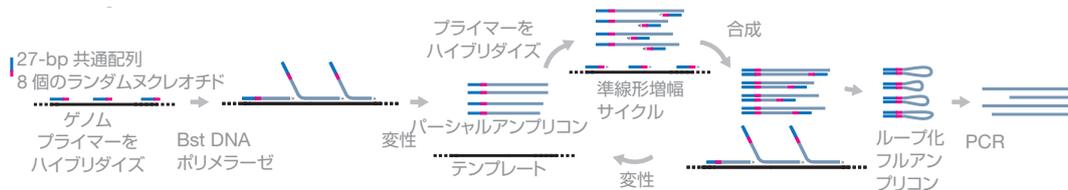
Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S. L., Marshall J., et al. (2013) Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. Nucleic Acids Res 41: 6119-6138

多重アニーリングおよびループ化による増幅サイクル法 (MALBAC)

多重アニーリングおよびループ化による増幅サイクル法 (MALBAC) は、MDAの欠点に対処することを意図としたものです¹¹²。この手法では、MALBACプライマーがランダムにDNAテンプレートにアニーリングします。高温下で置換活性を示すポリメラーゼが、セミアンプリコンを形成しながら、テンプレートを増幅します。増幅とアニーリングプロセスが繰り返されていくうちに、セミアンプリコンが、5'末端に相補的な3'末端を有する完全なアンプリコンへと増幅されます。すると、フルアンプリコンはハイブリッド形成を終え、ループ構造を形成します。このとき、ループアンプリコンのさらなる増幅は抑制され、セミアンプリコンとゲノムDNAのみが増幅されます。フルアンプリコン配列のディープシーケンスを行うことで、高精度なリードが得られます。また、ディープシーケンスにより、改良されたアライメントと一貫性の高い配列が得られます。

-
112. Zong C., Lu S., Chapman A. R. and Xie X. S. (2012) Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science* 338: 1622-1626
113. Lovett M. (2013) The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet* 22: R22-26
114. Lasken R. S. (2013) Single-cell sequencing in its prime. *Nat Biotechnol* 31: 211-212
-

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 大きなテンプレートのシーケンスが可能。 出発物質が非常に限られているサンプルのシングルセルシーケンスまたはシーケンスを行うことが可能。 フルアンプリコンのループ化により、テンプレートが実際よりも多くなるのを防ぎ、PCRバイアスを軽減することが可能。 GCリッチな領域を増幅することが可能。 ゲノムカバレッジが均一。 MDAに比べてアライメントのドロップアウト率が低い。 	<ul style="list-style-type: none"> Phi 29に比べてポリメラーゼが比較的エラーを起こしやすい。 プロトコールが温度感受性。 ゲノムカバレッジは最大90%であるが¹¹³、ゲノムの一部の領域は常に実際よりも少なく見積もられる¹¹⁴。



参考文献

Hou Y., Fan W., Yan L., Li R., Lian Y., et al. (2013) Genome analyses of single human oocytes. *Cell* 155: 1492-1506

卵母細胞には染色体交差が生じ、受精卵で両親の染色体が固有の組合せを形成します。本稿は、ヒト卵母細胞を用いて実証された、シングルセルゲノム解析のプロトコールに関するものです。卵母細胞の交差マップを得るため、著者らは、MALBAC を用いたシーケンスにより、同一女性卵子提供者に由来する卵母細胞の前核から採取した 3 組の第 1 極体と第 2 極体をシーケンスし、これらのゲノムをフェーシングしました。この画期的なアッセイは、減数分裂の研究や体外受精の際の胚選択に全ゲノムシーケンスを応用することにつながる重要な前進を象徴しています。

イルミナ技術 : HiSeq 2000

Ni X., Zhuo M., Su Z., Duan J., Gao Y., et al. (2013) Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 21083-21088

CTC の同定と研究に大きな関心が寄せられています。原発腫瘍由来の細胞が血流に入り、転移を伝播することがあります。そのような解析に対する主な障壁は、シングルセルから得られる DNA インプット量が少なく、カバレッジが低下してしまうことです。この研究では、MALBAC を用いて、肺がん患者由来シングル CTC の WGA シーケンスを行いました。著者らは、がんのサブタイプが同じである患者において同一である CNV を同定しました。がんに関するこのような情報は、薬剤耐性やがんのサブタイプの特定の役に立つ可能性があり、個別化治療につながる手段となり得る診断法を提供しています。

イルミナ技術 : MiSeq, HiSeq 2000

Zong C., Lu S., Chapman A. R. and Xie X. S. (2012) Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science* 338: 1622-1626

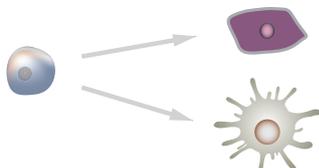
これは MALBAC 法について記述した初めての論文で、著者らは、この手法は、シングルセルについて調べるための従来の MDA 法よりも検出効率が高いと述べています。著者らは、偽陽性でないシングルがん細胞の CNV と一塩基変異体 (SNVs) を検出できることを実証しました。

イルミナ技術 : HiSeq 2000

エピジェネティクス

エピジェネティクスは、胚形成、分化、系譜特定化およびがんの進化の過程において極めて重要な役割を果たしています^{115, 116}。胚形成の過程においては、細胞が分化すると、これらの細胞はゲノムレベルで異なるだけでなく、エピゲノムレベルでも異なり¹¹⁵、その後の RNA 発現や細胞表現型に影響を及ぼします^{115, 116, 117}。生活習慣、環境要因、化学物質への曝露、ストレスなどは、妊娠中に、幹細胞のみならず分化体細胞におけるエピジェネティックな指標をも変化させることができる要因です¹¹⁸。エピジェネティックな指標の変化により、心血管疾患、呼吸器疾患、神経変性疾患、がんといった、さまざまな疾患に至る可能性があります¹¹⁸。現在、がんの進化とその後の腫瘍の不均一性におけるエピジェネティクスの役割を理解することに大きな関心が寄せられています。

細胞が、特定の条件下で、ある時点において、時期に関連してある組織に存在することを考えると、母集団シーケンスでは、どの細胞がある特定の遺伝型とその後の表現型を示すようになるのかを特定することができません¹¹⁷。シングルセルの DNA メチル化および ChIP-Seq に関するデータに、RNA 発現および SNV に関するデータを統合することで、これらの修飾の機能と、遺伝子制御におけるそれらの機能の役割を正確に解明することができます。ある時点において、ある微小環境内に存在するシングルセルの、ゲノム、エピゲノムおよびトランスクリプトームに関するデータを統合するような高解像度シーケンスデータを得ることは、最近まで不可能であるとされてきました。



幹細胞の分化過程において、エピゲノムレベルでの変化は、RNA 発現や、多くの細胞表現型の形成に影響を及ぼします。

総説

Baslan T. and Hicks J. (2014) Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev* 26C: 59-65

Easwaran H., Tsai H. C. and Baylin S. B. (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 54: 716-727

Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123

McGraw S., Shojaei Saadi H. A. and Robert C. (2013) Meeting the methodological challenges in molecular mapping of the embryonic epigenome. *Mol Hum Reprod* 19: 809-827

Umer M. and Herceg Z. (2013) Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods. *Antioxid Redox Signal* 18: 1972-1986

-
115. Guo H., Zhu P., Wu X., Li X., Wen L., et al. (2013) Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* 23: 2126-2135
 116. Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597
 117. Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123
 118. Alegria-Torres J. A., Baccarelli A. and Bollati V. (2011) Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics* 3: 267-277
-

参考文献

Eckersley-Maslin M. A., Thybert D., Bergmann J. H., Marioni J. C., Flicek P., et al. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell* 28: 351-365

ランダム常染色体モノアリル遺伝子発現とは、2つの相同アリルのうちの一方に由来する遺伝子の転写を指します。この研究では、イルミナのシーケンスを用いたアリル特異的 RNA-Seq スクリーニングにより、マウス細胞株におけるモノアリル発現メカニズムの検討を行いました。著者らは、モノアリルに発現したランダムな遺伝子を多数同定し、DNAメチル化と核局在のいずれにおいても活性アリルと不活性アリルが区別されないことを発見しました。しかし、著者らは、特定のヒストン修飾の濃縮に相関性が存在することを発見しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Green M. R., Vicente-Duenas C., Romero-Camarero I., Long Liu C., Dai B., et al. (2014) Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun* 5: 3904

悪性の状態に至る体細胞ゲノム変化を獲得することによってがんが生じるということは、十分に実証されています。しかし、何が引き金となってがんが発生するのかを特定することは困難です。この研究では、3q27.2の具体的な獲得、およびそのDLBCLの転帰不良との関連性について検討を行いました。イルミナの Genome Analyzer を用いて、著者らは全ゲノムの配列を決定し、HSPCのDNAメチル化の特徴を明らかにしました。著者らは、HSPCにおけるBCL6がん遺伝子発現を同定し、ノックイン発現により、マウスHSPC内の一過性Bcl6発現が成熟B細胞リンパ腫への進展を惹起し得ることを明らかにしました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Obata Y., Furusawa Y., Endo T. A., Sharif J., Takahashi D., et al. (2014) The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol* 15: 571-579

腸内細菌に対する過度な免疫応答を抑制するには腸内Treg細胞が必要です。この研究では、腸内微生物叢への曝露下でのDNAメチル化の状態および制御について検討を行いました。著者らは、イルミナのHiSeqを用いて、DNAメチル化アダプターであるUhrf1のT細胞特異的欠損を有するマウスを調べました。著者らは、この欠損を有するマウスが腸内制御性T細胞の増殖異常を示し、重度の大腸炎を発症することを発見しました。著者らは、腸内の免疫学的恒常性を維持するエピジェネティックな機構にはUhrf1が必要であると結論づけました。

イルミナ技術: HiSeq 1000

Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., Krueger F., Saadeh H., et al. (2014) Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 11: 817-820

DNAメチル化は、細胞における遺伝子制御にとって重要なメカニズムの1つです。この研究は、個々の細胞の全ゲノムDNAメチル化の特徴を明らかにするための、イルミナのHiSeqシーケンスを用いたシングルセルバイサルファイトシーケンス法(scBS-Seq)に関するものです。著者らは、マウスES細胞にこの手法を用いて、エピジェネティックな多様性がゲノム中の種々の機能部位間で異なることを明らかにしました。

イルミナ技術: HiSeq

Guo H., Zhu P., Wu X., Li X., Wen L., et al. (2013) Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* 23: 2126-2135

DNAメチル化は、遺伝子発現調節における重要な部分であり、同一組織内でも細胞間で異なります。この研究は、塩基解像度でのシングルセルのメチローム解析の手法に関するものです。著者らは、イルミナのHiSeq 2000を用いたシーケンスのために、scRRBSライブラリを作製しました。マウスES細胞の解析において、著者らは、第一極体のメチロームが、同一配偶子内の第2分裂中期の卵母細胞のメチロームに匹敵することを初めて示しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

de Wit E., Bouwman B. A., Zhu Y., Klous P., Splinter E., et al. (2013) The pluripotent genome in three dimensions is shaped around pluripotency factors. *Nature* 501: 227-231

Kind J., Pagie L., Ortazobkoyun H., Boyle S., de Vries S. S., et al. (2013) Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell* 153: 178-192

Magnusdottir E., Dietmann S., Murakami K., Gunesdogan U., Tang F., et al. (2013) A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat Cell Biol* 15: 905-915

Nagano T., Lubling Y., Stevens T. J., Schoenfelder S., Yaffe E., et al. (2013) Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* 502: 59-64

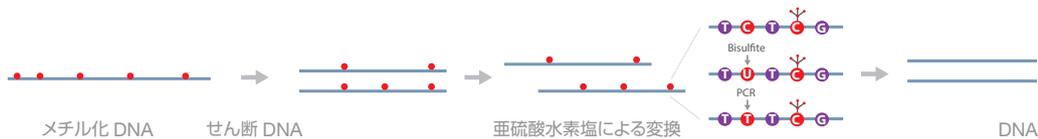
バイサルファイトシーケンス (BS-Seq)

バイサルファイトシーケンス (BS-Seq) または全ゲノムバイサルファイトシーケンス (WGBS) は、ゲノム DNA におけるメチル化シトシンを検出するための、十分に確立されたプロトコールです¹¹⁹。この手法では、ゲノム DNA を亜硫酸水素ナトリウムで処理した後にシーケンスを行うことで、ゲノムにおけるメチル化シトシンの一塩基解像度を得ることができます。亜硫酸水素塩処理の過程において、非メチル化シトシンは脱アミノ化されてウラシルとなり、シーケンスの際にチミジンに変換されます。同時に、メチル化シトシンは脱アミノ化を免れ、シトシンと読み取られます。その後、処理配列と未処理配列を比較することにより、メチル化シトシンの部位を特定することができます。DNA の亜硫酸水素塩処理により、非メチル化シトシンはチミジンに変換され、それにより配列複雑性が減少します。非常に高精度なディープシーケンスは、この複雑性減少を低減するのに役立ちます。

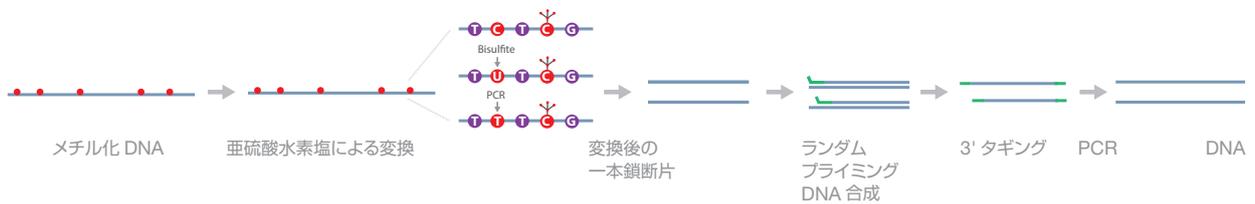
119. Feil R., Charlton J., Bird A. P., Walter J. and Reik W. (1994) Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res* 22: 695-696

EpiGnome Methyl-Seq キットには、第一段階として亜硫酸水素塩変換を組み込んだ、独自のライブラリー構築法が用いられています。EpiGnome 法では、均一なカバレッジが得られながらも、サンプルの多様性が保持されます。

BS-Seq または WGBS



EpiGnome Methyl-Seq



長所	短所
BS-SeqまたはWGBS <ul style="list-style-type: none"> 一塩基解像度で、全ゲノムにわたって、CpGと非CpGメチル化をカバーできる。 密度5mC以下および反復領域をカバーできる。 	<ul style="list-style-type: none"> 亜硫酸水素塩が非メチル化シトシンをチミジンに変換し、配列複雑性が減少することにより、アライメントが困難となり得る。 亜硫酸水素塩による変換の際に、シトシンがチミジンに変換され、SNVが見落とされることがある。 亜硫酸水素塩による変換の際に、5mCと5hmCが区別されない。
EpiGnome(TruSeq DNA Methylation) <ul style="list-style-type: none"> ライブラリー作製前に亜硫酸水素塩による変換が生じる。 少ないゲノムDNAインプット量(50 ng)。 CpG、CHGおよびCHHのカバレッジが均一。 断片化が不要で、メチル化アダプターも不要。 サンプルの多様性が保持される。 	<ul style="list-style-type: none"> 亜硫酸水素塩が非メチル化シトシンをチミジンに変換し、配列複雑性が減少することにより、アライメントが困難となり得る。 亜硫酸水素塩による変換の際に、シトシンがチミジンに変換され、SNVが見落とされることがある。 亜硫酸水素塩による変換の際に、5mCと5hmCが区別されない。 重複率が高い。

参考文献

Green M. R., Vicente-Duenas C., Romero-Camarero I., Long Liu C., Dai B., et al. (2014) Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun* 5: 3904

悪性の状態に至る体細胞ゲノム変化を獲得することによってがんが生じるということは、十分に実証されています。しかし、何が引き金となってがんが発生するのかを特定することは困難です。この研究では、3q27.2の具体的な獲得、およびそのDLBCLの転帰不良との関連性について検討がなされました。イルミナのGenome Analyzerを用いて、著者らは全ゲノムの配列を決定し、HSPCのDNAメチル化の特徴を明らかにしました。著者らはHSPCにおけるBCL6がん遺伝子発現を同定し、ノックイン発現により、マウスHSPC内の一過性Bcl6発現が成熟B細胞リンパ腫への進展を惹起し得ることを明らかにしました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., Krueger F., Saadeh H., et al. (2014) Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 11: 817-820

DNAメチル化は、細胞における遺伝子制御にとって重要なメカニズムの1つです。この研究は、個々の細胞の全ゲノムDNAメチル化の特徴を明らかにするための、イルミナのHiSeqシーケンサーを用いたscBS-Seqに関するものです。著者らは、マウスES細胞にこの手法を用いて、エピジェネティックな多様性がゲノム内の種々の機能部位間で異なることを明らかにしました。

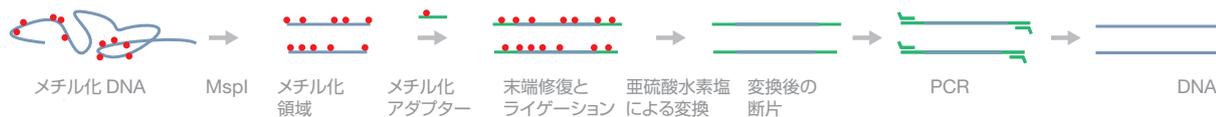
イルミナ技術: HiSeq

Reduced-Representation Bisulfite Sequencing (RRBS-Seq)

Reduced-Representation Bisulfite Sequencing (RRBS-Seq) は、ゲノム DNA に 1 つまたは複数の制限酵素を用いて配列特異的な断片化を行うためのプロトコールです¹²⁰。断片化されたゲノム DNA に亜硫酸水素塩処理を施してシーケンスを行います。RRBS-Seq は、特定の領域について調べる際によく用いられる手法です。この手法は、プロモーターや反復領域などにおいてメチル化が高度である場合に特に効果的です。

120. Meissner A., Gnirke A., Bell G. W., Ramsahoye B., Lander E. S., et al. (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 33: 5868-5877

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 一塩基解像度で、アイランドにおける CpG の全ゲノムをカバーできる。 CpGメチル化の高密度領域をカバーできる。 	<ul style="list-style-type: none"> 制限酵素が特定の部位を切断するため、配列選択にバイアスが発生する。 ゲノム中の全 CpG の 10~15% しか測定されない。 5mC と 5hmC が区別されない。 非 CpG 領域、全ゲノム CpG および酵素制限部位のない領域の CpG がカバーされない。



参考文献

Guo H., Zhu P., Wu X., Li X., Wen L., et al. (2013) Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* 23: 2126-2135

DNA メチル化は、遺伝子発現調節における重要な部分であり、同一組織内でも細胞間で異なります。この研究は、一塩基解像度でのシングルセルのメチローム解析の手法に関するものです。著者らは、イルミナの HiSeq 2000 を用いたシーケンスのために、scRRBS ライブラリを作製しました。マウス ES 細胞の解析において、著者らは、第一極体のメチロームが、同一配偶子内の第 2 分裂中期の卵母細胞のメチロームに匹敵することを初めて示しました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

メチルキャプチャー (MethylCap) シーケンス またはメチル結合領域キャプチャー (MBDCap) シーケンス

MethylCap^{121, 122} または MBDCap^{123, 124} では、タンパク質を用いてゲノム中のメチル化 DNA をキャプチャーします。まず、ゲノム DNA を超音波処理します。次いで、タグ標識した、メチル化シトシンに結合することのできる MBD タンパク質で、インキュベートします。その後、タンパク質-DNA 複合体を、このタンパク質のタグに特異的な抗体結合ビーズで沈殿させます。ディープシーケンスではゲノムカバレッジがより高くなり、MBD に結合したメチル化 DNA の大多数をキャプチャーすることができます。

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 密度5mCのCpG領域および反復領域のゲノム全般をカバーできる。 MBDタンパク質が5hmCと相互作用しない。 	<ul style="list-style-type: none"> ゲノム全般でのCpGおよび非CpGメチル化がカバーされない。密度5mC未満の領域も見落とされる。 一塩基解像度に比べて塩基対解像度が低い(約150 bp)。 タンパク質に基づく選択にバイアスが生じ、過剰メチル化領域が選択される。

121. Bock C., Tomazou E. M., Brinkman A. B., Muller F., Simmer F., et al. (2010) Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol* 28: 1106-1114
122. Brinkman A. B., Simmer F., Ma K., Kaan A., Zhu J., et al. (2010) Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 52: 232-236
123. Rauch T. A., Zhong X., Wu X., Wang M., Kernstine K. H., et al. (2008) High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 252-257
124. Rauch T. A. and Pfeifer G. P. (2009) The MIRA method for DNA methylation analysis. *Methods Mol Biol* 507: 65-75



参考文献

Obata Y., Furusawa Y., Endo T. A., Sharif J., Takahashi D., et al. (2014) The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol* 15: 571-579

腸内細菌に対する過度な免疫応答を抑制するには腸内 Treg 細胞が必要です。この研究では、腸内微生物叢への曝露下での DNA メチル化の状態および制御について検討を行いました。著者らは、イルミナの HiSeq を用いて、DNA メチル化アダプターである Uhrf1 の T 細胞特異的欠損を有するマウスを調べました。著者らは、この欠損を有するマウスが腸内制御性 T 細胞の増殖異常を示し、重度の大腸炎を発症することを発見しました。著者らは、腸内の免疫学的恒常性を維持するエピジェネティックな機構には Uhrf1 が必要であると結論づけました。

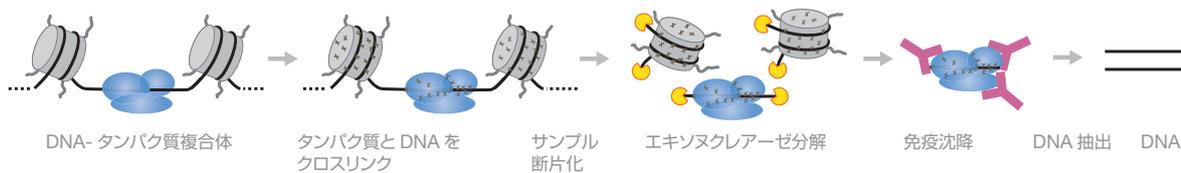
イルミナ技術: HiSeq 1000

クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq)

クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) は、特定のタンパク質結合部位をマッピングするための、十分に確立された手法です¹²⁵。この手法では、DNA-タンパク質複合体を *in vivo* においてクロスリンクします。その後、サンプルを断片化し、エキソヌクレアーゼで処理して非結合オリゴヌクレオチドをトリミングします。タンパク質特異的の抗体を用いて DNA-タンパク質複合体を免疫沈降します。DNA を抽出してシーケンスを行うと、高解像度のタンパク質結合部位配列が得られます。

125. Solomon M. J., Larsen P. L. and Varshavsky A. (1988) Mapping protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53: 937-947
126. Zentner G. E. and Henikoff S. (2012) Surveying the epigenomic landscape, one base at a time. *Genome Biol* 13: 250

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> タンパク質結合部位を塩基対解像度で分析することが可能。 特異的な制御因子またはタンパク質をマッピングすることが可能。 エキソヌクレアーゼの使用により、非結合DNAによるコンタミネーションを排除¹²⁶。 	<ul style="list-style-type: none"> 非特異的の抗体によって、被分析DNA-タンパク質複合体プールが希釈される可能性がある。 標的タンパク質が特定されていなければならない、抗体を産生できなければならない。



参考文献

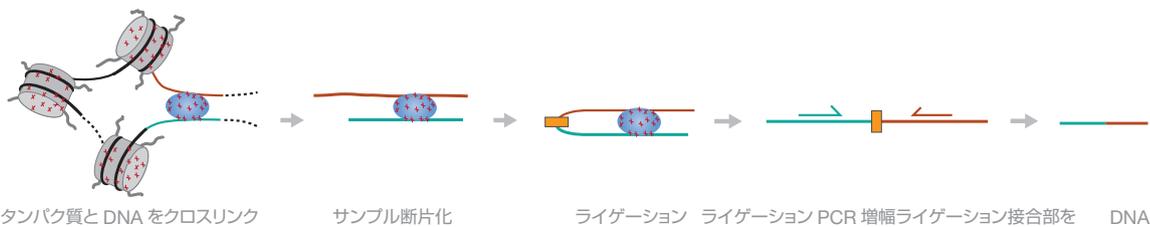
- Magnusdottir E., Dietmann S., Murakami K., Gunesdogan U., Tang F., et al. (2013) A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat Cell Biol* 15: 905-915
- Kind J., Pagie L., Ortabozkoyun H., Boyle S., de Vries S. S., et al. (2013) Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell* 153: 178-192

クロマチン構造キャプチャーシーケンス (Hi-C/3C-Seq)

クロマチン構造キャプチャーシーケンス (Hi-C)¹²⁷ または 3C-Seq¹²⁸ は、クロマチン相互作用の解析に用いられます。この手法では、ホルムアルデヒドを用いて DNA-タンパク質複合体をクロスリンクします。サンプルを断片化したら、DNA をライゲーションし、分解します。得られた DNA 断片を PCR 増幅してシーケンスを行います。ディープシーケンスでは、塩基対解像度の連結断片が得られます。

-
127. Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., Imakaev M., Ragozy T., et al. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326: 289-293
128. Duan Z., Andronescu M., Schutz K., Lee C., Shendure J., et al. (2012) A genome-wide 3C-method for characterizing the three-dimensional architectures of genomes. *Methods* 58: 277-288
-

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 長距離のDNA相互作用を検出することが可能。 高スループットな手法。 	<ul style="list-style-type: none"> ランダムな染色体の衝突によって検出に影響が及ぶ場合がある。 3C PCRが困難で、慎重な操作と実験デザインが必要。 相互作用をさらに確認することが必要。 ステップが多数であるため、大量の出発物質が必要。



参考文献

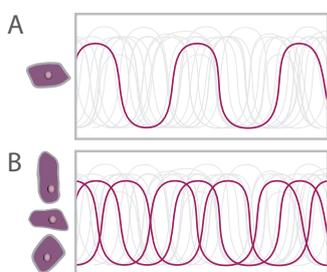
Nagano T., Lubling Y., Stevens T. J., Schoenfelder S., Yaffe E., et al. (2013) Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* 502: 59-64

3C を基盤とするゲノム技術により、数百万個の遺伝子座の密着性を同時に調べることができます。この研究において、著者は、イルミナのシーケンサーを用いて、シングルコピー X 染色体の全ゲノム統計解析および構造モデルを組み合わせたシングルセルの 3C を行いました。著者は、メガベース規模では個々の染色体が領域構造を維持しているものの、より大きな規模では染色体構造が細胞間で異なることを示しています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}, HiSeq

RNA への応用

発現量の少ない RNA 検出とは、無細胞環境中の微量な RNA 分子（循環腫瘍 RNA など）の検出と、シングルセルの発現パターンの検出の両方を指します。組織は多数の異なる細胞種で構成されており、それぞれが明確に異なる一連の機能を果たしています。単一の細胞種内でも、トランスクリプトームは極めて動的であり、時間、空間および細胞周期に依存しながら変化しています。細胞の回収と取扱い、そして増幅時の精度とバイアスに関する技術上の問題も、状況をさらに複雑にしています。この重層的な複雑性を解消するには、数千個もの細胞を解析しなければならないでしょう。固有のバーコードを使用することで、マルチプレックスを行って、各サンプルのリードがほとんど減少することなくプールのサンプルの数が大幅に増加しました。細胞キャプチャー法やサンプル調製法の新たな改善により、より多くの情報がより速く、より少ないコストで得られるようになります^{129, 130}。これらの進歩によって、私たちの細胞機能に関する知識が深まり、研究および人々の健康に重要な影響がもたらされることになるでしょう¹³¹。



この断面図に描かれている腎臓などの器官は、表現型的に異なる無数の細胞で構成されています。シングルセルトランスクリプトミクスにより、これらの細胞種それぞれが持つ機能の特徴を明らかにすることができます。

「シングルセルトランスクリプトミクスは、混合的な細胞集団の解体を可能にします。逆にごく限られた物質しか入手できない場合には、CTC など極めて希少な細胞のトランスクリプトームの特徴を明らかにできる場合があります。」

Macauley and Voet 2014

参考文献

- Baslan T. and Hicks J. (2014) Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev* 26C: 59-65
- Eckersley-Maslin M. A. and Spector D. L. (2014) Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends Genet* 30: 237-244
- Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860
- Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427
- Lovett M. (2013) The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet* 22: R22-26
- Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630
- Spaethling J. M. and Eberwine J. H. (2013) Single-cell transcriptomics for drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol* 13: 786-790

129. Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860
130. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630
131. Spaethling J. M. and Eberwine J. H. (2013) Single-cell transcriptomics for drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol* 13: 786-790

参考文献

Bajikar S. S., Fuchs C., Roller A., Theis F. J. and Janes K. A. (2014) Parameterizing cell-to-cell regulatory heterogeneities via stochastic transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E626-635

細胞間での遺伝子制御の違いは、発生やがんなど、数多くの生物学的背景で生じます。ほとんどの包括的な分子法では、集団を平均化することが必要であるため、偏りなく制御の不均一性を見つけ出すことは困難です。この研究では、全体的な測定値を数学的に解析することにより、つまり少数の細胞の平均値から、いかにシングルセルの制御状態を推測できるかが明らかになりました。著者らは、サンプリングの範囲が限られている場合には、単一細胞サンプルを用いるよりも、プールしたサンプルを用いるほうが、はるかに高い精度で集団レベルの推測を行うことができることを突き止めました。

Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 11: 190-196

細胞混合物から抽出した RNA に依存する RNA シーケンス法では、同一組織細胞間での個々の発現のばらつきは明確になりません。本稿において著者らは、シングルセル研究に応用できる *in vivo* トランスクリプトーム解析 (TIVA) について発表しています。イルミナのシーケンス技術を組み合わせ、著者らは培養と *in vivo* の双方でシングルニューロン間のトランスクリプトーム変動を捕らえ、解析しています。しかもこの方法は非侵襲的であり、インタクトな組織に応用できる可能性があります。この方法により、これまで困難とされてきた、複雑な組織の細胞不均質性の詳細な研究が可能となり、*in vivo* 生体機能イメージングとの併用が可能になります。

イルミナ技術: HiSeq

Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods* 11: 41-46

この包括的な解析において、著者らはマイクロフルイデックス自動システムを用いてシングルセル RNA-Seq の精度を qPCR と定量的に比較しました。市販のシングルセル RNA 増幅法を用いて、マイクロリットルスケールとナノリットルスケールの両方で、ライブラリー調製を行い、イルミナの HiSeq 2000 でシーケンスを行いました。この研究により、シングルセル RNA-Seq で qPCR と定量的に同等の結果が得られることが確認されました。これは、サンプル調製をマイクロフルイデックスデバイスなどを用いてナノリットルレベルの反応容量で行った場合に特に顕著でした。

イルミナ技術: HiSeq

Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublotte J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240

遺伝子発現は個々の細胞間で大きく異なっている可能性があり、ごく最近、シングルセルの発現を観察するゲノムプロファイリング手法が開発されました。この研究では、イルミナの HiSeq で Smart-Seq シングルセル RNA シーケンスを行って、リポ多糖に対してマウス BMDC の応答が不均一であることについて検討を行いました。著者らは、メッセンジャー RNA の存在量パターンおよびスプライシングパターンに広範囲な二峰性変動が存在することを発見し、その後、一部の転写産物について RNA-FISH 法によるバリデーションを行いました。

イルミナ技術: HiSeq

Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597

哺乳類の着床前発生の遺伝子調節メカニズムについて、その特徴を明らかにし、このメカニズムを詳しく分析することを目的としたこの研究では、シングルセルの全トランスクリプトームシーケンスにより、ヒトおよびマウスに由来する初期胚の検討を行いました。著者らは、多型転写産物の重要部分の新たな発生段階特異的モノアリル発現パターンについて報告しています。種間比較により、ヒト初期発生段階特異的モジュールの大多数 (9 個中 7 個) が保存されたものの、発生の特異性とタイミングはヒトとマウスとの間で異なることが明らかになりました。

イルミナ技術: HiSeq

Shalek A. K., Satija R., Shuga J., Trombetta J. J., Gennert D., et al. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510: 363-369

Yan L., Yang M., Guo H., Yang L., Wu J., et al. (2013) Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1131-1139

Goetz J. J. and Trimarchi J. M. (2012) Transcriptome sequencing of single cells with Smart-Seq. *Nat Biotechnol* 30: 763-765

Allele-Specific Gene Expression

二倍体の生命体は、それぞれの親から受け継がれた2本の染色体を持っています。遺伝子は、一方のアリルから転写される場合もあれば（モノアリル発現）、両方のアリルから転写される場合もあります（バイアリル発現）。ポピュレーションシーケンスを行うことで、全体的な遺伝子発現を明らかにすることができますが、希少アイソフォームの発現レベルは失われてしまうことがあります。シングルセルシーケンスでは、このような希少アイソフォームを検出するとともに、モノアリル発現とバイアリル発現の差も検出することができます。

RNA-FISH、RNA-Seq、PCR、生細胞イメージングなどの確立された手法に比べ、シングルセル RNA-Seq では、ある集団内の個々の細胞におけるモノアリル発現やバイアリル発現を最も正確に調べることができます¹³²。RNA 発現データと SNV データを組み合わせることで、どの SNV が、アリルの選択的発現やサイレンシングに至っていて、疾患やがんまたは組織特異的な分化においてどのような役割をその結果たしているのかを統合的に調べることができます^{133, 134}。混合的な背景を持つマウス胚のシングルセル RNA-Seq を用いたある研究において、モノアリル発現は転写バーストモデルと一致していました¹³⁵。それぞれの細胞において、両方のアリルから徐々に非依存的な転写バーストが起こりましたが、多くの場合は、どの時点でも、一方のアリルから転写された RNA しか存在していませんでした¹³⁶。このようなレベルの詳細な解析は、シングルセルでしか行うことができません。



分裂化の過程で細胞が分裂すると、これらの細胞は SNV を蓄積しますが、これらの SNV は、ランダムなモノアリル遺伝子発現の決定において何らかの役割を果たしている可能性があります^{132, 137}。

参考文献

- Eckersley-Maslin M. A. and Spector D. L. (2014) Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends Genet* 30: 237-244
- Gendrel A. V., Attia M., Chen C. J., Diabangouaya P., Servant N., et al. (2014) Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell* 28: 366-380
- Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860
- Barlow D. P. (2011) Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu Rev Genet* 45: 379-403

132. Eckersley-Maslin M. A. and Spector D. L. (2014) Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends Genet* 30: 237-244
133. Gendrel A. V., Attia M., Chen C. J., Diabangouaya P., Servant N., et al. (2014) Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell* 28: 366-380
134. Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860
135. Raj A. and van Oudenaarden A. (2008) Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 135: 216-226
136. Deng Q., Ramskold D., Reinius B. and Sandberg R. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343: 193-196
137. Eckersley-Maslin M. A., Thybert D., Bergmann J. H., Marionni J. C., Flicek P., et al. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell* 28: 351-365

参考文献

Deng Q., Ramskold D., Reinius B. and Sandberg R. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343: 193-196

著者らは、モノアリルに発現したランダムな遺伝子を多数同定し、DNAメチル化と核局在のいずれにおいても活性アリルと不活性アリルが区別されないことを発見しました。しかし、著者らは、特定のヒストン修飾の濃縮に相関性が存在することを発見しました。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24: 496-510

最近の複数の研究により、遺伝子発現レベルおよび転写制御における細胞間多様性が次々と発見されています。この研究では、個々の細胞間における転写の多様性を明らかにするため、イルミナの HiSeq 2000 で Smart-seq シングルセル RNA-seq プロトコルを用いて、リンバ芽球様細胞株 GM12878 の検討を行いました。著者らは、定量を慎重に行うことにより、発現レベルには、個々の細胞間で技術上なばらつき以上の有意差が認められると判断しました。また、著者らは、30~100 個の細胞から成る小規模なプールから得られたトランスクリプトームが、大量のインプット量から得られた同時期のプール RNA-Seq 解析の情報量および再現性とほぼ一致していることを示しました。

イルミナ技術: HiSeq

Pan X., Durrett R. E., Zhu H., Tanaka Y., Li Y., et al. (2013) Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 594-599

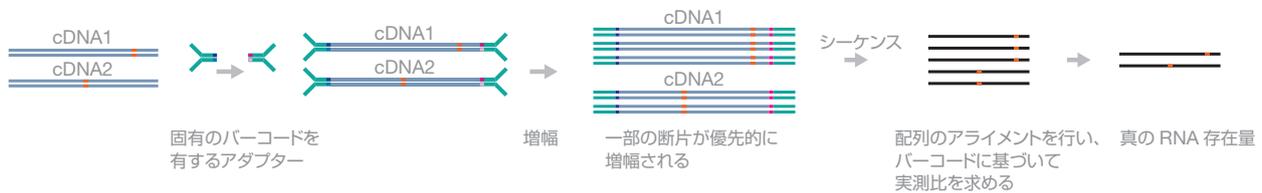
Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597

デジタルRNAシーケンス

デジタル RNA シーケンスは、増幅前に RNA 分子にバーコード標識を行うことで、配列依存的な PCR 増幅のバイアスを排除するという RNA-Seq です¹³⁸。RNA を cDNA に逆転写させた後、それぞれに固有のバーコードを持つ過剰量のアダプターをこの反応に追加します。その後、バーコード標識された cDNA を増幅し、シーケンスを行います。ディープシーケンスしたリードを比較し、バーコードを用いて RNA 存在量の実測比を求めます。

138. Shiroguchi K., Jia T. Z., Sims P. A. and Xie X. S. (2012) Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 1347-1352

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> PCR時の増幅バイアスが少ない。 RNA存在量に関する情報が得られる。 コピー数の少ないRNAの検出が可能。 1コピー単位の解像度。 	<ul style="list-style-type: none"> 一部の増幅バイアスは排除不可能。 ライゲーションの際にバーコードがターゲットと反応しない場合がある。



参考文献

Shiroguchi K., Jia T. Z., Sims P. A. and Xie X. S. (2012) Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 1347-1352

PCR 法が増幅ステップに含まれる実験プロトコールは、配列依存的なバイアスが混入しやすいとされています。RNA-Seq の場合には、このようなバイアスにより、発現レベルの定量が困難となります。これは、特にコピー数が非常に少ない場合に顕著です。この研究では、断片化した RNA プールに固有のバーコード配列を付加して定量測定を行う高精度な手法として、デジタル RNA-Seq を導入しています。著者らは、従来の RNA-Seq よりも高い精度および再現性で定量できるデジタル RNA-Seq によって、いかに大腸菌のトランスクリプトームプロファイリングが可能になるかを実証しています。最適化の効果は、シミュレーションデータとの比較により推定しました。

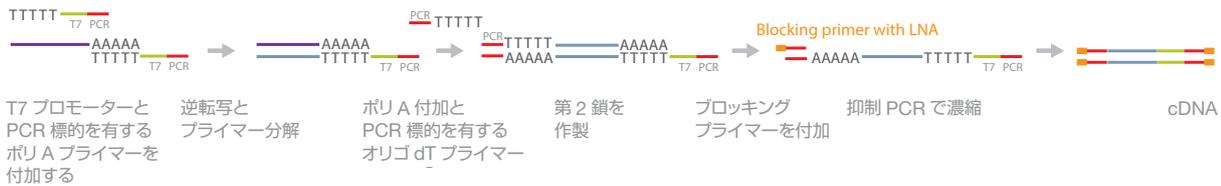
イルミナ技術: Genome AnalyzerIIx

シングルセルの全トランスクリプト増幅 (Quartz-Seq)

Quartz-Seq 法は、シングルセルの全トランスクリプト増幅 (WTA) を最適化する手法です¹³⁹。この手法では、T7 プロモーターと PCR 標的を有する RT プライマーを抽出 mRNA に付加します。逆転写により第 1 鎖 cDNA を合成し、続いて RT プライマーをエキソヌクレアーゼ I で分解します。その後、poly A テールを、PCR 標的を含有する dT プライマーとともに、第 1 鎖 cDNA の 3' 末端に付加します。第 2 鎖の形成後、ブロッキングプライマーを付加して、十分な PCR 濃縮量でシーケンスを行えるようにします。ディープシーケンスでは、シングルセルの全トランスクリプトームを高精度かつ高解像度で得ることができます。

139. Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., et al. (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 14: R31

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 自動化に適した単一チューブ反応。 RTプライマーをエキソヌクレアーゼIで分解し、産物の増幅を防ぐ。 断片が短く、濃縮の際に産物が抑制される。 	<ul style="list-style-type: none"> PCRバイアスにより、GCの多いテンプレートが実際よりも少なくなる可能性がある。 ポリメラーゼによって増幅エラーが生じ、シーケンスが正しく行われない。 PCR時にポリメラーゼによって500 bp未満のターゲットが優先的に増幅される。



参考文献

Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., et al. (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 14: R31

個々の細胞は、同じゲノムを共有していたとしても、異なった遺伝子発現を示すことがあります。遺伝子発現において個々の細胞を解析するには、バイアスが最小限に抑えられた、信頼性の高いプロトコルが必要になります。本稿は、イルミナのシーケンスをベースとする新規のシングルセル RNA-Seq 手法である Quartz-Seq について発表したもので、この手法では、既存の手法に比べてプロトコルが簡潔で、再現性および精度も高くなっています。著者らは、主に次の 3 つの点に改良を加えました。1) 副産物の合成を抑えられるようにプロトコルを最適化、2) 単一チューブ反応を可能にする信頼性の高い PCR 酵素を同定、3) RT および第 2 鎖合成に最適な条件を設定。

イルミナ技術: TruSeq RNA Sample Prep, HiSeq 2000

設計プライマーによるRNAシーケンス (DP-Seq)

設計プライマーによる RNA シーケンス (DP-Seq) は、わずか 50 pg というスタート量の限られたサンプルから mRNA を増幅する手法です¹⁴⁰。この手法では、まず特殊な定の七量体プライマーセットを設計します。poly A 濃縮により選択した mRNA が第 1 鎖 cDNA 合成を起こします。その後、設計プライマーを第 1 鎖 cDNA にハイブリダイズさせ、続いて第 2 鎖合成と PCR を行います。増幅した DNA のディープシーケンスにより、特定の mRNA 発現をシングルセルレベルで高精度に検出することができます。

-
140. Bhargava V., Ko P., Willems E., Mercola M. and Subramaniam S. (2013) Quantitative transcriptomics using designed primer-based amplification. *Sci Rep* 3: 1740
141. Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678
-

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 出発物質は50 pgと少量でよい。 転写産物長バイアスが少ない。 	<ul style="list-style-type: none"> 七量体を設計するために、標的領域の配列が明確でなければならない。 PCR時の指数関数的増幅により、プライマーダイマーや疑似PCR産物が発生する可能性がある¹⁴¹。 リード長バイアスが発生する。



参考文献

Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) [Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678](#)

限られた量の mRNA を用いる RNA-Seq 法の最近の進歩により、さまざまな生物系における希少細胞種の特徴を明らかにすることが容易になりました。本稿において、著者らは、増幅をベースとする 3 つの手法、Smart-Seq、DP-Seq および CEL-Seq を比較しています。著者らは、低 ~ 中程度発現転写産物の大多数で増幅が不十分であるなど、これらのライブラリーが示す技術的ばらつきが顕著であることを明らかにしました。これらのシーケンスエラーはごくわずかですが、増幅によって生じる大きな技術的ばらつきが、依然として、生物学的にわずかな差異を検出するためにこれらの手法を用いることへの妨げとなっています。

イルミナ技術: HiSeq

Bhargava V., Ko P., Willems E., Mercola M. and Subramaniam S. (2013) [Quantitative transcriptomics using designed primer-based amplification. *Sci Rep* 3: 1740](#)

シーケンス前の標準的な RNA 転写産物増幅法にはバイアスが混入する傾向があります。本稿では、増幅のためにマウスにおける発現転写産物の大多数を標的とすると同時に、これらの転写産物の相対的存在量も維持して、固有のプライマーサブセットを選択するためのプロトコールについて発表しています。このプロトコールはイルミナのシーケンスプラットフォーム用に開発されたもので、著者らは、このプロトコールによって、5 桁を超えるダイナミックレンジを、わずか 50 pg の mRNA から大量の増幅を行うことにより可能であることを実証しています。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

RNAテンプレートの5'末端でのスイッチ機構 (Smart-Seq)

Smart-Seq は、すべての転写産物にわたってリードカバレッジが得られるように改良を加えたシングルセルシーケンスのプロトコールとして開発されました¹⁴²。全ゲノムを網羅する完全なカバレッジにより、代替となる転写産物アイソフォームおよび SNV の検出が可能となりました。このプロトコールでは、細胞を溶解し、RNA をオリゴ (dT) 含有プライマーにハイブリダイズさせます。次に、少量の非テンプレート化 C ヌクレオチドを付加して、第 1 鎖を作製します。この poly C オーバーハングを全長転写産物にのみ付加します。その後、オリゴヌクレオチドプライマーに poly C をオーバーハングさせるようにハイブリダイズさせ、これを用いて第 2 鎖を合成します。全長 cDNA を PCR 増幅し、ナノグラム量の DNA を得ます。PCR 産物を精製し、シーケンスを行います。

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> mRNAの配列が不明でもよい。 出発物質は50 pgと少量でよい。 転写産物全体のカバレッジが改善されている。 リードを高レベルでマッピング可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 鎖特異的でない。 早期マルチプレックスが行われない¹⁴³。 4 Kbを超えるリードの非効率な転写に伴う転写産物長バイアスが発生する¹⁴⁴。 存在量の高い転写産物が優先的に増幅される。 精製過程で物質が失われる恐れがある。 ストランド侵入バイアスが発生しやすい¹⁴⁵。



参考文献

Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678

限られた量の mRNA を用いる RNA-Seq 法の最近の進歩により、さまざまな生物系における希少細胞種の特徴を明らかにすることが容易になりました。本稿において、著者らは、増幅をベースとする 3 つの手法、Smart-Seq、DP-Seq および CEL-Seq を比較しています。著者らは、低 ~ 中程度発現転写産物の大多数で増幅が不十分であるなど、これらのライブラリーが示すばらつきが顕著であることを明らかにしました。これらのシーケンスエラーはごくわずかですが、増幅によって生じる大きな技術的ばらつきが、依然として、生物学的にわずかな差異を検出するためにこれらの手法を用いることへの妨げとなっています。

イルミナ技術: HiSeq

- Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782
- Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630
- Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678
- Tang D. T., Plessey C., Salimullah M., Suzuki A. M., Calligaris R., et al. (2013) Suppression of artifacts and barcode bias in high-throughput transcriptome analyses utilizing template switching. *Nucleic Acids Res* 41: e44

Kadkhodaei B., Alvarsson A., Schintu N., Ramskold D., Volakakis N., et al. (2013) Transcription factor Nurr1 maintains fiber integrity and nuclear-encoded mitochondrial gene expression in dopamine neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 110: 2360-2365

初期のニューロン分化において重要である、発生に関わる転写因子は、多くの場合、成人の脳にも発現することがわかっています。この研究では、マウスモデル系における転写発現を調べることで、中脳腹側部ドーパミン(DA)ニューロンの発生についての検討を試みました。少量の total RNA からのシーケンスが可能である Smart-Seq 法を用いることにより、著者らは、レーザー顕微解剖 DA ニューロンから RNA のシーケンスを行うことに成功しました。著者らの解析により、必須転写因子 Nurr1 の転写活性化と、健康な DA 細胞の維持におけるその主な役割が明らかになりました。

イルミナ技術: HiSeq 2000、Genomic DNA Sample Prep Kit (FC-102-1001 [イルミナ])

Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. Genome Res 24: 496-510

最近の複数の研究により、遺伝子発現レベルおよび転写制御における細胞間多様性が次々と発見されています。この研究では、個々の細胞間における転写の多様性を明らかにするため、イルミナの HiSeq 2000 に Smart-seq シングルセル RNA-seq プロトコルを用いて、リンパ芽球様細胞株 GM12878 の検討を行いました。著者らは、定量を慎重に行うことにより、発現レベルには、個々の細胞間で技術的なばらつき以上に有意差が認められると判断しました。また、著者らは、30~100 個の細胞から成る小規模なプールから得られたトランスクリプトームが、大量のインプット量から得られた同時期のプール RNA-Seq 解析の情報量および再現性とほぼ一致していることを示しました。

イルミナ技術: Nextera DNA Sample Prep、HiSeq 2000

Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublomme J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. Nature 498: 236-240

遺伝子発現は個々の細胞間で大きく異なっている可能性があり、ごく最近、シングルセルの発現を観察するゲノムプロファイリング手法が開発されました。この研究では、イルミナの HiSeq で Smart-Seq シングルセル RNA シーケンスが行って、リポ多糖に対してマウス BMDC の応答が不均一であることについて検討を行いました。著者らは、メッセンジャー RNA の存在量パターンおよびスプライシングパターンに広範囲な二峰性変動が存在することを発見し、その後一部の転写産物について RNA-FISH 法によるバリデーションを行いました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Yamaguchi S., Hong K., Liu R., Inoue A., Shen L., et al. (2013) Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. Cell Res 23: 329-339

マウス始原生殖細胞 (PGC) は、エピゲノムを分化全能性に向けてリセットするために、全ゲノム DNA メチル化によるリプログラミングを起こします。この研究では、免疫染色技術を用いて 5mC から 5hmC の動態の特徴が明らかにされ、イルミナの RNA-Seq で得られたスクリプトームプロファイルと組み合わせで解析を行いました。この研究により、PGC によるリプログラミング時の 5mC および 5hmC の動態は、能動機構と受動機構の両方が含まれる複数のステップを通して PGC における DNA 脱メチル化が生じるモデルを裏付けていることが明らかになりました。また、トランスクリプトーム研究から、PGC によるリプログラミングは、減数分裂に関わるインプリンティング遺伝子サブセットの活性化において重要な役割を果たしている可能性があることが示唆されました。

イルミナ技術: HiSeq 2000

RNAテンプレートの5'末端での スイッチ機構第2版 (Smart-Seq2)

Smart-Seq2では、元のSmart-Seqプロトコールに改良が加えられています^{146, 147}。新たなプロトコールには、ロックド核酸 (LNA)、より高濃度のMgCl₂ およびベタインが含まれており、収率を大幅に改善するために精製過程が排除されています。このプロトコールでは、遊離 dNTP と、5'末端にアンカー配列を含むオリゴ (dT) がテイルしたオリゴヌクレオチドを含有する緩衝液中に、シングルセルを溶解します。逆転写を行い、2~5塩基の非テンプレート化ヌクレオチドをcDNAの3'末端に付加します。テンプレートスイッチングオリゴ (TSO) を付加し、2分子のリボグアノシンと1分子の修飾グアノシンを保有させて、LNAが3'末端の最後の塩基となるようにします。第1鎖の反応後、限られたサイクル数でcDNAを増幅します。その後、タグメンテーションを用いて、急速かつ効率的に増幅cDNAからシーケンスライブラリーを構築します。

-
146. Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G., et al. (2013) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 10: 1096-1098
147. Picelli S., Faridani O. R., Bjorklund A. K., Winberg G., Sagasser S., et al. (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protocols* 9: 171-181
-

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> 出発物質は50 pgと少量でよい。 mRNAの配列が不明でもよい。 転写産物全体のカバレッジが改善されている。 リードを高レベルでマッピング可能。 	<ul style="list-style-type: none"> 鎖特異的でない。 早期マルチプレックスが行われない。 poly A陽性RNAのみがシーケンスの対象となる。



参考文献

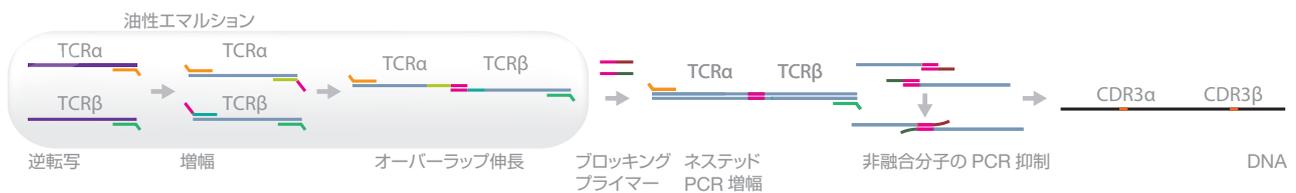
Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G., et al. (2013) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 10: 1096-1098

シングルセル遺伝子発現解析によって細胞の不均質性の特徴が明らかになることが期待されていますが、現在の手法では、カバレッジ、精度またはスループットの点で限界があります。本稿ではSmart-Seq2について紹介されています。この手法では、収率を高め、かつ個々の細胞から作製されるcDNAライブラリーの長さを伸ばすために、RT、テンプレートスイッチングおよび前増幅に改良が加えられています。著者らは、イルミナのHiSeqを用いてSmart-Seq2プロトコールの有効性を評価し、Smart-Seq2のトランスクリプトームライブラリーは、検出、カバレッジ、バイアスおよび精度の点で、Smart-Seqライブラリーから改善されていると結論づけました。また、Smart-Seq2のトランスクリプトームライブラリーは、より低コストの市販の試薬で作製することができます。

イルミナ技術: Nextera DNA Sample Prep, HiSeq 2000

TCRシーケンス

機能性 TCR は、 α 鎖と β 鎖から成るヘテロ二量体タンパク質です。どの T 細胞にも、 α 鎖と β 鎖が固有の組合せで存在します。高精度な機能解析を行うには、細胞溶解の過程で α 鎖と β 鎖のペアリングが破壊されるのを避けるために、両方のサブユニットのシーケンスを同時に行わなければなりません^{148, 149}。



TCR の α 鎖 - β 鎖ペアリングを同定するための細胞ベースのエマルジョン。RT-PCR 法放出された TCR の α 鎖および β 鎖の mRNA を、それぞれの液滴内で、逆転写、増幅、そして重複伸長します。エマルジョンから産物を抽出し、検討対象の融合分子を選択的に増幅します。非融合分子はブロックングプライマーで抑制します¹⁵⁰。

148. Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
149. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515
150. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515

参考文献

Ma Y., Mattarollo S. R., Adjemian S., Yang H., Aymeric L., et al. (2014) CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res* 74: 436-445

アントラサイクリン系薬剤ががん化学療法剤としての治療効果を発揮するには、樹状細胞の誘導と、Tリンパ球依存性の抗がん免疫応答が必要となります。この研究では、マウスがんモデルを用いて、アントラサイクリンをベースとする化学療法の、ケモカイン CCL2 とその受容体 CCR2 に対する効果について検討を行いました。著者らは、遺伝子発現の差の特徴を明らかにするために、イルミナの Mouse BeadArray を用いました。著者らは、アントラサイクリンをベースとする化学療法が、抗原提示を媒介する細胞をはじめとする骨髄性細胞の腫瘍内蓄積を促進することを明らかにしました。これらの結果により、免疫原性細胞死によって誘発される抗がん免疫応答に関する知識が深まります。

イルミナ技術: Mouse BeadArray

Papaemmanuil E., Rapado I., Li Y., Potter N. E., Wedge D. C., et al. (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46: 116-125

急性リンパ性白血病 (ALL) 症例の 4 分の 1 以上が ETV6-RUNX1 融合遺伝子を有しています。この遺伝子融合は ALL に特徴的なものですが、顕性白血病の発症にはさらなる変異が必要となります。この研究では、白血病性形質転換と関連のある二次イベントの特徴を明らかにするために、エクソームシーケンスおよび低カバレッジ全ゲノムシーケンスが用いられました。著者らは、ATF7IP および MGA の 2 つが ALL における新たながん抑制遺伝子であることを突き止めました。著者らは、ETV6-RUNX1 陽性リンパ芽球を白血病へと形質転換する変異プロセスを簡潔に示しています。

イルミナ技術: Genome AnalyzerIIx

Gao C., Kozłowska A., Nechaev S., Li H., Zhang Q., et al. (2013) TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy. *Cancer Res* 73: 7211-7221

この研究では、これまで報告されている放射線療法の免疫原性の機序と、局所放射線療法前後の核酸受容体応答について検討が行われました。著者らは、発現パターンの差の特徴を明らかにするために、イルミナの HiSeq 2000 で RNA-Seq を行いました。この研究から、腫瘍への局所的放射線照射と、骨髄性に細胞特異的な TLR9/STAT3 シグナル伝達阻害を組み合わせることが、放射線抵抗性がんの排除に役立つ可能性があることが示唆されました。

イルミナ技術: RNA-Seq 用 HiSeq 2000

Linnemann C., Heemskerk B., Kvistborg P., Kluijn R. J., Bolotin D. A., et al. (2013) High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med* 19: 1534-1541

患者の T 細胞への TCR 遺伝子の導入は、ウイルス感染とがんの両方の治療法となることが有望視されています。この研究は、イルミナの HiSeq シーケンスプラットフォームを用いた TCR 遺伝子の捕捉とシーケンスにより TCR 配列を同定する、新たな高スループットアッセイに関するものです。このアッセイは、がん生殖系列腫瘍抗原に反応する TCR で構成された、大規模なライブラリアセンブルによって検証されました。著者らは、ヒト由来またはヒトの TCR 遺伝子を導入したマウスに由来するオリゴクローナル T 細胞集団中の抗原特異的 TCR の同定が可能であることを実証しました。

イルミナ技術: TruSeq on Illumina HiSeq 2000

Mamedov I. Z., Britanova O. V., Zvyagin I. V., Turchaninova M. A., Bolotin D. A., et al. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 4: 456

本稿は、SmartSeq と同様に、TCR および IgG cDNA ライブラリー調製のための詳細なプロトコールに関するものです。このプロトコールは 1~2 日で行うことができます。

イルミナ技術: MiSeq、HiSeq 2000

Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublomme J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240

遺伝子発現は個々の細胞間で大きく異なっている可能性があり、ごく最近、シングルセルの発現を観察するゲノムプロファイリング手法が開発されました。この研究では、イルミナの HiSeq で Smart-Seq シングルセル RNA シーケンスが行って、リポ多糖に対してマウス BMDC の応答が不均一であることについて検討を行いました。著者らは、メッセンジャー RNA の存在パターンおよびスプライシングパターンに広範囲な二峰性変動が存在することを発見し、その後一部の転写産物について RNA-FISH 法によるバリデーションを行いました。

イルミナ技術: HiSeq

Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515

著者らは、 α および β 鎖 mRNA の逆転写、PCR 増幅およびその後のオーバーラップ伸長法による融合によってエマルジョン液滴内の天然の $\alpha\beta$ TCR CDR3 鎖ペアを検出するためのシングルセルベースの手法を提案しています。この PCR 抑制技術により、エマルジョン段階後に高レベルノイズを形成し得る遺伝子ペアのランダムなオーバーラップ伸長の問題が解消されます。著者らは、変動的な重軽抗体鎖の天然ペアの特定にこの方法を応用できると提案しています。

イルミナ技術: MiSeq 2 x 150 bp

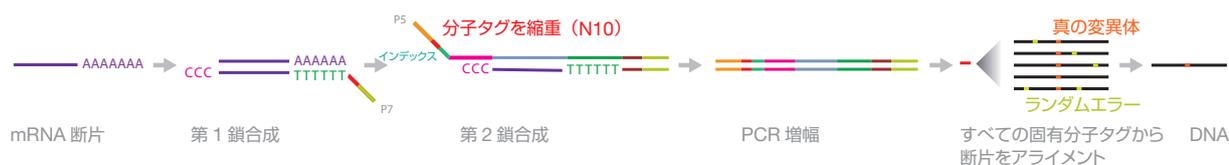
Bolotin D. A., Shugay M., Mamedov I. Z., Putintseva E. V., Turchaninova M. A., et al. (2013) MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods* 10: 813-814

固有分子識別子 (UMI)

固有分子識別子 (UMI) は、分子タグを用いてユニークな mRNA 転写産物を検出し定量するための手法です¹⁵¹。この手法では、断片化した後に、cDNA に逆転写することで mRNA ライブラリーを作製します。特異的なシーケンスリンカーを有するオリゴ (dT) プライマーを cDNA に付加します。これらとは別にランダムラベルした 10 bp のシーケンスリンカーとインデックス配列をテンプレートの 5' 末端に付加し、これを増幅してシーケンスを行います。シーケンスにより、高解像度の配列リードが得られ、真の変異体を高精度に検出することができます。

151. Kivioja T., Vaharautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., et al. (2012) Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods* 9: 72-74

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> ユニークな mRNA 転写産物のシーケンスが可能。 低頻度に発生する転写産物の検出に用いることが可能。 個々のバーコードに特異的なシーケンスリードに基づいた転写産物の定量が可能。 複数のプラットフォームに用いて、染色体の核型分析を行うことが可能。 	<ul style="list-style-type: none"> PCR時にポリメラーゼによって500 bp 未満のターゲットが優先的に増幅される。



参考文献

Cooper D. A., Jha B. K., Silverman R. H., Hesselberth J. R. and Barton D. J. (2014) Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 42: 5202-5216

リボヌクレアーゼ L (RNase L) が持つ生物学的意義にもかかわらず、この酵素によって切断される RNA はほとんど特定されていません。この研究において、著者らは、宿主およびウイルスの RNA 内に存在する RNase L 切断部位の頻度と部位を明らかにするため、イルミナのシーケンサーを用いました。この方法は、RNase L および RNase A で切断されたウイルス RNA と、感染および非感染 HeLa 細胞に由来する RNA を用いて最適化され、検証されています。著者らは、RNase L やその他の一本鎖特異的エンドリボヌクレアーゼに感受性を示す個々のゲノム領域を同定しました。宿主およびウイルスの RNA 内に存在するこれらの切断部位の頻度と部位を観察することで、これらの酵素が健康と疾患にどのような影響を及ぼしているのかが明らかになる可能性があります。

イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}, MiSeq

Islam S., Zeisel A., Joost S., La Manno G., Zajac P., et al. (2014) Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods* 11: 163-166

遺伝子発現はさまざまな組織間で異なり、実際、未分化細胞からさまざまな組織種が生み出されますが、同一組織のさまざまな細胞間でも遺伝子発現が異なります。遺伝子発現を測定するほとんどのアッセイでは、投入物質として複数の細胞が必要となりますが、この研究では、イルミナのシーケンシング技術に基づいたシングルセル RNA-Seq 法が用いられています。この技術を利用して、転写ノイズの原因を特定したり、初期胚や、細胞数が本来限られているその他のサンプルタイプで遺伝子発現を調べることができます。複合組織中の細胞種の多様性について検討する目的でシングルセルシーケンシングを行うことが、一例として挙げられます。

イルミナ技術: HiSeq 2000

Murtaza M., Dawson S. J., Tsui D. W., Gale D., Forshew T., et al. (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature 497: 108-112

最近の複数の研究において、がん細胞から血漿へと放出される腫瘍由来の循環無細胞 DNA をシーケンスすることで、固形がんにおけるゲノム変化の特徴を調べられることが明らかにされています。これが、非侵襲的なキッドバイオプシーです。本稿には、この研究において、このアプローチがイルミナの HiSeq シーケンスを用いて、治療後の転移性がんのゲノム進化の追跡にどのように応用されたかが述べられています。乳がん、卵巣がんおよび肺がんを有する患者 6 例を、1~2 年間にわたって追跡しました。このうち 2 例で同時生検の解析が行った結果、全ゲノムに血漿中腫瘍ゲノムが認められることが確認され、循環腫瘍 DNA の全エクソーム解析の proof-of-principle が実証されました。

イルミナ技術：TruSeq Exome Enrichment Kit、HiSeq 2000

Kivioja T., Vaharautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., et al. (2012) Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. Nat Methods 9: 72-74

Kivioja T., Vaharautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., et al. (2012) Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. Nat Methods 9: 72-74

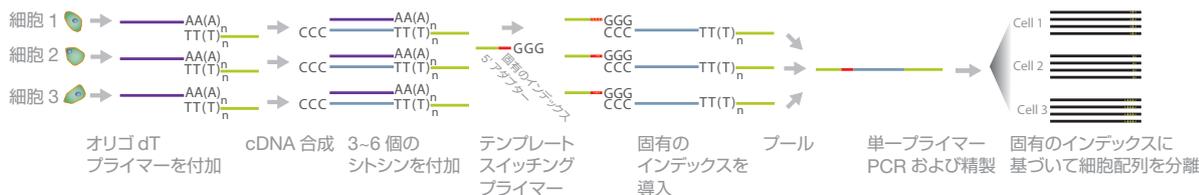
イルミナ技術：Genome Analyzer_{IIx}、HiSeq 2000

線形増幅シーケンスによる細胞発現 (CEL-Seq)

線形増幅シーケンス (CEL-Seq) による細胞発現は、微量のサンプルインプットに伴う課題を克服するため、RNA をバーコード標識し、これらの RNA をプールするという手法です¹⁵²。この手法では、個々の細胞が、それぞれの反応管内において、固有のバーコード標識プライマーの存在下で RT を起こします。第 2 鎖合成後、すべての反応管から回収した cDNA をプールして PCR 増幅を行います。増幅した DNA のペアエンドディープシーケンスにより、両鎖をシーケンスすることによって得られた配列を高精度に検出することができます。

152. Hashimshony T., Wagner F., Sher N. and Yanai I. (2012) CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2: 666-673
153. Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678
154. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> ● バーコードとプーリングによりマルチプレックスが可能で、多種多様なシングルセルを一度に調べることができる。 ● 細胞1個に1本の反応チューブを使用するため、サンプル間のコンタミネーションが大幅に減少する。 ● STRT-Seqよりもステップが少ない。 ● リード長バイアスがほとんどない¹⁵³。 ● 鎖特異的である。 	<ul style="list-style-type: none"> ● 3'バイアスが強い¹⁵⁴。 ● 存在量の高い転写産物が優先的に増幅される。 ● 400 pg以上のtotal RNAが必要。



参考文献

Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678

限られた量の mRNA を用いる RNA-Seq 法の最近の進歩により、さまざまな生物系における希少細胞種の特徴を明らかにすることが容易になりました。本稿において、著者らは、増幅をベースとする 3 つの手法、Smart-Seq、DP-Seq および CEL-Seq を比較しています。著者らは、低 ~ 中程度発現転写産物の大多数で増幅が不十分であるなど、これらのライブラリーが示す技術的ばらつきが顕著であることを明らかにしました。これらのシーケンスエラーはごくわずかですが、増幅によって生じる大きな技術的ばらつきが、依然として、生物学的にわずかな差異を検出するためにこれらの手法を用いることへの妨げとなっています。

イルミナ技術: HiSeq

Hashimshony T., Wagner F., Sher N. and Yanai I. (2012) CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2: 666-673

高スループットシーケンスによってかつてないほど詳細な遺伝子発現解析が可能になりましたが、RNA のスタート量が少ないことから、高スループットシーケンスをシングルセルに効率良く用いることには、依然として課題が残されています。本稿は、バーコード標識、サンプルプーリングおよび線形増幅を用いた、*in vitro* 転写 1 サイクルの、シングルセル RNA-Seq プロトコル、CEL-Seq に関するものです。このアッセイは、イルミナの定方向 RNA-Seq プロトコルの改訂版として設計されたもので、イルミナの HiSeq を用いてシーケンスを行います。著者らは、線虫の初期発生胚のシングルセル発現プロファイリングにこの手法を用いています。

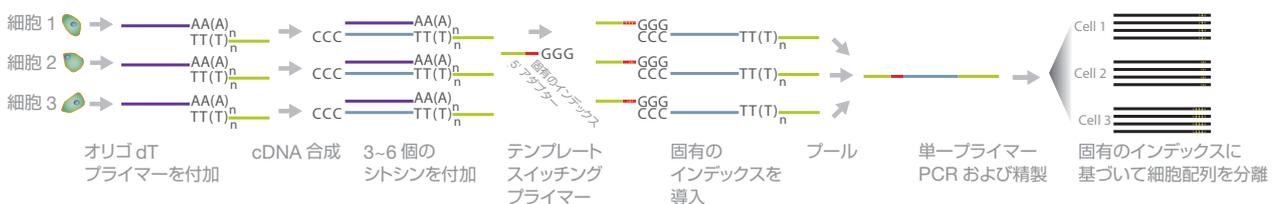
イルミナ技術: Genome Analyzer_{IIx}

シングルセルタグ標識逆転写 (STRT-Seq)

シングルセルタグ標識逆転写シーケンス (STRT-Seq) は、CEL-Seq に類似する手法で、固有バーコード標識とサンプルプーリングにより、非常に限られた量のサンプルに伴う課題を克服しています¹⁵⁵。この手法では、まずシングルセルを個々の反応チューブに入れ、3~6個のシトシンを付加したオリゴ (dT) プライマーを用いて第1鎖 cDNA 合成を行います。ヘルパーオリゴがテンプレートスイッチを促進し、これにより cDNA がバーコード標識されます。その後、単一プライマー PCR 法によりバーコード標識 cDNA を増幅します。ディープシーケンスにより、個々の細胞について、高精度なトランスクリプトームシーケンスを行うことが可能になります。

155. 155 Islam S., Kjallquist U., Moliner A., Zajac P., Fan J. B., et al. (2011) Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 21: 1160-1167

長所	短所
<ul style="list-style-type: none"> バーコードとプーリングによりマルチプレックスが可能で、多種多様なシングルセルを一度に調べることができる。 細胞1個に1本の反応チューブを使用するため、サンプル間のコンタミネーションが大幅に減少する。 	<ul style="list-style-type: none"> PCRバイアスにより、GCの多いテンプレートが実際よりも少なくなる可能性がある。 非線形PCR増幅により、再現性に影響を及ぼすバイアスが発生する可能性がある。 ポリメラーゼによって増幅エラーが生じ、シーケンスが正しく行われない。 PCRバイアスにより精度が失われる。 PCR時にポリメラーゼによって500 bp未満のターゲットが優先的に増幅される。



参考文献

Islam S., Zeisel A., Joost S., La Manno G., Zajac P., et al. (2014) Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods* 11: 163-166

遺伝子発現はさまざまな組織間で異なり、実際、未分化細胞からさまざまな組織種が生み出されますが、同一組織のさまざまな細胞間でも遺伝子発現が異なります。遺伝子発現を測定するほとんどのアッセイでは、投入物質として複数の細胞が必要となりますが、この研究では、イルミナのシーケンス技術に基づいたシングルセル RNA-Seq 法が用いられています。この技術を利用して、転写ノイズの原因を特定したり、初期胚や、細胞数が本来限られているその他のサンプルタイプで遺伝子発現を調べることができます。複合組織中の細胞種の多様性について検討する目的でシングルセルシーケンスを行うことが、一例として挙げられます。

イルミナ技術: HiSeq 2000

参考文献一覽

- Adalsteinsson V. A. and Love J. C. (2014) Towards Engineered Processes for Sequencing-Based Analysis of Single Circulating Tumor Cells. *Curr Opin Chem Eng* 4: 97-104
- Albert F. W., Treusch S., Shockley A. H., Bloom J. S. and Kruglyak L. (2014) Genetics of single-cell protein abundance variation in large yeast populations. *Nature* 506: 494-497
- Alegria-Torres J. A., Baccarelli A. and Bollati V. (2011) Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics* 3: 267-277
- Alexandrov L. B. and Stratton M. R. (2014) Mutational signatures: the patterns of somatic mutations hidden in cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 52-60
- Allard W. J., Matera J., Miller M. C., Repollet M., Connelly M. C., et al. (2004) Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res* 10: 6897-6904
- Bajikar S. S., Fuchs C., Roller A., Theis F. J. and Janes K. A. (2014) Parameterizing cell-to-cell regulatory heterogeneities via stochastic transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E626-635
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., et al. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19: 455-477
- Barlow D. P. (2011) Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu Rev Genet* 45: 379-403
- Barteneva N. S., Ketman K., Fasler-Kan E., Potashnikova D. and Vorobjev I. A. (2013) Cell sorting in cancer research--diminishing degree of cell heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 1836: 105-122
- Bartfai T., Buckley P. T. and Eberwine J. (2012) Drug targets: single-cell transcriptomics hastens unbiased discovery. *Trends Pharmacol Sci* 33: 9-16
- Baslan T. and Hicks J. (2014) Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev* 26C: 59-65
- Battich N., Stoeger T. and Pelkmans L. (2013) Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. *Nat Methods* 10: 1127-1133
- Behjati S., Huch M., van Boxtel R., Karthaus W., Wedge D. C., et al. (2014) Genome sequencing of normal cells reveals developmental lineages and mutational processes. *Nature* 513: 422-425
- Bergholz T. M., Moreno Switt A. I. and Wiedmann M. (2014) Omics approaches in food safety: fulfilling the promise? *Trends Microbiol* 22: 275-281
- Bhargava V., Ko P., Willems E., Mercola M. and Subramaniam S. (2013) Quantitative transcriptomics using designed primer-based amplification. *Sci Rep* 3: 1740
- Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. (2014) Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep* 4: 3678
- Bianchi D. W., Parker R. L., Wentworth J., Madankumar R., Saffer C., et al. (2014) DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* 370: 799-808
- Birnbaum M. E., Mendoza J. L., Sethi D. K., Dong S., Glanville J., et al. (2014) Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition. *Cell* 157: 1073-1087
- Blainey P. C. (2013) The future is now: single-cell genomics of bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev* 37: 407-427
- Bock C., Tomazou E. M., Brinkman A. B., Muller F., Simmer F., et al. (2010) Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol* 28: 1106-1114
- Bolotin D. A., Shugay M., Mamedov I. Z., Putintseva E. V., Turchaninova M. A., et al. (2013) MITCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods* 10: 813-814
- Boroviak T., Loos R., Bertone P., Smith A. and Nichols J. (2014) The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* 16: 516-528
- Brinkman A. B., Simmer F., Ma K., Kaan A., Zhu J., et al. (2010) Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 52: 232-236
- Bryant J. M. (2013) Culture-free club. *Nat Rev Microbiol* 11: 434
- Cann G. M., Gulzar Z. G., Cooper S., Li R., Luo S., et al. (2012) mRNA-Seq of single prostate cancer circulating tumor cells reveals recapitulation of gene expression and pathways found in prostate cancer. *PLoS One* 7: e49144
- Carter A. C., Davis-Dusenbery B. N., Koszka K., Ichida J. K. and Eggan K. (2014) Nanog-Independent Reprogramming to iPSCs with Canonical Factors. *Stem Cell Reports* 2: 119-126
- Chandrasekharan S., Minear M. A., Hung A. and Allyse M. (2014) Noninvasive prenatal testing goes global. *Sci Transl Med* 6: 231fs215
- Chi K. R. (2014) Singled out for sequencing. *Nat Methods* 11: 13-17
- Cho H., Jonsson H., Campbell K., Melke P., Williams J. W., et al. (2007) Self-organization in high-density bacterial colonies: efficient crowd control. *PLoS Biol* 5: e302
- Cooper D. A., Jha B. K., Silverman R. H., Hesselberth J. R. and Barton D. J. (2014) Ribonuclease L and metal-ion-independent endoribonuclease cleavage sites in host and viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 42: 5202-5216
- Corces-Zimmerman M. R., Hong W. J., Weissman I. L., Medeiros B. C. and Majeti R. (2014) Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 2548-2553
- Coulon A., Chow C. C., Singer R. H. and Larson D. R. (2013) Eukaryotic transcriptional dynamics: from single molecules to cell populations. *Nat Rev Genet* 14: 572-584
- de Almeida P. E., Meyer E. H., Kooreman N. G., Diecke S., Dey D., et al. (2014) Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance. *Nat Commun* 5: 3903
- de Wit E., Bouwman B. A., Zhu Y., Klous P., Splinter E., et al. (2013) The pluripotent genome in three dimensions is shaped around pluripotency factors. *Nature* 501: 227-231
- Dean F. B., Nelson J. R., Giesler T. L. and Lasken R. S. (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome Res* 11: 1095-1099
- DeKosky B. J., Ippolito G. C., Deschner R. P., Lavinder J. J., Wine Y., et al. (2013) High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire. *Nat Biotechnol* 31: 166-169
- Deng Q., Ramskold D., Reinius B. and Sandberg R. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic, random monoallelic gene expression in mammalian cells. *Science* 343: 193-196
- Depew J., Zhou B., McCarrison J. M., Wentworth D. E., Purushe J., et al. (2013) Sequencing viral genomes from a single isolated plaque. *Virology* 453: 181

- Ding L., Ley T. J., Larson D. E., Miller C. A., Koboldt D. C., et al. (2012) Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 481: 506-510
- Ding L., Raphael B. J., Chen F. and Wendl M. C. (2013) Advances for studying clonal evolution in cancer. *Cancer Lett* 340: 212-219
- Dodsworth J. A., Blainey P. C., Murugapiran S. K., Swingley W. D., Ross C. A., et al. (2013) Single-cell and metagenomic analyses indicate a fermentative and saccharolytic lifestyle for members of the OP9 lineage. *Nat Commun* 4: 1854
- Duan Z., Andronescu M., Schutz K., Lee C., Shendure J., et al. (2012) A genome-wide 3C-method for characterizing the three-dimensional architectures of genomes. *Methods* 58: 277-288
- Easwaran H., Tsai H. C. and Baylin S. B. (2014) Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell* 54: 716-727
- Eberwine J. and Bartfai T. (2011) Single cell transcriptomics of hypothalamic warm sensitive neurons that control core body temperature and fever response Signaling asymmetry and an extension of chemical neuroanatomy. *Pharmacol Ther* 129: 241-259
- Eberwine J., Sul J. Y., Bartfai T. and Kim J. (2014) The promise of single-cell sequencing. *Nat Methods* 11: 25-27
- Eckersley-Maslin M. A. and Spector D. L. (2014) Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends Genet* 30: 237-244
- Eckersley-Maslin M. A., Thybert D., Bergmann J. H., Marioni J. C., Flicek P., et al. (2014) Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell* 28: 351-365
- Embree M., Nagarajan H., Movahedi N., Chitsaz H. and Zengler K. (2014) Single-cell genome and metatranscriptome sequencing reveal metabolic interactions of an alkane-degrading methanogenic community. *ISME J* 8: 757-767
- Evrony G. D., Cai X., Lee E., Hills L. B., Elhosary P. C., et al. (2012) Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell* 151: 483-496
- Feil R., Charlton J., Bird A. P., Walter J. and Reik W. (1994) Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res* 22: 695-696
- Fend F. and Raffeld M. (2000) Laser capture microdissection in pathology. *J Clin Pathol* 53: 666-672
- Finn J. A. and Crowe J. E., Jr. (2013) Impact of new sequencing technologies on studies of the human B cell repertoire. *Curr Opin Immunol* 25: 613-618
- Fitzsimons M. S., Novotny M., Lo C. C., Dichosa A. E., Yee-Greenbaum J. L., et al. (2013) Nearly finished genomes produced using gel microdroplet culturing reveal substantial intraspecies genomic diversity within the human microbiome. *Genome Res* 23: 878-888
- Fraley S. I., Hardick J., Jo Masek B., Athamanolap P., Rothman R. E., et al. (2013) Universal digital high-resolution melt: a novel approach to broad-based profiling of heterogeneous biological samples. *Nucleic Acids Res* 41: e175
- Frumkin D., Wasserstrom A., Kaplan S., Feige U. and Shapiro E. (2005) Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biol* 1: e50
- Fu G. K., Xu W., Wilhelmy J., Mindrinos M. N., Davis R. W., et al. (2014) Molecular indexing enables quantitative targeted RNA sequencing and reveals poor efficiencies in standard library preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 1891-1896
- Gao C., Kozłowska A., Nechaev S., Li H., Zhang Q., et al. (2013) TLR9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy. *Cancer Res* 73: 7211-7221
- Gendrel A. V., Attia M., Chen C. J., Diabangouaya P., Servant N., et al. (2014) Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell* 28: 366-380
- Georgiou G., Ippolito G. C., Beausang J., Busse C. E., Wardemann H., et al. (2014) The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire. *Nat Biotechnol* 32: 158-168
- Gerlinger M., Rowan A. J., Horswell S., Larkin J., Endesfelder D., et al. (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 366: 883-892
- Goetz J. J. and Trimarchi J. M. (2012) Transcriptome sequencing of single cells with Smart-Seq. *Nat Biotechnol* 30: 763-765
- Green M. R., Vicente-Duenas C., Romero-Camarero I., Long Liu C., Dai B., et al. (2014) Transient expression of Bcl6 is sufficient for oncogenic function and induction of mature B-cell lymphoma. *Nat Commun* 5: 3904
- Grun D., Kester L. and van Oudenaarden A. (2014) Validation of noise models for single-cell transcriptomics. *Nat Methods* 11: 637-640
- Gundry M., Li W., Maqbool S. B. and Vijg J. (2012) Direct, genome-wide assessment of DNA mutations in single cells. *Nucleic Acids Res* 40: 2032-2040
- Guo H., Zhu P., Wu X., Li X., Wen L., et al. (2013) Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* 23: 2126-2135
- Haiser H. J., Gootenberg D. B., Chatman K., Sirasani G., Balskus E. P., et al. (2013) Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *Eggerthella lenta*. *Science* 341: 295-298
- Han A., Newell E. W., Glanville J., Fernandez-Becker N., Khosla C., et al. (2013) Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ alpha beta T cells and gamma delta T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 13073-13078
- Han A., Glanville J., Hansmann L. and Davis M. M. (2014) Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. *Nat Biotechnol* 32: 684-692
- Hasemann M. S., Lauridsen F. K., Waage J., Jakobsen J. S., Frank A. K., et al. (2014) C/EBPalpha is required for long-term self-renewal and lineage priming of hematopoietic stem cells and for the maintenance of epigenetic configurations in multipotent progenitors. *PLoS Genet* 10: e1004079
- Hashimshony T., Wagner F., Sher N. and Yanai I. (2012) CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2: 666-673
- Heitzer E., Ulz P., Belic J., Gutschli S., Quehenberger F., et al. (2013) Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome Med* 5: 30
- Hiatt J. B., Pritchard C. C., Salipante S. J., O'Roak B. J. and Shendure J. (2013) Single molecule molecular inversion probes for targeted, high-accuracy detection of low-frequency variation. *Genome Res* 23: 843-854
- Hou Y., Song L., Zhu P., Zhang B., Tao Y., et al. (2012) Single-cell exome sequencing and monoclonal evolution of a JAK2-negative myeloproliferative neoplasm. *Cell* 148: 873-885
- Hou Y., Fan W., Yan L., Li R., Lian Y., et al. (2013) Genome analyses of single human oocytes. *Cell* 155: 1492-1506
- Hsiao A. P., Barbee K. D. and Huang X. (2010) Microfluidic Device for Capture and Isolation of Single Cells. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng* 7759: Iourov I. Y., Vorsanova S. G. and Yurov Y. B. (2012) Single cell genomics of the brain: focus on neuronal diversity and neuropsychiatric diseases. *Curr Genomics* 13: 477-488
- Islam S., Zeisel A., Joost S., La Manno G., Zajac P., et al. (2014) Quantitative single-cell RNA-seq with unique molecular identifiers. *Nat Methods* 11: 163-166

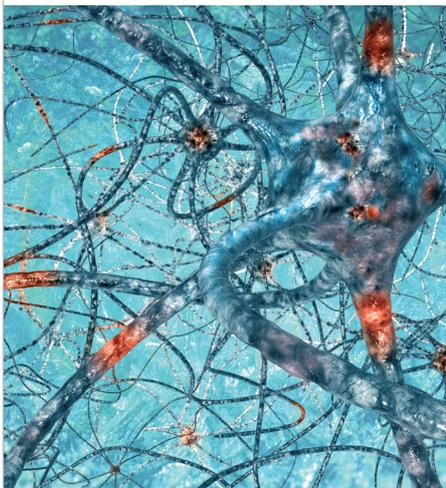
- Kadkhodaei B., Alvarsson A., Schintu N., Ramskold D., Volakakis N., et al. (2013) Transcription factor Nurr1 maintains fiber integrity and nuclear-encoded mitochondrial gene expression in dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 2360-2365
- Kamke J., Sczyrba A., Ivanova N., Schwientek P., Rinke C., et al. (2013) Single-cell genomics reveals complex carbohydrate degradation patterns in poribacterial symbionts of marine sponges. *ISME J* 7: 2287-2300
- Kaper F., Swamy S., Klotzle B., Munchel S., Cottrell J., et al. (2013) Whole-genome haplotyping by dilution, amplification, and sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5552-5557
- Kashtan N., Roggensack S. E., Rodrigue S., Thompson J. W., Biller S. J., et al. (2014) Single-cell genomics reveals hundreds of coexisting subpopulations in wild *Prochlorococcus*. *Science* 344: 416-420
- Kaster A. K., Mayer-Blackwell K., Pasarelli B. and Spormann A. M. (2014) Single cell genomic study of *Dehalococcoides* species from deep-sea sediments of the Peruvian Margin. *ISME J* 8:1831-42
- Kind J., Pagie L., Ortobozkoyun H., Boyle S., de Vries S. S., et al. (2013) Single-cell dynamics of genome-nuclear lamina interactions. *Cell* 153: 178-192
- Kirkness E. F., Grindberg R. V., Yee-Greenbaum J., Marshall C. R., Scherer S. W., et al. (2013) Sequencing of isolated sperm cells for direct haplotyping of a human genome. *Genome Res* 23: 826-832
- Kivioja T., Vaharautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., et al. (2012) Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods* 9: 72-74
- Kuppers R., Zhao M., Hansmann M. L. and Rajewsky K. (1993) Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 12: 4955-4967
- Landau D. A., Carter S. L., Stojanov P., McKenna A., Stevenson K., et al. (2013) Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 152: 714-726
- Lasken R. S. (2012) Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nat Rev Microbiol* 10: 631-640
- Lasken R. S. (2013) Single-cell sequencing in its prime. *Nat Biotechnol* 31: 211-212
- Lee E. C., Liang Q., Ali H., Bayliss L., Beasley A., et al. (2014) Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol* 32: 356-363
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., et al. (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326: 289-293
- Linnemann C., Heemskerck B., Kvistborg P., Kluijn R. J., Bolotin D. A., et al. (2013) High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture. *Nat Med* 19: 1534-1541
- Lister R., Mukamel E. A., Nery J. R., Urich M., Puddifoot C. A., et al. (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 341: 1237905
- Liu H., McDowell T. L., Hanson N. E., Tang X., Fujimoto J., et al. (2014) Laser capture microdissection for the investigative pathologist. *Vet Pathol* 51: 257-269
- Lloyd K. G., Schreiber L., Petersen D. G., Kjeldsen K. U., Lever M. A., et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* 496: 215-218
- Lohr J. G., Adalsteinsson V. A., Cibulskis K., Choudhury A. D., Rosenberg M., et al. (2014) Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat Biotechnol* 32: 479-484
- Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. (2014) Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* 11: 190-196
- Love K. R., Bagh S., Choi J. and Love J. C. (2013) Microtools for single-cell analysis in biopharmaceutical development and manufacturing. *Trends Biotechnol* 31: 280-286
- Lovett M. (2013) The applications of single-cell genomics. *Hum Mol Genet* 22: R22-26
- Ma Y., Mattarollo S. R., Adjemian S., Yang H., Aymeric L., et al. (2014) CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res* 74: 436-445
- Macaulay I. C. and Voet T. (2014) Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet* 10: e1004126
- Magnusdottir E., Dietmann S., Murakami K., Gunesdogan U., Tang F., et al. (2013) A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat Cell Biol* 15: 905-915
- Malmstrom R. R., Rodrigue S., Huang K. H., Kelly L., Kern S. E., et al. (2013) Ecology of uncultured *Prochlorococcus* clades revealed through single-cell genomics and biogeographic analysis. *ISME J* 7: 184-198
- Mamedov I. Z., Britanova O. V., Zvyagin I. V., Turchaninova M. A., Bolotin D. A., et al. (2013) Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol* 4: 456
- Mandl J. N. and Germain R. N. (2014) Focusing in on T cell cross-reactivity. *Cell* 157: 1006-1008
- Marinov G. K., Williams B. A., McCue K., Schroth G. P., Gertz J., et al. (2014) From single-cell to cell-pool transcriptomes: stochasticity in gene expression and RNA splicing. *Genome Res* 24: 496-510
- Martiny J. B., Riemann L., Marston M. F. and Middelboe M. (2014) Antagonistic coevolution of marine planktonic viruses and their hosts. *Ann Rev Mar Sci* 6: 393-414
- Mason O. U., Scott N. M., Gonzalez A., Robbins-Planka A., Baelum J., et al. (2014) Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME J* 8: 1464-1475
- McConnell M. J., Lindberg M. R., Brennand K. J., Piper J. C., Voet T., et al. (2013) Mosaic copy number variation in human neurons. *Science* 342: 632-637
- McGraw S., Shojaei Saadi H. A. and Robert C. (2013) Meeting the methodological challenges in molecular mapping of the embryonic epigenome. *Mol Hum Reprod* 19: 809-827
- McLean J. S., Lombardo M. J., Badger J. H., Edlund A., Novotny M., et al. (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: E2390-2399
- McLean J. S., Lombardo M. J., Ziegler M. G., Novotny M., Yee-Greenbaum J., et al. (2013) Genome of the pathogen *Porphyromonas gingivalis* recovered from a biofilm in a hospital sink using a high-throughput single-cell genomics platform. *Genome Res* 23: 867-877
- Meissner A., Gnirke A., Bell G. W., Ramsahoye B., Lander E. S., et al. (2005) Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 33: 5868-5877
- Melchor L., Brioli A., Wardell C. P., Murison A., Potter N. E., et al. (2014) Single-cell genetic analysis reveals the composition of initiating clones and phylogenetic patterns of branching and parallel evolution in myeloma. *Leukemia* 28: 1705-1715
- Moon S., Kim Y. G., Dong L., Lombardi M., Haeggstrom E., et al. (2011) Drop-on-demand single cell isolation and total RNA analysis. *PLoS One* 6: e17455
- Morgan X. C. and Huttenhower C. (2014) Meta-omic analytic techniques for studying the intestinal microbiome. *Gastroenterology* 146: 1437-1448 e1431
- Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621-628

- Mueller A. A., Cheung T. H. and Rando T. A. (2013) All's well that ends well: alternative polyadenylation and its implications for stem cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 25: 222-232
- Murtaza M., Dawson S. J., Tsui D. W., Gale D., Forshew T., et al. (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497: 108-112
- Nagano T., Lubling Y., Stevens T. J., Schoenfelder S., Yaffe E., et al. (2013) Single-cell Hi-C reveals cell-to-cell variability in chromosome structure. *Nature* 502: 59-64
- Nair S., Nkhoma S. C., Serre D., Zimmerman P. A., Gorena K., et al. (2014) Single-cell genomics for dissection of complex malaria infections. *Genome Res* 24: 1028-1038
- Navin N. and Hicks J. (2011) Future medical applications of single-cell sequencing in cancer. *Genome Med* 3: 31
- Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., et al. (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* 472: 90-94
- Navin N. E. and Hicks J. (2010) Tracing the tumor lineage. *Mol Oncol* 4: 267-283
- Newman A. M., Bratman S. V., To J., Wynne J. F., Eclov N. C., et al. (2014) An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* 20: 548-554
- Ni X., Zhuo M., Su Z., Duan J., Gao Y., et al. (2013) Reproducible copy number variation patterns among single circulating tumor cells of lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 21083-21088
- Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A. A., Korobeynikov A., et al. (2013) Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *J Comput Biol* 20: 714-737
- Obata Y., Furusawa Y., Endo T. A., Sharif J., Takahashi D., et al. (2014) The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells. *Nat Immunol* 15: 571-579
- Ong F. S., Lin J. C., Das K., Grosu D. S. and Fan J. B. (2013) Translational utility of next-generation sequencing. *Genomics* 102: 137-139
- Palacios-Gonzalez C., Harris J. and Testa G. (2014) Multiplex parenting: IVG and the generations to come. *J Med Ethics*
- Pan X., Durrett R. E., Zhu H., Tanaka Y., Li Y., et al. (2013) Two methods for full-length RNA sequencing for low quantities of cells and single cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 594-599
- Papaemmanuil E., Rapado I., Li Y., Potter N. E., Wedge D. C., et al. (2014) RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 46: 116-125
- Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G., et al. (2013) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 10: 1096-1098
- Picelli S., Faridani O. R., Bjorklund A. K., Winberg G., Sagasser S., et al. (2014) Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc* 9: 171-181
- Pinto S., Michel C., Schmidt-Glenewinkel H., Harder N., Rohr K., et al. (2013) Overlapping gene coexpression patterns in human medullary thymic epithelial cells generate self-antigen diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E3497-3505
- Poduri A., Evrony G. D., Cai X. and Walsh C. A. (2013) Somatic mutation, genomic variation, and neurological disease. *Science* 341: 1237758
- Potter N. E., Ermini L., Papaemmanuil E., Cazzaniga G., Vijayaraghavan G., et al. (2013) Single-cell mutational profiling and clonal phylogeny in cancer. *Genome Res* 23: 2115-2125
- Raj A. and van Oudenaarden A. (2008) Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* 135: 216-226
- Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., Li R., Deng Q., et al. (2012) Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol* 30: 777-782
- Raphael B. J., Dobson J. R., Oesper L. and Vandin F. (2014) Identifying driver mutations in sequenced cancer genomes: computational approaches to enable precision medicine. *Genome Med* 6: 5
- Rauch T. A., Zhong X., Wu X., Wang M., Kernstine K. H., et al. (2008) High-resolution mapping of DNA hypermethylation and hypomethylation in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 252-257
- Rauch T. A. and Pfeifer G. P. (2009) The MIRA method for DNA methylation analysis. *Methods Mol Biol* 507: 65-75
- Reyes A., Wu M., McNulty N. P., Rohwer F. L. and Gordon J. I. (2013) Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 20236-20241
- Robins H. (2013) Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing. *Curr Opin Immunol* 25: 646-652
- Roth A., Khattra J., Yap D., Wan A., Laks E., et al. (2014) PyClone: statistical inference of clonal population structure in cancer. *Nat Methods* 11: 396-398
- Rusch D. B., Lombardo M. J., Yee-Greenbaum J., Novotny M., Brinkac L. M., et al. (2013) Draft Genome Sequence of a Single Cell of SAR86 Clade Subgroup IIIa. *Genome Announc* 1:
- Saliba A. E., Westermann A. J., Gorski S. A. and Vogel J. (2014) Single-cell RNA-seq: advances and future challenges. *Nucleic Acids Res* 42: 8845-8860
- Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., et al. (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 14: R31
- Seth-Smith H. M., Harris S. R., Skilton R. J., Radebe F. M., Golparian D., et al. (2013) Whole-genome sequences of Chlamydia trachomatis directly from clinical samples without culture. *Genome Res* 23: 855-866
- Shalek A. K., Satija R., Adiconis X., Gertner R. S., Gaublotte J. T., et al. (2013) Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498: 236-240
- Shalek A. K., Satija R., Shuga J., Trombetta J. J., Gennert D., et al. (2014) Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature* 510: 363-369
- Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. (2013) Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet* 14: 618-630
- Shetzer Y., Kagan S., Koifman G., Sarig R., Kogan-Sakin I., et al. (2014) The onset of p53 loss of heterozygosity is differentially induced in various stem cell types and may involve the loss of either allele. *Cell Death Differ* 21: 1419-1431
- Shiroguchi K., Jia T. Z., Sims P. A. and Xie X. S. (2012) Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1347-1352
- Shugay M., Britanova O. V., Merzlyak E. M., Turchaninova M. A., Mamedov I. Z., et al. (2014) Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods* 11: 653-655
- Smallwood S. A., Lee H. J., Angermueller C., Krueger F., Saadeh H., et al. (2014) Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 11: 817-820
- Solomon M. J., Larsen P. L. and Varshavsky A. (1988) Mapping protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53: 937-947
- Spaethling J. M. and Eberwine J. H. (2013) Single-cell transcriptomics for drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol* 13: 786-790
- Speicher M. R. (2013) Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome Med* 5: 74
- Stepanuskas R. (2012) Single cell genomics: an individual look at microbes. *Curr Opin Microbiol* 15: 613-620

- Stephens P. J., Greenman C. D., Fu B., Yang F., Bignell G. R., et al. (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 144: 27-40
- Streets A. M., Zhang X., Cao C., Pang Y., Wu X., et al. (2014) Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7048-7053
- Strino F., Parisi F., Micsinai M. and Kluger Y. (2013) TrAp: a tree approach for fingerprinting subclonal tumor composition. *Nucleic Acids Res* 41: e165
- Suarez-Quian C. A., Goldstein S. R., Pohida T., Smith P. D., Peterson J. I., et al. (1999) Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *Biotechniques* 26: 328-335
- Swain Lenz D., Riles L. and Fay J. C. (2014) Heterochronic meiotic misexpression in an interspecific yeast hybrid. *Mol Biol Evol* 31: 1333-1342
- Swanton C. (2013) Plasma-derived tumor DNA analysis at whole-genome resolution. *Clin Chem* 59: 6-8
- Taghavi Z., Movahedi N. S., Draghici S. and Chitsaz H. (2013) Distilled single-cell genome sequencing and de novo assembly for sparse microbial communities. *Bioinformatics* 29: 2395-2401
- Tang D. T., Plessy C., Salimullah M., Suzuki A. M., Calligaris R., et al. (2013) Suppression of artifacts and barcode bias in high-throughput transcriptome analyses utilizing template switching. *Nucleic Acids Res* 41: e44
- Trapnell C., Cacchiarelli D., Grimsby J., Pokharel P., Li S., et al. (2014) The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat Biotechnol* 32: 381-386
- Treutlein B., Brownfield D. G., Wu A. R., Neff N. F., Mantalas G. L., et al. (2014) Reconstructing lineage hierarchies of the distal lung epithelium using single-cell RNA-seq. *Nature* 509: 371-375
- Tsai I. J., Hunt M., Holroyd N., Huckvale T., Berriman M., et al. (2014) Summarizing specific profiles in Illumina sequencing from whole-genome amplified DNA. *DNA Res* 21: 243-254
- Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., Shugay M., Putintseva E. V., et al. (2013) Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol* 43: 2507-2515
- Umer M. and Herceg Z. (2013) Deciphering the epigenetic code: an overview of DNA methylation analysis methods. *Antioxid Redox Signal* 18: 1972-1986
- Van der Aa N., Zamani Esteki M., Vermeesch J. R. and Voet T. (2013) Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome Med* 5: 71
- Van Loo P. and Voet T. (2014) Single cell analysis of cancer genomes. *Curr Opin Genet Dev* 24: 82-91
- Vermeulen L., Todaro M., de Sousa Mello F., Sprick M. R., Kemper K., et al. (2008) Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13427-13432
- Voet T., Kumar P., Van Loo P., Cooke S. L., Marshall J., et al. (2013) Single-cell paired-end genome sequencing reveals structural variation per cell cycle. *Nucleic Acids Res* 41: 6119-6138
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V. E., Zhou S., Diaz L. A., Jr., et al. (2013) Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-1558
- Wallace B. D., Wang H., Lane K. T., Scott J. E., Orans J., et al. (2010) Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science* 330: 831-835
- Wang F. P., Zhang Y., Chen Y., He Y., Qi J., et al. (2014) Methanotrophic archaea possessing diverging methane-oxidizing and electron-transporting pathways. *ISME J* 8: 1069-1078
- Wang J., Fan H. C., Behr B. and Quake S. R. (2012) Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell* 150: 402-412
- Wang L. and Wheeler D. A. (2014) Genomic sequencing for cancer diagnosis and therapy. *Annu Rev Med* 65: 33-48
- Wang Y., Waters J., Leung M. L., Unruh A., Roh W., et al. (2014) Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. *Nature* 512:155-60
- Warren E. H., Matsen F. A. t. and Chou J. (2013) High-throughput sequencing of B- and T-lymphocyte antigen receptors in hematology. *Blood* 122: 19-22
- Wasmund K., Schreiber L., Lloyd K. G., Petersen D. G., Schramm A., et al. (2014) Genome sequencing of a single cell of the widely distributed marine subsurface *Dehalococcoidia*, phylum *Chloroflexi*. *ISME J* 8: 383-397
- Weaver W. M., Tseng P., Kunze A., Masaeli M., Chung A. J., et al. (2014) Advances in high-throughput single-cell microtechnologies. *Curr Opin Biotechnol* 25: 114-123
- Wilson M. C. and Piel J. (2013) Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. *Chem Biol* 20: 636-647
- Woodsworth D. J., Castellarin M. and Holt R. A. (2013) Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med* 5: 98
- Woyke T., Sczyrba A., Lee J., Rinke C., Tighe D., et al. (2011) Decontamination of MDA reagents for single cell whole genome amplification. *PLoS One* 6: e26161
- Wu A. R., Neff N. F., Kalisky T., Dalerba P., Treutlein B., et al. (2014) Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nat Methods* 11: 41-46
- Wu J. and Tzanakakis E. S. (2013) Deconstructing stem cell population heterogeneity: single-cell analysis and modeling approaches. *Biotechnol Adv* 31: 1047-1062
- Xia H., Bodempudi V., Benyumov A., Hergert P., Tank D., et al. (2014) Identification of a cell-of-origin for fibroblasts comprising the fibrotic reticulum in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 184: 1369-1383
- Xue Z., Huang K., Cai C., Cai L., Jiang C. Y., et al. (2013) Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature* 500: 593-597
- Yamaguchi S., Hong K., Liu R., Inoue A., Shen L., et al. (2013) Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. *Cell Res* 23: 329-339
- Yan L., Yang M., Guo H., Yang L., Wu J., et al. (2013) Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1131-1139
- Yates L. R. and Campbell P. J. (2012) Evolution of the cancer genome. *Nat Rev Genet* 13: 795-806
- Yilmaz S. and Singh A. K. (2012) Single cell genome sequencing. *Curr Opin Biotechnol* 23: 437-443
- Yoshimoto N., Kida A., Jie X., Kurokawa M., Iijima M., et al. (2013) An automated system for high-throughput single cell-based breeding. *Sci Rep* 3: 1191
- Young G. T., Gutteridge A., Fox H. D., Wilbrey Cao L., et al. (2014) Characterizing Human Stem Cell-derived Sensory Neurons at the Single-cell Level Reveals Their Ion Channel Expression and Utility in Pain Research. *Mol Ther* 22: 1530-1543
- A. L., Yu C., Yu J., Yao X., Wu W. K., Lu Y., et al. (2014) Discovery of biclonal origin and a novel oncogene SLC12A5 in colon cancer by single-cell sequencing. *Cell Res* 24: 701-712
- Zentner G. E. and Henikoff S. (2012) Surveying the epigenomic landscape, one base at a time. *Genome Biol* 13: 250
- Zong C., Lu S., Chapman A. R. and Xie X. S. (2012) Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science* 338: 1622-1626

Neurobiology research review

An overview of recent publications featuring Illumina technology



Scientific Publication Reviews
can be accessed at
www.illumina.com/pubreviews

Most recent publication:

Neurobiology Research Review

Neurological disorders are complex diseases caused by a combination of genetic, environmental, and lifestyle factors. It is only recently, with the use of next-generation sequencing (NGS), that their full complexity is being revealed.

本研究論文集は Illumina, Inc. によりご提供しています。

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

代理店

本製品の使用目的は研究に限定されます。

© 2016 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, IlluminaDx, BaseSpace, BeadArray, BeadXpress, cBot, CSPPro, DASL, Design Studio, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, Infinium, iSelect, MiSeq, Nextera, NextSeq, NuPCR, SeqMonitor, Solexa, TruSeq, TruSight, VeraCode, the pumpkin orange color, the Genetic Energy streaming bases design は、Illumina, Inc. の商標または登録商標です。その他の会社名や商品名は、各社の商標または登録商標です。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. シングルセル研究論文集 00DEC2015

illumina[®]