

2020. May 12
イルミナオンラインセミナー
NextSeq 1000/2000 シリーズが実現する新たな未来
～最新ゲノム研究と今後の展望～

メタゲノムのその先へ bit-MAP®によるシングルセルゲノム網羅解析

Beyond metagenomes,
bit-MAP® single-cell genomics illuminates microbiome functionality

細川 正人

bitBiome (株) CSO (Chief Scientific officer)
早稲田大学 招聘研究員



創業者 取締役CSO (Chief Scientific Officer)

細川 正人 MASAHITO HOSOKAWA

東京農工大学工学府博士後期課程修了(短縮修了)。博士(工学)。日本学術振興会特別研究員DC2(2008年)、同特別研究員PD(2010年)、JSTさきがけ研究者(2015年)を務める。東京農工大、静岡がんセンターでの研究活動を経て、2013年より早稲田大学を研究拠点とし、シングルセル解析技術の開発に従事。同研究成果をもとに、bitBiome株式会社を2018年に創業。主な受賞として、H31文部科学大臣表彰若手科学者賞、H31JSTさきがけイノベーション賞など。

早稲田大学 招聘研究員





bitBiome – Who we are

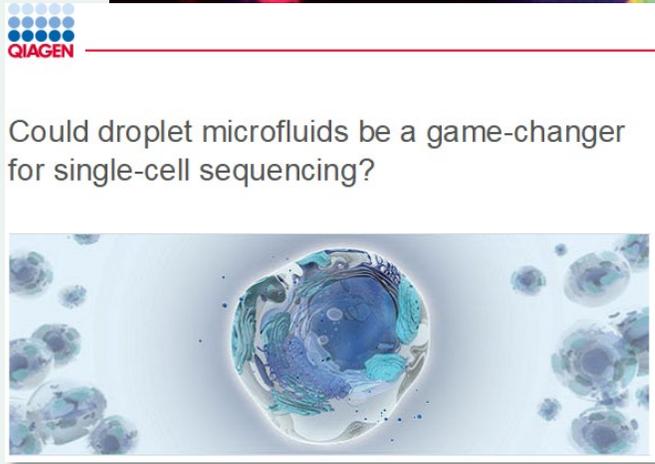
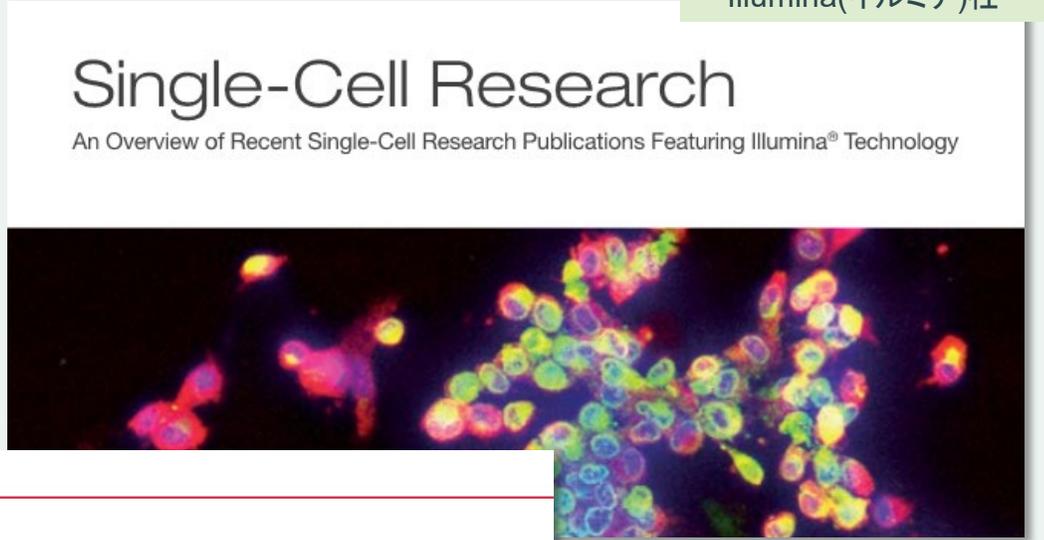
早稲田大学発、18年11月創業の バイオテックベンチャー



世界初の“微生物のシングルセルゲノム
解析技術” bit-MAP®を用い、
パートナー企業/研究機関とともに、
至るところに存在する微生物を解析



illumina(イルミナ)社



ゲノム解析業界のリー
ディング
カンパニーも
我々の技術に着目

Source: illumina社 web配布資料、QIAGEN社 メール

— シングルセルゲノム解析とは… 新たな微生物ゲノム解析戦略

多様な微生物の
集団



単離培養株ゲノム

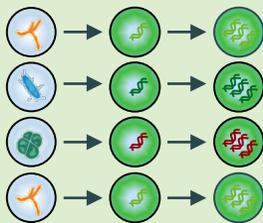
単離培養株のDNA

- 古典的な単離培養/解析

メタゲノム

全微生物DNAの混合物

- メタ16S rRNA解析
- ショットガンメタゲノム解析



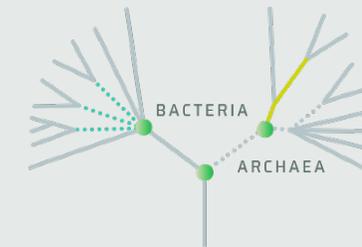
シングルセルゲノム

1細胞から増幅したDNA

- “bit-MAP®”

ゲノム解析のアウトプット

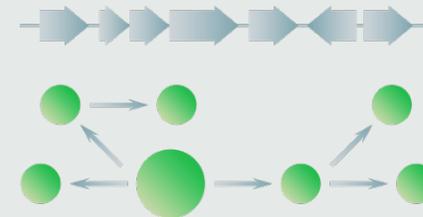
リファレンスゲノム拡張



微生物叢組成解析



遺伝子組成・パスウェイ解析



株レベルの多様性解析

G	A	T	T	A	C	A
G	A	T	T	A	C	A
G	A	T	T	T	C	A
G	A	T	T	T	C	A
G	A	T	T	T	C	A

手法毎に得手不得手があるため、
適切な戦略を組み合わせることが重要

メタゲノム解析に続く、未培養微生物の直接解析法の新たな選択肢： シングルセルゲノム解析

メタゲノム解析

全体を捉える

微生物コミュニティ



混ぜる



DNAを抽出



メタ16S 解析



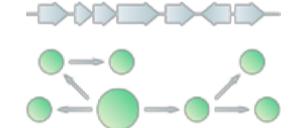
微生物叢組成解析



ショットガンメタゲノム解析



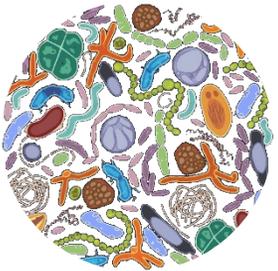
全遺伝子組成解析



シングルセル解析

個別に評価する

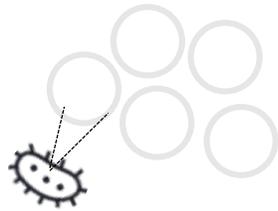
微生物コミュニティ



細胞1個を分離



DNAを抽出し増幅

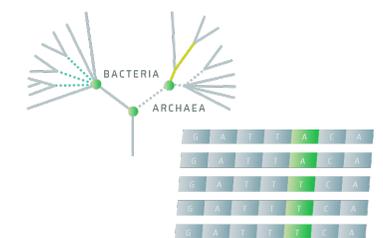


シングルセルゲノム解析

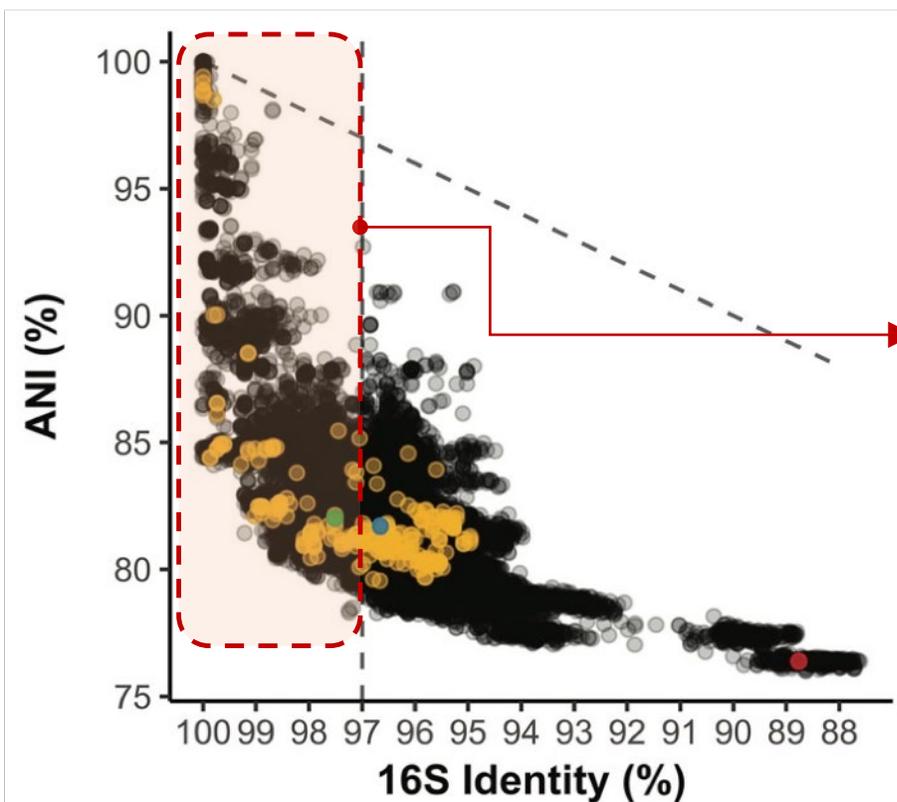


リファレンスゲノム拡張

株レベルの多様性解析



【課題】細菌叢組成解析(メタ16S rRNA解析)では、正確な分類・機能理解に至らない



NCBIに登録されている
*Streptomyces*属ゲノム(n=259)を比較
16S rRNA identity と ANI (Average nucleotide identity)
Chevrette et al. Front. Microbiol., 2019

16S rRNA遺伝子の相同性が高くても
ゲノム全体の配列一致度は必ずしも高くない

補足

16SリボソームRNA (rRNA) identity:

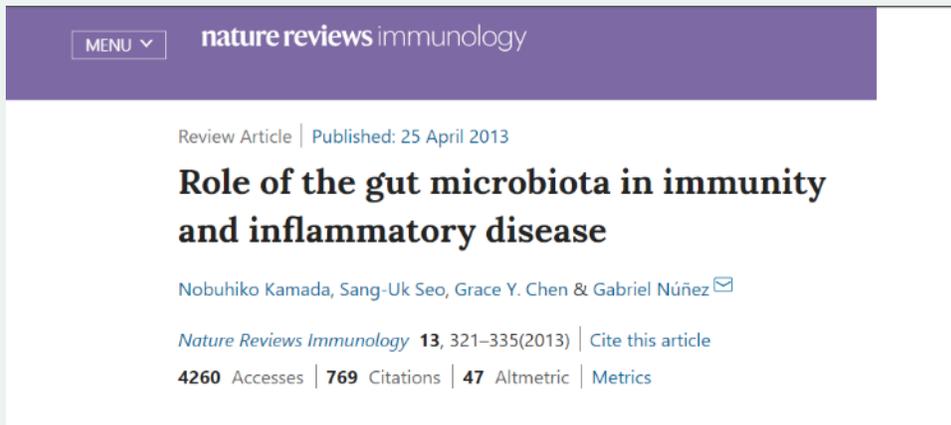
多くの細菌叢研究で、97%以上の16S rRNA遺伝子配列同一性を共有するグループを分離し、細菌をOTUに分類.

ANI:

全ゲノム配列に基づく指標。ゲノム全体を1,020 bpのフラグメントに分断し、30%以上一致するフラグメントの平均一致度を出す。95-96%以上が同種とみなされる。

コミュニティ全体としての微生物叢の理解に加えて、カギとなる微生物を株レベルで特定することが重要

微生物のバランス/構成が健康のカギ



MENU ▾ nature reviews immunology

Review Article | Published: 25 April 2013

Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease

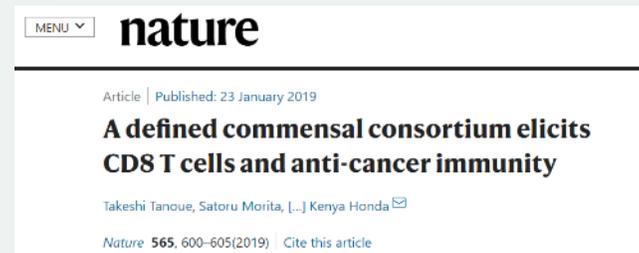
Nobuhiko Kamada, Sang-Uk Seo, Grace Y. Chen & Gabriel Núñez

Nature Reviews Immunology 13, 321–335(2013) | Cite this article

4260 Accesses | 769 Citations | 47 Altmetric | Metrics

- 腸内細菌叢の異常は複数の免疫関連疾患と相関¹

株レベルでの詳細な理解が重要



MENU ▾ nature

Article | Published: 23 January 2019

A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity

Takeshi Tanoue, Satoru Morita, [...] Kenya Honda

Nature 565, 600–605(2019) | Cite this article

- 11株の腸内細菌混合物が免疫チェックポイント阻害剤との相乗効果でCD8 T細胞を誘導する²

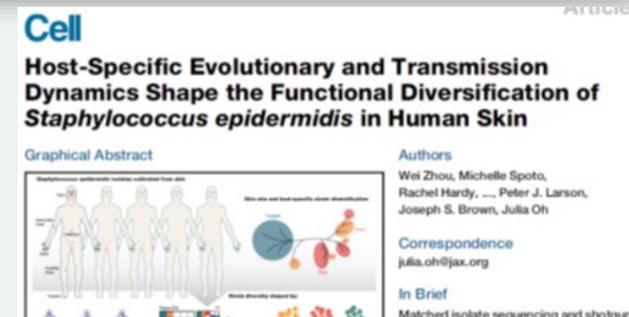


MENU ▾ nature microbiology

Article | Published: 27 January 2020

Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth

- F.rodentium*, *H.biformis* 株の作る抗腫瘍活性の短鎖脂肪酸³



Cell

Host-Specific Evolutionary and Transmission Dynamics Shape the Functional Diversification of *Staphylococcus epidermidis* in Human Skin

Graphical Abstract

Authors: Wei Zhou, Michelle Spoto, Rachel Hardy, ..., Peter J. Larson, Joseph S. Brown, Julia Oh

Correspondence: julia.oh@jax.org

In Brief: Matched isolate sequencing and shotgun

- 皮膚常在細菌-表皮ブドウ球菌は個人ごとに株が異なる⁴

リファレンスゲノム(全遺伝子配列情報)が急速に蓄積されている

方策1: 分離培養株からのゲノムシーケンス

RESOURCE
<https://doi.org/10.1038/s41587-018-0009-7>

nature
biotechnology

OPEN

A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses

Forster, S.C. *et al. Nat Biotechnol* **37**, 186–192 (2019).

腸内細菌株
737ゲノム

nature
biotechnology

RESOURCE

<https://doi.org/10.1038/s41587-018-0008-8>

OPEN

1,520 reference genomes from cultivated human gut bacteria enable functional microbiome analyses

Zou, Y. *et al. Nat Biotechnol* **37**, 179–185 (2019).

腸内細菌株
1,520ゲノム

nature
biotechnology

OPEN

1,003 reference genomes of bacterial and archaeal isolates expand coverage of the tree of life

Mukherjee, S. *et al. Nat Biotechnol* **35**, 676–683 (2017).

細菌/アーキア株
1,003ゲノム

方策2: メタゲノムからの微生物ゲノム再構築

nature
microbiology

ARTICLES

DOI: 10.1038/s41564-017-0012-7

OPEN

Corrected: Author correction

Recovery of nearly 8,000 metagenome-assembled genomes substantially expands the tree of life

Parks, D.H. *et al. Nat Microbiol* **2**, 1533–1542 (2017).

公共データ1500件から
7,903ゲノム

ARTICLE

OPEN

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1058-x>

New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome

Nayfach, S. *et al. Nature* **568**, 505–510 (2019).

公共データ3810件から
60,664ゲノム

ARTICLE

OPEN

<https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>

A new genomic blueprint of the human gut microbiota

Almeida, A. *et al. Nature* **568**, 499–504 (2019)

公共データ11,850件から
92,143ゲノム

Cell

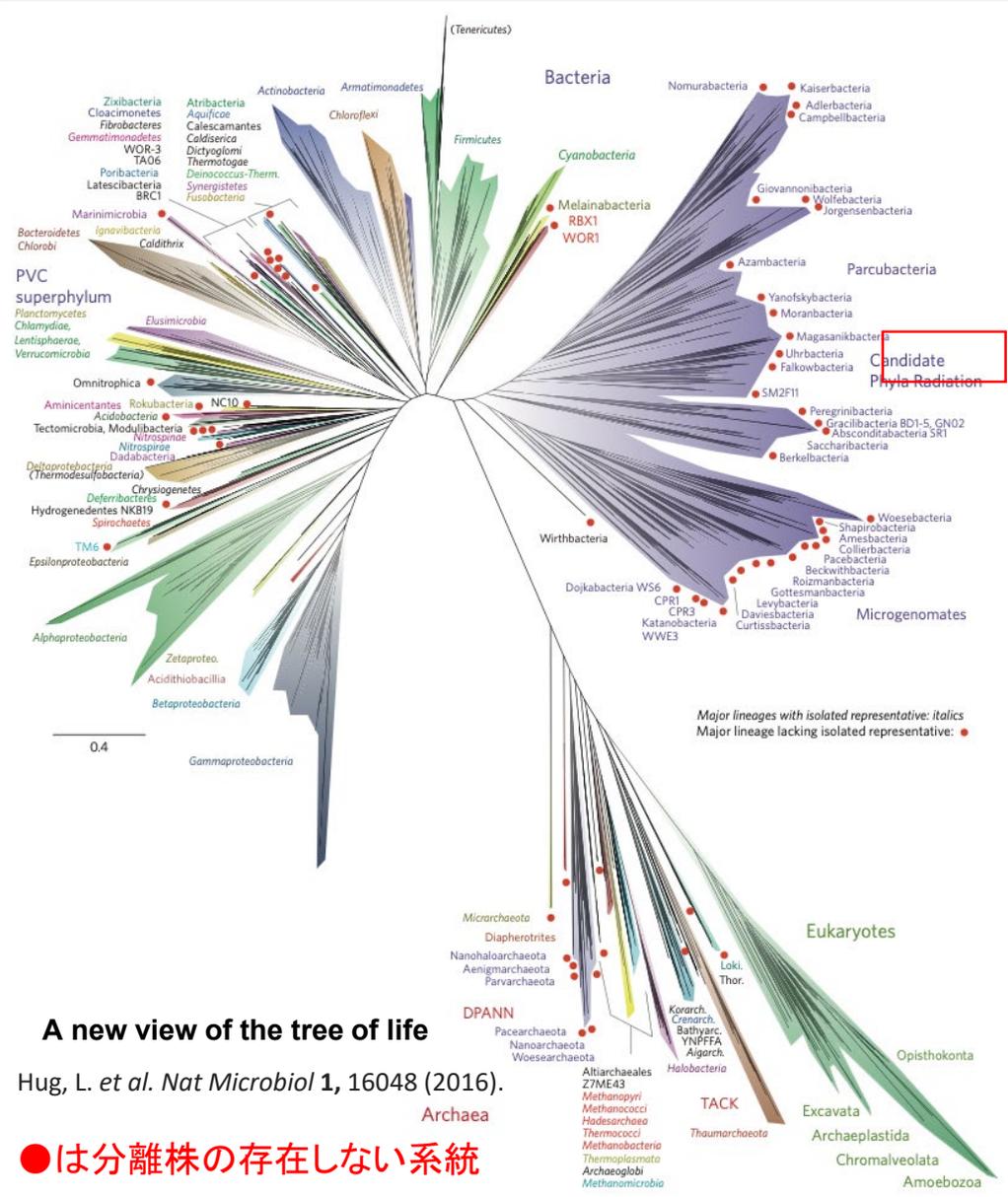
Resource

Extensive Unexplored Human Microbiome Diversity Revealed by Over 150,000 Genomes from Metagenomes Spanning Age, Geography, and Lifestyle

Pasolli *et al.*, 2019, *Cell* **176**, 649–662

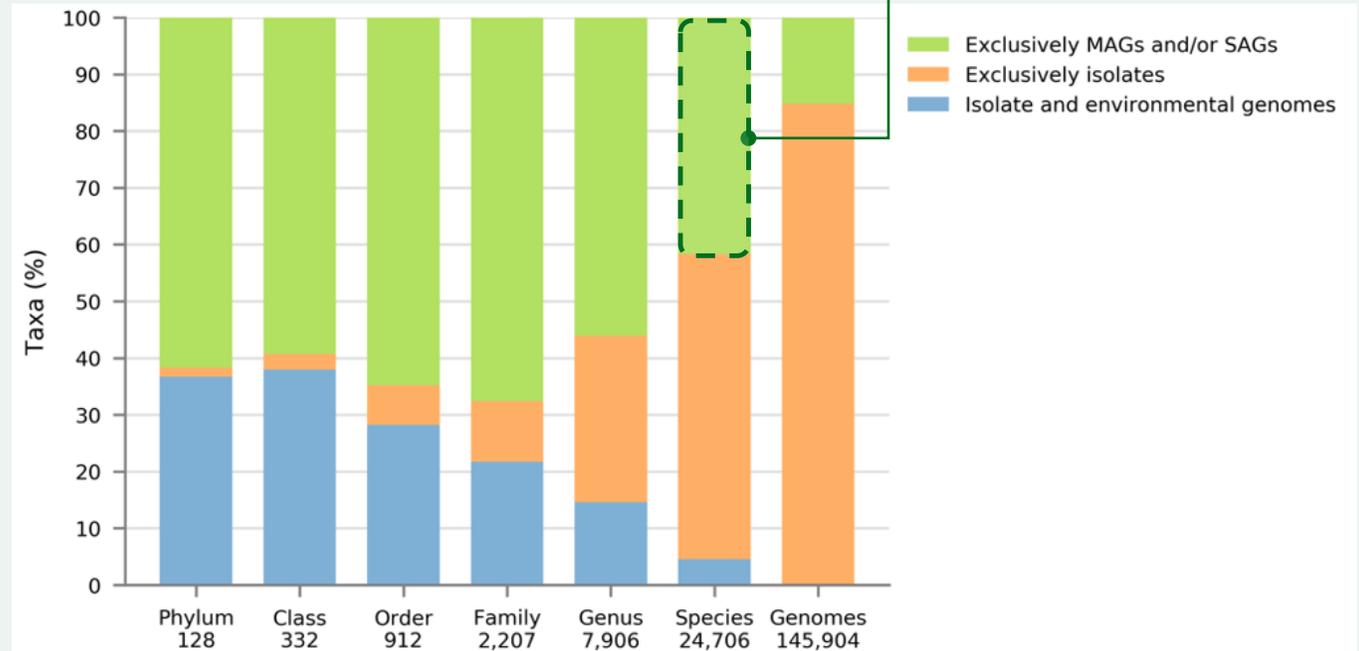
公共データ9,428件から
154,723ゲノム

メタゲノム由来の未培養細菌ゲノム情報が生物多様性の理解を押し広げている



メタゲノム解析で大量の新種微生物が推定
 ⇒世界中の研究者がアクセス可能なリファレンスに

Genome taxonomy database 14万バクテリアゲノム
 24706種の40%がメタゲノム由来



Parks, D., *et al. Nat Biotechnol* 36, 996–1004 (2018).

ショットガンメタゲノムから微生物ゲノムを再構築する方法

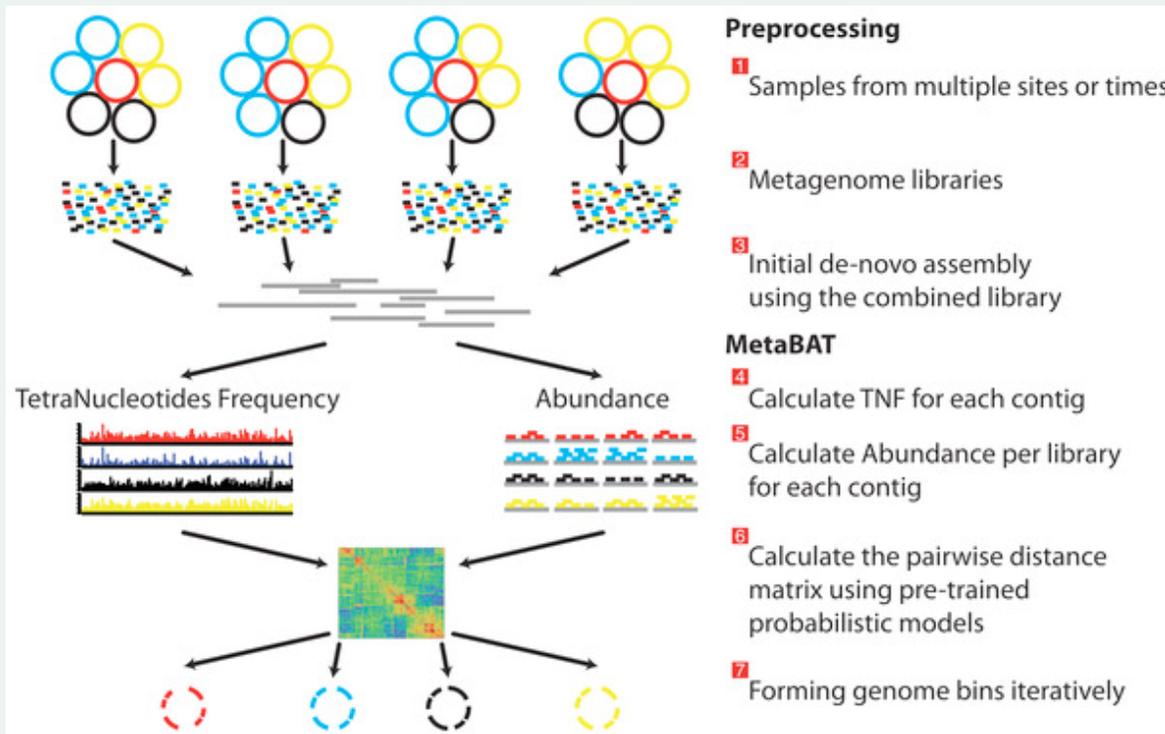
アセンブリ⇒ビンニング

1. 多種類のパズルを混ぜ合わせ、パズルの絵を想像しながらピースを組む = アセンブリ
 2. まとまったピースの中からもっともらしい絵が復元される組み合わせを選ぶ = ビンニング
- ※ ピースの集団には、欠けている箇所や間違っただけのピースが含まれている。使われないピースが大量に存在する

ビンニングツール(MetaBAT)

Kang DD, et al PeerJ 2015

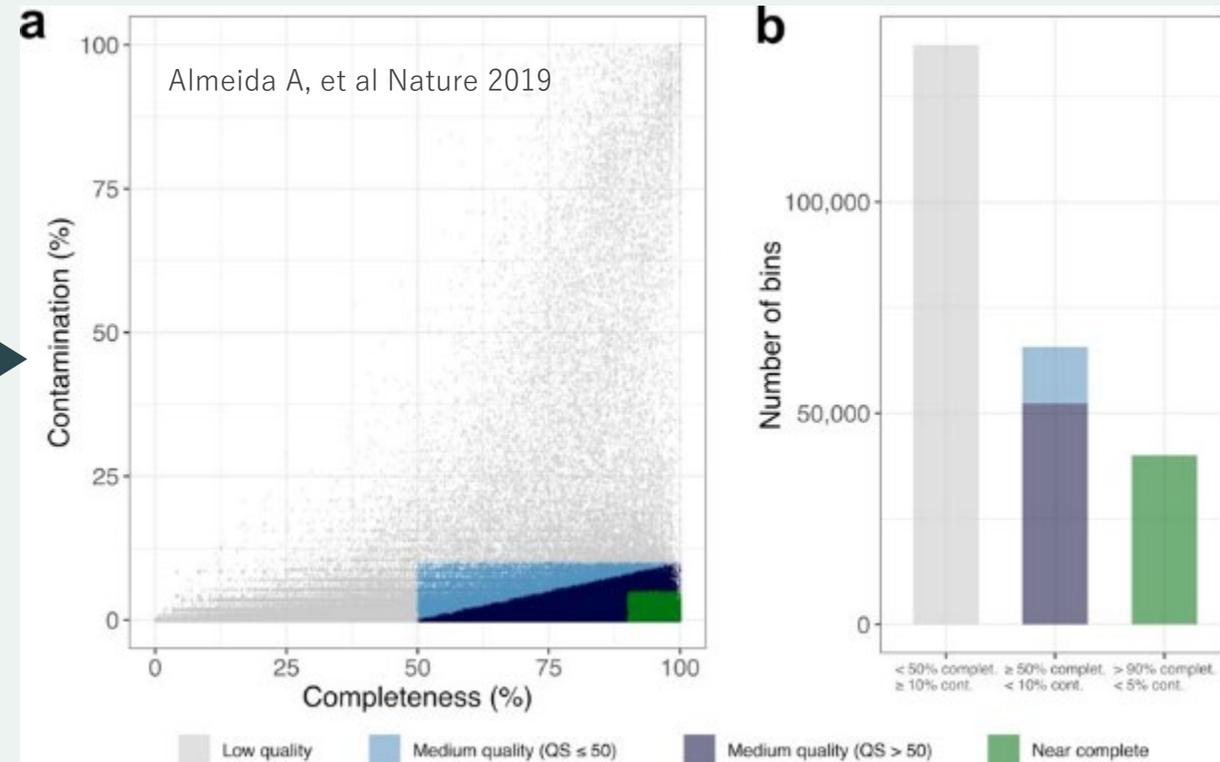
オリゴヌクレオチド頻度や量比からコンティグを分類



ゲノム品質評価ツール(CheckM)

Parks DH, et al Genome Res. 2015

分類されたデータから、クオリティの高いものを選抜



ゲノムの完全性と汚染の品質評価をシングルコピーマーカー遺伝子の頻度に基づき推定する

Bowers, R. *et al. Nat Biotechnol* 35, 725–731 (2017).

Minimum information about a single amplified genome (MISAG) and a metagenome-assembled genome (MIMAG) of bacteria and archaea

ゲノムの完全性、冗長性などから4水準に分けて、ゲノム情報を登録することが推奨されている

表1 MAG/SAGの品質評価基準および最小必要情報⁷⁾

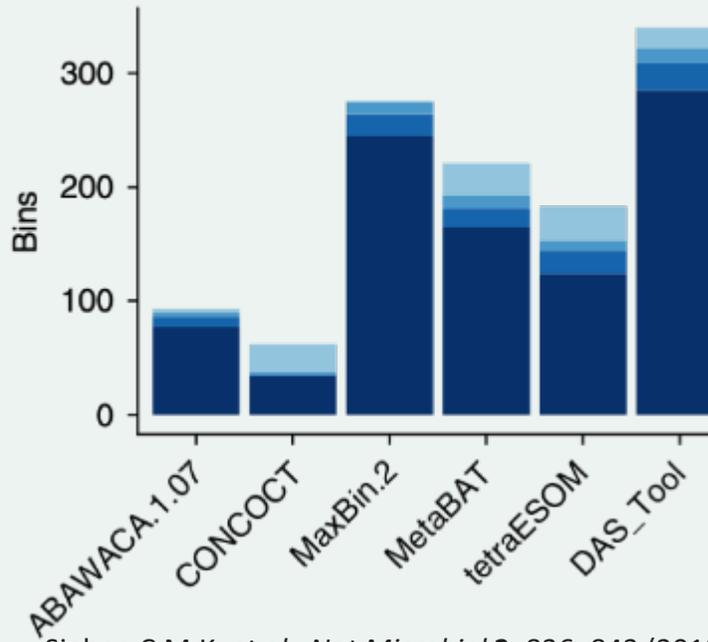
評価	アセンブリ精度* ¹	完全性* ²	冗長性* ²	補足
finished	ギャップや曖昧さを含まない単一の連続配列であること。Q50以上のエラー率であること。			この精度に達するには、手動での配列キュレーションが必要とされる。
high-quality draft	複数の配列断片から構成される。5S, 16S, 23S rRNA 遺伝子と少なくとも18個のtRNAの存在が認められること。	90%超	5%未満	ゲノム配列の完全性に加え、生物として備えるべきrRNA, tRNA情報などが備わっていることが条件。
medium-quality draft	多くの配列断片から構成される。	50%以上	10%未満	
low-quality draft	多くの配列断片から構成される。	50%未満	10%未満	

※細川正人 実験医学増刊 Vol.37 No.20 シングルセルゲノミクスより抜粋

【課題】メタゲノム ビニングによるゲノム再構築の難点

再現性：

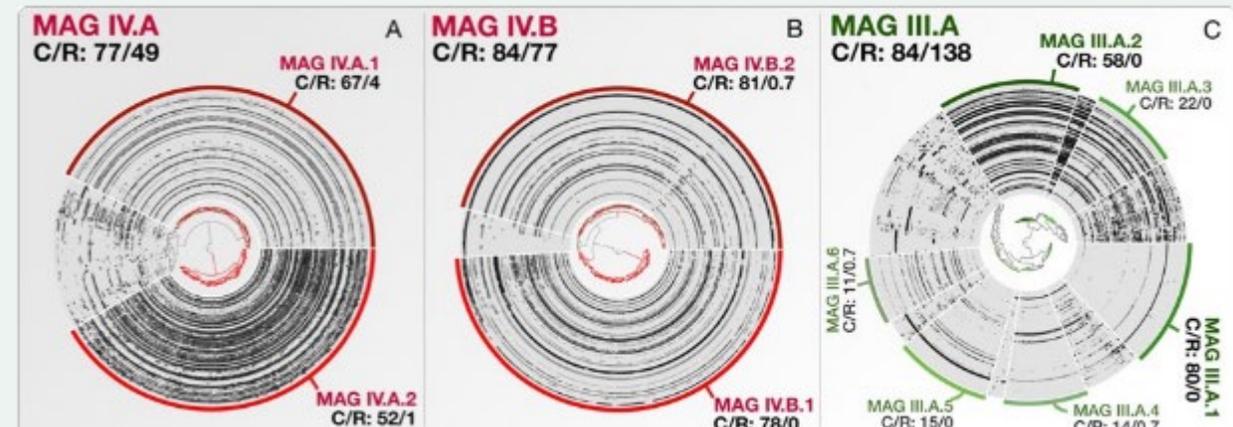
ビンングツールによって異なる結果を出力



Sieber, C.M.K. et al. *Nat Microbiol* **3**, 836–843 (2018).

品質：

ガイドライン基準を満たさない複合ゲノムがデータベースに登録



Shaiber A. et al. *mBio Jun 2019, 10 (3) e00725-19;*

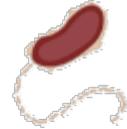
Espinoza, JL. et al. *mBio Nov 2018, 9 (6) e01631-18;*

その他にも、

- 計算に時間がかかる（日～週単位）
- 多様性が高いサンプル、近縁の菌種が多いサンプルほどビンングが困難で、希少種の情報を失いやすい
- 16S rRNA遺伝子情報が高頻度で欠失(全データの9割以上の例も)。メタ16S解析とのリンクが実質不可能

リファレンスゲノムの網羅的な獲得を可能とする次世代技術 シングルセルゲノム解析



			
Actinobacteria	Aquificales	Bacteroidetes	Chlamydiales
			
Cyanobacteria	Deinococcus-Thermus	Dictyoglomi	Firmicutes
			
Fusobacteria	Gemmatimonadetes	Planctomycetes	Proteobacteria
			
Spirochaetes	Tenericutes	Thermotogae	Verrucomicrobia

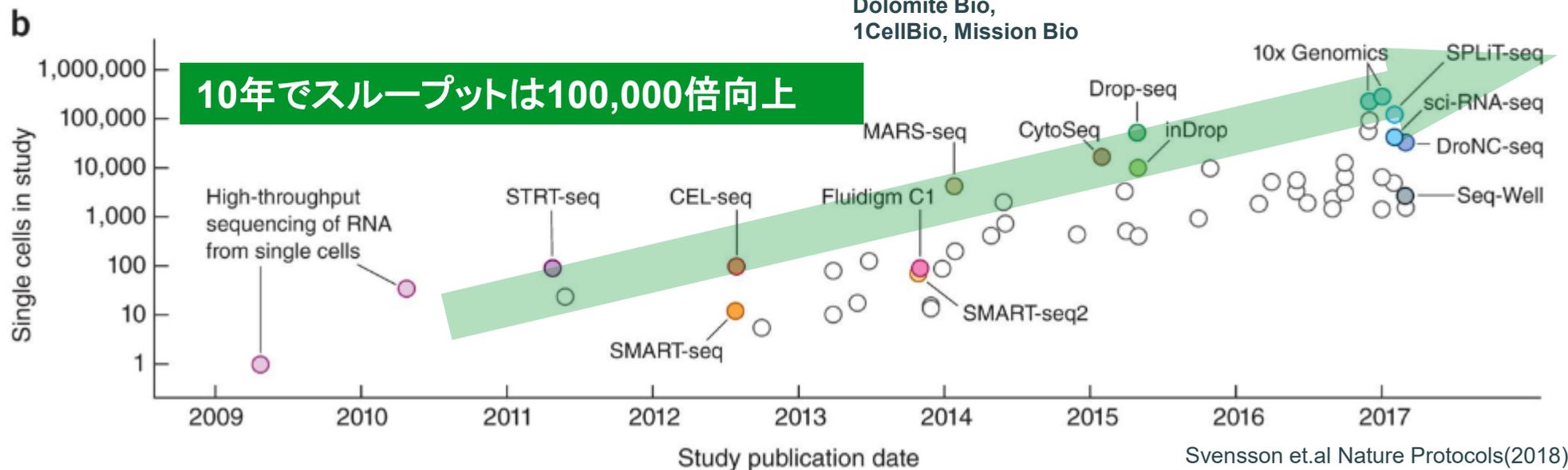
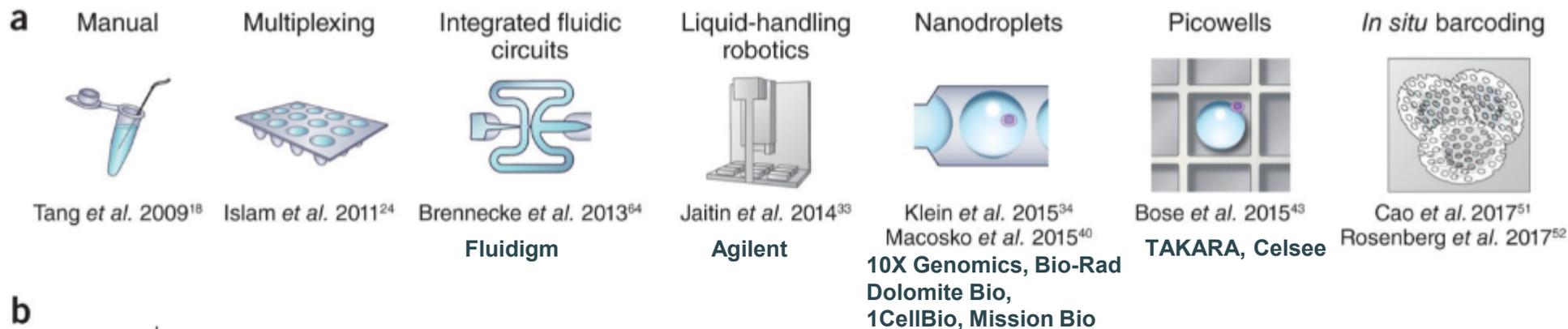
複雑系のまま、全体像を理解しようとする
=メタゲノム

個々に分解してから、1つずつ理解を始める
=シングルセルゲノム

過去10年で、あらゆる生物学研究でシングルセル解析が当たり前

動物細胞に特化したシングルセルゲノム解析技術

多彩な製品・サービスが展開



シングルセルゲノム解析 =

シングルセル(前処理)テクノロジー × DNAシーケンシングテクノロジー

細胞サンプル

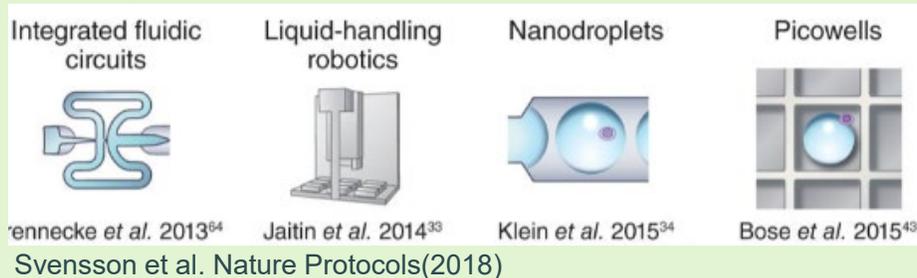


マイクロバイーム



シングルセルテクノロジー (微量DNAをシーケンスする前処理)

過去10年で様々な技術が開発・市販化



微生物に特化した技術/製品が無い

欠かすことのできない前処理

シーケンシング テクノロジー

ショートリード



ロングリード



出典元 (© 2016 DBCLS TogoTV)

シーケンスプラットフォームは
ユーザーの知りたい情報によって使い分け/併用
スループット/配列正確性のショートリード
長さ/リピート配列への精度のロングリード

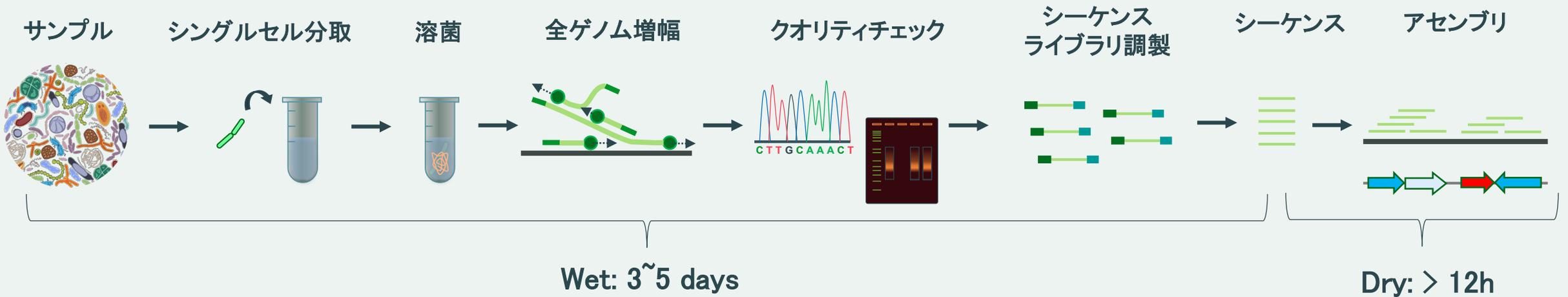
Bioinformatics

シングルセルに合わせた
解析パイプラインが必要



微生物シングルセル解析だけが10年間ほぼ進化していなかった

一般的なシングルセルゲノム解析ワークフロー



- 設備投資が必要 (クリーンルーム, FACS, 1細胞ゲノム増幅等試薬, NGS, データ解析環境)
- 作業者の訓練が必要
- 歩留まり・再現性の悪い実験系 (たまたま上手く行った例や質の低いデータの報告がほとんど)

シングルセルゲノム解析の成功に必要な4つの条件

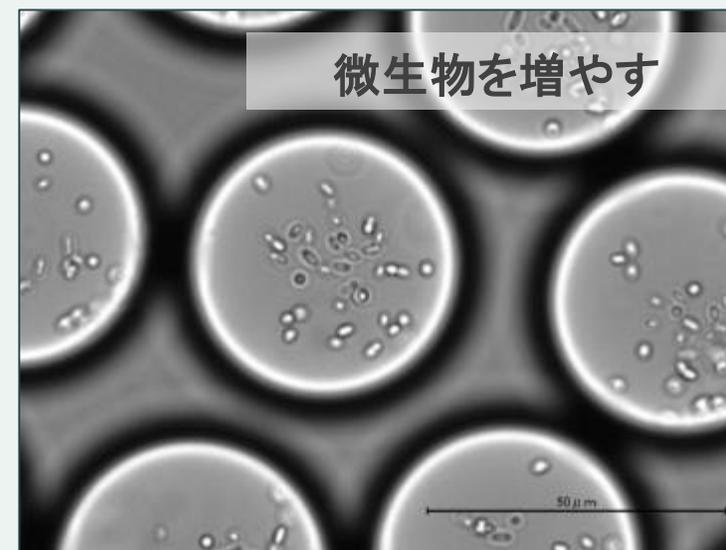
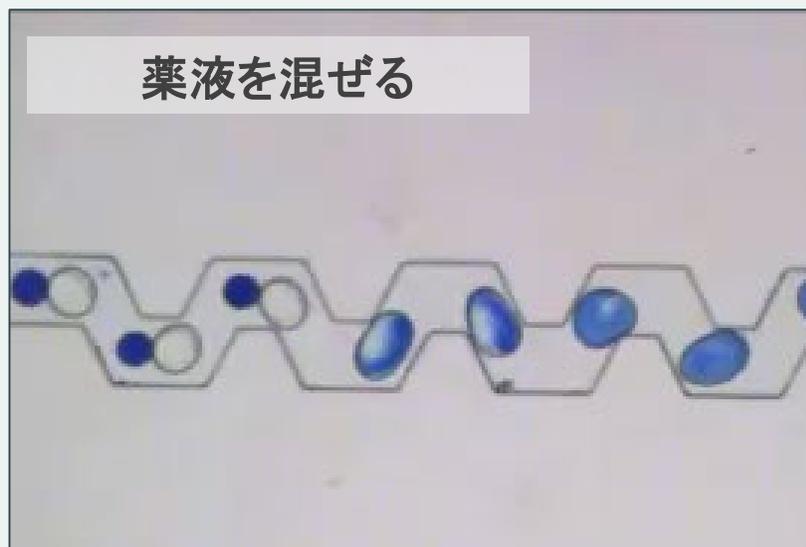
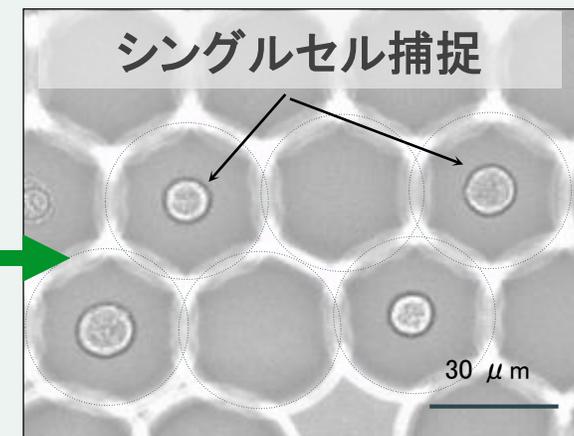
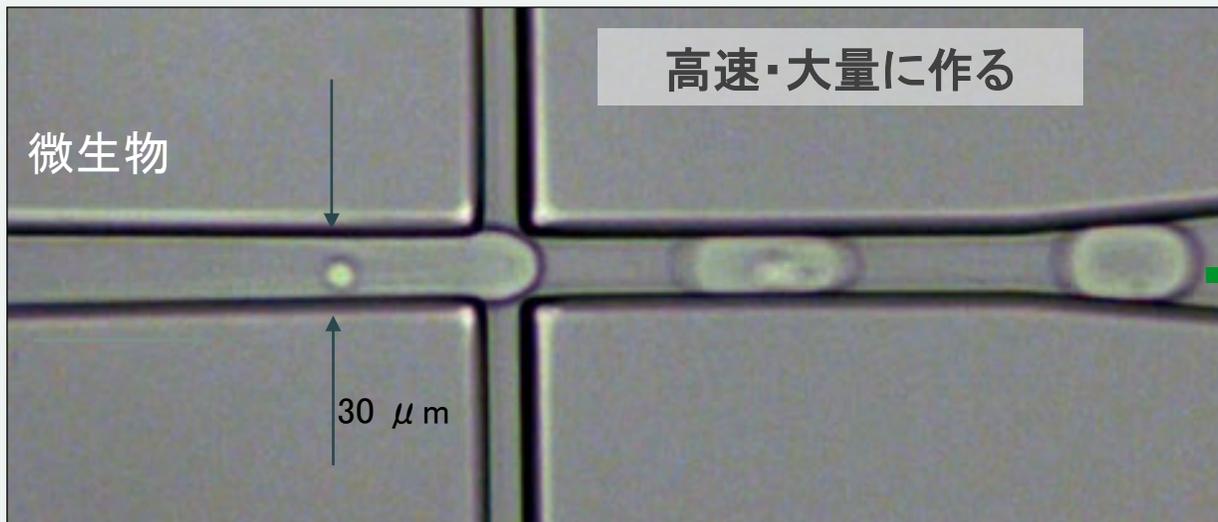
清浄な反応環境

高いスループット

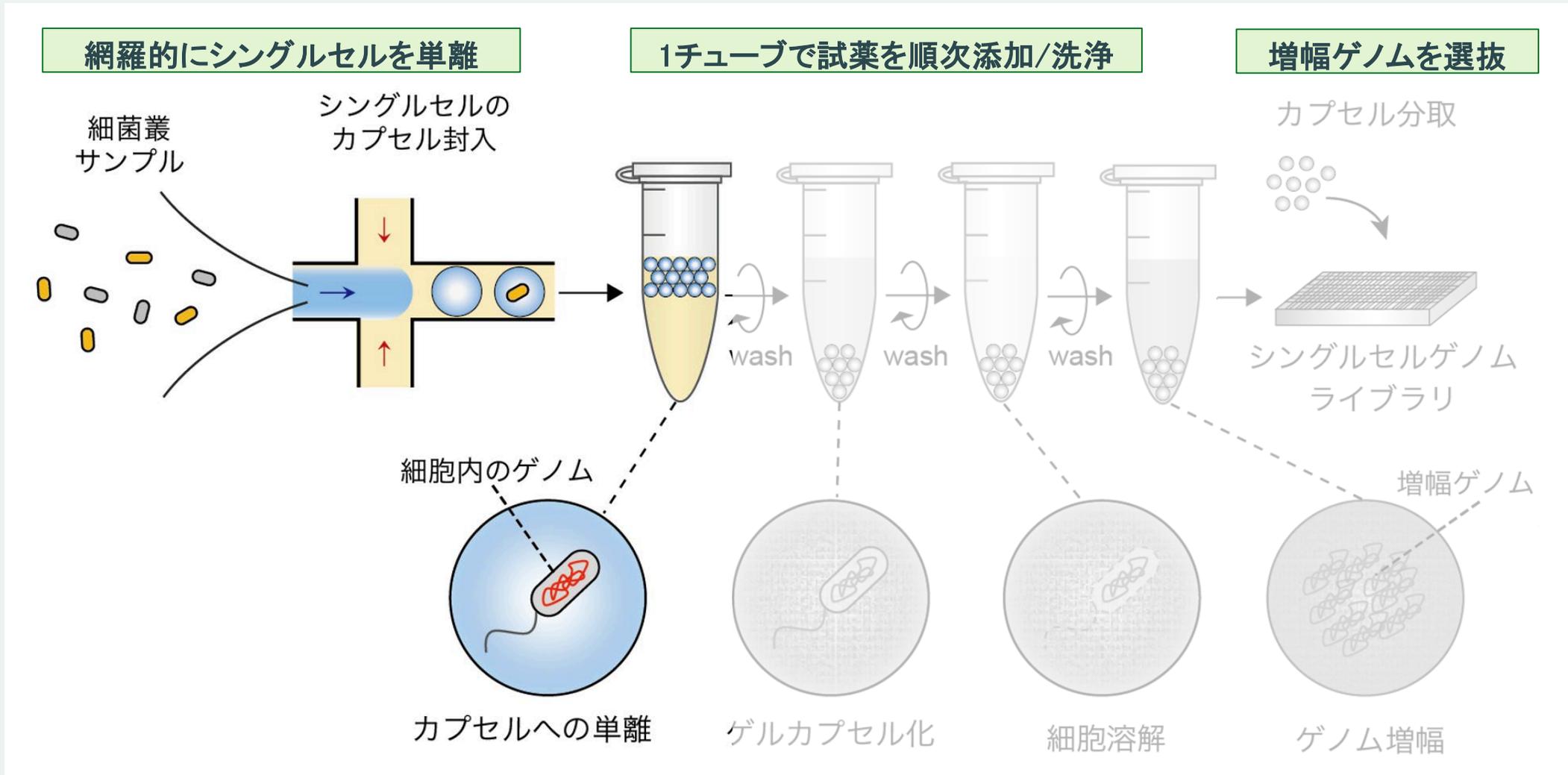
確実な溶菌

安定したゲノム増幅

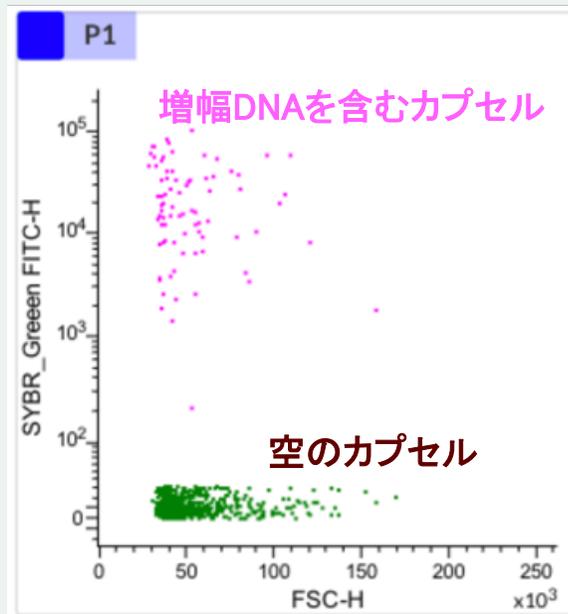
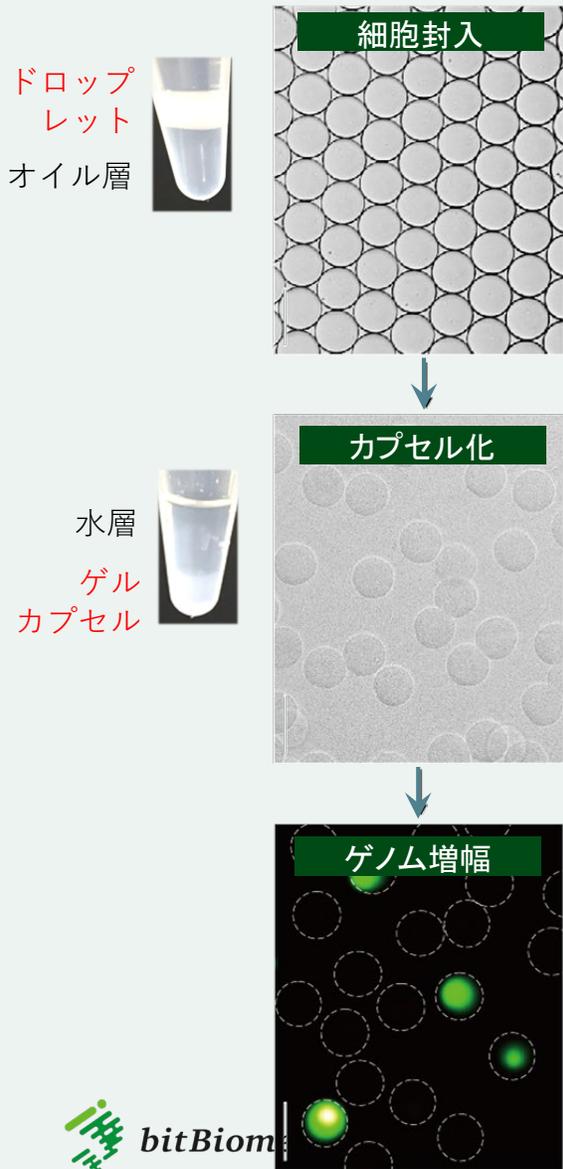
ドロップレット・マイクロフルイディクス



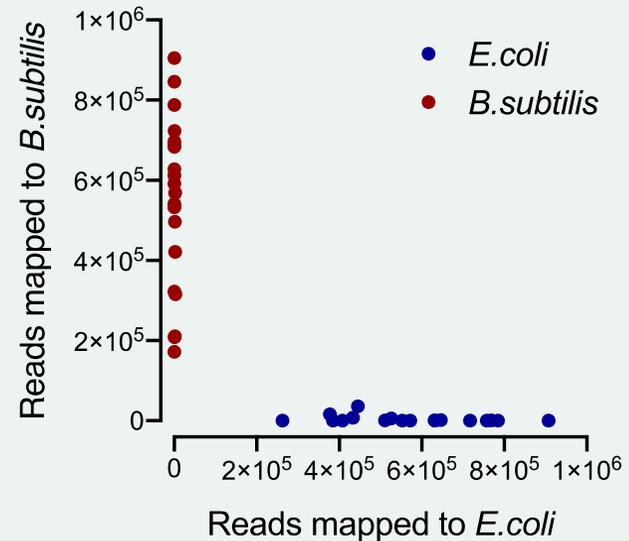
シングルセルゲノム解析の必要4条件を備えたブレイクスルー技術 SAG-gel (Single-cell amplified genome in gel)法を開発



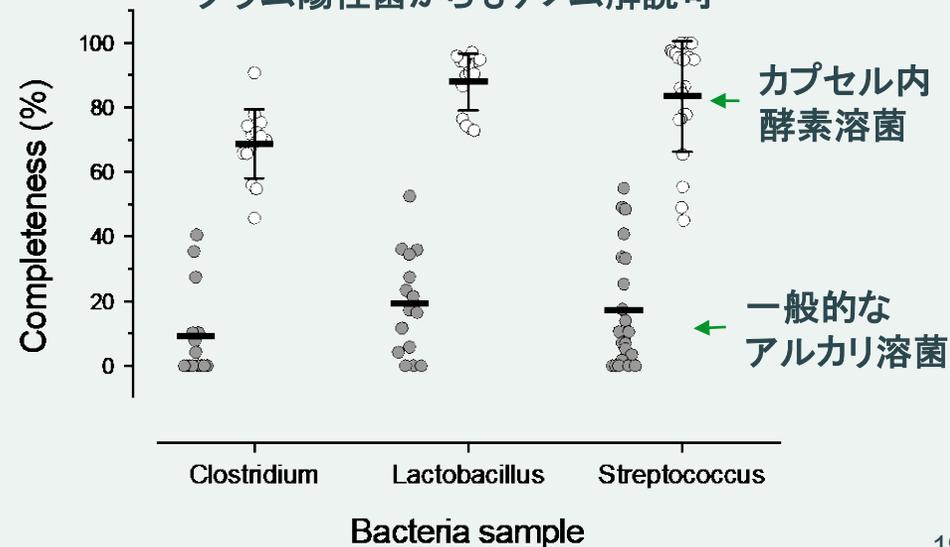
1チューブで数千~数万のシングルセルゲノムを独立増幅



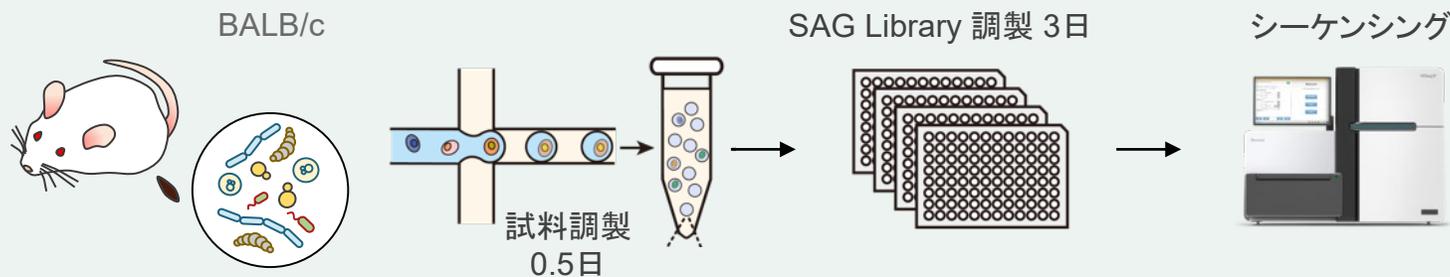
カプセル間でのコンタミネーションはない



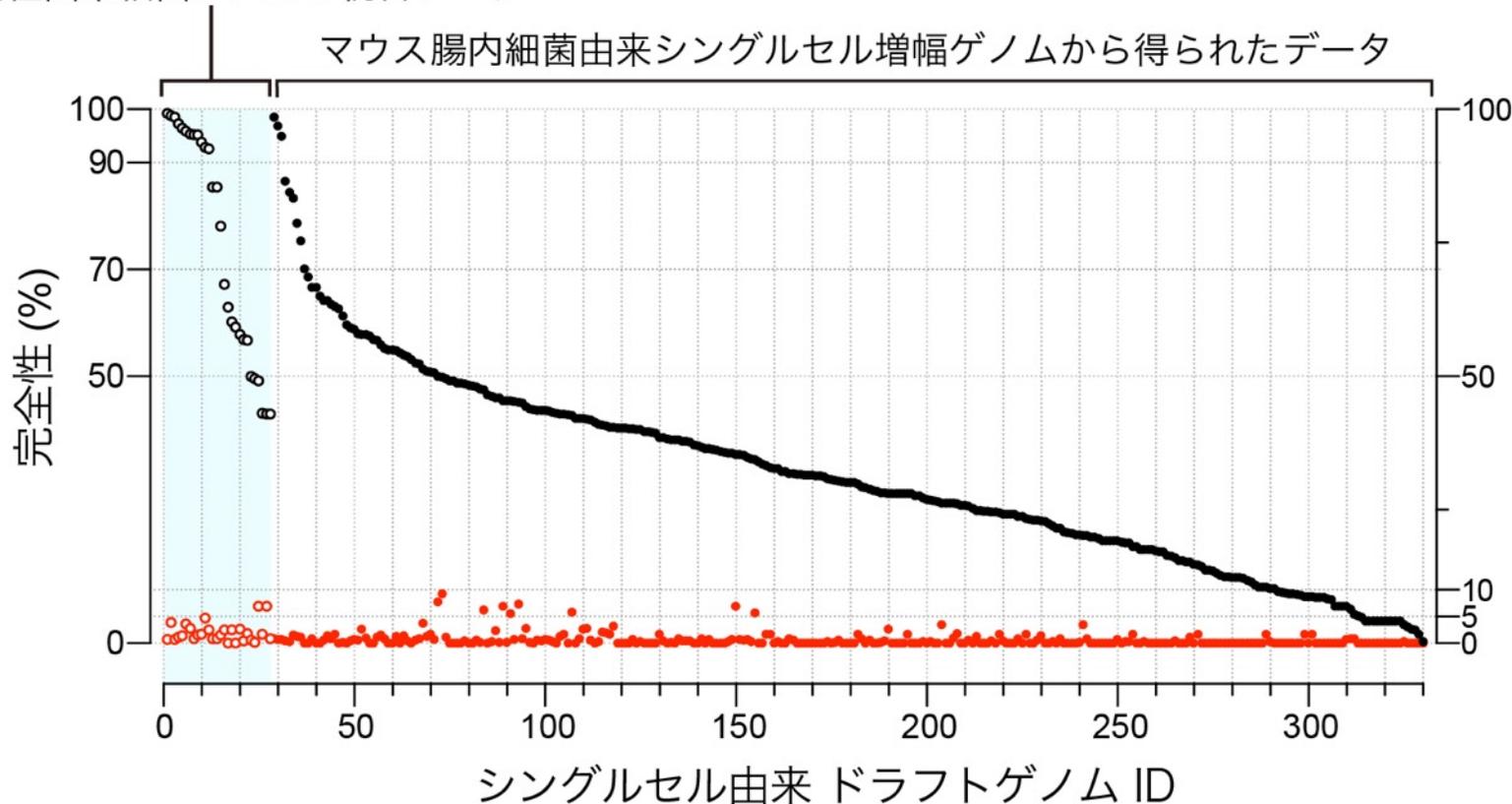
グラム陽性菌からもゲノム解読可



応用例1: 網羅的シングルセルゲノム解析から特定の細菌の機能を知る



同種由来細菌ゲノムの統合データ



ドラフトゲノムの完全性・冗長性は CheckM にて評価

Parks DH. Et al., Genome Research, 25: 1043-1055.

SAG-gel から得られるデータの特徴

- ・ 未培養細菌ゲノムを一挙に多数獲得
- ・ 配列の冗長性 (汚染) が極めて少ない
- ・ データ統合により配列の完全性が向上

302個 of SAG から重複のない31種のHQ, MQ腸内細菌 ドラフトゲノムを獲得

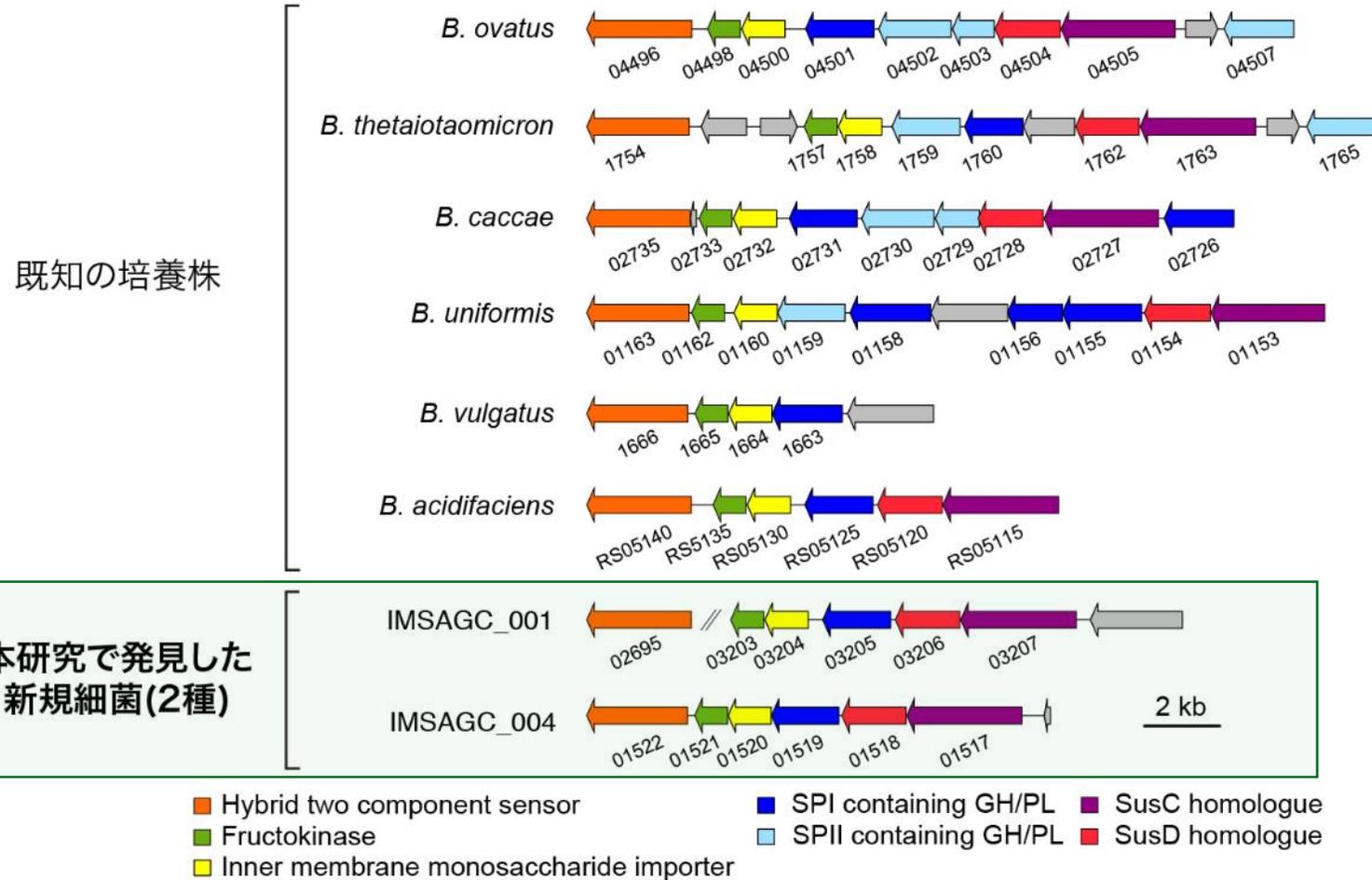
SAG ID	Lineage ^a	# contigs	Total length (Mb)	N50 (bp)	GC (%)	# CDS	Completeness (%) ^b	Contamination (%) ^b	SAG quality ^c
IMSAGC_001	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae;Bacteroides;Bacteroides acidifaciens	369	4.93	29923	43.1	4165	97.27	1.12	High
IMSAGC_002	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;28-4	709	5.08	13000	44.6	4725	93.87	1.78	Medium
IMSAGC_003	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;CAG-65	308	4.62	48295	50.7	4203	98.85	3.97	Medium
IMSAGC_004	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae;Bacteroides_B	305	4.22	34968	43.1	3598	98.62	0.8	Medium
IMSAGC_005	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;CAG-95	317	4.23	39279	43.6	4110	96.45	1.45	Medium
IMSAGC_006	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae;UBA3263;GCA_001689615.1	265	2.42	24935	50.4	2284	85.47	0.89	Medium
IMSAGC_007	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae	496	5.06	25158	47.1	4957	95.89	3.59	Medium
IMSAGC_008	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae;CAG-873	380	2.66	16733	52.1	2436	78.2	1.58	Medium
IMSAGC_009	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;CAG-95	597	5.02	23340	44.4	4633	95.33	2.87	Medium
IMSAGC_010	Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus;Lactobacillus johnsonii	54	1.91	104736	34.3	1789	99.22	0.78	High
IMSAGC_011	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;COE1	431	4.25	27757	37.9	3664	92.66	2.59	High
IMSAGC_012	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;Eubacterium_J	419	3.92	25561	45.0	3748	92.92	4.75	Medium
IMSAGC_013	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;14-2	884	5.14	11980	44.6	4945	85.42	0.95	Medium
IMSAGC_014	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Bacteroidaceae;F0040	273	2.64	20006	47.1	2340	95.18	1.58	Medium
IMSAGC_015	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;Dorea	388	2.55	12891	45.3	2429	67.29	2.53	Medium
IMSAGC_016	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae;CAG-485	385	1.94	8558	46.4	1735	56.91	0.5	Medium
IMSAGC_017	Firmicutes;Bacilli;Erysipelotrichales;Erysipelatoclostridiaceae;Erysipelatoclostridium;Erysipelatoclostridium cocleatum	299	2.69	19801	28.9	2384	95.28	0.94	Medium
IMSAGC_019	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;Dorea	311	2.42	20896	44.1	2370	62.98	0	Medium
IMSAGC_020	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;CAG-95	756	4.13						Medium
IMSAGC_021	Bacteria;Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales;Lachnospiraceae;Dorea	642	3.03						Medium
IMSAGC_027	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae;CAG-1031;GCA_001689585.1	314	2.00	15566	50.5	1738	59.25	0	Medium
IMSAGC_028	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Rikenellaceae;Alistipes	265	1.73	22105	52.5	1581	56.76	1.92	Medium
IMSAG_013	Firmicutes_A;Clostridia;Oscillospirales;CAG-272	229	1.72	16943	45.4	1622	59.65	0	Medium
IMSAG_025	Bacteroidota;Bacteroidia;Bacteroidales;Muribaculaceae;CAG-485	667	2.51	6077	45.3	2558	50	7.76	Medium
IMSAG_044	Firmicutes;Bacilli;Lactobacillales;Lactobacillaceae;Lactobacillus_H;Lactobacillus_H reuteri_A	200	1.82	17958	38.3	1735	86.54	0.54	Medium
IMSAG_049	Firmicutes_A;Clostridia;Lachnospirales	317	1.74	11294	39.6	1762	54.88	1.34	Medium

推定ゲノム完全性 90%以上の物も多数

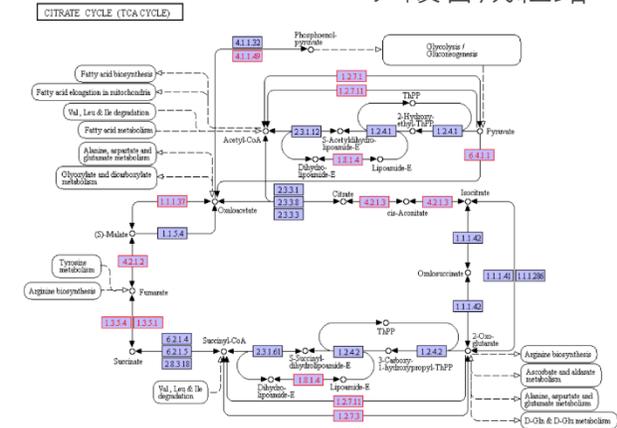
イヌリン利用遺伝子座・コハク酸代謝経路を特定し、代謝メカニズムを証明

Chijiwa et al., Microbiome 2020, <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0779-2>

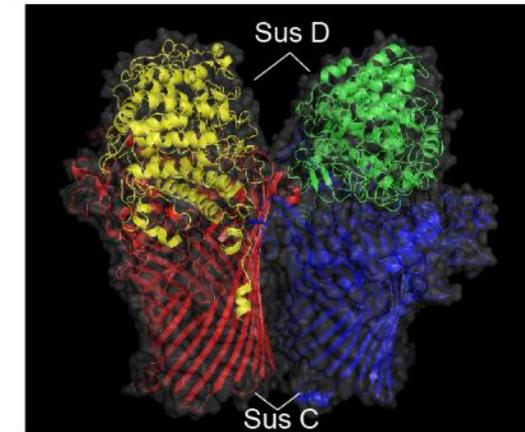
Bacteroides属細菌ゲノムにコードされたイヌリン利用遺伝子座



コハク酸合成経路

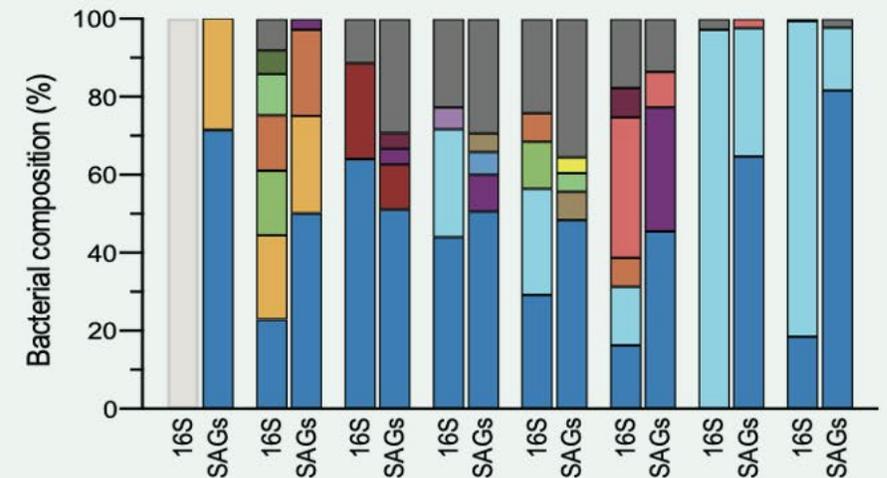
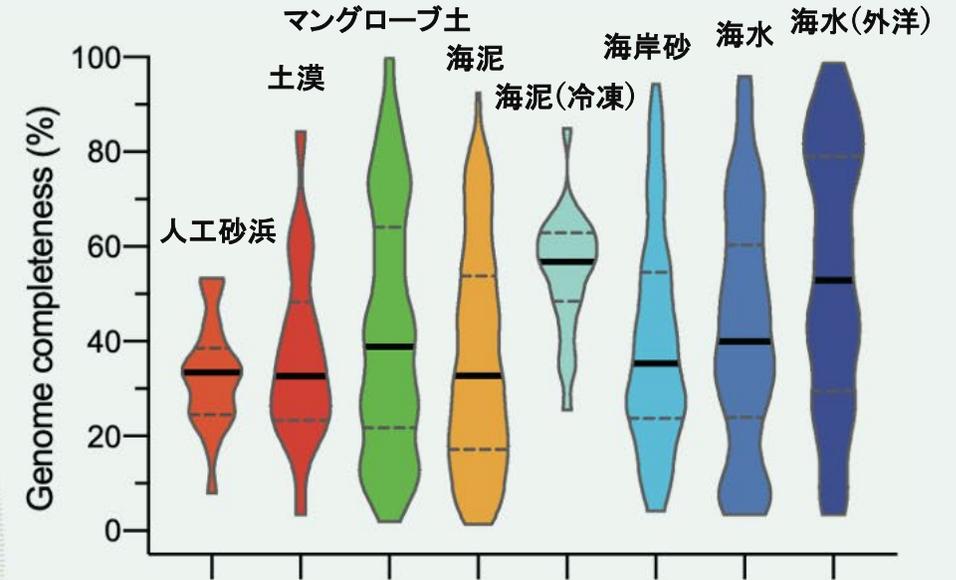
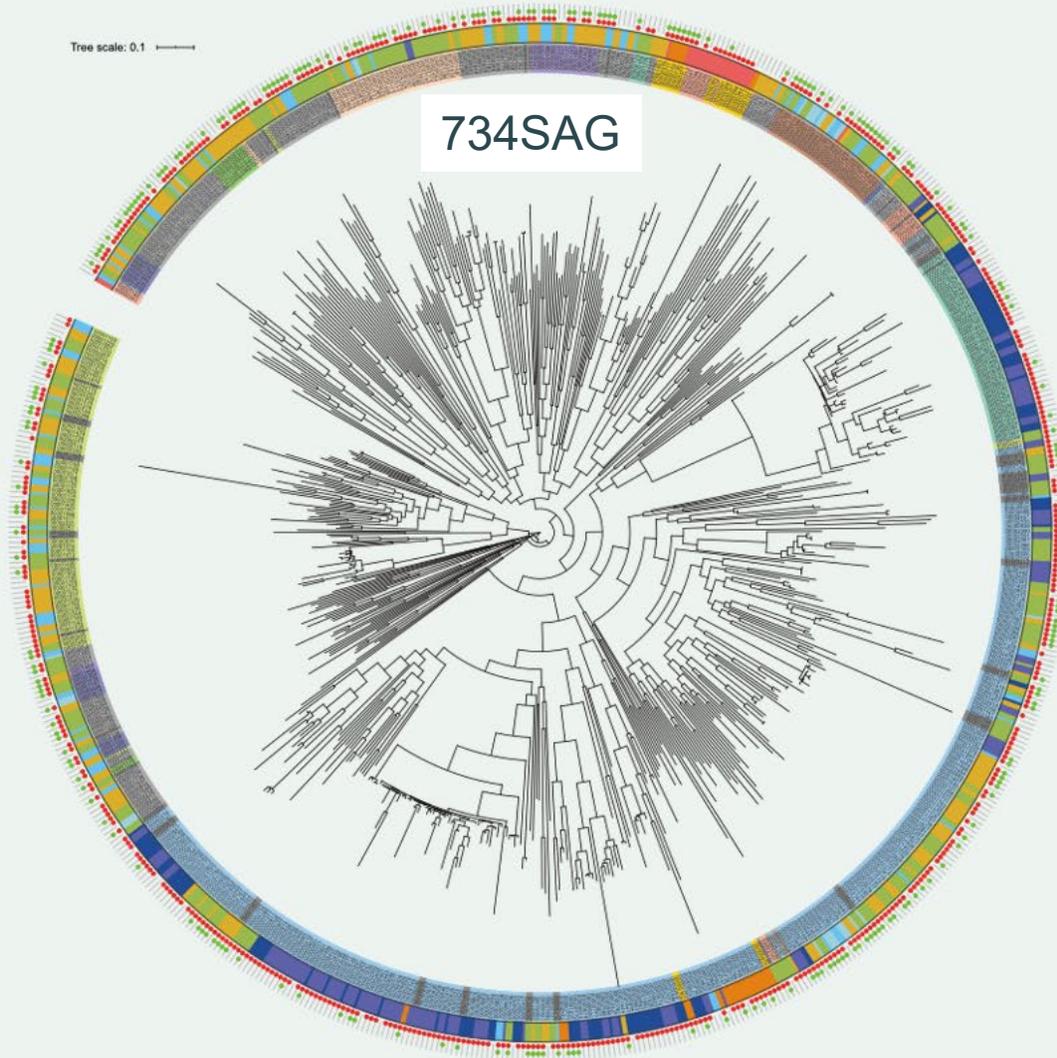


新規細菌でイヌリン取り込みに関与する膜タンパク質の構造予測



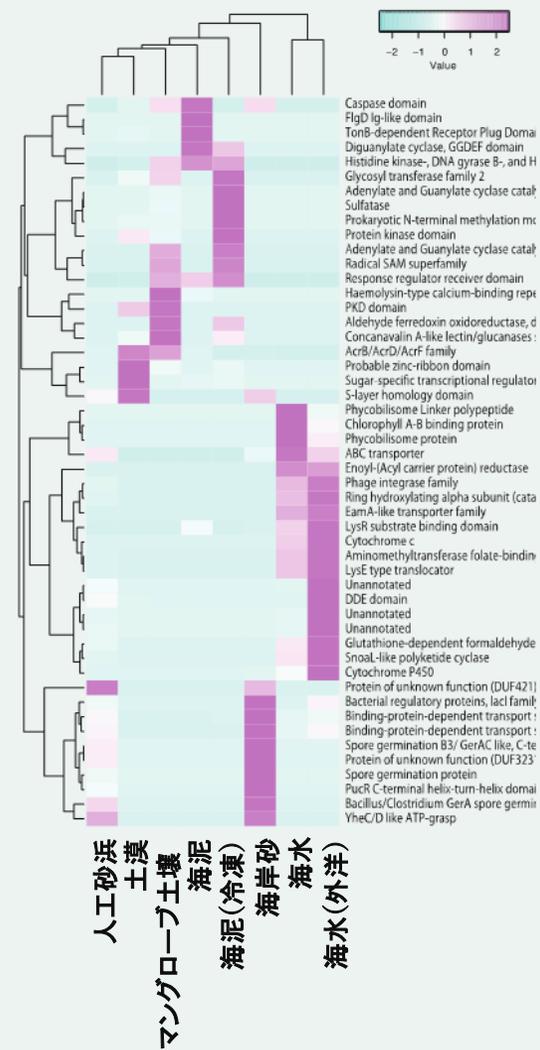
応用例2: 環境サンプルから大規模に細菌ドラフトゲノムを取得する

- Marker tophit phylum**
- ◆ Proteobacteria
 - ◆ Desulfobacterota
 - ◆ Cyanobacteriota
 - ◆ Bacteroidota
 - ◆ Patescibacteria
 - ◆ Bdellovibrionota
 - ◆ Actinobacteriota
 - ◆ Firmicutes
 - ◆ Omnitrophota
 - ◆ Planctomycetota
 - ◆ multiple_hits
 - ◆ Others
- Sampling site**
- S1 人工砂浜
 - S2 土漠
 - S3 マングローブ土壌
 - S4 海泥
 - S5 海泥(冷凍)
 - S6 海岸砂
 - W1 海水
 - W2 海水(外洋)
- Dataset legend**
- 16S rDNA detected(>500 bp)
 - <97% identity to top hit result

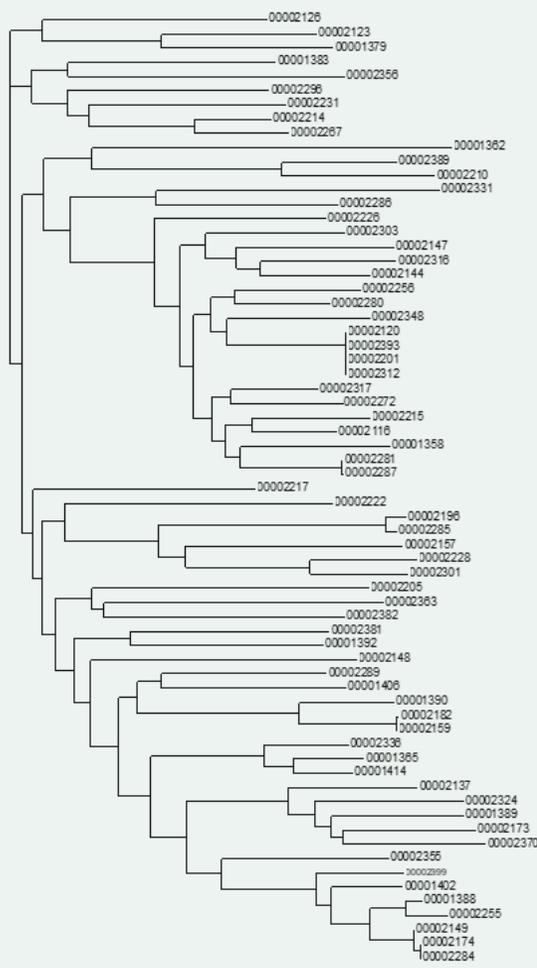


環境毎の特徴抽出、細菌のもつウイルス様配列、生合成遺伝子を同定

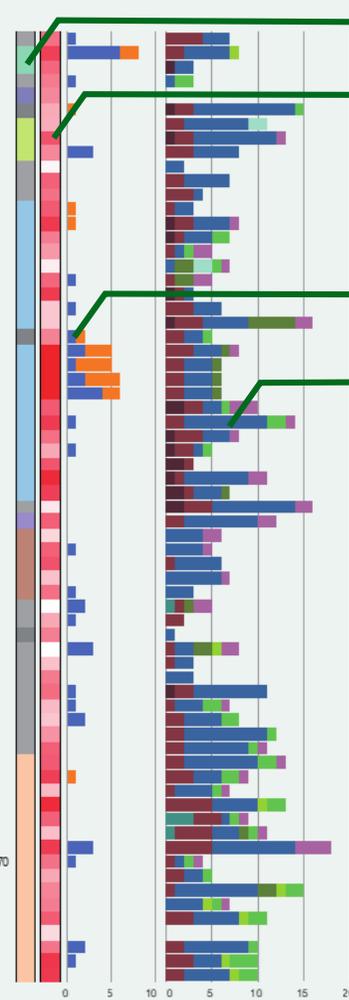
(全体像)環境特異的遺伝子群



(個別像)各細菌の詳細情報



マングローブ土壌の例



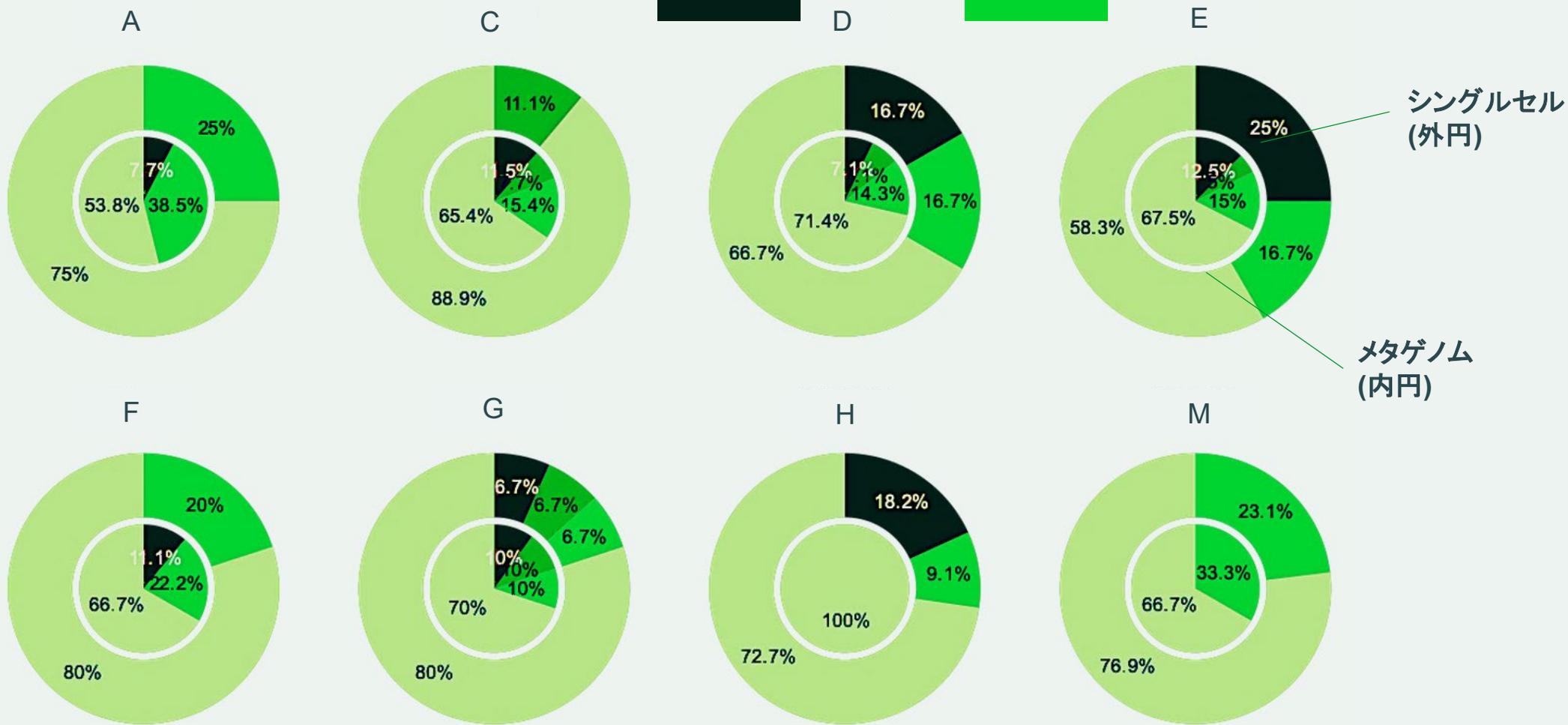
シングルセル解析導入の効果

- 複雑系の中での各細菌の機能を知る
- 解析細胞数のスケールアップが可能
- ターゲット細菌を選抜し解析

応用例3:ヒト腸内細菌からのドラフトゲノム獲得 メタゲノムとの比較、新規ゲノムの割合は？

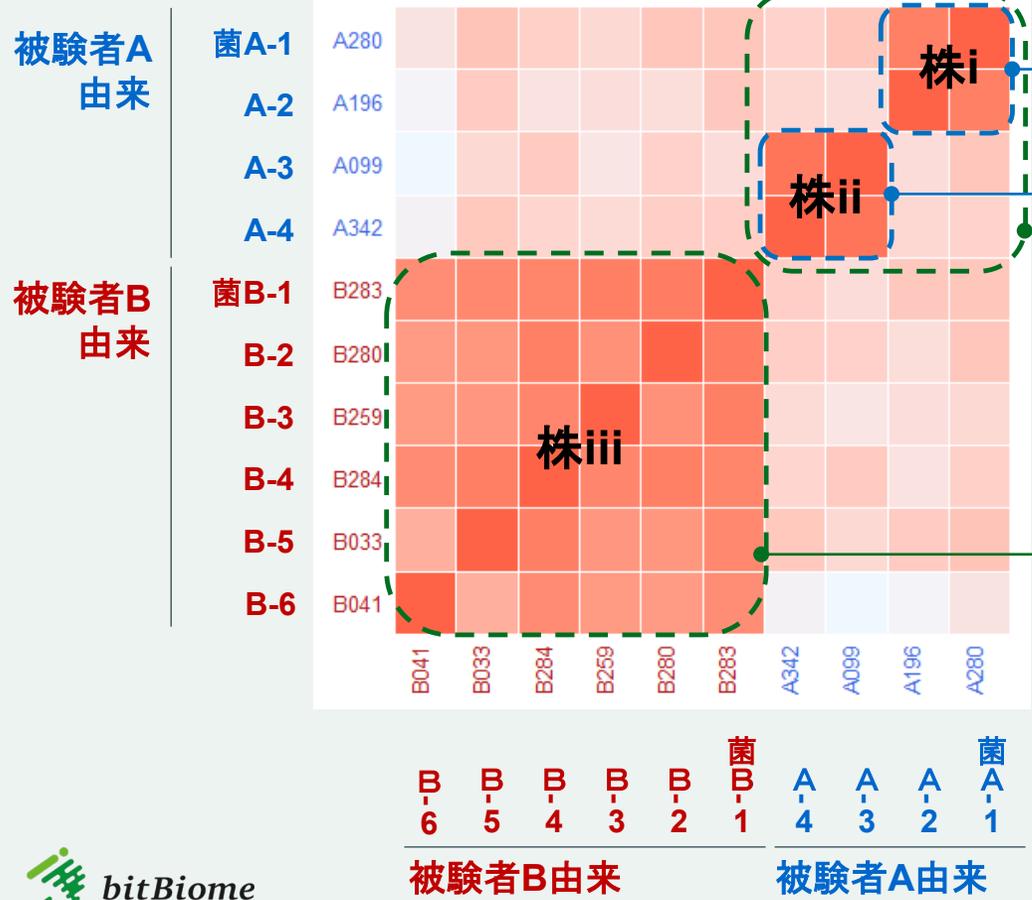
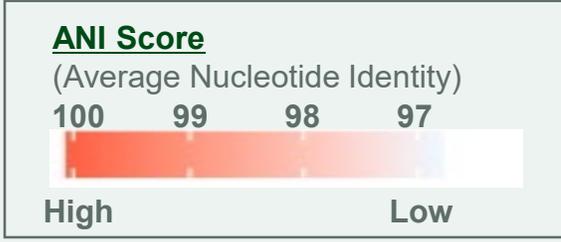
Unpublished data

被験者8名の平均: ドラフトゲノムの平均10%が未記載種、24%が分離株なし (頻度は被検者に依存)



ヒト腸内細菌同一種の中での亜種(株)を特定

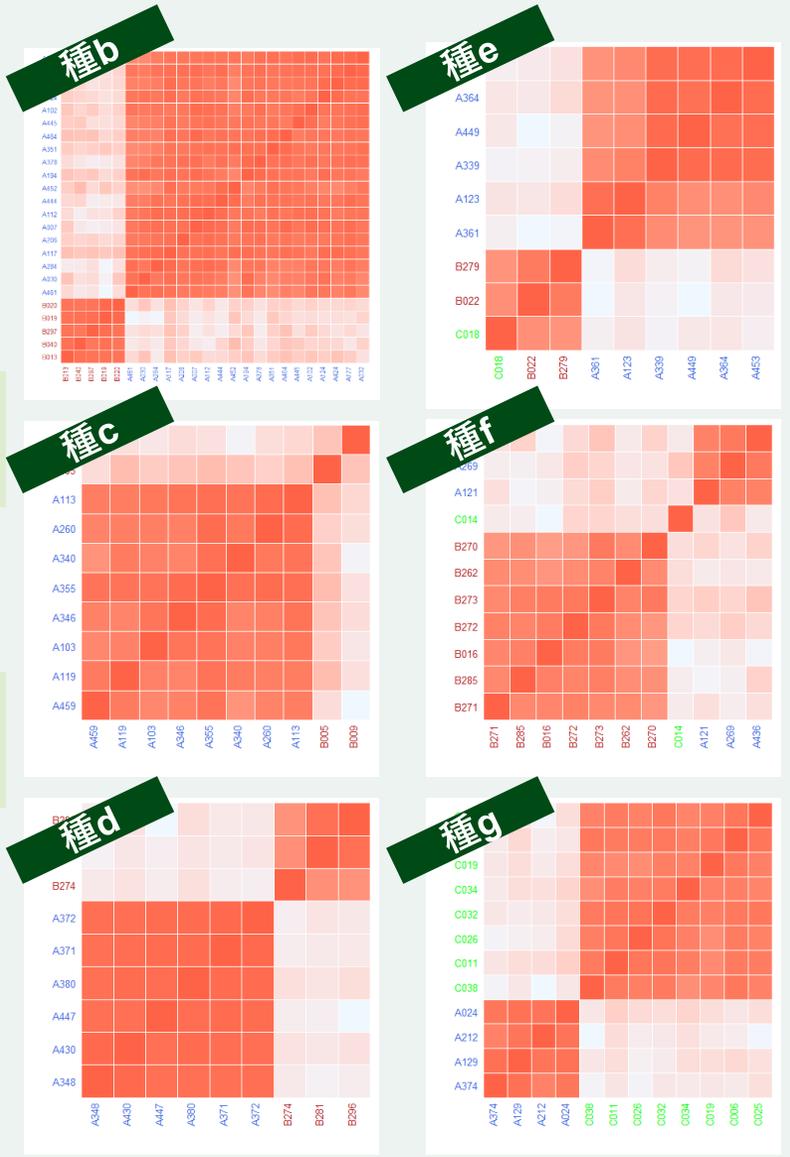
16S rRNA遺伝子により同一種として同定されたヒト腸内細菌 種aの種内比較ヒートマップ



被験者A内でも二種類の異なる株が存在する

被験者Aと被験者Bでは腸内細菌の株が異なる

Unpublished data

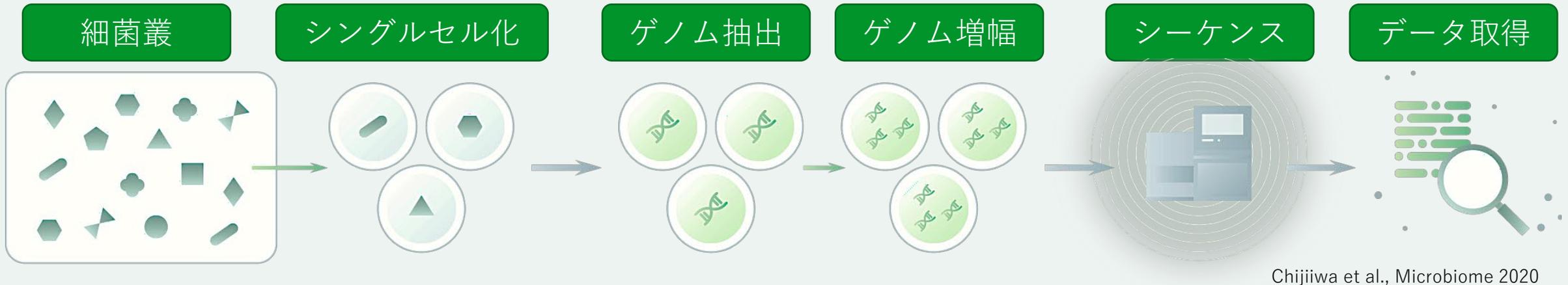


bitBiomeの提供するbit-MAP® 解析サービス



bit-MAP[®] bitBiome Microbiome analysis platform

SAG-gelを活用したシングルセルゲノム解析サービス：ウェットからドライまで一貫して実施

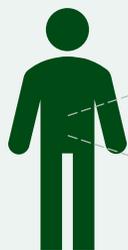


※同一サンプルからのショットガンメタゲノムの並行解析も実施可能

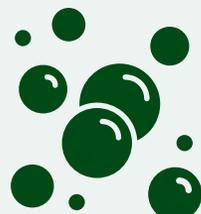


参考) 基本プロトコル: 1検体あたり96シングルセルを解析

1検体

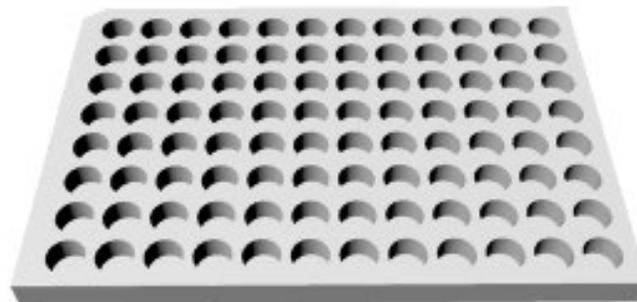


微生物叢



単離・
DNA増幅等

微生物96個体のゲノムを解析
(96ウェルプレートを使用)



- 各ウェルには、単離・DNA増幅が確認された「1微生物由来のDNAサンプル」
- 同種の微生物が異なるウェルに含まれることにより、96個体の解析結果の一部が重複する場合も存在 (優先種など)

解析レポート



ゲノム配列データ



等
(プランに
応じて)

bit-MAP®のBioinformaticsプロセス

自社の独自解析パイプライン

シングルセル
NGS生データ

De novo
assembly

ドラフトゲノム
(品質評価)

系統解析
遺伝子領域推定

より詳しく知る
機能解析

次世代シーケンサーでDNA配列を読む

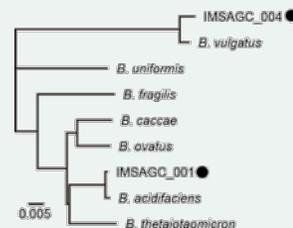
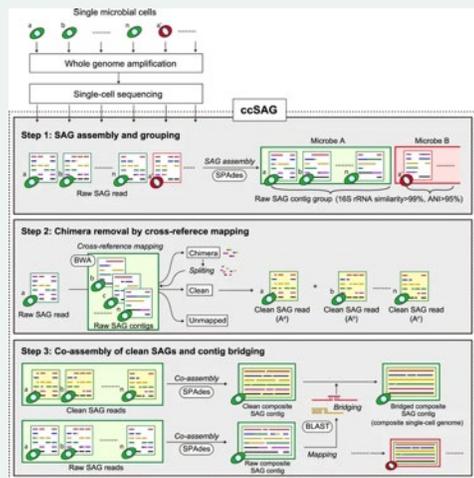
配列情報をつなぎ合わせゲノムを復元

独自データベースを参照しゲノムを精緻化
どの細菌が特徴的に現れるか？

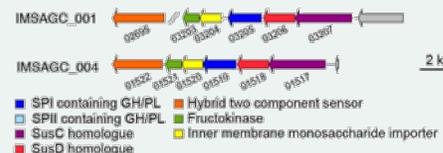
代謝経路予測



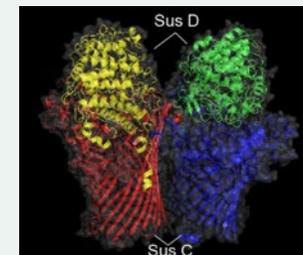
シングルセルだけでなく
ショットガンメタゲノム
ロングリードメタゲノム
などの解析技術も保有



どんな遺伝子を保有しているか？



タンパク質構造予測



Bionformaticsに関してもexpertiseを保有

Kogawa, M., Hosokawa, M., et al. Obtaining high-quality draft genomes from uncultured microbes by cleaning and co-assembly of single-cell amplified genomes. *Sci Rep* 8, 2059 (2018).

実際の腸内細菌機能解析事例

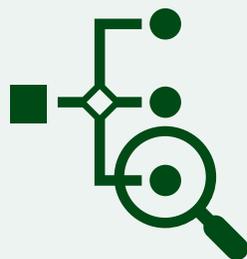
Chijiwa, R., Hosokawa, M., Kogawa, M. et al. Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota. *Microbiome* 8, 5 (2020).

bit-MAP®の特長/優位性



広範なカバレッジ

- 多種多様な微生物に対応可能



高解像度

- 種レベルの下の株レベルまで解析可能



高品質データ

- 1微生物由来ゆえ汚染がなく、完全性の高いゲノムデータ



ハイスループット

- 低コストにリファレンスゲノムを取得

— 微生物のシングルセルゲノム解析により何が得られるのか

1

未培養微生物を含む
微生物リファレンスゲノムデータベースを構築できる

2

ある生命現象が、どの微生物の
どの機能と関連しているのか、精密に理解できる

3

メタゲノムでは解析では困難な、
超多様・近縁種混在・DNA回収困難なサンプルにも対応できる

微生物群の解析で 抽象的に全体像を捉え...

メタ16S rRNA解析

- 微生物群に含まれる菌のメンバーリストを手早く解析可
- 機能解析はできず、系統解析に特化
- 存在率が低い種は“その他”扱い

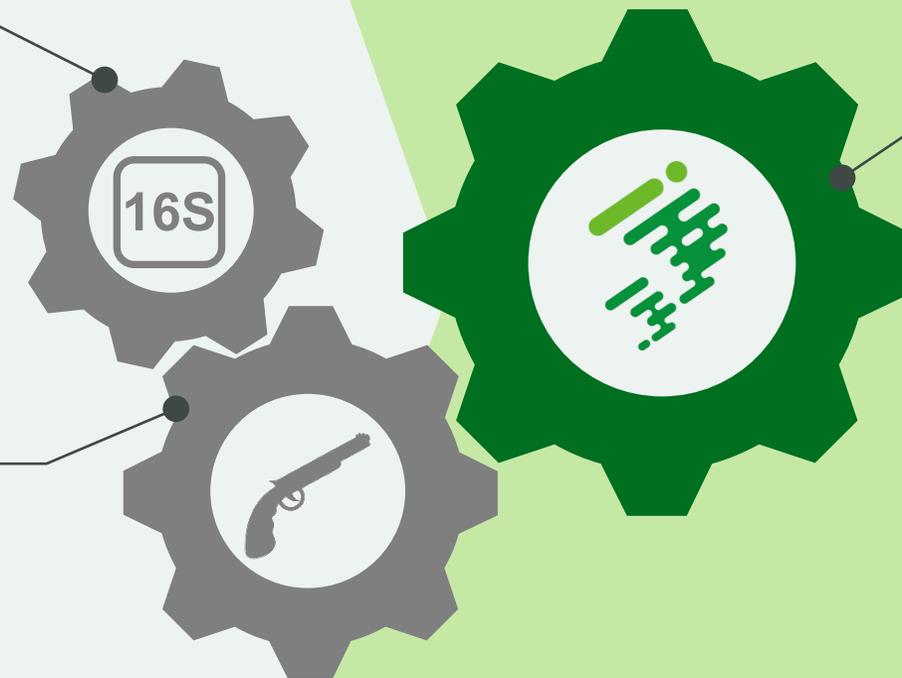
ショットガン メタゲノム解析

- 微生物群全体の組成/機能を解析可
- 一方、近縁種の比較やレア種のデータ取得は難しい
- 断片化された種混合ゲノム配列のPC上での再構築に課題も

シングルセル解析で ターゲットを完全に理解する

bit-MAP®による シングルセル解析

- 1個体ごとに、株レベルでゲノム配列から機能を解析
- その元となるゲノム配列は、間違いなくシングルセル由来
- レア種/難培養種まで幅広く解析可能



bitBiomeはメタゲノム解析に加え、世界唯一のシングルセルゲノム解析技術により、新たな発見・エビデンス創出を強力にサポート

メタ情報と組み合わせた微生物のゲノムカタログを創り、 次世代の産業応用へ



複雑な
微生物コミュニティから、

Actinobacteria	Aquificales	Bacteroidetes	Chlamydiales
Cyanobacteria	Deinococcus-Thermus	Dictyglomi	Firmicutes
Fusobacteria	Gemmatimonadetes	Planctomycetes	Proteobacteria
Spirochaetes	Tenericutes	Thermotogae	Verrucomicrobia

シングルセルゲノミクスにより
個別の微生物の
ゲノムカタログを作り、



パートナー企業/研究機関とともに
産業応用へ

bitBiome's mission

exp($\Sigma 0 \rightarrow 1$)

～ 絶え間ない新たな科学的発見の土台となり、知を爆発的に集積し、
医療や産業資源への応用を通じて豊かな世界を実現します ～

Activate the world with bitBiome,
and with microorganism 



Q&A

Appendix 技術関連



bit-MAP®とショート・ロングリードのハイブリッドシーケンス

細胞サンプル

シングルセルテクノロジー
(微量DNAをシーケンスする前処理)

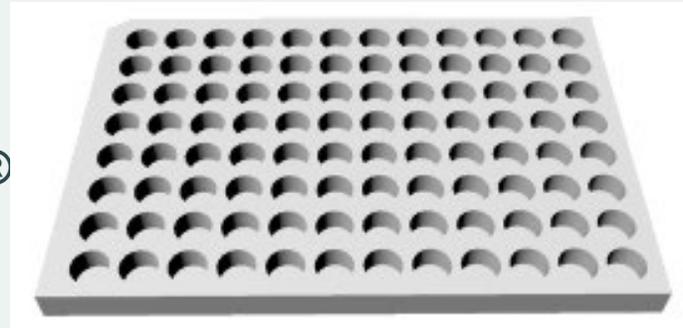
シーケンシング
テクノロジー

Bioinformatics



シングルセル由来ゲノムDNA
ライブラリー

bit-MAP®



ショートリード



illumina®

ロングリード



当社独自のショート・ロングリードのハイブリッド解析を確立済み



混在した細胞情報を

整理・保管できる形にし

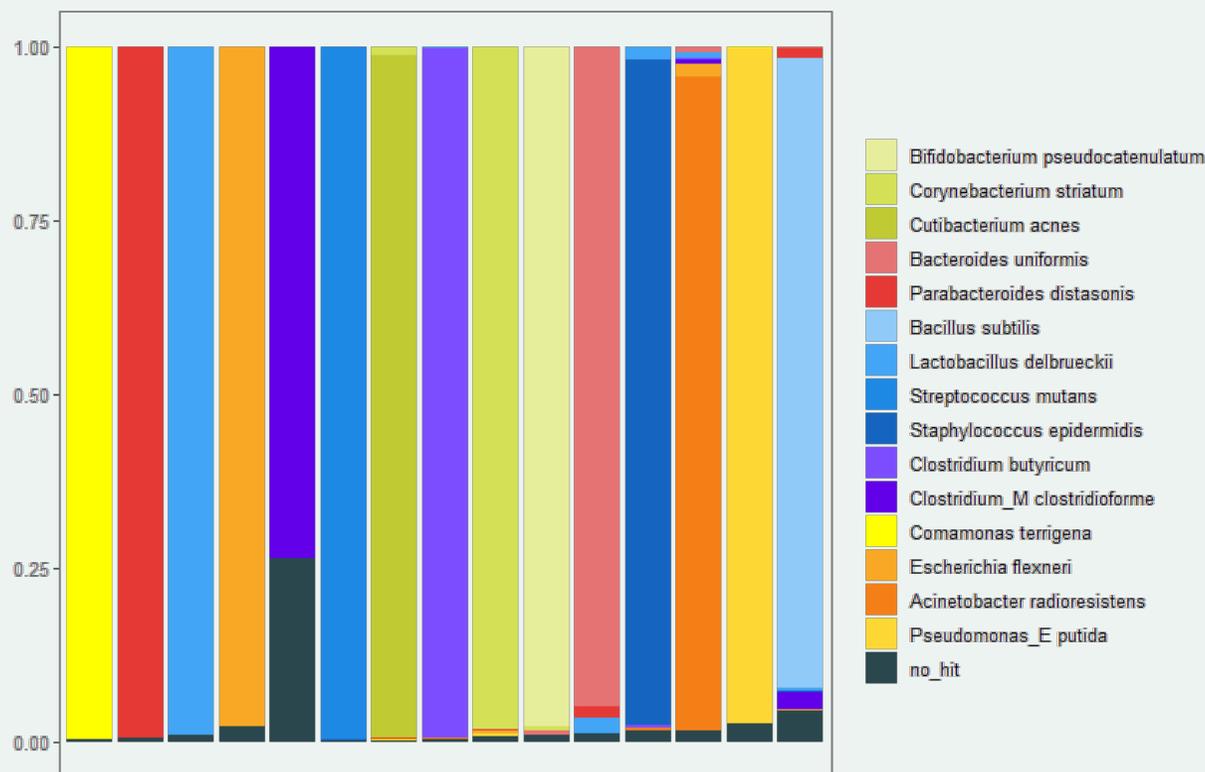
複数の方法で読み取りつなぎ合わせる

bitBiomeでは、上記フローによりロングリードの運用も行っており、未培養腸内細菌のシングルセルゲノムでもほぼ1本のドラフトゲノムにできることを確認済み

ビニング直後のメタゲノム由来ドラフトゲノム(MAG)の利用は 注意が必要

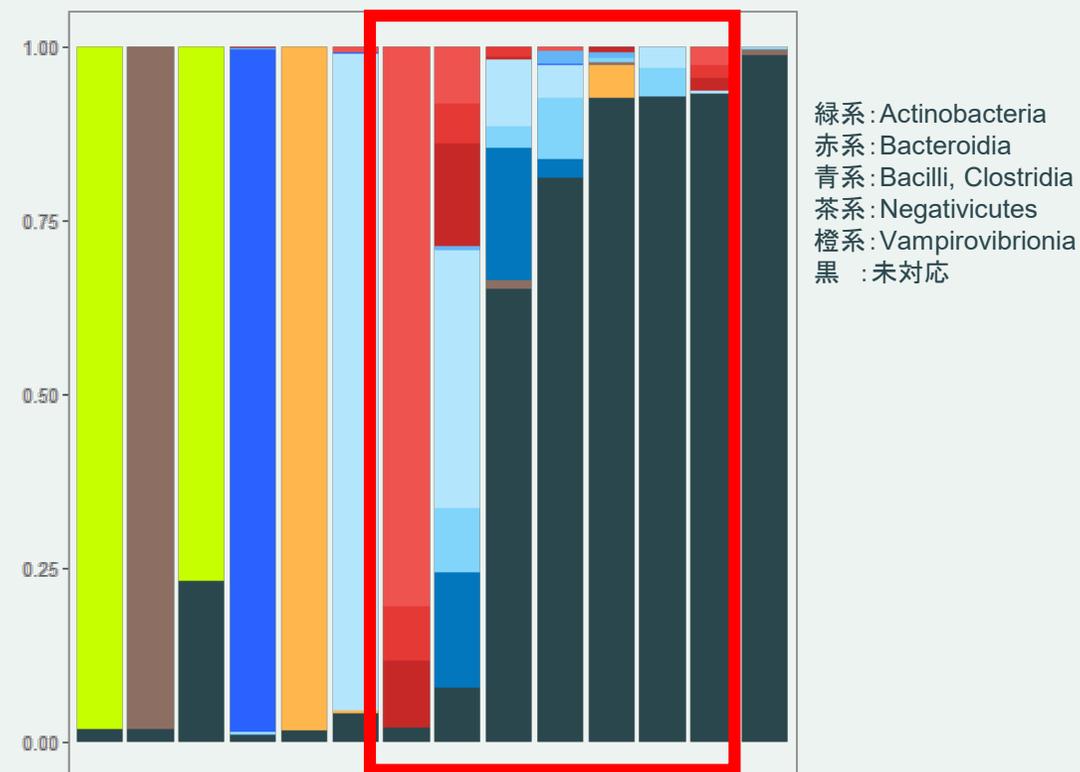
Hosokawa et al., in prep.

15種の細菌株を含むNBRC微生物カクテル



横軸: Non-redundant MAGs
縦軸: Composite SAGsと相同性の高いコンティグの割合

実際のヒト糞便サンプル



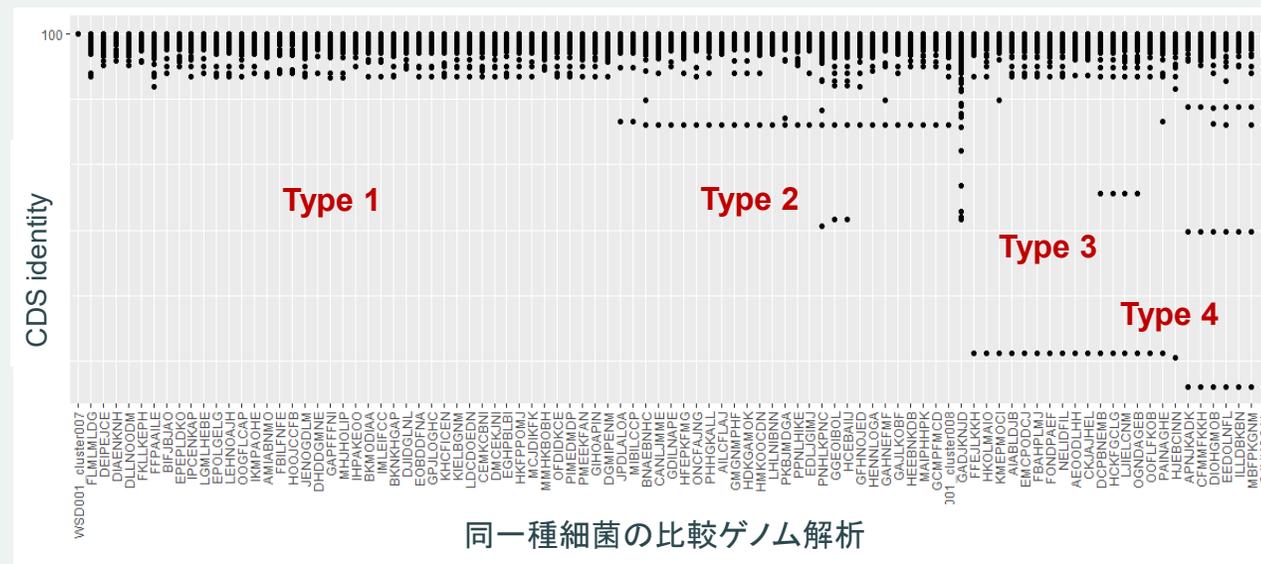
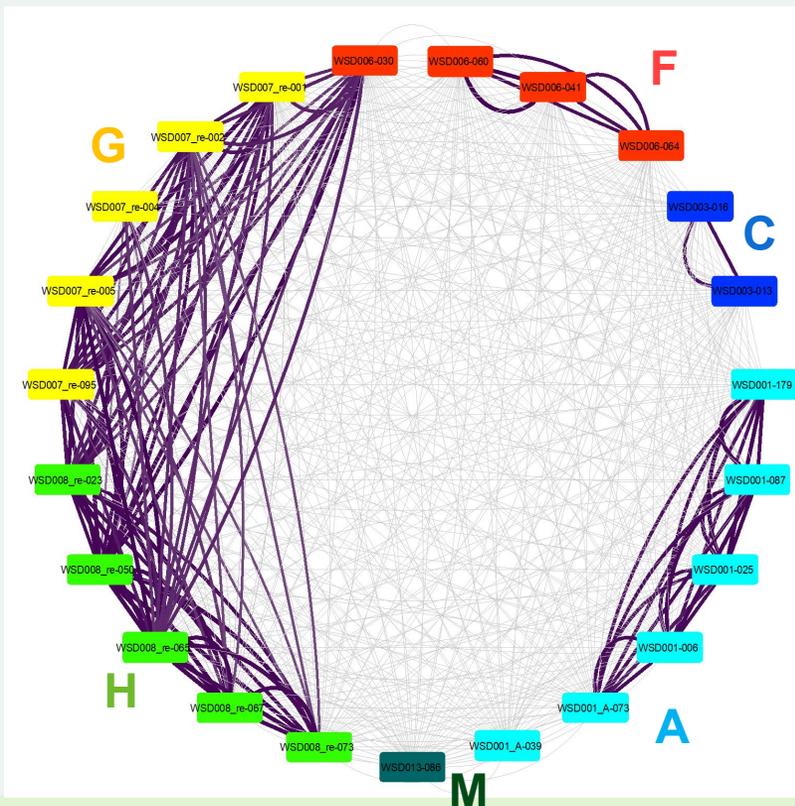
緑系: Actinobacteria
赤系: Bacteroidia
青系: Bacilli, Clostridia
茶系: Negativicutes
橙系: Vampirovibrionia
黒: 未対応

個々のMAGは一種(単一SAG)に対応している

MAGの多くが複数種の細菌由来の複合ゲノム?

細菌/遺伝子の伝搬の追跡にも利用の可能性

Hosokawa et al., in prep.

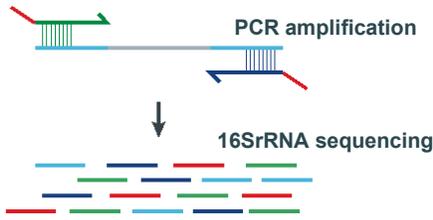
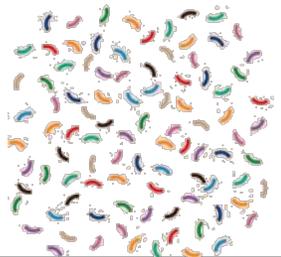
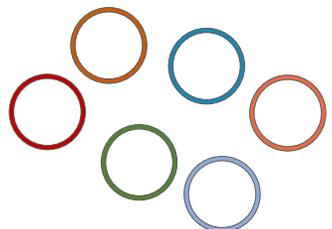


- ある細菌種では、家族間(3名 夫婦・親子)で同一株(>99.9%)を保有
- 他人とは明確に異なる家族特有の株?

- 同一細菌種の比較ゲノム解析
- 特定遺伝子上で規則的に出現する変異を発見

Our single-cell genomics deliver deeper insights in addition to existing outputs

Single-cell genomics can only explain who is doing what

	16S rRNA metagenomics	Shotgun metagenomics	Single-cell genomics (bitBiome)
Image			
Purpose	Microbiome composition	Composition & genome	Individual microbe function
Target	Partial 16S rRNA genes	Fragmented community genome	Individual genomes and plasmids
Length of sequence	400 base pairs (bp)	tens~tens of billions bp	millions~hundreds of millions × # of cells
Calculation effort	small	large	small
Microbial composition	○	○	○
Gene composition	✗	○	○
Linking taxa and function	✗	△	○
Strain variant analysis	✗	✗	○

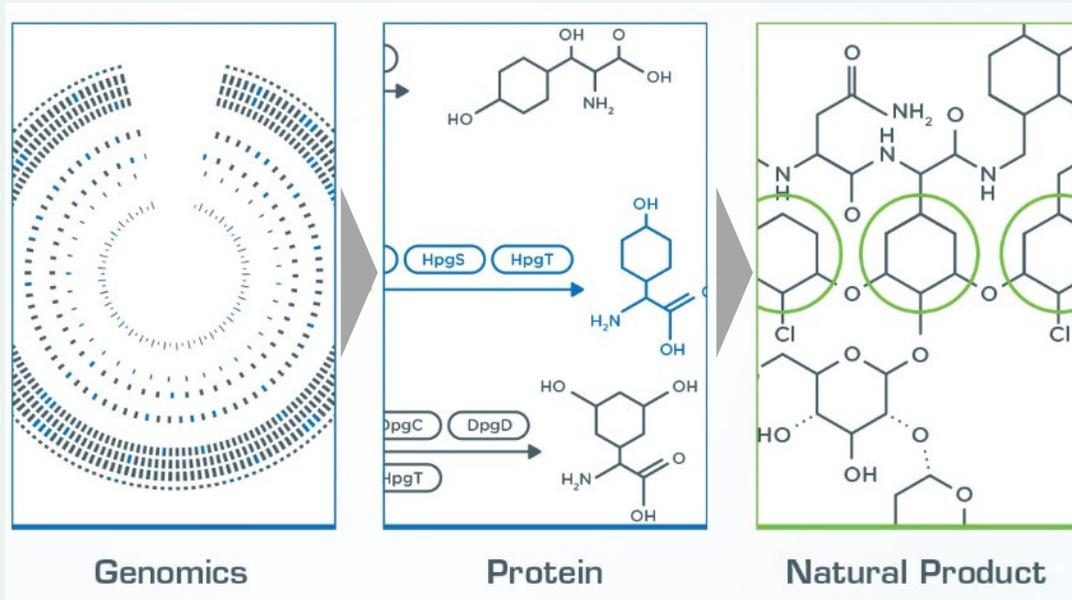
Why we focus on microbe "Genome"?

ゲノム解析コストが劇的に低下し、
生物の設計図(ゲノム)をおさえられる時代に

欧米では微生物ゲノムデータをもとに
革新的な製品を生み出す企業が続々登場

遺伝情報解読のコスト→10年前の10000分の1

遺伝情報(ゲノム)から 微生物の機能を 知り モノづくりをする時代



薬剤耐性菌に効く
新しい抗生物質



農作物の収穫を
増やす微生物農薬

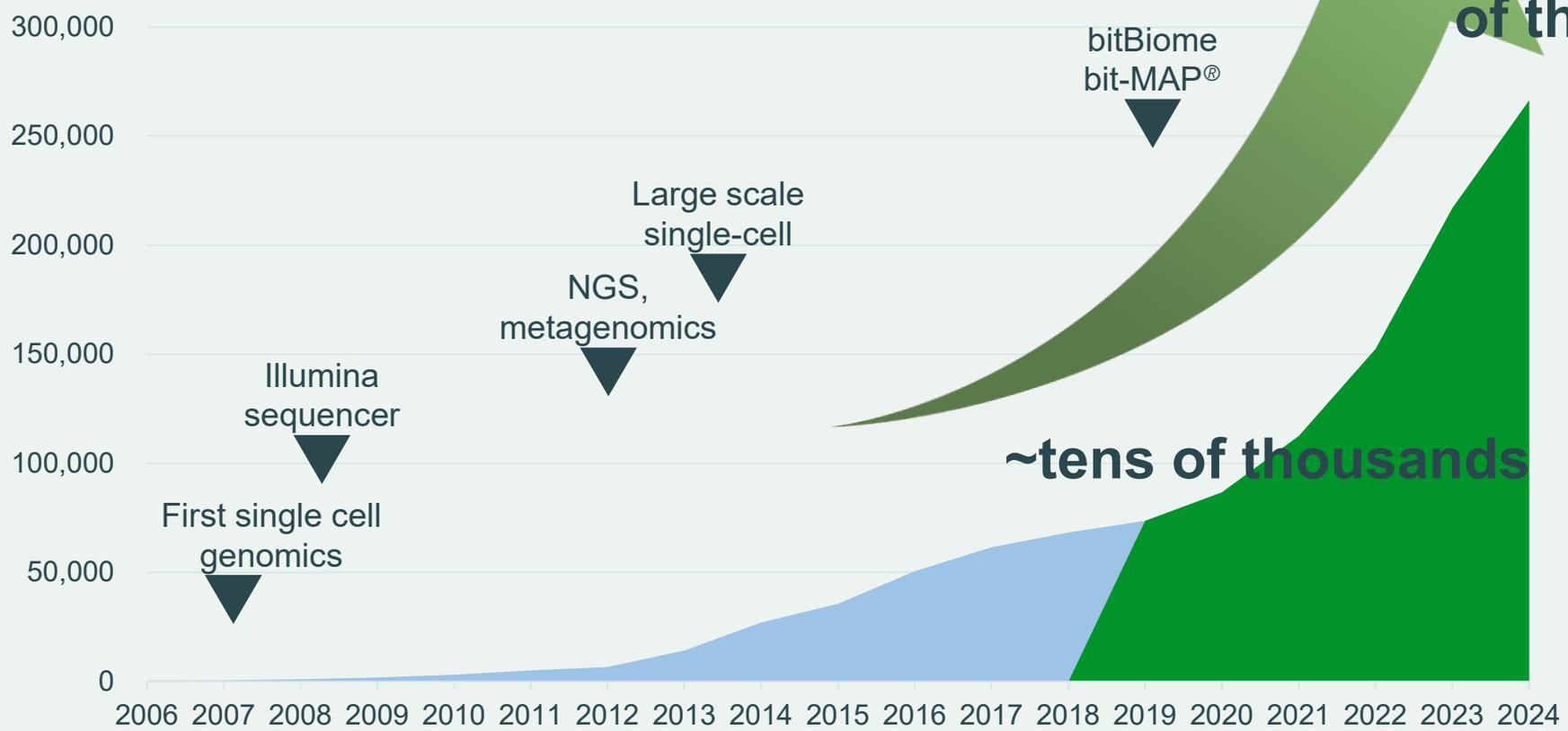


腸内疾患を治す
微生物による
新規薬剤



Microbe genomes in the database (cumulative)

of genome registered



~hundreds of thousands

~tens of thousands

With our platform, explosively accumulate microbe genomes in a few years

■ IMG-GOLD total (actual) ■ After bitBiome (estimate)



bitBiome