

# シングルセル遺伝子発現と クロマチン アクセシビリティの統合

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



## はじめに

シングルセル解析は、細胞型を区別し、動的な細胞状態を明らかにすることで、複雑な細胞集団の不均一性の解明に役立ちます。次世代シーケンサー（NGS）は、数百から数万の細胞についてシングルセル解像度でゲノム、トランスクリプトーム、エピゲノムまたはプロテオームを検証する革新的なアッセイを実現します。これらの相補的なメトリクスをマルチオームデータセットに統合することにより、細胞の表現型をより詳細に理解することができます。

多くのマルチオミクスアプローチは、別々の実験から得られたデータを結び付けるために、洗練されたアルゴリズムとモダリティ間の相関関係の推論に依存しています。<sup>1</sup>しかし、シングルセルシーケンスのワークフローでは、同じ細胞内の複数の細胞特徴を調べ、オリゴヌクレオチドバーコードを使用して結果を関連付けることにより、マルチオミクスを直接アッセイに組み込みます。

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

## プロトコルの概要

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

## サンプル調製

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

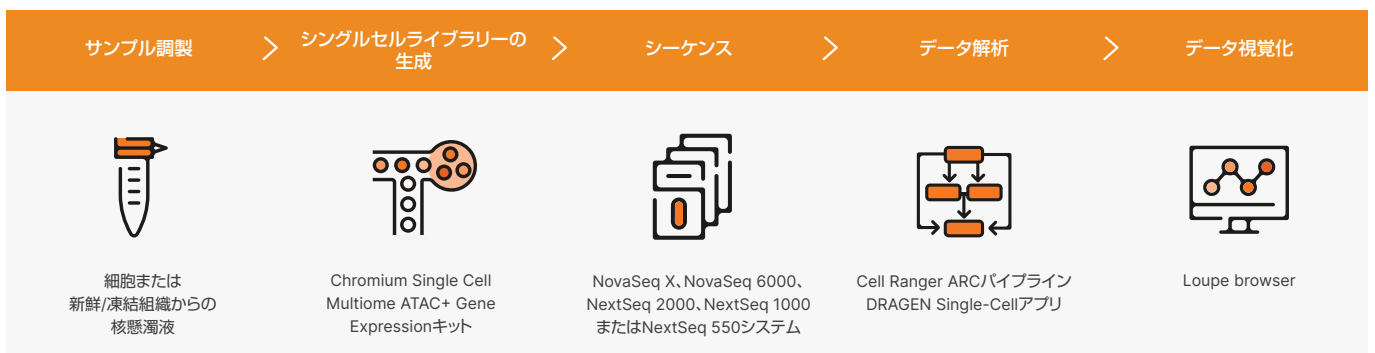


図1: シングルセルマルチオミクス実験のワークフロー：核懸濁液から開始し、その後ChromiumX/iXを用いたマイクロフルイデックスによるシングルセルの分画化およびバーコード付加に進みます。イルミナ装置で、2種類のマルチオームライブラリー（1つはシングルセルATAC-Seqライブラリー、もう1つはシングルセル遺伝子発現ライブラリー）をシーケンスします。Cell Ranger ARCまたはIllumina DRAGEN Single-Cellアプリ（BaseSpace™ Sequence Hub上で利用可能またはNextSeq 1000およびNextSeq 2000システムに内蔵）を使用してデータを解析します。Loupe Browserソフトウェアを使用してデータを視覚化します。

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

## シングルセルライブラリーの生成

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

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

この後、前増幅産物は、ATAC-Seqライブラリー構築用、および遺伝子発現ライブラリー構築のためのcDNA増幅用の両方のインプットとして使用します。<sup>3</sup> 得られたバーコード付きシングルセルマルチオーム遺伝子発現ライブラリーとATAC-Seqライブラリーは、これでイルミナNGSシーケンスシステムによるシーケンスが可能になります。

## イルミナ装置を用いたシーケンス

このアプリケーションに対して必要となるシーケンス出力に対処するには、ペアにしたマルチオームライブラリーをNovaSeq Xシステム、NovaSeq 6000システム、NextSeq 2000システム、NextSeq 1000システム、またはNextSeq 550システムでシーケンスすることが推奨されます (表1)。リード構成はライブラリーの種類によって異なります (表2、表3)。

マルチオームATAC-Seqライブラリーについては、PhiX添加の推奨値は1%です。この添加によって、適切なシーケンスの多様性を確保し、高品質なシーケンスに役立ちます。<sup>7</sup> 10x Genomicsサポートウェブサイトでは、シングルセルマルチオーム遺伝子発現ライブラリー<sup>8</sup> とシングルセルマルチオームATAC-Seqライブラリー<sup>9</sup> に対して期待されるシーケンスメトリクスが入手できます。

 詳細については、こちらをご覧ください：  
[Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression](#)

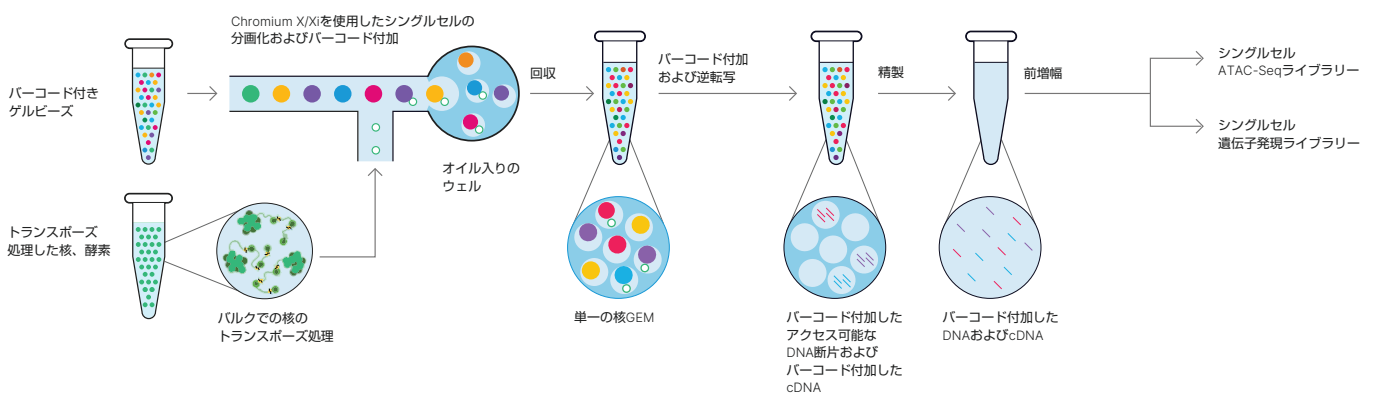


図2: 同一細胞からの3' 遺伝子発現ライブラリーとATAC-Seqライブラリーの生成: 単一核の懸濁液から開始し、トランスポーズ処理はバルクで実施し、その後個々の核はGEMにキャプチャーされます。GEMではDNA断片とmRNAの3' 末端にバーコードを付加します。GEMを壊してプールの断片を回収し、精製、前増幅、およびライブラリー構築を実施します。これにより、各サンプルから2種類の補完的なライブラリーが生成され、遺伝子発現およびオープンクロマチンのプロファイルを同一細胞に確実に関連付けることができます。<sup>2</sup>

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

ライブラリーの種類	核あたりの最小リードペア数 <sup>a</sup>	サンプルあたりの核	ランあたりのサンプル数								
			NextSeq 2000 <sup>d</sup>			NovaSeq 6000			NovaSeq X		
			P2 <sup>e</sup>	P3	SP	S1	S2	S4	1.5B	10B	25B
マルチオーム3'遺伝子発現	20,000 <sup>b</sup>	5,000	4	11	8	16	40	100 <sup>f</sup>	15	100	250
マルチオームATAC-Seq	25,000 <sup>b,c</sup>	5,000	4	8	6	12	32	80	12	80	200

- a. 最小リード数は10x Genomicsから提供された推奨値です。<sup>7</sup>
- b. 必要なパフォーマンスまたはアプリケーションに合わせてシーケンス深度を調整してください。Cell Ranger ARCのランサマリーのシーケンス飽和メトリクスと曲線を使用して、特定のサンプルタイプについてシーケンス深度を最適化することができます。
- c. 個別リード50,000。リード1から25,000、リード2から25,000。
- d. NextSeq 550システムでは、マルチオーム3'遺伝子発現の場合はランあたり4サンプル、マルチオームATAC-Seqライブラリーの場合はランあたり3サンプル。
- e. 同一サンプルスルーットを用いたP2フローセルは、NextSeq 1000システムでも使用可能です。
- f. 100サンプルをロードするには個別レーンのローディングが必要です。

表2: Chromium Single Cell Multiomeライブラリーの推奨リード構成

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

- a. 短い転写産物リードは、トランスクリプトームアライメント率の低下につながる可能性があります。細胞バーコード、分子バーコード (UMI) およびサンプルインデックスリードは示した値よりも短い値にしないでください。すべてのリードは推奨値よりも長くしても問題ありません。Cell Ranger ARCは、細胞バーコードまたはUMIリードの追加塩基を自動的に無視します。
- b. シーケンス長は使用するシーケンスキットに応じて調整できますが、30 bpよりも短くならないようにしてください。
- c. NextSeq 550システムなどの、24-bp i5インデックスリードに対応しないシーケンスシステムはカスタムレシピが必要です。<sup>10</sup>

表3: イルミナシーケンスシステムでのChromium Single Cell Multiomeアッセイの解析オプション

システム	カスタムレシピの必要性	FASTQ生成オプション	マルチオーム解析オプション
NextSeq 500およびNextSeq 550システム	必要 (マルチオームATAC-Seqライブラリー) 不要 (マルチオーム3' 遺伝子発現ライブラリー)	装置搭載 bcl2fastq bcl-convert Cell Ranger ARC mkfastq	Cell Ranger ARC DRAGEN Single-Cellアプリ
NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム	不要	装置搭載 bcl2fastq bcl-convert Cell Ranger ARC mkfastq	Cell Ranger ARC DRAGEN Single-Cellアプリ
NovaSeq 6000システム	不要	bcl2fastq bcl-convert Cell Ranger ARC mkfastq	Cell Ranger ARC DRAGEN Single-Cellアプリ
NovaSeq Xシリーズ <sup>a</sup>	不要	bcl2fastq bcl-convert	Cell Ranger ARC DRAGEN Single-Cellアプリ

- a. NovaSeq Xシリーズで生成されたシーケンスデータは、イルミナデマルチプレックスパイプライン (bcl2fastqまたはbcl-convert) を使用してFASTQファイルに変換されます。

## データの解析および視覚化

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

また、Cell Ranger ARCソフトウェアは、同様のプロファイルを用いて細胞のクラスターも同定します。解析パイプラインの出力には、QC情報<sup>1</sup>、およびLoupe Browser視覚化ソフトウェア (10x Genomics) またはサードパーティのRツールまたはPythonツールによる詳細な解析に使用できるファイルが含まれます。

また、イルミナのDRAGEN Single-Cellアプリ (クラウド、オンプレミスサーバー、またはNextSeq 1000システムおよびNextSeq2000システムのオンボードで利用可能) は、シングルセルのマルチオミクスデータを解析するためのツールも提供します。このパワフルな解析パイプラインは、品質管理メトリクスと、Scanpy、AnnData、Seuratなどの定評のあるシングルセル解析ツールと互換性のある細胞ごとの遺伝子発現マトリクスを出力します。

## データの特長

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

## 専門家のサポートにアクセス

イルミナと10x Genomicsのテクニカルサポートチームは、Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionワークフロー全体を通してサポートします。アッセイおよび解析に関するご質問は10x Genomicsサポート ([support@10xgenomics.com](mailto:support@10xgenomics.com))、シーケンスに関するご質問はイルミナサポート ([techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)) にお問い合わせください。これらのチームでは、より複雑な問題にも共同で対応しています。

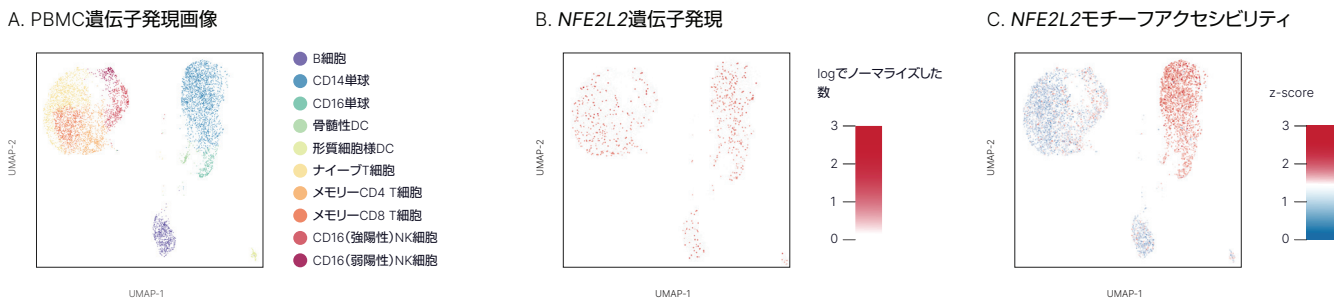


図3: 遺伝子発現およびクロマチン状態に対する補完的なシングルセルデータ: 健康人のPBMCから抽出した核をChromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expressionで処理し、ライブラリーをNovaSeq 6000システムでシーケンスしました。(A) 遺伝子発現データを用いた7,273個の核のクラスター解析: 細胞集団は、確立されたマーカー遺伝子に基づいてアノテーションを実施されました。(B) 転写因子NFE2L2の発現はすべての細胞型で観察されました。(C) ただし、同一細胞のATAC-Seqから得られたNFE2L2モチーフのアクセシビリティは単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

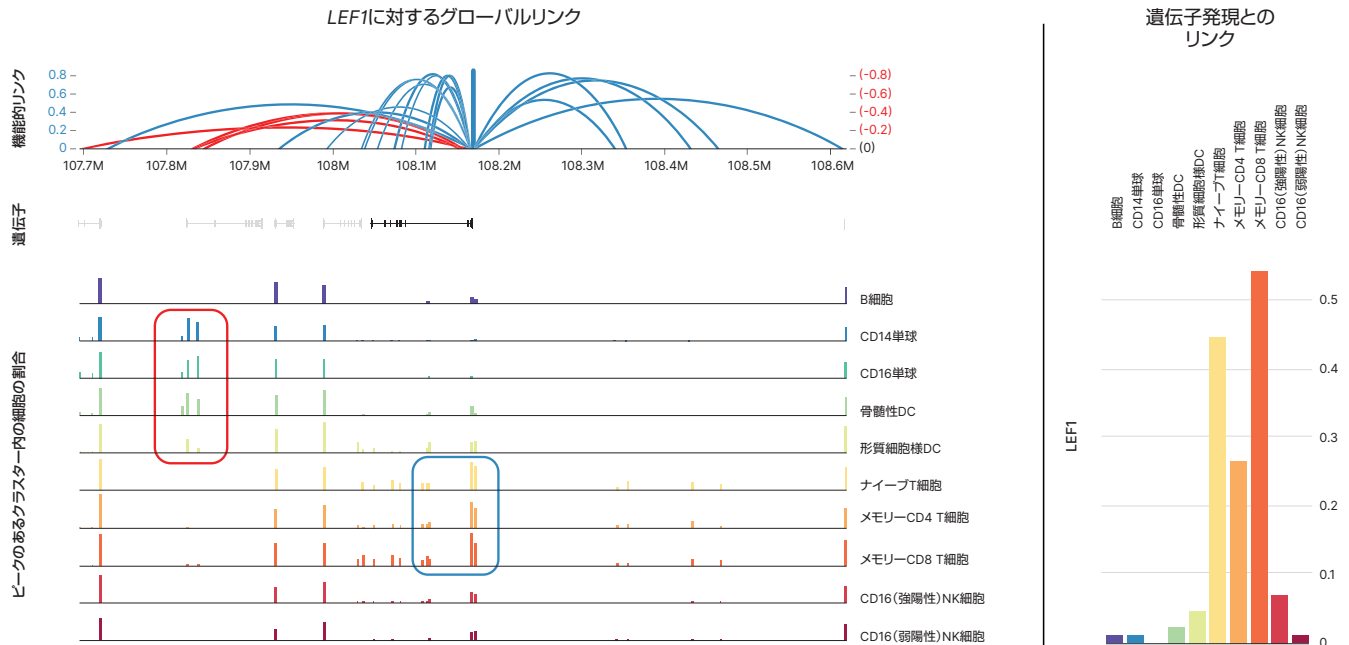


図4：目的の遺伝子に直接関連する推定制御エレメントの同定：LEF1に対するグローバルリンクは、図3で認められた7,273個の同一のPBMC核について、1 Mbの範囲内でLEF1遺伝子発現と相関（青色の弧）または逆相関（赤色の弧）するオープンクロマチンピークを示しています。LEF1発現レベルおよびオープンクロマチンピークは細胞型別に色分けされています。LEF1の細胞型特異的発現は、LEF1プロモーター近傍の関連するオープンクロマチン領域と相関し、ナイーブおよびメモリーT細胞で特に豊富に認められます（青色の囲み）。単球や骨髄樹状細胞などのLEF1発現の低い細胞は、数百キロベース離れたオープンクロマ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

## まとめ

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

## 詳細はこちら

[シングルセルシーケンス](#)

[Chromium Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression](#)

『NovaSeq X シリーズによる 高精度の次世代シーケンス』

## 参考文献

1. Stuart T, Butler A, Hoffman P, et al. [Comprehensive Integration of Single-Cell Data](#). *Cell*. 2019;177(7):1888-1902.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.05.031
2. 10x Genomics. [Simultaneous profiling of the transcriptome and epigenome from the same cell](#). Accessed October 25, 2023.
3. 10x Genomics. Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Support. [support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex](#). Accessed October 25, 2023.
4. 10x Genomics. Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Sample Prep Demonstrated Protocols. [support.10xgenomics.com/single-cell-multiome-atac-gex/sample-prep](#). Accessed October 25, 2023.
5. Buenrostro J, Wu B, Chang H, Greenleaf W. [ATAC-seq: a method for assaying chromatin accessibility genome-wide](#). *Curr Protoc Mol Biol*. 2015;109:21.29.1-21.29-9. doi:10.1002/0471142727.mb2129s109
6. 10x Genomics. [Specifying Input FASTQ Files for cellranger-arc count](#). Accessed October 10, 2023.
7. 10x Genomics. [Sequencing Requirements for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression](#). Accessed October 10, 2023.
8. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell 3' v3.1 Dual Index Libraries](#). Accessed October 25, 2023.
9. 10x Genomics. [Sequencing Metrics & Base Composition of Single Cell Multiome ATAC Libraries](#). Accessed October 10, 2023.
10. 10x Genomics. [Why do I need a custom recipe when sequencing Multiome ATAC libraries on the NextSeq?](#) Accessed October 25, 2021.
11. 10x Genomics. [Interpreting Cell Ranger ARC Web Summary Files for Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression Assay](#). Accessed October 25, 2023.

## 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](https://www.facebook.com/illuminakk)

販売店

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

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。  
商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](https://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。  
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。