

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 補助事業名：創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業）
2. 補助事業課題名：創薬支援のための大規模シーケンスによるゲノミクス解析支援と高度化
3. 研究開発代表者：国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター センター長 渡辺 恭良
4. 研究開発の成果

本事業は、ゲノミクス解析支援とその解析技術の高度化を目的としている。一般から公募した創薬研究のゲノミクス解析と領域 B の高度化の 2 つを支援している。支援と高度化の比率は 7 対 3 で、支援が主要な活動である。機能ゲノミクス領域 A 代表機関は、支援利用公募の事務局としての機能も担っており、全体の 10% 程度の労力を割いている。

4-1) 支援利用公募事務

当事業の機能ゲノミクス領域ホームページ原稿，利用申請用紙等の支援を利用してもらうための資料を作成した。公募時には、支援の受付，審査委員への審査依頼，審査結果の集計，採否通知などを行なった。平成 26 年度は 97 件の応募があり，75 件を採択した。平成 27 年度は，応募 101 件，採択 40 件であった。各年度において支援した研究分野をグラフに示した。両年度とも疾患と創薬関係の研究支援が 70% 以上であった。なお，本支援数は，領域 A，領域 B を合わせた数である。

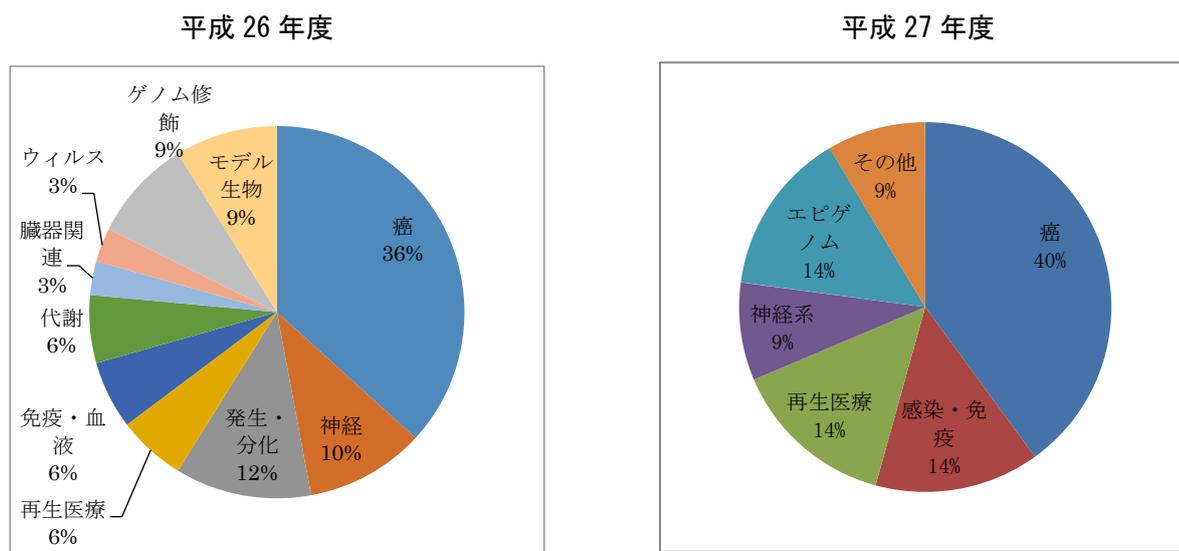


図 1. 年度ごとの支援研究分野

4-2) 支援の成果

領域 A 代表機関は分担機関である国立遺伝学研究所（遺伝研）と協力してゲノミクス解析支援を提供している。代表機関は，利用者からサンプルを受け取り，ライブラリを調製し，塩基配列を読むところまでを実施する。このデータを遺伝研が解析して，初めて利用者にとっての支援完了となる。利用者希望者との事前相談は，代表機関単独で行う場合，分担機関と共同で行う場合がある。以下に記す支援実績は，当代表機関が行なったシーケンス完了までの実績である。特別支援は 27 年度から実施した支援で，他の PDIS 拠点と共同で利用者を支援するのもである。

表 1. 年度ごとの支援件数と塩基数

年度	一般公募	領域 B 高度化	特別支援	合計
26 年度	61	15	0	76
27 年度	29	21	1	51
合計	90	36	1	127

4-3) 高度化の成果

以下に述べるゲノミクス解析技術の高度化を行なってきた。

4-3-1) 微量 RNA-seq ライブラリ調製法の開発

total RNA 数 ng からライブラリ調製を可能とする微量 RNA-seq ライブラリ調製法と平行して微量 RNA 品質評価方法を開発した。品質評価は、利用者から提供される total RNA の純度、分解度、量を調べて、そのサンプルが解析可能かどうかを判断する重要な評価である。イルミナ社の TruSeq RNA-seq サンプル調製キットをもとに領域 B 二階堂研究室からの助言を頂き、total RNA 2 ng からの RNA-seq ライブラリ調製法を開発した。total RNA 10 ng を提供頂けば、微量 RNA 品質評価法でチェックし、ライブラリ調製、シーケンスまで支援出来る。本法の開発に引き続き、3' 末端に polyA 鎖を持たない RNA を含めた微量トランスクリプトーム解析法を開発を行なった。大量に存在する rRNA の除去が鍵となる。NEB 社製 rRNA 除去キットが、微量 RNA にも適用できる事を見出し、total RNA 2 ng からの微量トランスクリプトーム解析用ライブラリ調製法を確立した。本手法でも先に述べた微量 RNA 品質評価法を使って、提供された total RNA を調べる。Poly A を利用した rRNA 除去方法で作製したライブラリに比べ(図2 Oligo dT), 検出される ncRNA に分類されるトランスクリプト (図2 NEB_rRD の protein_coding 以外のトランスクリプト) の種類が約 2 倍になった (図 2)。

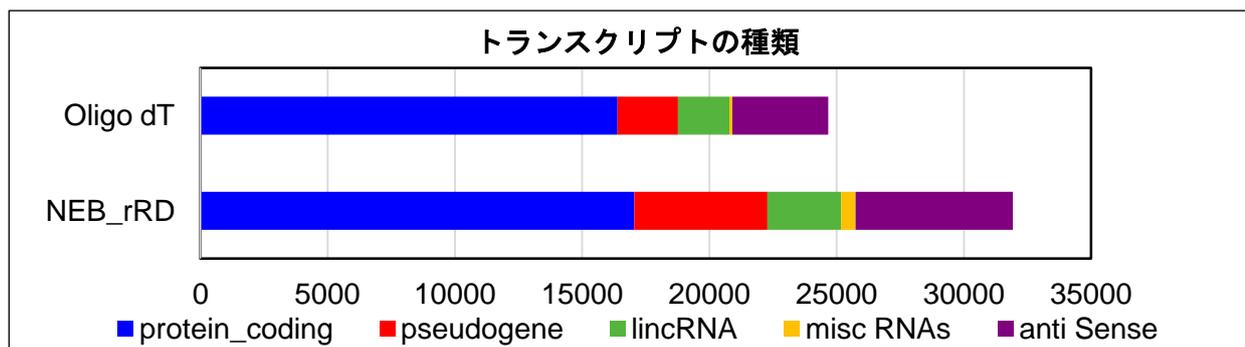


図 2. 検出されたトランスクリプトの種類。

4-3-2) 自動微量非増幅 CAGE の導入

開発を進めていたプロトコルで調製した CAGE ライブラリに GC バイアスの問題が発生し、開発計画全体の見直しとなった。このため、大幅に遅れている。一方、プロトコル完成後の自動化に向けてロボットの準備を進めている。現状のプロトコルで CAGE ライブラリを調製出来ることを確認した。

4-3-3) 濃縮 BS-seq の導入

領域 B の伊藤研究室で開発している CpG 領域を濃縮して少ないシーケンス量で解析できる手法を導入中。出発 DNA 3 ug の濃縮 BS-seq の導入は、完了した。DNA 100ng からの微量濃縮 BS-seq は、再現性が悪かったため、導入を見送った。今後検討する。

4-4-4) 超微量 RNA-seq ライブラリ調製法の評価

1細胞から100細胞以下を対象とした超微量 RNA-seq ライブラリ調整法、すなわち市販されている Ovation, SMARTer V3, 同 V4 の 3 種類の市販キットを評価した。また SMARTer V4 と タグメンテーション法を組み合わせることで RCR 重複が 2 以下に抑える事に成功した。しかしながら、超微量 total RNA 100 pg 以下では極めて再現性が悪く、支援へ提供できるレベルではないと判断した。