

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金
(創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業) 補助事業成果報告書

I. 基本情報

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）
Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research
(Platform for Drug discovery, Informatics, and Structural life science)

補助事業課題名：（日本語）超微量 RNA シーケンス技術の支援と高度化
（英 語）Development of a novel single-cell RNA-sequencing

補助事業担当者 （日本語）理化学研究所情報基盤センターバイオインフォマティクス研究開発ユニット ユニットリーダー 二階堂愛

所属 役職 氏名：（英 語）Itoshi Nikaido, Unit Leader, Bioinformatics Research Unit,
Advanced Center for Computer and Communication, RIKEN

実施期間：平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

本課題では、超微量 RNA-seq 法の開発と支援を実施した。本課題では 3 つの研究開発を行った。まず、高精度・高再現性を誇る 1 細胞 RNA-sequencing 法である Quartz-Seq (Sasagawa Y. and Nikaido I. et al. 2013)を用いて支援を実施した。支援を実施する上で、実験の再現性とスループットをより向上させるために、96 ウェルプレートフォーマットでの実験、分注ロボットによる分注や DNA 精製の自動化、96 ウェルフォーマットでの cDNA、DNA ライブラリのクオリティチェック装置などを導入した。また、DNA シーケンスライブラリを簡便に作製するため、Tn5 トランスポゼースを利用したライブラリ作製法を導入した。その結果、Quartz-Seq の性能を保ったまま、スループットが向上し Quartz-Seq Next の開発に成功した。これを用いて数十の支援を実施した。

高度化では、1 細胞由来 RNA を漏れなく cDNA に変換し、検出できる遺伝子数をさらに向上させるため、新しい逆転写・核酸増幅法 RT-RamDA 法を開発した(WO2016052619,

Hayashi T. et al. submitted). この方法を応用し、新しい 1 細胞 RNA-sequencing 法である RamDA-seq の開発を行った(Hayashi T. and Ozaki H. et al. submitted)。その結果、Quartz-Seq を含む、既存のどの 1 細胞 RNA-sequencing 法と比較しても、検出できる遺伝子数の大幅な向上を達成した。また、ほかの方法と比較し、RNA 全長にリードが被覆することを確認できた。また非ポリ A RNA の検出にも成功した。この RamDA-seq 法を 96 ウェルプレートフォーマットで実施できるようにし、一部のステップを自動分注ロボットにより自動化した。これにより、350 細胞を 3-4 日程度で実施できるようになった。RamDA-seq が計画より早く完成したため、計画を前倒しし、RamDA-seq を用いて、6 件程度の支援を実施した。

Quartz-Seq Next や RamDA-seq のデータを解析するために、データ解析パイプラインを実装した。このデータパイプラインは、ウェブブラウザ上から実行できるよう Galaxy 上に実装した。これらが誰でも簡単に、パソコンやクラウドコンピュータで実行できるように仮想計算機イメージとして実装し、公開した(Bayes Linux)。さらに、遺伝子セット解析、1 細胞 RNA-seq データからの転写制御ネットワーク予測などの新しいデータ解析アルゴリズムやデータベースを実装した(Tsuyuzaki K. et al. 2015, Matumoto T. et al. 2017)。

英文

The project aimed to develop and providing a novel single-cell RNA-sequencing method. We set three research targets for this program. First one is an improvement of Quartz-Seq which highly reproducible and sensitive single-cell RNA-sequencing method (Sasagawa Y. and Nikaido I. et al. 2013). To increase the throughput of single-cell RNA-sequencing, we used 96 well plate, and auto liquid handling robots to carry out whole transcript amplification using Quartz-Seq, so-called Quartz-Seq Next. Besides, we adopted a simplistic approach which makes DNA sequencing library from cDNA using Tn5 transposase. We finally provided experiments of Quartz-Seq Next to over ten research groups in this program.

To reduce a loss of capturing RNA molecules and improve a number of detected genes in single-cell RNA-sequencing, we developed a novel method for reverse transcription and amplification of cDNA, so-called RT-RamDA (WO2016052619, Hayashi T. et al. submitted). We adopted RT-RamDA to a novel single-cell RNA-sequencing. As a result, the novel single-cell RNA-sequencing method, so-called RamDA-seq outperforms other single-cell RNA-sequencing method including Quartz-Seq (Hayashi T. and Ozaki H. et al. submitted). In particular, the method remarkably improves a number of detected genes and read coverage in each transcript. We demonstrated that RamDA-seq could detect non-polyA RNAs. We also implemented the method to provide various research group in the program. The method can provide 350 cells per 3-4 days using 96 well plate and auto liquid handling robot. In this program, we provided experiment of a novel single-cell RNA-sequencing to six research groups.

To carry out reproducible data analysis of single-cell RNA-sequencing, we implemented Bayes Linux which include data analysis pipeline of RNA-sequencing and data pipeline management system (Galaxy). Bayes Linux can be easily run any personal computer and cloud computer system. The data analysis pipeline for single-cell RNA-sequencing can be performed on general Web browser without a knowledge of command line operations. The Bayes Linux is opened to the public via the web (<http://bit.riken.jp/software/bayes-linux>).

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 3 件）

国際誌

1. Matsumoto H, Kiryu H, Furusawa C, Ko MSH, Ko SBH, Gouda N, **Hayashi T**, Nikaido I. SCODE: An efficient regulatory network inference algorithm from single-cell RNA-Seq during differentiation. *Bioinformatics*. 2017.
2. G. Morota, F. Peñagaricano, J. L. Petersen, D. C. Ciobanu, **K. Tsuyuzaki** and I. Nikaido. An application of MeSH enrichment analysis in livestock. *Animal Genetics*. 2015.
3. Koki Tsuyuzaki, Gota Morota, Takeru Nakazato, Satoru Miyazaki and Itoshi Nikaido. MeSH ORA framework: R/Bioconductor packages to support MeSH over-representation analysis. *BMC Bioinformatics*. 2015, 16:45.

国内誌

4. 二階堂愛. 細胞状態ゆらぎを全遺伝子レベルで捉える 1 細胞遺伝子発現解析法. *生物物理*. 56:6. 2016/11/15.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

国際会議 (招待講演)

1. Itoshi NIKAIDO. Disassembling regionalization of neuroectoderm by single-cell transcriptome analysis. International Conference on Single Cell Research 2016. Tokyo. 16-17th November, 2016. 国内.
2. Itoshi NIKAIDO. A highly quantitative single-cell transcriptome method for realization of effective regenerative medicine. 2nd Kumamoto IRCMS Symposium. Kumamoto. October 31 - November 2, 2016. 国内
3. Itoshi Nikaido. On the origin of cellular heterogeneity. QBiC Symposium 2015, August 24 - 26, 2015. 国内.

4. Yohei Sasagawa, Tetsutaro Hayashi, Masashi Ebisawa and Itoshi Nikaido. Single-cell RNA sequencing methods ～Quartz-Seq and next technology～ Expanding Frontiers of genome Science II, International Symposium on Genome Science 2015. 国内.
5. Itoshi NIKAIDO. Quartz-Seq: An extremely reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method. 2nd UK-JAPAN Workshop on Neural Epigenetics. London UK. 15-17 December 2014. 国外.

国際会議 (ポスター)

1. Yoshitsugu Sakai, Shinoda Masataka, Deena Soni, Masashi Ebisawa, Hiroki Danno, Tetsutaro Hayashi, Yohei Sasagawa, Itoshi Nikaido. High throughput single cell gene expression analysis using SH800Z cell sorter. June 26-30. 2015. CYTO2015. UK. 国外.
2. Haruka Ozaki and Itoshi Nikaido. ATAC2NET: A pipeline for reconstructing gene regulatory network based on ATAC-Seq data. 15th European Conference on Computational Biology (ECCB 2016). World Forum Convention Center in The Hague, The Netherlands. 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 移植細胞に含まれる亜集団を同定する 1 細胞 RNA-seq 法. SONY ライフサイエンス学術セミナー. 二階堂愛. 東京. 2016/7/23. 国内
2. 細胞集団の不均質性を高精度計測する RNA シーケンス技術. 二階堂愛, PDIS 最先端セミナー. 創薬につなぐ日本の創薬基盤技術 -構造生物学とゲノム科学の最前線はここまで来た- 東京. 2015/02/04. 国内.
3. iPS・分化細胞集団の不均質性を 1 細胞・全遺伝子解像度で高速に測定する技術の開発. 二階堂愛. 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 平成 26 年度公開シンポジウム. 2015/01/21. 東京. 国内.

(4) 特許出願

WO2016052619 「核酸の増幅法」