

## 平成22年度 セルイノベーション 公開セミナー開催



2010年11月3日、TEPIAホール(東京都港区)で平成22年度セルイノベーション公開セミナー「次世代シーケンサーの急速な発展と生命科学への活用」が開催されました。本プログラムのシーケンス拠点とデータ解析拠点の活動状況、一部の先導研究の成果が報告され、2人のゲストの講演が行われました。

講演では、次世代シーケンス技術の最先端の状況とライフサイエンス研究の動向が示され、会場を埋めた聴衆と講演者の間で、「新しい技術が次々と現れる中、それを

研究に活かすにはどうするか」、「シーケンサーをめぐる世界の動向に対し、日本はどうあるべきか」など、活発な議論も繰り広げられました。

充実した内容だったことを反映してか、終了後は、「シーケンサーの重要性を強く感じた」(大学院生)、「みんなで力をあわせて、シーケンス拠点を発展させたい」(民間企業研究者)などの感想が聞かれました。

### ※ 当日のプログラム

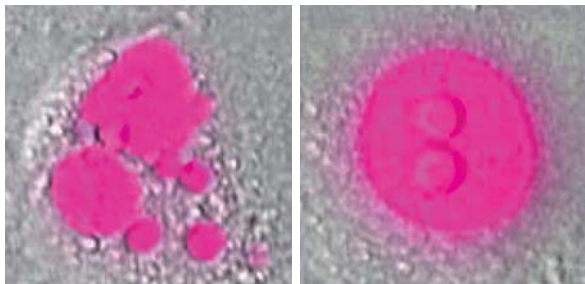
13:00   13:05	開会挨拶 石井康彦(文部科学省 研究振興局ライフサイエンス課長)	15:10   15:40	 メディカルゲノムサイエンスの展望 辻 省次(東京大学)
13:05   13:20	 次世代シーケンサーを用いた 細胞機能解析のプラットフォーム 山本 雅(プログラムオフィサー)	15:40   16:10	 生殖細胞の性分化制御機構の解析 相賀裕美子(国立遺伝学研究所)
13:20   13:50	 最先端研究によって支えられる 次世代シーケンス拠点 林崎良英(理化学研究所)	16:10   16:40	 エピゲノムを探る: 次世代シーケンサーによる メチローム解析 伊藤隆司(東京大学)
13:50   14:20	 セルイノベーションにおける データ解析と拠点の役割 池尾一穂(国立遺伝学研究所)	16:40   17:10	 次世代シーケンサーでかわる 医学生物学 菅野純夫(プログラムオフィサー)
14:20   14:50	 システム生物学的アプローチによる 合目的ネットワーク 数理解析法の開発 堀本勝久(産業技術総合研究所)	17:10   17:15	閉会挨拶 山本 雅(プログラムオフィサー)

### Contents

- p.1 平成22年度 セルイノベーション公開セミナー開催
- p.2 先導研究課題B紹介: 宮脇敦史・相賀裕美子
- p.3 先導研究課題B紹介: 伊藤隆司 用語解説
- p.4 トピックス

## 細胞個別的シーケンス解析のための 光学的サンプリング技術の開発

遺伝子の解析は、多くの細胞の集団を用いて行うのが一般的です。しかし、遺伝的に同じ細胞種でも、細胞周期やストレスなどの状態は個々の細胞で様々です。状態の違う細胞を集団で扱っていると、ある状態の細胞が示す際だった特徴が薄まって見えなくなってしまう。そこで私たちは、状態が異なる細胞を色分けす



NMuMG細胞(良性のがん細胞)。中濃度の抗がん剤で核が分断化する(左)が、高濃度では核DNA量を増やして生き延びる(右)。

る技術を開発しています。

すでに、細胞周期の進行を色の変化で示す蛍光プローブの開発に成功しています。これを用いてHeLa細胞を細胞周期の7つの段階に分け、各分画のCAGE解析をデータ解析拠点にお願いしました。解析が進めば、細胞周期の進行に伴って起こる遺伝子発現の変化が明らかになることでしょう。

一方、このプローブの基本型であるFucciというプローブを用いて、抗



理化学研究所  
脳科学総合研究センター

宮脇敦史

Atsushi  
Miyawaki

がん剤に対する細胞の応答を詳細に解析したところ、興味深い結果が得られました。中濃度の抗がん剤では、細胞は細胞質分裂後に核が分断化して死に向かうのですが、高濃度では、細胞質分裂をスキップして核DNA量を倍加させ元気に生き延びるのです。このような違いが生じる機構に迫るため、様々な濃度の抗がん剤に曝した細胞集団から、特徴的な状態にある細胞を集めて遺伝子発現を調べることを計画しています。

このほかに、酸化ストレスやオートファジーの状態を色分けするプローブの開発にも取り組んでいます。こうした技術を広く普及することで、次世代シーケンシングの有効性をいっそう高めることに貢献できればと思います。

## 生殖細胞及び精子幹細胞の 発生分化機構

生殖細胞は、個体発生の初期に作られる始原生殖細胞から分化し、雄の体内では精子に、雌の体内では卵子になります。しかし、この運命を決めるシグナルはまだ完全には理解されていません。

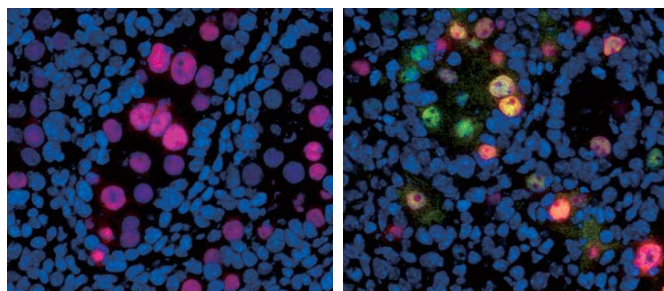
私たちは以前に、Nanos2というタンパク質が生殖細胞をオス化するのに重要な働きをしていることを突き止めました。そこで、本プログラムでは、Nanos2がどのようなメカニズムで遺伝子の発現変化を引き起こすのかを明らかにするために、以下の3つの方法で調べています。

1) Nanos2をノックアウトしたマウスと野生型マウスの遺伝子発現を比較するため、シーケンス拠点にRNA-seqをお願いしました。現在、生殖細胞由来のシ

ーケンスを得て解析を進めています。

2) Nanos2が遺伝子の発現制御に関連するヒストンH3K4のメチル化を引き起こすことがわかったため、メチル化したヒストンが結合しているDNAの配列をChIP-seqで調べています。1匹のマウスからは2万個程度しか生殖細胞が得られませんが、セルソーターで生殖細胞を純化する技術を利用し、70万個を集めた後ChIPを

野生型マウス(左)とNanos2ノックアウトマウス(右)の胎児精巣の断面写真。ノックアウトマウスの精巣の生殖細胞(赤)は雌のマーカー遺伝子(緑)を発現している。



国立遺伝学研究所  
系統生物研究センター

相賀裕美子

Yumiko  
Saga

行い、得られた約10ngのDNAのシーケンスを白髭克彦先生(先導研究課題A)にお願いしています。

3) Nanos2結合RNAを解析するRNA-IP-seqを行う予定です。これは、ごく少量のRNAからの解析になるため、まずは少量のRNAを用いた解析法を確立し、その後解析に入ります。

# 細胞解析研究革新のための 高性能エピゲノムシーケンス 技術の開発



東京大学  
大学院理学系研究科

伊藤隆司

Takashi Ito

私たちは、DNAのメチル化部位を単一塩基解像度で明らかにするバイサルファイトショットガンシーケンス (BSS) 法を開発し、その有効性を実証してきましたが、本プログラムでは、これを1000倍以上も高感度化することに成功しました。

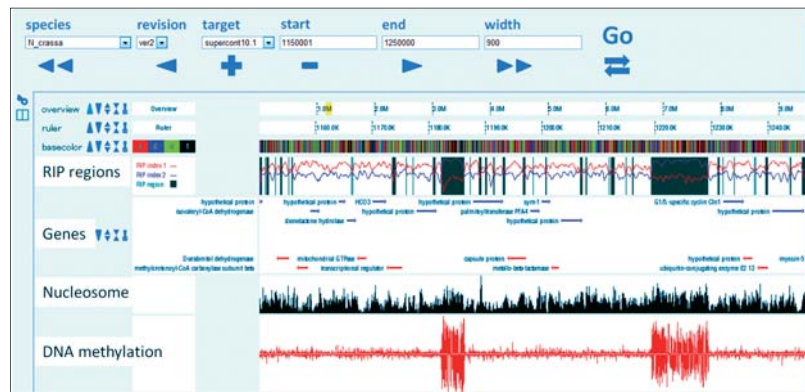
カギは、処理の順序を変えたことです。従来は、DNAを断片化し、配列決定に必要なアダプターを両端に付加してから、バイサルファイト処理を行っていました。しかし、せっかくアダプターを付加したDNA断片が、バイサルファイト処理によって切れてしまうことがあり、その配列は決定されないという問題がありました。試料減少を補うためにPCRを行うと、残った断片だけが増幅されるのでバイアスがかかってしまいます。そこで、最初にバイサルファイト処理を行い、同時に断片化を行うことにしました。その後でアダプターを付加すれ

ば、すべてのDNA断片の配列が決定されるはずでした。

さらに、従来はアダプターを付加する反応が難しく、この段階でも試料がむだになっていました。これに対しては、ランダム配列を利用して効率的にアダプターを付加する方法を開発しました。

こうして、数 $\mu$ gのDNAが必要だっ

たBSS法を、1ngのDNAからでもPCRなしで行えるようになりました。1ngのDNAはヒトの細胞150個に相当するので、多くの数を得にくい発生初期の細胞などにも適用できます。また、私たちのアダプター付加法はBSS法以外にも使えるので、様々な解析法の高感度化への応用も進めています。



BSSデータのブラウザ画面

## 用語解説

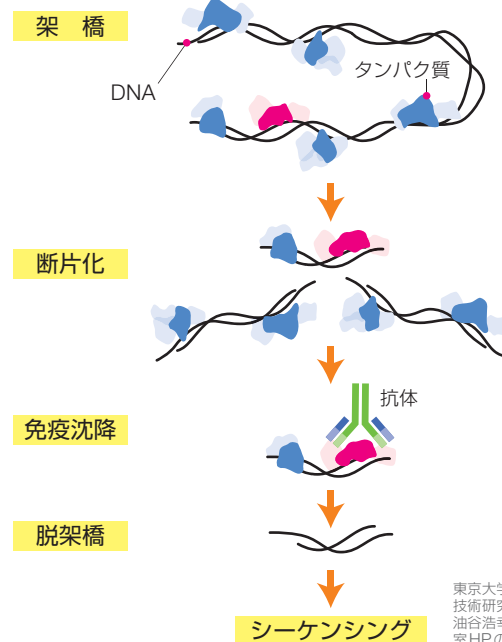
### ChIP-seq (ちっぷせつく)

クロマチン免疫沈降-シーケンシング解析のこと。英語の *chromatin immunoprecipitation-sequencing* を略したものです。

細胞内では、DNAにヒストンや転写因子など、様々なタンパク質が結合し、DNAの機能を調節しています。このため、あるタンパク質がDNAのどの部位に結合しているかは重要です。それを調べるために使われるのが、ChIP-seqです。

まず、ホルムアルデヒドで処理することにより、DNAとタンパク質の結合を固定します(架橋)。次に、超音波処理によってDNA-タンパク質複合体を断片化します。ここに、目的のタンパク質に対する抗体を加え、そのタンパク質を含む断片だけを沈降させます(免疫沈降)。沈降した断片のDNAとタンパク質を分離させて(脱架橋)DNAを回収します。回収されたDNAの塩基配列を次世代シーケンサーで読み取ります(シーケンシング)。

この結果を解析することで、目的のタンパク質が結合していたDNAの部位が明らかになります。



東京大学先端科学  
技術研究センター  
油谷浩幸教授研究  
室HPの図を改変

## 拠点サイトビジット

開催日：データ解析拠点 2010年5月28日(金)  
シーケンス拠点 2010年8月25日(水)



データ解析拠点の配列解析パイプラインシステム(左)とシーケンス拠点

シーケンス拠点に整備された種々の次世代シーケンサーと、データ解析拠点に整備されたコンピュータシステムを実際に見学し、それらの機能や使い方について理解を深めることは、本プログラムに参加している研究者にとって有益です。そこで、両拠点へのサイトビジットが行われました。データ解析拠点には35名、シーケンス拠点には41名が訪れ、拠点の研究者からの説明を受けました。先導研究へのサポート体制や両拠点の連携などについて、研究者同士が議論し理解を深めることもできました。

## BMB2010に出展

会期：2010年12月7日(火)～10日(金)  
会場：神戸国際展示場3号館(神戸ポートアイランド)

第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会合同大会(BMB2010)の特別企画、ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)実物つきパネル展示「バイオリソース勢ぞろい」に、本プログラムが出展しました。資料の配布と当ホームページのデモを実施し、ポスターの展示では、プログラムの紹介と進捗、今後期待される成果を紹介しました。



## 平成22年度成果発表会

日時：2010年9月17日(金)～18日(土)  
場所：東レ総合研修センター(静岡県三島市)

平成22年度成果発表会が開かれ、榊佳之プログラムディレクターをはじめ本プログラムメンバー71名が参加しました。全研究課題の代表研究者による口頭発表、分担研究者などによるポスター発表のほか、国立遺伝学研究所の小原雄治所長による招待講演が行われました。研究者が一堂に会することにより、研究者間の交流・情報交換も進み、研究課題間の連携を深めてプログラムをより強力に推進するための貴重な機会となりました。

## 協力機関の募集と採択

本プログラムでは、これまで構築したシーケンス拠点及びデータ解析拠点の基盤を大学や民間企業などのライフサイエンス分野の研究者が広く利用できるにするとともに、我が国の基盤技術の向上に資することを目的として、2010年12月にそれぞれの拠点の協力機関の募集を行いました。審査の結果、2011年1月に18課題が採択されました。協力機関は、自らの研究課題に必要な解析を拠点との共同研究で進め、それが拠点の基盤技術の向上に貢献することにつながると期待されます。