

次世代型遺伝子配列決定装置 GS Junior の運用報告 -試料調整における課題と改善-

所属 大気海洋研究所 共同利用共同研究推進センター 陸上研究推進室

発表者 渡邊 太郎

wataro@aori.u-tokyo.ac.jp

1. 背景・課題

生体高分子の1種である DNA や RNA などの『核酸』は、ほぼ全ての生物や細胞に含まれており、塩基と呼ばれる部分の種類・順序（塩基配列）が、生命活動に必要なタンパク質の構造を規定する。DNA にはその生物が持つ遺伝子（タンパク質）の情報が記録されており、状況に応じて RNA へ転写され、タンパク質へと翻訳される。そのため、DNA 解析からは『その生物はどのような遺伝子を持っているのか?』、RNA 解析からは『その細胞・臓器でどのような遺伝子が、どれだけ使われているのか?』を明らかにすることが可能である。

大気海洋研究所で使用されている Rosche 製の卓上型次世代シーケンサー (GS Junior ; 図 1) は、他機種と比較して出力される遺伝子の塩基配列（平均リード長 400 塩基長）が長いこと、ゲノム情報が明らかにされていない多くの海洋生物でも新規遺伝子の種類を推定しやすい。一方で、1 ランあたりの出力遺伝子数（リード数）は平均 15 万リードと少ないものの、逆に個人用 PC でも取り扱いが容易となるため、研究室単位での小規模解析を主とする実験系では有用な機種である。発表者は特に RNA の解析に関して、『解析対象の遺伝子をより多様に、かつ、より長いリードの出力』を目指してきたが、リード数の少なさをカバーするために検討が必要な課題が 3 点浮き彫りになった。すなわち

課題 1 : より高純度な mRNA 精製

課題 2 : 任意の不要遺伝子の除去

課題 3 : 短断片の除去（現在検討中）

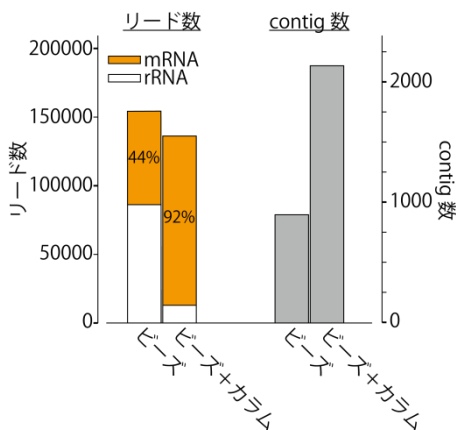
である。本発表では課題 1, 2 の概略と結果を、課題 3 については現在の検討状況を紹介したい。



図 1. 卓上型次世代シーケンサー (GS Junior)

2-1. より高純度な mRNA 精製（課題 1）

RNA は構造や機能から mRNA や rRNA などの種類に分けられ、さまざまな機能を担う mRNA が解析対象となることが

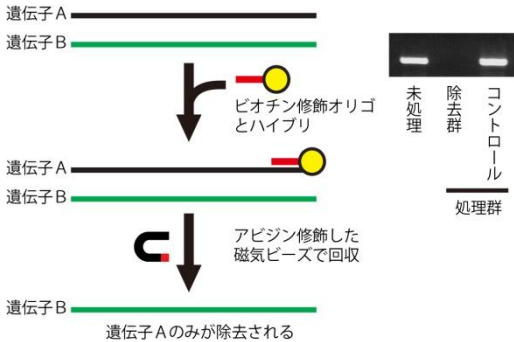


多い。ところが、細胞中の RNA のほとんどが rRNA であり、mRNA は 2-4% 程度にすぎない。これまで研究室で mRNA 精製（ビーズ精製）を行ってきたが、全リード中の 60% 近くが rRNA で、mRNA の検出効率を下げることになった。そこで、ビーズと遠心カラムを併用する工程を 2 回繰り返した結果、核酸以外の不要な巨大分子の除去も効率的に行われ、rRNA 数の混入率が約 10% と、機能遺伝子の検出効率が大きく改善された（図 2）。

図 2. 精製方法の変更による出力データの改善
同一の組織（オオメジロザメ腎臓）を用い、PolyA 末端を持たない rRNA を特異的に除去したところ、混入率の軽減とともに contig 数の増加（多様性の増加）が見られた。

2-2. 任意の不要遺伝子の除去（課題2）

カラム精製は mRNA の品質の大きな改善をもたらしたが、PolyA 末端と呼ばれる mRNA 中の特殊な構造を利用しているため、この構造を持たない細菌や発生初期の生物や、解析対象が DNA の場合には適用できない。そこで、ビオチン標識オリゴ DNA およびアビジン標識磁気ビーズを用い、任意の遺伝子の除去を試みた（図3）。その結果、除去効率は



は遺伝子によって開きが見られ、対象とする遺伝子や作製する標識オリゴ DNA の配列に大きく依存することがわかった。ただし、経時サンプリングの試料処理のように、除去対象が確定している場合には有効であると考えられる。

図3. ビオチン標識オリゴによる遺伝子除去 概略（左）および結果（右）
除去法の効果を評価するため、不要遺伝子と仮定した GAPDH を用い、標識オリゴを加えた。未処理群：オリゴ無添加，除去群：GAPDH 用のオリゴを添加，コントロール：GAPDH 用ではないオリゴを添加

2-3. 短断片の除去（課題3）

GS Junior は 2012 年に出カアルゴリズムの変更を伴うソフトウェアのアップグレードが行われ、出カリード数が最大で 1.5 倍に増加した。ところが、解析されたリードが短すぎて出力されない単断片の発生率は変化が見られないことも明らかになった（表 1）。遺伝子の同定が困難である短断片は、現行法での試料調整では除去しきれない。非モデル生物が研究対象となることが多い当研究所においては、遺伝子の同定ができないことは死活問題である。現在は、Rosche のプロトコルに影響を与えず、かつ短断片を除去できるような工程の追加を検討中である。

表 1. GS Junior より出力されたデータの内訳

	GS Junior のバージョン	
	アップグレード前	アップグレード後
総リード数	214,050	220,400
出力リード数	126,367	152,527
平均長	388.1±115.6	437.3±121.8
短断片（未出力）	48,613	46,263
短断片の割合（%）	22.7	21.0
ラン数	5	13

実際に解析で使用するデータ

常に一定の割合で出現する短断片を減らせないだろうか？

- emPCR 直前のサイズ分別
- emPCR breaking 時の分別

3. 展望

GS Junior は他機種と比べリード数が少ないものの、試料調整を工夫することで、ある程度のカバーが可能となる。特に、大気海洋研究所で研究対象とする生物種の多くは遺伝子の情報が乏しく、相同性検索により遺伝子の種類を判断するしか方法がない。そのため、リード長が長い GS Junior は有効なツールである。今後、個々の研究用途に応じた網羅解析を行い、ユーザーに少しでも還元したいと考えている。

4. 謝辞

本研究を行うにあたり、サンプルを提供していただいた沖縄美ら海水族館の皆様、大気海洋研究所・兵藤晋准教授にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。また、不要遺伝子の除去方法の検討は（2-2）、奨励研究（課題番号：24924011）による補助のもと行いました。