

# 放射線先端医学実験施設の紹介

---

医学系部門 生命科学実験班

田井 里佳



広島大学

# 本日の内容

- 1) 放射線先端医学実験施設の紹介
- 2) 放射線先端医学実験棟の紹介
- 3) ナノポアシーケンサPromethION24の紹介

# 放射線先端医学実験施設とは



# 放射線先端医学実験施設とは

- ・放射線の生体への影響を研究することを目的として設置された原医研の附属施設
  - ・共同利用・共同研究を促進するため、放射線実験系、動物実験系、遺伝子実験系の3つの研究支援体制を配置
- ⇒ 遺伝子実験系は、放射線障害に関連するヒト疾患発症メカニズムを遺伝子・分子レベルで解析することを目的とし、さまざまな研究機器を備え研究のサポートを行っている。

# 遺伝子実験系とは

## 広さ

- ・原医研棟・実験棟・総研に機器室が大まかに6室
- ・延床面積は880m<sup>2</sup>

## 本年度の利用者

所属	ラボ・グループ数	人数
原医研	17	99
広大内(原医研除く)	39	232
学外	7	11
合計	63	342

# 遺伝子実験系とは

保有機器: 32システム大小合わせて90機

## 主な設備・サービス

- ・フローサイトメーター (FACSCantoll, FACSAriaIIIu)
- ・イメージングシステム (Opera Phenix, IncuCyte Zoom)
- ・染色体解析システム (Metafer)
- ・次世代シーケンサ (HiSeq2500, PromethION24)
- ・組織標本作成システム

※詳細は、「遺伝子実験系 設備概要」へ

<https://gsentan.hiroshima-u.ac.jp/genetec.html>

# 放射線先端医学実験棟とは

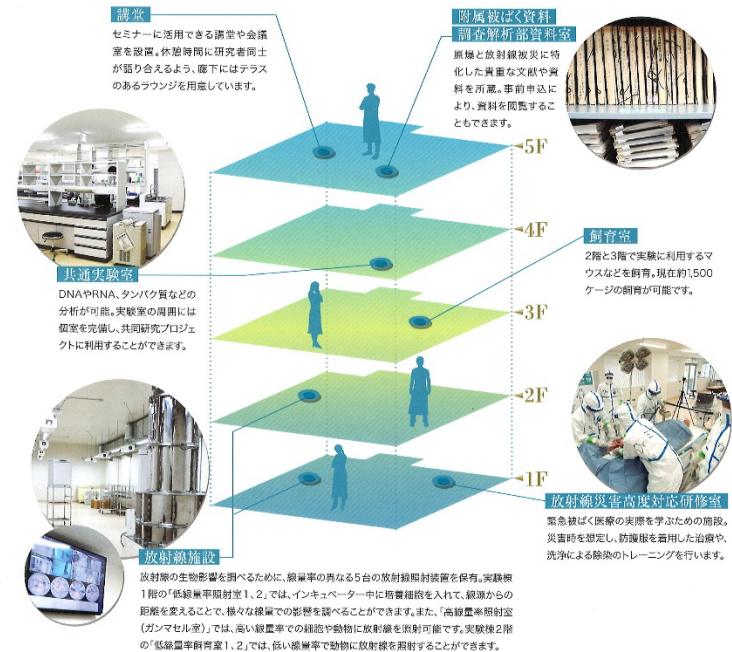
放射線医学研究の拠点として、世界の放射線災害・医学科学領域の発展に貢献することを旨として、2021年5月に稼働

共同利用・共同研究の促進のための先端施設および被ばく資料調査解析部、放射線災害医療分野の人材育成のための原子力災害トレーニングセンターを設置

広島大学原爆放射線医学研究所

2021年5月始動!

## 放射線先端医学実験棟



最先端設備を備えた充実した環境で、研究を推進

2021年5月、新設した「放射線先端医学実験棟」が本格稼働。国内外の研究者らとの共同利用・共同研究などのために放射線実験施設、動物実験施設、遺伝子実験施設、放射線災害医療分野の人材育成のための原子力災害トレーニングセンターを設置。放射線医学研究の拠点として、世界の放射線災害・医学科学領域の発展に貢献することを旨とします。

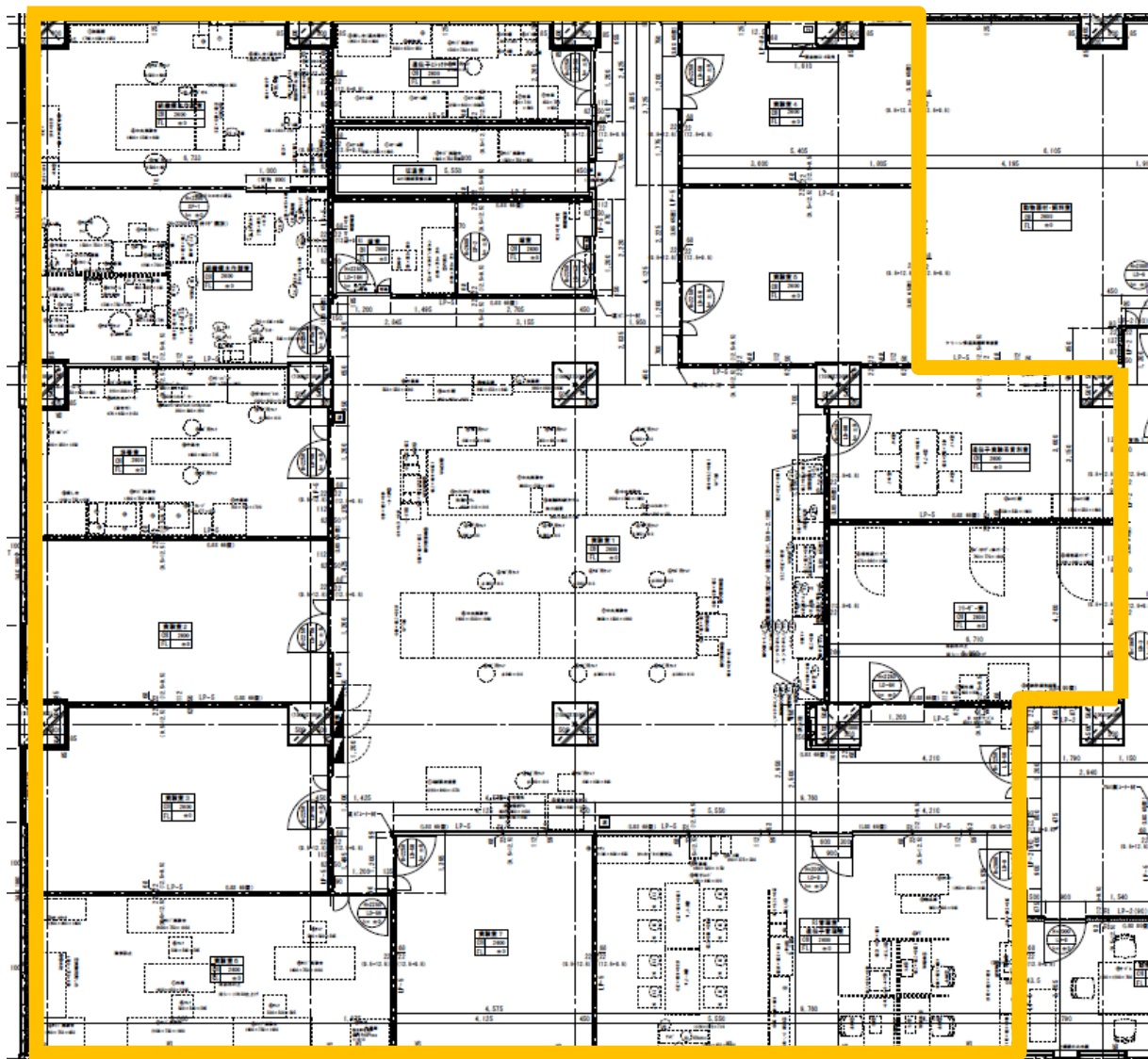




# 共同利用共同研究エリアとは

共同研究が機能的に完結できるスペースを提供

共同実験室  
レンタルラボ  
組織標本作製室  
培養室  
蛍光顕微鏡室  
低温室  
フリーザー室  
管理室





# 共同利用共同研究エリアとは



共同実験室



組織標本作製室



培養室



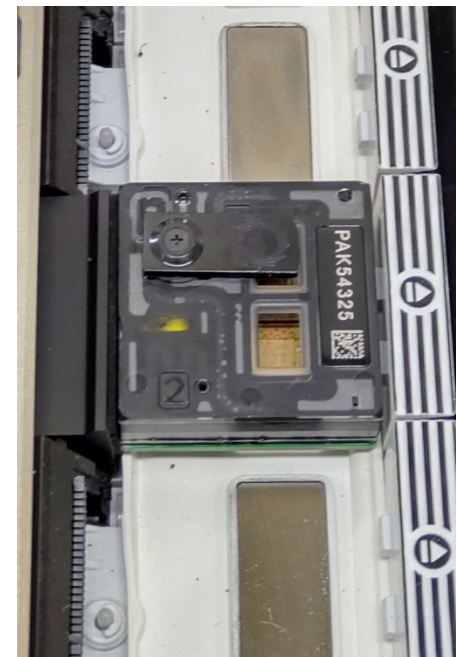
レンタルラボの1例

# ナノポアシーケンサとは

## PromethION24の概要

- ・最大24個のフローセルが使用可能
- ・1フローセルあたり3,000チャンネル  
各チャンネルで最大4つのナノポアを制御  
⇒12,000pores
- ・リアルタイムベースコール
- ・最大スペック  
リード長: 4Mb  
N50: 100kb  
データ量: 300Gb

実際には、  
リード長: 150kb  
N50: 10~20kb前後  
データ量: 80~120Gb



# ナノポアシーケンサとは

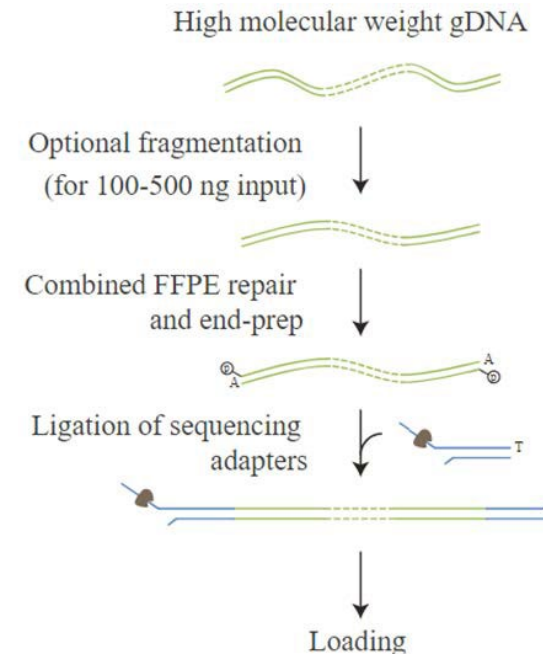
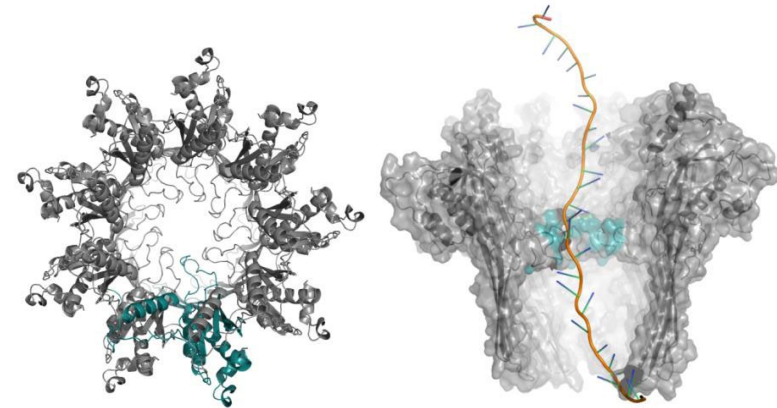
## ナノポアシーケンス原理

### ○ナノポア

- ・直径約 10 ナノメートルのタンパク質
- ・ナノポアに分子を通すことが可能

### ○ライブラリ

- ・モータータンパク質結合済みアダプター
- ・シーケンスアダプターの付加

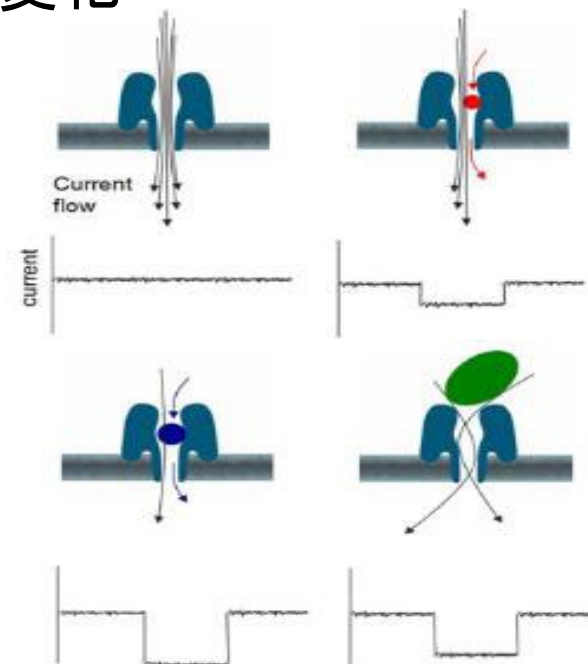


# ナノポアシーケンサとは

## ナノポアシーケンス原理

### ○シーケンス

- ・イオンが電気抵抗膜に埋め込まれたナノポアを通過
- ・モータープロテインにより、核酸をナノポアへ送り込む
- ・DNA/ RNA 塩基の通過により、電流が変化
- ・電流値の変化から、塩基配列を解析

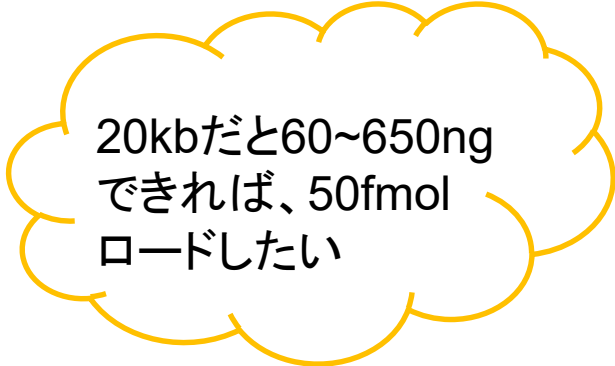


# ナノポアシーケンサとは

## QCの重要性

出力データ量を最大限にするには

- ・Pore占有率を高く保つ
- ・高品質のライブラリー（両端にアダプターを持つ分子）  
5～50 fmol / flowcell
- ・ライブラリーロード量と出力データ量は比例しない
  - 少ない場合：Poreがフリーの状態ではデータを出力できない
  - 過剰の場合：試薬消耗（ATP等が進み出力速度が低下）



20kbだと60~650ng  
できれば、50fmol  
ロードしたい

⇒抽出核酸の定量と純度のコントロールが重要



# ナノポアシーケンサとは

## QCの重要性

定量 : Qubit (dsDNAの測定)

QubitとNanoDropで  
濃度乖離がある場合は、  
不純物の混入  
⇒ポア失活の恐れ

純度 : NanoDrop (フェノール、アルコール、塩等の不純物検出)

–  $A_{260}/A_{280} = 1.8$

–  $A_{260}/A_{230} = 2.0 \sim 2.2$

$A_{260}/A_{280} > 1.8 \Rightarrow$  RNA  
 $A_{260}/A_{280} < 1.8 \Rightarrow$  タンパク質、フェノール  
 $A_{260}/A_{230} < 2.0 \Rightarrow$  不純物

フラグメント長 :

Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

TapeStation等

正確なサイズを測  
るのは難しい・・・  
DIN値で分解が  
ないか確認

– 長いリードを得るには、長鎖フラグメントが必要

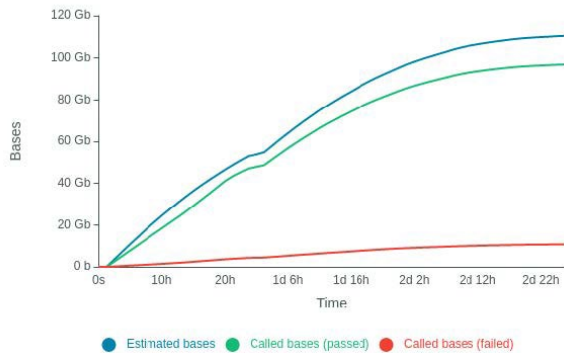


# ナノポアシーケンサとは

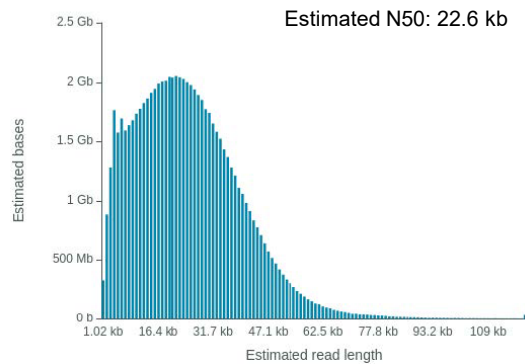
## Runの評価

### 1) 問題なかったら

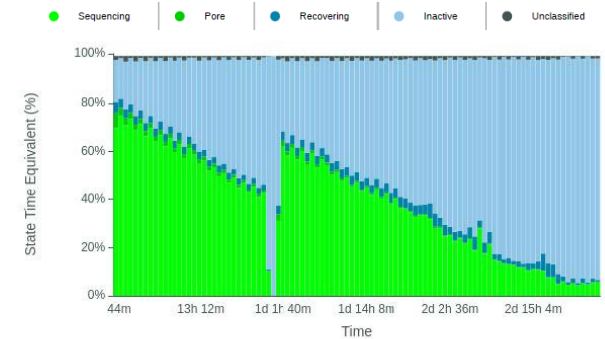
Cumulative Output Bases



Read Length



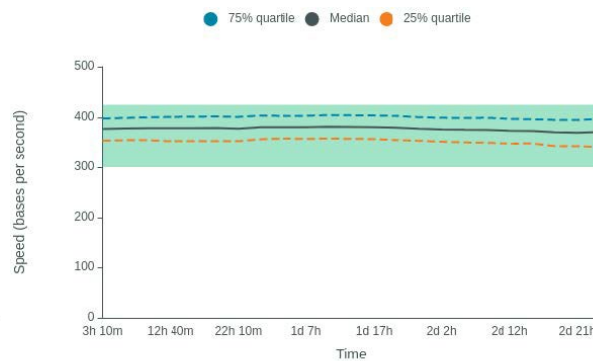
Duty Time



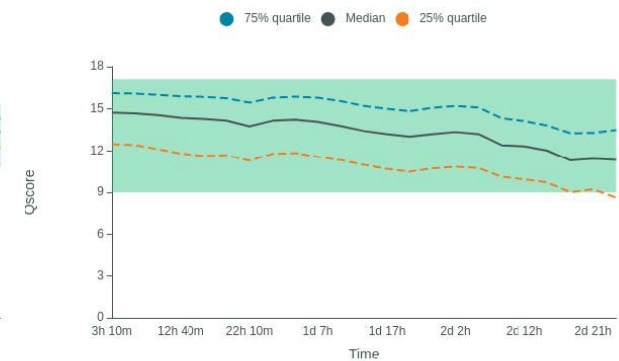
Bias Voltage History



Translocation Speed



Qscore

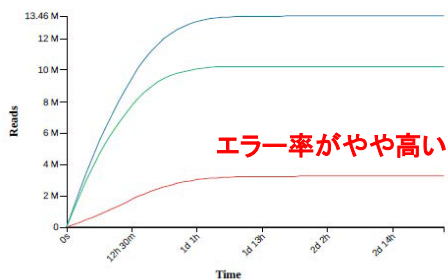


# ナノポアシーケンサとは

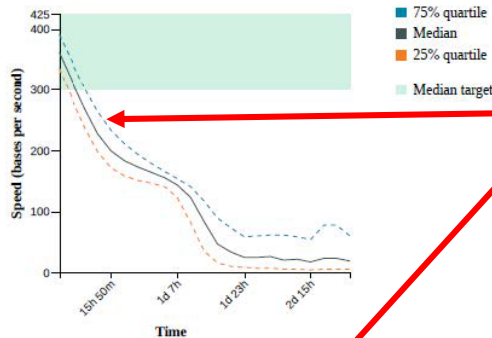
## Runの評価

### 2)短鎖の過剰ローディングは要注意

Cumulative Output Reads



Translocation Speed

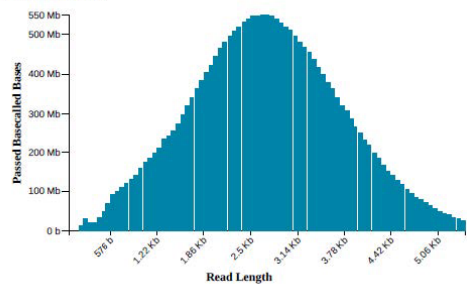


ライブラリーが短分子(3kb)でかつ500ng (250fmol)でロード量が過剰のため、シーケンス反応が急速に進みバッファー中のATP が枯渇して読み取り速度が低下しMedian Target 外となり、それと連動して読み取り精度(QScore)も低下した。これにより出力が低下したと考えられる。

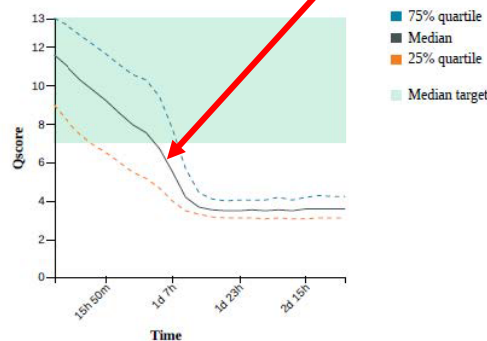
急速な電圧上昇も認められ、急速なイオン枯渇が予想される

Read Length Histogram Basecalled Bases - Outliers Discarded

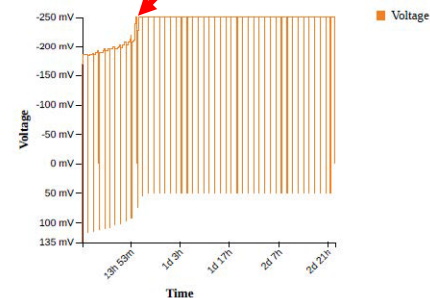
Estimated N50: 2.7 Kb



QScore



Bias Voltage History

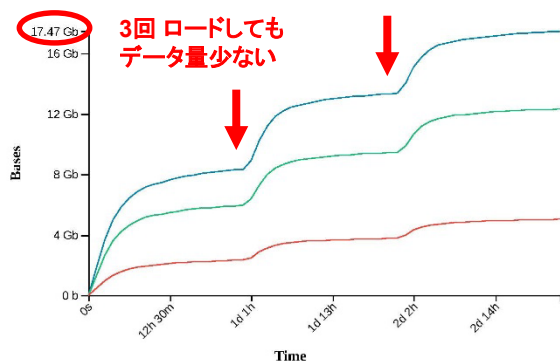


# ナノポアシーケンサとは

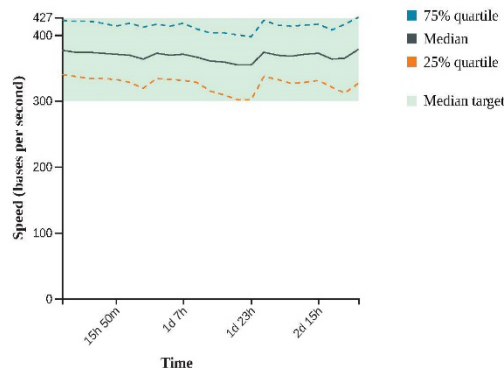
## Runの評価

### 3) 詰まりやすいサンプルに要注意

Cumulative Output Bases



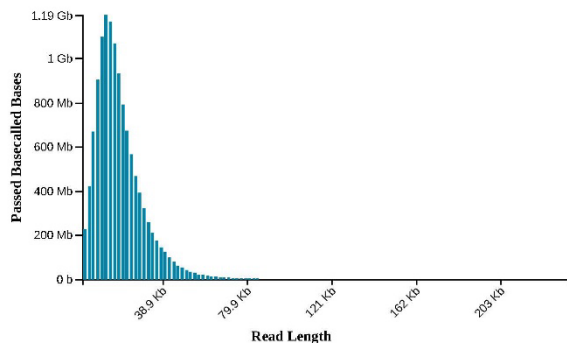
Translocation Speed



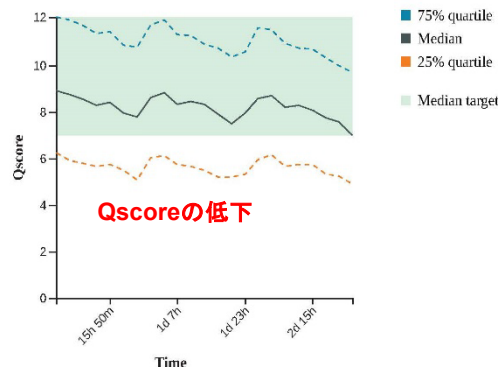
- ・リード長がかなり長い  
⇒複数回ロードする
- ・サンプルの性状として詰まり易い  
⇒複数回ロードしても、データ量が得られなければ、抽出方法の工夫が必要
- ・QC不良のサンプル(不純物等の混入)  
⇒急速なポア失活。抽出方法の再検討

Read Length Histogram Estimated Bases

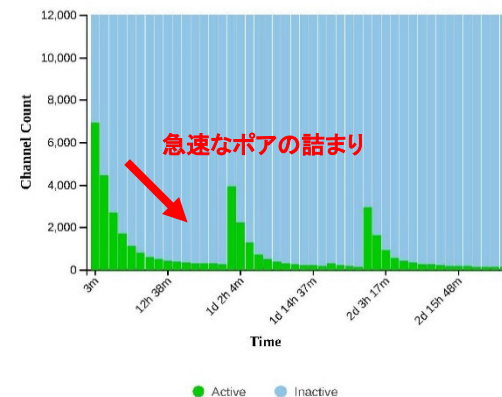
Estimated N50: 15.26 Kb



QScore

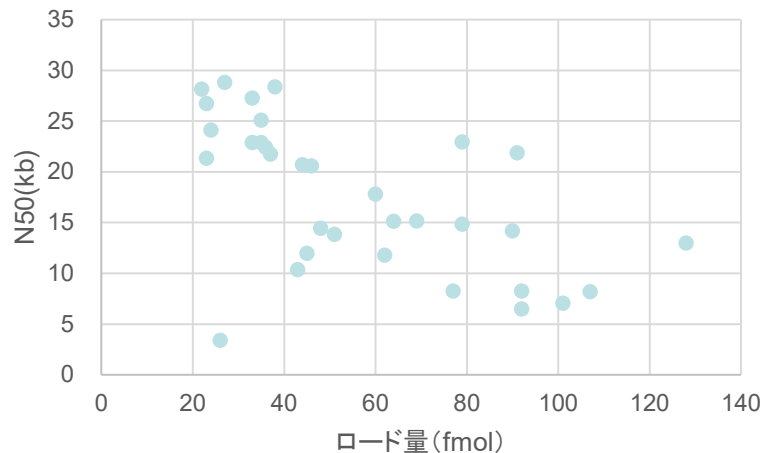


Mux Scan Grouped



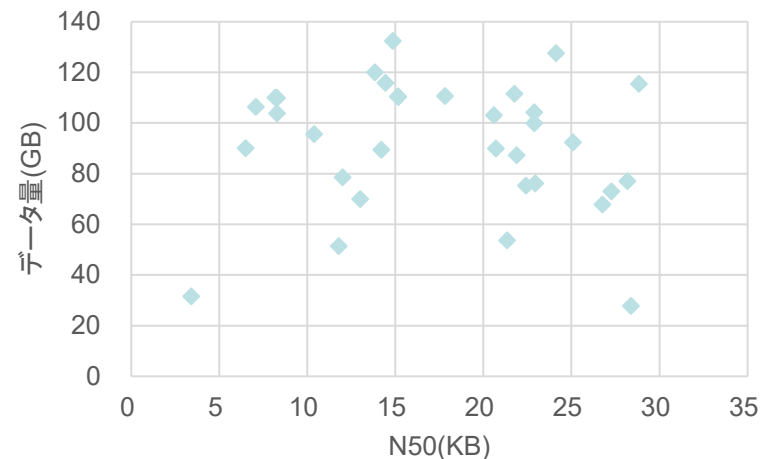
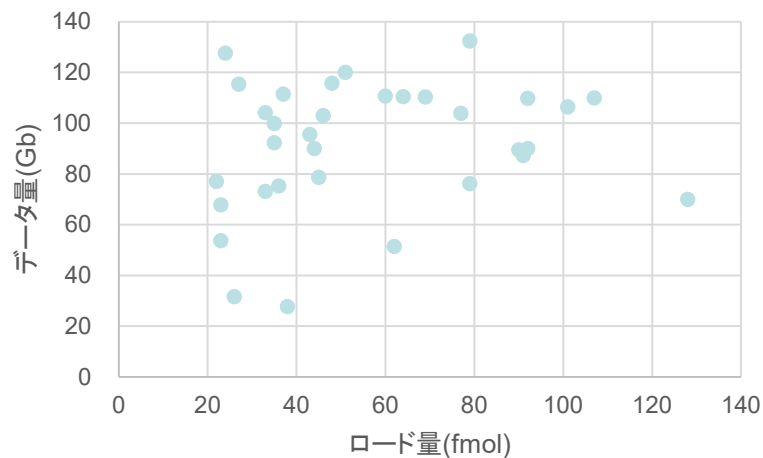
# ナノポアシーケンサとは

## 実際のRun状況



57ランしてみて...

- ・リード長が短いサンプルは過剰ロード傾向になる
- ・推奨量 (5~50fmol) 以上でも、100fmol程度までであれば、急激なデータ量低下は見られない
- ・N50: 20~30kb (2回ロード) でも100Gb前後のデータ量を得られることを確認した



# 最後に

○放射線先端医学実験施設に興味がある方は

HP: <https://gsentan.hiroshima-u.ac.jp/>

○問い合わせ先

遺伝子実験系 機器サービス室(実験棟418号室)

TEL: 082-257-5995

Mail: [gsentan@hiroshima-u.ac.jp](mailto:gsentan@hiroshima-u.ac.jp)