

次世代シーケンサーを用いた研究支援に関する報告

著者	森内 良太, 鈴木 智子, 道羅 英夫
雑誌名	技術報告
巻	22
ページ	1-4
発行年	2017-03-10
出版者	静岡大学技術部
URL	http://doi.org/10.14945/00010240

次世代シーケンサーを用いた研究支援に関する報告

○森内良太¹、鈴木智子²、道羅英夫²

¹技術部 教育研究支援部門、²グリーン科学技術研究所 ゲノム機能解析部

1. はじめに

静岡大学グリーン科学技術研究所研究支援室ゲノム機能解析部では、次世代シーケンサーMiSeq (illumina) (Fig. 1) を使用した研究支援を学内向けに行っている。遺伝子実験棟に MiSeq が設置 (2014 年 2 月) されて以来、多くのシーケンス解析が行われてきた。本稿では、これまでの解析についてまとめ現状を報告するとともに、新たにトライした解析支援内容や今後の支援について述べる。



Fig. 1 illumina の MiSeq

2. 次世代シーケンサーによる解析

2.1 次世代シーケンサーとは

膨大なシーケンシング反応を同時に行い、DNA 配列を高速に解読できる技術を有した分析機器を、次世代シーケンサーという。例えば、従来のシーケンサーは1回のランニングで70 Kbほどの塩基配列しか解読できなかったが、MiSeqは1回のランニングで15 Gb (およそヒトゲノム5人分)のシーケンスデータが出力され、またシーケンシングコストも30万円ほどである。MiSeqはデスクトップ型のシーケンサーであり、出力データ量やコスト、シーケンシングスピードの点において小回りがきいて使いやすいと考える。次世代シーケンサーは年々機能が向上しており、例えばMiSeqよりも非常に長いリードを出力できるPacBio (Pacific Bioscience)^[1]や、USB型のMinION (Oxford Nanopore Technologies)^[2]などが開発されている。

2.2 ゲノム機能解析部における解析支援内容

ゲノム機能解析部では主にゲノム解析、トランスクリプトーム解析、メタゲノム解析という3つの解析支援を行っている。ゲノム解析は、生物のゲノム配列や保有する遺伝子等のゲノム情報を明らかにする解析である。転写産物の網羅的な解析をトランスクリプトーム解析といい、例えば特定の環境やサンプル特異的に発現する遺伝子を同定する際に行われる。メタゲノム解析は、環境サンプル(土、海水、糞便等)からゲノムDNAを抽出して解析し、サンプル中に存在するバクテリア等の存在割合を調べる。

依頼者からサンプルを受け取った後、まず蛍光色素を使用した濃度測定やO.D.の測定、電気泳動等のクオリティチェックを行って、解析に使用できるサンプルなのか評価する。次にキットを使用してライブラリを作製し、バイオアナライザによるエレクトロフェログラムの確認やqPCRによる定量を行ってライブラリの評価を行う。適切なライブラリが作製できれば、MiSeqを使用してシーケンス解析を行う。シーケンス終了後、出力されたリードデータを使用して、依頼内容に沿った解析を行う。

3. MiSeqを使用したこれまでの解析支援について

3.1 解析サンプル数

これまでに MiSeq で解析したサンプル数 (2014年2月-2016年9月) について、Fig. 2 にまとめた。全体的にサンプル数は増加傾向であり、2015年度は180サンプルを扱った。また3つの解析のうち、トランスクリプトーム解析のサンプル数が最も多かった。2016年度は9月までの依頼をまとめたものであるため、他年度と比較してサンプル数は少ない。しかし10月以降は解析依頼サンプル数が増え、少なくとも全体で100サンプル以上は解析する予定である (2017年1月時点)。

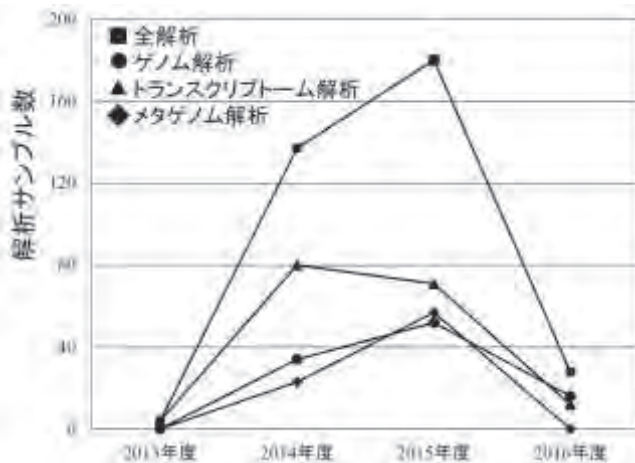


Fig. 2 これまでに解析したサンプル数

3.2 解析サンプルと解析依頼先の内訳

ゲノム解析とトランスクリプトーム解析サンプルの内訳を、Fig. 3 に示した。ゲノム解析において、解析サンプルの約80%がバクテリアやウイルス、菌類等の微生物であることがわかった。特にバクテリア・アーキアは全体の半分を占めており、需要が多いことがわかる。今後もバクテリアを中心とした微生物のゲノム解析依頼が多くを占めるだろうと予測される。逆にトランスクリプトーム解析では、植物や菌類、動物が大部分を占めていた。ゲノム解析とは異なり、バクテリアはあまり解析されていないが、今後実施したいという要望を伺っているため、積極的に支援していきたいと考えている。また解析依頼先に注目した場合、全解析やゲノム解析、トランスクリプトーム解析において、農学部が最も多くを占めていた (Fig. 4)。

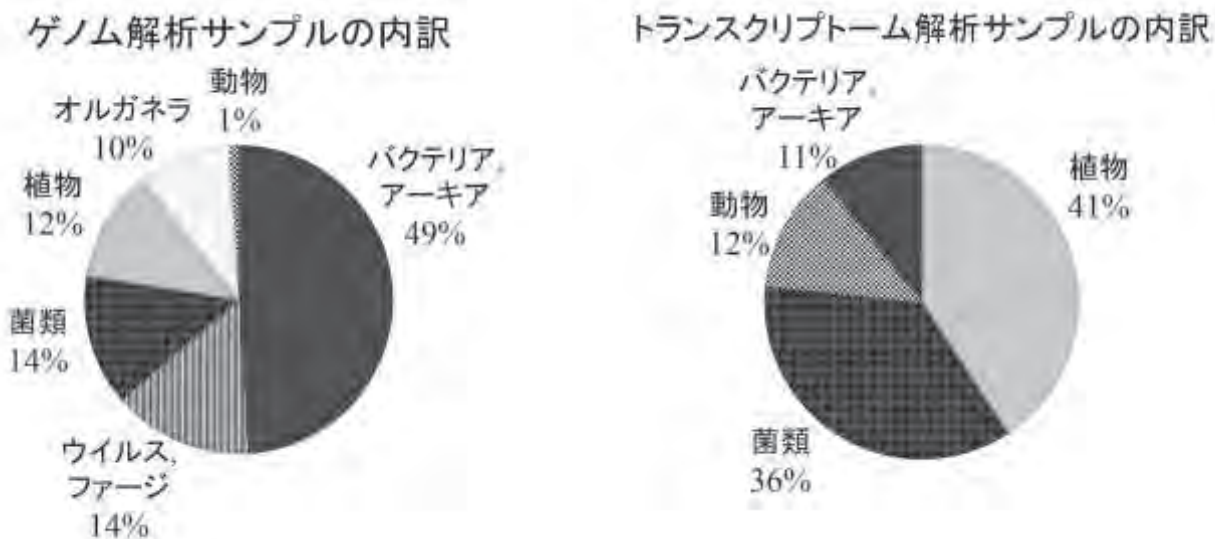


Fig. 3 ゲノム解析とトランスクリプトーム解析サンプルの内訳

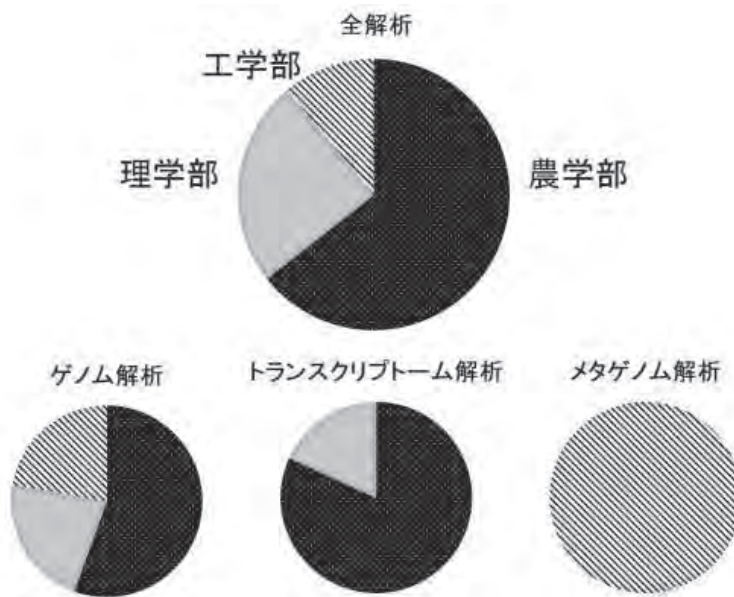


Fig. 4 解析依頼先の内訳

4. 新たにトライした解析支援について

4.1 全ゲノム配列決定の意義

MiSeq を使用することで、生物（特に微生物）のドラフトゲノム配列を決定することが可能である。ドラフトゲノム配列とは、ゲノムのサイズや保有している遺伝子等が明らかとなった大よその配列で、数十あるいは数百のコンティグ（リードデータをつなげた塩基配列のかたまり）よりなる。ドラフトゲノム配列より全ゲノム配列を用いた方が、より深い考察が可能である。例えば、どの遺伝子がどの染色体に存在するのかということは、全ゲノム配列を決定しないとわからない。さらにゲノム構造の進化を考える上でも、全ゲノム配列の解明は必須である。全ゲノム配列を決定することは、研究を推進するという意味で重要である。

4.2 全ゲノム配列決定支援解析ソフト GenoFinisher について

コンティグの数が少ない場合、ドラフトゲノム配列情報を元に全ゲノム配列を決定できることがある。GenoFinisher という解析ソフト¹⁾はバクテリアの全ゲノム配列決定を支援するソフトであり、例えばコンティグ同士のつながりを可視化したり (Fig. 5)、コンティグのつながりを確認するために必要な PCR 用のプライマー配列を出力する機能がある。さらに付属ソフトである AceFileViewer を使用することで、コンティグを形成するリードデータを確認することができる。これらの情報を駆使して、ドラフトゲノム配列から全ゲノム配列を決定することが可能となる。

4.3 全ゲノム配列の決定

あるバクテリアのゲノム解析を行ったところ、19 個のコンティグを取得し、そのうち 17 個がつながって 1 つの染色体を形成することがわかった。コンティグのつながりが複雑ではなく、全ゲノム配列を決定できる可能性が高かったため、依頼者の要望により全ゲノム配列決定を試みた。まず GenoFinisher を使用して、PCR に使用するプライマー配列を出力した。作製したプライマーを用いて約 70 通りの PCR を行い、繰り返し配列を介したコンティグ同士のつながりを明らかにした。ま

た繰り返し配列のバリエーションの決定や、コンティグのつながりが複雑な部位については、シーケンス解析を行うことで解決した。その結果、MiSeq のリードデータのみを使用して、全ゲノム配列を決定することに成功した。これまで、ゲノム機能解析部のスタッフだけでは、このような解析支援は行っていなかった。今回、筆者が **GenoFinisher** を使用することで、バクテリアの全ゲノム配列を決定することができ、解析支援の幅を広げることができた。



Fig. 5 **GenoFinisher** を使用したコンティグのつながりの可視化図

四角いパネルがコンティグを示し、コンティグ同士のつながりが線で可視化されている

5. 今後の支援について

バクテリアを主とした微生物ゲノム解析支援依頼が多いため、今後も力を入れていきたいと考えている。一方高等生物について、MiSeq から出力されるデータ量でドラフトゲノムを決定することは難しい。しかし、ある一部分のみを解析するターゲットシーケンスを行うことは可能であるため、そのような形で支援したいと考えている。バクテリアのトランスクリプトーム解析は今まで行われていないが、要望を伺っているため積極的に支援していきたい。

6. 参考文献

- [1] Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Bettman, P.B.B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., Winter, A. D., Dixon, J., Foquet, M., Gaertner, A., Hardenbol, P., Heiner, C., Hester, K., Holden, D., Kearns, G., Kong, X., Kuse, R., Lacroix, Y., Lin, S., Lundquist, P., Ma, C., Marks, P., Maxham, M., Murphy, D., Park, I., Pham, T., Phillips, M., Roy, J., Sebra, R., Shen, G., Sorenson, J., Tomaney, A., Travers, K., Trulson, M., Vieceli, J., Wegener, J., Wu, D., Yang, A., Zaccarin, D., Zhao, P., Zhong, F., Korfach, J., Turner, S. : Science, 323, 133-138 (2009)
- [2] Mikheyev, A.S. and Tin, M.M.Y. : Mol. Ecol. Resources, 14, 1097-1102 (2014)
- [3] Ohtsubo, Y., Maruyama, F., Mitsui, H., Nagata, Y., Tsuda, M. : J. Bacteriol., 194, 6970 -6971 (2012)