

魚類ゲノム研究におけるターゲットリシーケンス法の有用性の検証

はじめに

次世代シーケンサー（NGS）の普及とそのコスト低下により、従来マイクロアレイの設計が必要であった用途でも NGS を用いたジェノタイピング、GBS（Genotyping by Sequencing）法が使われるようになった。

TruSeq Genotype N₆（エニー）Kit は、動植物のあらゆる生物種を対象としてターゲットリシーケンスを行うことができる、カスタム仕様の GBS キットである。国立研究開発法人水産研究・教育機構 須田 亜弥子先生、藤原篤志先生のご協力のもと、重要な食用魚のゲノム解析における本キットの有用性について検証を行った。

TruSeq Genotype N₆ Kit の特長

TruSeq Genotype N₆ Kit は、イルミナ Concierge によるカスタムパネル設計、ライブラリー調製試薬、シーケンス試薬までがキットに含まれ、絞られた多型セットの低コスト解析に対応する。TruSeq Genotype N₆ Kit のワークフローを図 1 に示す。本キットでは、5,000 マーカーまでのターゲット領域に対応したカスタムオリゴパネルを設計することができ、以下のような特長を持つ。

- 一塩基多型（SNP）、挿入欠失（indels）などの複数種のマーカーを 1 つのパネルに含めることができる
- 完全なリファレンスゲノムがない生物種でもパネルを設計できる

ライブラリー調製は、アンプリコン生成法を採用している。カスタム設計後製造されたオリゴプールをサンプルであるゲノム DNA にハイブリダイゼーションさせ、そこから DNA を伸長、ライゲーションによってターゲット領域を含む一本鎖 DNA を合成する。それを鋳型として PCR 増幅し、同時にインデックス付加を行ってライブラリーを作成する。本キットには 384 種類のインデックスが含まれるため、最大 384 サンプルのマルチプレックス解析が可能である。

作成されたライブラリーを、キットに含まれるシーケンス試薬を用いて、NextSeq™ システム、MiSeq™ システムもしくは MiniSeq™ システムで解析し、ターゲットシーケンスを実施する。

データ解析には、BaseSpace™ Sequence Hub の TruSeq Amplicon App を利用することができる。

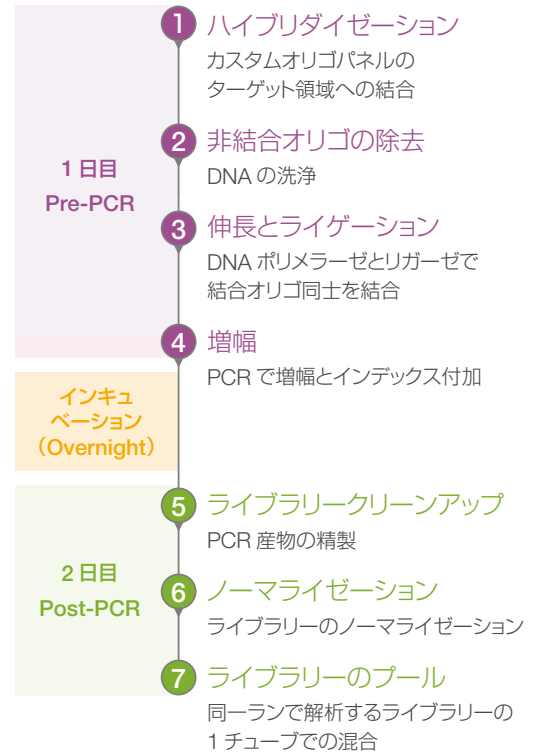


図 2：ライブラリー調製のフロー 二日以内に完了。



図 1：TruSeq Genotype N₆ Kit のワークフロー カスタムオリゴパネルはイルミナ Concierge サービスにより設計。設計、ライブラリー調製試薬、シーケンス試薬（NextSeq、MiSeq、MiniSeq 対応）までがキットに含まれる。

結果

本カスタムパネルでは、ゲノム上の 104 SNP に対して 100 アンブリコンを生成するプローブを設計した。このパネルを用いて、48 個体のゲノム DNA をそれぞれテクニカルレプリケート (n=2) で合計 96 サンプル、ライブラリー化した。これらの個体は、全ゲノムリシーケンスによるジェノタイプ結果が既に得られているものを用いた。

シーケンスでは 96 ライブラリーをプールし、キットに含まれる NextSeq 500/550 Mid Output Kit を用いて NextSeq 500 システム 1 ランで解析した。

データ解析のフローを図 3 に示す。トリミング (Trimmomatic v0.36)、マッピング (BWA v0.7.17)、SNP コール (GATK v4.0.12.0)、フィルタリング (VCFtools v0.1.13、サンプル共有率 70%、最小カバレッジ x20) の処理を経て、104 SNP 中 96 SNP が検出された。表 1 に結果の概要を示す。

リシーケンスデータとの SNP コール再現性が高く、精確性 (SNP コールの一致率) は 98% 以上を示しているため、以降の解析に十分なデータを取得することができた。

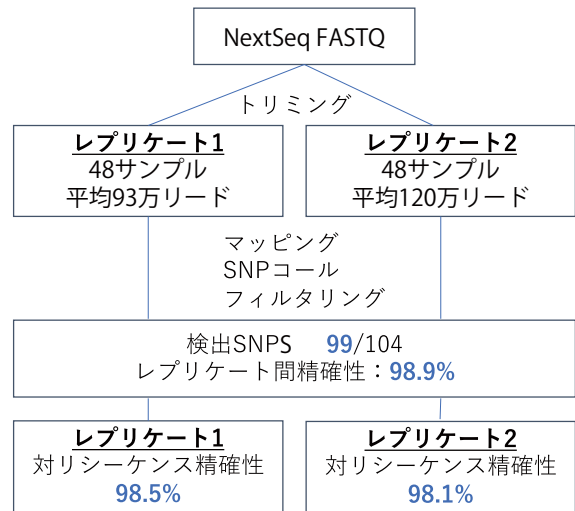


図 3: データ解析のフロー

表 1: 96 サンプル (48 個体、テクニカルレプリケート (n=2)) の結果

| | 48 サンプルの平均リード数 | 104 SNP 中の欠測率 (%) | リシーケンスデータとの SNP コールの一致率 (%) | レプリケート間の SNP コールの一致率 (%) |
|----------|----------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------|
| レプリケート 1 | 93 万 | 1.4 | 98.5 | 98.90 |
| レプリケート 2 | 120 万 | 0.7 | 98.1 | |

お客様の声

近年では次世代シーケンサーの進出により、様々なゲノム解析手法が利用されています。水産魚類の集団構造の解明や養殖魚のゲノミックセレクションを目的とした研究の場合は、ゲノムワイドな大量 SNP が必要となり、この場合は、全ゲノムリシーケンスや GRAS-Di 法¹などが有効です。

一方、系群判別や親子判別を目的とした場合は、数百の既知領域を正確にかつ安定的に取得できる手法が必要となり、この場合は、Genotype N₆ や Custom Ampliseq が適していると言えます。今回、試験的に Genotype N₆ を利用した印象として、ライブラリー作成はシンプルかつ容易であり、シーケンスデータも以降の解析に十分な高精度データが取得できました。

今後も目的に合わせた手法を取り入れていきたいと思っております。

1. 関連情報

次世代シーケンサーを利用した新規 genotyping 技術 GRAS-Di の開発
【イルミナ iSchool プロフェッショナル】 https://jp.illumina.com/events/webinar/2017/pro_webinar_170622_j.html

謝辞

製品性能検証にあたり国立研究開発法人水産研究・教育機構 須田 亜弥子先生、藤原 篤志先生に多大なるご協力を賜りました。ここにあらためて感謝の意を表します。

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階

Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810

jp.illumina.com

www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件: jp.illumina.com/tc

Pub. No. 5025-191001-01

© 2019 Illumina, Inc. All rights reserved.
すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc または各所有者に帰属します。
商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。