

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780044

研究課題名(和文)絶対寄生性線虫の全ゲノム増幅による次世代シーケンシング解析

研究課題名(英文)Genome sequencing from a single nematode using whole genome amplification

研究代表者

菊地 泰生(Kikuchi, Taisei)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：20353659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：寄生性線虫における難培養性はゲノム解析時の大きな障害となる。本研究では寄生性線虫における効率の良いゲノム解析を行うための全ゲノム増幅(WGA)-次世代シーケンシング法を開発することを目指した。既存の全ゲノム増幅シーケンシングデータを用いて問題点を抽出し、この問題を解消する3種のWGA方法を考案した。それぞれの方法をモデル線虫*C. elegans*を使用し、増幅均一性、一塩基多型、キメラ構造DNAの生成について検証した。その結果、いずれのゲノム増幅法も一塩基多型への影響はあまり大きくないこと、大きなサイズのライブラリーには増幅時に作成されるキメラDNAが品質に大きな影響を与えることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Genome sequencing of uncultivable parasitic nematodes is difficult because of limited amount of DNA from isolated individuals. In this study we aimed to develop a novel and efficient method to sequence genome from a single nematode using whole genome amplification (WGA) and a Next generation sequencer (NGS). Based on evaluation of existing results of WGA samples we have designed three new methods of WGA-NGS. We evaluated the three methods in terms of amplification uniformity, SNP distribution and generation of chimera DNA. We found all the methods are useful for SNP detection, but they are different in chimeric DNA generation and a combination of multiple methods can help to achieve better quality of assembly.

研究分野：寄生虫ゲノミクス

キーワード：寄生虫 ゲノム ゲノム増幅

1. 研究開始当初の背景

2011年、申請者らは植物寄生性線虫であるマツノザイセンチュウ (*Bursaphelenchus xylophilus*) の全ゲノムシーケンスを解読し、発表した (Kikuchi et al. 2011)。我々が発表したゲノムシーケンスは、これまで発表された他の寄生性線虫のゲノムに比べて高品質であった。この要因のひとつは、申請者らが確立した近親交配システムをゲノムシーケンシングに用いたことにある。しかし、近親交配作業は非常に時間がかかり技術的にも難しいため、多サンプルの解析に用いるのは現実的でない。また、多くの植物寄生線虫 (シスト線虫や根こぶ線虫など) は絶対寄生者であり、インブリッド (近親交配による株作出) が困難である。これらの線虫は体サイズが小さいため、線虫1個体からシーケンス解析に十分な DNA を獲得することができない。こういったケースでは、クローナルでない複数個体から抽出したゲノム DNA が使用されるが、多くの場合、個体間のシーケンス多様度が高く、ゲノム再構築 (ゲノムアセンブリー) や SNPs 解析の際に問題となる。

全ゲノム増幅 (Whole Genome Amplification, WGA) 法はゲノム全体を試験管内で増幅する技術である。わずかな量の DNA (1-10ng) から μg 単位の増幅が可能であるため、上記のような限られた量の DNA の解析に有用な技術である。一方で、近年の技術的進歩がもたらした次世代シーケンサーはゲノム解析への敷居を大きく引き下げた。この2つの技術の組み合わせは、寄生性線虫のゲノム研究に大きな進展をもたらす可能性を秘めている。

ジャガイモシスト線虫 (*Globodera pallida*) ゲノムプロジェクトにおいて、一部 WGA 法を用いたアセンブリーを行った。しかし、WGA は期待されるような高品質な結果をもたらさなかった。ここには、ゲノム増幅 (WGA) 反応中に発生する、ゲノムの部分重複や欠損、塩基の取り込みエラーなどの問題があるものと考えられているが、詳細な解析はなされていない。WGA は高い可能性を秘めた技術であるにも関わらず、以上のような問題から他の生物のゲノム解析にもあまり利用されていない。

これらの問題を克服する新たな WGA-シーケンシング法の開発は、寄生性線虫のゲノム研究分野の進展の最も重要なキーのひとつである。

2. 研究の目的

本研究では以下のことを明らかにする。

1) 既存の WGA シーケンシングデータを詳細に検討し、WGA 反応によって発生するゲノムの一部重複、欠損、塩基の取り込みエラー、不均衡増幅、およびそれに基づくゲノム再構築 (アセンブリー) の際の問題について詳細に明らかにする。

2) 明らかにした問題点に基づいて、新た

な WGA 法を考案し、*C. elegans* ゲノムを使った増幅結果の検証を行い、中規模サイズゲノムにおける最適な WGA-次世代シーケンシング法を開発する。

3) 開発された手法を用いて、病原力の異なる植物寄生性線虫集団 (マツノザイセンチュウ) の各1個体から WGA-次世代シーケンシングを行い、比較ゲノム解析により病原性関連遺伝子を抽出する。

3. 研究の方法

既存のジャガイモシスト線虫の全ゲノム増幅 (WGA) シーケンスデータを詳細に解析し WGA の問題点を抽出する。

抽出した問題点に基づいて新規 WGA 法を考案する。

一次評価、二次評価を経て最適な WGA-次世代シーケンシング法を確立する。

病原力の異なる植物寄生性線虫 (マツノザイセンチュウ) 集団の各1個体を用いて WGA-シーケンシングを行い比較ゲノム解析を試みる。

4. 研究成果

24年度は、1) 既存の WGA シーケンシングデータを詳細に検討し、WGA 反応によって発生するゲノムの一部重複、欠損、塩基の取り込みエラー、不均衡増幅、およびそれに基づくゲノム再構築 (アセンブリー) の際の問題について詳細に明らかにし、2) 明らかにした問題点に基づいて、新たな WGA 法を考案し、*C. elegans* ゲノムを使った増幅を行う計画のもと研究を遂行した。

既存の全ゲノム増幅シーケンシングデータ (2種の線虫: ヒツジ捻転胃虫 *Haemonchus contortus*、ジャガイモシスト線虫 *Globodera pallida*) をドラフトゲノムへのマッピングにより、増幅均一性 (カバレッジ)、一塩基多型 (SNPs)、キメラ構造 DNA の生成について検討し、ゲノムアセンブリーにはキメラ構造の生成が大きな問題になることを確認した。また、WGA には3種の方法を考案し、それぞれの方法でモデル線虫 *C. elegans* を使用し線虫ゲノムを増幅する手法を確立した。

25年度は3種の全ゲノム増幅法を *C. elegans* ゲノム DNA に適用し、各増幅産物を Illumina 社 HiSeq2000 を用いてシーケンス解析を行った。シーケンスライブラリーサイズには 350b と 3k を用い、ライブラリーサイズによる品質への影響も検討した。同時に非増幅 DNA を用いて同様のライブラリー作製およびシーケンスを行い比較標準とした。*C. elegans* のゲノム DNA 10ug を数マイクログラムに増幅し、各ライブラリーを作成し、次世代シーケンスリードを獲得した。得られた NGS リードをリファレンスゲノムにマッピングし、増幅均一性 (カバレッジ)、一塩基多型 (SNPs)、キメラ構造 DNA の生成について検討した。その結果、全ゲノム増幅による一塩基多型への影響

はあまり大きくないこと、リピートが多く含まれるゲノム領域での増幅が一定にならないこと、ライブラリーサイズが大きい場合には増幅時に作成されるキメラ DNA がライブラリー品質に大きな影響を与えることを明らかにした。

26 年、27 年度は、昨年度までにモデル線虫で確立した 1 個体からの WGA シーケンシング法を他線虫に適応し、集団における個体の多様性を全ゲノムレベルで検出することを試みた。動物寄生線虫である *Strongyloides ratti*, *Strongyloides venezuelensis* 線虫に感染したラットの糞を 2 % 寒天培地上でインキュベートし這い出した感染幼虫をワームピッカーを用いて Worm Lysis Solution を含むチューブに各 1 個体ずつ移動した。線虫溶解液の一部を WGA 反応に供し、得られた増幅 DNA を用いてシーケンスライブラリ (Nextera) を作成した。次世代シーケンサー (Miseq, Illumina) で獲得したリードをリファレンスゲノムにマッピングし、SNP、Indel、CNV の検出を行うことができた。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

1. Tsai IJ, Hunt M, Holroyd N, Huckvale T, Berriman M, Kikuchi T. Summarizing specific profiles in Illumina sequencing from whole-genome amplified DNA. *DNA Research*. 2014;21(3):243-54.

2. Bird DM, Jones JT, Opperman CH, Kikuchi T, Danchin EG. Signatures of adaptation to plant parasitism in nematode genomes. *Parasitology*. 2015;142(S1):S71-84.

3. Laing R, Kikuchi T, Martinelli A, Tsai IJ, Beech RN, Redman E, Holroyd N, Bartley DJ, Beasley H, Britton C, Curran D. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol*. 2013;14(8):R88.

4. Jones JT, Haegeman A, Danchin EG, Gaur HS, Helder J, Jones MG, Kikuchi T, Manzanilla López R, Palomares Rius JE, Wesemael WM, Perry RN. Top 10 plant parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 2013;14(9):946-61.

5. Hunt M, Kikuchi T, Sanders M, Newbold C, Berriman M, Otto TD. REAPR: a universal tool for genome assembly evaluation. *Genome Biol*. 2013;14(5):R47.

6. Cotton JA, Lilley CJ, Jones LM, Kikuchi T, Reid AJ, Thorpe P, Tsai IJ, Beasley H, Blok V, Cock PJ, Eves-van den Akker S. The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. *Genome Biol*. 2014;15(3):R43.

7. Palomares-Rius JE, Hirooka Y, Tsai IJ, Masuya H, Hino A, Kanzaki N, Jones JT, Kikuchi T. Distribution and evolution of glycoside hydrolase family 45 cellulases in nematodes and fungi. *BMC evolutionary biology*. 2014;14(1):69.

8. Tsai IJ, Tanaka E, Masuya H, Tanaka R, Hirooka Y, Endoh R, Sahashi N, Kikuchi T. Comparative genomics of *Taphrina* fungi causing varying degrees of tumorous deformity in plants. *Genome biology and evolution*. 2014;6(4):861-72.

9. Tanaka R, Hino A, Tsai IJ, Palomares-Rius JE, Yoshida A, Ogura Y, Hayashi T, Maruyama H, Kikuchi T. Assessment of helminth biodiversity in wild rats using 18S rDNA based metagenomics. *PloS one*. 2014;9(10):e110769.

10. Palomares-Rius JE, Kikuchi T. -Omics fields of study related to plant-parasitic nematodes. *Journal of Integrated OMICS*. 2013;3(1):1-0.

11. Palomares-Rius JE, Tsai IJ, Karim N, Akiba M, Kato T, Maruyama H, Takeuchi Y, Kikuchi T. Genome-wide variation in the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and its relationship with pathogenic traits. *BMC genomics*. 2015;16(1):1.

12. Kikuchi T, Cock PJ, Helder J, Jones JT. Characterisation of the transcriptome of *Aphelenchoides besseyi* and identification of a GHF 45 cellulase. *Nematology*. 2014;16(1):99-107.

13. Hino A, Tanaka T, Takaishi M, Fujii Y, Palomares-Rius JE, Hasegawa K, Maruyama H, Kikuchi T. Karyotype and reproduction mode of the rodent parasite *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitology*. 2014;141(13):1736-45.

14. Takeuchi T, Yamaguchi M, Tanaka R, Dayi M, Ogura N, Kikuchi T. Development and validation of SSR markers for the plant-parasitic nematode *Subanguina moxae* using genome assembly of Illumina pair-end reads. *Nematology*. 2015;17(5):515-22.

15. 大胡聖嗣, 竹内智昭, 菊地泰生, 小倉信

夫. 日本産ヨモギツブセンチュウの ITS1-5.8 SrDNA-ITS2 領域の塩基配列の解析. 日本線虫学会誌. 2014;44(2):49-53.

〔学会発表〕(計 0 件)
未集計

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 泰生 (Taisei Kikuchi)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：20353659