

受理年月日	受理番号

帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5月 29日

採択番号	30-共同-12		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	玄学南
研究課題名	フタトゲチマダニゲノムがコードする遺伝子の機能予測		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	やまぎしじゅんや 山岸潤也	北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・准教授 (役割分担) シーケンシング、バイオインフォ解析	
研究分担者	しらふじりか 白藤梨可	帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教 (役割分担) フタトゲチマダニ試料およびトランスクリプトームデータの提供	
	(原虫研共同研究担当教員名) 玄学南	帯広畜産大学・原虫病研究センター・教授 (役割分担) 研究助言	
研究期間	平成30年4月1日 ~ 平成31年3月31日		
目的・趣旨	<p>吸血性節足動物であるマダニ類は、吸血自体による不快感・障害に加え、SFTSV(重症熱性血小板減少症候群ウイルス)、クリミア・コンゴ出血熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、回帰熱、ボレリア類等を媒介するベクターとしても軽視することのできない衛生害虫である。国内のマダニ類では、フタトゲチマダニ(<i>Haemaphysalis longicornis</i>)が優占種の1つとされ、SFTSVの他、Q熱(コクシエラ)、日本紅斑熱(リケッチア)の病原体を媒介する。さらに、バベシア原虫のベクターでもあり、人のみならず、畜産業にも多大な経済的被害をもたらしている。これらの対策立案を想定した際、マダニのゲノムは、疫学・殺ダニ剤開発・組換えマダニワクチン開発等、広範囲にわたる研究・開発を行う上での基盤情報となりうるが、国内優占種であるフタトゲチマダニについては、ゲノム情報に関する基盤整備が極めて不十分であるのが実情である。この様な背景から我々は、帯広畜産大学で長期にわたり維持されているフタトゲチマダニのコロニーを材料に、ドラフトゲノムの解析に着手した。</p>		
研究経過の概要	<p>これまで、Illumina社製次世代シーケンサーを用いて、142Gbのフタトゲチマダニ由来配列を取得している。しかしながら、k-mer法から、そのゲノムサイズは8.3-8.8Gbと推定され、一般に<i>de novo genome assembly</i>に必要なx30~x50の深度に満たないことが判明した。実際に、ABYSSを用いてアセンブルを試みたが、得られたゲノムは、最も良い成績でも総塩基6.3Gb、contig数20.7M、N50が701bpと、向上の余地を大きく残すものであった。</p> <p>そこで今回、同じくIllumina社製次世代シーケンサーで、146Gbの塩基を追加取得し、基準であるx30を上回るデータの取得に成功した。さらに、近年利用可能となった超長鎖出力を可能とする次世代シーケンサーMinIONを導入、3回のRunにより4.5Gbを取得した。これらを材料に再度<i>de novo genome assembly</i>を試みたが、巨大なデータの使用に解析サーバーが耐えられず、これまでのところ良好な結果は得られていない。現在、解析パイプラインの見直しによる計算の効率化、MinIONリードの追加取得と断片からの遺伝子予測の可能性を検討している。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の 概要</p>	<p>研究分担者の白藤博士よりフタトゲチマダニより精製したゲノム DNA の供与を受け、ケミカル同仁社が提供する次世代シーケンシング受託サービス”GeneNex”を利用し、150 塩基ペアエンド計 146.1Gb、891 Mreads の塩基配列を得た。これに前年度までに取得した 141.6Gb を加えた 287.7 Gb、1.89 Greads を <i>de novo genome assembly</i> を行うためのデータとして用意した。これは、8.3-8.7 Gb と推定されるフタトゲチマダニゲノムの x33~x35 の深度にあたり、十分なデータ量と考えられる。そこで、最初に Quality trimming を行い、質の保たれた 265.7 Gb、1.83 Greads を確保した。次に、ABYSS を用いて、assembly を試みたが、恐らくメモリ不足により結果を得ることはできなかった。</p> <p>一方で近年、超長鎖配列の出力を可能とする次世代シーケンサー、MinION の利用が可能となった。この超長鎖配列は <i>de novo genome assembly</i> において、integrity の向上に大きく寄与することが知られている。そこで、本研究においても、本シーケンサーを利用し、FLO-MIN106 を 1 枚、FLO-MIN107 を 2 枚の計 3 枚を用いて 4.5 Gb、3.3 Mreads を取得した。しかしながら、今回取得した総データ量はフタトゲチマダニの推定ゲノムサイズにも満たず、<i>de novo genome assembly</i> に用いるには、追加データの取得が必要と考えられる。</p> <p>今後、フタトゲチマダニの <i>de novo genome assembly</i> を成功させるために、以下の方法が考えられる。まず、MinION を用いた超長鎖配列の追加取得については、コストパフォーマンスに優れる PromethION の利用を視野に入れる。一方、Illumina 社製次世代シーケンサーで取得した短鎖配列については、十分なデータ量を取得しているため、情報解析方法を工夫する必要がある。具体的には、北海道大学情報基盤センター大型計算機システムの利用、BBnorm を用いた短鎖配列のカバレッジのノーマライズによるデータ量のダウンサイジング、Velvet 等の ABYSS 以外のアセンブラーの使用が考えられる。とくに情報解析は大きな予算を必要としないため、プロジェクト終了後も継続して進めていきたい。</p>
<p>研究成果の 発表</p>	<p>特記事項無し</p>