



長引いた寒さもようやく緩んできました。
新しい季節が光溢れるものでありますように



新規導入機器 –Sequel IIeの紹介–

今年度、新たにPacbio社の次世代シーケンサー、Sequel IIeを導入しました。これに関して12/24にテクニカルセミナー「高精度ロングリードシーケンスが切り拓く非モデル生物の超階層生物学基盤」をオンライン開催し、60名ほどの方々にご参加頂き、大変盛況でした。ご参加頂いた方々ありがとうございます。

Pacbio社の次世代DNAシーケンサーはいわゆる第3世代、すなわち1分子をそのままシーケンスするタイプで、これまで2012年よりRS II→Sequelと運用してきました。今回のSequel IIeは最新機種です。

ZMW (Zero-mode waveguides) と呼ばれる光の波長より狭い容量の小孔の底面に、DNA polymeraseと鋳型となる環状一本鎖DNAのシーケンスライブラリーを設置し、塩基ごとに異なる蛍光ラベルされたヌクレオチドが、polymerase反応によって取り込まれる瞬間のみに検出される蛍光で塩基配列を決定していきます。

現在、多種多様な次世代シーケンサーが販売されていますが、PacBio社の優れた特徴は、塩基配列による読まれやすさや精度に偏りがありません。

Sequel IIeではpolymerase反応のスキャン時間を30時間（従来機は10-20時間）まで可能にし、環状一本鎖DNAのシーケンスライブラリーを何度もループ的に繰り返しシーケンスする（CCS: circular consensus sequence）ことで、シーケンス精度を大きく向上させたものとなっています。元々、第3世代のシーケンサーは1分子を特殊な技術（PacBio社の場合、ZMWに関連する技術）で、頑張ってシーケンスするもので、増幅したクローン配列集団を対象にシーケンス反応を行うショートリードの第2世代シーケンサーと比較すると、シーケンス精度が低い欠点がありました。

これらの欠点をCCSで克服し、ロングリードと高精度を両立させた、新しいタイプのシーケンサーといえるかと思えます。

Sequel IIeで主に行われるアプリケーションを3つ挙げ、本機の優位性を説明します。

<全ゲノムシーケンス>

上記の技術革新により、全ゲノムシーケンスのアセンブル結果は俄然繋がりの良いものが達成できます。

ゲノム配列上には類似の配列が多々存在し、ショートリードシーケンスのアセンブルでは、繰り返し配列の部分が繋げず、短いcontigが多数得られる結果になります。ロングリードのシーケンスはこのアセンブルでのつながりを長くするのに効果的ではありますが、繰り返し配列の微妙な違いを識別しうるほどの精度はなく、結局その部分で間違えてアセンブルしてしまうケースも見られました。高精度なロングリード配列により、微妙な違いを正しく識別してアセンブルしていくことが可能で、繋がりよく、またアリアルを識別してアセンブルすることが可能となっています。



Sequel IIeは従来機Sequelと比較し、ZMWの数が100万から800万と8倍になっています。またadaptive loadingという技術により、従来手法ではライブラリー濃度を調整して、個々のZMWに1分子のpolymeraseのみが入ったP1率と呼ばれる指標を最適化する試行錯誤が必要だったのですが、これが自動でできる状況になりました。



adaptive loadingはZMWへのライブラリーのloading状況をリアルタイムでサーベイし、適切な濃度になったところでloading作業を止めることで、最適な条件を達成できます。こちらでの初期運用ではP1率73-79%程度、すなわち800万のZMWの3/4程度が実際シーケンスに利用できる状況が確認されました。従来機では条件検討を事前に行ってもせいぜい50%程度だったので、このスループット差は絶大です。当然これはシーケンスコストにも反映することになります。

<Iso-Seq>

Iso-SeqはSMARTer法で全長mRNAから作製するcDNAライブラリーをそのままロングリードシーケンスする手法です。アセンブル作業は不要で、そのままスプライズバリエーションごとの全長配列を決定できてしまうものです。

一方、従来機の100万ZMWではスループット不足で、トランスクリプトやスプライズバリエーションの網羅的な検出には、数ランが必須でかなりコストのかかる実験でした。Sequel IIeで800万ZMWになったことで、1ランで一通りの解析を見るのに適度なスループットが確保出来るのではないかと思います。

<Single cell Iso-seq>

当室では10x genomics社のchromiumも運用をしています。今回は紙面の都合で触れませんが、こちらでも最新のchromiumXを導入しています。

この10x genomics社の技術で作製したsingle cellベースでのトランスクリプトームライブラリーに工夫を加え、最終的にSequel IIeでシーケンスすることでsingle cellベースのIso-Seqが達成できるという報告がいくつか出て来ています。

10x genomics社のsingle cellベースのトランスクリプトームに関して、現状では逆転写からcDNA化までのキャプチャー効率の性能上、cellに含まれるすべてのトランスクリプトを網羅的に検出するには至りませんが、ある程度の発現があるトランスクリプトならcell typeによるスプライズバリエーションの変動も解析可能な状況です。このアプリケーションはまだ、こちらでは実施しておりませんが、ご興味ある方は是非ご相談下さい。（山口）

テクニカルセミナー開催のご案内

徳島大学先端酵素学研究所と基礎生物学研究所の連携セミナーにて紹介されました徳島大学 小迫英尊教授の質量分析に関連する取り組みをテクニカルセミナーにて更に詳しくお伺いできる機会をいただきました。

本セミナーは、両研究所間の連携の取組としても開催し、当室の機器及び質量分析体制も紹介します。

<生物機能情報分析室 テクニカルセミナー>

日時：2022年3月25日

15:30- 15:35

はじめに

NIBB生物機能情報分析室 重信 秀治 教授

15:35- 16:35

近接依存性バイオチン標識 (BioID) 法による生体内タンパク質間相互作用の大規模解

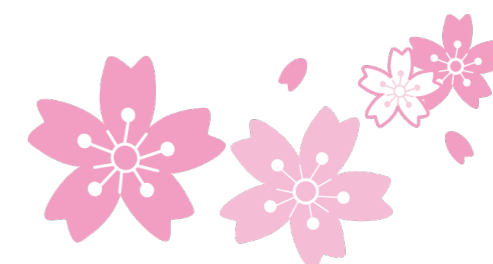
徳島大学 小迫 英尊 教授

16:35- 16:45

当室の機器及び質量分析体制の紹介

NIBB生物機能情報分析室 牧野 由美子 技術職員

詳しくは、チラシ・メールをご覧ください。（森友子）



あとがき

おこもり生活の中ですが、古本屋さんには度々通ってしまいます。最近時代小説！時を超えてお江戸の街中を旅しております。（浅尾）

アボカドの再生農業に挑戦していたのですが、冬の間部屋に入れていたら、猫たちに丸はげにされていました。今度、猫草でも買って帰ろうかと思えます。（森祥伍）

