

研究相談から技術指導まで ～共用機器を活用した学内研究推進活動～

時空間
ゲノミクス



時空間
ゲノミクス



時空間
ゲノミクス



時空間
ゲノミクス



ゲノミクス解析支援チーム
20190121 新共用システム成果報告会

琉球大学の強み . . . 地域性を活かした生命医科学

強みを延ばすためには、次世代シーケンシング (NGS) をはじめとする最先端技術の応用は不可欠

小さな講座で先端技術の導入や技術の維持は難しい . . .

全学的な取り組みが必要

「時空間ゲノミクス」プロジェクト

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/anthropology/jikuukan/>

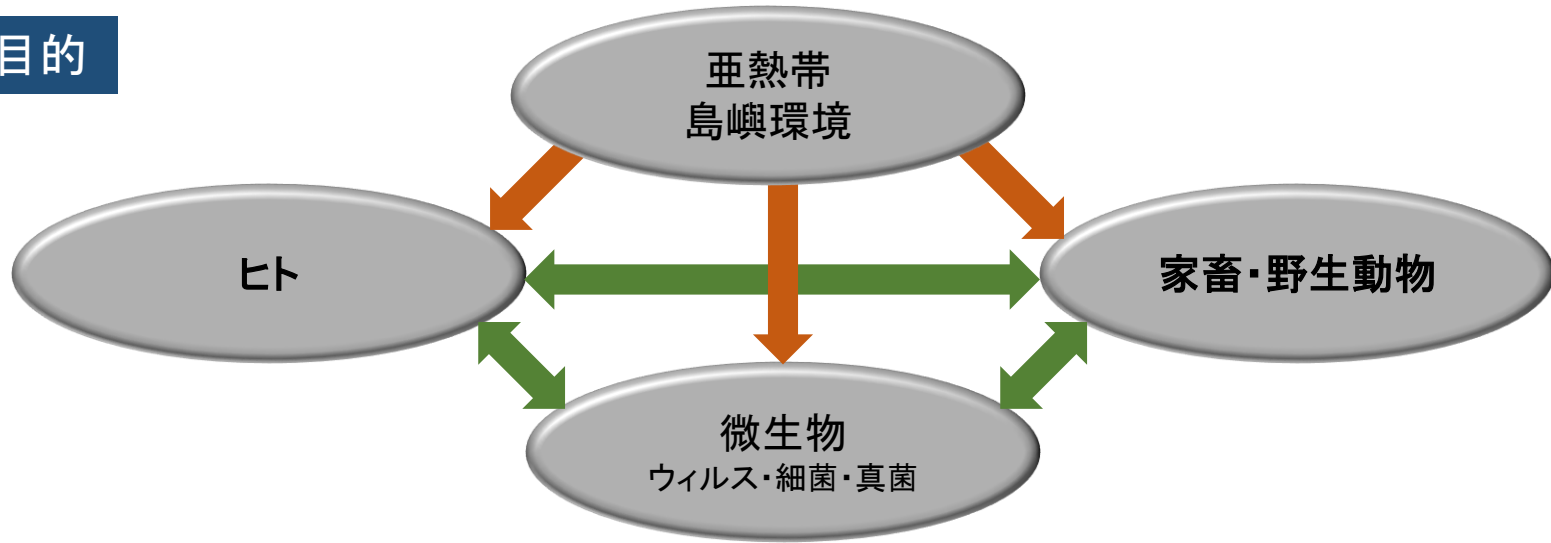
- 最先端ゲノミクス解析技術を導入・維持する専門家集団の形成
- ゲノミクス解析の技術的支援 . . . 請負でなく、あくまでサポート
- NGSの試運転資金の援助

NGS導入のハードルを下げる

亜熱帯島嶼の時空間ゲノミクス

— 環境・微生物・家畜・ヒトの相互作用から疾病の内因と外因を探る —

研究目的



- 亜熱帯島嶼という物理環境
- 家畜および在来の野生動物

- ウィルス・細菌・真菌(カビ)などの微生物
- ヒト

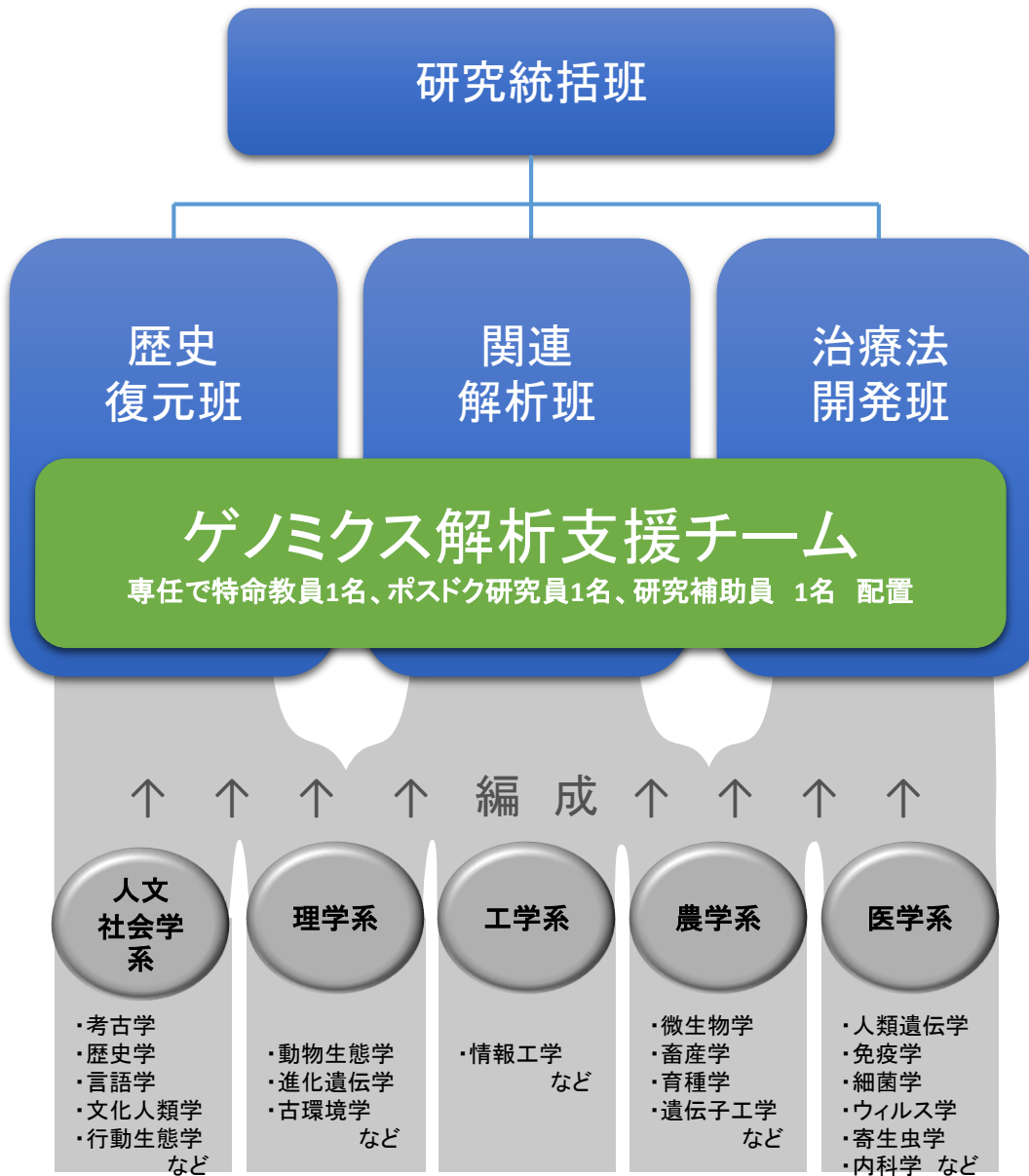
の相互作用を時間(歴史・進化)と空間(分布)の観点から検証して、
現代の疾患構造を理解し、医療に活かすことを目的とする。

① 琉球諸島における過去の人々の営みを考古学や歴史学のみならず、ヒト・微生物・家畜のゲノム解析を通じて総合的に紐解く

② 疾患感受性について遺伝要因と環境要因を特定し、疾患を集団形成や遺伝適応の観点から理解する

③ 感染症・アレルギー性疾患・がん・自己免疫疾患・遺伝子疾患・生活習慣病などの予防法・治療法を確立する

研究実施体制



学際的研究領域を創成し、既成の分野・部局の枠を超えた異分野融合型研究拠点を形成する。独立した卓越大学院の設置を将来的に見据えつつ、教育における部局間の柔軟化も図る。

主な研究協力機関

沖縄科学技術大学院大学

沖縄総合科学研究所

沖縄県立博物館・美術館

沖縄県埋蔵文化財センター

東京大学大学院
新領域創成科学研究科

ゲノム解析支援チーム

青山	洋昭	(戦略プロ・特命助教)
伊佐	睦実	(医・技術補佐)
今村	美菜子	(医・准教授)
岡崎	威生	(工・准教授)
木村	亮介	(医・准教授)
佐藤	行人	(戦略プロ・特命講師)
新里	尚也	(熱生研・准教授)
名嘉村	盛和	(工・教授)
藤本	真悟	(戦略プロ・ポスドク研究員)
松波	雅俊	(医・助教)
矢口	甫	(熱生研・ポスドク研究員)
和智	仲是	(島嶼地域・ポスドク研究員)

- NGS関連の実験計画・ドライ解析・ウェット解析, その他情報解析の支援
- 戦略プロジェクト研究「エコモルフォロジー」や個別研究も支援

支援内容の調書

琉球大学 ゲノミクス解析支援 研究推進計画書（平成30年度）

氏名・職名	琉球 太郎 ・ 理学部 助教
部局・研究室	生物科学科 ・ 海洋生物学分野
Email アドレス	ryutaro @ kaiyo.u-ryukyu.ac.jp
研究題目	琉球諸島の海洋生物ゲノミクス手法の基盤確立
監督者（PI）の 氏名・職名	沖縄 本島・教授（自身がPIの場合は不要）
支援番号・受理日 ※センターで記入	PJ- ; 年 月 日

研究の概要

研究の（1）背景、（2）着眼と目的、（3）材料・方法、（4）進捗状況（または準備状況）を簡潔に記載ください。

（1）背景:

琉球列島は我が国で唯一の亜熱帯性海洋に囲まれた環境。多くの海洋生物のゲノミクス解析により、気候変動に応じた遺伝子発現およびゲノムレベルの適応現象が研究可能になる。

（2）着眼と目的:

まだゲノミクス解析が進んでいないアオサンゴおよびミドリウミウシに着目して、ヒートショック蛋白遺伝子の網羅的レパートリー決定と遺伝子発現解析を行う。

（3）材料と方法:

アオサンゴ *Tektou sango* およびミドリウミウシ *Tektou umiushi* 各 10 個体を春・夏・秋・冬に何渡河島で採取。Rad-seq および RNA-seq 網羅解析を実施。

（4）進捗状況:

サンプル採取と発現解析が完了し、モデルサンゴでのゲノム編集による実証実験の準備中

今後の計画と目指す成果

研究を継続することで目指す成果と、実現するための計画（具体的でも希望・イメージでも可）を記載ください。

成果目標:

- （1）アオサンゴのゲノムおよび発現解析の論文化
- （2）ミドリウミウシの遺伝子機能解析結果の論文化
- （3）ゲノムデータベースおよびプログラムのオンライン公開

計画:

- （1）ゲノム編集による遺伝子機能実験
- （2）ゲノムアノテーションのデータベース化
- （3）

支援を希望する内容

ゲノミクス解析支援を希望する内容（実験およびデータ解析）や、試薬や経費などについて記載ください。

実験における支援:

- （1）DNA/RNA ハイブリッドサンプル調製
- （2）MiSeq による 1,200 万リード配列決定
- （3）qPCR による遺伝子発現定量解析

データ解析における支援:

- （1）MiSeq データのデータベース照合解析と行列化
- （2）遺伝子発現データの多変量解析
- （3）ゲノム情報のデータベース作成

関連業績・引用文献

記載した内容について、申請者の業績がある場合には下線を付けて記載ください。引用文献も記載可能です。

- [1] Ryukyu, T. & Okinawa, H. (2016) A quantitative protocol for DNA metabarcoding. *Genome*, 60(1), 715–720.
- [2] Ryukyu, T. & Okinawa, H. (2015) Gene expression of tropical tree after cold temperature exposure. *PLoS Tree*, 40(2), 512.
- [3] Ryukyu, T., Tokyo, N., & Okinawa, H. (2014) An efficient sequencing of endosymbiont genomes. *Microbes*, 30(3), 210–215.

赤字の例を消去してご記入ください。記入欄のサイズは自由に動かしながら、全体で2ページに収めてください。

実際の支援

■ 実験計画

- ・ 解析に必要なサンプルの質・量・数
- ・ NGS解析でどのくらいのスループットが必要か
(共用のMiSeq or HiSeqを業者委託)

など

■ ウェット解析

- ・ DNA・RNA抽出、ライブラリー作成、NGSのラン
- ・ 新規プロトコルの開発

など

経験の共有←はじめての実験には失敗がつきもの
試薬の共有←個別で購入するよりもコストダウン

■ ドライ解析

- ・ 様々な情報解析
- ・ 解析サーバの運用

など

知識の共有←日進月歩の解析技術を個人で勉強するのは大変

共用機器の有効活用

- 例えば次世代シーケンサーのような機器の場合、設置しただけでは、利用者は限定される。
- 運用・指導のための人材が必要。
- 全学の研究基盤センター、医学部の機器センターの人員拡充あるいは、一般の教員を巻き込んだ全学的な共用機器運営のための仕組みづくりが今後必要不可欠。

亜熱帯棟（亜熱帯島嶼科学拠点研究棟）における
DNA 分析に立脚した生態・進化、総合生物学

ゲノクス解析支援チーム

ヒト・医学

人類学



医学部
(木村)

微生物

細胞生物学



分生研
(新里)

動物・環境生態

人獣共通感染症



亜熱帯棟
(佐藤)

DNA 分析 + コンピュータ解析

21世紀、生物学分野での大きな技術革新

DNA 解読機器『次世代シーケンサー』



- 従来機： ヒトゲノム 30 億文字の解読に、143 年かかる（57,600塩基/日）
- 次世代シーケンサー： 1日の運転で、ヒトゲノムを 20 回解読（600 億塩基/日）

桁違い(10^6)の DNA データ産生力

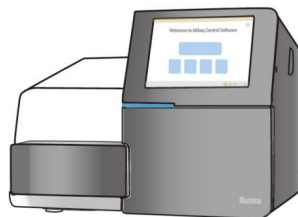
DNA 解読機器『次世代シーケンサー』



- 2004年：最初の論文（ヒトゲノム解読; USA）
- 2006年～我が国でも普及：国立遺伝研、理化学研究所、東大、・・・

演者：2009年から、科研費（若手B）で活用始める

- 2012年～小型機種が普及：多くの研究機関で、活用が広まる



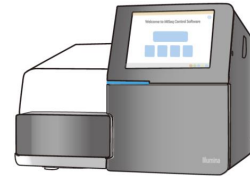
演者：2016年から、本学・戦略的研究プロジェクトセンター

遺伝・生態・進化 → 生物圏の総合理解

従来の DNA 分析

遺伝解析 = 生物の内的要因

次世代シーケンサー



環境・生態 DNA 分析 = 外的要因

遺伝子型



表現型

疾患変異



疾病

突然変異



進化



捕食者、競合種

病原体、宿主

分布、増減、(遺伝的変化)

亜熱帯棟で支援する学内研究

琉球列島シロオビアゲハの擬態進化

(農学部・辻先生、鶴井助教ら)

希少種ミヤコカナヘビの集団系統地理

(熱生研・戸田先生、島嶼研・和智さんら)

南西諸島ホソバワダンの大量SNP集団解析

(教育学部・齋藤助教)

日本列島アカハライモリの大量SNP集団解析

(教育学部・富永先生ら)

日本列島サッポロフキバツタの大量SNP集団

解析 (農学部・立田先生ら)

レプトスピラ菌と宿主の環境DNA解析

(医学部・クラウディア先生ら)

沖縄希少種の環境DNA検出 (熱生研・戸田

先生ら、教育学部・富永先生ら、ほか)

沖縄希少動物の食性DNA解析 (理・伊澤先

先生ら、熱生研・戸田先生ら、ほか)

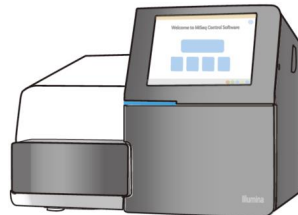
アグー豚の腸内細菌叢解析 (農学部・平良

先生ら)

サンゴ共生藻の環境DNA解析 (分生研・依藤

さんら)

遺伝子/ゲノム ↔ 生物個体/集団 ↔ 環境・生態



亜熱帯棟 DNA実験スペース



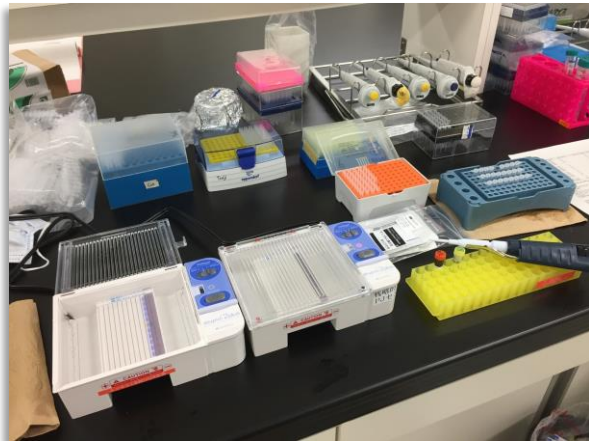
環境水ろ過



ハイパークリーン
DNAベンチ



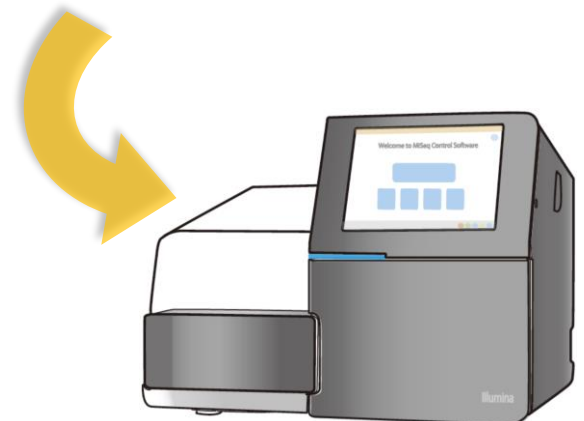
DNA 増幅機
(PCR マシン)



DNAサンプル調製



分注ロボット



次世代シーケンサー

環境 DNA 分析（魚類、動物）のプログラムを オンライン公開、論文化

MiFish Pipeline Start Workflow MitoFish Overview References Contact Us MiFish DB V

Overview

MiFish pipeline accepts a sequence data file in FASTQ (paired-end or single file) or FASTA format. If the input file is in FASTQ format, quality check, concatenation of paired-end sequences (if necessary), removal of unreliable sequences (including those with possible base call errors and those of atypical lengths), removal of primer sequences are performed.

After clustering of identical sequences, BLASTN searches are performed against the reference fish sequence database (currently containing more than 6,600 fish species).

For sequences that had hits with >97% similarity, species (or genus) name list with reliability information is shown. For sequences that do not had hits with >97% similarity, they are separately analyzed and provided for additional in-depth analysis.

In addition, species diversity analysis, principal component analysis, cluster analysis, phylogenetic analysis by the neighbor joining method can also be run for further analysis.

The following list is the external programs used in MiFish pipeline.

Quality check of FASTQ file: **FastQC** (FastQC Website)

Tail trimming: **SolexaQA** (BMC Bioinformatics. 2010, 11:485.)

Paired-end read assembly: **FLASH** (Bioinformatics. 2011, 27:2957-63.)

Primer removal: **TagCleaner** (BMC Bioinformatics. 2010, 11:343.)

Read clustering: **Uclust/usearch** (Bioinformatics. 2010, 26:2460-2461.)

Detection of chimeric sequences: **UCHIME** (Bioinformatics. 2011, 15:2194-2200.)

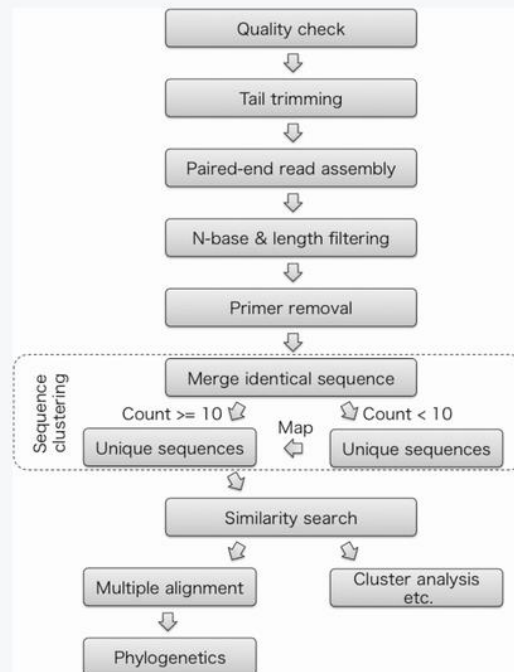
Sequence similarity search: **BLAST+ version 2.2.29** (BMC Bioinformatics. 2008, 10:421.)

Multiple alignment: **MAFFT** (Mol. Biol. Evol. 2013, 30: 772-780.)

Phylogenetic analysis: **Morphy** (J. Mol. Evol. 1995, 40: 622-628.)

References

If you use our tools, please refer to our [relevant papers](#).



ACCEPTED MANUSCRIPT

MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding

Yukuto Sato ✉, Masaki Miya, Tsukasa Fukunaga, Tetsuya Sado, Wataru Iwasaki ✉

Molecular Biology and Evolution, msy074, <https://doi.org/10.1093/molbev/msy074>

Published: 14 April 2018 Article history ▼

PDF Cite Permissions Share ▼

Abstract

Fish mitochondrial genome (mitogenome) data form a fundamental basis for revealing vertebrate evolution and hydrosphere ecology. Here, we report recent functional updates of MitoFish, which is a database of fish mitogenomes with a precise annotation pipeline MitoAnnotator. Most importantly, we describe implementation of MiFish pipeline for metabarcoding analysis of fish mitochondrial environmental DNA (eDNA), which is a fast-emerging and powerful technology in fish studies. MitoFish, MitoAnnotator, and MiFish pipeline constitute a key platform for studies of fish evolution, ecology, and conservation, and are freely available at <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/> (last accessed April 7th, 2018).

Keywords: database, fish, mitochondrial genome, metabarcoding, environmental DNA

Issue Section: Brief Communication

Sato, Miya, *et al.* 2018. *Mol Biol Evol*, 35, 1553–1555.