

# NGSハイブリダイゼーションキャプチャによる 標的病原体ゲノミクス

## 微生物ゲノムシーケンシングの現代技術の課題

次世代シーケンシング (NGS) は、微生物ゲノムや、複雑なサンプル中の微生物ゲノムを迅速に全ゲノムシーケンシングするための強力な方法です。しかし、関心のある微生物が存在する生物学的サンプルのほとんどは、微生物以外のDNAで占められています。そのため微生物ゲノムを正確に解析したり、微生物群集内の変異を完全に特徴付けるためには、非常に深いシーケンシングを必要とします。この問題に対し、シーケンス前にバックグラウンドに存在する非標的DNAをサンプルから除外するターゲットシーケンスは、サンプルごとのシーケンスおよびデータ分析の全体的なコストを大幅に削減します。通常、ターゲットシーケンスの濃縮には、部位特異的プライマーペアによるPCR増幅、または標的的特異的ビオチン化プローブによるハイブリダイゼーションベースのキャプチャで行われます。ウイルスまたは細菌株内及び株間の高度な配列変異を考えると、アンプリコン形成においてプライマーが適切に結合しない場合があります。したがってハイブリダイゼーションキャプチャは、現在、複雑なサンプル中のウイルスと細菌の両方において、包括的で費用対効果の高いシーケンシングにおける、現在最も汎用性の高い手法になります。

## ハイブリダイゼーションキャプチャとは何か

目的の微生物種を純培養できる場合、または宿主あるいは環境のバックグラウンド細胞から物理的に完全に分離できる場合、そのゲノムDNAは通常、事前にバックグラウンドDNAを除去せずに直接配列決定できます。ただし多くの実験においてこのアプローチは生物学的な様々な制約のために、または研究課題が *in vivo* データ構築を必要とするために実行不可能です。このような場合、これまでのNGSアプローチは、サンプルの全ショットガンシーケンスを実行するか（対象となる微生物ゲノムから得られるリードの割合はごくわずかである）、微生物のリード割合を増加させるターゲット増幅または他のアプローチをNGS前に実行することでした。どちらのシナリオでも、これらのアプローチの両方と比較して、ハイブリダイゼーションキャプチャは対象配列の多様性の損失を最小限に抑えながら、コストとバイオインフォーマティクスにおける大幅な利点があります。

ハイブリダイゼーションキャプチャは複雑な長いオリゴプールの柔軟な力を活用しNGSライブラリ内の目的の分子をターゲットにすることで機能します（図1）。

ハイブリダイゼーションキャプチャ技術は、まずNGSライブラリ（DNAまたはRNAシーケンス用）を変性させ、標的的特異的ビオチン化RNAプローブにハイブリダイズさせます。次にプローブ：ライブラリ複合体をストレプトアビジンコートした磁気ビーズに結合させ、非特異的結合したライブラリ分子を除去するために洗浄します。これらの「濃縮された」ライブラリを増幅することで、適切なNGSプラットフォームでシーケンスする準備が整います。

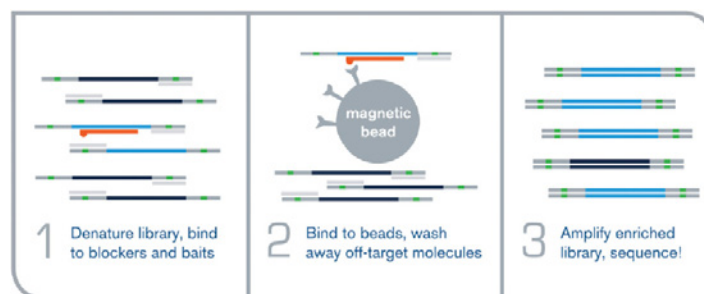


図1. 溶液内ハイブリダイゼーションキャプチャの概要

ビオチン化オリゴプローブがサンプル中のすべてのDNAから調製されたNGSライブラリ分子にハイブリダイズし、NGSの前にそのハイブリッド（ビオチン化オリゴプローブと標的分子）がストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ上に捕捉されます。

## ケーススタディ

ハイブリダイゼーション(Hyb)キャプチャの多くの利点が、微生物ゲノムの配列決定（特に小規模で多様なゲノムの配列決定）や株の同定に日常的に活かされています。

### 全組織DNAからのウイルス全ゲノムシーケンス

感染性ウイルス株の同定は、特にその株が新規であるか、以前に観察されていなかった特徴を示す場合示す場合には、全ゲノム配列決定が有効であることが多くあります。ただし、宿主または細胞培養サンプル中のDNAの大部分は非ウイルス源に由来します。Forthら（2019年）において、dsDNAウイルスアフリカ豚コレラウイルス（ASFV）の大型ゲノム（最大191 Kbp）が、培養細胞とブタ脾臓組織の両方からHybキャプチャを使用して効果的に取得されました。Hybキャプチャによりショットガンシーケンスに比べてウイルスDNAの割合が100倍以上増加し（図2）、わずかなシーケンスで高カバレッジゲノムの生成や、ウイルスバリエーションの調査などのさまざまな分析が可能になりました。

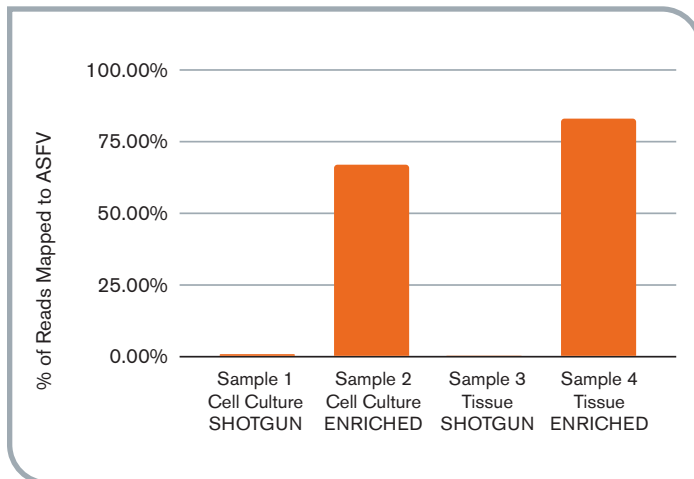


図2. 濃縮サンプル（細胞培養および組織）で観察されたASFVの高い比率。Forthら（2019）に提示されたデータに基づきます。

### 環境DNAからの病原体ゲノムシーケンス

病原性細菌は、通常、自然環境では低存在量ですが、伝染病が発生する可能性のある感染源となります。超低濃度な株の検出と特性評価は、大規模感染の予防と治療における重要なツールとして役立ちます。Vezzulliら（2017）は、他のDNA源の非常に多様なバックグラウンドに埋もれているにもかかわらず、Hybキャプチャを用いることにより、特定の病原性因子を含む超低頻度のコレラ菌ゲノムを河川原水から取得できることを示しました（図3）。これらの細菌は非常に少ないため、組織培養や従来の分子生物学的手法では研究できなかったでしょう。

### なぜ微生物配列決定のためにハイブリダイゼーションをキャプチャするのですか？

- 高度に分岐した分子でも効率的に回収可能
- DNAまたはRNA（cDNA）のどちらから構築されたかにかかわらず、あらゆるNGSライブラリに対応
- あらゆるタイプの突然変異を再構築する：SNP、InDel、または再編成
- プラットフォームに依存しない：ショートリードシーケンスとロングリードシーケンスの両方に同じキットを使用します

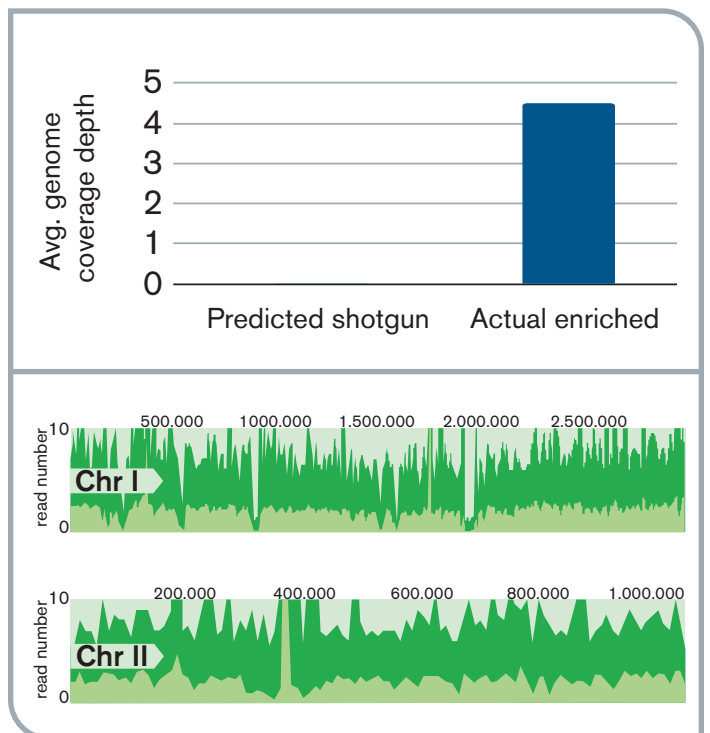


図3. 河川水におけるコレラ菌DNAの効果的なゲノム全体の濃縮。Vezzulliら（2017）は、濃縮アプローチはショットガンシーケンスの場合よりも~2500倍効果的であると推定しました（ショットガンでのゲノムカバレッジの平均が0.0018Xに対して濃縮では4.5X）。下の図はVezzulli et al.（2017）、736ページ、図2を引用したものです。

## 包括的な16S rRNAメタゲノムプロファイリング

16S rRNA遺伝子座は、細菌群集のプロファイリング研究によく用いられるターゲットです。その複数の可変領域をシーケンスすることで、メタゲノム研究において広範な種レベルの解像度を得ることができます。しかし、「普遍的な」16Sアンプリコン法にはバイアスがかかることが知られており、16Sまたは全ショットガンメタゲノムディープシーケンスはコストが高く、シーケンスだけでなく解析にも時間を必要とすることがある。Baudryら（2021）は、ゴールドスタンダードなショットガンシーケンスと同等のプロファイリング能力を有しながら、シーケンス費用と時間を大幅に削減することができる16Sハイブリダイゼーションキャプチャパネルが、2つの異なる手法の間の重要な「中間地点」を提供できることを示しました（図4）。

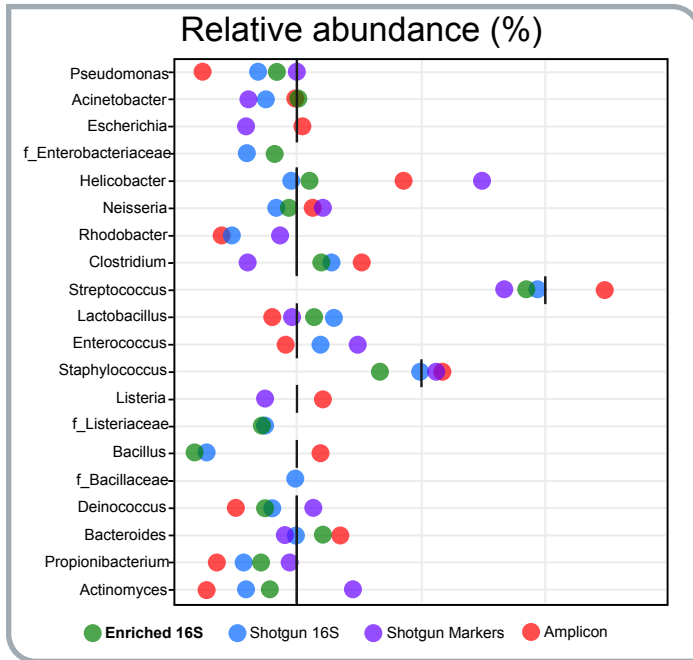


図4. 16Sハイブリダイゼーションキャプチャは、ショットガンアプローチと比較して必要なシーケンス深度の数分の一で、同様のデータを提供します。縦線はモックコミュニティサンプルにおける割合を示します。Beaudryら（2021）図3より引用。

## 抗菌薬耐性遺伝子シーケンス

抗菌薬耐性の病原性細菌の増加は、世界で最も差し迫ったグローバルな公衆衛生の脅威の1つと考えられています。Guitorら（2019）は、抗菌薬耐性遺伝子（ARG）「レジストーム」をターゲットとするHybキャプチャパネルを設計し、モックコミュニティサンプルと生物学的サンプルでその性能を評価しました。彼らは、myBaitsが包括的なARGプロファイリングを可能にするだけでなく、全メタゲノムショットガンシーケンスと比較してかなり低いリード深度で新規コンテンツを検出する効果的なツールであることを実証しました（図5）。

## % of Reads Mapping to Targeted Regions

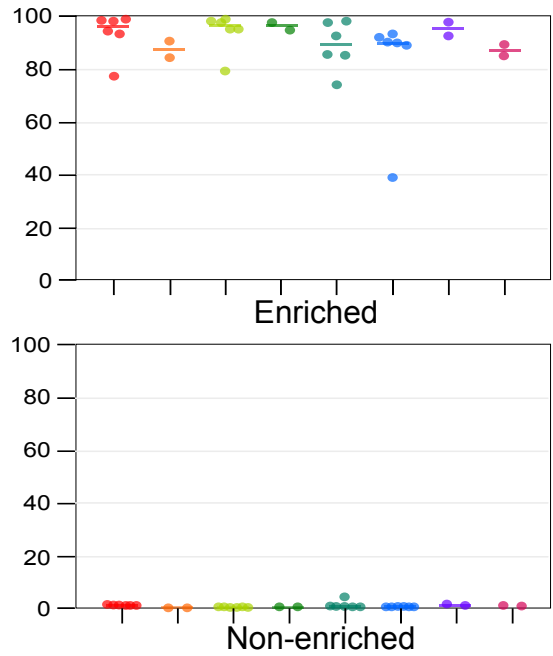


図5. ハイブリダイゼーションキャプチャは、ショットガンに比べて桁違いに高い標的特異性を提供します。4つまたは8つの異なるゲノムDNAのモック細菌コミュニティサンプルを用いた対照実験について、包括的な「レジストーム」ARGベイトセットによるmyBaits濃縮を行った場合（上）と行わなかった場合（下）で、8つの異なる標的領域にマッピングされたシーケンスリードの割合を示します。Guitorら（2019）図3Aより引用。

**myBaits**  
ハイブリダイゼーションキャプチャキット

- **適用性** - お客様のプロジェクトに合わせたプローブを設計します
- **シームレス** - NGSライブラリ調製とシーケンスの間に組み込みます
- **フレキシブル** - バリエーション探索だけでなく、リシーケンスにも最適
- **完全なキット** - myBaitsキットはHybキャプチャプロトコルに必要なすべての試薬が含まれます。
- **簡単** - 特別な装置やトレーニングは必要ありません
- **プラットフォームにとらわれない** - どのNGSプラットフォームにも適用可能です

## 古代ウイルスのゲノムDNAシーケンス

Hyb キャプチャの複雑なサンプルから非常に少ない微生物DNAを濃縮する能力に加えて、もう1つの重要な機能は、プローブ配列からの相対的に分岐したDNAを増加させ、損傷および分解した核酸をキャプチャする能力です。たとえば、考古学的または古生物学的サンプルではウイルスDNAは環境DNAおよび宿主DNAに侵されているだけでなく、化石形成プロセスによって大きなダメージを受けます。Dugganら (2016) は、約400年前のミイラからのほんのわずかな、断片化され残っていたゲノムフラグメントでさえも取得し、天然痘-痘瘡ウイルス (VARV) のゲノムシーケンスを完全に再構築することができました。もしターゲットエンリッチメントしなければ、シーケンシングだけで桁違いにコストがかかるような試みです (図6)。

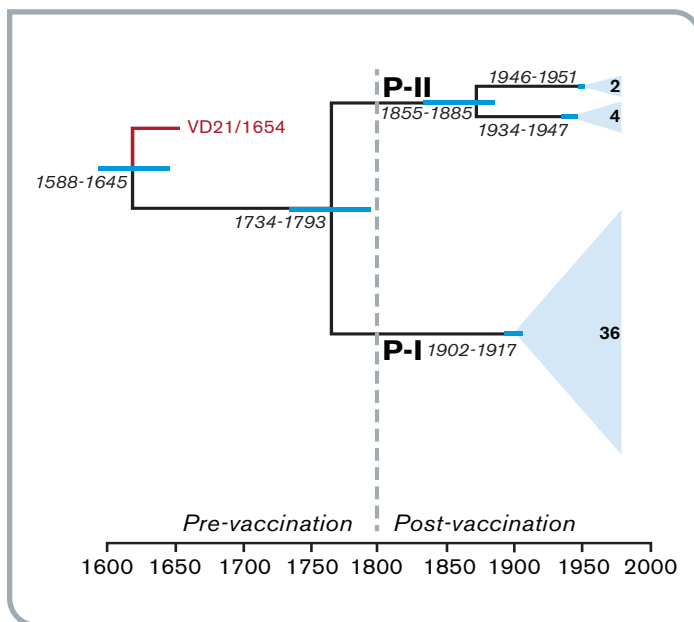


図6. 天然痘-痘瘡ウイルス (VARV) の時間スケールの進化的系統樹  
赤色: 16世紀の株, Dugganら (2016)、3410ページ、図3を引用。

## 外部寄生虫の宿主と病原体の同時シーケンス

新規疾患の感染源と感染経路はしばしば不明です。咬みつく節足動物のような外部寄生虫は病気の潜在的なベクターとして簡単に特定できますが、暫定的な病原体の感染源として機能する可能性のあるものを含む、その寄生虫の宿主の範囲を特定するのははるかに困難です。Campanaら (2016) によって実証されたように、Hyb キャプチャは、寄生虫の直近の血液摂取とその寄生虫に含まれる病原体スペクトルの両方を迅速かつ安価に特定する手段として役立ちます (図7)。このことは、宿主DNAが大部分である可能性のある複雑なDNAサンプルでの多種プロファイリングにおけるHybキャプチャの汎用性を強調しています。

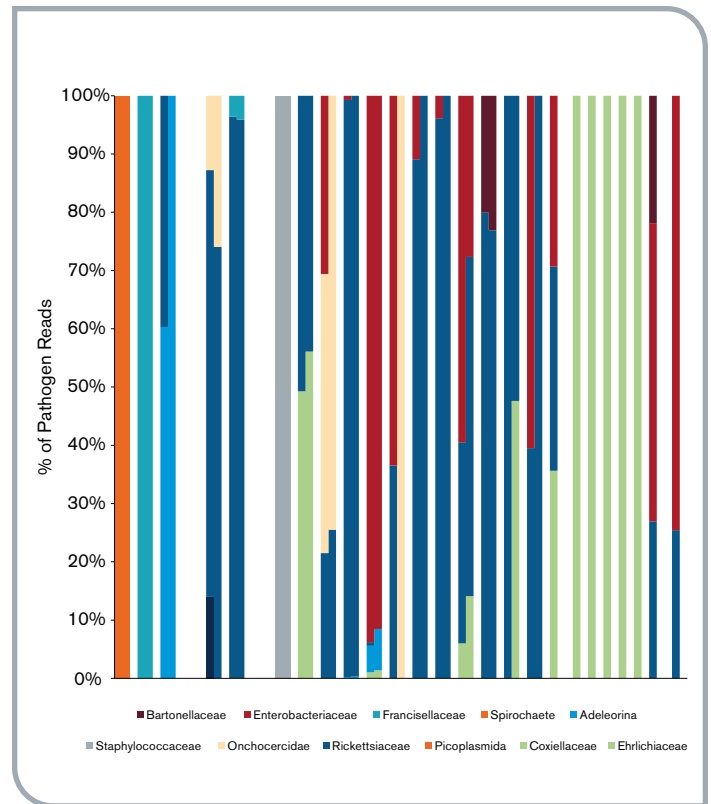


図7. ダニおよびノミのサンプルで同定された、共濃縮された病原体および大型寄生虫の豊富な分類群 Campanaら (2016年) 11ページ、図3からの引用。

## なぜハイブリダイゼーションキャプチャなのか

Hybキャプチャシステムには、マルチプレックスアンプリコンシーケンスなどの、別のターゲットシーケンスアプローチと比較して多くの利点があります (図8)。Hybキャプチャプローブは、プローブとターゲットの配列に最大30数%の相違がある場合でも機能します。Hybキャプチャプローブ自体はシーケンスされるライブラリー分子に直接組み込まれないため、実験の柔軟性が大幅に向上します。分子を濃縮するためにハイブリダイズする必要があるプローブは1つだけであり、プローブとプローブの相互作用は必要ないため、ほとんどの実験で最適化の必要性が最小限に抑えられます。数Kbの長さのライブラリー分子でも濃縮し、PacBio®やOxford Nanopore®などのロングリードプラットフォームを使用して配列決定することができます。これらの利点は、SNV、短いindel、再編成など、ターゲット領域内またはターゲット領域に隣接するあらゆるタイプの新規な配列の特徴を、通常、下流のバイオインフォマティクス解析で再構築できることを意味します。



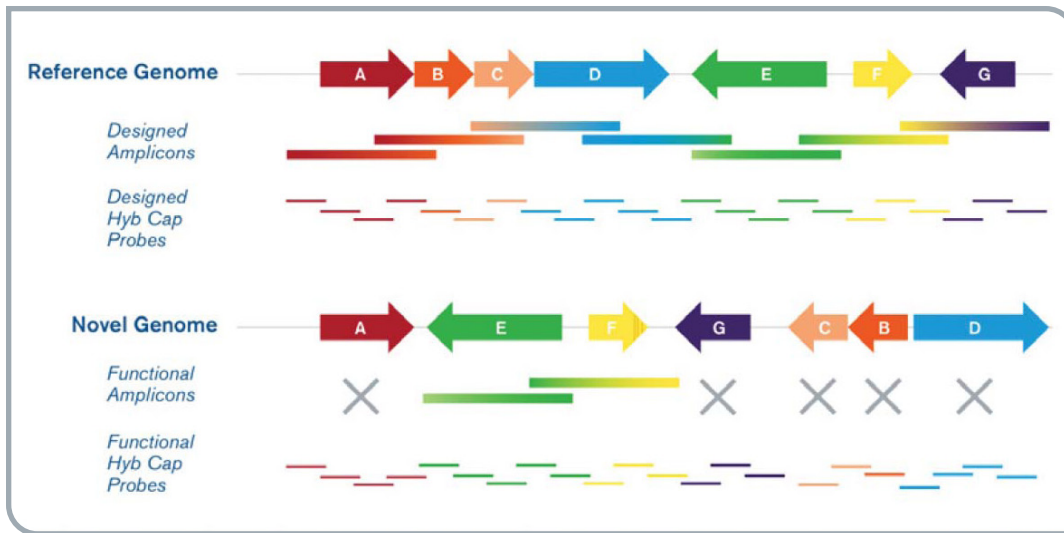


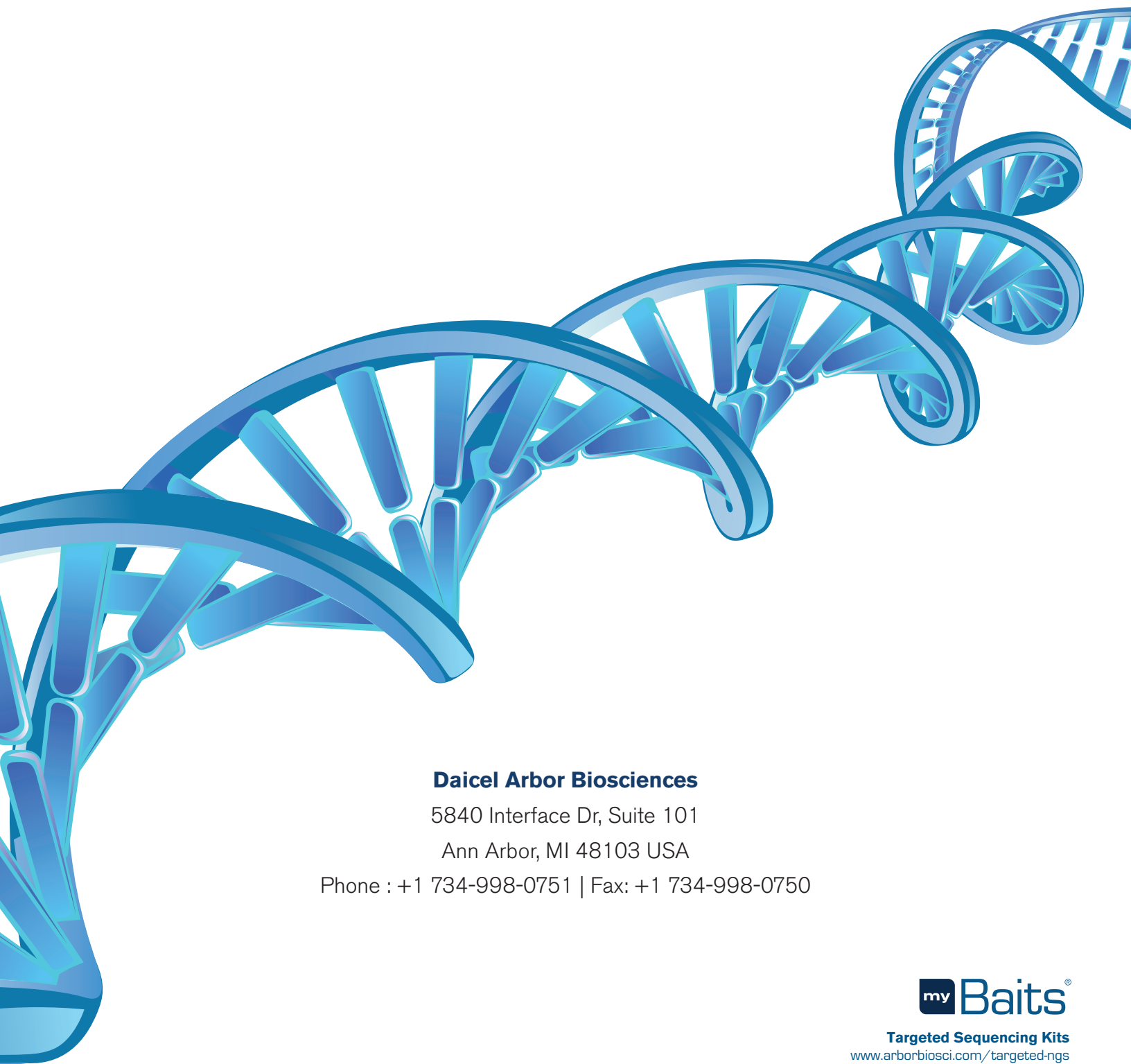
図8. ハイブリダイゼーションキャプチャは、転座や逆位などのリアレンジメントや配列の変異の両方に適します Hybキャプチャとアンプリコンの両方のシーケンスは、既知のシーケンス領域を効果的に濃縮できます。ただし、Hybキャプチャのみが、新規ウイルス株のゲノムからゲノムコンテンツをキャプチャする場合など、プローブの設計に使用されるリファレンスと比較して、大幅なリアレンジメントおよび/または変異を持つ標的配列を回収できます。

## 結論

複雑な宿主、環境、メタゲノムDNAのバックグラウンドに組み込まれた微生物ゲノム解析は、直接のハイスループットシーケンスや従来の分子生物学的手法では、非常に高価になり、特徴づけることができなくなることがあります。Daicel Arbor BiosciencesのmyBaitsシステムが提供する安価で汎用性が高く、プラットフォームにとらわれないハイブリダイゼーションキャプチャ法は、ほとんどの状況において、微生物ゲノムシーケンシングコストを桁違いに削減し、菌株のシーケンス、遺伝子含有量、およびゲノム構造における新規の変異を明らかにすることができます。通常、サイズが小さい微生物ゲノムのキャプチャプローブセットは、標準的な哺乳動物エクソームまたはSNPジェノタイピングパネルよりもさらに小さく、キャプチャ実験の特異性と感度を向上させます。菌株の同定、病原性の検出、伝染の歴史の追跡、または古代進化の起源の解明などの目的に関わらず、ハイブリダイゼーションキャプチャは、他の技術にはない微生物ゲノムシーケンスにおけるロジスティックおよび予算面での利点を提供します。

## 引用文献

- Beaudry, M.S. et al. (2021). **Improved Microbial Community Characterization of 16S rRNA via Metagenome Hybridization Capture Enrichment.** *Frontiers in Microbiology.*
- Campana, M.G. et al. (2016) **Simultaneous identification of host, ectoparasite and pathogen DNA via in-solution capture.** *Molecular Ecology Resources.*
- Duggan, A.T. et al. (2016) **17th Century Variola Virus Reveals the Recent History of Smallpox.** *Current Biology.*
- Forth, J.H. et al. (2019) **A Deep-Sequencing Workflow for the Fast and Efficient Generation of High-Quality African Swine Fever Virus Whole-Genome Sequences.** *Viruses.*
- Guitou, A.K. et al. (2019) **Capturing the Resistome: a Targeted Capture Method To Reveal Antibiotic Resistance Determinants in Metagenomes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*
- Vezzulli, L. et al. (2017) **Whole-Genome Enrichment Provides Deep Insights into Vibrio cholerae Metagenome from an African River.** *Microbial Ecology.*



**Daicel Arbor Biosciences**

5840 Interface Dr, Suite 101

Ann Arbor, MI 48103 USA

Phone : +1 734-998-0751 | Fax: +1 734-998-0750

**my Baits<sup>®</sup>**

**Targeted Sequencing Kits**

[www.arborbiosci.com/targeted-ngs](http://www.arborbiosci.com/targeted-ngs)

12/2021



web: [www.arborbiosci.com](http://www.arborbiosci.com)  
email: [info@arbor.daicel.com](mailto:info@arbor.daicel.com)  
phone: 1-734-998-0751  
X(twitter): @ArborBio

●お問合せ先（公認販売店）：



**プライムテック株式会社**

東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大国ビル2F  
Phone: 03-3816-0851(代表) FAX: 03-3814-5080  
<http://www.primetech.co.jp/> [reagents@primetech.co.jp](mailto:reagents@primetech.co.jp)