

メタトランスクリプトーム 研究のためのリボソーム RNA除去

RNAから解析までのソリューション
Ribo-Zero™ Plus Microbiomeが
微生物の活動について
より深い洞察を与えます

- 糞便サンプルを含む複雑な微生物サンプルのRNAシーケンスを最適化
- メタトランスクリプトーム解析のための簡単に使えるソフトウェアソリューションへのアクセス
- トランスクリプトームの価値の高い部分に注目し、健康な状態と疾患状態におけるマイクロバイオームの役割を理解

illumina®

はじめに

マイクロバイームは健康と疾患に関する複数の側面に影響を及ぼします。従来の微生物研究では、細菌の多様性全体を調べるために16S遺伝子のシーケンスや、株レベルでの微生物の潜在的な機能を特定するためにショットガンメタゲノミクスを使用しています。このようなDNAベースのメソッドを補完する方法として、RNAシーケンス、すなわちメタトランスクリプトームを実施することで、マイクロバイームの代謝プロファイルを理解するための活性遺伝子の発現に関する直接的な情報を得ることができます。しかし、メタトランスクリプトームシーケンスは、トータルRNA分子の85%以上を構成する細菌細胞中の相対存在量の高いリボソームRNA (rRNA) によって妨げられます。¹ シーケンス前にrRNAを除去することにより、トランスクリプトームの価値の高い、有益な部分の解析に焦点を置くことができます。

イルミナは、糞便サンプルなどの複雑な微生物サンプルのメタトランスクリプトームシーケンスのために、RNAから解析までのソリューションを提供しています (図1)。Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitは不要なリードを減らし、発現した細菌RNAのカバレッジを増やすことで微生物の活動に対するより詳細な解析と洞察を可能にします。本キットにはヒトの成人と乳幼児の腸に共通する細菌rRNA、およびヒト、マウスおよびラットからの宿主RNAを取り除く、除去用オリゴヌクレオチドプールが含まれています。また、本キットは補完的なBaseSpace™ Microbiome Metatranscriptomicsアプリへのアクセスを含みます。このアプリは使い勝手の良いグラフィックインターフェースを使用して複雑なメタトランスクリプトームを解析するためのパイプラインを実行します。

本テクニカルノートは、Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitを使用して、BaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリからの一部出力データを用いて、糞便サンプルに関するrRNA除去性能を示します。

メソッド

サンプル調製

健康な成人と乳幼児からの糞便サンプルはOMNIgene•GUT DNA/RNAコレクションチューブ (DNA Genotek, カタログ番号:OMR-205) を用いて収集しました。トータルRNAは、製造元のプロトコルに従ってRNeasy PowerMicrobiome Kit (QIAGEN, カタログ番号:26000-50) を用いて成人と乳幼児の混合サンプル100 ngから抽出しました。これらの糞便RNAサンプルを「G」サンプルと呼びます。コントロール糞便サンプルは、ZymoBIOMICS Fecal Reference with TruMatrix Technology (ZymoBIOMICS, カタログ番号:D6323) から購入しました。トータルRNAは、ZymoBIOMICS RNA Mini Kit (ZymoBIOMICS, カタログ番号:R2001) を使用してコントロールサンプル100 ngから抽出しました。これらの糞便RNAサンプルを「Z」サンプルと呼びます。

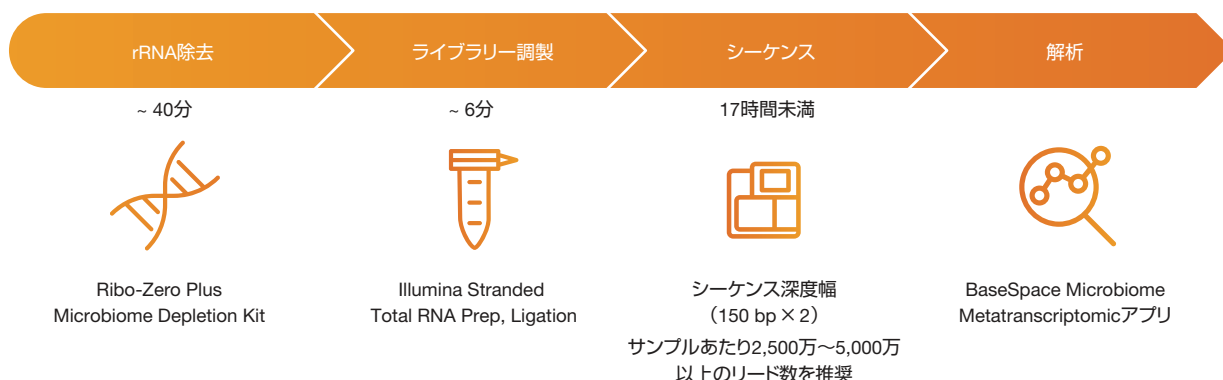


図1: NGSベースのRNAシーケンス (RNA-Seq) ワークフローにおけるRibo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit : Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitは既存のRNA-Seqのワークフローに組み込むことができ、トータルRNAサンプルから不要なrRNAを約40分で効率的に除去します。

ライブラリー調製

rRNA除去のために、RNAをrRNAに相補的なDNAプローブでハイブリダイズします。これらのプローブにより、rRNA分子をRNase Hが特異的に分解することができます。このDNAプローブをDNase Iで消化し、残ったインタクトRNAをビーズ精製します。² この後、リボソーム除去RNAサンプルを用いてライブラリー調製します。Illumina Stranded Total RNA Library Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (イルミナ、カタログ番号:20072063)にはDP1およびDPM除去プローブセットの両方が含まれています。DP1はRibo-Zero Plus Depletion Kit (イルミナ、カタログ番号:20037135)に入っている除去プローブセットですが、DPMはマイクロバイオームをターゲットとした最新のrRNA除去プローブセットです。DPMプローブセットはTan et al.の記述どおりに開発しました。³ 簡潔に説明すると、プローブは成人と乳幼児を含む健康なヒトの糞便サンプル、およびAmerican Type Culture Collection (ATCC)モックコミュニティサンプル (MSA-2002、MSA-2005、およびMSA-2006)の38細菌種に認められるrRNAを除去するようにデザインされています。

ライブラリーは、除去なし、Ribo-Zero Plus (DP1のみ)による除去、またはRibo-Zero Plus Microbiome (DP1 + DPM)による除去のいずれかによって、『Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus, Ribo-Zero Plus Microbiome Reference Guide』⁴の記述どおりに調製しました。サードパーティー社製のrRNA除去キットも標準的な手順を用いて同一サンプルを対象に検証しました。PCRサイクルはライブラリー調製プロトコールで推奨されている13サイクルから15サイクルまで増やしました。

シーケンス

ライブラリーをプールし、150 bp × 2のリード長を用いてNextSeq™ 2000システムでシーケンスしました。ローディング濃度は750 pMで1% PhiXを添加し、NextSeq 1000/2000 P2フローセル(イルミナ、カタログ番号:20046813)にローディングしました。サンプルにより推奨のリード数は変動しますが、サンプルあたり5,000万以上のリード数は、固有に発現した遺伝子数の大半を取得し、まれに発現する遺伝子を含め、遺伝子機能の完全な多様性を捉えるには十分であると予測されます。

データ解析

シーケンスのフィルタリング、アライメントおよび転写産物カバレッジは、BaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリ (Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitに含まれます)のデフォルトの解析設定を使用してBaseSpace Sequence Hubで実施しました(図2)。

結果

BaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリは、どの細菌がサンプル中に存在し、それらの細菌が存在する環境でどのような機能的パスウェイを使用しているかを特定するために、必要なデータと図を出力します。BaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリのワークフローには、バイオインフォマティクスパイプラインのBBduk、HUMAN 3.0およびKaijuが含まれます(図2)。⁵⁻⁷

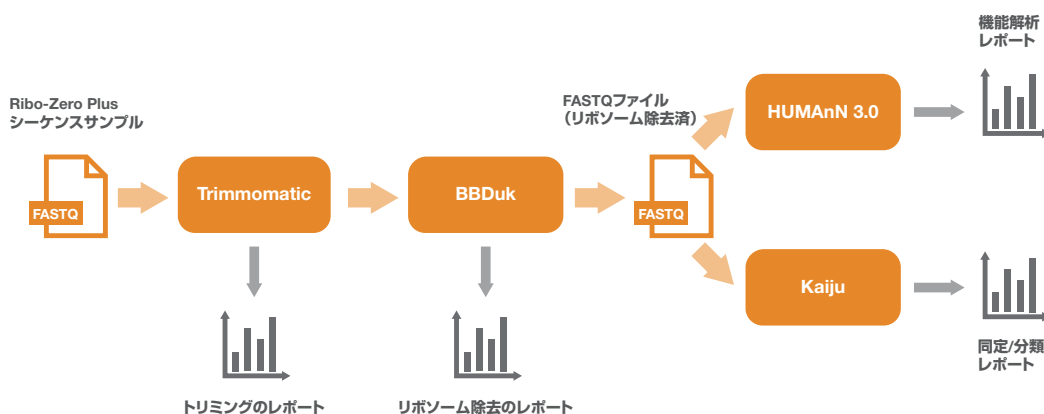


図2: BaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリのワークフロー: BaseSpace Microbiome MetatranscriptomicsアプリはRibo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitに含まれており、包括的なメタトランスクリプトーム解析に必要なバイオインフォマティクスツールを提供します。

BBdukパイプライン⁵はバイオインフォマティクスのフィルタリングされたrRNAとホストRNAをレポートします(図3および図4)。Retainedリードはフィルタリング後に残っているRNAです。HUMAN 3.0パイプライン⁶は遺伝子機能とパスウェイ別に相対存在量を割り当てます(図5)。Kaijuパイプライン⁷は菌分類をして、インタラクティブなKronaプロットで表示します(図6)。

2種類の糞便の混合サンプルであるサンプルGおよびサンプルZからのRNAシーケンスライブラリーは、rRNA除去なしで、またはRibo-Zero Plus(単一種のrRNA除去用にデザインされたもの)、Ribo-Zero Plus

Microbiome Depletion Kit、またはサードパーティー社製キットの3種類のうちの1つのrRNA除去キットを用いて調製しました。BBdukパイプラインは除去後にどのrRNA遺伝子またはホストRNAが残存しているかに関する詳細な情報を提供します(図3)。予想されたとおり、rRNA除去なしのライブラリーのリードの98%以上がrRNAでした。Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitは効率的に不要なrRNAとホストRNAを除去し、Ribo-Zero Plusまたはサードパーティー社製rRNA除去キットのいずれを用いた場合よりもrRNAが少なくなりました(図4)。

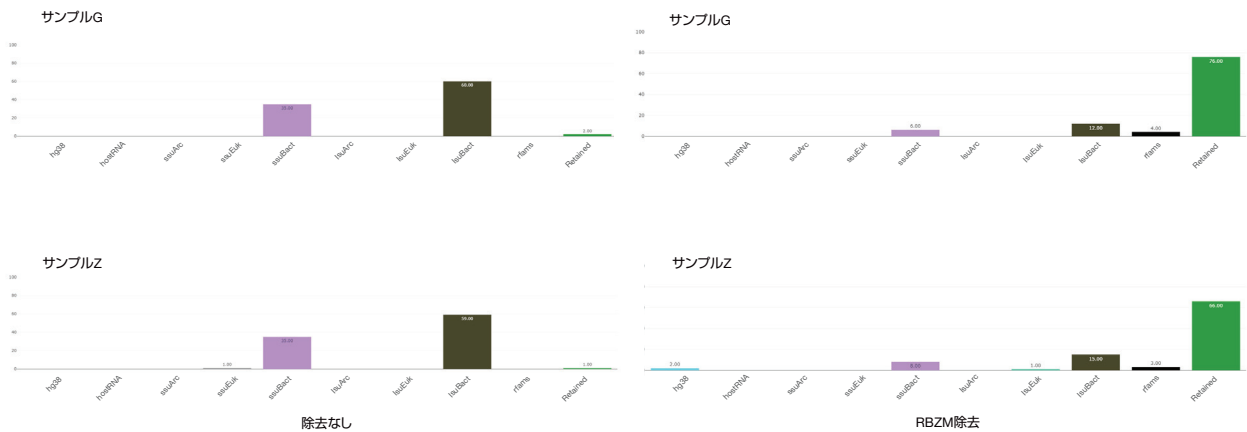


図3：除去後に残ったrRNAの割合に関するBBduk出力：サンプルGとサンプルZに対するBaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリを用いた代表的なBBduk出力。両サンプルともRibo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitで処理しました。緑色の棒は微生物研究コミュニティに関心のあるRNAを表しています。その他のカテゴリーはフィルタリングされる不要なRNA/ホストRNAです。RBZM:Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit。

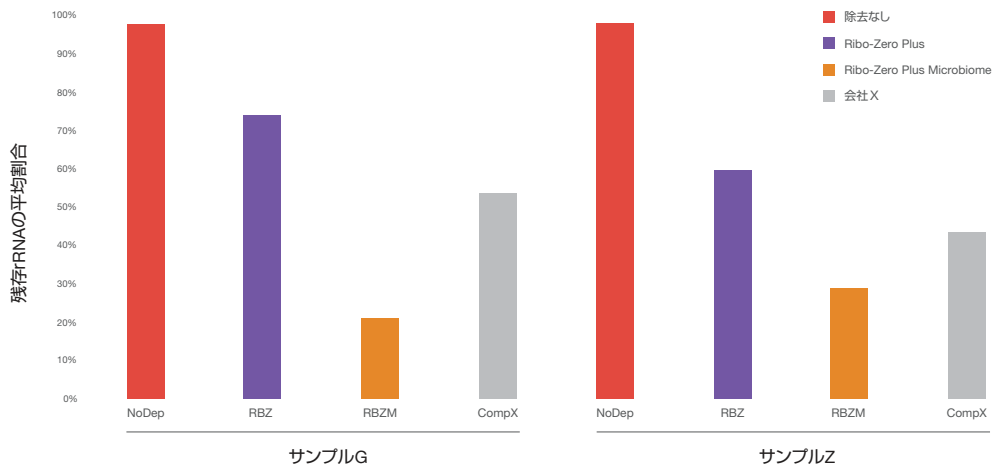


図4：除去後に残ったrRNAの割合：Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitを用いた堅牢なリボソーム除去(橙色の棒)。rRNAが少ないほど好ましいことを示します。Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit(紫色の棒)と市販購入できるサードパーティー社製リボソーム除去キット(灰色の棒)を比較した結果。NoDep:除去なし、RBZ:Ribo-Zero Plusのみ用いた除去、RBZM:Ribo-Zero Plus Microbiomeを用いた除去、CompX:サードパーティー社製キット。

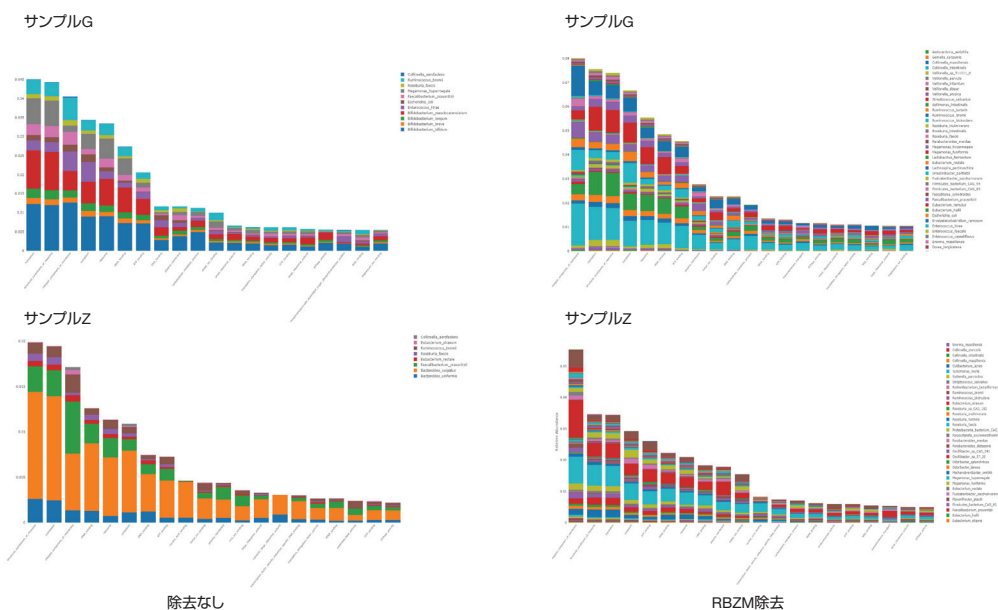


図5: rRNA除去により、より高い解像度でより多くの遺伝子ファミリーをシーケンスすることができます: 上位20の遺伝子オントロジー (GO) タームに対する遺伝子ファミリーからグラフ化されたHUMANn 3.0パイプラインの結果と予測される細菌の寄与。棒グラフの各色はメタトランスクリプトームに寄与する個々の微生物種を表しています。Ribo-Zero Plus Microbiomeで処理したサンプルGとサンプルZ(右図)は、除去なしサンプルよりもそれぞれの遺伝子に対して個別の微生物寄与について高い解像度を示します。

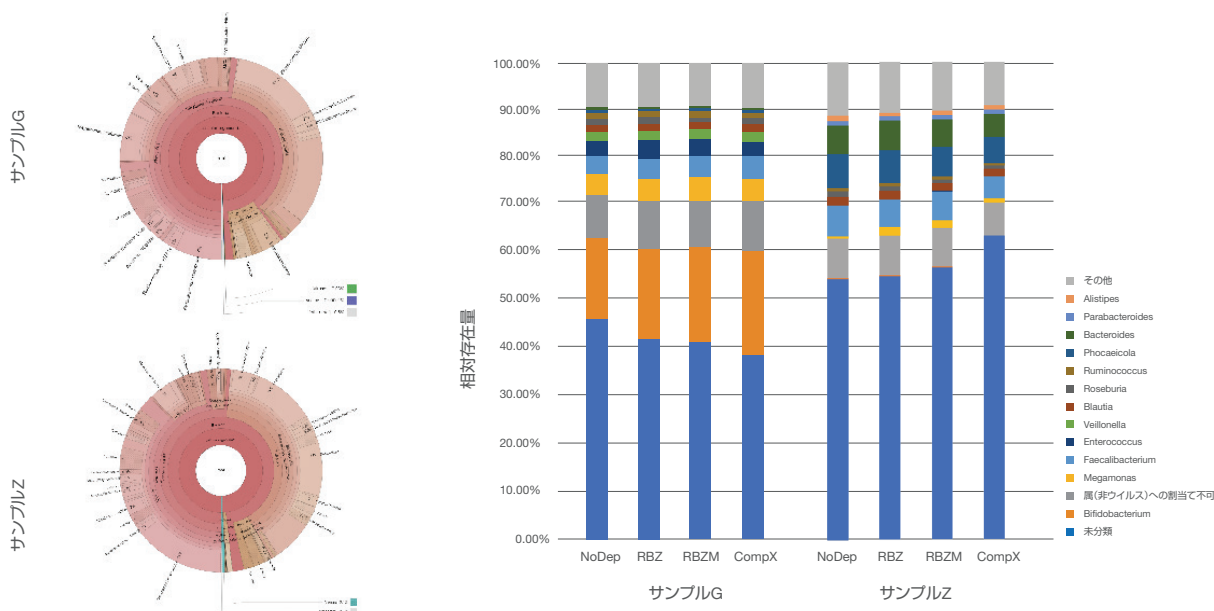


図6: 視覚化とダウンロードを実施しやすい形式での分類群プロファイル: Microbiome Metatranscriptomics BaseSpaceアプリからのKaijuパイプラインの結果。(A) Ribo-Zero Plus Microbiomeで除去した2種類の異なるサンプルからのKronaプロット。Microbiome Metatranscriptomics BaseSpaceアプリのKronaグラフは動的であり、ウイルスや非細菌分類群を含め、サンプル中の微生物多様性をより詳細に探索することができます。(B) Excelを用いたグラフ作成に使用できるTSVファイルも出力されます。菌分類はすべてのメソッドで同等でした。同様の分類群は相同なRNAを有することがあるため、このメソッドではデータベースと同程度の正確性であることに留意してください。

HUMAnN 3.0パイプラインからのデータ解析では、rRNA除去が不要なリードの削減と、発現した遺伝子のシーケンスの最適化にどれほど重要であるかが示されました。Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitで調製したライブラリーからのデータでは、rRNAを除去していないライブラリーと比較して、高い解像度で遺伝子ファミリーの多様性をより深く解明し、どの種が遺伝子発現に寄与しているかを同定しました(図5)。BaseSpace Microbiome Metatranscriptomicsアプリは、インタラクティブなKronaグラフやExcelと互換性のあるファイル形式で出力される菌分類などの詳細なメタトランスクリプトーム解析結果を提供します(図6)。

まとめ

Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kitは、メタトランスクリプトーム研究のためにRNAから解析までのワークフローソリューションです。Ribo-Zero Plus Microbiomeの除去プロトコルは糞便サンプルからの不要なrRNAリードを減らし、関心のあるRNAリードの割合を増やします。さらに、補完的な解析ソフトウェアにより、経験豊富なユーザーのみでなく、マイクロバイオームの新規ユーザーもこの手法を用いることができます。トランスクリプトームの価値の高い部分を解析することに焦点を置くことで、マイクロバイオームにおける活性遺伝子の機能についてのより詳細な洞察を得ることができます。治療、食事、疾患状況に対してどのようにマイクロバイオームが反応するかということを理解することにより、生物医学研究に関する情報を得ることができ、より優れた多くの標的化治療につながる可能性があります。

詳細はこちら

Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus Microbiome Depletion Kit:jp.illumina.com/products/by-type/accessory-products/ribo-zero-plus-microbiome-depletion.html

参考文献

1. Karpinets TV, Greenwood DJ, Sams CE, Ammons JT. RNA:protein ratio of the unicellular organism as a characteristic of phosphorous and nitrogen stoichiometry and of the cellular requirement of ribosomes for protein synthesis. *BMC Biol.* 2006;4:30. doi:10.1186/1741-7007-4-30
2. Illumina. Microbial RNA sequencing enabled with the Illumina Ribo-Zero Plus rRNA Depletion Kit. jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/ribo-zero-plus-data-concordance-tech-note-1270-2020-003.pdf. Published 2020. Accessed May 24, 2022.
3. Tan A, Murugapiran S, Mikalauskas A, et al. Rational probe design for efficient rRNA depletion and improved metatranscriptomic analysis of human microbiomes. *Microbiome* (In Review).
4. Illumina. Ribo-Zero rRNA Removal Kit Reference Guide. https://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/ribosomal-depletion/ribo-zero/ribo-zero-reference-guide-15066012-02.pdf. Updated 2016. Accessed May 24, 2022.
5. Joint Genome Institute (JGI). BBDuk Guide. <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/bbduk-guide/>. Accessed May 24, 2022.
6. Menzel P, Ng KL, Krogh A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat Commun.* 2016;7:11257. doi:10.1038/ncomms11257
7. Beghini F, McIver LJ, Blanco-Míguez A, et al. Integrating taxonomic, functional, and strain-level profiling of diverse microbial communities with bioBakery 3. *Elife.* 2021;10:e65088. doi:10.7554/eLife.65088

イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810
jp.illumina.com

 www.facebook.com/illuminakk

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : jp.illumina.com/tc

© 2022 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc.または各所有者に帰属します。
商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html をご覧ください。
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

Pub. No. M-GL-00692 v1.0-JPN 22SEP2022

illumina®