

Title	ナノポアシーケンサーを用いたヒトデ幼生間充織細胞のトランスクリプトーム解析
Sub Title	Transcriptome analysis of starfish immune cells by MinION nanopore sequencing.
Author	古川, 亮平(Furukawa, Ryohei)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>予算上の制約から申請した研究計画を大幅に変更し、ナノポアシーケンサーMinIONを用いたRNA-seqの実験系の立ち上げに注力した。MinIONを用いたcDNA-PCR sequencingに必要なRNAを簡便に得るため、幼生の免疫細胞である間充織細胞ではなく成体の免疫細胞である体腔細胞を材料とした。</p> <p>cDNA-PCR Sequencing Kitのマニュアルに従い、50 ngのpoly A+ RNAをテンプレートとして、逆転写反応とstrand switching、PCRによる全長転写産物の増幅、アダプター付加を行い、増幅したcDNAを精製してライブラリーとした。濃度を測定し、600 ngのcDNAをMinIONでのシーケンシングに供した。</p> <p>シーケンシングのランは最大時間である48時間行い、およそ725万リードのデータを得た。ベースコールにはハイスペックなコンピュータが必要であったため、real timeでのベースコールは行わずに生データを出力した。これらの生データを、推奨ベースコーラーであるalbacore v2.3.4を搭載した最小必要スペックのコンピュータを用いてベースコールし、約13 GBのfastqファイルを得た。得られたリードのうち、Quality score <math>\geq</math> 7のリードが約510万リード得られ、平均リード長は約1000 bp、最大リード長は約7500 bpであった。これらの結果は、シーケンシング前のライブラリーのQC結果とよく一致しており、出力されたデータ量も含め、良好なシーケンシングデータが得られたと判断できる。</p> <p>続いて、Quality score <math>\geq</math> 7のリードでfastqファイルを作成し、高速なアライナーであるminimap2を用いてde novoアセンブリを試みた。ところが、コンピュータのスペック上の問題からアラインメントを行うことが出来なかった。今後はよりハイスペックなコンピュータを用いて、再度de novoアセンブリを行う必要がある。</p> <p>Due to the limitation of budget, we changed the research plan significantly and focused on the setup of the RNA-seq experiment system using the nanopore sequencer MinION. In order to simply obtain the RNA necessary for cDNA-PCR sequencing using MinION, the coelomocytes, which are adult immune cells of starfish rather than larval mesenchymal cells, were used as materials.</p> <p>Using 50 ng of poly A RNA, we performed reverse transcription reaction, strand switching, amplification of full-length transcript by PCR, and adapter addition according to the manual of cDNA-PCR Sequencing Kit, and purified amplified cDNA as a library . The concentration was determined and 600 ng of cDNA was subjected to sequencing in MinION.</p> <p>The sequencing run for 48 hours, which is the maximum time, and data of approximately 7.25 million reads were obtained. Since a base-call required a high-spec computer, we output raw data without making a base call in real time. These raw data were base-called using a computer with the minimum required specifications equipped with the recommended base caller albacore v2.3.4 to obtain a fastq file of about 13 GB. Among the obtained leads, about 5.1 million reads of Quality score <math>\geq</math> 7 were obtained, the average read length was about 1000 bp, and the maximum read length was about 7500 bp. These results are in good agreement with the QC results of the library before sequencing, and it can be judged that good sequencing data was obtained, including the amount of data output.</p> <p>Then, a fastq file was created with a lead of Quality score <math>\geq</math> 7, and de novo assembly was tried using minimap 2 which is a high-speed aligner. However, due to problems with computer specifications, alignment could not be performed. It is necessary to do de novo assembly again using a more powerful computer.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180302">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180302</a>

publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	文学部	職名	助教(有期)(自然科学)	補助額	200 (B) 千円
	氏名	古川 亮平	氏名(英語)	Ryohei Furukawa		
研究課題(日本語)						
ナノポアシーケンサーを用いたヒトデ幼生間充織細胞のトランスクリプトーム解析						
研究課題(英訳)						
Transcriptome analysis of starfish immune cells by MinION nanopore sequencing.						
1. 研究成果実績の概要						
<p>予算上の制約から申請した研究計画を大幅に変更し、ナノポアシーケンサー MinION を用いた RNA-seq の実験系の立ち上げに注力した。MinION を用いた cDNA-PCR sequencing に必要な RNA を簡便に得るため、幼生の免疫細胞である間充織細胞ではなく成体の免疫細胞である体腔細胞を材料とした。</p> <p>cDNA-PCR Sequencing Kit のマニュアルに従い、50 ng の poly A+ RNA をテンプレートとして、逆転写反応と strand switching、PCR による全長転写産物の増幅、アダプター付加を行い、増幅した cDNA を精製してライブラリーとした。濃度を測定し、600 ng の cDNA を MinION でのシーケンシングに供した。</p> <p>シーケンシングのランは最大時間である 48 時間行い、およそ 725 万リードのデータを得た。ベースコールにはハイスペックなコンピュータが必要であったため、real time でのベースコールは行わずに生データを出した。これらの生データを、推奨ベースコーラーである albacore v2.3.4 を搭載した最小必要スペックのコンピュータを用いてベースコールし、約 13 GB の fastq ファイルを得た。得られたリードのうち、Quality score <math>\geq 7</math> のリードが約 510 万リード得られ、平均リード長は約 1000 bp、最大リード長は約 7500 bp であった。これらの結果は、シーケンシング前のライブラリーの QC 結果とよく一致しており、出力されたデータ量も含め、良好なシーケンシングデータが得られたと判断できる。</p> <p>続いて、Quality score <math>\geq 7</math> のリードで fastq ファイルを作成し、高速なアライナーである minimap2 を用いて de novo アセンブリを試みた。ところが、コンピュータのスペック上の問題からアラインメントを行うことが出来なかった。今後はよりハイスペックなコンピュータを用いて、再度 de novo アセンブリを行う必要がある。</p>						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
<p>Due to the limitation of budget, we changed the research plan significantly and focused on the setup of the RNA-seq experiment system using the nanopore sequencer MinION. In order to simply obtain the RNA necessary for cDNA-PCR sequencing using MinION, the coelomocytes, which are adult immune cells of starfish rather than larval mesenchymal cells, were used as materials.</p> <p>Using 50 ng of poly A RNA, we performed reverse transcription reaction, strand switching, amplification of full-length transcript by PCR, and adapter addition according to the manual of cDNA-PCR Sequencing Kit, and purified amplified cDNA as a library. The concentration was determined and 600 ng of cDNA was subjected to sequencing in MinION.</p> <p>The sequencing run for 48 hours, which is the maximum time, and data of approximately 7.25 million reads were obtained. Since a base-call required a high-spec computer, we output raw data without making a base call in real time. These raw data were base-called using a computer with the minimum required specifications equipped with the recommended base caller albacore v2.3.4 to obtain a fastq file of about 13 GB. Among the obtained reads, about 5.1 million reads of Quality score <math>\geq 7</math> were obtained, the average read length was about 1000 bp, and the maximum read length was about 7500 bp. These results are in good agreement with the QC results of the library before sequencing, and it can be judged that good sequencing data was obtained, including the amount of data output.</p> <p>Then, a fastq file was created with a lead of Quality score <math>\geq 7</math>, and de novo assembly was tried using minimap 2 which is a high-speed aligner. However, due to problems with computer specifications, alignment could not be performed. It is necessary to do de novo assembly again using a more powerful computer.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			