

# illumina 5-Base DNA Prepを用いた 高精度なメチル化 およびバリエーション検出

標準的なメチル化アッセイと  
同等のDNAメチル化検出

全ゲノムシーケンスと同等に  
正確な生殖系列バリエーション  
コール

単一のアッセイから、優れた  
性能とカバレッジで2つの  
洞察を取得

## はじめに

DNAメチル化と遺伝情報を組み合わせたマルチオームアプローチは、発生や疾患の複雑なパスウェイを明らかにするのに役立ちます。しかし、遺伝バリエーションとDNAメチル化の両方をプロファイリングするには、通常別々のアッセイが必要になります。Illumina 5-Base DNA Prepは独自のケミストリーと最適化された解析法を用いて、同一アッセイで、アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C)、5-メチルシトシン (5mC) の5塩基を検出します。<sup>1</sup> Illumina 5-Base DNA Prepから得られる2つの洞察により、ゲノムとエピゲノムにわたる包括的な発見が実現します。

本テクニカルノートでは、Illumina 5-Base DNA Prep、酵素的メチル化シーケンス (EM-Seq v2)、バイサルファイトシーケンス、メチル化アレイおよび全ゲノムシーケンス (WGS) を比較します。Illumina 5-Base DNA Prepは、その他のメチル化手法と比較してメチル化測定で高い一致を示し、WGSと同等の生殖系列バリエーション性能を有することを示します。

## 方法

メチル化シーケンスライブラリーはヒトリファレンスゲノムサンプル NA12878 (Coriell Institute for Medical Research) 由来のゲノムDNA 50 ngから調製し、以下の3種類の方法を使用して比較しました。

- Illumina 5-Base DNA Prep (イルミナカタログ番号: 20140364)
- NEBNext Enzymatic Methyl-seq v2 Kit (New England Biolabs、カタログ番号: E8015S)
- EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research、カタログ番号: D5005) を使用したバイサルファイト変換を用いたxGen Methyl-Seq DNA Library Prep Kit (IDT、カタログ番号: 10009860)

はじめに、gDNAを機械的に約450 bpに剪断しました。各ライブラリー調製は製造元の手順に従い、製造元の試薬を使用しました。ライブラリーはNovaSeq™ 6000システム、151 bp × 2リードでシーケンスしました。

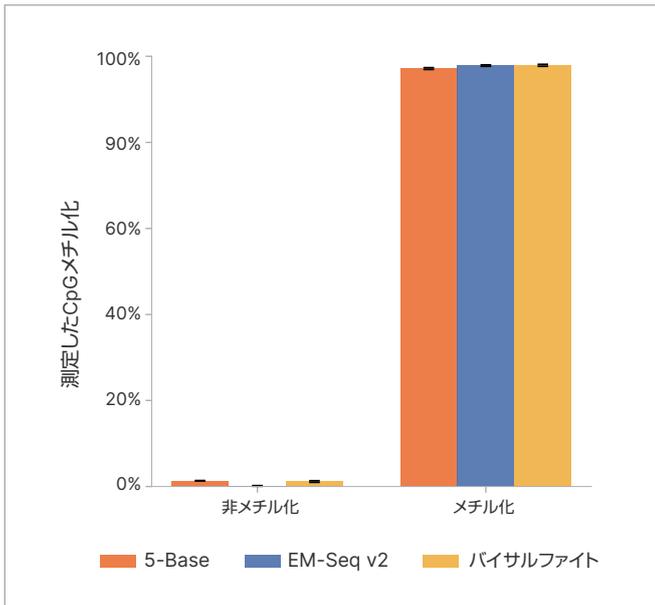
メチル化解析の比較には、データを450Mクラスター/900Mペアエンドリードにダウンサンプリングしました。メチル化データは、Illumina 5-Base DNA Prepには、DRAGEN™ Germline v4.4.6を、EM-Seq v2およびバイサルファイトシーケンスにはDRAGEN Methylation v4.4.4を使用して解析しました。アレイデータはInfinium™ MethylationEPIC v2.0マイクロアレイ (イルミナ、カタログ番号: 20087706) およびiScan™システムを用いて生成しました。データはR v4.5.1のSeSAMeパッケージv1.26.0を用いて解析しました。

生殖系列バリエーションコールには、WGSとの比較のため、データを500Mクラスター/1Bペアエンドリードにダウンサンプリングしました。Illumina DNA PCR-Free PrepデータはBaseSpace™ Sequence Hubデモデータ (basespace.illumina.com/s/2teNclBsUsmH) から取得し、400Mクラスター/800Mペアエンドリードにサブサンプリングしました。Illumina 5-Base DNA PrepおよびIllumina DNA PCR-Free PrepのバリエーションコールにはDRAGEN Germline v4.4.6を用いました。EM-Seq v2およびバイサルファイトシーケンスのバリエーションコールはBis-SNP v0.7.1を用いました。

## 結果

### 標準的な手法と同等のメチル化検出

Illumina 5-Base DNA Prepは、2種類の標準的なメチル化アッセイである、EM-Seq v2およびバイサルファイトシーケンスと比べて、メチル化検出の特異性と感度が高いことが示されています (図1、図2)。小さなゲノムを添加したコントロールに対する加重メチル化レベルにおいて、真陽性率と真陰性率は、この3種類の方法の間で変わりありません (図1)。Illumina 5-Base DNA PrepではCpGアイランドのメチル化が測定され、これはEM-Seq v2、バイサルファイトシーケンス、およびInfinium MethylationEPIC v2.0メチル化マイクロアレイの結果と極めて高い一致を示しています (図2)。

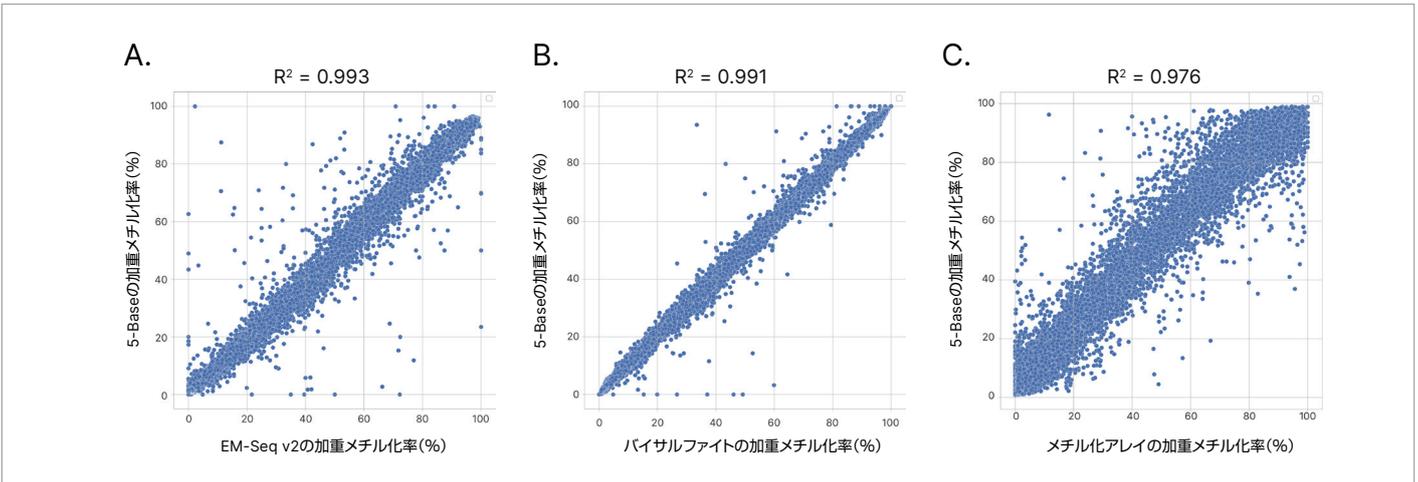


**図1: メチル化検出に関する同等の真陽性率および真陰性率**  
 Illumina 5-Base DNA Prep (オレンジ色) は、EM-Seq v2 (青色) およびバイサルファイトシーケンス (黄色) と同等の真陽性メチル化率および真陰性メチル化率を提供します。小さなゲノムのスパイクインには、陰性コントロールとして非メチル化ラムダバクテリオファージDNA、陽性コントロールとしてメチル化pUC19 DNA を用いました。

### マッピングとカバレッジの最大化

Illumina 5-Base DNA Prepは、EM-Seq v2またはバイサルファイトシーケンスと比較して、マッピングリード率とインサート長中央値が高く、優れたシーケンスデータ品質を示します (図3)。Illumina 5-Baseによる変換はDNAに損傷を与えないため、より長い断片を保持することができます。Illumina 5-Baseワークフローは、より長いインサートサイズ (約350 bp) を選択するように最適化されており、バリエーションコール性能を最大化します。

Illumina 5-Base DNA Prepは、EM-Seq v2およびバイサルファイトシーケンスと比べて、特定のリード長に対して、メチル化のより包括的なカバレッジを提供します (図4)。また、Illumina 5-Base DNA Prepは、ヒトゲノム全体の均一なGCカバレッジを提供し、低GC領域ではEM-Seq v2より高いノーマライズカバレッジを示し、高GC領域ではバイサルファイトシーケンスより高いノーマライズカバレッジを示します (図5)。



**図2: CpGアイランドでの高精度なメチル化測定値**  
 Illumina 5-Base DNA Prepを用いた個々のCpGアイランドの加重メチル化レベルは、(A) EM-Seq v2、(B) バィサルファイトシーケンス、(C) Infinium MethylationEPIC v2.0アレイの結果と極めて高い一致を示しています。

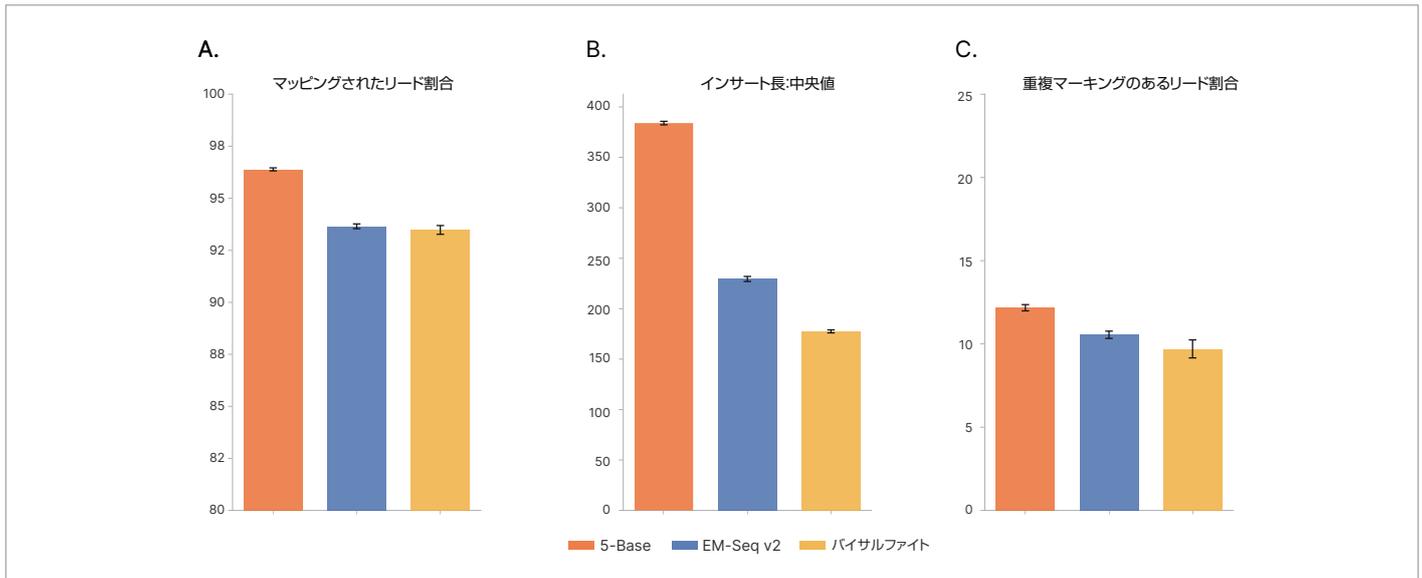


図3: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた優れたシーケンスデータ品質

Illumina 5-Base DNA Prep (オレンジ色) は、EM-Seq v2 (青色) およびバイサルファイトシーケンス (黄色) と比べて、(A) より高いマッピングリード率、(B) より優れたインサート長中央値を示し、(C) 同等のPCR重複率を示します。

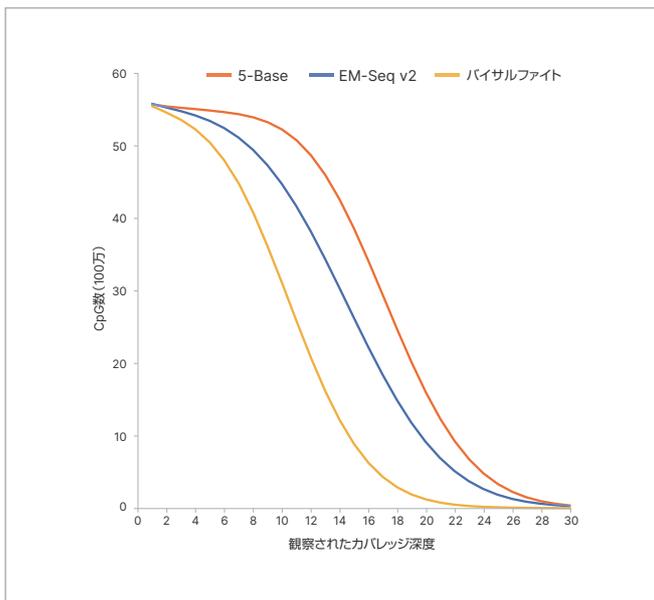


図4: Illumina 5-Base DNA Prepを用いたCpGサイトの高いカバレッジ

観察された各カバレッジ深度でのCpG数は、閾値以上のCpGコンテキスト内にある合計シトシン数から算出しました。Illumina 5-Base DNA Prep (オレンジ色) は、450Mクラスター/900Mペアエンドリードの場合、EM-Seq v2 (青色) より10 ×カバレッジ以上で約20%多くのCpGを示し、バイサルファイトシーケンスより10 ×カバレッジ以上で68%多くのCpGを示しました。各手法のレプリケートは平均しました。

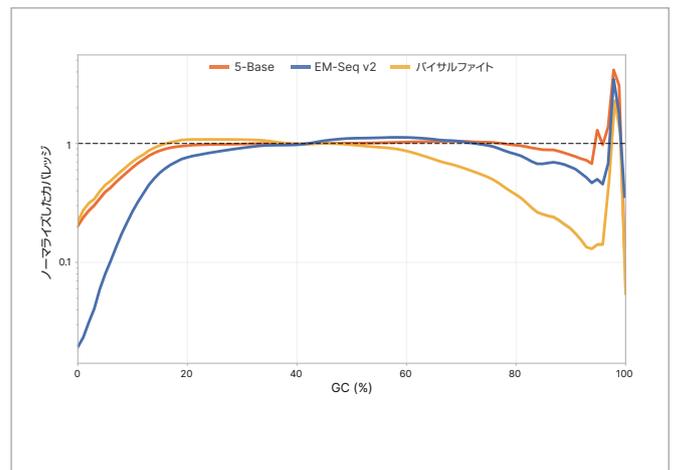


図5: Illumina 5-Base DNA Prepを用いたヒトゲノムにおける広範囲なGCコンテンツに対する均一なカバレッジ

Illumina 5-Base DNA Prep (オレンジ色) は、ノーマライズしたカバレッジのGCバイアスの低下を示し、これはEM-Seq v2 (青色) より低いGC率 (1%~20%)、およびバイサルファイトシーケンス (黄色) より高いGC率 (70%~100%) でより高く一致することが示されています。

## 生殖系列バリエーションコールの提供

メチル化検出に加えて、Illumina 5-Base DNA Prepは、Illumina DNA PCR-Free PrepのようなゴールドスタンダードWGSアッセイとの一致を示し、高精度の生殖系列バリエーションコールを提供します（図6、表1）。標準的なメチル化検出アッセイである、EM-Seq v2およびバイサルファイトシーケンスは、ライブラリー複雑性およびデータ収量が低く、4塩基バリエーションコールアルゴリズムとの互換性が低いことが認められました。これらの限界は、EM-Seq v2またはバイサルファイトシーケンスデータから得られたDNAバリエーション結果の精度とユーザビリティに影響します。

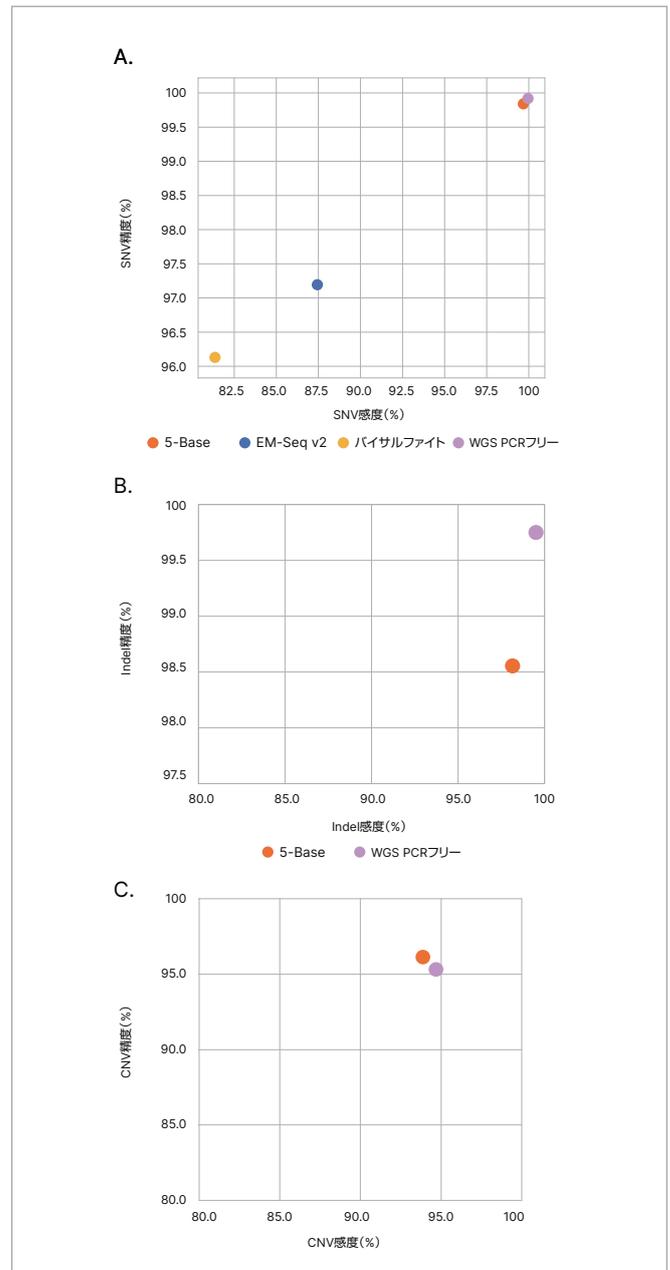


図6: Illumina 5-Base DNA Prepを用いた高精度の生殖系列バリエーションコール

(A) 生殖系列シングルヌクレオチドバリエーション (SNV) コールに対する感度および精度プロットでは、Illumina 5-Base DNA Prep (オレンジ色) はIllumina DNA PCR-Free Prep (紫色) を用いた標準WGSに非常に近く、EM-Seq v2 (青色) およびバイサルファイトシーケンス (黄色) より感度と精度が高いことが示されています。信頼領域におけるSNVコール性能は、NA12878のNIST 4.2.1 Truthセットを用いて評価しました。テクニカルレプリケートの結果は平均しました。また、Illumina 5-Base DNA Prepは、Illumina DNA PCR-Free Prepと比べて、(B) 高い精度での挿入/欠失 (Indel) バリエーションコールおよび (C) コピー数バリエーション (CNV) コールを示しています。Indelコールの差はPCRとPCRフリーの使用によるものです。

表1: ゴールドスタンダードWGSと同等の生殖系列バリエーションコール性能を示すIllumina 5-Base DNA Prep

アッセイ	偽陽性	真陽性	偽陰性	精度	感度	F1スコア
<b>SNV</b>						
Illumina 5-Base DNA Prep	5777	3,246,292	10,731	0.9982	0.9967	0.9975
Illumina DNA PCR-Free Prep	2348	3,252,713	1345	0.9993	0.9996	0.9996
EM-Seq v2	90,820	3,144,462	451,770	0.9720	0.8744	0.9206
バイサルファイトシーケンス	117,749	2,925,648	670,584	0.9613	0.8136	0.8813
<b>Indel<sup>a</sup></b>						
Illumina 5-Base DNA Prep	6712	457,155	8677	0.9855	0.9814	0.9835
Illumina DNA PCR-Free Prep	1172	465,589	2349	0.9975	0.9950	0.9963
<b>CNV<sup>a</sup></b>						
Illumina 5-Base DNA Prep	82,271	2,345,550	134,484	0.9661	0.9458	0.9558
Illumina DNA PCR-Free Prep	101,835	2,364,830	116,446	0.9587	0.9531	0.9559

a. Bis-SNPソフトウェアのみSNVを提供するため、IndelおよびCNVベンチマークはEM-Seq v2およびバイサルファイトシーケンスのデータセットでは利用できません。

## まとめ

Illumina 5-Base DNA Prepは、EM-Seqおよびバイサルファイトメチル化アッセイと同等のメチル化検出精度があり、同等のリード深度に対してより多くのCpGのカバレッジを取得します。Illumina 5-Baseソリューションは、高精度のバリエーションコールも提供するため、単一のアッセイで同一DNAサンプルから複数の洞察を得ることができ、潜在的な探索力を向上させることができます。

詳細はこちら

[Illumina 5-Base DNA Prep](#)

## 参考文献

1. Illumina. Illumina 5-Base DNA Prep data sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689/illumina-5-base-dna-prep-data-sheet-m-gl-03689.pdf). Published 2025. Accessed November 11, 2025.

## 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](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illuminakk](https://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](http://jp.illumina.com/tc)

© 2026 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](http://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。

