

## 学内グラント 報告書

## 平成23年度 学内グラント終了後報告書

次世代シーケンサーによる高速な既知の  
疾患遺伝子スクリーニング系の開発

研究代表者 神田 将和（ゲノム医学研究センター）

## 緒 言

近年出現した高出力シーケンサーによる高速なゲノム解析に基づいた診断支援の可能性がよく議論されている。本研究ではミトコンドリア呼吸鎖異常症（MRCD）をモデル疾患としてプロトタイプの開発を行った。対象とした理由は、従来法では確定診断に労力と時間を要し、また小児において重篤な表現型を呈する、100以上の多岐に渡る原因遺伝子を背景にもつからである。今回は高出力シーケンサーを用いた系が短時間・広範囲・高精度でスクリーニングできる能力があるかを評価することを目的とした。結果として、キャプチャーシーケンス系における現状の性能、またMRCDで見られるヘテロプラスミーに対して実用可能であることを明らかにできた。

## 材料と方法

**MRCD 原因遺伝子を抽出するためのカスタムキャプチャー：**ミトコンドリアDNA全周およびターゲットとした特定遺伝子のエキソン部位とのみハイブリダイゼーションする合成オリゴを設計した。これを用いてゲノム医学研究センターに設置してある高速シーケンサーによりデータを取得、同じく現有設備であるクラスタマシンに高速シーケンサーのデータ解析環境を整備して解析した。

## 結 果

対象とした遺伝子のエキソン領域とミトコンドリアゲノム全域を、効率良く選択的にシーケンスしていることが確認できた。前者は対象とした約100万塩基の97%を10回以上の冗長度でシーケンスできていた。後者のミトコンドリアゲノムについては全長の99.92%を1000回以上の冗長度で取得できた。一部の検体からはミトコンドリアゲノムにある有害変異も検出した。

## 考 察

今回の実験は遺伝子100個のエキソン領域90%程度をカバーし、そこにある変異を網羅的に検出できる系を目指した。結果として97%をカバーできており、変異検出に関しても優れた性能を持つことが明らかにでき、当初の目的は達成できた。

うまくいかない一部の領域だが、この原因についてはGCリッチな配列によるPCR増幅の効率低下が予想される。当時は良い対策がなかったが、最近になってPCR-freeライブラリによる改善の可能性がでてきている。

またPCRアンプリコンを用いるような簡便な実験系では精度・感度が低くなるケースについても今回の系は優れた性能を持つ反面、やはり高コストであることがいえない。

今後はいくつかの選択肢が選べる状況になると考えられるが、今回得られた知見を踏まえて、適切なアプローチによるゲノム情報による診断支援を行える可能性を考えていく。

## 研究成果リスト（論文、学会発表、特許出願等）

\*本研究における研究成果の学会や出版物への発表はまだなされていない。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、カスタムキャプチャー用オリゴライブラリの設計において本学ゲノム医学研究センター・トランスレーショナルリサーチ部門・仲地豊助教とゲノム科学部門・森山陽介特任研究員に、高出力シーケンサーの実験と混合サンプルの条件設定においてはトランスレーショナルリサーチ部門・平田智子技術員・岡崎康司教授に多大な協力を頂きました。深く感謝いたします。