

学内グラント 報告書

平成23年度 学内グラント終了時報告書

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する、また小児において重篤な表現型を呈し、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実験系が、100以上ある原因遺伝子を短時間・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。我々はカスタムキャプチャー用オリゴライブラリーのプロトタイプ設計に続き、実際の実験を行い、検証を行った。結果として、ミトコンドリア病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。また現在盛んに用いられているエキソーム法を含めて、キャプチャー型の欠点である領域に対しては、単純にバイトオリゴを増量させるだけで全てのケースには対応できないことが明らかになった。また用いた中の2検体においては疾患の原因となりうる候補変異を見出した。

材料と方法

ミトコンドリア病由来DNAの収集・準備

本学の小児科の協力を得て既に完了しており、今回の申請では10検体を解析に用いた。実験自体の検証を行うため、事前に作成したポジティブコントロールDNAも別途用いた。

ミトコンドリア病原因遺伝子を抽出するためのカスタムキャプチャーの設計

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、ゲノムDNAから

シーケンスしたい領域だけを抽出できるカスタムキャプチャーとした。

シーケンス解析

患者検体由来ゲノムDNAを10検体ほどシーケンスデータとして産生し、変異検出の解析を行った。またヘテロプラスミー検出感度の簡易テストとして、PCRにより増幅した断片を任意の比率（1:99, 5:95, 10:90, 20:80など）で混ぜ合わせることで、シーケンスにより混合比率がどの程度まで検出できるのかを観察した。解析はゲノム医学研究センターに設置してあるクラスマシンの次世代シーケンサーのデータ解析環境を整備して行った。

結 果

今回プロトタイプとして設計したオリゴライブラリーによるシーケンス結果の中から、ヒトゲノム中のPOLG2遺伝子座位での結果を示す（図1）。対象としたエキソン領域だけを効率良く選択的にシーケンスしていることが観察できた。またミトコンドリアゲノム全域も対象としており、それらのシーケンス結果を示す（図2）。ほぼ全域においてシーケンスをすることに成功し、最大で各サンプルにおける多型の存在も観察できた。

次に市販エキソーム製品の捉えない領域についてもバイトオリゴを設計した場合、シーケンスを得たケースの確認ができた（図3）。

最後にPCR産物を任意の比率で混合した擬似サンプルの解析から、感度良く混合比率が再現されていることが確認できた（図4）。

1:99の混合サンプルではミトコンドリアゲノム1676番目の塩基を520,706回シーケンスしており、G塩基が515,158回コール（99%）された。1%のみ混合したA塩基のコールは5,238回（1%）であった。シーケンスエラーに起因するその他の塩基はそれぞれC塩基が17回、T塩基が293回であった。

5:95の混合サンプルではミトコンドリアゲノム1676番目の塩基を562,227回シーケンスしており、G塩基が534,384回コール(95%)された。5%のみ混合したA塩基のコールは27,497回(5%)であった。シーケンスエラーに起因するその他の塩基はそれぞれC塩基が49回、T塩基が295回であった。

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。精密な解析はまだ十分にできていないが、シーケンスデータを観察する限りは一部のエキソン以外、キャプチャー及びシーケン

スに成功していた。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た。ミトコンドリアゲノムのシーケンスデータについては、マッピングする際にrCRSと呼ばれるミトコンドリアゲノム配列を用いている。この配列と日本人が保有するミトコンドリアゲノムとは差異があるため、マッピングバイアスを生んでいると思われる領域が認められた。そのような条件下ではあるが、全域をシーケンスすることに成功し、また図4で示した高い精度でヘテロプラスミーを検出できる知見を得た。また今回の実験は性能評価を主としているため、検体のセレクションにバイアスがあるが、既知の原因遺伝子2つに変異候補を



図 1. カスタムキャプチャーによる特定のゲノム領域のシーケンス。得られたシーケンスデータをマッピングし、可視化した。遺伝子のエキソン構造に沿って設計したバイト（最下段）により、対象エキソンのDNAのみが選択的にシーケンスされていることが分かる（図上部のシーケンスリード）。

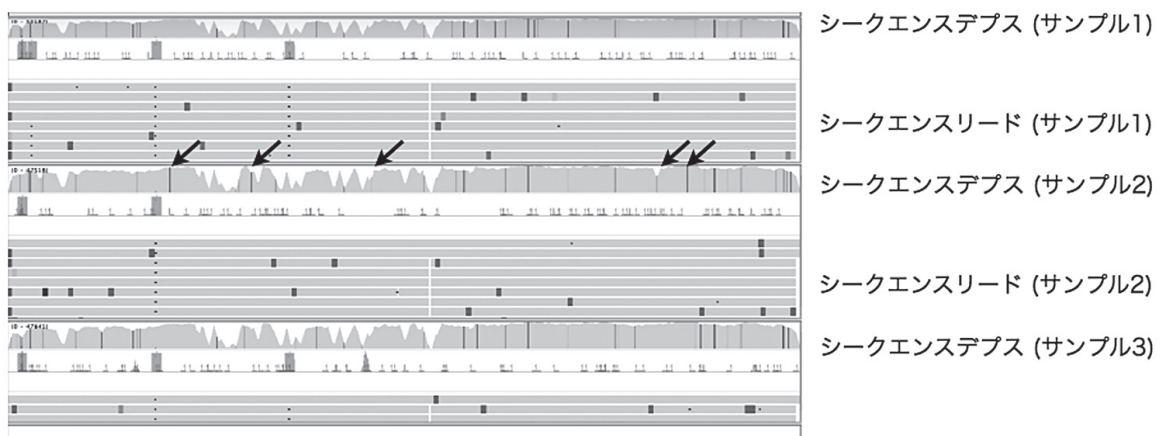


図 2. カスタムキャプチャーによるミトコンドリアゲノム全域のシーケンス。得られたシーケンスデータをマッピングし、可視化した。各サンプルのシーケンスデプス（何回その位置の塩基がシーケンスされたかを表す数値）の中で、色が異なる部分（矢印）ではリファレンスミトコンドリアゲノム配列 rCRS とシーケンスが異なることを示しており、各検体での差異が見てとれる。

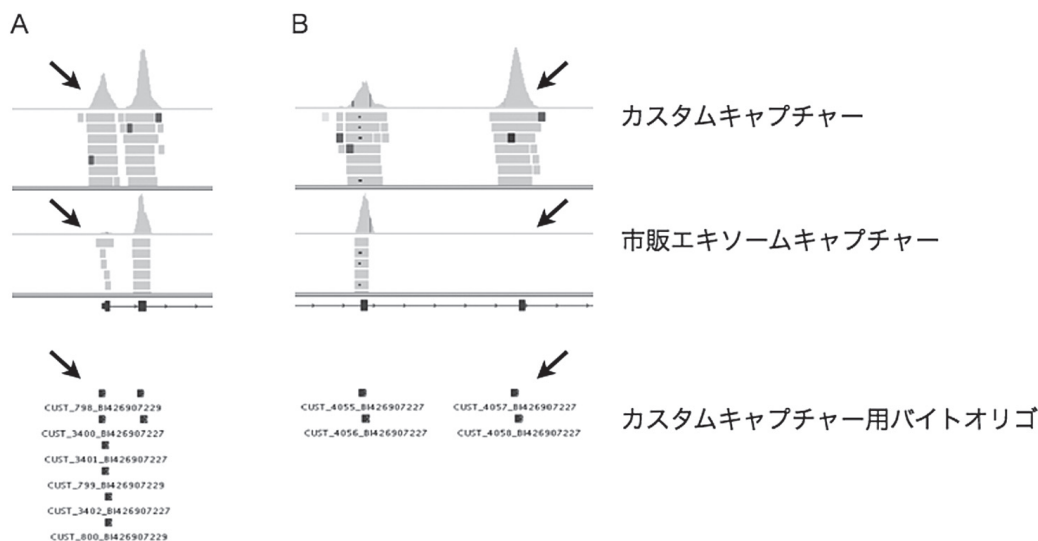


図 3. 対象エクソンへのバイト設計によるシーケンス範囲の向上. 現在流通しているエキソームキャプチャーでは対象とされていないエクソンであっても、キャプチャー用オリゴを追加することでキャプチャーできた。

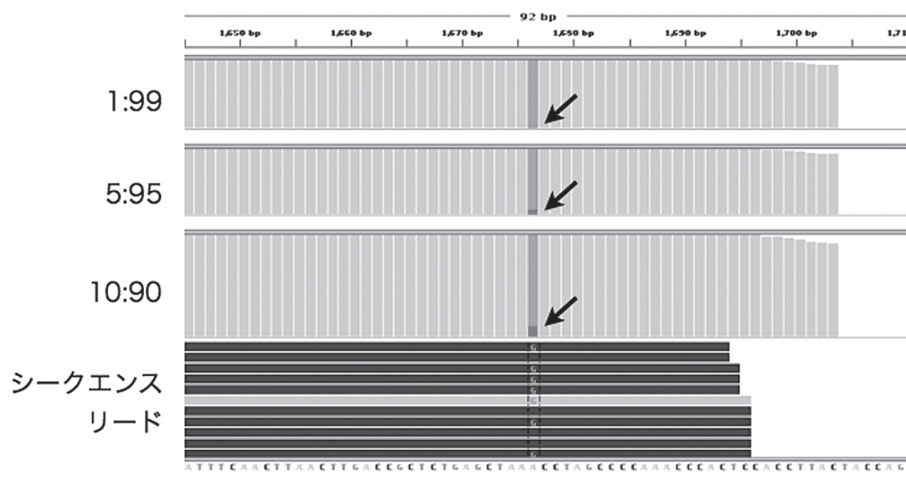


図 4. PCR 産物を任意の比率で混合したサンプルを用いた検出感度の測定. 横軸はミトコンドリア DNA 配列上の位置, 縦軸の数字は PCR 産物の混合比率を示している. 実際の混合比率とシーケンスで検出される混合比率は一致していた。

得たため、これらについては検討を進めていく。

本研究はまだ十分なデータが揃っていないが、今後の追加実験・解析をすることで現行手法の限界と、今後でてくる新技術を加えた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引き続き考えていきたい。

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。