

標本道場・初心者編 分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣



NGSについて教えてください。



NGSとは、Next generation sequencer, Next generation sequencingの略語で、数百万から数十億もの膨大なシーケンス反応を同時に実行できる技術、機器のことです。

はじめに

DNA (deoxyribonucleic acid: デオキシリボ核酸) は、生命を構成、維持に関与し、タンパク質などの構築に必要なコードを持っている。そして、このDNA配列を解読することで、様々な疾患の原因解明が可能となりつつある。次世代シーケンス (Next Generation Sequencer: NGS) は、数千から数百万のDNA配列を高速で読む、かつ複数人のDNA配列を同時に読むことができる装置である。

2005年に世界初の次世代シーケンサーが登場した。シーケンスといえばキャピラリー電気泳動を用いたサンガーシーケンスが主流であったが、現在では、様々なNGSの機種が登場し、各社がそれぞれ異なる原理で解析している。

ここでは現在主流で使われているNGSの技術を説明します。

サンガーシーケンス (図1)

サンガーシーケンスでは、単鎖のDNA鋳型に対して相補的なコピーを産生する。

つまり、サンプル (患者) DNA配列に相補的なプライマーによりDNA合成反応を行う。

反応にはそれぞれ各DNA塩基 (A, G, T, およびC) に対応する4種のジデオキシヌクレオチド (ddNTP) の混合物が含まれる。これらのジデオキシヌクレオチドは伸長する鎖に組み込まれる。

ジデオキシヌクレオチドは

- ① DNA分子に組み込まれると鎖の伸長が停止する。
- ② 各ジデオキシヌクレオチドには独自の蛍光色素が付加されている。

といった2つの性質を有する。

伸長はサンプル (患者) DNA配列に相補的なジデオキシヌクレオチドが組み込まれることで、性質①により反応は停止され、多数の異なる長さのDNA片コピーが作製される。伸長停止後に、電気泳動を行ってDNA分子をその長さで分類し、DNA配列は性質②により、ゲルを通過するジデオキシヌクレオチドの蛍光発光を読み取る^{1)~4)}。

標本道場・初心者編

分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

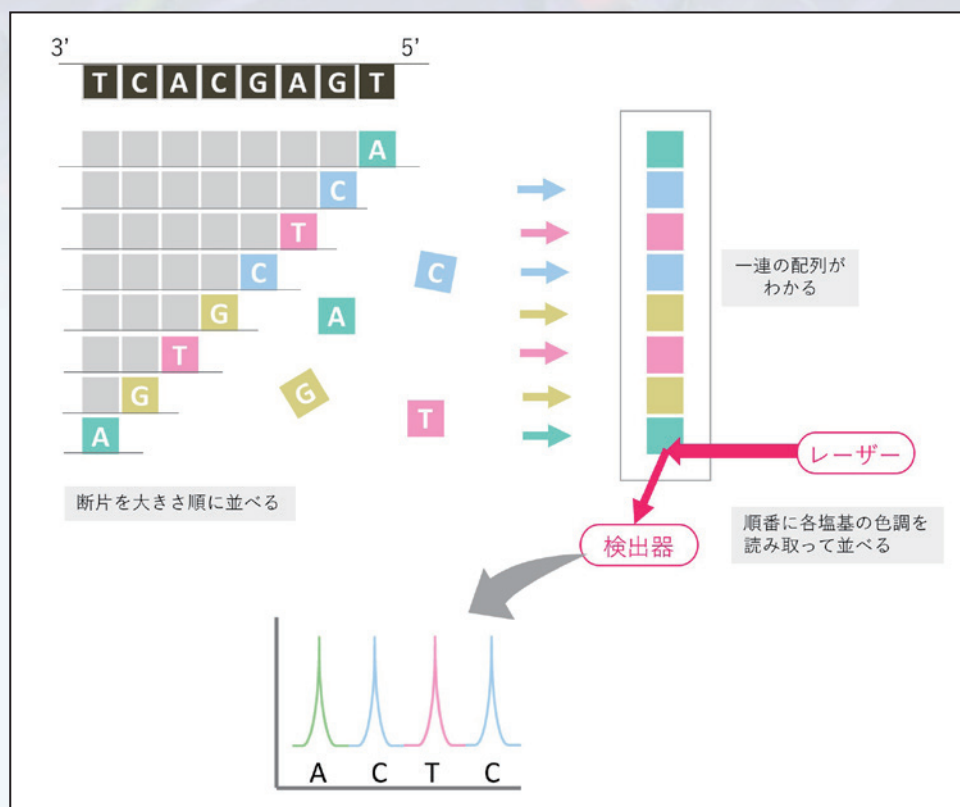


図1

NGS

次世代シーケンサーは急速に広まりつつある。

数百万から数十億もの膨大なシーケンス反応を同時並行して実行できる技術であり、さまざまな技術的特長をもつ機器が存在する。

いずれも以下のような共通した特長を持つ。

1. サンプル調製

次世代シーケンサーでの解析を行うためには、ライブラリー*を作製する必要がある。

*ライブラリー：NGSでDNA配列を読み取るために必要なプライマーや、DNA片をフローセルの基盤に結合させるためのアダプターなどをDNA片に結合させ、磁気ビーズを用いて不純物を除去し精製して作製する（図2）。

標本道場・初心者編

分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

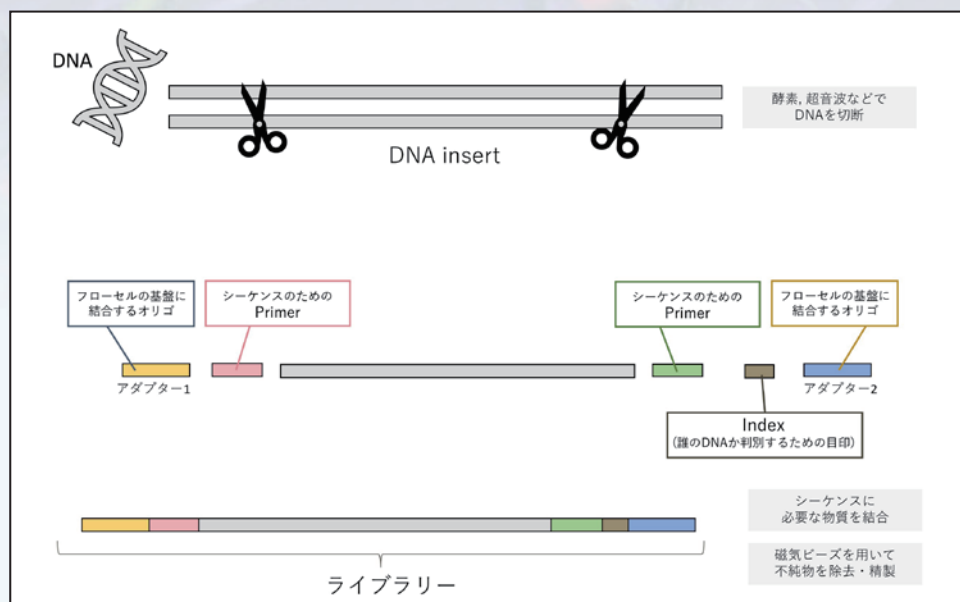


図2

2. シーケンス機器

DNA取り込みの繰返しにおいて、塩基配列を光または蛍光シグナルを介して視覚的に読み取る、あるいは、電位の検出を介して読み取る装置。

3. データ出力

それぞれの機器はシーケンス終了時に生データを出力する。

塩基配列データに遺伝子構造や遺伝子機能の情報、文献情報などを注釈付け(アノテーション)することで、より意味をもつ結果を導くことができる。

— 検出原理 —

【ブリッジPCR・合成によるシーケンス＋蛍光を検出】

ブリッジPCRという方法を用いて、DNA片を増幅させ、1本鎖DNA片のクラスターをフローセル表面に構築する(図3)。

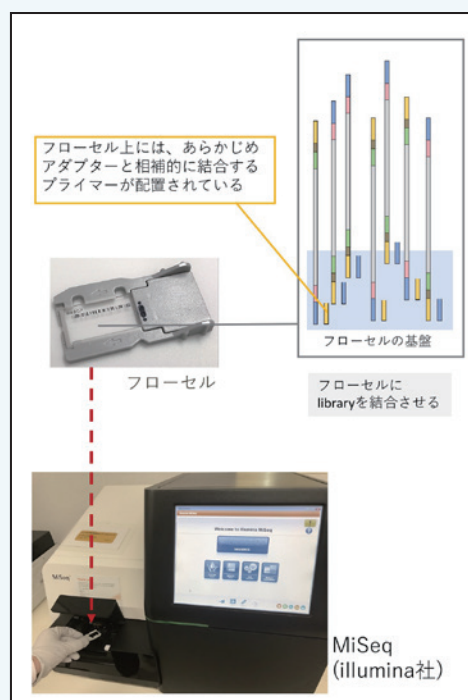


図3

標本道場・初心者編

分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

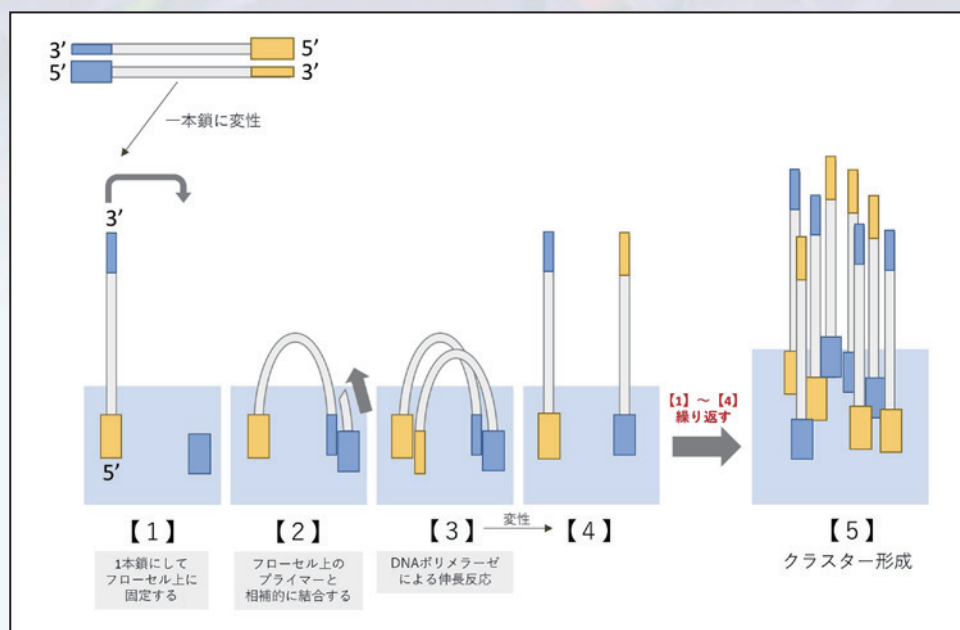


図4

この状態にするには(図4)、

- 【1】 フローセル上には、あらかじめアダプター 1、2と相補的なプライマー (1'、2')が高密度に配置されている。サンプル(患者)DNAから得たDNA片の両端に、2種類のアダプター配列(アダプター 1、2)を結合させ、1本鎖にしてフローセル上に固定する。
- 【2】 サンプル(患者)DNAの1本鎖DNAは、アダプター 2の側でこのフローセル上のプライマーと相補的に結合する(ブリッジ“橋”の形になる)。
- 【3】 アダプター2側からDNAポリメラーゼによる伸長反応のあとで変性させる。
- 【4】 フローセル上にはアダプター 1側で結合した1本鎖と、アダプター 2側で結合した1本鎖ができていく。
- 【5】 この反応を繰り返し、1本鎖DNAを固定しながら増幅させる。

フローセルの基板上に増幅させたDNAを鋳型として、伸長反応を行い、取り込まれたデオキシヌクレオチド(dNTP)を順番に蛍光顕微鏡によって解析する。

伸長反応に使用するヌクレオチドは

- ① 各ヌクレオチドは特有の発光波長をもつ単一の蛍光分子に可逆的に結合されている。
- ② 各ヌクレオチドはまた可逆的に終結され、1回のサイクルごとに一つのヌクレオチドのみが組込まれる。

といった2つの性質を持っている。

標本道場・初心者編

分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

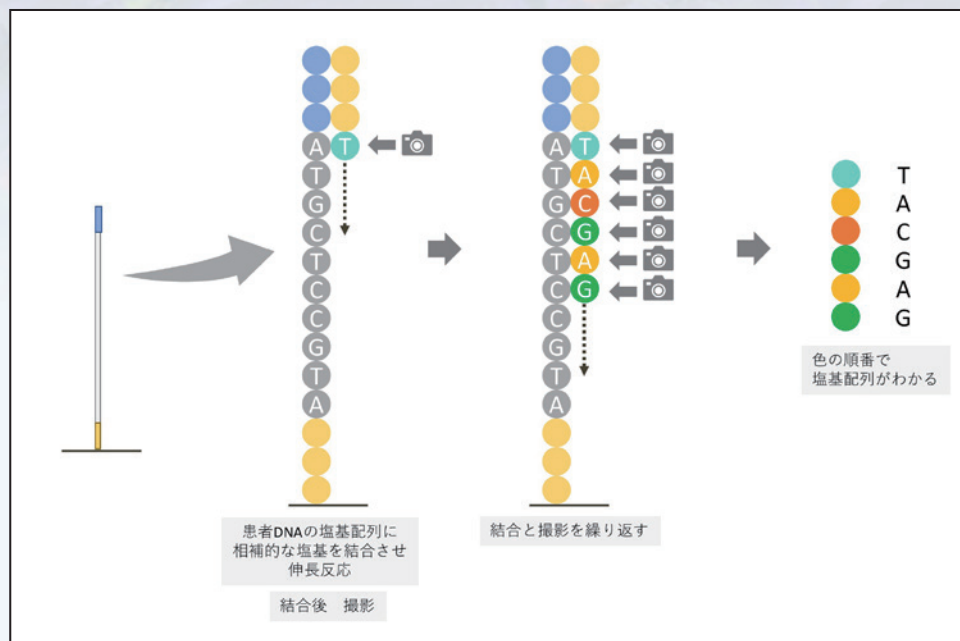


図5

4種全てのヌクレオチドがシーケンスチップに添加され、その中からサンプル（患者）DNAの塩基に相補的なヌクレオチドが取り込まれる。残りのDNA塩基は洗い流される。余分なヌクレオチドが除去された時点で、取り込まれたヌクレオチドの蛍光シグナルを読み取る。その後、蛍光分子と終止基の両方が切断されて洗い流され、シーケンス反応が完了するまでこの工程が繰り返される（図5）^{5) 6)}。

【エマルジョンPCR+pH変化を検出】

エマルジョンPCRという方法を用いて、DNA片を増幅して、配列解析を行う（図6）。

- 【1】**断片化したサンプル（患者）DNAの両端にアダプターを結合させ、1本鎖にし、アダプターと相補的な配列のDNAが結合したビーズと、1:1で結合するように混合する。増幅試薬とともにエマルジョン（油中水滴）で包む。これにより、オイル中にビーズとDNA片1つずつを含みビーズ上で数百万コピーに増幅される。
- 【2】**その後エマルジョンを破壊してビーズを濃縮する。
- 【3】**穴が無数に開いたプレート上に載せる。1つの穴に1つのビーズが入る仕組みとなっている。
- 【4】**プレート上ではアダプターに相補的なプライマーから、伸長反応が行われる。この際、伸長のための材料としてdNTPを含む溶媒を1つずつ入れ替えていく。

標本道場・初心者編 分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

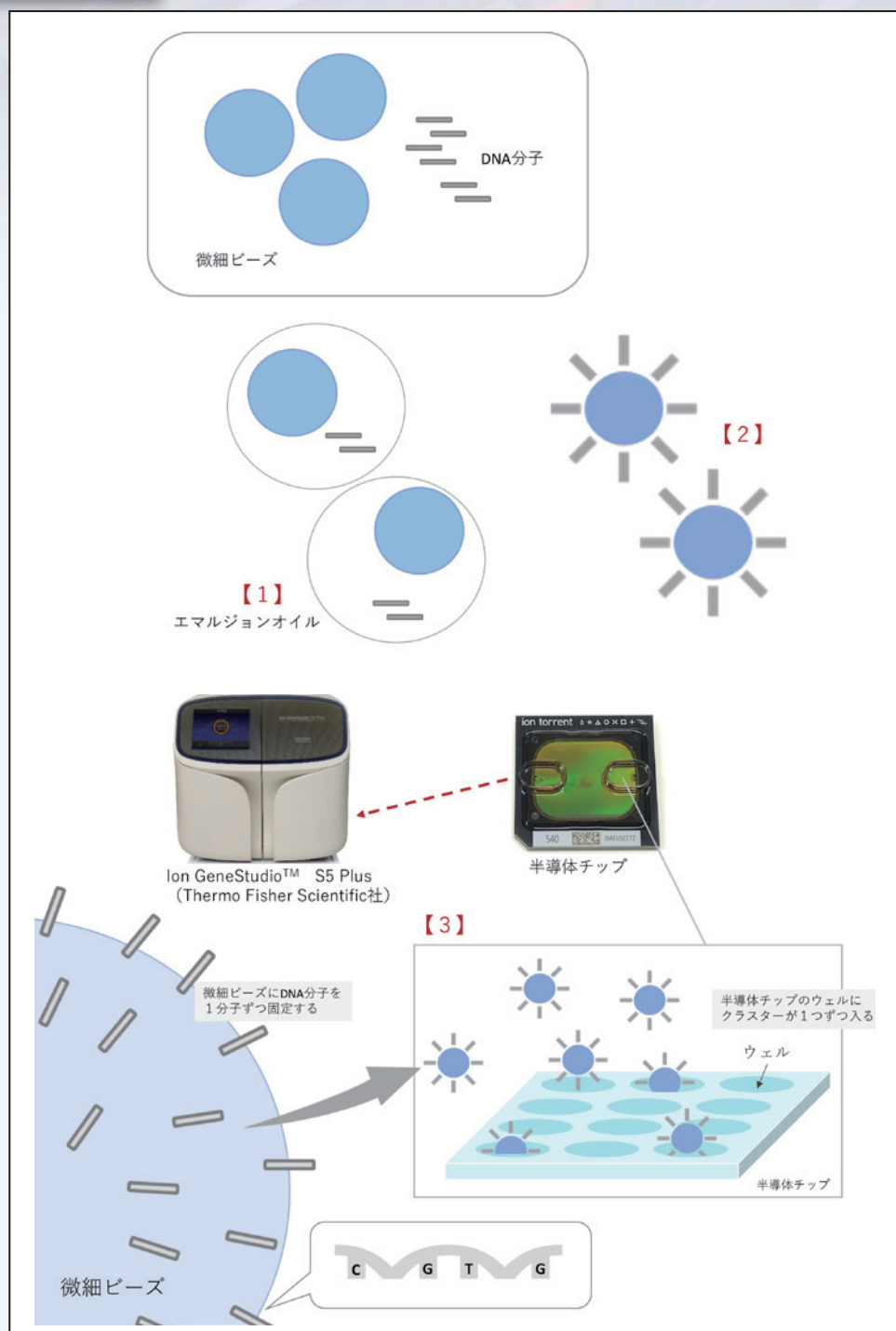


図6【1】【2】【3】

標本道場・初心者編

分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

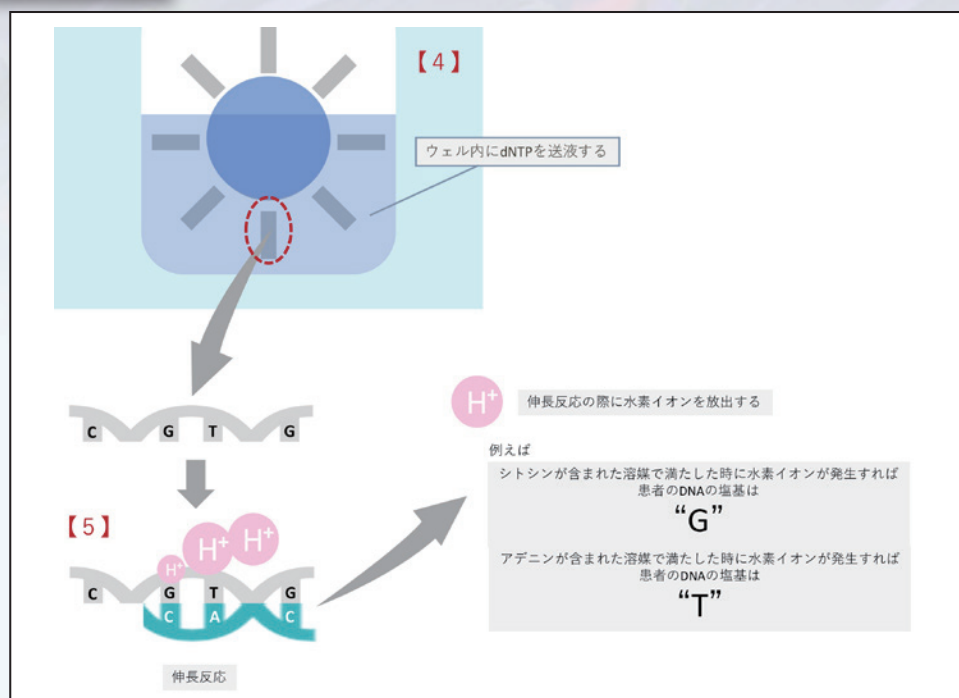


図6【4】【5】

【5】患者DNAに相補的伸長反応の際に放出された水素イオンによるpH変化を検出することで塩基配列を決定する。

解析は光を用いず、半導体による電位検出によって塩基を判定するシステムである⁽⁶⁾⁽⁷⁾。

NGSとサンガーシーケンスとの違い

サンガーシーケンスとNGSとの決定的な違いは、シーケンス可能な量にある。

サンガー法では一度に1つのDNAフラグメントをシーケンスすることしかできないが、NGSは1回のラン当たり何百万ものフラグメントを同時に大量並列シーケンスでき、感度も高い。

NGSで得たデータは？

NGSによるDNA配列の解読により、患者一人一人に適した医療（プレジジョン・メディスン：Precision Medicine）、遺伝性疾患などの分野が革命的に進歩している。

NGSで塩基1つ1つを読み取ったデータは、ヒトの標準（基準となる）遺伝子配列である「リファレンス配列」と比較する。患者の遺伝子配列が、リファレンス配列と「どこの塩基が

標本道場・初心者編

分子病理

慶應義塾大学医学部
腫瘍センターゲノム医療ユニット
柳田絵美衣

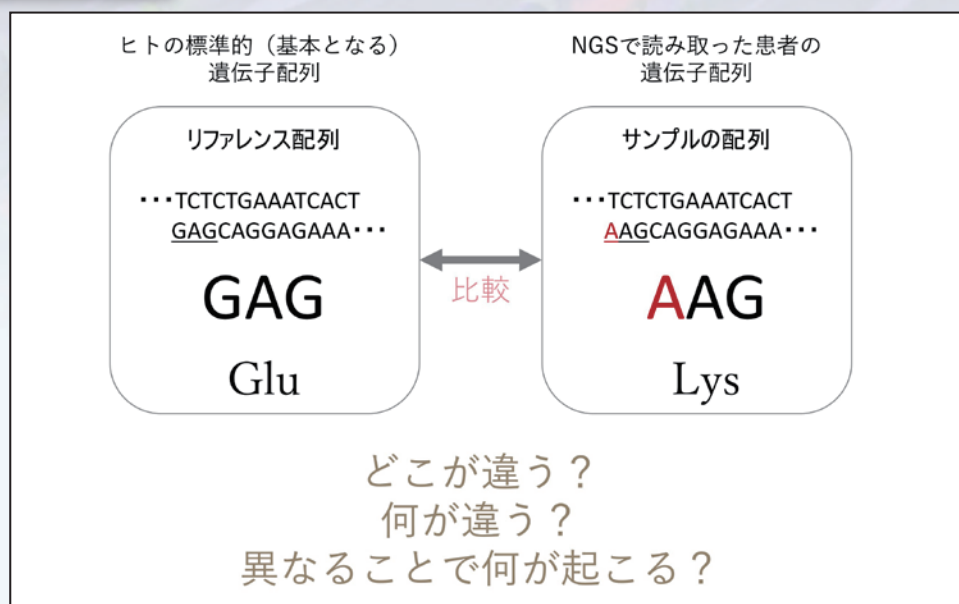


図7

異なるのか?」「どの塩基が異なるのか?」「異なることで、どのような影響があるのか?」を調べていく(図7)。配列上の塩基が異なることで、コードされるアミノ酸、タンパク質が異なる場合がある。タンパク質が異なることで、機能異常や機能停止など生命機能に変化が起こる可能性があり、これによりがん遺伝子の機能亢進や、がん抑制遺伝子の機能消失が起こり、正常細胞をがんや様々な疾患に導く。

また、このような遺伝子の変異を探ることで、遺伝子変異から産生される異常なタンパク質に特異的に作用する分子標的治療薬などの薬剤、エントリー可能な治験の情報を見つけ出し、患者に提供することが可能となる。

■参考■

- 1) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Sanger, F, Air, GM and Barrell, BG. 1977, Nature, Vol. 265, pp. 687-695.
- 2) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Snager, F, Nicklen, S and Coulson, AR. s.l.: Proc Natl Acad Sci USA, 1997, Vol. 74, pp. 5463-5467.
- 3) Overview of DNA sequencing strategies. Shendure, JA, Porreca, GJ and Church, GM. Chapter 7, s.l.: John Wiley & Sons, 2011.
- 4) Energy transfer primers: a new fluorescence labeling paradigm for DNA sequencing and analysis. Ju, J, Glazer, AN and Mathies, RA. 2, s.l.: Nat Med, 1996, pp. 998-999.
- 5) illumina. [Online] <http://www.illumina.com/>.
- 6) Leave a Nest. [Online] <https://lne.st/2012/12/04/1737/>
- 7) Ion Torrent. Applied Biosystems. [Online] <http://www.lifetechnologies.com/ca/en/home/brands/ion-torrent.html>.

■画像提供■

Thermo Fisher Scientific 社