

次世代シーケンサーを用いたゲノム解析のための ゲノム DNA の調製

総合技術センター

分析・解析技術分野 友成さゆり (Sayuri Tomonari)

1. はじめに

次世代 DNA シーケンサー (next generation sequencer : NGS) が登場して8年近くになる。「次世代」の呼称は現在実用化されているサンガー法 (ジデオキシ法) を原理とするマルチキャピラリー自動化 DNA シーケンサーとの対比によるもので、解析処理能力が桁違いに向上している。

例を挙げると、1993-2003 年に行われたヒトゲノム (約 3.1Gb) 全配列決定では 13 年の年月と 3000 億円を費やした。それが現在においては、次世代シーケンサーの一つである HiSeq2500 (イルミナ社) を用いると、なんと 1RUN 当たり約 65 万円の解析コストで 600Gb のデータ量を約 11 日で得ることが可能となり、100 人分の生データを出すだけでも 1 台で 1 年弱で終わることができる。

しかし次世代 DNA シーケンサー装置にもそれぞれ長所・短所があり、研究目的に適した機種選定とそれに対応した周辺機器、データ解析システム (コンピュータ環境) を導入し、それらを使いこなす必要がある。それでもサンガー法とは比較にならないほど高速に膨大な配列決定が可能なこと、クローニング工程が不要なことから、近年では基礎的な生命科学から医療現場、創薬、法医学など様々な分野で利用されている。またリシーケンス以外にも新規ゲノム配列決定や遺伝子発現 (RNA-seq), DNA 結合タンパク質の結合部位の同定 (ChIP-seq), エピゲノム解析 (DNA のメチル化やヒストン修飾の解析) な

ど多くのアプリケーションに対応しており、あらゆる現象を捉える「多目的顕微鏡」になっている。

2. 実験背景について

次世代シーケンサーによるゲノム配列解析においては、ゲノム DNA の調製後、DNA を断片化しサイズを調整したライブラリを作製し、特殊な PCR のステップを経てライブラリの末端配列を決定する (HiSeq の場合、単一リード長は 50-150bp)。得られたリードをアSEMBルし、配列を復元する (コンティグの作成)。さらに、コンティグ間の位置関係の情報を含むスキファールドを作成する。コンティグ長やスキファールド長が長いほど、ゲノム配列がより広範囲にわたって決定されたことになる。

生物工学科・三戸太郎助教の研究室では、次世代シーケンサー (主に HiSeq) を利用してフタホシコオロギ (ゲノムサイズ: 約 1.7Gb) の全ゲノム配列の解析を進めている。これまでに数百塩基から千塩基程度のサイズのライブラリを作製し、解析を行ってきた。しかしアSEMBリの結果、コンティグ / スキファールド長は低い値にとどまっていた。そこで、次のステップとして数千塩基から 1 万塩基程度のサイズのライブラリを作製しその末端配列を決めるメイトペア解析を行うこととなった。そのために必要となる、抽出過程での物理的剪断の少ない高品質ゲノム DNA の調製を行ったので、ここで報告する。

3. 実験内容

3-1 準備物について

材料：羽化後2週間程経過したアダルトのフタホシコオロギの精巣 (Testis) を10個体分

試薬：ホモジネーションバッファー (0.1M 塩化ナトリウム, 0.03M トリス塩酸 pH8.0, 0.01M エチレンジアミン四酢酸-2 ナトリウム塩, 0.5% トライトン-100, 0.01M 2-メルカプトエタノール: HB), エクストラクションバッファー (0.1M トリス塩酸 pH8.0, 0.1M 塩化ナトリウム, 0.02M エチレンジアミン四酢酸-2 ナトリウム塩: EB), 飽和フェノール, イソアミルアルコール:クロロホルム=1:24 (CIA), 10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 1×TE 溶液 (10mM トリス塩酸 pH8.0, 1mM エチレンジアミン四酢酸-2 ナトリウム塩), 1×TAE 溶液 (40mM トリス塩酸 pH8.0, 20mM 酢酸, 1mM エチレンジアミン四酢酸-2 ナトリウム塩), 100%エタノール, 70%エタノール, 20mg/ml プロテイナーゼ K, 1×リン酸緩衝生理食塩水 (PBS), ジエチルエーテル, 液体窒素

器具：30 ml ホモゲナイザー (滅菌処理), 乳鉢 (滅菌処理, 使用前に冷却), スパーテル (冷), ピンセット, ハサミ, パラフィン台, 虫ピン, 22G 針 (冷), エッペンドルフチューブ (冷), 50 ml チューブ, ガラス棒 (滅菌処理), キムワイプ, アイスボックス, 遠心機 (機械棟 802/kubota 6200), ハイブリオープン (化学生物棟 808/シーソーを設置), NanoDrop (化学生物棟 802), 蛍光分光光度計 Tecan M200 (機械棟 701)

3-2 精巣の取り出し

① ジエチルエーテルを染み込ませたキムワイプ

が入った 50 ml チューブにフタホシコオロギを入れて麻酔した。

- ② 精巣は背中側にあるので, パラフィン台の上に胸部を虫ピンで固定した。
- ③ 羽を切り落とし, 腹部の中央を縦に切り, 胸部付近は横にも切り, 大きく開いた。さらに虫ピンで固定した。
- ④ 精巣は胸部すぐ下の腹部にあり, 正中の左右に 5 mm 程度の大きさの白色で弾力がある組織であった。黄色の脂肪が付着しないように PBS 中に取り出した。
- ⑤ アイスボックスで冷却しておいたエッペンドルフチューブに水分をできるだけ除いた精巣を入れ, 即, 液体窒素中にて凍結させた。

3-3 ホモゲナイズ〜精製

- ① あらかじめ液体窒素で冷やしておいた乳鉢に, 3-2-⑤の凍結させた精巣をエッペンドルフチューブから 22G 針で取り出し, 即, すりつぶした。
- ② 粉末状になったサンプルを予め冷やしておいたスパーテルで HB が 10 ml 入った 30 ml ホモジナイザーへ, 即, 移しホモジナイズした。操作①と②は, 乳鉢に直接液体窒素を注ぎ足しながら行った。
- ③ 2 本の 15 ml チューブに分注し, 遠心分離 (500g・1min・4°C) した。
- ④ 上清を新しい 15 ml チューブに取り, 遠心分離 (2000g・5min・4°C) した。
- ⑤ 上清を除きペレットに HB を 1 ml 加え, ペースルで潰して混合した。
- ⑥ EB を 13.5 ml 追加し, 50 ml チューブに移し替えた。
- ⑦ 20mg/ml プロテイナーゼ K を 75 μ l, 10% SDS を 1.5 ml 加えた。

- ⑧ 37°Cのハイブリオープン中で 12h 以上穏やかに振盪させた。
- ⑨ 翌日オープンから取り出し、飽和フェノールを 15 ml加えて、室温のシーソーで穏やかに 2h 混合した。この間 30min ごとに手動で穏やかに混合した。
- ⑩ 遠心分離 (3000rpm・5min・室温) し、上清を新しい 50 mlチューブに移し替えた。
- ⑪ 飽和フェノールを 15 ml加え、シーソーで穏やかに 30min 混合した。
- ⑫ 操作⑩を繰り返した。
- ⑬ その上清に飽和フェノールと CIA を 1:1 で混合した溶液を 15 ml添加し、手動で穏やかにエマルジョンになる (白濁した状態) まで混合した。
- ⑭ 操作⑩, ⑬を繰り返した。
- ⑮ 遠心分離 (3000rpm・5min・室温) し、上清を新しい 50 mlチューブに移し替え、100%エタノール 30 mlを静かに注ぎ、穏やかに確実に混合した。
- ⑯ 白い糸状 DNA が現れるので、これをガラス棒に付着させ取り出した。
- ⑰ その状態のまま 70%エタノールに 10sec 浸した。
- ⑱ 操作⑰を繰り返した後、DNA が透明になるまで風乾させた。
- ⑲ ガラス棒ごと 50 μ l の TE 溶液に浸け、4°Cで一晩以上かけて溶解させた。
- ⑳ また操作⑱の後のチューブから、エタノール沈殿の操作により、残りの DNA も回収した。

3-4 DNA の濃度測定および品質確認

- ① NanoDropにて DNA (RNA を含む) の純度測定を行った。また 260nm の吸光度から濃度

も求めた。280nm/260nm の OD (optical density) 比はタンパク質などの不純物の量を反映し、その値は 1.8~2.0 であることが好ましい。結果を表 1 に示した。

- ② 次に、蛍光分光光度計 Tecan M200 にて dsDNA の定量を行った。QuantiFluor ds DNA system (Promega 社, E2670) を使用し、dsDNA の濃度を求めた。励起波長/蛍光波長は 504nm/531nm。また試薬の量の関係上、ガラス棒により精製した DNA サンプルのみを行った。結果を表 1 に示した。

表 1 DNA の濃度測定結果

		濃度	OD 比	収量
NanoDrop よる DNA (RNA を含む) の吸光度測定	ガラス棒	570ng/ μ l	1.98	<u>55.3</u> μ g
	遠心分離	2.9 μ g/ μ l	1.99	281 μ g
Tecan M200 by QuantiFluor dsDNA System による dsDNA 定量		231ng/ μ l	/	<u>22.4</u> μ g

実験①から、純度の高い DNA が得られたことがわかった。また収量 (下線で示した値) において、Nanodrop の測定結果から得られた値が高いのは RNA の混入に因ると考えられる。実験②から、ガラス棒からの精製のみの DNA で目標とする収量 (20 μ g) が取得できたので、こちらを鋳型として使用することとした。

- ③ 抽出したゲノム DNA についてアガロースゲル電気泳動による品質確認 (分解していないか、大きなサイズのものがあるか、RNA の含有量はどのくらいか、などを検証する) を行った。結果を図 1 に示した。

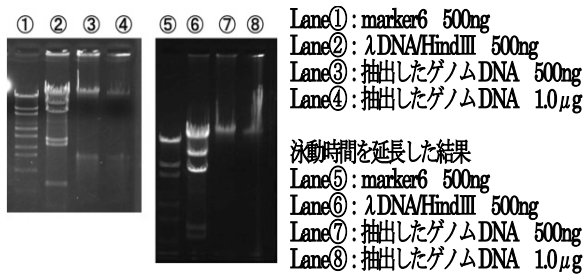


図1 アガロースゲルによる電気泳動結果

0.8% agarose gel で泳動した。用いた DNA サイズマーカーは marker6 [Lane①と⑤の上から 19.33, 7.74, 6.22, 4.26, 3.47, 2.69, 1.88, 1.49, 0.93(kb)] と λDNA/HindIII [Lane②と⑥の上から 23.01, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.02, 0.56(kb)]。

実験③の Lane③と④にみられる約 1.8kb のバンドは RNA であると考えられる。このことは実験①および②の結果からも予想される。また DNA サイズマーカーの一番上のバンドより大きい位置にみられるバンドから、目標とした大きなサイズの DNA が得られていることも確認できた。しかもラダーやスメアーが確認できなかったので、DNA の分解は起こっていないと考えられる。

4. 調製したゲノム DNA を用いた解析結果について

このゲノム DNA を使用したメイトペア解析を共同研究先に依頼した。その結果、10kb のメイトペア解析ではスキヤホールド N50 (スキヤフォルドを長い順に連結し、全ゲノム長の 50% を越えた時点のスキヤフォルドの長さ; スキヤフォルド長の指標として使われる) が 520kb から 2.4Mb へと約 4.6 倍も伸び、さらに 20 kb のメイトペア解析の結果を加えると 10 倍強の 5.5Mb と劇的に伸びたとの報告を受けた (2014 年 1 月現在解析進行中)。本ドラフトゲノム配列はコオロギゲノムの構造解析に大きく貢献すると考えられる。

5. 終わりに

本実験に関しまして、ご指導いただいた三戸助教に深く感謝申し上げます。

参考文献・図書等

- [1] 次世代シーケンサー 目的別アドバンスドメソッド, 秀潤社, 2012 年 9 月 19 日発行
- [2] ワトソン組換え DNA の分子生物学第 2 版, 善株式会社, 1993 年 5 月 20 日発行