

第 12 節 DNA 配列解析の前処理技術

1. 序章

当社 (PSS) は 1995 年に Magtration® と称する独自の磁性粒子制御技術を開発した。この Magtration® 技術に基づいて全自動核酸抽出・精製装置を開発し、現在までに 10000 台以上の装置を世界に販売してきた (図 1)。この Magtration® は、世界 10 数カ国に特許出願・登録されている独自技術である。PSS では独自の Magtration® 技術をコアに、自社で磁性粒子も開発し、最適化されたプロトコル、およびあらかじめ充填されたプレパック試薬を用いて、誰でも簡単に高品質な DNA/RNA の抽出を行うことが可能なパーソナルタイプの小型装置を開発し販売している。この技術の開発により、特に専門的な知識や技量がなくとも、熟練度による差が出やすい、核酸抽出工程を自動化することで、その後の工程においても信頼性の高い結果を得ることが可能となった。最近になって、PSS では、この Magtration® 技術で培った自動化技術を基盤とし、(1) 核酸の抽出、(2) 核酸の増幅反応のセットアップ、(3) 核酸の増幅およびモニタリング、(4) 検査結果の自動判定、の核酸増幅解析に必要な工程を全て自動化した、全自動遺伝子解析装置を開発するなど、より複雑な反応工程の自動化をコンパクトな機器で可能にしている¹⁾。

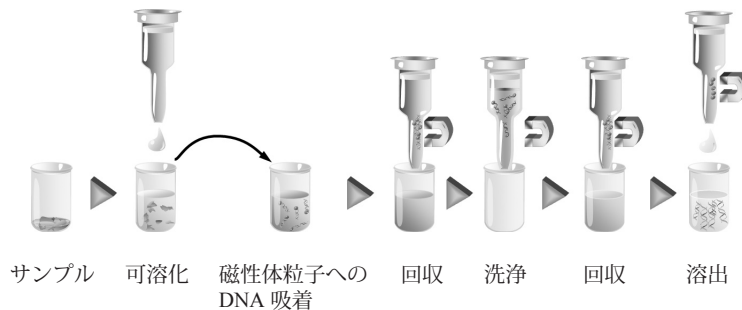


図 1 Magtration® 技術を用いた DNA 精製方法

次世代シーケンサーの市場での登場は 2005 年のことであり、既に 9 年が経過し、急速に普及していることから、次世代とは言えないのかもしれない。とはいえ、この呼称はサンガー法 (ジデオキシ法) を原理とするキャピラリー DNA シーケンサーに対するものともいえ、本稿においても次世代シーケンサーと呼ぶ。次世代シーケンサーによって、我々はそれまでのシーケンサーの 1000 倍以上の速度でデータを収集することが可能となった。また、ヒトゲノムの DNA 塩基配列を解析するコストも、10 年前は 10 億ドル以上という莫大なコストが必要であったが、現在では数 1000 ドル程度での解析が可能にまで飛躍的に下がっている²⁻⁵⁾。膨大なゲノムデータを解釈する作業はまだ始まったばかりであるが、次世代シーケンサーを用いて得られるゲノム情報の解明および利用は、疾患と塩基配列の関連性といった医学やバイオテクノロジーの飛躍的な発展に貢献しており、医療現場における新たな診断ツールとしての利用に期待が高まっている。一方で、次世代シーケンサー技術は飛躍的に進化したものの、次章に記すように、シーケンス解析に用いるサンプルの調製は非常に複雑な工程が必要である。また、各社のシーケンサーや解析手法などにより、その調製方法は異なる。さらに、質の高いシーケンス結果を得るためには、質の高いシーケンスにかけるためのサンプルを調製せねばならず、DNA 塩基配列解析に用いるサンプルの前処理、特に結果の精度、確度を高いレベルで要求される医療現場での診断ツールとしての使用に際しては、重要な因子となることが予想される。

本稿では、次世代シーケンサーの塩基配列解析プロセスを述べた後に、PSS の保有する核酸精製技術、自動化技術、解析技術を結集し、来るべきクリニカルシーケンスの容易な実用化を可能にするための、DNA 配列解析の前処理技術の開発について述べる。

2. 次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析プロセス

(1) 次世代シーケンサーの基本原則および性能

昨今、次世代シーケンサーの普及が急速に進んでおり、また、新規機器が続々と発表されている。各シーケンサーにはそれぞれ特徴があり、目的に応じて機器を使い分けたり、異なる原理のシーケンサーの結果を合わせて総合的に結果を解釈したりと、状況に応じて利用されている。ここでは、現在最も普及している Roche 社の GS FLX +, GS Junior, Illumina 社の HiSeq, MiSeq, Life technologies 社の 5500 SOLiD, Ion PGM, Ion Proton の基本原則と性能について簡単に紹介する。

シーケンシング手法は、逐次合成によるシーケンス反応 (Sequencing by synthesis; SBS) を基本原則としている。鋳型 DNA に相補的な DNA の合成を行い、合成反応によって取り込まれた DNA を逐次的に同定する。この取り込まれる DNA が、GS FLX +, GS Junior, Ion PGM および Ion Proton においてはデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP), HiSeq, MiSeq, および 5500 SOLiD においては蛍光色素で修飾された dNTP または DNA 配列を用いる。これによって、鋳型 DNA の配列を再構成する。

シーケンシングは、いずれも DNA の合成過程の中で行われる。各シーケンサーは、それぞれ異なる特徴的な検出原理を持つ (表 1)。GS FLX + と GS Junior では、DNA 合成反応により生じるピロリン酸によって合成された ATP と、反応液として添加されたルシフェリンおよびルシフェラーゼによって発光を得るパイロシーケンシング法が応用されている⁶⁾。Ion PGM と Ion Proton では、同様にピロリン酸が産出される際に同時に発せられる水素イオンをシリコンチップ上に形成されたナノデバイスによって検出する⁷⁾。HiSeq と MiSeq では、異なる蛍光物質が標識された dATP, dGTP, dCTP, dTTP のいずれかを検出する⁸⁾。5500 SOLiD では、それぞれ異なる蛍光色素で標識された ATGC の塩基 2 つから成る合計 16 種類の配列を DNA リガーゼによって合成させ、蛍光パターンを読み取る⁹⁾。

上記のシーケンシング反応を行う為に、PCR によって DNA を増幅する必要がある。PCR の反応場はそれぞれ特徴的である。担体に結合するように処理された DNA が、担体の表面上に固定化され、PCR 反応が行われる。Roche 社や Life technologies 社の手法では球状の粒子、Illumina 社のそれでは平面のガラスチャンネルをそれぞれ担体とする。それらの担体は、粒子ひとつひとつ、またはフローセルと呼ばれるハニカム構造に分かれたウェルをそれぞれ反応場とする。粒子上での PCR は、オイル中に分散された球状の水溶液滴の中で行われることからエマルジョン PCR と呼ばれ、平面上の PCR はブリッジ PCR と呼ばれる。

表 1 主な次世代シーケンサーの基本原則

メーカー	機種名	PCR	基本原則
Roche 社	GS FLX +	エマルジョン PCR	パイロシーケンシング
	GS Junior		
Illumina 社	HiSeq	ブリッジ PCR	DNA 合成シーケンシング
	MiSeq		
Life technologies 社	Ion PGM	エマルジョン PCR	イオン半導体
	Ion Proton		
	5500 SOLiD		DNA リガーゼシーケンシング

次世代シーケンサーの性能は、スループット、リード長、時間当たりのリード長で大別できる (表 2)。GS FLX + は、リード長が 700 base と、他のシーケンサーと比べて長い連続した DNA 配列を読み取ることができる。HiSeq は 1 ラン当たりを得られるリード数が 60 億塩基と非常に大きい。GS Junior や MiSeq は、それぞれ GS FLX + と HiSeq のロースループットタイプであり、小回りが利く仕様である。5500 SOLiD では、唯一、単一塩基ではなく 8 塩基プローブを用い、このうち 3' 端の 2 塩基に対してそれぞれ異なる蛍光色素が標識されている。この原理によって、一塩基多型 (Single

Nucleotide Polymorphism; SNPs) など一塩基の違いとエラーとを区別しやすく、リシーケンスに向いている。Ion Proton は、DNA 合成反応時に放出される水素イオンを検出することで、他の手法よりも桁違いの高速化に成功した。このように、各機種に応じて、リード長、時間当たりのリード長、また、当然のことながら機器価格とランニングコストも異なる。この他、読み取りエラーの頻度についてもしばしば取り沙汰される。

表 2 主な次世代シーケンサーの性能

メーカー	機種名	スループット	リード長 (base)	1 ラン当たりのリード数 (Mb/ran)	1 時間当たりのリード数 (Mb/ 時間)
Roche 社	GS FLX +	HTP	400-700	1	30
	GS Junior	LTP	400	0.1	4.5
Illumina 社	HiSeq	HTP	100-150	< 6,000	1,000-6,000
	MiSeq	LTP	50-250	< 34	70-200
Life technologies 社	Ion PGM	LTP	> 100	< 5	10-220
	Ion Proton	LTP	200	< 80	2,500-10,000
	5500 SOLiD	HTP	60	> 1,400	800

この他、DNA もしくは RNA の単一の分子について塩基配列を検出する一分子シーケンシングの実用化が期待されている。読取精度、生産性の観点から、当面は実用化されても上述のシーケンサーとの併用が必要だと考えられている。

(2) 次世代シーケンサー解析におけるサンプル前処理プロセス

サンプルの前処理は、次世代シーケンサーのオペレーターの悩みの種の一つと言える。いくら次世代シーケンサーが優秀であっても、その前処理が適切でなければ、その性能を十分に発揮できない。その上、その工程は時間と労力を要し、工程が適切に行われていることを確認しなければならない。最も広く応用されているゲノム解析の場合、次のプロセスを必要とする (図 2)。(a) サンプルからの核酸の抽出、(b) DNA の断片化、(c) DNA サイズセレクション、(d) DNA 末端の平滑化処理、(e) DNA 末端へのアダプター配列の付加、(f) DNA の精製、(g) DNA の増幅。DNA の断片化には、多くの場合、超音波装置やネブライザーといった物理破碎処理法を用いる。DNA サイズセレクションには、磁性粒子を用いた手法と電気泳動を用いた手法が知られている。アダプター配列の付加工程は、各シーケンサーに合わせた独自のキットが市販されている。これらの工程を経た DNA が、上述したように各シーケンサー独自の PCR 法によって増幅され、それらを基にシーケンシングが行われる。

これらの操作に加えて、標的が遺伝子発現解析である場合、抽出した RNA を cDNA に合成する工程が加わり、エピジェネティクス解析の ChIP-seq であれば、クロマチン免疫沈降とクロマチンからの DNA の分離工程が加わる。このように、次世代シーケンサーでデータを得るまでの前処理は、多くの工程を含む。長い工程は、労力やコストが嵩むだけでなく、工程毎のばらつきを蓄積したりエラーを誘発したりするといったリスクを産む。よって、これらの処理を自動化することは、より質の高いシーケンスの結果を得ることに繋がる。

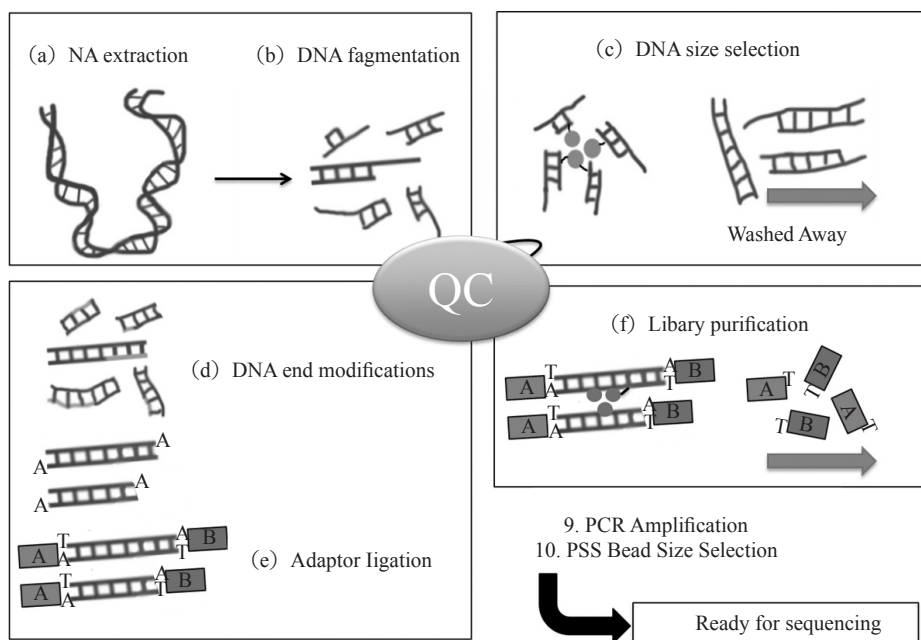


図2 次世代シーケンサーの前処理のワークフロー

3. 自動化に向けた前処理技術の開発

PSS ではこれまでに Magtration[®] 技術をコアにして、様々なサンプル処理工程の自動化に取り組んできた。その成果としては、磁性粒子を用いた核酸抽出装置に始まり、体外診断用医療機器としての酵素抗体法による自動免疫検査装置、分光法を用いた生化学・免疫検査装置、また核酸の抽出のみならず、その後の検査工程を全て自動化した全自動核酸増幅検査装置の開発も行った¹⁾。さらに、独自のキャピラリー反応技術を用いた様々な反応工程の自動化にも取り組んできた^{10,11)}。これらの機器においては、自動分注機や磁性粒子の制御機構のみではなく、様々な酵素反応を行うための緻密な温度調節機構、遺伝子の増幅に用いる PCR 法を効率よく行うための温度サイクル調節機構、蛍光測定ユニット、化学発光測定ユニット、分光測定を行うための分光器ユニット、などの測定に関するユニットも搭載されている。加えて、反応を自動化するための特殊な形状・素材の専用消耗品も同時に開発され、自動化プロセスの効率化、およびユーザービリティの向上に寄与している。現在、PSS ではこれらの技術を結集し、かつ新たな要素を加えることで次世代シーケンサー向けのサンプル前処理技術の開発を行っている。その一部を紹介する。

(1) サンプル処理工程の自動化

図2に示したように、次世代シーケンサー解析に用いるサンプルを調製するためには、数多くの工程を経なければならない。PSS ではその工程の自動化、および自動化に適した各種サンプルの調製方法を以前より開発しており、その一部はすでに自社製の SX-8G compact を用いて自動化に成功している(図3)。SX-8G compact は、Magtration[®] 機能を有した8連の分注ノズルを持つ Basic な機器であるが、その汎用性の高さと温度調節機能は柔軟性があり各種工程の自動化に適している。

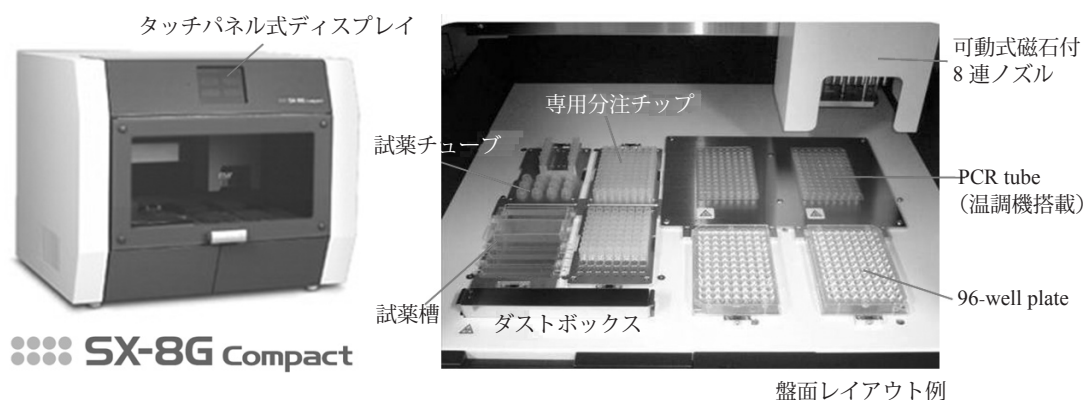


図3 SX - 8G compact

(a) サンプルからの核酸の抽出

サンプルからの核酸の抽出に関しては、PSS では既に独自の磁性粒子を用いて、血液、血漿、血清、動植物組織、食品サンプル、細菌、ウイルスなどからのゲノム DNA の抽出、RNA および DNA の抽出用試薬を製品化しており、SX-8G compact に適応している。これらの試薬およびプロトコルを用いることで、再現の良い核酸の抽出が可能となる。また、このプロセスは (f) の様々な工程を経た DNA の精製にも使用される。

(b) DNA の断片化

DNA の断片化に関しては、従来では超音波や、ネブライザーによる切断などが行われている。PSS ではこのプロセスを自動化するために、SX-8G compact での化学的 DNA の切断方法を検討した (図 4A)。この手法は酸素ラジカルにより DNA 切断を行う方法であり、液体の添加のみで反応を制御できるため、自動化機器には有効な手法であると考えられる。また、これと並行して全自動遺伝子検査装置向けに開発した小型の超音波破碎ユニットの使用も同時に検討している。

(c) DNA サイズセレクション

DNA サイズは表 2 に示したように、使用する各社のシーケンサーによって最適な DNA 鎖長を選択しなければならない。PSS では磁性粒子を利用した DNA のサイズセレクション法の開発も行っており、SX-8G compact で既に自動化している (図 4B)。この方法では、DNA 鎖長に応じて磁性粒子への DNA の結合力が変わる特性を利用して、磁性粒子に結合させた DNA 分子をその鎖長に応じて順次溶出する技術を応用したものである。工程としては磁性粒子を用いた核酸抽出法となら変わりはなく、自動化に適している手法である。

(d および e) DNA 末端の平滑化処理、アダプター配列の付加

この処理においては各社手法が異なるものの、酵素反応の自動化を行う工程であり、一般的な分注機能および温度調節機能で十分対応可能である。実際に、SX-8G compact においても、各社のプロセスに最適な反応プロトコルは構築済みである。

(g) DNA の増幅

自動化において、もっとも困難な工程が DNA の増幅工程であろう。この工程においては Roche 社、Life Technologies 社はエマルジョン PCR 法を用いており、その反応液は数 mL から数十 mL と量も多く、かつ PCR 反応を行う前には均一なエマルジョンを作製しなければならない。PCR 反応後においても、Breaking と呼ばれる、オイルと有機溶媒の混合液の中から解析に用いるマイクロビーズを回収することが必要である。かつ、自動分注機において取り扱いのしにくいオイルや有機溶媒を頻繁に使用しなければならない。PSS ではすでに中～大容量向けのエマルジョン作製ユニット、PCR ユニット、Breaking ユニットの開発を行っており、実際のシーケンサーを用いた検証を行い実用化に向けて検討中である。

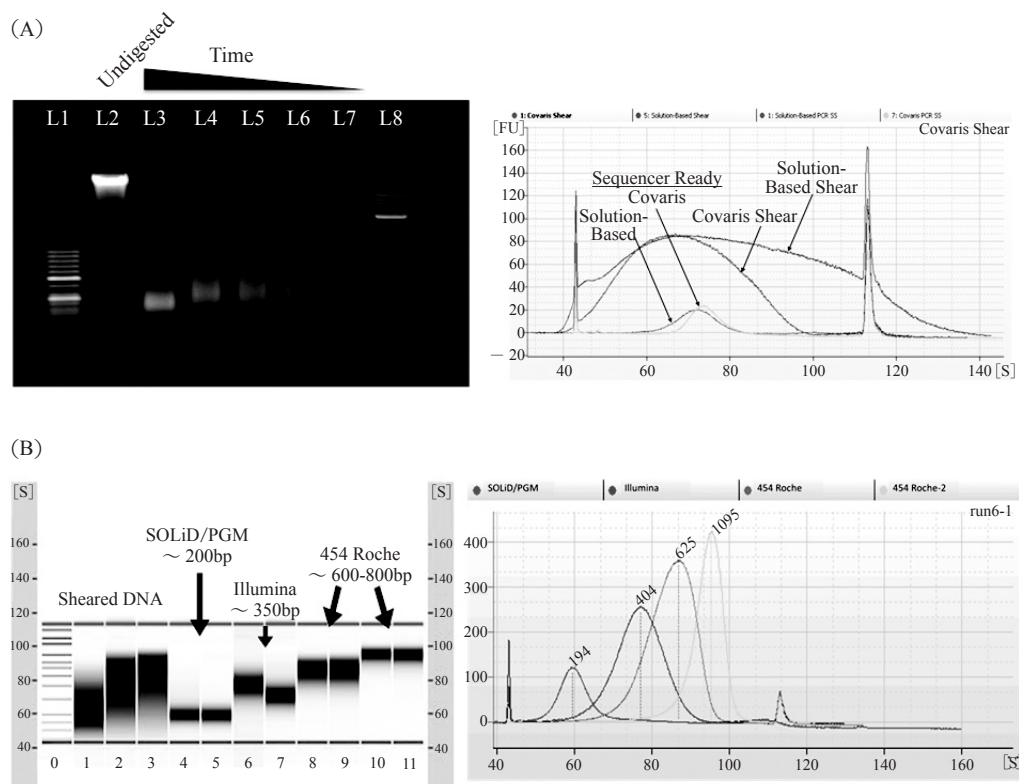


図4 DNA切断とDNA鎖長に応じた分画の自動化

※カラーの図は巻頭ページ参照

(2) サンプル処理工程の Quality control

前述のとおり、より良いシーケンス解析結果を得るためには、シーケンスに用いるサンプルのクオリティーが、各社のシーケンサーおよび解析手段に合致していなければならない。現状ではQC工程は人の手により行われ、その判断も実務経験を積んだ研究者により行われている。

PSSではこれらの工程の自動化も視野に入れた開発を行っている。例えば、工程(a)や(f)の後で測定に十分な量のDNAを保持していることを確認する目的でDNAの濃度を測定し、適切な濃度に調製したのちに再度確認を行う。また、(c)の後にDNAの断片化と分離が適切に行われたことを確認する為、電気泳動を用いてDNAの鎖長を確認するなどの工程である。これらはこれまでに他の自動機器で確立してきた、分光測定ユニット、蛍光測定ユニット、キャピラリーを用いた解析手法、自動測定に適した消耗品などの技術に応用し開発を行っている。また、測定データの処理、結果の判定に関するアルゴリズムの構築についても、診断機器ソフトウェアの開発経験を生かし開発を行っている。

QCの工程が自動化されることで、より標準化されたクオリティーの高いシーケンスデータが、簡単にどこでも得られることが可能となると予想される。

4. まとめ

次世代シーケンサーの登場により、これまでの常識を超えた医学・生物学分野での知見が急速に得られている。また、新たな疾病原因の発見、薬剤効果・副作用予測などへの利用も広く行われており、近い将来に次世代シーケンサーを利用した体外診断が行われることになると予想する。しかし、上述のように、次世代シーケンサーはどの施設でも容易に使用できるわけではなく、医療の場で使用可能な安定した結果を得るためには、数多くの熟練した技術者が必要である。これは、今後予想される次世代シーケンサーを利用したクリニカルシーケンスによる体外診断の導入の障壁となると考えられる。PSSでは、前述したような自動化可能な技術を結集し、各社のシーケンサーに対応可能な全自動の前処理装置を開発中である。このような機器を数年以内に市場に導入することにより、次世代シーケンサーの利用が容易にな

るとともに、医療現場へのスムーズな導入が可能となると考える。

文 献

- 1) 宮下雪子, 上田哲也, *Medical Science Digest* (2012) **38**, 644-648
- 2) M. Kircher and J. Kelso, *Bioessays* (2010) **32**, 524-536
- 3) N. Hall, *J. Exp. Biol.* (2007) **210**, 1518-1525
- 4) T. C. Glenn, *Mol. Ecol. Resour.* (2011) **11**, 759-769
- 5) L. Lin *et al.*, *J. Biomed. Biotech.* (2012) **2012**, Article ID 251364, 11 pages
- 6) M. Ronaghi *et al.*, *Analytical Biochemistry* (2000) **282**, 186-193
- 7) B. A. Flusberg *et al.*, *Nature Methods* (2010) **7**, 461-465
- 8) D. R. Bentley *et al.*, *Nature* (2008) **456**, 53-59
- 9) J. Shendure *et al.*, *Science* (2005) **437**, 376-380
- 10) 澤上一美, 田島秀二, シーエムシー出版刊, 2006年4月
- 11) Y. Kagawa *et al.*, *J. Bioscience and Bioengineering* (200) **110**, 505-508