

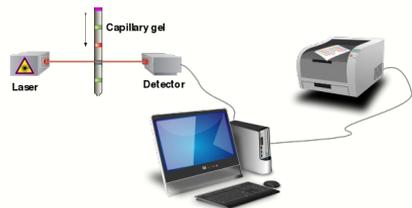
NGS(次世代シーケンス)スタートガイド

概要・前処理工程・基礎用語

Yuji Hamamoto

Next Generation Sequencing (NGS) 次世代シーケンシング

- ヒトゲノムはATGCの配列が30億続き、遺伝情報を保存



旧世代シーケンス(サンガー法)

- 数百配列ずつの解析が限界
- ヒトゲノム1人解析するのに4,000億円と13年



次世代シーケンス

- 配列を超高速で解析
- ヒトゲノム1人解析するのに10万円以下と数日

遺伝子の配列がわかると

- ヒトゲノムの配列は個人によって0.1%違いがあり、この違いが、容姿、体質、性格など、人の多様性につながっている
↓
 - どの配列がどう違えば、どういう個人差に結びつくかを明らかにするための研究が盛んに行われている
 - 配列が分かると、病気の有無やかかり易さ、薬の効き方や副作用が事前にわかるようになり、医療への応用が期待される
(2019年より保険適用が開始)
- 他にもNGSを利用した実験は多岐にわたる

↓ 緑内障患者に特徴的な配列を検出した例

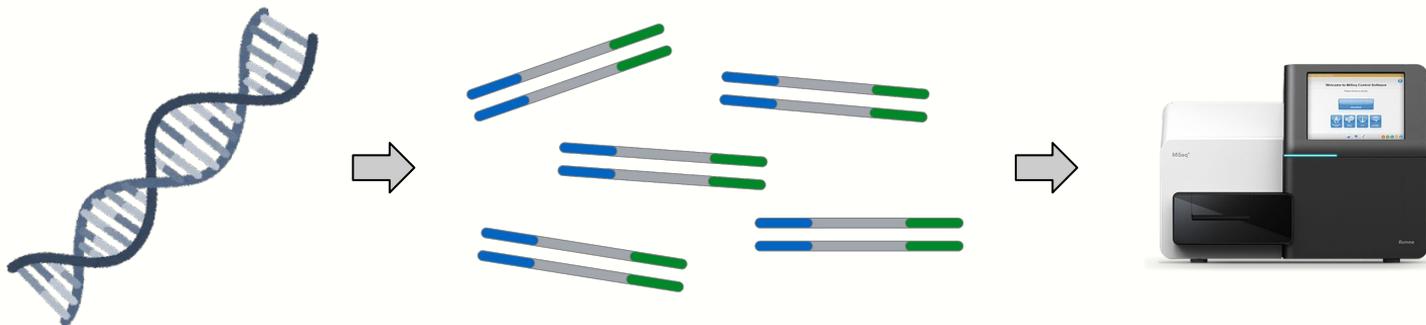


どうすればNGSで配列解析が出来るか

- (唾液などから)サンプルを取っても、すぐNGS解析は出来ない

↓

- サンプルからヒトゲノム以外の不純物を除き、適切な長さに切断し、両端に解析用のオリゴDNAを付加し、解析したくない配列は除く必要がある



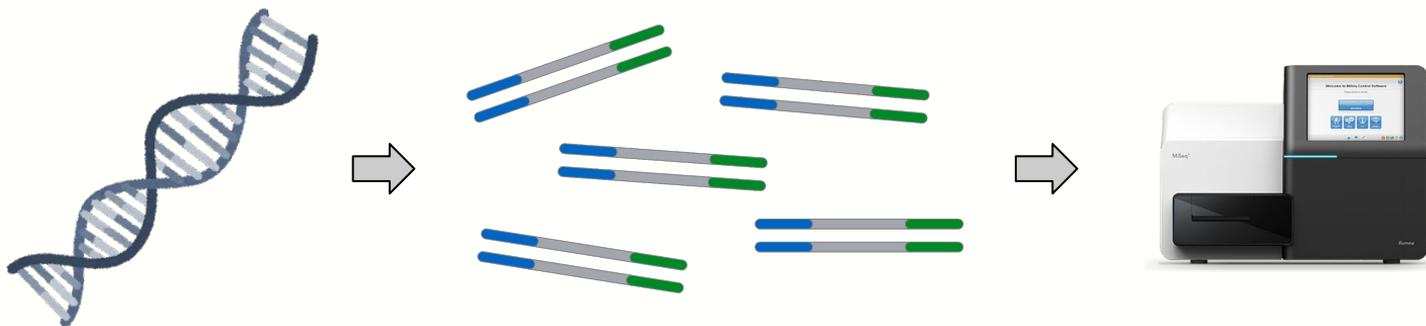
どうすればNGSで配列解析が出来るか

- (唾液などから) サンプルを取っても、すぐNGS解析は出来ない

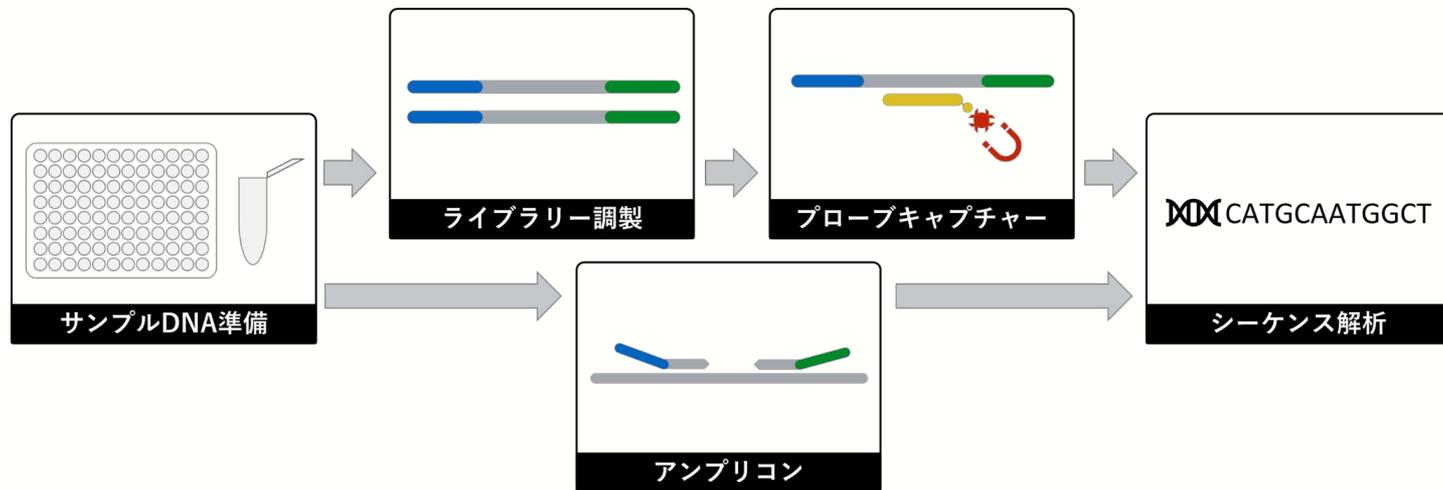


- サンプルからヒトゲノム以外の不純物を除き、適切な長さに切断し、両端に解析用のオリゴDNAを付加し、解析したくない配列は除く必要がある

この工程に必要な試薬を、NGS前処理試薬として各メーカーより販売

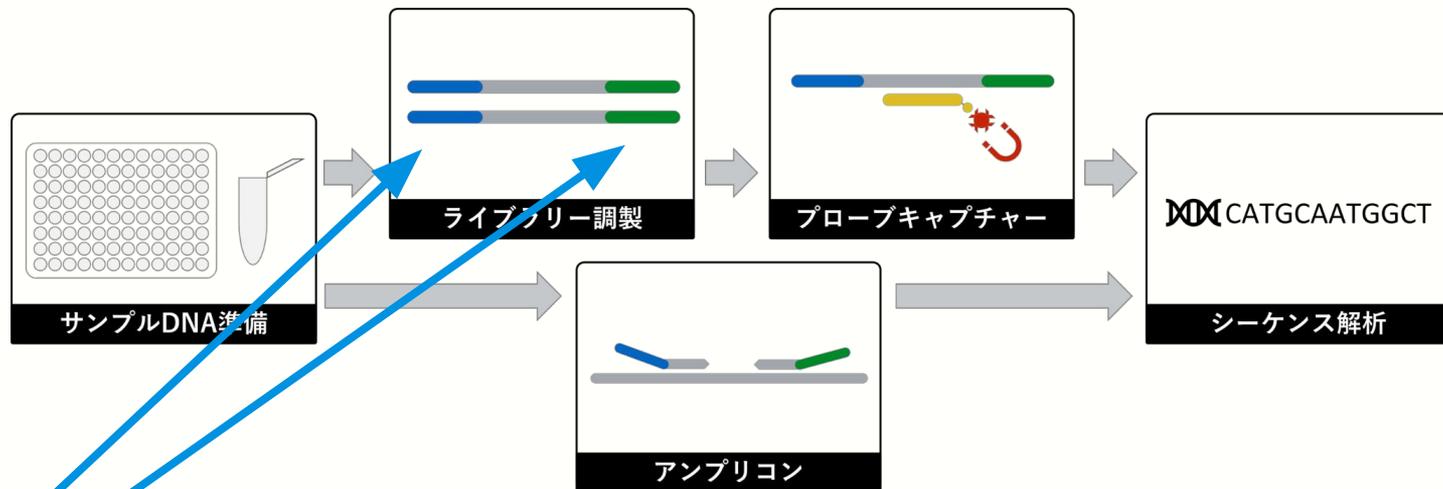


NGS前処理工程の詳細



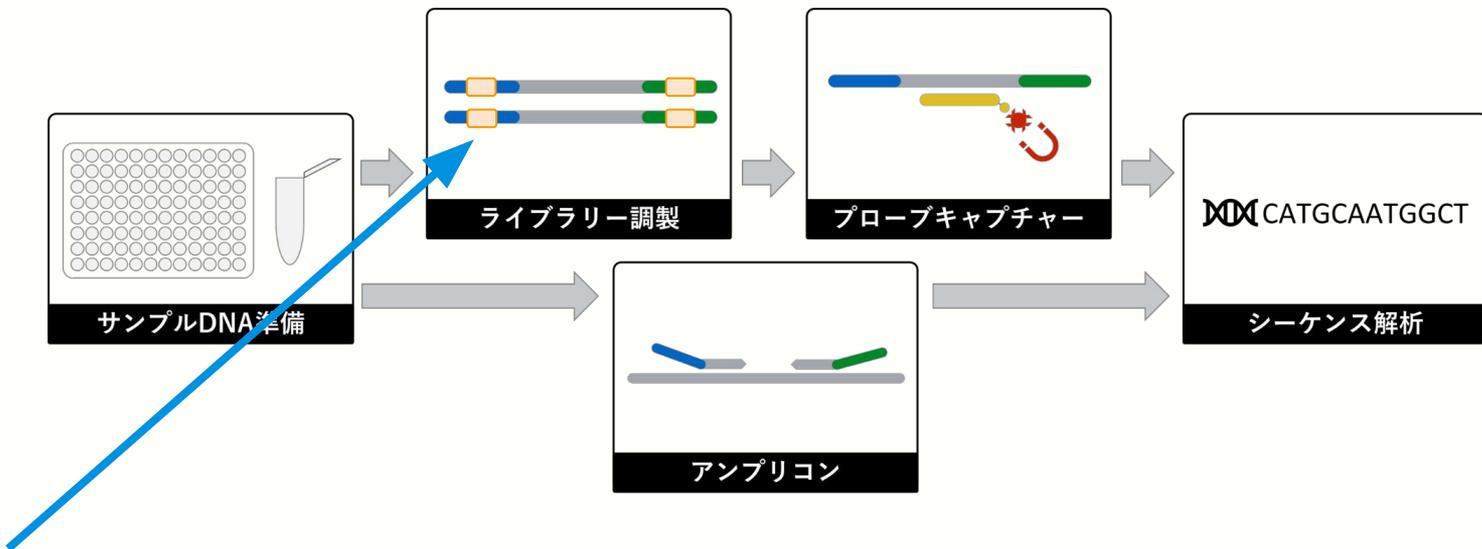
- 次ページより各語句、工程、代表的な試薬を説

語句説明:アダプター



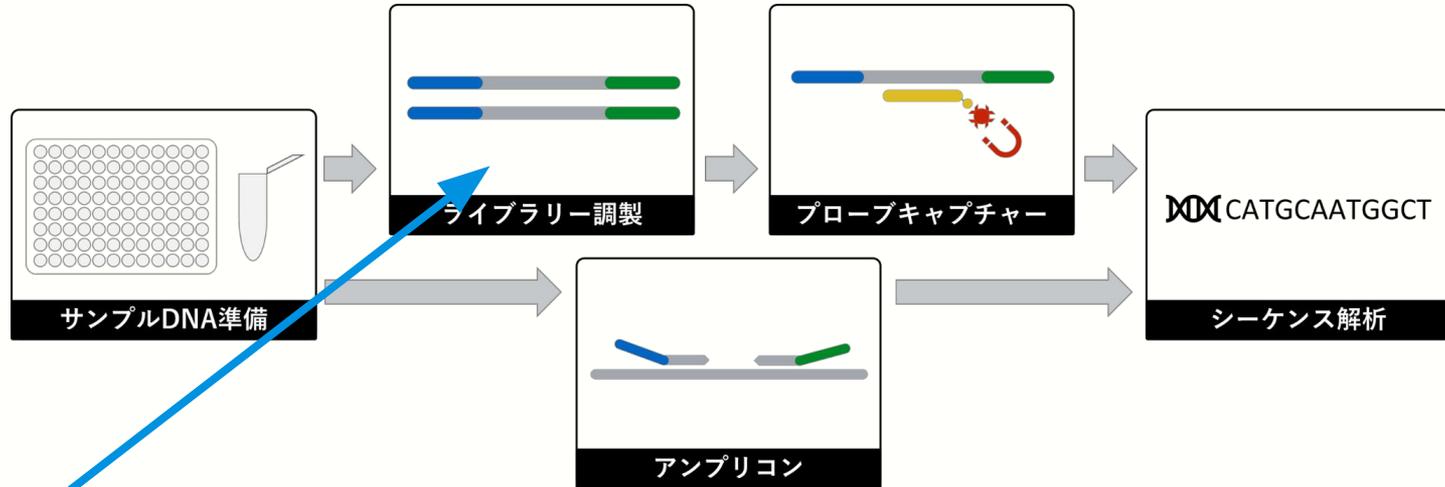
- シーケンス機器で解析するために、サンプルDNAの両端に付けたオリゴDNA

語句説明: インデックス



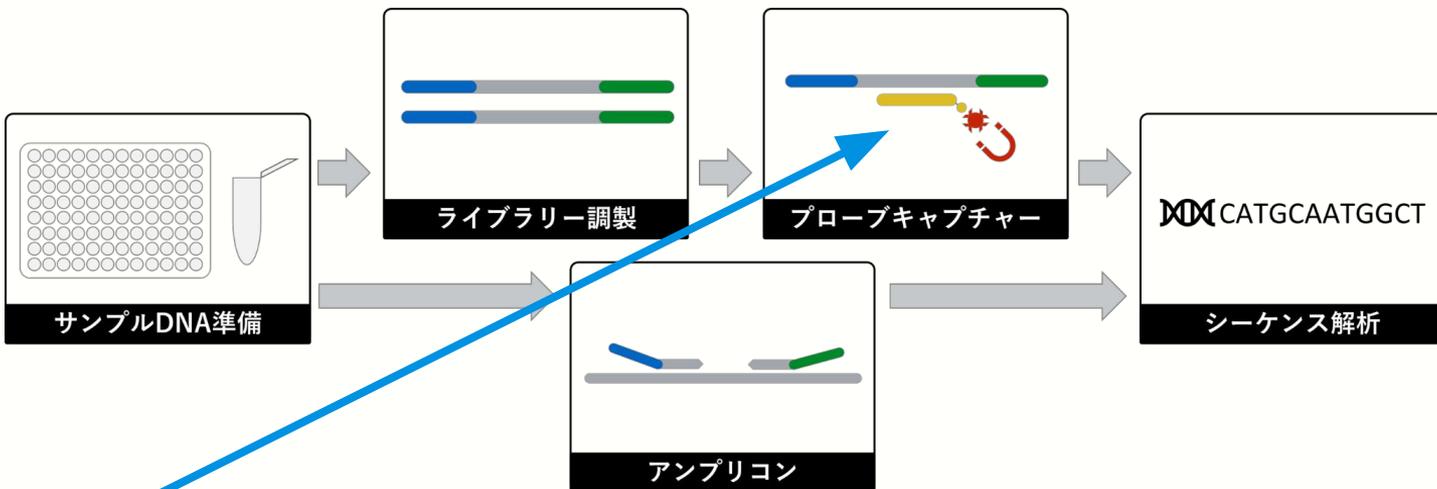
- アダプター配列中の各サンプルに応じた固有の配列
- インデックスを付けておくことで、複数サンプルを同時にシーケンスしても、解析時にインデックス配列を指標にサンプルごとデータ振り分けることが出来るように

語句説明:ライブラリー



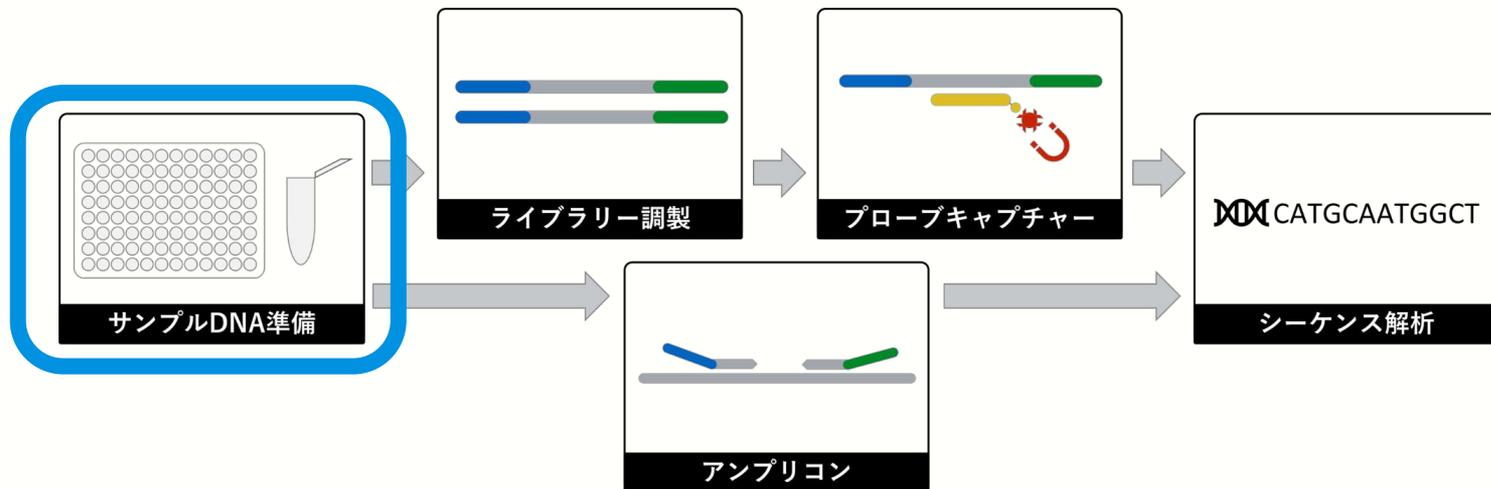
- アダプターを付けてシーケンス可能な状態にしたサンプルライブラリーを作る工程をライブラリー調製という

語句説明: キャプチャープローブ/バイト



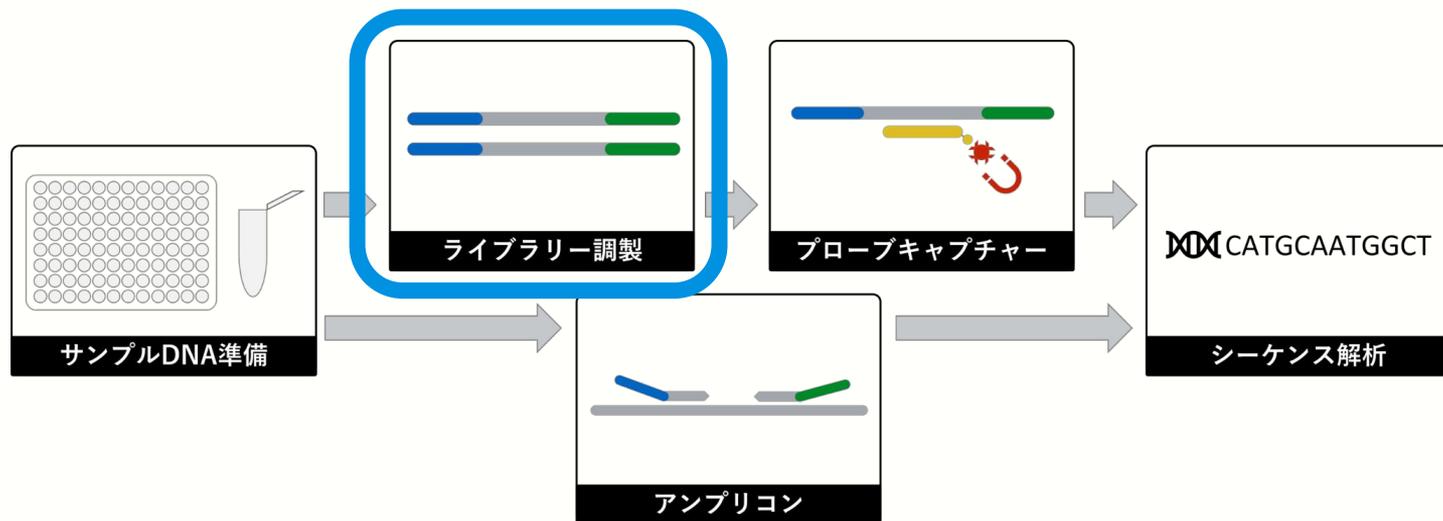
- サンプル中の特定の配列のみを濃縮するためのプローブ
目的の配列のみをより詳細に解析でき、余計な解析のコストと手間を減らすことができる
(NGS機器の設定で目的の配列のみを解析することは出来ない)

工程①: サンプルDNA準備



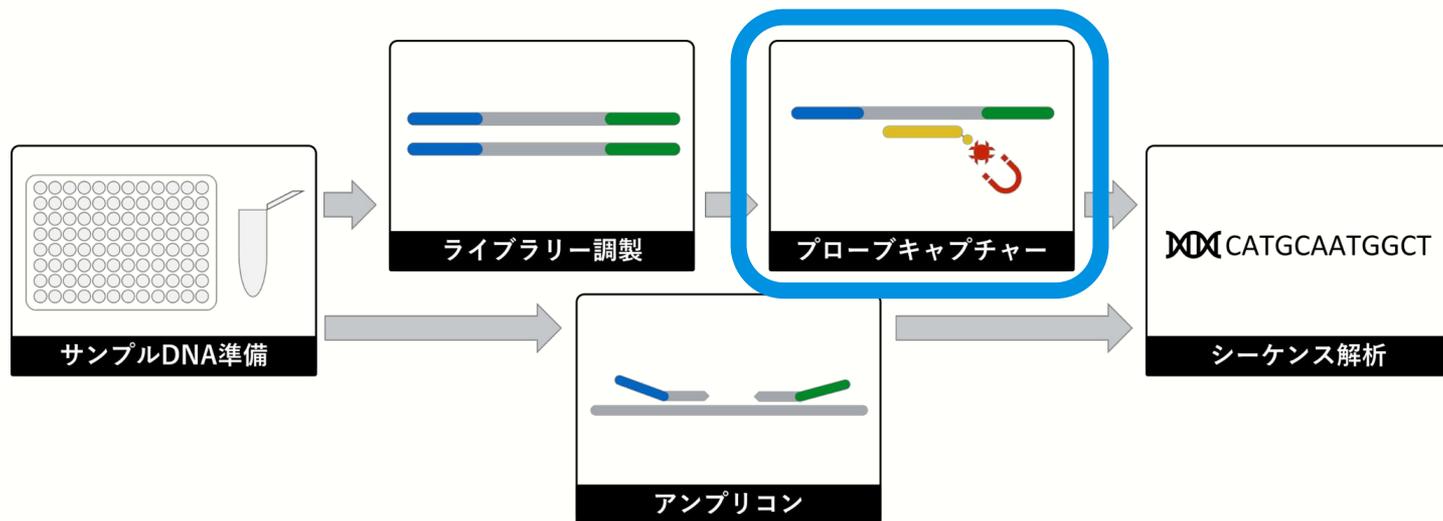
- 解析したいサンプルから、なるべく品質や量を落とさずにDNA/RNAを抽出、精製する
- 質や量が低いサンプルで実験を進めると、後の工程でリカバリーできず全ての作業が無駄になる恐れも
- 特にFFPEなど品質の低いサンプルでは、慎重にサンプル品質を確認しながら進めるのがベター

工程②:ライブラリー調製



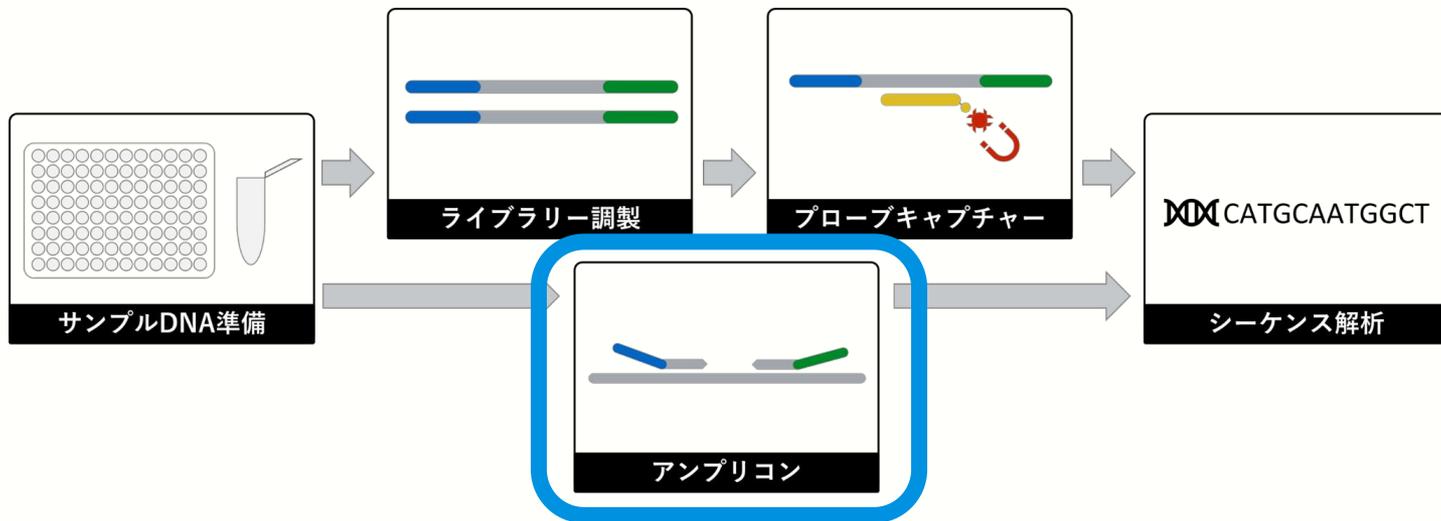
- サンプルを適切な長さに切断し、アダプターを両端に付加してシーケンス可能な状態にする
- 断片化は、超音波などによる物理的方法、酵素、トランスポゾンの何れかが多い
- アダプター付加方法は、全長のアダプターを付加したりPCRしながら付加したりと様々

工程③-A:プローブキャプチャー



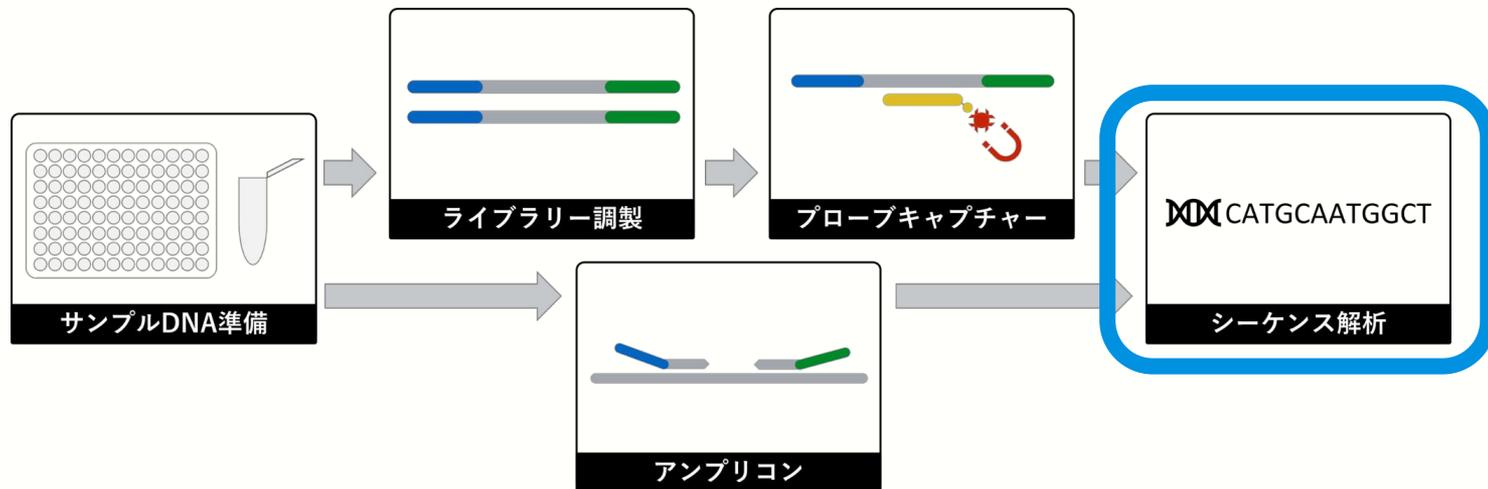
- サンプル中から特定の領域のみを解析したい場合は、キャプチャープローブを用いて濃縮する（濃縮する必要がなければ、工程を飛ばしてシーケンス解析に進む）
- 次ページのアンプリコンシーケンスと比べて、広い領域を濃縮する場合に使用することが多い

工程③-B:アンプリコンシーケンス



- 目的の配列のみをPCR増幅しながらライブラリー作製する手法
- 前ページのプローブキャプチャーと比べて、狭い領域を濃縮する場合に使用することが多い

工程④:シーケンス解析



- 準備したライブラリーを実際にシーケンスする
- 取得した配列を目的に応じて解析する
- 以前は解析の難しさがハードルであったが、各社よりツールが提供されるなど幾分楽に

まとめ

- NGSは遺伝子配列が超高速で取得でき、各種研究や医療等への応用が進んでいる
- NGSでシーケンスするにはサンプルDNAやRNAだけでは出来ず、適切な長さにする、両端にアダプターを付けるなど、前処理が必要
- NGS実験では専用の工程や用語が使われる
本資料をベースに少しずつ知識を増やしていければ
- **NGS研究をしている人も、自分の専門分野以外は全く分からないことも
まずは自分の興味のある分野から進めて問題ない**