

Whole genome amplification法によるヒト死後脳ゲノムDNAの増幅

上田順子¹、岩本和也¹、文東美紀¹、中野陽子¹、鶴飼渉²、橋本恵理²、斉藤利和²、加藤忠史¹
(1. 理研・脳科学・精神疾患動態、2. 札幌医大・医・神経精神医学)

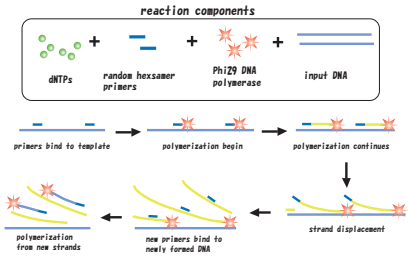
1. 要旨

ヒト死後脳試料のように、貴重な臨床サンプルを用いて遺伝学的解析を行う場合、ゲノムDNAの枯渇は重要な懸案の一つである。Whole genome amplification (WGA) 法は、DNAを $10^4 \sim 10^6$ 倍に増幅することができ、希少な試料から大量のDNAを取得する有効な手法とみなされている。WGA法は、phi29 DNA polymeraseでゲノムを増幅する multiple displacement amplification (MDA) 法とPCR法を基本にした方法に大別できる。今回、我々は、ヒト死後脳由来ゲノムDNAからの適切なWGA法の選択、および、ゲノムDNA抽出条件の検討を行った。

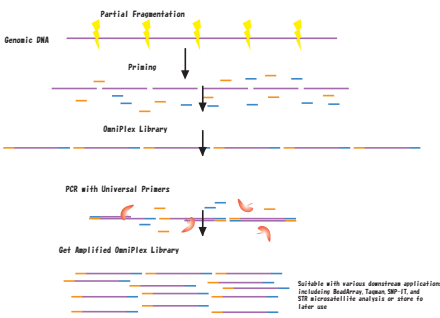
MDA法を利用したREPLI-g、Genomiphi v2、および、PCR法を利用したGenomePlex WGAの3種の市販WGAキットについて、増幅成功率とgenotype一致率の評価を行った。市販DNA抽出キットを用いて抽出されたゲノムDNAでは、PCR法に基づくGenomePlex WGAが、増幅成功率、genotype一致率共に最も高かった。また、標準的なDNA抽出法 (proteinase K/phenol:chloroform extraction, ProK/PCI法) で抽出したDNAでは、MDA法、PCR法問わず、増幅成功率、genotype一致率共に好成績を示した。対照的に、TrizolやISOGENでtotal RNAを抽出後、残液から回収したDNAでは両法共に産物の増幅は認められなかった。更に、Affymetrix 50KXba SNPチップを使用し、増幅前のゲノムDNAとWGA産物のgenotype一致率について検討したところ、Genomiphi v2で99%以上、GenomePlexで92%以上の一致率を示した。これらの結果により、ヒト死後脳由来ゲノムDNAからのWGAは、適切なDNA抽出法と適切なWGA法を選択すれば、遺伝学的解析に使用可能な高品質の産物が得られることが示された。

2. Whole genome amplification (WGA) の原理

a) MDA-based (REPLI-g:Qiagen社/Genomiphi:GE社)



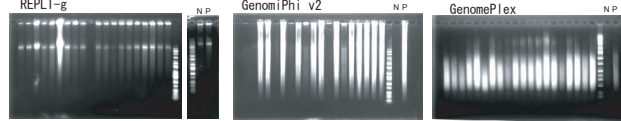
b) PCR-based (GenomePlex:SIGMA社)



Whole genome amplification (WGA) 法は、PCR法を基本にしているか否かで、二つに大別できる。REPLI-gとGenomiphiは、PCR法を使わない方法で、multiple displacement amplification (MDA) 法と呼ばれる方法を使用する。MDA法では、バクテリオファージ由来のphi29 DNA polymeraseを利用し、ゲノムDNAを増幅する。まず、ランダムヘキサマープライマーが鋳型ゲノムDNAにアニールし、そこからphi29 DNA polymeraseが相補鎖を合成する。合成された相補鎖に、更にプライマーがアニールし、phi29 DNA polymeraseによる合成が始まる。このようにして、ゲノムDNAの増幅が連続して行われるのが特徴である。この方法の欠点は、ゲノムDNAを含まないNegative controlサンプルでも、おそらくバクテリオファージ由来DNAの増幅産物が確認できることである。GE社のGenomiphi ver. 2では、その点が大きく改善されているとされている。MDA法に対して、GenomePlexはPCR法を基本にした方法である。まず、ゲノムDNAを、500bp前後の断片にする。次に、断片の両端をプライミングアダプターを付加することにより、libraryを作成する。libraryをPCR増幅することによって、偏りのないゲノムDNAの増幅が可能とされている。この方法では、基本的なNegative controlの顕著な増幅は確認されない。PCR法を利用した方法には、他にも、Primer Extension Pre-amplification (PEP) 法、Degenerate Oligonucleotide-Primer (DOP) PCR法などがある。

3. 各WGAの増幅結果とSNP typing によるクオリティチェック

a) ヒトの死後脳由来ゲノムDNAからのWGA産物の電気泳動



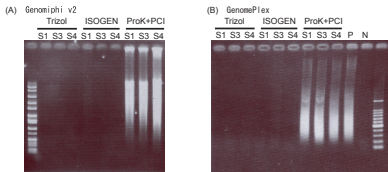
b) ヒトの死後脳由来ゲノムDNAからのWGAの成功率 (収量/genotyping)

	MDA-based			PCR-based
	REPLI-g	Genomiphi v2	Genomiphi v2*	GenomePlex
# of samples tested	20	20	105	20
# of WGA products	19	14	105	20
Success rate of WGA	95%	70.00%	100.00%	100%
# of concordant genotypings	13	11	105	19
# of discordant genotypings	6	3	0	1
Concordance rate	68.40%	78.60%	100.00%	95%

(a) 10 ngのヒトの死後脳ゲノムDNAから、WGA増幅を行った。ゲノムDNAは、市販カラム (Promega社) で抽出を行ったものを使用した (N = 20)。Positive control (P) として、培養リンパ芽球 (lymphoblastoid cell line, LCL) 由来ゲノムDNA 10 ngを、Negative control (N) としてDDWを用いた。反応後のサンプルを電気泳動したところ、基本的にすべての方法で、産物の増幅が確認された。GenomiphiとGenomePlexでは、Negative controlの増幅が認められたが、無視可能なレベルであった。対して、REPLI-gでは試料やPositive controlと、サイズや収量の点から区別できない産物の増幅が認められた。

(b) 収量が100 ng以上得られた時を成功とした場合の成功率と、Taqman probeによるrs2070106 SNPのgenotypingの一致率を示す。*は、一般的なProK/PCI法で新たにゲノムDNAの抽出を行い再実験を行った時の結果である。

4. ゲノムDNA抽出方法の各WGAの増幅効率への影響



ヒト死後脳凍結小片から、ISOGEN (NIPPON GENE社)、Trizol (Invitrogen社) と、一般的なProK/PCI法の三種の方法でゲノムDNAを抽出し、各々をGenomiphiとGenomePlexで増幅した結果。両法とも、ProK/PCI法で抽出したゲノムDNAのみ、WGA増幅に成功している。この結果は、3b)のGenomiphiでも、ProK/PCI法で抽出したゲノムDNAを使用した方が、実験の成功率が高いことと一致する。増幅産物のgenotypingの結果、増幅に成功したすべてのサンプルでgenotypeは一致した。

5. SNP chipを用いたWGA産物のクオリティチェック

	genomic DNA	Genomiphi v2	GenomePlex
LCL_TB100	95.87%	99.36%	84.65%
LCL_TB106	95.82%	98.63%	85.76%
Br_S1	97.42%	98.96%	74.94%
Br_S3	96.47%	98.47%	77.06%
Br_S4	97.59%	98.52%	78.21%

4の結果を受けて、リンパ芽球株 (LCL) と死後脳試料 (Br) からProK/PCI法でゲノムDNAの抽出を行い、GenomiphiとGenomePlexでWGAを行った。それらの産物で、50KXba SNPchip (Affymetrix社) による網羅的SNP genotypingを行い、増幅前のゲノムDNAの結果とcall rateを比較した。Genomiphiでは、増幅前のゲノムDNAと同等のcall rateが、GenomePlexでは低いcall rateが得られた。

	Genomiphi v2		GenomePlex	
	analyzed	Concordance rate (%)	analyzed	Concordance rate (%)
LCL_1	56303	99.70%	48321	97.10%
LCL_2	55958	99.90%	48852	96.80%
Br_S1	56988	99.80%	43205	93.80%
Br_S3	56162	99.70%	43968	92.60%
Br_S4	56930	99.90%	45339	94.30%

上記のSNPchip解析で、WGA前後のサンプルにおけるgenotypeの一致率を計算した。Genomiphi v2では、すべて99%以上の高い一致率を示し、WGA法による増幅の偏りが少ないことを示している。

6. 考察

- ヒト死後脳由来ゲノムDNAのWGA増幅について、REPLI-g、Genomiphi、GenomePlexの3種類の方法を評価した。当初我々は、WGAの実験に、市販のDNA抽出カラムを用いて抽出されたゲノムDNAを用いていた。この場合、3種のWGA法全てにおいて、基本的にgenotypeなどに使用できるゲノムDNA増幅産物を得ることができた。しかし、WGAの増幅効率やgenotypeの成功率は、鋳型として用いるゲノムDNAの品質に多分に依存していることが分かった。
- 市販のカラム、あるいはISOGENやTrizolといった、RNAとDNAを連続して抽出するようなプロトコールで抽出されたゲノムDNAは、一般的なProK/PCI法で抽出されたゲノムDNAより、収量・バイアスのない増幅といった点で劣っていると考えられる。これらの方法で抽出したゲノムDNAを、PCI法や市販の別種のカラムで再精製しても、genotypingの成功率に改善は認められなかった (data not shown)。市販のゲノムDNA抽出試薬は、脳組織を手早く溶解するために、強力なホモジェナイズの過程を含んでいる。短い時間で高品質のゲノムDNAが得られる代わりに、ゲノムDNAの分解が避けられず、それがMDA法によるWGAの成功を妨げるのではないかと考えられた。従って、脳組織からDNAを抽出する際には、一般的なProK/PCI法を選択することが、死後脳でWGA法を行う際には適していると言える。
- MDA法では収量的にWGAが成功したとしても、品質の劣るDNAを用いた場合、バイアスのない増幅が保証されるものではない。よって、増幅前のDNAの品質がよくない、あるいは不明である場合には、MDA法ではない方法が推奨される。
- 高品質のゲノムDNAを使用した場合は、MDA法であるGenomiphiとPCR法であるGenomePlexとでは、Genomiphiの方が、SNPアレイのcall rate、増幅前のゲノムDNAとのgenotype一致率、どちらの点でも優れていた。
- 目的や出発試料の状態に合わせて、適切なゲノムDNA抽出方法とWGA法を選べば、ヒト死後脳由来ゲノムDNAのWGA産物を分子遺伝学的解析に使うことは、十分可能であると考えられる。

7. 謝辞

This study was supported by a Grant-in-Aid from the Japanese Ministry of Health, Welfare, and Labor. Postmortem brain and DNA extracts were donated by the Stanley Medical Research Institute, courtesy of Drs. Michael B. Knable, E. Fuller Torrey, Marea J. Webster, and Robert H. Yolken. We are indebted to the Research Resource Center at the RIKEN Brain Science Institute for SNPchip analysis.

8. 文献

Iwamoto K, Ueda J, Nakano Y, Bundo M, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Kato T. Evaluation of whole genome amplification methods using postmortem brain samples. J Neurosci Methods. 2007; 165(1):104-110.