

Agilent Bravo NGS 自動化システムおよび DNA メチル化キャプチャ法の 組み合わせによる DNA 開始量低減化プロトコルの確立

著者

美辺詩織
大桃秀樹
清水厚志
岩手医科大学
医歯薬総合研究所生体情報解析部門
いわて東北メディカル・メガバンク機構
生体情報解析部門

齋藤るみ子
生井聡史
石井善幸
吉崎史子
アジレント・テクノロジー株式会社
診断・ゲノミクス部門

木下雅彦
アジレント・テクノロジー株式会社
クロマトグラフィー・
質量分析テクニカル部門

はじめに

エピジェネティクスは DNA のメチル化やヒストン修飾といった化学修飾に基づく遺伝子発現制御機構であり、疾患の発症や進行、成長や発達などに重要な役割を果たす知見が近年多く示されています。特に、CpG 部位の 7～8 割で見られるシトシンのメチル化は、ヒトを含むほぼ全ての生物種における重要なエピジェネティック部位として知られています。これまでに CpG 部位を手掛かりとした多数の検出方法が開発され、様々な知見が生まれています。

多因子性疾患の理解においては、タンパク質コード領域などに典型的な機能喪失を生じる遺伝性疾患とは異なり、個人間におけるエピジェネティックな変化 (CDMV: common DNA methylation variation) の差を捉えることが重要です。また、疾患や生活習慣と関連する DNA メチル化部位の探索に用いられるエピゲノムワイド関連解析 (EWAS: Epigenome-wide association study) により、これまでに多くの DNA メチル化バイオマーカーが見つかっています。CDMV 解析では、従来 1 μ g のゲノム DNA、および多くの検体数が必要となることから、大規模コホート調査やバイオバンクの検体が用いられています。その一方で、大規模に収集された DNA には限りがあることに加え、被験者にとってより負担の少ない検体収集方法が求められていることから、解析に使用する試料の低減化は急務になっています。これに対して有効な方法の一つが、DNA 開始量低減化プロトコルによる網羅的解析です。メチル化キャプチャーシークエンスでは、全ゲノムバイサルファイトシークエンスとは異なり、目的とする領域を濃縮してバイサルファイト処理を行うことから、効率的なシークエンスを行うことが可能となります。本アプリケーションノートでは、アジレントの Bravo NGS 自動化システムおよび複数の SureSelect を組み合わせ、従来法より DNA 量を低減したメチル化キャプチャーシークエンス解析の一例をご紹介します。

方法

キャプチャパネルのデザイン

本検討で用いたキャプチャパネルは、ヒト末梢血単核細胞 (単球および CD4 陽性 T リンパ球)、および好中球におけるメチル化多様性が大きい領域¹、さらにそれらに疾患エピゲノムマーカーを搭載したカスタムパネルを用いました。デザインの詳細については、ケーススタディー #5994-2724 JAJP² をご覧ください。

用いたサンプルと DNA 断片化

市販血液 (Whole Blood K2-EDTA: 株式会社サンフコ) から Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit (Promega) を用いてゲノム DNA (gDNA) を抽出しました。抽出した gDNA は Covaris E220 Focused-ultrasonicator (Covaris, LLC) を用いて断片化し、Agilent 2200 TapeStation System および D1000 ScreenTape を用いてフラグメントのピークサイズが 250 ~ 300 bp であることを確認しました。

以下のライブラリ調製、ハイブリダイゼーション、バイサルファイト変換などの各調製プロセスは全て Bravo NGS 自動化システム Option B を用いて実施しました。

ライブラリ調製

ライブラリ調製には、SureSelect XT HS2 Library Preparation Kit (XT HS2 Kit) および SureSelect Methyl-Seq XT Kit (Methyl XT Kit) を用いました。

断片化した gDNA (50 μ L) は、XT HS2 Kit を用いて、末端修復及び A テール付加反応を行いました。続いて、Methyl XT Kit に含まれる SureSelect Methyl-Seq Adapter を用いてメチル化アダプタをライブラリ断片の 5' 末端および 3' 末端の両方にライゲーションしました。その後、Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) を用いて精製を行いました。その際、キャプチャプローブとのハイブリダイズに用いる量を可能な限り多く確保するために、ビーズ比率を 0.8 \times 容量から 1.8 \times 容量に変更しています。ライブラリは、35 μ L の Nuclease free water で溶出しました。得られたライブラリは、Agilent 4200 TapeStation System および High Sensitivity D1000 ScreenTape キットを用いて、ライブラリのピークサイズを確認しました。

キャプチャライブラリとのハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーション反応には、Methyl XT Kit を用いました。

精製したライブラリの全量を、濃縮遠心機を用いて乾燥し、3.4 μ L の Nuclease free water で再溶解しました。その後、Hyb Mix、Block Master Mix およびカスタムキャプチャライブラリと混合し、サーマルサイクラーを用いて 65°C、16 時間以上の条件でハイブリダイゼーションを行いました。

ハイブリダイゼーション終了後、メチル化アダプタ付き DNA ライブラリと Methyl-Seq キャプチャライブラリのハイブリッドを、Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Thermo Fisher Scientific) によってキャプチャし、20 μ L の 0.1 N NaOH で溶出しました。

バイサルファイト変換

バイサルファイト変換反応は、DNA Methylation-Gold Kit もしくは EZ-96 DNA Methylation-GoldMagPrep (いずれも Zymo Research) を用いて、キャプチャされた DNA ライブラリに含まれるメチル化されていないシトシン残基をバイサルファイト変換反応によりウラシル残基に変換しました。

キャプチャされたライブラリ 20 μ L に対して CT Conversion Reagent 130 μ L を加え、64°C、2.5 時間バイサルファイト変換反応を行いました。その後、直ちに脱スルホン化およびカラムもしくはビーズによる精製を実施し、20 μ L (カラム精製) もしくは 35 μ L (ビーズ精製) の M-Elution Buffer で溶出し、精製方法の比較を行いました。

なお、本プロセスは Zymo Research 社が提供するプロトコルに準じて行っていますが、バイサルファイト変換反応では、98°Cでのインキュベーションを省略して実施しました。

PCR 反応とビーズ精製

バイサルファイト変換後のライブラリは、Methyl XT Kit を用いて PCR 増幅を行いました。その後、Agencourt AMPure XP を用いて精製を行い、25 μ L の Nuclease free water で溶出しました。その後、XT HS2 Kit を用いて、メチル化アダプタ付き DNA サンプルの増幅およびデュアルイン

デックスタグの付加反応を PCR により実施しました。最後に Agencourt AMPure XP を用いて精製を行い、25 μ L の Nuclease free water で溶出して最終ライブラリを得ました。得られた最終ライブラリは、Agilent 4200 TapeStation System および High Sensitivity D1000 ScreenTape キットを用いて、ライブラリのピークサイズと濃度を確認しました。その後、NovaSeq 6000 シーケンサー (Illumina) を用いて 150 paired-end でシーケンスを行いました。

なお、ライブラリ調製における詳細なプロトコルは、AppNote #5994-6841EN³ をご覧ください。

データ解析

デマルチプレックスを行い、得られた各サンプルの FASTQ ファイルは、以下のワークフローに従って解析を行いました。最初に、アダプタ配列を AGeNT_3.0.6 trimmer で除去し、リード長を 100 bp に揃えました。残ったリードを Bismark-0.24.2 でリファレンス配列 (hg19) にマッピングしました。マッピング後に deduplicate_bismark で PCR Duplicate を除去し、最後に bismark_methylation_extractor でメチル化・非メチル化シトシンを抽出してメチル化率を算出しました。

結果

キャプチャ前のライブラリの収量

ライブラリ調製に用いる DNA 開始量は 50 ng、100 ng、250 ng、500 ng の 4 通りで実施しました。メチル化アダプタを付加した後の DNA ライブラリを電気泳動にて確認したところ、全サンプルにおいて開始量依存的に、アダプタ付き DNA ライブラリが得られました (Fig. 1 および Table 1)。TapeStation による 500 ng での TapeStation でのサイズ確認の一例を Fig. 2 に示しました。

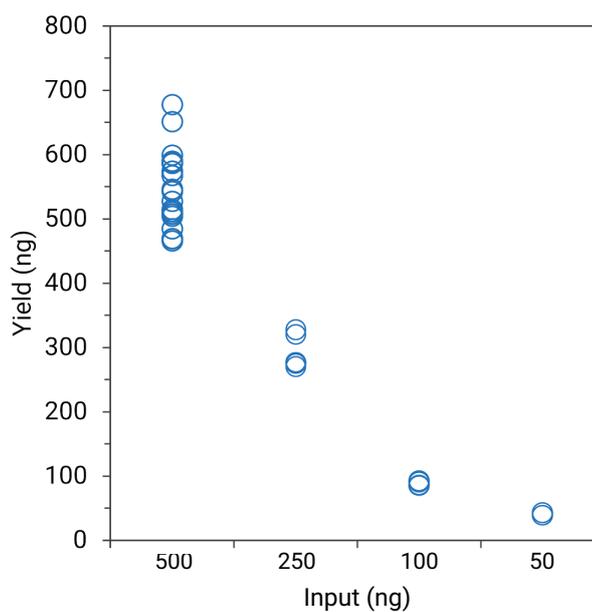


Fig. 1 キャプチャ前ライブラリの収量分布

Table 1 キャプチャ前ライブラリ収量

Input (ng)	n	Ave. yield (ng)
500	20	548.2
250	6	292.7
100	4	88.3
50	2	40.8

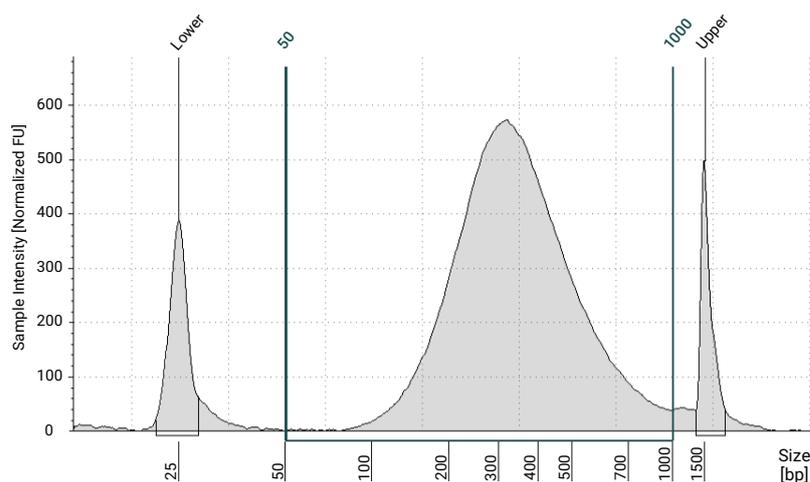


Fig. 2 キャプチャ前ライブラリを High-Sensitivity D1000 キットで泳動した例 (開始量 500 ng、5 倍希釈)

各種条件検討における最終ライブラリの収量

得られた DNA ライブラリ全量について、キャプチャライブラリとのハイブリダイゼーションを行った後にバイサルファイト変換を行いました。

このプロセスでの精製は、通常はカラム (EZ DNA Methylation-Gold Kit) を用いて実施していますが、処理数が多くなるにつれ、人的リソースの圧迫などが大きな課題となっていました。そのため本検討では、多検体での処理や人的リソースを減らすことを目的とし、カラムによる精製とビーズによる精製の2通りで検討しました。バイサルファイト処理ライブラリの PCR は、開始量に応じ、プロトコル推奨もしくは推奨前後のサイクル数 1~3 パターンを実施しました。また、比較対照として従来法で調製したライブラリをコントロールとしました。

その結果、精製方法の違いにおいては、実施した 500 ng、250 ng の開始量いずれにおいても、ビーズ精製のほうがカラム精製よりも 22 ~ 54% 高い収量を示しました。また、従来法との比較においては、精製方法の違いに関わらず、明らかな収量の増加が認められました。

また開始量の違いに合わせてバイサルファイト処理ライブラリの PCR のサイクル数を増やすことにより、全サンプルでシーケンスに十分な収量を得ることができました。

以上の条件で得られた最終ライブラリ濃度を Fig. 3 および Table 2 に示しました。また、TapeStation によるサイズ確認の一例を Fig. 4A、4B に示しました。

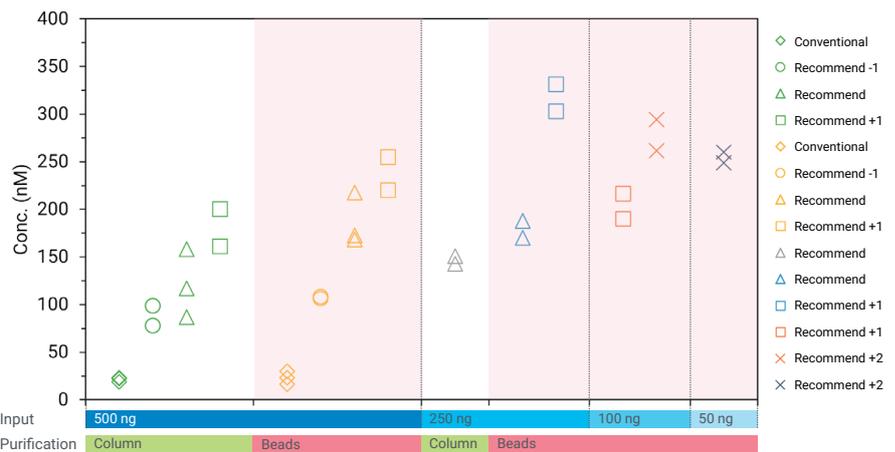


Fig. 3 最終ライブラリの収量分布

Table 2 最終ライブラリ収量

Input (ng)	Lib prep method	Purify	#PCR1	#PCR2	Ave. conc (nM)	n
			Number of cycles	Number of cycles		
500	Conventional	Column	8	6	21.4	3
			8 (Recommend -1)	8	88.3	2
			9 (Recommend)	8	120.7	3
			10 (Recommend +1)	8	180.5	2
	Revised	Beads	8 (Recommend -1)	8	107.3	2
			9 (Recommend)	8	186.2	3
			10 (Recommend +1)	8	237.5	2
			10 (Recommend)	8	147.0	2
250	Revised	Beads	11 (Recommend +1)	8	179.0	2
		Beads	12 (Recommend +2)	8	277.8	2
	Revised	Beads	11 (Recommend +1)	8	203.3	2
		Beads	12 (Recommend +2)	8	277.8	2
100	Revised	Beads	13 (Recommend +2)	8	254.3	2

#PCR1 (バイサルファイト処理ライブラリ PCR) は、開始量に応じて PCR サイクル数を変更しました。
#PCR2 (インデックス PCR) は従来法では 6 サイクル、改変方法では 8 サイクルに固定しました。

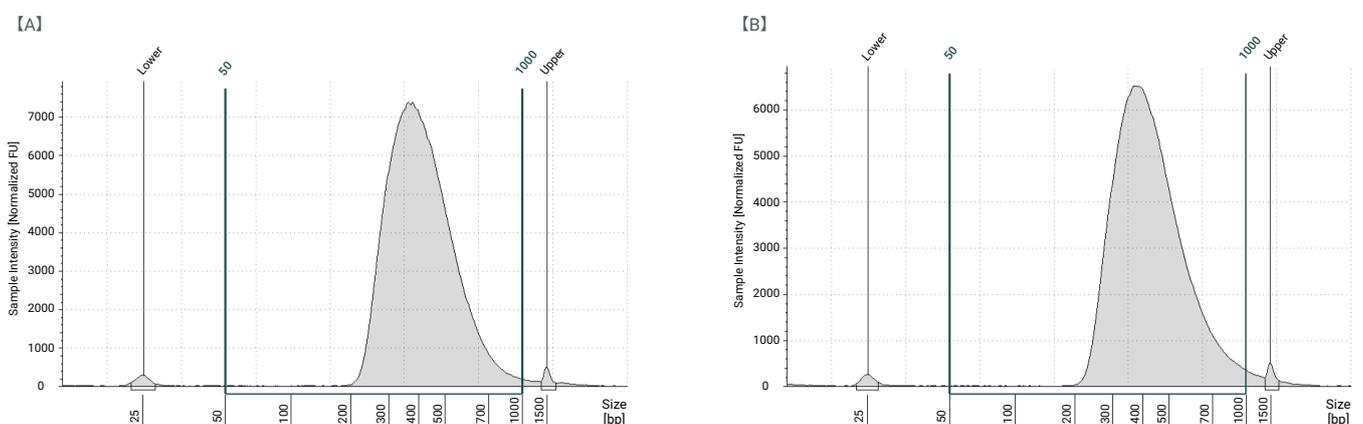


Fig. 4 最終ライブラリを High-Sensitivity D1000 キットで泳動した例

【A】 開始量 500 ng : ビーズ精製 / # PCR1=9 サイクル (推奨) 【B】 開始量 250 ng : ビーズ精製 / # PCR1=10 サイクル (推奨)

シーケンス結果

マッピング効率は、従来法と比較して約5%前後上昇しました (Fig. 5)。本検討では SureSelect XT HS2 のキットを併用しており、PCR には Herculase II Fusion DNA ポリメラーゼが用いられていることが従来法とは異なる点です。Fig. 3 でもライブラリ収量の増加が示されましたが、この酵素は正確性に優れた増幅能を有しており、結果としてマッピング効率の上昇に影響を与えたものと考えられました。

On Target % およびターゲットカバレッジにおいては、全体で約3倍の差となりました (Fig. 6、Fig. 7)。本検討ではデュアルインデックスでのライブラリ調製であるのに対し、従来法ではシングルインデック

スでの調製という違いはあるものの、従来法と比較して良好な結果が得られました。また、500 ng、250 ng の開始量いずれにおいても、精製方法の違いや、バイサルファイト処理ライブラリの PCR のサイクル数の違いは、結果に影響を与えませんでした。しかしながら、100 ng および 50 ng を開始量としたサンプルにおいては、急激な On Target % およびターゲットカバレッジの低下が認められました。

最後に、Duplication リードの割合およびメチル化・非メチル化シトシン (C) の割合を確認しました (Fig. 8)。Duplication リードの割合では、開始量 500 ng の場合、従来のカラム精製では PCR サイクルの増加に伴ってその割合が増える一方、

ビーズ精製では PCR サイクルによる変化はなく、ほぼ 40% 前後で一定でした。また、開始量 250 ng の場合では、開始量 500 ng における 9 ~ 10 サイクルとほぼ同様で約 55% 程度でした。開始量が 100 ng 以下になると、duplication リードの割合がさらに上昇し、有効リードの割合は約 30% 以下でした。原因として、開始量の減少に伴い PCR サイクル数を増やしたことから、有効リードが減少したものと示唆されました。また、バイサルファイト変換効率は、全てのサンプルにおいて 93 ~ 94% 程度と一定でした。検出された C の総数は、各サンプルにおいて得られたリード数に依存しており、開始量が 100 ng 以下の場合、C の検出数が減少しました。

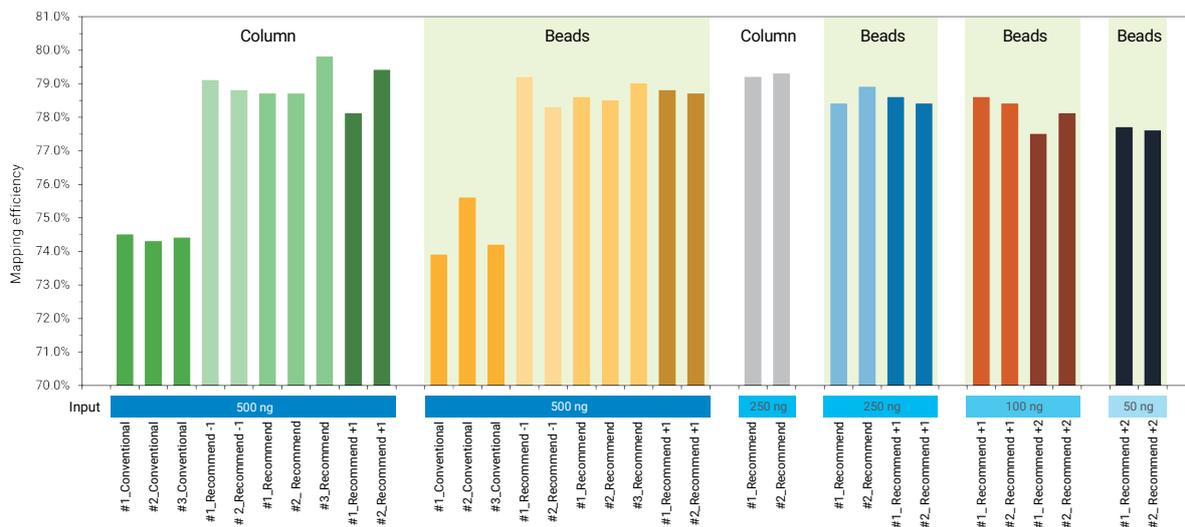


Fig. 5 Mapping 効率

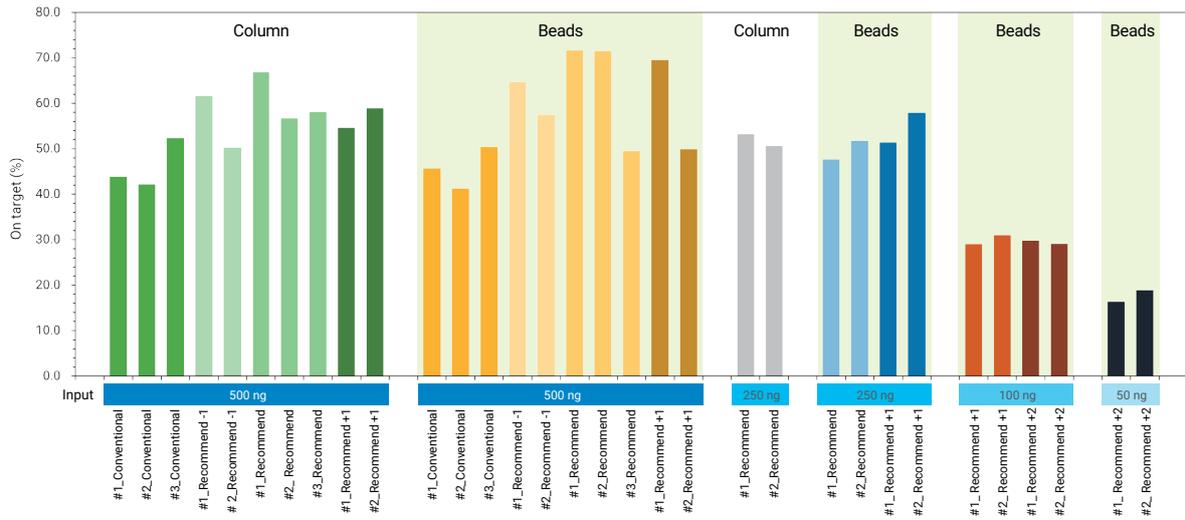


Fig. 6 On target %

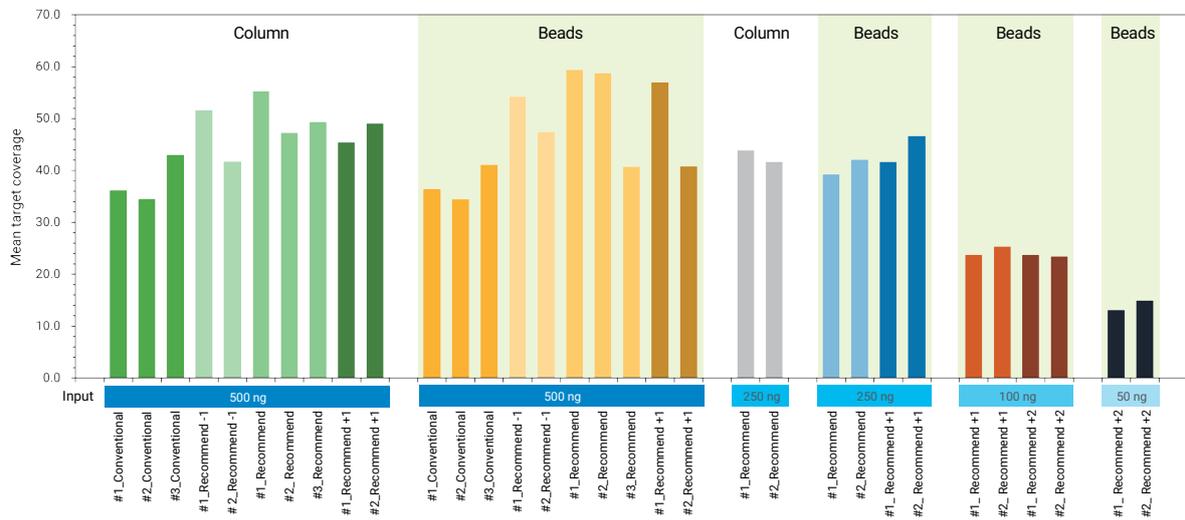


Fig. 7 ターゲットカバレッジ

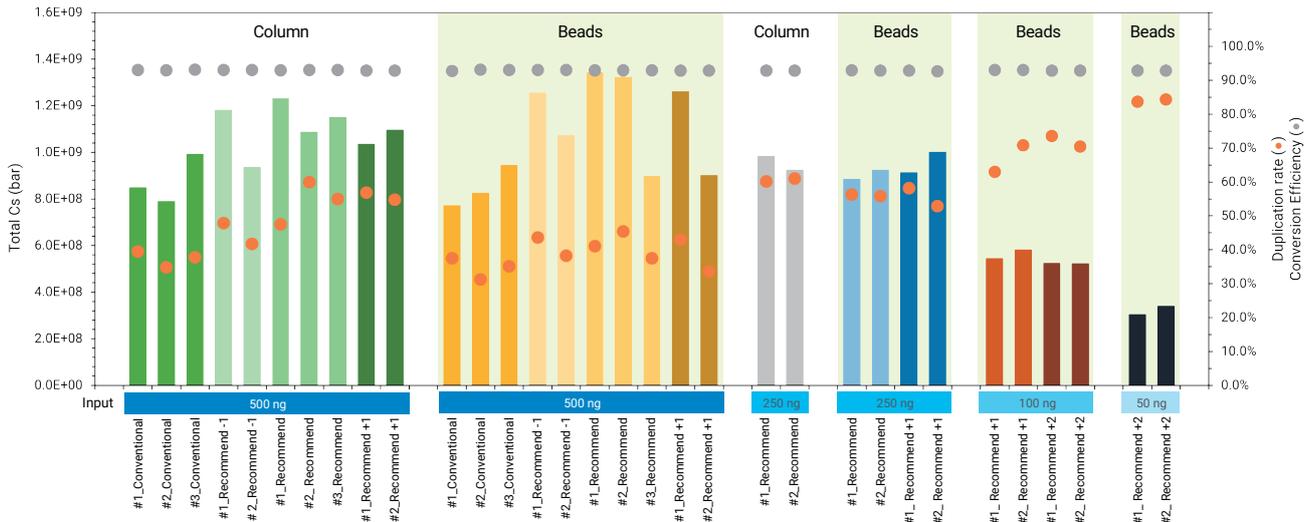


Fig. 8 C カウント数と変換効率：
各サンプルの C カウント数 (左軸) および変換効率 (右軸：●)、Duplication % (右軸：●)

まとめ

本アプリケーションノートで紹介した手法を用いることで、DNA 開始量を従来の 1 µg 量から 250 ng 量へ低減化して、限りある検体をより有効活用できるようになりました。今後さらなる条件検討を行い、その結果を精査することで、低減化した DNA 開始量から安定した網羅的 DNA メチル化解析が可能となると考えられます。

また、本解析ではバイサルファイト変換における精製方法をビーズ精製に変更することで、一連のワークフローの自動化に成功しました。これらは人的リソースの削減や、ヒューマンエラーなどのリスクを従来法より低く抑えることができるようになり、結果としてシーケンス結果から得られる知見をより増やすことにつながります。

本手法は、大規模なコホート解析などで一層貢献できるものと期待できます。

引用文献

- Hachiya T *et al.*, *npj Genom Med.* (2017) 2 : 11.
- Application Note: Use of a Modified Agilent SureSelect XT HS2 Target Enrichment Procedure for Analysis of Methylation Status in a Model Organism. Agilent technologies application note, publication number 5994-6841EN, 2023
- ケーススタディー：DNA メチル化キャプチャ法による効率的なエピゲノムマーカー探索手法の確立 Agilent technologies ケーススタディー, publication number 5994-2724JAJ, 2020

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒 192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1

●カスタムコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

www.agilent.com/genomics/genomics-jp

G240632

© Agilent Technologies, Inc. 2024

本書の一部または全部を書面による事前の許可なしに複製、
改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、
法律で禁止されています。

Printed in Japan, May, 2024

5994-7377JAJP