損傷DNAを酵素的に修復するキットの開発とFFPE試料への応用

Development of an Enzymatic Repair Kit for Damaged DNA and Its Application to FFPE Samples

○北嶋友人、鳥居昇平、樋口歩花、渡邉有紀、木村剛隆、松本裕之
タカラバイオ株式会社

Introduction

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料は臨床・研究の場で広く用いられ、その解析件数は近年ますます増加している。一方、ホルマリン固定やパラフィン包埋、長期保存の過程で、DNAには脱アミノ化や塩基の酸化、脱塩基部位（APサイト）、一本鎖切断（ニック・ギャップ）などの損傷が蓄積することが知られている。これらの損傷はPCR増幅を阻害したり、シーケンス解析においてアーティファクトを生じさせたりすることで、解析結果の信頼性を損なう。そこで、こうした損傷を酵素的に修復するキットを開発した（図1）。本発表では、本キットの酵素ミックス（Repair Enzyme Mix、以下Repair Mix）による修復効果を示すとともに、短鎖（Illumina）および長鎖（Nanopore）シーケンス解析における有用性について報告する。

図1　DNA修復キットによる損傷DNA修復の模式図

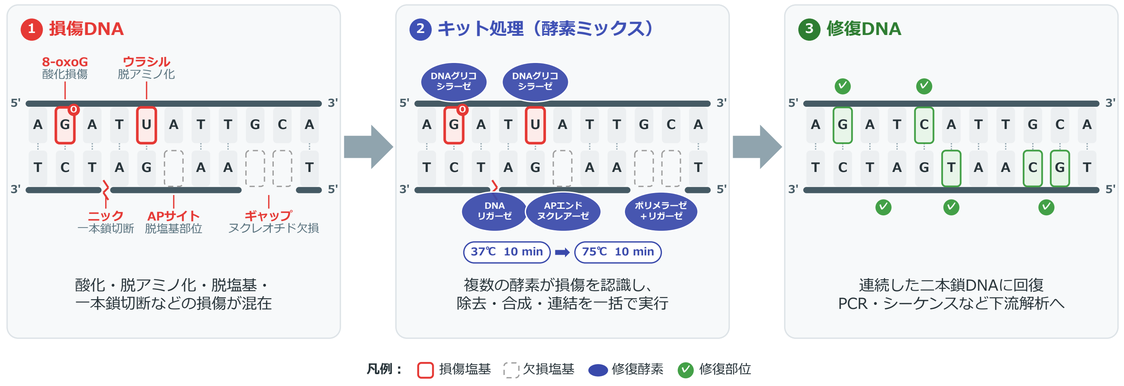
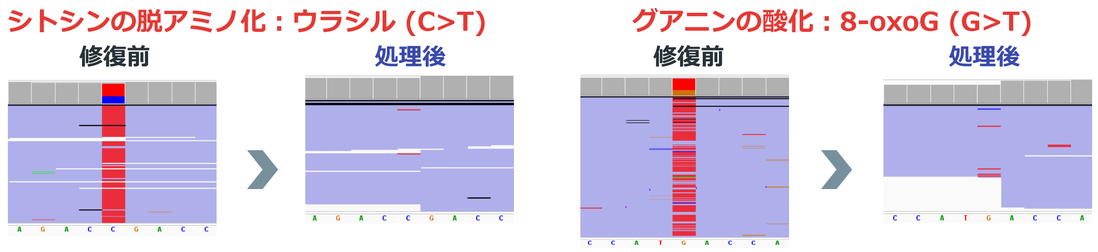


図2　損傷オリゴの修復（IGV表示）



ウラシルまたは 8-oxoG を1か所含む合成オリゴDNAを相補鎖とアニーリングさせて二本鎖DNAとし、Repair Mixを用いて修復反応を行った。修復前に損傷位置に集中していたリファレンスとのミスマッチ（C>T、G>T）は、処理後にほぼ消失した。

Materials & Methods

① FFPE DNAの修復評価（Illumina）

サンプル	FFPE DNA（Colon、Lung ; BioChain）
修復反応	**Repair Mix** : DNA 30 ng／50 µL、37℃ 10 min → 75℃ 10 min **Commercial kit A** : DNA 30 ng、37℃ 15 min **No enzyme（対照）** : 修復反応なし
精製	磁気ビーズ精製 : NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select（製品コード : 744970）
ライブラリー作製	ThruPLEX® DNA-Seq FLEX（製品コード : R400736）、DNA 5 ng
シーケンス	NextSeq 2000（Illumina）、P2 XLEAP-SBS™（300 cycles）、2 × 150 bp
データ解析	fastp → Bowtie 2（GRCh38）→ Picard / Tasmanian（BQ ≥ 30） 同一リード数に均一化し、C>T・G>T置換率、インサートサイズ、マッピング品質を評価

② ニック修復評価（Nanopore）

損傷DNA調製	Human Genomic DNA（製品コード : 636401）にNb.BbvCI（NEB）でニックを導入
修復反応	**Repair Mix** : DNA 250 ng／50 µL、37℃ 10 min → 75℃ 10 min
精製	
ライブラリー作製	Rapid Sequencing Kit V14 - gDNA（Oxford Nanopore Technologies）、DNA 150 ng
シーケンス	GridION、R10.4.1 flow cell（Oxford Nanopore Technologies）
データ解析	passリードのN50を算出し、No enzymeとPCの差に対するRepair Mixの回復率を評価

	PC（陽性対照）	No enzyme	Repair Mix
ニック導入	−	+	+
修復処理	−	−	+

Results 1｜FFPE DNAの修復

各条件 n=2（点・線は個々の測定値）

（1）サンプルQC・DNA回収率・ライブラリー収量

表1　FFPE DNAのQC

サンプル	レーン	ng/µL	Peak (bp)	DIN
FFPE_Colon	B1	59.33	414	1.7
FFPE_Lung	C1	105.33	372	1.5

4200 TapeStation System（Agilent Technologies）で解析した結果、いずれもDIN 1.5〜1.7と高度に断片化していた（表1、図3）。

図3　泳動像

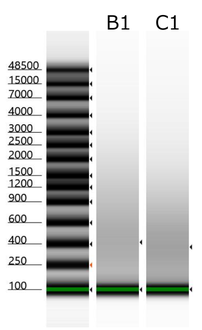


図4A　DNA回収率

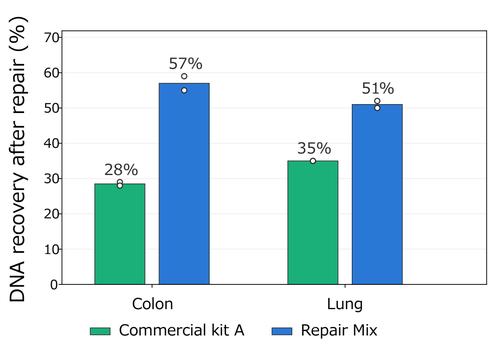
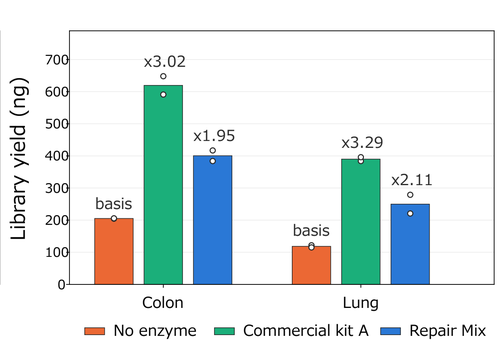


図4B　ライブラリー収量



Qubit（Thermo Fisher Scientific）で定量したRepair Mix処理後のDNA回収率（精製後DNA量／投入量）は51〜57%で、Commercial kit A（28〜35%）を上回った（図4A）。ライブラリー収量はNo enzyme比で、Repair Mixでは約2倍、Commercial kit Aでは約3倍に増加し、いずれもシーケンスに十分な量が得られた（図4B）。

Results 1｜FFPE DNAの修復（続き）

各条件 n=2（点・線は個々の測定値）

（2）ライブラリー品質・インサートサイズ

図5　ライブラリー品質

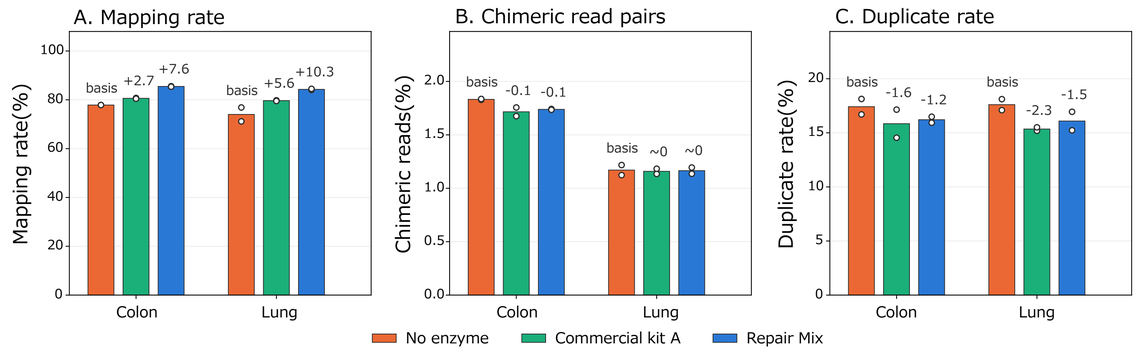
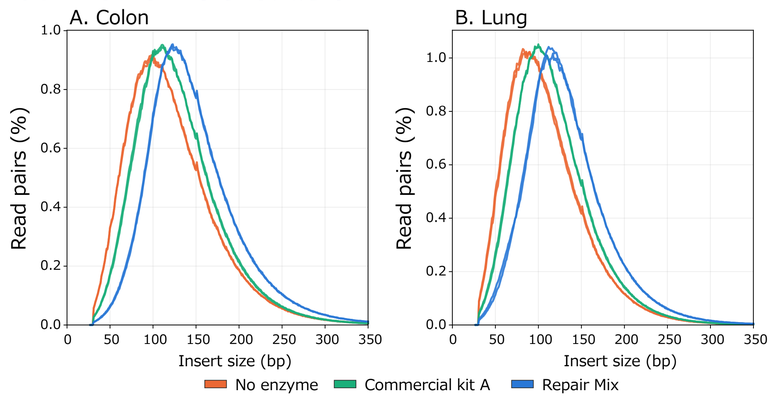


図6　インサートサイズ分布



Repair Mix処理によりマッピング率はNo enzyme比で7.6〜10.3ポイント向上し、Commercial kit A（2.7〜5.6ポイント）を上回った（図5A）。キメラ率・重複率の悪化は認められなかった（図5B、C）。インサートサイズの分布は長鎖側にシフトし、中央値は24〜25 bp増加した（図6）。

（3）損傷由来エラーの低減とリード位置別プロファイル

図7　損傷由来の置換率（C>T・G>T）

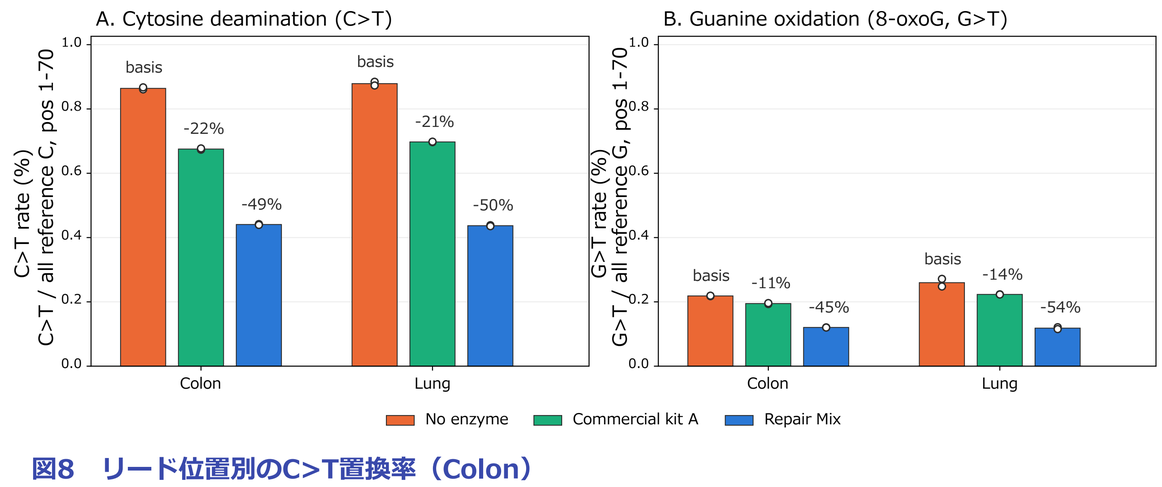
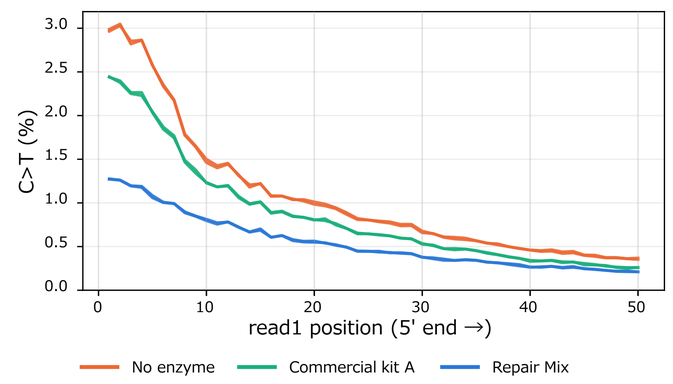


図8　リード位置別のC>T置換率（Colon）

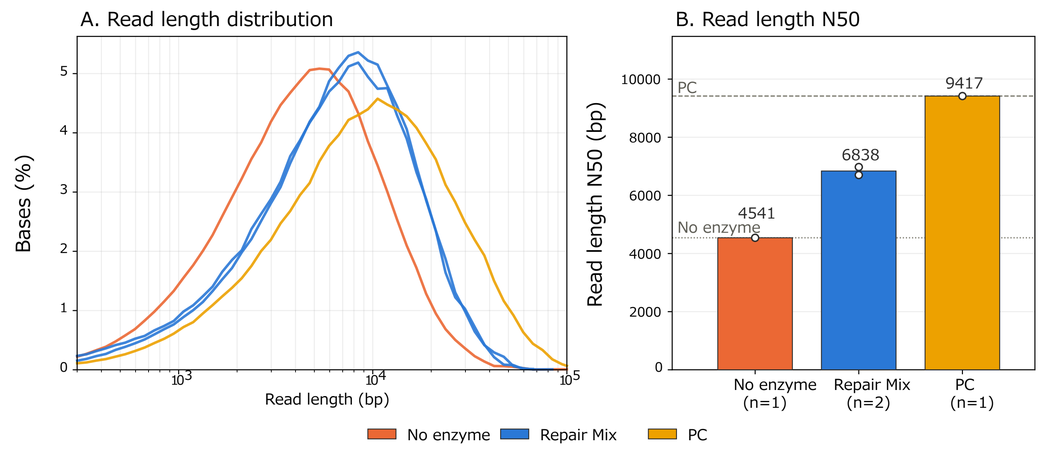


Repair Mix処理によりC>T置換率・G>T置換率はいずれもNo enzyme比でほぼ半減し、Commercial kit A（No enzyme比11〜22%の低減）を大きく上回る低減効果を示した（図7A、B）。リード位置別に見ると、C>T置換はリード5'末端付近で特に高く、Repair Mix処理により末端付近で大きく低下した（図8、Colonの例）。

Results 2｜ニックの修復（Nanopore）

No enzyme・PC n=1、Repair Mix n=2

図9　リード長分布とN50



ニックを導入したgDNA（No enzyme）のN50は4,541 bpであったが、Repair Mix処理により6,838 bpに増加し（図9A、B）、ニック未導入のgDNA（PC、9,417 bp）との差の47%が回復した。

Conclusion

- 合成オリゴを用いてウラシル・8-oxoG の修復を確認した。FFPE DNAではC>T（脱アミノ化）・G>T（8-oxo G）置換率がほぼ半減し、Commercial kit Aを大きく上回る低減効果が得られた。損傷由来と考えられる塩基置換の低減により、低頻度変異解析における偽陽性の抑制が期待される。
- Repair Mix処理により同一リード数あたりのマッピングリード数が増加し、インサートサイズも増加したことから、シーケンスデータをより効率的に解析に利用できると期待される。また、精製後のDNA回収率はCommercial kit Aを上回った。
- ニックの修復によりNanoporeのリード長（N50）が約1.5倍に増加し、ニックを含むDNAのロングリード解析への適用可能性が示された。
- 本前処理は修復反応（計20分）と磁気ビーズ精製からなる簡便なもので、短鎖・長鎖いずれのライブラリー作製にも組み込むことができた。

本キットは、FFPE試料をはじめとする損傷DNAのNGS解析の信頼性向上に貢献すると考えられる。

1) Steiert TA, et al. Nucleic Acids Res. 2023;51(14):7143–7162.
2) Briggs AW, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(37):14616–14621.