



次世代シーケンサ ⇔ マイクロアレイ マイクロアレイをどのように使いこなすか？

アジレント・テクノロジー(株)
バイオアプリケーショングループ
2012. March

次世代シーケンサとマイクロアレイ

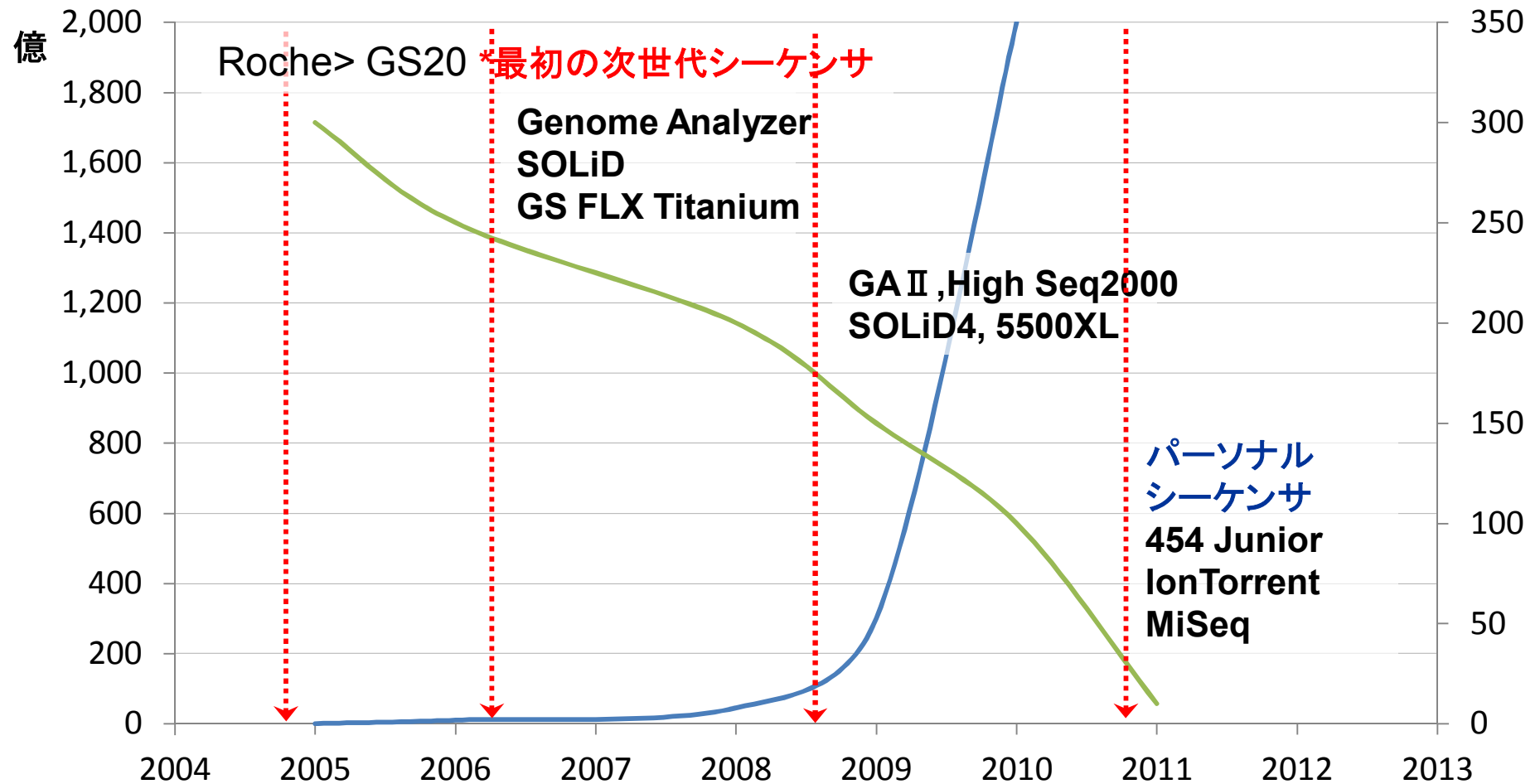
- 次世代シーケンサの発展と変化
- 論文報告数のトレンド
- 次世代シーケンサとマイクロアレイの使い分け

次世代シーケンサの発展と変化

—シーケンス量(bp)

—1ランコスト(万円)

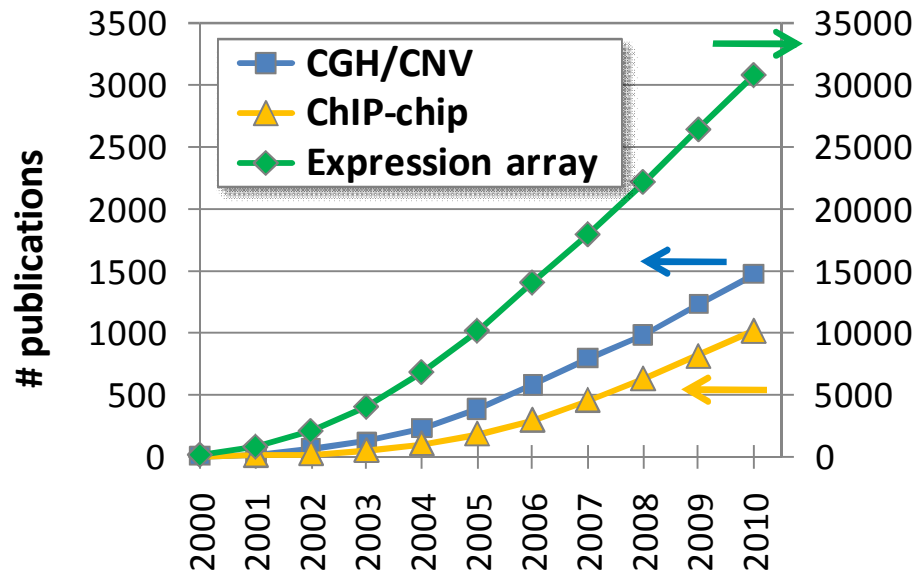
単位:万円



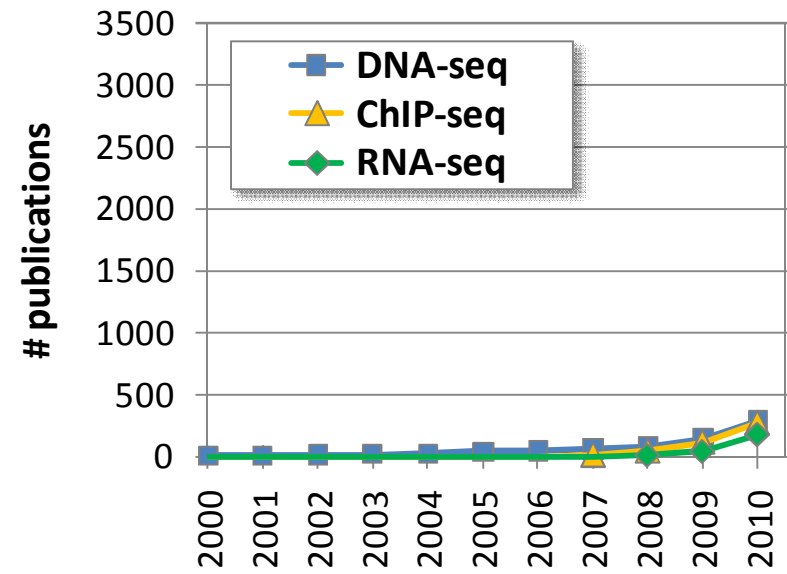
論文報告数のトレンド

PubMed 検索

マイクロアレイ

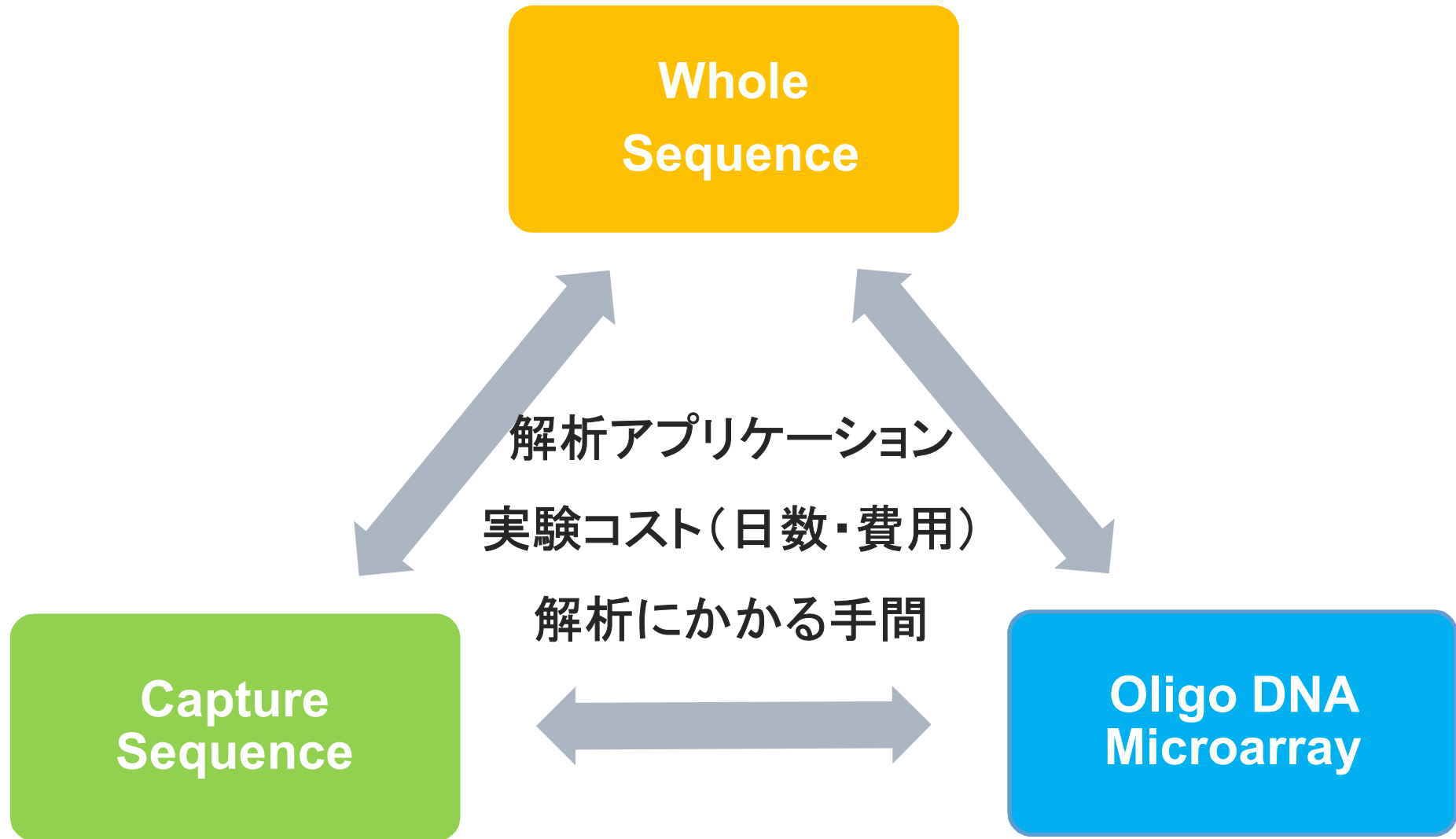


シーケンサ



マイクロアレイを用いた報告が圧倒的に多く、増加傾向

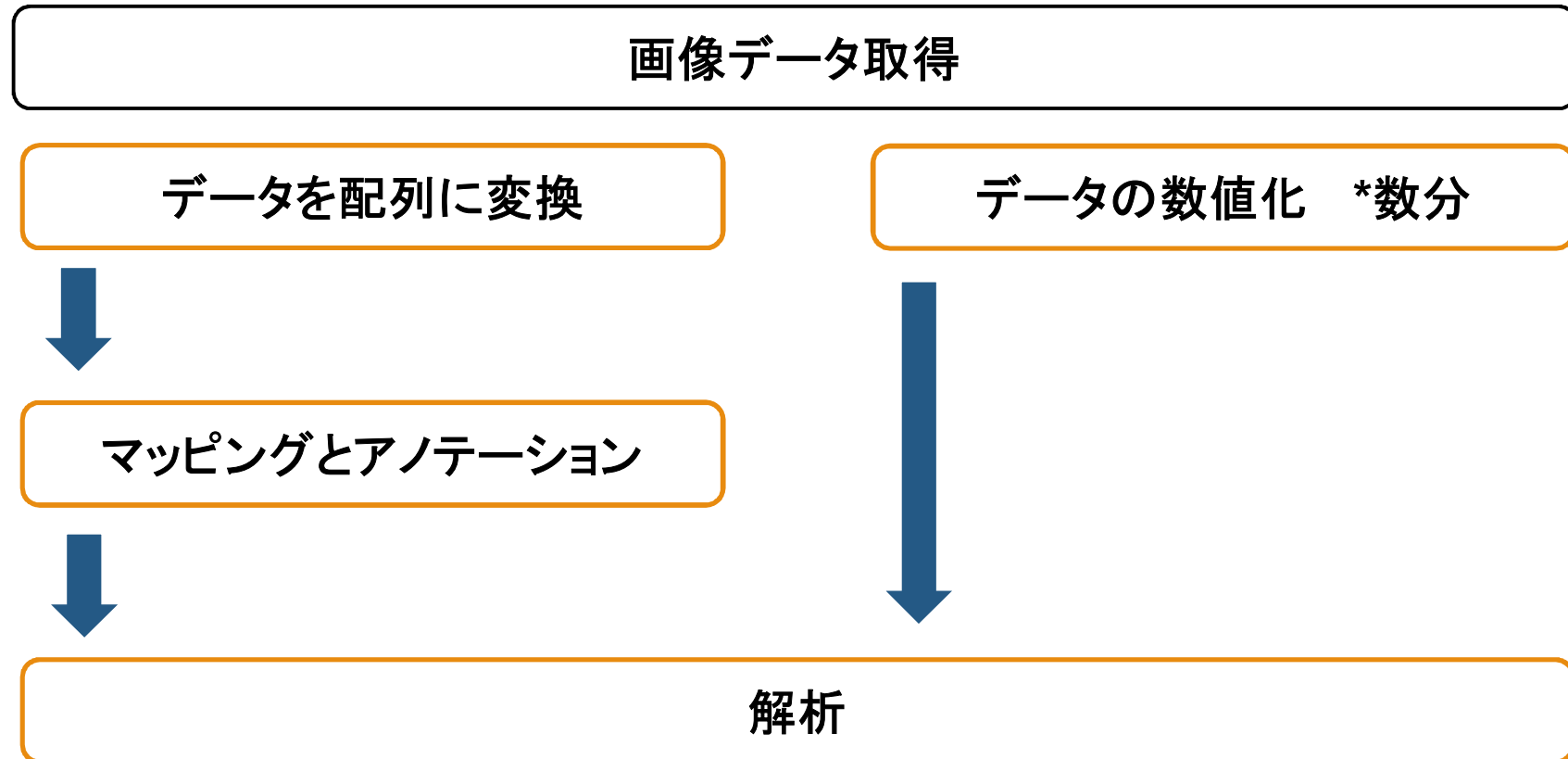
次世代シーケンサとマイクロアレイの使い分け



次世代シーケンサ・マイクロアレイの解析フロー比較

次世代シーケンサ

オリゴDNAマイクロアレイ



マイクロアレイは解析ステップが少ない

Whole Genome/Transcriptome Sequence

DNA Seq

- **新モデル生物配列決定**
- リシーケンシング

RNA Seq

- デジタル遺伝子発現
- **新規**転写物の探索

ChIP Seq

- ゲノム全体に対して転写因子結合サイト決定



新規探索

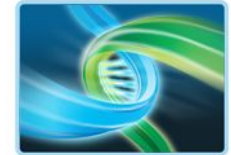
- *De Novo*シーケンスが可能(リファレンスゲノムが不要)
- New GeneやNew Variantを発見できる



解析に多大なリードが必要なため、コスト高

- Human Genome 3GBの解析に、90~120GBのシーケンス情報が必要
- Whole Transcriptome解析にはDeep Sequenceが必要

Capture Sequence (Target Enrichment)



DNA Cap Seq

- ExomeのSNP, mutation解析
- リシーケンシング
- カスタマイズによる特定領域の解析

RNA Cap Seq

- Fusion Geneの探索
- 特定遺伝子群のバリエーション解析 (New Variant)

読みたい場所・興味のある領域だけを選んでシーケンスする



- より安価なコストで、1サンプルをシーケンス可能に
- ターゲット領域により多くのリードが得られる
- ターゲット領域では新規SNPなどの探索も可能

全遺伝子プロファイリングには不向き



リファレンスゲノムが必要

フォーカス領域以外の情報がなくなる

Oligo DNA Microarray

CGH/CNV/SNP

- コピー数比解析
- 切断点解析(kb)
- 既知SNP解析

mRNA/miRNA

- 既知 mRNA/miRNAプロファイリング
- 微量サンプル解析

ChIP-on-chip

- 既知遺伝子プロモーターの解析

Methylation

- CpG island
メチル化解析



既知情報を活用したプロファイリング



- 短い時間で実験結果が得られる
- アノテーション付きのデータであるため、解析の手間が少ない
- FFPEサンプルや微量サンプルにも対応したプロトコルがある



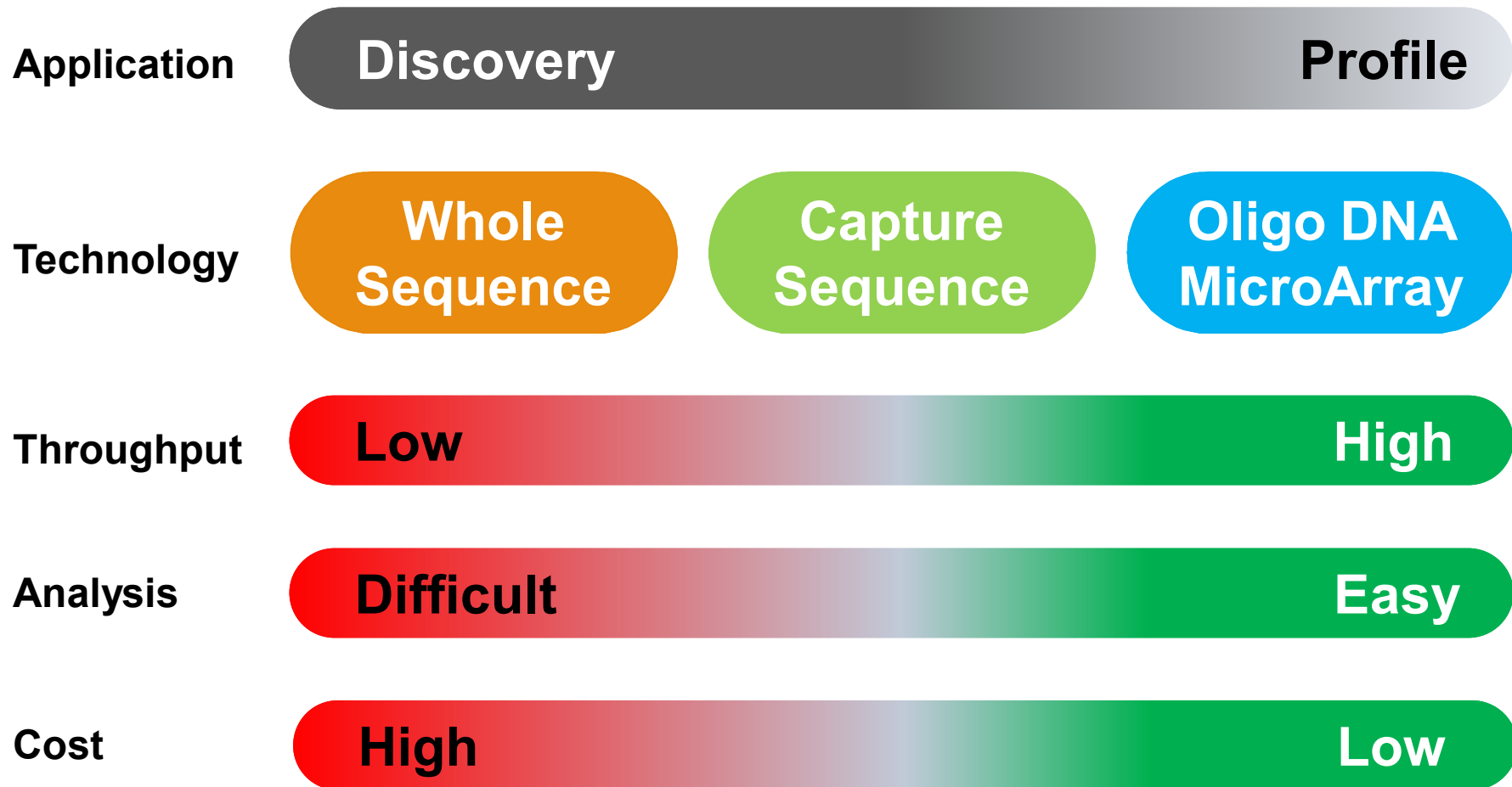
データベースにない情報の解析が困難

一般的に次世代シーケンサより感度(測定レンジ)が劣る > 後述

各テクノロジーの数値データ比較

比較項目		Whole Sequence	Capture Sequence	Oligo DNA Microarray
実験日数	Genome	6~13日	6~13日+1~5日	3日
	Transcriptome			1.5日
1ランで解析可能なサンプル数	Genome	0.5~2	8~96	1~16
	Transcriptome	8~	~96	8~32
マッピング		必要	必要	不要
データサイズ サンプル	Genome	100 Gb~	~10 Gb	~10 Mb
	Transcriptome	~10 Gb	~1 Gb	~数Mb
インフォマティシヤンの必要度		高	高	低~中
ランニングコスト	Genome	100万円以上	約30万円	2.5~10万円
	Transcriptome	~15万円	数万円	2.5~4万円

次世代シーケンサとマイクロアレイの使い分け



次世代シーケンサ時代に求められるマイクロアレイ

マイクロアレイが研究に利用されるために必要な性能

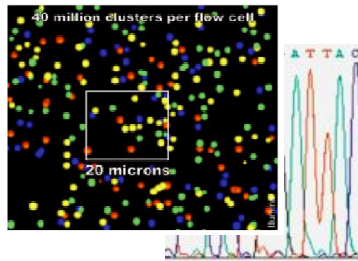
- ・シーケンサと同等の感度と測定精度
- ・シーケンスデータを活用する柔軟性(カスタムアレイ)

次世代シーケンサ時代に必要とされるマイクロアレイとは？ アジレント高感度DNAマイクロアレイ

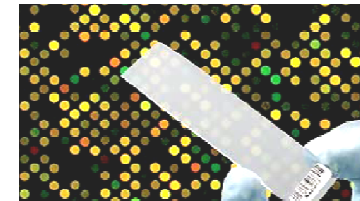


感度と測定精度がシーケンサと同等である

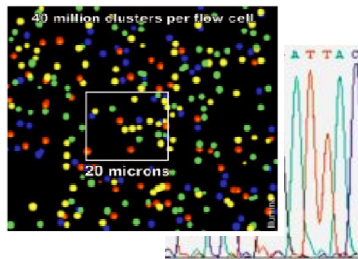
>5logのダイナミックレンジ



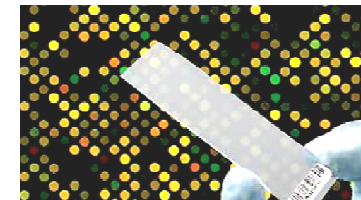
感度は??



- シーケンスデータを活用する柔軟性(カスタムアレイ)



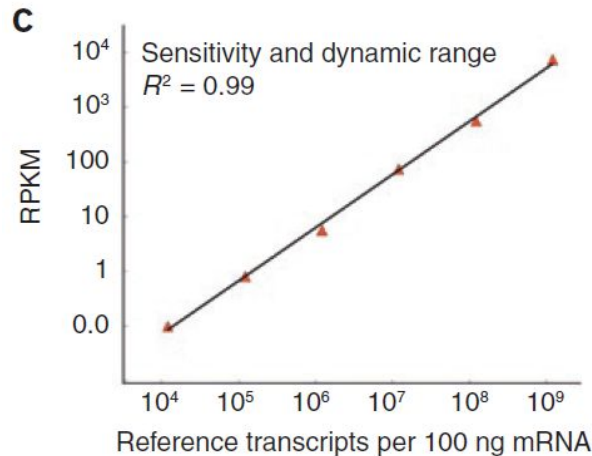
活用する方法は??





なぜ高感度・5logのシグナルレンジが重要なのか？

- 次世代シーケンサを利用した発現解析のダイナミックレンジは、5 log



全遺伝子の発現を捉えるには
5logは必須

Ali, et al., *Nature Method* 5. 621-628 2008

- シグナル伝達・転写関連遺伝子なども発現が変動する

- ケモカイン受容体や
細胞間シグナル関連遺伝子
- Auxin関連遺伝子

低発現遺伝子をきちんと検出
する必要がある

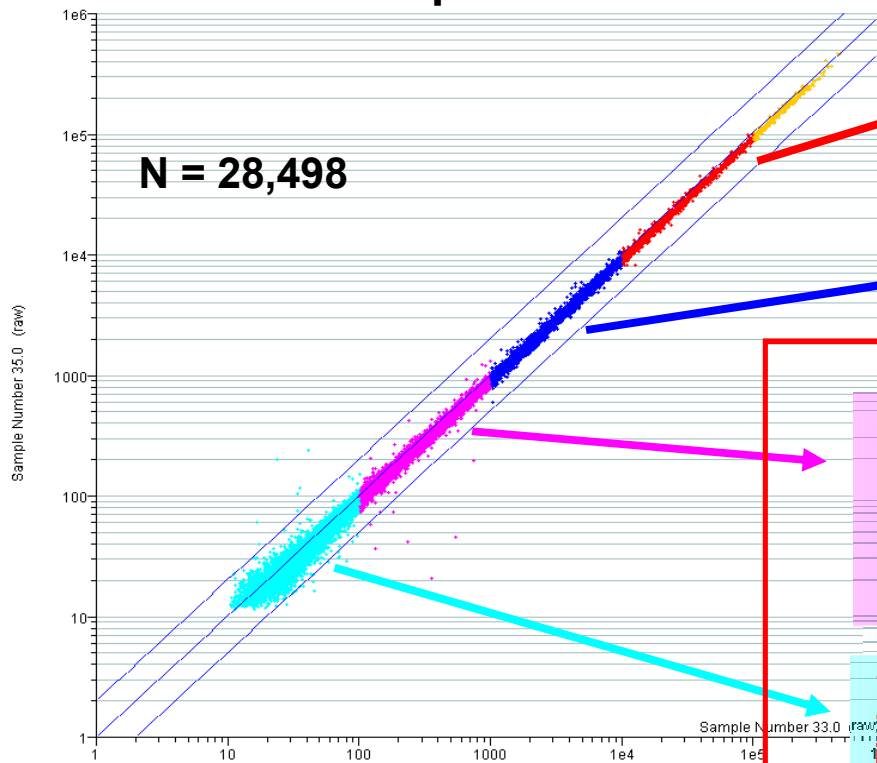
Ogawa, et al., *The Journal of urology* 183.1206-1212 2010

Hoshi, et al., *PNAS* 106. 6416-6421 2009

5logのダイナミックレンジをもつ アジレント次世代高感度DNAマイクロアレイ

GeneSpringによるGO解析

MCF-7(乳がん由来のcell line)
Well Above SpotsのScatter Plot



N = 28,498

X-axis: MCF-7 4 pack all data (MCF-7 by XDR) : Sample Number 33.0
Y-axis: MCF-7 4 pack all data (MCF-7 by XDR) : Sample Number 35.0
Colored by: MCF-7 10021-2
Gene List: P or M in 10021-2 and 4 (28498)

- Protein biosynthesis
- Macromolecule biosynthesis
- Cellular biosynthesis
- Biosynthesis
- Macromolecule metabolism

生合成
代謝関連
遺伝子

- Macromolecule/RNA/primary/biopolymer/cellular metabolism
- Cellular physiological process
- RNA processing/mRNA metabolism
- Nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
- Protein transport

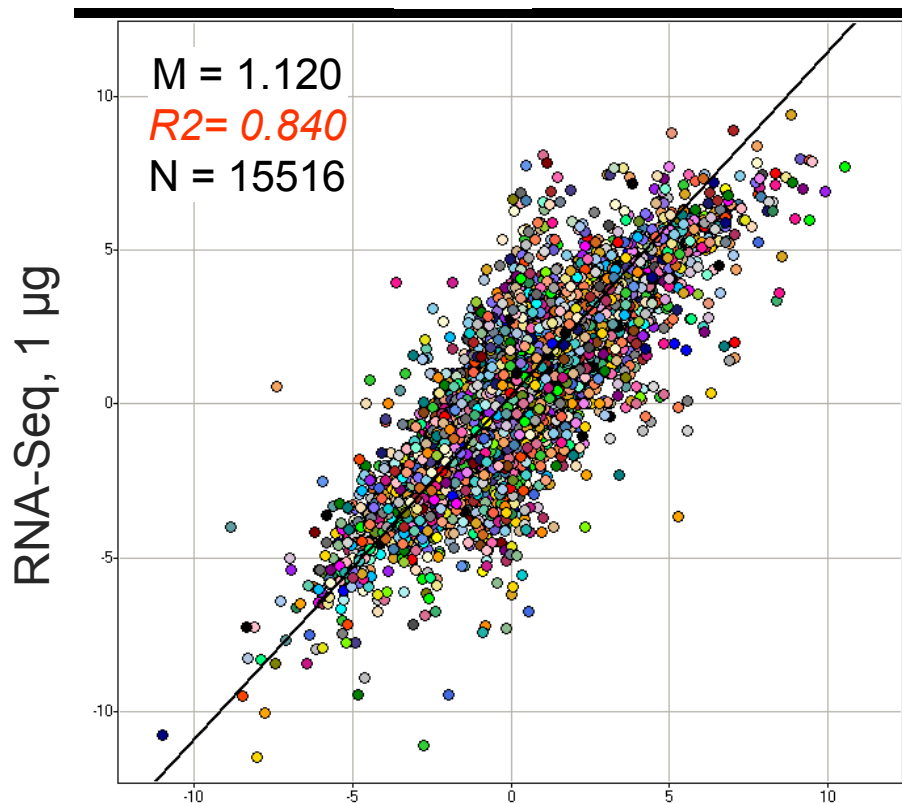
- Regulation of transcription, DNA-dependent
- Regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism
- Metabolism
- Regulation of cellular metabolism
- Cellular physiological process
- Synaptic transmission
- Transmission of nerve impulse
- Leukotriene biosynthesis
- Glutathione biosynthesis
- development

発現レベルの高い
遺伝子群の制御
に関わる遺伝子

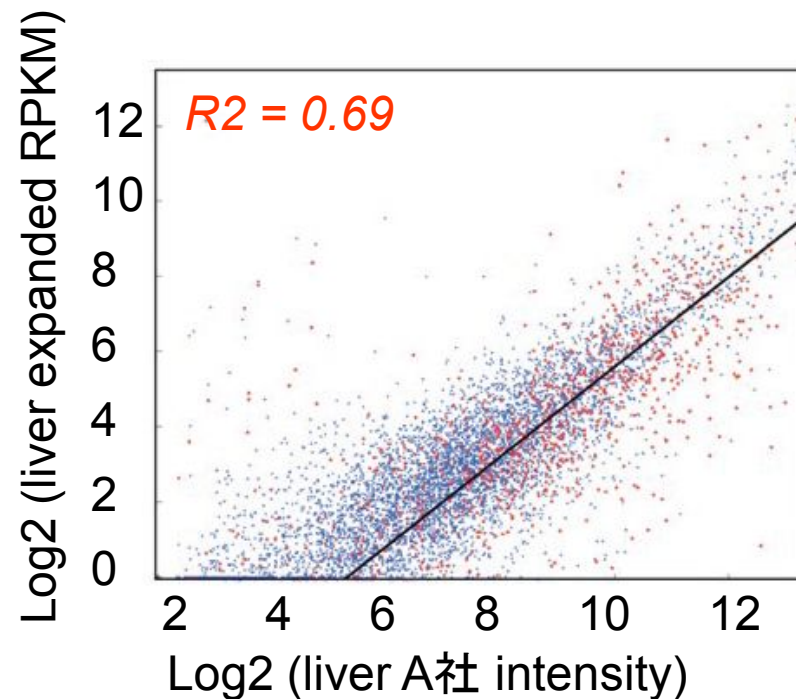
神経伝達物質、ホルモ
ン、免疫系、シグナル伝
達系に関連する遺伝子
や、輸送に関するもの

アジレントマイクロアレイとNGSの高い相関性

Agilent Array vs RNA-Seq
Log₂ Ratios (B/A)



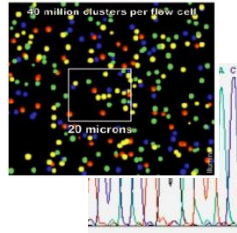
8x60K, 25 ng, 1-color



Ali, et al., *Nature Method* 5. 621-628 2008



カスタムアレイで活用するシーケンスデータ



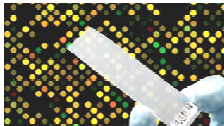
Discovery

ゲノム情報のなかった生物

cDNA配列情報の取得

ゲノム情報のある生物

New Gene, Variant
Non-coding RNA



Profile or Validation

ゲノム情報のなかった生物

モデル生物カスタムアレイ

ゲノム情報のある生物

フォーカスカスタムアレイ

より安価に、より迅速に研究を進めるツール

カスタムマイクロアレイ

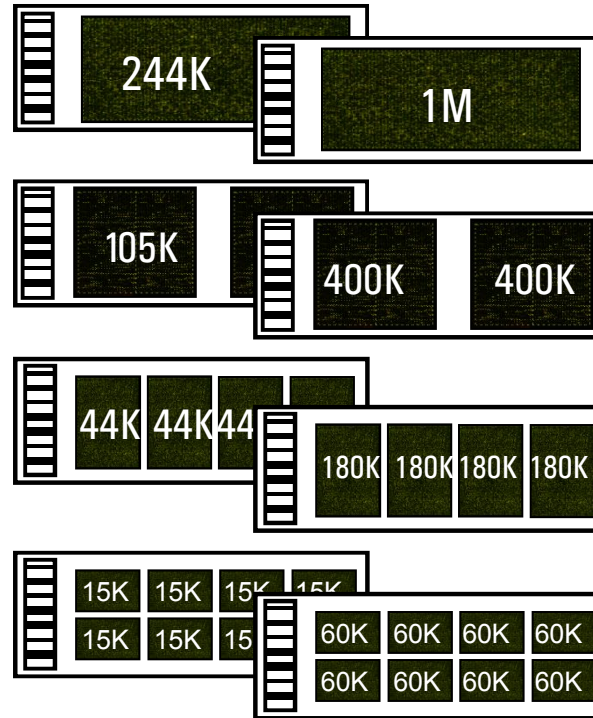
デザイン料**無償** 1枚から作れる画期的なカスタムアレイ「eArray」



ユーザー登録無料
(ご利用約款への
同意が必要です)

- Probe database
 - Gene Expression
 - CGH
 - CHIP-on-chip
 - miRNA
- Probe Design (遺伝子発現のみ)

配列情報から
Probe Designが可能



解像度やスループット
を希望にあわせて選択



**1枚から
オーダー可能**

ランニングコストは
2.5万円～

遺伝子プロファイリング手法の特徴

	新アジレント発現 マイクロアレイ	次世代シーケンサ デジタル遺伝子発現
遺伝子の網羅性	高	高
新規の遺伝子	事前に配列情報が必要	前情報必要なし
データ量	MB	TB
スタート Total RNA量	10 ng ~ (真核生物)	1 µg ~
実験時間	1.5日	1週間以上
操作の簡便性	簡便	煩雑
感度	高	高
ダイナミックレンジ	5 log₁₀	5 log ₁₀
コスト	~ 3.5 万円 / サンプル	約 15 万円 / サンプル (必要な読取り深度による*)

アジレント高感度遺伝子発現マイクロアレイは、少ないサンプル量、簡便な実験、低コストで広いダイナミックの遺伝子プロファイリングが可能

まとめ

- ゲノム配列解読や新規SNPの発見等は次世代シーケンサ
- 安価にハイスループットで網羅的にプロファイルする時はDNAマイクロアレイ
- アジレント高感度マイクロアレイは、少量サンプル・簡便な実験で次世代シーケンサに匹敵するデータを産出。
- さらに次世代シーケンサデータを活用して、容易にカスタムアレイを作成可能。

