



# NGSアプリケーション紹介 (MiSeqシステム)

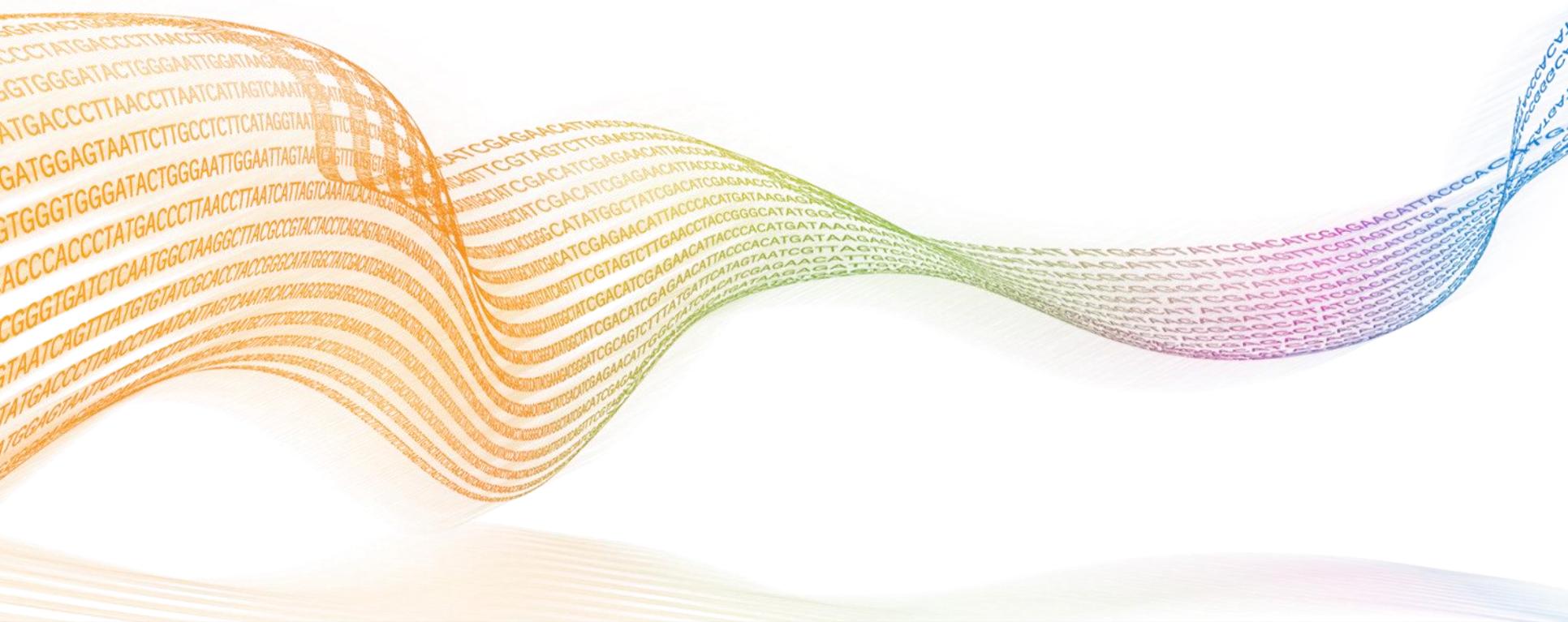
イルミナ株式会社  
サービス・サポート部  
仲 健太

© 2014 Illumina, Inc. All rights reserved.

Illumina, 24sure, BaseSpace, BeadArray, BlueFish, BlueFuse, BlueGnome, cBot, CSPro, CytoChip, DesignStudio, Epicentre, GAllx, Genetic Energy, Genome Analyzer, GenomeStudio, GoldenGate, HiScan, HiSeq, HiSeq X, Infinium, iScan, iSelect, ForenSeq, MiSeq, MiSeqDX, MiSeqFGx, NeoPrep, Nextera, NextBio, NextSeq, Powered by Illumina, SeqMonitor, SureMDA, TruGenome, TruSeq, TruSight, Understand Your Genome, UYG, VeraCode, verifi, VeriSeq, the pumpkin orange color, and the streaming bases design are trademarks of Illumina, Inc. and/or its affiliate(s) in the U.S. and/or other countries. All other names, logos, and other trademarks are the property of their respective owners.

illumina®

# 第2部 NGSを利用した実験の組み立て方



# 多岐にわたるNGSの応用分野



# NGSの代表的なアプリケーション



HiSeq2500  
1000 Gb / ラン  
6日 / ラン



NextSeq 500  
120 Gb / ラン  
1日 / ラン

全ゲノム解析  
エクソーム解析

トランスクリプトーム解析  
遺伝子発現プロファイル解析  
メチル化解析

ターゲットリシーケンシング  
ChIP-Seq解析  
Small RNA解析

多サンプルアンプリコンシーケンス  
アンプリコンシーケンス  
ライブラリQC

メタゲノム解析  
微生物ゲノム解析

MiSeq  
~15 Gb / ラン  
~3日 (55時間) / ラン



# 研究の目的と実験デザイン

## 研究の目的

- ▶ **なにを読むのか**
  - 生物種: ヒト、動物、植物、微生物
  - メタゲノム
- ▶ **どう読むのか**
  - リシーケンス
  - アセンブル
- ▶ **どこを読みたいのか**
  - 全ゲノム
  - 遺伝子領域
- ▶ **目的は何か**
  - SNP & indel探索、1塩基変異
  - 染色体構造、コピー数変化
  - 発現プロファイリング
  - ピーク検出
- ▶ **どういう精度を得たいのか**
  - ざっくりと傾向をつかむ
  - ある程度の精度で詳細に観察

## ランのデザイン

- ▶ **リード長の選択**
  - 35bp, 50bp, 75bp, 100bp.... (任意)
- ▶ **ライブラリーの選択**
  - シングルリード (片側読み)
  - ペアエンド (両端読み: 200-500bpインサート)
  - メイトペア (両端読み: 2-5kbインサート)
- ▶ **データの厚み**
  - 10x, 20x, 30x....

## 実験をする上での制約

- ▶ **コスト**
  - プロジェクトの予算 (試薬)
- ▶ **時間**
  - ランにかかる日数とこなすべきプロジェクト数
- ▶ **サンプル**
  - 数、量、クオリティ など
- ▶ **検証**
  - その他の手法は?

## 第2部 NGSを利用した実験の組み立て方

### ▶ ライブラリー調製からデータ解析

#### 1. DNAシーケンス解析

1. 疾患パネル紹介
2. メタゲノム解析

#### 2. RNAシーケンス解析

# イルミナが提供する主なライブラリー調製キット

## DNA用

TruSeq Nano DNA

TruSeq DNA  
PCR-Free

TruSeq Synthetic  
Long-Read

Nextera DNA

Nextera XT

Nextera Mate Pair



TruSeq Custom  
Amplicon Low Input

TruSeq Amplicon  
Cancer Panel

TruSeq Exome  
TruSeq Rapid Exome

Nextera Rapid Capture  
Custom Enrichment

TruSight Tumor 15

TruSight Myeloid

TruSight  
疾患パネル

TruSeq ChIP

## RNA用

TruSeq RNA

TruSeq Stranded  
mRNA

TruSeq Stranded  
Total RNA

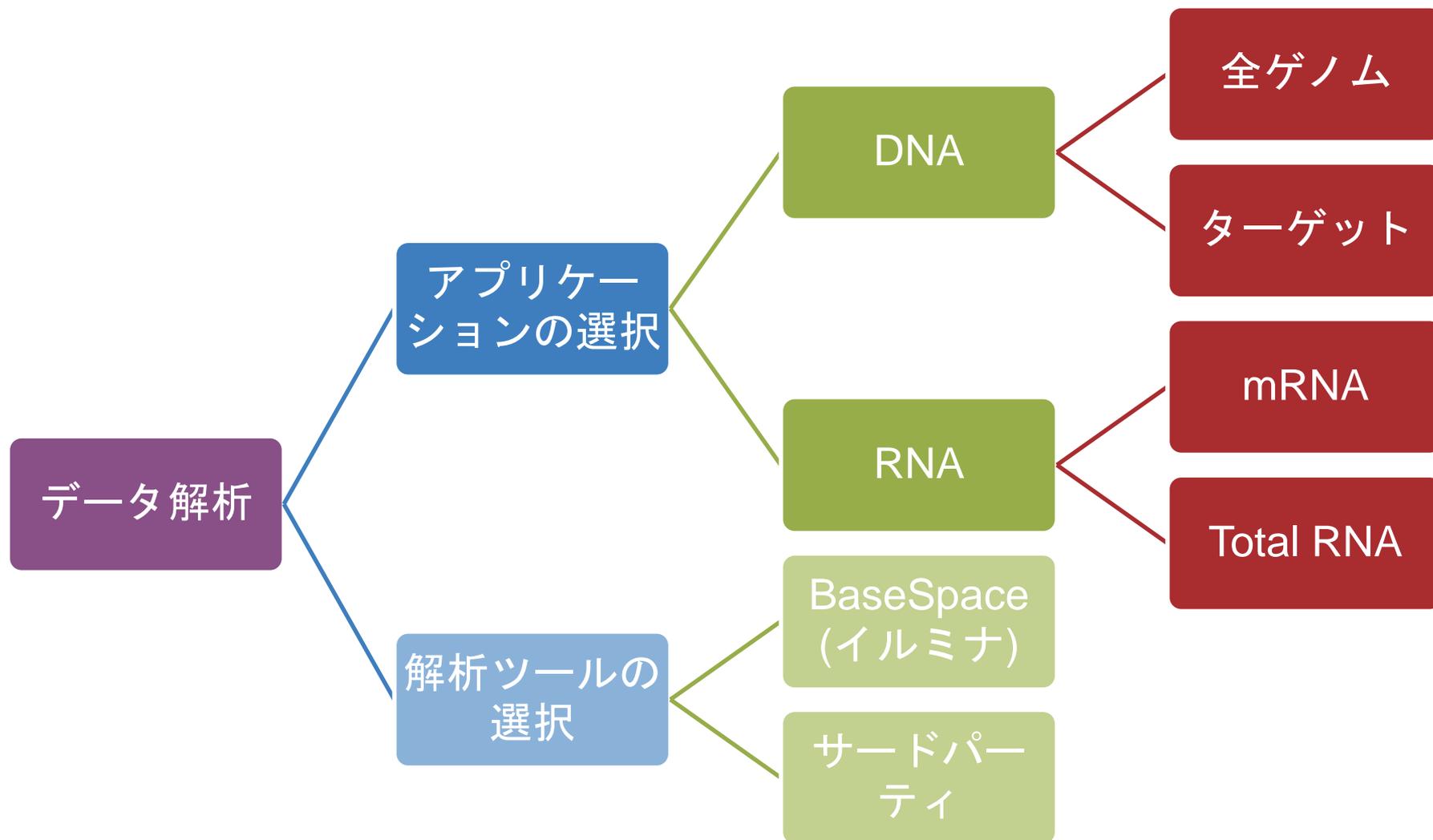
TruSeq Small RNA

TruSeq RNA  
Access

TruSight RNA  
Pan-Cancer

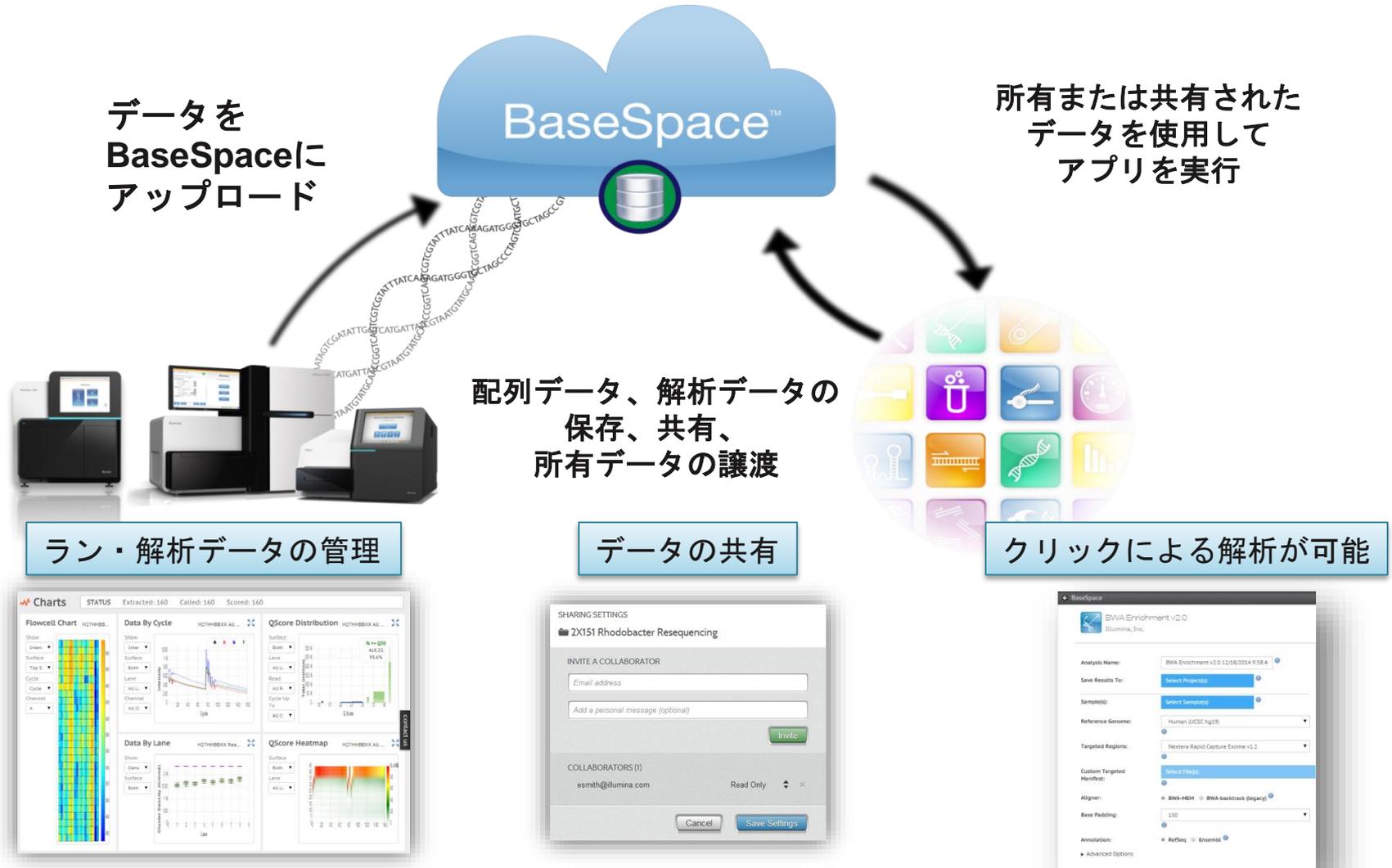
TruSeq Targeted  
RNA Panel

# データ解析



# BaseSpace 概念図

## 配列データ、解析データの保存・共有・譲渡



# データ解析計算量例 (250 iCredit)

アプリケーション	条件	iCredit	サンプル数
<b>微生物</b>			
Kraken (16S)	100K 300 PE	0.025	10,000サンプル
SPAdes(de novo)	500Gb 300 PE	4.5	55サンプル
<b>アンプリコンシーケンス</b>			
Amplicon DS	3M 150SE	0.25	100サンプル
<b>エクソーム</b>			
Isaac Enrichment	8Gb 75SE	6	41サンプル
BWA Enrichment	8Gb 75SE	9	27サンプル
<b>トランスクリプトーム</b>			
RNA Express	10M 75SE	0.125	2,000サンプル
TopHat Cufflinks	30M 75SE	6	41サンプル
TopHat Cufflinks	50M 75PE	13	19サンプル
<b>全ゲノム解析</b>			
Isaac WGS	120Gb 150PE	27	9サンプル
BWA Whole Genome	120Gb 150PE	144	1サンプル

# BaseSpaceで提供されているアプリケーション

## 全ゲノムシーケンス



Tumor Normal v1.1  
ILLUMINA, INC.



TruSeq Phasing Analysis v1.1  
ILLUMINA, INC.



BWA Whole Genome Sequencing v2  
ILLUMINA, INC.



Isaac Whole Genome Sequencing v2  
ILLUMINA, INC.

## ターゲットシーケンス



Amplicon DS v1.1  
ILLUMINA, INC.



TruSeq Amplicon v1.1  
ILLUMINA, INC.



BWA Enrichment v2.1  
ILLUMINA, INC.



Isaac Enrichment v2.1  
ILLUMINA, INC.

## トランスクリプトーム



TopHat Alignment  
ILLUMINA, INC.



RNA Express v1.0  
ILLUMINA, INC.



Cufflinks Assembly & DE  
ILLUMINA, INC.



Small RNA v1.0  
ILLUMINA



TruSeq Targeted RNA v1.0  
ILLUMINA



iPathwayGuide  
ADVAITA BIO

## Methyl-Seq



MethylSeq v1.0  
ILLUMINA INC.

## メタゲノム解析



SRST2  
BASESPACE LABS



16S Metagenomics v1.0.1  
ILLUMINA, INC.



Kraken Metagenomics  
BASESPACE LABS



MetaPhlan  
HUTTENHOWER LAB, HSPH



GENIUS Metagenomics: Know Now  
COSMOSID

## バクテリア de novo アセンブル



SPAdes Genome Assembler 3.5  
ALGORITHMIC BIOLOGY LAB



Prokka Genome Annotation  
BASESPACE LABS



Velvet de novo Assembl  
BASESPACE LABS



TruSeq Long-Read Assembly v1.1  
ILLUMINA, INC.



Assemble bacteria de novo - FREE  
DNASTAR, INC.

## その他



SRA Submission v0.0.3  
BASESPACE LABS



SRA Import v0.0.3  
BASESPACE LABS



FASTQ Toolkit v1.0  
BASESPACE LABS



SRST2  
BASESPACE LABS



FastQC  
BASESPACE LABS



The Broad's IGV  
BROAD INSTITUTE



VCAT v2.0  
BASESPACE LABS



VariantStudio App  
ILLUMINA, INC.



PicardSpace  
BASESPACE LABS

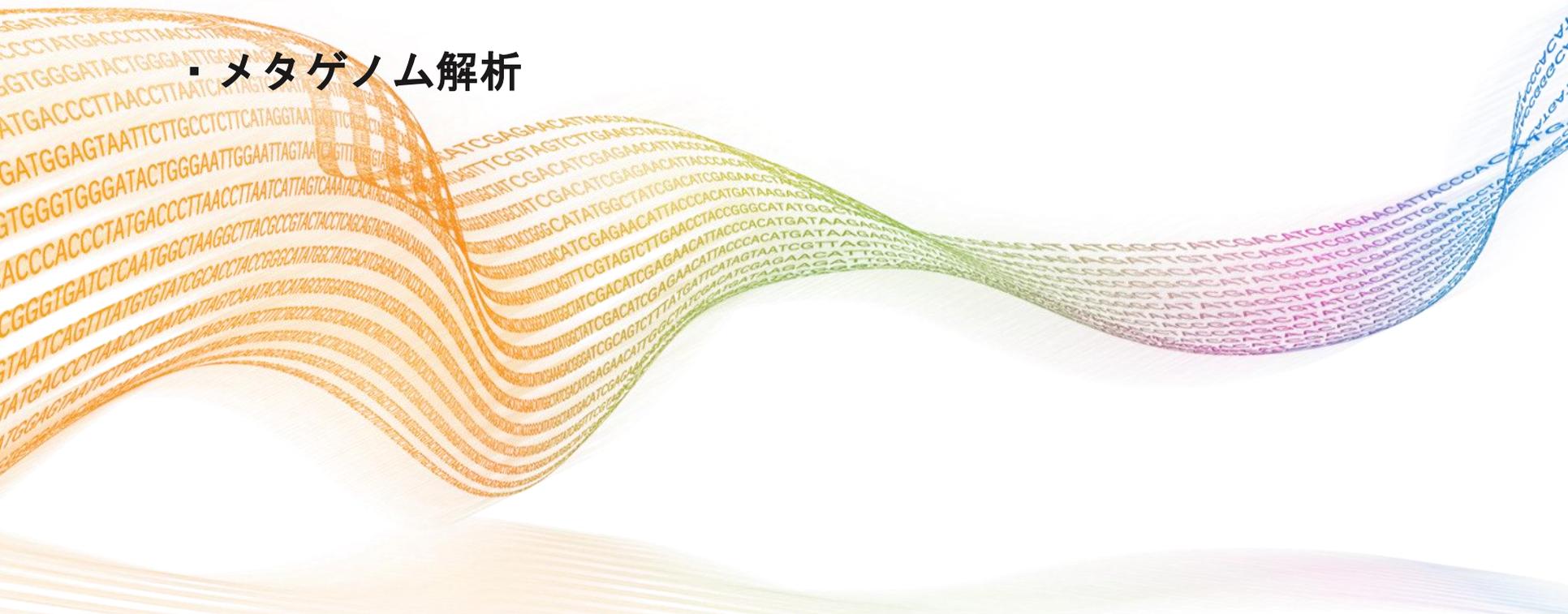


FastQC  
BASESPACE LABS

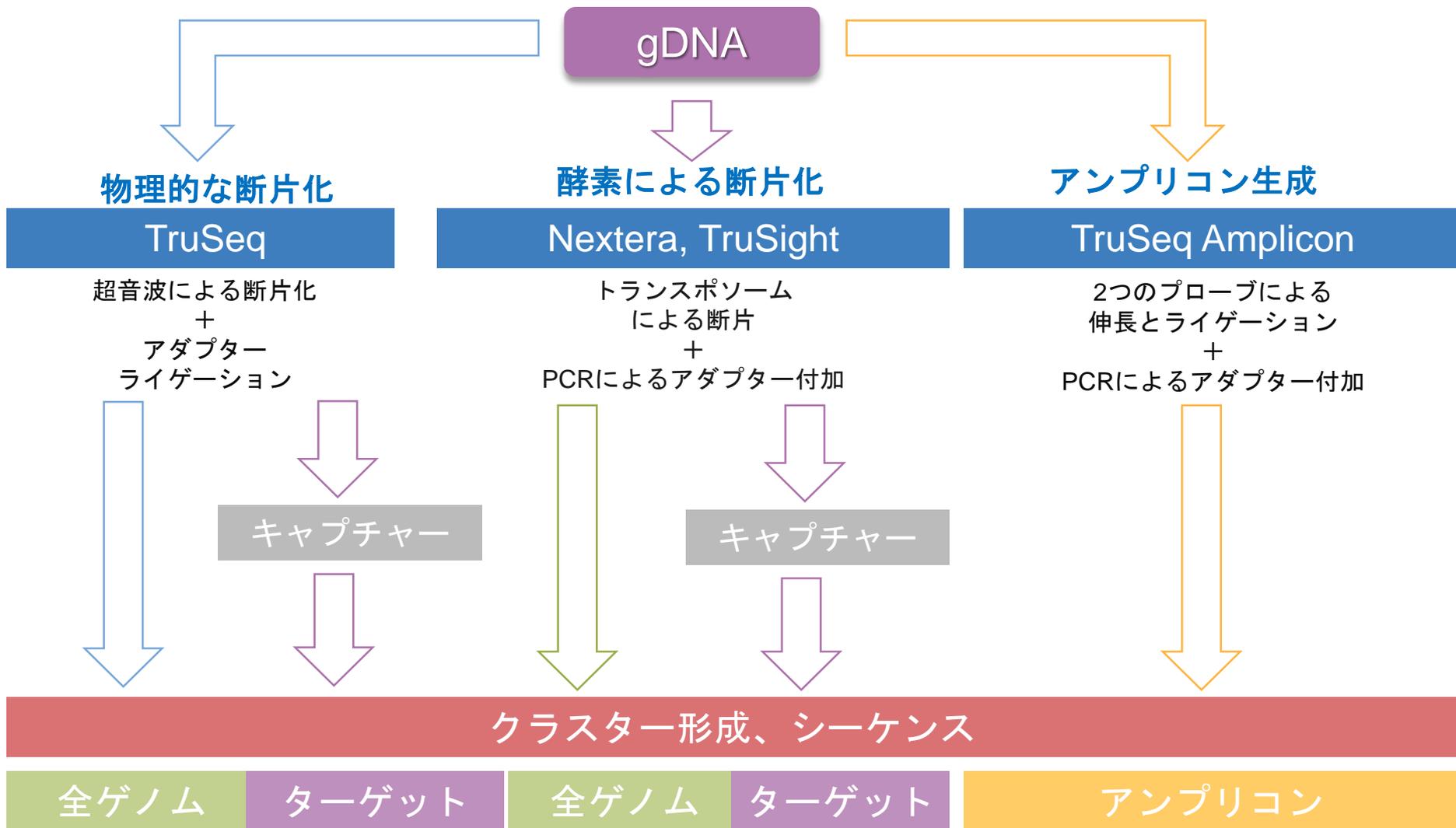
# 1. DNAシーケンス

- ・ 疾患パネル紹介

- ・ メタゲノム解析

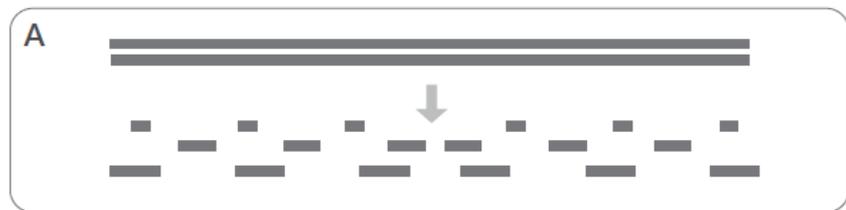


# DNAライブラリー調製の主な方法

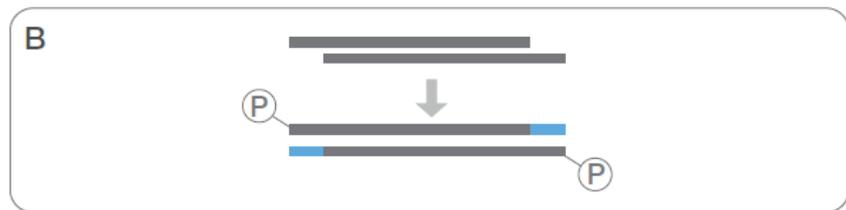


# 物理的な断片化方法

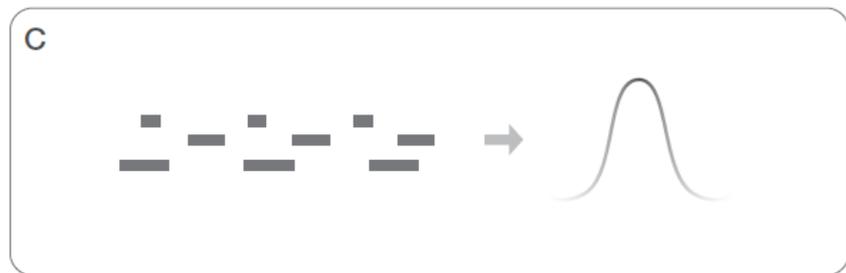
## 超音波による断片化+アダプターライゲーション



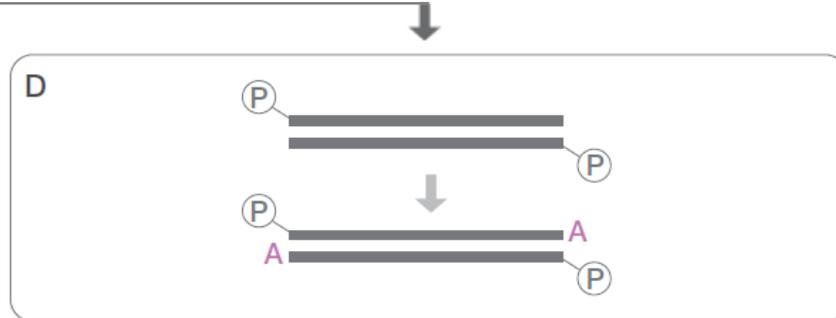
ゲノムDNAを断片化します。



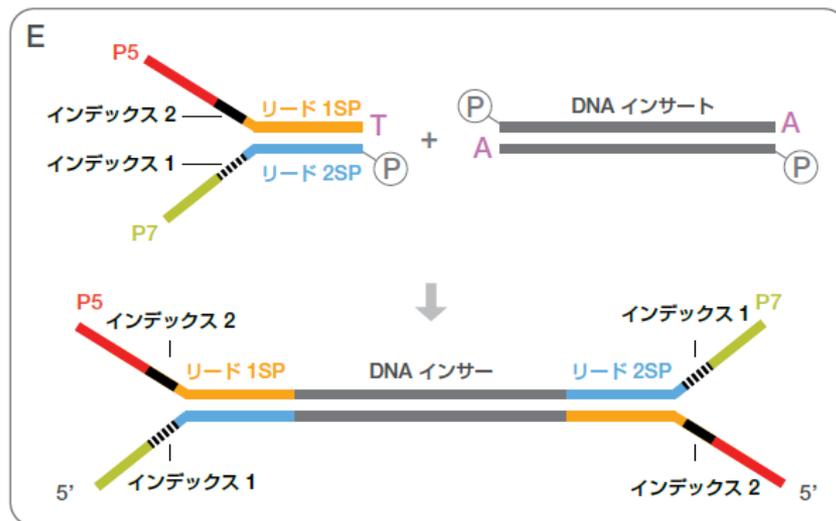
DNA断片の末端を平滑化します。



サンプル精製用ビーズを用い、特定の長さのインサートサイズを選択します。



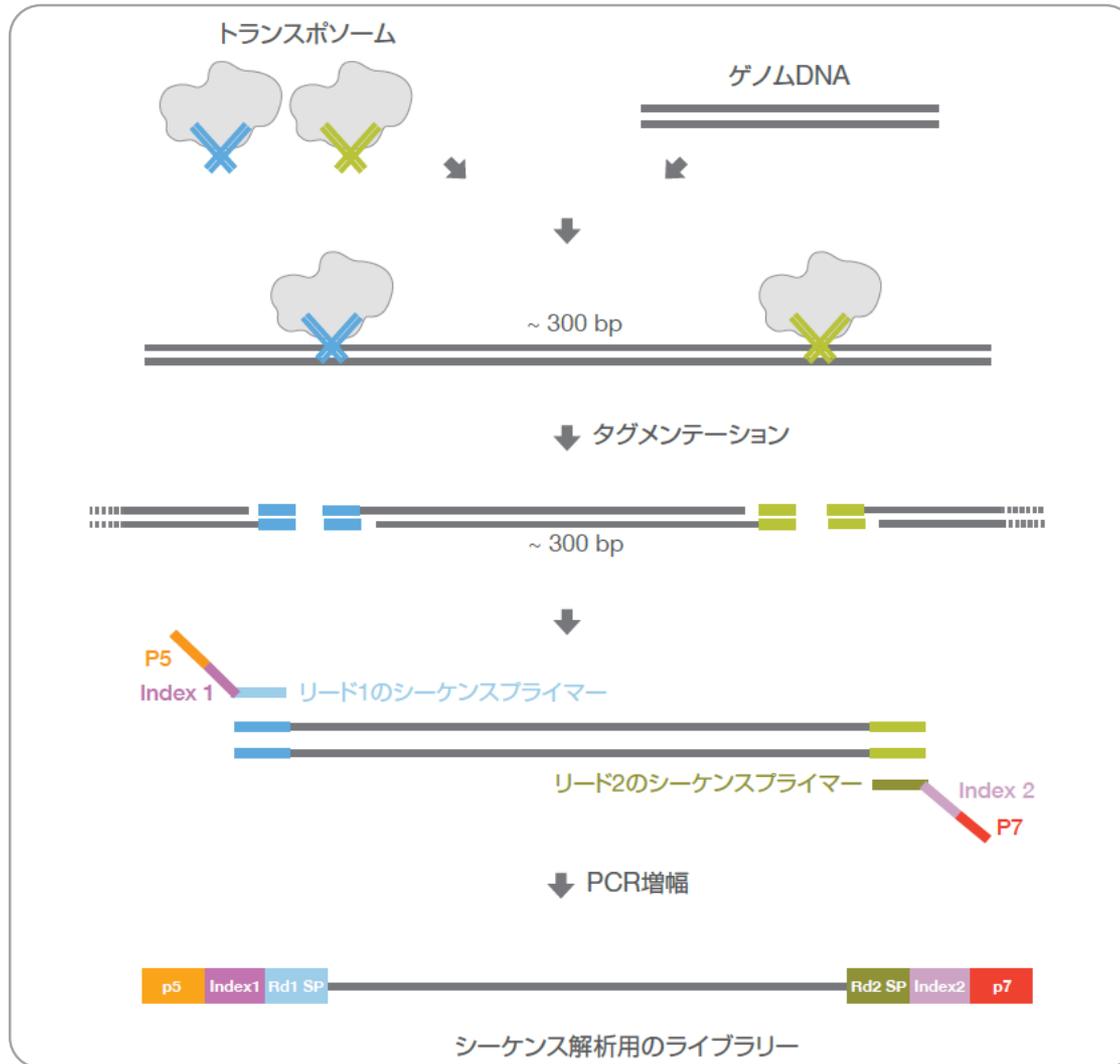
A塩基を付加します。



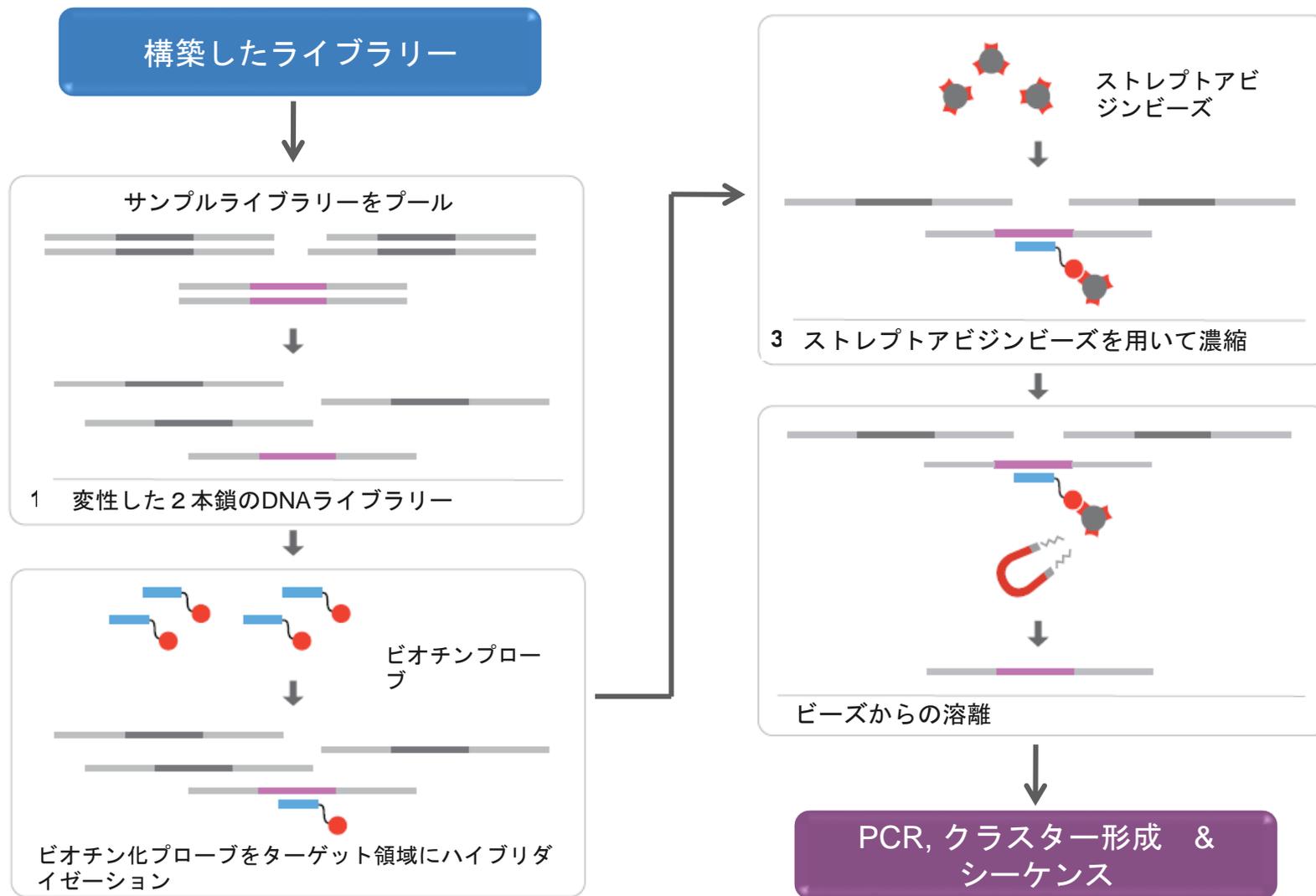
デュアルインデックスのアダプターがDNA断片\*にライゲーションされ、クラスター形成用の最終産物が得られます。

# 酵素による断片化方法

トランスポソーム断片化 + PCRアダプター付加



# 標的領域濃縮方法



# TruSight疾患パネル



One

疾患関連4813遺伝子をターゲットとしたエクソーム解析



Cardio

遺伝性心臓疾患174遺伝子をターゲット



癌パネル

癌の素因に関係する94遺伝子をターゲット



遺伝性疾患パネル

重篤な小児遺伝性疾患に関与する552遺伝子をターゲット

# TruSight Cancer – 94 遺伝子

よくある癌、稀な癌の**遺伝的素因**を同定

癌との関連が報告されている284 SNPsが解析できる

## ▶ 臨床応用

- 患者サンプルを用い、稀な複数の癌に対するコスト効率のよい遺伝的素因テスト（1種類の稀な癌パネルであればコストが高くかかってしまう）
- 同定した変異から、家族への検査の必要性を決定
- 癌種ごとに、治療法の可能性を提供

## ▶ 研究

- 癌サンプルをコスト効率よく迅速に区分け（既知遺伝子に基づくサンプルの情報引き出し）
- 現在の手法は多くのDNA量を必要とし、ワークフローに時間がかかる

- Somatic（体細胞変異）ではなく、Germline（生殖細胞変異／SNP）にフォーカス
- サンプルは、**正常細胞を想定**（癌細胞ではない）
  - 例) 癌患者の血液サンプル
  - 例) 健康者の血液サンプル

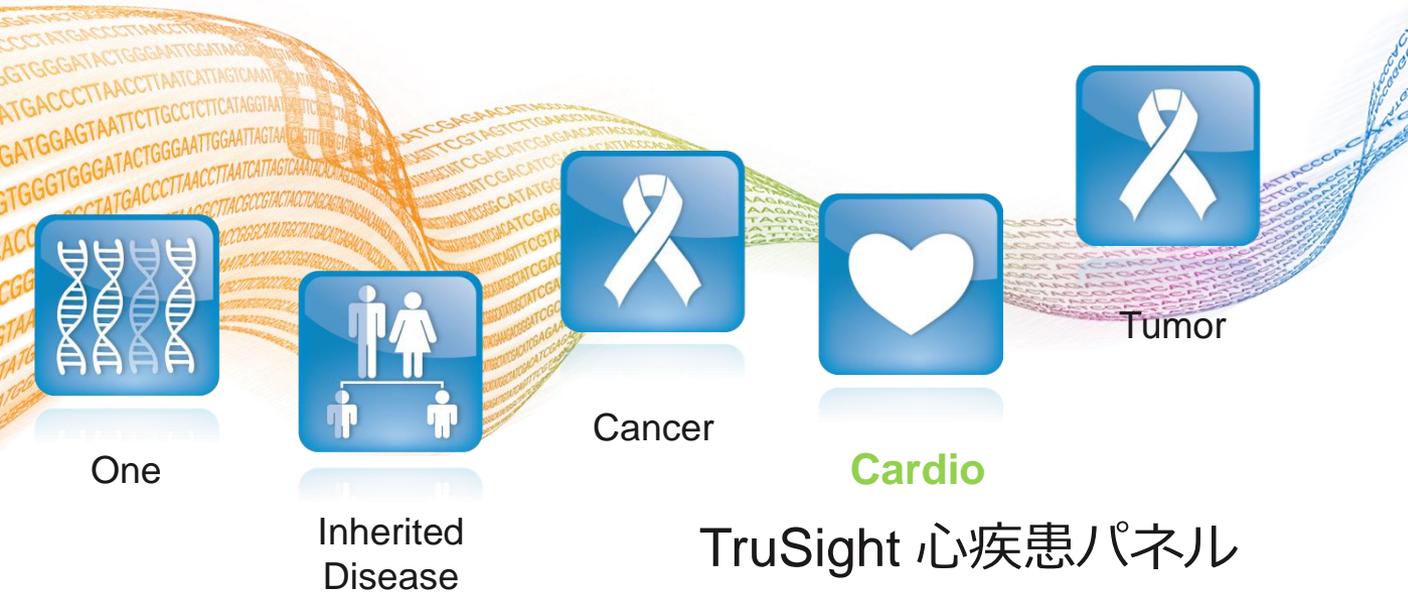
# TruSight Cancer Panelがターゲットにしている癌 遺伝性腫瘍・家族性腫瘍

遺伝性腫瘍の病名	原因遺伝子	その他にできやすいがんの例
リンチ症候群 (遺伝性非ポリポーシス大腸がん； HNPCC)	MSH2, MLH1	子宮体がん、卵巣がん、胃がん、小腸がん、 卵巣がん、腎盂（じんう）・尿管がん
家族性大腸ポリポーシス (家族性大腸腺腫症)	APC	胃がん、十二指腸がん、デスモイド腫瘍
遺伝性乳がん・卵巣がん症候群	BRCA1, BRCA2	前立腺がん、膵臓がん
リー・フラウメニ症候群	TP53	乳がん、急性白血病、脳腫瘍、副腎皮質腫瘍
網膜芽細胞腫 (もうまくがさいぼうしゅ)	RB1	骨肉腫、肉腫
多発性内分泌腫瘍症 (MEN) 1型	MEN1	下垂体・膵ランゲルハンス島・副甲状腺腫瘍または過形成
多発性内分泌腫瘍症 (MEN) 2型	RET	甲状腺髄様がん、副甲状腺機能亢進症、褐色細胞腫

独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター  
<http://ganjoho.jp/public/cancer/data/genetic-familial.html>

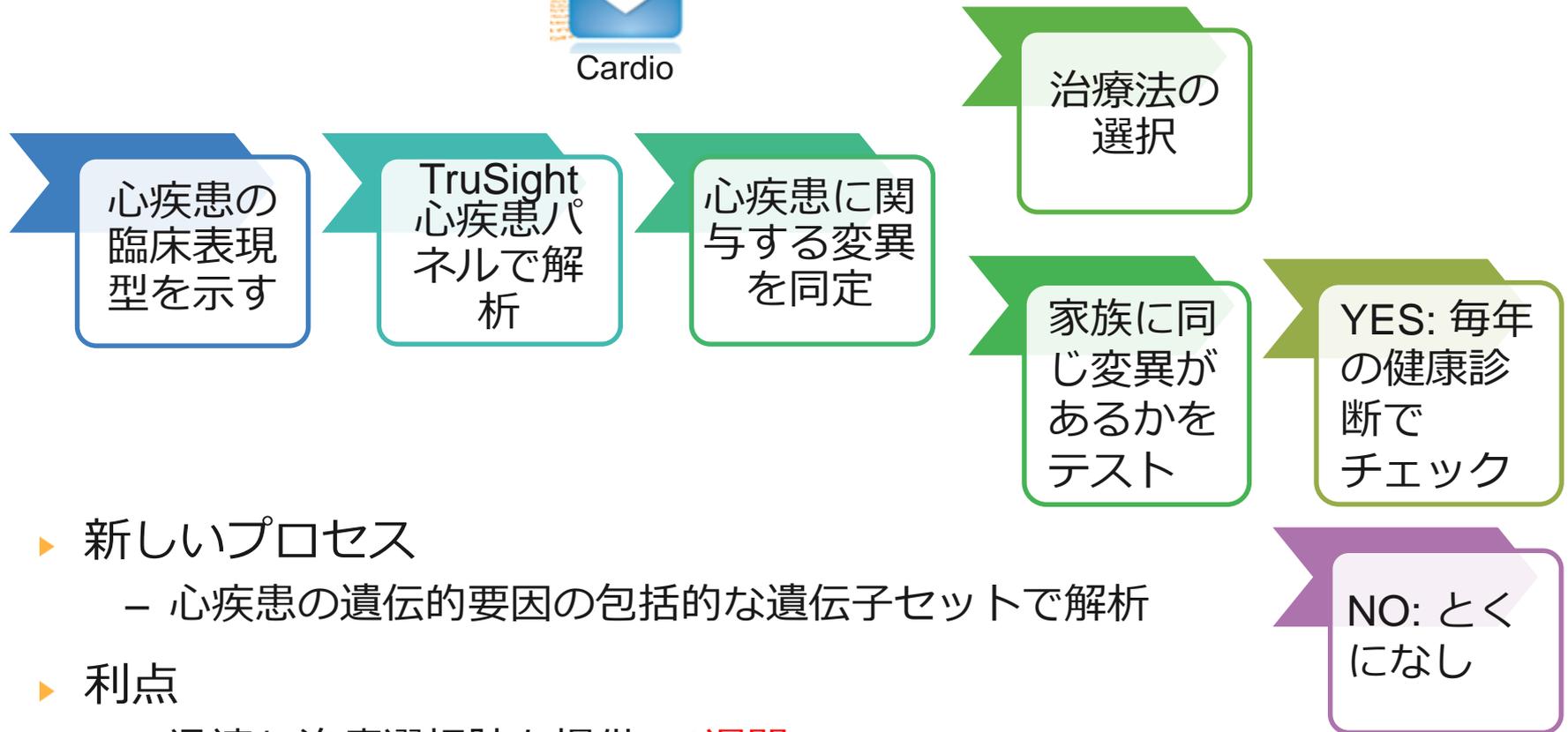
TruSight Cancer Panelはこれら**全ての遺伝子**を含んでいます。

# TruSight Portfolio



- ▶ 17の遺伝性心臓疾患に関与する174 遺伝子のエクソン領域をカバー
- ▶ 遺伝的要因と関連する心疾患にフォーカス
- ▶ コンテンツはImperial College of Londonとの共同研究

# 心疾患の遺伝的要因を包括的なテストで解析



## ▶ 新しいプロセス

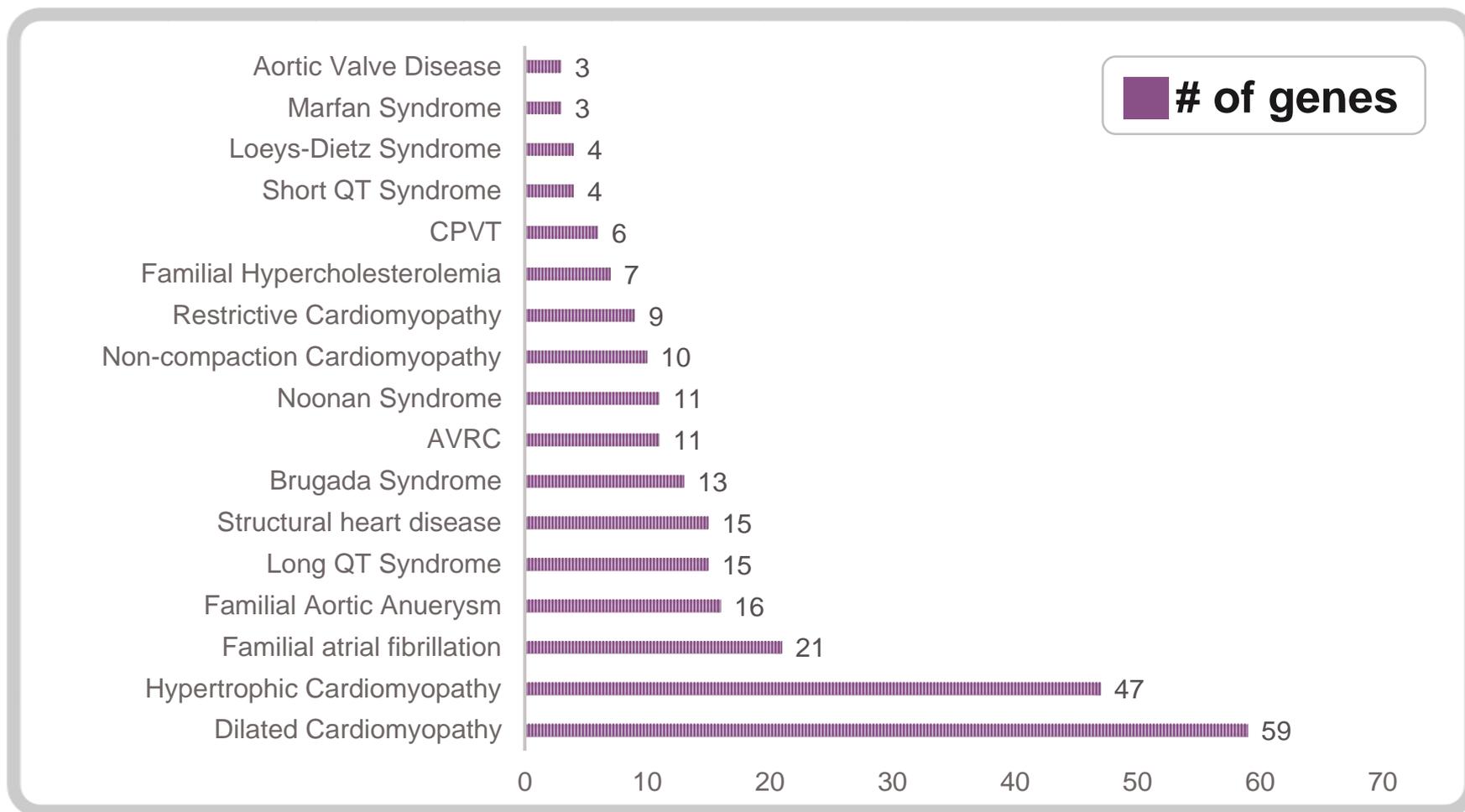
- 心疾患の遺伝的要因の包括的な遺伝子セットで解析

## ▶ 利点

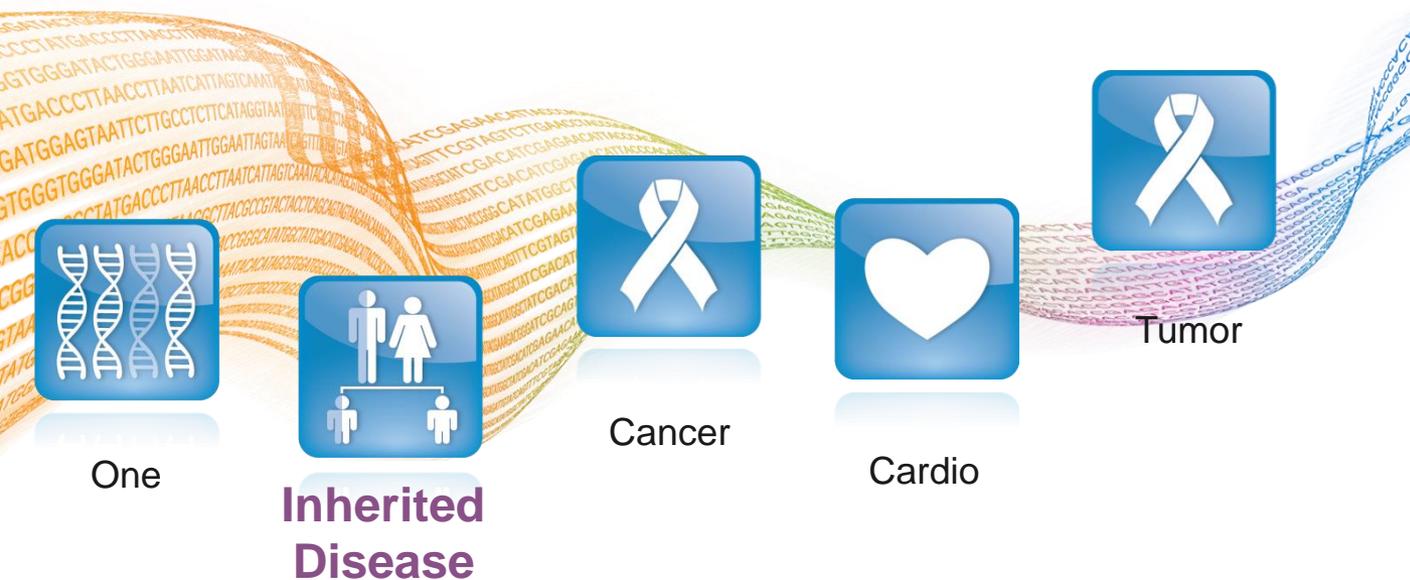
- 迅速な治療選択肢を提供 **1週間**
- **家族スクリーニングの必要性も判定** (遺伝性の有無)

# 遺伝性心疾患

臨床的関連のある遺伝子をカバー



# TruSight Portfolio



## TruSight 遺伝疾患パネル

- ▶ 552遺伝子のコーディングエクソン、イントロン-エクソン境界、病原性変異を含む既知の領域をカバー
- ▶ 重度の小児疾患に寄与する遺伝子にフォーカス
- ▶ Stephen Kingsmore博士、Carol Saunders博士、Hilger Ropers博士らによる設計
  - マーシー子供病院 (CMH) 小児ゲノム医療センター
  - マックスプランク研究所

# TruSight Inherited Diseases – 552 遺伝子 小児疾患（遺伝性疾患）の特徴付け

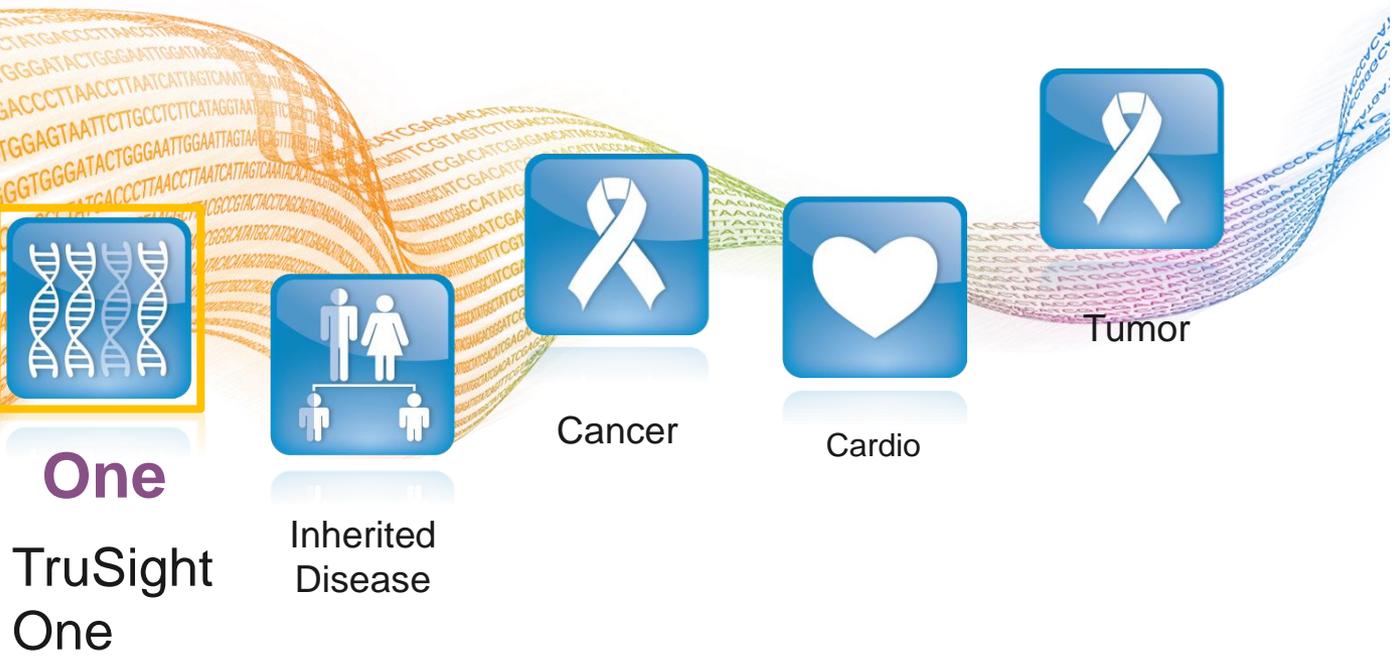


- ▶ 現在のプロセス
  - 疾患が同定できるまで、繰り返し単一遺伝子疾患のテストを実施



- ▶ 新しいプロセス
  - 網羅的な遺伝子セットで解析
- ▶ 利点
  - スピード（数ヶ月 > 1週間）
  - コスト効率
  - 網羅性

# TruSight Portfolio



**One**  
TruSight  
One

Inherited  
Disease

Cancer

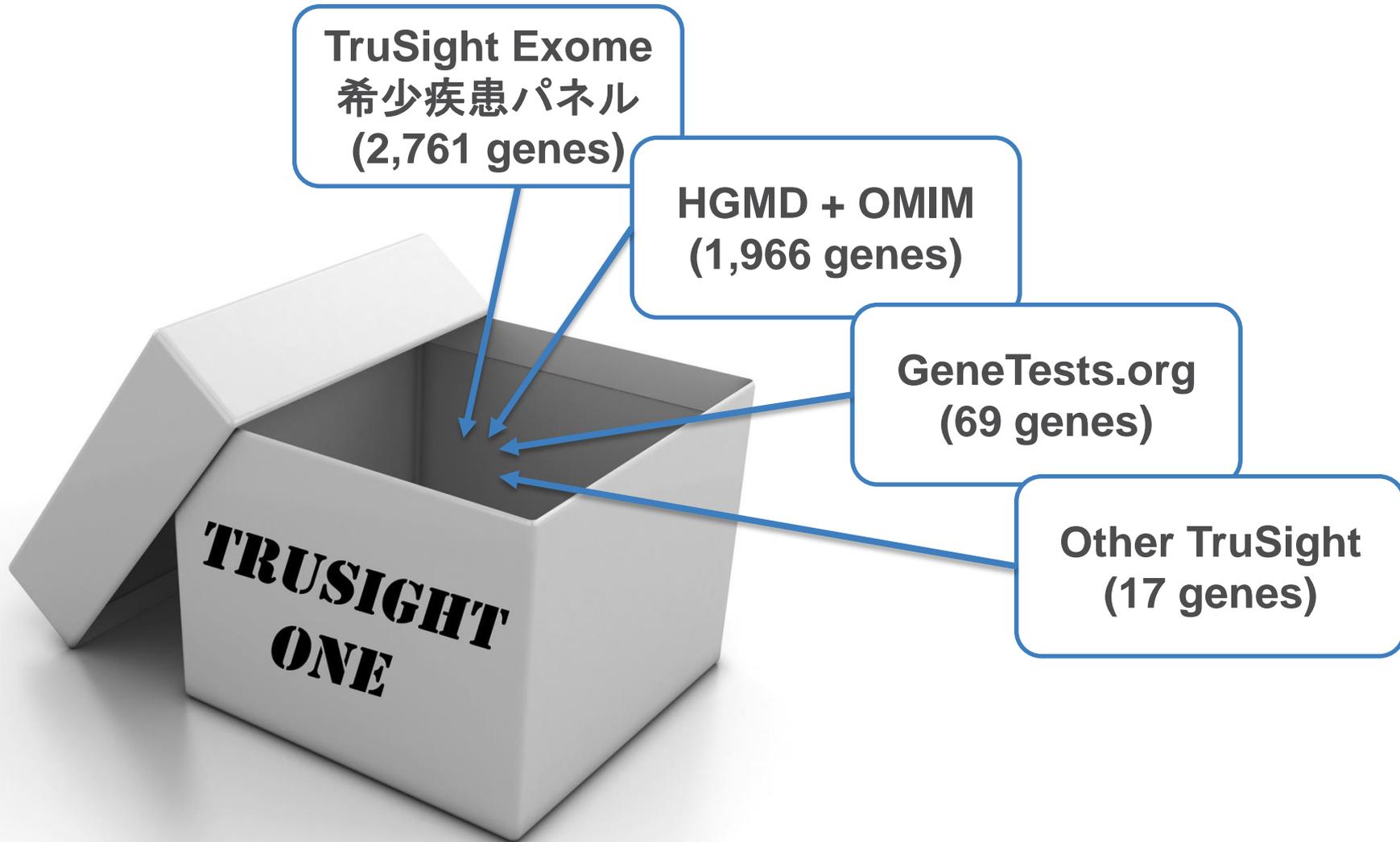
Cardio

Tumor

- ▶ 4813 遺伝子をカバー
- ▶ TruSight Exomeに追加コンテンツを搭載した、疾患関連遺伝子解析用のパネル

# TruSight Oneシーケンスパネル

包括的な疾患関連遺伝子のエクソーム解析



# 疾患関連遺伝子のエクソームをターゲットとした TruSight Oneの実績

OPEN

Citation: Human Genome Variation (2014) 1, 14022; doi:10.1038/hgv.2014.22  
© 2014 The Japan Society of Human Genetics All rights reserved 2054-345X/14  
www.nature.com/hgv

## DATA REPORT

A novel *PTCH1* mutation in a patient with Gorlin syndrome

Nana Okamoto<sup>1,5</sup>, Takuya Naruto<sup>2,5</sup>, Tomohiro Kohmoto<sup>3</sup>, Takahide Komori<sup>1</sup> and Issei Imoto<sup>4</sup>

## CLINICAL REPORT

AMERICAN JOURNAL OF  
medical genetics

Severe Craniosynostosis With Noonan Syndrome  
Phenotype Associated With *SHOC2* Mutation:  
Clinical Evidence of Crosslink Between  
FGFR and RAS Signaling Pathways

Toshiki Takenouchi,<sup>1</sup> Yoshiaki Sakamoto,<sup>2</sup> Tomoru Miwa,<sup>3</sup> Chiharu Torii,<sup>4</sup> Rika Kosaki,<sup>5</sup>  
Kazuo Kishi,<sup>2</sup> Takao Takahashi,<sup>1</sup> and Kenjiro Kosaki<sup>4\*</sup>

## DATA REPORT

Detection of 1p36 deletion by clinical exome-first diagnostic  
approach

Miki Watanabe<sup>1,2,5</sup>, Yasunobu Hayabuchi<sup>3,5</sup>, Akemi Ono<sup>3</sup>, Takuya Naruto<sup>1</sup>, Hideaki Horikawa<sup>1,4</sup>, Tomohiro Kohmoto<sup>1,2</sup>, Kiyoshi Masuda<sup>1</sup>,  
Ryuji Nakagawa<sup>3</sup>, Hiromichi Ito<sup>3</sup>, Shoji Kagami<sup>3</sup> and Issei Imoto<sup>1</sup>

Next-generation sequencing discloses a nonsense  
mutation in the *dystrophin* gene from long preserved  
dried umbilical cord and low-level somatic mosaicism  
in the proband mother

Mariko Taniguchi-Ikeda<sup>1,2</sup>, Yasuhiro Takeshima<sup>3</sup>, Tomoko Lee<sup>3</sup>, Masahiro Nishiyama<sup>1,2</sup>, Hiroyuki Awano<sup>1</sup>,  
Mariko Yagi<sup>4</sup>, Ai Unzaki<sup>1</sup>, Kandai Nozu<sup>1</sup>, Hisahide Nishio<sup>1</sup>, Masafumi Matsuo<sup>5</sup>, Hiroki Kurahashi<sup>6</sup>,  
Tatsushi Toda<sup>2,7</sup>, Ichiro Morioka<sup>1</sup> and Kazumoto Iijima<sup>1</sup>

## Case report

Somatic mosaicism of a *CDKL5* mutation identified by  
next-generation sequencing

Takeshi Kato<sup>a</sup>, Naoya Morisada<sup>a,\*</sup>, Hiroaki Nagase<sup>b</sup>, Masahiro Nishiyama<sup>a</sup>,  
Daisaku Toyoshima<sup>a</sup>, Taku Nakagawa<sup>a</sup>, Azusa Maruyama<sup>b</sup>, Xue Jun Fu<sup>a</sup>,  
Kandai Nozu<sup>a</sup>, Hiroko Wada<sup>c</sup>, Satoshi Takada<sup>d</sup>, Kazumoto Iijima<sup>a</sup>

## DATA REPORT

Novel *PLA2G6* mutations associated with an exonic deletion  
due to non-allelic homologous recombination in a patient with  
infantile neuroaxonal dystrophy

Toshiyuki Yamamoto<sup>1</sup>, Keiko Shimojima<sup>1</sup>, Takashi Shibata<sup>2</sup>, Mari Akiyama<sup>2</sup>, Makio Oka<sup>2</sup>, Tomoyuki Akiyama<sup>2</sup>, Harumi Yoshinaga<sup>2</sup> and  
Katsuhiro Kobayashi<sup>2</sup>

## DATA REPORT

A novel *COL11A1* missense mutation in siblings with  
non-ocular Stickler syndrome

Tomohiro Kohmoto<sup>1,2</sup>, Atsumi Tsuji<sup>3</sup>, Kei-ichi Morita<sup>4</sup>, Takuya Naruto<sup>1</sup>, Kiyoshi Masuda<sup>1</sup>, Kenichi Kashimada<sup>3</sup>, Keisuke Enomoto<sup>3</sup>,  
Tomohiro Morio<sup>3</sup>, Hiroyuki Harada<sup>4</sup> and Issei Imoto<sup>1</sup>

## DATA REPORT

A novel frameshift mutation of *CHD7* in a Japanese patient  
with CHARGE syndrome

Tomohiro Kohmoto<sup>1,2,4</sup>, Miki Shono<sup>3,4</sup>, Takuya Naruto<sup>1</sup>, Miki Watanabe<sup>1,2</sup>, Ken-ichi Suga<sup>3</sup>, Ryuji Nakagawa<sup>3</sup>, Shoji Kagami<sup>3</sup>,  
Kiyoshi Masuda<sup>1</sup> and Issei Imoto<sup>1</sup>

Somatic mosaicism and variant frequency detected  
by next-generation sequencing in X-linked  
Alport syndrome

Xue Jun Fu<sup>1</sup>, Kandai Nozu<sup>a,1</sup>, Hiroshi Kaito<sup>1</sup>, Takeshi Ninchoji<sup>1</sup>, Naoya Morisada<sup>1</sup>, Koichi Nakanishi<sup>2</sup>,  
Norishige Yoshikawa<sup>2</sup>, Hiromi Ohtsubo<sup>1</sup>, Natsuki Matsunoshita<sup>1</sup>, Naohiro Kamiyoshi<sup>1</sup>, Chieko Matsumura<sup>3</sup>,  
Nobuaki Takagi<sup>4</sup>, Kohei Maekawa<sup>4</sup>, Mariko Taniguchi-Ikeda<sup>1</sup> and Kazumoto Iijima<sup>1</sup>

# 日本におけるTruSight One解析例



徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部人類遺伝学分野  
教授  
井本逸勢 先生

先生のご研究にTruSight One シーケンスパネルを使いたいと思われたのはなぜですか？

臨床に関与した主要な遺伝子を網羅していることから、疾患や症状から責任遺伝子候補が複数想定される場合など、簡便にスクリーニングしてシーケンスできる。特に、エクソン数が多くホットスポットが無いような場合や、配列変異だけでなく（下記参照）欠失や重複変異もある程度の頻度であり得る場合などは、よい適応になる。

TruSight One シーケンスパネルの利点は何でしょう？

疾患と関連している遺伝子のため、変異の解釈がエクソームと比較して楽である。また適度にゲノムワイドに分布して多数のシーケンスをカバーしていることから、CNVを算出できる。このため、疾患や症状によって、TruSightOne -> CNVの範囲決定と確認のためにアレイ という流れが有効になっている。



地方独立行政法人神奈川立病院  
機構 神奈川立こども医療センター 遺伝科  
黒澤健司 先生

先生のご研究にTruSight One シーケンスパネルを使いたいと思われたのはなぜですか？

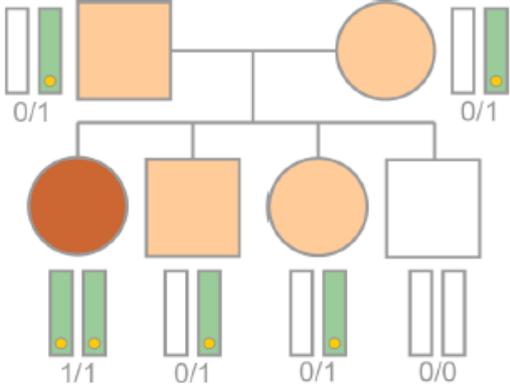
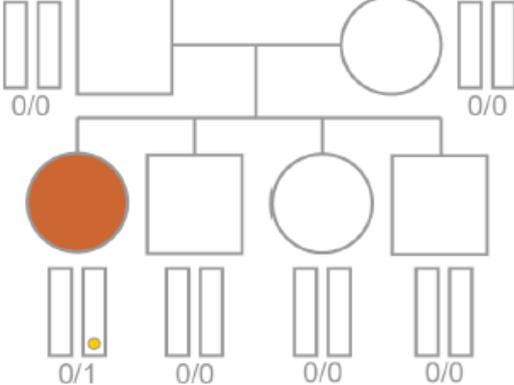
総合病院（小児病院）で臨床研究を行うためには、様々な遺伝病に対応できるゲノム・遺伝子解析体制が必要。全エクソーム解析が理想であるが、自施設内で臨床研究として行うにはコストや解析装置にも限界があり、検出された変異のvalidationの問題も残る。TruSight One 以前に採用していたパネル解析が臨床研究の現場できわめて有用であることを経験していたので、パネル解析の拡張版として採用した。

TruSight One シーケンスパネルの利点は何でしょう？

- 1) コパリスや高出力のシーケンス機器を必要とせず、検査室（研究室）単位で使用できること
- 2) 搭載遺伝子リストが通常の臨床研究に必要な遺伝子をほぼ網羅していること
- 3) 比較的均一に設計されているので、CNV変換後のデータも安定していること
- 4) 症例ごと（あるいは家系単位）で解析が可能であること（通常の疾患群単位のパネル解析では、コストダウンを図るために症例を多数集約して解析する必要があるが、総合病院ではそれは現実的ではない。同一疾患症例を多数集約するまでに相当の時間がかかってしまう。）。

弊社ウェブページ「研究者の声」より抜粋  
[http://jp.illumina.com/science/featured\\_researchers.html](http://jp.illumina.com/science/featured_researchers.html)

# 先天性疾患の原因変異探索の研究デザイン例

<p>疾患状態</p>	 <p>家族内集積がある 遺伝性疾患</p>	 <p>家族内集積なし 孤発性疾患</p>
<p>仮説</p>	<p>常染色体劣性遺伝</p>	<p><i>De Novo</i> 変異</p>
<p>スクリーニング</p>	<p>親子兄弟</p>	<p>親子兄弟</p>
<p>検証実験</p>	<p>別家系1~2組</p>	<p>別家系の発症者2~3名</p>

# アンプリコン疾患パネル



TruSeq Amplicon  
Cancer Panel

血液および固形腫瘍に関与する48遺伝子の  
ホットスポットをターゲット



TruSight Tumor 15

固形癌に関与する15の遺伝子をターゲット  
としたマルチプレックスPCRパネル



TruSight Tumor 26

肺癌、大腸癌、メラノーマ、胃癌、卵巣癌  
に関与する26遺伝子をターゲット



TruSight Myeloid

骨髄性悪性腫瘍に関連する54遺伝子をター  
ゲット

Coming soon



TruSight Lymphoid

リンパサンプルにおける変異の検出

Coming soon



TruSight ALL

急性リンパ性白血病に関連する約60遺伝子  
をターゲット

Coming soon

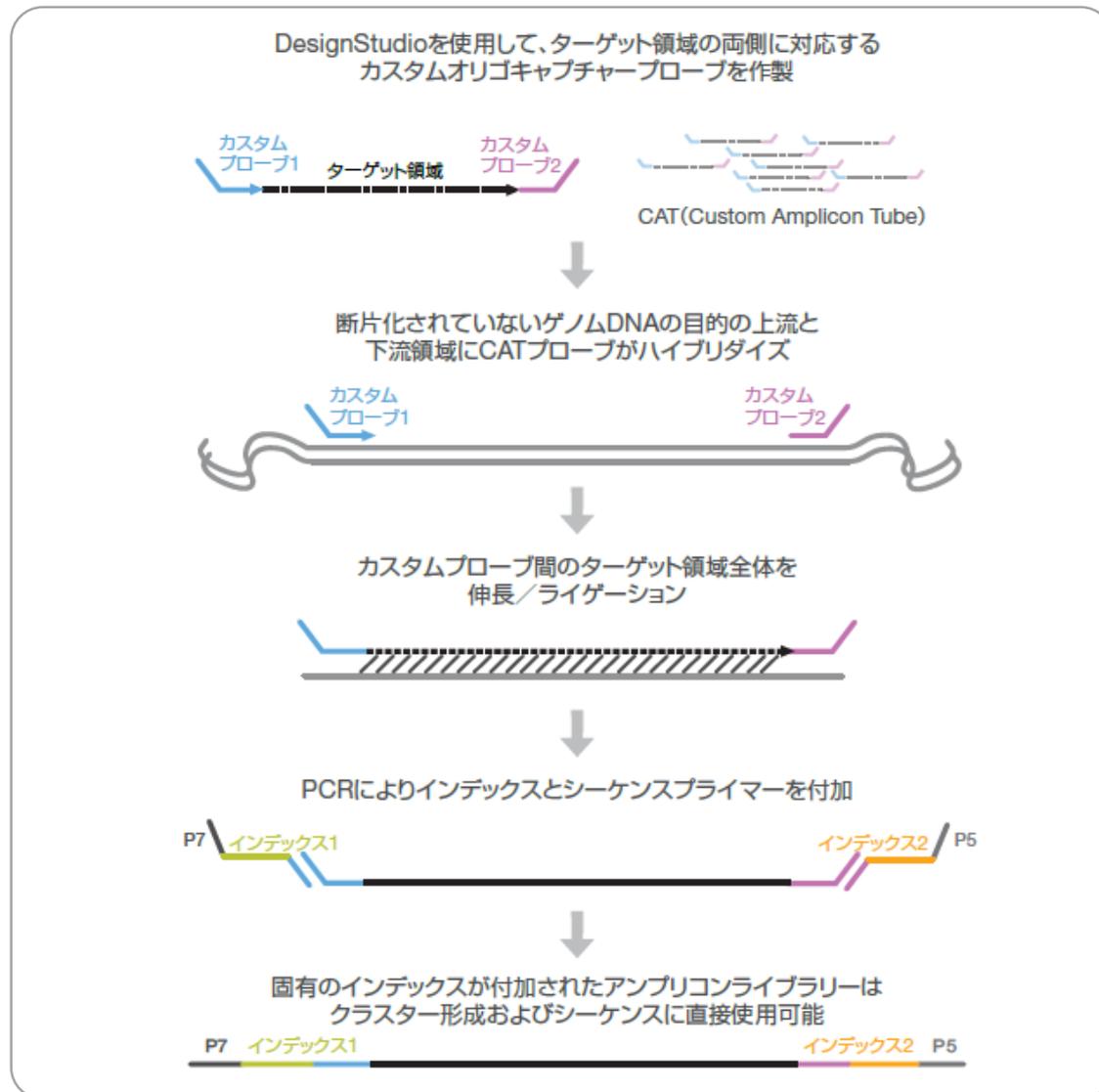


TruSight Myeloma

骨髄腫関連遺伝子をターゲット

# アンプリコン生成方法

プローブ伸長/ライゲーション+PCRアダプター付加



# がん研究における次世代シーケンサーの活用

リスク予測

スクリー  
ニング

診断

薬剤応答

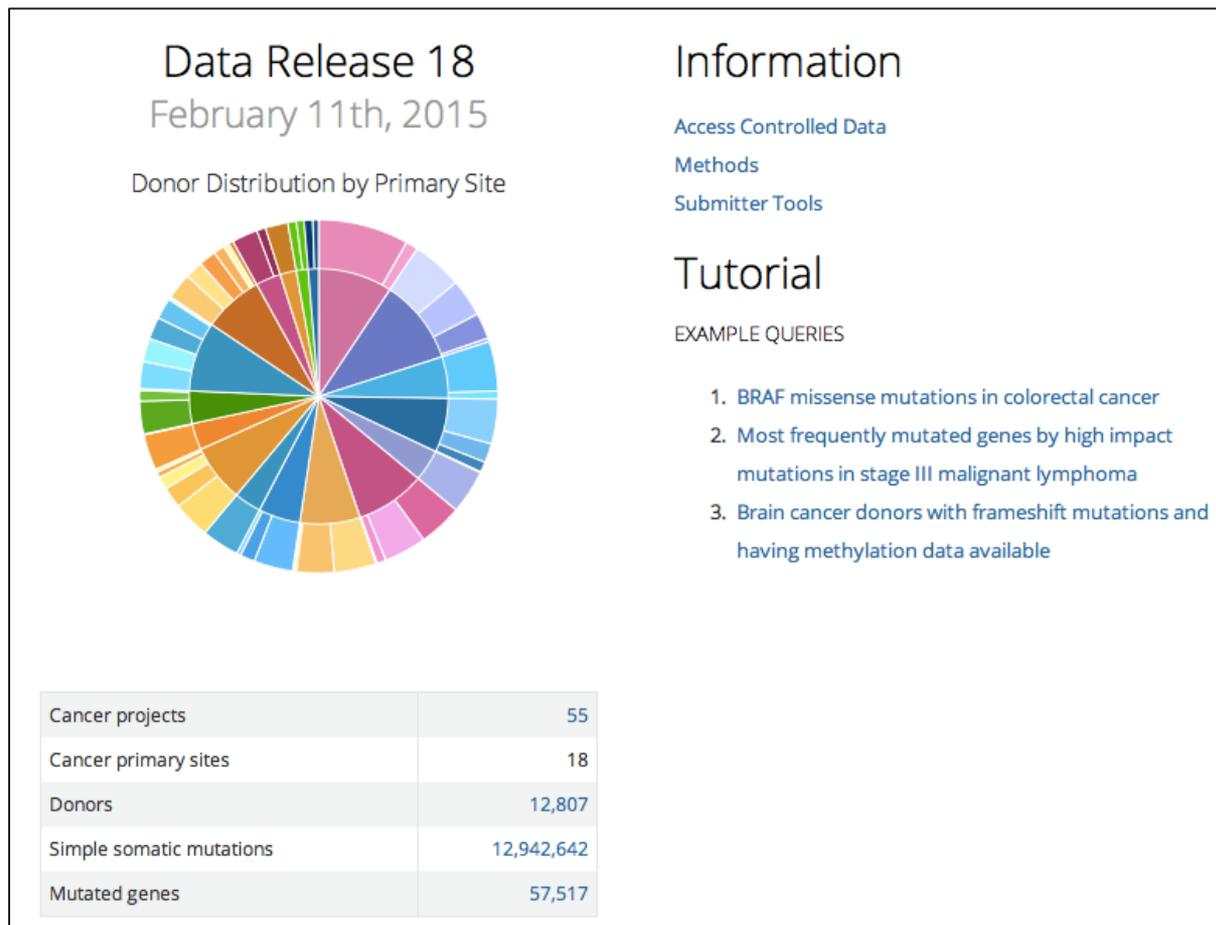
転移/再発



# ICGC: International Cancer Genome Consortium

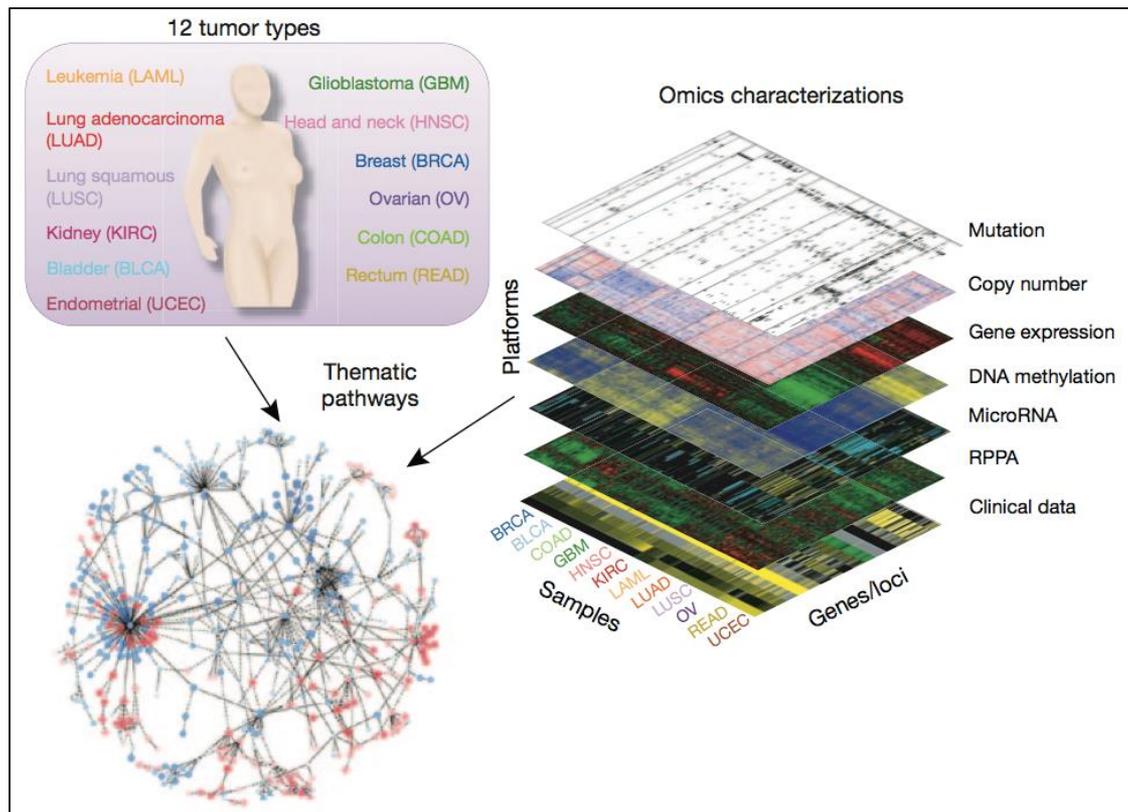
<https://dcc.icgc.org/>

- ▶ 国際共同研究（国際がんゲノムコンソーシアム）
- ▶ 50種類のがんについてそれぞれ500症例（500ペア、1000人分）のゲノム解読が目的
- ▶ 現在12,807人ドナーが登録



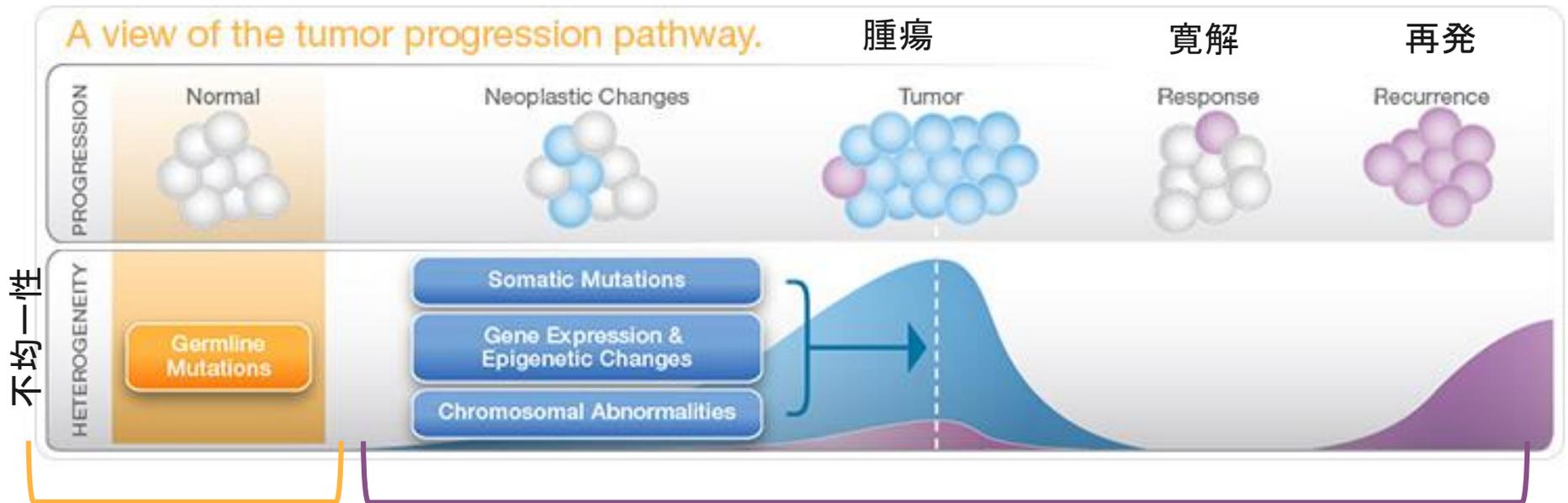
# TCGA : The cancer genome atlas pan-cancer analysis project

- ▶ 米国NIH
- ▶ 20種類以上のがんを対象としたオミックス解析
  - 変異
  - CNV
  - 遺伝子発現
  - DNAメチル化
  - microRNA
  - RPPA
  - 臨床データ



Weinstein, John N., et al. "The cancer genome atlas pan-cancer analysis project." *Nature genetics* 45.10 (2013): 1113-1120.

# イルミナがん関連シーケンスコンテンツセットの概要



## TruSight Cancer

- 94 遺伝子
- 濃縮ベース
- 遺伝リスクの探索
- 平均カバレッジ 500x

## TruSeq Amplicon Cancer

- 48 遺伝子 (血液腫瘍を含む)
- アンプリコンベース
- 体細胞変異の探索
- 低コスト、ハイスループット

## TruSight 腫瘍パネル

- 15もしくは26 遺伝子
- アンプリコンベース
- 体細胞変異の探索
- 最高の検出限界
- 最高のカバレッジ

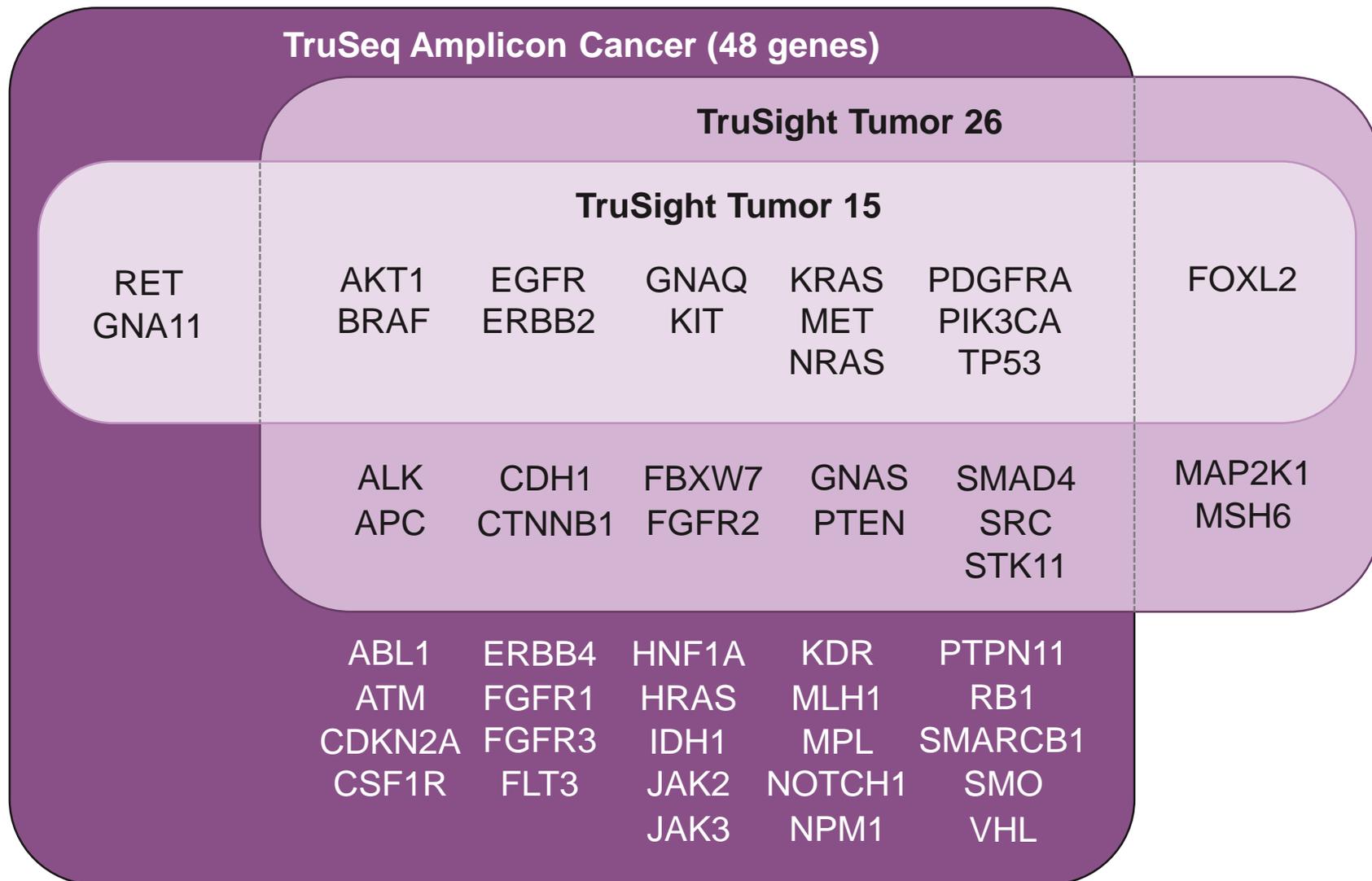
## TruSight RNA Pan Cancer

- 1385 遺伝子 (血液腫瘍を含む)
- 融合遺伝子、バリエーション、発現プロファイルの評価
- MiSeqでも1ランあたり8サンプルの解析が可能

# イルミナがんパネルの比較

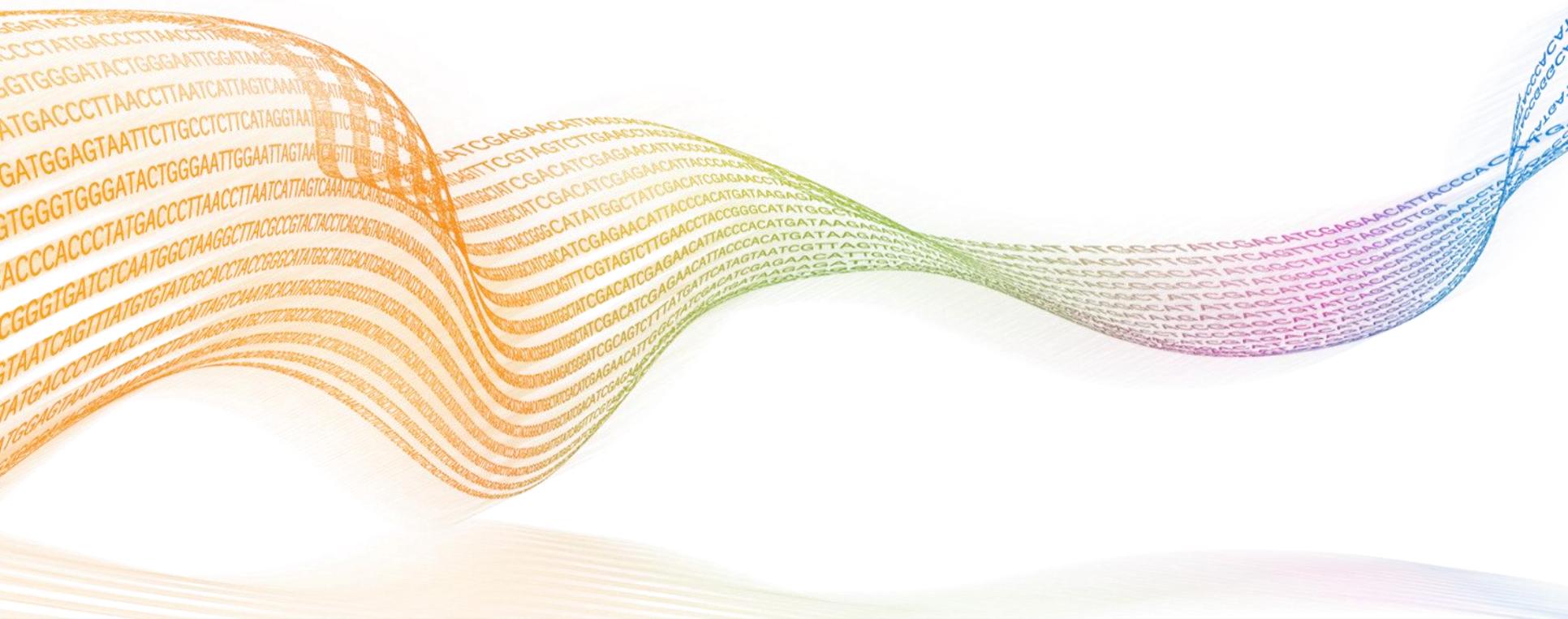
	TruSight Tumor 15	TruSight Tumor 26	TruSight Myeloid	TruSeq Amplicon Cancer	TruSight Cancer
利用形態	体細胞変異	体細胞変異	体細胞変異	体細胞変異	生殖細胞変異
がん腫	肺癌、卵巣癌、 大腸癌、結腸直 腸癌、メラノー マ、乳癌	肺癌、卵巣癌、 大腸癌、結腸直 腸癌、メラノー マ	骨髄性悪性	乳癌、卵巣癌、 大腸癌、白血病	肺癌、胃癌、大 腸癌、卵巣癌、 メラノーマ
スタート量	20ng	30-300ng	50ng	150-250ng	50ng
検出変異頻度	5%	5%以下	5%	5%	NA
遺伝子数	15 遺伝子	26 遺伝子	54 遺伝子	48 遺伝子	94 遺伝子
ターゲット	44 kb	21 kb	141 kb	35 kb	255 kb
手法	アンプリコン	アンプリコン	アンプリコン	アンプリコン	濃縮
リード長	151bp x2	121bp x2	150bp x2	150bp x2	150bp x2
カバレッジ	20,00x以上	7,000x	500x	1,000x	100x
解析アプリ	TruSight Tumor 15	Amplicon DS	TruSeq Amplicon	TruSeq Amplicon	BWA Enrichment

# 対象とする遺伝子の比較



# カスタムパネル製品

# TruSeq Custom Amplicon Low Input



# TruSeq Custom Amplicon Low Input

## 10ngインプット量からのアンプリコンシーケンス

**NEW!**

製品名	TruSeq Custom Amplicon Low Input	TruSeq Custom Amplicon v1.5
gDNAインプット量	10 ng	50 ng
FFPEインプット量	10 ng ~	250 ng
アッセイ時間	6.5時間	10時間
キットサイズ	16, 96+サンプル	96+サンプル
アンプリコン数	16 ~ 1,536	16 ~ 10,000*
アンプリコンサイズ	150, 175, 250 bp	150, 175, 250, 425 bp

\*イルミナコンシェルジュサービスのご利用によりデザイン可能

### 価格も大幅改定!

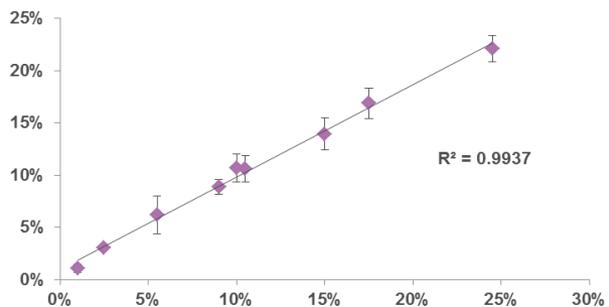
例) 200アンプリコン、16サンプルのライブラリー調製からシーケンスまで  
ライブラリー調製キット ; 286,000円、シーケンス試薬キット ; 178,000円  
サンプルコスト **わずか29,000円** (\*インデックスキットも含む)

# TruSeq Custom Amplicon Low Input

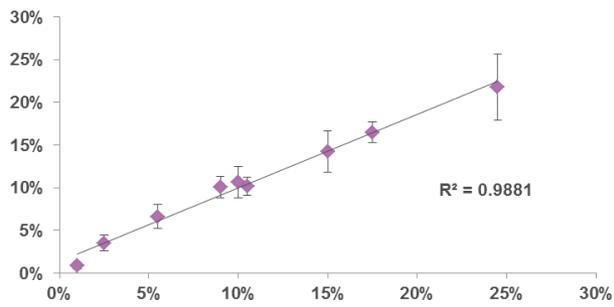
10ngインプット量で、5%アリル頻度を検出

## gDNAサンプル

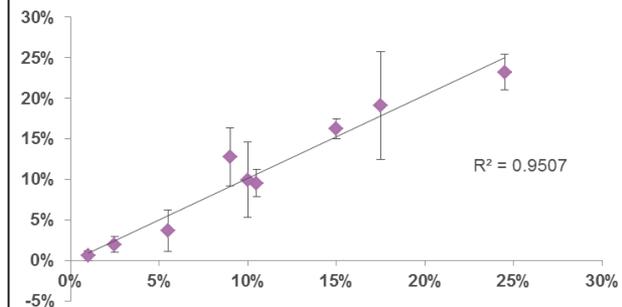
MAF at 10ng vs Expected



MAF at 5ng vs Expected

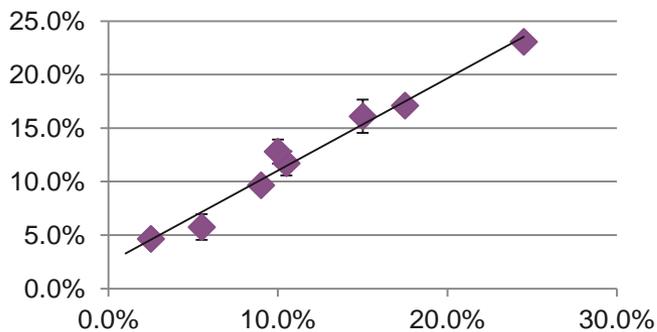


MAF at 1ng vs Expected

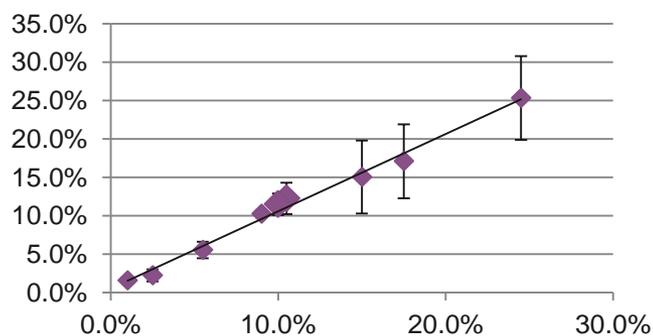


## 高品質FFPEサンプル

Sample 1: 10ng



Sample 1: 5ng



# イルミナが提供するライブラリー調製手法

	物理的な断片化		酵素による断片化		アンプリコン生成
		+ Capture		+ Capture	
アプリケーション	全ゲノム	Exome	全ゲノム	Exome / Target	Target
製品名	TruSeq DNA	TruSeq Exome	Nextera DNA	TruSeq Rapid Exome	TruSeq Custom Amplicon
				TruSight One TruSight Panels	TruSeq Amplicon Cancer (48 genes) TruSight Tumor (26 genes) TruSight Myeloid
DNAインプット量	100-1000 ng	100 ng	1-50 ng	50 ng	30-300 ng
FFPE対応	No	No	No	No	Yes / No
カスタム対応	No	No	No	Yes	Yes

# ターゲットシーケンス解析ワークフロー

BaseSpace®

ライブラリー調製

シーケンス

アライメント  
変異コール

アノテーション  
フィルタリング



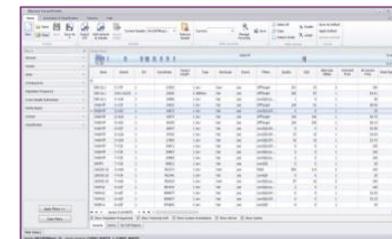
Nextera Rapid  
Capture Exome  
TruSight One



Enrichment



VariantStudio

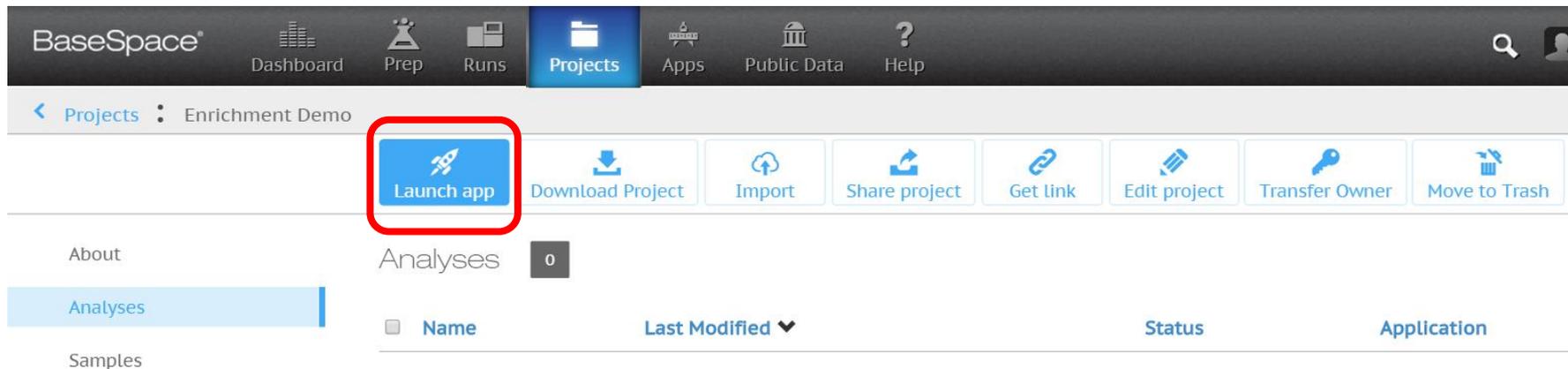


サンプルから答えまで、一連の工程をサポート

# アライメント&変異コール用解析アプリの選択

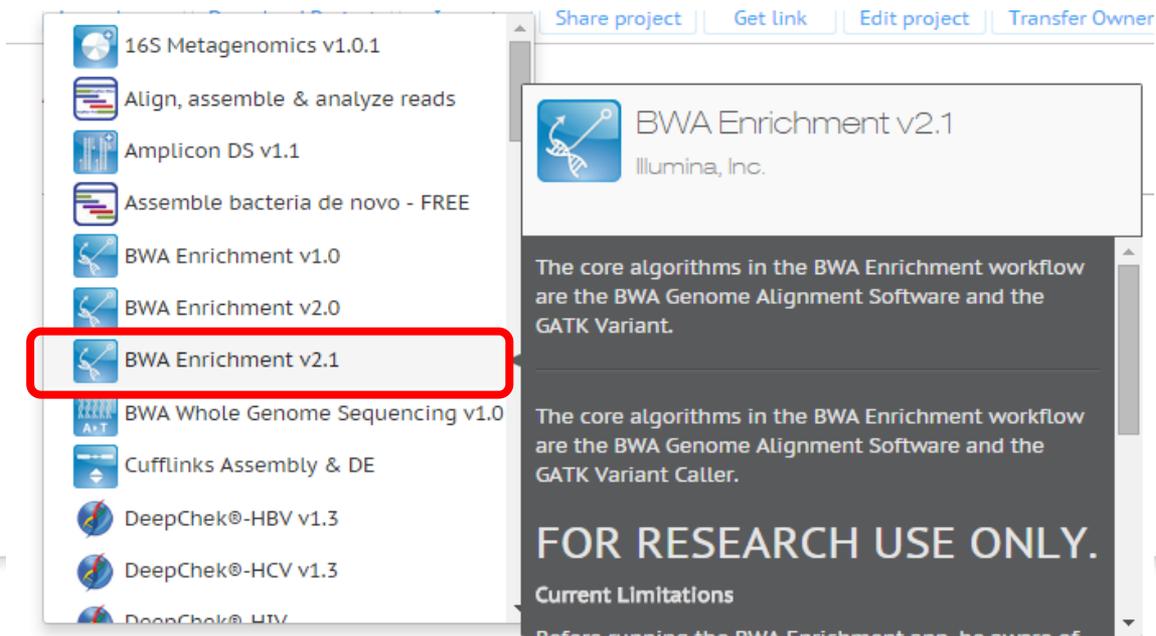
## BWA Enrichment v2.1

① Project WindowでLaunch Appを選択する



The screenshot shows the BaseSpace web interface. The top navigation bar includes 'Dashboard', 'Prep', 'Runs', 'Projects' (highlighted), 'Apps', 'Public Data', and 'Help'. Below the navigation bar, the breadcrumb path is 'Projects > Enrichment Demo'. A row of action buttons is visible: 'Launch app' (highlighted with a red box), 'Download Project', 'Import', 'Share project', 'Get link', 'Edit project', 'Transfer Owner', and 'Move to Trash'. Below this row, there is a section for 'Analyses' with a count of '0'. A table header is partially visible with columns: 'Name', 'Last Modified', 'Status', and 'Application'.

② BWA Enrichment v2.1を選択する



The screenshot shows a dropdown menu of applications. The items listed are: '16S Metagenomics v1.0.1', 'Align, assemble & analyze reads', 'Amplicon DS v1.1', 'Assemble bacteria de novo - FREE', 'BWA Enrichment v1.0', 'BWA Enrichment v2.0', 'BWA Enrichment v2.1' (highlighted with a red box), 'BWA Whole Genome Sequencing v1.0', 'Cufflinks Assembly & DE', 'DeepChek@-HBV v1.3', 'DeepChek@-HCV v1.3', and 'DeepChek@-HTV'. To the right, a preview window for 'BWA Enrichment v2.1' by Illumina, Inc. is shown. The preview text reads: 'The core algorithms in the BWA Enrichment workflow are the BWA Genome Alignment Software and the GATK Variant.' and 'FOR RESEARCH USE ONLY. Current Limitations'. The preview also includes a warning: 'Before running the BWA Enrichment app, be aware of'.

# 解析レポートでライブラリーの品質を確認

Total Aligned Reads	Percent Aligned Reads	Targeted Aligned Reads	Read Enrichment	Padded Target Aligned Reads	Padded Read Enrichment
118,766,453	99.6%	66,901,497	56.3%	74,478,982	62.7%

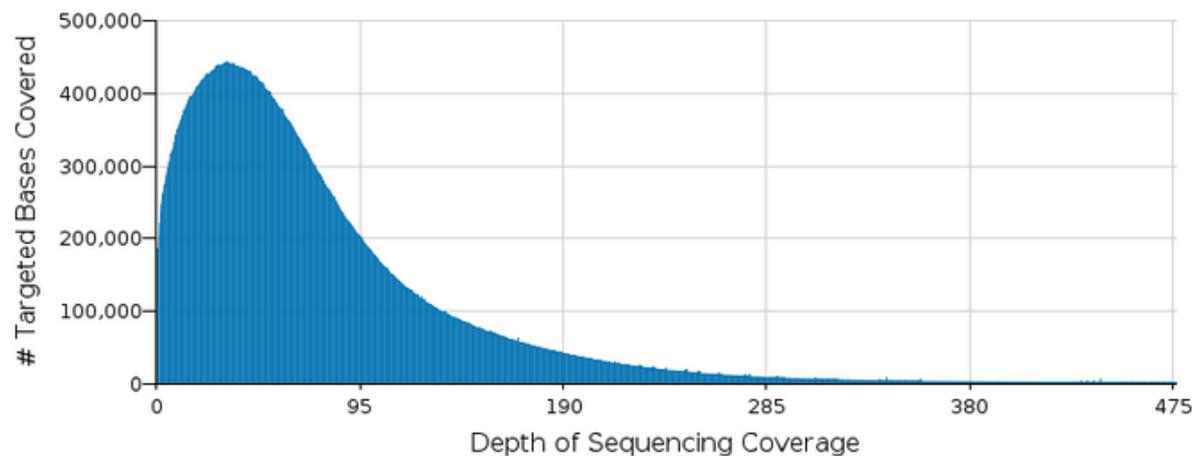
標的領域にアライメントされたリード割合

Mean Coverage	Uniformity of Coverage (Pct > 0.2*mean)	Target Coverage at 1X	Target Coverage at 10X	Target Coverage at 20X	Target Coverage at 50X
96.4 X	87.6%	99.4%	94.6%	87.6%	64.3%

カバレッジの均一性

X10、X20以上でカバーされる標的領域の割合  
製品仕様 (x10以上のカバー領域>80%)  
Nextera Rapid Capture Exomeの場合

Depth of Coverage in Targeted Regions



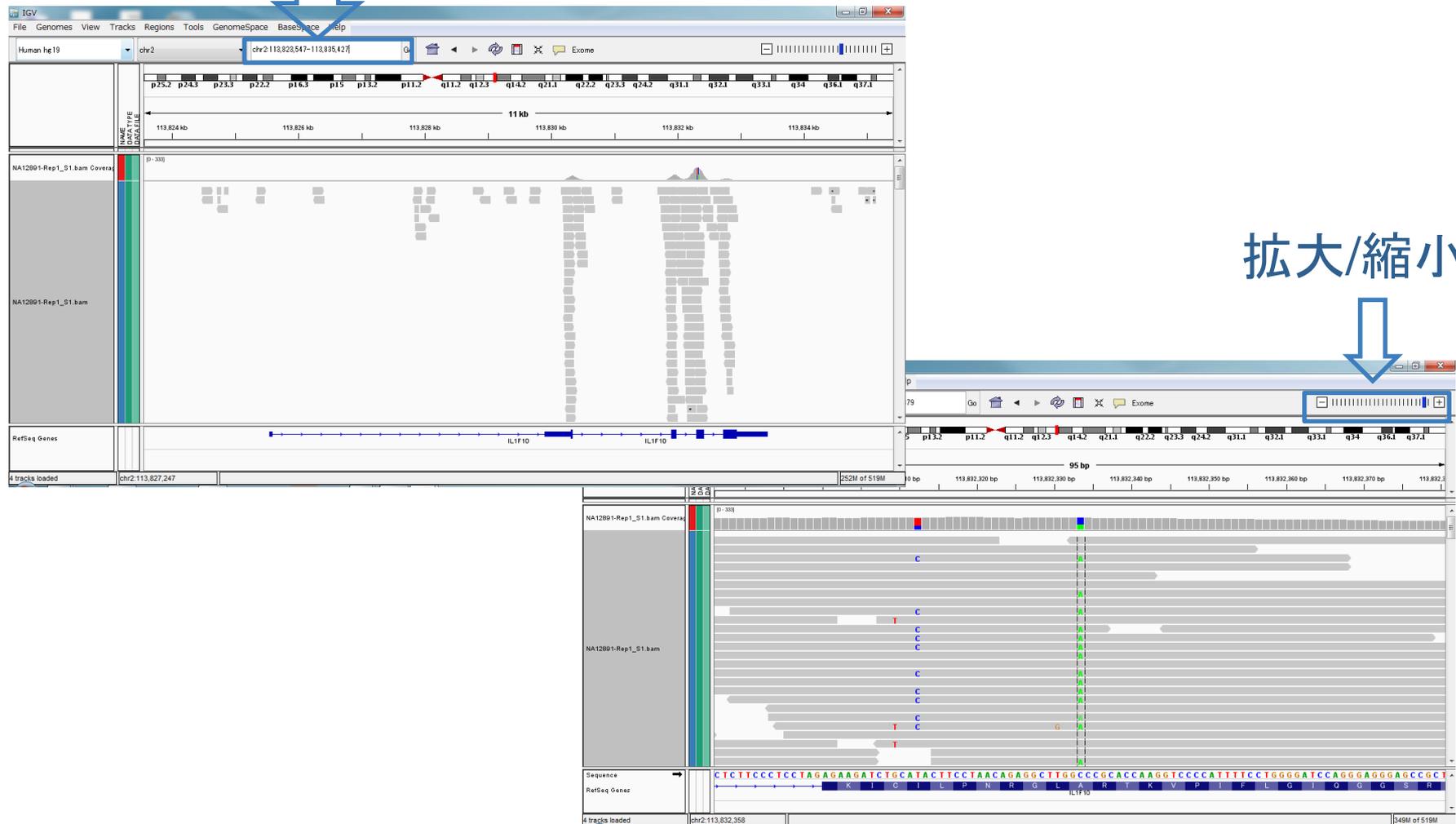
# ゲノムブラウザ The Broad's IGV

- ▶ Broad Instituteが開発した多機能ゲノムブラウザ
- ▶ ゲノムへのアライメントとバリエントを可視化

The screenshot displays the The Broad's IGV (Integrative Genomics Viewer) interface. At the top left, the logo and name "The Broad's IGV BROAD INSTITUTE" are visible, along with a "Launch" button. The main window shows a genomic track for Human hg19, specifically chromosome 15 (chr15) at position chr15:20,006,734-20,006,774. The interface includes a navigation bar with a "Go" button and a "Free" button in the top right corner. The main display area shows a genomic map with a red arrow pointing to a variant on chromosome 15. Below the map, there are several tracks: "genome.vcf", "SAMPLE", "sorted.bam Coverage", "content", "Sequence", and "RefSeq Genes". A detailed variant call is shown in a pop-up window, including the reference sequence (T), alternate sequence (G), quality score (119), and variant attributes (VARTYPE\_SNV: true). The variant is located at position 20006754 on chromosome 15. The reference sequence is T, and the alternate sequence is G. The variant is a SNP with a quality score of 119 and is not filtered out. The variant attributes include VARTYPE\_SNV: true.

# IL1F10遺伝子領域のアライメントとバリエーション

「IL1F10」と入力



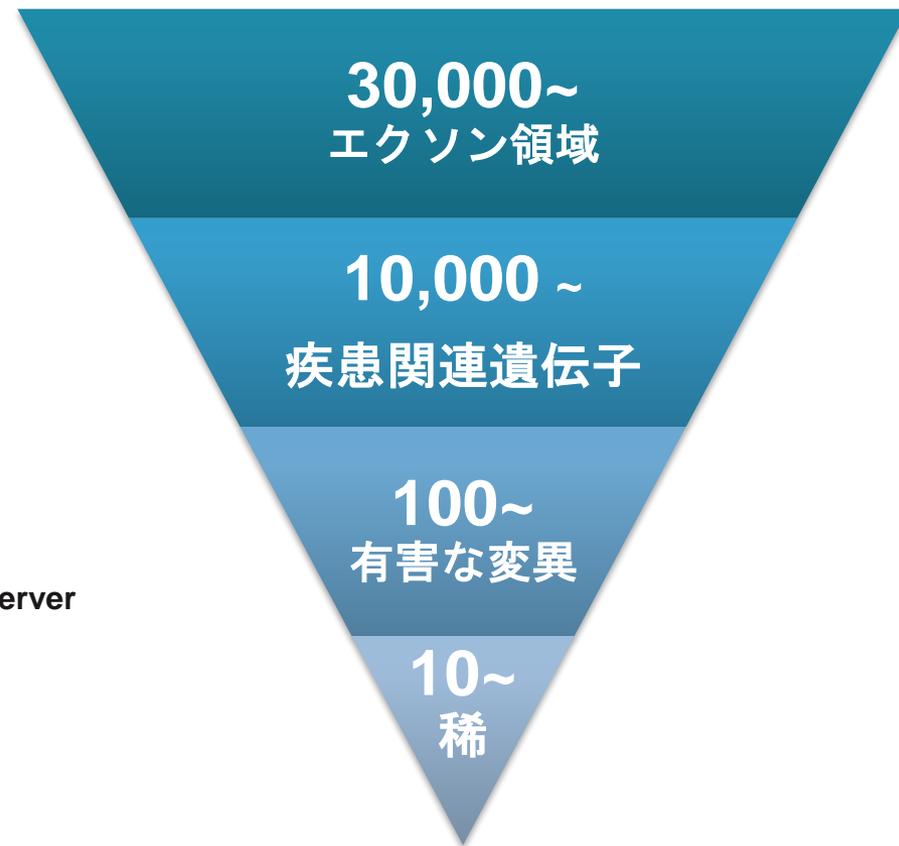
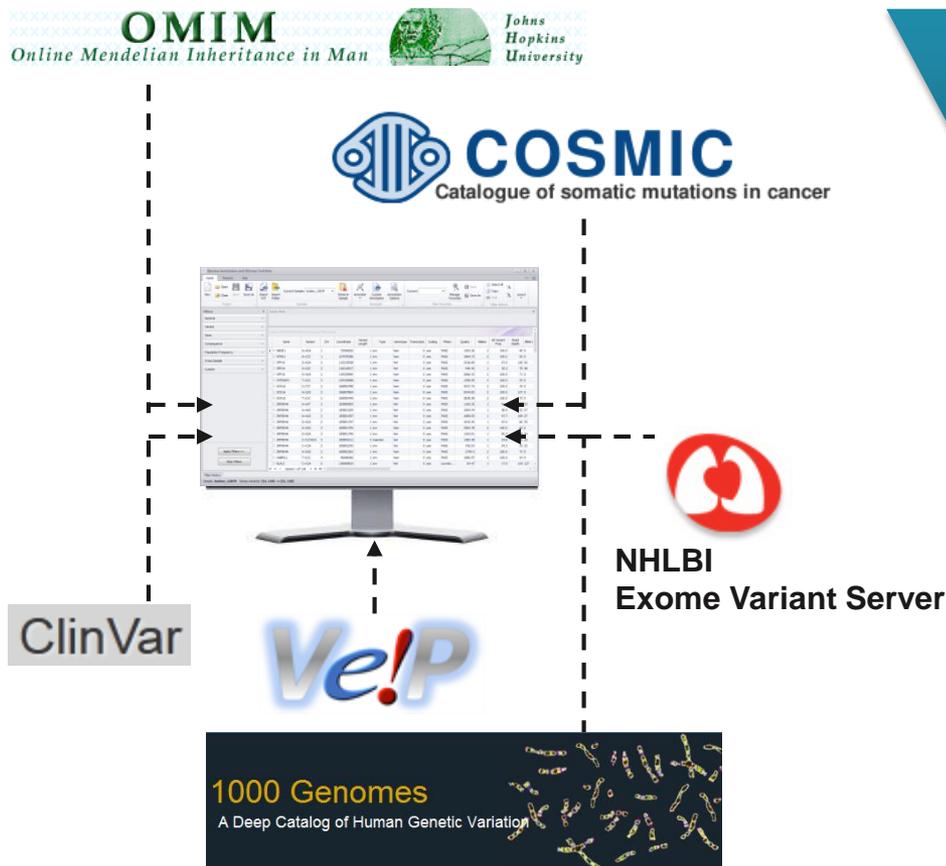
# どの変異が疾患と関連したものなのか？

## ▶ アノテーション

- 変異した塩基に関する情報付加

## ▶ フィルタリング

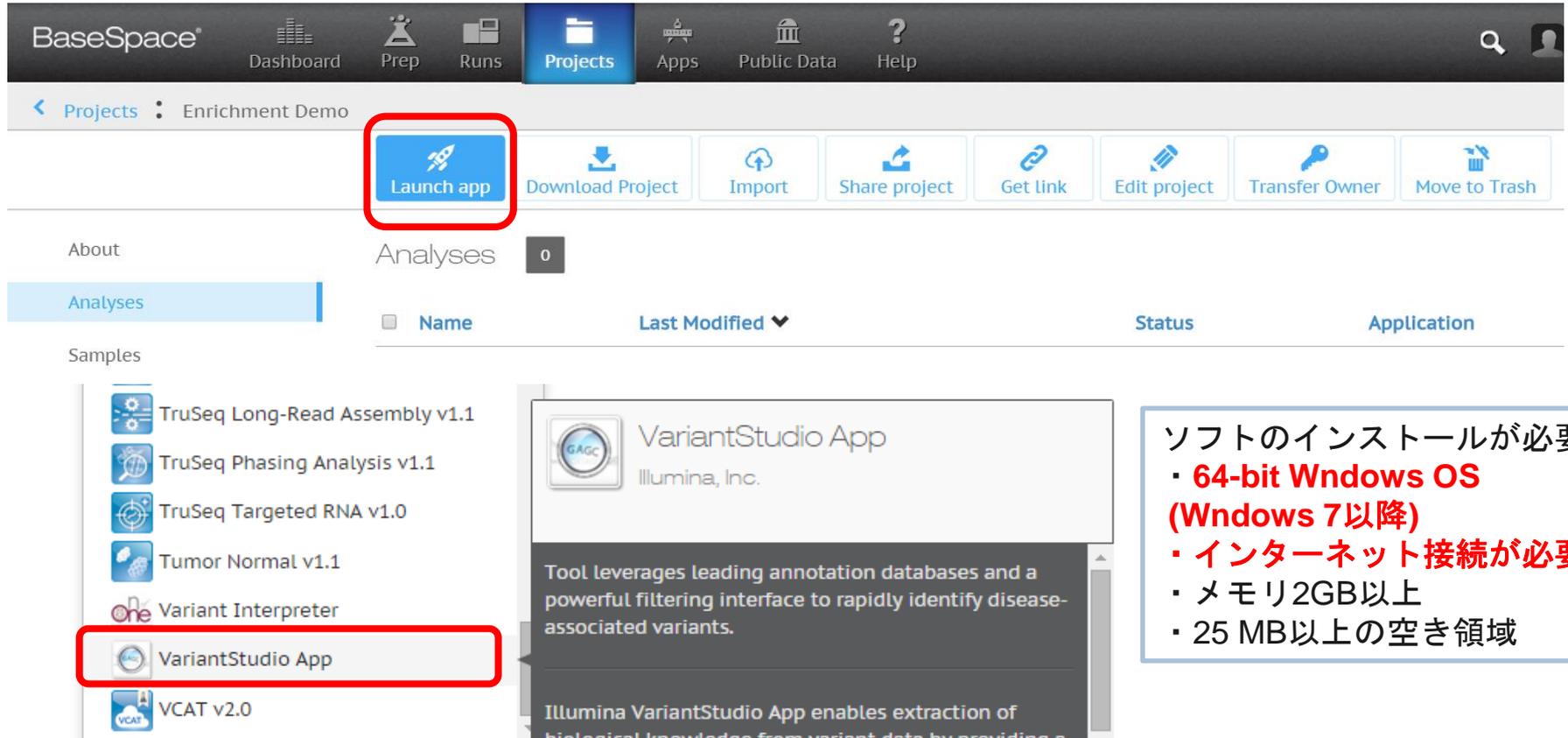
- 疾患に関連しない変異を除外



# アノテーション&フィルタリング用解析アプリの選択

## VariantStudioの実行

### ① Project WindowでLaunch Appを選択



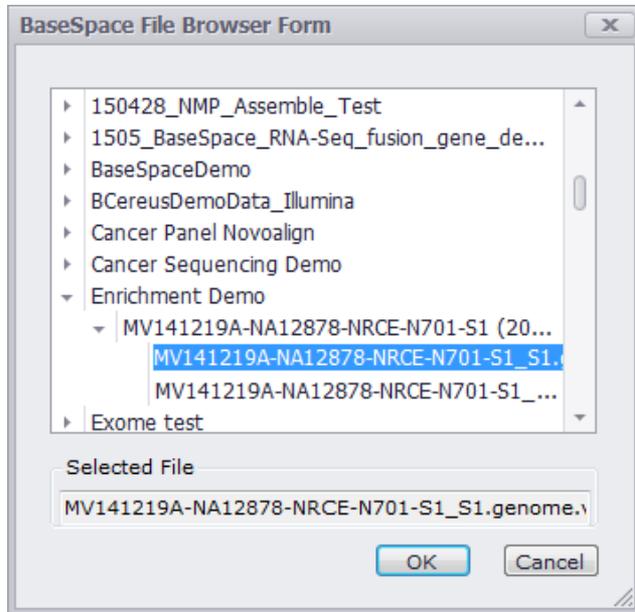
The screenshot shows the BaseSpace interface. The top navigation bar includes 'Dashboard', 'Prep', 'Runs', 'Projects', 'Apps', 'Public Data', and 'Help'. The 'Projects' tab is active, showing a breadcrumb 'Projects > Enrichment Demo'. Below the navigation bar is a toolbar with buttons for 'Launch app', 'Download Project', 'Import', 'Share project', 'Get link', 'Edit project', 'Transfer Owner', and 'Move to Trash'. The 'Launch app' button is highlighted with a red box. Below the toolbar, there is a section for 'Analyses' with a count of 0. A table with columns 'Name', 'Last Modified', 'Status', and 'Application' is visible. Under the 'Samples' section, a list of applications is shown, with 'VariantStudio App' highlighted in a red box. A tooltip for 'VariantStudio App' is displayed, showing the GAGC logo, the name 'VariantStudio App', and the developer 'Illumina, Inc.'. The tooltip text describes the tool's capabilities: 'Tool leverages leading annotation databases and a powerful filtering interface to rapidly identify disease-associated variants.' and 'Illumina VariantStudio App enables extraction of biological knowledge from variant data by providing a rich annotation database, flexible filtering, and a streamlined variant classification and reporting tool. This easy-to-use software application leverages leading annotation databases and a powerful filtering interface to rapidly identify disease-associated variants in data sets ranging from small targeted'.

ソフトのインストールが必要

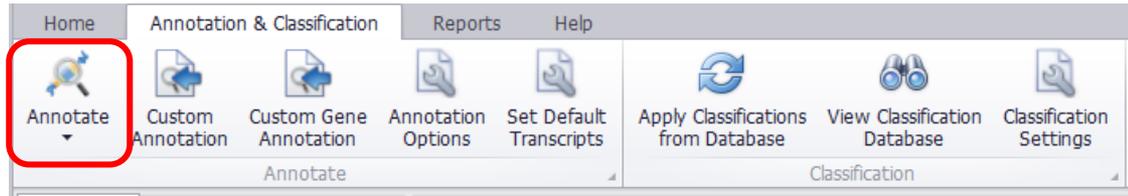
- ・ **64-bit Windows OS (Windows 7以降)**
- ・ **インターネット接続が必要**
- ・ **メモリ2GB以上**
- ・ **25 MB以上の空き領域**

### ② Variant Studioの実行

# VariantStudioが提供する変異アノテーション情報



結果閲覧したい変異解析結果(VCFファイル)を選択



Annotation & Classificationタブから”Annotate”を選択

- dbSNP
- 各人種集団でのアレル頻度
- タンパク質構造への影響度 (SIFT、Polyphen)
- COSMIC: 癌由来の体細胞変異データベース
- ClinVar: 臨床的表現型に関連のある変異データベースなど

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Genotype	Allele Freq Amr	Allele Freq Asn	Allele Freq AF	Allele Freq Eur	Allele Freq Evs	COSMIC ID	ClinVar Disease Name	Sift	PolyPhen
SDC3	C>C/T	1	31349647	het	13.00	3.00	2.00	19.00	15.36		Obesity,_associati...	tolerated(1)	unknown(0)
SAA1	C>C/T	11	18290859	het	58.00	26.00	45.00	61.00	0.00	COSM147...	Serum_amyloid_a_...	tolerated(...)	benign(0...
ITGA2B	A>C/C	17	42453065	hom	36.00	42.00	43.00	40.00	37.96	COSM436...	Bak_platelet-specifi...	tolerated(...)	benign(0)
MTHFR	G>G/A	1	11856378	het	49.00	37.00	11.00	35.00	27.06	COSM146...	MTHFR_deficiency...	tolerated(...)	probably_...
DPYD	G>A/A	1	98348885	hom	77.00	94.00	55.00	78.00	71.59		Dihydropyrimidine_d...	tolerated(...)	possibly_d...
DBT	T>C/C	1	100672060	hom	94.00	97.00	78.00	91.00	85.92		Intermediate_mapl...	tolerated(1)	benign(0)
AMPD1	G>G/A	1	115236057	het	8.00	0.00	1.00	11.00	9.46	COSM147...	Muscle_AMP_deami...		
SLC6A20	G>G/A	3	45814094	het	6.00	1.00	0.20	10.00	7.32		Iminoglycinuria,_dig...	deleteriou...	probably_...
CASR	G>G/T	3	122003757	het	14.00	2.00	0.41	14.00	11.16		Serum_calcium_level	tolerated(...)	benign(0...
BANK1	G>G/A	4	102751076	het	20.00	15.00	23.00	29.00	28.33		Systemic_lupus_ery...	tolerated(...)	benign(0...
CYP4V2	C>C/G	4	187113041	het	47.00	30.00	43.00	54.00	46.36		Bleiti_crystalline_co...	tolerated(1)	benign(0...
KLKB1	G>G/A	4	187158034	het	59.00	66.00	79.00	52.00	58.45	COSM149...	Prekallkrein_deficie...	tolerated(1)	benign(0)
IL7R	T>C/C	5	35861068	hom	57.00	40.00	75.00	70.00	70.09	COSM149...	Severe_combined_l...	tolerated(...)	benign(0)
IL7R	G>A/A	5	35871190	hom	59.00	48.00	90.00	71.00	74.58	COSM149...	Severe_combined_l...	tolerated(...)	benign(0)
HEXB	T>C/C	5	73981270	hom	98.00	100.00	100.00	95.00	96.93	COSM450...	Sandhoff_disease_...	tolerated(...)	benign(0...
FGFR4	G>G/A	5	176520243	het	34.00	45.00	12.00	29.00	24.23	COSM156...	Cancer_progression...	tolerated(...)	possibly_d...
PLG	A>A/G	6	161127501	het	0.00	0.00	0.20	1.00	0.43		PLASMINOGEN_DEF...	deleteriou...	possibly_d...
SERPINE1	G>G/A	7	100771717	het	9.00	10.00	0.41	9.00	8.53		Plasminogen_activa...	tolerated(...)	benign(0...
TAS2R38	T>T/C	7	141672604	het	64.00	65.00	52.00	45.00	46.32		Phenylthiocarbamid...	tolerated(...)	possibly_d...
PRSS1	C>C/T	7	142458412	het	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		Hereditary_pancrea...	tolerated(...)	benign(0...
PRSS1	A>A/T	7	142458451	het	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		Hereditary_pancrea...	deleteriou...	benign(0...
PRSS1	A>A/G	7	142458526	het	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		Hereditary_pancrea...	tolerated(...)	benign(0...
CYP11B2	A>A/G	8	143994266	het	7.00	0.17	1.00	8.00	7.23		Corticosterone_met...	tolerated(...)	benign(0...
STOX1	A>A/C	10	70645376	het	24.00	10.00	3.00	21.00	16.51		Preeclampsia/eclam...	tolerated(...)	benign(0)
TRCN2	A>A/T	11	68846309	het	10.00	0.17	4.00	22.00	12.86		Skin/hair/eye_nim...		

# VariantStudioでのフィルタリング

The screenshot shows the Illumina VariantStudio interface with several key elements highlighted:

- Filters Panel:** A vertical list of filter categories on the left. 'Family Based' is highlighted with a red box, and 'Classification' is highlighted with a purple box. A red text box labeled 'フィルタリング' (Filtering) is positioned below these categories.
- Family Based Filter Settings:** A panel titled 'Family Based' with the following options:
  - Use Family Based Filtering
  - Type: X-linked Recessive
  - Mother: [dropdown]  Affected
  - Father: [dropdown]  Affected
  - Child: MV141219A-NA1  Affected
- Genetic Diagrams:** Two diagrams illustrating inheritance patterns. The left diagram, labeled '家族内集積がある 遺伝性疾患' (Familial aggregation in genetic disease), shows a pedigree with affected individuals in multiple generations. The right diagram, labeled '家族内集積なし 孤発性疾患' (No familial aggregation, sporadic disease), shows a pedigree with only one affected individual in the first generation. Chromosomes are shown below each individual to indicate carrier status (e.g., 0/1, 1/1, 0/0).
- Classification Filter Settings:** A panel titled 'Classification' with the following options:
  - Filter by classification
  - Benign
  - Presumed Benign
  - Presumed Pathogenic
  - Pathogenic
  - Unknown Significance
- Population Frequency Filter Settings:** A panel titled 'Population Frequency' with the following options:
  - Global Frequency < 5
  - American Pop 5
  - Asian Pop Frequency < 5
  - African Pop Frequency 5
  - European Pop 5
  - EVS Frequency < 5
  - Set all to: 5 [Set All]

The background shows a variant table with columns for variant ID, reference/alternate alleles, position, and frequency.

# エクソーム解析ワークフローのまとめ



## BWA Enrichment

アライメント  
(BWA)

変異コール  
(GATK)

VCF  
アノテーション

レポートの  
出力



## VariantStudio

VCFの入力

アノテーション

フィルタリング



# メタゲノム解析



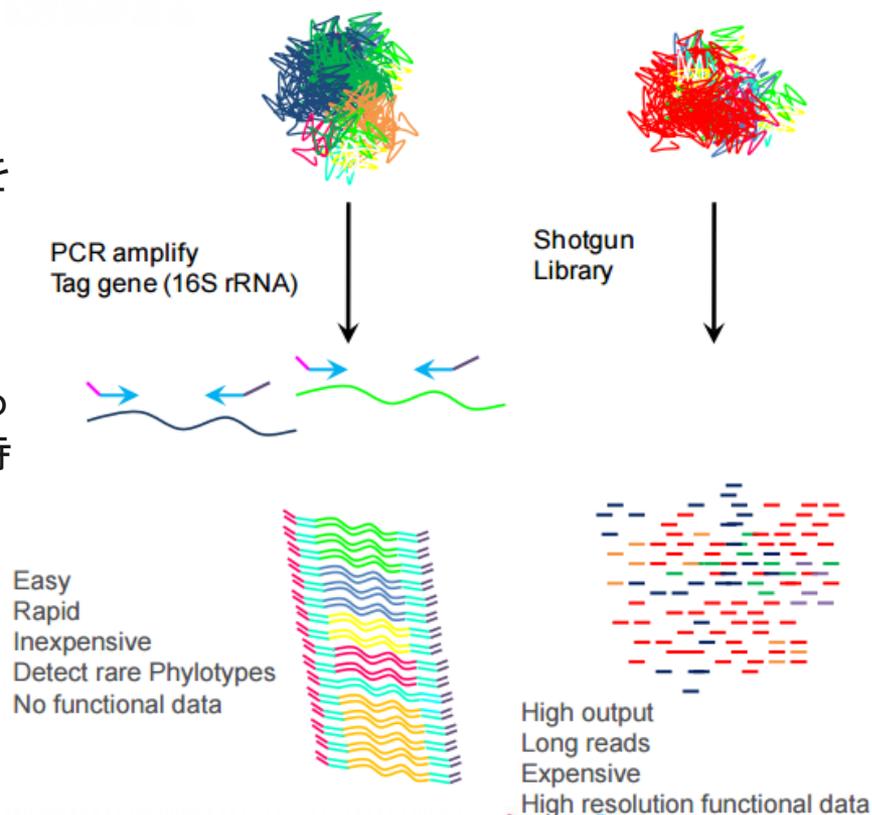
# メタゲノム解析=微生物を集団で解析する

## 16s rRNA解析

- 微生物ゲノムの16s rRNA遺伝子のみをシーケンスする
- 16s遺伝子はウイルスを除くすべての微生物に存在する
- 16s rRNAの配列は多様性を持つため、その配列の解析からサンプルに含まれる微生物を同定可能

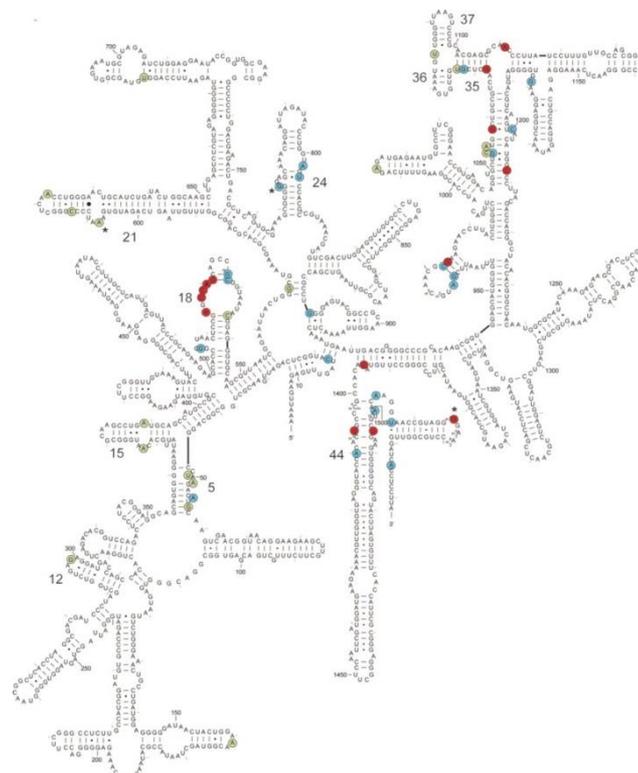
## ショットガン解析

- 微生物の全ゲノム・転写物をシーケンスする
- 遺伝子の機能予測やウイルスの解析まで期待できる



# 16S rRNA 遺伝子配列とは？

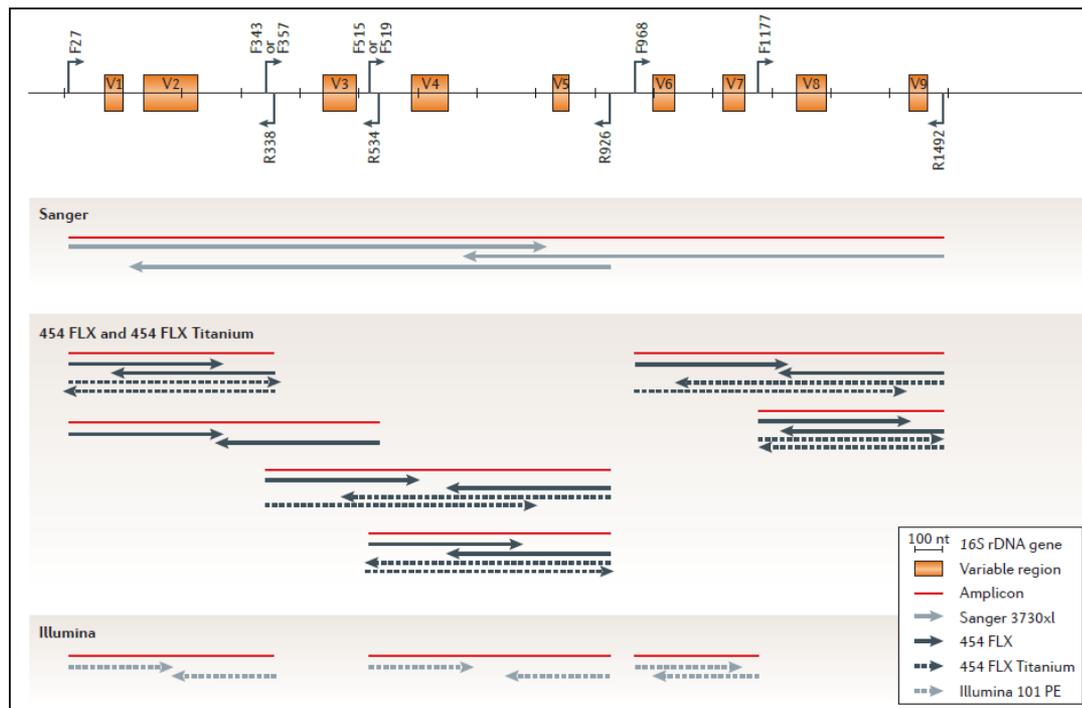
- ▶ 16S rRNAは1,542塩基長の原核生物のリボソームRNAの一部である。（真核生物の場合は18Sとなる）
- ▶ 16S rRNA遺伝子は保存領域と可変領域を有しており、保存領域をターゲットとしてプライマーをデザインすることで、可変領域の増幅およびシーケンスが可能。



16S rRNA遺伝子の模式図。基準細菌16S rRNAの可変領域（青色）および保存領域（紫色）の位置。  
灰色部分は、すべての細菌において不変な領域。

# 16S rRNA領域の増幅用プライマーの注意点

- ▶ V1とV2領域を挟むF27-R338プライマーセットは、細菌への特異性が高い一方で腸内細菌叢の主要コミュニティである **Bifidobacterium** 属（ビフィズス菌など）の検出感が低い
- ▶ V4領域を囲む F515-R806プライマーセットは細菌や古細菌など多様性高いコミュニティを感度良く検出することができる一方、**皮膚常在菌のPropionibacterium** 属（アクネ菌など）の増幅が困難

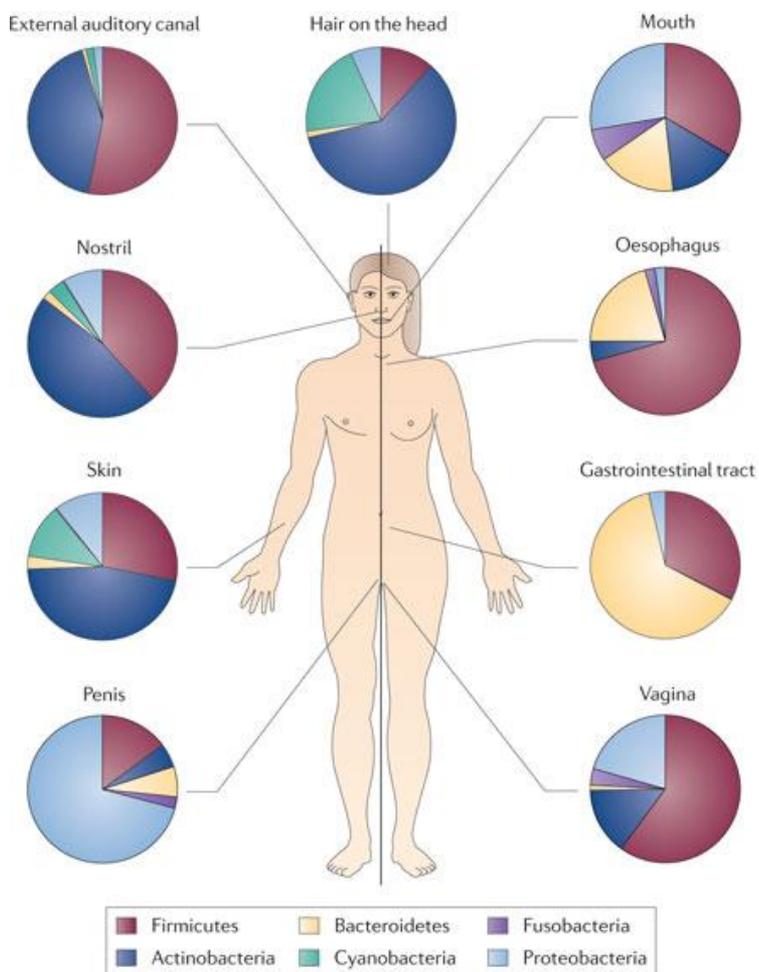


“Experimental and analytical tools for studying the human microbiome” Kuczynski et al., Nat Rev Genet. 2011 Dec 16;13(1):47-58

# 参考になる大規模な国際プロジェクト

プロジェクト	期間	内容
Earth Microbiome Project (EMP)	2010-	地球上の様々な環境サンプルを収集し約200,000サンプルを解析し、細菌叢ゲノムリファレンスを構築。
MetaHIT	2008-2012	健常者、肥満者、IBD患者の糞便を解析。
NIH Human Microbiome Project (HMP)	2008-2013	健康な242名の様々な組織からサンプリングし、細菌叢ゲノムリファレンスを構築。
NIH The Integrative Human Microbiome Project (iHMP)	2013-	早産、炎症性腸疾患、2型糖尿病を対象とした疾患コホートを立ち上げ

# 菌叢解析の研究例



Nature Reviews | Microbiology

Aymé Spor, Omry Koren & Ruth Ley, Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology* 9, 279-290 (April 2011)

## 肥満

- 菌叢の多様性が低い傾向
- Chatelier E. et al, **Nature** (2013)

## 糖尿病

- マーカー遺伝子の同定
- Junjie Qin et al, **Nature** (2012)

## 大腸癌

- マーカー菌種の同定
- Zeller G et al, **Mol Syst Biol.** (2014)
- Zackular J et al. **Can Prev Res.** (2014)

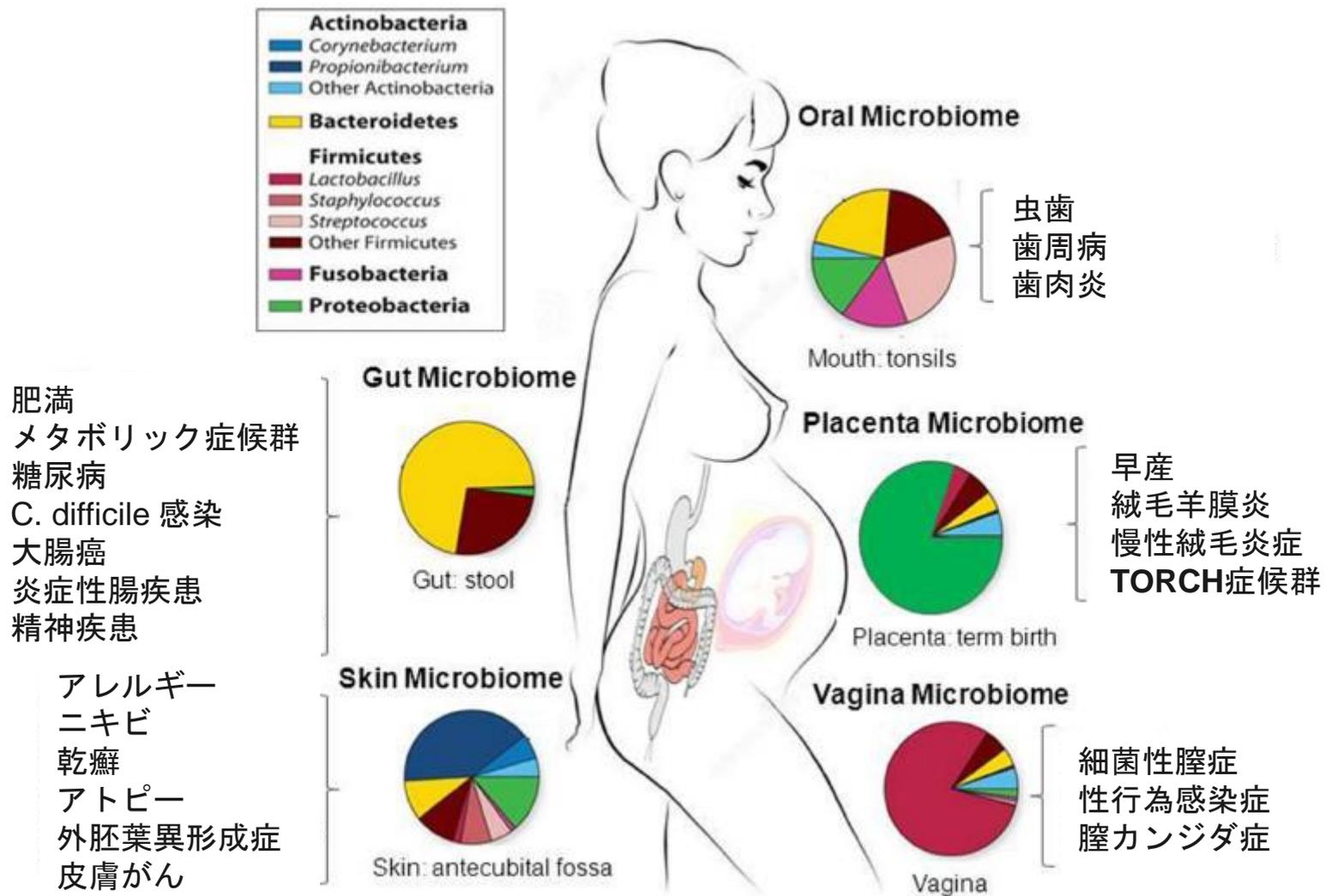
## 肝癌

- 肝癌誘発菌種の同定
- Yoshimoto et al. **Nature** (2013)

## 食生活

- 人工甘味料による耐糖能異常
- Suez J. et al., **Nature.** (2014)

# 細菌共生バランス失調と疾患



Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches.  
 Belizário JE and Napolitano M, Front Microbiol. 2015 Oct 6;6:1050.

# 16S rRNA解析 ワークフロー

## プライマー 合成

V3-4領域の配列を利用して、  
460 bpのアンプリコンを生成するオリゴプライマーペアを発注

## ライブラリー 調製

V3-4領域を少ないサイクル数で増幅し、  
Nextera XTキットでライブラリー調製

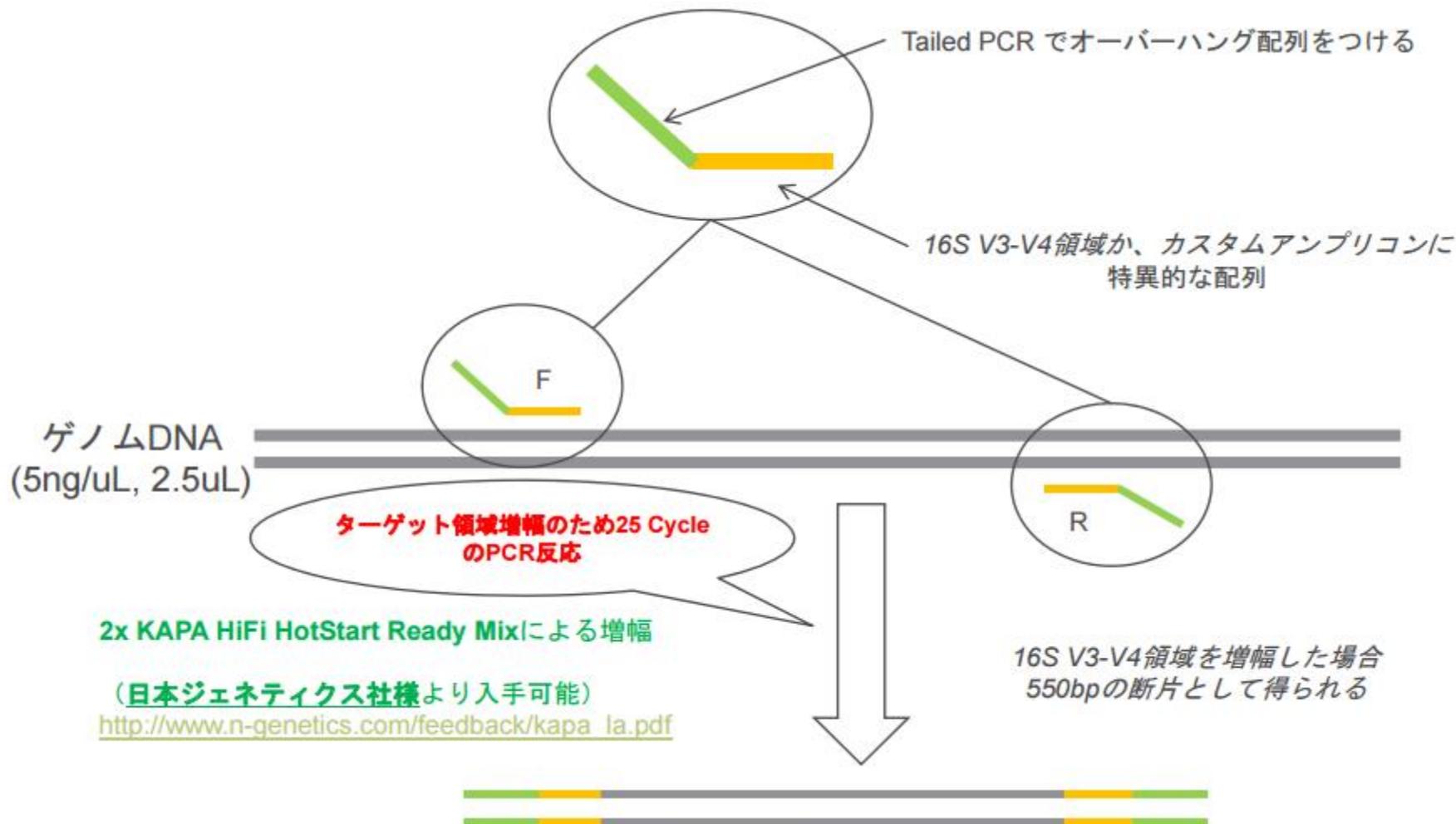
## シーケンス MiSeq

96インデックスを利用した場合、1サンプルあたり100,000リードで、  
V3-4領域を十分なカバレッジにより精確にシーケンス

## データ解析 MSR/ BaseSpace

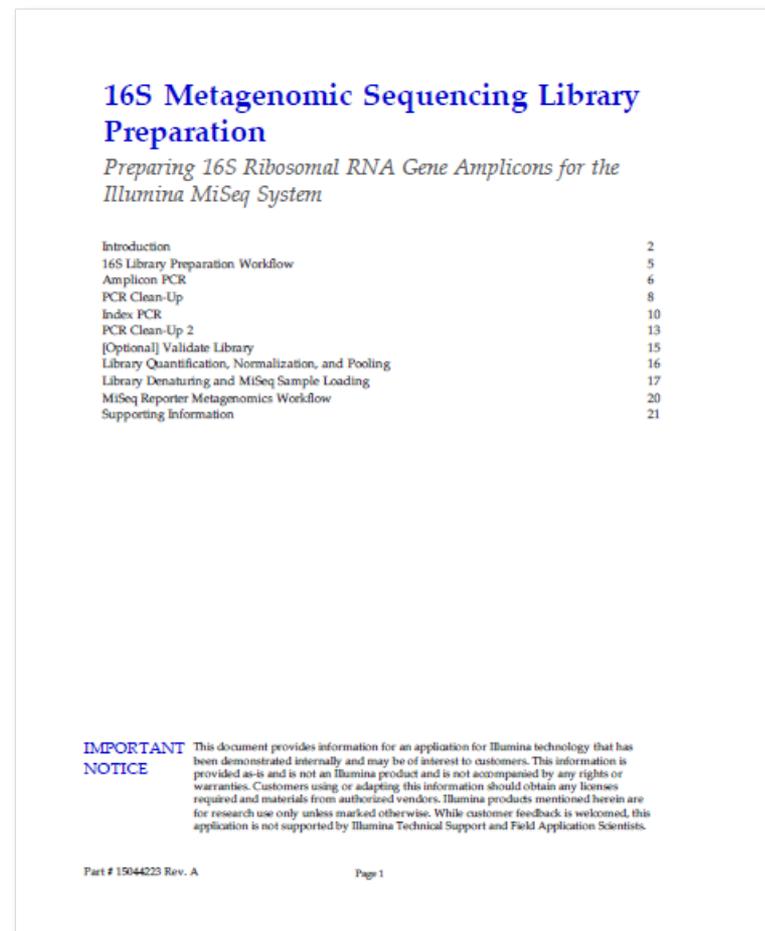
Greengenesデータベースを利用した分類を行い、  
属あるいは種のレベルでグラフィカルに表示

# 16s領域をPCRで増幅



# 16S rRNA解析のための検証済プロトコール

- ▶ MiSeqを利用したプロトコール
  - V3-V4領域を含む460 bの領域をPCR増幅
  - シーケンス条件：2x250–2x300
  - 解析：MSRまたはBaseSpace
- ▶ 応用可能なプロトコール
  - ユーザー独自のPCRプライマーが設計可能なアダプター配列情報
  - ユーザー独自のPCRプライマーを用いる際のT<sub>m</sub>値設定ガイド



プロトコール(pdf): [http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)

# Earth Microbiome Project 標準プロトコル

サンプル調製方法の詳細が記載



<http://www.earthmicrobiome.org/emp-standard-protocols/>



## EMP Standard Protocols

### Sampling Protocol

Currently there is no standard protocol for sampling, as this is very specific for different medium of environmental sample. Also, it is extremely difficult to be prescriptive for this.

### DNA Extraction Protocol

Modified from MoBio 96-Well Manual Extraction Method

Items not provided in the extraction kit:

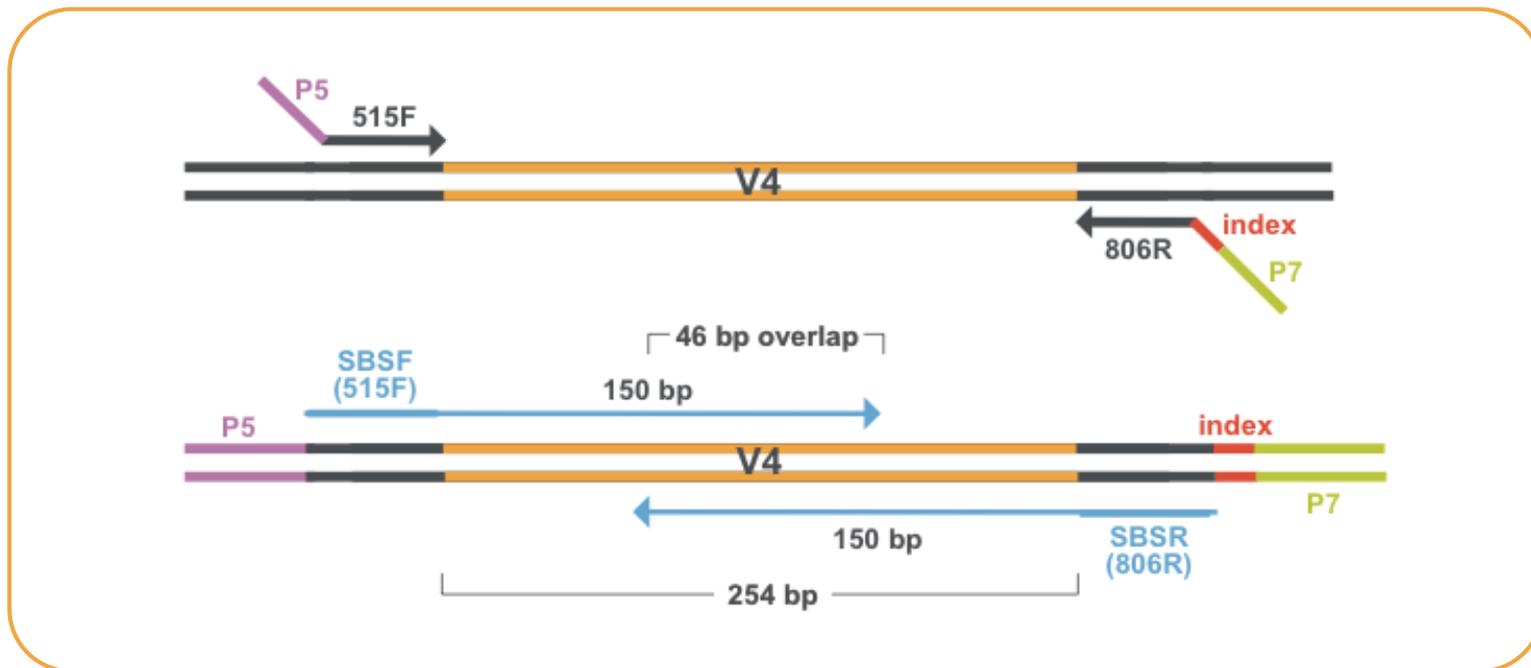
### Meetings

**\*\*REGISTRATION  
CLOSED\*\*** November 21st-  
22nd 2011  
**NEON and the EMP**  
NEON, Center Green,  
Boulder, CO, USA

Saturday, February 18, 2012  
**The Earth Microbiome  
Project: Modeling the  
Microbial Planet**  
Time: 8:30 AM to 11:30 AM

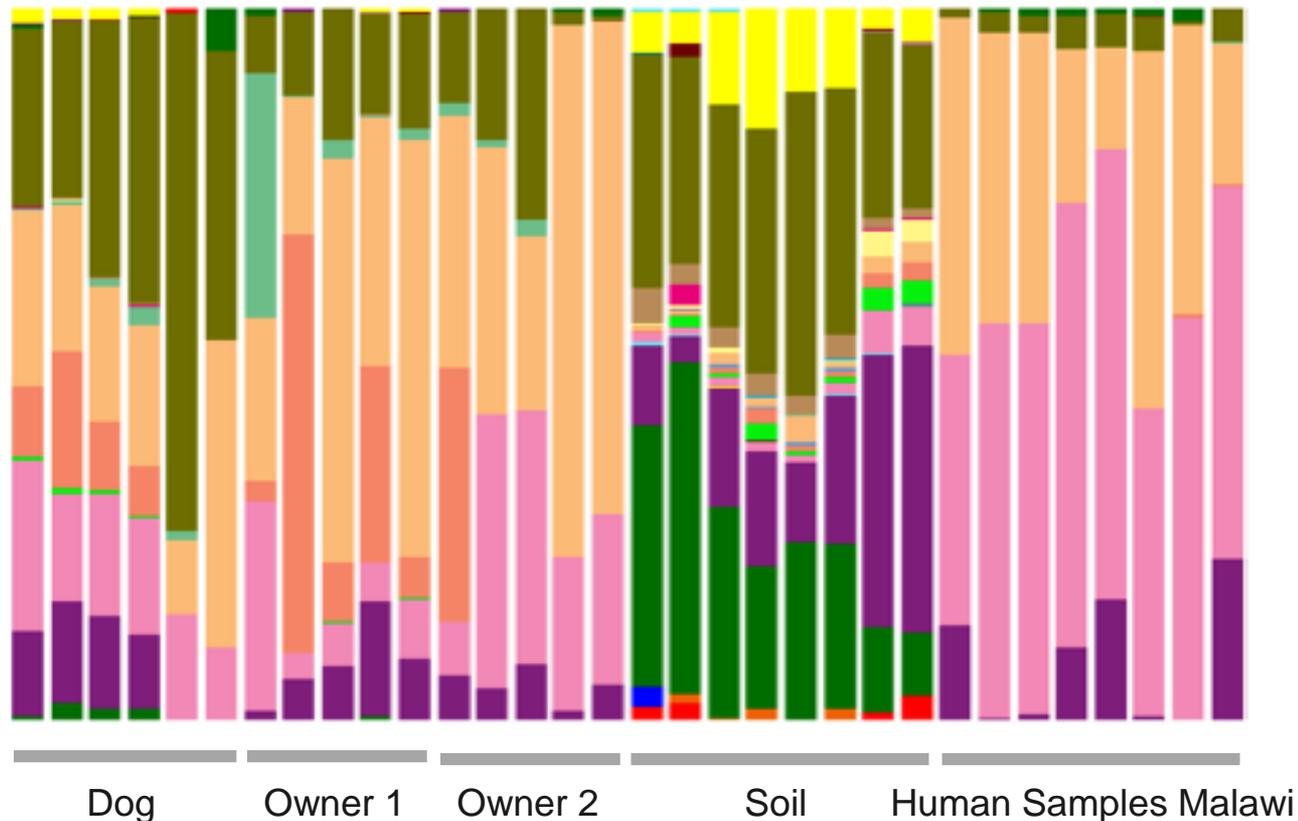
# 16S菌叢解析用ライブラリー作製：Tailed PCR

- 16S 菌叢解析用のサンプル調製キットは存在しない
- お客様ご自身でオリゴの合成 ~ PCRを実施いただく必要がある



# 32サンプルを1度に同時解析

- ▶ 16S rRNA遺伝子のV4領域（254bp）を対象に、32サンプルを1ランで、150塩基ペアエンドで解析
- ▶ Qiime (J G caporaso, J Kuczynski, J stombaugh, et al., 2010) を用いて門(Phylum)のレベルで分類



We thank Jeeff Gordon for the Malawi human fecal samples and Rob Knight for donation of the family study human/canine host-associated samples from different body sites and soil samples.

# イルミナウェビナーシリーズ： 16S rRNA遺伝子から始める腸内細菌菌叢解析

<http://www.illumina.co.jp/>

illumina® お問い合わせ MyIllumina Tools

アプリケーション システム 臨床研究 受託サービス サイエンス サポート カンパニー Search

Subscribe | 色 心

## 次世代シーケンサー論文集 感染症も追加配布を決定！

病原体、ウィルスの同定に、次世代シーケンサー  
を利用した文献をクローズアップ

お申し込みはこちら

イルミナニュース イルミナのテクノロジーが腫瘍学遺伝子-環境共同研究 (COGS) による貴重な発見を可能に >>

- COGS 成果を発表**  
革新的な研究が  
癌遺伝子の理解をさらに前進
- 最新論文**  
ひよこ豆のドラフト配列が  
形質改善の手助けに
- BaseSpace**  
1TBまでストレージ無料  
クラウド解析ソリューション
- ウェビナー**  
研究者による  
最先端の解析をオンラインで配信

## 16S rRNA遺伝子から始める腸内細菌菌叢解析

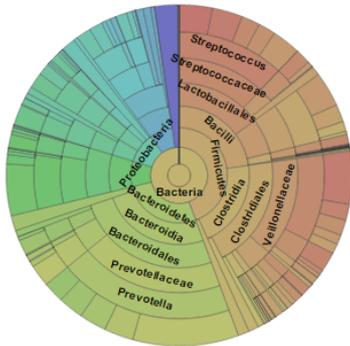
森永乳業株式会社  
食品基盤研究所  
小田巻俊孝

# 16S rRNA解析・メタゲノム解析BaseSpaceアプリ



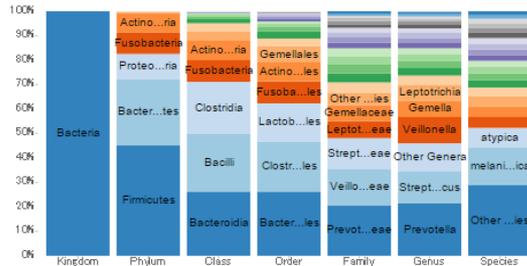
## 16S Metagenomics 16S rRNA菌叢解析

16S Metagenomics v1.0.1  
ILLUMINA, INC.



Top 20 Classification Results by Taxonomic Level

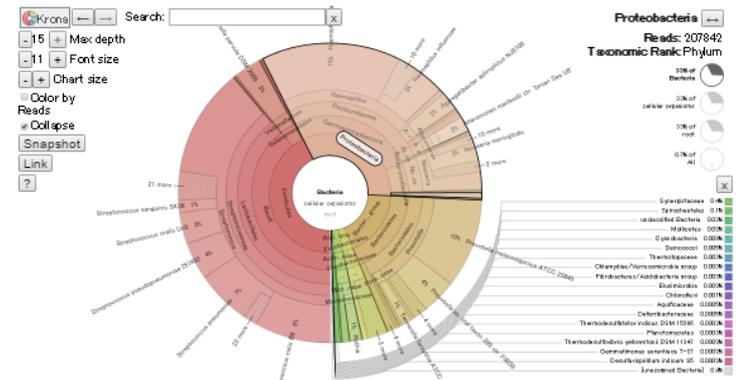
This column chart shows the relative abundance of the top 20 classification results within each taxonomic level. Mouse over any category to see its description and abundance.



## Kraken Metagenomics メタゲノム系統解析

Kraken Metagenomics  
BASESPACE LABS

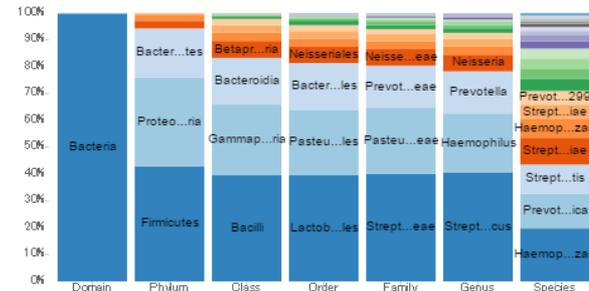
Krona Classification Chart



[Open in new window](#)

Top 20 Classification Results by Taxonomic Level

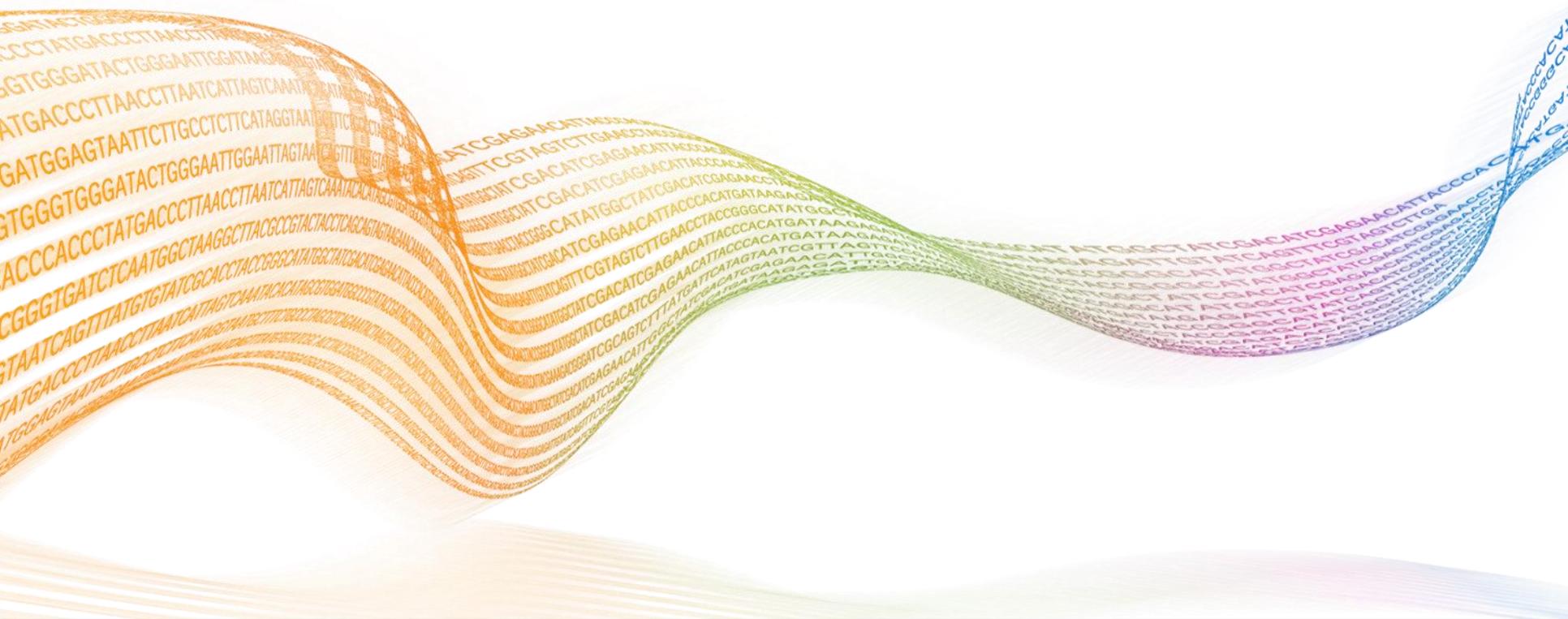
This column chart shows the relative abundance of the top 20 classification results within each taxonomic level. Mouse over any category to see its description and abundance.



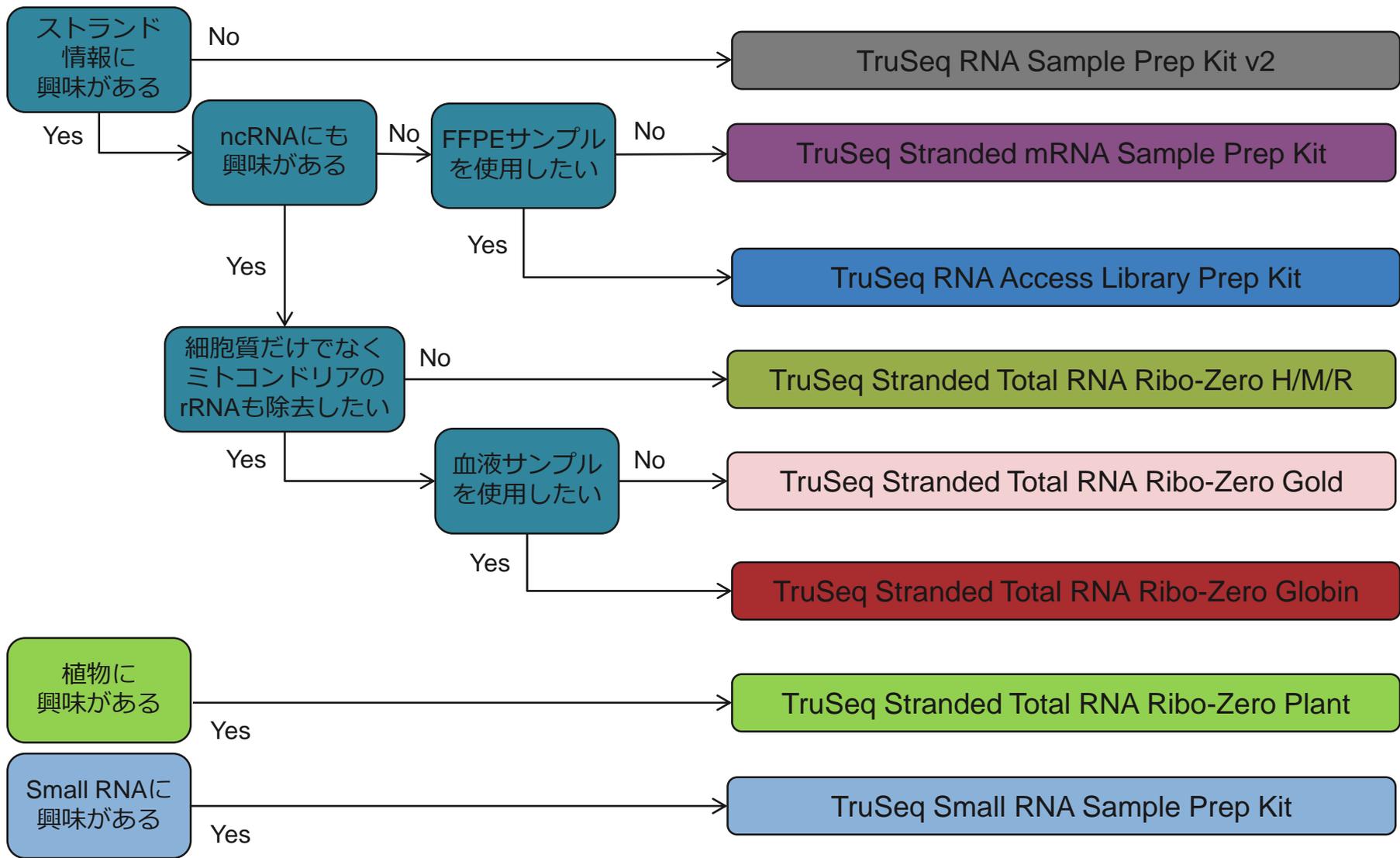
# DNAライブラリー調製を詳しく学ぶには

- ▶ データシート : TruSeq PCRフリーDNAサンプル調製キット
  - Pub. No. 770-2013-J001 20MAR2013
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_truseq\\_dna\\_pcr-free\\_sample\\_prep-j.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_truseq_dna_pcr-free_sample_prep-j.pdf)
- ▶ データシート : Nextera DNAサンプル調製キット
  - Pub. No. 770-2011-J021 07DEC11
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_nextera\\_dna\\_sample\\_prep-j.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_nextera_dna_sample_prep-j.pdf)
- ▶ データシート : TruSeq Custom Amplicon Low Inputライブラリー調製キット
  - Pub. No. 770-2015-J012 11DEC2015)
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_tru\\_seq\\_custom\\_amplicon\\_low\\_input.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_tru_seq_custom_amplicon_low_input.pdf)
- ▶ データシート : Nextera メイトペアサンプル調製キット
  - Pub. No. 770-2012-J052 05MAR2013
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_nextera\\_mate\\_pair\\_sample\\_prep-j.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_nextera_mate_pair_sample_prep-j.pdf)

# RNAシーケンス



# RNA-Seq : キットの選択



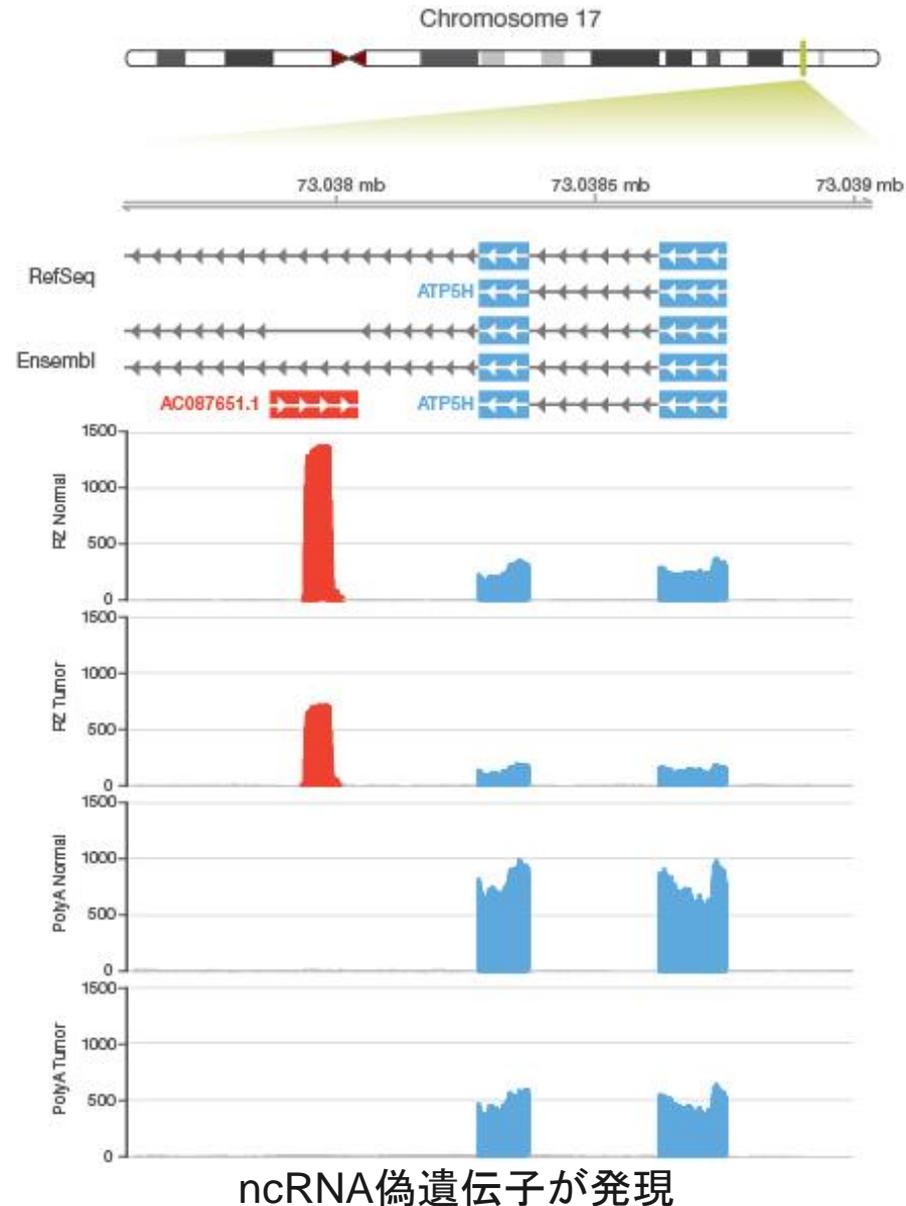
# ストランド情報

## ▶ ストランド情報 :

- 2本のDNA鎖のどちらの鎖からRNAが生成されたのかを示す

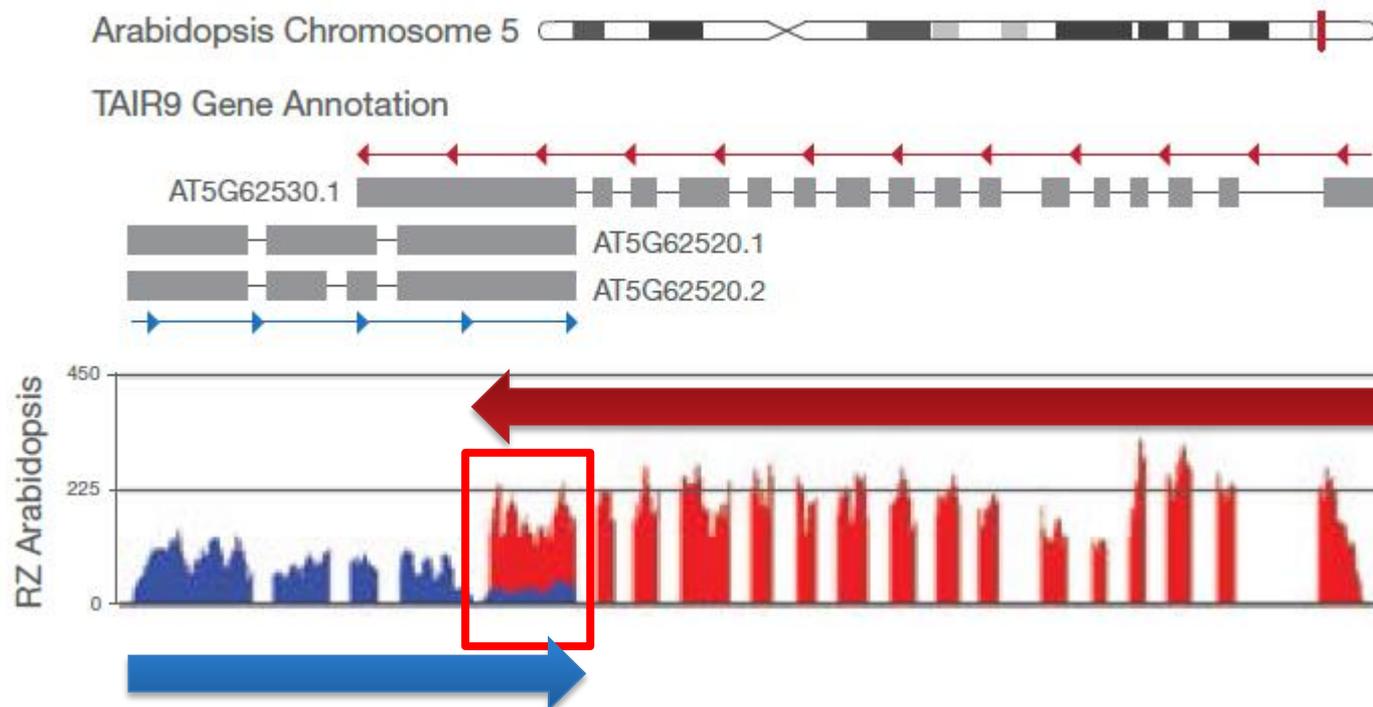
## ▶ ストランド情報の重要性

- 鋳型となる鎖がわかれば、ゲノムに特異的にマッピングすることができるため、結果として効率よく配列を読むことができ、サンプルとコストを抑えることができる
- 遺伝子調節の重要な役割を示すアンチセンスRNAの発現を検出することが可能
  - ATPH遺伝子発現（青色）の解析
  - Total RNAキットで解析した場合、ncRNAの偽遺伝子の発現（赤色）を解析できる
  - ストランド情報も参照すると、反対の向きでこのncRNA偽遺伝子が発現していることがわかる

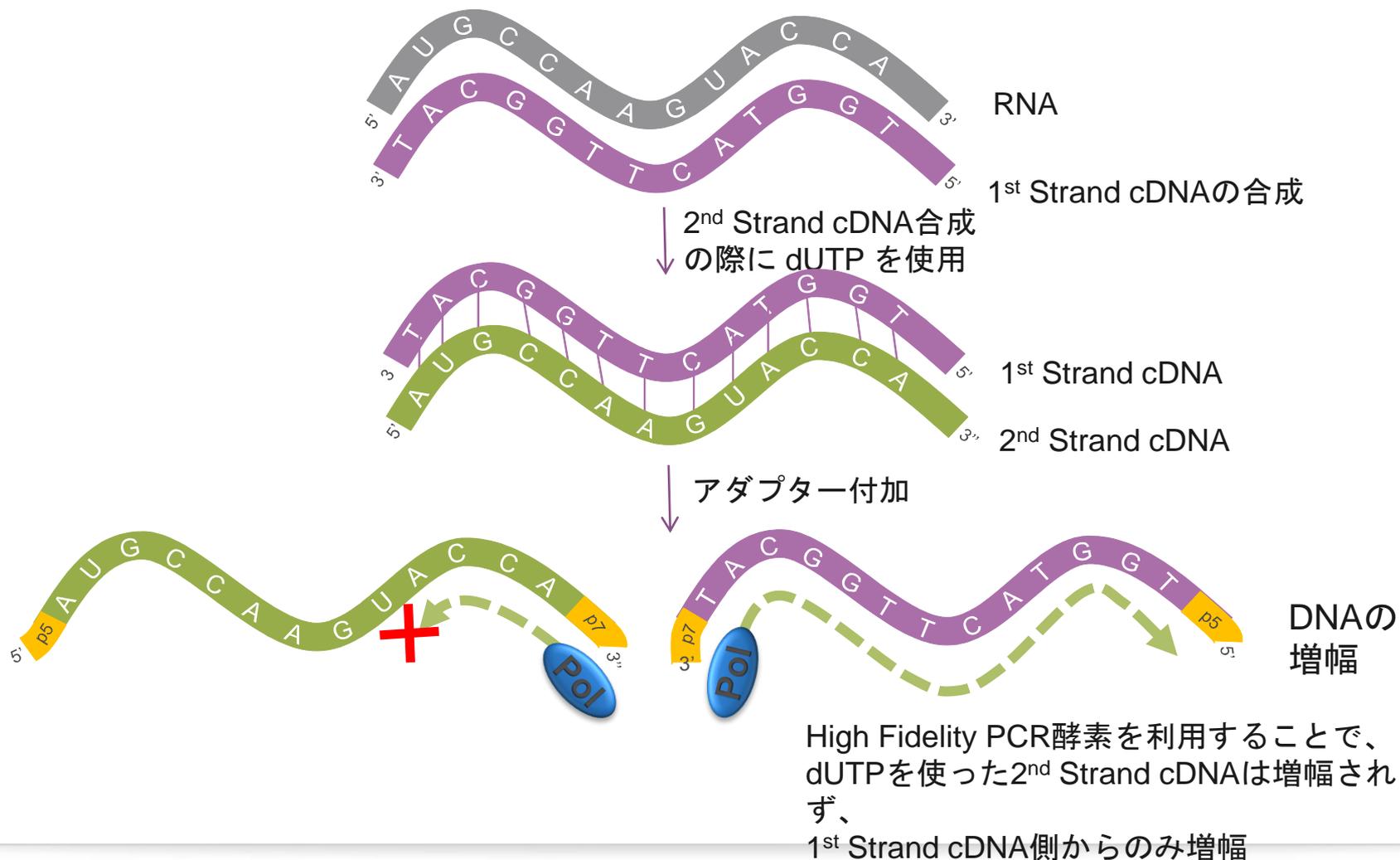


# ストランド情報

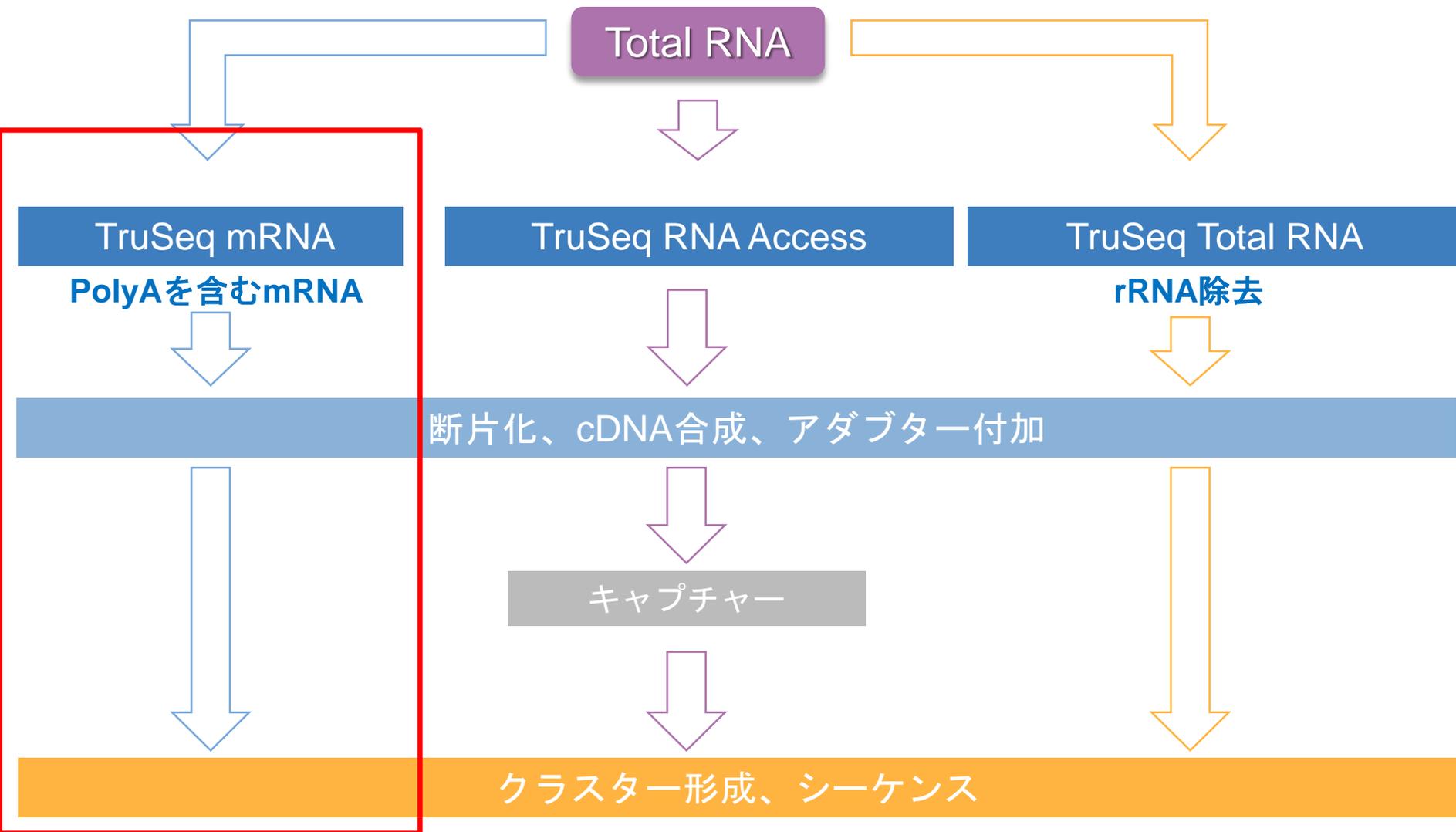
- ▶ センスとアンチセンスに分けることで、転写産物の定量が精密に観察できる
- ▶ オーバーラップした遺伝子上でも、明確な定量が可能



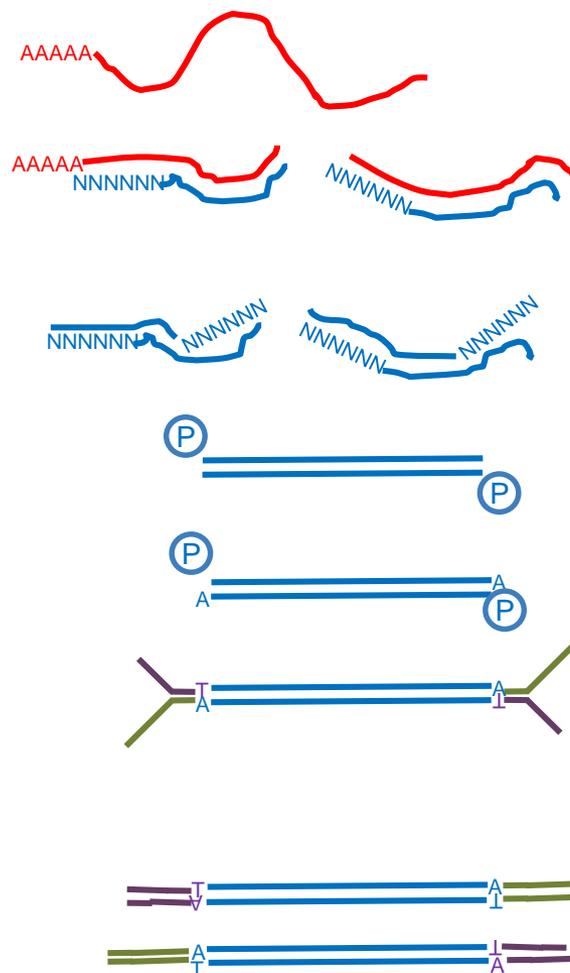
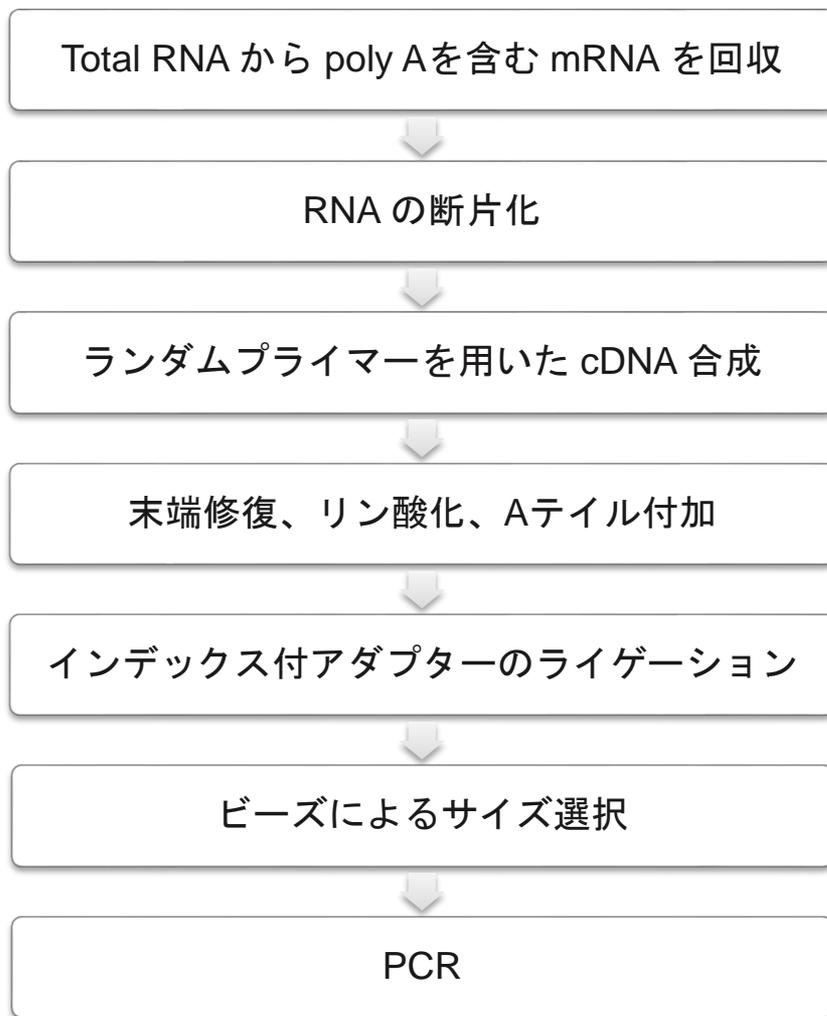
# ストランド情報を維持したライブラリー作製原理



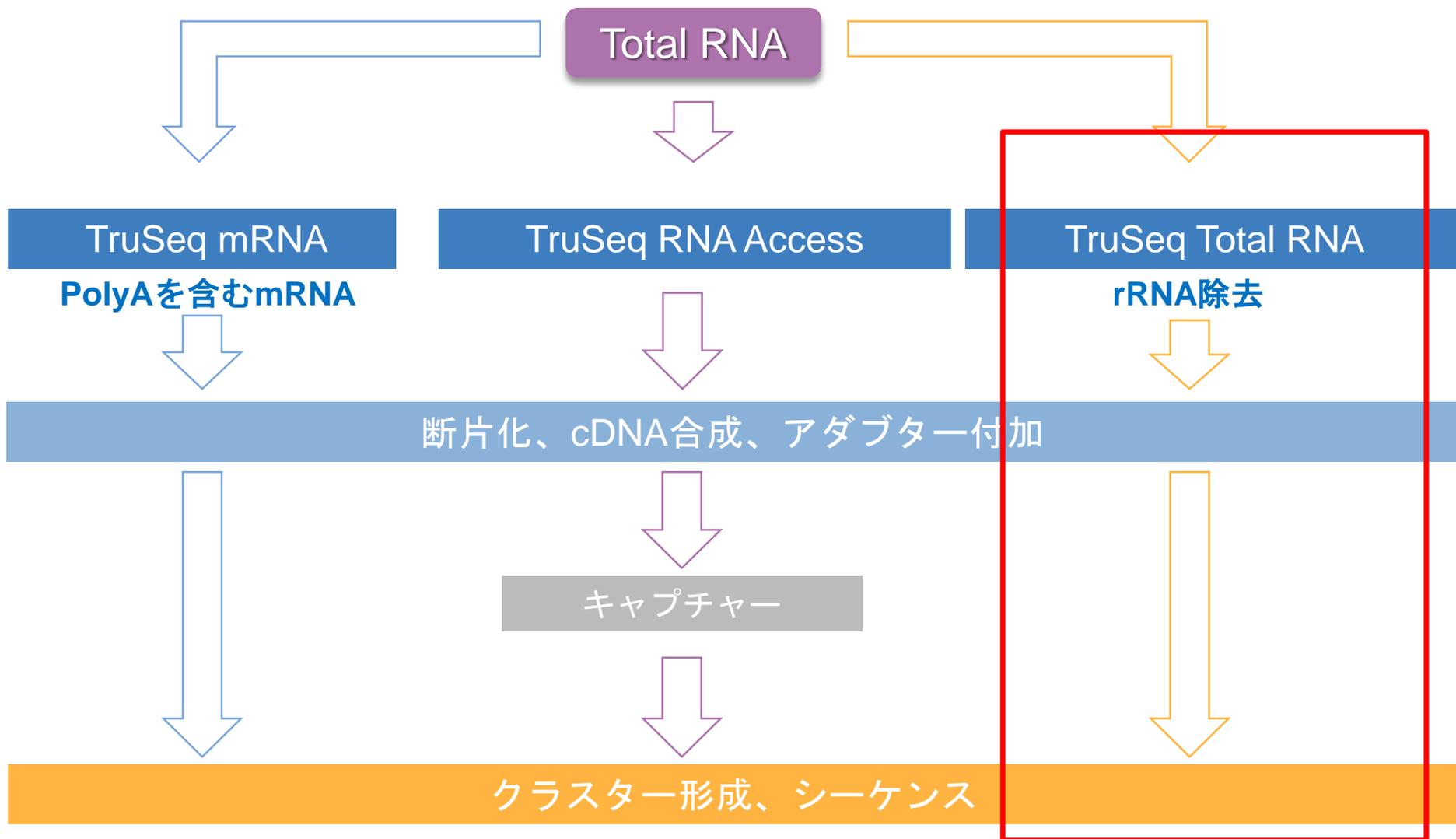
# RNAライブラリー調製の主な方法



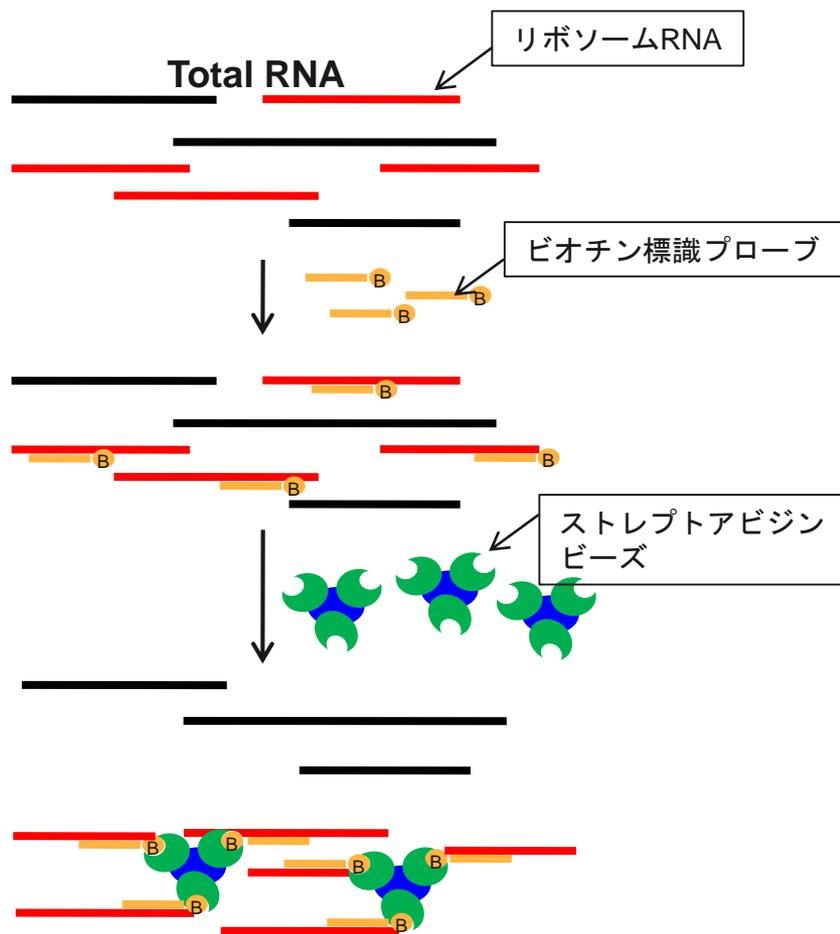
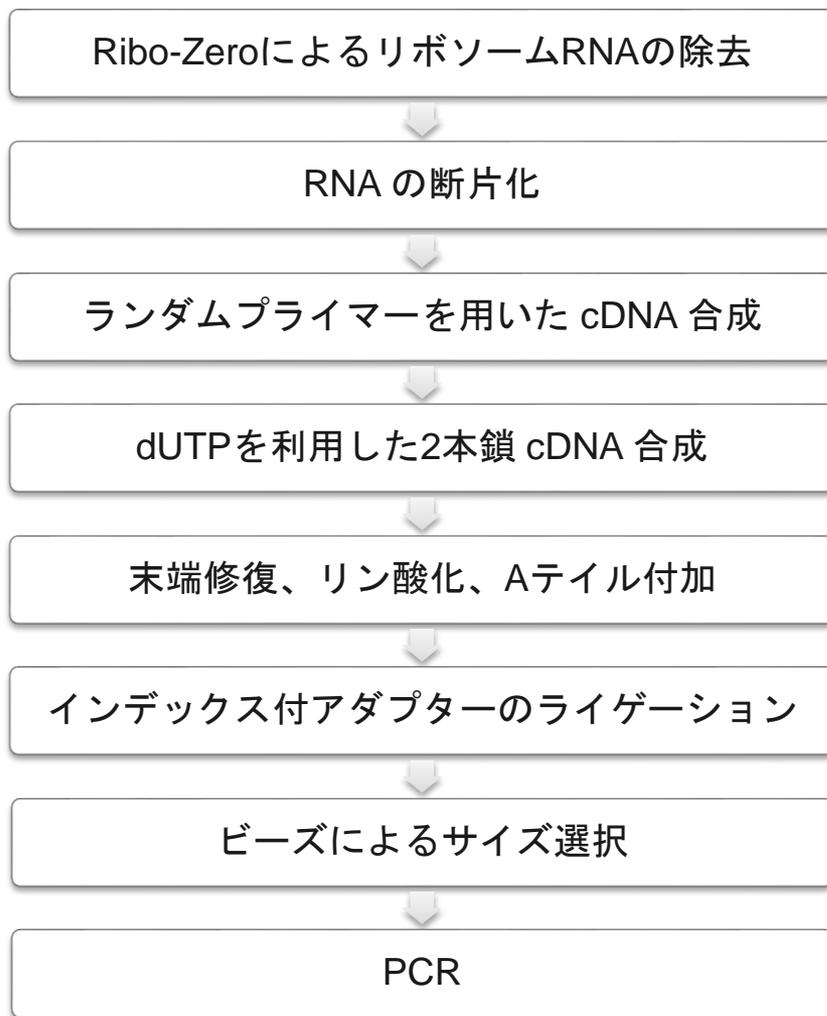
# TruSeq RNAライブラリー調製の手順



# RNAライブラリー調製の主な方法



# TruSeq Total RNAライブラリー調製の手順



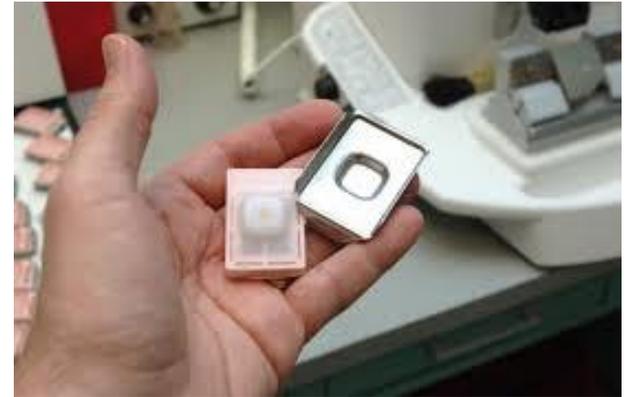
# TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero

- ▶ 複数の Ribo-Zero に対応

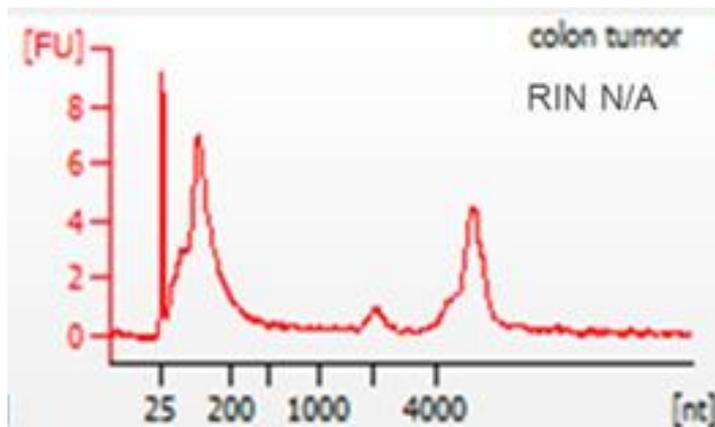
Ribo-Zero キット	内容
Human/Mouse/Rat	ヒト、マウス、ラットの rRNA 除去 (細胞質)
Gold	ヒト、マウス、ラットの rRNA 除去 (細胞質 + ミトコンドリア)
Plant	植物の rRNA 除去 (細胞質 + 葉緑体)
Globin	グロビン mRNA 除去

# FFPEサンプル; トラスクリプトーム解析における大きな課題

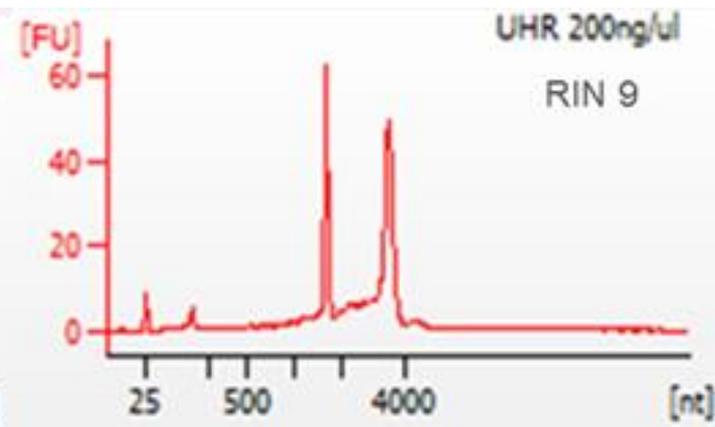
- ▶ パラフィンブロックの中には莫大な量の価値あるデータが埋もれている
- ▶ FFPE由来のRNAは、ホルマリン固定の過程で断片化されたり化学的に修飾されたりするため、解析が最も困難なものサンプルのひとつ



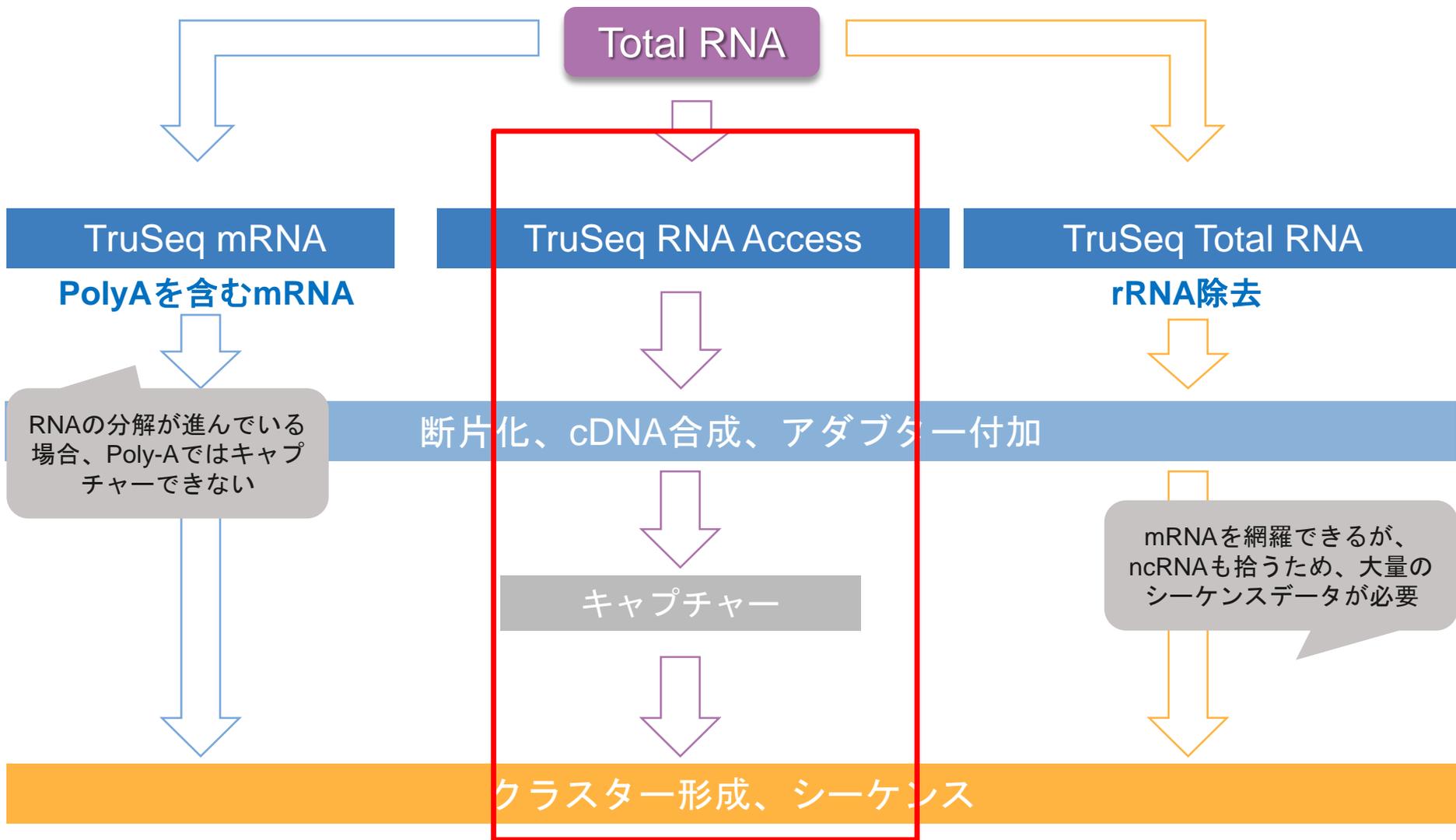
FFPE



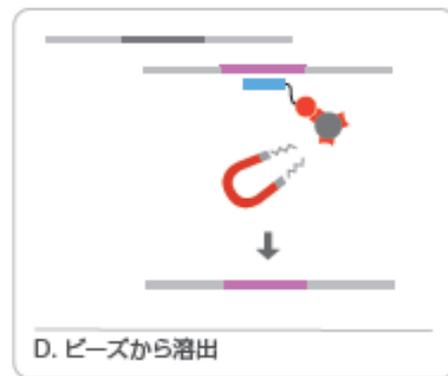
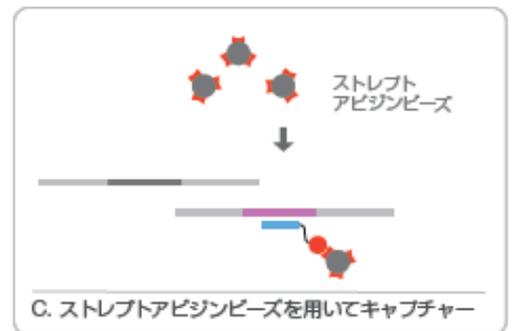
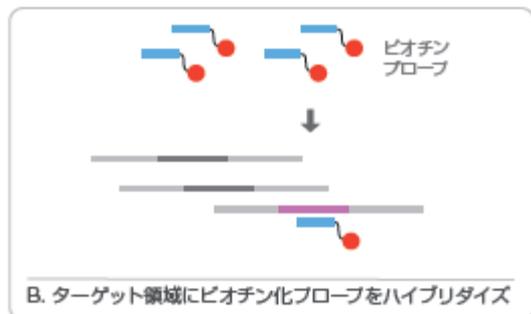
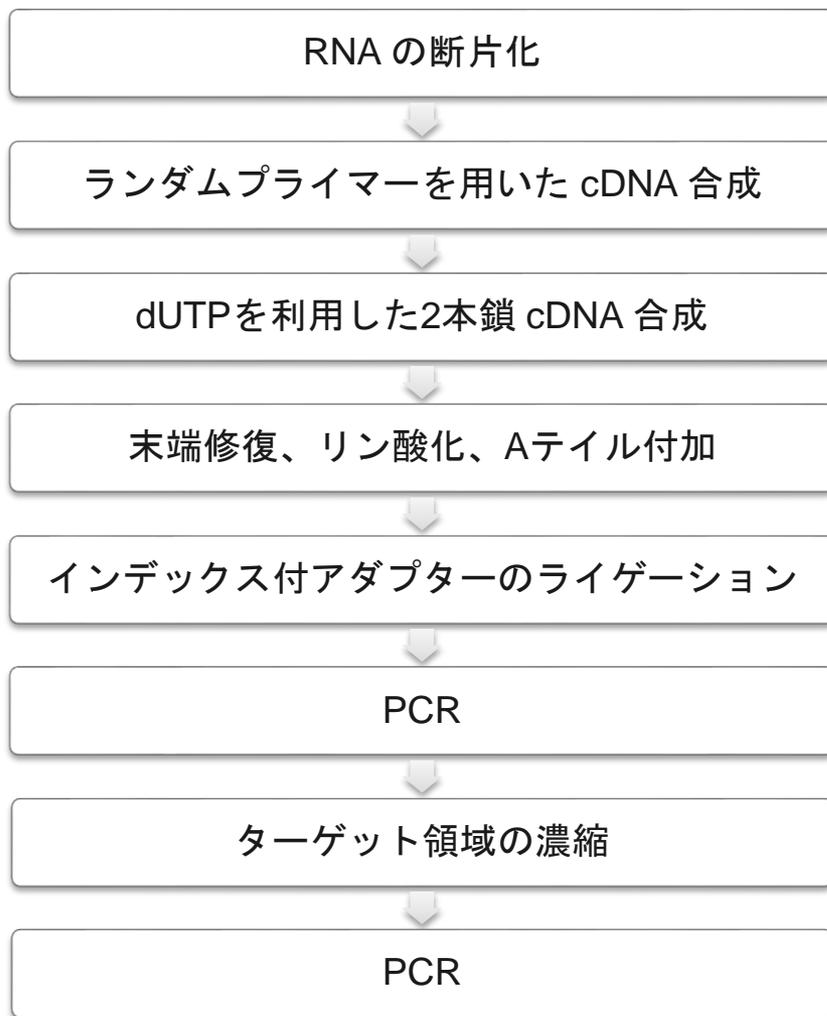
Fresh/Frozen



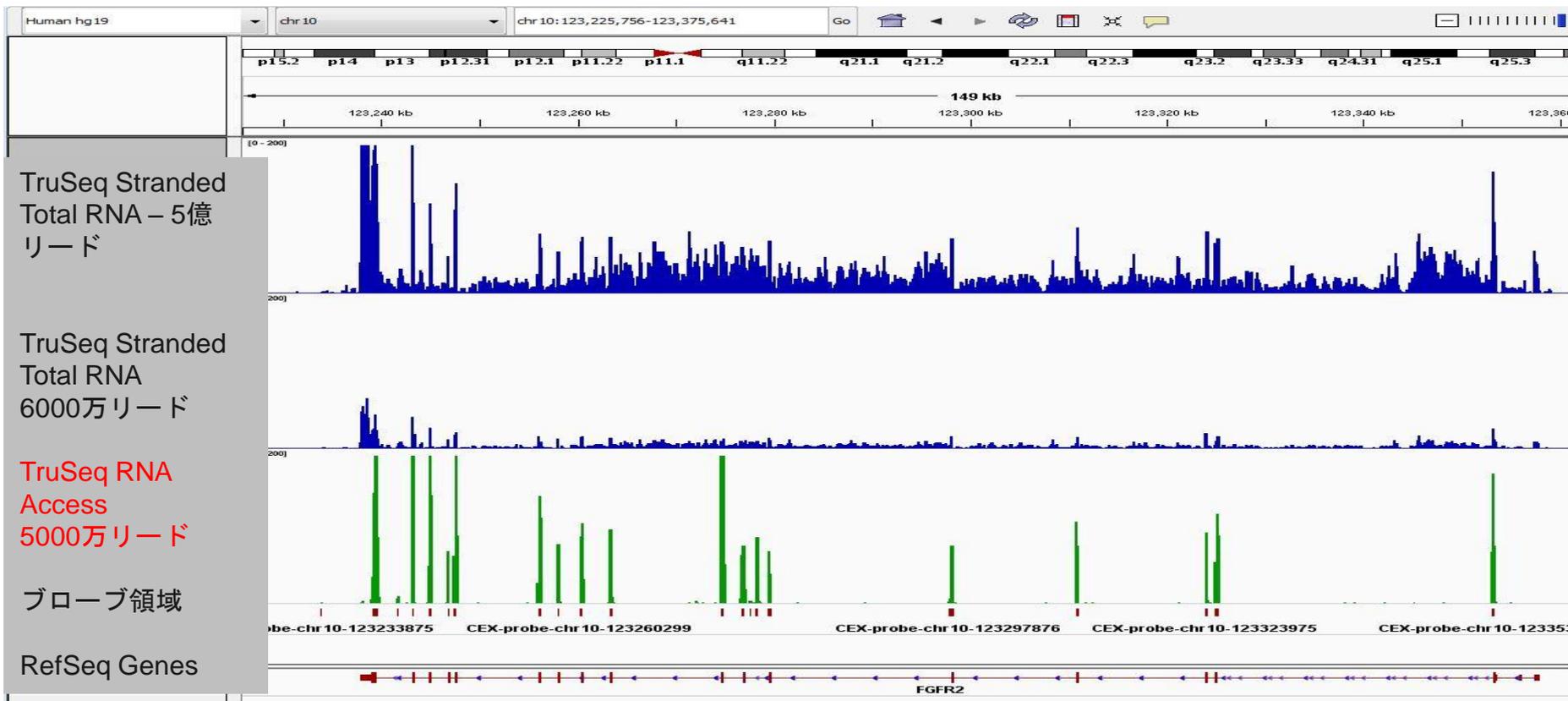
# RNAライブラリー調製の主な方法



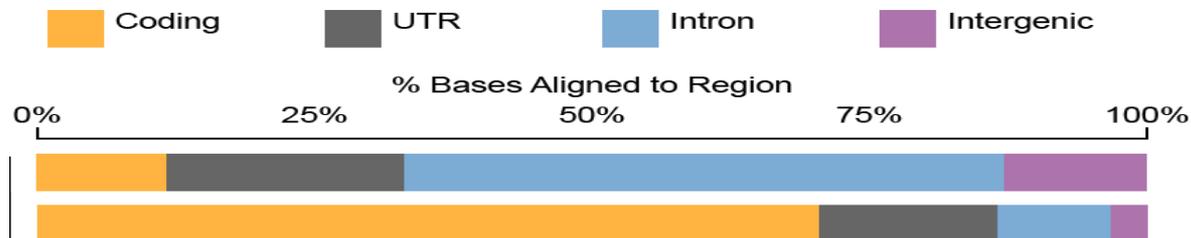
# TruSeq RNA Accessライブラリー調製の手順



# RNAライブラリー調製の違いによるデータ比較



コーディング領域 (mRNA) だけを効率よくシーケンス



# イルミナが提供するライブラリー調製キット

	TruSeq mRNA		TruSeq RNA Access	TruSeq Total RNA
解析対象RNA種	mRNA		mRNA	mRNA & ncRNA
手法	Poly-Aによる回収		コーディング領域を濃縮	rRNAの除去
ストランド情報	No	Yes	Yes	Yes
製品名	TruSeq RNA v2	TruSeq Stranded mRNA	TruSeq RNA Access	TruSeq Stranded Total RNA
Total RNA インプット量	100-1000 ng	100-4000 ng	10-20 ng	100-1000 ng
FFPE対応	No	No	Yes	Yes
アッセイ時間	2日間	2日間	2.5日間	2日間
ハンズオン時間	12時間	9時間	11時間	8時間

# トランスクリプトーム解析ワークフロー

BaseSpace®

ライブラリー調製

シーケンス

アライメント

発現量比較

パスウェイ解析



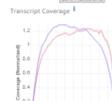
TruSeq mRNA  
TruSeq RNA Access  
TruSeq Total RNA



TopHat

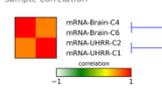
App Session TopHat Alignment 05/16/2015 8:13:50

	Reads	Number of Reads	% Total Aligned	% Abundant	% Unaligned	Coverage	% Spliced
mRNA	75,775	97,783,035	92.04%	15.43%	7.94%	0.05	99.36%
miRNA	75,775	94,264,211	91.99%	12.21%	4.01%	0.05	99.12%
lincRNA	75,775	83,714,339	86.32%	11.21%	3.69%	0.05	99.47%
antisense	75,775	84,937,023	86.49%	9.39%	3.31%	0.04	99.44%

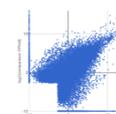


Cufflink

Sample Correlation

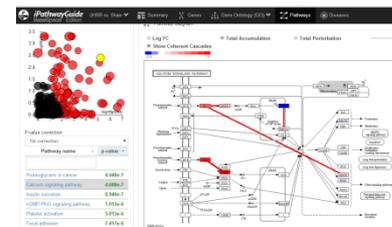


Differential Expression Gene Browser



iPathwayGuide  
ADVAITA BIO

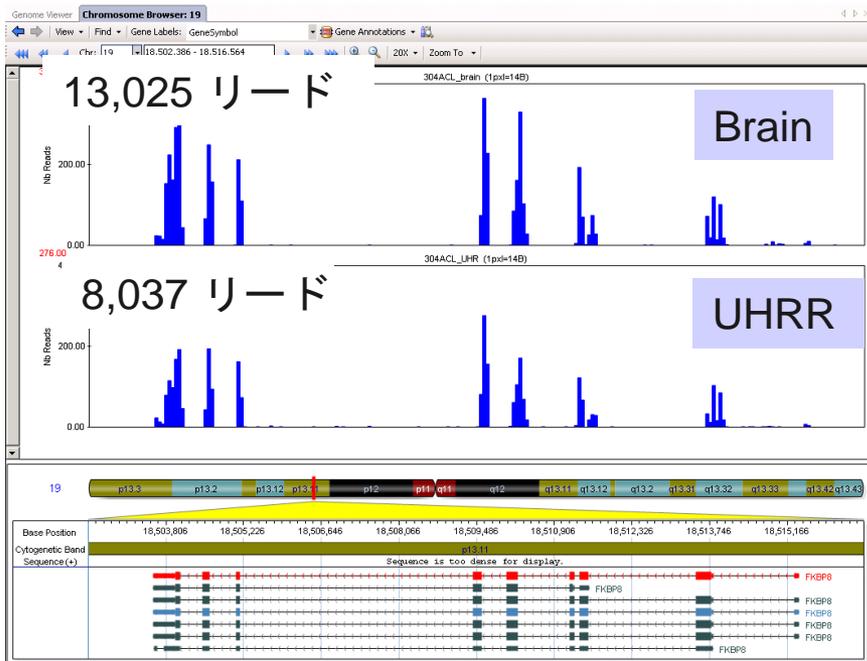
有償オプション



サンプルから答えまで、一連の工程をサポート

# トランスクリプトーム解析の考え方

- ▶ cDNAをシーケンスすることで塩基配列を取得(リード)
- ▶ リードの塩基配列を参照配列に対してアライメント
- ▶ アライメントされたリードをカウント



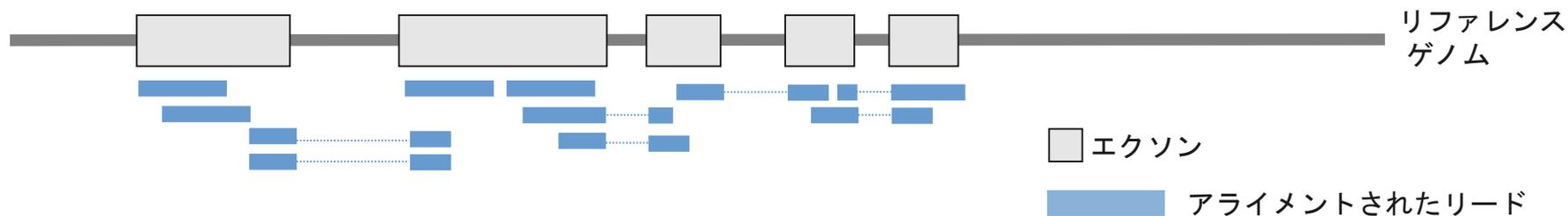
FKBP8 遺伝子発現



RPS3 遺伝子発現

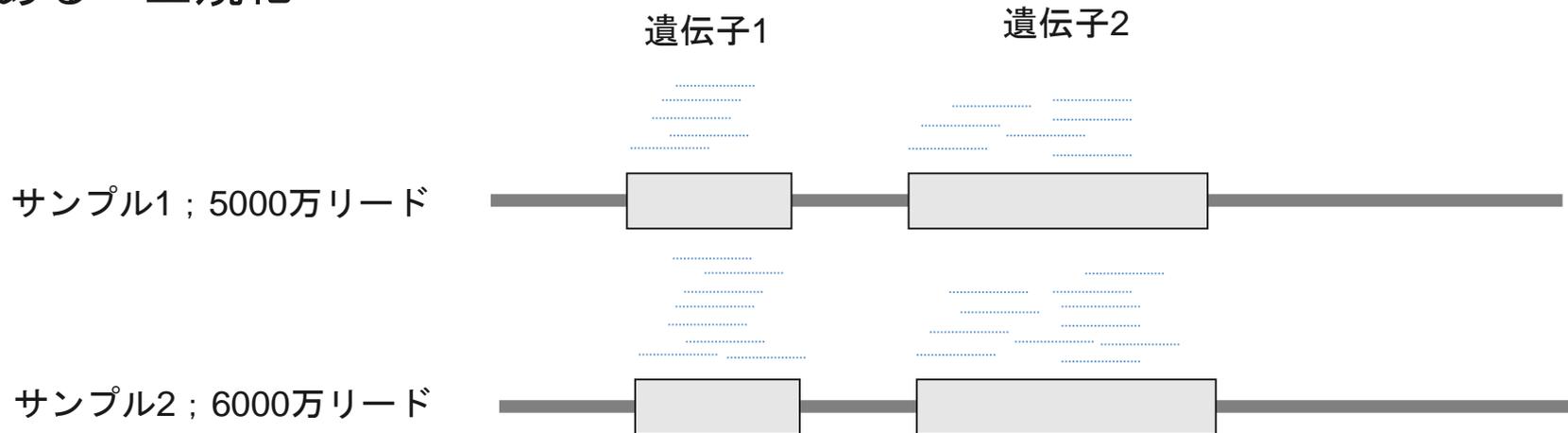
# RNA-Seq解析のアライメント

RNA-Seq解析のアライメントは、スプライスジャンクションの考慮が必要



# RNA-Seq解析の発現量比較

発現量の比較解析をする場合は、サンプル間のデータ量を揃える必要がある→正規化



FPKM (Fragments per kilobase of exon per million mapped sequence reads)

$$\text{FPKM} = \frac{\text{エクソン1kbあたりにマッピングされたリード数}}{\text{マッピングされた全リードにおける100万リードあたり}}$$

FPKM ≒ 1細胞あたりおよそ1コピー程度の発現量

# 発現量比較用解析アプリの実行Cufflink Assembly

## & DE 実行結果

	Comp	Comparison	Merged
Gene Count	45,635	52,884	62,231
Transcript Count	87,392	96,262	119,726
Link to gene models	<a href="#">GTF result</a>	<a href="#">GTF result</a>	<a href="#">GTF result</a>
<b>Relation to reference transcripts</b>			
Equal (=)	44,934	45,437	46,093
Potentially novel (j)	18,903	20,155	31,453
Unknown, intergenic (u)	21,848	28,622	39,115
Overlap with opposite-strand exon (x)	1,361	1,674	2,459
Other	346	374	606

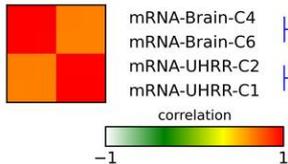
カウントされた遺伝子・トランスクリプト  
新規転写産物の数について

### Differential Expression

Gene Count	62,225
$\Delta$ Gene Count	27,052
Transcript Count	119,696
$\Delta$ Transcript Count	27,379
CuffDiff results	<a href="#">differential gene expression, differential transcript expression</a>

発現量の違いがみられた遺伝子・トランスクリプトの数

### Sample Correlation

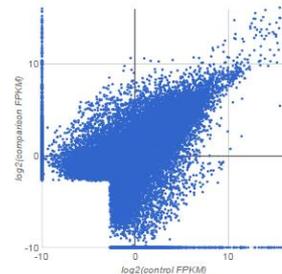


サンプル間の相同性

### Differential Expression Gene Browser



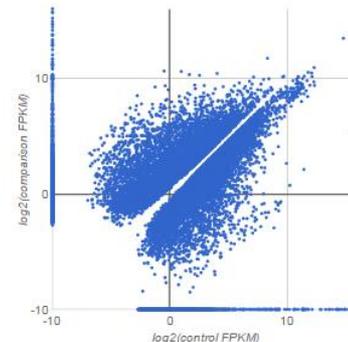
スキャッタープロット



発現差のある遺伝子

Significant

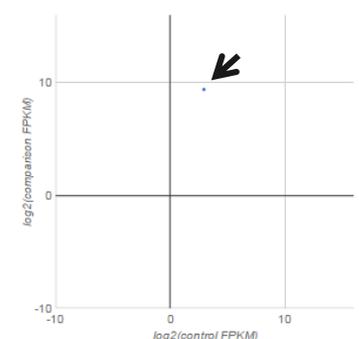
Choose a value...  
Choose a value...  
false  
true



特定遺伝子の表示

Gene

NRGN



# 発現量変動の大きい遺伝子だけをフィルタリング

Microsoft Excel

significant = "yes"  
log<sub>2</sub>(fold-change)でソート

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
370	TEX26	TEX26	TEX26	chr13:315	control	comparisc	OK	0	0.733947	inf	#NAME?	5.00E-05	8.90E-05	yes			
371	TMEM211	TMEM211	TMEM211	chr22:253	control	comparisc	OK	0	0.35315	inf	#NAME?	0.00015	0.000258	yes			
372	TNR	TNR	TNR	chr1:1752	control	comparisc	OK	0	6.15347	inf	#NAME?	5.00E-05	8.90E-05	yes			
373	TREML1	TREML1	TREML1	chr6:4111	control	comparisc	OK	0	0.428431	inf	#NAME?	5.00E-05	8.90E-05	yes			
374	VIP	VIP	VIP	chr6:1530	control	comparisc	OK	0	8.35456	inf	#NAME?	5.00E-05	8.90E-05	yes			
375	VSTM5	VSTM5	VSTM5	chr11:935	control	comparisc	OK	0	1.99741	inf	#NAME?	5.00E-05	8.90E-05	yes			
376	YIPF7	YIPF7	YIPF7	chr4:4462	control	comparisc	OK	0	0.466413	inf	#NAME?	5.00E-05	8.90E-05	yes			
377	GEAP	GEAP	GEAP	chr17:429	control	comparisc	OK	0.307986	1770.56	12.4891	34.1922	5.00E-05	8.90E-05	yes			
378	SYT4	SYT4	SYT4	chr18:408	control	comparisc	OK	0.017874	80.1717	12.131	11.351	0.00955	0.013556	yes			
379	SCN2B	SCN2B	SCN2B	chr11:118	control	comparisc	OK	0.012015	45.9921	11.9024	10.0693	0.02255	0.03056	yes			
380	CAMK2A	CAMK2A	CAMK2A	chr5:1495	control	comparisc	OK	0.062008	212.412	11.7421	20.8775	5.00E-05	8.90E-05	yes			
382	GABRA1	GABRA1	GABRA1	chr5:1612	control	comparisc	OK	0.024212	80.9769	11.7076	10.0107	0.00025	0.000422	yes			
383	STMN4	STMN4	STMN4	chr8:2709	control	comparisc	OK	0.06626	182.179	11.4249	11.6056	0.007	0.010094	yes			
384	GRIA2	GRIA2	GRIA2	chr4:1581	control	comparisc	OK	0.023058	61.905	11.3906	12.8887	5.00E-05	8.90E-05	yes			
385	SLC6A1	SLC6A1	SLC6A1	chr3:1103	control	comparisc	OK	0.034664	76.8008	11.1135	14.2834	5.00E-05	8.90E-05	yes			
387	GPM6A	GPM6A	GPM6A	chr4:1765	control	comparisc	OK	0.186003	396.293	11.057	24.7559	5.00E-05	8.90E-05	yes			
388	OPCML	OPCML	OPCML	chr11:132	control	comparisc	OK	0.017869	37.407	11.0317	11.4694	0.00025	0.000422	yes			
389	MT3	MT3	MT3	chr16:566	control	comparisc	OK	0.43546	856.17	10.9411	21.7277	5.00E-05	8.90E-05	yes			
390	DIRAS2	DIRAS2	DIRAS2	chr9:9337	control	comparisc	OK	0.070422	133.499	10.8885	19.986	5.00E-05	8.90E-05	yes			
391	HMP19	HMP19	HMP19	chr5:1734	control	comparisc	OK	0.070297	129.187	10.8437	15.9517	5.00E-05	8.90E-05	yes			
392	CA10	CA10	CA10	chr17:497	control	comparisc	OK	0.034827	63.9818	10.8432	10.2524	0.0004	0.000661	yes			
394	CNTN2	CNTN2	CNTN2	chr1:2050	control	comparisc	OK	0.036353	66.0456	10.8272	19.051	5.00E-05	8.90E-05	yes			

コマンド 23609 レコード中 13573 個が見つかりました

100%

# トランスクリプトーム解析ワークフロー



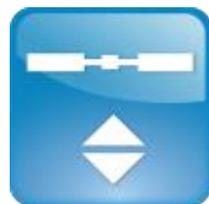
## TopHat Alignment

アライメント  
(TopHat 2)

融合遺伝子  
検出  
(TopHat-  
Fusion)

変異コール  
(Isaac)

発現定量  
(Cufflinks)



## Cufflink Assembly & DE

発現定量  
(Cufflinks)

アSEMBル統合  
(Cuffmerge)

比較解析  
(Cuffdiff 2)



iPathwayGuide

ADVAITA BIO

有償オプション

パスウェイ解析

# RNAライブラリー調製を詳しく学ぶには

- ▶ データシート : TruSeq RNA Accessライブラリー調製キット
  - Pub. No. 470-2013-J004 01MAY2014
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet\\_truseq\\_rna\\_access\\_library.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/datasheet_truseq_rna_access_library.pdf)
- ▶ ウェビナー : RNA-Seq～研究にあわせたアプリケーションの選び方～
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2015\\_techsupport\\_session7.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2015_techsupport_session7.pdf)
- ▶ ウェビナー : NGSをはじめよう！RNA-Seq入門（キットの選び方、実験デザイン）
  - [http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2014\\_techsupport\\_session2.pdf](http://jp.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/apac/japan/documents/pdf/2014_techsupport_session2.pdf)