マイクロアレイによる 二重らせん構造

マイクロアレイとは? DNAマイクロアレイについて

Agilent Technologies October, 2008





内容

- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

遺伝子発現解析遺伝子発現量の増減を定量的に検出

マイクロアレイ

ノザンブロット

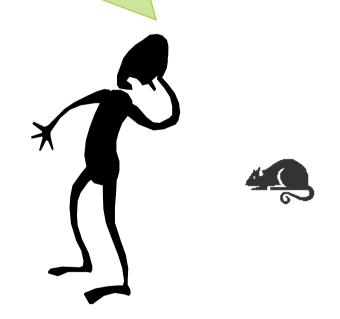
リアルタイムPCR

EST解析

Sequencing

In Situ Hybridization

どの遺伝子がどれだけ 転写されているかを知りたい! 色々方法があるけど どれがいいの?



まず『何をしたいか』を明確に

Profiling?

Screening?

この疾病の性質を明らかにしたい

そのためには まず病気の細胞と健 常な細胞の何が違う かを調べたいな・・・



Marker detecting?

この組織に分化すればこの遺伝子が発現 するので、 分化したかどうか、 この遺伝子の発現を チェックして調べたい な・・・

そのために、"どのような性質の検出"が必要か?

- ・ある現象に関わる遺伝子群の 候補を新規に見つけたい
- ・多数の遺伝子の発現量を調べたい
- ・全遺伝子の発現プロファイルをとりたい

- ・特定の遺伝子の発現量を調べたい
- ・正確に何コピーあるのか調べたい
- ・新規遺伝子を発見したい



マイクロアレイがお勧め!



他の検出手法を検討

マイクロアレイ応用例1

ヒトがストレスを感じた時に発現量が変動する遺伝子を網羅的にスクリーニング

Gene expression signature in peripheral blood cells from medical students exposed to chronic psychological stress.

Biol Psychol. 2007 Oct;76(3):147-55

Kawai T, Morita K, Masuda K, Nishida K, Shikishima M, Ohta M, Sasito T, Rokutan K,



マイクロアレイ応用例2

全遺伝子発現のプロファイリングを使って、細胞の性質を調べる

Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

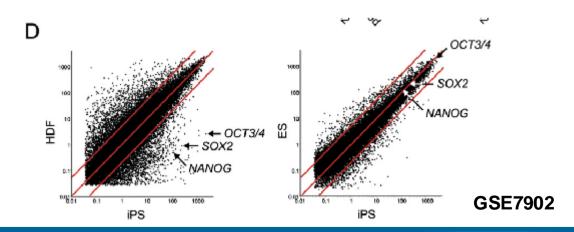
Cell 131, 1-12, November 30, 2007

Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka

iPS細胞とES細胞の類似性の確認

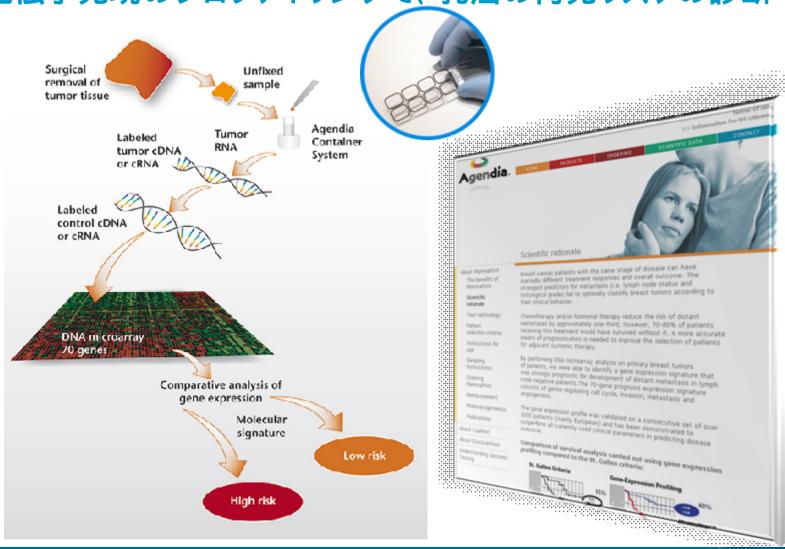
細胞の形態・増殖・表面抗原・遺伝子発現・

エピジェネティックな状態・テロメラーゼ活性など



マイクロアレイ応用例3

遺伝子発現のプロファイリングで、乳癌の再発リスクの診断



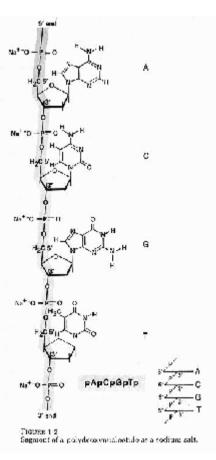
- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

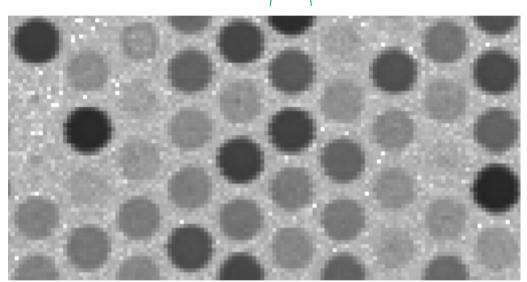
DNAマイクロアレイとは

マイクロ DNA

= デオキシリボ核酸 = 小さい・微小な = 大群・整列

アレイ



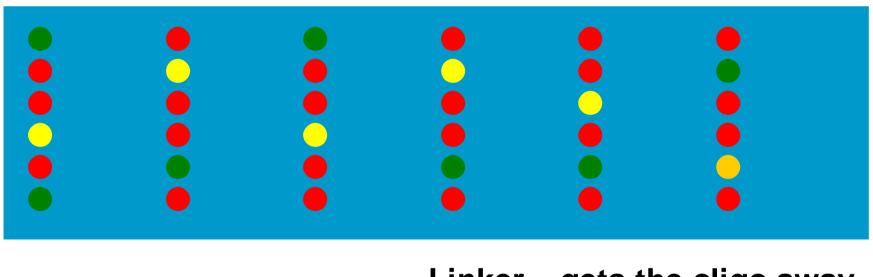


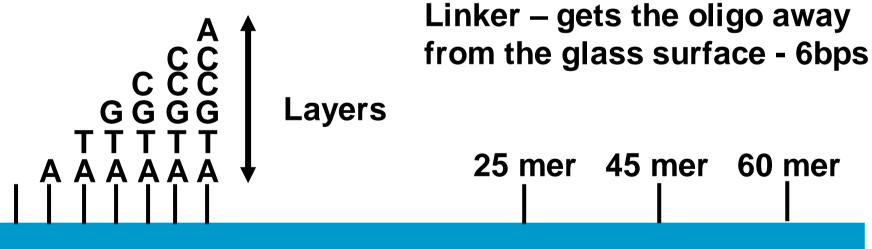
65um

Agilent microarrayのTIFF画像

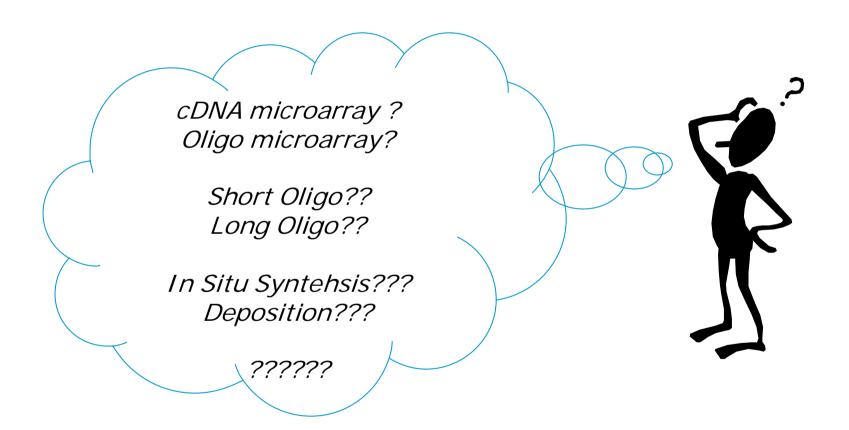
DNAを基盤上に整列化させたもの

Agilent Synthesizes Oligos In Situ

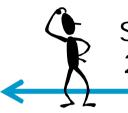




DNAマイクロアレイの選択肢



ショートオリゴアレイ vs. ロングオリゴアレイ



Short オリゴ 20-30 mer Long オリゴ 50-80 mer



サイズ

Pros

■ SNPsを区別できる

Cons

- 感度が低い
- SNPsの影響を受けやすい
- 1遺伝子あたり複数プローブ 必要
 - ミスマッチの考慮が必要
 - データ解析が困難

Pros

- 感度が高い
- SNPs (多型) の影響を受けに 〈い
- 1遺伝子あたり1プローブ

Cons

■ SNPsの区別ができない

Longオリゴの利点:データ解析

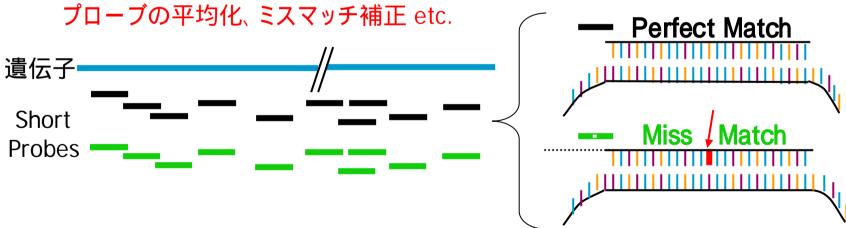
Long: 1遺伝子あたり1プローブ

■ シンプルなデータ解析

遺伝子 Long Probe Long Probe

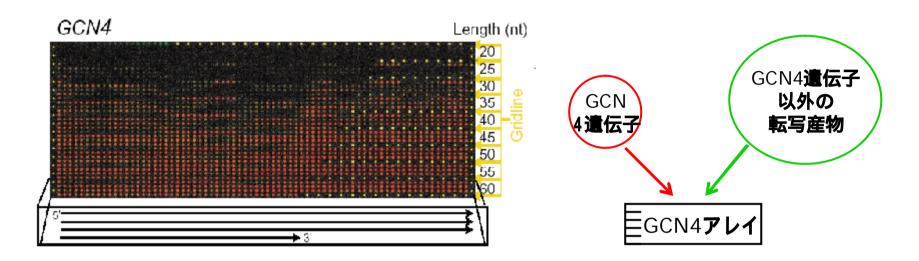
Short: 1**遺伝子あたり**10+プローブ

■ 複雑なデータ解析



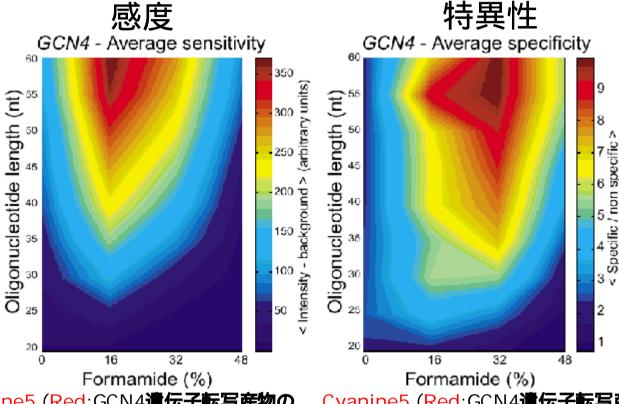
プローブの長さ





- GCN4遺伝子のシークエンスからオリゴプローブをデザイン
- 5から順に3塩基ずつずらしてプローブを作成
- プローブの長さ; 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60mer
- Cyanine5 (Red) GCN4遺伝子転写産物のみ
- Cyanine3 (Green) GCN4遺伝子以外の転写産物

プローブの長さ: 感度と特異性



Cyanine5 (Red:GCN4遺伝子転写産物の み)からパックグランドを差し引いたシグナル

Cyanine5 (Red:GCN4遺伝子転写産物のみ) からCyanine3 (Green: GCN4遺伝子以外の 転写産物)を差し引いたシグナル

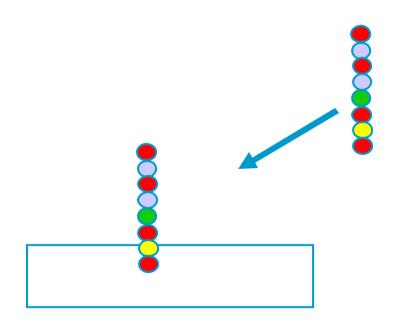


60mer 感度と特異性のベストバランス

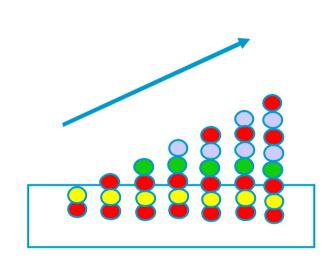


DNAマイクロアレイ製造の種類

3. Deposition方式 vs. in situ 合成方式



• Deposition 方式



• In situ 合成方式

Deposition方式 vs. in situ 合成方式





Deposition (オリゴ)

In situ 合成 (オリゴ)



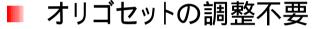
Pros

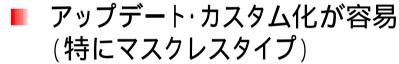
__

Cons

■ オリゴセットの調整・維持 管理が必要

Pros





Cons

__

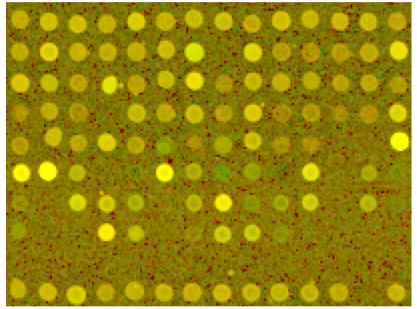


In-situ 合成方式では、オリゴの 遺伝子セットを調整する必要が無い

Bartett et al. 2003 DrugDiscoveryToday 8: 134

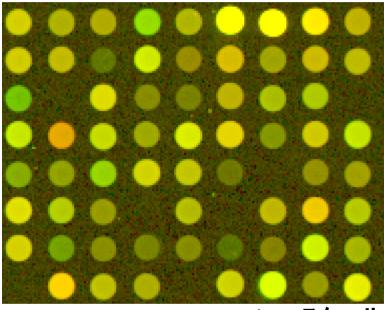
スポット、バックグランドの違い

60mer deposition



Log スケール

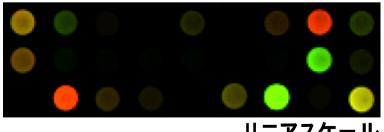
60mer In situ **合成**



Log スケール



スポットの均一性 スポット位置の正確性 バックグランド



リニアスケール

THE MAGIC OF MICROARRAYS

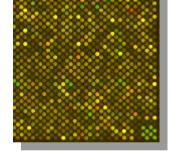


マイクロアレイなら、ゲノムにコードされている全遺伝子の発現量を網羅的に検出することが可能



例).AgilentのWhole Human Genome アレイ (4x44k)

- ・ ヒトゲノムの遺伝子および転写産物(合計41K)を網羅
 - > 44,375 total feature platform
 - > 33.2K unique genes
 - > 30.5K functionally validated
- 標準フォーマット(1x3スライド)でオリゴ合成したマイクロアレイ



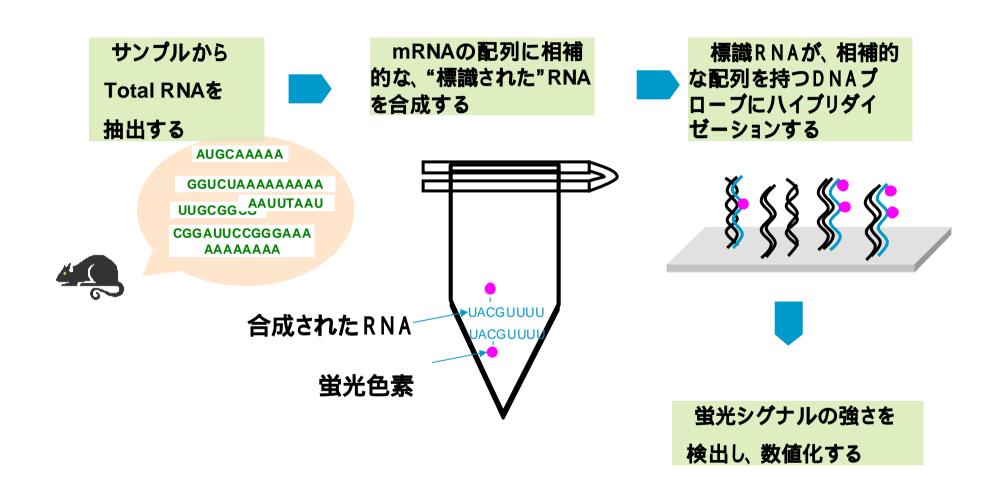


1枚のアレイでヒトゲノムを網羅的にカバー

目的によって最大244,000のプローブを搭載できます

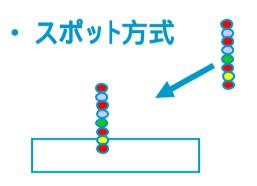
244,000

検出原理の概要

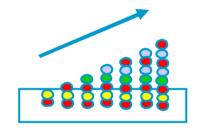


様々なDNAマイクロアレイ

- cDNAアレイとオリゴアレイ
- スポット方式とIn Situ合成方式



• In situ 合成方式



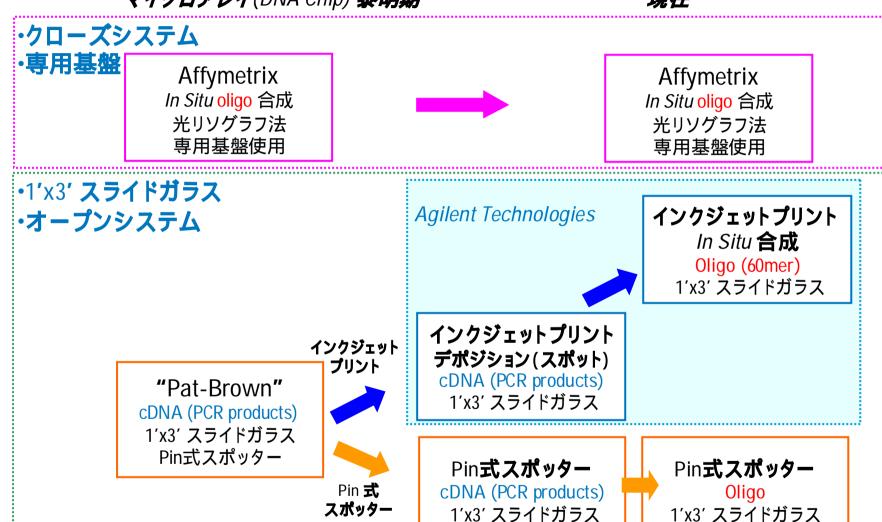
あらかじめ合成した分子を基盤上にスポット 基盤上で1merずつ 目的の長さまで合成

- 基盤の種類
- プローブの合成方法・長さ
- 実験プロトコル・・・

Agilent's DNA Microarray

マイクロアレイ(DNA Chip) 黎明期

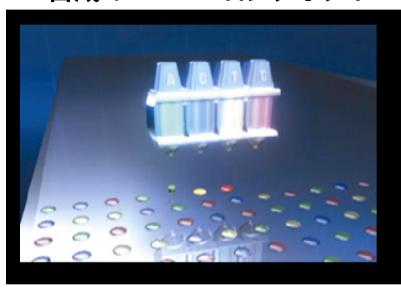
現在

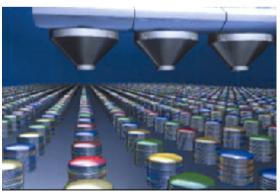


アジレント マイクロアレイの特長

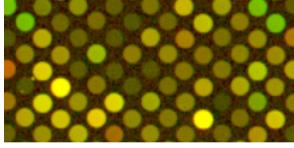
Inkjet技術を使い、1x3インチの汎用スライドガラス上に、

In Situ 合成の60mer ロングオリゴ









- 高感度、高品質、高精度
- スポット抜け(ロット差)がない
- 高いフレキシビリティ
- 60merの合成効率99.5%以上

- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

一般的なマイクロアレイ実験の流れ

1.実験デザイン

2.RNA抽出

3.ラベル化

4.ハイブリダイゼーション

5.洗浄

6.スキャン

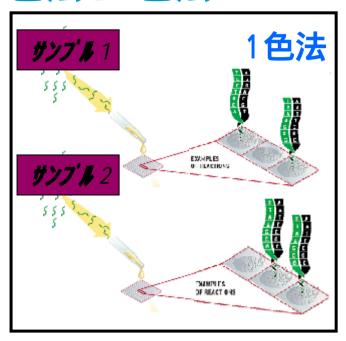
7.数值化

8.データ解析

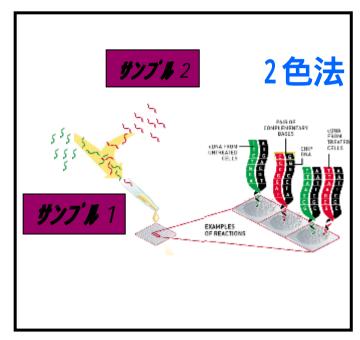
ここはAgilentから実験プロ トコルが提供されている

Step 1. 実験デザイン

- ・何と何を比較したいのか?
- ・1色法と2色法



1 サンプル 1 アレイで、発現量を測定サンプル間、アレイ間を比較するにはアレイ間補正が必要



2サンプルを同一アレイ上で比較した発現比を測定

色素補正が必要

Step 2. RNA抽出

- ・実験ステップ1:サンプルからTotal RNAを抽出する
 - ▶ 組織
 - ▶ セルライン
 - ➤ LCM細胞





注意

RNAの濃度や品質、

またコンタミネーションの

チェックが必要(後述)



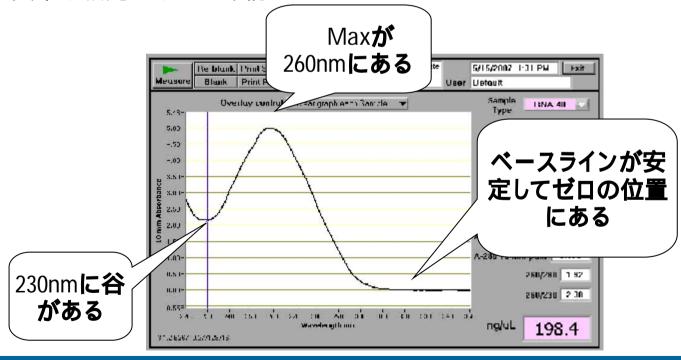
Step 2. RNA抽出 Total RNAの確認 UV吸光度測定 RNA濃度・不純物を調べる

測定する UV 吸光度: 230nm, 260nm, 280nm, 320nm

A₂₆₀ 濃度測定 1 = 40 ug/ml (RNA)

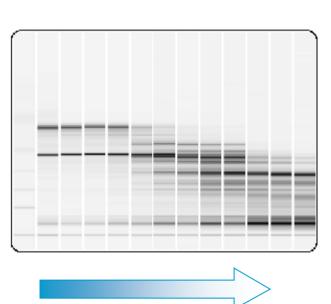
A280 タンパク質、フェノールの混入を確認 (A260/A280 = 1.8 ~ 2.0)

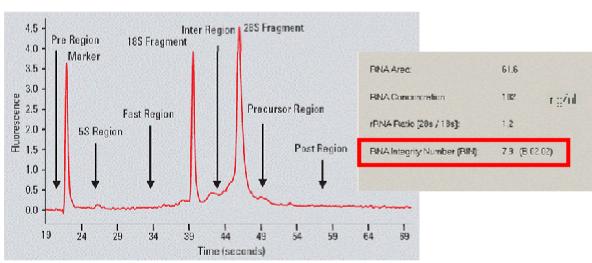
A320 異常な吸光がないか確認



Step 2. RNA抽出 Total RNAの確認

電気泳動 RNAの分解具合を調べる

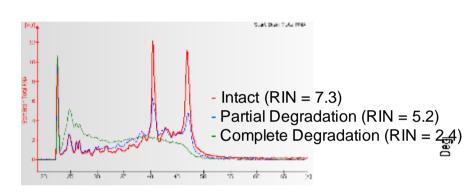




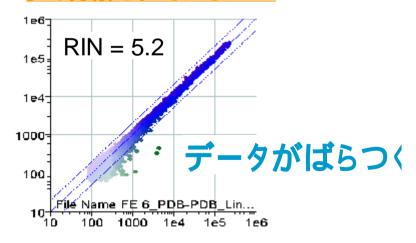


分解しているサンプルでマイクロアレイ実験を行なうと・・・ セルフvsセルフプロット = 結果は同じになるはずなのに。。。

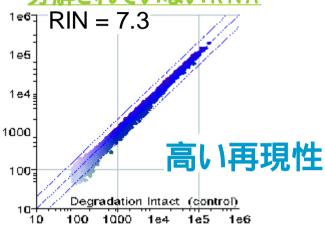
縦軸と横軸に、同じサンプルでとった アレイデータをプロット



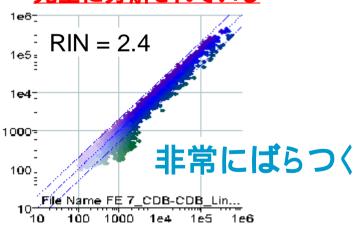
少し分解されているRNA



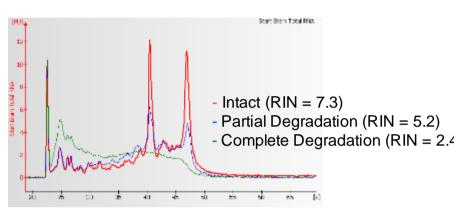
分解されていないRNA

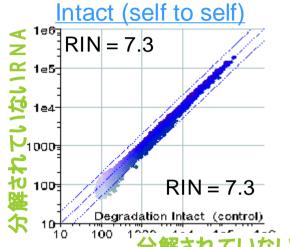


完全に分解されている

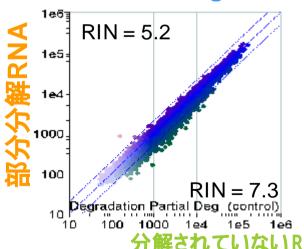


分解しているサンプルでマイクロアレイ実験を行なうと・・・ 全〈同じサンプルでも、発現差があるように見えてしまう!

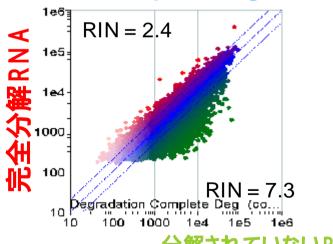




Intact vs. Partial Degradation



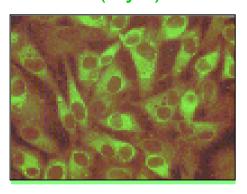
分解されていないRNA Intact vs. Complete Degradation



Step 3. ラベル化

ラベル化とは...

サンプルRNAに緑 (Cy3) で色をつける反応



Cy3

様々なラベル化法(例

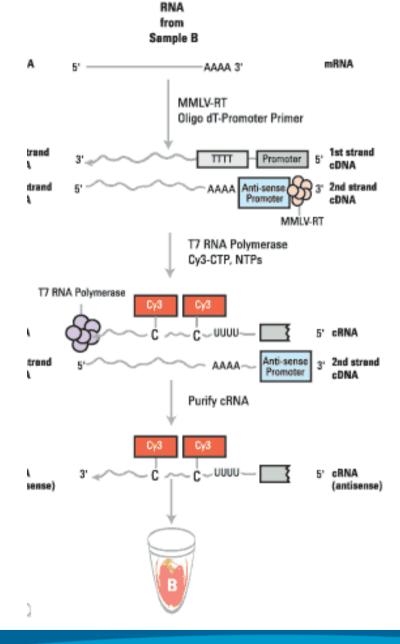
Direct / Indirect

増幅 / 非増幅

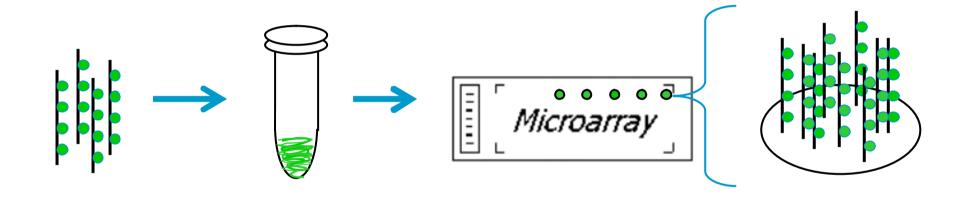
1色法 / 2色法

Step 3. ラベル化

Agilentのラベル化法は T7 promotor primerを 使った増幅法



Step 4. ハイブリダイゼーション



Step 5.洗浄

非特異的なシグナルを可能な限り除去し、特異的なシグナルを可能な限り残す

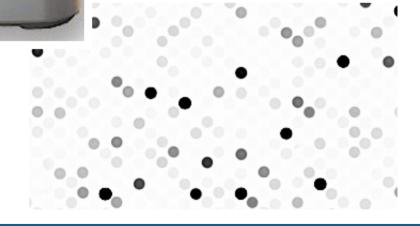


アジレント遺伝子発現 アレイ実験では作業は たった数分

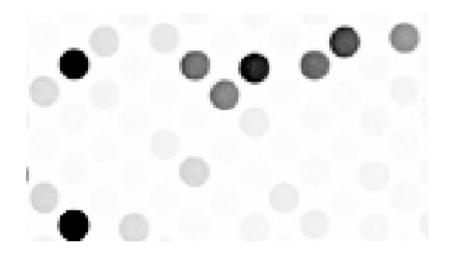


Step 6. スキャナーでスライドを読み取り

ハイブリ終了後、Cy3の 蛍光を読み取るにはスキャナが必要

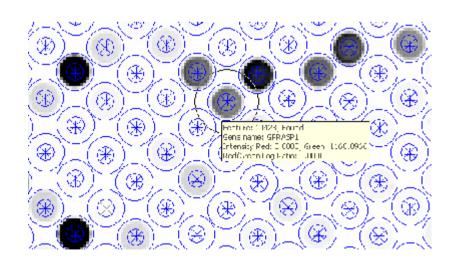


Step 7. イメージの数値化



このままではただの 光っているイメージ





スポットの中の緑(Cy3) のシグナル値を抽出



- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

Agilent 4x44K 遺伝子発現Whole Genome シリーズ



品名	AMADID (Design Number)	搭載プローブ
Whole Human Genome	14850	- Agilent eQCプロープ - Agilent Whole Human Genomeプロープ (n=41,000)
Whole Mouse Genome	14868	- Agilent eQCプローブ - Agilent Whole Mouse Genomeプローブ (n=41,174)
Whole Rat Genome	14879	- Agilent eQCプローブ - Agilent Whole Rat Genomeプローブ (n=41,012)

Agilent 4x44K 遺伝子発現 その他受注製造力タログアレイ

























酵母

線虫

ゼプラフィッシュ

イヌ

発生再生研究用マウス アカゲザル

シロイヌナズナ

イネいもち病菌

イネ

ニワトリ

ウシ

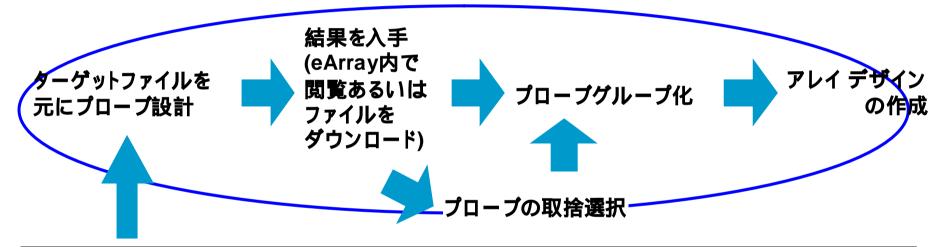
八工 etc

目的の生物種のアレイがない場合・・・カスタムアレイ作成

対象生物のmRNAの配列情報があれば、

どんな生物でもマイクロアレイ作成可能!

eArray



ターゲットファイル

事前に、プローブ設計の元となるターゲットファイルを準備します。 FASTA形式のトランスクリプト配列リストまたはGenBankのAccessionIDリストを 1つ用意します。

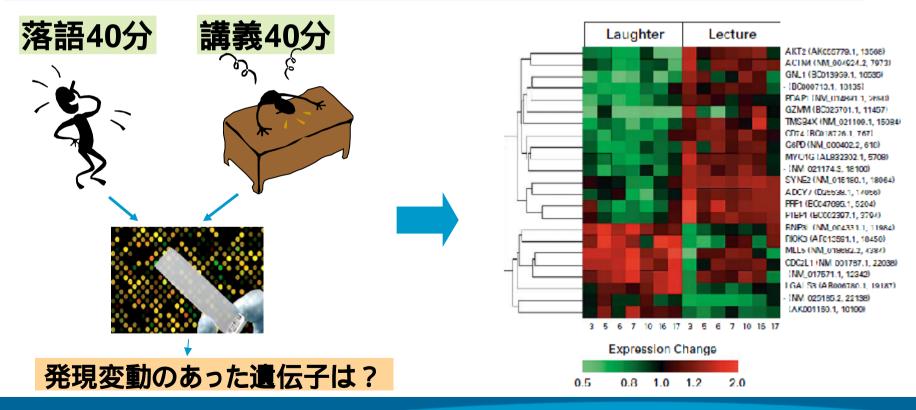
- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

型糖尿病患者で笑いによる遺伝子発現の変化を調べる

Laughter Regulates Gene Expression in Patients with Type 2 Diabetes

Psychother Psychosom 2006;75:62-65

Takashi Hayashi Osamu Urayama Koichi Kawai Keiko Hayashi Shizuko Iwanaga Masayuki Ohta Toshiro Saito Kazuo Murakami



イネ(Oryza sativa)が、植物活性化剤BTHで病原菌抵抗 性を誘導される仕組みの解明

Rice WRKY45 Plays a Crucial Role in Benzothiadiazole-Inducible **Blast Resistance**

The Plant Cell. June 29, 2007

Masaki Shimono, Shoji Sugano, Akira Nakayama, Chang-Jie Jiang, Kazuko Ono, Sejichi Toki, and Hiroshi Takatsuji





Mock処理

0.5 mM BTH処理

BTHの溶媒のみで処理

葉からRNA抽出 葉からRNA抽出

Table 1. Summary of Microarray Data for the BTH-Inducible Genes Characterized in This Study

Accession Number	Locus ID	Annotation	Fold Change (BTH/Mock)	FDR(Q Value)
AK068337	Os09g0417600	Os WRKY76	313.0	< 0.00001
AK067834	Os09g0417800	Os WRKY62	425.0	< 0.00001
AK066255	Os05g0322900	WRKY45	35.8	< 0.00001
AK108389	Os05g0571200	Os WRKY19	14.2	<0.00001
AK064395	Os09g0518200	SA-glucosyltransferase	60.2	< 0.00001
AK072241	Os12g0559200	Lipoxygenase	12.1	<0.00001
AK107926	Os01g0382000	PR-1b	5.5	< 0.00001
AK071613	Os12g0555500	PBZ1	4.2	0.04300
AK 103453	Os10g0528300	GST (Tau class)	97.8	< 0.00001
AK072220	Os07g0418500	Cytochrome P450	38.6	<0.00001
AF25 1277	Os07g0 129200	PR-1a	10.1	0.01200

マイクロアレイで発現差のある遺伝子を検出

マイクロアレイ結果の一部 (GSE7567で全データDownload可能)

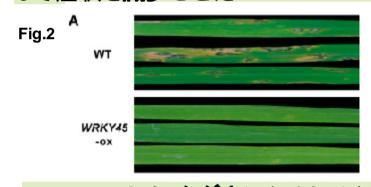
326個の遺伝子が検出された



イネ(Oryza sativa)が、植物活性化剤BTHで病原菌抵抗性を誘導される仕組みの解明

候補遺伝子中のWRKY転写因子について更に検証を進める

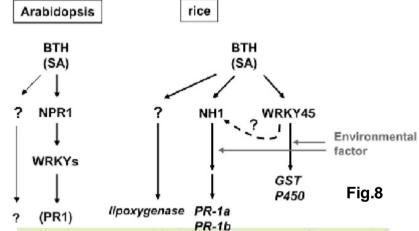
WRKY遺伝子ファミリーのうち、**WRKY45を 過剰発現**させたイネのみ、**病原菌接種**にたい
して症状を**減少**させた



WRKY45をノックダウンさせたイネでは、 BTH処理しても**耐性が上がらなかった**

WRKY45が病原菌耐性に関与している

さらにマイクロアレイで、WRKY45の下流で働く遺伝子の候補を探索 他様々な実験で下のようなモデルを提案



WRKY45過剰発現イネは、成長に対する影響も比較的少なかった

イネの病原菌耐性を改善できる可能性が示唆される

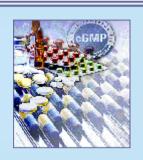


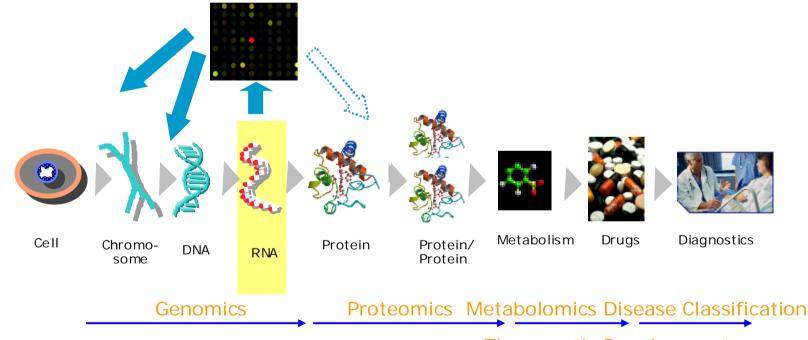
- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

DNA Microarray Technology in Omics Research



Discover Biology with New Microarray Platform

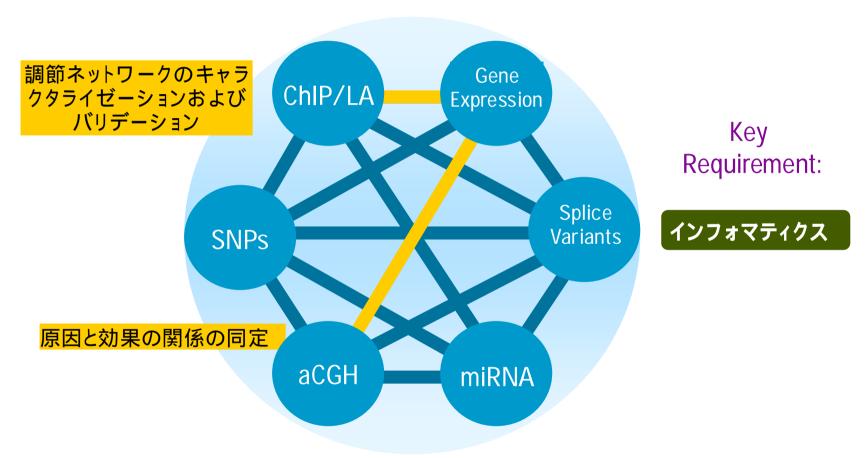




Therapeutic Development

マイクロアレイを用いた研究のトレンド

2. 様々な種類のデータを、包括的な「システム」の観点で統合解析



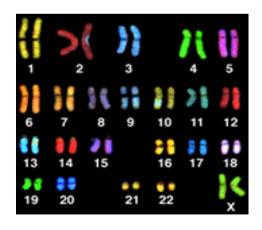
Goal: 異なるアプリケーションのデータセットを 結び付けることで新しい洞察を得る.

aCGH 染色体コピー数変化をマイクロアレイで検出

- CGH: Comparative Genomic Hybridization
- 全ゲノムに対し、一回の実験でDNAコピー数の変化を検出するメソッド
- がんの研究分野で非常に有用なアプローチ
- 新しいがん関連遺伝子(ゲノム増幅領域)あるいはがん抑制遺伝子 (ゲノム欠失領域)の発見 新しいターゲットの同定

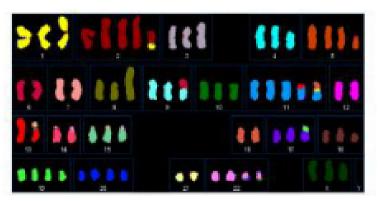
通常のヒトゲノム(染色体)

安定した2倍体で存在。 (心臓血管系、神経系の疾病でも通常2倍体)



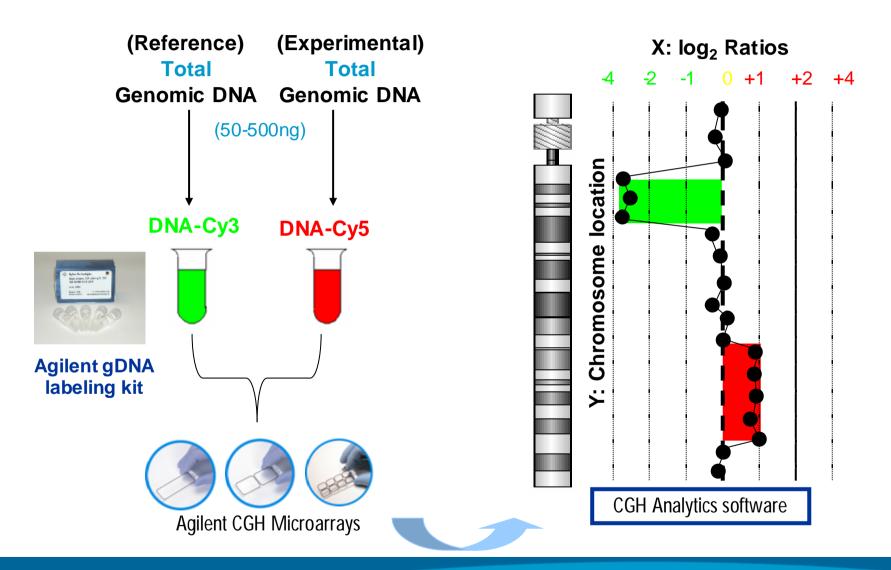
がんにおけるヒトゲノム(染色体)

コピー数の変化、ゲノムの再構成などがゲノムワイドにみられる。



Colon Carcinoma HT-29

アジレントのaCGH実験フロー



miRNAプロファイリングにおける背景

重要性の認識

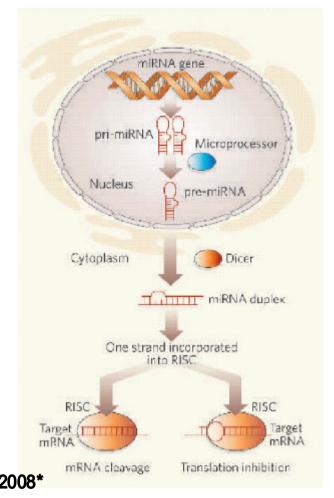
遺伝子発現、発生、分化、ストレス応答、アポトーシス...

サンプル調製の問題点 必要量、サイズ分画、濃縮...

性能の問題点 Tmおよび特異性の確保 再現性、感度、ダイナミックレンジ...

アレイメーカーによる本格的なアレイ

miRNAデータベースの充実 4361 entries (Sanger miRBASE Release 9.1), 474 in humans Projected \$100M to be awarded by the NIH for miRNA-related research in 2008*



Cancer Genomics: Small RNAs with big impacts from Nature 435: 745-746 (9 June 2005)

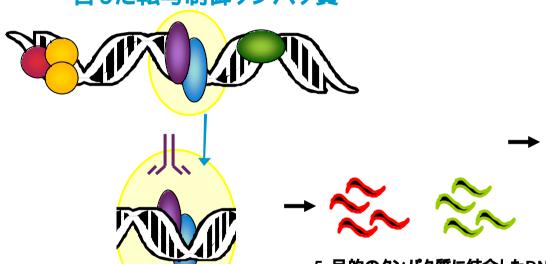
*Source: NIH CRISP database at http://crisp.cit.nih.gov/



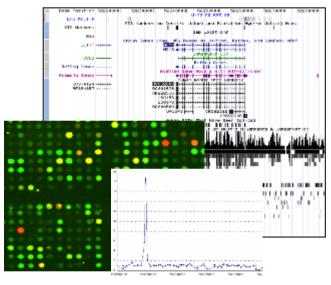
ChIP-on-chip 実験·解析

染色体におけるゲノムDNA-タンパク質相互作用を 多数の相互作用の集まりとして丸ごと捉える

in vivoにて調節エレメントに結 合した転写制御タンパク質



5. 目的のタンパク質に結合したDNA断片 およびリファレンスのラベル化 結合情報の解析結果を ゲノムブラウザで表示

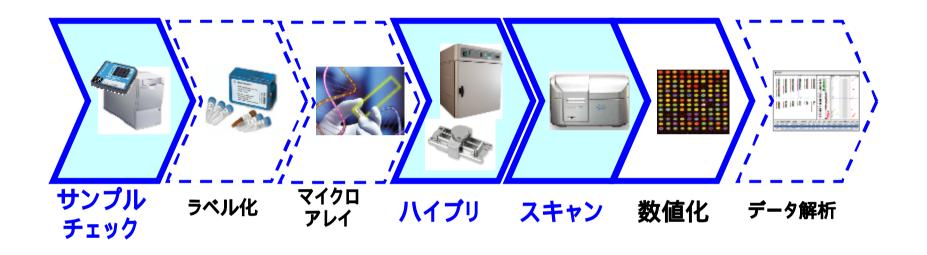


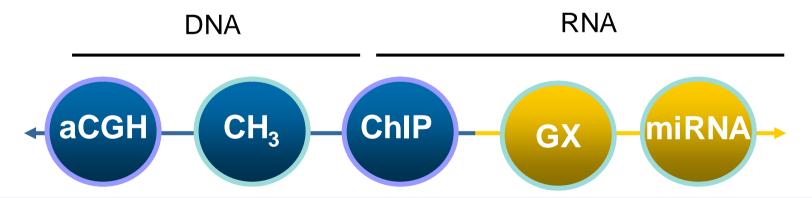
6. マイクロアレイへのハイブリ ダイゼーションとシグナル検出

- 1. タンパク質-DNA 複合体の架橋
- 2. 細胞の溶解と DNAの超音波破砕
- 3. 目的のタンパク質-DNA複合体の免疫沈降
- 4. 脱架橋およびDNA断片の増幅

すべてのアプリケーションに対して 共通のハードウェアを使用可能

同じシステムで 複数の研究が可能





- 1.DNAマイクロアレイの概要
 - -DNAマイクロアレイで何ができるのか?
 - -DNAマイクロアレイとは何か?
- 2.DNAマイクロアレイを使う
 - -マイクロアレイ実験の流れ
 - -Agilentのマイクロアレイの種類
 - -マイクロアレイ使用研究例
- 3.遺伝子発現解析以外のDNAマイクロアレイ
- 4.参考文献

参考文献

- ·統合ゲノミクスのためのマイクロアレイデータアナリシス
 - I.S. Kohane/A.T. Kho/A.J.Butte 星田有人 訳
- ・ラボマニュアル DNAチップとリアルタイムPCR

野島博

·DNAチップ実験まるわかり

佐々木 博己, 青柳 一彦

·The Chipping Forecast III

http://www.nature.com/ng/journal/v37/n6s/index.html

 Critical Review of Published Microarray Studies for Cancer Outcome and Guidelines on Statistical Analysis and Reporting

Alain Dupuy, Richard M. Simon (J Natl Cancer Inst 2007;99: 147 – 57)

Gene Expression Omnibus(GEO)

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/index.cgi

Questions please...

Thank You!!

