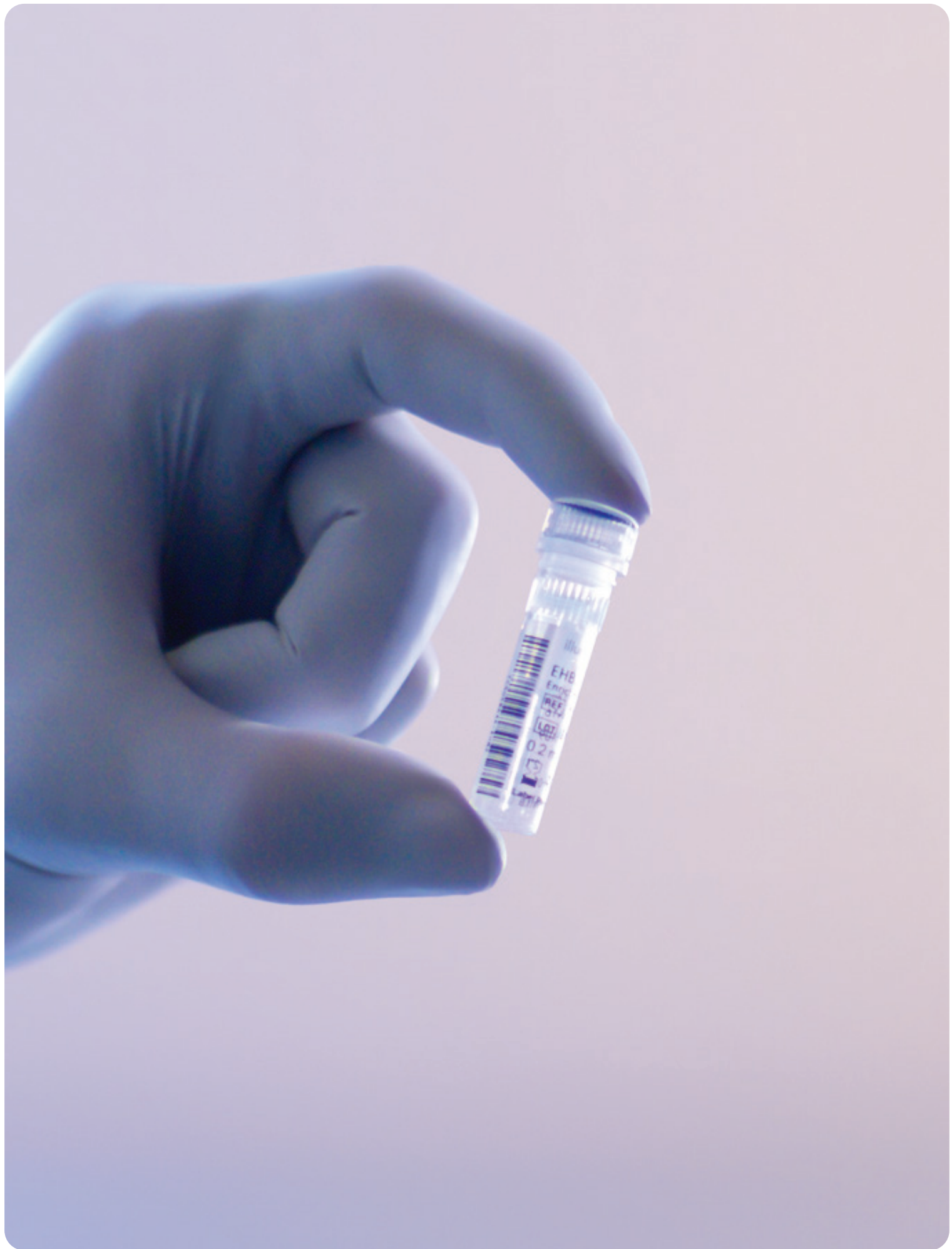


# RNAシーケンス メソッド

RNAプロファイリングのための  
イルミナソリューション  
ターゲットパネルから  
全トランスクリプトームまで



# 目次

<b>01</b>	はじめに	
	核酸抽出 .....	5
	ライブラリー調製 .....	5
	シーケンス .....	6
	データ解析 .....	7
	洞察 .....	7
<b>02</b>	メソッド1: mRNA-Seq	
	関連アプリケーション .....	8
	ステップごとの概要 .....	9
<b>03</b>	メソッド2: ターゲットRNA-Seq	
	関連アプリケーション .....	12
	ステップごとの概要 .....	13
<b>04</b>	メソッド3: トータルRNA-Seq	
	関連アプリケーション .....	16
	ステップごとの概要 .....	17
<b>05</b>	充実したサポート	
	信頼されるテクノロジー、信頼されるパートナー .....	20
	詳細はこちら .....	20
<b>06</b>	製品情報	
	ライブラリー調製 .....	21
	シーケンスシステム .....	21
	データ解析 .....	22
<b>07</b>	参考文献	
	参考文献 .....	23

# 01 はじめに

ゲノムについてより深い洞察を得るにつれて、遺伝子配列以外の要因が発達や病状などにどのように影響するかがわかってきます。何が起きているのかを真に理解するためにサイエンティストたちは、ゲノムに加えてトランスクリプトーム、エピゲノム、プロテオームを調べて包括的な答えを見つけるマルチオミクスアプローチに目を向けています。このガイドでは、トランスクリプトームを研究するための次世代シーケンサー (NGS) ワークフローに焦点を当てます。

NGSベースのRNAシーケンス (RNA-Seq) は、トランスクリプトーム全体の遺伝子発現を解析し、トランスクリプトームに関する事前の知識を必要とせずに変化を明らかにし、さまざまなRNA形式を特徴付ける非常に感度の高いメソッドを提供します。この技術は単一の実験で、転写アイソフォーム、遺伝子融合、および1塩基変異 (SNV) を見出します。<sup>1-3</sup> バルクRNA-Seqは、細胞集団内の平均RNA発現を測定する確立された方法です。NGSの初心者にとって最適なバルクRNA-Seqは、そのシンプルさとRNA-Seqが提供する情報の深さの恩恵を受けて、トランスレーショナル研究や臨床がん研究でますます使用されるようになっていきます。<sup>4</sup>

## RNA-Seqワークフローの概要

Illumina RNA-Seqワークフローは、RNA抽出、ライブラリー調製、シーケンス、およびデータ解析を統合し、トランスクリプトーム研究をサポートします (図1)。

図1: RNAシーケンスワークフロー



## 主な利点:

RNA-Seqには、qPCRや遺伝子発現アレイなどの他のRNA解析方法に比べて、次のような利点があります:

- 遺伝子発現アレイよりも広いダイナミックレンジをカバーし、より高い感度と精度を実現<sup>5</sup>
- 既知と新規の両方の特徴を捉え、リファレンスなしでトランスクリプトーム解析が可能<sup>2</sup>
- 発現プロファイリングを超えて、選択的スプライス部位、遺伝子融合、およびアレル特異的発現を検出し、トランスクリプトームの豊富なビューを提供

## ステップ1 RNA抽出

市販のRNA抽出および精製キットの多くを利用できます。特定のターゲットと特定のサンプルタイプから、可能な限り最高品質の核酸を生成するキットまたは方法を選択してください。

## ステップ2 ライブラリー調製

核酸を単離した後に核酸ライブラリーを調製します。核酸ライブラリーは、既知のオリゴヌクレオチドアダプター配列を各ストランドの5' と3' 末端に付加した類似サイズの断片の集まりで、シーケンシング用の装置にロードされます。イルミナのRNAライブラリー調製ポートフォリオは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織などさまざまなシーケンスメソッドとサンプルタイプに対応した幅広いソリューションを提供しています (表1)。イルミナRNAライブラリー調製ソリューションは、迅速で自動化に適したワークフローオプションにより、高い柔軟性、拡張性、パフォーマンスを実現し、シーケンス対応ライブラリーを1日で調製します。このガイドに記載されているRNAライブラリー調製製品はポートフォリオの代表的なものであり、利用可能なすべてのオプションを網羅している訳ではありません。最新の情報はお問い合わせください。

[RNAライブラリー調製ポートフォリオの全体情報](#)

表1: 厳選されたイルミナRNA調製キットの比較<sup>a</sup>

パラメーター	Illumina Stranded mRNA Prep	Illumina RNA Prep with Enrichment	Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus
関心分野	高品質サンプルのコーディングトランスクリプトーム	FFPEサンプルのコーディングトランスクリプトーム	ノンコーディングRNAとコーディングRNA
説明	遺伝子発現の定量、既知および未知のアイソフォームの同定、遺伝子融合の検出、アリル特異的発現の測定	特定の対象遺伝子群に絞った発現の解析、定量的な発現情報の取得、スモールバリエーションや遺伝子融合の検出	既知および新規の特徴を検出しながらの遺伝子と転写産物の測定、ターゲット化したハイブリダイゼーションにより、豊富なrRNAを除去して、トランスクリプトームの価値の高い部分に注目
作用機序	ライゲーションベースのRNAライブラリー調製前のポリA選択	タグメンテーションベースのRNAライブラリー調製とそれに続くハイブリッドキャプチャー濃縮	ライゲーションベースのRNAライブラリー調製前のrRNA除去
インプット	25~1,000 ngの高品質RNA	10 ngの高品質RNA、20 ngのFFPE RNA	1 ngの高品質RNA、10 ngのFFPE RNA
ハンズオンタイム	3時間未満	2時間未満	3時間未満
合計アッセイ時間	6.5時間	9時間未満	~7時間
自動化機能	あり	あり	あり

a. その他のRNAライブラリー調製キット情報は以下から入手可能です。 [jp.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/rna.html](http://jp.illumina.com/techniques/sequencing/ngs-library-prep/rna.html)

**ステップ3**  
**シーケンス**

ライブラリー調製が終われば、シーケンシングの準備完了です。研究テーマが何であれ、イルミナの柔軟性のあるシーケンスシステムは、シンプルなタッチパネル操作のワークフローを使用して答えを見つけるのに役立ちます (表2)。少量の情報、例えば原核生物種や小さなターゲットRNAの腫瘍学パネルに焦点を当てた研究では、MiSeq™ i100シリーズまたはNextSeq™ 1000およびNextSeq 2000システムなどのベンチトップシーケンスシステムを使用できます。大規模な研究の場合、NovaSeq™ 6000システムやNovaSeq Xシリーズのようなハイスループット装置を使用することができ、ユニークデュアルインデックスを使用して最大384サンプルをマルチプレックス化することが可能です。

表2: シーケンスシステムの選択の例



システム	MiSeq i100シリーズ	NextSeq 1000および NextSeq 2000システム	NovaSeq 6000システム	NovaSeq Xシリーズ
システムの概要	シンプルな操作と高速で柔軟なシーケンス	幅広いアプリケーションと実績のあるパフォーマンス	より深い洞察が得られる強力な発見力	驚異的なスループットと革新的な経済性
出力幅	1.5~30 Gb	10~540 Gb <sup>a</sup>	65 Gb~6 Tb	165 Gb~16 Tb
フローセルあたりのシングルリード	5~100M	100M~1.8B	800M~10B	1.6~26B
最大リード長	2 × 300 bp	2 × 300 bp	2 × 250 bp	2 × 150 bp

a. P4フローセルランに基づく最大仕様。P4フローセルはNextSeq 2000システムでのみ使用できます。

#### ステップ4

### データ解析

RNA-Seqデータは、イルミナのクラウドコンピューティングソフトウェアであるBaseSpace™ Sequence Hub およびIllumina Connected Analyticsを用いて、簡単かつ安全に転送、保存、解析できます。バイオインフォマティクスの専門知識を持たないユーザー向けには、直感的なインターフェース、簡単なランセットアップアップとモニタリング、シンプルなタッチパネル操作で二次解析ができるBaseSpace Sequence Hubが推奨されます。より高度なユーザーのために、Illumina Connected Analyticsは、高度に設定可能でスケーラブルな解析によるカスタマイズをサポートします。どちらのプラットフォームも、RNA-Seqデータの正確かつ効率的な解析のために、DRAGEN™二次解析パイプラインへのクラウド内アクセスを提供しています。

#### ステップ5

### 洞察

二次解析パイプラインからのアウトプットは、次のようなレポート作成および探索ソフトウェアに取り込むことができます：

- **Correlation Engine**—高度にキュレーションされた公開データを使用して個人のオミクスデータを解析し、データを生物学的文脈に当てはめます
- **Illumina Connected Insights**—体細胞腫瘍学研究アプリケーションにおけるバリエーションの解釈とレポート作成を効率化します
- **Partek™ Flow™**ソフトウェア—インタラクティブでカスタマイズ可能、論文に利用可能な視覚化機能を使用して、統計解析を実行しデータを探索します



## 02 メソッド1: mRNA-Seq

メッセンジャーRNAシーケンス (mRNA-Seq) では、遺伝子発現の定量、コーディングトランスクリプトーム中の既知および未知のアイソフォームの同定、アレル特異的発現の測定を、高感度かつ高精度に行うことができます。この方法では、ライブラリー調製の前に、ポリAテールを持つタンパク質コード遺伝子が選択されます。mRNA-Seqを使用してコーディングトランスクリプトームを研究することで、関心領域に関連する情報を提供するトランスクリプトームのより小さく、より管理しやすい部分に焦点を当てることができます。

### 関連アプリケーション

#### 疾患研究のための遺伝子発現プロファイリング

正常な細胞の発達と疾患のメカニズムを理解するために、研究者は、特定の組織、またはさまざまな条件に対する反応における発達中の発現差異を頻繁に調査します。mRNA-Seqは、発現レベルが低い遺伝子のプロファイリングにおいて優れたパフォーマンスを発揮します。これは、複雑な疾患の研究において、遺伝子発現プロファイルを評価するために使用されており、潜在的に治療効果のあるバイオマーカーを同定することで精密医療の進歩の基礎を築いています。<sup>6</sup>

mRNA-Seq実験から得られるデータは、複雑な疾患や細胞生物学のメカニズムに関与する遺伝子ネットワークとパスウェイについて洞察を提供してくれます。<sup>7,8</sup> たとえばトランスクリプトーム解析は、研究者が異なる病変の脳領域を比較して、アルツハイマー病 (AD) における意味のある遺伝子発現の変化を同定するのに役立ちます。<sup>7,9</sup> 発現差プロファイリングは、心不全の病因を明らかにし、心臓病を検出するための遺伝子シグネチャを同定します。<sup>10-14</sup>

#### 医薬品開発のためのバイオマーカープロファイリング

mRNA-Seqは、医薬品開発プロセスの効率と成功率を向上させることを目的として、RNAベースの薬剤反応バイオマーカーを見出し、プロファイリングするためにますます利用されるようになってきました。このアプリケーションにはさまざまなテクノロジーが使用されていますが、mRNA-Seqの機能は特に有益であると期待されています。<sup>15-17</sup>

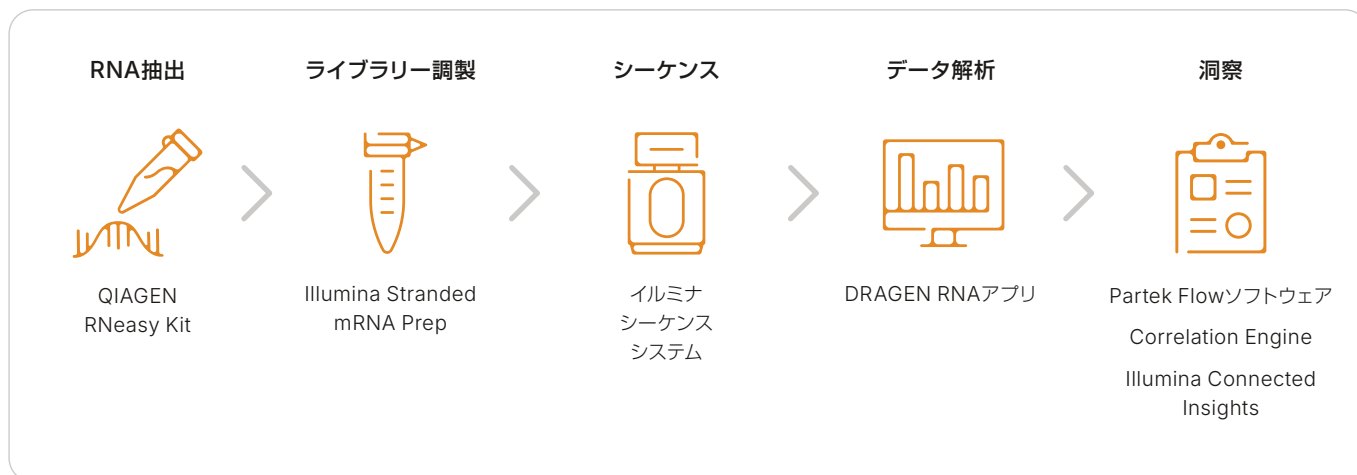
RNA解析によって検出可能な発現差異プロファイルと遺伝子融合は、有効性、副作用の発生率、薬力学、およびその他の属性を含むさまざまな応答特性と関連していることが示されています。<sup>18-21</sup> したがって、このようなバイオマーカーは、臨床試験データの解釈に情報を提供したり、試験コホートのより効率的な層別化を可能にしたり、免疫療法のためのネオアンチゲン候補を同定したりするなど、開発プロセスの複数の段階において非常に貴重なツールとなっています。<sup>22,23</sup> RNAベースのバイオマーカーは、これまで臨床試験で失敗した化合物を含むコンパニオン診断の開発基盤となる可能性もあります。



## ステップごとの概要

mRNA-Seqには5つの基本的なステップがあります：RNA抽出、ライブラリー調製、シーケンス、解析、洞察です（図2）。

図2：mRNA-Seqワークフロー。



### ステップ1

#### RNA抽出

mRNA-Seqでは、高品質のmRNAをインプットとして使用することが重要です。サンプルの種類に応じて、mRNA単離にはいくつかの市販オプションがあります。Illumina mRNA-Seqワークフローでは、QIAGEN RNeasy for RNAキットの使用が推奨されます。mRNA品質の効果的な評価は、RNAシーケンスを成功させるための重要なステップであり、平均mRNA断片サイズを測定することで実現できます。

### ステップ2

#### ライブラリー調製

Illumina Stranded mRNA Prepは、ストランド情報を正確に測定して、正確で偏りなくコードトランスクリプトームを検出します（表3）。

表3：Illumina Stranded mRNA Prepの仕様

機能	仕様
RNAインプット量	25~1,000 ngの高品質RNA
合計アッセイ時間	6.5時間
ハンズオンタイム	3時間未満

### ステップ3 シーケンス

mRNA-Seqには、いくつかのシーケンスシステムを使用できます。どれを選択するかは、アプリケーション、研究の規模、スループット要件など、いくつかの要因によって異なります (表4)。

表4: 異なるシーケンスシステムでmRNA-Seqを実施するための実験パラメーター

システム	フローセル	フローセルあたりの シングルリード	フローセルあたりの サンプル数 <sup>a</sup>	推奨される リード長
MiSeq i100 Plus システム	50M	50M	2	2 × 75 bp
	100M	100M	4	
NextSeq 1000 および NextSeq 2000 システム	P1	100M	4	2 × 75 bp
	P2	400M	16	
	P3 <sup>b</sup>	1.2B	48	
	P4 <sup>b</sup>	1.8B	72	
NovaSeq 6000 システム	SP	1.6B	64	2 × 75 bp
	S1	3.2B	128	
	S2	8.2B	328	
	S4	8-10B	384	
NovaSeq X シリーズ	10B	10B	384	2 × 75 bp
	25B	26B	384	

a. サンプルあたり25Mリードに基づきます。十分な遺伝子発現と融合遺伝子コールの大部分の使用例。  
b. フローセルは、NextSeq 2000システムでのみ使用可能です。

### ステップ4 データ解析

mRNA-Seqデータの二次解析には、RNA定量、遺伝子融合検出、スモールバリエーションコーリングを1つの統合ワークフローで実行するDRAGEN RNAパイプラインの使用を推奨しています (表5)。このパイプラインは、DRAGEN Serverを使用したオンプレミス、クラウドベースのBaseSpace Sequence HubおよびIllumina Connected Analyticsプラットフォーム、NextSeq 1000およびNextSeq 2000システムやNovaSeq Xシリーズなどの特定のシーケンスシステムに搭載された状態で利用できます。

## ステップ5 洞察

二次データ解析後、結果をCorrelation Engineに転送して、遺伝子発現変化の生物学的影響を理解することができます(表5)。Correlation Engineには、生物学的解釈に役立つ知識ベースの遺伝子セットと、数千の公開研究の結果が含まれています。RNA-Seq実験からの差分遺伝子発現データを疾患との関連性と結び付けたり、相関遺伝子を視覚化したりします。ロバストな統計アルゴリズムと情報が豊富に得られる視覚化を使用したPartek Flowソフトウェアで、さらなる洞察を得ることができます。さらにIllumina Connected Insightsを使用すると、研究アプリケーションの解釈とレポート作成を効率化できます。

表5: Illumina mRNA-Seq解析ソフトウェア

パイプライン	アプリケーション	インプット	アクセスポイント
DRAGEN RNA	参照のみのアライメントや、遺伝子融合検出を伴うアノテーション支援アライメントなど、複数の動作モードを提供します。遺伝子融合モジュールは、DRAGEN RNAスプライスアライナーを使用して、補足的な(キメラ)アライメントに対してスプリットリード解析を実行し、潜在的なブレイクポイントを検出します。	FASTQ  オプション: カスタム参照遺伝子アノテーションファイル(GTF、GFF、またはGFF3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>DRAGENサーバー</li> <li>BaseSpace Sequence Hub</li> <li>Illumina Connected Analytics</li> <li>オンボードNextSeq 1000/2000システム、NovaSeq Xシリーズ</li> </ul>
RNA-Seq解釈	mRNAからのシーケンスデータを処理して転写産物の量を推定し、サンプル間で発現が異なる転写産物を同定します	csv、txt、xlsxファイル	<ul style="list-style-type: none"> <li>Correlation Engine</li> </ul>
RNA-Seqの視覚化と統計解析	差分解析、クラスタリング、データ探索プロットを実施	tsv、csv、txt、gz、FASTQ、BAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>Partek Flowソフトウェア</li> </ul>
Illumina Connected Insights	腫瘍学研究アプリケーション向けのDRAGENソフトウェアからの合理化された解釈とレポート作成をサポート	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>VCFファイルの自動取り込み機能を備えたIllumina Connected Insights</li> </ul>



## 03 メソッド2: ターゲットRNA-Seq

ターゲットRNA-Seqは、関心のある特定の転写産物を選択してシーケンシングし、定量的情報と定性的情報の両方を提供する非常に正確な方法です。ターゲットRNA-Seqは、濃縮ベースまたはアンプリコンベースのいずれかのアプローチによって実施できます。どちらのアプローチでも、対象となる遺伝子に焦点を絞った遺伝子発現解析が可能になります。ここでは、FFPE組織を含む多くのサンプルタイプで既知および新規の遺伝子融合パートナーの両方を検出できる濃縮アッセイに焦点を当てます。

### 関連アプリケーション

#### がん研究のためのバリエーション検出

ターゲットRNA-Seqは、変異の機能的影響を直接測定する重要なツールです。平均的ながんには約46個の変異が含まれていますが、がんの発症に必要なのはわずか5~8個です。<sup>24</sup> ゲノムプロファイリングだけでは、これらのドライバー変異とパッセンジャー変異、またはがんの発症や進行に影響を与えない変異を区別するには不十分です。ターゲットRNA-Seqを使用した遺伝子発現パターンと変異の結果を測定することにより、がんの進行に重要な因子を大規模かつ偏りなく区別できるようになり、その結果より詳細で正確ながんモデリングが可能になります。

#### 呼吸器病原体の検出と特性解析

ターゲットRNA-Seqは、呼吸器病原体を迅速かつ正確に同定する効果的な方法を提供します。Illumina RNA Prep with Enrichmentとターゲット特異的なプローブパネルを組み合わせることで、呼吸器病原体のさまざまなサブセットのターゲットシーケンスが可能になります。たとえば、Respiratory Virus Oligo Panel v2は、SARS-CoV-2とその他の一般的な呼吸器ウイルスを1回のアッセイでターゲットにします。<sup>25</sup> あるいは、イルミナは、ウイルス、細菌、真菌、および関連する抗菌薬耐性 (AMR) マーカーをはじめとする約280種類の呼吸器病原体を対象とした呼吸器病原体ID/AMRパネルを提供しています。<sup>26</sup>



## ステップごとの概要

ターゲットRNA-Seqには5つの基本的なステップがあります：RNA抽出、ライブラリー調製と濃縮、シーケンス、データ解析、洞察です（図3）。

図3：ターゲットRNA-Seqワークフロー



### ステップ1

#### RNA抽出

ターゲットRNA-Seqの場合、高品質のインタクトRNAまたはFFPEサンプルから単離されたRNAをインプットとして使用できます。サンプルの種類に応じて、RNA単離にはいくつかの市販オプションがあります。インタクトサンプルに使用するにはQIAGEN RNeasy for RNAキットを、FFPE組織に使用するにはQIAGEN RNeasy FFPEの使用が推奨されます。RNAの品質の効果的な評価は、RNA-Seqを成功させるための重要なステップであり、ライブラリー調製前に平均RNA断片サイズを測定することで実現できます。

### ステップ2

#### ライブラリー調製

Illumina RNA Prep with Enrichmentは、濃縮およびインデックス化されたシーケンスライブラリーを作成する高速で統合されたワークフローを提供します（表6）。このキットは、最大限の柔軟性を実現するために、さまざまな事前構築済みプローブまたはカスタムプローブを使用して、優れた捕捉効率とカバレッジ均一性で、膨大な数のターゲット遺伝子の迅速な調査を可能にします。<sup>27</sup>

表6：Illumina RNA Prep with Enrichmentの仕様

機能	仕様
RNAインプット量	10 ngの高品質RNA、20 ngのFFPE RNA
合計アッセイ時間	9時間未満
ハンズオンタイム	2時間未満

### ステップ3 シーケンス

関心のあるターゲットを選択するために使用できるパネルが多数あります。このワークフロー例では、Illumina Exome Panelを使用してコーディングトランスクリプトームを解析することに重点を置きます。使用するシーケンスシステムは、アプリケーション、研究規模、スループット要件など、いくつかの要因によって異なります（表7）。

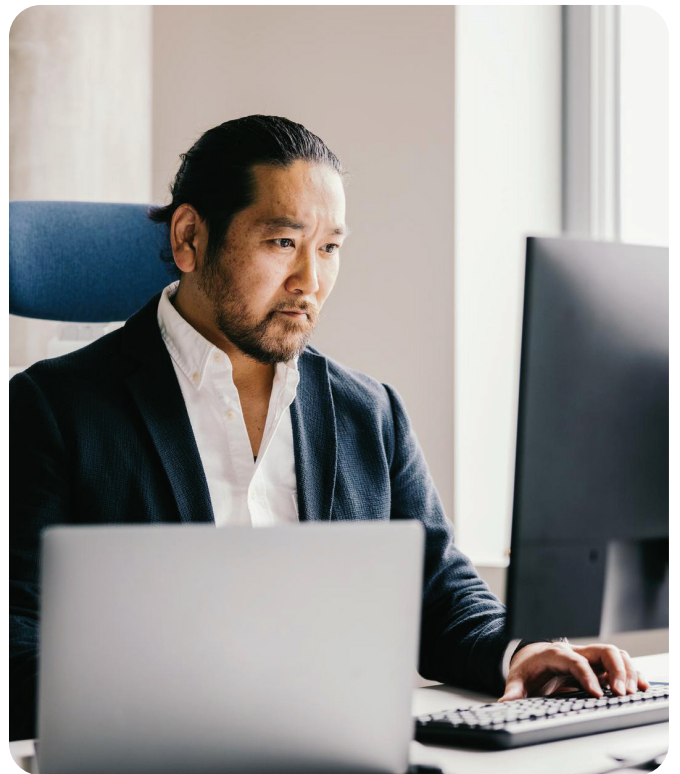
表7: さまざまなシーケンスシステムでターゲットRNA-Seqを実行するための実験パラメーター

システム	フローセル	フローセルあたりのシングルリード	フローセルあたりのサンプル数 <sup>a</sup>	推奨されるリード長
MiSeq i100 Plus システム	25M	25M	8	2 × 100 bp
	50M	50M	16	
	100M	100M	33	
NextSeq 1000およびNextSeq 2000システム	P1	100M	33	2 × 100 bp
	P2	400M	133	

a. TruSight RNA Pan-Cancer Panelを使用し、サンプルあたり3Mクラスターに基づきます。

### ステップ4 データ解析

イルミナは、DRAGEN RNAパイプラインまたはEnrichmentパネル固有の解析ワークフロー、すなわちDRAGEN Microbial Enrichment Plusの使用を推奨します（表8）。これらのパイプラインは、DRAGEN Serverを使用したオンプレミス、BaseSpace Sequence HubおよびIllumina Connected Analyticsなどのクラウドベースのプラットフォーム、特定のシーケンスシステムでのオンボードで利用できます。



## ステップ5 洞察

二次解析の後、統計解析とインタラクティブな視覚化を使用して、Partek Flowソフトウェアでデータをさらに調べます。ターゲットRNA-Seqを使用する体細胞腫瘍学アプリケーションの場合、Illumina Connected Insightsにより、RNAからのSNV、スプライスバリエーション、融合バリエーションのQC、アノテーション、解釈、キュレーションとその後のレポート作成が行えます（発現解析は将来的に提供予定）。RNAはDNAと一緒に評価することも、逐次で評価することもできます。また、どちらのオプションでも、必要に応じて結果を1つの研究レポートに統合できます。

表8: Illumina mRNA-Seq解析ソフトウェア

パイプライン	アプリケーション	インプット	アクセスポイント
DRAGEN RNA	参照のみのアライメントや、遺伝子融合検出を伴うアノテーション支援アライメントなど、複数の動作モードを提供します。遺伝子融合モジュールは、DRAGEN RNAスプライスアライナーを使用して、補足的な（キメラ）アライメントに対してスプリットリード解析を実行し、潜在的なブレイクポイントを検出します。	FASTQ  オプション: カスタム参照遺伝子アノテーションファイル (GTF, GFF, またはGFF3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>DRAGENサーバー</li> <li>BaseSpace Sequence Hub</li> <li>Illumina Connected Analytics</li> <li>オンボードNextSeq 1000/2000システム、NovaSeq Xシリーズ</li> </ul>
DRAGEN Microbial Enrichment Plus	一般的なイルミナ感染症および微生物濃縮パネル (VSP, RVEK, RPIPなど) の二次解析を行います。	FASTQ, BCL	<ul style="list-style-type: none"> <li>BaseSpace Sequence Hub</li> <li>Illumina Connected Analytics</li> <li>オンボードのMiSeq i100シリーズ</li> </ul>
RNA-Seqの視覚化と統計解析	差分解析、クラスタリング、データ探索プロットに対応	tsv, csv, txt, gz, FASTQ, BAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>Partek Flow</li> </ul>
Illumina Connected Insights	腫瘍学研究アプリケーション向けのDRAGENソフトウェアからの合理化された解釈とレポート作成をサポート	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>VCFファイルの自動取り込み機能を備えたIllumina Connected Insights</li> </ul>

## 04 メソッド3: トータルRNA-Seq

遺伝子は、タンパク質に加えて、膨大な数の非タンパク質コードエレメントをコードしており、これらは転写制御の観点から細胞がどのように組織化されるかを調整する上で重要な役割を果たしています。トータルRNA-Seqの主な強みは、トランスクリプトームの新しい機能を同定できる点にあります。NGSベースのトータルRNA-Seqは、プローブ設計の制限なしに、コーディングとノンコーディング転写産物の両方を含むトランスクリプトーム全体をシーケンシングし、コーディングと複数の形態のノンコーディングRNA活性を高分解能で塩基ごとに見ることができ、これにより、特定の瞬間における全トランスクリプトームの遺伝子発現の包括的な像が得られます。トータルRNA-Seqは、既知領域と未知領域両方を含むトランスクリプトーム全体を捕捉します。<sup>1-4</sup>

### 関連アプリケーション

#### 疾患と関連するパスウェイの発見

がんサンプルとがんではない組織との間のトランスクリプトームの差異の検証は、がんサブタイプの識別、変異の影響評価、バイオマーカーの同定およびその他の変数評価において有用であることが示されています。トータルRNA-SeqとDNAシーケンス解析およびメチル化解析を組み合わせることで、予測される臨床転帰と相関する特徴的な分子グループに髄膜腫瘍を分類することに成功し、医療治療に関する知見が得られる可能性があることが示唆されました。<sup>28</sup>

#### 治療奏効の評価

トータルRNA-Seqは、モデルシステムまたは組織検体のレトロスペクティブ研究において、新しい薬物療法に対する生物学的反応または反応の欠如に関連する遺伝子とパスウェイを同定できる可能性があります。抗PD-1免疫療法を受けている黒色腫患者の腫瘍サンプルに対するマルチオミクスプロファイリング研究の一環として、トータルRNA-Seqにより、他のバイオマーカーとともに免疫療法に対する反応の成功をロバストに予測するインターフェロンガンマ (INF $\gamma$ ) 発現パターンが同定されました。<sup>26</sup>





## ステップごとの概要

トータルRNA-Seqには5つの基本的なステップがあります：RNA抽出、リボソームRNA (rRNA) 除去（オプション）とライブラリー調製、シーケンス、データ解析、洞察です（図4）。

図4：トータルRNA-Seqワークフロー。



### ステップ1

#### RNA抽出

全トランスクリプトーム法では、高品質のRNAまたは分解サンプルをインプットとして使用できます。RNA単離キットには、サンプルの種類に応じていくつかのオプションがあります。イルミナは、細胞からのRNA抽出にはQIAGEN RNeasyを、FFPE組織からのRNA抽出にはQIAGEN RNeasy FFPEを推奨しています。RNA品質の効果的な評価は、トータルRNA-Seqを成功させるための重要なステップであり、ライブラリー調製前に平均RNA断片サイズを測定することで実現できます。

### ステップ2

#### ライブラリー調製

Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusを使用すると、低RNAインプットと低品質のサンプルから全トランスクリプトームシーケンスに対応したライブラリー調製が可能で、幅広いRNA-Seqアプリケーションをサポートします。このキットには、トランスクリプトーム解析を容易にするために、複数の生物種からのrRNAとグロビンRNAを1本のチューブで除去するためのRibo-Zero Plusが含まれています。（表9）。<sup>30</sup>

表9：Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plusの仕様

機能	仕様
RNAインプット量	1 ngの高品質RNA、10 ngのFFPE RNA
合計アッセイ時間	~7時間
ハンズオンタイム	3時間未満

### ステップ3 シーケンス

使用するシーケンスシステムは、アプリケーション、研究規模、スループット要件など、いくつかの要因によって異なります（表10）。

表10：異なるシーケンスシステムでトータルRNA-Seqを実施するための実験パラメーター

システム	フローセル	フローセルあたりの シングルリード	フローセルあたりの サンプル数 <sup>a</sup>	推奨される リード長
NextSeq 1000および NextSeq 2000 システム	P1	100M	2	2 × 100 bp
	P2	400M	8	
	P3 <sup>b</sup>	1.2B	24	
	P4 <sup>b</sup>	1.8B	36	
NovaSeq 6000 システム	SP	1.6B	32	2 × 100 bp
	S1	3.2B	64	
	S2	8.2B	164	
	S4	10B	200	
NovaSeq Xシリーズ	10B	10B	200	2 × 100 bp
	25B	26B	384 <sup>c</sup>	

a. サンプルあたり50Mリードに基づきます。  
b. P3およびP4フローセルは、NextSeq 2000システムでのみ使用可能です。  
c. イルミナインデックスに基づきます。追加インデックスを追加できます。

### ステップ4 データ解析

イルミナは、全トランスクリプトームライブラリーの二次解析にDRAGEN RNAパイプラインの使用を推奨しています。DRAGEN RNAパイプラインは、DRAGEN Serverを使用したオンプレミス、クラウドベースのBaseSpace Sequence HubおよびIllumina Connected Analyticsプラットフォーム、一部のシーケンスシステムにオンボード搭載された状態で利用できます（表11）。

ヒトの胃腸（GI）管などの複雑なマイクロバイオームサンプルからのメタトランスクリプトームの解析を含む研究では、BaseSpace Sequence HubのMicrobiome Metatranscriptomeアプリケーションが分類学および機能的プロファイリングを提供します。

## ステップ5 洞察

下流の三次解析では、DRAGEN RNAパイプラインからのアウトプットをIllumina Connected Insightsに自動的に取り込んで、バリエーションの解釈やレポート作成を行えます。結果をCorrelation Engineに転送して遺伝子発現の変化の生物学的影響についての洞察を得たり、Partek Flowソフトウェアに転送してさらに統計解析や情報豊富な視覚化を行ったりすることもできます。

表11: イルミナのトータルRNA-Seq解析ソフトウェア

パイプライン	アプリケーション	インプット	アクセスポイント
DRAGEN RNA	参照のみのアライメントや、遺伝子融合検出を含むアノテーション支援アライメントなど、複数の動作モードを提供します。  遺伝子融合モジュールは、DRAGEN RNAスプライスアライナーを使用して、補足的な(キメラ)アライメントに対してスプリットリード解析を実行し、潜在的なブレイクポイントを検出します。	FASTQ  オプション: カスタム参照遺伝子アノテーションファイル (GTF, GFF, またはGFF3)	<ul style="list-style-type: none"> <li>DRAGENサーバー</li> <li>BaseSpace Sequence Hub</li> <li>Illumina Connected Analytics</li> <li>オンボードNextSeq 1000/2000システム、NovaSeq Xシリーズ</li> </ul>
Microbiome Metatranscriptomics	マイクロバイオーム由来のRNAライブラリーの分類およびパスウェイ濃縮解析を行います	FASTQ	<ul style="list-style-type: none"> <li>BaseSpace Sequence Hub</li> </ul>
RNA-Seq解釈	mRNAからのシーケンスデータを処理して転写産物の量を推定し、サンプル間で発現が異なる転写産物を同定します	csv, txt, xlsファイル	<ul style="list-style-type: none"> <li>Correlation Engine</li> </ul>
RNA-Seqの視覚化と統計解析	差分解析、クラスタリング、データ探索プロットに対応	tsv, csv, txt, gz, FASTQ, BAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>Partek Flowソフトウェア</li> </ul>
Illumina Connected Insights	腫瘍学研究アプリケーション向けのDRAGENソフトウェアからの合理化された解釈とレポート作成をサポート	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>VCFファイルの自動取り込み機能を備えたIllumina Connected Insights</li> </ul>



## 05 充実したサポート

イルミナは、可能な限り最高のパートナーとなるよう努めています。世界的に展開しており、成功を後押しするため私たちのサポートを利用していただくことができます。テクニカルサポートは、お電話でのお問い合わせについては週5日、オンラインサポートについては24時間365日（夜間・土日祝日は英語のみでの対応）、世界中どこからでも複数の言語でご利用いただけます。近くの大都市圏から迅速な応答時間で対応します。イルミナは、成熟した世界的製造インフラによって実現できる優れた製品一貫性、供給および品質を提供します。

### 信頼されるテクノロジー、信頼されるパートナー

選ばれるNGSプラットフォームプロバイダーとして、イルミナは世界中に20,000台以上のシーケンスシステムを送り出してきました。イルミナのNGSテクノロジーは、その他すべてのNGSテクノロジーを合わせた数の5倍の42万1,000以上の査読付き論文で引用されています。<sup>31</sup> 数十年の専門知識を基に、イルミナは未来のNGS性能とアプリケーションのイノベーションと構築に絶え間なく貢献しています。

詳細はこちら

[Illumina RNA sequencing](#)



# 06 製品情報

## ライブラリー調製

製品名	カタログ番号
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (16 samples)	20040532
Illumina Stranded mRNA Prep, Ligation (96 samples)	20040534
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (16 samples)	20040536
Illumina RNA Prep with Enrichment, (L) Tagmentation (96 samples)	20040537
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (16 samples)	20040525
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus (96 samples)	20040529
Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Microbiome (96 samples)	20072063
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples) <sup>a</sup>	20091654
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set B, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples) <sup>a</sup>	20091656
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set C, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples) <sup>a</sup>	20091658
Illumina DNA/RNA UD Indexes Set D, Tagmentation (96 Indexes, 96 Samples) <sup>a</sup>	20091660
PhiX Control Kit, v3	FC-110-3001

a. A、B、C、Dセットを組み合わせると、合計384個のインデックスが使用可能です。

## シーケンスシステム

システム	カタログ番号
MiSeq i100 Plus System	20115695
NextSeq 1000 System	20038898
NextSeq 2000 System	20038897
NovaSeq 6000 System	20012850
NovaSeq X System	20084803
NovaSeq X Plus System	20084804

## データ解析

製品名	カタログ番号
BaseSpace Sequence Hub Professional Annual Subscription <sup>a</sup>	20042109
BaseSpace Sequence Hub Enterprise Annual Subscription <sup>a</sup>	15066411
Illumina Connected Analytics Professional Annual Subscription	20044876
Illumina Connected Analytics Enterprise Annual Subscription	20038994
Illumina Connected Insights–Oncology Genome Equivalent Sample – VCF	20090138
Illumina Connected Insights Starter Implementation Package	20071787
Illumina Connected Insights Expanded Implementation Package	20071787 (as scoped)
Partek Flow software	イルミナの営業担当者にお問い合わせください
Correlation Engine	イルミナの営業担当者にお問い合わせください
DRAGEN Server	20051343

a.BaseSpace Sequence Hubサブスクリプションには、解析アプリの実行やデータ保存にご利用いただける無料のiCreditsが含まれています。追加iCreditsの購入が可能です。

# 07 参考文献

- Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nat Rev Genet.* 2011;12(2):87-98. doi:10.1038/nrg2934
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10:57-63. doi:10.1038/nrg2484
- Wilhelm BT, Landry JR. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-Sequencing. *Methods.* 2009;48:249-57. doi:10.1016/j.ymeth.2009.03.016
- Wang Y, Mashock M, Tong Z, et al. Changing Technologies of RNA Sequencing and Their Applications in Clinical Oncology. *Front Oncol.* 2020;10:447. Published 2020 Apr 9. doi:10.3389/fonc.2020.00447
- Su Z, Labaj PP, Li S, et al. A comprehensive assessment of RNA-Seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. *Nat Biotech.* 2014;32:903-914. doi:10.1038/nbt.2957
- Xu J, Gong B, Wu L, Thakkar S, Hong H, Tong W. Comprehensive Assessments of RNA-seq by the SEQC Consortium: FDA-Led Efforts Advance Precision Medicine. *Pharmaceutics.* 2016;8(1):8. Published 2016 Mar 15. doi:10.3390/pharmaceutics8010008
- Crist AM, Hinkle KM, Wang X, et al. Transcriptomic analysis to identify genes associated with selective hippocampal vulnerability in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 2021;12(1):2311. doi:10.1038/s41467-021-22399-3
- Allen M, Wang X, Burgess JD, et al. Conserved brain myelination networks are altered in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *Alzheimers Dement.* 2018;14(3):352-366. doi:10.1016/j.jalz.2017.09.012
- Guennewig B, Lim J, Marshall L, et al. Defining early changes in Alzheimer's disease from RNA sequencing of brain regions differentially affected by pathology. *Sci Rep.* 2021;11(1):4865. doi:10.1038/s41598-021-83872-z
- Zhang X, van Rooij JGJ, Wakabayashi Y, et al. Genome-wide transcriptome study using deep RNA sequencing for myocardial infarction and coronary artery calcification. *BMC Med Genomics.* 2021;14(1):45. doi:10.1186/s12920-020-00838-2
- Luo X, Yin J, Dwyer D, et al. Chamber-enriched gene expression profiles in failing human hearts with reduced ejection fraction. *Sci Rep.* 2021;11(1):11839. doi:10.1038/s41598-021-91214-2
- Jain PN, Robertson M, Lasa JJ, et al. Altered metabolic and inflammatory transcriptomics after cardiac surgery in neonates with congenital heart disease. *Sci Rep.* 2021;11(1):4965. doi:10.1038/s41598-021-83882-x
- Meng Z, Chen C, Cao H, Wang J, Shen E. Whole transcriptome sequencing reveals biologically significant RNA markers and related regulating biological pathways in cardiomyocyte hypertrophy induced by high glucose. *J Cell Biochem.* 2019;120(1):1018-1027. doi:10.1002/jcb.27546
- Andersen JD, Jacobsen SB, Trudsø LC, Kampmann ML, Banner J, Morling N. Whole genome and transcriptome sequencing of post-mortem cardiac tissues from sudden cardiac death victims identifies a gene regulatory variant in NEXN. *Int J Legal Med.* 2019;133(6):1699-1709. doi:10.1007/s00414-019-02127-9
- Zhao S, Fung-Leung W-P, Bittner A, Ngo K, Liu X. Comparison of RNA-seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS ONE.* 2014;9(1):e78644. doi:10.1371/journal.pone.0078644
- Atak ZK, Gianfelici V, Hulselmans G, et al. Comprehensive analysis of transcriptome variation uncovers known and novel driver events in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003997. doi:10.1371/journal.pgen.1003997
- Kumar-Sinha C, Kalyana-Sundaram S, Chinnaiyan AM. Landscape of gene fusions in epithelial cancers: seq and ye shall find. *Genome Med.* 2015;7:129. Published 2015 Dec 18. doi:10.1186/s13073-015-0252-1
- Docking TR, Parker JDK, Jadersten M, et al. A clinical transcriptome approach to patient stratification and therapy selection in acute myeloid leukemia. *Nat Commun.* 2021;12(1):2474 doi:10.1038/s41467-021-22625-y
- Figgett WA, Monaghan K, Ng Milica, et al. Machine learning applied to whole-blood RNA-sequencing data uncovers distinct subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Transl Immunology.* 2019;8(12):e01093
- Lu L, Zhang H, Pang J, Hou G, Lu M, Gao X. ERG rearrangement as a novel marker for predicting the extra-prostatic extension of clinically localised prostate cancer. *Oncol Lett.* 2016;11(4):2532-2538. doi:10.3892/ol.2016.4282
- Perez-Gracia JL, Sanmamed MF, Bosch A, et al. Strategies to design clinical studies to identify predictive biomarkers in cancer research. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:79-97. doi:10.1016/j.ctrv.2016.12.005
- Fang B, Mehran RJ, Heymach JV, Swisher SG. Predictive biomarkers in precision medicine and drug development against lung cancer. *Chin J Cancer.* 2015;34(7):295-309. doi:10.1186/s40880-015-0028-4
- Zhao X, Modur V, Carayannopoulos LN, Laterza OF. Biomarkers in Pharmaceutical Research. *Clin Chem.* 2015;61(11):1343-1353. doi:10.1373/clinchem.2014.231712

24. Pon JR, Marra MA. [Driver and passenger mutations in cancer](#). *Annu Rev Pathol*. 2015;10:25-50. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040312
25. Illumina. Surveillance of infectious disease through wastewater sequencing Application Note. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/covidseq-wastewater-epidemiology-app-note-m-gl-00429.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/covidseq-wastewater-epidemiology-app-note-m-gl-00429.pdf). Published 2022. Accessed April 24, 2024.
26. Illumina. Rapid detection of respiratory pathogens using the MiniSeq System Application Note. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/respiratory-pathogen-panel-miniseq-app-note-m-gl-01508.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/respiratory-pathogen-panel-miniseq-app-note-m-gl-01508.pdf). Published 2023. Accessed April 24, 2024.
27. Illumina. Illumina RNA Prep with Enrichment Data Sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-rna-prep-enrichment-data-sheet-m-gl-02145.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/illumina-rna-prep-enrichment-data-sheet-m-gl-02145.pdf). Published 2023. Accessed April 24, 2024.
28. Nassiri F, Liu J, Patil V, et al. [A clinically applicable integrative molecular classification of meningiomas](#). *Nature*. 2021;597(7874):119-125. doi:10.1038/s41586-021-03850-3
29. Newell F, Pires da Silva I, Johansson PA, et al. [Multiomic profiling of checkpoint inhibitor-treated melanoma: Identifying predictors of response and resistance, and markers of biological discordance](#). *Cancer Cell*. 2022;40(1):88-102.e7. doi:10.1016/j.ccell.2021.11.012.
30. Illumina. Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribozero Plus Data Sheet. [illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembledassets/marketing-literature/illumina-stranded-total-rna-prep-data-sheet-m-gl-02148.pdf](https://illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembledassets/marketing-literature/illumina-stranded-total-rna-prep-data-sheet-m-gl-02148.pdf). Published 2020. Accessed August 20, 2024.
31. Data calculations on file. Illumina, Inc. 2022.

## イルミナ株式会社

〒108-0014 東京都港区芝 5-36-7 三田ベルジュビル 22 階  
Tel (03) 4578-2800 Fax (03) 4578-2810  
[jp.illumina.com](http://jp.illumina.com)

 [www.facebook.com/illuminakk](https://www.facebook.com/illuminakk)

販売店

本製品の使用目的は研究に限定されます。診断での使用はできません。 販売条件 : [jp.illumina.com/tc](http://jp.illumina.com/tc)

© 2024 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。  
商標および登録商標の詳細は [jp.illumina.com/company/legal.html](http://jp.illumina.com/company/legal.html) をご覧ください。  
予告なしに仕様および希望販売価格を変更する場合があります。

