PUBLICATION NOTE

myBaits®RNA-Seq Captureを利用して低発現遺伝子の転写活性を明らかにする

イントロダクション

プロトカドヘリン遺伝子は、脳の発達中における神経回路の組み立てに関与する神経表面のアイデンティティコードを確立するうえで不可欠であり、この遺伝子は確率的な転写活性化を示すことが知られています。コロンビア大学、イエール大学、ホワイトヘッド生物医学研究所、ニューヨークゲノムセンターおよびUCSFの研究者らは、Pcdhの確率的なプロモーター選択の背後にあるメカニズムを解明にするために協力して取り組みました（1）。しかしながら、Pcdh遺伝子の発現レベルが低いため、標準的なRNA-seqライブラリでそれらを検出するためには、多大なコストとバイオインフォマティクスの課題が生じました。この課題を克服するために、研究者はシーケンス前にRNA-Seq NGSライブラリからPcdh転写物を濃縮するための効率的かつ費用効果の高いソリューションとして、Arbor Biosciencesのカスタム設計されたmyBaits®ターゲットキャプチャキットを使用しました。このソリューションにより、研究者は標準的なRNA-Seqのシーケンススループットの10%のみを使用して、Pcdh転写産物を45倍以上濃縮でき、Pcdh発現の検出感度が劇的に向上しました。

Pcdh遺伝子の転写調節の重要性

脳の発生段階において、個々のニューロンの神経突起が互いに選択的に回避する能力は、神経回路の組み立てにおいて重要な役割を果たします。自己回避と呼ばれるこのプロセスは、アイデンティティコードとして機能する細胞表面のホモフィリックな認識分子のユニークな組み合わせによって媒介されます（2）。哺乳類では、このアイデンティティコードは、クラスター化されたプロトカドヘリン（Pcdh）遺伝子によって生成されます。これらの遺伝子は、3つのタンデムに配列されたα、β、およびγサブクラスターで構成され、ゲノムのほぼ1 Mbにまたがっていますが、確率論的かつコンビナトリアルなプロモーター選択のメカニズムはあまり理解されていません（3、4）。Pcdhα遺伝子のこれらの選択的なエンハンサー/プロモーターの相互作用には、CTCF/cohesinタンパク質複合体が、交互のエキソン上の二つの結合部位（CBS）に結合することが必要であることが以前観察されていました。（5）。 CBSのDNAメチル化も確率的Pcdhαプロモーター選択のメカニズムで重要な役割を果たす可能性があります（5）。しかしながら、Pcdh遺伝子プロモーターのDNAメチル化とプロモーターの選択の間の一時的な関係は不明です。

技術的課題

確率的なプロモーター選択のメカニズムを読み解くために、Canzioと同僚（1）がCellに発表した研究では、さまざまな実験条件下でのPcdhαプロモーターDNAのメチル化状態と対応する転写状態が調べられました。

この研究の主要な技術的課題の1つは、発現レベルが低いため、発現を正確に検出し、Pcdh遺伝子の転写状態の変化を評価することでした。カリフォルニア大学サンフランシスコ校の神経学UCSFウェイル神経科学研究所の准教授であるDaniele Canzio博士は、次のように説明しています。

「Pcdh遺伝子の発現レベルは一般に非常に低く、トランスクリプトーム全体のRNA-Seqを使用するとコストが高くなり、稀な転写産物を検出する感度が低くなります。 またPcdh遺伝子座はゲノムの1 Mbに及ぶため、RT-qPCRなどのレガシー技術を使用することは現実的ではありませんでした。 したがって、Pcdhトランスクリプトを検出および定量化するための効率的で信頼性が高く、費用対効果の高い方法が必要でした」– Dr. Canzio

解決法

研究チームは、神経細胞において低発現のPcdh転写産物を手頃な価格でシーケンスするために、RNA前駆体（pre-mRNA）およびメッセンジャーRNA（mRNA）からcDNAをキャプチャする、RNAプローブベースの濃縮戦略を採用しました。彼らはArbor Biosciencesを選択して、PcdhαおよびγクラスターのCBX5遺伝子座を含むカスタム設計のmyBaits®ターゲットキャプチャキットを作成しました。

結果

Canzioと同僚はmyBaits®キャプチャプロトコル（図1）に従い、直接ショットガンシーケンスのシーケンススループットの10%で、45倍を超えるPcdh RNAトランスクリプトシーケンスリードの濃縮を達成しました（スループット正規化後、470倍を超える濃縮 、図3）。 驚くべきことに、この濃縮により、SK-N-SH細胞で、デュアルCBSを含むPcdhα選択的エクソンの高レベルのアンチセンスRNA転写が明らかになりました（図2）。

「Arbor Biosciencesは、卓越した顧客サービスと専門的な科学的サポートを提供してくれたため、プロジェクトを迅速かつ円滑に進めることができました」– *Dr. Canzio*

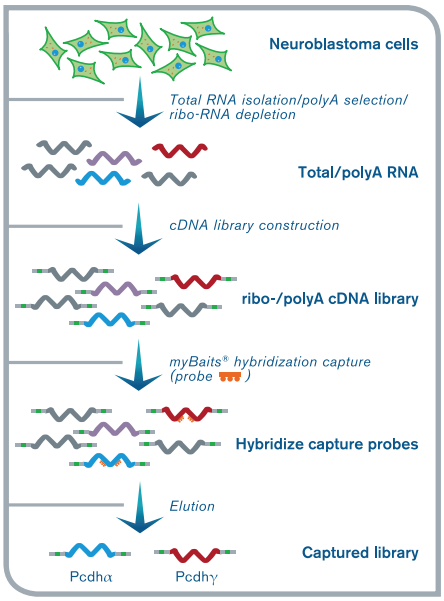

図1. myBaits®RNA-Seqキャプチャのワークフローの概要
トータルRNAの分離からシーケンスまでを示しています。 青、赤、紫のサンプルは、それぞれPcdhα, β, γ遺伝子クラスターからのRNAを示しています　灰色は残りのゲノムからのRNAを示しています。

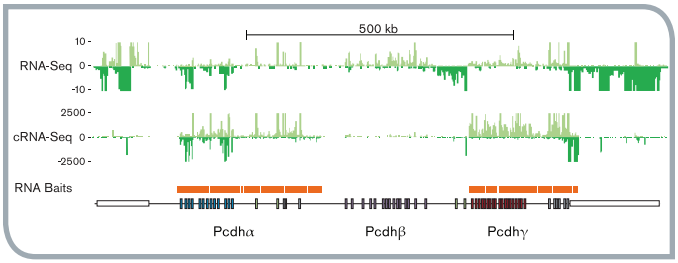

図2. PcdhαオルタナティブエクソンのアンチセンスRNAの高レベルな転写がmyBaits®RNA-Seqキャプチャによって明らかになりました。オレンジ色のバー：PcdhαおよびγクラスターのmyBaitsプローブ

Canzio博士は、「myBaits®は、カスタム設計における柔軟性と信頼性、優れたキャプチャパフォーマンス、およびインテリジェントなコスト削減を提供する、私たちが望んだ選択肢でした」と述べています。

	%Pcdhα Mapped Reads	%Pcdhγ Mapped Reads	%CBX5 Mapped Reads
Standard RNA-Seq	0.01	0.02	0.005
myBaits® RNA-Seq Capture	4.7	10.9	2.8
Fold Enrichment	470	545	560

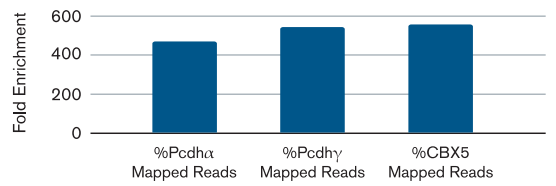

図3. 標準的なRNA-SeqとmyBaits®RNA-Seqキャプチャ間のマッピングされたリードカウントの比較 myBaits®RNA-Seqキャプチャを使用することでPcdhトランスクリプトが3桁まで濃縮が行われたことを示しています。

結論

CanzioらはLong non-coding RNAの転写とDNA脱メチル化が組み合わせられることで、クラスター化されたPcdhα遺伝子の確率的プロモーターの選択が確実になることを明らかにしました。 この研究は、確率的なプロモーター活性化の一般的なメカニズムを初めて明らかにし、それによって、確率的な遺伝子発現が起こる他のクラスター化された遺伝子ファミリーのさらなる研究の基礎を築きました。

「RNA-Seqキャプチャの進歩により、RNA-Seqを対象のゲノム領域のみにターゲティングできる安価なカスタムアッセイを設計できるようになり、低発現のPcdhα転写産物が濃縮されました。myBaits® RNA-Seqキャプチャは、これらの注目に値する発見に到達するための貴重なツールであり、Pcdh遺伝子の転写調節の理解をさらに深めることができると確信しています。」
– Dr. Canzio

引用文献

1. Canzio, D. *et al.* (2019) **Antisense lncRNA Transcription Mediates DNA Demethylation to Drive Stochastic Protocadherin α Promoter Choice.** *Cell.*
2. Zipursky S.L. *et al.* (2013) The molecular basis of self-avoidance. *Annu. Rev. Neurosci.*
3. Lefebvre J.L. *et al.* (2015) Development of dendritic form and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
4. Mountoufaris, G. *et al.* (2018) Writing, reading, and translating the clustered protocadherin cell surface recognition code for neural circuit assembly. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*
5. Guo, Y. *et al.* (2012) CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin a promoter choice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

web www.arborbiosci.com
email info@arborbiosci.com
phone 1-734-998-0751
X(twitter) @ArborBio

●お問合せ先（公認販売店）：
プライムテック株式会社
東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone: 03-3816-0851（代表）　FAX: 03-3814-5080
http://www.primetech.co.jp/ reagents@primetech.co.jp