BioSkryb GENOMICS

アプリケーションノート

単一ニューロン間のモザイク現象

Cells explored. Answers revealed.

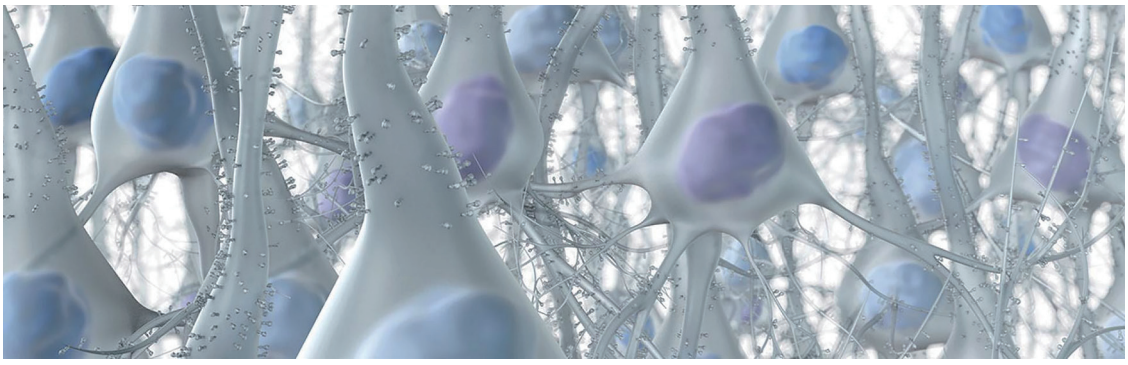
ResolveDNA全ゲノム増幅を利用した単一ニューロンでの体細胞SNVとIndelの解析

Commentary by:

Jon Zawistowski, PhD
Senior Director
Research & Development
BioSkryb Genomics

Gary Harton, PhD
Chief Science Officer
BioSkryb Genomics

個々の細胞の寿命を通じて神経細胞変異が蓄積することで、てんかん、認知症、アルツハイマー病、不安やうつ病などの神経病状の発症に関係しているとされています[1]。単一ニューロンのゲノムモザイク現象を正確な特徴付けることで、最終的に脳の発達と機能の理解に革命をもたらすかもしれません[2,3]。本稿では、著者らはPrimary Template-directed Amplification (PTA)法[4]を利用したResolveDNA全ゲノム増幅(WGA)キットを用い単一ニューロンを増幅し、ResolveDNAが提供する高いアレルバランスを利用し、独自のソフトウェア解析ツールSCAN2と組み合わせました。このバイオインフォマティクス・アルゴリズムは、脳内のシングルセルのモザイク現象を明らかにするためにPTA法と組み合わせた、新しいシングルセル計算解析ツールです。ResolveDNAは、優れた均一性で全ゲノムにわたる広範な増幅が可能なため、一塩基変異（SNV）、挿入・欠失（Indel）、構造変異、コピー数多型（CNV)[5]を検出する上で、これまでにない感度と特異性が得られます。



序論

ヒトの生命は、1つのゲノムから生まれた1つの細胞から始まり、1兆回近い細胞分裂が起こります。胚から細胞の分化が進むにつれて、多種多様な細胞型が出現し、それぞれの形質が特定の機能や仕事を持つようになります。こうした分裂や分化の過程で、娘ゲノムの複製や分裂中にエラーが生じます。脳は単一ゲノムのもとで機能するというこれまでの仮説とは対照的にヒトの脳には体細胞遺伝子多様性が広く存在しているという仮説が、最近の証拠によって裏付けられました[2,3,6,7]。

この変異を検出する能力は進歩しているものの、大きなボトルネックは次世代シーケンシング（NGS）により、単一細胞のゲノムを正確かつ均一に増幅し、そのゲノムを描出できるようにすることの難しさです。この変異を検出する能力は進歩しているものの、大きなボトルネックは次世代シーケンシング（NGS）により、単一細胞のゲノムを正確かつ均一に増幅し、そのゲノムを描出できるようにすることの難しさです。Luquetteらによって発表された論文で、単一ニューロンレベルでmultiple displacement amplification (MDA) のようなWGAのための以前の方法とPTA法を用いたResolveDNAとの比較を行いました。

この論文では、MDAはゲノム全体に不均一性をもたらし、しばしば二倍体細胞の相同染色体を異なる速度で増幅し、アレルの不均衡を引き起こすことが判明しました。 このような遺伝的変化をより正確に捉えるため、ゲノムを正確に増幅する改良法が試験されました。

シングルセルシーケンス用ResolveDNAシステムの高いアレルバランスと均一な増幅を、 次世代

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

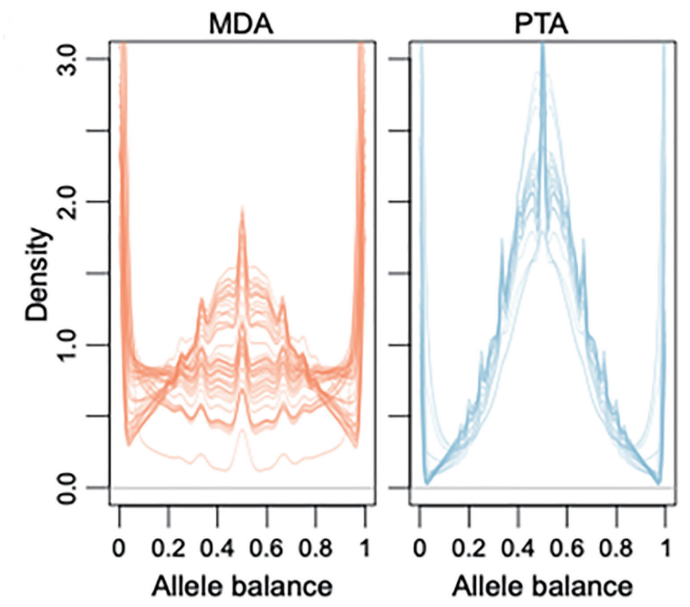


図1. PTA法でのアレルバランスの比較 それぞれのサンプルでの生殖細胞系列のSNPのアレルバランス。それぞれの線は一つのシングルセルに対応する。0.5に近い数値は相同染色体から均一に増幅したことを示し、0あるいは1に近い数値は一方のアレルがドロップアウトしたことを示す。

の計算解析ツールであるSingle Cell Analysis（SCAN2）と組み合わせることで、Luquetteらは、単一ニューロンにおける超特異的な体細胞SNVおよびIndel検出が可能であることを実証しました5。本研究では、ResolveDNAで増幅したゲノムのシングルセルシーケンスデータを用いて、クローン性また非クローン性体細胞（すなわち、単一ニューロンに限定される）SNVおよびindelをより正確に同定するために、SCAN2の開発と共に、8人の定型発達者から採取した76個の前頭前皮質単一ニューロンの全ゲノム解析とSCAN2解析を行いました。

論文で発表された単一ニューロンから得られたデータより、ResolveDNAを用いたWGA後のアレルバランスは、彼らの研究室でMDA法を用いて行われた以前の研究と比較して優れていることが明らかになりました（図1）。アレルバランスは二倍体細胞におけるアレル間の増幅の均等性を測定します。0.5に近い値は両方のアレルの増幅が成功したことを示し、0または1に近い値は一方のアレルの消失を示します。論文のデータは、ResolveDNAによって増幅されたシングルセルゲノムは、生殖細胞系列のヘテロ接合一塩基変異体について、アレルバランスが50%に近いことを示しているのと比較して、MDA法は、同時に分析された個々の細胞内および細胞間の対立遺伝子のバランスがより変化しやすいことが指摘されています。

ゲノムカバレッジの均一性をさらに明らかにするために、LuquetteらはMAPD測定法を用いて領域増幅バイアスを計算しました（図2）。0.3-0.7の範囲のバランスレベルを示した割合がMDA増幅ゲノムでは平均して37%のみだったのに対し、PTA増幅ゲノムは68%でした。著者らはまた、ResolveDNA反応における増幅失敗の割合が低いことも見出しました。いくつかのハプロタイプがほぼ完全に失われるという形で増幅失敗の証拠を示したのは、たった1つのニューロンだけでした。このデータから、ResolveDNAのMAPDはおよそ3倍減少し、カバレッジと増幅の均一性が劇的に改善されたことがわかります。

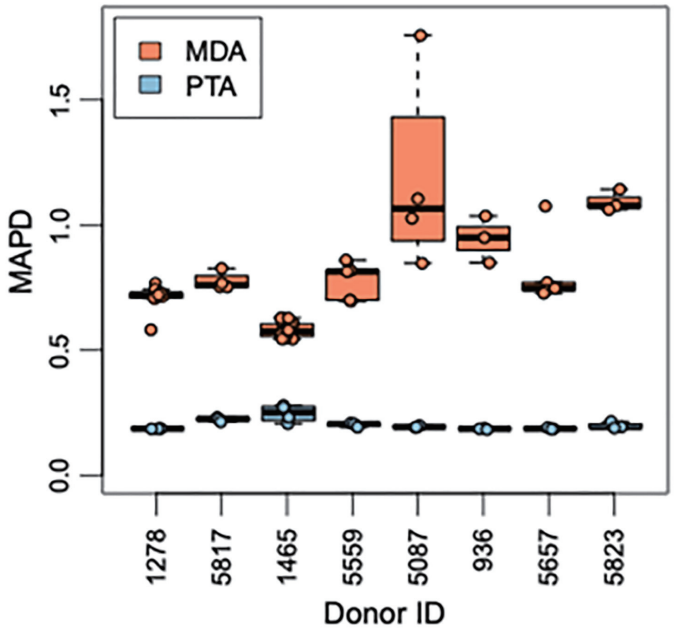


図2. PTA法でのMAPDの比較 同一サンプルから得られたMDA増幅およびPTA増幅したニューロンゲノムのMedian absolute pairwise deviation（MAPD）。低い数値は良いパフォーマンスであることを示す。MDAの平均MAPD（0.75）とPTAの平均MAPD（0.21）は、隣接する50kbウィンドウ間のリード深さの平均変動がそれぞれ68%と14%に相当する。

MDA法と比較してResolveDNAによるPTA法で得られた均一性は、単一ニューロンゲノムのCNVの測定（図3）によって向上したことが実証された。このデータは、ゲノム全体の均一性とバランスがMDA法を用いた場合よりも優れていることを示しています。このような全ゲノム増幅の均一性の向上は、脳における遺伝子モザイクの特徴付けに劇的な改善をもたらしました。具体的には、Luquetteらの論文で報告されているように、解析によって単一ニューロンにおける非クローン性体細胞変異が加齢とともに増加することが確認されたましが、この蓄積速度の推定値は年間15 SNVでした。加えて、体細胞indelもまた、ニューロン1個当たり年間少なくとも2個増加しており、これはヒトニューロンにおける体細胞SNVよりも遺伝子機能に重大な影響を与える可能性があります。

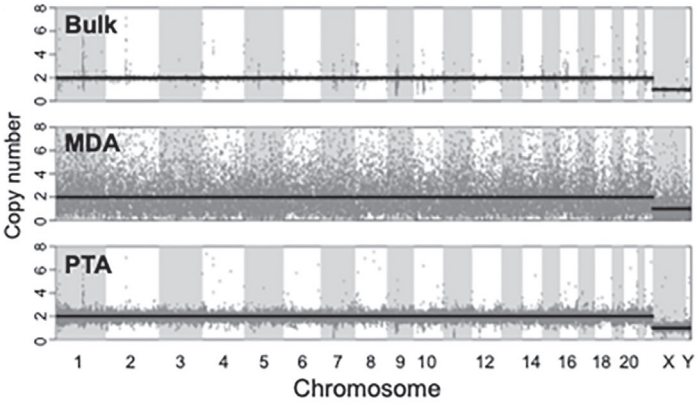


図3. PTA法でのCNV解析の比較 幼児から高齢者までの8人の脳の前頭前皮質から単一ニューロンを収集した。単一ニューロンをPTA法またはMDA法で増幅し、塩基配列を決定した。バルクゲノム（上）、MDA増幅ゲノム（中）、PTA増幅ゲノム（下）の代表的なコピー数プロファイルを示した。

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

要約

Luquetteらの論文では、ResolveDNAシングルセルゲノム増幅システムと新規に開発されたSCAN2を組み合わせることで、単一ニューロンから最高レベルの精度で一塩基変異を明らかにする能力を実証しました。このデータから、組み合わせた方法をさらに洗練させることで、神経機能障害や病理を引き起こす根本的なゲノムメカニズムの再定義をもたらす新たな生物学的仮説が導き出される可能性があることが示されました。Luquetteらの論文は、このような実験から導き出される結論に最高の信頼性を確保するためには、鋳型の増幅を行うために採用した方法と、その結果得られた次世代シーケンシングデータを解釈するプロセスの両方が重要であることを明確にしています。解析プロセスを洗練させる手法の継続的な開発は、拡大するシングルセルゲノム分野にとって不可欠であり、様々な研究分野において必須です。神経学、腫瘍学、生殖医療、マイクロバイオームの研究などが含まれますが、これらに限定されません。

参照文献：

1. Proukakis, C., Somatic mutations in neurodegeneration: An update. Neurobiol Dis, 2020. 144: p. 105021.
2. Evrony, G.D., One brain, many genomes. Science, 2016. 354(6312): p. 557-558.
3. Evrony, G.D., et al., Resolving rates of mutation in the brain using single-neuron genomics. Elife, 2016. 5.
4. Gonzalez, V., et al., Accurate Genomic Variant Detection in Single Cells with Primary Template-Directed Amplification. 2020: www.biorxiv.org. p. 1-53.
5. Luquette, L., et al., Ultraspecific somatic SNV and indel detection in single neurons using primary template-directed amplification. bioRxiv, 2021.
6. Lodato, M.A., et al., Aging and neurodegeneration are associated with increased mutations in single human neurons. Science, 2018. 359(6375): p. 555-559.
7. Muotri, A.R. and F.H. Gage, Generation of neuronal variability and complexity. Nature, 2006. 441(7097): p. 1087-93.
8. BioSkryb Genomics, i., ResolveDNA™ Whole Genome Amplification Kit For high-quality single-cell and low-input DNA amplification, in www.bioskryb.com, B. Genomics, Editor. 2021, BioSkryb Genomics: Durham, NC. USA

注意：

このアプリケーションノートは執筆時点で下記のbioRxivで公開された原稿をレビュー、また詳述しました。

LJ Luquette, MB Miller, Z Zhou, CL Bohrson, A Galor, MA Lodato, C Gawad, J West, CA Walsh, PJ Park. Ultraspecific somatic SNV and indel detection in single neurons using primary template-directed amplification. doi:https://doi.org/10.1101/2021.04.30.44203 (https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.04.30.442032v1)

本アプリケーションノート公開後、下記より出版されています。

Luquette, L.J., Miller, M.B., Zhou, Z. et al. Single-cell genome sequencing of human neurons identifies somatic point mutation and indel enrichment in regulatory elements. Nat Genet 54, 1564–1571 (2022).https://doi.org/10.1038/s41588-022-01180-2

Published by:

BioSkryb GENOMICS

2810 Meridian Parkway, Suite 110
Durham, NC 27713
www.bioskryb.com

All data on file.
For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
BIOSKRYB and RESOLVEDNA are trademarks of BioSkryb, Inc.
All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

TAS-023, 01/2022

本製品は研究用です。診断用には使用しないでください。

PRIMETECH CORPORATION

お問合せ：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

ライフサイエンス事業部　バイオ試薬ソリューション部
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
E-mail：reagents@primetech.co.jp