

CAGE : 5' RNA-seq

CAP ANALYSIS OF GENE EXPRESSION

受託解析サービス & ライブラリ作製Kit

mRNA/ncRNAを定量する新たなトランスクリプトーム解析法

ダナフォーム & 理化学研究所の共同開発技術

- mRNA/ncRNAなどの転写産物を転写開始点ごとに発現定量解析
- 発現変動が見られた転写開始点周辺領域の転写因子結合モチーフを探索
- ライブラリをPCR-freeで作製し、5'末端のみをシーケンスすることで
定量性/感度を大幅に改善 CAGE > RNA-seq
- 200万分子中の1つのRNAを99.99%の確度で検出する超高感度技術
- 機能解析に大きく貢献
 - ENCODE : NIH ヒトゲノム解析プロジェクト
 - FANTOM : 理化学研究所 国際研究フォーシアム
 - 文部科学省 : ゲノムネットワークプロジェクト

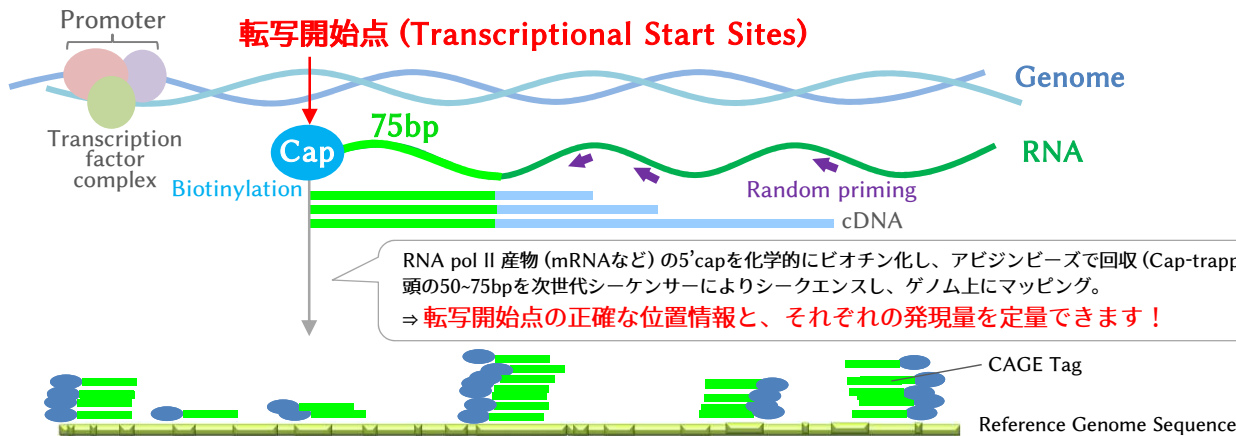
<https://cage-seq.com/jp>

CAGE - 新たなトランスクリプトーム解析法

CAGEはCap Analysis of Gene Expressionの略で、ダナフォームと理研による共同開発技術です。RNA pol II 産物のCap構造を捕捉するCap-trapper法により、RNAの5'末端の塩基配列を決定する実験手法です。この塩基配列をゲノム上にマッピングすることで、遺伝子の転写開始位置をゲノムワイドに1塩基単位で正確に同定することができます。これにより各転写物のプロモーター領域をより的確にとらえ、より綿密な発現プロファイリングが可能となります。従って、CAGEは転写のシグナル伝達のカスケードを明らかにするなど、新しい視点に立ったゲノムアノテーション研究における強力なツールとなります。

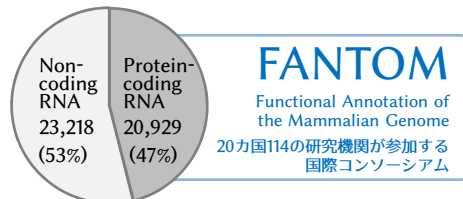
FANTOMは理研を中心に20カ国100以上の研究機関により結成された国際研究コンソーシアムです。ヒトの主要な組織、初代培養細胞、細胞株をCAGEを用いてゲノムワイドな解析を行い、201,802個のプロモーターと65,423個のエンハンサーを同定し、正常な細胞や細胞株の体系的な定義を得ることに成功しました。その役割は、トランスクリプトーム解析の分野を軸に発展・拡大しており、得られた知見を基礎・応用の両面で有用なリソースとして公開しています。

CAGEの原理



理研 FANTOM プロジェクト

| CAGE peaks within 500bp of annotated 5'-end | | Human | | Mouse | |
|---|----------------|-----------|------------|---------|------------|
| | | Peaks | Peaks/gene | Peaks | Peaks/gene |
| Robust Promoter | Coding + ncRNA | 184,827 | | 116,277 | |
| | Coding RNA | 82,150 | 4.3 | 61,134 | 3.2 |
| Permissive Promoter | Coding + ncRNA | 1,048,124 | | 652,860 | |
| | Coding RNA | 245,514 | 11.8 | 146,185 | 7.1 |



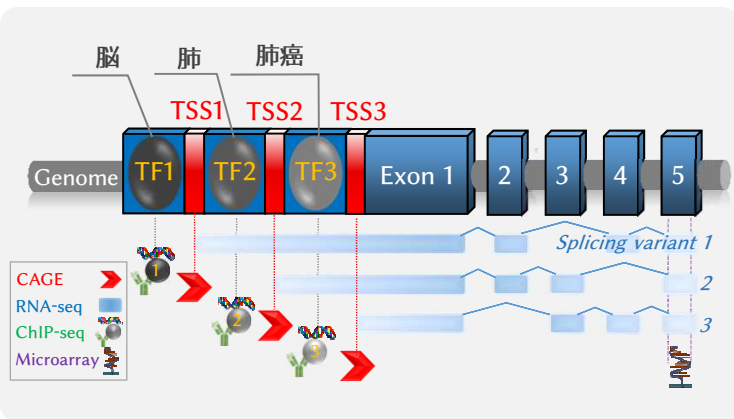
FANTOMは、ヒト1,000種・マウス400種のサンプルをCAGE解析し、TSSを184,827個、エンハンサーを43,011個同定しました。(2015年には、同201,802個、同65,423個が明らかになりました。Science 347, 1010)

RNA種約5万に対し開始点は18~100万カ所あり、1遺伝子に対し平均3~20カ所もの開始点の存在が確認されています。

Nature 2014 Mar 27; 507

CAGEであれば遺伝子を転写開始点単位で定量できる!

主な遺伝子発現解析法の比較



遺伝子単位だけではなく、**mRNAの5'末端単位 = 転写開始点単位**でも発現量を定量することができます。

1種の遺伝子に対し複数の転写因子が環境によって使い分けられている場合、それぞれを別々に定量します。

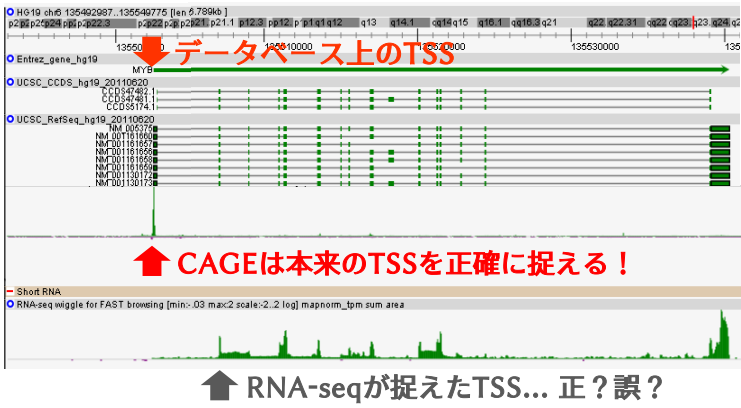
これはRNA-seqでは難しく、Microarrayでは不可能です。

| | CAGE | RNAseq | SAGE | Micro array |
|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 未知遺伝子を含むトランスクリプトーム解析 | ○ | ○ | ○ | × |
| 定量性/ダイナミックレンジ | ◎ ¹ | ○ | ○ | △ |
| プロモーター部位の同定 | ◎ | △ | × | × |
| 転写因子結合モチーフの予測 | ◎ | △ | × ² | × ² |
| Bidirectional enhancer RNAの同定 | ◎ | × | × | × |
| Alternative Exon1の同定 | ◎ | △ | × | × |
| 選択的スプライシングや融合転写物など遺伝子の構造の同定 | × | △ ³ | × | × |
| サンプル調整難易度 | △ ⁴ | ○ | ○ | ◎ |
| データ解析ツール | ○ | ○ | △ | ○ |
| 全工程にかかる解析所要期間 | △ ⁵ | △ | △ | ○ |

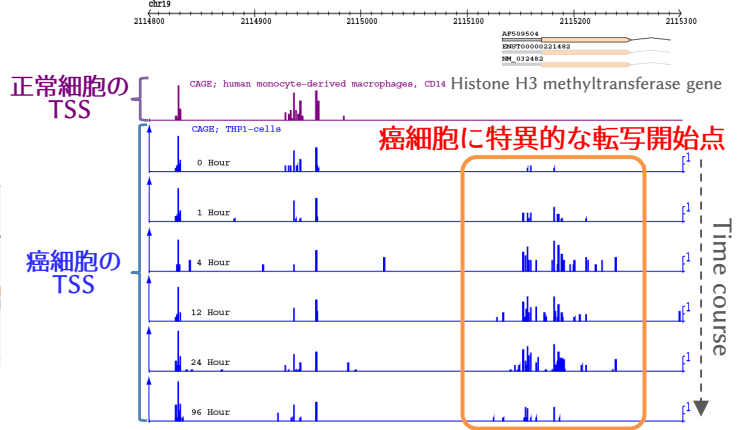
1. PCRの工程が無く、長さのバイアスも受けない
2. 5'末端はデータベース情報に依存
3. Sequence depthによる
4. 8日間の工程
5. 1-2か月

解析例 1： 遺伝子における複数の転写開始点を 1 bp の解像度で解析

■ 本来の転写開始点がクリアに分かる！



■ 新規バイオマーカー探索に有用！



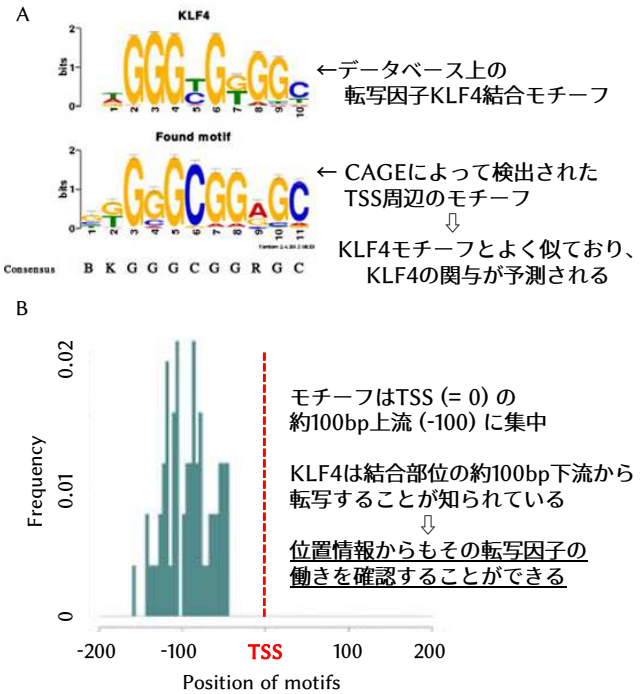
解析例 2： 発現変動遺伝子解析結果を基にTSS周辺の転写因子結合モチーフを探索

■ 間葉系幹細胞 (Control) vs 脂肪前駆細胞 (Case)

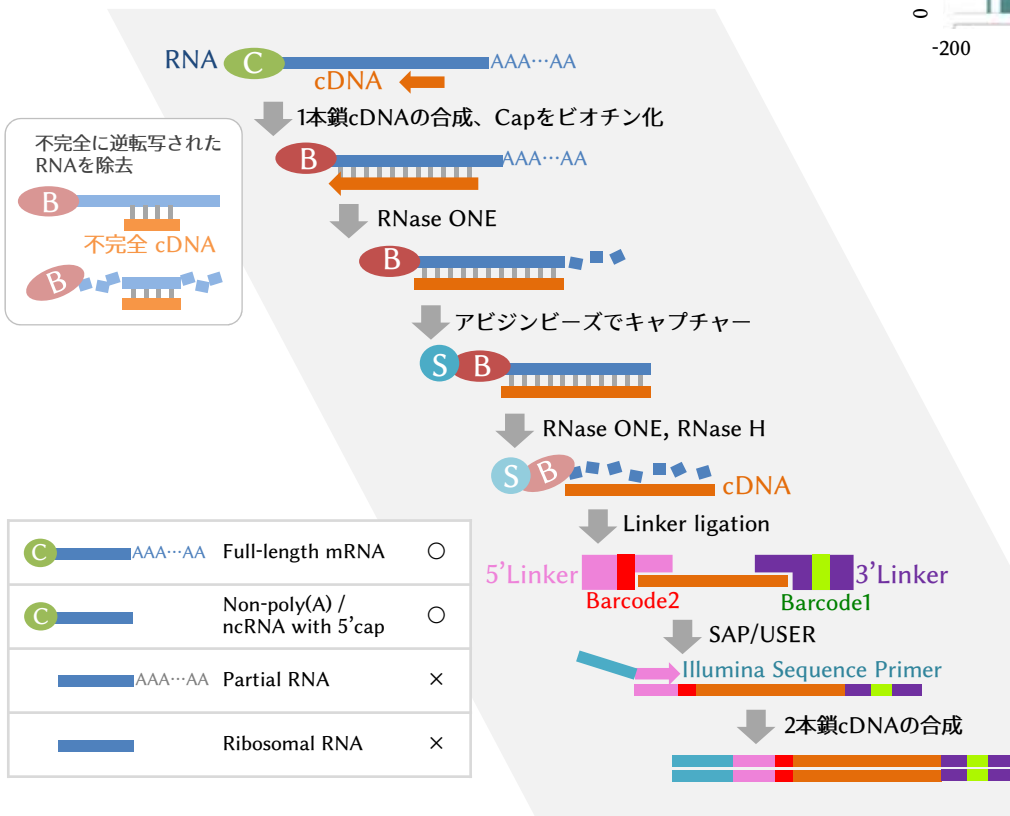
| Motif No. | Consensus Motif | Foreground : /100 | Background : /1000 | Pvalue | Known Motifs (Pvalue) |
|-----------|---------------------------------|-------------------|--------------------|----------|--------------------------|
| AMD_001 | CAACTNGCG | 27 | 51 | 1.42E-04 | NA |
| AMD_002 | GTARCNNWNSSCG | 31 | 54 | 1.32E-05 | NA |
| AMD_003 | CT | | | | NA |
| AMD_004 | ACGTNNNGNACC | 28 | 44 | 1.24E-05 | PPAR γ (9.21e-05) |
| AMD_005 | AASGNNSTCGKNNNW | 36 | 59 | 7.19E-07 | NA |
| AMD_006 | RNNNNNGCGAATAR | 24 | 51 | 1.14E-03 | NA |
| GLAM2_008 | GGGVGGCGGGGGNG GVSGGGNVVGGGV | 92 | 345 | 1.53E-06 | SP1 (2.09e-07) |

脂肪細胞分化に関する PPAR γ モチーフがヒット！
転写への関与を示唆しています

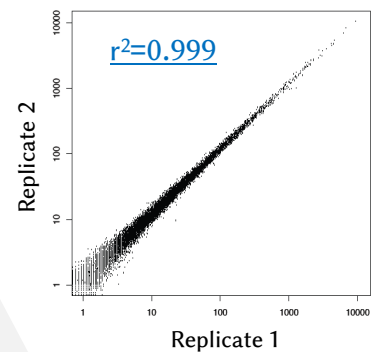
■ TSSからモチーフまでの位置を捉える！



CAGEライブラリ作製



高い再現性



CAGEの特異性

- 遺伝子の転写産物を転写開始点ごとに定量でき、ゲノムワイドにプロモーター活性を定量解析できる世界で唯一の技術です。
- 発現変動が見られた遺伝子の転写開始点周辺領域のモチーフを探索し、関与していた転写因子候補を予測できます。
- PCRの工程が無く、また5'末端で特化してシーケンスするため、RNA-seqのような遺伝子の長さによるバイアスが無く、定量性に優れます。
- 新たなRNA分子(mRNA, lncRNA, enhancerRNAなどのncRNA)やプロモーターを発見できます。
- 200万のRNA分子から1つのRNAを99.99%の確度で検出できる高感度技術です。
- 大規模、高速の解析を低コストで実現できます。

主な論文

- **Analysis of the human monocyte-derived macrophage transcriptome and response to lipopolysaccharide provides new insights into genetic aetiology of inflammatory bowel disease.**
Baillie JK et al. PLoS Genet. 2017 Mar 6;13(3):e1006641. doi: 10.1371/journal.pgen.1006641.
- **An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends.**
Hon CC et al. Nature. 2017 Mar 9;543(7644):199-204. doi: 10.1038/nature21374. Epub 2017 Mar 1.
- **Single-Nucleotide Resolution Mapping of Hepatitis B Virus Promoters in Infected Human Livers and Hepatocellular Carcinoma.**
Altinel K et al. J Virol. 2016 Nov 14;90(23):10811-10822. Print 2016 Dec 1.
- **Novel biomarkers that assist in accurate discrimination of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung.**
Takamochi K et al. BMC Cancer. 2016 Sep 29;16(1):760.
- **Reduced expression of APC-1B but not APC-1A by the deletion of promoter 1B is responsible for familial adenomatous polyposis.**
Yamaguchi K, et al. Science Rep. 2016 May 24;6:26011. doi: 10.1038/srep26011.
- **Transcriptional, epigenetic and retroviral signatures identify regulatory regions involved in hematopoietic lineage commitment.**
Romano O, et al. Science Rep. 2016 Apr 20;6:24724. doi: 10.1038/srep24724.
- **A predictive computational framework for direct reprogramming between human cell types.**
Rackham OJ, et al. Nat Genet. 2016 Mar;48(3):331-5. doi: 10.1038/ng.3487. Epub 2016 Jan 18.
- **Large-scale profiling of signalling pathways reveals an asthma specific signature in bronchial smooth muscle cells.**
Alexandrova E, et al. Oncotarget. 2016 Feb 5. doi: 10.18632/oncotarget.7209.
- **Enhanced Identification of Transcriptional Enhancers Provides Mechanistic Insights into Diseases.**
Murakawa Y, et al. Trends Genet. 2016 Feb;32(2):76-88. doi: 10.1016/j.tig.2015.11.004. Epub 2016 Jan 15. Review.
- **Expression Specificity of Disease-Associated lncRNAs: Toward Personalized Medicine.**
Nguyen Q, et al. Curr Top Microbiol Immunol. 2016;394:237-58. doi: 10.1007/82_2015_464.
- **DeepCAGE Transcriptomics Reveal an Important Role of the Transcription Factor MAFB in the Lymphatic Endothelium.**
Dieterich LC et al. Cell Rep. 2015 Nov 17;13(7):1493-504.
- **Nuclear transcriptome profiling of induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells identify non-coding loci resistant to reprogramming.**
Fort A, et al. Cell Cycle. 2015;14(8):1148-55. doi: 10.4161/15384101.2014.988031.
- **Transcribed enhancers lead waves of coordinated transcription in transitioning mammalian cells.**
Arner E, et al. Science 2015 Feb 27;347(6225):1010-4. doi: 10.1126/science.1259418.
- **A promoter level mammalian expression atlas.**
FANTOM Consortium and the RIKEN PMI and CLST(DGT), et al. Nature 2014 Mar 27;507(7493):462-70. doi: 10.1038/nature13182.
- **An atlas of active enhancers across human cell types and tissues.**
Andersson R, et al. Nature 2014 Mar 27;507(7493):455-61. doi: 10.1038/nature12787.
- **Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance.**
Fort A et al. Nature Genetics. 2014 Jun;46(6):558-66.

and many others...

提供サンプル条件

| サンプル | | Total RNA |
|------------|-----------|---------------|
| Total RNA量 | | > 3 µg *1 |
| 濃度 | | 0.1 - 1 µg/µL |
| 純度 | A260/A280 | > 1.8 *2 |
| | A260/A230 | > 1.8 *2 |
| RIN | | > 7.0 |

*1 Total RNA量が少量でもご対応可能な場合もございますのでご相談ください。

*2 純度が満たない場合は当社でカラム精製し、改善することもございますのでご相談ください。

納品物

- シーケンスデータ (塩基配列情報、クオリティ情報)
- マッピングデータ (リファレンスゲノムにマップされた配列情報と位置情報)
- CTSS (CAGE Transcription Start Sites) 情報
- 遺伝子発現情報 (ノーマライズした発現量、結果の信頼性を示す情報)
- 遺伝子発現比較解析結果 (比較対象との差異量情報、相関図など)
- 報告書 (サンプル、シーケンスライブラリ、シーケンスの品質情報、解析結果の説明文書)

NGSシーケンシング

| NGS | HiSeq 2500 / NextSeq |
|---------|---------------------------|
| 推奨サンプル数 | 6 ~ 16 mix / レーン |
| 平均データ量 | 1,000万 ~ 1,500万リード / サンプル |
| シーケンス | 50 bp / 75 bp Single-end |
| データ解析 | 国立遺伝学研究所のフリー解析パイプラインでも可能* |
| 納期 | 1 ~ 2.5ヵ月 |

* http://cell-innovation.nig.ac.jp/index_en.html

価格

■ CAGE解析受託サービス (★解析費用込み)

| サンプル数 | 価格 (税別) |
|---------|------------------|
| 1 - 6 | 150,000 円 / サンプル |
| 7 - 11 | 130,000 円 / サンプル |
| 12 - 23 | 110,000 円 / サンプル |
| 24 - | 90,000 円 / サンプル |

■ CAGE Library Preparation Kit *

| 数量 | 価格 (税別) | Cat. No |
|---------|-------------|----------|
| 8 サンプル | 200,000 円 | 52003-08 |
| 48 サンプル | 1,200,000 円 | 52003-48 |

*Kitの他に、逆転写酵素、品質チェック用の試薬 (BioAnalyzer用のチップやqPCR用の試薬など) が必要となります。



株式会社ダナフォーム

〒230-0046 神奈川県横浜市鶴見区小野町75-1 LVP2-108
TEL 045-510-0607 FAX 045-510-0608
E-mail : order@dnaform.jp