

次世代シーケンス(NGS)に関するお役立ち情報をお届けします。

今号のポイント: ドロップレットベース(3'エンド)法ではカバーできない解析を、完全長シーケンスが可能なSMART-Seq® v4で補完することで、より完全なシングルセルRNA-Seqが可能となりました。

【キーワード】 シングルセル(sc)RNA-Seq、SMART-Seq® v4、遺伝子アイソフォーム解析

SMART-Seq® v4による遺伝子アイソフォームの解析

■ 背景

細胞集団を一度にまとめて解析するバルクNGS解析は、希少な細胞型の重要な生物学的現象が見えにくくなることから、多くの研究者は、個々の細胞がシステム全体の複雑な生物学にどのように貢献しているかをよりよく理解するために、シングルセルNGS解析、すなわちscRNA-Seqに注目するようになった。

scRNA-Seqにおいて、ドロップレットベースの手法は、解析可能な細胞数が多いため多くの研究者に使用されているが、その手法だけではシングルセルデータセットを完全に理解するためには十分ではない。最近、タカラバイオがインタビューしたCalifornia Institute of TechnologyおよびAllen Institute of Brain Scienceの研究者グループは、完全長シーケンスが可能なSMART-Seq® v4により、ドロップレットベースの手法では難しい遺伝子アイソフォームの解析を行い、マーカーを発見しアイソフォームアトラスを作成した(Booeshaghi *et al.* 2020)。今号では、SMART-Seq® v4によるアイソフォームの解析を簡単に紹介する。

■ SMART-Seq® v4による手法とドロップレットベース手法の比較

著者らは、先ずBICCN(BRAIN Initiative Cell Census Network)の既存マウス一次運動野(MOp)サンプルのscRNA-Seqデータを調査した。SMART-Seq® v4による手法(6,160細胞)と、10x Genomics社Chromium(10xv3)(90,031細胞)を使用した手法のいずれにおいても、幅広い種類の細胞型の特定ができた(Figure 1、パネルa)。10xv3の3'エンドテクノロジーでは解析できる細胞の数が多いため、いくつかの希少な細胞型の識別ができるが、細胞のカバレッジが低い。一方、SMART-Seq® v4による手法は、より高い感度と完全長転写産物のプローブがあるため、3'エンド法ではできないアイソフォーム特異的のマーカーを発見することができた(Data not shown: 詳しくは論文中のExtended Data Figure2: b, cを参照)。

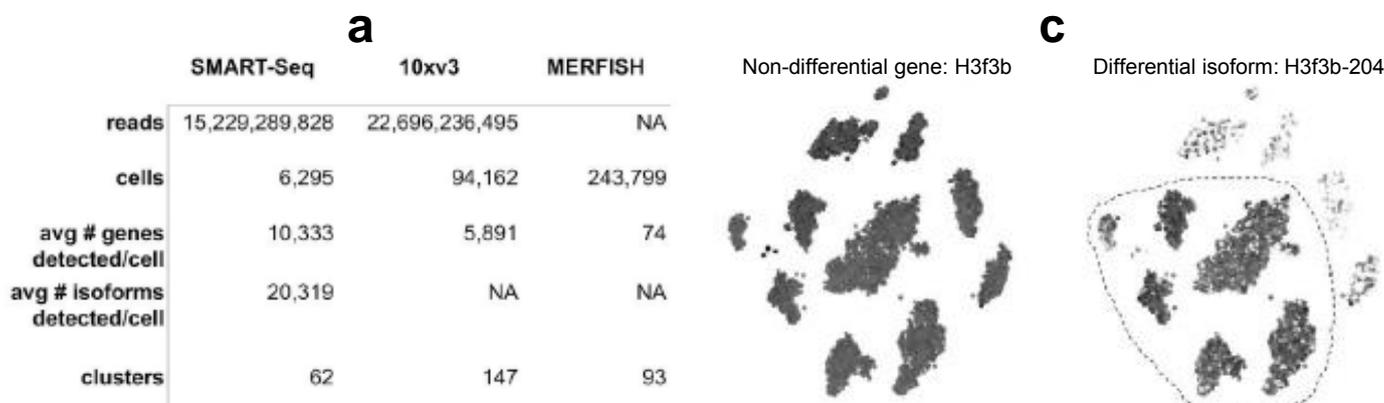


Figure 1. Isoform specificity in the absence of gene specificity. Panel a. Overview of data analyzed. Panel c. The *H3f3b* gene abundance distribution across cells (left) and *H3f3b-204* isoform distribution across cells (right). Image and caption adapted from Figure 1 of Booeshaghi *et al.* 2020 (some panels not shown) and used under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



裏面につづく ➡

■ アイソフォームアトラス

著者らはSMART-Seq[®] v4で決定された2種類のニューロン(グルタミン酸作動性とGABA作動性)にあるアイソフォームの存在量の差異分析に注目した。2種類の細胞において260遺伝子が安定的に発現され、312のアイソフォームマーカーが観察された。その中のH3f3b遺伝子では、アイソフォームH3f3b-20がグルタミン酸作動性ニューロンに高く発現しているが、GABA作動性ニューロンでの発現は低いことが示された(Figure 1、パネルc)。著者らは、「ドロップレットベース手法による遺伝子レベルの分析では、このアイソフォームの変化は見えない」と述べている。SMART-Seq[®] v4によるアイソフォームの定量化、セルサブクラスおよびクラスター分布は、すべて10xv3データとの比較によりvalidateされた。これらのデータを組み合わせることで、MOpのアイソフォームアトラスの開発が可能となった(Figure 2)。

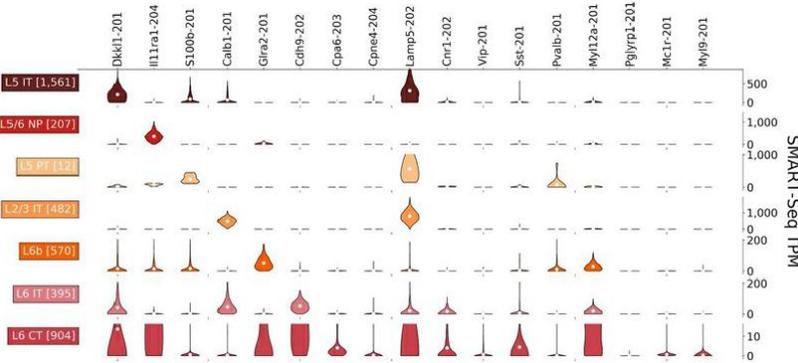


Figure 2. Isoform atlas.

A sample from an isoform atlas displaying isoform markers differential with respect to subclasses. Each row corresponds to one subclass, and each column corresponds to one isoform. SMART-Seq isoform abundance estimates are in TPM units, and each column is scaled so that the maximum TPM is four times the mean of the isoform specific for that row's cluster. Image and caption adapted from Figure 2 of [Booeshaghi et al. 2020](#) (some panels not shown) and used under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](#).

■ まとめ

アリストテレスはかつて“The whole is greater than the sum of its parts.”と述べたが、今号で示した解析アプローチは、いくつかの異なるテクノロジーを使用することにより、1つの手法だけを用いる場合よりもはるかに高度な研究結果を得ることができた優れた例である。scRNA-Seqに関する、著者からのコメントを以下に紹介する。

“SMART-Seqテクノロジーは、ドロップレットベース手法の競合ではなく、補完手法とみなすべきである。私たちは、ドロップレットベースのscRNA-Seqにより細胞型を特定し、そしてさらにSMART-Seq[®] v4を通してアイソフォームを解析するワークフローを推奨する。”

<参考文献>

Booeshaghi, A. S. et al. Isoform cell type specificity in the mouse primary motor cortex. *bioRxiv* 2020.03.05.977991 (2020).

◆ 完全長遺伝子解析を可能にするcDNA合成キット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SMART-Seq [®] v4 Ultra [®] Low Input RNA Kit for Sequencing	12回	634888	¥267,800
	24回	634889	¥494,400
	48回	634890	¥803,400
	96回	634891	¥1,236,000
	192回	634892	¥2,060,000
	480回	634893	¥4,923,400
	960回	634894	¥5,500,000

注) 断片化とライブラリー調製のために、イルミナ社Nextera XT DNA Sample Prep KitおよびNextera XT Index Kitが別途必要です。

<関連製品> cDNA合成に加え、ライブラリー調製キットとUnique Dual Index Kitを含む“完璧”なキット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
SMART-Seq [®] v4 PLUS Kit	48回	R400752	¥888,000
	96回	R400753	¥1,386,000

・インデックスの種類は、48回、96回用がそれぞれ48種類、96種類です。

・イルミナ社とは、Illumina, Inc. (本社: 米国カリフォルニア州サンディエゴ) の日本法人であるイルミナ株式会社 (本社: 東京都港区) をいいます。
 ・本チラシで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
 ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。・本チラシに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。
 ・本チラシ記載の価格は2020年7月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2020年7月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店