



# CAGE

5' RNA-seq 受託解析サービス

## mRNA/ncRNAを定量する 新たなトランスクリプトーム解析法

### mRNA/ncRNAなどの発現を転写開始点ごとに定量解析

- ✓ PCR-freeのライブラリでRNA-seqと比べ大幅に定量性／感度が向上
- ✓ 5'末端のみのシーケンスで転写産物長によるバイアスが無い解析を実現
- ✓ 転写開始点周辺の転写因子結合モチーフを高効率に探索可能
- ✓ 新規遺伝子発現ネットワーク探索や遺伝子の機能解析に大きく貢献

### ダナフォーム & 理化学研究所の共同開発技術

- 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コンソーシアム
- 文部科学省: ゲノムネットワークプロジェクト

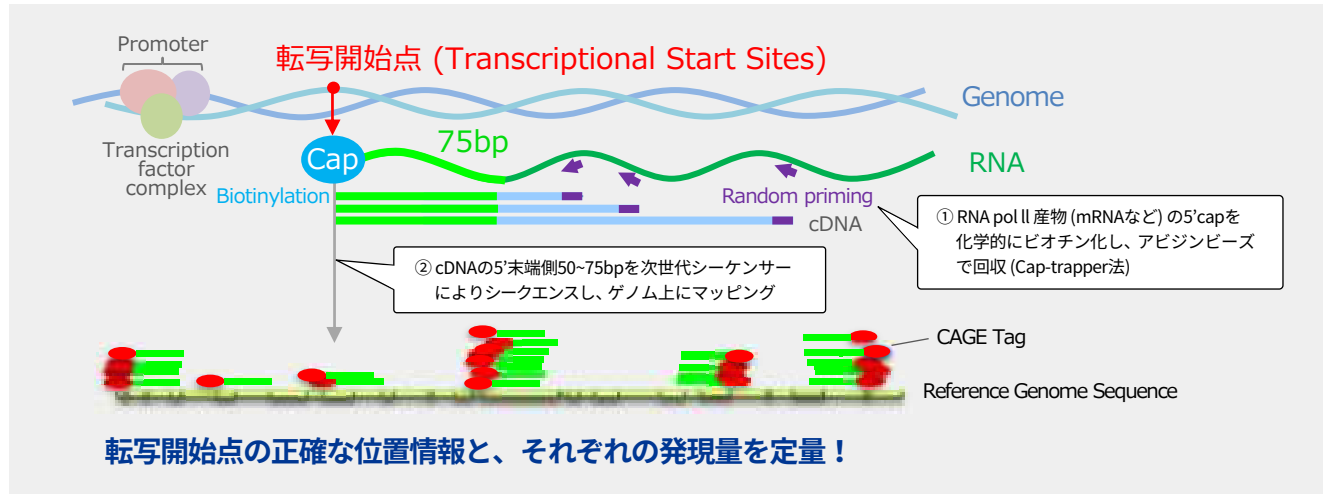
<https://cage-seq.com/jp>



# CAGE: 転写開始点をとらえるトランスクリプトーム解析

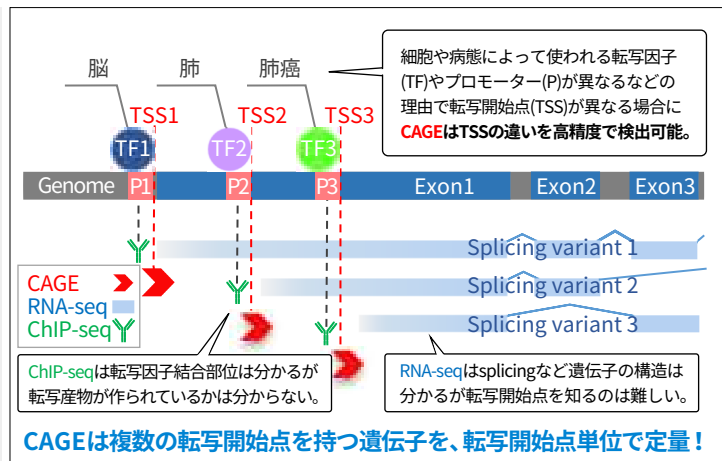
CAGE(Cap Analysis of Gene Expression)は、RNAポリメラーゼII産物のCap構造を捕捉するCap-trapper法によりRNAの5'末端の塩基配列を決定、ゲノム上にマッピングする技術です。転写開始点の位置を1塩基単位、かつゲノムワイドに同定することで、各転写産物のプロモーター領域や発現量を的確にとらえた発現プロファイルを可能にします。

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の強力なツールとなります。



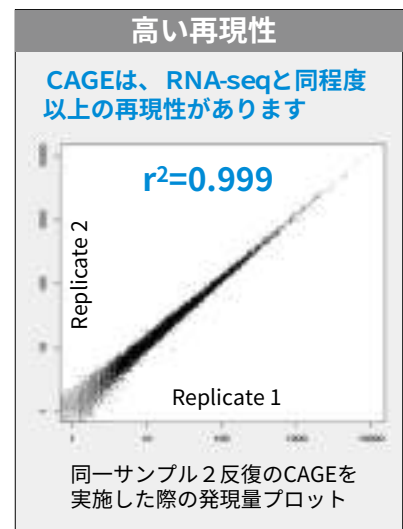
## CAGEと主な遺伝子発現解析の違い

- 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る場合、その識別は**RNA-seqでは困難、マイクロレイでは不可能です**。CAGEはそれらを個別に定量可能です。
- Cap構造を持つRNA分子のみを回収、5'末端の配列を決定するため、**CAGEには配列長依存性がありません**。
- CAGEは転写開始点単位で発現量を定量するため、複数の転写因子が発現させる遺伝子の場合、**RNA-seqより正確性・定量性に優れています**。
- CAGEはスプライシングや融合転写物の解析など、**遺伝子構造の同定には適しません** (これらの用途にはRNA-seqをお勧めします。当社での受託も可能です)



主要な遺伝子発現解析法の比較	CAGE	RNA-seq	SAGE	Micro array	ChIP-seq
未知遺伝子を含むトランスクリプトーム解析	○	○	○	×	△
発現量の定量性/ダイナミックレンジ	◎ <sup>1</sup>	○	○	△	×
プロモーター部位の同定	◎	△	×	×	○
転写因子結合モチーフの予測	◎	△	× <sup>2</sup>	× <sup>2</sup>	◎
Bidirectional enhancer RNAの同定	◎	×	×	×	×
Alternative Exon1の同定	◎	△	×	×	×
選択的スプライシング、融合転写物等遺伝子の構造の同定	×	△ <sup>3</sup>	×	×	×
サンプル調整難易度	△ <sup>4</sup>	○	○	◎	△
データ解析ツール	○	○	△	○	○
全工程にかかる所要期間	△ <sup>5</sup>	△	△	○	△

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

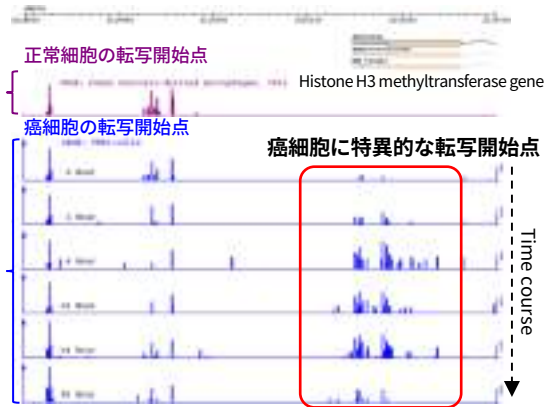


# 解析例 1 遺伝子の複数の転写開始点を1 bpの解像度で解析

## 例1. 本来の転写開始点がクリアに分かる！



## 例2. 新規バイオマーカー探索に有用！



# 解析例 2 転写開始点周辺の転写因子結合モチーフの探索

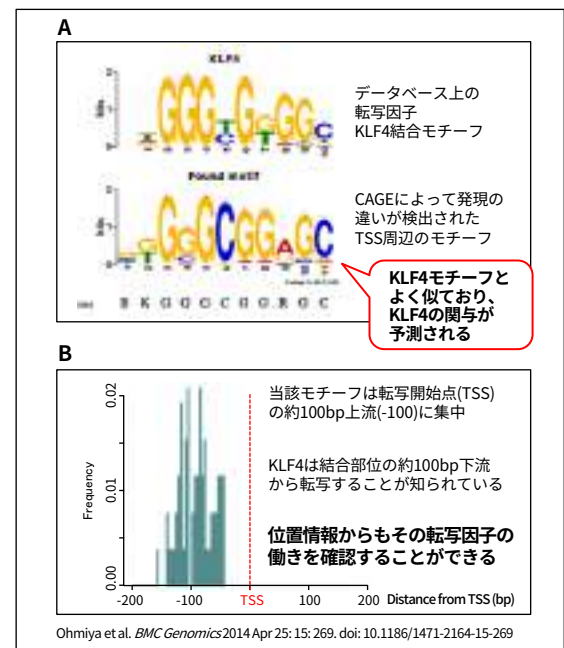
## 例1. 細胞間で発現が異なる転写開始点の近傍モチーフ探索

間葉系幹細胞(Control)と脂肪前駆細胞(Case)でCAGE発現に違いが見られた転写開始点の近傍で見つかった転写因子結合モチーフ候補

Motif No.	Consensus Motif	Foreground: /100	Background: /1000	P value	Known Motifs (P value)
AMD_001	CAACTNGCG	27	51	1.42E-04	NA
AMD_002	GTARCNNWNSSCG	31	54	1.32E-05	NA
AMD_003	CTTCARNNNNGCA	36	108	4.77E-03	NA
AMD_004	ACGTNNNGNNACC	28	44	1.24E-05	PPARγ (9.21e-05)
AMD_005	AASGNNSTCGKNNNW	36	59	7.19E-07	NA
AMD_006	RNNNNNGCGAATAR	24	51	1.14E-03	NA
GLAM2_008	GGGVGGCGGGGNGG VSGGGNWWGGGV	92	345	1.53E-06	SP (2.09e-07)

脂肪細胞分化に関与するPPAR $\gamma$ モチーフがヒット！  
転写への関与を示唆

## 例2. TSSからモチーフまでの位置をとらえる！

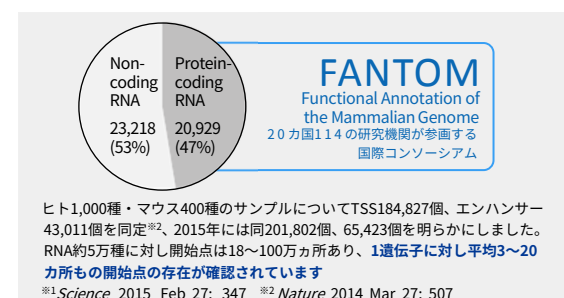


# 理化学研究所FANTOMプロジェクト

20カ国、100以上の研究機関が参加する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を用いて解析し、201,802個のプロモーターと65,423個のエンハンサーを同定することに成功しました<sup>\*1</sup>。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 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

Nature 2014 Mar 27; 507より



# CAGEを用いた主な論文

- Promoter-level transcriptome in primary lesions of endometrial cancer identified biomarkers associated with lymph node metastasis.**  
Yoshida E, et al. *Sci. Rep.* 2017 Oct 26;7:14160. doi: 10.1038/s41598-017-14418-5.
- 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.
- 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.
- 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. *Sci. Rep.* 2016 May 24;6:26011. doi: 10.1038/srep26011.
- 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.
- 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.
- Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance**  
Fort A, et al. *Nat. Genet.* 2014 Jun 28;46:558-566. doi:10.1038/ng.2965.
- Two independent transcription initiation codes overlap on vertebrate core promoters.**  
Haberle V, et al. *Nature* 2014 Mar 20; 507(7492):381-385. doi: 10.1038/nature12974.
- Tiny RNAs associated with transcription start sites in animals.**  
Taft RJ, et al. *Nat. Gen.* 2009 Apr 19;41(5): 572-578. doi:10.1038/ng.312.

## 基本サービス

### 1. ご依頼 (受付サンプル)

サンプル	Total RNA
Total RNA量	> 3µg ※1
濃度	0.1-1.0 µg/ µl
純度 ※2	A260/A280 > 1.8
	A260/A230 > 1.8
RIN	> 7.0

※1 Total RNA量が少量でも対応可能な場合もございます。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することで改善する場合もございます。ご相談ください。

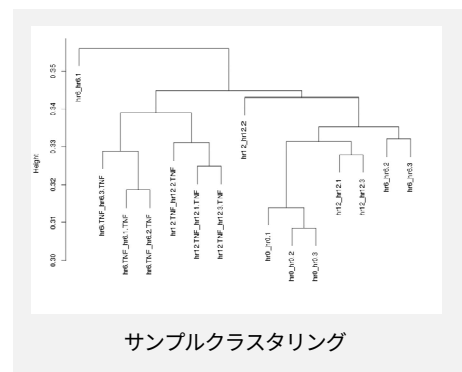
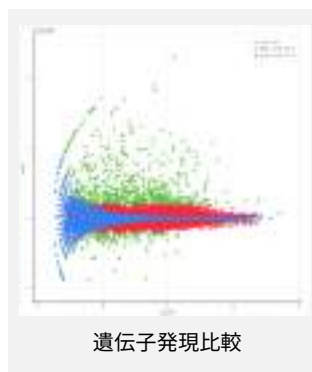
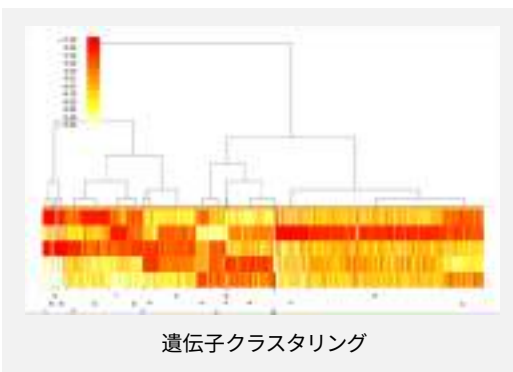
### 2. ライブラリ作成・NGSシーケンス

NGS	HiSeq 2500/NextSeq
推奨サンプル数	6~16mix/レーン
平均データ量	1,000~1,500万リード/サンプル
シーケンス	50bp/75bp 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

※[http://cell-innovation.nig.ac.jp/index\\_en.html](http://cell-innovation.nig.ac.jp/index_en.html)

### 3. データ解析・納品 (納期1~2ヵ月)

シーケンシングデータ (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、転写因子結合モチーフ探索の結果など)
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)、手引書



## 価格

### CAGE解析受託サービス (解析費用込み)

サンプル数	価格
1-23 サンプル	110,000円/サンプル (税込121,000円)
24 サンプル以上	90,000円/サンプル (税込99,000円)

### CAGE Library Preparation Kit

数量	価格	Cat. No.
8 サンプル	200,000円 (税込220,000円)	52003-08
48 サンプル	1,000,000円 (税込1,100,000円)	52003-48

※逆転写酵素、品質チェック用試薬 (BioanalyzerのチップやqPCR用の試薬等) は別途ご用意ください。

## 株式会社ダナフォーム

〒230-0051 神奈川県横浜市鶴見区鶴見中央 2-6-29

アスク・サンシビル 3F

TEL : 045-508-1539 FAX : 045-510-0608

E-mail : [contact@dnaform.jp](mailto:contact@dnaform.jp) URL : <http://dnaform.jp/ja/>