

トランスクリプトーム-単一塩基分解能で同時に複数のRNA修飾をプロファイリング

Vahid Khoddamia,b,c,1,2 ,Archana Yerrab,c,1 ,Timothy L.Mosbrugerd,Aaron M.Fleminge,Cynthia J.Burrowse,3 ,Bradley R.Cairnsb,c,3

aDepartment of Cell Biology,Harvard Medical School,Boston,MA02115;bハワード・ヒューズ医学研究所,ユタ大学School of Medicine,Salt Lake City,UT84112;cDepartment of腫瘍学的Sciences,Huntsman Cancer Institute,ユタ大学School of Medicine,Salt Lake City,UT84112;dBioinformatics Shared Resource,Huntsman Cancer Institute,ユタ大学School of Medicine,Salt Lake City,UT84112;AND<ユタ大学},ソルトレイクシティ,ユタ州(84112)

執筆:Cynthia J.Burrows、2019年1月25日(レビューは2018年10月9日に送付、Juan D.Alfonzo、Thomas Carell、Peter C.Dedonによるレビュー)

修飾されたリボヌクレオチドがRNAの配列、構造、機能、安定性、運命、および他の分子との相互作用に影響を与える可能性があるため、RNA修飾の幅と重要性は急速に増大している。したがって、細胞のRNA修飾を一塩基分解能で知ることは、細胞の状態と運命に関する重要な情報を提供してもよい。現在の主な制限は、トランスクリプトーム全体および単一塩基分解能で同時に複数の修飾の再現可能なプロファイリングを可能にする方法の欠如である。ここで、我々は、m5 C,Ψおよびm1 Aを単一塩基分解トランスクリプトーム全体で高感度かつ同時に検出することを可能にするRNA重亜硫酸塩配列決定の修飾であるRBS-Seqを開発した。RBS-Seqを用いて、m5 Cおよびm1 Aは、既知のシグネチャー塩基ミスマッチに基づいて正確に検出され、ここで、1–2塩基欠失を示すΨ 部位と同時に検出される。構造解析から,cDNA合成中にbaseskippingを引き起こすΨ-monobisulfite内転,熱誘導リボース開環及びMg2 +-assisted再配向を含む欠失シグネチャーの基礎となる機構を明らかにした。これらの修飾をそれぞれ独自の化学的手法で検出することにより、同一RNA中の3つの修飾すべてを高精度にマッピングすることが可能となり、共変動研究が可能となる。HeLa RNAにRBS-Seqを適用すると、tRNAおよびrRNA中のほとんどすべての既知のm5 C,m1 A,およびψ 部位が明らかになり、非コードRNAおよびmRNA中の数100もの新たなm5 CおよびΨ 部位が提供された。しかし、われわれの結果は以前の研究とは大きく異なっており、非コードRNAとコードRNA∼m5 C部位が10倍少ないことを示唆している

mRNAにはm1 Aがほとんどない。これらを総合すると、

今後のepitranscriptome研究に大いに貢献できるものと期待している。

修飾塩基シュードウリジン| RNAメチル化| m1 A| メチルアデノシン

RNAのovalentな修飾は数多くあり(1)、トランスクリプトーム全体のプロファイリングにより(2–4).の広範かつ系統的な解析が可能これまでのところ、 *N*6 -methyladenosine(m6 A)5-メチルシトシン(m5 C)プソイドウリジン(Ψ)および *N*1 -methyladenosine(m1 A)(5–14).を含む限られた数の改変について、トランスクリプトーム全体のプロファイリングが報告されているしかしながら、高感度で真の単一塩基分離能を提供するプロファイリング法は、現在、m5 C(9、14、15)およびm1 A(16)に対してのみ利用可能である;これらの(m6 A,m1 A,およびΨのうちの3種は、抗体(m6 Aまたはm1 A)(5、6、8、10)に対して、または逆転写(m1 AおよびΨ)中のポリメラーゼ休止/終結を含む技術(7,11–13, 17、18)に対して、初期濃縮または抗体を介する検出を含んでいる。Ψ (19)の最近の単一塩基技術は検出前のかさ高い付加物形成に依存している。さらに、Ψ プロファイリングのための現在の方法は有用であるが、大部分は、広範な採用または直接的な候補サイト検証(7,11–13, 20)に必要とされる感度、解像度および技術的容易性に欠ける。m5 C,m1 A,とΨ を、同じサンプルからsinglebaseの分解能トランスクリプトーム-ワイドに同時に検出するために、われわれはΨ のための分子アプローチと解析パイプラインを開発し、m5 Cとm1 A.のための改良された配列決定ベースの方法を開発した

C

最初に、3つの修飾すべての配列決定/mismatchbased検出のための概念的基礎を提供する(図1 *A*)、およびHeLa細胞データセット(図1 *B* および *C*、*SI付録*、図中の複数のさらなる例を含む)中の修飾の明瞭さを示す例示的tRNA(グリシン))。 S1– S3).

RNA(およびDNA)中のm5 Cの検出は

重亜硫酸に対する感受性:非メチル化シトシンは、シトシンをウリジンに変換する重亜硫酸イオンによって効率的に脱アミノ化され、その後、脱スルホン化、RT-PCR、および配列決定に続いてチミジンとして読まれる。対照的に、m5 Cは重亜硫酸に抵抗し、配列決定後もシトシンのままである(15、21)(図1 *A*))。我々は、熱と、RNA変性および重亜硫酸処理(一本鎖RNAを優先的に修飾する)を改善する強力な化学変性剤ホルムアミドとを組み合わせることによって、従来のm5 Cプロファイリング法を改善し、包括的なC→ T変換を提供した。

重要性

修飾塩基の分野は、同じRNA中の複数の一般的なRNA修飾をプロファイリングするための高感度で正確な単一塩基分離法の開発によって著しく進歩するであろう。我々の研究は、真の塩基対分解能を有するトランスクリプトーム全体でΨ 部位をプロファイリングするための( *i* )な定量的方法、我々が観察したΨ依存性欠失シグネチャーの化学的理解(*iii*)、m5 Cおよびm1 A,および( *iv* )をプロファイリングするための改善された方法、ならびに同じRNA中の3つの修飾すべてを同時に検出するためのこれらの方法の組み合わせを含む、この目標に向けたいくつかの進歩を提供する。( *ii* )これら3の非常に一般的なRNA修飾を含むepitranscriptomeな研究は、この方法によって得られる組合せ能力と実行の比較的容易さによって大いに前進するはずである。

投稿者:V.K.and B.R.C.designed research;V.K.,A.Y.,and A.M.F.performed research;V.K.,A.Y.,T.L.M.,and A.M.F.contributed new reants/analytic tools;V.K.,A.Y.,T.L.M.,A.M.F.,C.J.B.,and B.R.C.C.解析データ;V.K.,C.J.R.C.が論文を書いた。

レビュー担当者:J.D.A.,オハイオ州立大学;T.C.,Ludwig Maximilians University、およびP.C.D.,Massachusetts Institute of Technology。

著者は利害の衝突がないと宣言する。

このオープンアクセス記事は、[Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivativesライセンス4.0(CC BY - NC - ND)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)で配布されている。

データの蓄積:この論文で報告されたデータは、Gene Expression Omnibus(GEO)データベース(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)に保管されている。[GSE90963](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE90963))。この文書で報告されているすべてのカスタムコンピュータスクリプトは、GitHub<https://github.com/HuntsmanCancerInstitute/RBSSeqTools>に保管されている。

1 V.K.とA.Y.はこの研究に等しく貢献した。

2 Presentの住所:16635 - 148テヘラン、Academic Center for Education,Culture and Research、Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology、Cell Science Research Center、Department of Stem Cells and Developmental Biology。

連絡先の3 To。Eメール:[burrows@chem.utah.edu](mailto:burrows@chem.utah.edu)またはbrad.cairns@hci.utah.edu.

この記事には、www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1817334116/-/DCSupplementalのオンラインでのサポート情報が含まれている。

2019年3月14日発行。



6784–6789 | PNAS | April 2, 2019 | vol. 116 | no. 14 [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817334116](https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817334116)

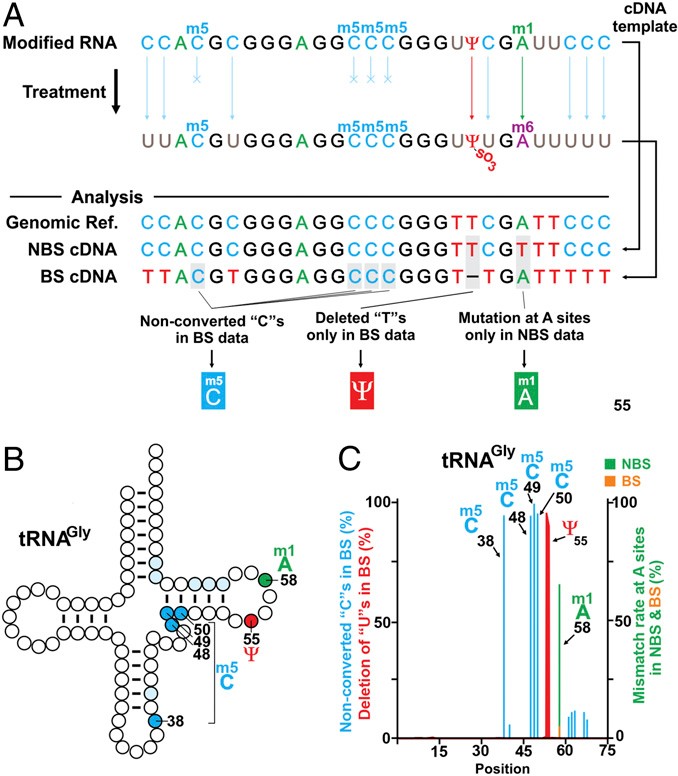


図1.RBS-Seqはm5 C,m1 A,とΨの同時塩基対分解能transcriptomewideマッピングを可能にする。(*A*)重亜硫酸に対する修飾ヌクレオチドの反応性の概略図(*上*)および修飾ヌクレオチドの同時マッピングの原理(*下*)。m5 Cでは、亜硫酸水素塩処理によってCsが脱アミノ化され(Usに変換;cDNA配列決定でTs)、m5 Csは亜硫酸水素塩に抵抗し(cDNA配列決定でCsのまま)、シトシンのメチル化部位が確立される。m1 Aについては、m1 Aを有する部位でのcDNA合成は、しばしばNBSサンプルにおける誤った取り込み/ミスマッチを与える。対照的に,治療中にm1 AはDimroth転位(N1 からN6 へのメチルの移動)を介してm6 Aに変換され,サンプル中のチミン(cDNAはアデノシンのまま)を忠実に鋳型とする。したがって、NBSサンプルとBSサンプルを比較することにより、m1 Aサイトが特定される。Ψについては、亜硫酸水素塩処理の際のΨ ヌクレオチドは、安定なmonobisulfite付加物を形成し(図4)、これは、リバーストランスクリプターゼとの頻繁なバイパスを引き起こし、正確な修飾部位に欠失シグネチャーを残す。(*B*)その周知の複数のm5 Cおよび単一のm1 AおよびΨ 改変部位を示すtRNAGly,の模式図。 (*C*)改変ヌクレオチドの正確な位置およびそれらのレベルを示すtRNAGly遺伝子座についてのHeLa細胞株からの実際のRBS-Seq結果を要約する棒グラフ。40番目と60–66番目のm5 Cのレベルが低いことは、tRNAタイプのサブセット(31、32)であるでに示す。

HeLa RNAにおける99.7%の頻度(*SI付録*、図。 S4– S8).最適化は、二次構造の領域の内部および/または外部に置かれたm5 C塩基を用いて、合成RNAオリゴマーを介して定量された(*SI付録*、図S5)。RBS-SeqをHeLa RNAに適用し、3種類の入力RNA種[ポリA-選択

(∼85 (22)、分析パイプライン(*SI Appendix*,図S9)(23)は、亜硫酸水素塩処理((∼200)由来のデータセットを比較した。(∼92

このレジメンでは、ヌクレオチドの複雑さが減少した結果生じる不正確なアラインメントによって生じる偽陽性を減少させる。–次に、3つの入力タイプすべてからの結果を集計し、C/G経路および強い二次構造に対する計算および目視検査を介して追加の偽陽性を除外し、nonconversion[≥20%(FDR≤ 0.05)( *SI*]の閾値を課した

*付録*、図S9)。 このアプローチと、

以下のRNAカテゴリーの高閾値候補部位のリストが得られた:486 :豊富な非コードRNA(tRNA、rRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、およびtRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA、tRNA297m5 C

(例えば、PTENとHDGF;図2 *A* と *B* と3 *A*,*SI付録*、図S2 *A*,とデータセットS1と S2)、14つの偽遺伝子、および32つの他の非コードRNA。顕著なmRNA内の新しい部位には、PTEN,XRCC3、FANCA、RXRB、FGFR4、およびEIF3B(データセットS1)が含まれる。重要なことに、tRNA中の既知の/確認された部位の試験は、RBS-Seqが単一のシトシン(例えば、図1 *C*).C49)において100%に近づくm5 Cについてのダイナミックレンジを有することを示した。われわれの読みとり数は以前の研究を上回ったが、mRNA中の486の高閾値候補m5 C部位の収量は、以前に報告された10,275の部位(14)よりもはるかに低く、これは主に、われわれのより効果的な変性および脱アミノ/変換、偽陽性率の低下によるものであった(*SI付録*、図1)。 S10、S11、データセットS1)。さらに、偽陽性を除去するために追加の統計的および分析的パラメータを適用するマウスESCにおけるより最近のm5 Cプロファイリングは、閾値を通過するmRNAの266部位を報告している(24)。

m6 A,m1 Aとは違ってA:Tワトソン–クリック塩基対合。これは逆転写を一時停止させ、頻繁なヌクレオチドの誤取り込みを誘発し、m1 Aの同定に有用な一塩基ミスマッチシグネチャを生成する(8、17、25)予想されたように、RBS-Seqからの我々のNBSデータセットにおいて、我々は実際に、非コードRNAにおける周知のm1 A部位において有意な(FDR 0.01)m1 A-relatedミスマッチを検出した。 [例えば、28S rRNA中のm1 A-1322(図2 *C* および*SI付録*、すべてのtRNA中の図S2 *B*)およびm1 A-58(図2 *D* およびデータセットS3)]予想外なことに、これらのミスマッチは我々のKSZデータセット(*SI付録*、表S3)では全く存在しないか、大きく減少しており、tRNAは、tRNAGly<BS}およびtRNAThrについての我々の手法(∼90%の顕著なダイナミックレンジを示す。図2 *D*).根拠については

m1 Aのm6 Aへの変換(メチル基の移動を含む)

Dimroth転位(26)(*SI Appendix*,図S12)と呼ばれるよく研究された過程を経て、RBS-Seq法の脱スルホン化工程に存在するアルカリ熱条件下で容易に起こる(*SI Appendix*,図S7)。N6  N1 したがって、整合した元のNBSサンプルと比較して、BSサンプル内の塩基ミスマッチ頻度の比較は、m1 A(*SI付録*、図S13およびデータセットS3)の部位を明らかにする。注目すべきことに、本発明者らの方法および分析によって、個々のA部位における有意なm1 A(>1%は、mRNA内のいずれの単一部位においても検出されなかった(*SI付録*、図1)。 S14およびS15、データセットS4)。われわれの結果は、mRNA中の数1000のm1 A部位を対象とした初期の研究(10、25)とは対照的であるが、mRNAおよびnCiRNA中のm1  Aを極めてまれにしか定量しない(HEK293T細胞中の全15部位)(24、27–29))という最近の研究によって裏付けられている。

その後、Ψに注目した。偶然にも

tRNA、rRNA、およびsnRNAのほぼすべての既知のΨ 部位において、再現性のある高浸透度の1–2ヌクレオチド欠失シグネチャーが観察された。注目すべきことに、われわれのアプローチは逆転写を停止させないので、同じRNA上の2つの近傍Ψ 部位を特異的に明らかにすることができる(*SI付録*、図1)。 S2 *C*, S16– S19およびデータセットS5)。浸透度に関しては、(Ψ55を含む以前の研究からの)tRNAの既知/検証済みΨ 部位の47つの独自のマッピングが>の50%浸透度(例えば、tRNAGly;>人90%、図1 *B* および *C*)を示し、Ψ 検出のためのRBS-Seqの例外的なダイナミックレンジ(データセットS5)を実証した。以下では、削除メカニズムについて詳しく説明する。 しかしながら、この一貫した独特の特徴が、新規Ψ 部位をトランスクリプトーム全体で同定するための拡大を促し、比較目的のためにHeLa細胞を選択した。ここでは、統計的アプローチ(*SI付録*、図S16)を含むカスタム解析パイプラインが開発され、754の固有サイトが明らかになった。388 :さまざまな非コードRNA種の部位、mRNAの322部位、およびコード領域(図3 *B*))に強いバイアスをかけた偽遺伝子の44部位(CDC6、図2 *E* および *F*、*SI付録*、図S2 *C*,およびデータセットS5、FDR< 0.001を含む)。したがって、われわれの研究は、非コード種およびmRNA種において数100のΨ 部位を提供し、これらは、タンパク質の翻訳および代謝(特にRNA代謝)に関連するGOカテゴリーについて明確な濃縮を示す(*SI付録*、図S17およびデータセットS6)。



化学

生化学

Khoddamiら PNAS | April 2, 2019 | vol. 116 | no. 14 | 6785

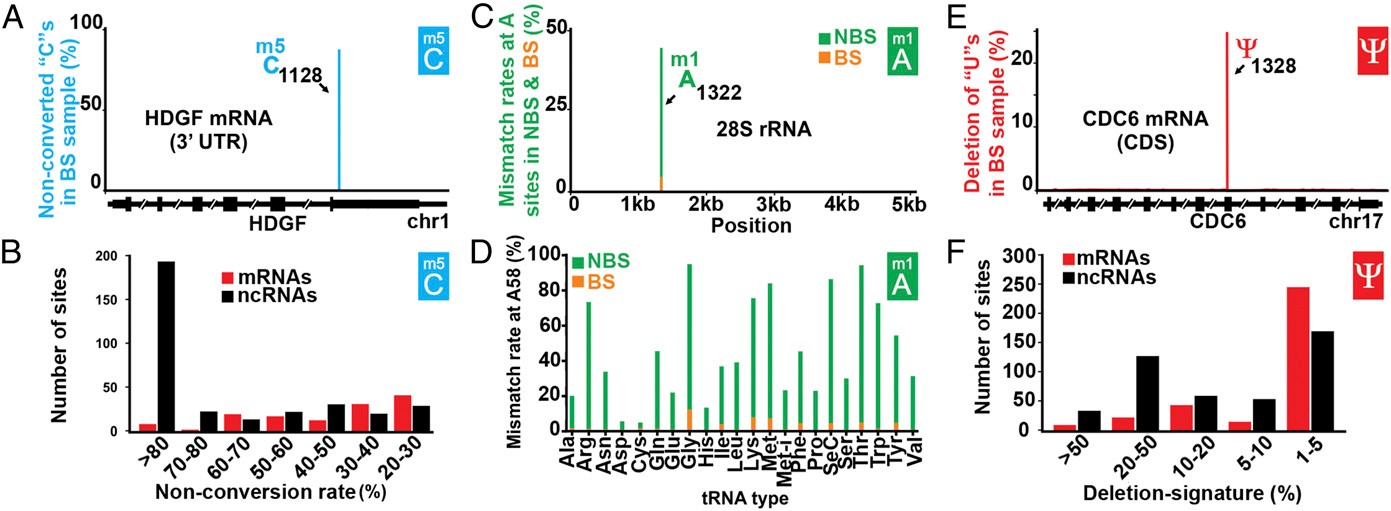


図2.HeLa細胞におけるトランスクリプトーム全体のRBS-Seq解析は、mRNAおよびncRNAにおける広範なm5 CおよびΨ 、ならびにほぼ独占的にrRNAおよびtRNAにおけるm1 Aを示す。(*A*)HDGF mRNAは、その3′ UTR内に単一のm5 C塩基を有する。(*B*)コーディングRNAおよび非コーディングRNAにおけるm5 C部位の分布およびダイナミックレンジ。nonconversion率(重亜硫酸処理後にシトシンのまま残る1個のシトシンを含む読み取りの割合)で層別化(*C*)ヒト28S rRNA転写体におけるミスマッチ率(塩基ミスマッチを有する読み取りのパーセント)は、位置1322に単一の周知のm1 Aヌクレオチドを示す。(*D*)NBSおよびBSサンプル中の(HeLa細胞由来の)ヒトtRNAのよく知られたA58部位におけるミスマッチ率。ミスマッチ率が最も高いtRNAの代表を示す。(*E*)CDC6mRNAに沿った欠失率(1–2塩基欠失を有する読み取りのパーセント)は、単一のΨ ヌクレオチドを示す。(*F*)コードRNAおよび非コードRNAにおけるΨ 候補部位の分布およびダイナミックレンジ。

顕著なmRNAの部位には、SMC2、EIF3D、POLE4、LMO7、CC DC22、ATP5F1、TRIM8(データセットS5)などがある。

これまでに4つのグループがトランスクリプトームをΨに実施している

異なる名前のプロファイルレポート:Pseudoseq(7)およびΨ

(13)(酵母及び哺乳動物細胞を使用)、PSI-seq(12)(酵母)及びCeU-seq(11)(哺乳動物細胞)。4つの方法はすべて同じ原理を共有している。即ち、RNAを化学的に *N*-シクロヘキシル- *N*′-(2-モルホリノエチル)-カルボジイミド-メソ- *p* -トルエンスルホン酸(CMC)で処理すると、プソイドウリジン上にかさ高い基が残り、cDNA合成中に逆転写が停止し、RNASeqを介して全体的にプソイル化の部位が示されるCM Cベースのテクノロジー

Ψ 部位、特にhighabundance RNAの同定やmRNAΨ 部位の候補の同定にはniquesが有用であることが証明されている。しかしながら、類似の方法および同一の酵母菌株を利用しているにもかかわらず、哺乳類細胞型(典型的にはHeLaおよび/またはHEK293)(20)における公表されたCMCに基づく結果を比較した場合、候補部位間の重複は極めて低く(典型的には4%)、同等に低かった(*SI付録*、図S20およびデータセットS7)。興味深いことに、HeLa細胞を用いたRBS-Seqからの候補Ψ 部位は、以前のCMCに基づく研究(HeLaまたはHEK293のいずれか)と、それ自身を用いた以前の研究(*SI Appendix*、図S21およびDataset S7)よりも良好に重複しており、RBS-Seqの陽性率が高いことと一致していた。

これらの違いをよりよく理解するために、検証アプローチに目を向けた。Ψ 部位のマッピングにcDNAの連鎖停止に依存するCMCベースの方法では、ほとんどのmRNAに対して実行可能性を超える量の純粋な標的RNAを必要とするため、検証するのが難しい(7、13)。したがって、ほとんどの先行研究では、検証が欠如しているか(11、12)、極めて少数(5未満)の候補部位しか検証されていない対照的に、RBS-Seqは、対応するcDNA内に現れるΨ依存性欠失シグネチャーが、遺伝子特異的PCR増幅を通して容易にスケールアップされ、バーコードされたアンプリコンのハイスループット配列決定によって定量化されるので、mRNAに容易に適合された直接的なハイスループット検証プロトコルを提供する。したがって、以前の研究との妥当性確認および比較のために、我々は60の候補部位を試験し、それらを4つのグループに分割した:グループI、RBS-Seqによって一意に識別される部位(12つの部位)、グループII、RBS-Seqと少なくとも1つのCMCベースの方法(25つの部位)との間で共有される部位、グループIII、CMCベースの方法の少なくとも1つで検出されたが、RBS-Seqによって識別されない部位。

RBS-Seq(14サイト)で十分なカバー率が得られているにもかかわらず、グループIVでは、1つ以上のCMCベースの方法からのサイト(RBS-Seqではない)(データセットS8)。検証試験のために、HeLaまたはHEK293全RNAを流線型重亜硫酸+ 熱+ に処理したMgCl2 以下に記載する化学的手法を用いたプロトコルに続いて、バーコードした∼125-bpアンプリコンを含むRT-PCR

(RBS-MiSeqと命名)、欠失

シグネチャ解析パイプライン(*SI付録*、図S22 *A*))注目すべきことに、グループIおよびII部位の圧倒的多数(37のうち34)が検証され、HeLaおよび/またはHEK293データセットを用いたZSU1000の配列読み取りのうち10を含む明確な欠失シグネチャーを生じ、RBS-seqによって同定された部位の信頼性を提供した。グループIIIについては、14のうち10が検証され、配列決定の深さの増加および/または我々の焦点を当てた検証アプローチの適用が、RBS-Seqによって生成されたまれな偽陰性を解決できることを示唆している。最後に、グループIV(9件中0件)の候補者はいずれも検証されず、RBS-Seqと比較してCMCに基づく技術単独では偽陽性率がはるかに高いことが強く示唆され、以前の研究における重複が少ないことと一致している。各グループの例は、*SI付録*、図S22 *B*,に提供され、完全な結果は、データセットS8に提供される。

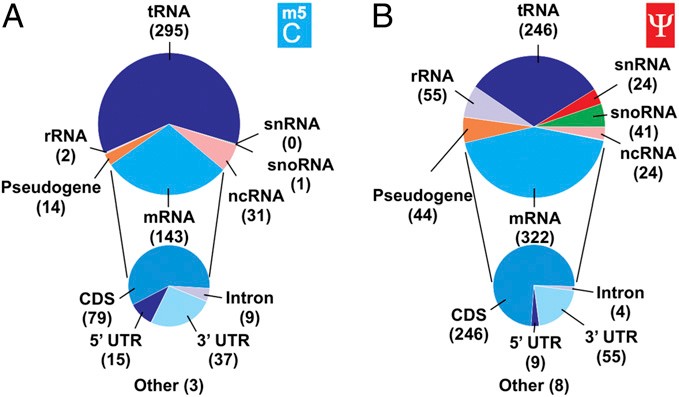


図3.(*A*)拡張されたmRNA注釈を有するRNA種における候補m5 C部位の分布。(*B*)異なるRNA種における候補Ψ 部位の分布、および拡張されたmRNA注釈。すべてのサイトとそれに対応する注釈については、データセットS1および S5 を参照されたい。



6786 | [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817334116](https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1817334116) Khoddamiら

我々のΨ プロファイリングアプローチと結果を独立して試験するために、我々は、最も病気に関連するヒトΨ シンターゼであるDyskelin(DKC 1)を調べた。*DKC1*の変異は,テロメアの短縮および骨髄線維症(30、31)を特徴とする先天性異常角化を引き起こす。DKC1はH/ACA box snoRNAを利用してsnoRNAと標的rRNAとの間の塩基対形成を介してrRNAへのΨ のターゲッティングを誘導し(32)、DKC1もテロメラーゼ非コードRNA(TERC)(33、34)と相互作用するが、TERCが実質的なΨ を受け取るかどうかは不明である(35)。この問題を解決するために、siRNAを介してDKC1枯渇HeLa細胞から単離された総RNAおよびポリA選択RNAの両方について、ハイスループットRBS-Seq後に欠失シグネチャー分析を行い、∼84%re-を得た。

DKC1転写産物レベルの誘導(*SI付録*、図S22 *C* および)

*D*)。DKC1-siRNAと対照-siRNAデータセットとの比較は、227部位における欠失シグネチャーレベルの有意な減少(>25%減少(FDR 0.01)を明らかにした;ほとんどがrRNA内に存在するが、18部位がmRNA内に観察された(*SI付録*、図S22 *E* および *F*,およびデータセットS9)。不思議なことに

58:HEK293mRNAのDKC1依存性部位

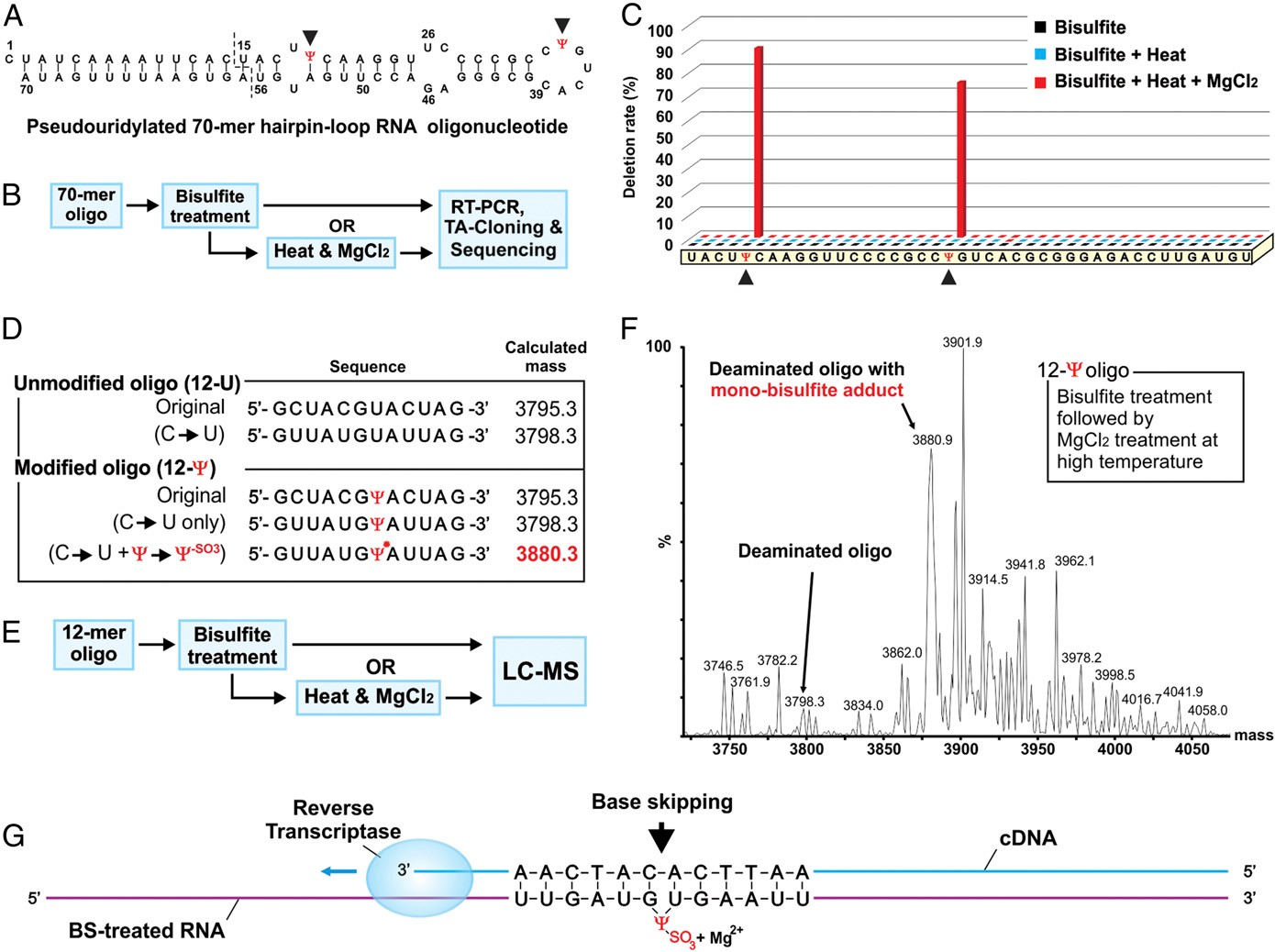
Ψ-seqは、RBS-SeqによってHeLa mRNAに見出される18つの部位と重複しない。さらに、Ψ-配列はHEK293細胞においてTERC内の2つのDKC1依存性Ψ 部位を報告したが、RBS-配列は報告しなかったので(13)、本発明者らは、HeLa細胞およびHEK293細胞の両方において、合理化されたRBS-MiSeq検証手順を用いて、両方の部位においてTERCを特異的に試験した。注目すべきことに、30Kを超える読み取りが両方の細胞型において両方の部位に重複していたにもかかわらず、有意な欠失は観察されず(データセットS8)、TERCは、試験した条件下では、これらの細胞型においてDKC1の相互作用パートナーであるが、直接的な偽ウリジル化基質ではないことが示唆された。

最後に、Ψ において観察された1–2塩基欠失シグネチャーの化学を解明し、検証方法論を導くために、本発明者らは、本発明者らのRBS-Seqプロトコルのいずれの段階が、2つのΨ 部位を有する合成70-merオリゴヌクレオチドを利用し、塩基欠失頻度を定量することによって塩基欠失を誘発するかを決定した。驚くべきことに、亜硫酸水素塩処理のみでは、いかなる欠失シグネチャーも誘導されなかったが、マグネシウムイオン(20 mM)の存在下でのBS RNAの15分間の加熱(75 °C)は、浸透体欠失シグネチャーを生成するために必要かつ十分であった(図4 *A*– *C*)。



化学

生化学

 図4.逆転写酵素バイパスを誘導するためのシュードウリジン-亜硫酸水素塩付加物およびheat/Mg2 +-induced転位の特徴。(*A*)下流実験で使用したpseudouridylated70-mer RNAオリゴヌクレオチドの配列および分子内折り畳み。2つのΨ サイト(赤)は矢印で示されている。(*B*)オリゴ処理のフローチャート、RT-PCR、TAクローニング、および個々のコロニーのサンガー配列決定。(*C*)参照配列および下部の2つのΨ 部位を用いたオリゴヌクレオチド実験から得られた欠失シグネチャーの要約であって、重亜硫酸工程の不十分さ、およびその後の熱+ の必要性を示す。削除シグニチャを生成するMgCl2ステップ。(*D*)下流実験で使用した12量体対照(12 - U)およびpseudouridylated(12-Ψ)オリゴマーの配列および計算質量。(*E*)12-糖を用いたΨ 反応性試験の反応順序及び方法。(*F*)亜硫酸水素塩及び熱+ 処理後の12-Ψ の質量スペクトルMgCl2処理は安定なmonobisulfite付加物の形成を示す。12-Uおよび12-Ψ の質量スペクトルは、*SI付録*、図S24に示す。(*G*)cDNA合成中に、リボースringopenedΨ-monobisulfiteが重合部位から離れて配向し、塩基スキップを説明するMg2 +,によって補強されることを示す、提案されたモデル。

Khoddamiら PNAS | April 2, 2019 | vol. 116 | no. 14 | 6787