

microRNAのバイオセンサー：psiCHECK™-2 Vectorのアプリケーション

By Trista Schagat and Jolanta Vidugiriene, Promega Corporation

アブストラクト

microRNAによる遺伝子発現の調節について、精力的な研究が行われています。この分野の進歩には、miRNA活性を簡単、迅速にスクリーニングできるツールがきわめて重要になると予想されます。本研究では、本来はsiRNAによるサイレンシング効率のスクリーニングを目的としてデザインされたpsiCHECK™-2 Vectorが、細胞microRNA 活性のバイオセンサーとして有用であることを明らかにします。

イントロダクション

microRNAs (miRNAs) は、遺伝子発現を調節する短鎖非コードRNAです。miRNAはメッセンジャーRNA配列の3'-末端に存在する非翻訳領域を標的とし、RNAの安定性に影響を及ぼすことにより、翻訳を抑制します(1)。ヒトでは200個を超えるmiRNAが同定されており、発現プロファイリング研究から、幅広い生体内プロセスや病態（発生、代謝、癌など）への関与が示唆されています。現在では、miRNAの機能および調節機序の解明に向けた取り組みが行われています。このような取り組みは、miRNA活性のモニタリングおよびmiRNAの標的候補配列のスクリーニングに利用できる簡単、迅速なアッセイを必要としました。

psiCHECK™ Vector は、RNA 干渉の初期の最適化に利用できる迅速な定量アプローチを提供します(2)。また、これらのベクターは、miRNAの標的配列などの3'-末端の非翻訳領域（3' UTR）が遺伝子発現に与える影響の検討にも最適です。psiCHECK™ Vectorは、SV40プロモーター制御下にあるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の停止コドンの下流にマルチクロニング領域を含んでいます（図1）。このため、検討対象とする3' UTR配列とともにウミシイタケ転写物を発現させることができます。ウミシイタケルシフェラーゼ活性は、3' UTRが転写の安定性および翻訳効率に与える影響の測定に使用されます。

psiCHECK™-2 Vectorは、他のほとんどのルシフェラーゼレポーターベクターと異なり、構成的に発現するホタルルシフェラーゼ遺伝子を含みます。ホタルルシフェラーゼはトランスフェクションの補正に使用できるため、第2のベクター対照をトランスフェクションする必要がありません。miRNAは翻訳に影響を及ぼしますが、転写活性化には影響を及ぼさないため、miRNAレポーターの調節作用が内部対照の発現に影響を及ぼすおそれはなく、同じプラスミドからmiRNAレポーターと内部対照の両方を発現させることができます。本研究では、psiCHECK™-2 Vectorが、異なる細胞株でmiRNA-21 (miR-21) のバイオセンサーとしても、miRNAの標的を検討するツールとしても使用できることを明らかにします。

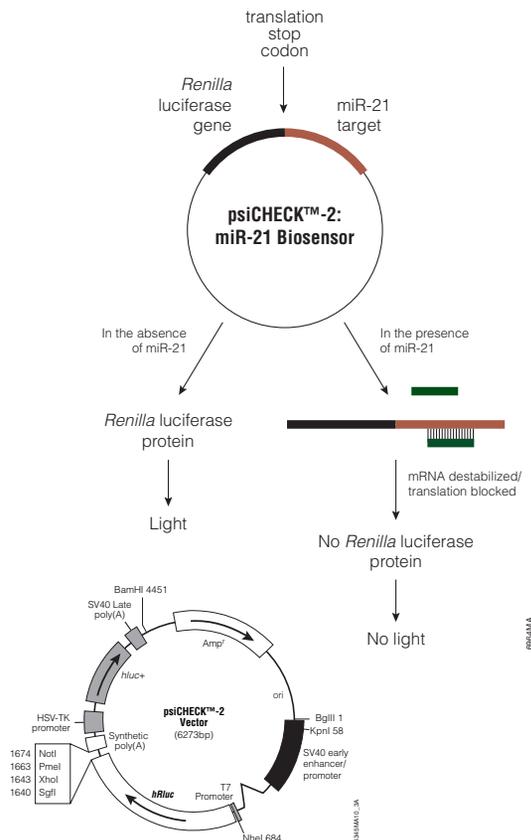


図 1. psiCHECK™-2 Vector を用いた miR-21 活性の検出

psiCHECK™-2 Vector のウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子の前方に存在するマルチクロニング領域に miR-21 の標的配列をクローニングした。

表 1. 数種類のヒト細胞における miR-21 microRNAの相対的な発現レベル

Cell Line	Relative miR-21 Expression
HEK293 (kidney)	Low (3)
K-562 (chronic myelogenous leukemia)	Low to moderate (3)
HeLa (cervical carcinoma)	High (4)
MCF-7 (breast adenocarcinoma)	High (3)

miRNAのバイオセンサーの作製

miRNA 活性のバイオセンサーとしての psiCHECK™-2 Vectorの有用性を検討するため、miR-21をモデルとして選びました。異なる細胞株および組織におけるmiR-21の相対的な発現レベルは、各種手法（ノーザンブロット法、ビーズベースの発現プロファイリングなど）によりすでに評価されています（3、4；表1）。HEK293 細胞とHeLa 細胞の相対的な差は、RT-PCRにより確認しました（データ未掲載）。

本研究の目的は、ウミシイタケルシフェラーゼの発現がHEK293細胞、K-562 細胞、HeLa細胞およびMCF-7細胞で報告されている発現と同じ傾向を示すかどうかを明らかにすることでした。また、psiCHECK™-2 VectorがmiR-21の既知の標的配列（miR-21ミスマッチ、5）をレポートできるかどうかを明らかにすることも目的としました。正確な miR-21 配列またはmiR-21の標的（miR-21ミスマッチ、5）を含む相補的オリゴヌクレオチドには、制限酵素部位SgfIおよびPmeIの一部を両端に付加して作成しました（表2）。簡単にインサートをチェックするために、psiCHECK™-2 Vectorには含まれていない制限酵素部位（EcoICRI）も付加しました。SgfIおよびPmeIで消化処理したpsiCHECK™-2 Vectorに、アニーリングしたオリゴヌクレオチドをクローニングしました。psiCHECK™-2:miR-21 コンストラクトおよび psiCHECK™-2: miR-21ミスマッチコンストラクトは、PureYield™ Plasmid Maxiprep Systemを用いて精製し、シークエンシングにより配列を確認しました。レポーター遺伝子（ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子）下流にmiRNAの逆相補配列をクローニングすることにより、バイオセンサーを作製したことに注目してください。配列がこのような方向性を有するため、細胞内の miRNA は融合転写物に結合し翻訳を調節すると予想されます。

細胞株におけるmiR-21の検出

すべてのバイオセンサーのトランスフェクションには、amaxa社の Nucleofector® 技術を使用しました。Nucleofector® 技術は、ウイルスを使用しない効率の高い手法で、独自の電荷と細胞株専用の溶液を用いて迅速にトランスフェクションを行います（www.amaxa.com）。全解析とも、トランスフェクション18~24時間後にDual-Glo™ Luciferase Assay SystemおよびGloMax® 96 Microplate Luminometerを用いて行いました。

図2に示すように、すべての被験細胞株において、ウミシイタケルシフェラーゼ転写物の 3' UTRにmiR-21標的配列が付加することにより発現に対する有意な影響がみられました。最も大きな影響が認められたのは、miR-21 発現レベルが高いことが報告されている細胞株 [HeLa (2) および MCF-7 (1)] でした。ノーザンブロット法により解析したところ、K-562細胞およびHEK293 細胞はmiR-21発現レベルが MCF-7 細

胞と比較して低く、HEK293細胞の発現レベルが最低でした(1)。このような傾向はルシフェラーゼの測定データにも認められ、psiCHECK™-2をmiRNAのバイオセンサーとして使用できることが裏づけられました。実験間でのレプリケートの差は、内部対照（ホタルルシフェラーゼ）を用いて補正できるため、継代数が異なる細胞を用いた場合にも統計学的有意差を検出することができました。

遺伝子の3' UTRに存在する miRNA の標的には、miRNAの作用を調節するmiRNAミスマッチが含まれます。我々は、標的配列（ミスマッチ miR-21）を用いて、psiCHECK™-2 VectorをmiR-21活性の標的のスクリーニングツールとして検討しました(5)。図2に示すように、miR-21 発現レベルが高い細胞では、miR-21ミスマッチがウミシイタケルシフェラーゼの発現に影響を及ぼしました。

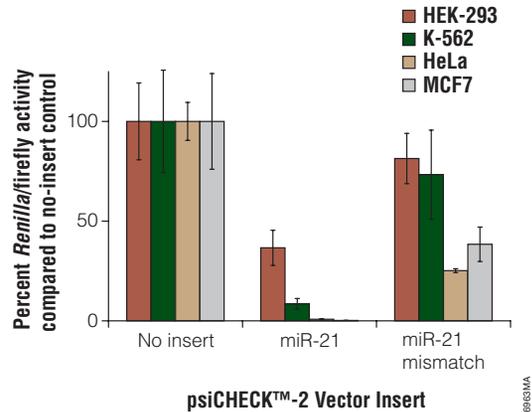


図2. psiCHECK™-2:miR-21バイオセンサーを用いたmiR-21活性の検出

図に示すpsiCHECK™-2コンストラクトを用いたトランスフェクション18~24時間後、Dual-Glo™ Luciferase Assay Systemおよび GloMax® 96 Microplate Luminometerを用いて細胞のルシフェラーゼ活性を解析した。各コンストラクトのウミシイタケルシフェラーゼ活性の補正值（ウミシイタケルシフェラーゼ活性/ホタルルシフェラーゼ活性）を、対照（検討対象とする配列を挿入していないpsiCHECK™-2 コンストラクト）と比較した。データは、別の日に異なる継代数の細胞を用いて実施したトランスフェクション実験3回の平均値を示す。各トランスフェクションのルシフェラーゼ活性は、2~4リプリケートの平均値とした。

Construct	Oligonucleotides (sequences identical or complementary to miR-21 are capitalized)
psiCHECK™-2:miR-21	Oligo 1: (5') cg ^c agtagagctctagt TCAACATCAGTCTGATAAGCTA gttt (3')
	Oligo 2: (5') aaac TAGCTTATCAGACTG ATGTTGA actagagctctactgcat (3')
psiCHECK™-2:miR-21 mismatch	Oligo 1: (5') cg ^c agtagagctctagt TCAACATCAGaaGATAAGCTA gttt (3')
	Oligo 2: (5') aaac TAGCTTATCctCTGATGTTGA actagagctctactgcat (3')

まとめ

本研究から、psiCHECK™-2 VectorがmiRNA活性のバイオセンサーとしても、miRNAの標的のスクリーニングツールとしても使用できることが明らかになりました。psiCHECK™-2 VectorにmiR-21の逆相補配列をクローニングすることにより、細胞株間でのmiR-21活性の相対的な差を検討することができました。miR-21の標的（ミスマッチmiR-21）をpsiCHECK™-2 Vectorにクローニングすることにより、レポーター発現に対する標的の影響を、miR-21発現レベルが高い細胞株と低い細胞株の間で比較評価できました。

psiCHECK™ Vectorを使用することにより、miRNAの標的のみならず、あらゆる3' UTR配列が翻訳に与える影響をスクリーニングできます。検討対象とする3' UTR配列をウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子に付加することにより、3' UTRによる調節のマーカースとしてルシフェラーゼ活性を使用することができます。psiCHECK™-2 Vectorはホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子を含むため、これを内部対照として使用し、日差変動を改善できるという付加的な利点もあります。ルシフェラーゼレポーターを使用すれば、配列、細胞株、増殖および刺激条件について、細胞培養ウェル内で直接、簡単にスクリーニングすることができます。

参考文献

1. Zamore, P.D. and Haley, B. (2005) *Science* **309**, 1519–24.
2. Vidugiriene, J. *et al.* (2004) *Promega Notes* **87**, 2–6.
3. Lu, J. *et al.* (2005) *Nature* **435**, 834–8.
4. Lagos-Quintana, M. *et al.* (2001) *Science* **294**, 853–8.
5. Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2003) *RNA* **9**, 112–23.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
psiCHECK™-2 Vector	20 µg	C8021	55,000