

Vol. 3 MiCheck miRNAバイオセンサークロンを用いた miRNAが関わる遺伝子発現抑制の網羅的解析

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 神経薬理研究部
北條浩彦 先生

はじめに

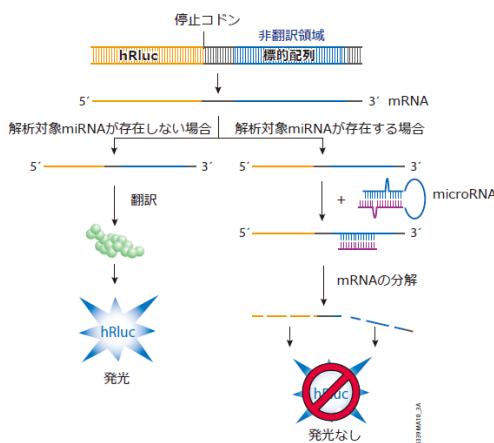
マイクロRNA(miRNA)は、約21~25ヌクレオチド鎖長の機能性小分子RNAです。そのmiRNAをコードする遺伝子はゲノム上に数百から数千種類存在し(ヒトゲノム上には2,588種類のmiRNAが存在しています*)、主にRNAポリメラーゼIIによって転写されています。初期miRNA転写産物(primary miRNA: pri-miRNA)は、核内でプロセッシングをうけステム・ループ構造を持ったmiRNA前駆体(pre-miRNA: pre-miRNA)になります。その後、pre-miRNAは細胞質に移動し、Dicerのプロセッシングを受けて二本鎖のmiRNAになりRNA-induced silencing complex (RISC)に取り込まれます。最終的には片方の一本鎖miRNAがRISCに残り、その塩基配列に基づく遺伝子発現抑制が惹起されます。発現抑制はmiRNAと相補的または一部相補的なメッセンジャーRNA (mRNA) に対して起こります。そのため、1種類のmiRNAが複数の遺伝子の発現調節に関わっています。このユニークな遺伝子発現調節はさまざまな生命現象・生命機能に関わり、さらに病気にも関連しています。したがって、miRNAの発現状況や活性状態はそれらとの関係を調べるうえで重要な情報となります。

(* 2014年11月28日現在)

1. コンストラクトの設計

miRNAが関与する遺伝子発現調節を簡単に調べるために、miRNAのターゲットとなるリポーター遺伝子の構築を行いました。解析対象となるmiRNAの相補配列をDNA合成し(二本鎖のオリゴDNAにする)、それをpsiCHECK™-2ベクターがコードするウミシタケルシフェラーゼ遺伝子の3'非翻訳領域(3'-UTR)に挿入してmiRNAバイオセンサークロンを構築しました。3'-UTRにmiRNAの相補配列を挿入することでアミノ酸コドンフレームを気にすることなく、つまり、ルシフェラーゼのアミノ酸コードを変えずにmiRNAのターゲットリポーター遺伝子を構築することができます。この方法で176種類のmiRNAバイオセンサークロンを構築しました。

2. MiCheck miRNAバイオセンサーの作用機序



miRNAバイオセンサークロンのウミシタケルシフェラーゼ遺伝子3'-UTRにはmiRNAと結合する相補配列が存在します。解析対象のmiRNAがRISCに取込まれ機能性小分子RNAとして働いている場合、その相補配列をもったルシフェラーゼ遺伝子は配列特異的な転写後抑制を受けます[RNA interference (RNAi)と同じ発現抑制]。その結果、ウミシタケルシフェラーゼ(タンパク質)の発現が下がり、そして酵素活性が低下します。したがって、ウミシタケルシフェラーゼ活性を調べることで、RISCに取込まれ実際に機能しているmiRNAの発現抑制活性を調べることができます(図1)。

図1: MiCheck miRNAバイオセンサークロンの作用機序

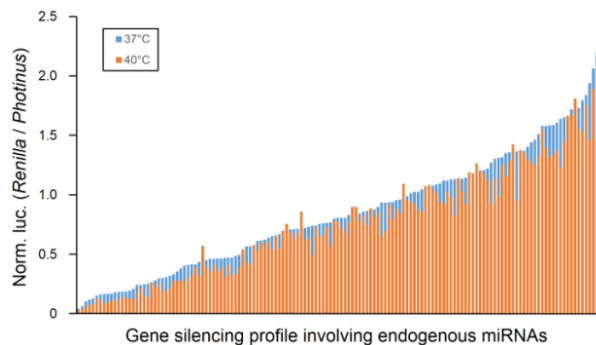
各 microRNA 標的配列はSV40 プロモーター制御下にあるウミシタケルシフェラーゼ遺伝子の停止コドンの下流、3'非翻訳領域に挿入しています。このため、microRNA 標的配列を含んだウミシタケルシフェラーゼ転写物が発現します。ウミシタケルシフェラーゼ転写物は検討対象のmicroRNA によってその翻訳が影響を受けるので、その結果を発光値として検出することができます。

3. 熱ストレスとmiRNAが関わる遺伝子発現制御

miRNAが関わる遺伝子発現制御が熱ストレス下で影響を受けるか否かについてMiCheck miRNAバイオセンサークロンを用いて調べました。HeLa細胞に143種類のMiCheck miRNAバイオセンサークロンとコントロールのpsiCHECK™-2ベクター(miRNAのターゲット配列を持たない)をトランスフェクションし、16時間後、40℃の熱処理を行いました。熱処理後、デュアル・ルシフェラーゼアッセイを行い、ウミシタケルシフェラーゼの活性(ターゲット)をホタルルシフェラーゼの活性(コントロール)で正常化し、さらにpsiCHECK™-2ベクター(miRNAのターゲット配列を持たない:抑制を受けない)を導入した細胞から得られた正常化ウミシタケルシフェラーゼの値を基にそれぞれの発現抑制値を算出しました。得られた40℃の発現抑制値を通常の37℃培養で得られた発現抑制値と比較したところ、多くのmiRNAが関わる遺伝子発現抑制が熱処理後に亢進しているように観察されました(図2)。おもしろいことにDNAチップを用いたmiRNAの発現解析の結果、熱処理をしてもmiRNAの発現に大きな変化が表れていないことが示されました。miRNAが関わる遺伝子発現抑制の亢進にはmiRNAの発現量は関与していないと考えられます。

図2 : 40℃と37℃のmiRNAが関わる遺伝子発現抑制

143種類のMiCheck miRNAバイオセンサークローンとコントロールのpsiCHECK™-2ベクターをHeLa細胞にトランスフェクションし、熱処理40℃と通常の37℃温度条件下でmiRNAが関わる遺伝子発現抑制を調べました。37℃のmiRNAバイオセンサークローンから得られた発現抑制のデータ（青）を基に40℃の同じクローンから得られたデータ（橙）を重ねて示したグラフです（文献1より改変）。



4. psiCHECK™-2ベクターを選んだ理由

レポーター遺伝子（レポータープラスミドなど）を細胞内に導入しその発現を解析する場合、最も注意しなければならない事はトランスフェクション効率（レポーター遺伝子の導入効率）です。細胞の種類や状態、使用するトランスフェクション試薬や方法そして導入する核酸（レポータープラスミド）の精製具合などによってその効率は影響されます。その様な実験ごとに異なるトランスフェクションであっても解析対象となるレポーター遺伝子の発現を正常化し比較・検討できるようにするのが、一緒に導入されるコントロールのレポーター遺伝子（コントロール・レポーター遺伝子）の役目です。コントロール・レポーター遺伝子の条件は、解析対象のレポーター遺伝子と分けて（識別して）検出できること、そして解析対象のレポーター遺伝子と同じトランスフェクション効率で細胞内に導入されることです。psiCHECK™-2は、解析対象レポーター遺伝子（ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子）とコントロール・レポーター遺伝子（ホタルルシフェラーゼ遺伝子）の両方を持つプラスミドベクターです。したがって、psiCHECK™-2ベクターを用いれば、たとえトランスフェクション効率が変動したとしても導入後の細胞には必ず解析対象レポーター遺伝子とコントロール・レポーター遺伝子が同じコピー数ずつ存在することになります。これにより実験間で異なるトランスフェクション効率であっても解析対象レポーター遺伝子の発現量を同数のコントロール・レポーター遺伝子の発現量によって正常化し、正確に比較することができるようになります。この正確な定量化（正常化）が、レポーター遺伝子を使ったmiRNAの発現抑制解析には不可欠な要素であり、それを可能にするpsiCHECK™-2は理想的なプラスミドベクターであるといえます。

こんなところで苦労しました

MiCheck miRNAバイオセンサークローンは、miRNAに対する相補配列を持った二本鎖オリゴDNAを合成し、それをpsiCHECK™-2ベクターに挿入してクローンを構築しますが、miRNAの中にはどうしてもバイオセンサークローンが得られない（クローン化できない）モノがありました。それらは、おそらく、設計したオリゴDNAの配列がプラスミドの複製に何らかの影響を与えているのではないかと考えています。

本実験で使用したクローンが購入できます

ヒト143種+マウス33種

バイオセンサークローン
MiCheck miRNA

詳細・クローンリストはWebでご覧いただけます

www.promega.co.jp/micheck/index.html

参考文献

1. Fukuoka M., Yoshida M., Eda A., Takahashi M., Hohjoh H. (2014) Gene silencing mediated by endogenous microRNAs under heat stress conditions in mammalian cells. *PLoS ONE*, **9(7)**: e103130.
2. Takahashi M., Eda A., Fukushima T., and Hohjoh H. (2012) Reduction of type IV collagen by upregulated *miR-29* in normal elderly mouse and *klotho*-deficient, senescence-model mouse. *PLoS ONE*, **7(11)**: e48974.
3. Tamura Y., Yoshida M., Ohnishi Y., and Hohjoh H. (2009) Variation of gene silencing involving endogenous microRNA in mammalian cells. *Mol Biol Rep*, **36**: 1413-1420.

関連製品

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	100回分	E1910	29,000

日本語 Web site : www.promega.co.jp

テクニカルサービス ● Tel. 03-3669-7980 / Fax. 03-3669-7982 ● E-mail: prometec@jp.promega.com

プロメガ株式会社

本社 〒103-0011
東京都中央区日本橋大伝馬町14-15 マツモビル
Tel. 03-3669-7981 / Fax. 03-3669-7982

大阪事務所 〒532-0011
大阪市淀川区西中島6-8-8 花原第8ビル704号室
Tel. 06-6390-7051 / Fax. 06-6390-7052

販売店: