

Gene Expression Application Note No.4

リアルタイム定量PCRによる
miRNAターゲットmRNAの
相対定量

Ute Ernst, Jitao David Zhang, Anja Irsigler,
Stefan Wiemann, Ulrich Tschulena

Division: Molecular Genome Analysis
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg



Ute
Ernst

Jitao David
Zhang

Anja
Irsigler

Stefan
Wiemann

Ulrich
Tschulena

1 イントロダクション

microRNA (miRNA) は、細胞増殖、分化、アポトーシス等の多くの基本的細胞内プロセスにおいて、遺伝子発現のプライマリーレギュレーターとなっている、タンパク質に翻訳されない小さな内在性のノンコーディングRNAです。

miRNA発現はまた、腫瘍増殖にも重要な役割を果たしています。一般に、miRNAは翻訳コントロールによって標的タンパク質発現の調節を行っていると言われていました。しかしながら、ターゲットmRNAを分解するレベルでの遺伝子発現調節を行っていることも報告されています。miRNAは、細胞内の特異的mRNA濃度をRNAを分解することによって直接的に調節するのと同様に、そのダウストリームでmRNA転写や転写後レギュレーションを調節するタンパク質カスケードをターゲットとしてmRNAレベルを調節していることも証明されています。

現在の研究において、我々は乳がんや他の腫瘍でアップレギュレートされることが知られているmiRNA hsa (Homo sapiens) miR-21に注目しています。miR-21にはさらに、アポトーシスと細胞増殖における機能的役割があることが報告されています。我々は、ヒトmiR-21の役割をさらに研究するために、PDCD4、PTENそしてTLR2の3種類の推定ターゲット遺伝子のmRNA発現へmiR-21レベルが与える影響について解析を行いました(図1)。

2 材料と方法

細胞培養

HeLa 細胞は、1% L-グルタミン、1% ペニシリン/ストレプトマイシン、10% FBS 添加DMEM中で37°C、5% CO₂の条件で維持しました。

トランスフェクションは、X-tremeGENE siRNA トランスフェクション試薬 (ロシュ) と、miRNA 21 miRIDIAN mimic、miRNA mimic miRIDIAN controlとmiRNA 21 miRIDIAN inhibitor、miRNA miRIDIAN inhibitor controlのsiRNA (全て50nM, Dharmacon) を用い、使用説明書に従って行いました。

RNA 精製と逆転写

トータルRNAは、トランスフェクションの2日後にHeLa細胞 (mimic miRNAあたり3回の生物学的レプリケート) から、High Pure RNA Isolation Kit (ロシュ) を使用説明書に基づいて使用し、抽出しました (図2)。

平行して、短鎖のRNAを含むトータルRNAをHigh Pure miRNA Isolation Kit (ロシュ) を製品説明書に記載された1カラムプロトコールで用い、2回の生物学的レプリケートとして抽出を行いました (図2)。

ファーストストランドcDNA合成は、1反応あたり500から1,000ngのトータルRNAから、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ) を使用説明書に従って、オリゴ(dT)₁₈とランダムヘキサマープライマーのミックスを使用して行いました。

miRNAのファーストストランドcDNA合成は、1反応あたり4ngのsmall RNAを含むトータルRNAから、miRCURY LNA First-strand cDNA Kit (Exiqon) を用いて行いました。

qRT-PCR

遺伝子発現解析

定量RT-PCRは、Universal ProbeLibrary (UPL) プローブ (ロシュ) と、2x FastStart Universal Probe Master (Rox) PCR試薬 (ロシュ) を用いて、トータル反応液量11μl/ウェルで、384ウェルフォーマットのABI 7900HT リアルタイムPCR装置 (Applied Biosystems) を使用して実施しました。cDNA/RNAの濃度は、1反応あたり10ngを使用しました。ABI 7900HT リアルタイムPCR装置 (Applied Biosystems) のPCR条件は、変性を95°C 15min、45サイクルのPCRを95°C 15sec、60°C 60secにて実施しました。

miRNA定量

miRNAの定量RT-PCRは、miRCURY LNA SYBR Green master mix、miRCURY LNA Endogenous control SNORD44、LNA PCR primer for miR-21 (Exiqon) とLightCycler® 480 (ロシュ) を使用して、1:10希釈したcDNAについて384ウェルプレートに反応液量20μlで反応させました。LightCycler® 480のPCR条件は、変性95°C 10min、40サイクルのPCRを95°C 10sec、60°C 20secで実施しました。推定ターゲット遺伝子の発現レベルは、HPRT1とGAPDHをリファレンス遺伝子 (ハウスキーピングコントロール) として、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出しました (Livak and Schmittgen, 2001)。

hsa miR-21については、ノンターゲットのmimicおよびinhibitor-miRIDIAN control合成miRNAをHela細胞にトランスフェクトしたものを対照実験としました。

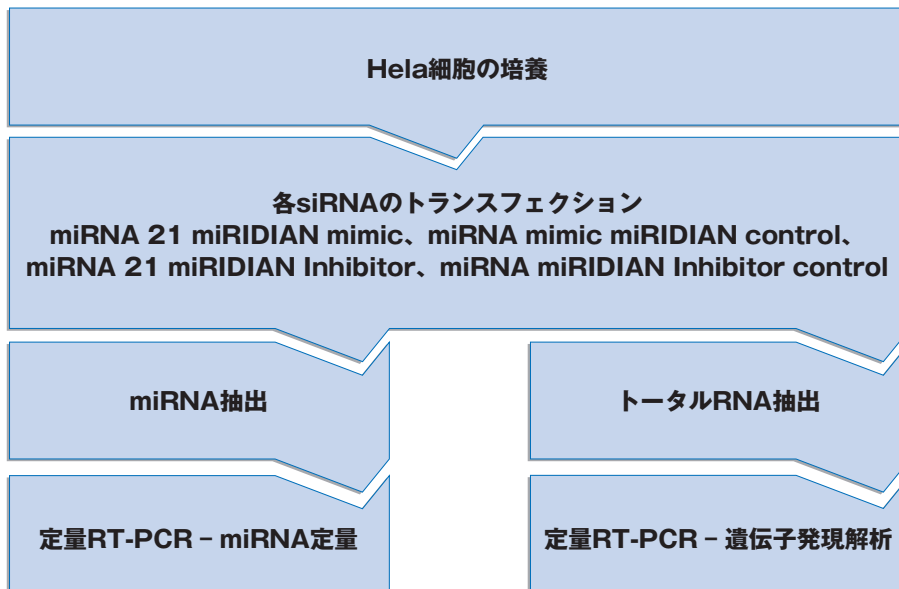


図1: hsa miR21レベルがその推定ターゲット遺伝子PDCD4、PTEN、TLR2発現に与える影響を解析するためのワークフロー。

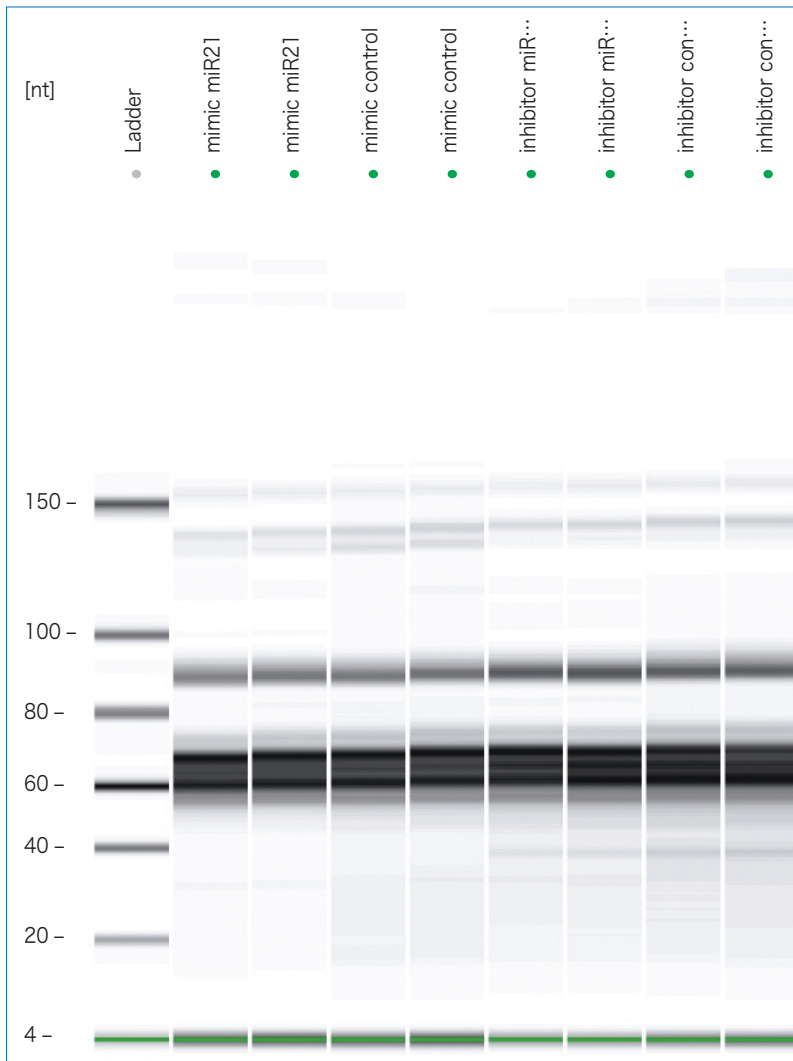


図2 : miRIDIAN miRNA mimic または miRIDIAN miRNA InhibitorをトランスフェクションしたHela細胞から分離した小サイズRNAのAgilent Bioanalyserを用いたゲル電気泳動。

miR-21レベルの上昇が推定ターゲット遺伝子(PDCD4, PLEN, TLR2)mRNAレベルに与える影響を解析するために、我々は、miR-21により調節を受けていることが報告されているそれらのmRNAの発現量を、Universal ProbeLibraryプローブ(ロシユ)とABI 7900HTリアルタイムPCR装置(Applied Biosystems)を用いて定量しました。X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent(ロシユ)を用いて、miR-21のmimic、inhibitorとそれぞれのコントロールsiRNA(miRNA 21 miRIDIAN mimic、miRNA meridian mimic control、miRNA 21 inhibitor および miRNA Inhibitor control)を、Hela細胞にトランスフェクトしました。

miRIDIAN miRNA mimicは、内在性miRNAのようにターゲットmRNAを調節できる成熟miRNAとして機能する合成2本鎖オリゴです。一方、miRIDIAN miRNA inhibitorは、加水分解されない成熟miRNAの逆相補的な1本鎖合成オリゴで、トランスフェクションの後に内在性miRNAの活性を低下させます。これは、成熟miRNAへのinhibitorの非可逆的結合によるものです(Meister, Landthaler et al. 2004)。

我々は、成熟型miR-21に対してmiR-21のmiRIDIAN mimicとinhibitorがもたらす影響を、LightCycler® 480を用いた定量RT-PCRによって定量しました。miRNAはHigh Pure miRNA Isolation Kitを用いて抽出し、miRCURY LNAを用いた定量RT-PCRを行い、核小体低分子RNA(snoRNA)のSNORD44によりノーマライズしました。50nMのmiR-21 miRIDIAN mimicをトランスフェクトしたHeLa細胞では、miRIDIAN mimic control処理したコントロール細胞よりもmiR-21濃度が7.3倍増加しました(図3)。一方、50nMのmiR-21 miRIDIAN inhibitorをトランスフェクトしたHeLa細胞では、miR-21レベルに77%の減少が見られました(図3)。この結果は、X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent(ロシユ)がmiRIDIAN mimicとmiRIDIAN inhibitorの両方をターゲット細胞内に導入する際のもとも優秀なツールであることを示しています。さらに、High Pure miRNA Isolation Kit(ロシユ)は、その後に行うmiRNA濃度の解析のためのmiRNAの抽出に有益なツールです。

我々は、細胞内miR-21濃度をアップレギュレートまたはダウンレギュレートするためのmiRIDIAN mimicとinhibitorのトランスフェクションの後、miR-21の推定ターゲットであるPDCD4、PTENおよびTLR2の発現を調べました。トータルRNAは、mimicまたはinhibitorと各コントロールのトランスフェクションより2日後のHeLa細胞から、High Pure RNA Isolation Kit(ロシユ)を用いて抽出しました。

mRNAレベルはUniversal ProbeLibraryプローブとABI 7900 HTリアルタイムPCR機器(Applied Biosystems)を用いた定量RT-PCRによって定量し、リファレンス(ハウスキーピング)遺伝子であるHPRT1とGAPDHでノーマライズしました。我々は、miR-21の過剰発現がPDCD4(ヒト新規発がん抑制因子)のmRNAレベルをコントロールと比較して29%有意に減少させることを見出しました(図4)。この結果は、最近の研究成果である、miR-21過剰発現がタンパク質とmRNA両者のレベルにおいてPDCD4に影響することを裏付けるものとなっています(Frankel, Christoffersen et al., JBC, 2008, 283)。

一方、PTEN(human phosphatase and tensin homolog)mRNAレベルに対しては、miR-21の影響はみられませんでした。これは、miR-21レベルのアップレギュレートとダウンレギュレートのいずれにおいても、認められませんでした(図5)。これらの所見は、最近の研究結果である、miR-21はPTENのmRNAレベルを変化させないが、翻訳への影響を介して、タンパク質のレベルで影響を与えるということと一致しています(Wickramasinghe et al. 2009, NAR)。興味深いことに、TLR2(toll-like receptor 2)のmRNAレベルはmiR-21 inhibitorのトランスフェクション後、コントロール細胞と比較して57%も強くダウンレギュレートされました(図6)。miR-21とTLR2は両者共にアポトーシスのレギュレーションに役割を持つ遺伝子として関わっており、TLR2はmiR-21の抗アポトーシス活性の重要なメディエーターである可能性があります。TLR2が直接または間接的にmiR-21活性のターゲットであるかどうかはまだ明らかにされていません。

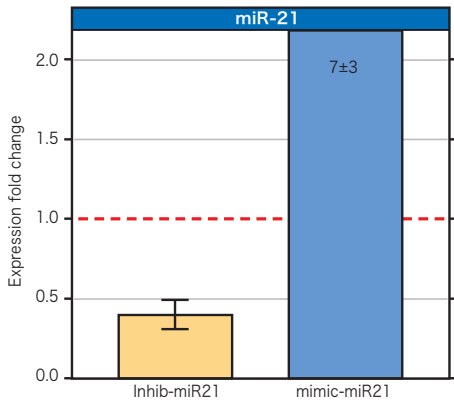


図3：miR-21発現の高レベル変動

各inhibitorおよびmimic controlトランスフェクション細胞(=1.0 赤色の破線)に対するmiR-21阻害後(黄色)またはmiR-21過剰発現後(青色)のmiR-21相対発現レベルを示します。

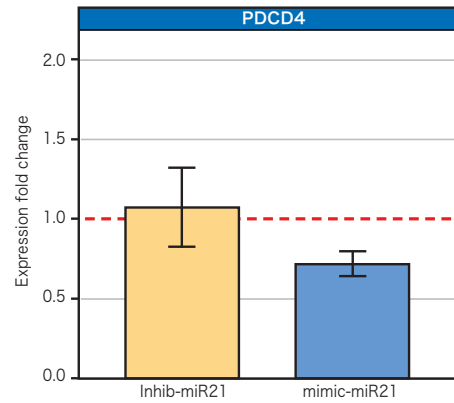


図4：PDCD4遺伝子発現へのmiR21変動の影響

各inhibitorおよびmimic controlトランスフェクション細胞(=1.0 赤色の破線)に対して、miRNA-21のダウンレギュレーション(黄色)はPDCD4 mRNAレベルに影響しないにもかかわらず、miRNA-21過剰発現(青色)がPDCD4 mRNAレベルの減少を引き起こすことを示しています。

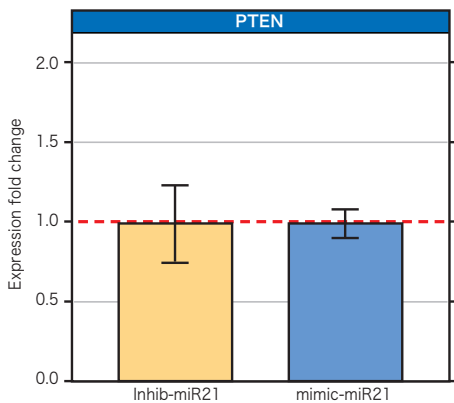


図5：PTEN遺伝子発現へのmiR21変動の影響

PTEN RNAのmRNAレベルはmiRNA-21の細胞内濃度が異なっても変化しません。各inhibitorおよびmimiccontrolトランスフェクション細胞(=1.0 赤色の破線)に対して、miRNA-21過剰発現(黄色)とmiRNA-21 inhibitor処理後(青色)のPTEN mRNA発現レベルを示しています。

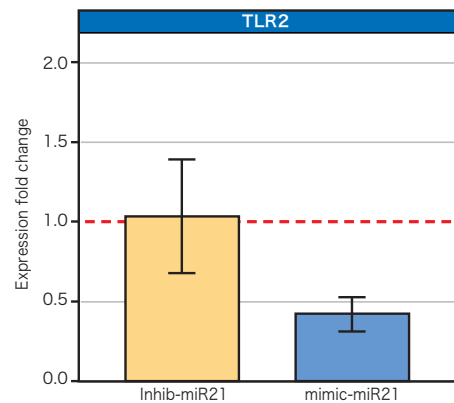


図6：TLR2遺伝子発現へのmiR21変動の影響

各inhibitorおよびmimic control トランスフェクション細胞(=1.0 赤色の破線)に対して、miR-21の阻害(黄色)はTLR2 mRNAレベルに影響を与えないが、miR-21の過剰発現(青色)はTLR2 mRNAレベルの低下を引き起こします。

4 結論

本研究において我々は、3種類の推定ターゲット遺伝子であるPDCD4、PTENおよびTLR2のmRNA発現に対するhsa miR-21の影響を解析しました。X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (ロシュ)を用いることで、外来性miRNAであるmiRIDIAN mimicとinhibitor (Dharmacon)をHeLa細胞へ簡便にトランスフェクトし、ヒトmiR-21の応答を変化させることができました。

miR21レベルの解析に関しては、High Pure miRNA Isolation Kitによって、miRCURY LNA First-strand cDNA Kit、miRCURY LNA SYBR Green Master Mix、miRCURY LNA Endogenous control SNORD44、LNA miR-21 PCR primer(Exiqon)とLightCycler® 480 (ロシュ)を使った定量RT-PCR増幅のための高

品質なテンプレートを作成することができました。推定ターゲットの遺伝子発現解析において、RNA抽出にHigh Pure RNA Isolation Kit (ロシュ)、逆転写にTranscriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (ロシュ)、そしてUniversal ProbeLibraryプローブ、FastStart Universal Probe Master(Rox) 試薬 (ロシュ)とABI 7900HTリアルタイムPCR装置 (Applied Biosystems)を使ったワークフローは、細胞内miRNA変動後のmRNAレベル定量に大変有用でした。

遺伝子発現解析において構築が容易なこのワークフローは、miRNAによって典型的に誘導されるわずかなmRNAレベル変化の検出に対しても十分に高感度です。

5 リファレンス

1. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
2. Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y. and Tuschl, T. (2004) Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*, **10**, 544-550.
3. Frankel, L.B., Christoffersen, N.R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A. and Lund, A.H. (2008) Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem*, **283**, 1026-1033.
4. Wickramasinghe, N.S., Manavalan, T.T., Dougherty, S.M., Riggs, K.A., Li, Y. and Klinge, C.M. (2009) Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res.*

Ordering Information

製品名	製品番号	包装単位	希望販売価格(税抜)
X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent	4 476 093	1 ml	23,600円
	4 476 115	5 × 1 ml	94,300円
High Pure RNA Isolation Kit	1 828 665	50回	32,700円
High Pure miRNA Isolation kit	5 080 576	50回	33,000円
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	4 896 866	100反応	64,500円
	4 897 030	200反応	110,000円
LightCycler® 480 II Instrument, 384 well	5 015 243	1台	9,334,000円
FastStart Universal Probe Master (Rox)	4 913 957	10 × 1.25 ml	90,000円
	4 914 058	10 × 5 ml	319,000円
Universal ProbeLibrary Set, Human	4 683 633	1セット	470,000円
Universal ProbeLibrary Set, Human Reference Gene Assays	5 046 114	1セット	98,000円

For Life science research only.

X-TREMEGENE, LIGHTCYCLER, HIGH PURE and FASTSTART are trademarks of Roche.

ProbeLibrary and LNA are registered trademark of Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark.

SYBR is a trademark of Molecular Probes, Inc.

miRIDIAN is a trademark of Dharmacon.

Other brands or product names are trademarks of their respective holders.



お問い合わせは…

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
AS事業部 (研究用試薬・機器)

本社：〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号
TEL.03-5443-5287 FAX.03-5443-7098
E-Mail: tokyo.biochemicals@roche.com
U R L : <http://www.roche-biochem.jp>