

microRNAのプロファイリングを 目的としたmicroRNA cloning

川東 豊、三嶋 拓也、水口 義昭、瀧澤 俊広

日本医科大学大学院 機能形態学分野

はじめに

microRNA (miRNA) は18 ~ 26 nt 程度の non-coding RNA であり、器官の発達、ウイルス感染、癌の発生などに関与していることが示唆されており、研究対象として非常に興味深い分野である。

このmiRNAの研究手法として、クローニングやバイオインフォマティクスを用いて、発現しているmiRNAを決定するという方法があり、さまざまな種で多数のmiRNAが発見されているのは、主にこの手法によるところが大きい。

われわれも以前より、さまざまな細胞や組織でのmiRNAのクローニングを行い、そのプロファイリングの作成を目標に研究を行ってきており、いろいろなデータがそろいつつある。しかし、このクローニングにおいては、従来、論文などで発表されている手法は、total RNAの抽出から始めて、concatemerization、TAクローニング、シーケンスまで数日間という長い時間を要するというのが1つの問題点であった。

今回われわれが用いたsmall RNA Gel Extraction Kit、small RNA Cloning Kitは去年の暮れに、タカラバイオから発売されたものであるが、この長い時間がかかるという問題点を見事にクリアしている商品であるように思われる。

ここでは、ヒトの培養細胞株から抽出したtotal RNAを用いてのクローニングについて、シーケンスデータとともに紹介する。

方法

(1) total RNA 抽出

クローニングの準備として当然、total RNAの準備が必要だが、この後のsmall RNAの抽出において、15%変性ポリアクリルアミドゲルへアプライする量を考慮すると、10 mg/ml程度の濃度のRNAを確保することが望ましい。培養細胞では、75 cm²のフラスコで90 ~ 99%コンフルエント程度に細胞が増えたもの8 ~ 10枚程度からRNAを抽出し、最終的に50 µl程度のRNase free dH₂Oに溶解すると、大体この濃度になる。

(2) small RNA 抽出

ここでは、15%変性ポリアクリルアミドゲルにマーカーとサンプルを同時に泳動することになるのだが、最初は1ウェルあたりに10 µl程度のtotal RNA(100 µg)をアプライする

ように調製し、2ウェルぐらい泳動するのが良いと思われる。1ウェル分はsmall RNAのストックとしてとっておくと、トラブルシューティングしやすい。

われわれは、アプライする前に80、5分の熱処理を行っている。200 Vでおおよそ45分程度、電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色し、目的の長さの部分のゲルを切り出す。

この後のゲルからの溶出においてわれわれは、従来はA社の試薬を用いて37で一晚静置し、溶出を行っていたが、ここで、small RNA Gel Extraction Kitを用いると、約1時間程度でゲルからの抽出が終了する。電気泳動開始から染色時間を入れても2時間半もあれば終了する。細かい手法に関しては製品プロトコルに譲るが、コツとしては最初のゲルを破碎するための遠心を、製品プロトコルでは8,000 × g、30秒としているが、破碎されにくい場合があるので、初めから10,000 × g、もしくはそれ以上のスピードで1 ~ 2分遠心したほうが良い。結局、そのほうが早く破碎が終わる印象がある。また、最後に溶出するdH₂Oは、次のクローニングのファーストステップのBAP処理を見越して40 µl程度にして、そのdH₂Oを2回カラムにアプライするようになるとよい。

(3) small RNA クローニング

ここから先のクローニングについては、基本的には製品プロトコルにしたがっているが、エタノール沈殿は100%エタノールを加えた後、-20、20分の後、遠心機のmax speed(われわれは20,000 × g) 10分程度で十分である。

従来では、アダプターのライゲーションだけで2回計8時間、ライゲーションのたびに電気泳動を行い、ゲルからの溶出を行うので、3回の一晩静置を必要としたが、small RNA Cloning Kitでは、徹夜をすれば丸1日で最後のPCRまで行うことが可能である。

最後のPCRを行ったら、われわれは12.5%未変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし、PCR産物の抽出を行っているが、このときのゲルからの抽出では、small RNA Gel Extraction Kitの37、30分のインキュベーションを1 ~ 2時間程度に延長している。この理由としては、われわれのsmall RNA Cloning Kitの抽出効率の検証実験で、18 ~ 26 nt程度の短いsmall RNAの抽出では30分で十分だが、約60 ~ 70 bpとなるPCR産物の溶出では、30分では若干効率が落

ちたことによる。ただ、PCRを行っているので、30分でも十分なPCR産物は得られると考えられる。
そして、最後の溶出は60 μ l のdH₂Oで2回のアプライを行い、高濃度・高収量のPCR産物溶液を得ている。

(4) concatemerization

miRNAのクローニングでもっとも難しいのは、このconcatemerizationであると思われる。ここで製品プロトコールでは、得られたPCR産物をそのまま制限酵素処理しているが、われわれは、このPCR産物をテンプレートとして2nd PCRを行っている。具体的には、*TaKaRa Ex Taq[®] HS*を用いて、全体量300 μ lに対して、先ほど得られたPCR産物を1 μ l加え、PCRを行う。サーマルサイクラーの設定は、98、10秒、60、30秒、72、30秒を15サイクルである。

製品プロトコール通り、はじめのPCR後に制限酵素処理を行い、concatemerizationを行っても良いが、1st PCR 2nd PCRという流れをとったほうが、

- ・同じtotal RNA量でも、より多くのクローニング実験を行える
- ・1st PCRの確認の電気泳動で目的とするところにバンドが見えていれば、その後のクローニングにたとえ失敗したとしても、2nd PCRからやり直すことが可能となり、大幅な時間の節約となる
- ・Concatemerizationを効率よく行うためには、十分なPCR産物としっかりした制限酵素処理が重要となるが、2nd PCRを行うことでPCR産物の量をしっかり確保できる

などの利点がある。

ただ、small RNA Cloning Kitに含まれているプライマーでは、2nd PCRを行うには少ないので、プライマーは別に購入する必要がある(配列は製品プロトコールに掲載)。

また、このキットに添付の*Sse8387 I*という制限酵素は8塩基認識の制限酵素であり、理論上は $4^8 = 65,536$ 塩基に1回、認識部位が出現する確率となるので、クローニングされたmiRNAに、この制限酵素の認識部位が含まれる可能性は大変低くなり、実験の精度が格段に向上するが、1 U 単位の価格が高い制限酵素である。われわれのプロトコールでは、2nd PCR後の制限酵素処理は300 μ l系に10 ~ 15 μ l(150 ~ 300 U程度)の制限酵素を加えるようにしているので、この制限酵素を使用すると、ランニングコストがかかってしまうという問題点がある。しかし、この制限酵素の認識部位は*Pst I*の認識部位も含んでいるので、これを利用し、*Pst I*で制限酵素処理を行っている。*Pst I*は6塩基認識の制限酵素であるが、確率的にはそれでも $4^6 = 4,096$ 塩基に1回の認識部位が出現する程度である。確率的にはこれでも十分と考えている。

300 μ l系の制限酵素処理を37、8時間行い(2nd PCRの溶液は加える制限酵素の量に応じて除タンパク・エタノー

ル沈殿を行い、量を調節しておく)除タンパク・エタノール沈殿を行い、最終的に5 μ lのdH₂Oで溶解しておく。制限酵素処理後のPCR産物のライゲーションには、タカラバイオのDNA Ligation Kit Ver. 2.1を使用した。I液 10 μ l、II液 5 μ lを加え、16、1時間のライゲーションを行った。

この溶液を2%TAEアガロースゲルで電気泳動する。われわれは1,000 bp以上の部分を1.5 cm程度切り出して、ゲルよりDNAを抽出している。

抽出したDNAは、末端は切断されたままなので、DNA溶液11.9 μ l、dNTP 1.5 μ l、10 \times *Ex Taq* Buffer 1.5 μ l、*TaKaRa Ex Taq[®] HS* 0.1 μ lで、72、5分のエクステンションを行う。こうすることでTAクローニングが可能になるので、TAクローニングベクターに組み込み、トランスフォーメーション、シーケンスを行う。

結果

(1) 1st PCR

1st PCRで目的のPCR産物は得られているが、アダプター同士がライゲーションしているものの方が量的に多いことがわかる(図1)。

(2) 2nd PCR

先に述べたように、われわれは製品プロトコールのPCR後に、それをテンプレートとして2nd PCRを行っている。2nd PCRを行うことで、目的とするPCR産物が、アダプター同士がライゲーションしたもののより量が圧倒的に増えていることがわかる(図2)。

(3) シーケンス

シーケンス結果を示す(図3)。青で示した部分がアダプター配列、赤で示した部分がmiRNA配列である。このクローニングには、5つのmiRNA配列がシーケンスできたことがわかる。アダプター配列は制限酵素処理をしてから再度ライゲーションしているため、プロトコールの配列と微妙に違い、miRNA配列を見つけるのに少々苦労するが、制限酵素認識部位を目安にすると見つけやすい。

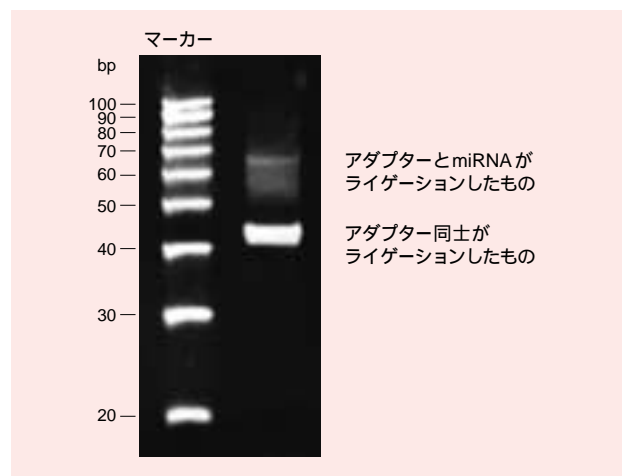


図1 1st PCR 結果

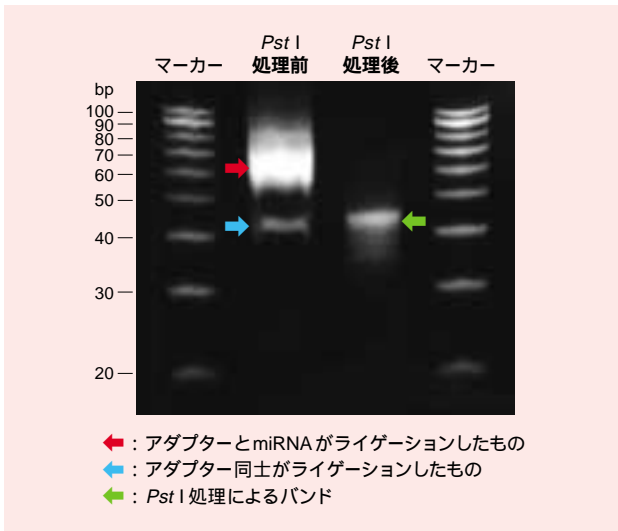


図2 2nd PCR 結果

miRNA のクローニング自体はすでに論文上で発表されている手法であるが、マーカー、アダプター、PCR プライマーなどを発注し、なおかつ数日間の実験期間を要し、さらにトランスフォーメーション、シーケンスまで合わせると1週間程度かかることを考えると、予備実験的にどのmiRNAが発現しているか、多く発現しているのはどれかなどを確認するには、これらの製品は非常に有用なツールであると考えられる。

今後さまざまな生物種・細胞種において、miRNA のクローニング結果が報告されることになるであろうが、その流れに乗り遅れないためにも、さらに精度を高めた実験をしていきたいと考えている。

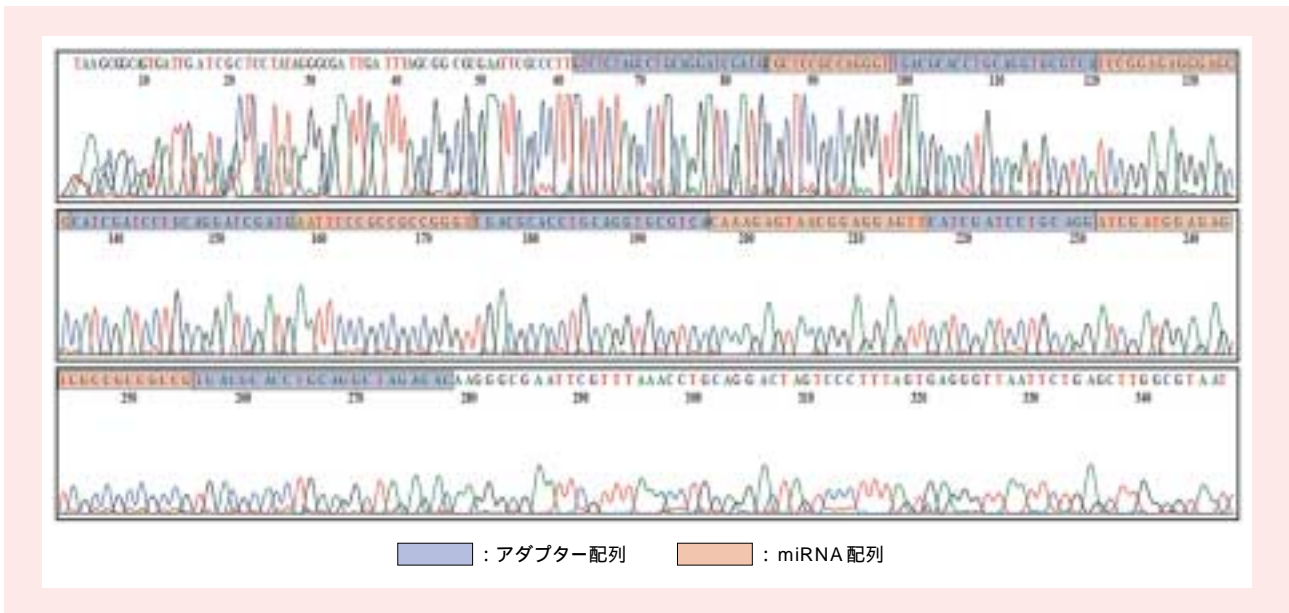


図3 シーケンス結果

本稿でご紹介した製品

- small RNA Gel Extraction Kit*
製品コード 9106 20回 ¥25,000
- small RNA Cloning Kit*
製品コード RR065 10回 ¥78,000
- TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version
製品コード RR006A 250 U ¥30,000
製品コード RR006B 1,000 U ¥96,000
- DNA Ligation Kit Ver. 2.1
製品コード 6022 1 Kit ¥25,000
- Sse8387 I
製品コード 1183A 400 U ¥10,000
製品コード 1183B 2,000 U ¥40,000
製品コード 1183BH(高濃度) 2,000 U ¥40,000

* : 特集2(本誌14ページ)で、microRNA 関連製品についてご紹介しています。あわせてご覧ください。

本文中の製品に該当するライセンス確認事項は23ページをご覧ください。
[①](#) [②](#)