

microRNA 研究用製品のご紹介

small RNA

近年、細胞内で発現している RNA の中に、タンパク質をコードしていないものが多く存在し、それらが重要な機能を持つことが明らかになってきました。これらは機能性 RNA という名称で分類されていますが、その中でも特に 18 ~ 26 塩基程度の低分子 RNA の機能が注目されています。これら低分子 RNA の機能としては、遺伝子発現を mRNA レベルで抑制する、遺伝子発現を翻訳レベルで抑制する、ことがこれまでに示されています^{1,2)}。microRNA (miRNA)^{3,4)} は低分子 RNA の一つで、現在までに各種生物において数十から数百種類の miRNA がデータベース miRBase⁵⁾ に登録されています。そのターゲットとなるメッセンジャー RNA (mRNA) や制御機構に関しては、不明な部分がまだまだ多く、全種類の解明とともに現在多くの研究者が注目している分野です。その生成メカニズムは、まず核内で 5 -cap 構造と 3 -polyA tail 構造を持つ長鎖の一次前駆体 (primary miRNA : pri-miRNA) として、通常 mRNA と同様に RNA polymerase II によって転写されます。その後、核内において Drosha と呼ばれる

ヌクレアーゼにより pri-miRNA 中の高次構造が認識され、その stem-loop 構造部分が二次前駆体 (pre-miRNA) として切り出され、細胞質へ輸送されます。細胞質に輸送された pre-miRNA は、今度は Dicer と呼ばれるヌクレアーゼによってループ部分の切断を受けて一本鎖の RNA 分子の成熟体 (mature-miRNA) となり、RISC (RNA Induced Silencing Complex) と呼ばれるタンパク質複合体と相互作用して、その機能を発揮すると考えられています⁶⁾。タカラバイオでは、MPSS[®] (Massively Parallel Signature Sequencing) を用いた網羅的な miRNA の探索と解析サービスを既に提供しており、BIO VIEW 50 号にてご紹介いたしました。MPSS[®] を用いることで、新しい miRNA を獲得することができ、さらにサンプル特異的な発現解析を網羅的に行うことが可能となります⁷⁾。このたび、これら新規 miRNA を含む発現ライブラリーやクローニングキットなど、新たに miRNA 研究用製品を発売いたしましたので、ご紹介いたします。

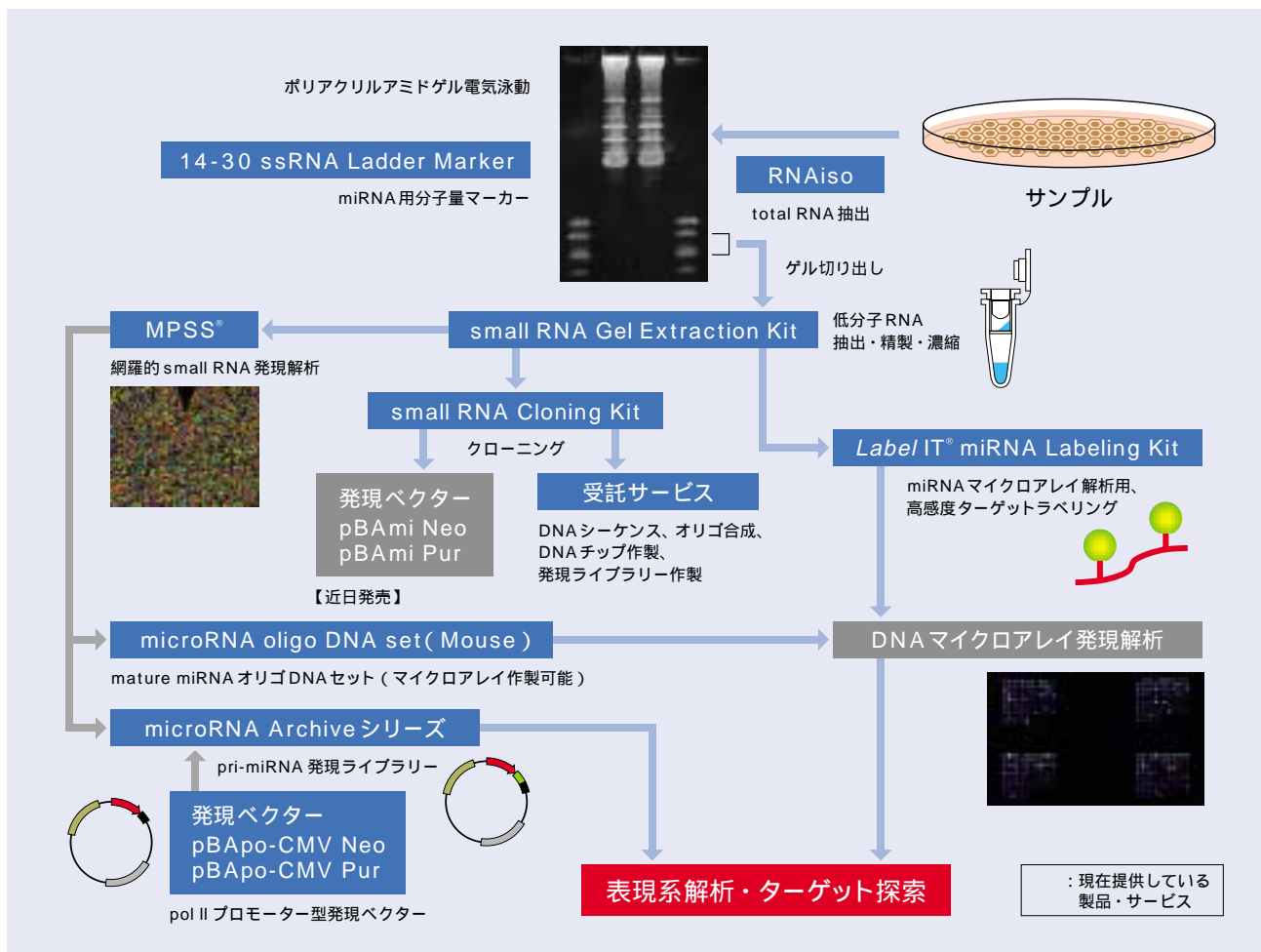


図1 microRNA 実験の流れ(クローニングから発現解析・表現系解析まで)⁸⁾

miRNA 実験の流れ

図1に、miRNAのクローニングから発現解析・表現系解析までの実験の流れの一例を示します。サンプルからtotal RNAを抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にてmiRNA画分を切り出してmiRNAの抽出・精製を行い、ベクターにクローニングしてシーケンシングを行います。もしくは精製したmiRNAを蛍光標識してDNAマイクロアレイによる発現解析や、MPSS[®]解析に供して新規miRNAの探索を行います。

各種 miRNA 研究用製品のご紹介

- ・ small RNA Gel Extraction Kit
簡便・迅速な低分子RNA調製キット

miRNAなど低分子RNAをクローニングするためのRNA調製には、total RNAなどから目的サイズのRNA画分を分画する必要があります。その手段としてポリアクリルアミドゲル電気泳動は有効な方法ですが、電気泳動後のゲルから低分子RNAを回収するには、低分子核酸のエタノール沈殿などの操作に長時間を要します。small RNA Gel Extraction Kitは、ポリアクリルアミドゲルからの低分子RNA回収操作を簡便化した製品です。本キットでは、2種類のフィルター付き遠心チューブを使用し、低分子RNA調製ステップを迅速に(約1時間で)行なうことができます(図2)。煩雑なエタノール沈殿操作は不要です。また、抽出過程におけるリボヌクレアーゼの影響は、抽出バッファーに含まれる変

性剤により排除できるため、回収したRNAはsmall RNA Cloning Kitの基質として利用できる他、一般的なアプリケーションにも使用可能です。

- ・ small RNA Cloning Kit
miRNAからcDNAをわずか1、2日で調製可能

miRNAなど低分子RNAの発現解析を行う手段の一つとして、クローニング解析は有用な方法です。その場合、低分子RNAはmRNAのようなpolyA tailを持たないため、分離した低分子RNA画分に対し、その5'側および3'側にRNAまたはRNA/DNAキメラのアダプターを結合させて逆転写し、PCRで増幅した後、クローニングを行う方法が用いられています⁹⁾。

本キットは、上記原理をもとにした低分子RNAのクローニング用cDNA増幅キットです。従来の方では、酵素反応後の精製やアダプター結合後のゲル抜き操作などが必要で、反応終了まで3、4日かかりますが、本キットを用いることで、1、2日の簡便な操作で低分子RNA由来cDNAを増幅することが可能です。磁性ビーズの利用により、煩雑なゲル抜き操作は不要です。増幅したcDNAは、そのままTAクローニングに用いることができます。また、アダプター配列中にある制限酵素サイトを利用したクローニングも可能です。

Total RNAを電気泳動してゲル抜きを行うなどの操作で調製した低分子RNA(small RNA)を、本キットを用いてクローニングする場合の流れを図3に示します。

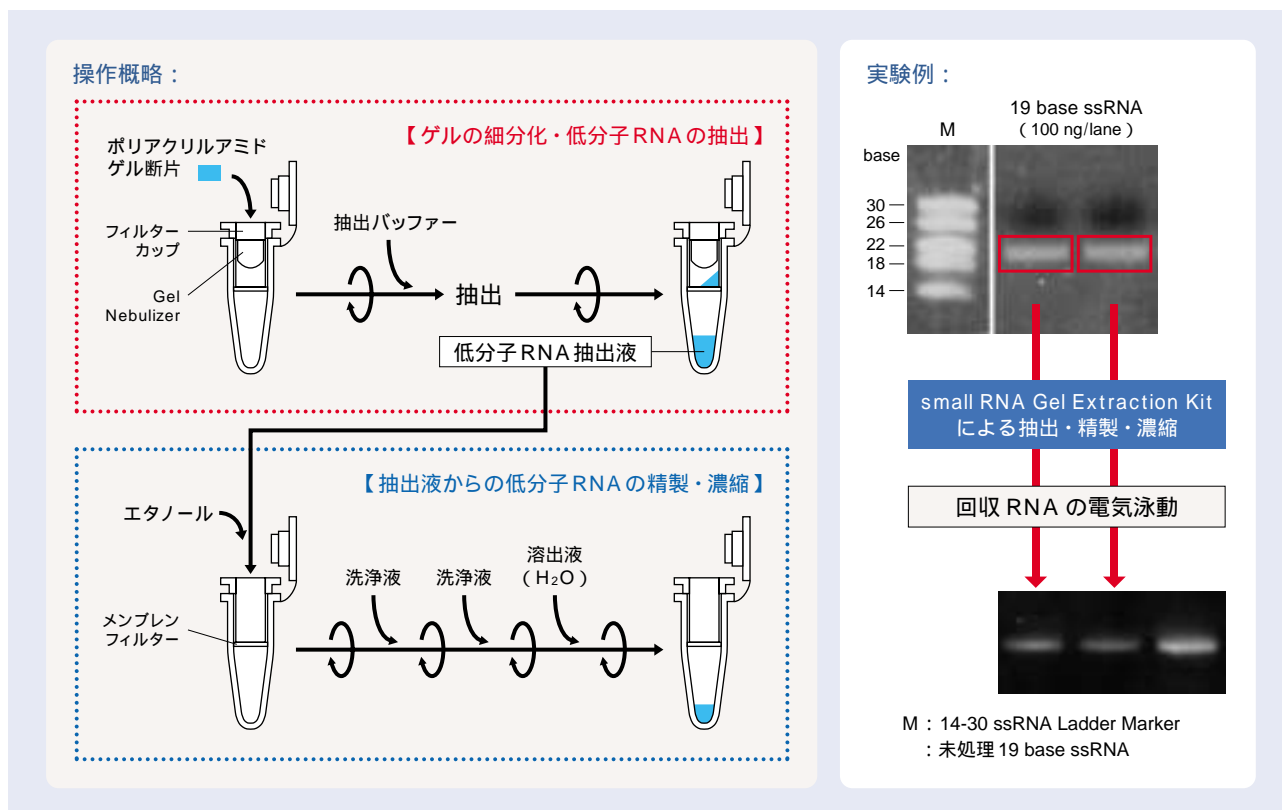


図2 small RNA Gel Extraction Kitの操作概略および実験例

microRNA

研究用製品のご紹介

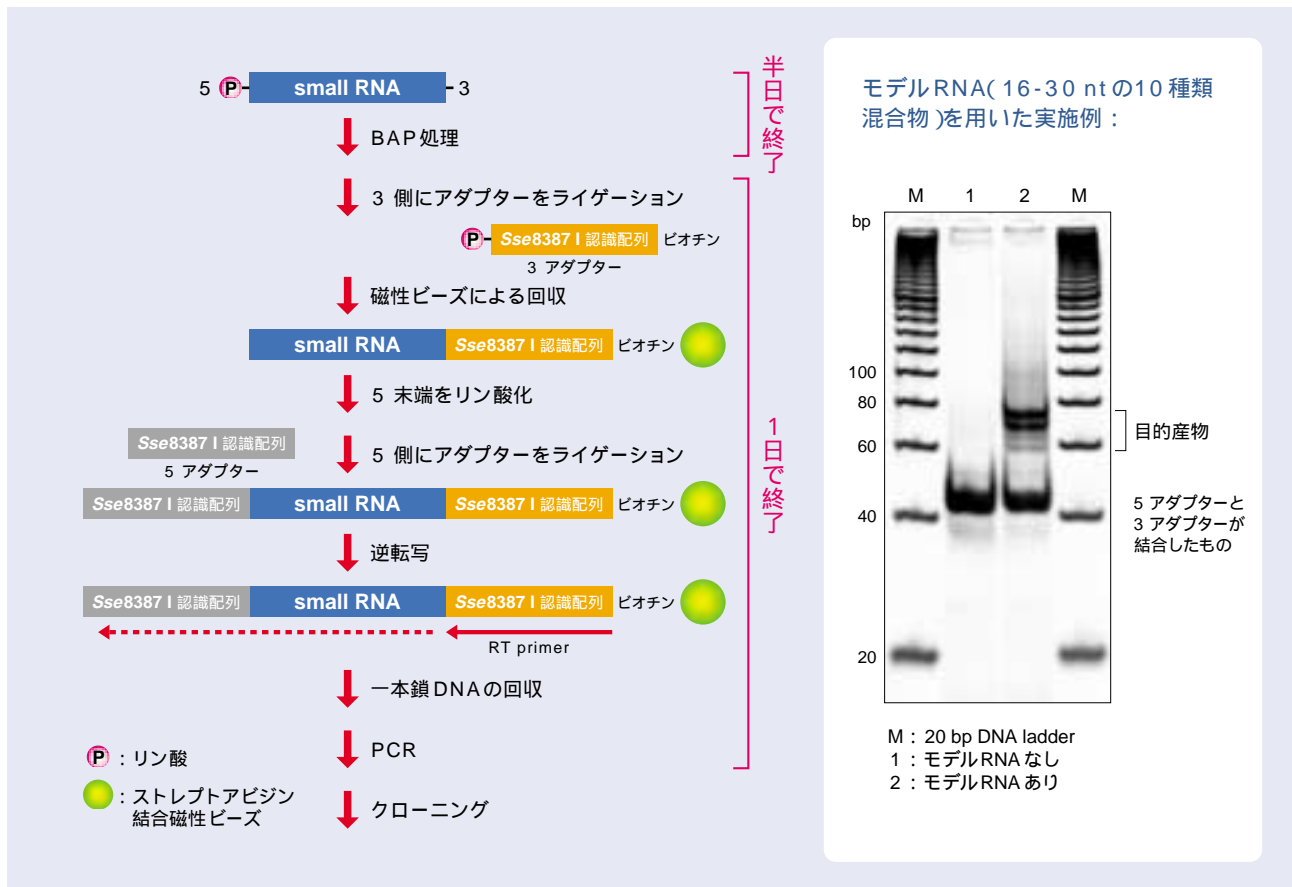


図3 small RNA Cloning Kit を用いた microRNA クローニングの流れ

調製した small RNA を BAP 処理により、5 側のリン酸基を外す。

BAP 処理した RNA の 3 側に、ビオチン化 RNA/DNA キメラアダプターを結合させる。

ストレプトアビジン結合磁気ビーズを用いてビオチン化アダプター結合 small RNA を回収し、リン酸化により 5 側にリン酸基を付与する。

5 側に、RNA/DNA キメラアダプターを結合させた後、RT-primer を用いて逆転写酵素 M-MLV により、逆転写反応を行う。

cDNA をビーズから回収し、PCR を行う。

PCR フラグメントまたは制限酵素処理したフラグメントを回収し、クローニングを行う。

本キットを用いて、10 種類のモデル RNA (16 ~ 30 nt) を cDNA 化し、増幅した後、電気泳動により確認した例を図 3 に示しました。目的産物に相当するバンドを抽出することにより、簡単に small RNA 由来 cDNA をクローニングすることができます。

なお、本誌 18 ~ 20 ページでは、日本医科大学大学院 川東 豊先生による本試薬使用例をご紹介します。

・ microRNA Archive Human ver. 1、Mouse ver. 1
microRNA の網羅的機能解析・Phenome 解析のリソース

microRNA Archive シリーズは、miRBase⁵⁾ に登録されているヒトおよびマウスの miRNA の pre-miRNA と、タカラバイオが MPSS[®] テクノロジーによって独自に発見した miRNA 候補の推定 pre-miRNA 配列⁷⁾ について、それらをコードしているゲノム上の配列の前後およそ 60 塩基を含む領域を、プラスミドベクター pBApo-CMV-Neo¹⁰⁾ の CMV プロモーター下流 (BamH I 部位と Hind III 部位の間) にクローニングしたものです (図 4)。

これらのプラスミドをトランスフェクトした動物細胞では、CMV プロモーターから pri-miRNA 様の RNA が転写され、pre-miRNA および mature-miRNA へとプロセッシングを受け、その結果、各プラスミドにコードされている miRNA が機能を発揮することが期待されます。

製品形態は、100 µg/ml の各 miRNA 発現プラスミド DNA 溶液 50 µl が、96 穴プレート 4 枚の各ウェルに分注された形で、すぐ実験に利用できるようになっており、現在 Human miRNA と Mouse miRNA のそれぞれの発現セットがあります。

Human ver. 1 では、miRBase (ver. 7.0) に登録されたヒト miRNA のうちの約 300 配列 (mature-miRNA) と、タカラバイオが 293 細胞を材料にして行った MPSS[®] 解析で発見し

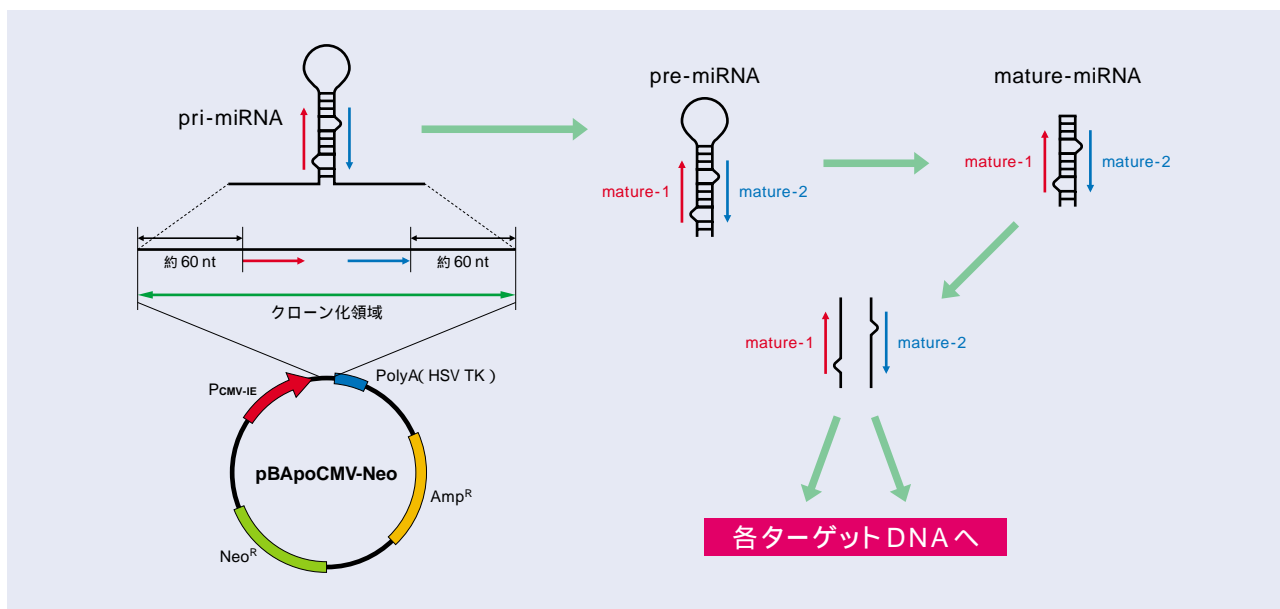


図4 microRNA Archive シリーズの基本構造

た未公開の mature-miRNA 候補約 30 配列¹¹⁾が用意されています。

Mouse ver. 1 は、マウス胎児を材料にして MPSS[®]解析で発見した新規 miRNA 候補⁷⁾、約 100 種を含む 300 種以上のクローンが用意されています。

miRNA の時間的・空間的発現制御は、pri-miRNA の転写制御だけでなく、post-transcriptional なプロセッシング制御も受けていることが予測され、microRNA Archive シリーズは、これらの天然型に近い miRNA の発現を行うためのプラスミドセットですので、各 miRNA 自身の機能解析やプロセッシング制御解析、あるいはそのターゲット遺伝子の探索等への利用が期待されます。

その他 miRNA 研究用製品のご紹介

- ・ microRNA oligo DNA set Mouse ver. 1
miRBase⁵⁾に登録されているマウス miRNA と、タカラバイオが MPSS[®]テクノロジー⁷⁾によって独自に発見した miRNA 候補のオリゴセットです。マイクロアレイ作製などに有用です。
- ・ Label IT[®] miRNA Labeling Kit
ワンステップで miRNA の標識を行うキットです。反応時間はわずか 60 分で、非酵素的な化学標識を行うため、再現性良く標識率の高いターゲットを作製することが可能です。
- ・ RNAiso
細胞や組織サンプルから total RNA を簡便に抽出できます。
- ・ 14-30 ssRNA Ladder Marker
miRNA を電気泳動する際に最適な分子量マーカーです。

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。□

【参考文献】

- 1) Bartel, DP.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. (2004) *Cell*, 116, 281-297.
- 2) Aravin, A., et al.: Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. (2005) *FEBS Lett.*, 579, 5830-5840.
- 3) Kim, VN.: Small RNAs: classification, biogenesis, and function. (2005) *Mol Cells*, 19, 1-15.
- 4) He, L., Hannon, GJ.: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. (2004) *Nat Rev Genet.*, 7, 522-531.
- 5) <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>
- 6) Ambros, V., et al.: uniform system for microRNA annotation. (2003) *RNA*, 9, 277-279.
- 7) Mineno, J., et al.: The expression profile of microRNAs in mouse embryos. (2006) *Nucleic Acids Res.*, 34, 1765-1771.
- 8) http://bio.takara.co.jp/catalog/Catalog_d.asp?C_ID=C2282
- 9) <http://web.wi.mit.edu/bartel/pub/protocols/miRNACloningUpdate0705.pdf>
- 10) http://bio.takara.co.jp/catalog/Catalog_d.asp?C_ID=C2262
- 11) 投稿準備中

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
- ・ microRNA Archive Human ver. 1、Mouse ver. 1
弊社各販売課までお問い合わせください
- ・ microRNA oligo DNA set Mouse ver. 1
弊社各販売課までお問い合わせください
- ・ Label IT[®] miRNA Labeling Kit *Mirus 社の製品です
製品コード MIR8305 2 x 5 反応(合計 10 反応分) ¥54,000
製品コード MIR8325 2 x 25 反応(合計 50 反応分) ¥220,000
- ・ RNAiso
製品コード 9105 100 ml ¥16,000
製品コード 9107 200 ml ¥28,000
- ・ 14-30 ssRNA Ladder Marker
製品コード 3416 25 レーン分 ¥25,000