

# miRNA mimic 固相トランスフェクションプレートによる miRNA 機能解析

細川 浩之<sup>1</sup>, 佐藤 秀昭<sup>2</sup>, 吉川 智啓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>株式会社サイトパスファインダー, <sup>2</sup>株式会社ジーンデザイン

CytoPathfinder

GeneDesign, Inc.

## はじめに

### miRNAによる遺伝子発現制御

細胞内在性の小分子RNAはmiRNAと呼ばれ、近年、様々なガン細胞においてmiRNAの発現異常が見られることや、miRNAによる遺伝子発現制御がガン細胞、幹細胞、免疫細胞などにおいて重要な役割を果たしていることが示されている。ヒトにおいては、現在、2,000種以上のmiRNAが発見されており、その数は更に増えている。遺伝子発現制御の機構としては、多くの場合、遺伝子下流の非翻訳領域(3' UTR)を介した mRNA と miRNA の相互作用により、タンパク質発現を抑制していることが明らかになっている。

### miRNA mimicによる機能獲得

化学合成したdsRNA (miRNA mimic) を細胞へ導入することによるmiRNAの機能分析は、lentivirus 発現系とともに、ハイスループット化が可能であり、非常に有用なアッセイである。miRNA mimic を用いる利点としては、トランスフェクション条件を整えることにより確実に過剰発現状態を実現できること、化学修飾などによりオフターゲット効果を低減できることにあるだろう。

### miRNA mimic と固相トランスフェクション

固相トランスフェクションはトランスフェクション実験を再現性の高いものにし、比較的容易にハイスループット化を可能にする。今回、新規に合成した miRNA mimic を固相トランスフェクションと組み合わせて実施したアッセイの例を示す。

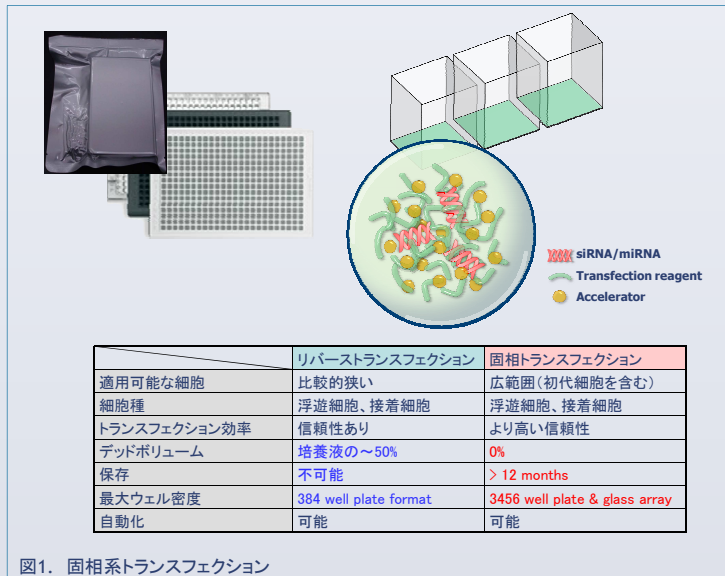


図1. 固相トランスフェクション

## 方法

### レポーターアッセイによる miRNA mimic 機能評価

レポーターアッセイ用プラスミド (GeneCopoeia) を導入した HeLa 細胞を用いてレポーターアッセイを行なった(図2)。

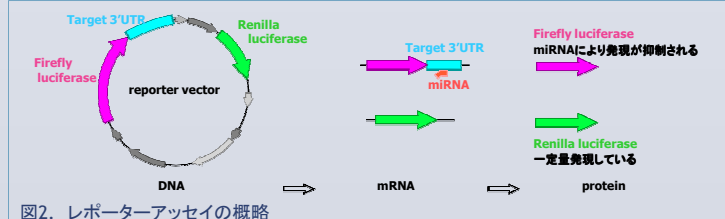


図2. レポーターアッセイの概略

### 新規 miRNA mimics の細胞生存への影響

レポーターアッセイにて遺伝子発現抑制機能を確認した新規 miRNA mimic より合成法を1種類選択し、32種のガン関連 miRNA mimic を合成した。これら32種の固相トランスフェクション法(図1)によりHeLa, A549, もしくは、HEK293細胞に導入し、細胞生存への影響を調べた。一部についてはPI染色後、顕微鏡観察した。

## 結果

### miRNA mimic による遺伝子発現抑制

miRNA mimic の評価用のためにmiR-1, let-7a, miR-26a, miR-34a, miR-135a, miR-137を選択し、各種合成法にて合成した。その機能をレポーターアッセイにて調べた。miR-1に対するアッセイを一例として図3a-cに示している。miR-1の標的遺伝子としてすでに報告のあるG6PDの3'UTR配列を持つレポーターベクターを用いた。G6PDには三か所のmiR-1の標的となる可能性のある配列が存在している(図3a)。他の let-7a, miR-26a, miR-34a, miR-135a, miR-137の標的配列は存在しない。従って、miR-1 mimic をトランスフェクションした場合に、試験レポーターの発現量が抑制され、他のmiRNA mimicを導入した場合には変化が少ない合成法が、miRNA mimic として優れている候補と判断できる。実際の測定例を図3bに示している。未処理と比較し、miR-1 mimic 導入時に試験レポーターの発現量が抑制されていることが分かる。

本アッセイを繰り返すことにより、いくつかの合成法にて、図3cに示すような特異性が高いmiRNA mimic を得ることができた。これらの合成法より、1合成法を選択し、テストライブラリを作成した。

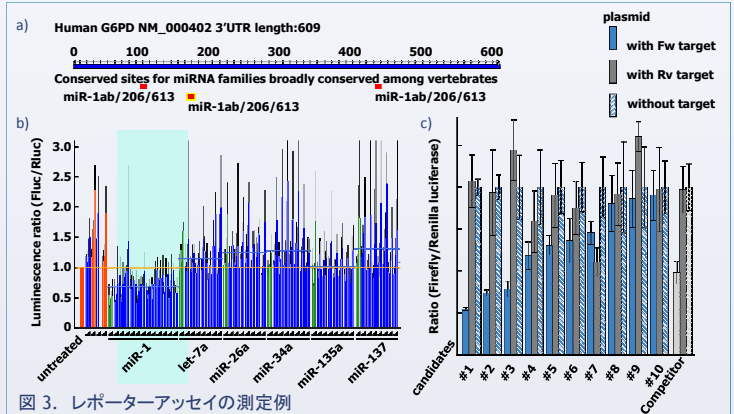


図3. レポーターアッセイの測定例

### 新規 miRNA mimics の細胞への影響

32種のmiRNA mimics について、細胞生存への影響を調べた(図4)。細胞死を引き起こすsiRNAをコントロールとして用いることで、トランスフェクション条件を決定した。HeLa を1% FBS 存在下にて培養した場合には、miR-200c-3p, miR-17-5p, miR-214-3p, miR-20b-5p, miR-16-5p が細胞の生存率を低下させていた。A549 では、1% FBS 存在下にて培養した場合に miR-199a-5p, miR-200c-3p, miR-16-5p が生存率を低下させていた。

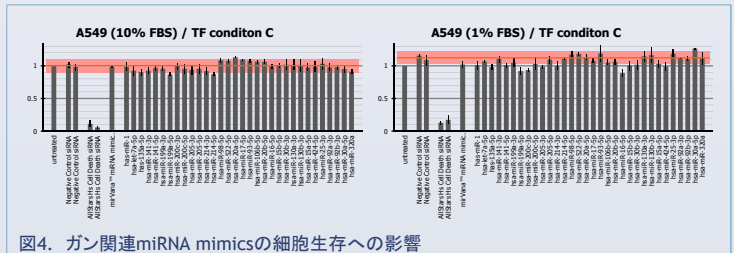


図4. ガン関連miRNA mimicsの細胞生存への影響

A549 細胞を1% FBS 存在下にて培養後、PI染色し、顕微鏡観察したところ、miR-106b-5pを導入した場合に、apoptotic な細胞が増えているように見えた。培養時間を延ばせば、生存率が変わってくるかもしれない。

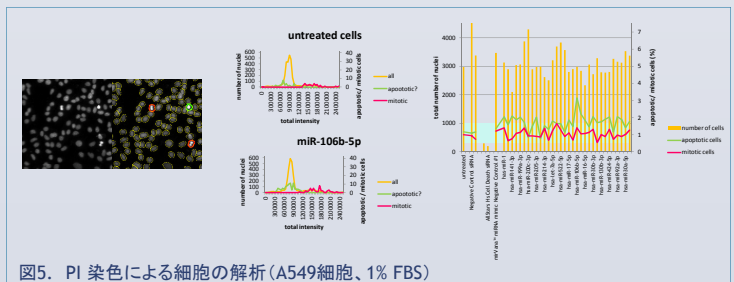


図5. PI染色による細胞の解析(A549細胞、1% FBS)

## まとめと展望

- ガン関連 miRNA の一部のmiRNA mimic が細胞の生存率を低下させた。
- 一部のmiRNA mimic が細胞周期に影響を与える可能性が示唆された。

miRNA mimic と固相トランスフェクション法と組み合わせることで、ハイスループット、ハイコンテントアッセイと親和性が高まるだろう。

## 謝辞

本研究は経済産業省 グローバル技術連携支援事業の支援を受けて実施したものです。深く感謝いたします。

## 連絡先

CytoPathfinder, Inc

〒135-0064 東京都江東区青海2-4-7

(独)産業技術総合研究所臨海副都心センター別館バイオ・IT融合棟0616号室

TEL: 03-5530-8086 FAX: 03-5530-8087

http://www.cypathfinder.com

GeneDesign, Inc.

〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-7-29

TEL: 072-640-5180 FAX: 072-640-5181

http://www.genedesign.co.jp