

機関番号：33703

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21791819

研究課題名 (和文) 電気泳動による次世代のマイクロ RNA プロファイリング法

研究課題名 (英文) Next-generation method with electrophoresis in microRNA expression profiling

研究代表者

林 徹 (HAYASHI TORU)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：10454266

研究成果の概要 (和文) : マイクロ RNA の新しいプロファイリング法の確立を目的とした。核酸 1 塩基の違いを検出できる電気泳動法 (変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法) を用いることで、複数試料間で特異的な発現パターンを示すマイクロ RNA を、既知あるいは未知を問わず検出することを目指した。条件検討の結果、約 20 塩基と短いマイクロ RNA の 1-2 塩基の違いも区別することが出来た。マイクロ RNA には様々なバリエーションが存在しているがこれらも識別可能と考えられる。

研究成果の概要 (英文) : The purpose of this study was to establish a new method to analyze microRNAs (miRNAs) expression profile. In denaturing gradient gel electrophoresis DNA fragments of the same length but with different base-pair sequences can be separated. This method enables us to detect miRNAs including novel sequences and to distinguish single nucleotide difference among miRNAs. Then, I attempted to detect miRNAs showing specific expression pattern among multiple samples by this electrophoresis. This method distinguished tiny sequences variation successfully, suggesting that it is probable to detect miRNA variants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：マイクロ RNA、遺伝子解析

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：マイクロ RNA、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物の発生や分化、増殖などの調節機構に、低分子 RNA であるマイクロ RNA が関与している。このマイクロ RNA は 19 ~ 24 塩基と短く、標的とするメッセンジャー RNA と部分相補的に結合し、翻訳レベルでタンパク質の発現を制御している。

(2) 従来、生体に発現するマイクロ RNA の「種類」を調べるプロファイリングは、マイクロアレイやクローン解析によって実施されてきた。しかしマイクロアレイでは未知の配列をもつマイクロ RNA は看過されてしまう。また、クローン解析の場合、1 試料につき数千反応以上もの膨大なシーケンス解析が必要である。

2. 研究の目的

従来のプロファイリング法の欠点を補う方法として、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の適用が可能と考えられた。この電気泳動法は500 bp以下のDNA断片から1塩基置換を検出できる技術であり、塩基配列の違いによってバンドパターンが形成される。マイクロRNAをクローニングし、そのPCR産物を電気泳動するだけで、試料に発現しているマイクロRNAの種類数を既知または未知を問わずバンドとして視認できる。さらに、複数サンプルのバンドパターンを比較すれば、特徴的な発現パターンを示すマイクロRNAを、バンドの有無から明らかに出来る。特徴的な発現パターンを示すマイクロRNAを迅速に同定できるため、時間と経費を有効利用できる。一度に比較できるサンプル数も従来法より多い。

つまり、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法によるマイクロRNAへのアプローチは、cDNAライブラリーやマイクロアレイなど従来法の欠点を補う、画期的なマイクロRNA解析法となることが期待できる。これまで申請者は、胎仔マウス顎下腺の形態形成に関連するmRNAおよびタンパク質の解析に取り組んできた。マイクロRNAによる調節機構は、顎下腺の形態形成にも密接に関与していると思われる。

本研究の目的は、胎生期の顎下腺に発現するマイクロRNAのプロファイリングを実施することで、マイクロRNA解析における変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の有用性を示すことにある。

3. 研究の方法

(1) 胎生13日目の胎仔マウスから、器官形成過程中的顎下腺を採取した。顎下腺あたりのマイクロRNA発現量は極微量と考えられるため、胎仔マウス60匹以上(妊娠マウス4腹に相当)から顎下腺を採取した。

(2) マイクロRNAと結合しているタンパク質(Ago2)を標的とした免疫沈降法により、顎下腺のマイクロRNAを特異的に抽出および精製した。次に、マイクロRNAにアダプタ配列をライゲーションし、cDNA合成を行なった。続いてクローニングを実施した。

(3) マイクロRNAに関するクローンライブラリーを作成した。102クローンについて、シーケンス解析を実施し、各クローンの配列情報を取得した。

(4) 解析した塩基配列情報に基づき、代表的なマイクロRNAの各クローン(single clone DNA)、およびそれらのクローン混合液

(mixture clones DNA)からプラスミドを抽出した。

(5) アダプタ配列領域を標的としたPCRを実施した。得られたPCR産物を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で解析した。

(6) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法でバンドパターンを解析する際は、シングルバンドが得られるか、バンドの分離度が十分に得られるかが重要である。そのため、PCRに用いる酵素、PCRプライマー、PCR反応条件をはじめとする各条件について、条件検討を実施した。

(7) 至適化したPCR条件を用いて用意した増幅産物を、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法によって解析した。

4. 研究成果

本研究において、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法に用いる理想的なPCR増幅産物は、非特異的増幅産物を含まない105 bp程度の増幅産物(マイクロRNA+両末端アダプタ配列+GCクランプ[後述]の合計のサイズ)である。なお、本実験で使用した核酸サイズマーカーは、10 bpごとにバンドが見られるタイプを使用した(最上部のバンドが100 bpに相当)。

(1) single clone と mixture clones の PCR による増幅産物

single clone DNAとして、mmu-miR-199a-3pの配列をもつプラスミドを使用した。また、mixture clones DNAとして、102 clones分のプラスミド混合物を使用した。

これらの鋳型DNAを用いて、GCクランプ(後述)を付加したプライマーによるPCRを実施した。得られた増幅産物の泳動結果を図1に示した。左レーンには、mixture clones DNAの増幅産物を、右レーンにはsingle clone DNAの増幅産物を泳動した。後者は目的のサイズをもつシングルバンド(105 bp)であることが確認できた。



図1

一方、mixture clones DNAでは非特異的な増幅産物がみられた。よって、目的のサイズに相当するバンドを切り出し、そのゲルに含まれる核酸を再度PCRすることで(2nd PCR)、より特異的な増幅を試みた。



図2

2nd PCR の結果、mixture clones DNA の非特異的な増幅産物の生成が抑制された(図 2)。ただし目的のバンド(105 bp)の増幅効率はまだ低いと考えられた(図 2: 右レーンの上部。下部は非特異的な増幅産物)。

(2) GC クランプを付加した PCR プライマーと、DNA ポリメラーゼについての検討

非特異的な増幅産物を減らすため、GC クランプと PCR プライマー、DNA ポリメラーゼについて至的条件を検討した。

GC クランプとは主に塩基 G と C から成る 40 塩基程度の配列である。この GC クランプを一組の PCR プライマーのうち片方の 5' 末端に付加した。そのプライマーを使用し得られた増幅産物を変性剤濃度勾配ゲルで電気泳動すると、増幅産物のサイズではなく塩基配列の違いに基づいたバンドの分離が可能となる(Molecular Microbial Ecology Manual, 3.13: 743-770, 2004)。なお、上述したように図 1 は GC クランプを付加した PCR プライマーを使用した PCR 結果である。

今回の条件検討では、報告されている 2 種類の GC クランプ(Molecular Microbial Ecology Manual, 3.13: 743-770, 2004)を用いた。GC クランプの配列は以下の通りである。

●GC1989

5' -CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCGCCCCCGCCCC-3'

●GCunpub

5' -CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCCG-3'

さらに、一組のプライマー (forward: 5' -AAAGATCTGCGAGGTGCGTCA-3' ;reverse: 5' -GTCTCTAGCCTGCAGGATCGATG-3' ;タカラバイオ small RNA Cloning Kit)のうち、forward と reverse のどちらに GC クランプを付加すれば、非特異的な増幅産物が減るのかを検討した。

加えて、3 種類の DNA ポリメラーゼによる違いも検討した。本実験では、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ)、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (タカラバイオ)、Hot GoldStar DNA Polymerase (Wako) の 3 種類を用いた。いずれもホットスタート対応であるため非特異的な増幅を抑制する効果があると考えられた。

PCR に用いた鋳型 DNA は結果 (1) と同じく、single clone DNA と mixture clones DNA

の 2 種類とした。

つまり、GC クランプ 2 種類×プライマー (forward, reverse)×PCR 酵素 3 種類×DNA 鋳型 2 種類の計 24 通りの PCR を実施した。

図 3-1, 図 3-2 にこれらの PCR 結果を示した。結論として、鋳型 DNA に関わらず目的とする増幅産物(105bp 付近)を効率的に増幅することが出来た。

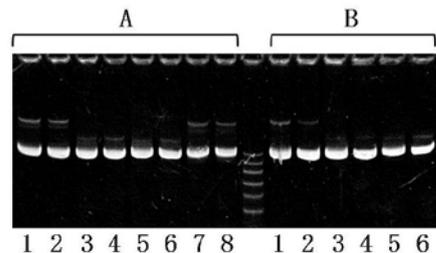


図 3-1

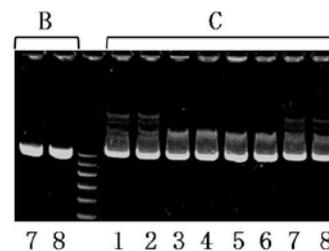


図 3-2

●用いた DNA ポリメラーゼ

A lanes: Hot GoldStar

B lanes: Ex Taq Hot Start Version

C lanes: PrimeSTAR GXL

●鋳型 DNA の種類

odd-numbered lanes: mixture clones DNA

even-numbered lanes: single clone DNA

●GC クランプの種類と付加したプライマー

lanes 1-2: GCunpub attached to forward

lanes 3-4: GCunpub attached to reverse

lanes 5-6: GC1989 attached to reverse

lanes 7-8: GC1989 attached to forward

まず、非特異的な増幅産物は完全には消えなかった。しかし、図 1 および図 2 に比べて目的のバンドサイズ(105 bp 付近)の増幅効率が著しく向上した。これは使用する GC クランプを変えた点や Hot start 用の DNA ポリメラーゼを用いた点が影響したと考えられた。

3 種類の酵素のうち、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase で非特異的な増幅産物の形成が目立つように思われた(図 2-2, C lanes)。

また、forward プライマーに GC クランプを付加すると、非特異的な産物の形成がより大きいサイズにまで見られる傾向があった(lanes 1, 2, 7, 8)。

総じて、非特異的増幅産物の形成を抑える場合、DNA ポリメラーゼは TaKaRa Ex Taq Hot Start Version か Hot GoldStar DNA Polymerase が好ましく (A lanes, B lanes)、GC クランプは Reverse プライマーに付加することが考えられた (lanes 3, 4, 5, 6)。

(3) 他の PCR 各種条件検討結果

変性剤濃度勾配ゲル電気泳動のための PCR を実施するにあたり、(2) で得られた条件に加え、以下のような反応条件を設定した。DNA ポリメラーゼは TaKaRa Ex Taq Hot Start Version を用いた。

●PCR 反応条件: 95°C 10 分、95°C 30 秒→60°C 15 秒→72°C 5 秒 (20 サイクル)、72°C 5 分
プライマー濃度 0.5 μM, マグネシウム濃度 1.0 mM

その結果、鋳型 DNA に関わらず、目的のサイズにシングルバンドが得られた (図 4: 右は mixture clones DNA, 左は single clone DNA)。非特異的増幅産物が見られなかったこと

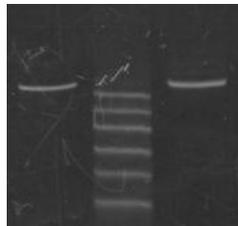


図 4

から、これらの条件で得られる PCR 増幅産物は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動での解析に使用できると考えられた。

(4) 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の結果

マイクロ RNA はデータベースに登録されている配列以外にも、塩基の付加あるいは欠失により様々なバリエーションが存在している。マイクロアレイ解析では看過されるこれらの僅かな塩基配列の違いを、本法によって識別できるかを検討した。

結果 (1)-(3) で至適化された PCR 条件を用いて、以下の鋳型 DNA について PCR 増幅産物を得た。

●single clone DNA
lane1: mmu-miR-130a
(CAGTGCAATGTAAAAGGGCATTAA)
lane2: mmu-miR-199a-3p
(ACAGTAGTCTGCACATTGGTTA)
lane3: mmu-miR-199a-3p variant
(TACAGTAGTCTGCACATTGGTTA)

●mixture clones DNA
lane4: 102 clones の混合物
(マイクロ RNA の種類としては 44 種類から構成されている)

その結果、バンドパターンの違いにより、mmu-miR-199a-3p とその variant 間の 1 塩基の違いを識別することが出来た (図 5: lane2, lane3)。

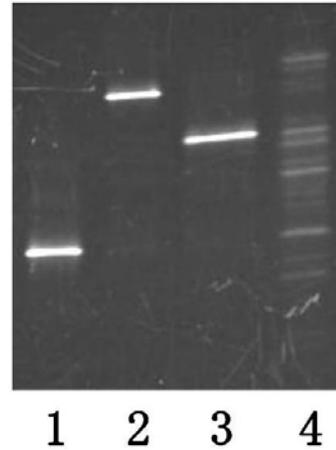


図 5

また、single clone DNA のバンドは、mixture clones DNA 中のバンド (lane4) と位置 (泳動距離) が一致していると考えられた。このことから、本法において任意のマイクロ RNA 配列をマーカーとして使用することで、未知試料中に目的のマイクロ RNA があるかどうかを判断できると考えられた。

改善すべき課題として、mixture clones DNA で見られたそれぞれのバンド強度の違いが何に起因するのか、さらに各バンドの分離度を向上するための泳動条件を検討することが考えられた。

本実験では試料として、胎仔マウス顎下腺由来のマイクロ RNA を使用した。現時点では、顎下腺の分枝形態形成の解析を視野に入れたプロファイリングは実施できなかった。ただし、この手法はほとんど全ての生体試料におけるマイクロ RNA 解析に適用可能である。本手法はクローン解析やマイクロアレイ解析の欠点を補い、かつ特有の利点を備えているため、第 3 のマイクロ RNA 解析手法として期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)
Toru Hayashi, Noriko Koyama, Yukio Azuma, and Masanori Kashimata. Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland in vitro. *Developmental Biology*, 352, 299-307, 2011

[学会発表] (計 2 件)
①Toru Hayashi, Noriko Koyama, Yukio Azuma,

Masanori Kashimata. Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland in vitro. Salivary Gland and Exocrine Biology Gordon Research Conference 2011. Galveston, Texas, February 6-11, 2011.

②林 徹、胎仔マウス顎下腺マイクロ RNA の EGF 処理による発現上昇、第 52 回 歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 21 日、タワーホール船堀、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 徹 (HAYASHI TORU)
朝日大学・歯学部・助教
研究者番号：10454266

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：