

し、I-2-4 に準じて cDNA を合成した。ヒト胸腺 cDNA 1 µg を鋳型に CYP24 mRNA の 3'-UTR を 10 pmol/µL の CYP24 ex11-S プライマーと CYP24 3UTR-AS プライマー (Table 3) を 1 µL ずつ、2.5 mM dNTPs 2.5 µL、10×PCR 緩衝液 2.5 µL、25 mM MgCl₂ 2 µL、Taq DNA ポリメラーゼ 0.2 µL、滅菌精製水を加えて全量を 25 µL とした。94°C で 5 分間反応させた後、94°C で 30 秒間、54°C で 30 秒間、72°C で 2 分間を 30 サイクル、続いて 72°C で 5 分間反応させた。この PCR 産物を *Acc* II および *Bam*H

I で消化し、精製することで CYP24 mRNA の 3'-UTR +1529 から +1609 までの 81 bp の断片を得た。この断片を klenow fragment で処理し、平滑末端化した。これをあらかじめ *Xba* I で消化し、klenow fragment 処理により平滑末端化した pGL3-promoter ベクターに T4 ligase を用いて組み込み、DH5α コンピテントセルに形質転換した。このとき、順方向に 1 つ挿入されたものを pGL3/F1、順方向に 2 つ挿入されたものを pGL3/F2、逆方向に 1 つ挿入されたものを pGL3/R1 プラスミドとした。

Table 3. Sequence of primers used for plasmid construction.

Primer	Sequence
CYP24-ex11-S	5'-TGCATTTGGCTCTTTGTTG-3'
CYP24-3'UTR-AS	5'-AATATTTAAAACTTTTATTTTACTTTCAGAC-3'
pGL3-LucEnd-S	5'-AATCAGAGAGATCCTCATAAAG-3'
SV40-poly(A)-AS	5'-TACTTGCTTTAAAAAACCTCCC-3'

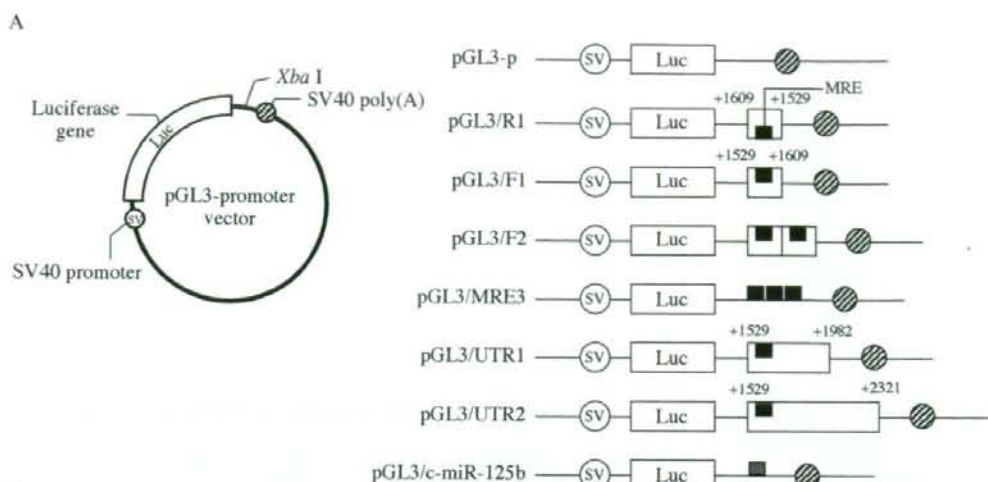


Fig. 7. Schematic representation of the luciferase reporter gene constructs. **A**, various target fragments were inserted at the *Xba* I site, downstream of the luciferase gene in the pGL3-promoter vector. **B**, nucleotide sequence of 3'-UTR of human *CYP24* gene. The numbering refers to the ATG in translation starting with A as 1. Black box shows stop codon. Red box shows miR-125b recognition element (MRE125b). Blue boxes show near-perfect matching sequence with the miR-125b seed. Each restriction enzyme recognition site is underlined.

II-B-2-2 pGL3/MRE3 プラスミドの構築

CYP24 の MRE125b を 3 つ タンデム に 連結させた pGL3/MRE3 プラスミドを以下の方法により構築した。両末端に

Xba I 認識配列を付加させた 3 × MRE125b センス鎖: 5'-CTA GAT TTG CTA ACA TCA TAT CCA ACT CAG GGA AGC GGA TTT GCT AAC ATC ATA TCC AAC TCA GGG AAG CGG

ATT TGC TAA CAT CAT ATC CAA
CTC AGG GAA GCG GAT-3'および3×
MRE125b アンチセンス鎖: 5'-CTA GAT
CCG CTT CCC TGA GTT GGA TAT
GAT GTT AGC AAA TCC GCT TCC
CTG AGT TGG ATA TGA TGT TAG
CAA ATC CGC TTC CCT GAG TTG
GAT ATG ATG TTA GCA AAT-3'を設計した(下線部は *Xba* I 認識配列を示す)。100 pmol/μL センス鎖およびアンチセンス鎖をそれぞれ 3.5 μL、0.1 M MgCl₂ 1 μL、0.5 M NaCl 2 μL を合わせて全量を 10 μL とした。90°C で3分間加熱後、60分かけて徐々に冷却することでアニールさせた。アニールしたオリゴヌクレオチドは両端に *Xba* I で消化された際と同様な断片を有するように設計されている。この2本鎖オリゴヌクレオチドを 2 μL、10×Protruding end kinase buffer を 10 μL、100 μM ATP を 1 μL、T4 kinase を 2 μL、滅菌精製水で全量を 100 μL にあわせ、37°C で1時間インキュベートし、DNA断片5'末端にリン酸を付加した。これをあらかじめ *Xba* I で消化した pGL3-promoter ベクターにサブクローニングし、DH5αコンピテントセルに形質転換することで pGL3/MRE3 を得た。

II-B-2-3 pGL3/UTR1 プラスミドの構築

ヒト CYP24 mRNA の 3'-UTR +1529

から+1982までを有するルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3/UTR1 を以下の方法により構築した。II-2-2-1のPCR産物を *Acc* II および *Stu* I で消化し、精製することで CYP24 mRNA の 3'-UTR +1529 から+1982 までの 454 bp の断片を得た。この断片を klenow fragment で処理し、平滑末端化した。これをあらかじめ *Xba* I で消化し、平滑末端化した pGL3-promoter ベクターにサブクローニングし、DH5αコンピテントセルに形質転換することで pGL3/UTR1 を得た。

II-B-2-4 pGL3/UTR2 プラスミドの構築

ヒト CYP24 mRNA の 3'-UTR +1529 から+2321までを有するルシフェラーゼレポータープラスミド pGL3/UTR2 を以下の方法により構築した。II-2-2-1のPCR産物を *Acc* II および *Sca* I で消化し、精製することで CYP24 mRNA の 3'-UTR +1529 から+2321 までの 793 bp の断片を得た。さらにこの断片を klenow fragment 処理し、平滑末端化した。これをあらかじめ *Xba* I で消化し、平滑末端化した pGL3-promoter ベクターにサブクローニングし、DH5αコンピテントセルに形質転換することで pGL3/UTR2 を得た。

II-B-2-5 pGL3/c-miR125b プラスミド

ドの構築

miR-125b によりルシフェラーゼ活性が低下する陽性対照として miR-125b に相補的な配列を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミド

pGL3/c-miR125b を以下の方法により構築した。両末端に *Xba* I サイトを付加した

c-miR125b センス鎖: 5'-CTA GAT
CAC AAG TTA GGG TCT CAG GGA

┆-3' および c-miR125b アンチセンス鎖:

5'-CTA GAT CCC TGA GAC CCT AAC

TTG TGA ┆-3' を設計した (下線部は

Xba I 認識配列を示す)。このセンス鎖お

よびアンチセンス鎖を II-2-2 と同様

にアニールした後、T4 kinase でリン酸

化した。この 2 本鎖オリゴヌクレオチ

ドをインサートとし、あらかじめ *Xba* I

で消化した pGL3-promoter ベクターに

組み込み、DH5 α コンピテントセルに形

質転換することで pGL3/c-miR125b を得

た。

II-B-3 コロニーPCR

目的の DNA 断片が挿入されているこ

とを確認するため、10 \times PCR 緩衝液 2.5

μ L、10 pmol/ μ L の pGL3-promoter ベク

ターのルシフェラーゼ遺伝子上に設計

した pGL3-LucEnd-S プライマーおよび

pGL3-promoter ベクターの SV40 polyA

シグナル上に設計した SV40

poly(A)-AS プライマー (Table 3) をそ

れぞれ 1 μ L、2.5 mM dNTP 2.5 μ L、25

mM MgCl₂ 1.5 μ L、Taq DNA ポリメラー

ゼ 0.2 μ L (1.0 U)、滅菌精製水を加えて

全量を 25 μ L とした反応液を作成した。

寒天培地から単離したコロニーを突つ

いた滅菌爪楊枝を入れて混合し、94 $^{\circ}$ C

で 5 分間反応させた後、94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、

54 $^{\circ}$ C で 30 秒間、72 $^{\circ}$ C で 1~2 分間を 30

サイクル、続いて 72 $^{\circ}$ C で 5 分間反応さ

せた。反応後、一部を分取し EtBr を含

む 0.8% アガロースゲルを用いて電気泳

動を行った。

II-B-4 プラスミド DNA の少量調製

目的の DNA 断片が含まれているコロ

ニーを、2 \times YT-Amp 培地 3 mL 中で

37 $^{\circ}$ C、8 時間培養した。その培養液を

50 μ L に 60% (v/v) グリセロールを 50

μ L 加えて、これを大腸菌のグリセロー

ルストックとして -80 $^{\circ}$ C で保存した。プ

ラスミドの少量調製は Wizard Plus

Minipreps を用い以下の方法で行った。

培養液を 1.5 mL のチューブに移し、

10,000 rpm、1 分間遠心分離することに

より集菌した。大腸菌ペレットを 200

μ L の cell resuspension solution で懸濁、

200 μ L の cell lysis solution を加えて転

倒攪拌し、200 μ L の neutralization

solution を加え混和した後、12,000 rpm、

4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離した。マニホー

ルドにセットしたミニカラムに、よく

混和した Wizard Miniprep DNA

purification resin を 1 mL 入れて、さらに

上清を加えた後、減圧下で濾過した。Column wash solution 2 mL を加えて吸引してミニカラムを洗浄した後、ミニカラムを 1.5 mL のチューブに移し、10,000 rpm で 2 分間遠心分離して液体を完全に除去した。ミニカラムを新しいチューブに移して滅菌精製水 50 μ L を添加し、1 分間室温で放置した後、10,000 rpm で 20 秒間遠心分離して DNA を溶出させた。

II-B-5 プラスミド DNA の大量調製

II-B-4 で保存した大腸菌のグリセロールストックを滅菌爪楊枝でつついて、2 \times YT-Amp 培地 25 mL で一晩培養した。4,000 rpm、5 分間遠心分離することにより集菌した。プラスミドの大量調製は Plasmid Midi Kit を用い以下の方法で行った。大腸菌ペレットを 4 mL の Buffer P1 に懸濁させ、4 mL の Buffer P2 を加え転倒攪拌した後、室温で 5 分間静置した。4 mL の Buffer P3 を加え、ただちに転倒攪拌した後、氷中で 15 分間静置した。5,000 rpm、15 分間遠心分離した上清を 1.5 mL チューブに分注し、さらに 15,000 rpm で 15 分間遠心分離して蛋白を取り除いた。この上清をあらかじめ Buffer QBT 4 mL で平衡化した QIAGEN-tip 100 に添着させ、Buffer QC 20 mL で洗浄した後、Buffer QF 5 mL を加えて DNA を溶出させた。3.5 mL のイソプロパノールを加えて 15,000 rpm、15

分間遠心分離し、沈殿を 70%エタノールで洗浄し、乾燥させた後、TE 20 μ L に溶解した。プラスミドの定量には Nanodrop を用いた。

II-B-6 シークエンス解析

II-B-4 または II-B-5 で調製したプラスミドを鋳型とし、以下の方法に従って pGL3/c-miR125b、pGL3/R1、pGL3/F1、pGL3/F2、pGL3/MRE3、pGL3/UTR1 および pGL3/UTR2 プラスミドの確認を行った。プライマーは pGL3-Luc End-S プライマーあるいは SV40-poly(A)-AS プライマー (Table 3) を用いた。Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit および Thermo Sequenase Cy5.5 Terminator Cycle Sequencing Kit を用いて以下のよう反応液を調製した。Cy5 では、プラスミド 2 μ g、Reaction buffer 3.5 μ L、未標識 primer (10 pmol/ μ L) 0.5 μ L、Thermo Sequenase DNA polymerase 1 μ L に滅菌精製水を加えて全量を 27 μ L とし、先に分注しておいた各 dNTPs/Cy5-ddNTP 2 μ L に 6 μ L ずつ加え反応液とした。Cy5.5 では、プラスミド 2 μ g、Reaction buffer 3.5 μ L、primer (10 pmol/ μ L) 0.5 μ L、Thermo Sequenase DNA polymerase 2 μ L に滅菌精製水を加えて全量を 31.5 μ L とし、先に分注しておいた各 dNTPs/Cy5.5-ddNTP 1 μ L に 7 μ L ずつ加え反応液とした。サーマルサイクラーを用いて 95°C で 2 分間反応さ

せた後、95°Cで30秒間、54°Cで30秒間、72°Cで90秒を45サイクルの条件でサイクルシーケンス反応を行った。反応終了後、反応液を1.5 mL チューブに移し各チューブに7.5 M 酢酸アンモニウム 2 μ L、グリコーゲン溶液 2 μ L、氷冷しておいた100%エタノール 30 μ Lを加え、-20°Cで20分間放置した。その後15,000 rpm、30分間、4°Cで遠心分離し、沈殿を70%エタノールで洗浄し、沈殿を乾燥させた後、Formamide loading dye 6 μ Lを加えて溶解させ、そのうち2 μ LをLong-Read Tower DNA シークエンサーにより解析した。

II-B-7 プラスミドDNAのKGN細胞へのトランスフェクション

プラスミドDNAの細胞への導入はリポフェクション法で行った。トランスフェクション効率を補正するため、ホタルルシフェラーゼ発現プラスミド (pGL3-promoter) とウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド (phRL-TK) を共発現させた。KGN細胞は24 well 細胞培養用プレートに 8×10^4 cells/well になるように播種し、5% CO₂ 存在下、37°Cで24時間培養した。450 ngのpGL3 および50 ngのphRL-TKと、TfxTM-20 ReagentをDNA : TfxTM-20 Reagent = 1 : 1になるように混合した。さらにFBSを含まないDMEMを加え、全量が200

μ L/wellとなる混合液を調製した。これら混合液を各細胞に1 well 当たり200 μ Lずつ添加し、5% CO₂ 存在下、37°Cで1時間インキュベートした。その後10% FBSを含む培地を1 mL 加え48時間培養した。

II-B-8 プラスミドDNAとprecursorのMCF-7細胞へのトランスフェクション

MCF-7細胞は24 well 細胞培養用プレートに 5×10^4 cells/well になるように播種し、5% CO₂ 存在下、37°Cで24時間培養した。450 ngのpGL3 および50 ngのphRL-TK、さらに各濃度のprecursorとTfxTM-20 ReagentをDNA : TfxTM-20 Reagent = 1 : 1.5になるように混合した。ここにFBSを含まないDMEMを加え、全量が200 μ L/wellとなる混合液を調製した。これら混合液を各細胞に1 well 当たり200 μ Lずつ添加し、5% CO₂ 存在下、37°Cで1時間インキュベートした。その後10% FBSを含む培地を1 mL 加え48時間培養した。

II-B-9 プラスミドDNAとAsOのKGN細胞へのトランスフェクション

プラスミドDNAとAsOの細胞への導入にはLipofectamineTM 2000 Reagentを用いた。KGN細胞は24 well 細胞培養用プレートに 8×10^4 cells/well になるように播種し、5% CO₂ 存在下、37°Cで

24 時間培養した。450 ng の pGL3 および 50 ng の phRL-TK と As-miR-125b または As-negative control (Table 4) に FBS を含まない DMEM を加えて 50 μ L に調製した。また、0.5 μ L の Lipofectamine™ 2000 Reagent と FBS を含まない DMEM を合わせて 50 μ L とし

た溶液を別に調製し、それぞれ室温で 5 分間インキュベートした。これらの溶液を混合し、さらに室温で 20 分間インキュベートした後、1 well あたり 100 μ L ずつ添加し、5% CO₂ 存在下 37°C で 48 時間培養した。

Table 4. Sequence of antisense DNA/LNA oligonucleotide.

Antisense oligo	Sequence
As-miR-125b	5'-TCACAAGTTAGGGTCTCAGGGA-3'
As-negative control	5'-AGACTAGCGGTATCTTAAACC-3'

Bold letters are LNA.

II-B-10 ルシフェラーゼアッセイ法 Dual-Luciferase™ Reporter Assay System はホタルルシフェラーゼが Beetle luciferin を基質として発光し、ウミシイタケルシフェラーゼが Coelenterazine を基質として発光することを利用している。II-2-7、II-2-8、II-2-9 でトランスフェクションした細胞から培地を取り除き、0.5 mL の PBS を加えて洗浄した。PBS を取り除いた後、1 × PLB を 100 μ L/well ずつ加えて室温で 15 分間振とうし、1.5 mL のチューブに移して 15,000 rpm、1 分間遠心分離した。得られた上清を新しいチューブに回収し、これをセルライゼートとした。96 well プレートに 50 μ L ずつセルライゼートを分注した後、Wallac 1420 ARVOsx マルチラベルカウンタにセッ

トし LAR II 100 μ L を添加することでホタルルシフェラーゼ活性を、Stop & Glo Reagent 100 μ L を添加することでウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。活性値はホタルルシフェラーゼの発光度をウミシイタケルシフェラーゼの発光度で除することにより求めた。

II-B-11 統計解析

Negative control と pre-miR-125b または As-miR-125b を導入したときの相対的ルシフェラーゼ活性の比較は Student's *t*-test、空ベクターとその他のプラスミドにおける相対的ルシフェラーゼ活性との比較は one-way ANOVA と Dunnett's test により解析した。P < 0.05 の時、統計学的に有意とした。

II-C. 研究結果

II-C-1 内因性 miR-125b によるルシフェラーゼ活性への影響

miR-125b 陽性の KGN 細胞に CYP24 の MRE125b を含む各種プラスミドを導入し内因性の miR-125b によるルシフェラーゼ活性の変動を測定した (Fig. 8)。空ベクターである pGL3-p と比べ、pGL3/c-miR125b では 24%まで活性が低下し、KGN 細胞に発現する内因性の miR-125b が機能していることが示された。pGL3/MRE3 においても pGL3-p の

28%まで活性が低下し、miR-125b は CYP24 の MRE にも作用することが示された。CYP24 の MRE を含む pGL3/F1、pGL3/F2、pGL3/UTR1、pGL3/UTR2 においても pGL3-p に比べ有意な活性の低下が認められた。pGL3/UTR2 では 36%まで活性が低下し、内因性の miR-125b による強い影響が認められた。また、MRE が逆向きに挿入された pGL3/R1 においても pGL3-p に比べ有意な活性の低下が認められた。

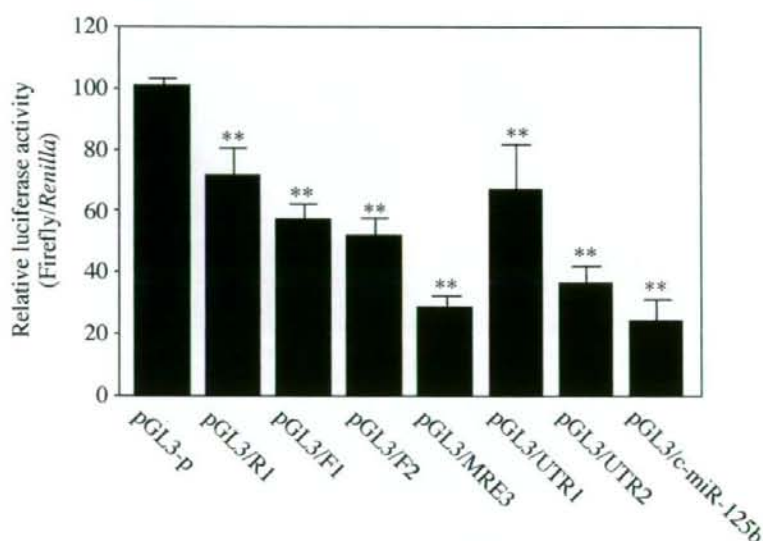


Fig. 8. Luciferase assays with reporter constructs containing MRE125b in human CYP24 in KGN cells. A series of reporter constructs containing the 3'-UTR of the human CYP24 gene was transiently transfected into KGN cells. Relative luciferase activities were normalized with the *Renilla* luciferase activities. Values are expressed as percentages of the relative luciferase activity of pGL3-promoter plasmid (pGL3-p). Columns are mean \pm SD of three independent experiments. **, $P < 0.01$, compared with pGL3-p.

II-C-2 MCF-7 細胞におけるルシフェラーゼ活性に対する pre-miR-125b の影響

miR-125b 陰性の MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入し、CYP24 の MRE125b を含む各種プラスミドを用い

てルシフェラーゼアッセイを行った (Fig. 9)。Pre-miR-125b の導入により pGL3/c-miR125b では pre-miR negative control の 22%まで活性が低下し、細胞内で precursor が働くことが確認された。pGL3/MRE3 においても pGL3/c-miR125b と同程度の活性の低下が認められ、CYP24 の MRE に対しても precursor の影響が認められた。pGL3/F1 では 93%、pGL3/F2 では 76%まで活性が低下し、各プラスミドに含まれる MRE125b の数に比例して活性が減少することが示された。しかし、MRE が逆向きに挿入された pGL3/R1 では pre-miR-125b による活性の低下は認められなかった。また、pGL3/UTR1 にお

いては有意ではないものの、pre-miR-125b により pGL3/F1 と同程度の活性の減少が認められ、pGL3/UTR2 においては pre-miR-125b による有意な活性の低下が認められたため、MRE125b は CYP24 mRNA の 3'-UTR を長く含む場合でも機能することが示された。続いて、pGL3/MRE3 と pGL3/c-miR125b を用いて precursor 濃度依存性の検討を行った (Fig. 9B)。その結果、どちらのプラスミドにおいても precursor 0.1 pmol で空ベクターに比べ有意な活性の低下が認められ、0.25 pmol において pGL3/MRE3 では 30%、pGL3/c-miR125b では 17%まで活性が低下した。

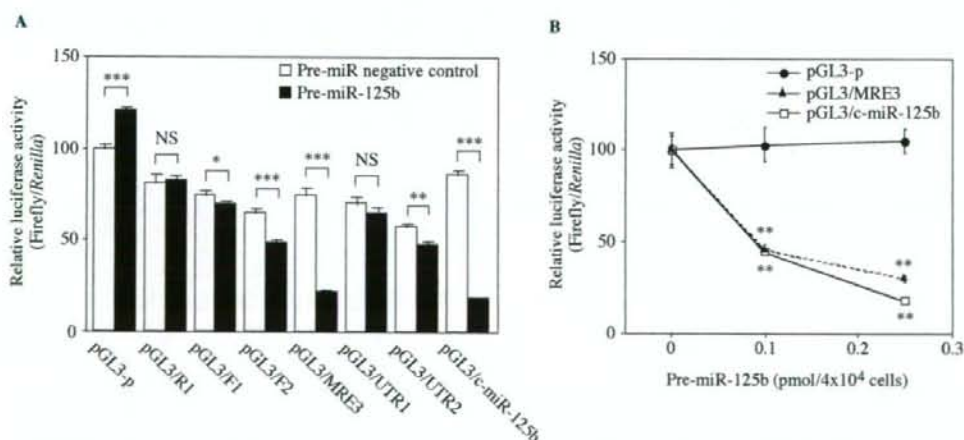


Fig. 9. Luciferase assays with reporter constructs containing MRE125b in human CYP24 in MCF-7. A, a series of reporter constructs containing the 3'-UTR of the human CYP24 gene was transiently transfected into MCF-7 cells with 0.25 pmol/4x10⁴ cells of pre-miR-125b or pre-miR negative control. B, various concentrations of pre-miR-125b was transiently transfected into MCF-7 cells with luciferase reporter plasmids. Relative luciferase activities were normalized with the *Renilla* luciferase activities. Columns and data points are mean \pm SD of three independent experiments. A, *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, compared with pre-miR negative control. B, **, $P < 0.01$, compared with 0 pmol pre-miR-125b.

II-C-3 AsO 導入によるルシフェラーゼ活性への影響

miR-125b 陽性の KGN 細胞に As-miR-125b を導入し、内因性の miR-125b の阻害がルシフェラーゼ活性に及ぼす影響を検討した (Fig. 10)。As-negative control を導入した場合、Fig. 8 と同様に各プラスミドに含まれる MRE125b の数に比例して活性が減少し、内因性の miR-125b による影響が認めら

れた。As-miR-125b を導入したところ、pGL3/c-miR125b、pGL3/MRE3 および pGL3/F2 において As-miR-125b による有意な活性の回復が認められた。このことから活性の低下は内因性の miR-125b によるものであることが確認できた。また、pGL3/R1 および pGL3/UTR1、pGL3/UTR2 においては As-miR-125b による活性の回復が認められなかった。

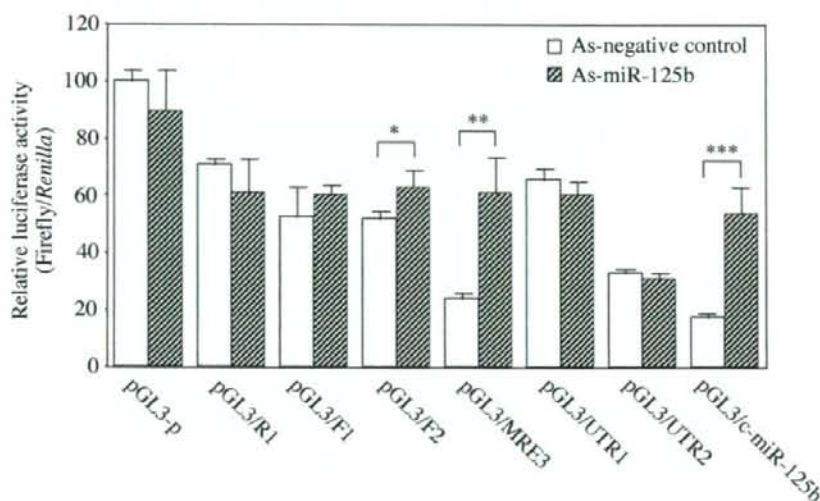


Fig. 10. Luciferase assays with reporter constructs containing MRE125b in human CYP24 in KGN cells. A series of reporter constructs containing the 3'-UTR of the human CYP24 gene was transiently transfected into KGN cells with 0.5 pmol/8x10⁴ cells of As-miR-125b or As-negative control. Relative luciferase activities were normalized with the Renilla luciferase activities. Columns are mean \pm SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$, compared with As-negative control.

II-D. 考察

miRNA が標的 mRNA に対して機能的であるためには seed sequence が相補的に一致することが重要であることが報告されている (Lewis et al., 2005)。

CYP24 mRNA の MRE125b は miR-125b に対して全体的な相補性は低いものの、seed sequence が完全に相補的である (Fig. 3)。このため、miR-125b が CYP24 の MRE125b を標的として認識し、ルシ

フェラーゼ活性の変動が認められたと考えられる。KGN 細胞では内因性に miR-125b が発現しているため、CYP24 の MRE125b を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドを導入することでルシフェラーゼ活性の低下が認められた。また、As-miR-125b を導入し内因性の miR-125b を分解することでルシフェラーゼ活性の回復が認められたことから、CYP24 の MRE125b に miR-125b が作用することが明らかとなった。miR-125b 陰性の MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入し、miR-125b を強制発現させたところルシフェラーゼ活性の低下が認められ、MRE125b と miR-125b の相互作用は細胞株に依存しないことが示された。MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入した際、空ベクターである pGL3-p においてルシフェラーゼ活性が増加するという現象が認められた。1 つの miRNA の標的遺伝子は複数存在することが考えられているため、miR-125b がルシフェラーゼ活性に対して抑制的に働く何らかの因子に作用し、その因子の変動による 2 次的影響である可能性が考えられた。しかし、KGN 細胞に AsO を導入した場合には pGL3-p において大きな変動が認められなかったことから、この現象は MCF-7

細胞に特有のものと考えられた。また、KGN と MCF-7 細胞のどちらにおいても pGL3/R1 で pGL3-p に比べルシフェラーゼ活性の低下が認められ、pGL3-p ベクターに断片を組み込むこと自体がルシフェラーゼ活性に何らかの影響を与えている可能性が考えられた。本章ではどちらの細胞においても pGL3/MRE3 は pGL3/c-miR125b と同程度の反応性を示し、MRE125b が 1 つの場合は precursor および AsO による活性への影響が小さく、MRE125b の配列が増えるほど活性の低下または増加が顕著になることが明らかになった。pGL3/UTR1 は MRE125b のほかに miR-125b の seed sequence と相補性が高い配列を 1 つ含み、pGL3/UTR2 は同様の配列を 2 つ含んでいる (Fig. 7B)。pGL3/UTR1 と比べて pGL3/UTR2 の方が miR-125b による活性の減少が大きいことから、miR-125b は MRE125b 以外の領域にも結合する可能性も考えられる。pGL3/UTR2 において大きな活性の低下が認められたため、miR-125b は CYP24 mRNA 全長に対しても機能的に働くことが示唆された。以上の結果より、次章では内因性の CYP24 に対する miR-125b の影響を検討した。

III 章 CYP24 タンパク発現量および活性に及ぼす miR-125b の影響

III-A. 緒言

I 章で示したように MCF-7 細胞では内因性の CYP24 タンパクが高く発現しているが、KGN 細胞では発現が低い。II 章において、miR-125b が CYP24 の MRE125b に対して機能することが示されたため、内因性の CYP24 タンパクの発現に及ぼす miR-125b の影響を pre-miR-125b または As-miR-125b を導入することで検討した。また、CYP24 の酵素活性を 25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性を測定することで検討した。

III-B. 研究方法

III-B-1 実験材料および使用機器
25(OH)D₃ と 24,25(OH)₂D₃ はフナコシ (Tokyo, Japan) より購入した。
1 α ,25(OH)₂D₃ は和光純薬工業から購入した。25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性測定用の HPLC 装置は CO-965 カラムオープン (JASCO, Tokyo, Japan)、L-2200 オートサンプラー (日立製作所, Tokyo, Japan)、L-2400 UV 検出器 (日立製作所)、L-2130 ポンプ (日立製作所)、D-2000 Elite インテグレーター (日立製作所) を用いた。カラムは YMC-Pack ODS-A (6.0 mm ID×300 mm, 5 μ m, YMC, Kyoto, Japan) を使用した。

III-B-2 Pre-miR-125b の MCF-7 細胞へのトランスフェクション

MCF-7 細胞は 35 mm dish に 2.1×10^5 cells/2,100 μ L/dish となるように播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。FBS を含まない DMEM 210 μ L に pre-miR-125b または Pre-miR negative control #2 を 1.68 μ L 加えた溶液と FBS を含まない DMEM 210 μ L に Lipofectamine™ 2000 Reagent を 4.2 μ L 加えた溶液を別々に調製し、室温で 5 分間インキュベートした。これらの溶液を混合し、さらに室温で 20 分間インキュベートした。転倒攪拌した後、1 well あたり 420 μ L ずつ添加し、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

III-B-3 AsO の KGN 細胞へのトランスフェクション

III-B-2 に準じ、KGN 細胞を 60 mm ディッシュに 8.8×10^5 cells/dish となるように播種し、5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間培養した。FBS を含まない DMEM 550 μ L に As-miR-125b または As-negative control を 1.9 μ L 加えた溶液と FBS を含まない DMEM 550 μ L に Lipofectamine™ 2000 Reagent を 5.5 μ L 加えた溶液を別々に調製し、室温で 5 分間インキュベートした。これらの溶液を混合し、さらに室温で 20 分間インキュベートした。転倒攪拌した後、1 枚あたり 1,100 μ L ずつ添加し、5% CO₂ 存

在下 37°C で培養した。

III-B-4 ノーザンブロッティング

MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入してから 48 時間後、または KGN 細胞に As-miR-125b を導入してから 72 時間後、I-2-3 に従って total RNA を調製した。Total RNA 15 µg を用い、I-2-7 に従ってノーザンブロッティングを行った。

III-B-5 Total cell lysate の調製および蛋白定量

MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入してから 48、72 時間後または KGN 細胞に As-miR-125b を導入してから 48、72 時間後、I-2-8 に従って total cell lysate を調製し、その蛋白量を Bradford 法により定量した。

III-B-6 SDS-PAGE とウエスタンブロッティング

III-B-5 で調製した total cell lysate を用いて I-B-10 に従いウエスタンブロッティングを行った。β-actin の検出には 1 次抗体としてウサギ抗ヒト β-actin 抗体 (Odyssey Blocking Buffer + 0.1% Tween 20 で 200 倍希釈)、2 次抗体として蛍光標識された抗ウサギ IgG 抗体 (Odyssey Blocking Buffer + 0.1% Tween 20 で 5,000 倍希釈) を用いた。

III-B-7 cDNA の調製および real-time

RT-PCR

III-B-4 で調製した total RNA を用い、I-B-3 に従って cDNA を調製した。この cDNA を用いて、I-2-4 に従い CYP24A1 mRNA および GAPDH mRNA の定量を行った。

III-B-8 25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性の測定

III-B-2 に従って MCF7 細胞に pre-miR-125b を、III-B-3 に従って KGN 細胞に AsO を導入した。トランスフェクションの 24 時間後に培地を 50 nM の 1α,25(OH)₂D₃ と 10% CS-FBS を含む phenol red-free の DMEM に交換した。24 時間後、培地を除去し、細胞を PBS で一度洗浄した。基質である 25(OH)D₃ を最終濃度 10 µM となるように 3% FBS を含む phenol red-free の DMEM 中に加え、5% CO₂ 存在下、37°C で培養した。18 時間後、1.6 mL の培地を回収し、内部標準物質 (IS) として 100 µM コルチコステロンを 10 µL 添加し、6.4 mL の 3:1 (v/v) のクロロホルム:メタノール溶液を加えて 10 分間激しく攪拌した。3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行った後、有機溶媒層を新しい試験管にとり、40°C に加温した水浴中で窒素気流下乾固させた。残渣に移動相 100 µL を加えて溶解し、そのうちの 50 µL を HPLC に注入した。HPLC による測定は Sakaki ら (2000) の方法を一部変更し

で行った。HPLCの移動相はグラジエント機能を使用し、0分から40分まで55%アセトニトリル/0.2%酢酸を、50分から60分まで90%アセトニトリルを、65分から75分まで55%アセトニトリル/0.2%酢酸を用いた。カラム温度は35°C、流速は1 mL/minで溶離液を265 nmでモニターした。定量はISに対するピークの高さ比を用いた。また、1 wellあたりの蛋白量を求めるため、培地を回収した後の細胞に1×PLBを500 μL/wellずつ加えて室温で15分間振とうし、1.5

mLのチューブに移して15,000 rpm、1分間遠心分離し、Bradford法により定量した。

Fig. 11に代表的なクロマトグラムを示す。保持時間はISであるコルチコステロンが9.0分、代謝物である24,25(OH)₂D₃が41.0分、基質である25(OH)D₃が61.0分であり、夾雑ピークが無いことを確認した。代謝物の生成量は24時間まで直線性があることを確認し (data not shown)、反応時間は18時間とした。

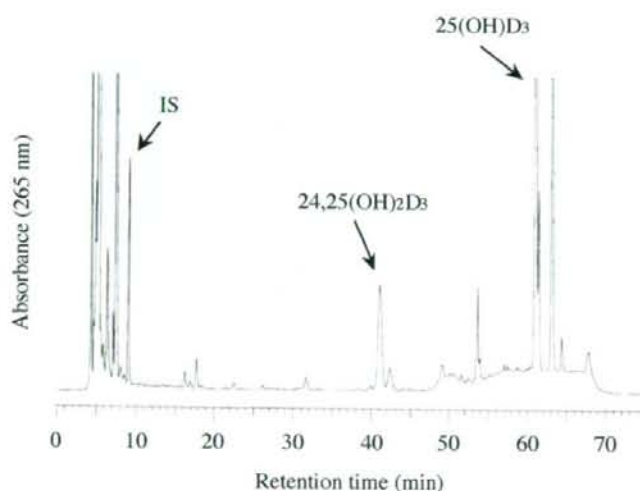


Fig. 11. Representative chromatogram of 24,25(OH)₂D₃ formation from 25(OH)D₃ in MCF-7 cells. The cells were incubated with 10 μM of 25(OH)D₃ for 18 hours, and then the medium was subjected to HPLC analysis as described in *Materials and Methods*.

III-B-9 統計解析

Pre-miR negative control と

pre-miR-125b または As-negative control

と As-miR-125b を導入したときの

25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性の比較

は Student's *t*-test により解析した。P < 0.05 の時、統計学的に有意とした。

III-C. 研究結果

III-C-1 Pre-miR-125b 導入による

CYP24 タンパク発現量への影響

MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入し、miR-125b が CYP24 タンパク質の発現に及ぼす影響について検討した。トランスフェクトしていない (NT) 細胞および pre-miR negative control を導入した細胞では miR-125b の発現は認められなかったが、pre-miR-125b を導入した細胞では mature miR-125b が発現しているこ

とが確認された (Fig. 12A)。

Pre-miR-125b 導入後 48 時間では CYP24 タンパク発現量は pre-miR negative control と同程度であったが、72 時間後では pre-miR negative control と比べて 59% まで減少が認められた (Fig. 12B)。一方、CYP24 mRNA 発現量は pre-miR-125b 導入により増加することが示された (Fig. 12C)。

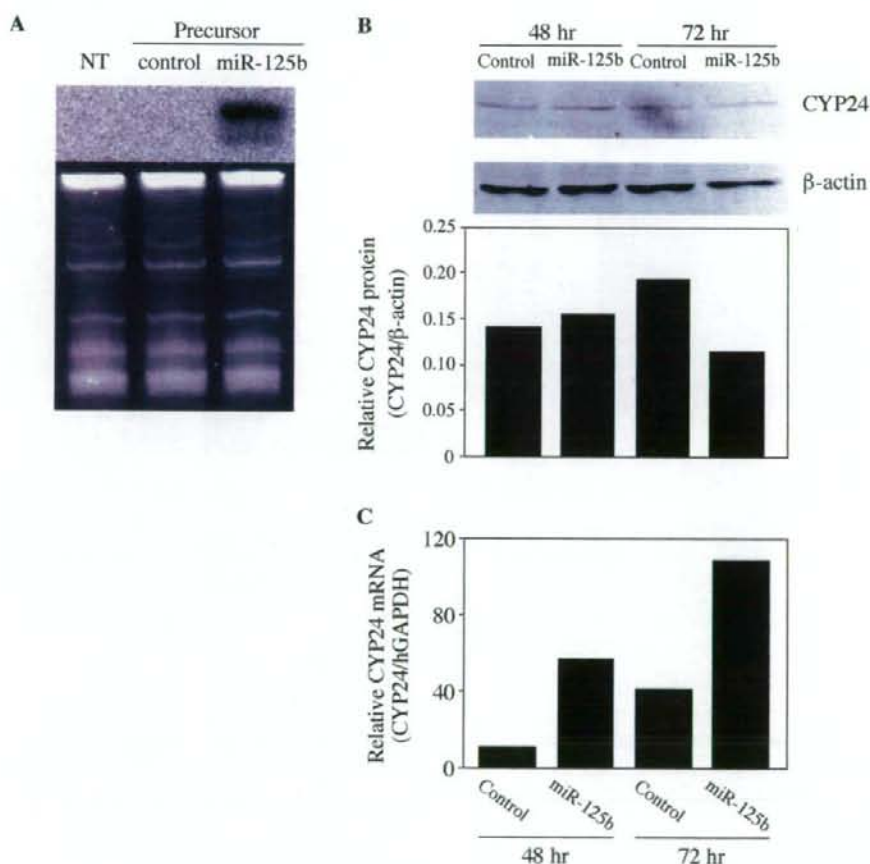


Fig. 12. Effects of pre-miR-125b on the expression levels of endogenous CYP24 protein and mRNA in MCF-7 cells. A-C, pre-miR-125b or pre-miR negative control (84 pmol/1.68x10⁵ cells) was transfected into MCF-7 cells. A, after 48 hours, the cells were harvested and total RNA were isolated. Expression levels of mature miR-125b were determined by Northern blot analyses. The ethidium bromide-stained gels are included as loading controls. B and C, after 48 or 72 hours, the cells were harvested and total cell lysate and total RNA were isolated. Expression levels of CYP24 protein and mRNA were determined by B, Western blot analysis and C, real-time RT-PCR analysis, respectively. NT: no transfection.

III-C-2 AsO 導入による CYP24 タンパク発現量への影響

KGN 細胞に As-miR-125b を導入し、内因性の miR-125b の機能を阻害することによる CYP24 タンパク発現量への影響を検討した。Mature miR-125b の発現量はトランスフェクトしていない (NT) 細胞および As-negative control を導入した細胞には認められたが、

As-miR-125b を導入した細胞では発現が認められなくなった (Fig. 13A)。

As-miR-125b を導入後 72 時間で CYP24 タンパク発現量の増加が認められ、As-negative control を導入したものに比べ 2.7 倍に上昇した (Fig. 13B)。一方で、CYP24 mRNA の発現量は As-negative control を導入したものに比べ減少することが示された (Fig. 13C)。

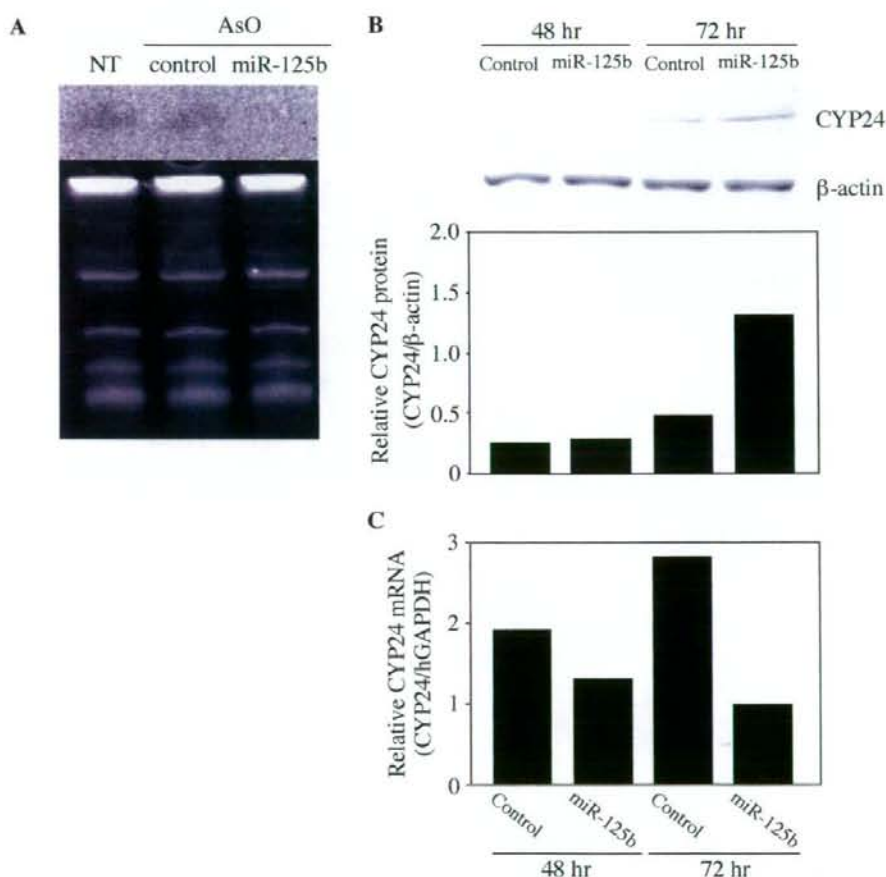


Fig. 13. Effects of As-miR-125b on the expression levels of endogenous CYP24 protein and mRNA in KGN cells. A-C, As-miR-125b or As-negative control ($2.5 \text{ pmol}/4 \times 10^5$ cells) were transfected into KGN cells. A, after 72 hours, the cells were harvested and total RNA were isolated. Expression levels of mature miR-125b were determined by Northern blot analyses. The ethidium bromide-stained gels are included as loading controls. B and C, after 48 or 72 hours, the cells were harvested and total cell lysate and total RNA were isolated. Expression levels of CYP24 protein and mRNA were determined by B, Western blot analysis and C, real-time RT-PCR analysis, respectively. NT: no transfection.

III-C-3 Pre-miR-125b 導入による
25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性への影
響

MCF-7 細胞に pre-miR-125b または
pre-miR negative control を導入し、
25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性を測定
した (Fig. 14)。Pre-miR negative control

を導入した場合、25(OH)D₃ 24 位水酸化
酵素活性は 1.23 pmol/min/mg protein で
あったが、pre-miR-125b を導入するこ
とにより、活性値は 0.78 pmol/min/mg
protein となり、有意な ($P < 0.05$) 活性
の低下が認められた。

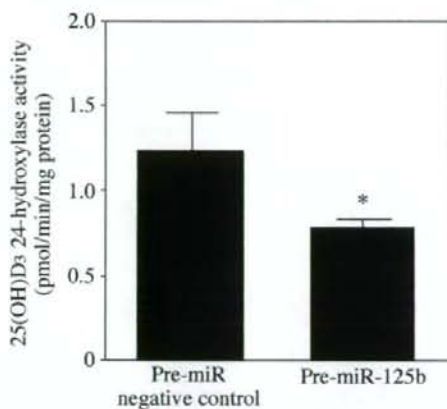


Fig. 14. Effects of pre-miR-125b on the 25(OH)D₃ 24-hydroxylase activity in MCF-7 cells. The cells were incubated with 10 μ M of 25(OH)D₃ for 18 hours, and then the medium was subjected to HPLC analysis as described in *Materials and Methods*. Columns are mean \pm SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$, compared with pre-miR negative control.

III-C-4 AsO 導入による 25(OH)D₃
24 位水酸化酵素活性への影響

KGN 細胞に As-miR-125b または
As-negative control を導入し、25(OH)D₃
を基質として 25(OH)D₃ 24 位水酸化酵
素活性を測定した (Fig. 15)。

As-negative control を導入した場合の

25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性は 0.42
pmol/min/mg protein であり、

As-miR-125b を導入した細胞では 0.61
pmol/min/mg protein となり有意ではな
いものの、1.4 倍の活性の増加が認めら
れた。

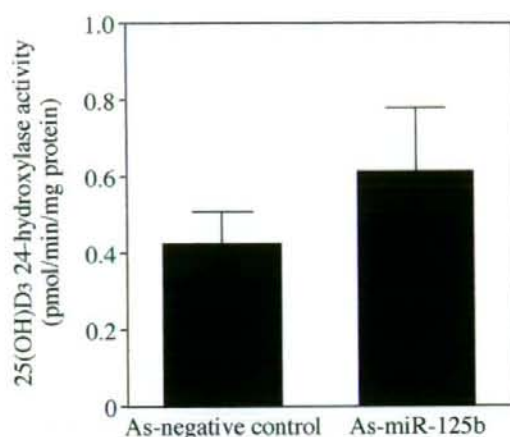


Fig. 15. Effects of As-miR-125b on the 25(OH)D₃ 24-hydroxylase activity in KGN cells. The cells were incubated with 10 μ M of 25(OH)D₃ for 18 hours, and then the medium was subjected to HPLC analysis as described in *Materials and Methods*. Columns are mean \pm SD of three independent experiments.

III-D. 考察

本章では内因性の CYP24 タンパク発現量および酵素活性が miR-125b により変動することを明らかにした。内因性の CYP24 タンパクが高く発現している MCF-7 細胞に pre-miR-125b を導入することで CYP24 タンパク発現量の減少および活性の低下が認められた。このとき CYP24 mRNA 発現量は pre-miR-125b によって逆に増加することが明らかになった。また、KGN 細胞に As-miR-125b を導入したところ、CYP24 タンパク発現量の増加および活性の上昇が認められたが、CYP24 mRNA 発現量は減少した。miRNA は mRNA の発現量に影響することなく標的遺伝子の翻訳段階を抑制することが知られている。しかし、標的遺伝子の転写や mRNA の安定性などに関わる因子に miRNA が作用する

可能性も否定できない。miR-125b の標的となり得る遺伝子も 1,000 以上存在することから、CYP24 mRNA 発現量の変動の原因の 1 つとして miR-125b が他の遺伝子に対して働いた可能性が考えられた。本章の結果からも明らかのように CYP24 タンパク発現量と CYP24 mRNA 発現量は相関せず、CYP24 の発現調節には転写後調節も大きく寄与していると考えられる。CYP24 の発現調節機構には 1 α ,25(OH)₂D₃ による転写活性化および副甲状腺ホルモン (PTH) による発現抑制が良く知られている。CYP24 遺伝子の 5' 上流領域 (5'-UTR) にはビタミン D 応答配列 (vitamin D response element; VDRE) が 2 ヶ所存在し (Ohyama et al., 1996)、VDR を介して顕著に誘導される。また、PTH は CYP24 mRNA を不安定化し、分解を促進する

ことが報告されている (Zierold et al., 2000; 2001)。本章の結果より miR-125b が CYP24 の転写後調節に関与することが明らかになり、CYP24 の発現調節における新たな機構を示すことができた。

CYP24 の酵素活性は 25(OH)D₃ または 1α,25(OH)₂D₃ の 24 位水酸化酵素活性を測定することで求めることが多い。

Inaba ら (1991) はヒト白血病細胞株 HL-60 のミトコンドリア画分を用いて CYP24 の酵素活性を HPLC で測定し、25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性の K_m は 520 nM、1α,25(OH)₂D₃ 24 位水酸化酵素活性の K_m は 20 nM と算出している。

また、Sakaki ら (2000) はヒト CYP24 の大腸菌発現系を用いて CYP24 酵素活性を測定し、25(OH)D₃ 24 位水酸化酵素活性の K_m は 160 nM、1α,25(OH)₂D₃ 24 位水酸化酵素活性の K_m は 72 nM と報告しており、CYP24 は 25(OH)D₃ よりも 1α,25(OH)₂D₃ に対して親和性が高い。

これまでに MCF-7 細胞には

1α,25(OH)₂D₃ 合成酵素である CYP27B1 が mRNA、タンパクともに発現しているものの、25(OH)D₃ から 1α,25(OH)₂D₃ を合成できないことが報告されている (Welsh et al., 2003; Townsend et al.,

2005b)。本研究においても 25(OH)D₃ を基質とした場合、CYP27B1 の代謝物である 1α,25(OH)₂D₃ の生成は認められず (Fig. 11: retention time 45.0 min) これらの報告と一致した。このことから、

MCF-7 細胞においては 25(OH)D₃ から 1α,25(OH)₂D₃ への経路を考える必要がなく、CYP24 活性を評価できたと考えられる。

以上、本章では内因性の CYP24 に対して miR-125b が転写後調節を行うこと、さらに miR-125b による CYP24 タンパク発現抑制が CYP24 の酵素活性にも影響を及ぼすことを明らかにした。

E. 結論

本研究では CYP24 の転写後調節に miR-125b が関与することを明らかにし、miRNA の動態学および毒性学の解明の一端となる有用な情報を提供できたと考えられる。

G. 研究発表

論文発表

Human CYP24 catalyzing the inactivation of antiproliferative agent calcitriol is post-transcriptionally regulated by miR-125b. 投稿中.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無

参考文献

- Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T, Yoshiki S and Suda T (1981) Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 . *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4990-4994.
- Albertson DG, Ylstra B, Segraves R, Collins C, Dairkee SH, Kowbel D, Kuo WL, Gray JW and Daniel P (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat Genet* **25**: 144-146.
- Anderson MG, Nakane M, Ruan X, Kroeger PE and Wu-Wong R (2006) Expression of VDR and CYP24A1 mRNA in human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**: 234-240.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M and Croce CM (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2999-3004.
- He L and Hannon GL (2004) MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Rev Genet* **5**: 522-531.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Menard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Menci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M and Croce CM (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* **65**:7065-7070.
- Inaba M, Burgos-Trinidad M and Deluca HF (1991) Characteristics of the 25-hydroxyvitamin D_3 - and 1,25-dihydroxyvitamin D_3 -24-hydroxylase(s) from HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* **284**: 257-263.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D and Slack FJ (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**: 635-647.