

## メチル化修飾マイクロ RNA 解析のための単分子検出法の開発

(阪大<sup>1</sup>・東理大<sup>2</sup>) 大城 敬人<sup>1</sup>、小本 祐貴<sup>1</sup>、浅井 歩<sup>1</sup>、今野 雅允<sup>2</sup>、石井 秀始<sup>1</sup>、谷口 正輝<sup>1</sup>

Development of single molecule detection method for methylation-modified microRNA analysis (<sup>1</sup>Osaka University, <sup>2</sup> Tokyo University of Science) ○Takahito Ohshiro<sup>1</sup>, Yuki Komoto<sup>1</sup>, Ayumu Asai<sup>1</sup>, Masamitsu Konno<sup>2</sup>, Hideshi Ishii<sup>1</sup>, Masateru Taniguchi<sup>1</sup>

We focused on the methylation of m6A in microRNA and evaluated the methylation modification rate. As a result, when comparing the samples of the patient group with signal pancreatic cancer and the healthy subject group, it was detected that the proportion containing the signal of m6A increased. This was confirmed by mass spectrometry. From the above, it can be said that it is possible to easily diagnose the disease by evaluating the methylation-modified state of a specific microRNA by this method.

*Keywords* : RNA; Single-Molecule Detection; Tunnel-Current; Epigenetics

本研究では、尿中のマイクロ RNA 中の m6A のメチル化に注目し、各アデニン部位でのメチル化修飾率を評価した。これまでがん診断として、マイクロ RNA 解析(RNA-seq)が注目されてきた。しかし、その解析は種類や量となり、それだけでの識別精度は十分でないことが分かっている。一方、特定のマイクロ RNA で、メチル化を指標として高精度に識別される可能性が示唆されている。ここでは、ナノギャップ電極デバイスによってマイクロ RNA の単分子トンネル電流計測を行い、m6A (N6-methyladenosine)の修飾を分子ごとの電気伝導度により検出し、定量が可能であるかについて検討を行った。

試料となる修飾塩基としては、m6A とした。この核酸塩基モナー、m6A を含む合成オリゴ、あるいは抽出した mRNA を含む水溶液 1 $\mu$ M の濃度に調整し、室温・大気圧下で計測を行った。尿中に存在するエクソソームを、ナノワイヤーデバイスにより抽出した。計測に用いる nano-MCBIJ デバイスにより電極間距離をトンネル電流測定可能な距離に制御し、電気計測を行った。一方、同じく抽出した RNA についてイルミナによる RNA 種の特定制を行い、RNA 量の多いマイクロ RNA に対して m6A への修飾割合について評価を行った。まず、ガン患者由来の人のサンプルから hsa-let7a-5p に相当とするシグナルを検出した。このうち、hsa-let7a-5p の#3 について、A のコンダクタンス値をもつシグナルと m6A のコンダクタンス値をもつシグナルを比較した。その結果、シグナル膀胱がんの患者群のサンプル中では、m6A のシグナルを含む割合は、健常者群と比べ著しく増加していることが分かった。以上のことから、本計測法が、特定のマイクロ RNA のメチル化修飾状態について評価でき、疾患の診断に供する可能性があることが示されたといえる。

1) Single-Molecule RNA Sequencing for Simultaneous Detection of m6A and 5mC, Ohshiro T, Konno M, Asai A, Komoto Y, Satoh T, Eguchi H, Doki Y, Taniguchi M, Ishii H, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19304