

大腸がんマイクロ RNA 修飾塩基のエピトーク単分子検出 Single-Molecule Epigenetic Detection of micro RNA in colon cancer cell

阪大産研¹・阪大医² ○大城敬人¹, 小本祐貴¹, 今野雅允², 浅井歩², 石井秀始², 谷口正輝¹
ISIR-SANKEN, Osaka Univ.¹, Medical Department, Osaka Univ.², ○Takahito Ohshiro¹,
Yuuki Komoto¹, Masamitsu Konno², Ishii Hideshi², Masateru Taniguchi¹

E-mail: toshiro@sanken.osaka-u.ac.jp

1. 緒言

高速・高精度かつ低コストに個人の遺伝情報を読み取ることのできる次世代 DNA シーケンサの開発は、近年世界中でしのぎを削っている。われわれは、これまでにトンネル電流を指標として、天然核酸塩基およびメチル化などの修飾核酸塩基をコンダクタンスの値の違いから識別可能であることを示している [1-4]。

本研究では、培養した大腸ガン細胞中のマイクロ RNA 中のメチル化に注目し、がん細胞の状態について評価することを目的とした。これまで消化器系ガンの細胞から抽出されたマイクロ RNA は、種類や量だけでは十分に識別できていないのが現状である。その中で、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) および 5mC (5-methylcytosine) の修飾を検出し、定量が可能であるかについて検討を行った。

2. 計測・実験条件

計測に用いる nano-MCBIJ により作製した金ナノ接合を自己破断後、ピエゾ素子を用いて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。試料となる修飾塩基としては、5mC と m6A とした。この核酸塩基モノマー、5mC と m6A を含む合成オリゴ、あるいは抽出した mRNA を含む水溶液 1μM の濃度に調整し、室温・大気圧下で計測を行った。mRNA は、RKO セルライン大腸がん細胞を破碎し、mRNA 各分を遠心分離し、必要に応じて磁気ビーズで対象配列に対して相補鎖を修飾したもので精製したものをを用いる。

3. 結果・考察

大腸がんの培養細胞より抽出したマイクロ RNA の 200c-5p について評価を行い、5mC および m6A の検出とその割合を検出する。その結果、5mC および m6A の割合は、5.5%と 6.6%となっており、その割合は質量分析で評価値と同程度であることが分かった。

次に、200c-5p 中の C 中の 5mC の転換率を、#4, #8, #9, #10, #13 について評価を行った。その結果、#13 が最も転換率が大きく、18.5%とわかった。同様に m6A の転換率について評価を行い、#7 の m6A が 10.9%となり最も大きいことが分かった。このことから本計測法が、細胞の特定のマイクロ RNA の複数の修飾状態について評価できる可能性が示された。

関連論文 [1] Ohshiro T., Komoto Y., Konno M, Koseki J, Asai A, Ishii H, Taniguchi M., Sci.Rep., 9, (2019), 3886 [2] T. Ohshiro, K. Matsubara, M. Tsutsui, M. Furuhashi, M. Taniguchi, T. Kawai, Sci. Rep., 2 (2012) 00501. [3] J Am Chem Soc. 2011 133, (2011) 9124. [4] T. Ohshiro, M. Tsutsui, K. Yokota, M. Furuhashi, M. Taniguchi, T. Kawai, Nat. Nanotechnol., 9 (2014) 835.