

1 分子微小電流シグナルの機械学習識別法の開発

Single-Molecule Methylation modification of microRNA For Cell Discrimination

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-MCMBJ 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 1 μ M 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

約 1nm に制御した電極ギャップをもつナノ電極を用いて、電極付近を通り過ぎる 1 分子に流れるトンネル電流を計測した。このとき、m6A および 5mC の核酸塩基モノマーを含む溶液の測定を行い、そのコンダクタンス値を決定した。シグナルは、最大電流 I_p によって特徴付けられ、そのヒストグラムの最頻値より 148 pS と 110 pS とした。これを、rGMP で正規化された相対 G で比較し、コンダクタンスの順序を調べてみると、5mC (1.21) > rGMP (= 1) > m6A (0.90) > rAMP (0.77) > rCMP (0.52) > rUMP (0.41) となることがわかった。

次に、合成オリゴヌクレオチドのメチル化部位検出を行った試料配列として、5'-GGTGCCT-3' (メチル化サンプルなし) および 5'-GGTGmCCT-3' (メチル化サンプル) の遺伝子プロモーター領域を測定した。その結果、両者の電気伝導度を配列順番ごとに比較すると、#5 位置での C と mC の違いをうまく識別できた。この方法を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ことに成功した。定量した。この値は、質量分析で得られた値と同等であることが分かった。本計測法が、マイクロ RNA から細胞状態を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.