

# 単分子検出法による網羅的メチル化修飾のマイクロ RNA 解析

## Single-Molecule Electrical detection method

### Towards Comprehensive methylation-modified microRNA

阪大産研<sup>1</sup>・阪大医<sup>2</sup> ○大城敬人<sup>1</sup>, 小本祐貴<sup>1</sup>, 今野雅允<sup>2</sup>, 浅井歩<sup>2</sup>, 石井秀始<sup>2</sup>, 谷口正輝<sup>1</sup>  
 ISIR-SANKEN, Osaka Univ.<sup>1</sup>, Medical Department, Osaka Univ.<sup>2</sup>, ○Takahito Ohshiro<sup>1</sup>,  
 Yuuki Komoto<sup>1</sup>, Masamitsu Konno<sup>2</sup>, Ishii Hideshi<sup>2</sup>, Masateru Taniguchi<sup>1</sup>

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、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。

#### 2. 計測・実験条件

試料となる修飾塩基としては、m6A とした。この核酸塩基モノマー、m6A を含む合成オリゴ、あるいは抽出した mRNA を含む水溶液 1μM の濃度に調整し、室温・大気圧下で計測を行った。m 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-MCMBJ により作製した金ナノ接合を自己破断後、ピエゾ素子をもち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。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。

#### 3. 結果・考察

RNA 量の多いマイクロ RNA が hsa-let7a であった。そこで、hsa-let7a-5p (UGA GGU AGU AGG UUG UAU AGUU)中の各マイクロ RNA 中の A 中の m6A 修飾について評価をおこなった。A は、#3, #7, #10, #17, #19 に存在する。まず、ガン患者由来の人のサンプルから、全体で 6256 の 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、シグナル膝ガンの患者群のサンプル中では、m6A のシグナルを含む割合は 7.6%のメチル割合となることがわかった。一方、健常者群では 4.0%のメチル割合を検出した。このメチル化部位について、既報の報告ではメチル化の割合ががん患者群で大きくなることが質量分析の結果わかっており、今回の結果を一致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。

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.