

代謝物応答性人工核酸を用いた標的代謝物の超感度検出法の開発

(青山学院大理工) ○本橋 優人・盛谷 周平・西原 達哉・田邊 一仁

Highly sensitive detection of target metabolite using metabolite-responsive oligonucleotide
(Graduate School of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University) ○Yuto Motohashi,
Shuhei Moritani, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe

Metabolites produced from living cells have been attracting attention as disease biomarkers. In this study, we employ a DNA high-throughput sequencing technology to quantify the target metabolites. We attempted to construct a molecular system to encode the information of target metabolites in each sample into the DNA sequences using metabolite-responsive oligonucleotide. When glucose oxidase (GOx) and phenylboronic acid tethered oligonucleotide (PheBA-ODN) were added to glucose as a target, production of hydrogen peroxide (H_2O_2) was observed. H_2O_2 was further reacted with PheBA-ODN to form oligonucleotide with terminal amino group (DNA- NH_2). DNA- NH_2 was recovered and quantified by quantitative PCR. Thus, we can quantify the amount of glucose in metabolites.

Keywords : Functional oligonucleotide; Metabolites

近年、生体内で産生される代謝物は、疾病診断や生命現象の解明において極めて重要な役割を果たす。既存の代謝物解析には、液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS) 等が用いられている。しかしながら、検体ごとに代謝物の分離を必要とするため、多検体解析を指向した場合、スループット性の向上が必要不可欠となる。

これらのことから、我々は、次世代シーケンサー等で解析可能な DNA に標的代謝物の情報をコードする方法論の構築に取り組んだ。超高感度、かつハイスループットな代謝物解析を目指した。

本研究では、標的代謝物としてグルコースを選択し、この代謝物の情報を DNA 配列に置き換えるシステムの構築を試みた。グルコースのコード化手法は Figure 1 に示した。グルコースはグルコースオキシダーゼ (GOx) と反応することによって、過酸化水素 (H_2O_2) を産生する。一方、フェニルボロン酸を末端に有する人工核酸 (PheBA-ODN) は、 H_2O_2 との反応でアミノ基末端の人工核酸 (DNA- NH_2) を生成物として与える。このようにして得られた DNA- NH_2 をビオチンで標識し、ストレプトアビジン標識した磁性ビーズで回収、定量することによりグルコースを定量可能である。

実際に、グルコースを含む水溶液に対して、GOx、及び PheBA-ODN を添加したところ、 H_2O_2 が産生して DNA- NH_2 が得られた。また、DNA- NH_2 を本システムで回収し、定量 PCR にて定量可能であることを明らかにした。現在、細胞内グルコース量の定量を試みている。

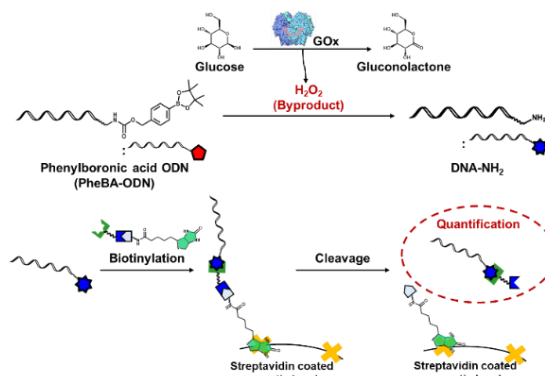


Figure 1. Schematic illustration of quantification of glucose using Phenylboronic acid ODNs.