

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14754

研究課題名（和文）DNAバーコーディングを活用した代謝物の超高感度定量

研究課題名（英文）High sensitive metabolite detection using DNA barcoding strategy

研究代表者

西原 達哉（NISHIHARA, Tatsuya）

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：00773201

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：近年、生体内で産生される代謝物は、疾病と関連する診断マーカーとして機能することから、医学研究分野を中心に注目されている。本研究では、標的代謝物情報をDNAの配列情報へ置換する方法論の構築を試みた。実際に、レドックスの維持に寄与するグルタチオン、および、がん代謝において重要な役割を果たすグルコース、乳酸へ適用し、代謝物情報をDNAの配列情報へ置き換え可能であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の質量分析計によるメタボローム解析の課題解決に向け、代謝物情報をDNAの配列情報へ置換する方法論の構築を進めた。実際に、レドックスの維持に寄与するグルタチオン、および、がん代謝において重要な役割を果たすグルコース、乳酸へ適用し、代謝物情報をDNAの配列情報へ置き換え可能であることを初めて明らかにした。これにより、mRNAとの同時解析も可能であった。そのため、従来の代謝物解析の課題克服に繋がる重要な成果であると言える。

研究成果の概要（英文）：In the field of medicine, metabolome analysis has been actively conducted in recent years, combining separation methods such as capillary electrophoresis (CE), liquid chromatography (LC), and gas chromatography (GC) with mass spectrometry techniques. Metabolome analysis has been conducted in the cohort study to discover the disease biomarker. In this study, we attempted to convert the metabolite information into DNA sequences using chemical reactions. The proposed methodology can realize integrated analysis with the transcriptome and genome.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：代謝物 DNAバーコード

1. 研究開始当初の背景

代謝物の総体であるメタボロームは物理化学的な性質が異なる多種多様な低分子化合物の集合であるため、メタボローム解析にはこれまで困難を伴っていた。しかし、近年の分析技術の進展に伴い、液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS)、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) など、複数の分析技術を組み合わせて用いることにより、網羅的なメタボローム解析が実現され始めてきた。実際に、医学研究分野を中心にメタボローム解析の重要性が認識され、世界中でバイオマーカー探索や疾患代謝研究に応用されるようになってきた。

その一方で、LC-MS や、CE-MS に代表される従来の質量分析計によるメタボローム解析は標的代謝物の分離を前提とするため、多成分解析に優れるものの、スループット性に乏しい点が課題であった。また、トランスクリプトーム解析などとは独立した分析となるため、代謝物解析とのマルチオミクス解析には多くの時間とコストがかかってしまう。これらの従来の代謝物解析が抱える課題を克服した新たな分析手法の開発が求められていた。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、代謝物情報を DNA の配列情報へ置き換える分子システムを新たに構築し、ゲノムやトランスクリプトームと標的代謝物の同時解析の実現を目指した。

3. 研究の方法

DNA バーコーディングを活用した代謝物解析を実現する分子システムの構築にあたり、代謝物応答性の人工核酸を設計、合成した。具体的には、標的代謝物との反応性部位を導入した人工核酸とその相補鎖からなる二重鎖 DNA を用いた。標的代謝物との反応に伴い得られる生成物 DNA を回収し、相補鎖を検出することで、標的代謝物の検出を行う。実際に、本方法をレドックス維持に寄与するグルタチオン、および、がん代謝において重要な役割を果たすグルコース、乳酸へ適用し、実現可能性を検証した。

・グルタチオンの DNA コード化

グルタチオンの DNA コード化にあたり、ジスルフィド結合を介して、ビオチンおよび、DNA から構成される人工核酸 (Biotin-SS-DNA) を設計、合成した。本人工核酸をストレプトアビジン磁性ビーズに対して標識し、解析対象とするサンプルと混合させ、グルタチオン濃度依存的に DNA が磁性ビーズから遊離可能か、定量 PCR を用いて検証した。

・グルコース、乳酸の DNA コード化

グルコース、乳酸の DNA コード化にあたり、フェニルボロン酸を含有した人工核酸、および標的代謝物に対応するオキシダーゼを利用した。対象代謝物に対するオキシダーゼをサンプルに加えることにより、酵素反応が進行し、副生成物として過酸化水素が生じる。本人工核酸は、過酸化水素との間で反応が進行し、脱炭酸を介し、アミノ基が生じるよう設計している。そのため、アミノ基に対してビオチン化を行い、ビオチン化 DNA を回収することで、標的代謝物の検出が実現する。実際に、一連の操作を経て、回収される DNA 量を評価した。

4. 研究成果

・グルタチオンの DNA コード化 (論文投稿中)

まず、グルタチオンと Biotin-SS-DNA を反応させたサンプルを作成し、HPLC、および MALDI-TOF-MS により評価した。その結果、グルタチオンと Biotin-SS-DNA の間で反応が進行し、グルタチオン付加体の形成、すなわち、置換反応の進行が確かめられた。また、グルタチオンの濃度依存的に生成物量 (GSH-SS-DNA) が増加することも明らかとなった。

次に、磁性ビーズに Biotin-SS-dsDNA を標識し、GSH 溶液と混和した。この際、交換反応が進行した場合、GSH-SS-dsDNA の形で上澄みに遊離する。実際に、上澄み中に含まれる相補鎖 DNA を定量 PCR にて定量した結果、加えた GSH 量に依存的に増加することが確かめられた。

最後に、本評価系を細胞抽出液に適用した。その結果、細胞抽出液に含まれる GSH を定量することに成功した。また、過酸化水素を曝露した細胞を用い、細胞抽出液中に含まれるグルタチオン量の減少を追跡可能か検証した。その結果、過酸化

GSH 検出を指向したジスルフィド交換反応に基づく DNA 遊離システム

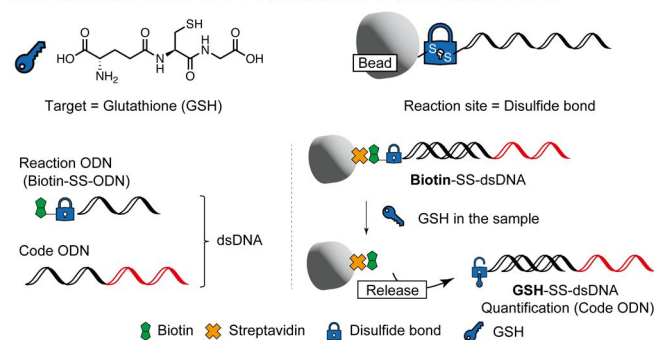


図. 本研究の概略図

水素未投与の細胞に比べ、曝露した細胞から作成した抽出液において、有意な GSH の減少が認められた。本方法論で得られた定量値と、市販されている比色法を用いて得られた定量値は同等であり、高精度に GSH を定量可能であることを確かめた。さらに、GSH の DNA コード化後の細胞抽出液をエタノール沈殿させ、逆転写操作、および定量評価までシームレスに実施した。その結果、GSH、および mRNA をそれぞれ検出可能であることを明らかにした。本結果は、トランスクリプトームと GSH の同時解析の可能性を示唆するものである。

・グルコース、および乳酸の DNA コード化 (論文投稿中)

フェニルボロン酸を備えた人工核酸 (PB-DNA) を設計、合成し、標的代謝物、およびオキシダーゼを加え、反応進行を評価した。その結果、グルコース、および乳酸の濃度依存的に、DNA-NH₂ へ変換されることが確かめられた。

そこで、次に、標的代謝物依存的に生じる DNA-NH₂ を回収可能性を検証した。具体的には、磁性ビーズに対して、PB-DNA を担持し、標的代謝物とオキシダーゼを含む溶液と混和させた。続いて、ビオチンラベル化溶液と置換し、ビオチン標識を行った。最後にストレプトアビジン標識磁性ビーズによる回収を行った。その結果、標的代謝物量依存的に回収 DNA が増加することが確かめられた。また、本方法論を細胞培養液に適用し、がん細胞の増殖に伴うグルコースの減少、および乳酸の増加をモニターすることに成功した。

これらの成果は、代謝物情報を DNA 配列情報へ変換可能であることを初めて示したものである。先述した通り、代謝物情報をコードした DNA を用いることで、mRNA との同時解析も可能となる。そのため、従来の代謝物解析の課題克服に繋がる重要な成果である。また、本研究を進めていく過程で、代謝物以外の生体分子の検出にも広く適用可能であることを新たに見出した。現在、多成分の酵素活性評価の実現に向け、さらに研究を展開している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 矢島百華 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 代謝物の高感度検出を目指したDNA配列情報へコード可能にする新規ラベル化剤の開発
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 本橋優人 盛谷周平 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 矢島百華 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 代謝物の高感度検出を実現する新規ラベル化剤の開発
3. 学会等名 第11回 CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 本橋優人 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 代謝物の超高感度検出を可能にする機能性核酸の開発
3. 学会等名 第15回 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Tatsuya Nishihara, Yuto Motohashi, Shuhei Moritani, Momoka Yajima, Kazuhito Tanabe
2. 発表標題 Functional Oligonucleotide Encoding the Metabolite Information
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 西原達哉 本橋優人 盛谷周平 矢島百華 田邊一仁
2. 発表標題 代謝物情報をコード可能にする機能性核酸の開発
3. 学会等名 第15回 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 西原達哉 本橋優人 盛谷周平 田邊一仁
2. 発表標題 標的代謝物の多検体解析を指向した機能性人工核酸の開発
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 盛谷周平 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 検体中に含まれるグルタチオン濃度をコード可能にする機能性核酸の開発
3. 学会等名 第11回 CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 本橋優人 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 フェニルボロン酸含有人工核酸を用いた代謝物解析手法の開発
3. 学会等名 第15回 バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yuto Motohashi, Tatsuya Nishihara, Kazuhito Tanabe
2. 発表標題 Detection of cellular metabolite using phenylboronic acid-modified oligonucleotides
3. 学会等名 The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 本橋優人 盛谷周平 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 細胞内の標的代謝物情報をコード可能にする機能性人工核酸の開発と応用
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 三尾玲緒斗 西原達哉 田邊一仁
2. 発表標題 アミノペプチダーゼ活性をコード可能にする機能性核酸の開発
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------