

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12745

研究課題名(和文) 核酸アプタマーを膜外配列として用いた人工リガンド作動性イオンチャネルの構築

研究課題名(英文) Creation of artificial ligand-sensitive ion-channel using nucleic acid aptamer for extracellular segment

研究代表者

二木 史朗 (Shiroh, Futaki)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50199402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多様なリガンドに対応できるオーダーメイドセンサーへの展開を視野に、リガンドとの結合によりコンホメーション変化する核酸アプタマーを膜外領域にもつアラメチシンチャネルの構築を行うことを目的とした。アラメチシン-核酸ハイブリッドの調製はクリック反応により可能であった。このハイブリッド分子は脂質二重層中でイオンチャネルを形成したが、ハイブリッド化アラメチシンは脂質膜を不安定化することがわかり、安定なチャネル記録を得ることは難しかった。また、核酸部分の構造変化によるチャネル電流の変化は顕著とは言えず、今後の設計の見直しが必要であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to construct an alamethicin channel with a nucleic acid aptamer which changes its conformation by binding with a ligand in the extramembrane region, with a view to developing into a tailored sensor capable of responding to various ligands. Preparation of alamethicin-nucleic acid hybrids was conducted by click reaction. Although this hybrid molecule formed ion channels in the lipid bilayer, it was found that the hybridized alamethicin destabilizes the lipid membrane and it was difficult to obtain reproducible channel recordings. In addition, the change in the channel current due to the structural alteration of the nucleic acid segment was not conspicuous, and it was found that it is necessary to reexamine the structural design in the future.

研究分野：生体機能化学

キーワード：イオンチャネル アプタマー

## 1. 研究開始当初の背景

膜を介する情報の人為的制御、あるいは刺激に応じて変化する膜電流を利用するセンシングなどを目的として、これまでにさまざまな機能性人工イオンチャネル系の創出が試みられてきた。これは同時に、膜存在下での超分子構造の構築原理や天然のイオンチャネルの分子メカニズムを探るという観点からも重要で魅力的なチャレンジである。

申請者は、天然の受容体型チャネル蛋白質が膜外領域でのリガンド認識によりチャネルを開口することに着目し、イオンチャネル形成ペプチドであるアラメチシンに、リガンドとしての Fe( )との相互作用により構造変化するロイシンジッパー型配列(Futaki, S., Kiwada, T., Sugiura, Y. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 15762-15769)を膜外領域配列として連結することにより、リガンドとの相互作用を膜電流変化として検出出来る新しいタイプの人工受容体型イオンチャネルの創出に成功している (Kiwada, T., Sonomura, K., Sugiura, Y., Asami, K., Futaki, S. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 6010-6011; Futaki, S., Asami, K. Chem. Biodivers. 2007, 4, 1313-1322)。

これ以前に報告された人工チャネル構築の試みの多くは、チャネルポアのみを形成するにとどまっておき、外的刺激あるいはリガンドとの相互作用を電流レベルに反映出来ないものが多かった。仮に電流制御(ゲーティング)可能なものであっても、リガンドとの相互作用は電流の減少としてアウトプットされる(リガンドがチャネルのポアをふさぐ)ものがほとんどであった。このような膜外配列の構造変化を利用した電流制御の例はほとんどなく、申請者らの「リガンドによる膜外構造変化を膜電流変化としてアウトプットする」という概念は、極めてユニークであり、機能性人工チャネル設計におけるプロトタイプとして重要と考えられる。

この概念を発展させ、申請者は、「Ca<sup>2+</sup>結合タンパク質カルモジュリン由来ペプチド」(Finnら, Nat. Struct. Biol. 1995)を連結したハイブリッドチャネルの構築を報告している(Noshiro, D., Sonomura, K., Yu, H.-H., Imanishi, M., Asami, K., Futaki, S. Bioconjug. Chem. 2013, 24, 188-195; Futaki, S., Noshiro, D., Kiwada, T., Asami, K. Acc. Chem. Res. 2013, 46, 2924-2933)。

これらのチャネルでは、リガンド(Fe<sup>3+</sup>やCa<sup>2+</sup>)添加により誘起される膜外配列のコンホメーション変化が、アラメチシンの会合状態に影響を及ぼし、結果的にチャネル電流の増加を誘導することが確認された。すなわち、「リガンド結合による膜外配列の構造変化」を「チャネル電流変化」として検出できる人工受容体が構築できた。この結果は、リガンドと結合して構造変化する適当なペプチド

配列を「膜外配列」に用いることにより、様々なオーダーメイドの人工チャネル・センサー分子が創出できることを示唆する。しかし、興味の対象となるリガンドとの相互作用により構造変化を誘起する適当なペプチド・タンパク質配列が天然に存在しなかったり、人工設計が困難である場合も多い。

一方、SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)等のライブラリースクリーニング法を用いることにより、様々なリガンドと結合し、構造変化する「核酸アプタマー」(特定の分子と選択的に結合する核酸分子)が取得できる。ここでSELEXとは10<sup>14</sup>程度のランダム配列の核酸ライブラリーを用いて、ターゲット分子と特異的に結合する核酸(アプタマー)を作出する技術であり、1990年にL. Goldらにより報告された。ライブラリー核酸とターゲット分子を混合した後、ターゲット分子に結合している核酸をDNAの場合はPCR法、RNAの場合はRT-PCR法を用いて増幅させ、シーケンス解析で配列を決定し、分子-分子間相互作用解析によりアプタマーを特定する。これまでに、コカインに対するアプタマー(Stojanovic, M. N., de Prada, P., Landry, D. W. J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 4928-4931)やアルギニン結合性アプタマー(Harada, K., Frankel, A. D. EMBO J. 1995, 14, 5798-5811)など、数多くのアプタマーが創出されてきた。これらアラメチシンと連結することで、多様なリガンドの結合をチャネル電流変化として捉えられる「アプタマーチャネル」の創出が期待できる。膜外配列の構造変化をチャネル電流制御に利用する申請者のアプローチは、SELEX等と組み合わせることで様々なオーダーメイドチャネル・受容体の創出に応用可能であると期待される。

チャネルを透過するイオン流はチャネル電流として観察される。パッチクランプ法は、単一のチャネルを透過するイオン流のリアルタイムでの測定を可能とする。間接的ではあるものの単一分子の構造変化、あるいは会合状態の変化をリアルタイムで測定できる方法は現在でも極めて限られている。

パッチクランプ法は生細胞膜上のイオンチャネルの挙動を観測するための手法であるが、平面脂質二重膜(planar lipid bilayer)にペプチドやタンパク質を再構成することで、同等の測定が可能である(平面膜法)(新津藍, 蛋白質科学会アーカイブ, 2017, 10, e086)。これに加え、パッチクランプ法にはない平面膜法の利点として、1)精製したチャネルの使用が可能であり脂質組成を任意に選択でき、構造機能相関研究により適した方法であることや、2)細胞小器官上のチャネルなど、パッチクランプ法では測定が困難なチャネルの測定も可能であることが挙げられる。イオンチャネルをはじめとす

る膜タンパク質の基礎的な研究だけでなく、近年では膜タンパク質創薬や、嗅覚や味覚の膜受容体を利用した新規バイオセンサーへの応用が期待されている(川野竜司, 生物物理, 2015, 55, 77-80)。しかし、一つのチャンネル孔を通過する電流値が小さく、全体として大きな膜電流が得られないため、従来の平面膜法では、検出に十分な S/N を得るのが難しく、また、pA (ピコアンペア) レベルの微小電流を測定することになるため、電気的ノイズや振動の除去が難しく、測定には習熟が必要であるという欠点があった。

近年開発された液滴接触法は、パッチクランプ法と同感度のピコアンペア単位の微小電流をリアルタイムで測定可能である(川野竜司, 生物物理, 2015, 55, 77-80; 神谷厚輝, 大崎寿久, 竹内 昌治, 分析化学, 2015, 6, 441-449)。ナノテクノロジーや MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術と組み合わせることにより、新しいタイプの高感度センサーやスイッチとしての展開も期待されている。

申請者は、これまでの申請者のチャンネル構築に関する知見と、アプタマーによる種々の分子の認識の可能性、チャンネル電流測定を容易とする液滴接触法を組み合わせることで、テーラーメイドセンサーの創出が可能ではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、この設計原理の妥当性を検証するために、目的に適した DNA アプタマーを選出するとともに、アラメチシンとアプタマー

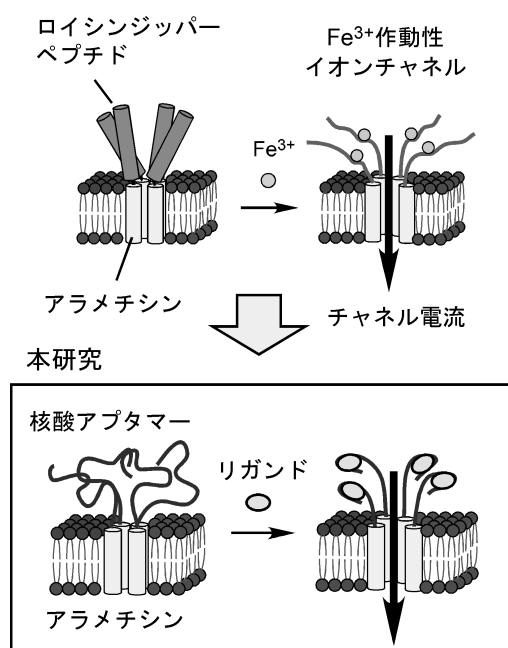


図1. 核酸アプタマーの認識能を利用したオーダーメイド・イオンチャンネル・受容体の創出

一間の架橋様式に検討を加え、高感度で高精度のセンシングを可能とするような構造要件を検討することを目的とした(図1)。

## 3. 研究の方法

系の設計に関しては、1)種々のアプタマーに適用可能であること、2)アラメチシン部分と結合する DNA 配列が比較的短く、架橋体の調製がよいこと等を考慮し、Nutiu, R., Li, Y. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 4771-4778 に記載の ATP センサーの配列を参考にした。この系は、ATP と結合する DNA アプタマーとこれと相補的な 2 本の DNA 配列からなり、相補的 DNA にはそれぞれ蛍光団と消光団が連結されている。ATP 非存在下では、蛍光団に隣接する形で消光団が配置されるので、蛍光を発しない。一方、DNA アプタマーが ATP と結合すると、これに伴う構造変化により蛍光団を有する相補的 DNA 鎖と消光団を有する DNA 鎖はアプタマーから解離し、蛍光を発する。これにより ATP を感知する系である。この相補鎖に対応する核酸配列をアラメチシンと連結させた架橋体が合成できれば、これを脂質膜に導入すると、膜上には相補的 DNA が提示される。次いで、ATP 結合性 DNA アプタマーをこれに加えると、相補鎖 DNA 部分と二本鎖を形成する。この段階では膜上の立体障害のため、アラメチシンチャンネルは開口しない。しかし、ATP を系に加えると、アプタマーと ATP との結合により、アプタマーは膜上に提示された DNA 相補鎖と解離する。膜外 DNA 鎖間の立体障害が解消され、アラメチシンの膜内での会合が促進されることで、会合体の中心部をイオン流が透過できる。すなわち、ATP の存在は、チャンネル電流として観察されることが期待される。

クリック反応によるペプチド部分とアプタマー部分の連結を想定し、以下のアラメチシン配列を設計した：

(1) XPXAXAQXVXGLXPVXXQQF-G-Pra-CONH<sub>2</sub>  
(X=Aib, -aminoisobutyric acid ;Pra = propargylglycine)

Aib を含むペプチドはその立体障害により通常の合成法では調製困難なため、マイクロウェーブを用いる Fmoc 固相法により行った。ペプチド鎖構築後、トリフルオロ酢酸-エタンジチオール処理により、ペプチドの樹脂からの切り出しと脱保護を行った。さらに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、得られたペプチドを精製し、凍結簡素を行うにより目的のペプチドの粉末を得た。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOFMS) により目的物の同定を行った。

一方、3' をアジド化したオリゴ DNA:

(2) CTGACTGGACCC

を受託合成により合成した。

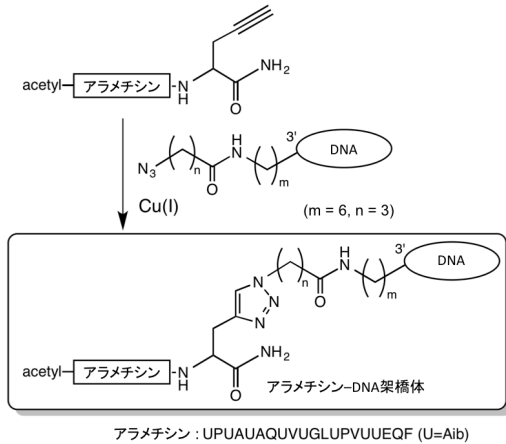


図2 . アラメチシン-DNA 架橋体の調製

(1)と(2)の連結に関する反応条件の検討条件を行った。物性の異なる二つのフラグメントの縮合において、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた架橋体の検出、クリック反応の条件検討と最適化、HPLCによる目的物の単離法の検討に時間を費やしたものの、最終的に結果、銅触媒として  $\text{CuSO}_4$ 、アスコルビン酸、TBTA 存在下に室温、一夜反応させることでほぼ定量的に反応が進行することが確認された。HPLC による精製により、研究遂行に必要な (1)-(2) の架橋体を得た (図2)。目的物の同定はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS) により行った。

チャンネル活性の測定に関しては、液滴接触法 (droplet contact method) (Kawano, R., Tsuji, Y., Kamiya, K., Kodama, T., Osaki, T., Miki, N., Takeuchi, S. PLoS ONE 2014,

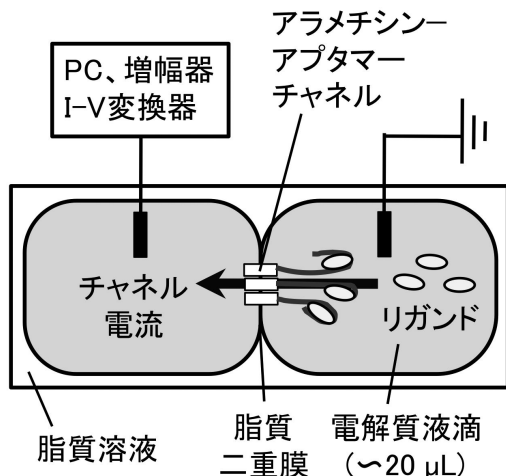


図3 . 液滴接触法によるチャンネル活性の測定・評価

9, e102427) を用いた (図3)。この方法の採用により、脂質二分子膜が簡便に再現良く形成され、従来の平面膜法に比べて形成される二分子膜の面積が小さいために、電気ノイズが格段に低く、測定も非常に容易となった。また必要となるサンプル量も少量となった。

チャンネル電流の測定には、脂質として diphytanoyl phosphatidylcholine のデカン溶液、バッファーには 300 mM NaCl ならびに 5 mM  $\text{MgCl}_2$  を含む 10 mM Tris HCl (pH 8.3) を用いた。液滴の一方に合成したアラメチシン-アダプター-DNA (1)-(2) あるいは、アラメチシンセグメント (1) を添加し、膜の両端に 200 mV の電位差を発生させた状態で、液滴の接触面に生じる脂質二重層にこれらの分子を自発的に挿入させた。室温、Sampling rate 100 kHz、Filter 10 kHz の条件で測定を行った。

(1)-(2) のチャンネル電流測定に先立ち、(1) のチャンネル電流の測定を行った。天然のアラメチシンは、膜内で会合して、会合数の変化に応じた複数の電流レベル (あるいはコンダクタンス) が時々刻々と変化する特徴的なチャンネル電流を与える。(1) を膜の一方から添加することによって、N 末端側から優先的に膜に挿入されると考えられる。(1) のチャンネルを測定したところ、このアラメチシンに典型的なチャンネル電流は認められず、短時間の開口を示すスパイクが高頻度で出現する可能性が示唆された。すなわち、アラメチシンに加えての G-Pra- $\text{CONH}_2$  配列の付加により、膜中で天然アラメチシンに比べて不安定な会合状態しか取れない可能性が示唆された。

アラメチシン-アダプター-DNA (1)-(2) に関しても、膜の一方の側からこれを添加すると、アラメチシン部分のみが膜に組み込まれ、アダプター部分は膜外に提示されることが期待された。(1)-(2) は天然アラメチシンとより類似した矩形波を与えるチャンネル電流を与えた。しかし、膜が非常に破れやすくなり、長時間の測定は成功しなかった。

さらに、別途合成したアダプター-DNA

(3) CACTGACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGT

をこれに添加し、アダプター部分と複合体を形成させた。

次いで、アラメチシン-DNA アプタマー複合体 (1)-(2)/(3) のチャンネル挙動に関して検討した。(1)-(2) に比べてチャンネル電流は減少したため、(3) の添加により膜外領域の立体障害が増加し、チャンネルが形成されにくくなり、チャンネル電流が低下することが示唆された。しかしこれに ATP を加えても、著明な電流変化は得られなかった。今後は、この原因に関して究明を行い、改良を加えて目的の達成を目指したい。

#### 4. 研究成果

本研究では、多様なリガンドに対応できるオーダーメイドセンサーへの展開を視野に、リガンドとの結合によりコンホメーション変化する核酸アプタマーを膜外領域にもつアラメチシンチャンネルの構築を行うことを目的とした。アラメチシン-核酸ハイブリッドの調製はクリック反応により可能であった。このハイブリッド分子とアプタマー部分の複合体(1)-(2)/(3)は脂質二重層中でイオンチャンネルを形成したが、(1)-(2)は脂質膜を不安定化することがわかり、安定なチャンネル記録を得ることは難しかった。また、(3)の構造変化による(1)-(2)からの解離によるチャンネル電流の変化は顕著とは言えず、今後の設計の見直しが必要であることが分かった。恐らくは(1)-(2)のチャンネル形成確率が低いため、(3)との相互作用の有無による(1)-(2)の会合状態の変化がチャンネル電流として観測されにくいことが原因の一つと考えられ、今後、アラメチシンとDNAを結ぶリンカー配列などに見直し、所望の結果が得られるセンサー系を確立したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

二木 史朗 (FUTAKI Shiroh)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：50199402

##### (2)研究分担者

##### (3)連携研究者