

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18232

研究課題名（和文）リボソーム融合型ナノポア技術による1分子タンパク質網羅定量解析

研究課題名（英文）Comprehensive Single-Molecule Protein Quantification Analysis Using Ribosome-Integrated Nanopore Technology

研究代表者

上村 想太郎（UEMURA, Sotaro）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：00447442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ペプチド分子の網羅的解析技術の開発のためのリボソーム融合型ナノポアによるタンパク質の網羅解析基盤技術開発を目標としました。本研究の全期間において、まずナノポア測定に利用可能な膜チャネルタンパク質のうち、トランスロコンであるSecYEGと分子モーターであるSecA複合体の選定を行い、人工脂質二重膜上での再構成を実現しました。その結果、膜挿入電流シグナルを検出し、さらに基質であるペプチド分子とATP存在下においてのみ、特徴的なナノポア電流波形を検出することに成功しました。現在では繰り返しアミノ酸配列を含む人工ペプチドに対する電流波形変化の検出を試みています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究による1分子ペプチドのアミノ酸配列同定の学術的意義や社会的意義は極めて大きく、その効果は計り知れない。特にペプチドはそもそも分解酵素によって分解されやすく分子数が少なく、増幅する技術も存在しない。基礎研究においてはシグナル伝達、アポトーシス制御だけでなく成長因子や免疫応答、神経伝達などの細胞機能制御に関わる学問領域に大きな貢献が期待される。さらに応用研究として、抗菌ペプチド、ドラッグデリバリー、ペプチド医薬品やホルモン検出などの臨床応用や診断、創薬領域にも大きな貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the goal was to develop a foundational technology for comprehensive protein analysis using ribosome-integrated nanopores to advance the comprehensive analysis of peptide molecules. Throughout the duration of the study, we first selected the translocon SecYEG and the molecular motor SecA complex from among the membrane channel proteins available for nanopore measurements, and successfully reconstituted them on artificial lipid bilayers. As a result, we detected membrane insertion current signals and were able to observe characteristic nanopore current waveforms only in the presence of peptide molecule substrates and ATP. Currently, we are attempting to detect current signal changes in response to artificial peptides containing repetitive amino acid sequences.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測 ナノポア計測 ペプチド 機械学習

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

質量分析のタンパク質測定限界以下で、かつ抗体を必要としない高感度でハイスループットなタンパク質網羅解析技術を開発するために、本研究では無細胞翻訳系を融合したナノポアによるタンパク質の網羅解析を行う基盤技術の開発を行います。この手法を用いればタンパク質の高次構造が形成される前に測定が可能であり、ナノポアの通過はタンパク質翻訳と共役しているため、従来の通過速度より遅く制御させることが可能です。

さらに特定のアミノ酸信号を事前に機械学習させることによってアミノ酸配列の決定精度を向上させ、最終的には細胞から抽出した細胞液を用いて新しいペプチドの配列を網羅的にかつ定量的に決定することを目標とします。

2. 研究の目的

タンパク質は、すべての生体細胞において主要な働きをしており、DNAのコピーから基礎代謝の触媒、細胞運動の生成まで、細胞のすべての機能を維持しています。タンパク質の網羅的な定量解析は、生物学的プロセスや疾患を理解するための重要な情報になります。しかしながら、DNA配列決定の技術的進歩に比べて、高感度でハイスループットなタンパク質網羅解析技術の開発は大きく遅れているのが現状です。

本研究では無細胞翻訳系を融合したナノポアによるタンパク質の網羅解析を行う基盤技術の開発を行います。さらに特定のアミノ酸信号を事前に機械学習させることによってアミノ酸配列の決定精度を向上させ、最終的には細胞から抽出した細胞液を用いて新しいペプチドの配列を網羅的にかつ定量的に決定することを目的とします。

3. 研究の方法

まず、脂質二重膜を人工的に再構成し、そこへリポソームに再構成された膜タンパク質を導入する実験系を立ち上げます。膜タンパク質は α ヘモリシンのみならず、アミノ酸測定に最適な孔のサイズを持つCALHM2や他のイオンチャネルタンパク質も同時に試みます。次に膜タンパク質でDNAなどの核酸や短いペプチドを検出できる1分子ナノポア検出系の確立を目指します。さらにアミノ酸の検出系を確立するために様々な手法で検出を行います。例えばペプチドの長さや電荷など様々なパラメータを変動させた上で、ナノポアの信号処理を行います。また、リポソームあるいはモータータンパク質と膜タンパク質を一体化させ、ナノポアでのアミノ酸の検出を行います。

4. 研究成果

本研究では、いまだに実現していないペプチド分子の網羅的解析技術の開発のためのリポソーム融合型ナノポアによるタンパク質の網羅解析基盤技術開発を目標としました。この開発の実

現によって生体内におけるペプチド分子の1分子レベルにおける同定のみならず、あらゆるタンパク質やその断片、さらにはタンパク質変異体のアミノ酸配列情報取得が実現し、あらゆる疾患対象(精神疾患、不妊、糖尿病、アルツハイマー、アレルギー、等)の個別疾患を診断する医療機器への展開が期待されます。

本研究の全期間において、まずナノポア測定に利用可能な膜チャネルタンパク質のうち、トランスロコンである SecYEG と分子モーターである SecA 複合体の選定を行い、人工脂質二重膜上で再構成を実現しました。その結果、膜挿入電流シグナルを検出し、さらに基質であるペプチド分子と ATP 存在下においてのみ、特徴的なナノポア電流波形を検出することに成功しました。現在では繰り返しアミノ酸配列を含む人工ペプチドに対する電流波形変化の検出を試みています。例えば特定の2つのアミノ酸の繰り返し配列やシグナル配列を用いた実験を試みています。

一方で課題は膜挿入効率の低さであり、これによって生じるシグナル検出頻度の低さにあります。これを克服するために、現在ではハイスループット超並列測定の実現及び、SecYEG タンパク質への変異導入を試みており、その結果、取得データ量の大幅な向上が見込まれ、解析による配列同定精度向上が期待できます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 R. Baba, H. Kabata, Y. Shirasaki, T. Kamatani, M. Yamagishi, M. Irie, R. Watanabe, M. Matsusaka, K. Masaki, J. Miyata, K. Moro, S. Uemura, and K. Fukunaga	4. 巻 1
2. 論文標題 Upregulation of IL-4 receptor signaling pathway in circulating ILC2s from asthma patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Allergy Clin. Immunol.,	6. 最初と最後の頁 299-304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacig.2022.07.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Kana, Nakajima Akira, Hori Shohei, Tanaka Yumiko, Shirasaki Yoshitaka, Uemura Sotaro, Irie Naoki	4. 巻 12
2. 論文標題 Whole-embryonic identification of maternal microchimeric cell types in mouse using single-cell RNA sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 n/a~n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-20781-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iizuka Ryo, Yamazaki Hirohito, Uemura Sotaro	4. 巻 19
2. 論文標題 Zero-mode waveguides and nanopore-based sequencing technologies accelerate single-molecule studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 n/a~n/a
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophysico.bppb-v19.0032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takumi Uchida, Hirohito Yamazaki, Ryo Iizuka, Sotaro Uemura
2. 発表標題 Development of a single-particle inclusions detection method by solid-state nanopore for miRNA in single exosome detection
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hikaru Nozawa, Hirohito Yamazaki, Ryo Iizuka, Rina Hirano, Tomoya Kujirai, Hitoshi Kurumizaka, Sotaro Uemura
2. 発表標題 A study on the structural dynamics of the nucleosome containing H2A.B using solid-state nanopores
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村宗太郎、山崎洋人、志甫谷涉、濡木理、上村想太郎
2. 発表標題 ナノポア計測によるCALHM2チャネルダイナミクスの解明
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎洋人、上村想太郎
2. 発表標題 フォトサーマル効果を活用した一分子ナノポア計測技術の創出
3. 学会等名 第82回 応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirohito Yamazaki, Sotaro Uemura
2. 発表標題 Photothermally enhanced single molecule nanopore sensing
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田匠、山崎洋人、上村想太郎
2. 発表標題 レーザー照射による固液界面でのリポソームの捕捉と破壊
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村宗太郎、山崎洋人、志甫谷涉、濡木理、上村想太郎
2. 発表標題 CALHM2をナノポアとして用いた多様なサイズの分子検出法の開発
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 日本化学会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 208
3. 書名 生体分子環境の化学	

〔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
研究協力者	塚崎 智也 (Tsukazaki Tomoya)		

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
---------	---------