

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19039

研究課題名（和文）生体分子認識型ナノポアによるバイオセンサと細胞機能制御

研究課題名（英文）Biosensors and control of cell functions using biomolecular-recognition nanopores

研究代表者

神谷 厚輝（Kamiya, Koki）

群馬大学・大学院理工学府・助教

研究者番号：70612315

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究によって、バレル構造をもつナノポアタンパク質群であるouter membrane proteinの一つのOmpGのストランド数を増減させることで、ナノポアタンパク質のポア直径を変えることに成功した。そして、改変OmpGナノポアにおけるDNA通過を人工細胞膜のパッチクランプにて観察した。ポア直径を大きくした改変型OmpGのほうが、野生型OmpGに比べ、分岐部分のDNA残基が長いT字型の二本鎖DNAが通過できることを明らかにした。無細胞タンパク質合成系時にリポソームを共存させると、OmpGやOmpAがリポソームに再構成され、ナノポアを形成してい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

ストランド数を増減させることでポア内のイオンの通過には、ポア内の水と接する部分のアミノ酸残基の電荷やかさ高さが重要な役割を果たしていることが分かった。改変型OmpGなどによって、分岐の長さが異なるT字DNAの検出に成功した。したがって、自由にポアサイズを設計できるようになると、様々な大きさの生体分子の検出が可能になる。

研究成果の概要（英文）：We created a modified OmpG that expands and truncates α -hairpins, allowing the generation of small or large nanopores compared to that of wild-type (WT) OmpG nanopores. We demonstrated the detection of various structures of DNA (branched DNA) depending on the nanopore size using OmpG WT or mutated OmpG nanopores. Insights into the changes in pore diameters will be crucial to form precise pore diameters for the detection of various types of single biomolecules and for sequencing DNA, peptides, and proteins. Next, OmpG and OmpA synthesized by a cell-free synthesis system were incorporated into nano-sized liposomes. The nanopore formation in the nano-sized liposomes was confirmed using a patch-clamp method.

研究分野：生体関連化学

キーワード：ナノポアタンパク質 リン脂質膜 バイオセンシング タンパク質改変 無細胞タンパク質合成系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノサイズの孔をもつ膜タンパク質をナノポアタンパク質という。ナノポアタンパク質は、ポアの大きさに依存してイオンや小分子を輸送する働きを持っている。人工細胞膜上にナノポア一分子存在していれば、人工細胞膜のパッチクランプにて、そのナノポア内を通過するイオンを電流値として計測できる。この原理を利用し、ナノポアを通過することが出来る大きさの生体分子の検出をすることが出来る。生体分子の検出法としては、ナノポア内に生体分子が閉塞すると、イオンが流れずに電流値が低下し、生体分子が完全に通過すると、電流値がもとの値に戻る。この原理によって、ナノポアによる長鎖 DNA シーケンスが実現している。二種類のナノポア形成様式が存在する。多くのナノポアが、膜上で多量体化しナノポアを形成する。この種類の代表的なナノポアであるヘモリシンは、六量体と七量体のナノポアを形成する。そして、六量体と七量体でナノポアの直径が異なる。一方、グラム陰性菌等の外膜に存在する 1 本のポリペプチド鎖から形成される バレル構造をもった outer membrane protein(Omp)がある。この Omp はナノポアを形成し、ストランド数によってナノポアの直径が異なる。この Omp は、イオンから糖までの物質を輸送することが可能である。また、1 本のポリペプチド鎖からナノポアが形成されるため、ヘモリシンのような多量体から形成されるナノポアよりも、ポア直径が揃うことが推測される。しかしながら、ヘモリシンのような多量体から形成されるナノポアよりも、Omp を用いたバイオセンシング研究は、あまり進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、Omp ファミリーの 14 本のストランドから形成される OmpG のストランド数を増減させ、OmpG ナノポアの直径がどのくらい変化するかを検討した。そして、そのナノポアでどれくらいの大きさの生体分子を認識できるかを検討した。大腸菌で発現させた OmpG は多段階の精製過程やリフォールディング作業が存在するため、非常に煩雑である。そこで、無細胞タンパク質発現にて Omp が正しいフォールディングで発現すれば良いと考えた。本研究では、無細胞タンパク質発現にて発現した OmpG や OmpA がどのような組成のリポソームに再構成されやすいかを検討した。

3. 研究の方法

1. 改変型 OmpG の発現とイオン透過

OmpG の任意の部分の 4 本の β ストランドを挿入・欠損させた DNA を遺伝子組換えにて作製し、大腸菌にて発現・精製を行い、改変型 OmpG を形成させた。そして、改変型 OmpG のフォールディング状態を、円偏二色性分光測定によって確認した。そして、改変 OmpG 1 分子のイオン輸送を人工細胞膜のパッチクランプ測定にて観察した。また、改変 OmpG のナノポアのポアサイズを確認するために、様々な分子量のポリエチレングリコール(PEG)を OmpG ナノポアに作用させ、人工細胞膜のパッチクランプ測定にて電流値の減少等を観察した。

2. 改変型 OmpG による様々な形状の DNA の検出

改変型の OmpG ナノポアに一本鎖 DNA, 二本鎖 DNA, 分岐構造をもった DNA が検出できるかを検討した。人工細胞膜に OmpG を再構成し、水溶液中に存在する DNA がポア内を閉塞する様子を電流値の減少から検出した。それぞれの OmpG ナノポアがどれくらいのかさ高い DNA まで検出できるかを検討した。

3. 無細胞タンパク質発現によって発現させた OmpA と OmpG の機能評価

表面電荷やアシル基が異なるナノサイズリポソームを共存し、無細胞タンパク質発現系によって OmpA や OmpG を発現させた。そして、リポソームに再構成されていない OmpA や OmpG を除去するためにショ糖密度勾配遠心によってリポソームを精製した。そして、リン脂質濃度をあわせて、SDS-PAGE を行うことで、タンパク質のバンドからリポソームへの再構成量を評価した。リポソームに再構成された OmpG や OmpA は人工細胞膜のパッチクランプによって、ポア形成の有無を判断した。

4. 研究成果

1. 改変型 OmpG の発現とイオン透過

野生型の OmpG, 改変型 OmpG として、 β ストランド数を 4 本増やした OmpG+4 β 、 β ストランド数を 4 本減らした OmpG-4 β の遺伝子を作製した。そして、大腸菌で野生型、改変型の OmpG を発現精製した。円二色性スペクトルの結果から、それぞれの OmpG は凝集していないことが明らかになった。そして、人工細胞膜のパッチクランプによって、それぞれの OmpG 一分子の電流値は、野生型の OmpG が約 130 pA, OmpG+4 β が約 150 pA, OmpG-4 β が約 110 pA と 160 pA であった。 β ストランド本数に比例して、電流値が大きくなった。しかしながら、OmpG-4 β の 1

つは、 β ストランド数を少なくしたにも関わらず、電流値が大きくなった。したがって、それぞれの OmpG のポア直径を概算する目的で、様々な分子量の PEG による OmpG ナノポアの閉塞の状況を確認した。ナノポアの直径よりも小さな直径の PEG は、ナノポア内に留まるため電流値が低下する。逆に、ナノポアの直径よりも大きな直径の PEG は、ナノポア内に入りこむことが困難なため電流値が変化しない。この PEG 実験から、 β ストランド数が多いほど、ナノポア直径が大きくなることが明らかになった。OmpG-4 β の 1 つが高い電流値を示した。これは、ポア内の水と接する部分のアミノ酸残基の環境が他の変異体と変わったからであると推測される。

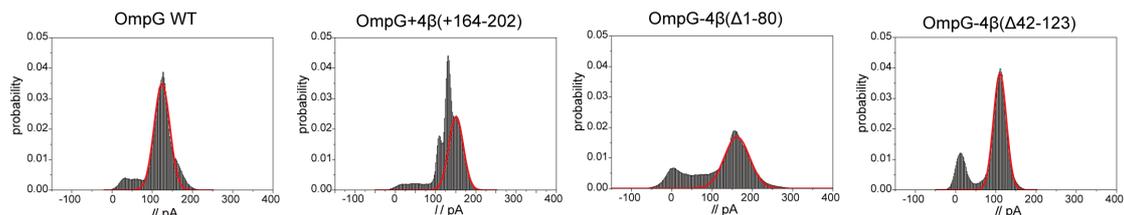


図 1 様々な OmpG 1 分子の電流シグナルのヒストグラム

2. 改変型 OmpG による様々な形状の DNA の検出

それぞれの OmpG ナノポアを透過できる DNA を検討した。1 分子の OmpG ナノポアの典型的な電流シグナルは、短く浅い電流阻害シグナルが存在する。1 本鎖 DNA や 2 本鎖 DNA を含んだ溶液で OmpG ナノポアのシグナルを計測すると、比較的長く深い電流阻害シグナルが観察された。印加電圧を +100 mV から +120 mV に上げると、この電流阻害シグナルの阻害時間が短くなった。この結果は、DNA が OmpG ナノポアを通過することが示唆された。2 本鎖 DNA までは OmpG ナノポアは通過可能であることが分かったため、T の字の分岐構造をもった 2 本鎖 DNA を設計した。分岐の長さを 4 塩基対、10 塩基対、15 塩基対とした。野生型 OmpG では、4 塩基対分岐まで顕著に阻害シグナルが観察された。一方、OmpG+4 β では、10 塩基対まで顕著に阻害シグナルが観察された。この結果は、PEG の実験による OmpG のポア直径の概算と一致している。したがって、DNA の構造の形状を様々な OmpG で認識できる。これらの研究をまとめ、ACS Applied Nano Materials に採択された。

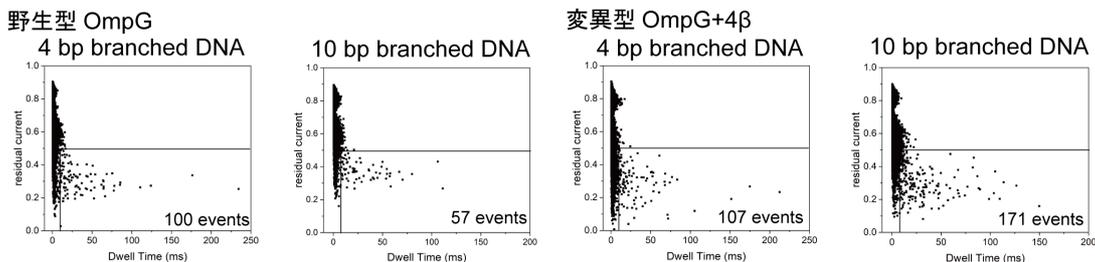


図 2 分岐型 DNA の OmpG ナノポアへの通過

3. 無細胞タンパク質発現によって発現させた OmpA と OmpG の機能評価

OmpG や OmpA を再構成させるリポソーム組成は表面電荷や膜流動性を考え、DOPC, DLPC, DOPE/DOPG, 大腸菌膜抽出リン脂質を用いた。これらのリポソームを含んだ状態で無細胞タンパク質発現系によって OmpA と OmpG を発現させた。そして、ショ糖密度勾配遠心で精製した後、リン脂質濃度を一定にして、SDS-PAGE にて OmpA と OmpG のバンドの濃さから再構成量を検討した。負電荷をもった DOPE/DOPG(7:3)と大腸菌抽出リン脂質によるリポソームでは、OmpA と OmpG の再構成量が高かった。次に、リポソームに再構成された OmpA や OmpG のポア形成を確認するため、OmpA や OmpG 再構成リポソームを平面人工細胞膜に膜融合させ、パッチクランプ測定を行った。その結果、大腸菌で発現・精製した OmpA や OmpG と同様な電流値を示した。したがって、無細胞タンパク質発現系で発現した OmpA や OmpG はリポソーム膜内でポアを形成することが確認された。これらの研究をまとめ、Scientific Reports に採択された。

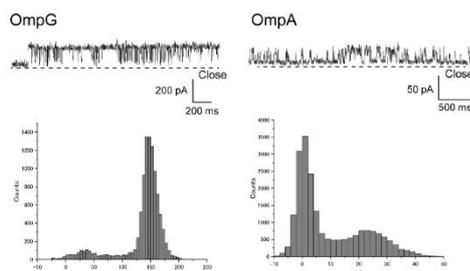


図 3 無細胞タンパク質発現系で発現した OmpG と OmpA から得られた電流シグナル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kamiya Koki	4. 巻 12
2. 論文標題 Formation and function of OmpG or OmpA-incorporated liposomes using an in vitro translation system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06314-4	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 Tosaka Toshiyuki, Kamiya Koki	4. 巻 5
2. 論文標題 Modified Outer Membrane Protein-G Nanopores with Expanded and Truncated -Hairpins for Recognition of Double-Stranded DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 6149 ~ 6158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsnm.1c04417	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Toshiyuki Tosaka, Koki Kamiya
2. 発表標題 INVESTIGATION OF ION PERMEABILITY OF MUTANT NANOPORE-FORMING PROTEIN FOR BIOLOGICAL SENSING USING A PATCH CLAMP METHOD OF THE ARTIFICIAL LIPID BILAYER
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 様々な大きさの生体分子検出を目指した改変型 バレルナノポアタンパク質の物質透過性の検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第43回研究会（CHEMINAS 43）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 ポアサイズ変換を目指した改変型 バレルナノポアタンパク質の検討
3. 学会等名 細胞を創る研究会 14.0
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 Investigation of pore diameter conversion of -barrel nanopore-forming protein by changing number of -strands
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 ストランド数を変化させた改変型 バレルナノポアタンパク質の物質透過性の検討
3. 学会等名 令和3年度 日本化学会関東支部群馬地区 研究交流発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 ストランド数変化による バレルナノポアタンパク質のポアサイズ変換と生体分子の検出
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豆生田葵衣、神谷厚輝
2. 発表標題 カスケード反応効率化のためのDNAを介した酵素複合体の作製
3. 学会等名 日本化学会 第102春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiyuki Tosaka, Koki Kamiya
2. 発表標題 DETECTION OF Y-SHAPED DNA USING MUTANT NANOPORE PROTEIN BY A PATCH CLAMP METHOD OF THE ARTIFICIAL LIPID BILAYER
3. 学会等名 The 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神谷厚輝
2. 発表標題 生体分子の再構成による人工細胞膜の機能化
3. 学会等名 立命館大学「生体膜・脂質研究の最前線」シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 ポアサイズが異なる改変型 バレルナノポアタンパク質を用いた様々な形状のDNA検出
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第43回研究会 (CHEMINAS 43)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 様々な形状のDNA検出のための ストランド数変化した改変型 パレルナノポアタンパク質の構築
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 ポアサイズを改変させた パレルナノポアタンパク質による物質輸送
3. 学会等名 細胞を創る研究会 15.0
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 改変型ナノポアタンパク質のポアサイズ変換と様々な形状のDNA検出
3. 学会等名 日本化学会秋季事業 第12回 CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 登坂俊行、神谷厚輝
2. 発表標題 ポアサイズ変化させた改変型 パレルナノポアタンパクのリポソームへの再構成法の検討
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

群馬大学 理工学府分子科学部門 神谷研究室
<http://kamiya.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index2.html>

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