

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2014

課題番号：25708024

研究課題名(和文) 巨大生体ナノポアを用いたタンパク質/DNAアプタマー複合体の一分子計測

研究課題名(英文) Single molecule detection of protein/DNA aptamer complex using giant biological nanopores

研究代表者

川野 竜司 (Kawano, Ryuji)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90401702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,800,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ加工技術を基盤に、液滴接触による平面脂質膜を再現性よく安定に形成する方法を確立した。この方法を用い、バイオセンシングのための持ち運び可能なポータブル脂質膜計測システムを開発した。5-30 nmのサイズのナノポアを平面脂質膜に再構成することに成功した。その巨大ナノポアを用い、従来のナノポアでは計測不可能であったサイズのタンパク質の一分子計測に成功した。またタンパク質/アプタマー複合体に関してチャンネル電流計測を行った。

研究成果の概要(英文)：We have developed stable lipid bilayer using droplet contact method. This method allows us to measure current signals of larger-sized nanopore proteins with the portable system. Using this system, we are able to measure a serine protease and a toxin protein with DNA aptamer using the large nanopore at the single molecule level.

研究分野：化学

キーワード：電気化学 一分子計測 チャンネル膜タンパク質 脂質二分子膜 マイクロ加工

1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面には、細胞内外の物質のやりとりを制御するチャンネルを持った膜タンパク質が多数存在する。膜タンパク質のチャンネルは一般的に数Åから数 nm のサイズであり、イオンだけではなく薬として作用する分子などの膜透過に深い関わりを持つ。これまで生物物理学や生化学といった分野において、チャンネル膜タンパク質の物理化学的な性質やその構造を明らかにするためにパッチクランプ法が用いられてきた。この方法により、チャンネルの上下に電圧を印可し、チャンネルを流れる電流を観測することで、チャンネルを流れるイオンや分子を定量的に測定できる。最近パッチクランプ法を応用し、人工脂質二分子膜に再構成した膜タンパク質のナノチャンネル内を通過する一分子を感度よく検出する方法が提唱されており、これはナノスケールのコールターカウンター法とみなすことができる。

コールターカウンター法は細孔電気抵抗法とも呼ばれ、溶液中の細胞やタンパク質などの微粒子を非破壊計測する方法である。電解質中の微粒子が濃度勾配や圧力勾配により細孔を通過するとき、微粒子の体積に応じて電流をブロックする。このときのブロッキング電流と、ブロックする時間を測定することにより、微粒子の体積や移動速度を得ることができる。コールター法は、他の粒度測定方法とは異なり、粒子を一個ずつ高速で測定し、かつ粒子の形状や、屈折率、色、密度などの影響を受けないことから、極めて精密な粒度分布測定が可能である。ではこの細孔をもっと小さくしたらどうなるのか。H. Bayley らは 1.5 nm の直径を持つチャンネル膜タンパク質 (α -hemolysin, α HL) を人工脂質二分子膜中に再構成し、チャンネルレコーディングを行うことに初めて成功した (*Nature* 1999)。この方法は非常に優れた高感度一分子認識法であり、さらに Bayley らは α HL を用いて光学異性体の一分子認識にも成功するなど (*JACS* 2006)、本手法の応用・展開が盛んになりつつある。また最近では一本鎖 DNA を α HL に通過させた時、A, T, G, C の塩基の構造差異によってチャンネル電流が変化する可能性が

あることから、生体ナノポアを用いた第四世代の DNA シーケンスとして注目を集めている。

これまで申請者もこの生体ナノポアを用いて DNA をはじめとする一分子の観測を行ってきた。例えば、ナノポアシーケンスに応用するため、DNA 一分子のチャンネル通過挙動を拡散係数や拡散の活性化エネルギーの算出から明らかにした (*JACS* 2010)。この生体ナノポア計測は、従来の一分子計測と比較して非破壊でかつ高い S/N 比のシグナルから分子の挙動を定量的に見積もることが可能であることから、新しい分析手法として大きな展開が期待できる。しかしながら、これまで生体ナノポアとしては α HL 以外のチャンネルはほとんど使われておらず、標的とする分子サイズと α HL のチャンネルサイズが合わないことが大きな問題であった。

我々はこれまで DNA アプタマーと小分子を複合化させ、複合化した DNA のシグナルを観測することで、 α HL ポアよりも小さな分子の一分子計測を試みている。コカイン分子の大きさは α HL ポアサイズと較べ小さいので、直接ブロック電流の計測はできない。そこでコカイン分子が特定の配列を持つ DNA と三次元複合体を形成することを利用し、その一分子のナノポア計測を行った。コカインアプタマー形成前の DNA は α HL チャンネルを通過するが、形成後はチャンネルサイズより大きな複合体になり末端の DNA がナノポアをブロックした状態になることから、この変化をチャンネルシグナルとした。その結果、ごく微量のコカイン分子 (300 ng/mL) をおよそ一分で計測することに成功した (*JACS* 2011)。これにより小分子の計測はアプタマーを用いることで可能になったが、 α HL ポアよりも大きな分子の計測は未だに難しい。そこで、本研究では、 α HL ポアよりも大きなペプチドチャンネルを用いて生体ナノポアによる一分子計測法を確立する。特にこれまでの知見を生かし、アプタマー抗体薬に応用できるタンパク質/DNA アプタマー複合体について計測を行う。

2. 研究の目的

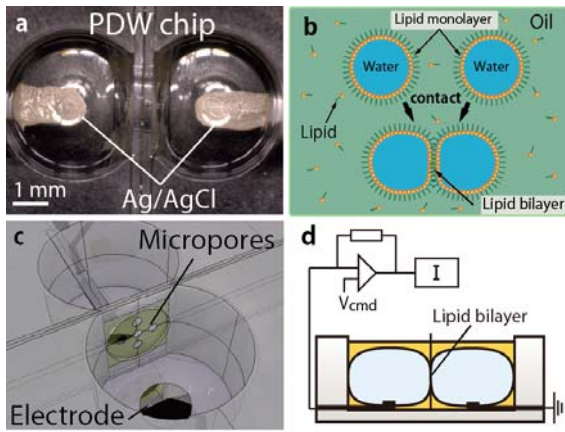


図 1 液滴接触法とそのデバイス。a)デバイス写真 (top view)。b)液滴接触による脂質二分子膜形成。c)液滴接触面の面積を小さくする。d)測定系の模式図。

本研究の目的は、生体ナノポアを用いたタンパク質/DNA アプタマー複合体の一分子計測を行うことである。生体ナノポア計測は一分子を定量的に、非破壊で計測できることから生体分子の高感度検出法として最近注目されている。しかしながら、これまでほとんどの研究が直径 1.5 nm のヘモリシンポアを用いて行われており、それよりも大きなサイズの分子、特にタンパク質などを測定することは難しかった。本研究では、ヘモリシンよりも巨大なサイズのナノポアを形成するチャンネル膜タンパク質、パーフォリン (PFN)、ストレプトリジン (SLO)、を平面脂質二分子膜中に再構成する。またそれらのチャンネルを用い、これまでヘモリシンポアでは計測できなかったサイズのタンパク質の一分子計測を試みる。さらに DNA アプタマーを組み合わせることにより選択的なナノポアセンシング技術へと展開する。

3. 研究の方法

マイクロ微細加工技術は微細な構造物を集積化するのに適しており、特に電子デバイスと相性がよい。これまで平面脂質二分子膜を簡便にかつ安定に作製し、そこにイオンチャンネルを再構成することで、チャンネル電流計測をスループット高く行うことが可能な人工細胞膜チップの開発に取り組んできた。

これを実現するために簡便にかつ再現性良く平面脂質二分子膜を形成可能な方法「液滴接触法」を提案している。この方法では、リン脂質を溶解させた有機溶媒に水滴を落とすと水滴の表面に脂質単分子層が自発的に形成する性質を利用している。この水滴を二つ用意し接触させると、脂質の単分子層も

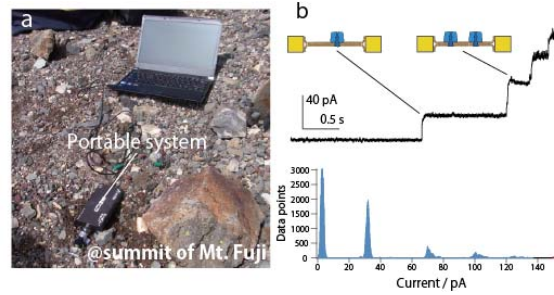


図 2 ポータブルチャンネル電流計測システム。a)富士山山頂での計測風景。b)富士山山頂でのヘモリシンチャンネル電流計測結果。

接触し、脂質二分子層になる。実際に形状を最適化した「8」の字型のウェルに脂質溶液、水滴、水滴の順に滴下する方法により、単純なピペット操作のみで脂質二分子膜を得ることができる (図 1)。

このシステムを用い、ナノポアのチャンネル電流計測を行う。特に本研究ではその場計測を目指し、ポータブルシステムでのチャンネル電流計測を試みた。

4. 研究の成果

液滴接触法は、脂質溶液に水溶液を滴下するだけで簡便、再現良く脂質二分子膜を作製できる。その技術を基盤に、液滴同士を機械的に接触分離することで、二分子膜を高速に形成する方法を開発した。液滴同士の接触・分離をメカニカルな機構により行えるようマイクロデバイスを設計、作製し、回転運動により脂質二分子膜の高速作成を実現した。また液滴接触法デバイスをアイレ化することで、ハイスループットでのイオンチャンネル計測に成功した。

ポータブルシステムによるチャンネル膜タンパク計測のため、液滴接触法で膜形成を行うチップを小型化し、ハンドヘルドのパッククランプアンプに実装した (図 2)。これを USB によりノート PC と接続することで、持ち運び可能なシステムとした。本システムを屋外に持ち出しヘモリシンを用いたナノポア計測を行ったところ、屋外においても十分に計測が可能であることが明らかとなった。

PFN、SLO どちらのチャンネル膜タンパク質に関しても、脂質膜に再構成するためには特定の条件を探索する必要がある。そのために脂質組成、脂質以外の膜添加物、バッファ溶液組成に関してそれぞれ検討を行ったところ、どちらのポアに関しても接触法で作製した平面膜においてポアを形成させることに成功した。

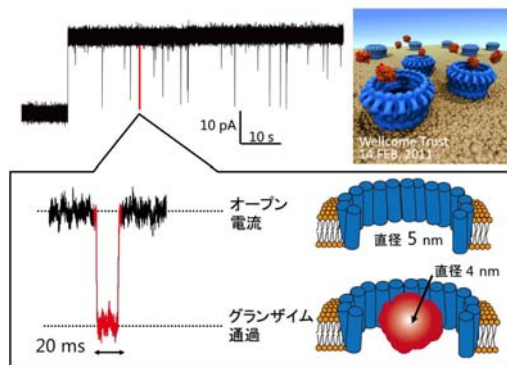


図3 平面脂質二分子膜中に再構成したパーフォリンナノポアによる、グランザイムの一分子検出。

得られたチャネルコンダクタンスと、既報の理論式（ヒルの式、ギルバートの式）を用い、ポア直径を見積もった。その結果、PFNに関しては3~8 nm、SLOに関しては、10~30 nmの直径を持つナノポアを形成していることが明らかとなった。更に結晶構造から得られたモノマー分子のサイズから、多量体化モデルを作製し、得られたポアサイズと分子サイズからいくつのモノマーが会合してポアを作っているのかに関し推定を行った。その結果、PFNに関してはおよそ6~20量体程度の会合数でポア形成を行っており、SLOに関しては、およそ10~40量体を形成していることを実際にポアを流れるイオン電流から明らかにすることができた。

次にヘモリシンポアでは計測不可能なサイズの水溶性タンパク質に関し、PFNナノポアを用い一分子計測を行った。標的としたタンパク質はアポトーシス誘因セリンプロテアーゼ（グランザイムB）で、直径約5 nmである。このグランザイムBに関し、PFNを平面脂質膜に再構成し、チャネル電流計測を行ったところ、グランザイムBのチャネル通過に起因する阻害電流が観測できた（図3）。

この結果を基盤に、腸管毒の原因タンパク質エンテロトキシンとそのDNAアプタマーに関し巨大ナノポアでの一分子計測を試みている。現在エンテロトキシン/DNAアプタマー複合体を作製しSLOを用いその阻害電流計測を行っており、ヘモリシンよりも大きなサイズのナノポアによる選択的一分子計測に展開している。

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5件）

【原著論文】（査読付き）

1. R. Kawano, Y. Tsuji, K. Kamiya, T. Kodama, T. Osaki, N. Miki, S. Takeuchi “A Portable Lipid Bilayer System for Environmental Sensing with a Transmembrane Protein” *PloS ONE*, **2014**, 9(7): e102427.
2. †Y. Tsuji, †R. Kawano, T. Osaki, K. Kamiya, N. Miki, S. Takeuchi “Droplet Split-and-Contact Method for High-Throughput Transmembrane Electrical Recording” *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 10913-10919. (†equal contribution)
3. R. Kawano, Y. Tsuji, K. Sato, T. Osaki, K. Kamiya, M. Hirano, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi “Automated Parallel Recordings of Topologically Identified Single Ion Channels” *Sci. Rep.*, **2013**, 3: 1995.

【国際学会紀要】（査読付き）

4. H. Watanabe and R. Kawano “Extend The Size of Biological Nanopore Using Magainin and Perforin Pores” *Proceedings of MicroTAS 2014*, 2125-2127.
5. L. Zaleha, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, “Micro-scale droplet contact method by mechanical motion: reproducible and robust lipid bilayer formation” *Proceedings of MicroTAS 2013*, 1433-1435.

〔学会発表〕（計5件）

1. R. Kawano “Stable lipid bilayer formation using microfabrication and its applications” 2nd CMS international symposium (invited), Jan. 20 2015, Kyusyu Univ. (Fukuoka).
2. R. Kawano “Lipid bilayer microarray analysis of membrane permeabilization by antimicrobial polymers” 2nd International symposium on Fusion Materials (invited), Nov. 2 – 4 2014, Univ. of Tokyo (Tokyo).
3. H. Watanabe, R. Kawano “Extend the size of biological nanopore using magainin and perforin pores.” The 17th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences, Oct. 26 – 30 2014, Texas USA.
4. 渡辺寛和、川野竜司 「マガイニンとパーフォリンを用いたナノポアのサイズ拡張とナノポアセンシングへの応用」第4回CSJ化学フェスタ2014年10月14

日～16日、タワーホール船堀（千葉）

5. L. Zaleha, Ryuji Kawano, Toshihisa Osaki, Koki Kamiya, Norihisa Miki, Shoji Takeuchi, “Micro-scale droplet contact method by mechanical motion: reproducible and robust lipid bilayer formation”, Micro TAS 2013, October 29, 2013 Freiberg Germany.

〔図書〕（計1件）

1. 川野竜司 “ナノポア計測：膜タンパク質ナノポアを用いた電気化学的一分子認識”, *Chemical Sensors*, **2014**, Vol. 30 No. 4, 46 (pp.132-138).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

川野 竜司 (KAWANO RYUJI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：90401702