

令和元年6月10日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19138

研究課題名(和文) ナノポアプローブ：チャンネル膜タンパク質のナノ空間を利用したナノ環境計測

研究課題名(英文) Nanopore probe: nano-environment measurement using namespace of a channel protein

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では約1.4 nmのナノポアを形成する膜タンパク質のポア内ナノ空間において、一分子が運動する様子を電気生理的に観測することで溶液中の粘性という考え方がナノ空間ではどのように捉えられるかに関して検討を行った。その結果、ナノ空間での粘性はバルク中とは異なる考え方が必要であることがわかった。またナノ空間内でのホフマイスター系列はバルクと異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ空間内での一分子の振る舞いの理解は、生体内での酵素反応などの制限された空間で起こる現象を考える上で役に立つ。本研究では、ナノポアタンパク質の内部のナノ空間内で外部溶液の粘性を変化させたときにナノ空間ではどのような変化を見せるのかについて検討を行い、粘性を発現する基になる相互作用の種類がナノ空間では大きな影響を及ぼすことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Alpha-hemolysin, which is a pore-forming toxin, has 1.4 nm pore in the lipid bilayer. We introduced single hairpin DNA into the pore and observed the movement at the single molecule level. This movement can reflect the state in nano-space, and we attempted to reveal a viscosity effect in the nano-space using glycerol and PEG.

研究分野：マイクロ分析化学、生物物理

キーワード：ナノポア 脂質二分子膜 マイクロ流体

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。最近チャネル型の膜タンパク質を用いたナノポア計測が新しい一分子計測法として提唱されている。ナノポア計測は平面脂質二分子膜に再構成した膜タンパク質のナノチャネル内を通過する一分子を感度よく検出でき、これはナノスケールのコールター法とみなすことができる。これまで我々は、脂質二分子膜中に約 1.4 nm のナノポアを有す α HL という膜タンパク質を再構成し、そのイオン流を電気シグナルの形で計測してきた。特にこのナノポアを通過する一分子の挙動に注目して研究を行っている。この一連の研究を推進する中で、短鎖のヘアピン DNA (hpDNA) が α HL ポア中に留まり運動し一分子レベルでその運動を電氣的に観測可能であるという報告 (NAR2003) から、これを応用すればナノ空間内の溶液環境の計測が可能ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、チャネル膜タンパク質のナノ空間を利用し、単一に制限されたナノ空間内の物質の物理化学的振る舞いを観測可能な手法について構築を行う。ナノ材料は幅広い分野で応用展開されており、特にナノ空間水溶液中の物質の振る舞いに関する知見は、分離膜などのエネルギー分野、ドラッグデリバリーシステム (DDS) などのバイオ分野で重要である。ナノ空間で実際に起きている物理化学的現象を観測する手法はいくつかあるが、これまでではどれも単一の空間ではなくナノ空間集合体 (バルク) の観測結果から一つのナノ空間内の現象を見積もっている。近年限定されたナノ空間内の観測手法がいくつか報告されているが、例えばカーボンナノチューブ内の水分子の移動を低真空電子顕微鏡で観測するなど大掛かりな実験系を必要としている。最近我々は、チャネル膜タンパク質を流れるイオン電流を一分子レベルで計測可能なナノポア計測の手法を応用することで限定ナノ空間内の様子を電氣的に観測する方法を考案した。 α -hemolysin (α HL) はおよそ直径 2 nm x 5 nm のナノ空間を有すマッシュルーム型の膜タンパク質である。10 塩基対のヘアピン DNA (hpDNA) はこのマッシュルーム状の形をした α HL ナノポアの上部の空間 (vestibule) にちょうど収まり、電圧印加条件下でその空間に留まり分子運動をする (図 1a)。このナノポア内にトラップしたヘアピン DNA (hpDNA) の分子運動の解析からナノ空間内の物理化学的性質、特に粘性と水和の状態について直接観測する方法を構築できるのではないかと考えた。これまでこのサイズの単一ナノ空間内の現象を定量的に観測した例はなく、本研究で得られた知見は物理化学的興味のみならず、生体分子の限定空間での性質を明らかにできることから、ナノ材料設計、創薬、DDS 等の幅広い分野で役立つと考えている。

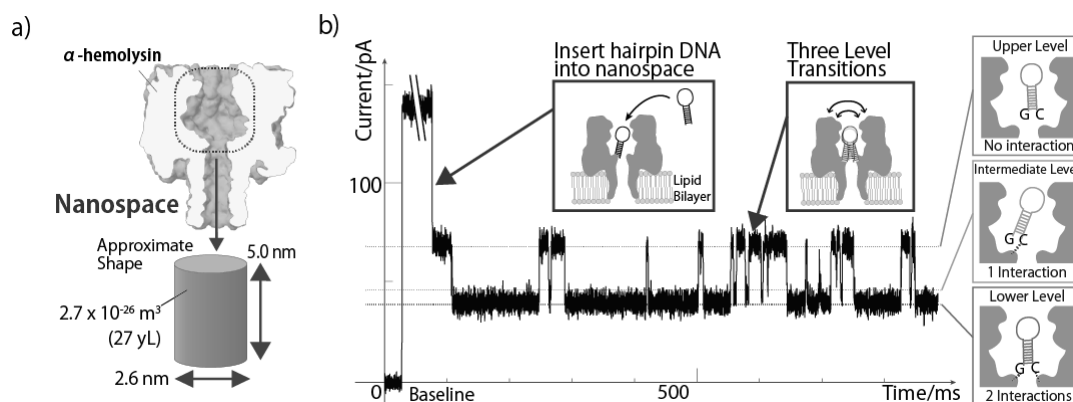


図 1 a)チャネル膜タンパク質のナノ空間を利用(体積:ヨクトリットル)。b)膜タンパク質ポアに入った hpDNA がナノ空間内で運動し、この 3 状態の運動を一分子レベルでイオン電流値として観測できる。本課題ではこれをナノプローブ法として測定法を確立し、ナノ空間における溶液の粘性や溶媒和の影響を調べた。

3. 研究の方法

これまでの予備検討により hpDNA のポア内での運動をチャンネル電流計測から一分子レベルで観測することに成功し (図 1b)、粘性の及ぼす影響がバルク溶液とナノ空間で異なる知見を得ている。hpDNA は熱運動、印加電圧、イオン輸送など複数の要因を駆動力にしてポア内で運動をしていると考えられる。この時の運動を詳細に解析すると、3 種類の異なる阻害電流が観測でき、これらは hpDNA の異なる 3 状態を反映している。ごく最近我々は溶液の粘性を変化させるとこれらの状態も変化することを見出し、この 3 種類の状態はポア内の物理化学的要素を反映したものになることが強く示唆された。そこで本研究では、

(1) グリセロール (水素結合) とポリエチレングリコール (高分子の絡み合い) という粘度は同じであるが異なる粘性溶液を用いたナノ空間内での粘性効果

(2) ナノ空間内における水和状態関するホフマイスター系列の検討

に関して研究を推進する。このナノ空間内で運動する hpDNA をプローブとして周りの溶液環境の物性を観測する新たな方法論を確立する。

4. 研究成果

(1) のナノ空間粘性に関して得られた成果を述べる。増粘剤として低分子のグリセロールと高分子のポリエチレングリコール (PEG) を用い、バルクにおける粘性とナノポア内で運動する hpDNA の運動状態を比較した。その結果、グリセロール溶液ではバルクで観測される粘性率が高くなるにつれて hpDNA の分子運動の低下が見られたが、PEG を用いた場合は、この運動の定量が低かった。

これは増粘剤であるグリセロールと PEG の粘性を原因となる相互作用の様式が異なるからであると考えた。グリセロールでは水素結合により分子間に相互作用が働き、マクロな視点では粘性率として観測される。一方で、PEG は高分子同士の絡み合いが主な粘性率の原因であると考えた。ナノ空間においては、低分子であるグリセロールはポア内に十分分配され、水素結合性の相互作用によりバルク溶液の粘性と相関する分子運動が見られた。対照的に、PEG では分子量が大きいため十分にナノ空間内に入り込めず、また制限された空間のため高分子鎖同士の絡み合いも不十分であるため、hpDNA の分子運動の低下が抑えられたと考えている。

(2) のホフマイスター系列の研究成果について述べる。ホフマイスター効果はタンパク質の溶解度への塩の影響として知られている現象であり、これまでその強度の順序がホフマイスター系列として報告されている。この効果はタンパク質の凝集や変性だけでなく、酵素活性などの分子レベルでの現象においてもその影響が報告されており、ナノスケールでの現象理解が必要である。このメカニズムについて近年いくつかのモデルが提唱されており、それによりホフマイスター効果はタンパク質分子と水分子の界面での現象に起因することが明らかになりつつある。異なるイオン種 $N(CH_3)_4Cl$, KCl , $LiCl$, $MgCl_2$, $KHPO_4$, KBr を用いたチャンネル電流計測において、それぞれのイオン溶液で hpDNA が運動する様子を観測できた。

カチオンを比較したところ、状態の遷移頻度は、 KCl を用いた場合に比べて、 $LiCl$ を用いた時は速く、 $N(CH_3)_4Cl$ を用いた時は遅くなった。この傾向はホフマイスター系列と同様である。一方で $MgCl_2$ を用いた場合は遅くなり、ホフマイスター系列には従わない結果となった。また、UL の占める割合は $MgCl_2$ の時最も多く、 $N(CH_3)_4Cl$ の時最も多かった。この結果もまたホフマイスター系列と一致した。これらの結果により、ホフマイスター系列の右側のカチオンを用いた場合 hpDNA の運動性は増大し、左側のカチオンを用いた場合には減少すると考えられる。また、アニオンではカチオンと異なる傾向が確認できた。ナノポアプローブを用いた計測から得られたホフマイスター系列は次のようになった。

Anion: $N(CH_3)_4^+ > K^+ > Li^+ > Mg^{2+}$

Cation: $HPO_4^{2-} \cong Br \cong Cl$

また、イオン濃度を増加させることで、hpDNA の動きが活発になることが分かった。高イオン濃度状態では αHL と hpDNA の間の水素結合が断たれ、hpDNA の動きが活発になると考えられる。このことから、ナノポア内での水素結合ネットワークの強さがイオン種によって変動していることが示唆された。

当初の研究計画にはなかったが、本研究を進めて行くうちに、このナノポアタンパク質を用いたナノ空間探索プローブに空間分解能を付与するため、ナノニードル上に構築することを着想した。今回米国のグループとともに金ナノニードルを作製し、その先端に脂質二分子膜を形成し、ナノポアタンパク質を再構成することでナノポアプローブの再構成を試みた。その結果 α HL のポア形成シグナルが確認でき、空間分解能を有するナノポアプローブの実現可能性が示唆された。本成果は 2019 年に *ACS Nano* 誌に報告した。今後は実験のセットアップや脂質膜の組成を見直し、空間分解能を有する走査型のナノポアプローブの構築を目指す。

5. 主な発表論文等

1. Kan Shoji, Ryuji Kawano, and Ryan J. White “Spatially Resolved Chemical Detection with a Nanoneedle-Probe-Supported Biological Nanopore”
ACS Nano, **2019**, 13(2), 2606-2614, DOI :10.1021/acsnano.8b09667

〔雑誌論文〕（計 1 件）

〔学会発表〕（計 3 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://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。