

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：82704

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655072

研究課題名(和文) 膜タンパク質チャンネル/金属錯体ナノ孔複合システムを用いた一分子計測

研究課題名(英文) Single molecule detection using Biological/MOP nanopore system

研究代表者

川野 竜司 (Kawano, Ryuji)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号：90401702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ナノポア計測では、脂質二分子膜中に形成したチャンネル膜タンパク質を通過する分子を電気的に計測する。しかしこれまで主に直径1.4 nmの細孔を有するヘモリシンという膜チャンネルが用いられてきたが、これを用いたナノポア計測では、チャンネルサイズより小さい分子の検出に課題があった。そこで本研究では構造を自由に設計できる配位高分子をヘモリシンと複合化することで、サイズ制御可能なナノポア計測を提案する。本研究の結果、1) 水溶液中で構造が安定なRhMOPの合成、2) RhMOPとヘモリシンの複合化、に成功した。現在のところ、この複合化を確率的に行っているため、今後複合化の能動的制御を目指す。

研究成果の概要(英文)：This project proposes a strategy for single molecule detection using a synthetic metal-organic cage embedded into a channel protein. A single molecule detection based on biological nanopore, such as pore-forming proteins, has been studied as a high sensitive biosensor. However, the size of the biological nanopore is difficult to control because of their inherent structure. In this study, we synthesized metal-organic polyhedra which had ~ 0.6 nm nanopore as a nanocage, and we successfully integrated this synthetic nanopore with an α -hemolysin (biological) nanopore.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合科学・分析化学

キーワード：脂質二分子膜 膜タンパク質 MEMS 金属錯体 配位高分子 一分子計測 MOP

1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面には、細胞の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 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、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様々な研究が行われてきた。特にチャネルの上下に電圧を印可し、チャネルを流れる電流を観測するパッチクランプ法が広く用いられている。最近パッチクランプ法を応用し、人工平面脂質二分子膜内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する方法が提唱されている。この方法では主に、直径 1.4 nm のチャネルを有するアルファ-ヘモリシンという膜タンパク質が用いられている。これまで我々もこの 1.4 nm のナノチャネルを用いて DNA をはじめとする一分子の観測を行ってきた(R. Kawano et al. *Langmuir* 2009, *J. Am. Chem. Soc.* 2010) が、目的とする分子サイズと膜タンパク質のチャネルサイズが合わないことが大きな問題であった。

2. 研究の目的

創薬や生体診断に用いる場合、検出のターゲットとなる薬効を示すような有機分子のサイズは 1 nm よりも小さくチャネル電流変化の検出が困難である。そこで本研究ではサブナノ孔の大きさを自由に制御でき、かつ有機合成的に水素結合性などの分子認識部位の導入が可能な金属錯体ナノ孔を膜タンパク質と組み合わせることにより、精密な一分子認識システムを提案する。

金属錯体は金属イオンと所望の構造に錯形成するように設計された有機配位子を組み合わせることで、自由に構造設計が可能

である。特にかご状の金属錯体はその中心にサブナノから数ナノメートルの空孔を有し、有機配位子の長さを変えることでナノ孔のサイズを自由に制御できる。さらに有機配位子には有機合成的手法を用いることで、様々な置換基の導入が可能であり、特定の分子構造を特異的に認識する相互作用部位を戦略的に統合することができる。しかしながら、金属錯体を脂質膜に埋め込むことは困難であるため、本研究ではチャネル膜タンパク質(生体ナノポア)との複合化によりこれの解決を目指した。

3. 研究の方法

具体的な研究方法は、1)水溶性のかご状金属錯体の合成、2)水溶性かご状金属錯体の人工細胞膜(平面脂質二分子膜)への埋め込み、の2点に関して行った。

1)では一般的に金属錯体は水に溶けにくく、また配位結合を有する錯体は水溶液中で分解することが多い。そこで本研究では Rh を中心金属とした安定な MOP (metal-organic polyhedra)合成を試みた。2)ではこれまで我々は生体ナノポアを解析するための脂質二分子膜アレイを、MEMS 技術を用いて作製してきた。とくに液滴接触法と命名した安定性、再現性の良い脂質膜形成法は、種々の生体ポアの再構成を効率的に行うことができ、本研究でもこれを用いた。

4. 研究成果

研究成果として、1)水溶性かご状金属錯体の合成、2)水溶性かご状金属錯体とヘモリシンチャネル(生体ナノポア)の複合化、について報告する。

1) 水溶性かご状金属錯体の合成

水溶液に溶解し、且つ~1 nm 程度の直径の細孔を有する分子として我々は MOP を選択した。MOP 分子は金属原子に有機の配

位子が配位結合で接続され、およそ直径 ~ 0.6 nm 程度の細孔を有することが知られている。これまで中心金属に Cu を用いたものが一般的に合成されているが、CuMOP は水中で配位結合が切断され構造を保つことができない。そこで本研究では、中心金属にロジウムを選択し、配位子として 1,3-benzenedicarboxylate (BDC) を用いてサブナノメートルの細孔を持つかご状金属錯体 RhMOP, $[\text{Rh}_{24}(\text{OH m-BDC})_{24}]$ (RhMOP-OH) の合成を試みた。種々の合成条件を検討した結果、RhMOP の合成に成功し、X 線結晶構造解析の結果から、直径 0.4 -0.6 nm の細孔の形成が確認できた。さらにこの RhMOP は水溶液、バッファー溶液中でも構造を保持できることがわかった。

2) 水溶性かご状金属錯体とヘモリシンチャネル (生体ナノポア) の複合化

-ヘモリシンは黄色ブドウ球菌の毒素であり、分子量 32 kDa のモノマーが細胞膜中で自己集合しおよそ直径 1.4 nm のポアを開け細胞溶解を引き起こす。このヘモリシンの構造はβバレル部分が膜を貫通し、膜外部分におよそ 3 nm マッシュルーム型の構造を作る。我々は RhMOP 分子自体の直径がおよそ 2.5 nm であることに着目し、ヘモリシンのマッシュルーム型の頭部分と RhMOP 分子のサイズ適合性があるのではないかと予想し、検討を進めた。実際の実験はパッチクランプアンプを用いた一分子電流計測法で行い、一分子のヘモリシンチャネルが脂質膜にポアを形成するとポアサイズに応じたイオン電流が観測された。そこに RhMOP を入れるとイオン電流が大幅に減少した。これはヘモリシンチャネルに RhMOP が複合化し、チャネルサイズが小さくなることから流れるイオン電流も減少したと考えられる。現在のところ RhMOP とヘモリシンチャネルの複合化は確率的に起こっているが、印加電圧を変えることで

複合化効率が上がるというデータがとれてきている。今後外部要因によりこの複合化の制御を試みる。

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 2件)

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” *Scientific Reports* **2013**, 3: 1995 | DOI: 10.1038/srep01995. (査読あり)

R. Kawano, S. Furukawa, D. Kiriya, T. Osaki, S. Kitagawa, S. Takeuchi “Synthetic Nanocage Formed by Rhodium-Organic Cuboctahedra: For Single Molecule Detection in Lipid Bilayer” *Proceedings of IEEE Transducers* **2013**, 1, 416-417. (査読あり)

[学会発表](計 1件)

R. Kawano, S. Furukawa, D. Kiriya, T. Osaki, S. Kitagawa, S. Takeuchi “Synthetic Nanocage Formed by Rhodium-Organic Cuboctahedra: For Single Molecule Detection in Lipid Bilayer” *The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)* at Centro de Convenciones Internacional de Barcelona (CCIB), 2013年06月16日~2013年06月20日.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~rjkawano/>

6．研究組織

(1)研究代表者

川野 竜司（KAWANO, Ryuji）

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・

人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号：90401702

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

古川 修平（FURUKAWA, Shuhei）

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准

教授

研究者番号：90452276