

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750171

研究課題名(和文) ナノポアによる1分子糖鎖高分子の分岐構造分析法開発

研究課題名(英文) Single molecule branch structure analysis of glycopolymers using nanopore

研究代表者

武政 誠 (Takemasa, Makoto)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・客員研究員

研究者番号：30318795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：高分子の分岐構造を1分子単位で分析する手法をナノポアを利用して開発した。電解質水溶液を満たしたセルを、計測対象の分子断面径よりも少しだけ大きな細孔(ナノポア)を有する薄膜で2分割し、計測対象分子がナノポアを通過する際のイオン電流変化を計測する事により、コールター原理を用いて1分子内の分子断面径を得た。ナノポアを多糖類等の糖鎖関連高分子に対して本研究で初めて適用し、直鎖状、および分岐を有する糖鎖高分子に対して1分子単位での検出、断面積評価を可能にした。また、1分子内の構造、例えば折り畳み構造や分岐構造の一部評価も可能となった。

研究成果の概要(英文)：An analysis system for branch structure of single molecule glycan and polysaccharide was developed using a nanopore, nano-scale version of Coulter counter. Translocation of polyelectrolyte glycans through a small pore fabricated on thin membrane, whose size is comparable to the diameter to the molecule, induces a pulse-shaped current change signal corresponding to each molecule. Current pulses, ascribed to the translocation of each linear polysaccharide molecule, were observed for polysaccharides. It was shown that the resolution in the cross-sectional area is high enough to distinguish of one glucose unit in the single molecule, and branch structure information was obtained. This analysis technique is promising not only for glycans but also for branched polymer in more general.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ナノポア 多糖類 分岐高分子 1分子 デキストラン

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、糖たんぱく質や多糖類に代表される生体内で情報や機能を担う重要な分子であり、第三の生命鎖とも言われる。蛋白質の過半数は糖蛋白質、つまり側鎖として糖鎖が結合しており、分岐構造を有する分子構造となっている。一方、多糖類の多数、特に植物由来の多糖類も分岐構造を有する事からも、分岐構造は糖鎖高分子の基本的な構造と言える。高分子の分岐構造解析は、様々な手法が開発されてきたものの、いずれも多数分子の平均構造を解析する手法となっている。前述の糖たんぱく質や多糖類のように、原理的に1分子毎に異なる分岐構造を有し、また各分子の構造が機能に直結する場合には、平均構造の解析では不十分であり、1分子単位での分岐構造解析が望まれていた。

既存の高分子を対象とした分岐構造解析手法では、感度が不足しており1分子単位での分岐構造の解析は不可能である。また、低分子の糖鎖の解析方法についても、多数分子の平均構造を対象とするため、高分子の糖鎖1分子に対する分岐構造解析としては利用できない。

そのため、構造と機能の相関を明らかにする事ができず、言い換えると糖鎖高分子の機能の詳細が不明のまま、機能制御や糖鎖高分子を資源として十分に活用する事もできない状況が続いてきた。

2. 研究の目的

糖鎖高分子の分岐構造を1分子単位で解析する手法開発を行う。既存の分析手法では、高分子の分岐構造は多数分子の平均構造としてしか分析できず、またその場合でも構造のごく一部しか分析できない。しかし、糖蛋白質や多糖類などの天然の生体高分子は、1分子毎に異なる分岐構造を有し、その分岐構造が生体機能に直結するため、分岐構造分析法の開発が切望されている。本研究で、分岐高分子の中でも特に「糖蛋白質」及び「多糖類」に代表される糖鎖高分子の分岐構造を対象として、ナノポア(薄膜に形成した数nm径の穴)を利用した1分子分岐解析法を開発する。

3. 研究の方法

高分子を1分子毎に構造解析を行うために、主鎖に沿って末端から断面積を精密に評価する手法(コルター原理)を利用した。分子の断面積よりも僅かに大きな細孔(直径数nmの穴、ナノポア)が開いた薄膜の両側に電解質水溶液(KCl水溶液等)を満たして、両区画間に、一定電圧を引加する。両区画間に流れる電流をモニターすると、ほぼ一定の電流が観測される。これは、ナノポアを経由して流れるイオン電流(K^+ や Cl^- の移動)に起因する。セル内に電解質高分子が存在し、両区画間に引加された電圧

による電気泳動により、電解質高分子もナノポアを経由して反対側の区画へと移動する。その際にイオン電流が一時的に低下し、パルス状の電流変化が生ずることがDNAやタンパク質に対して報告されている。これは、電解質高分子がナノポアを通過中はナノポアの断面積の一部が、電解質高分子により遮断されるため、イオン電流が部分的に遮断される事に起因している。

分岐高分子が通過する際には、分岐構造を反映した特徴的な電流変化が観測されると期待された事から、本研究では、コルター原理をナノスケール化し、糖鎖高分子に応用する事で、分岐構造解析に利用した。

ナノポア式1分子内形状計測においては、断面積方向の分解能は十分に高いが、主軸側に沿った長さの分解能は、断面積に対して10~100倍程度劣る事がDNA等での計測において報告されており、高分解能1分子計測においては、主軸方向の分解能の改善が望まれていた。本研究では、圧電スキャナーを利用して1分子の位置を精密に制御する事で、分子の通過速度を低下し、また制御しながら分子の断面積を評価する事にも取り組んだ。

4. 研究成果

ナノポアを利用した1分子計測法の開

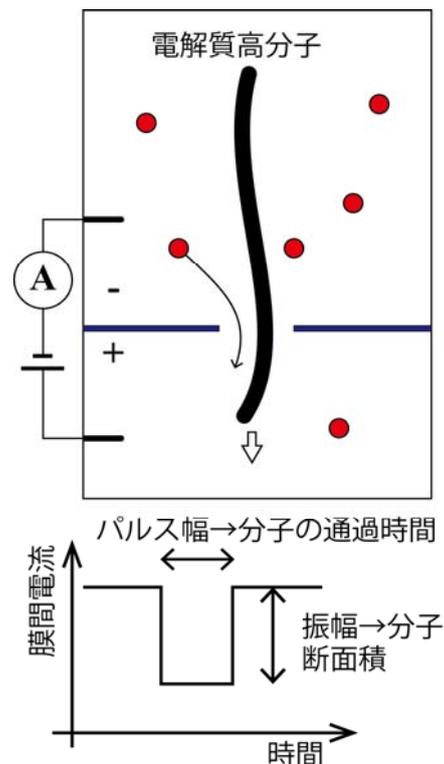


図1 (a)ナノポアを通過する高分子は、ナノポアの断面積を部分的に遮断するため、低分子イオン(図中赤●)に起因する膜間電流を一部遮断する。つまり膜間電流から、ナノポアを通過する分子の断面積変化を検出する事が可能になる(コルター原理)。(b)膜間電流の計測例。振幅はナノポアを通過した分子の断面積を、パルス幅は分子の通過時間を反映する。

発に取り組み、特に糖鎖高分子を対象として1分子計測が可能なる事を初めて実証した。分岐構造についても一部の試料については情報を得る事が出来、従来の分析手法では不可能であった糖鎖、特に高分子糖鎖に対する1分子分析手法としての将来性に期待が持てる結果が得られた。

過去に報告された、DNA やタンパク質を計測対象としたナノポア利用研究の大半は、ナノポア作成法として膜たんぱく質を利用している。糖鎖、特に分岐を有する糖鎖の場合では分子の断面積が大きいために α -hemolysin などの膜たんぱく質の穴を通過する事ができず、これらのナノポア関連技術を利用する事ができなかった。そこでもう一つのナノポア作成技術と言える、半導体微細加工技術を応用して作成した固体ナノポア(シリコン/窒化シリコン製)を利用して本研究で実験を行ったところ、窒化シリコン基板やナノポア壁面に対する試料の吸着などの問題を克服して1分子計測が各種糖鎖高分子に対して実施可能である事を確認した。

この固体ナノポアを利用した分析が膜タンパク質等のナノポアに対する利点として、ナノポア径を自在に調整できる点あげられる。2nm~50nm 程度の範囲では、分析対象となる分子の断面積径に応じて、ナノポア径を分子径よりもわずかに(2~3nm 等)に大きい穴にする事も容易である。また、多種多様な溶媒条件(pH, 温度, 溶媒種等)に対する耐性が高いために、実験をより幅広い条件で実施可能である点も重要となる場合があった。

直鎖状高分子、例えば carrageenan 類や pullulan などを図1のセルの片側に添加してナノポア経由の電流を記録したところ、一定振幅のパルスが多数観測された(図2a)。この電流は主にナノポアを通過する低分子イオン(K^+ 等)によって支配されるため、電流の落ち込みはナノポアを通過中の分子が、ポアを遮断した断面積に比例していると考えられる。つまり、パルス振幅が一定となったのは、通過した分子の断面積が一定であった事を意味する。長時間のデータを蓄積して多数のパルスを解析すると、電流のヒスト

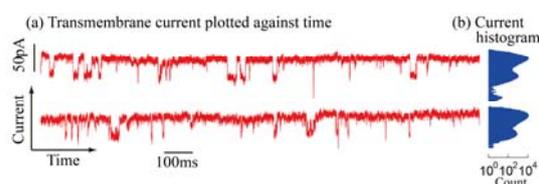


図2 (a)典型的な膜間電流の計測例(デキストラン硫酸について観測した結果を示す)。ほぼ一定振幅の多数のパルス状電流が観測されている。(b)電流ヒストグラム。aの電流値から作成した。各行の全電流値から作成したヒストグラムを、各行の右に示した。

グラムには、先ほどの一定振幅(以下、この振幅を I_1 とする)に対応するピーク以外にも、複数のピークが観測された。その振幅は I_1 の整数倍となり、振幅が大きいほど観測頻度が下がる傾向がみられた。

これは分子断面積が直鎖部分の整数倍、つまりナノポアを通過する局所部分では分子が数本同時に通過していると考えられる。パルス初期に振幅が I_1 の2倍($I_2=2I_1$)、後に I_1 となるタイプの電流パルスは直鎖状分子でも頻りに観測されるため、直鎖分子が相対的に小さいポアを通過する際に折り畳まれたと解釈する事ができる。

一方、パルスの中間部分だけ振幅が $I_2(=2I_1)$ と観測されるケースは、直鎖分子ではほぼ観測されないものの、分岐を有する糖鎖高分子、例えばデキストラン等で観測される事が分かった。分子内の折りたたみ構造を考慮しても、直鎖分子1本のナノポア通過でも説明ができない。2本の分子が同時にナノポアを通過する事で、パルス中間部分の電流が2倍になる現象自体は説明できるが、2本の分子が通過した事に起因しているわけではなく、高分子の分岐構造を反映した電流変化であると結論づけられた。何故なら(1)今回の実験条件においては希薄溶液物性や過去の文献などを考慮しても dextran 分子の会合はほぼないと考えられ、(2)ナノポアが分子の流体力学半径等分子サイズに比べて十分小さい事、も併せて考えると、2本の分子が偶然同時にナノポアに入ったとは考えにくい。さらに、(3)分子の断面積より少し大きい程度のポアを作成して利用する事でも、同時に複数分子が通過する事を抑制可能であるが、その場合でも、同様の現象が観測された。つまり、分岐を有する分子構造を反映した電流パルスを、ナノポアを通過するイオン電流で観測する事ができた。

イオン電流による断面積計測の分解能は、直鎖構造を持つ多糖類の1分子内折りたたみ構造の分析から、糖の数をグルコース1個単位でカウント可能な程高く、従来法と比較しても非常に高い分解能を有する事が確認できた。

一方で、分子の主鎖方向の分解能は、断面積方向に対して数十倍程度劣る事が、糖鎖高分子についても確認された。これは、分子の通過速度が一定でなく、また電流検出増幅器の速度限界を超えた速度で分子がナノポアを通過してしまうケースが多いためであると考えられた。

この問題を解決するために、ナノポアを通過する分子の位置を高精度で制御する事を試みた。圧電スキャナーの持つ高い位置決め精度(数ナノメートル)を利用して、計測対象分子を1本ずつ、ナノポアへ誘導し、分子の位置を制御しながらイオン電流で分子断面積を計測する事を試みた。具体的には、AFMの探針先に計測対象分子を化学架橋により固定化し、対象分子をナノ

スケールで位置制御しながらナノポアの中に入れて断面積をイオン電流で計測する系の構築に取り組んだ。AFM の装置内でナノポアを經由するイオン電流を低ノイズで計測するためのセルを開発した。

圧電スキャナーを利用してナノポア内の分子の位置を制御する事も技術的に可能になりつつあるが、成功率が低い問題があり今後の改良が必要である。本技術を低ノイズナノポアデバイスと組み合わせる事で、従来のナノポア式断面積計測技術の欠点を補う技術に発展すると期待される。

以上のように、ナノポアを利用したイオン電流により、多糖類をはじめとした糖鎖高分子を1分子単位で検出する事が可能となった。またその1分子内の折りたたみや分岐構造など微細構造も含めた精密計測が可能であり、太さ方向に関しては糖1個単位の分解能を持つ強力な手法であることが確認された。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

1. Makoto Takemasa, Masahiro Fujita, and Mizuo Maeda, "Single molecular analysis of polysaccharides using a nanopore", International symposium on Environment, Energy and Materials, 2014/3/17~2014/3/19, 同志社大学

2. 武政 誠、藤田 雅弘、前田 瑞夫, "ナノポアによる1分子電気泳動", 第33回キャピラリー電気泳動シンポジウム, 2014/11/14~2014/11/15, 日本女子大学

3. 武政 誠、藤田 雅弘、前田 瑞夫, "ナノポアによる多糖類の1分子測定", 第62回高分子討論会, 2013/9/11~9/13, 金沢大学

4. Makoto Takemasa, Masahiro Fujita, and Mizuo Maeda, "Single Molecular Analysis of Glycans using a Solid State Nanopore", International Union of Materials Research Societies - International Conference on Electronic Materials 2012, 2012/9/23-9/28, Pacifico Yokohama

5. 武政 誠、藤田 雅弘、前田 瑞夫, "ナノポアによる1分子多糖類の分析", 第61回高分子討論会, 2012/9/19~9/21, 名古屋工業大学

6. 武政 誠、藤田 雅弘、前田 瑞夫, "ナノポアによる多糖類の1分子解析", 第22回バイオ・高分子シンポジウム, 2014/6/25~6/26, 東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武政 誠 (TAKEMASA Makoto)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工