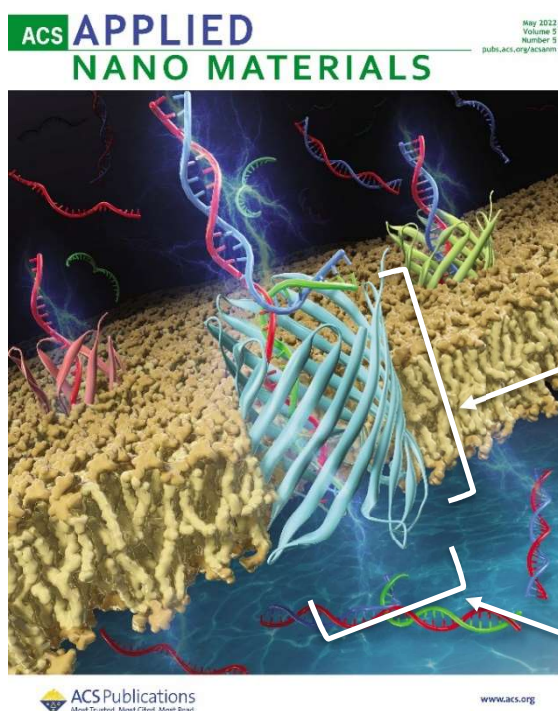


2022年6月10日

報道関係者 各位

## 遺伝子組換えでナノポアの大きさ自由自在に 様々な構造のDNA検出に成功

群馬大学（群馬県前橋市）理工学府分子科学部門 神谷厚輝助教と同大学物質・生命理工学教育プログラム博士前期課程2年生 登坂俊行は、細胞膜上の小さな穴（ナノポア）を形成するタンパク質のポアサイズ（穴の大きさ）を遺伝子組み換えにより改変し、様々な構造のDNA検出に成功した。この成果は、米国化学会のACS Applied Nano Materialsに掲載され、その雑誌の中表紙に採択された。



ナノポアタンパク質

ナノポア：

DNAなどの生体分子が通過できる

ナノポアを形成するタンパク質であるOuter membrane protein-G (OmpG)では、通常14本のβストランド（鎖状につながったアミノ酸配列）が樽状配向してナノサイズのポア（ナノポア）を形成する（上図）。このβストランドの本数を遺伝子組換えにより増減させたところ、βストランド数の本数に応じてポアサイズが改変できることを明らかにした。さらに、遺伝子組換えを行ったOmpGのポアサイズの違いにより、形状の異なるDNAの検出に成功した。

## 1. 本件のポイント

- ナノポアを形成するβストランド（鎖状につながったアミノ酸配列）数の増減によりポアサイズの異なるナノポアタンパク質を構築できる原理を理解。
- ナノポアの直径の違いにより、形状の異なるDNAの検出に成功。

## 2. 本件の概要

OmpGなどのナノポアタンパク質（注1）は、人工細胞膜に挿入することで生体分子（特にDNA）の高感度検出が可能です。この検出は、人工細胞膜を生体分子が通過する際、膜上のナノポアがイオンの流れを阻害することを利用してしています。ナノポアタンパク質はその種類ごとに機能やポアサイズが異なります。様々な大きさの生体分子を一分子検出するためには、タンパク質としての性質が揃った、様々なポアサイズをもつナノポアタンパク質の開発が必要となります。

今回は、バレル状（樽状）のナノポアを形成するOmpGに着目し、バレルを構成するβストランド（注2）の本数を遺伝子組換えにより増減させることで、OmpGのポアサイズの改変に挑戦しました。改変型OmpGを大腸菌から発現・精製を行い、野生型と改変型のポアサイズやイオンの透過量をパッチクランプ法（注3）により検討しました。その結果、ポアサイズはβストランド数に依存して改変したことが確認され、イオンの透過量はポアサイズとナノポアの内側表面のアミノ酸の電荷やアミノ酸のかさ高さに影響する原理を理解しました。さらに、改変型OmpGを用いて二本鎖DNAやT字分岐DNAの一分子検出にも挑戦し、ポアサイズの違いにより、異なる形状のDNAを認識できることを明らかにしました。本研究で、ナノポアタンパク質のポアサイズに関する知見が蓄積され、今後ポアサイズが厳密に制御された高感度なバイオセンサとしての開発が期待されます。本成果は、2022年5月27日に、ACS Applied Nano Materials誌に掲載されました。

### 用語

- （注1） ナノポアタンパク質:細胞膜上に存在し、水溶性の分子が透過できる小さな穴（ナノポア）を形成することで、細胞内外の物質輸送を担う。
- （注2） βストランド:疎水性アミノ酸残基が鎖状につながったアミノ酸配列であり、互いに相互作用し、シート状の構造やバレル状の構造を形成する。
- （注3） パッチクランプ法:ナノポアやイオンチャンネル内のイオンの流れを電氣的に測定する方法。

## 3. 発表雑誌

雑誌名:ACS Applied Nano Materials

論文題名: Modified Outer Membrane Protein-G Nanopores with Expanded Truncated β-Hairpins for Recognition of Double-Stranded DNA

著者:Toshiyuki Tosaka, Koki Kamiya

DOI番号: <https://doi.org/10.1021/acsnm.1c04417>

#### 4. 謝辞

本研究は、日本学術振興会(JSPS)科研費 挑戦的研究(萌芽) JP21K19039、新学術研究(公募) JP20H04692、卓越研究員事業、中谷医工計測技術振興財団 技術開発研究助成[奨励研究]からの支援を受けて行われました。

#### 5. 本件に関するお問い合わせ先

##### 【研究に関すること】

群馬大学 理工学府分子科学部門 生命分子機能化学研究室

助教 神谷 厚輝 (かみや こうき)

Tel:0277-30-1342

E-mail:kamiya@gunma-u.ac.jp

神谷研究室のホームページ:<http://kamiya.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp/index2.html>

##### 【報道に関すること】

群馬大学総務課広報係

Tel: 027-220-7010 FAX: 027-220-7012

E-mail:s-public@jimu.gunma-u.ac.jp (係共通)

## 研究の詳細

Outer membrane protein (Omp)はグラム陰性菌の外膜に存在し、バレル状の小さな穴、ナノポアを形成し、細胞内外の物質輸送を担っています。Ompはバレルを構成するβストランドと呼ばれる鎖状のアミノ酸配列の本数が多いほどポアサイズが大きくなる傾向にあります。本研究では様々な大きさの生体分子の一分子検出のための、様々な大きさのナノポアタンパク質の開発を目指しました。イオンや糖類を透過することができ、14本のβストランドからなるOmpGに着目し、βストランドを4本挿入したOmpG+4βと反対にβストランドを4本欠損させたOmpG-4βを作製しました(図1)。そしてパッチクランプ法によりイオンの透過性を検討したところ、OmpG+4βは野生型よりもイオン透過性が高く、OmpG-4βは野生型よりもイオン透過性が低くなる結果が得られました。さらに、ナノポア内側の電気的性質を大きく変化させたOmpG-4βを作製したところ、イオンの透過性は野生型よりも高くなりました。また非電解質である様々な大きさの分子をOmpGのナノポア内に滞留させることでOmpGのポアサイズを評価したところ、OmpGは約3 nmの分子まで滞留させたのに対し、OmpG+4βは約5 nm、OmpG-4βは約2 nmまでの分子を滞留させることを示しました。よって、βストランド数依存してOmpGのポアサイズが変化したことが確認され、イオンの透過性はポアサイズのみならず、ナノポア内側の電気的性質、いわば、ナノポア内側のアミノ酸電荷が影響することを示しました。また二本鎖DNA共存下でパッチクランプ法を実施すると、数ミリ秒単位のイオン電流の阻害が観察されました(図2)。この阻害時間の長さは印加電圧を上げるほど、短くなるのが分かり、二本鎖DNAがOmpGのナノポアを透過していると判断されました。さらに改変型OmpGによるT字に分岐したDNAの検出にも挑戦しました。分岐構造をもつDNAは生体内で相同組換え時に発生し、このようなDNAもポアサイズの違いにより検出できるのではと考えました。その結果、βストランドを欠損させたOmpG-4βはいずれの形状のDNAも検出することができず、より小さな生体分子の高感度検出に適していると考えられました。また、βストランド数を増加させたOmpG+4βはより長い分岐をもつDNAを検出することができ、ポアサイズの違いにより形状の異なるDNAを認識することに成功しました。

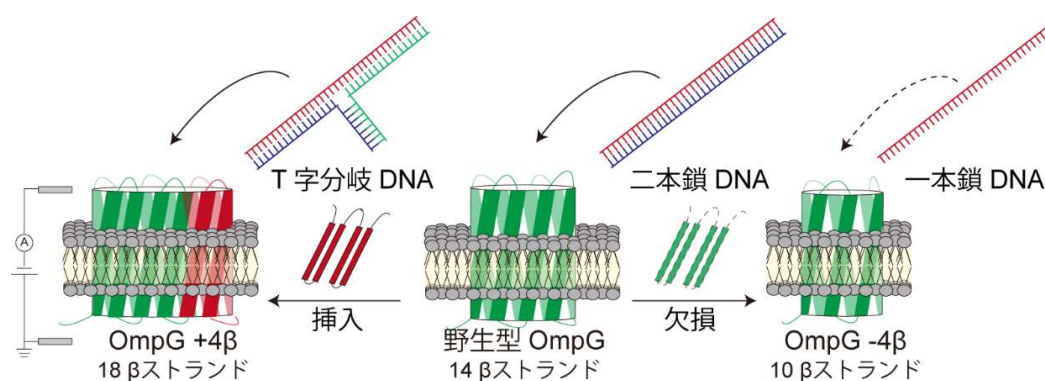


図1. 野生型と改変型OmpGの構築とパッチクランプ法による様々な形状のDNA検出

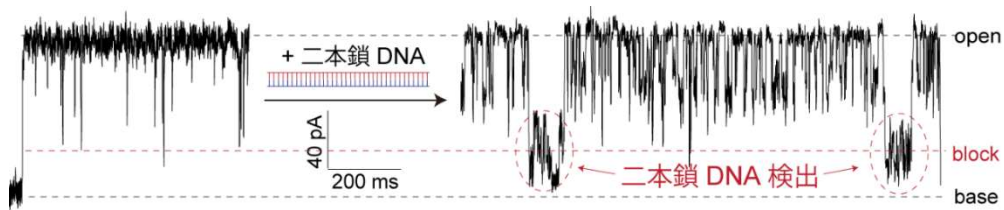


図2. OmpGのイオン電流シグナルと二本鎖DNA検出

## 社会に対する成果の還元、今後の展望

本研究で、 $\beta$ ストランド数を増減することでOmpGのポアサイズを改変することに成功し、ポアサイズの違いにより形状の異なる生体分子を検出可能であることを示しました。この研究成果から得られた知見は、様々な大きさの生体分子の一分子検出を可能なナノポアタンパク質の開発に貢献するものであり、今後、より高感度なバイオセンサの開発や様々な大きさの分子の人工細胞膜内外の輸送を担うバイオ素子としての応用を目指しています。