

ナノポア応用研究の最前線

特集によせて

庄司 観¹・山崎 洋人²

ナノポア計測は、脂質二分子膜や窒化シリコン薄膜のようなイオン不透過性の薄膜に構築されたナノメートルスケールの細孔（ナノポア）を流れるイオン電流を計測することで行われる。標的物質がナノポア内を通過することで一時的にイオンの流れが阻害され、阻害電流シグナルとして検出することができる。このシグナルは、ナノポア内を通過した物質のサイズや形状、チャージなどの情報を有しており、統計解析により通過した物質の物理的な情報を取得することができる。

カリフォルニア大学サンタクルーズ校のDavid W. Deamerらのグループによって、1980年代後半から90年代にかけてナノポアシーケンサーのコンセプトが考案された。そして1996年に、そのコンセプトを実証した最初の論文が公開されてから今日に至るまで、ナノポア技術を用いた一分子計測技術は大いに発展を遂げてきた。2015年にOxford Nanopore Technologies社から世界初の商用ナノポアシーケンサー（MinION）が販売されると、小型かつ安価なシステムとして、分子生物学や医学分野の研究者から大きな注目を浴び、MinIONを用いた研究が数多く報告されている。本特集をご覧になられている生物工学会員の中にも、すでに使用された経験をお持ちの方がいらっしゃると思われる。

一方、ナノポア技術はナノポアシーケンサー以外にも高感度・高時間分解能を有する一分子計測技術として、分子サイズが数ナノメートル程度の低分子化合物から比較的大きなタンパク質、さらには直径数百ナノメートル程度の細胞小胞やウイルスの検出など、汎用的な計測手法として幅広く応用されている。しかしながら、日本国内では、ナノポア技術を用いた分子計測技術が広く浸透しているとは言い難い状況である。そこで筆者らは、より多方面の分野の研究者からナノポア計測技術に興味を持っていただきたく、2022年度に開催された第60回日本生物物理学会年会にて、「先端的ラベルフリーナノポア計測による生物物理学への応用と展開」というシンポジウムを開催し、ナノポア計測技術に関する最新の取組み・研究成果を紹介した。本特集も、上記シンポジウムを聴講していただいた東京工業大学の松浦教授にお声がけいただき、企画させていただくこととなった。本特集では、先のシンポジウムでご講演していただいた先生方

に加え、ナノポア技術の発展と応用に必要不可欠である分野横断的な研究に取り組んでいらっしゃる先生方に寄稿をお願いした。

ナノポア計測において高感度一分子計測を実現するためには、「ナノポア内を流れる分子輸送現象の解明・理解」「標的分子に対する最適なナノポア構造体の設計・構築」「標的分子シグナルの増幅」そして「高精度シグナル解析技術」が必要不可欠である。そこで、青山学院大学の三井教授には有限要素法シミュレーションを用いたナノポア近傍の分子の流れに関してまとめていただいた。東北大学の馬淵助教には、MDシミュレーションを用いた合成DNAナノポア内部のイオン輸送現象解析に関して執筆いただいた。これらのシミュレーション技術は、ナノポア計測によって引き起こされるさまざまな物理現象を理解する上で、もっとも重要な基礎技術である。また慶応義塾大学の齋木教授には、光学的手法を用いたナノポア近傍における標的DNA分子の挙動観察について寄稿いただいた。

群馬大学の神谷助教には遺伝子工学的な改変型ポア形成膜タンパク質の構築と分子計測について執筆いただいた。理化学研究所の新津研究員には、*de novo*タンパク質デザイン工学に基づいて設計される*de novo*設計ナノポアに関してまとめていただいた。

東京農工大学の川野教授には、DNAコンピューティング技術を用いた標的核酸分子の特異検出および体液診断への応用に関して寄稿いただいた。多数の核酸分子が含まれる体液から標的分子のみを検出することは困難であり、DNAコンピューティングによる分子増幅技術はナノポア計測の病理診断への応用を大きく加速させている。

最後に、名古屋大学の有馬講師にはAIを用いたシグナル解析およびウイルス検査への応用に関して執筆いただいた。煩雑な統計学的シグナル解析が必要であることがナノポア計測の応用を妨げる課題の一つであるが、機械学習による解析プラットフォームの構築は、ナノポア技術の用途拡大を押し進めるであろう。

上述のように本特集では、ナノポア技術に関する複数の記事を紹介していただいた。生物工学会の皆様がナノポア研究に興味を持っていただき、今後の皆様の研究に少しでもナノポア技術が寄与できることを期待している。

著者紹介 ¹長岡技術科学大学 工学研究院 機械系(准教授) E-mail: kshoji@mech.nagaokaut.ac.jp

²長岡技術科学大学 産学融合トップランナー養成センター(特任講師) E-mail: hirohitoyamazaki@vos.nagaokaut.ac.jp
生物工学会誌 第101巻 第8号(2023)

DNAの泳動から評価するナノポア付近の物理的環境と有限要素法によるシミュレーション

Kent Lloyd¹・守山 裕大²・三井 敏之^{2*}

ナノポアとは、ナノスケールの膜に生成した同スケールの穴のことである。天然に存在する生体物質としては、細胞膜のイオンチャネルもナノポアといえるが、比較的に内径が大きい α ヘモリシンのような溶血素子は、高分子センシングのバイオニアとして用いられ、現在のナノポアを用いたDNAシーケンスの成功につながった¹⁾。一方で、半導体デバイス技術の発展も進み、安定したナノスケールの加工制御法が確立され、さまざまな物質による薄膜を用いた、人工的な固体ナノポアを用いた生体分子やウイルスセンシングの研究も盛んである。

ナノポアセンシング

ナノポアによるセンシングは、膜内のナノポアを通過する微小なイオンの流れをイオン電流として検出し、その値の変化をI-Vコンバーターで高速に計測することで行われる。イオン液体をポアのある膜で隔て、膜の両側の液内に基準電極として用いられるAgClなどの電極を配置して、電極間に一定の電位差を加えることによりイオン電流を得る。イオン電流は定常的だが、ポアを通過するイオンの速度より、遅い速度で動く高分子やウイルスなどの物質がポアを通過したり相互作用したりすると、イオンが通るポアの断面積を減らすことになり、電流値は一時的に変化する。この変化を封鎖電流と呼び、これがポアを通過する物質の検出手段である。ナノポアを通過する1つの物質で1つの封鎖電流が発生するため、封鎖電流により、1分子の長さや形状の情報を直接観察でき、また1ウイルスの種類の評価が可能になる。現在、生体分子によるバイオポアを用いて、封鎖電流の変化からDNA1分子の塩基配列を検出できるようになったことは驚きである。一方、固体ナノポアの開発では、化学的・物理的パラメータの自由度が高いため、さまざまな材料によるナノポアの作製方法が試されており、検出物質もDNAに限らず、RNAやウイルスなど、多岐にわたる。さらに薄膜への電極の付加や、光学的な検出など物理量も増えており、今後の固体ナノポアの発展が楽しみである。

ナノポアのシミュレーション

ナノポアを含むデバイスの開発は、25年前に始まり、DNAなどの検出が報告されてきたが、これらのデバイスの開発に並行して必要だったのが、ポアを流れる定常状態のイオン電流と検出物質による封鎖時の電流変化のシミュレーション技術であった。基本的にナノポアによる検出は、一次元の電流変化によりなされ、イオン電流が適切にポアを流れているか、物質がポアを通過する際に封鎖電流を検出できるか、ポアの形状によってイオン電流のI-V曲線が非対称になるかなど、観測データの解釈にシミュレーションが役立ってきた。特にCOMSOL社が開発した有限要素法のパッケージであるCOMSOL Multiphysicsは、固体ナノポアの実験に携わる多くの研究者に利用されてきた。ナノスケールの物理を再現するシミュレーションとしては、分子動力学(MD)のほうが優れているが、いろいろな意味でハードルが高い。一方、COMSOL Multiphysicsを使用することで、直接観測ができないポアと分子などの相互作用や、イオン種による流れの発生、ウイルスやDNA分子などのポア通過経路によるイオン電流の変化などの予測が可能になり、少なくともイオン電流では、予測と実測値が定量的に一致する。そこで筆者らは、ポア通過前や通過中のDNA分子の挙動を蛍光染色により光学的に観測することで、 μm スケールでのDNAの速度を見積もり、その結果と有限要素法で予想したポア付近の電場や流れから、DNAが受ける力を評価し、ポア付近の物理的環境を明らかにしてきた。本稿では、シミュレーションに必要な微分方程式について、シミュレーション時間を短縮する方法や実験結果との相違などを説明する。筆者のような実験家にも、最新のパッケージの利用によりシミュレーションを研究ツールとして活用できるので、この場を借りて皆様にも有限要素法によるシミュレーションをお勧めしたいと思う。

有限要素法はシミュレーションをする領域を有限個のメッシュに分けて、それぞれのメッシュにおいて、与えられた微分方程式から得られる物理的な条件を満たすように連立方程式を立て、数値的に解く方法である。この方法の特徴は、メッシュを細かく分割することでより正

*著者紹介 青山学院大学理工学研究科(教授) E-mail: mitsui@phys.aoyama.ac.jp

¹青山学院大学理工学研究科機能物質創成コース、²青山学院大学理工学物理科学科

確な解を得ることができるが、近似解を反復的に求めるので、その分、計算に時間がかかる。特に固体ナノポアにおけるセンシングでは、ポアサイズや電極の付加による表面電位の制御など、物理的環境が多様で複雑である。また、固体ナノポアのシミュレーションでは、MDシミュレーションよりも大きな領域をシミュレーションする必要があることから、主に有限要素法が用いられる。

有限要素法で取り扱う微分方程式

有限要素法によりナノポア付近の物理量を評価する場合は、主にポアソンの式、ネルンスト・プランクの式、ナビエ・ストークスの式の3つの微分方程式を使用する。計算時間の短縮には、対称性やメッシュサイズの最適化から初期条件の設定まで、さまざまな工夫が必要である。まずは3つの微分方程式について説明する。ポアソンの式、ネルンスト・プランクの式、ナビエ・ストークスの式それぞれナノポア付近における静電ポテンシャル、イオン輸送、水溶液（流体）の流れを記述する。

①ポアソンの式 (Poisson equation)

$$\nabla \cdot \epsilon_f \nabla \phi = -\rho = -e \sum_i z_i c_i \quad (1)$$

ここで、 $\nabla \phi$ は電場、 ρ は空間電荷密度、 ϵ_f は媒質の誘電率であり、真空の誘電率 ϵ_0 と比誘電率 ϵ_r より、 $\epsilon_f = \epsilon_0 \epsilon_r$ と表せる。 z_i と c_i は、それぞれイオン種 i の価数と濃度を表す。このポアソンの式は、ナノポア付近のイオンによる移動電荷や、ポア壁などの表面電荷、電極電位による静電ポテンシャル ϕ を与え、以下の式に、その勾配である電場 $\nabla \phi$ を、以下の②と③の式に用いる。

②ネルンスト・プランクの式 (Nernst-Planck equation)

$$j_i = c_i \mathbf{v} - D_i \nabla c_i - \mu_i c_i \nabla \phi \quad (2)$$

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = -\nabla \cdot j_i \quad (3)$$

ここで、 j_i 、 D_i 、 μ_i はそれぞれイオン種 i のフラックス、拡散定数、移動度で、 \mathbf{v} はイオン溶液の流速である。よって、式(2)はイオン種の流速を与える。右辺は、溶液の流れによる移動の項、拡散項、電気泳動の項である。移動度 μ_i は、電場による外力と溶液の粘性により終端速度で移動するものとする。式(3)はイオンの保存則である。イオン溶液の流速 \mathbf{v} は、次のナビエ・ストークスの式で与えられる。固体ナノポアの実験が始まった2005年頃は、イオン溶液としてKClが使われていた。その理由は、 K^+ と Cl^- は溶液内のイオン濃度が等しく、移動度が同程度で極性が逆であるために、ナノポア内部で、イオン溶

液の流れが生じない($\mathbf{v}=0$)と考えられるからである。この場合、固体の表面電荷や、電極への印加電位と溶液の電位との電位差から、式(1)~(3)の有限要素法によるシミュレーションによってイオン溶液中のイオンが固体表面付近に形成する電気二重層の厚さを見積もることができる。この厚さは、単純な幾何を仮定して式(1)~(3)を解析的に解いた結果から得られるデバイ長と一致する。実際には、ポア壁面の表面電荷により、ポア内部の K^+ と Cl^- の濃度は等しくならず流れが発生する。この流れは電気浸透流と呼ばれ、式(2)の右辺第一項は無視できない。この流れを評価するためには、流体力学のナビエ・ストークスの式が必要となる。

③ナビエ・ストークスの式 (Navier-Stokes equation)

$$\rho_f \left(\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + (\mathbf{v} \cdot \nabla) \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \eta \nabla^2 \mathbf{v} + \frac{e \sum_i z_i c_i}{\epsilon_f} \nabla \phi \quad (4)$$

ここで、 ρ_f は流体密度、 p は流体圧力、 η は流体の粘性である。左辺の第二項は流体慣性であり、イオン溶液の流速 \mathbf{v} は右辺の第三項のイオンの動きによる外力と流体の粘性によって生じる。ナノポアの系では、定常流を仮定して左辺の第一項を0とし、 ∇p も0とする。ここで得られた流速 \mathbf{v} は、式(2)の右辺の第一項の \mathbf{v} を与える。

この4つの式に基づく有限要素法の繰り返し計算により、ポア付近の電場、イオン輸送、水溶液の流れが評価できる。ポアが真円の場合、イオン電流はポアの抵抗とポアへのアクセス抵抗の直列として解析的に計算できるため、シミュレーション結果の妥当性を評価することができる。また、シミュレーションのイオン輸送からポアを通過するイオン電流が予想でき、この値は実験的に測定されたイオン電流値と比較もできる。シミュレーション結果が妥当であれば、ナノポアの材質やイオン種を変更したり、ポアの形状を複雑にしたり、電極付加による電界制御の効果を与えたりした場合に、実験的に実装する前に、ナノポア周辺の物理量を容易に評価することができる。

有限要素法の結果と観測結果

筆者らは、膜厚200 nmの膜に直径100 nm以上のポアを作製することにより、ポア付近の電場の効果を増強して、DNAの電気泳動を光学顕微鏡の分解能で観察している。DNAの動きは、次の式(5)により記述することができる。

$$\mathbf{v}_{DNA} = \mathbf{v}_{ele} + \mathbf{v}_{EOF} \quad (5)$$

ここで、 \mathbf{v}_{ele} は、 $\mathbf{v}_{ele} = \mu_i c_i \nabla \phi$ より得られる電気泳動由来

のDNAの移動速度で、 v_{EOF} は電気浸透流によるDNAの流れである。DNAの正味の動きは、この2つの速度の合成として近似できる²⁾。

図1の白いspotが蛍光観測による λ ファージDNAで、yoyo-1という蛍光分子をtagとしている。上段の図では左上にナノポアがある。たとえば、0.58 sまでにポアに近づいた λ ファージDNA (左矢印) が0.72 sでは消え、ポアへの進入を示した。DNAの軌道 (右下図) と、有限要素法の結果と式(5)によるDNAの動きを比べると、イオン溶液が0.1 M KCl, ポアSiNの場合、シミュレーションと実験結果は定量的に一致した³⁾。図2のように、表面を導体にして表面電位を負にし、DNAの泳動と電気浸透流の向きを逆にした場合、シミュレーションでは中心付近のDNAは進入して、他のDNAはポアから離れる動きを予想した。興味深いことに実験でも同様の動きが確認できたが、浸透流の効果によるDNAの進入は、5倍の範囲で観られた^{4,5)}。このように、溶液の流れが発生するシミュレーションでは、式(4)の速度が大きくなるため、細かいメッシュが必要となり、計算時間が一日間くらいに増加する。そこで、式(4)を除いた、あるいは式(1)のみの解を得て、その結果を初期条件としてすべての式を用いた計算を行うと速やかに解が収束した。

もっとも興味深いシミュレーションの結果は、ポア内

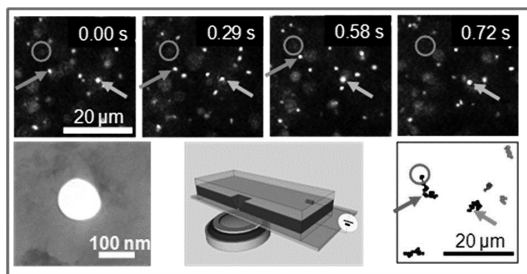


図1. 上段は蛍光観測によるDNAの泳動, 下左図はTEM像, 下中図はスキマティック, 下右図はDNAの軌道³⁾. Copyright 2012 ACS.

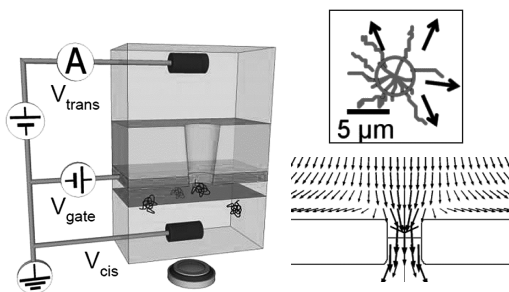


図2. 左図はスキマティックで薄膜表面はAu. 右上図はDNAの挙動を示す。右下図はシミュレーションによる挙動予想⁴⁾. Copyright 2015 IOP Science.

のDNAが浸透流に及ぼす効果である。固体ナノポアによるDNA検出では、イオン電流のノイズの急激な増加がみられ、その後のDNA検出がノイズにより困難になる。短いDNA (<10 kbp) を使用するとノイズの増加があまりみられないので、DNAがナノポアに詰まって除去できないのではないかと考えられていた。そこで筆者らは、詰まりの様子を直接観測し、線形および環状のDNAを用いて、DNAがポアに詰まるとポア内の電場の力ではポアから取り出せないことを実験的に確認した⁶⁾。図3の上段は、ポアに詰まったDNAの様子を示す。DNAはmsecのスケールでポアを通過するため、観測では1フレーム以内に通過するはずだが、1秒以上の間、ポアの位置に留まっている。1.14 sでは、DNAが電気泳動と反対向きに伸びているように見える。この実験のシミュレーションでは、ポア内にDNAを置き、計測時間の短縮のために円筒座標系を採用し、 θ 依存性をなしとした。結果は、DNAの電荷による電気浸透流は電気泳動の向きと逆で、式(5)では、電気浸透流由来の v_{EOF} (白色矢印) の速さが $\mu_c \nabla \phi$ による v_{ele} (灰色矢印) の速さと同程度であり、DNAの数を増やすと、 v_{EOF} のほうが大きくなった。図3の下段では、予想されるDNAの動きを白色矢印と灰色矢印の合成として、黒矢印で示した。グレースケールの図のため見づらいが、ポア内にDNAがない状態のシミュレーション (右下) では、DNAは黒矢印によりポアを通過する向きに動くが、ポア内に詰まりを模倣した線形と環状のDNAを置くと、DNAは、黒矢印の向きより、電場による力とは逆向きの力を受け

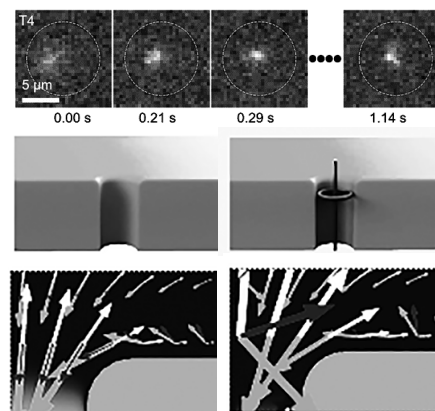


図3. 上段はDNAの詰まりの様子. 中段はシミュレーションにおけるDNAの形状と位置, 結果が下段. ポア内の v_{ele} を灰色矢印, v_{EOF} を白色矢印, そして、予想されるDNAの動きを黒色矢印で示す⁶⁾. 左下はポアのみで、ポアに進入する向き (黒矢印) に、一方で右下はDNAを右中図のように置いた結果として、DNAはポアから出る向きに動く。Copyright 2019 MDPI.

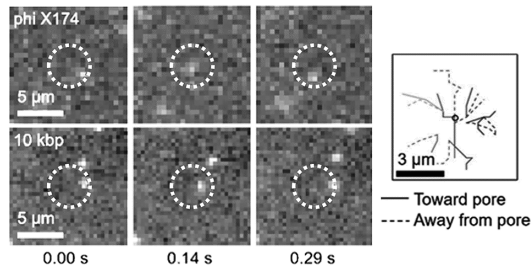


図4. 環状DNAの振る舞い. 左上段はphiX174, 左下段10 kbp環状DNAであり, ポアに進入しない. 右はDNAの軌道⁶⁾.

る. これは図3の1.14 sのDNAの逆向きの伸びの要因とも考えられる. さらに電場などのパラメータを変えてシミュレーションを行った結果, KClイオン溶液を用いたナノポアによるDNAセンシングでは, 一度DNAがポアに詰まると, 電極の電位差だけでは詰まったDNAを除去できないことがわかった. そこで, 筆者らは, DNAの電荷による電気浸透流を増強するために環状DNAを用いて実験を行った. 図4では, 環状DNAは, ポアに進入する直前に180度近く向きを変え, ポアから離れる動きが観られた. 環状DNAは, ポアに進入する際に二本鎖のDNAが二本分進入することになる. このシミュレーションでは, DNAがポアに進入した後に, 電気泳動による速さより, 電気浸透流による逆流が大きくなり, DNAがポアから進入した側に戻る. このように, ナノポア内の局所的空間では, 表面電荷のある物質の進入により物理的環境が常に変化することがわかった.

現在, 筆者らはシミュレーションの3D化を行っている. 単純に2Dから3Dに変更するだけでは, 解は収束しない. そこで, まずは①ポアソンの解を初期条件として, ②ネルンスト・プランクの式と③ナビエ・ストークスの式を解くときに, Auxiliary Sweep Continuationを適用する. これは, パッケージ付属のアルゴリズムで, 自動的に複数のパラメータによる結果を比べて, 収束の時間を早める. この機能により, 特異的な形状のポアでもシミュレーションが可能になった.

試しに, スリット状のポアにDNAを通す実験を行っ

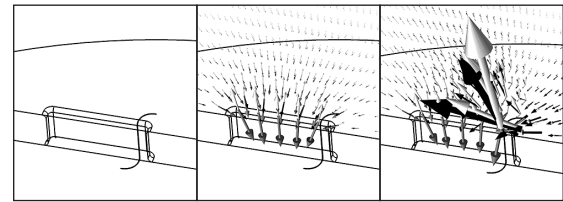


図5. 3Dシミュレーションによるスリットポアの形状とDNAの位置を示す(左図). 中図と右図はDNAの表面電荷が0と -20 mC/m^2 の結果で, 電気浸透流による流れ(白色矢印)とDNAの電気泳動の速度(灰色矢印), この二つの合成によるDNAの動く向き(黒矢印)を示す.

ている. 図5は, 実際の実験で使用するナノスリットと同スケールの形状によるシミュレーションの結果である. 図5の左図のように, スリットの右端にDNAを置いた. 図5中と右図は, それぞれDNAの表面電荷が0と -20 mC/m^2 の結果である. DNAがスリット内にいない場合として, 表面電荷を0としたシミュレーションも行った. この場合, DNAはスリットを通過する. 一方で, DNAの典型的な表面電荷である -20 mC/m^2 をDNA表面に与えてシミュレーションを行うと, 図5右図の黒矢印の向きにDNAは力を受ける. この向きはスリットから出戻り向きであり, 先駆的な実験結果と一致する. このような変化を予想するために有限要素法によるシミュレーションは必須であり, COMSOL Multiphysicsは有限要素法のパッケージとして実験家に優しく, ナノポア研究におけるシミュレーションのスタンダードとなりつつある. 今後は, シミュレーションを先行し, ポアの形状, イオン種, イオン濃度などのパラメータを決定してから実験を行いたいと考えている.

文 献

- 1) Xue, L. *et al.*: *Nat. Rev. Mater.*, **5**, 931 (2020).
- 2) Stein, D. *et al.*: *Nano Lett.*, **10**, 765 (2010).
- 3) Ando, G. *et al.*: *ACS Nano*, **6**, 10090 (2012).
- 4) Sugimoto, M. *et al.*: *Nanotechnology*, **26**, 065502 (2015).
- 5) Kato, Y. *et al.*: *J. Phys. Chem. B*, **122**, 827 (2018).
- 6) Kubota, T. *et al.*: *Polymers*, **11**, 84 (2019).

MDシミュレーションによる DNAナノポアのイオン輸送解析

馬淵 拓哉^{1,2*}・高橋 潤³

はじめに

細胞膜中に存在するナノ細孔であるイオンチャネルは、細胞膜を挟んで細胞の中と外を行き来するイオンの流れを制御することで、生体内でのエネルギー活動の本質を担う重要な膜タンパク質である。非常に複雑なイオンチャネルの構造や機能を有機合成による人工分子で再現し、イオン輸送を制御しようとする研究は、生物学や医療など多分野における重要課題の1つである。近年、天然イオンチャネルの機能を模倣した人工分子を合成するプラットフォームとして「DNAナノテクノロジー」が注目されている。本稿では、DNAナノテクノロジーおよび人工DNAチャンネルに関する研究について概説し、理論から微視的現象を解析する分子シミュレーションの活用例について紹介する。

DNAナノテクノロジー

DNAは生命の遺伝情報を保持する高分子であり、4種類の塩基 (A, C, T, G) を持つヌクレオチドがひも状に連なったものである。近年では、このDNA分子を利用して人工的にナノ構造体を設計・合成する技術が発展し、ナノスケールの機能性材料やデバイスの構築が実現している^{1,2)}。

ナノテクノロジーの素材としてDNA分子を利用することを最初に提唱したのは、Seemanである³⁾。Seemanは、1982年にDNAの相補性を利用し、4方向に分岐するDNA構造を自己集合させ、格子構造を作製する手法を提案した。1998年には、2つの2本鎖DNAを結合させた構造体を用いて作製したタイル状の構造体を自己集合させ、原子間力顕微鏡でも観察可能なサイズの2次元構造体を作製することに成功した⁴⁾。これらの研究が、ナノテクノロジーの素材としてDNAを用いるDNAナノテクノロジーの始まりである。これ以降、2006年にRothemundにより、100 nm程度までの2次元構造体を自在に設計できるDNAオリガミが開発され⁵⁾、2009年にはDouglasらにより、2次元のDNAオリガミを折りたたむことによって3次元のDNAナノ構造体を作製できるようになった⁶⁾。

DNAナノテクノロジーの特徴としては、DNAの塩基配列が1塩基単位で設計可能であるため、自由かつ精密な3次元構造設計ができることである。また、塩基配列にDNA以外の分子を修飾できるため、構造体にDNA以外の特性を付与することも可能である。そのほかにも、DNAを混合するのみで自己集合により容易に設計した反応を実現できる点やDNAは安価かつ大量に製造できる点が挙げられる。

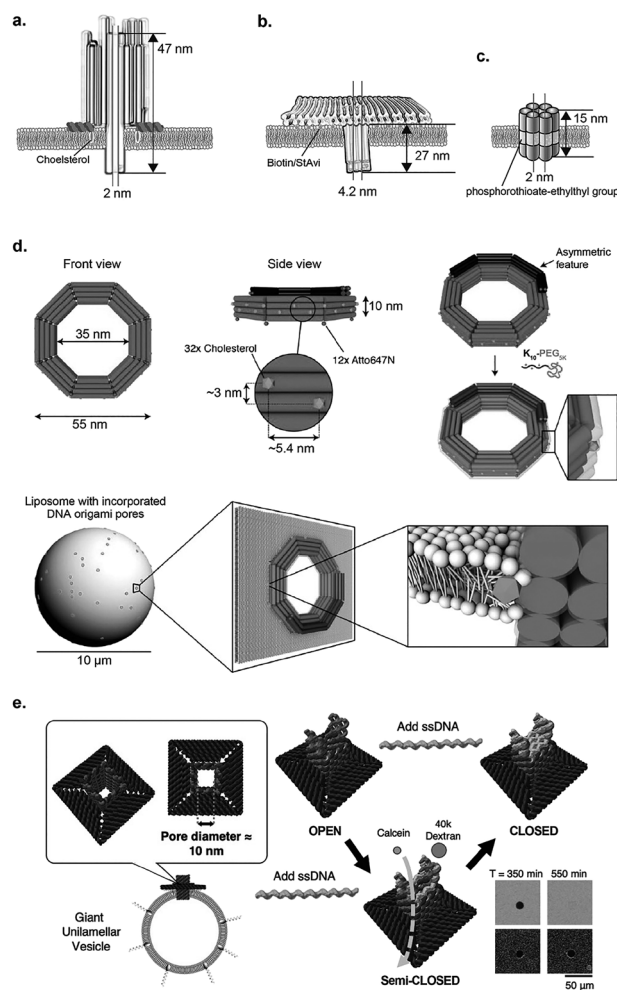


図1. DNAを基盤とした人工ナノポアの例。文献2のFigure 4より。

著者紹介 ¹東北大学学際科学フロンティア研究所 (助教) E-mail: mabuchi@tohoku.ac.jp

²東北大学流体科学研究所, ³東北大学大学院工学研究科

人工DNAチャネル

DNAナノテクノロジーの発展に伴い、DNAを基盤としたさまざまな人工ナノポアが開発されている(図1)。設計するポア径により輸送されるターゲット分子は異なるが、本稿では、イオンや小分子の輸送をターゲットとした比較的ポア径の小さな($< \sim 2$ nm)人工DNAチャネルの研究について紹介する。

2012年にSimmelらによって作製された直径2 nmのポアを有するDNAナノポアが、最初に報告された人工DNAチャネルである⁷⁾。疎水性分子であるコレステロールを介して脂質二重膜への結合・貫通が確認されている。この報告以降、膜貫通しイオンや小分子を輸送可能とする人工DNAチャネルを構築する研究がさかんに行われるようになった。Burnsらによる6つの二重らせんの束(six-helix bundle: 6HB)が、人工DNAチャネルの代表例として挙げられる⁸⁾。この構造体は複数の一本鎖DNAを組み上げて作製されており、6HB内部ポア径は約2 nmである。また、チャネルの膜貫通部分に位置するリン酸基にはホスホロチオエート化によってエチル基が修飾されており、チャネル表面と脂質二重膜間の疎水性相互作用が強くなることで、脂質二重膜への貫通および膜貫通状態での安定化を実現している。同様の構造体として、4つの二重らせんの束(four-helix bundle: 4HB)からなるポア径が天然イオンチャネルとほぼ同等の約0.8 nmである人工チャネルもGöpflichらにより報告されている⁹⁾。DNA配列中に疎水性分子であるコレステロールが膜アンカーとして修飾されており、実験において脂質二重膜への貫通と電流の通過が確認されている。DNAナノテクノロジーが用いられたもっとも簡素な人工DNAチャネルとしては、Göpflichらによる二重らせんDNAのみを用いた人工チャネルである¹⁰⁾。親水性であるDNAを脂質二重膜に貫通させナノポアを形成させるため、配列中に疎水性分子であるポルフィリンを膜アンカーとして修飾した。分子シミュレーションにより、脂質二重膜の膜面と二重らせんDNAの間隙がイオンの通り道となりイオンが透過することが予想され、実験により実際に電流がチャネルを通過することが確認された。

ほかにも膜貫通し物質を輸送するだけでなく、開閉が可能なチャネルも開発されている。Howorkaらは、DNAを信号として入力することでポアの開閉が可能な人工チャネルを報告した¹¹⁾。初期状態においては直径2 nmのポアが1本のDNAによって閉じられているが、そのDNAの対となるDNAを入力することで、封をしていたDNAが解離しポアが開く、という機構を持っている。

分子シミュレーションを用いた理論的解析

前述のように、さまざまな人工DNAチャネルが開発され、実験によりその有用性が実証されている。しかしながら、人工DNAチャネル内部におけるナノスケールのイオン輸送現象の詳細を実験的手法により解析することは困難であるため、分子シミュレーションを用いた分子論的手法が有効である。分子シミュレーションでは物理学的な理論に則って分子の動きを再現し、その統計集団を解析する。その中でも、輸送経路やそれを規定する分子間相互作用に関する分子レベルの理解を得ることに関しては、運動方程式に従って分子系の時間発展を数値的に追跡することが可能な分子動力学(molecular dynamics: MD)法などのアプローチが有効である。MD法には複数のモデルが存在し、扱う対象の粒度に応じて再現可能な現象の時間的・空間的スケールが大きく異なる。量子化学計算によって電子状態を扱う量子化学MD、原子一つ一つを扱う全原子MD、複数の原子を1つの粗視化粒子として取り扱う上位の粗視化MDなどがある。

量子化学計算は計算コストが大きく、人工DNAチャネルのような複雑な系における輸送現象に適用することはまだあまり一般的ではない。目的によっては量子化学的な要素を近似しても良い場面は多々あり、その場合は全原子MDのような古典力学に基づく方法を用いる。最近の一般的な計算機であれば数万から数十万原子からなる系について数百ナノ秒から数マイクロ秒の計算が可能であり、チャネル内部のイオン透過現象を直接シミュレーションすることが可能である。Yooらは、前述したBurnsらによって作製された6HB人工DNAチャネルを用いて、 K^+ および Cl^- イオンの輸送特性およびナノポア構造特性の全原子MDによる解析を行った¹²⁾。その結果、膜張力がイオン輸送に大きく影響することが明らかとなった。Maingiらは、6HB人工DNAチャネルの構造揺らぎについて解析を行った¹³⁾。人工DNAチャネル末端におけるサブマイクロ秒の時間スケールのゆらぎが、人工チャネルの入出部の部分的開閉をもたらし、実験的に観察された電圧状態の変化に対するメカニズムと相関があることを示唆した。

一方で、実験的にも収率向上が喫緊の課題であるDNA構造体の膜貫通現象については、マイクロ秒オーダー以上の時間を要する現象のため、全原子MD法で再現することは困難である。そこで、複数の原子の集団を一つの粒子として扱う(たとえば、MARTINI力場¹⁴⁾ではDNA1塩基あたり7-9粒子)ことで、大規模かつ複雑な系に対して長時間のシミュレーションを実現する。

Maingiらは粗視化MDを用いて脂質二重膜への6HB人工DNAチャンネルの貫通シミュレーションを行った¹⁵⁾。膜貫通時における人工DNAチャンネルに修飾した疎水性の膜アンカー分子と脂質二重膜との相互作用を解析し、膜アンカー分子の膜貫通時の影響が小さい一方で、膜貫通後の安定化に大きく寄与していることを明らかにした。

チャンネル内部への分子修飾によるイオン輸送制御

これまでに報告されている透過の制御は、ポア径の調整によるサイズ依存性の制御のみにとどまり、チャンネル内部への機能性の付与による輸送制御は実現していない。一方で、イオン輸送を制御するために実験的にチャンネル内部への分子修飾を試行錯誤で行うのは、検討すべき条件数が指数的に増え、膨大な時間とコストが必要となる。そこで分子シミュレーションを用いることで、種々の修飾分子とイオン間の相互作用特性を系統的に評価することが可能となり、イオン透過メカニズムの理解に向けて効率的に解析を進めることができる。

現在進行している筆者らの研究の一例として、図2aに示すような6HBを基本構造として用い、チャンネル内部への分子修飾が K^+ および Cl^- イオンの輸送特性に与える影響に関する解析結果の一部を紹介する。DNAの構成要素であるリン酸基のうち図2bに示した円筒領域内のリン酸基に対し疎水基であるエチル基を修飾した。元々の6HBはリン酸基により全体的に負に帯電しており親水性だが、エチル基修飾によりチャンネル内側表面が疎水性となる。

図3aにエチル基修飾の有無で比較した電流値およびイオン輸送比の結果を示す。エチル基修飾により電流値が約3分の1となることが示され、チャンネル内部の疎水化により K^+ イオンとチャンネル表面の相互作用が抑制されるのと同時に、疎水性相互作用によりポア径がより小さくなったことが電流値減少の要因であることが明らか

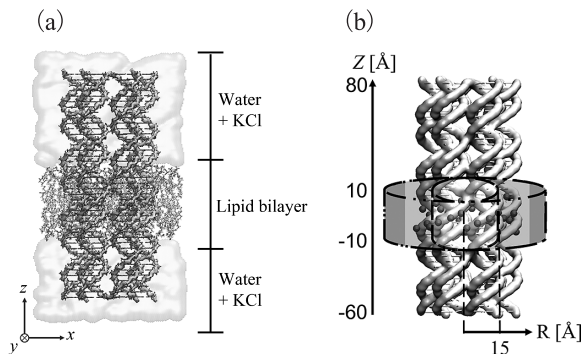


図2. (a) 6HBを用いた計算系の概略図. (b) エチル基修飾の位置 (円筒領域内).

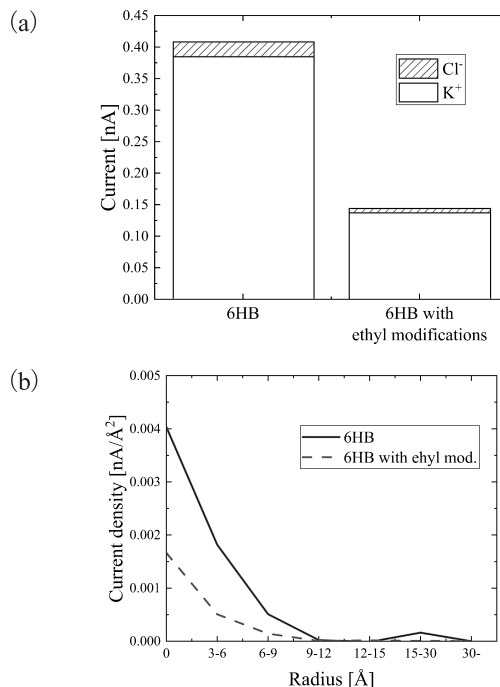


図3. (a) エチル基修飾の有無で比較した電流値およびイオン輸送比. (b) ナノポア半径方向の電流密度分布.

となった。また、エチル基修飾の有無にかかわらず、 K^+ イオンが電流値の9割以上を占めていることから、6HBに対するエチル基修飾は電流の絶対値を抑制するのみで、イオン輸送比への影響は限定的であるということが明らかとなった。図3bにエチル基修飾の有無におけるナノポア半径方向の電流密度分布を示す。エチル基修飾の有無にかかわらず、ポア中心部での輸送が支配的であり、チャンネル界面の電流値への影響は比較的小さいことが明らかとなった。

今後は6HB以外にもさまざまなポア径を有する構造を用いつつ、かつエチル基以外の種々の極性・非極性分子を修飾させ、修飾位置、密度、イオン種などを変化させることでそれらの影響を調査し、人工DNAチャンネルの構造特性とイオン輸送特性との相関の理解を進めていく。

新規人工DNAチャンネルの理論的設計に向けて

筆者らはこれまでの研究活動において、高分子電解質膜におけるプロトン (H^+) 輸送現象の解明に取り組んできた。一見するとナノポアの研究とは分野も異なり関連性が低いと思われるかもしれないが、いずれもナノ細孔におけるイオン輸送という点では共通点も多い。プロトン輸送はGrotthuss機構という従来の古典的なMD法では取扱いが困難な化学変化を伴う複雑な輸送機構を有するため、独自に開発した反応性プロトン輸送モデル

(aTS-EVBモデル)¹⁶⁾やReaxFFモデルを用いて輸送メカニズムを明らかにしてきた¹⁷⁻²⁰⁾。これらのモデルは古典力学の範囲内で化学反応を取り扱うため、量子化学MDと比較して計算コストを大幅に削減できるのが利点で、人工DNAチャンネルのような複雑な系にも適用できる。

生体中に存在するプロトン濃度はNa⁺のたかだか100万分の1程度と僅少だが、天然のプロトンチャンネルには、他のイオンを排除しプロトンのみを選択し輸送する特性が備わっている。現状では道のりはまだまだ遠いが、筆者らはこれまでの異分野研究で培った解析技術を活用して、最終的には、エネルギー産生や細胞運動など多くの生命機能に重要であるプロトンの選択的輸送を可能とする人工DNAチャンネルの構築を実現したいと考えている。

おわりに

本稿では、DNAナノテクノロジーを用いたナノポアに関する研究について概説し、MD法に立脚したイオン輸送解析や筆者らの取組みについて述べた。目的に応じてMD法における粒度およびモデルを適切に使い分けることが、プロトン輸送（化学反応）から膜貫通現象まで、時間的・空間的スケールが大きく異なる現象に対する分子レベルでの理解の深化を実現する上で不可欠である。さらに、実験グループと連携して進めることで、実験結果との比較・検討を行い、そのフィードバックを受けて

効率的に新規人工DNAチャンネルに向けた設計指針の改良を行っていくことが重要であると考えられる。

文 献

- 1) Shen, H. *et al.*: *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11**, 13859 (2019).
- 2) Murata, S. *et al.*: *Adv. Funct. Mater.*, **32**, 2201866 (2022).
- 3) Seeman, N. C.: *J. Theor. Biol.*, **99**, 237 (1982).
- 4) Winfree, E. *et al.*: *Nature*, **394**, 539 (1998).
- 5) Rothmund, P. W. K.: *Nature*, **440**, 297 (2006).
- 6) Douglas, S. M. *et al.*: *Nature*, **459**, 414 (2009).
- 7) Langecker, M. *et al.*: *Science*, **338**, 932 (2012).
- 8) Burns, J. R. *et al.*: *Nano Lett.*, **13**, 2351 (2013).
- 9) Göpfrich, K. *et al.*: *Nano Lett.*, **15**, 3134 (2015).
- 10) Göpfrich, K. *et al.*: *Nano Lett.*, **16**, 4665 (2016).
- 11) Burns, J. R. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **11**, 152 (2016).
- 12) Yoo, J. and Aksimentiev, A.: *J. Phys. Chem. Lett.*, **6**, 4680 (2015).
- 13) Maingi, V. *et al.*: *Acs Nano*, **9**, 11209 (2015).
- 14) Souza, P. C. T. *et al.*: *Nat. Methods*, **18**, 382 (2021).
- 15) Maingi, V. *et al.*: *Nat. Commun.*, **8**, 14784 (2017).
- 16) Mabuchi, T. *et al.*: *J. Chem. Phys.*, **143**, 014501 (2015).
- 17) Mabuchi, T. and Tokumasu, T.: *Mech. Eng. J.*, **4**, 17-00054 (2017).
- 18) Mabuchi, T. and Tokumasu, T.: *J. Phys. Chem. B*, **122**, 5922 (2018).
- 19) Mabuchi, T. and Tokumasu, T.: *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **57**, 867 (2019).
- 20) Mabuchi, T.: *J. Phys. Chem. B*, **126**, 3319 (2022).

光学的手法を用いたナノポア計測技術

山崎 洋人¹・齋木 敏治^{2*}

はじめに

ナノポア計測は、ナノサイズの孔を通過するイオン電流測定を基盤技術とし、単一生体分子計測手法として注目されている。このイオン電流計測法は、生体分子のナノポア通過時に生じるイオン流量変化を検知することで、高い時間・空間分解能でのラベルフリー計測を実現する¹⁾。その一方で、イオン電流計測法は、基本的には単一のナノポアで計測するため、分子検出スループットに限界があることが課題としてあげられる。この課題を解決するために、イオン電流計測法に加えて、ナノポア計測系に光学的手法を融合した計測アプローチがある(図1)。このアプローチでは、複数のナノポアごとの光信号を高感度カメラで並列的に検知することにより、マルチナノポア計測を可能とする。また、イオン電流計測法と併用することで、ナノポア計測の機能性を高めることもできる。具体的には、①色素標識による単一生体分子の蛍光検出²⁾、②蛍光イオンインジケータによるラベルフリー生体分子検出³⁾、③プラズモニックナノポアを活用した増強蛍光・ラマン光検出⁴⁾などの研究事例がある。

本稿では、筆者らによる光学的手法を用いたナノポア計測の取組みとして、DNA通過過程の可視化を紹介する。また、純光学的シーケンサー実現に向けた一塩基分解能ラマン計測の試行についても触れたい。

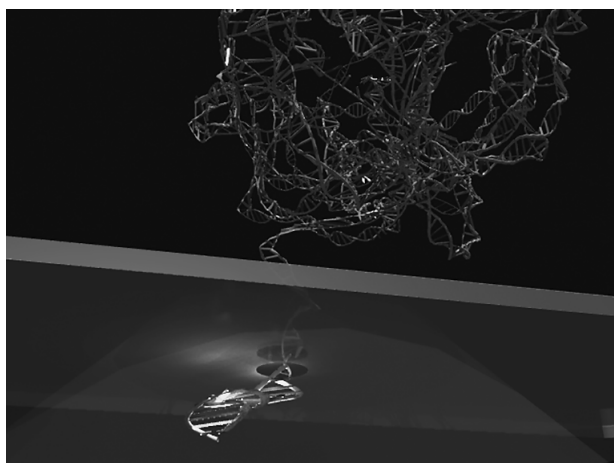


図1. 光学的手法を用いたナノポア計測の概要図

光学的手法を用いた生体分子のナノポア通過観察

ナノポア計測において、分子検出スループットの向上や分子通過速度制御のため、生体分子のナノポア通過の原理解明に向けた基礎研究が進められてきた。イオン電流計測法を用いた事例として、イスラエル工科大学のMellerらは、ナノポア通過時間とDNA長との相関を調べることで、一定の長さのDNAでは、DNAとナノポア界面およびそれ自身との相互作用が強くなり、通過に長い時間を要することを示した⁵⁾。このように、イオン電流計測法ではナノポア通過時のDNAの挙動のみを観察対象とし、通過前後のナノポア近傍における挙動の情報は一切得られない。そこで、これを直接観察するアプローチとして、光学的手法が用いられている。たとえば、ノースカロライナ大のTimpらは、2次元レーザースキャンを行い、ナノポア周囲でのDNA挙動の可視化を実施した⁶⁾。その結果、ナノポア通過前のDNAは、ナノポアから数 μm 離れた領域でも電気泳動力と電気浸透流の影響を受けることを示した。しかしながら、この光学的手法では、強い電気泳動力、電気浸透流、界面相互作用を受け、劇的な挙動変化が予想されるナノポア近傍(数 μm 以内)での観察ができないことが課題である。そこで筆者らは、空間分解能サブ μm 、時間分解能100 μs を有する光学的観察手法を構築し、ナノポアごく近傍でのDNA通過ダイナミクスの可視化を試みた⁷⁾。まず、シリコンの紫外光に対する高い遮光性を利用することで、サブ μm の集光スポットをナノポア界面上に実現した。図2aに有限差分時間領域法による光強度分布の計算結果を示す。紫外光(波長:355 nm)を膜厚10 nmのシリコン薄膜に集光すると、薄膜上に直径280 nm、深さ140 nmの光スポットが形成されることがわかる。また、高い時間分解能を有するフォトンカウンティング法(図2b)を構築することで、100 μs の時間分解能で高感度な蛍光観察も可能とした。

光ディテクターから出力される電流パルス列(1パルスが1フォトン相当)を、大量メモリ搭載・高速A/D変換ボードに保存する。この保存波形のパルス数をLabviewプログラムで数えることで、時間分解能100 μs 以下でのフォトンカウンティング法を考案した。従来手法(既製のフォ

著者紹介 ¹長岡技術科学大学 産学融合トップランナー養成センター(特任講師)²慶應義塾大学 理工学部 電気情報工学科(教授) E-mail: saiki@elec.keio.ac.jp

トンカウンターを使用)では、ナノポア通過時の蛍光信号が単なるバースト(時間幅2 ms)として検出されたのに対し、本手法により、通過ダイナミクスを反映した波形(たとえば急峻な立ち上がりとなだらかな立ち下がり)が得られるようになった(図2c)。

この光学的手法を用いて、ナノポア近傍におけるDNA挙動のDNA長とナノポア膜特性依存性について究明した。まず、長さ10 kbpと48 kbpのDNAのナノポア通過を比較したところ、検出波形にDNA長依存性がみられた。理論計算との比較から、ナノポア近傍における非一様な静電場分布が影響し、長いDNAほどナノ

ポア通過後のドリフト速度が遅くなることを明らかにした⁷⁾。また、空孔率の異なる2つのポーラスナノシリコン薄膜を用いて実験を行ったところ、検出波形の膜特性依存性が見いだされた。この結果は、周囲のナノポアからDNAが受ける複雑な流体力学的相互作用による、DNAのナノポア通過速度の低下として説明できた(図3a)⁸⁾。さらに印加電圧の増加に伴い、蛍光信号のピーク強度が高くなることを見いだした。蛍光ピーク強度は光スポットにおけるDNAコイルの大きさ(スポットに小さく収まるほど蛍光強度は高くなる)を反映しており、ナノポア通過時に静電場を受け、DNAの収縮が起きていると解釈した(図3b)⁹⁾。以上の研究成果から、高空間・時間分解能を有する光学的手法がナノポア近傍におけるDNA挙動の観察に有効であることを示した。

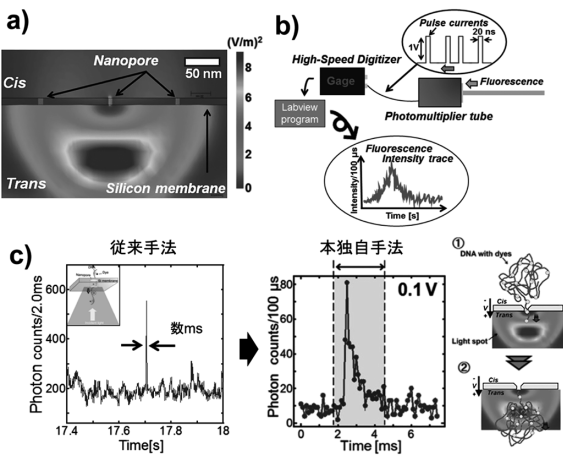


図2. a) 有限差分時間領域法によるシリコンナノ薄膜上の光スポットの電場強度分布. b) 時間分解フォトンカウンティング法の概略. c) 従来法と独自手法による検出波形の比較.

プラズモンを用いた一塩基分解能ラマン計測

ナノポアDNAシーケンサーの著しい技術進展を受け、修飾RNAの網羅的解析やアミノ酸配列解読への展開に期待が寄せられている。しかし、イオン電流変化を信号とする現状のナノポアシーケンサーでは多種の修飾RNAやアミノ酸の識別は容易ではない。この課題克服に対しては、単一塩基・アミノ酸分解能ラマン分光によるスペクトル情報の取得が有望である。ただし、ラマン信号は微弱であり、金属ナノ構造のギャッププラズモン(ホットスポット)を利用した電場増強効果による高分解能・高感度化が必須である。ただし一般的な認識では、たとえホットスポットを利用しても一塩基に相当するサブnmの空間分解能達成はほぼ不可能である。短鎖DNAラマン計測において一塩基分解能の達成を主張する研究報告が数例あるが^{4,10)}、高分解能の起源については満足のいく理解に至っていない。図4に示す金属ナノ粒子表面のアダトム(吸着原子)が形成する「ピコキャビティ」の寄与がその可能性として挙げられるが¹¹⁾、具体的な原子スケール

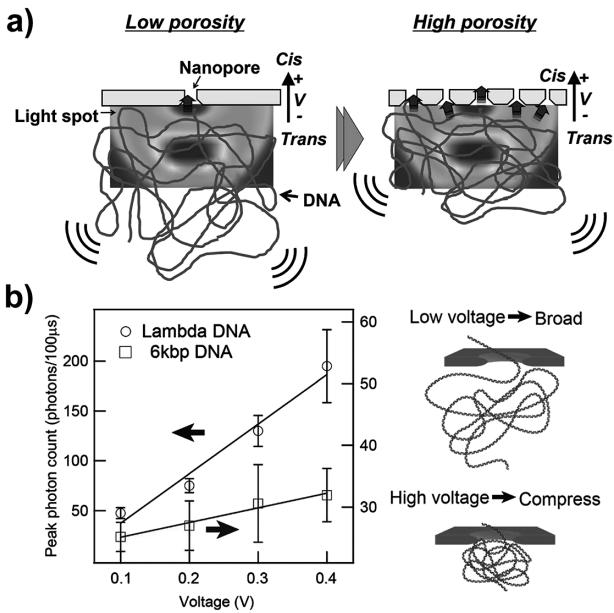


図3. a) ナノポア膜の空孔率の違いにともなうDNA通過挙動の差異. b) 蛍光信号ピーク強度の電圧依存性とナノポア通過後のDNA収縮による解釈.

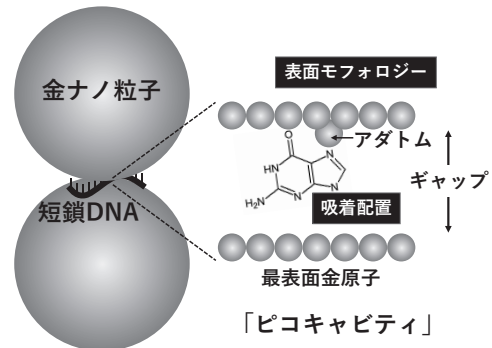


図4. 金ナノ粒子二量体のギャップにおけるピコキャビティの形成と一塩基分解能の可能性

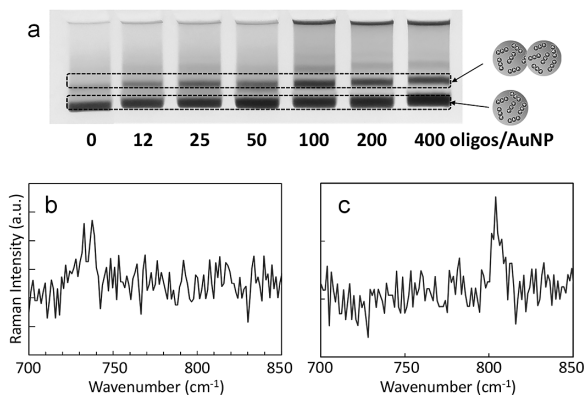


図5. a: 金ナノ粒子二量体作製後の電気泳動分離. b, c: AAA, CCCを挟み込んだ単一の二量体からのラマンスペクトル.

のモフォロジーやDNAのアダトムへの吸着配置の解明と最適化が必要である. ここでは, 水中にて金ナノ粒子二量体のギャップにピコキャビティを形成し, 一塩基分解能ラマン分光計測を試みた研究を紹介する.

直径40 nmの金ナノ粒子とオリゴヌクレオチド(短鎖DNA)を混合し, 塩による粒子間反発の低減と加温インキュベーションにより金ナノ粒子二量体を効率良く形成した. その際, 低pH下にてアデニンとシトシンをプロトン化し, 金ナノ粒子への吸着率を高めた. これまでの研究により, 高温インキュベーションによって金ナノ粒子間に架橋生成, すなわち金表面原子移動が短時間で生じていることを確認している. この事実は, インキュベーション温度を最適化することにより, 一塩基分解能・高ラマン増強度を達成する金表面モフォロジーとDNA吸着配置が形成される可能性を示唆する.

図5aにインキュベーション後の金ナノ粒子溶液の電気泳動写真を示す. アデニンが3つ連なったオリゴヌクレオチド(AAA)を混合した. 溶液中には二量体だけではなく, 孤立した金ナノ粒子(単量体)や三量体も含まれており, ゲル中の移動度の違いを反映して, それぞれバンドを形成している. 混合したオリゴヌクレオチドの濃度上昇とともに二量体, 三量体の生成効率が向上していることがわかる. 続いて, ゲルから二量体のみを回収し, 顕微ラマン分光測定を実施した. 水中をブラウン運動する二量体を観測対象とし, レーザー集光スポットを通過した瞬間に発するラマン散乱信号を検出した. なお, 二量体の濃度は薄く, スポット内に同時に複数の二量体が存在する確率は無視できる. 結果を図5bに示す. アデニンの呼吸モードに由来するピークが見えている. シングルショットの計測時間は100 msと設定したが, 粒子の拡散係数を考慮すると, 実効的には10 ms程度でラ

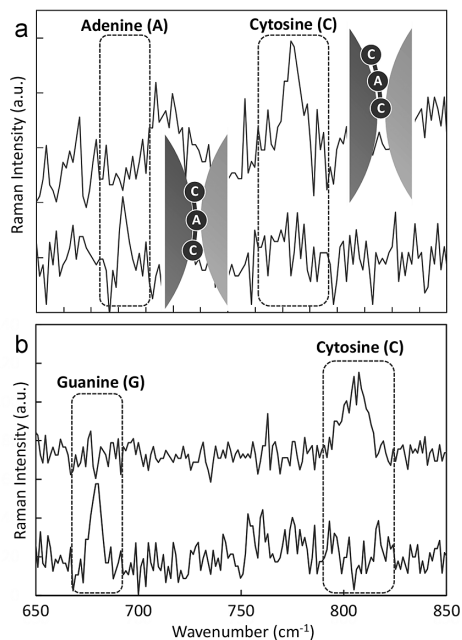


図6. a, b: 12C-A-12C, 12C-G-12Cを挟み込んだ単一の二量体からのラマンスペクトル

マンスペクトルを取得できている. ホットスポットに存在するオリゴヌクレオチドの数を評価することは難しいが, 数オリゴヌクレオチドを挟んだ単一の二量体からのラマン信号をミリ秒スケールで測定できていることは確実である. グアニン(GGG)を混合した場合も同様の結果を得ることができた(図5c).

続いて, 一塩基分解能の可能性を議論するため, オリゴヌクレオチドとして25塩基シトシン(C)の中央のみアデニンで置き換えたもの(12C-A-12C)を用意した. もし二量体ギャップにおけるホットスポットの広がり数が塩基にわたるのであれば, ラマンスペクトルはCのピークのみか, AとCのピークをともに含むことになる. 逆にAのみのピークが得られれば, ホットスポットが一塩基程度に局在していること, すなわち一塩基分解能が実現可能であることを支持する. 実際, シングルショット測定(100 ms測定)で得られた多数のスペクトルを精査すると, ある頻度でAからのピークのみを含むスペクトルが見つかった. 図6aはその一例である. Cのピークのみを含むスペクトルも併せて示している. AをGで置き換えた12C-G-12Cに対しても同様の結果を得ることができた(図6b). インキュベーション温度・時間やオリゴ, 塩を加えるタイミングなど, 最適化すべきパラメータが多く, 十分な再現性を得るには至っていないが, 一塩基分解能の実証実験としては一定の成果が得られたと考えている.

おわりに

本稿では、光学的測定の特長を活かしたDNA検出・分光手法を二例紹介した。ナノポア通過過程の観察に関しては、DNAを二色で染色し、通過前と通過後のダイナミクスを分離して可視化する実験を試みている。前後の挙動に相関が見られ、通過速度制御の重要なヒントになると期待している。一塩基分解能ラマン測定に関しては、短鎖DNAのみでなく、塩基にも立ち返りながら、ラマンスペクトルをもとに二量体ギャップ中（金表面に挟まれたサブナノ空間）での塩基の配置を議論している。アミノ酸、ペプチド、タンパクへの応用を見据え、第一原理計算や分子動力学を駆使したシミュレーションの援用が不可欠であると認識している。一塩基分解能達成はシーケンシング応用だけでなく、ピコキャビティをプローブとした生体分子ダイナミクス計測の基本原則としての可能性も秘めている。たとえば、観察対象分子を挟み込んだ金ナノ粒子二量体をナノポアで捕捉し、環境変化にともな

う分子の変形や配置変化をピコキャビティによるラマン測定で高感度に検出することができるであろう。

謝 辞

ここで紹介した研究成果はすべて、研究室の学生ならびに共同研究いただいた方々の努力とご尽力によるものであります。研究に携わったすべての方々に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Wanunu, M.: *Phys. Life Rev.*, **9**, 125 (2012).
- 2) McNally, B. *et al.*: *Nano Lett.*, **10**, 2237 (2010).
- 3) Ivankin, A. *et al.*: *ACS Nano*, **8**, 10774 (2014).
- 4) Huang, J. A. *et al.*: *Nat. Commun.*, **10**, 5321 (2019).
- 5) Wanunu, M. *et al.*: *Biophys. J.*, **95**, 4716 (2008).
- 6) Kurz, V. *et al.*: *ACS Nano*, **7**, 4057 (2013).
- 7) Yamazaki, H. *et al.*: *Appl. Phys. Exp.*, **9**, 017001 (2016).
- 8) Yamazaki, H. *et al.*: *Nano Futures*, **1**, 011001 (2017).
- 9) Yamazaki, H. *et al.*: *Analyst*, **144**, 5381 (2019).
- 10) Chen, C. *et al.*: *Nat. Commun.*, **9**, 1733 (2018).
- 11) Carnegie, C. *et al.*: *J. Phys. Chem. Lett.*, **9**, 7146 (2018).

膜タンパク質の機能改変とナノポアセンサへの応用

神谷 厚輝^{1*}・登坂 俊行¹

はじめに

ナノサイズの孔をもったナノポアタンパク質が、人工脂質二重膜に再構成されるとパッチクランプ装置において、そのナノポアの孔を通過するイオンを電流値として計測できる¹⁾。この方法では、ナノポアタンパク質を分子レベルで簡単に観察可能である。さらに、DNAなどの生体分子がちょうど通過できるポア直径をもつナノポアを用いると、生体分子がナノポアを通過するときにナノポアを閉塞する。その際、ナノポア内を流れるイオンの量が減少するため、電流値の低下が生じる。したがって、この電流値の低下によって生体分子が検出される²⁾。生体分子検出でもっとも研究が盛んなナノポアタンパク質として α ヘモリシンがある。 α ヘモリシンは細胞膜上で6量体と7量体を形成する³⁾。6量体と7量体ではナノポア直径が異なり、7量体のみ1本鎖DNAがちょうど通過できるポア直径である。 α ヘモリシンのような複数のサブユニットから形成されるナノポアは、さまざまな直径を形成してしまうため生体分子の検出の再現性を出すには、多くの実験回数を要する。そこで、筆者らは1本のポリペプチド鎖からナノポアを形成できるグラム陰性菌に存在するouter membrane protein (Omp) に注目して研究を行ってきた。本稿では、本研究室で行ってきたOmpの研究について解説する。

Outer membrane protein とは

大腸菌には、8–26本の β ストランドの β バレルからなる多様なOmpが存在する⁴⁾。またOmpの機能は、受動輸送、構造の完全性の維持、外膜の生合成と維持、宿主細胞の接着と侵入、バイオフィーム形成、細胞防御と非常に多様である。たとえば、14本の β ストランドが β バレル構造を形成するOmpであるOmpGは、栄養物、イオン、タンパク質を受動的かつ選択的に取り込む機能を有している。OmpGは単糖類から三糖類までの大きさの分子を取り込むことができ⁵⁾、透過分子の選択性の低さからバイオリジカルセンサなどの工学的な応用が期待される。

Outer membrane phospholipase A (OmpLA) の人工細胞膜への再構成

12本の β ストランドから形成されるOmpLAは、カルシウムイオン存在下で2量体を形成し、ホスホリパーゼ活性を有することが知られている⁶⁾。筆者らは、大腸菌で発現したOmpLAを精製し、人工細胞膜のパッチクランプ^{7,8)}でイオンがOmpLAを通過することを初めて明らかにした。すなわち、OmpLAもナノポアを形成していることが分かった。直径約10 μm の細胞サイズのリポソームにOmpLAを再構成して、リポソーム外液に蛍光分子のカルセインを加えると、時間が経つにつれ、リポソーム内にカルセインの蛍光が観察された。したがって、OmpLAのナノポアは、イオンだけでなく小分子の通過も可能である。

OmpLAの β バレルを繋ぐ両端のループ構造は、正電荷アミノ酸と負電荷アミノ酸の偏りが生じている。これを利用することで、配向性を制御してOmpLAをリポソーム膜に挿入できると考えた。たとえば、負電荷をもったリポソームでは、OmpLAのループで正電荷アミノ酸が存在する側からリポソーム膜に挿入される。逆に、正電荷をもったリポソームでは、OmpLAのループで負電荷アミノ酸が存在する側からリポソームに挿入される。各組成のリポソームにOmpLAを再構成後、リポソーム外液にプロテアーゼKを加えることで、リポソーム膜の外側に存在するタンパク質が分解される。ゲル電気泳動を行った結果、分解がOmpLAの配向によって予想されたタンパク質断片のバンドと一致した。すなわち、リポソームの表面電荷でOmpLAの配向性を制御できることを明らかにした。

次に、リポソームに再構成されたOmpLAのホスホリパーゼ活性を利用したリポソーム膜の出芽を観察した。OmpLA再構成リポソームにカルシウムイオンを加えるとOmpLAが2量体を形成することで、ホスホリパーゼ活性が活性化される。リポソーム膜内に存在するOmpLAがホスホリパーゼ活性を示すことで、リン脂質をリゾリン脂質と脂肪酸に分解する。カルシウムイオンの添加によりOmpLAが活性化してリポソーム膜内のリゾリン脂質と脂肪酸量が多くなると、リポソーム膜が不安定にな

*著者紹介 群馬大学大学院理工学府分子科学部門(助教) E-mail: kamiya@gunma-u.ac.jp
¹群馬大学大学院理工学府分子科学部門

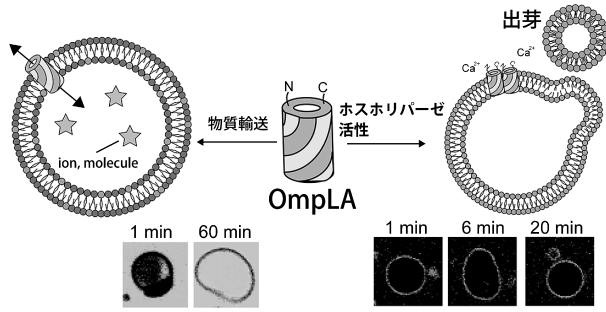


図1. リポソーム膜上でのOmpLAの機能. リポソーム膜上における物質輸送とリポソームからの小胞の出芽. 本図は、文献9を改変した.

り、細胞サイズのリポソームから小胞が出芽した(図1). したがって、OmpLAは1種類の膜タンパク質で2つの機能をリポソーム上で再現することができる、珍しい膜タンパク質である⁹⁾.

OmpGやOmpAの無細胞タンパク質合成とポア形成

OmpGやOmpAを調製するには、リフォールディングなど精製後に多くの処理が必要である. そこで、タンパク質を簡便に合成できる無細胞タンパク質合成系にて、ナノポアを形成したOmpGやOmpAを調製できるかを検討した. 一般的に、無細胞タンパク質合成系にて膜タンパク質を合成させるときは、人工細胞膜のリポソームを共存させることで、膜タンパク質の合成と同時にリポソームに膜タンパク質が組み込まれ、機能を有した膜タンパク質を得る¹⁰⁾. 筆者らも、リポソームを共存させ、機能を保持したOmpGやOmpAの合成を目指した. まず、リポソーム組成によるOmpGやOmpAの取込み量の違いを検討した. 方法として、ナノサイズのリポソームを共存させて無細胞タンパク質合成を行い、ショ糖密度勾配遠心により、リポソームに挿入されていないOmpGやOmpAとリポソームに分離した. その結果、大腸菌膜から抽出されたリン脂質から形成されたリポソームや大腸菌膜組成に似せた合成リン脂質からなるリポソームでは、多くのOmpGやOmpAがリポソームに挿入されることが明らかになった. そして、OmpGやOmpAを含むリポソームをパッチクランプ装置に接続した平面リン脂質二重膜に融合させ、OmpGやOmpAポア内を流れるイオンの電流値を計測することで、無細胞タンパク質合成系で合成したOmpGやOmpAがポアを形成するかを検討した. 大腸菌で合成させた後に精製したOmpGやOmpAと同程度の電流値が計測され(図2)、無細胞タンパク質合成系で合成されたOmpGやOmpAはリポソーム上でナノポアを形成することが明らかになった¹¹⁾.

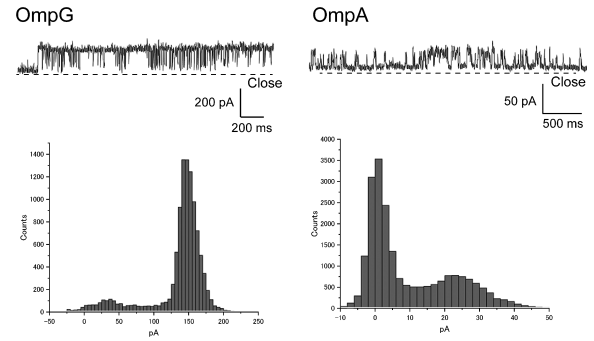


図2. 無細胞タンパク質合成系で合成させたOmpGとOmpAから得られた電流シグナル. 本図は、文献11を改変した.

OmpGのナノポア直径の改変

前述のように、OmpGは14本のβストランドからなるβバレル構造のナノポアを形成している. このOmpGのβストランド数を遺伝子工学的に増減させることで、OmpGのナノポア直径を変更できるのではないかと考えた. 戦略としては、OmpGのさまざまなドメイン部分に4本のβストランドを増加・減少させた(図3). 大腸菌にて発現させた改変OmpGを精製し、精製した改変OmpGのCDスペクトルの取得と人工細胞膜のパッチクランプ測定によって1分子の改変OmpGのナノポア内に透過するイオンを測定した. βストランド数の増減によって、改変OmpGのナノポア内を流れる電流値は、野生型OmpGと比べ変化した. 野生型OmpGの電流値は 130 ± 17 pAであったのに対し、4本のβストランドを増加させたOmpG+4β(+164-202)の電流値は 150 ± 18 pA、4本のβストランドを減少させたOmpG-4β(Δ1-80)およびOmpG-4β(Δ42-123)の電流値はそれぞれ 160 ± 22 pA、 110 ± 10 pAであった(図4). 当初の目論見通りに、βストランド数を増加させた改変OmpGは電流値が大きくなり、逆にβストランド数を減少させた改変OmpGは電流値が小さくなった. しかしながら、βストランド数の増減と電流値の大小が伴わない改変OmpGも存在した¹²⁾.

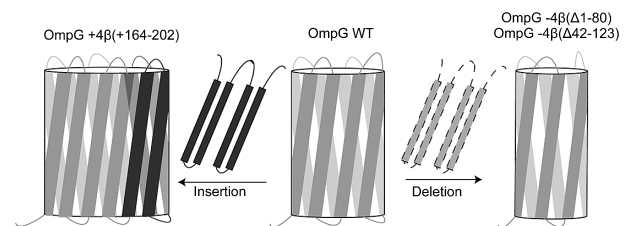


図3. OmpGのβストランド数を増減することでOmpGナノポア直径を改変. 4本のβストランド数を挿入したOmpG変異体と4本のβストランド数を削除したOmpG変異体を形成した. 本図は、文献12を改変した.

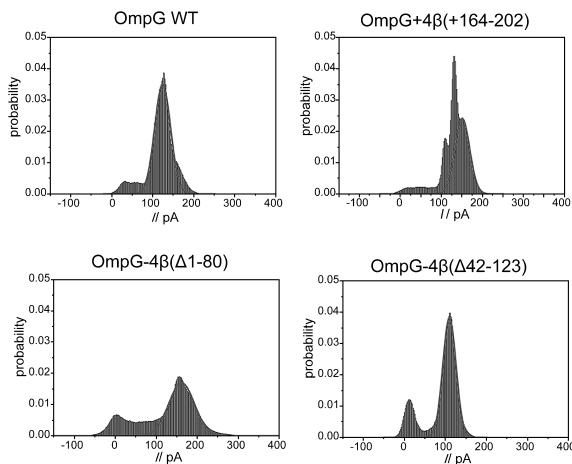


図4. 野生型および変異型のOmpG一分子から得られた電流シグナル. 本図は, 文献12を改変した.

次に, β ストランドの増減だけでは, OmpGのナノポアの電流値を制御できない理由を知るために, さまざまな分子量のポリエチレングリコール (PEG) を水溶液に加え, 人工細胞膜パッチクランプによって, OmpGの電流値変化からOmpGナノポアのポアサイズを推測した. PEGは非イオン性物質であるため, OmpGのナノポア直径よりも小さい直径のPEGは, OmpGのナノポア内に滞留しイオンの流れを阻害する. したがって, 電流値は減少する. 逆に, OmpGのナノポア直径よりも大きな直径のPEGは, OmpGのナノポア内に滞留しないためイオンの流れを阻害しない. したがって, 電流値の変化はない. この現象を利用し, 低分子量のPEGから電流値の測定を行い, 電流値の回復する分子量のPEGまで測定することで, ナノポアの直径を推測できる. 野生型OmpGでは分子量4000以下のPEGを添加した際に電流値の減少が見られ, 分子量6000以上のPEG添加により電流値が回復した. したがって, 野生型OmpGでは分子量4000程度のPEGに相当する大きさの分子までナノポア内に滞留させることができると考えられる. 同様に, OmpG+4 β (164-202)では分子量8000以下, 各OmpG-4 β では分子量2000以下のPEGの添加によりイオン電流値が減少する結果が得られた. 各OmpGにおける滞留させることができた最大サイズのPEGからOmpGのポアサイズを比較すると, OmpG+4 β (164-202)は野生型OmpGよりも大きく, 両OmpG-4 β は野生型OmpGよりも小さくなると推定された. ポアサイズの序列は大きい順にOmpG+4 β (+164-202), 野生型OmpG, OmpG-4 β (Δ 1-80)とOmpG-4 β (Δ 42-123)であり, ポアサイズが β ストランド数に依存する結果が得られた¹²⁾. このPEGによるOmpGナノポア直径の推測

結果のように β ストランド数に依存して電流値が変化したOmpGは, イオン透過性が高い序列いわば電流値が高い順に, OmpG+4 β (+164-202) (150 ± 18 pA), 野生型OmpG (130 ± 17 pA), OmpG-4 β (Δ 42-123) (110 ± 10 pA)であった. しかしながら, β ストランド数を4本欠損させたOmpG-4 β (Δ 1-80)の電流値は, 160 ± 22 pAとなりOmpG+4 β (+164-202)や野生型OmpGに比べ高い電流値を示した. 16本の β ストランドからなるOmpFやOmpCのポアサイズは14本の β ストランドからなるOmpGよりも小さいが, イオン透過性はOmpFやOmpCの方が大きい¹³⁾. これはナノポアタンパク質のイオン透過性の大きさはナノポアの大きさのみならず, ナノポア内表面に存在する電荷をもつアミノ酸残基も影響すると考えられる. OmpG-4 β (Δ 1-80)のポア内表面では野生型と比較してグルタミン酸残基の数が減少しており, 他のOmpGと比較してナノポア内表面の電荷バランスが大きく崩れている. OmpG-4 β (Δ 1-80)のイオン透過性の大きさはナノポア内表面と透過するイオンとの静電的相互作用が影響して野生型OmpGよりも大きくなったと考えられる.

改変OmpGのナノポアによる さまざまな形状のDNAの検出

α ヘモリシンのナノポアによる一本鎖DNAの検出を応用し, OmpGナノポアによるDNAの検出を試みた. α ヘモリシンのポア直径は, ちょうど一本鎖DNAが通過する大きさである. OmpGのポア直径は, α ヘモリシンのポア直径よりも大きいため, 二本鎖DNA(dsDNA)や分岐構造をもつ二本鎖DNAの通過を試みた. dsDNA存在下でのOmpGの電流シグナルは, OmpG固有の短い時間で浅い電流阻害シグナルの他に, 比較的長い時間で深い電流阻害シグナルが観察された. OmpG特有のcloseイベントとdsDNAの通過によるcloseイベントを区別するために, residual current (阻害時の残留電流率)が0.5以下, dwell time (closeイベント継続時間)が10 ms以上のイベントをdsDNAの通過によるcloseイベントとした(図5). ここで, open状態の電流値を I_{open} , 阻害イベント時の電流値を I_{block} とし, 両者の比 I_{block}/I_{open} をresidual currentとした. 印加電圧を+100 mVから+120 mVに上げて阻害イベントにおけるdwell timeの電位依存性を確認したところ, たとえば50 msを超える阻害イベントの割合は+100 mVと比較して+120 mVでは低下した. これは, 印加電圧を高くすることで負電荷をもつDNAが早くナノポア内を通過したためであると推測される. したがって, 野生型OmpGナノポア内にdsDNAが通過していることが確認された. ポアサイズが異なる改変型OmpGによるdsDNAの

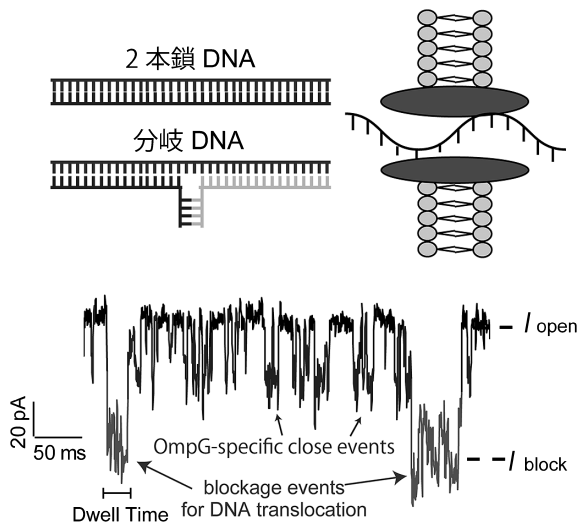


図5. 2本鎖DNAや分岐DNAをOmpGナノポアで検出(上段). OmpGナノポアを2本鎖DNA通過時の電流シグナル. 阻害が深く, 長い阻害シグナルがDNA通過である. 本図は, 文献12を改変した.

検出を行った. 野生型OmpGよりもポアサイズが大きいOmpG+4β(+164-202)でもdsDNAの通過シグナルが確認された. しかし, 野生型OmpGよりもポアサイズが小さいOmpG-4β(Δ42-123)ではdsDNAの通過シグナルが確認されなかった.

次に, T字型に分岐したdsDNAがOmpG WTやOmpG+4β(+164-202)のナノポアを通過するかを検討した. 分岐部分の長さを, 4塩基対, 10塩基対, 15塩基対にしたものを設計した. 野生型OmpGの場合, 4塩基対分岐DNAでは150秒間に100回の阻害イベントが, 10塩基対分岐DNAでは150秒間に57回の阻害イベントが観察された. 4塩基対分岐DNAのほうが, 10塩基対分岐DNAに比べ, 阻害イベントが多く, dwell timeが長く, residual currentが低かった(図6). したがって, 野生型OmpGは4塩基対分岐DNAまで通過可能であることが示された. また, OmpG+4β(+164-202)の場合, 4塩基対分岐DNAでは150秒間に107回の阻害イベントが, 10塩基対分岐DNAでは150秒間に171回の阻害イベントが, 15塩基対分岐DNAでは150秒間に57回の阻害イベントが観察された(図6). この結果から, OmpG+4β(+164-202)は10塩基対分岐DNAまで通過可能であることが示された. この実験から, ポアの直径の違いにより, 形状の異なるDNAを認識できる可能性を示した¹¹⁾.

まとめ

グラム陰性菌の外膜に存在するOmpの一種のOmpGについて, βストランド数を変えることでポア直径を改

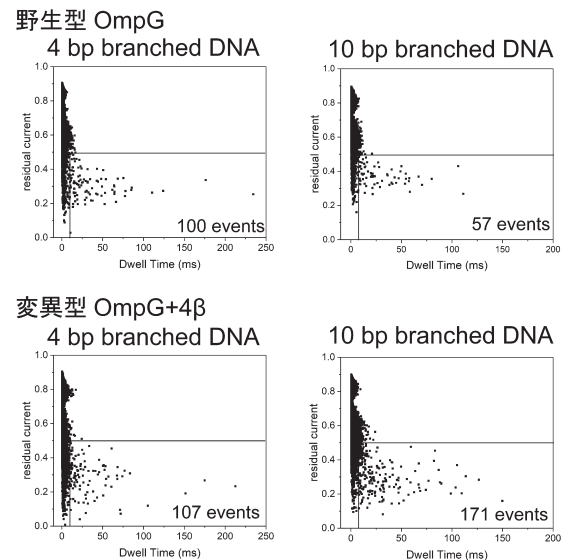


図6. 野生型OmpG(上段)と変異型OmpG(下段)の分岐DNAのresidual currentとdwell timeの散布図. 四角で囲まれた部分に存在する点が, DNAがナノポアを通過したイベントを表す. 本図は, 文献12を改変した.

変することに成功した. OmpGのナノポア内を通過するイオンの量は, ポア内部のイオンと接するアミノ酸残基の電荷に依存して変化することが分かった. ポア直径を改変したOmpGによって, さまざまな形状の二本鎖DNAの検出に成功した. さらに, 無細胞タンパク質合成によって合成したOmpAやOmpGのナノポアをリポソームに再構成し, 大腸菌で合成したOmpAやOmpGのナノポアと同等の電流値を示したことから, 無細胞タンパク質合成系で合成したOmpAやOmpGのナノポアのサイズは, 大腸菌で発現したOmpAやOmpGのナノポアのサイズと同等であった. この方法で, 自由自在にポアサイズを設計でき, なおかつ, 透過させる分子のみに特異性を持たせることができれば, 次世代のバイオロジカルセンサの創製に寄与する. Ompは他の膜タンパク質に比べ, 非常に熱安定性が高いことも大きな特徴である. したがって, 野外の環境センシングなどにも活用可能である. また, このナノポアをリポソーム膜や細胞膜に再構成することで, リポソームや細胞の内外の選択的な物質輸送を可能にし, バイオリアクタや細胞機能操作に資する材料にも活用可能である.

文献

- 1) Kasianowicz, J. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13770 (1996).
- 2) Crnković, A. *et al.*: *Life*, **11**, 27 (2021).
- 3) Furini, S. *et al.*: *Biophys. J.*, **95**, 2265 (2008).
- 4) Horne, J. E. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **295**, 10340 (2020).

- 5) Fajardo, D. A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **180**, 4452 (1998).
- 6) Dekker, N. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **272**, 3179 (1997).
- 7) Kawano, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 1995 (2013).
- 8) Kamiya, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 17498 (2018).
- 9) Ohnishi, S. Kamiya, K.: *ACS Synth. Biol.*, **10**, 1837 (2021).
- 10) Moritani, Y. *et al.*: *FEBS J.*, **277**, 3343 (2010).
- 11) Kamiya, K.: *Sci. Rep.*, **12**, 2376 (2022).
- 12) Tosaka, T. Kamiya, K.: *ACS Appl. Nano Mater.*, **5**, 6149 (2022).
- 13) Buehler, L. K. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **266**, 24446 (1991).

De novo 設計ナノポアの創製

新津 藍

近年の膜タンパク質の設計研究において、重要な標的となってきたのがナノポア構造である。ナノポア構造を人工設計することができれば、ポアのサイズや化学的特性を自由に改変することが可能になる。本稿では、自己会合してポアを形成する人工膜ペプチド・タンパク質の創出に焦点を当て、最近の研究例や設計に利用できるツールを紹介する。さらに、鍵となる設計指針についても議論する。

膜タンパク質設計とナノポア構造

タンパク質の設計には、天然のタンパク質を改変することで機能を損動・付与する方法と、一からアミノ酸配列を構築する *de novo* 設計がある。前者は α ヘモリシンをはじめとする天然タンパク質ポアの部分改変¹⁾や、Wzaなどの天然の膜貫通ポア部分を抜き出してアミノ酸配列アラインメントを実施することで得られるコンセンサス配列ペプチドポア²⁾などを例とし、ナノポア設計において広く行われてきた。一方、後者は膜貫通 α ヘリックスを束ねて作る人工イオンチャネルの研究に端を発し、40年程前から設計法が開発されてきた。本稿では、この *de novo* 設計に焦点を当て、人工ナノポア創製への応用について議論する。

膜タンパク質の *de novo* 設計には、2つの利点がある。まず、アミノ酸配列を設計し、その立体構造と機能を分析することで、配列—構造—機能相関を得ることができる点である。これは、膜タンパク質のフォールディングルールを理解する重要な情報となる。もう1つは、タンパク質の構造や機能を自在に改変することができるようになる。これは新しい膜タンパク質材料を創製する道を拓く。この2つの観点から、設計の標的としてこれまでもっとも注目されてきた構造の1つがナノポア構造である。その理由として、生物学的側面からは、イオンチャネルをはじめとする生命システムに欠かせない機能を持つタンパク質ポアの機能をボトムアップに理解したいという動機がある³⁾。また、タンパク質工学的側面からは、目的のナノポア計測に最適なポアサイズと化学特性を持つ構造を人工設計により作製したいという需要も大いにあった⁴⁾。さらに現実的な問題として、膜タンパク質の設計は水溶性タンパク質の設計と比べると、そのPDB

(Protein Data Bank) への登録数の差を反映して依然発展はゆるやかである⁵⁾。したがって、ペプチドやタンパク質を対称的に並べる比較的シンプルな設計によりイオンや分子の透過という機能が得られるナノポア構造は良い標的と言える。

ナノポア設計のアプローチ

De novo 設計ナノポアを実現するためには、水相・脂質膜表面・疎水相と異なる環境を貫通するペプチドやタンパク質を決まった数、決まった配置で並べる必要がある。ここで鍵となるのが、それぞれの環境において最適なバランスで疎水性相互作用と極性残基間相互作用(水素結合・塩橋・cation- π など)をもつ一連のアミノ酸配列を設計することである。これは簡単な問題ではなく、これまで多様なアプローチにより安定な人工ナノポアを目指した設計が行われてきた(図1)。

配列パターンニング設計 タンパク質 *de novo* 設計の手順は、まず骨格構造を設計し、次にそれを満足するような側鎖の組合せを選択していく。計算機が発達する以前からタンパク質設計において行われてきた手法としては、骨格構造に特定の配列パターンを持つ天然の構造モチーフを選択し、アミノ酸配列を最適化していく配列パ

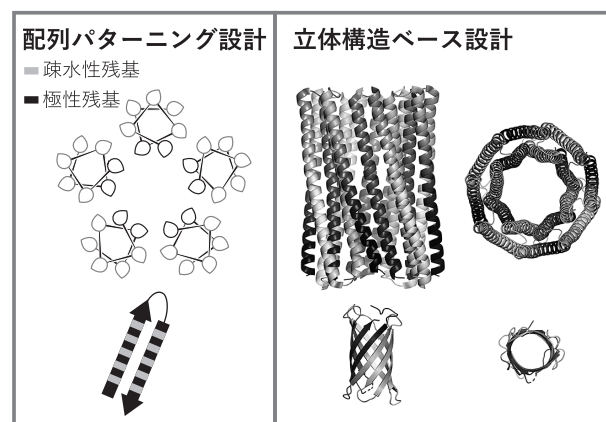


図1. ナノポア設計の例。(左)疎水性残基と極性残基を規則的に配置する配列パターンニング設計の例。上段は5量体コイルドコイル構造のヘリカルホイール、下段は β ストランド。(右)計算機を用いた立体構造ベースの設計例。上、下はそれぞれPDBIDが5M6Z, 6X9Z。左側が膜断面、右側が膜垂直方向から見た構造。

ターニングが挙げられる。ナノポアの基本構造は、 α ヘリックスもしくは β ストランドをサブユニットとしたバレル(筒形)構造である。DeGradoらのグループが報告した、もっとも初期の*de novo*設計ナノポアは、 α ヘリックスペプチドをサブユニットとしていた³⁾。このペプチド設計では、疎水性残基がポアの外向き・親水性残基がポアの内向きとなり、かつ7回繰り返しパターンとすることでコイルドコイル構造を指向するよう配列パターンニングされた(図1左上)。平面膜を用いた電流測定により、設計ペプチドはイオンを透過できるチャネルを形成することが確認されている。一方、 β ストランドペプチドをサブユニットとしたナノポア設計は試料の凝集が起りやすく挑戦的であるが、配列パターンニング(図1左下)によって β バレル構造を形成するペプチドが得られることが近年川野らのグループから報告された⁶⁾。タンパク質*de novo*設計において骨格構造は自由に選択できるように見えるが、実際にフォールディングできる“現実的な”骨格構造は限られており、それを最初のステップで絞り込むことが重要であると指摘されている⁷⁾。配列パターンニングでは骨格構造を天然に存在する構造に限定していることから、その点では設計の成功率を高めるアプローチとなっている。

計算機を用いた配列スクリーニング 近年では、アミノ酸配列の組合せを広く探索して最適化するために、計算機を用いた設計法が開発されてきた。その設計法は、大きく2つに大別される：

(A. 配列ベース) 配列パターンニングを発展させて配列組合せを計算機で生成しスコアリングする手法

(B. 構造ベース) アミノ酸配列のランダム探索と立体構造モデリングを同時に行って構造モデルの安定性をスコアリングする手法

Aは短いモチーフ配列を探索するのに有効である。たとえば、コイルドコイル構造の繰り返し単位である7残基の配列を計算機により生成し、コイルドコイルの安定性を予測するbZipスコアを利用してスクリーニングすることで、非常に安定な水溶性バレル構造を構築する手法がWolfsonらのグループにより開発された⁸⁾。Bでは、骨格構造は“現実的”であれば天然構造に存在する必要はなく、リンカーも含めた長いアミノ酸配列をスクリーニングすることができる。これはBakerらにより開発されたRosetta⁹⁾が主流となり、現在広く設計に利用されている。ここで、A・Bの手法は共に、水溶性タンパク質を設計標的として開発がスタートしている。これらの方法を膜タンパク質、特にナノポア設計に応用するためには脂質二重膜環境を設計に導入する必要がある。これ

まで多くの場合、膜環境はアミノ酸配列の中に仮想的に組み込まれてきた。まず、水溶性タンパク質として配列スクリーニングを行った後に、ポア構造の外側にありサブユニット間の相互作用に関わらないアミノ酸残基を脂質ヘッドグループ近傍は芳香族アミノ酸、疎水相には疎水性アミノ酸、水相にはカチオン・アニオン性アミノ酸、といった配置になるように置き換えて最適化を再度実施する。この戦略を用いて、筆者はScottらと共同し、Aの配列スクリーニングを適用することで安定な α ヘリックスペプチドチャネルが構築できることを報告した¹⁰⁾(詳細は後述する)。BakerらはBのRosettaを用い、リンカーで繋がる長い4回膜貫通モノマーを設計することでサブユニット間の相互作用面を大きくし、 α ヘリックスを基礎とするタンパク質ポアを構築した¹¹⁾(図1右上)。また β ストランドがすべてリンカーでつながる β バレル構造の設計¹²⁾(図1右下)にも同様の戦略で成功している。

もう1つ膜環境を導入する方法としてとられているのが、構造モデリングの際の溶媒和スコアに仮想膜のスコアリング関数を組み込む戦略である。こちらの方が理にかなっているように思われるが、実際には水溶性タンパク質に比べて考慮すべきパラメータが多い膜タンパク質の構造安定性について正しく評価できるスコアリング関数は、未だ発展途上にある。Rosettaの膜タンパク質オプションとしてRosettaMPが公開されているが、これまでは主に天然の膜タンパク質構造モデリングに活用されてきた。最近Fleishmanらは、膜タンパク質の膜挿入アッセイ実験データを基に改良したRosettaスコアリング関数¹³⁾を用いて[GAS]xxx[GAS]モチーフを持つ α ヘリックスペプチド2量体および3量体を*de novo*設計した¹⁴⁾。今後より大きな構造への応用可能性について検証が待たれる。

設計に利用できるソフトウェア

前項で紹介したRosettaの他にも、タンパク質設計を支援するソフトウェアツールが公開されている。ここでは最近のものを中心に紹介する。注意点として、これらのツールは膜環境をスコアリング関数に組み込んでいない。したがって、ナノポア設計においては最初に水溶性として設計した構造を前述のように膜貫通構造に改変するなどの工夫が必要となる。

骨格構造を角度や距離などのパラメータで表現して設計を行うのに便利なのがISAMBARD¹⁵⁾である。ISAMBARDは構造分析の機能もあり、高分解能構造や分子動力学計算などから得られたタンパク質・核酸の立体構造のパラメータを計算し、設計の起点とすることもできる。特に

コイルドコイル構造の設計がしやすくなっていて、コイルドコイルに特化したモデリング機能をブラウザ上で簡単に動かせるツールとして、CCbuilder2.0¹⁶⁾も公開されている。最近開発されたDamietta¹⁷⁾は、スコアリング関数に分子動力学計算の力場を参考にしたパラメータを用いて精度を高め、さらにエネルギー計算をテンソル化して高速モデリングを実現している点の特徴である。dTERMen¹⁸⁾は、スコアリング関数として天然のタンパク質構造に存在する配列-立体構造モチーフとの相同性を指標にしている点でユニークである。このツールでは、構造モチーフを探索するデータベースを膜タンパク質のみにすれば膜タンパク質設計にも応用できると期待される。また、dTERMenでは、アミノ酸残基をノード、残基間相互作用をエッジとしたグラフとしてタンパク質の構造モチーフを表現し、PDBを参照データベースとしている点で、構造予測におけるブレイクスルーであるAlphaFold2¹⁹⁾と共通点がある。AlphaFold2もしくはRosettaFold²⁰⁾のタンパク質の*de novo*設計への応用可能性としては、最近では機械学習を用いて骨格構造を生成するRF Diffusion²¹⁾との組み合わせが注目されている。ナノポア設計の観点では、ColabFold²²⁾上で使えるAlphaFold-multimerによる会合体予測やRF Diffusionの会合体生成を活用することで、ペプチド・タンパク質バレル構造の設計が可能となるかもしれない。現状では、サブユニットの相互作用面が小さい場合に構造予測精度は低くなる可能性があり、また、人工配列の膜タンパク質がどこまで正確に予測できるかという点も未知数であるため、今後設計から実験まで系統的に行って検証を進める必要があるだろう。

ナノポア *de novo* 設計の課題

最後に筆者が設計を行ったペプチドポア¹⁰⁾を例にとって、そこから見えるナノポア *de novo* 設計の今後の課題について議論したい。本研究では、先に述べた計算機を用いたコイルドコイル構造の配列スクリーニング (A) により設計を行った (図2)。

まず、以前設計された水溶性の *de novo* 設計 α ヘリックスバレル⁸⁾のアミノ酸配列を起点とした。水溶性のペプチドバレルは疎水性残基が内側を向いて強固なパッキングを形成しているため、7残基の繰り返し配列 (*hpphhph*, *h*: 疎水性残基, *p*: 極性残基) \times 5個のうち2個のみについてバレルの内向きのアミノ酸残基を極性残基の Thr と Ser に置き換えた (*TppShph*) とし、水中で安定に6量体を形成し続けた。得られた6量体の結晶構造では、Thr と Ser が水を含んだ水素結合ネットワーク形成が観

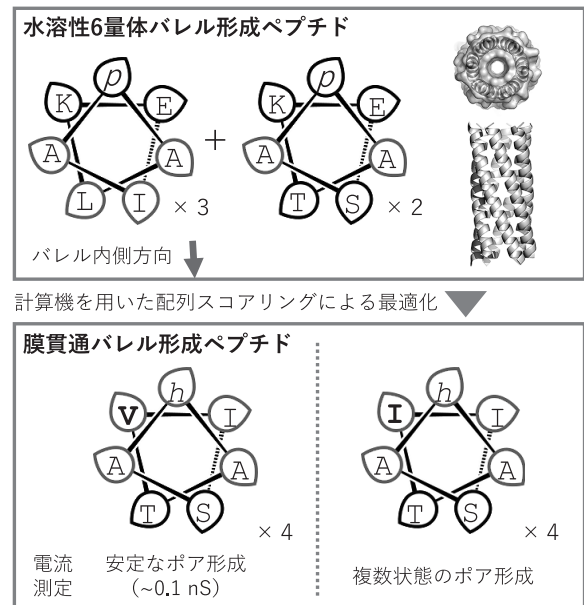


図2. コイルドコイル構造を基盤としたポアを形成する膜貫通 α ヘリックスペプチドの設計の流れ。ヘリカルホイールはコイルドコイルの7残基繰り返し配列を示し、下方向の残基が内側を向いてバレル構造を形成するように設計している。上段右は水溶性ペプチド6量体の結晶構造 (PDBID:6YB0)。pは極性残基、hは疎水性残基。

測された。続いて、この水素結合を維持しながら配列を膜貫通とするためにバレルの外側を向くアミノ酸を疎水性残基に置き換えた (*ThhShhh*)。ここでさらにコイルドコイル構造の安定性スコアを指標に配列スクリーニングを実施したところ、もっとも高スコアだった配列は *TVISAhA* であった。そこで、脂質二重膜に貫通する長さとなるように7残基 \times 4の28残基のペプチド配列を設計した。ここで残る *h* はペプチド相互作用に寄与せず外側を向いている残基であることから、膜表面に位置する部位2か所には Trp、疎水相に位置する部位2か所には Leu を配置して膜貫通トポロジーを指向した。また、N末端に4つの Lys を付与することで膜への挿入方向が一定となるようにした。こうして得られたペプチドは、平面膜での一分子チャンネル電流測定において単一サイズの安定なポアを形成しイオンを透過できることが確認され、これまで挑戦的とされてきたペプチドを基盤とする安定なイオンチャンネルの設計が達成された。さらにここで興味深い知見として、配列スクリーニングではやや低スコアだった類似配列 (*TIISAhA*) のペプチドでは、多様な異なるサイズのポア形成が観測された。Val と Ile という側鎖構造のわずかな違いが、バレル構造の安定性を大きく分けたのである。ここから明らかになったのは、水素結合ネットワークと最適化されたペプチド間パッキ

ングの両者がそろって初めて安定なペプチドバレル構造が得られること、さらに十分安定なパッキングを与えるアミノ酸配列スペースは非常に狭いことの2点である。後者についてはこれまでの筆者のコンセンサス設計ペプチドポア的设计過程²⁾やDeGradoらのグループによる疎水性残基のパッキング最適化を行った膜ペプチド5量体の設計過程²³⁾においても、同様の知見が得られている。そこで、より一般的に言い換えると、既存の*de novo*設計法で得られる膜タンパク質は設計された水溶性タンパク質とは異なり、天然のタンパク質が有する *marginal stability* から脱していないことが示唆される。これをどのように解決していくかが、今後自在に膜タンパク質・ナノポアを*de novo*設計できるようになるための課題であると考えられる。

今後の展望

この課題へアプローチする方法を考察する。まず、既存の構造モデリングでは計算効率を向上して多くの配列候補を高速にスクリーニングする必要があるため、仮想的な膜環境のスコアリング関数が用いられている。しかしながら言うまでもなく、実際の脂質二重膜は脂質分子が流動性や伸縮性を持ち、タンパク質との相互作用によって動的に構造変化する。したがって、仮想膜環境で一次配列スクリーニングを行った後に、脂質分子を露わに組み込んだ構造モデリング、たとえば、分子動力学計算を用いた二次スクリーニングを行うことで設計の成功率向上につながると期待される。計算時間は長くなるが、一般に時間がかかる膜ペプチド・タンパク質実験の手間を最小に抑えることで、トータルの効率も向上すると考えられる。また、設計膜タンパク質が *marginal stability* から脱していないことを逆手にとり、分子動力学計算を導入することで、準安定状態を設計することもできるようになるかもしれない²⁴⁾。冒頭で述べたナノポア設計の当

初の目標の一つに立ち返ると、外部シグナルによって開閉するイオンチャネルの機構を設計によって理解するためには、準安定状態の設計が必須である。そこから発展すれば、必要に応じて開閉するナノポア計測のための新しいタンパク質の設計への道筋も開けてくるだろう。

文 献

- 1) Ayub, M. and Bayley, H.: *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **34**, 117 (2016).
- 2) Mahendran, K. R. *et al.*: *Nat. Chem.*, **9**, 411 (2017).
- 3) Lear, J. D. *et al.*: *Science*, **240**, 1177 (1988).
- 4) Niitsu, A. *et al.*: *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **372**, 20160213 (2017).
- 5) Korendovych, I. V. and DeGrado, W. F.: *Q. Rev. Biophys.*, **53**, e3 (2020).
- 6) Shimizu, K. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **17**, 67 (2022).
- 7) Pan, X. and Kortemme, T.: *J. Biol. Chem.*, **296**, 100558 (2021).
- 8) Thomson, A. R. *et al.*: *Science*, **346**, 485 (2014).
- 9) Leman, J. K. *et al.*: *Nat. Methods*, **17**, 665 (2020).
- 10) Scott, A. J. *et al.*: *Nat. Chem.*, **13**, 643 (2021).
- 11) Xu, C. *et al.*: *Nature*, **585**, 129 (2020).
- 12) Vorobieva, A. A. *et al.*: *Science*, **371**, eabc8182 (2021).
- 13) Weinstein, J. Y. *et al.*: *PLOS Comput. Biol.*, **15**, e1007318 (2019).
- 14) Elazar, A. *et al.*: *Elife*, **11**, e75660 (2022).
- 15) Wood, C. W. *et al.*: *Bioinformatics*, **33**, 3043 (2017).
- 16) CCBuilder 2.0: <http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/ccbuilder2/builder> (2023/4/30).
- 17) Max-Planck-Gesellschaft Damietta: <https://www.bio.mpg.de/damietta> (2023/4/30).
- 18) Zhou, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 1059 (2020).
- 19) Jumper, J. *et al.*: *Nature*, **596**, 583 (2021).
- 20) Baek, M. *et al.*: *Science*, **373**, 871 (2021).
- 21) RosettaCommons/RFdiffusion: <https://github.com/RosettaCommons/RFdiffusion> (2023/4/30).
- 22) Mirdita, M. *et al.*: *Nat. Methods*, **19**, 679 (2022).
- 23) Mravic, M. *et al.*: *Science*, **363**, 1418 (2019).
- 24) Niitsu, A. and Sugita, Y.: *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **25**, 3595 (2023).

DNA コンピューティング技術と ナノポア計測を組み合わせた体液診断技術

竹内 七海¹・滝口創太郎¹・神原 史佳¹・川野 竜司^{1*}

はじめに

自然界では「情報」を「物質」に埋め込んで(符号化して)利用している。低分子を想定したケミカルスペース(理論的に想定可能な分子の種類)は 10^{60} と推定されており¹⁾、実際の分子の数はケミカルアブストラクトサービス(CAS)の登録数をみると現在 2×10^8 を超えている²⁾。では、この膨大な種類の候補「物質」に具体的にどのようにして「情報」を符号化するのか?自然界では情報を物質の並び方・順序として埋め込む例が多数あり、これを利用した情報処理は自然計算と呼ばれている³⁾。

情報・計算では、順序とその保持が重要であると考えられている。これは、たとえばアルファベットのことを考えるとわかりやすい。情報は複数のアルファベットの順序として埋め込まれ、それを保持することで伝達が可能となる。生物ではこの情報の順序と保持を5種類の核酸塩基と、20種類のアミノ酸を用いて行っている。特にDNAは4種類の塩基ATGCを用いて遺伝情報を保存、伝達している。DNA コンピューティングは、このDNA分子を用いた情報処理技術であり、自然計算の代表的な分野:分子コンピューティングの一種である。

DNA分子による計算は、主に任意の情報を符号化(エンコード)したDNA鎖の結合・解離、また酵素反応を組み合わせた化学反応により情報処理を行う。分子が計算を行うので、入力・出力ともDNA分子の配列や構造といった形で行われる。ここで分子にエンコードされる出力情報は人間が認識できる形にデコードされないと使うことができないため、核酸増幅やゲル電気泳動、出力したDNA鎖に結合する蛍光プローブなどを用いるのが一般的である。本稿では、近年電気的一分子計測法として注目されているナノポア計測をDNA コンピューティングにおける出力情報のデコーディングとして利用する手法について概説する。また、このナノポアデコーディングを体液診断など医療応用へと展開する取組みに関しても、最新の知見について紹介したい。

デコーディング手法としてのナノポア計測

核酸分子を高感度・電氣的・ラベルフリーに検出できる技術として、ナノポア計測がある。ナノポア計測では、ナノサイズの孔(ナノポア)を通過した分子を電氣的に検出するため、検出分子とポア直径のサイズ親和性が検出シグナルのS/N比に重要である。狭窄部の直径が1.4 nmのチャネル膜タンパク質 α -hemolysin (α HL) (図1a)は、そのサイズから核酸検出に優れたナノポアとしてよく用いられてきた。本項では、筆者らが提案してきたマイクロデバイス中でのナノポア計測法⁴⁾とデコーディング手法への応用戦略⁵⁾について概説する。ナノポア計測では二つのチャンバーを持つマイクロデバイス中で脂質の単分子膜で覆われた液滴を接触させる「液滴接触法⁴⁾」により、接触界面に脂質二分子膜を作製する(図1b)。ここに α HLが再構成されるとナノポアを通過したイオンにより電流値が上昇する(図1c)。 α HLよりサイズの小さい一本鎖DNA ($\phi \approx 1.0$ nm) は電位勾配下で瞬時にナ

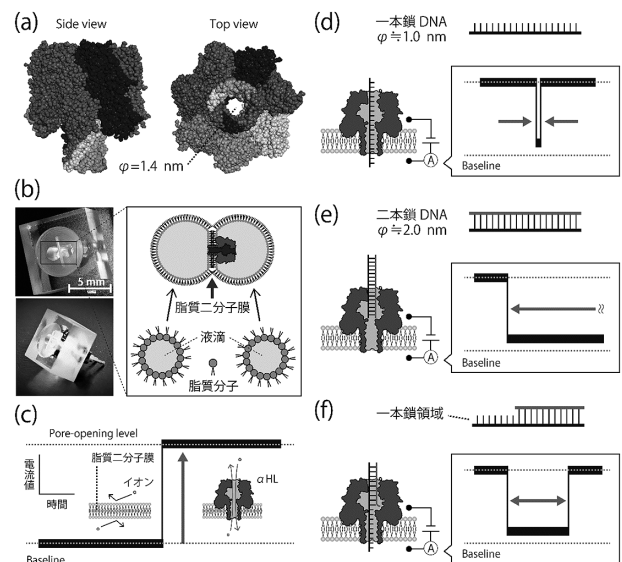


図1. (a) チャネル膜タンパク質 α -hemolysin (α HL, PDB ID: 7AHL) の構造, (b) ナノポア計測用マイクロデバイスと液滴接触法, (c) α HLの再構成による電流値の上昇 (d–f) α HLを用いて各構造の核酸分子を検出した際に得られる電流阻害シグナル

*著者紹介 東京農工大学大学院生命工学専攻(教授) E-mail: rjkawano@cc.tuat.ac.jp
¹東京農工大学大学院生命工学専攻

ノポアを通過し、一過的にイオンの流れが遮断された結果として時間の短い電流阻害シグナル (= 核酸検出シグナル) が得られる (図1d). 一方で、サイズの大きな二本鎖DNA ($\phi \approx 2.0$ nm) は α HLの狭窄部に詰まり、時間の長い電流阻害シグナルとして検出される (図1e). また二本鎖DNAの末端に一本鎖領域を持たせると、一本鎖領域からナノポアに挿入された場合に電位勾配下で二本鎖領域を解離しながらゆっくりとナノポアを通過する (図1f). この通過時間は電流阻害シグナルにおける阻害時間であり、二本鎖領域の熱力学的安定性 (ギブズ自由エネルギー: ΔG) に依存する⁹⁾. 以上のように、 α HLナノポアによる核酸検出シグナルには、検出された核酸分子の構造情報が反映される. また核酸分子の構造を塩基配列から人工設計するツールは充実しており、特に熱力学シミュレーションNUPACK⁷⁾では得られた分子構造の ΔG も算出できる. そこでDNAコンピューティングの出力情報を核酸分子の構造情報に落とし込む配列設計ができれば、ナノポア計測における電流阻害シグナルから出力情報 (= 構造情報) を電氣的・ラベルフリーにデコーディングできると考えた.

論理演算のデコーディング はじめに、入出力の情報を0, 1で扱うシンプルなDNA論理演算 (NAND回路) の実装とナノポア計測によるデコーディングに取り組んだ⁸⁾. 出力情報としてのDNA分子がポアに詰まる二本鎖もしくはポアを通過できる一本鎖・一本鎖領域を持つ二本鎖を形成するよう、入力DNAを配列設計した. これにより、ナノポア計測で出力分子を検出した際に時間の長い/短い電流阻害から出力0, 1を容易に見分け (図2a), 計算からデコーディングまでを約10分で実装した. 次に、より高度な情報処理として酵素反応を組み込んだAND回路の実装とデコーディングに取り組んだ⁹⁾. 出力1として転写反応により一本鎖RNAが増幅される分子反応系を設計することでRNA検出シグナルの頻度から出力0, 1を見分け、約1時間での情報処理に成功した (図2b).

並列計算のデコーディング DNAコンピューティング提唱者であるL. M. Adlemanが実装したDNA並列計算についても、ナノポア計測による出力情報のデコーディングを試みた¹⁰⁾. Adlemanは有向グラフの都市・経路の情報を符号化したDNAを配列設計することで、有向ハミルトン閉路問題 (巡回セールスマン問題のように各都市を一筆書きで巡回できる経路を探索する組合せ最適化計算) を解いてみせた¹¹⁾. 本研究では、出力分子の末端構造としてヘアピンと一本鎖領域を形成するよう計算用DNA (都市・経路) を配列設計した. これにより出力分子は図2cのような構造を取り、一本鎖領域から

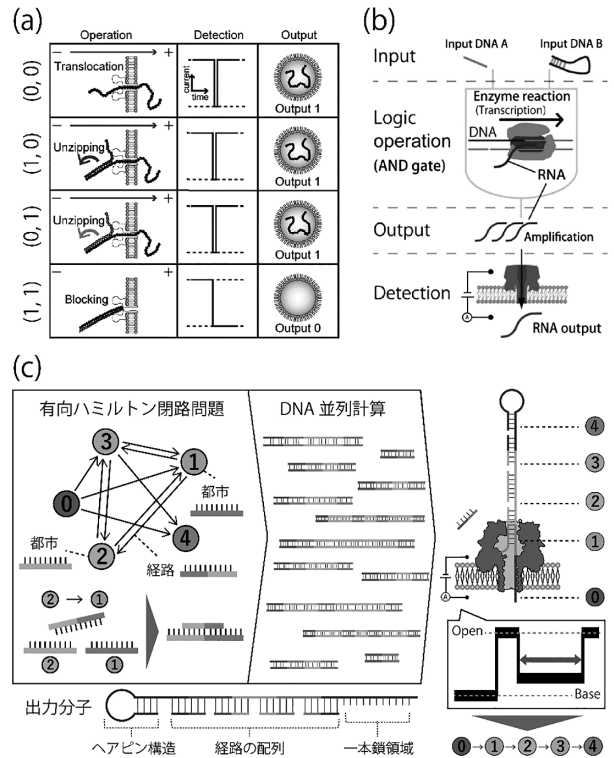


図2. ナノポア計測によるDNAコンピューティング出力情報のデコーディングに関する研究. (a) NAND回路, (b) 酵素反応を含むAND回路, (c) 有向ハミルトン閉路問題 (並列計算).

ナノポアに挿入されて電位勾配下で結合した相補鎖を解離しながらゆっくりとナノポアを通過できる. この通過時間が出力分子の ΔG と相関することを利用して、電流阻害時間の統計解析と熱力学シミュレーションの結果から出力情報のデコーディングに成功した (図2c).

以上より、筆者らが開発してきた手法を用いてさまざまなDNAコンピューティングの出力情報を電氣的・ラベルフリーにデコーディングできることを示した. またDNA分子にコードされた出力情報を電気信号へと変換可能なナノポア計測は、DNAコンピューティングと電子回路によるコンピュータの橋渡しになると期待できる.

体液診断への応用に向けて

DNAコンピューティングは、前述のような情報科学的研究だけでなく、DNA分子の生体親和性を利用した診断・治療などの医療応用が期待されている. 本項では、DNAコンピューティングをナノポア計測と組み合わせることで体液診断に応用する研究を紹介する. ここでの標的バイオマーカーであるmicroRNA (miRNA) は20塩基程度の小さなRNA分子であり、がんにおいては複数種類のmiRNAが同時に発現上昇・発現減少するため、miRNAの発現パターン認識が診断に有用である¹²⁾.

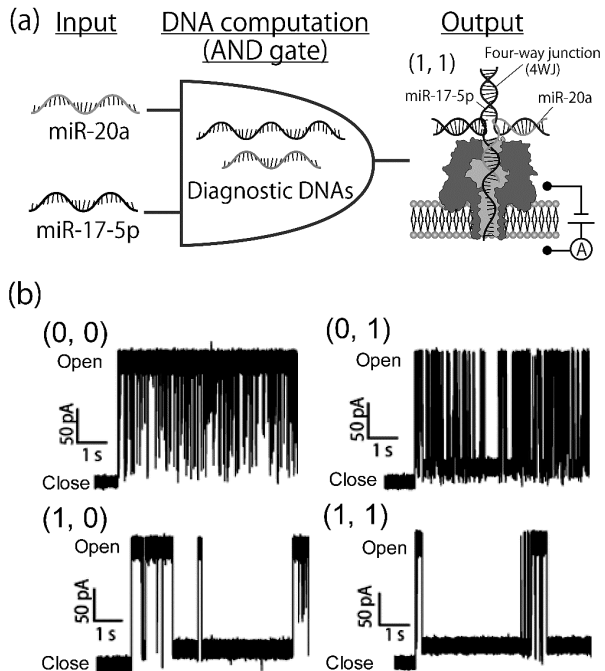


図3. AND回路による小細胞肺癌診断. (a) AND回路と出力分子(4WJ)の構造, (b) 各入力パターンにおける電流阻害シグナル.

AND回路によるがん診断 DNA コンピューティングを用いた複数miRNA検出の第一歩として、小細胞肺癌で特異的に過剰発現する2種類のmiRNA (miR-20a, miR-17-5p) を入力とするAND回路 (図3a) を構築した¹³⁾. それぞれのmiRNAについて存在する/しない場合を1/0とし、入力が(1, 1)の場合にのみ入力miRNAと設計した診断用DNAが四つ又構造(4WJ)を取り、ナノポアに詰まる。それ以外の入力では4WJは形成されず、短い電流阻害時間が得られる。結果、入力(1, 1)の場合にもっとも長い電流阻害時間が観察され (図3b), 小細胞肺癌のmiRNA発現パターンを識別することができた。

5種類miRNA同時検出によるがん診断 miRNAのより複雑な発現パターン認識を目指し、胆管がんで特異的に発現上昇する5種類のmiRNA (miR-193, miR-106a, miR-15a, miR-374, miR-224) の同時検出を試みた¹⁴⁾. 5種類のmiRNAと同時に結合できる診断用DNA (図4a) を用いて、miRNAを入力分子、診断用DNAを計算実行分子、診断用DNA/miRNA二本鎖分子を出力分子とする並列計算を行った。診断用DNAは一本鎖領域からポア内に侵入し、miRNAとの結合をほどこしながらポア内を通過する。「がんのパターン(5種類のmiRNAが発現)」と「その他のパターン(1種類または3種類のmiRNAが発現)」についてナノポア計測を行ったところ、「がん

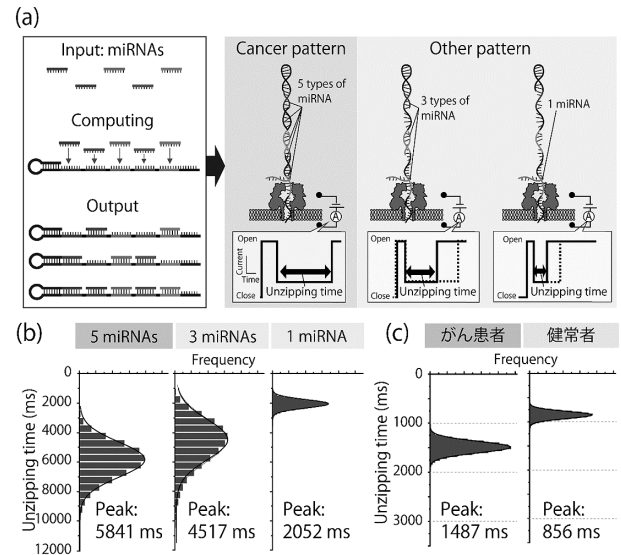


図4. 5種類miRNA検出による胆管がん診断. (a) 診断用DNAによる並列計算とナノポア計測の様子, (b) 各入力パターンにおける電流阻害時間, (c) 実検体における電流阻害時間.

のパターン」でより長い通過時間が得られた (図4b). 続いて実際の検体を用いて本手法の有効性を検証した。健康者、胆管がん患者の血漿検体からシリカカラムを用いてmiRNAを抽出し、診断用DNAを添加して並列計算を行った。ナノポア計測の結果、がん検体でより長い通過時間が観察され (図4c), miRNAの発現パターンから胆管がんを識別することに成功した。

おわりに

本稿では、人工配列設計したDNAを分子計算機として扱うDNAコンピューティングと呼ばれる研究分野を紹介するとともに、ナノポア計測によるDNAコンピューティング出力情報のデコーディングと病理診断への応用について概説した。ナノポア計測は分子に符号化された情報を電気信号へと変換するため、自然計算と電子回路によるコンピュータの橋渡しなど、さらなる応用展開が期待できる一方で、本稿で紹介したような実験系は習熟したスキルを必要とする。最近では使用方法がプロトコル化されたナノポア計測デバイスが市販されており、産業界のサポートが本稿で紹介した技術を実用化する足掛かりとなり得る。特に、Oxford Nanopore Technology社のマルチプレックスに計測ができるポータブルなナノポアアレイ¹⁵⁾にDNAコンピューティングを利用した病理診断システムを搭載することで、新たな「その場診断」ツールとして社会に実装できると考える。

謝 辞

本研究で用いた血漿検体は国立国際医療センター (NCGM) バイオバンクよりご提供いただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。また、本研究は科研費基盤 (A) および新学術領域「分子ロボティクス」の助成により進めることができました。ご支援、ご協力に感謝いたします。

文 献

- 1) Bohacek, R. S. *et al.*: *Med. Res. Rev.*, **16**, 3 (1996).
- 2) 化学情報協会: <https://www.jaici.or.jp> (2023/4/27).
- 3) 萩谷昌己, 横森 貴 編: 自然計算へのいざない, 近代科学社 (2016).
- 4) Kawano, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 1995 (2013).
- 5) Kawano, R.: *Biotechnol. J.*, **13**, 1800091 (2018).
- 6) Liu, P. and Kawano, R.: *Small Methods*, **4**, 2000101 (2020).
- 7) NUPACK: <https://www.nupack.org/> (2023/5/10).
- 8) Yasuga, H. *et al.*: *PLoS One*, **11**, e0149667 (2016).
- 9) Ohara, M. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **6**, 1427 (2017).
- 10) Takiguchi, S. and Kawano, R.: *Nanoscale*, **13**, 6192 (2021).
- 11) Adleman, L. M.: *Science*, **266**, 1021 (1994).
- 12) Cui, M. *et al.*: *Front. Genet.*, **10**, 626 (2019).
- 13) Hiratani, M. and Kawano, R.: *Anal. Chem.*, **90**, 8531 (2018).
- 14) Takeuchi, N. *et al.*: *JACS Au*, **2**, 1829 (2022).
- 15) Jain, M. *et al.*: *Genome Biol.*, **17**, 239 (2016).

AIと固体ナノポアセンサによるウイルス検査

有馬 彰秀^{1*}・筒井 真楠²・鷺尾 隆²・馬場 嘉信^{1,3,4}・川合 知二²

はじめに

我々は、常にさまざまな物理性状を有する微粒子の影響下にある。ウイルスや有害細菌はもちろんのこと、PM2.5やバイオエアロゾルなど、健康を脅かす多種多様な微粒子へと対処していくため、その分析手法の開発は今後ますます重要になる。

ナノポアは、その中でも1粒子レベルの圧倒的感度を持つセンサである^{1,2)}。特に微細加工技術によって固体材料に作製する固体ナノポアは、化学的・機械的耐久性があり、ポア径を検体に寄せて作製が可能であることから、粒子検出における高いS/N比を狙える³⁾。加えて分子修飾・金属酸化物製膜などによる機能性の付与も容易であり、高い拡張性を有する^{4,5)}。

しかし、イオン電流シグナルに反映された各粒子の物理性状に着目する以上、性質の類似した粒子間における識別精度の劣化は避けられない。本稿では、その解決を目指した筆者らによる人工知能(AI)技術とナノポア計測の融合に基づく高精度ウイルス識別の展開について解説する。

ウイルス感染診断の現状とナノポア計測の親和性

ウイルスは、DNAもしくはRNAがタンパク質の殻であるカプシドによって包まれたヌクレオカプシドが基本構造であり、種によっては、さらにその外側にエンベロープと呼ばれる脂質二重膜を持つ。種は同じであっても、感染・伝播性や抗原性が変化した変異株の存在もあり、遺伝子はもちろんのこと、感染に寄与するスパイクタンパク質の違いなどもあり、その物理性状は多種多様である。加えてよく知られるように、ウイルスは単独で増殖することができず、宿主細胞の複製機構を流用する。そのため、増殖において独自のサイクルを持つ感染性細菌などと比較するとその対処ははるかに難しく、ヒトに感染するもので根絶を成し得たのは天然痘のみである。

近年の新型コロナウイルス感染症(COVID-19)のパンデミックにおいても、我々は変異株への対応に追われながらも、その発生から一応の収束までを目の当たりにした。特定の効果的な治療法が存在しない中で重要とされるのが早期発見・隔離であり、ワクチンの完成とその

十分な広がりまでの時間を稼ぐことが求められた。感染の診断にはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法や抗原検査が主に利用され、検査センターが街中に設置されるほどの広がりを見せた。これらの手法はそれぞれ高精度・短時間での判定が特徴であるが、高額な機器や専門的スキルが必要な点や、視認による判定では精度が検査者の能力に依存する点などが課題として挙げられる。

このような状況において、ナノポア計測の手技は比較的シンプルであり、1粒子検出に基づくため、感染初期のまだウイルスが増殖していない段階でも評価できる可能性がある。さらに、ウイルス感染症の示す疫学的観点からではなく、ウイルスの粒子としての物理性状に基づいた分析が行える。そこで筆者らは、新規ウイルス検査法の原理実証として、固体ナノポアを用いた単一ウイルス粒子の検出とその識別を試みた⁶⁻⁸⁾。

ポリイミド製膜SiN_xナノポアの作製

ウイルス検出に利用したSiN_xナノポアは、0.5 mmのSiウエハの両面に50 nmの窒化膜を製膜したものを基板として用い、微細加工技術を用いて作製した。片面のSiN_xを反応性イオンエッチング(RIE)によって一部を除去し、Si層を露出させた。その露出部分を囲うようにポリプロピレンチューブを接合し、水酸化カリウム溶液によって異方的にエッチングを行った。エッチングがもう片面のSiN_xまで到達すると、フリースタンディングなSiN_x薄膜(メンブレン)が残る。このSiN_xメンブレンに電子線リソグラフィーによって直径300 nmの円を描画し、RIEによって掘削した。

筆者らが測定に用いた固体ナノポアの特徴として、直径に対する厚さの比(アスペクト比)が非常に小さい点が挙げられる⁹⁾。この低アスペクト比ナノポアは、その高い空間分解能への期待から、グラフェンやMoS₂などの2次元材料でのアプローチが研究室レベルで展開されてきた。これまで筆者らは、その構造をSiN_xナノポアで模倣することで、高効率・高感度での計測が可能なデバイスとして利用してきた。加えて今回のウイルス検出では、デバイスの低容量化を志向して、ポリイミドをナノポア近傍まで製膜した。長時間分解能の計測のためには、デバイスの電気

* 著者紹介 名古屋大学未来社会創造機構(特任講師) E-mail: arima@chembio.nagoya-u.ac.jp

¹名古屋大学未来社会創造機構、²大阪大学産業科学研究所

³名古屋大学大学院工学研究科、⁴量子科学技術研究開発機構

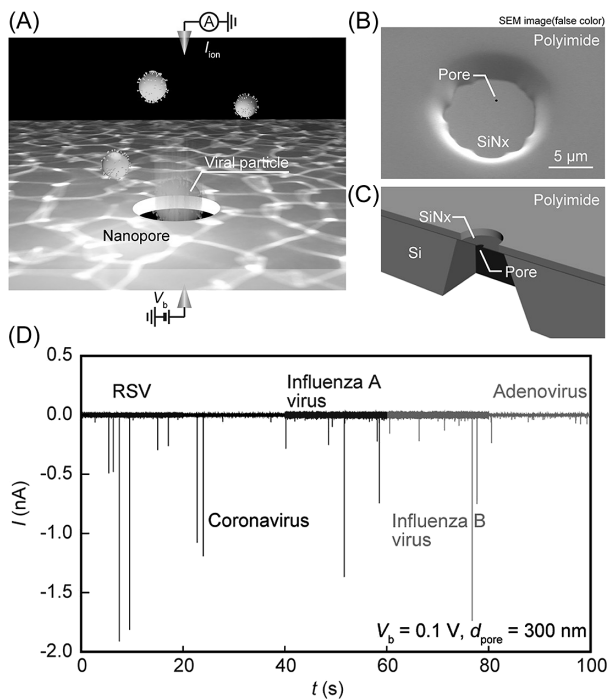


図1. 固体ナノポアによる単一ウイルス粒子検出。(A)概念図。(B)ポリイミド製膜SiNxナノポアのSEM画像および(C)構造。(D)ウイルス検出におけるイオン電流トレース。文献6より転載。

容量の低減化は重要な課題であり、このポリイミド層の寄与によってウイルス粒子の通過のような、短時間のイベントを捉えられることが明らかとなっている¹⁰⁾。

計測では酸素プラズマ処理を通して試料導入用の流路となるポリジメチルシロキサン (PDMS) ブロックをナノポアチップの両面に接合し、一方の流路に孔径450 nmのメンブレンフィルタによって前処理を行った培養ウイルスの分散液、他方には緩衝液を導入した。Ag/AgCl電極をそれぞれの流路に設置した後、電圧を印加した際にナノポアを流れるイオン電流を計測した。検出対象として、代表的な呼吸器感染症の起因ウイルスであるアデノウイルス・コロナウイルス・RSウイルス・A型/B型インフルエンザウイルスの5種を採用した(図1)。

ウイルス1粒子検出

ナノポアを挟んで電圧を印加することで、ナノポアでの電場集中が引き起こされる。これによって、ナノポア近傍の粒子には、水中で荷電粒子が受ける静電気力である電気泳動力に加え、電気浸透流 (Electroosmotic flow; EOF) の抗力が作用する。電気浸透流はナノポア壁面の対イオンが電場を受けて移動する際に、溶媒分子も引きずられていくことに伴って生じる壁面近傍の流体の流れである。

今回のウイルス検出では、前処理としてメンブレンフィルタによる処理を行ったが、計測の段階でもこの電

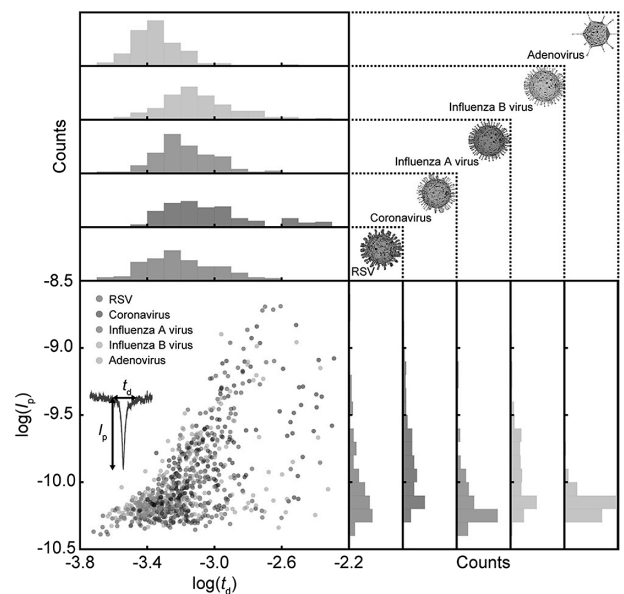


図2. 呼吸器感染症起因ウイルス検出シグナルにおける波高(I_p) - 波幅 (t_d) のヒストグラムと散布図。文献6より転載。

気浸透流が夾雑物に対するフィルタとしての機能を果たすことが示唆されている¹¹⁾。SiNxナノポアにおいて、電気浸透流はウイルス粒子が牽引される方向とは逆へと流れる。そのため、表面電荷が小さい粒子はポアへの侵入が阻害される。加えて、ナノポア計測ではポア径と比して大きな粒子は通過できず、逆に微小な場合には十分なイオン電流阻害を引き起こすことができない。EOFフィルタに加え、これらの検出における選択性から、シグナルとして検出される粒子は大きく制限される。

しかし、たとえ同一種であってもそれぞれの粒子にはばらつきがあるため、得られたシグナルからそのウイルス種を推定することは容易ではない。ウイルス5種の検出における波高(I_p) - 波幅 (t_d) の散布図を図2に示す。ポリイミド製膜SiNxナノポアによって1粒子レベルでの検出が可能であることが示された一方で、識別によく利用される両パラメータの分布には大きな重なりがあった。これを基にした識別が困難であることは明らかであり、新しいアプローチが必要であった。

AIナノポアプラットフォームによるウイルス種識別析

そこで活用したのがAIを利用した機械学習に基づく解析である。低アスペクト比ナノポアを利用したことで、イオン電流シグナルには検体粒子の物理性状が複雑に反映されていると考えられ、それらの特徴を十分に活用したより高度なイオン電流波形解析を目指した(図3)^{6,7)}。

具体的には、これまで利用されていた波幅と波高に加え、面積や立ち上がりの角度、ピークの尖度や位置比、慣性といった多様なパラメータを採用した。さらに、シ

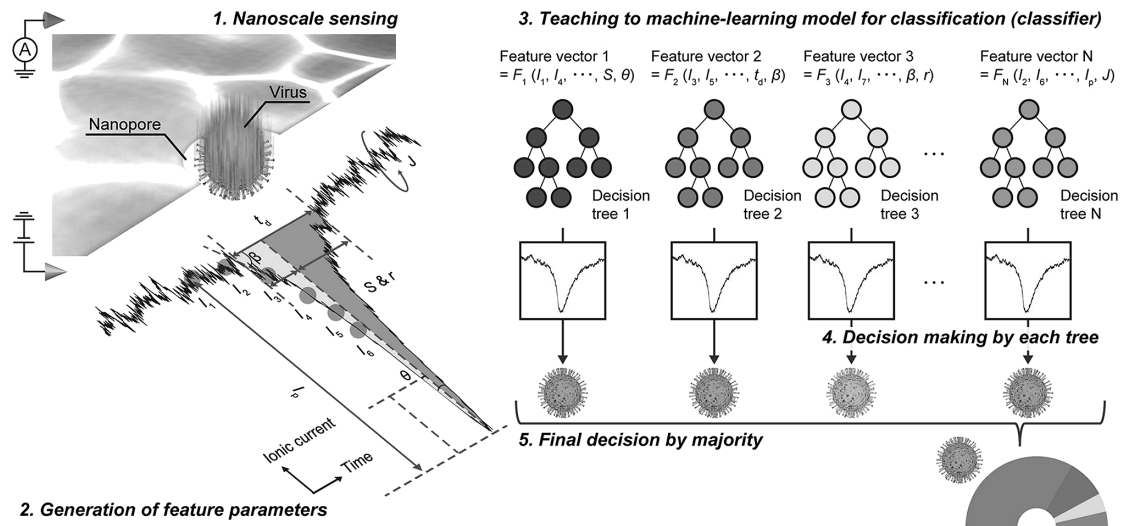


図3. AIと固体ナノポアセンサによるウイルス種識別. 文献7より転載.

グナルを規定の間隔で分割し、各区間における電流値とこれらの新規パラメータをランダムに混合した形状特徴量ベクトルを作成し、教師データとして分類モデル(分類木)に異なる組合せを学習させた。そして、検出されたイオン電流シグナルに対し、それぞれの分類木でウイルス種を判定し、その多数決によって最終的な分類を行った。この幅広い特徴量のランダムな学習によってシグナルの形状特徴量を網羅的に捉えた識別を可能にしておき、加えて多数の粒子からデータベースを構築することで、粒子集団としてのばらつきもカバーしている。

今回のウイルス種識別では、個別に計測を行ったそれぞれのウイルス種のシグナルを学習させ、テスト用データの推定を行った。その結果、5種のウイルスにおいて70%を越える精度を示した(図4)。強調したいのはこれが1粒子の検出に基づくものであり、シグナル数の増加によって精度が向上する点である。この5種の場合では20数個で99%を越え、感染初期でも利用可能な検査法として実用化が検討できるレベルになってくる。さらに、A型/B型インフルエンザウイルスの結果が示すように、同一ウイルス種の亜型の識別へも適用可能であり¹¹⁾、加えて、唾液との混合溶液中での検出も行えることも実証されている。今後臨床現場におけるこのAIナノポアプラットフォームによる簡便・迅速・低侵襲の検査が期待される。

ウイルス認識ナノポアの開発

前項までは、分析において機械学習を活用することで、各シグナルの形状の特徴を網羅的に捉えた高精度識別を実現した事例について紹介した。この解析のソフト面からのアプローチに加え、ハード面であるデバイスの改良

RSV	Coronavirus	Adenovirus	Influenza A virus	Influenza B virus	Accuracy (F-measure)
					71.3%
					74.8%
					82.2%
					72.7%
					87.3%
					84.1%
					84.6%

図4. AIナノポアプラットフォームによる複数種ウイルスの識別精度. 文献6より転載.

も進んでいる。それがウイルス認識ナノポアである(図5)⁸⁾。

ウイルス認識ナノポアは、ナノポア壁面にウイルス認識分子を修飾することで、検出における特異性を増強させたものである。設計思想は一般的なイムノセンシングと類似しているが、大きく異なるのが強固な認識では逆に検出の障害になる点である。ナノポアセンシングは、粒子の通過に伴うイオン電流変化を検出するため、ポア閉塞が容易に引き起こされると計測のスループットが激減する。

この課題を解決するために、ペプチドアレイを利用して適度な強度のペプチドを探索した。実証実験ではインフルエンザウイルスを測定対象としたため、A型(H1N1)インフルエンザウイルスと強く相互作用する既知の配列を基準に、一部の配列を削ったものに対して結合試験を行った。その中から適当と考えられる配列を抽出し、ポア内部に修

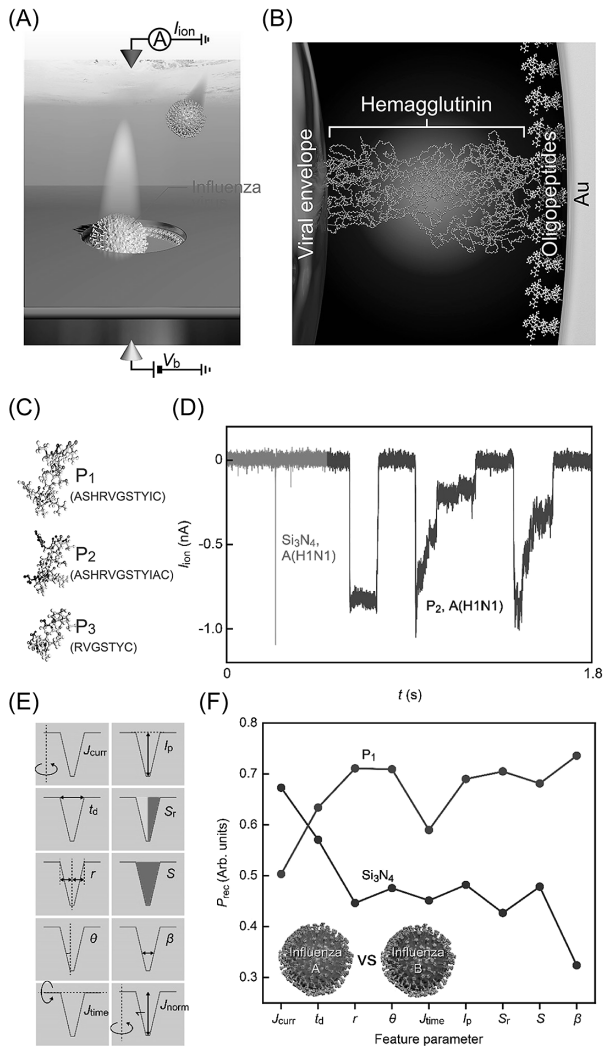


図5. ウイルス認識ナノポアによるウイルス粒子検出. (A) インフルエンザウイルス粒子検出および (B) 分子認識ナノポア の概念図. (C) 修飾したペプチド. (D) 修飾の有無によるシグナルの比較. (E) 機械学習で利用した形状特徴量および (F) インフルエンザウイルスの亜型判別精度における形状特徴量 依存性. 文献8より転載.

飾した. この際, Si_3N_x ナノポアにAuを積層し, リンカー部 位を加えたペプチドを金-チオール結合によって修飾した.

このペプチド修飾ナノポアを用いたA型インフルエン ザウイルス粒子の検出では, 非修飾 (Si_3N_x) ナノポアと 比較して, 通過時間の大幅な延長が確認された. さらに, その延長の度合いは結合試験で得られた認識強度の順と 対応していた. 加えて機械学習を利用した亜型間の識別 において精度が向上することが示されたが, 各形状特徴 量に着目した際, もっとも高い値が得られたのは尖度で あった. 尖度はナノポア内部の粒子挙動を強く反映した パラメータであると考えられることから, ウイルス認識 ナノポアの有用性も示された. この1粒子-少数粒子間

の弱い認識に基づく高精度識別は, 原理的にはあらゆる 粒子に適応可能であり, 今後多様な粒子の分析・識別に 貢献することが期待される.

おわりに

以上, AIとナノポアセンシングの融合に基づく, 新 たなウイルス検査について解説した. このAINANOポア プラットフォームでは, 機械学習を利用した解析が行わ れるため, 精度が数値として得られ, 検査者の能力に依 存しない判定が可能である. 加えてデータベースの構築 も容易であり, その有用性はシグナル数の確保やウイル ス種の拡張によって爆発的に向上する.

この手法は, ウイルスに限らず細菌のような生体微粒 子にも適用可能であり^{12,13)}, 今後も多様な粒子解析にお ける機械学習の利用が進むと考えられる. このAINANOポア プラットフォームを基盤としたベンチャー企業もす でに設立されており (アイポア株式会社: <https://aipore.com/>), ナノポアチップや計測装置, AIを利用した解析 が可能なソフトウェアまで一貫して提供している.

さらに, 近年の研究により, 複数のナノポアを集積し たデバイスによって単一細菌の内包DNAの抽出とその 検出も実証されており¹⁴⁾, 粒子としての物理性状のみな らず, その遺伝情報も活用できる可能性も見いだされつ つある. 加えて, シグナル解析においても深層学習を利用 したノイズ除去アルゴリズムも開発されている¹⁵⁾. 今 後も, バイオナノテクノロジーと情報科学の目覚ましい 進化を受け, このAINANOポアプラットフォームもさら なる発展が期待される.

文 献

- 1) Miles, B. N. *et al.*: *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 15 (2013).
- 2) He, Y. *et al.*: *NPG Asia Mater.*, **13**, 48 (2021).
- 3) Fried, J. P. *et al.*: *Chem. Soc. Rev.*, **50**, 4974 (2021).
- 4) Eggenberger, O. M. *et al.*: *Nanoscale*, **11**, 19636 (2019).
- 5) Leong, I. W. *et al.*: *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **15**, 6123 (2023).
- 6) Arima, A. *et al.*: *ACS Sens.*, **5**, 3398 (2020).
- 7) Arima, A. *et al.*: *Anal. Chem.*, **93**, 215 (2021).
- 8) Arima, A. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 16834 (2018).
- 9) Tsutsui, M. *et al.*: *ACS Nano*, **6**, 3499 (2012).
- 10) Leong, I. W. *et al.*: *ACS Omega*, **4**, 12561 (2019).
- 11) Arima, A. *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 16305 (2018).
- 12) Hattori, S. *et al.*: *Sci. Rep.*, **10**, 15525 (2020).
- 13) Tsutsui, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **90**, 1511 (2018).
- 14) Tsutsui, M. *et al.*: *Small Methods*, **5**, 2100542 (2021).
- 15) Tsutsui, M. *et al.*: *Small Methods*, **5**, 2100191 (2021).