

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019

受付番号 201960385

氏名 江 司 観
(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地 (派遣先国名) 用務地: シンシナティ大学 (国名: 米国)

2. 研究課題名 (和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

ナノニードル型生体ナノポアプローブを用いた細胞-機械インターフェイスの創製3. 派遣期間: 平成 31 年 4 月 1 日 ~ 令和 2 年 1 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

College of Arts and Sciences, University of Cincinnati5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

要約

本研究では、ナノニードル型生体ナノポアプローブを用いて細胞から放出される化学物質を検出することを最終的な目標としており、派遣期間中はナノニードルを用いた生体ナノポアプローブの開発及び改良に焦点を当て研究を行った。さらに、局所的な溶液粘度計測を目指し、ヘアピン DNA とナノポアを用いた粘度計測を試みた。以下に詳細を記載する。

研究背景・目的

膜タンパク質をガラスピペットの先端に再構築した生体ナノポアプローブを使用した bio-inspired scanning ion conductance microscopy (bio-SICM) [1,2]が開発され、液中において非接触で表面形状と化学物質の両方を計測することが可能な顕微鏡技術として期待されている。しかしながら、従来の bio-SICM プローブでは、ガラスピペットの先端径(数十マイクロメートル)が空間分解能のボトルネックであること、脂質二分子膜の安定性が低く長時間測定することが難しいなどの問題があった。そこで本研究では、bio-SICM に関する研究を行っているシンシナティ大学の Ryan White Lab.に滞在し、ナノニードルを用いた新たな生体ナノポアプローブの開発を目指し研究を行った(Fig. 1)。

特に滞在期間中は、“金ナノニードルを用いたナノポアプローブの開発”、“計測される電流値の安定化を目指した Ag/AgCl マイクロ電極を用いた新たなナノポアプローブの開発”、“ヘアピン DNA を用いた液体の粘性評価”について実験を行った。上記の実験を通じて投稿論文 4 報 (内 2 報は査読中) を投稿することができた。以下に研究内容の詳細について示す。

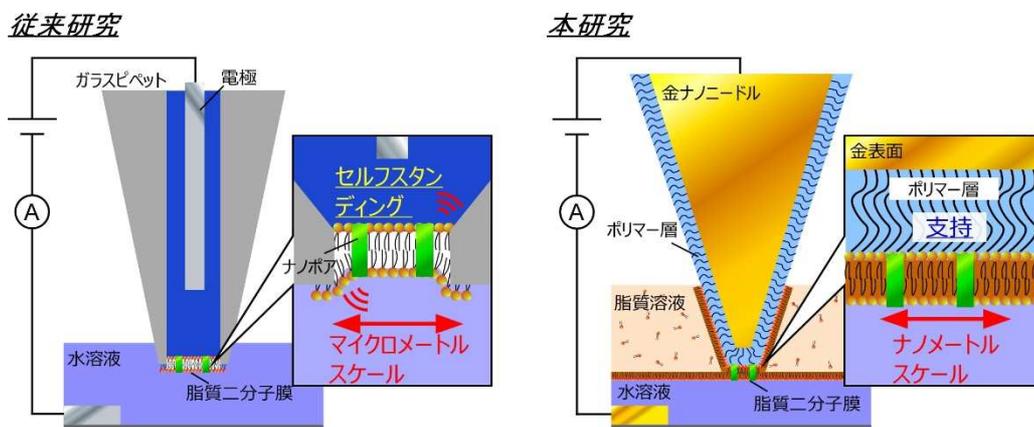


Fig. 1 本申請研究で開発した金ナノニードルを用いた生体ナノポアプローブと従来のガラスピペットを用いたナノポアプローブの比較。金ナノニードルを用いることで高い膜安定性を得ることができ、また、先端径が細いためより高い空間分解能を得られる可能性がある。

研究内容

1. 金ナノニードルを用いたナノポアプローブの開発

本研究では、金ナノ電極を用いた脂質二分子膜形成手法[3]を改良し、ナノポアプローブとしての応用を目指した。本実験では主に以下の3点に関して検証を行った。

一つ目は、“ナノニードルに修飾する polyethylene glycol (PEG)の長さ及び PEG 層及び浴溶液の塩濃度の最適化、生体ナノポアの向きの制御”である。PEG の長さは、ナノニードル側の溶液体積、及び膜タンパク質とナノニードルの距離に影響するため、PEG の長さがポア形成やチャネル電流に影響を与えると考えられる。また、本実験では金を電極として用いているため金表面のチャージアップによりチャネル電流の低下が予測される。その電流低下は、ナノポアを通過するチャネル電流に依存するため塩濃度を低下させることでチャネル電流の減衰を低減することが出来る。さらに、ポア形成膜タンパク質の構造が膜に対し非対称であるため、ポア形成膜タンパク質による化学物質の検出には、ポアの向きが非常に重要である。二つ目は、“ナノポアプローブを用いた化学物質の検出”である。本実験では、ポア形成膜タンパク質として α ヘモリシン(α HL)を使用し、D-グルコースが7個環状に結合した β -シクロデキストリン(β CD)の検出を試みた。 β CDは、ヘモリシンの β バレル側から侵入したときのみ検出可能であるため、 α HLポアの向きを制御する必要がある。三つ目は、“マイクロ流体デバイスを用いた化学物質の局所検出”である。本プローブの高空間分解能性を実証するためにマイクロ流体デバイスを用いて β CDの濃度勾配を形成し、本ナノポアプローブを用いて濃度勾配の計測を行った。

2. Ag/AgCl マイクロ電極を用いた新たなナノポアプローブの開発

金ナノニードルを用いた生体ナノポアプローブの問題点として電流値の減衰が挙げられる。溶液中の塩濃度を低下させることで減衰を改善することが可能であるが、“S/N比が低下する”、“塩濃度がナノポアの形成に影響を与える”などの問題点が存在するため、塩濃度を変化させず電流値の減衰を改善させる必要がある。そこで本研究では、ガラスピペット内に封入したAg/AgClマイクロ電極を用いた脂質二分子膜の形成、及び、ナノポアセンシングへの応用を試みた。

3. ヘアピンDNAを生体ナノポアに加えることによる液体の粘性評価

ナノポア計測では、ターゲット分子のナノポア通過や結合を電流変化として計測、得られた電流を解析することで分子の情報を取得する。しかしながら、ナノポア計測によって得られる情報は限られており、分子情報以外を取得することは難しい。そこで本実験では、ヘアピン状の

DNA をポア内に封入し DNA の動きを計測することで、ナノポアセンシングによる溶液の粘度測定を試みた。 α HL ポア内にヘアピン DNA が滞在する場合、ヘアピン DNA と α HL ポアの相互採用によりヘアピン DNA が振動することが知られており、その振動を解析することで溶液の粘度を計測することができる。

研究結果

1. 金ナノニードルを用いたナノポアプローブの開発

・金ナノニードル型ナノポアプローブの最適化

PEG 長さの検討では、長さ 24 nm と 1.8 nm の PEG を修飾した金ナノニードルを作製し α HL ナノポアの電流値を計測した。さらに、 α HL モノマーを浴溶液もしくは PEG 層の溶液に加えることで α HL ポアの向きを制御を行った。その結果、それぞれの PEG 長さ、ポアの向きにおいて α HL のポア形成によるチャンネル電流を確認したが、PEG 長さが 1.8 nm で α HL を PEG 溶液に加えた場合、チャンネル電流値が他のケースに比べ低い値となった(Fig. 2)。PEG 長が短い場合、 α HL ポアとナノニードル表面の距離が短く、さらに PEG 層側から α HL を再構築した場合、 α HL ナノポアのヘッド部分がニードル表面と干渉したためチャンネル電流が低くなったと考えられる。一方、長い PEG を用いた場合、ポアの向きにかかわらず理論値と同様の電流値が得られたため、長い PEG を用いることで正しいチャンネル電流測定が可能であることが分かった。

塩濃度の検討では、浴溶液側の塩濃度を 1 M から 0.2 M まで下げることで電流値の減衰を改善することに成功した。塩濃度が 1 M の場合、30 s で電流が初期値の約 70 % に低下するのに対し、0.2 M の場合、電流値の低下が初期値の 5 % 以内となった(Fig. 3)。金電極のチャージアップによるチャンネル電流の減衰はポアを通過する電流値、金表面に形成される電気二重層のキャパシタンスから概算することができ、本実験によって得られた結果と理論値が同様の値となり電流値の減衰が金電極のチャージアップによるものであることが分かった。

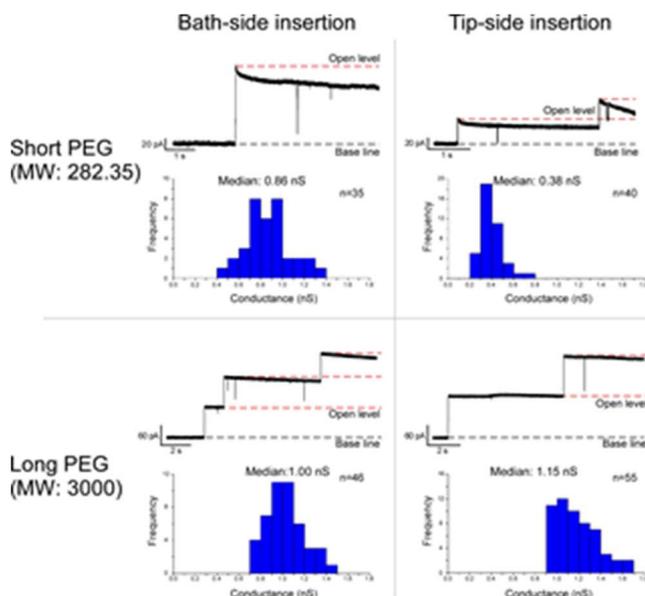


Fig.2 ナノニードルを用いて計測した α HL のチャンネル電流及びポアコンダクタンスのヒストグラム。PEG 長が短い場合では、長い場合に比べ低いポアコンダクタンスが得られた。

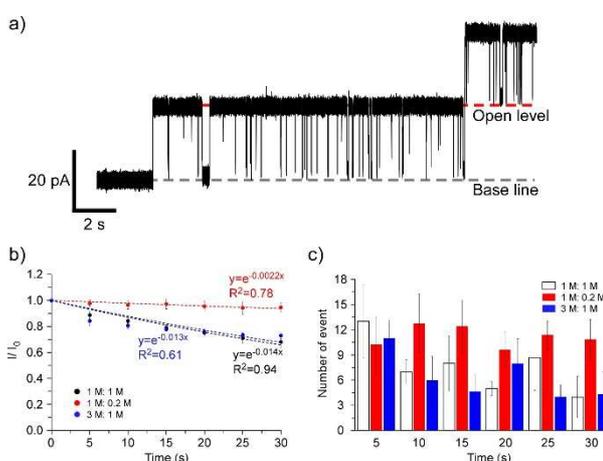


Fig. 3 PEG 層と浴溶液の塩濃度をそれぞれ 1M、0.2 M KNO_3 とした際のチャンネル電流測定結果。塩濃度を低くすることでチャンネル電流、阻害頻度の減衰が低減される。

・ナノポアプローブを用いた β CD 分子の検出

浴溶液に 10, 50, 100, 200 μ M の β CD を加えチャンネル電流測定を行った。その結果、いずれの濃度においても β CD が α HL ポアに侵入したことにより発生した阻害電流を確認した(Fig. 3)。また、その阻害頻度は、 β CD 濃度の増加に比例して上昇していることが確認でき、本ナノポアプローブを用いて β CD を検出することに成功した。

・マイクロ流体デバイス中の局所ナノポアセンシング

最後に、ナノニードル型生体ナノポアプローブを用いてマイクロ流体デバイスを用いて形成した β CD の濃度勾配を検出した。Fig. 4 に測定したチャンネル電流及び阻害頻度から計算したマイクロ流路内の濃度勾配を示す。チャンネル電流測定では、どの位置においても β CD による阻害電流を確認することができた。また、阻害頻度から濃度を計算した結果、マイクロ流体デバイス内にリニアな濃度勾配が形成されていることが確認でき、ナノポアプローブを用いた局所ナノポアセンシングに成功した。

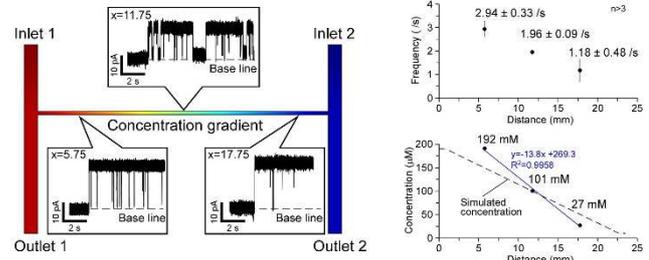


Fig. 4 マイクロ流体デバイス中でのナノポアセンシング結果。マイクロ流体デバイスの各ポイントにおいて異なる阻害頻度が確認された。また、阻害頻度から計算した β CD 濃度は流路の位置に比例している。

2. Ag/AgCl マイクロ電極を用いた新たなナノポアプローブの開発

金ナノニードルを用いたナノポアプローブで課題となっていた電流値の減衰を改善するために、平衡電極である Ag/AgCl マイクロ電極を用いて脂質二分子膜の形成とチャンネル電流測定を試みた。ガラスピペットに直径 50 μ m の銀ワイヤを封入し、紙やすりを用いて先端を丸く形成、最後に漂白液に浸し銀電極の先端を塩化銀化させることで Ag/AgCl マイクロ電極を作製した。金ナノニードルと同様に水溶液と脂質溶液が層となった浴溶液にマイクロ電極を挿入することで脂質二分子膜の形成を試みた。その結果、脂質二分子膜の形成による膜容量の上昇を確認し、さらにポア形成膜タンパク質である α HL の再構築によるチャンネル電流を計測することに成功した。本電極を使用した場合、チャンネル電流の減衰は確認されず非常に安定したチャンネル電流を計測した。さらに、本プローブを用いて single stranded DNA (ssDNA) の検出実験を行った。その結果、ssDNA の α HL ポアの通過による阻害電流を確認し、本プローブを用いた化学物質の検出に成功した(Fig. 5)。

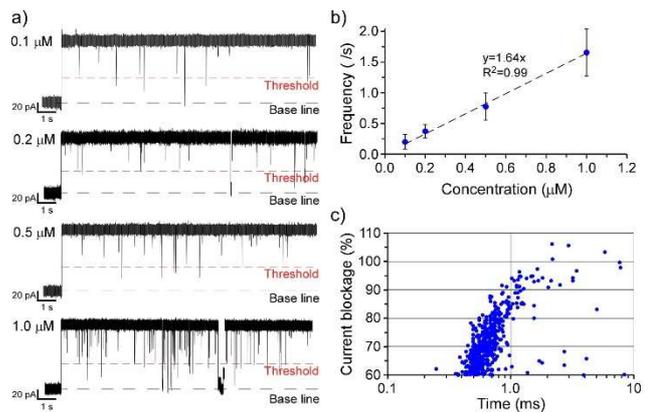


Fig. 5 a) 異なる DNA 濃度におけるナノポアセンシング結果。 b) DNA 濃度に比例して阻害頻度が上昇している。 c) 阻害電流のスカッタープロット。

また、本ナノポアプローブの特徴として脂質二分子膜形成の高い再現性が挙げられる。脂質溶液と水溶液が層になった浴溶液を用意し、プローブの上げ下げのみで脂質二分子膜の形成をコントロールすることができる。本利点を生かし複数のマイクロドロップレットを用意することで、異なるサンプルを連続で計測するハイスループットセンシングを行った。その結果、5分以内に4つの異なるサンプルを用いてナノポアセンシングすることに成功し、ハイスループットなナノポアセンシングを実証した。

3. ヘアピン DNA を生体ナノポアに加えることによる液体の粘性評価

ヘアピン DNA を用いた実証実験では、浴溶液にポア形成膜タンパク質である α HL とヘアピン DNA を加え、金ナノニードルを用いて脂質二分子膜を形成し電流値を計測した。その結果、 α HL ナノポア形成した後にヘアピン DNA がナノポア内に侵入、留まることで長時間の障害電流が計測された(Fig. 6)。しかしながら、ヘアピン DNA の振動による電流値の変

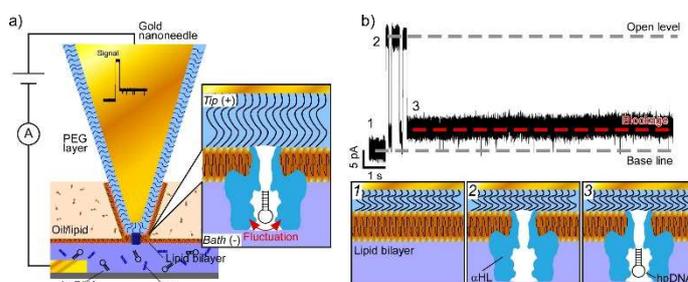


Fig. 6 a) ヘアピン DNA を用いた局所粘度測定の概略図。b) ヘアピン DNA がナノポア内に侵入したことによる電流値の減少が確認された。

化を確認することができなかった。 α HL とヘアピン DNA の相互作用によるヘアピン DNA の振動は、粘性以外にも、溶液の塩濃度、塩の種類にも影響されるため、0.2 M KNO_3 を用いた本実験では塩濃度が低く振動を確認することができなかったと考えられる。金ナノニードルを用いた本実験では、電流値の減衰を低減するために塩濃度を低下させたが、今後はこれまでに開発した Ag/AgCl 電極を用いた脂質二分子膜の形成手法を用いることで高塩濃度中での実験を行い、局所的な粘性評価実験を行う。

以上のように本研究では、細胞を一分子レベルで刺激可能なデバイスの開発を目指し、一分子検出が可能なナノポアセンシング技術を応用したナノポアプローブを開発した。特に金ナノニードルを用いた生体ナノポアプローブを開発し局所的な化学物質の検出が可能であることを実証した。さらに、Ag/AgCl 電極を用いた脂質二分子膜の形成手法を提案し安定した膜形成および電流計測を実現した。最後に、ヘアピン DNA と α HL ポアを用いた粘度計測系をナノニードル型生体ナノポアプローブに応用し、局所的な粘度計測実現の可能性を示した。上記の結果より、ナノポアプローブを用いることで細胞から放出される化学物質の局所検出の可能性を示し、本プローブを用いた新たな細胞観察手法を提案することができた。今後は本渡航により得られたプローブ技術を応用した走査型プローブ顕微鏡の開発を行い、新たな細胞観察手法の確立を目指す。

成果の発表・関係学会への参加状況

上記の研究成果をもとに、2 報の論文が掲載され、現在 2 報の論文を投稿中であり、派遣期間中に複数の論文を投稿することができた。また、金ナノニードルを用いたナノポアプローブに関する論文は、ナノサイエンス分野で著名な学術論文誌である ACS Nano に掲載されており、期待以上の研究成果をあげることができたと考えている。一方で、学会への参加に関しては、アメリカの国内学会 1 件のみと多くの学会に参加することはできなかった。特に、日本国内の学会に関しては、出張費用を捻出することが困難であり参加することができなかった。

1. Y. Zhou, L. K. Bright, W. Shi, C. A. Aspinwall, and L. A. Baker, *Langmuir*, vol. 30, no. 50, pp. 15351–15355, 2014.
2. F. C. Macazo and R. J. White, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 8, pp. 2793–2801, 2016.
3. D. Okuno, M. Hirano, H. Yokota, Y. Onishi, J. Ichinose, and T. Ide, *Analytical Sciences*, vol. 32, no. 12, pp. 1353–1357, 2016.