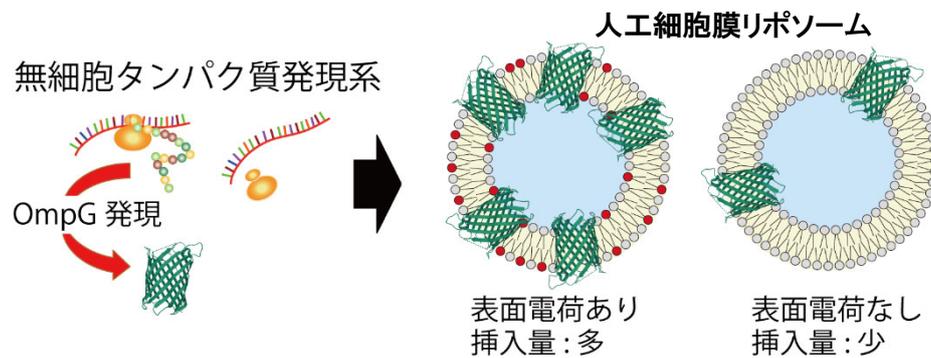


2022年2月10日

報道関係者 各位

大量のナノポアを人工細胞膜への挿入技術を確立 高感度バイオセンサの開発に期待

群馬大学（群馬県前橋市）理工学府分子科学部門 神谷厚輝助教は、DNAなどの生体分子を検出するセンサとなるナノポア（薄膜上の小さな穴）を、人工細胞膜に多量に挿入できることを明らかにした。



ナノポアを形成する外膜タンパク質（Outer membrane protein）である OmpG と OmpA を、試験管内の無細胞タンパク質発現系を用いて発現させ、OmpG と OmpA の人工細胞膜への挿入量を調べたところ、人工細胞膜を構成するリン脂質の組成によって、その挿入量が異なることが分かった。

本研究成果は、2022年2月11日（日本時間）にオンラインで公開されます。本件に関する報道は、下記の時刻まで控えていただけますようお願い申し上げます。

●報道解禁：日本時間 2月12日 0：00

1. 本件のポイント

- 人工細胞膜表面の電荷と、リン脂質の炭化水素鎖の不均一性がOmpGの人工細胞膜への挿入量に影響
- 人工細胞膜に挿入されたOmpGやOmpAがナノポアを形成することを確認

2. 本件の概要

OmpGやOmpAなどのナノポアタンパク質は、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。これは、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います。ナノポアタンパク質は通常、大腸菌等で発現・精

製されており、多量に発現させるには時間と設備が必要となります。今回は、無細胞タンパク質発現系（注1）を用いて、ナノポアを形成するOmpGやOmpA発現を、人工細胞膜リポソームと共存下で行いました。リポソーム（注2）に挿入されていないOmpGやOmpAは遠心処理で除去、OmpGやOmpAのリポソームへの挿入量を評価しました。リポソームの表面が負電荷の場合、リポソームへのOmpGとOmpAの挿入が顕著に増大しました。リポソーム表面が負電荷で、リン脂質の炭化水素鎖が不均一な場合に最も多く挿入され、最大で約8倍のOmpGがリポソームに挿入されました。さらに、挿入されたOmpGがナノポアを形成していることを、パッチクランプ法（注3）によって明らかにしました。本研究で、膜の電荷や不均一性がOmpGやOmpAの人工細胞膜への挿入に影響することを明らかにし、膜タンパク質が膜上に集積されることによる機能化や、生体分子を検出できる高感度バイオセンサ素子としての活用が期待されます。

用語

（注1）無細胞タンパク質発現系:大腸菌や酵母などの細胞内に存在する転写・翻訳機構を取出し、試験管内でタンパク質を発現させる方法。

（注2）リポソーム:細胞膜の構成成分のリン脂質が二分子膜を形成した小胞。細胞膜と同じ構造を持つため、ドラッグデリバリーシステムに活用されている。

（注3）パッチクランプ法:ナノポアやイオンチャ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:Scientific Reports 2022年2月11日(金)19時(日本時間)にオンライン公開

論文題名: Formation and function of OmpG or OmpA-incorporated liposomes using an in vitro translation system

著者:Koki Kamiya

DOI番号: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06314-4>

4. 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@jimmu.gunma-u.ac.jp (係共通)

研究の詳細

OmpGやOmpAに代表されるouter membrane proteinは精製時に変性状態で存在するため、リフォールディングという工程を行うことで、正しいタンパク質構造になります。このリフォールディングの工程は、1日-3日程度かかることが知られています。無細胞タンパク質発現系で膜タンパク質を発現させる場合、発現中に人工細胞膜のリポソームを添加すると、膜タンパク質が凝集せずにリポソームに再構成されます。この仕組みをOmpG発現に応用しました。リポソームを共存させて無細胞タンパク質発現系でOmpGを発現させました。そして、ショ糖密度勾配遠心によって、リポソームに挿入されていないOmpGを除去しました(図1)。回収したリポソームサンプルを、ポリアクリルアミド電気泳動を行いバンドの濃さによりリポソームへのOmpGの挿入量を確認しました。用いたリポソームの組成は、電氣的に中性のホスホチジルコリン(PC)から構成されている炭素数18の脂肪酸をもつリン脂質のDOPC、炭素数12の脂肪酸をもつリン脂質のDLPC、大腸菌由来のリン脂質ホスホチジルグリセロール(PG)とホスホチジルエタノールアミン(PE)のPG/PE、炭素数18の脂肪酸をもつリン脂質DOPG/DOPEの4種類です。DOPCやDLPCリポソームに比べ、大腸菌のPG/PEやDOPG/DOPEリポソームの方が、OmpGとOmpA共に多くの量が挿入されました(図2)。したがって、OmpGとOmpAのリポソームへの挿入には、リポソーム表面の電荷が重要であると明らかになりました。さらに、大腸菌のPG/PEリポソームの方がDOPG/DOPEリポソームよりも、OmpGとOmpA共に多くの量が挿入されたことから、不均一な炭化水素鎖もOmpGとOmpAの挿入には重要な役割を果たしていると考えられます。また、リポソームに挿入されたOmpGやOmpAがナノポアを形成しているかを、人工細胞膜のパッチクランプ測定にて確認しました。このパッチクランプデバイス内の人工平面細胞膜にOmpGやOmpAを挿入したリポソームを膜融合させ、OmpGやOmpAナノポア内のイオンの流れを測定しました。その結果、今回無細胞タンパク質発現系で発現させたOmpGやOmpAの電流値は、大腸菌で発現・精製したOmpGやOmpAの電流値と一致しました。したがって、無細胞タンパク質発現系で発現させたOmpGやOmpAは正しいフォールディングをしていることが分かりました。

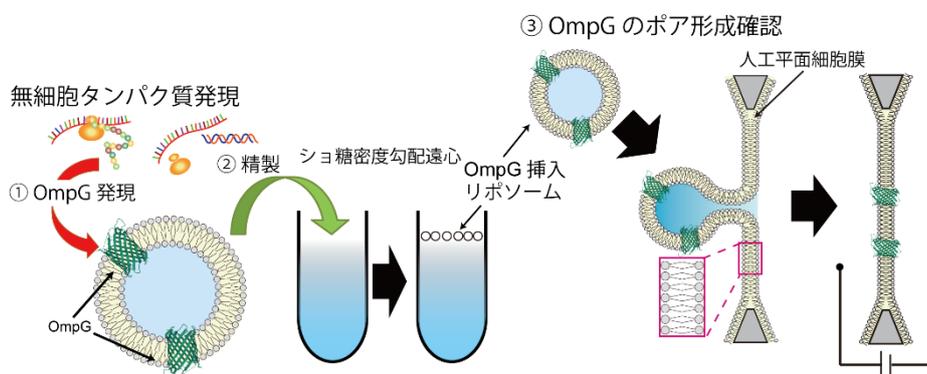


図1 無細胞タンパク質発現によるOmpGのリポソームへの挿入、精製、機能評価

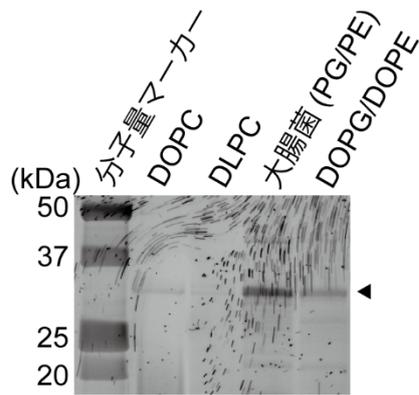


図2 OmpG挿入リポソーム精製後のポリアクリルアミドゲル電気泳動。矢印はOmpG由来のバンドを示す。

社会に対する成果の還元、今後の展望

本研究で、outer membrane proteinの人工細胞膜リポソームへの挿入には、リポソーム表面の電荷とリン脂質の炭化水素鎖の不均一性が大きく影響することが分かった。今後は、他の種類の膜タンパク質でリポソームへの挿入量が最大になる組成を見つけ、膜タンパク質のリポソームへの挿入原理の理解につなげたいです。また、OmpGやOmpAを効率的に人工細胞膜へ集積ができるため、高感度な生体分子検出に応用可能です。