

2023 年 2 月 3 日
国立大学法人 東京農工大学
国立大学法人 横浜国立大学
国立研究開発法人 科学技術振興機構 (JST)

ナノポアを形成する新規ベータシートペプチドを無細胞合成し オリゴペプチドの検出と識別に成功

～1 分子をラベルフリーに検出可能なバイオセンシング技術への応用に期待～

国立大学法人東京農工大学大学院工学府大学院生 藤田祥子（卓越大学院生）、同大学大学院工学研究
院生命機能科学部門の川野竜司教授と国立大学法人横浜国立大学の川村出准教授らのグループは再
構成型無細胞合成系（注 1）を用いて、人工設計したナノポア（注 2）を形成するベータシートペ
プチド（注 3・4）を合成し、オリゴペプチド（注 5）の検出に成功しました。本技術は、1 分子をラ
ベルフリー（非標識）で検出可能なバイオセンシング技術であるナノポアセンシングへの応用が期待さ
れます。

本研究成果は、American Chemical Society が発行する ACS Nano に 2 月 3 日（日本時間）に掲載さ
れました。

DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c07970>

論文名: Cell-Free Expression of De Novo Designed Peptides That Form β -Barrel Nanopores.

著 者: Shoko Fujita, Izuru Kawamura, and Ryuji Kawano

現状：ナノポアセンシングは、ナノポアを通過した分子を 1 分子レベルで電氣的に検出し、分子のサイ
ズ等によってラベルフリーに識別する技術として注目されています。ナノポア計測を用いて DNA
の配列を解読する DNA ナノポアシーケンサーが実用化され、次のターゲットとしてナノポアを用い
たペプチドやタンパク質のアミノ酸配列の解読が期待されています。アミノ酸の複雑な構造のシーケ
ンシングに適したナノポアを自在設計するため、当グループはナノポアを形成するベータシートペ
プチド SVG28 の新規設計を報告しました（注 6）。しかし、この SVG28 は疎水性が高いため複雑かつ
時間のかかる化学合成法（注 7）を用いる必要があり、SVG28 配列の改善を行っていく上で課題とな
っていました。

研究プロジェクトについて：本研究は JST CREST 原子・分子の自在配列・配向技術と分子システム
機能 JPMJCR21B2、JSPS 科研費学術変革領域研究（A）「超越分子システム」21H05229、基盤（A）
19H00901、の助成を受けたものです。

研究成果：本研究では、化学合成法より簡単で時間のかからない合成方法として再構成型無細胞合成
系に着目しました。大腸菌そのものを使うより膜ペプチドを発現しやすく、また大腸菌破碎液を用い
た無細胞合成系と比較して収量が多いという特徴を持っています。ただし、この合成系では SVG28 の
ような疎水性が高い配列の液相合成は困難でした。

そこでナノポア形成能を維持したまま無細胞合成可能となるよう、ナノポア形成に重要な膜貫通部

位を避けて親水性変異を導入した親水性改変体（図 1）を設計することで、SVG28 の無細胞合成に成功しました。さらに、親水性改変体の変異導入後も安定にナノポアを形成することを確認し、この親水性改変体ナノポアを用いて 8 残基のオリゴペプチドを検出することに成功しました。

またナノポア計測で得られる、オリゴペプチドの通過を示すシグナルの阻害電流量と電流阻害時間を解析することで、オリゴペプチド中の 1 アミノ酸の違いを識別することに成功し、ペプチドシーケンシングへの応用展開の可能性を示しました。

今後の展開：本研究では、ナノポアを形成するベータシートペプチド SVG28 の無細胞合成およびこれを用いたオリゴペプチドの検出に成功しました。本成果はナノポアセンシングにおいて、ターゲット分子に対するナノポアのアミノ酸配列の最適化や、変異導入によるナノポア配列の進化工学を行う上で重要な技術となります。今後は、無細胞合成が可能な SVG28 配列を基に新たな改変体の設計やスクリーニングを行うことを目指しています。

注 1) 再構成型無細胞合成系

大腸菌における転写・翻訳に関与するタンパク質を個別に抽出し、これを用いてペプチドやタンパク質を試験管内で合成する手法。

注 2) ナノポア

膜タンパク質やイオンチャネルによって、脂質二分子膜中に形成されるナノメートル（1 ミリメートルの 100 万分の 1）サイズの微細な孔（ポア）。

注 3) ベータシート（構造）

タンパク質の二次構造の一つ。アミノ酸の主鎖の水素結合により形成されたシート状の構造。

注 4) ペプチド

アミノ酸 100 残基以下の短鎖のタンパク質。

注 5) オリゴペプチド

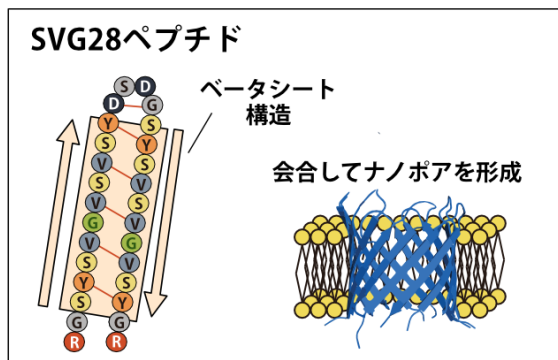
アミノ酸 10 残基以下の短鎖のペプチド。

注 6) K. Shimizu, B. Mijiddorj, M. Usami, I. Mizoguchi, S. Yoshida, S. Akayama, Y. Hamada, A. Ohyama, K. Usui, I. Kawamura, R. Kawano

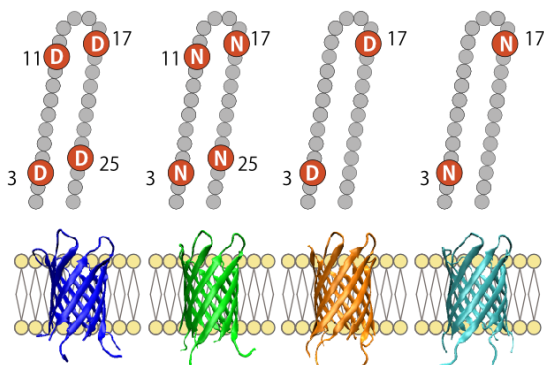
De novo design of a nanopore for single-molecule detection that incorporates a β -hairpin peptide.
Nature Nanotechnology **2022**, 17, 67-75, DOI: 10.1038/s41565-021-01008-w

注 7) 化学合成

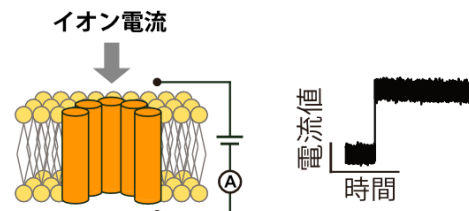
化学反応により試験管内でアミノ酸を連結し、ペプチドやタンパク質を合成する手法。これまで疎水性の高いペプチドを合成するために O-アシルイソペプチド法を用いていた。



親水性改変体在设计



親水性改変体のポア開口を確認



親水性改変体によるオリゴペプチドの検出

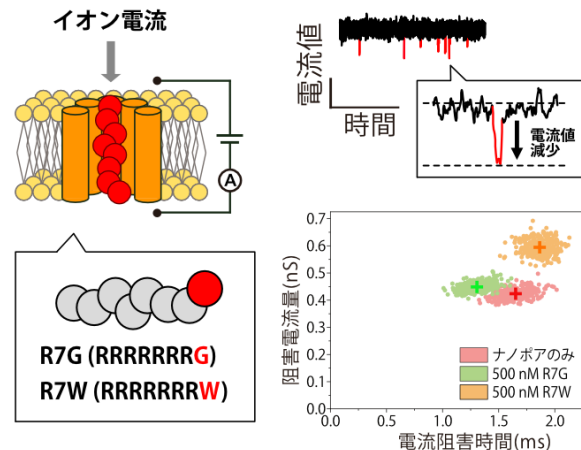


図1 本研究の概要。ナノポア形成ベータシートペプチド SVG28 の親水性改変体在设计して無細胞合成を行い、親水性改変体がナノポアを形成することを確認しました。親水性改変体のナノポア計測にオリゴペプチド R7G および R7W を添加すると、通過するオリゴペプチドに由来する電流値の減少が観測され、これらの識別に成功しました。

また、本論文が ACS Nano 誌の supplementary cover に採用されました。



◆ 研究に関する問い合わせ ◆

東京農工大学大学院工学研究院
生命機能科学部門 教授
川野 竜司（かわの りゅうじ）
TEL/FAX：042-388-7187
E-mail：rjkawano[at]cc.tuat.ac.jp

◆ 報道に関する問い合わせ ◆

東京農工大学 総務部 企画課 広報係
TEL：042-367-5930 FAX：042-367-5553
E-mail：koho2[at]cc.tuat.ac.jp

横浜国立大学 総務企画部 学長室 広報・渉外係
TEL：045-339-3027 FAX：045-339-3034
E-mail：press[at]ynu.ac.jp

科学技術振興機構 広報課
TEL：03-5214-8404 FAX：03-5214-8432
E-mail：jstkoho[at]jst.go.jp

◆ JST 事業に関する問い合わせ ◆

科学技術振興機構 戦略研究推進部 グリーンイノベーショングループ
嶋林 ゆう子（しまばやし ゆうこ）
TEL：03-3512-3531 FAX：03-3222-2066
E-mail：crest[at]jst.go.jp