

松本 和彦

国立大学法人 大阪大学 産業科学研究所
教授

糖鎖機能化グラフェンを用いた二次元生体モデルプラットフォームの創成

§ 1. 研究実施体制

(1) 大阪大学グループ

- ① 研究代表者: 松本 和彦 (大阪大学産業科学研究所、教授)
- ② 研究項目
 - ・たんぱく質試料を用いたウイルス検出の予備検討
 - ・六方晶窒化ホウ素上へのグラフェン直接合成
 - ・グラフェントランジスタ上への新規リンカー分子の検討
 - ・グラフェントランジスタを用いた酵素反応の電氣的計測
 - ・グラフェントランジスタを用いたシアリダーゼ反応計測の予備検討
 - ・グラフェントランジスタと複合化した表面弾性波センサーの開発

(2) 中部大学グループ

- ① 主たる共同研究者: 河原 敏男 (中部大学 工学部 電子情報工学科、教授)
- ② 研究項目
 - ・天然糖鎖の単離・構造解析

(3) 京都府立医科大学グループ

- ① 主たる共同研究者: 渡邊 洋平 (京都府立医科大学大学医学研究科、講師)
- ② 研究項目
 - ・インフルエンザウイルス臨床分離株の分離
 - ・分離インフルエンザウイルスの亜型鑑別

§ 2. 研究実施の概要

大阪大学グループは、インフルエンザウイルス感染時の足掛かりとなるシアロ糖鎖を用いてグラフェンを機能化、「二次元生体モデルプラットフォーム」としてデバイス化し、インフルエンザウイルス計測の高度化に取り組む。具体的には、鳥ないしヒトのシアロ糖鎖で機能化したグラフェン電界効果トランジスタ(G-FET)にウイルスを反応させ、ヒト感染性に変異した危険な鳥インフルエンザウイルスの超高感度検出を目指す(図 1)。

平成 27 年度は、インフルエンザウイルス由来のたんぱく質へマグルチニン(HA)を用いてウイルス検出の予備検討を行った。シアロ糖鎖を修飾したグラフェン上に HA を導入し、G-FET の電流値変化から HA 結合量を評価して鳥インフルエンザ HA は鳥型糖鎖に、ヒトインフルエンザ HA はヒト型糖鎖に優先的に結合することを示した。

本計測においては、グラフェンの電気特性向上により、高感度化が期待できる。六方晶窒化ホウ素(h-BN)上ではグラフェンの構造が安定化し、電気特性が向上するため、h-BN/グラフェン積層構造のバイオセンサ応用に着目した。今回、h-BN 上に蒸着した非晶質炭素からグラフェンを直接合成することに成功し、新規手法による積層構造構築を実現した。一方、グラフェン上の糖鎖密度向上によっても高感度化が可能である。そこで、グラフェンと糖鎖を繋ぐリンカーの検討を行い、従来のピレンリンカーよりグラフェンに結合し易いポルフィリンをリンカーとして、G-FET 表面の機能化に成功した。今後、これらの手法による高感度化の定量評価を進める。

インフルエンザウイルスの高感度検出と、ワクチン作製の指標となる亜型鑑別を同時に行うグラフェン電荷検出型 ELISA の開発に向け、マイクロウェルと複合化した G-FET を開発した。マイクロウェル中に酵素ウレアーゼの反応産物を閉じ込めることで、わずか 40 fg の酵素を 1 分以内に検出できた。ウレアーゼはピロリ菌感染の診断指標だが、今回の結果は市販の診断キットの 5000 分の 1 量のウレアーゼを約 100 倍高速に検出したことになる。

G-FET の創薬への応用についても検討を開始した。多くの抗インフルエンザ薬は、細胞からウイルスが脱離する際にシアロ糖鎖を切断する酵素シアリダーゼを阻害し、ウイルスの連鎖的な増殖を抑える。シアリダーゼ反応とその阻害を G-FET で計測できれば、創薬プラットフォームへの応用の道が拓ける。今回、シアロ糖鎖を修飾した G-FET にシアリダーゼを導入し、G-FET の電流変化を計測した。電流変化は酵素活性からの予測とよく一致していた。

ウイルスの表面電荷に加えて質量も同時検出するデバイスの開発も進めている。一般に、ウイルス凝集塊は感染性が高いとされるが、その詳細は明確でない。そこで、G-FET と表面弾性波(SAW)センサーを複合化し、ウイルス粒子の比表面積を評価することで、ウイルス凝集と感染性の関係の検証を目指している。今回、櫛形電極から G-FET に SAW を印加し、G-FET に生じる表面波励起電流を溶液中で初めて観測した。溶液に電圧を印加することで SAW による電子電流と正孔電流を観測し、その物理現象を明らかにした[1]。

鳥型ウイルスは
鳥型糖鎖にのみ結合
新型変異ウイルスは
両方に結合可能

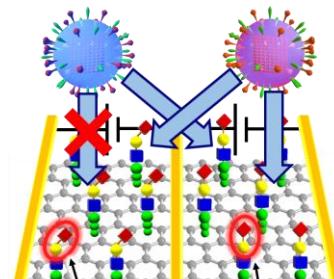


図 1: G-FET を用いた新型変異ウイルスの鑑別。ヒト感染性を得た鳥インフルエンザウイルスは、鳥型・ヒト型両方のシアロ糖鎖に結合する。

中部大学グループは、ウイルスの高感度検出に適した糖鎖の探索・合成を行う。インフルエンザウイルスがヒト・鳥どちらに感染するかは、細胞表面の糖鎖におけるシアル酸(Sia)の結合位置の僅かな差(ヒト:Sia α 2-6Galactose、鳥:Sia α 2-3Galactose)に依存している。シアル酸だけでなく、糖鎖の幾何学的構造(長さ、枝分かれ、修飾基等)や、糖鎖の分布密度によってもウイルス/糖鎖の反応様式(感染性)が変化する。よって、糖鎖構造や密度の精密な決定・制御が重要である。そこで、糖鎖の精密構造(単糖の配列)を調べるとともに、様々な天然糖鎖を単離・精製する。これらを、末端の誘導体化、及び、結合構造の検討を行うことでデバイス化に繋げることを目指す。

平成 27 年度は、各種糖鎖の構造を調べた後に、鶏卵、ウシ・ヤギ乳、赤血球、動物組織などを原料にして、鳥およびヒトインフルエンザウイルスが結合出来るシアロ糖鎖を単離・調製した。この中で分岐構造等の異なる糖鎖で比較を行うため2種類の糖鎖に関して、グラフェンデバイスとの比較データを得るために、HA との反応を ELISA 法によって調べた。また、糖鎖構造の支持体の一つである低密度リポたんぱく粒子の脂質部位の酸化に伴う密度変化・粒径変化を見出した。この結果は糖鎖の分布制御、ひいては二次元生体モデルプラットフォームの表面機能化の制御に繋がるものである[2]。

京都府立医科大学グループは、糖鎖修飾グラフェンを用いたインフルエンザウイルスの超高感度検出系を構築する上で必要となるウイルス材料を準備する。

平成 27 年度は、多検体の臨床サンプルからインフルエンザウイルス株を分離した。これらのウイルス材料を、来年度以降、本研究課題における他の研究機関(阪大、中部大、香川大)に円滑に提供することで、事業を推進する。

- [1] Satoshi Okuda, Takashi Ikuta, Yasushi Kanai, Takao Ono, Shinpei Ogawa, Daisuke Fujisawa, Masaaki Shimatani, Koichi Inoue, Kenzo Maehashi and Kazuhiko Matsumoto, "Acoustic carrier transportation induced by surface acoustic waves in graphene in solution", Applied Physics Express, vol. 9, No. 4. pp. 045104-1-4, 2016
- [2] Toshimi Kido, Kazuo Kondo, Hiroshige Itakura, Shinji Yokoyama, "Sequential change in physicochemical properties of LDL during oxidative modification", Chemistry & Physics of Lipids, 193, 52–62(2015)