

松本和彦

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
 - ・グラフェントランジスタを用いたインフルエンザウイルスの電気的検出
 - ・液中 AFM による糖鎖機能化グラフェンの表面形態観察
 - ・グラフェントランジスタを用いたノイラミニダーゼ反応と抗ウイルス薬による反応阻害の計測
 - ・グラフェントランジスタでの酵素反応計測による病原体の検出
 - ・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・構造解析と各種糖鎖によるデバイス化
 - ・糖鎖の分布の評価と制御技術の開発

(3) 香川大学グループ

- ① 主たる共同研究者: 中北 慎一 (香川大学 総合生命科学研究センター、准教授)
- ② 研究項目
 - ・天然糖鎖の単離・誘導体化と各種糖鎖の近接場光による評価

(4) 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 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
- ・不活化ウイルスサンプルの準備と供給

§ 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 28 年度は、実際のインフルエンザウイルスを用いた実験を開始し、G-FET で糖鎖に結合したウイルスを検出することに成功した。たんぱく質試料を用いて糖鎖分子の長さの最適化に関する研究も進めた。G-FET の電流変化だけでは得られない形態情報を得るために、液中 AFM による糖鎖機能化グラフェンの観察も開始し、グラフェン上に構造化した糖鎖等の生体分子を観察できた。さらに、グラフェン表面でのノイラミニダーゼ酵素反応と抗インフルエンザ薬による反応阻害の計測にも成功している。酵素反応は創薬以外にウイルス検出の高感度化にも応用可能であり、その予備的検討として酵素ウレアーゼを持つ病原体ピロリ菌を、菌の表面電荷ではなくその酵素反応産物によって、市販キットの検出限界の一万分の一以下の量で検出した。表面弾性波センサーやマイクロ流路と G-FET の複合化も進めた。

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。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、ウイルス/糖鎖の反応様式(感染性)が変化するので、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 28 年度は、分岐構造・長さの異なる糖鎖を準備して、デバイス化のために、プレートやガラスへの結合構造を調べると共に、タンパク質との反応性、及び、細胞培養で増やしたウイルスとの反応性から、糖鎖の選択・構造最適化を行った。

まず、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の測定条件を詳細につめるため、ブロッキング条件を検討し、また、各プロセスの条件依存性(反応時間、分子濃度等)を調べて、糖鎖反応性の比較基準を構築した。そして、HA タンパク質及びインフルエンザウイルスと糖鎖の反応を調べた。ヒトおよび鳥由来ウイルスとしては、A/California/07/2009 (H1N1)、A/mallard/Hokkaido/24/2009 (H5N1)を用い、鳥型、ヒト型に応じて、反応性が高い糖鎖の配位が異なることが分かった。また、シアリルラクトースとシアロ糖鎖ポリマーのウイルスとの反応性に関して赤血球凝集阻害活性により調べ、ヒト型糖鎖では傘型の配置でウイルスと結合するため、適度のスペースが必要であり、高分子鎖が糖鎖を分散させるのに有効であることがわかった。同様に、原子間力顕微鏡、透過型電子顕微鏡から、シアリルラクトースでは一部に凝集物が見られるのに対して、シアロ糖鎖ポリマーでは分散性が良いことも確認された[1]。また、長さの異なる糖鎖を準備してインフルエンザウイルスとの反応性を調べた。ヒトへの感染性が増加する変異を起こすにつれて、糖鎖のラクタミンリピート構

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

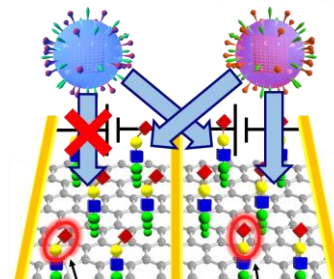


図 1: G-FET を用いた新型変異ウイルスの鑑別。ヒト感染性を得た鳥インフルエンザウイルスは、鳥型・ヒト型両方のシアロ糖鎖に結合する。

造が重要となることが分かった[2]。

ここまでは、糖鎖分子単独構造とウイルスの反応性を検討してきたが、実際のウイルスの反応は細胞膜上で起こり、例えばラフト構造等その分布の影響を受けると予想される。例えば、糖転移酵素遺伝子欠損マウスを用いた実験によりラフト構造を制御し分子反応が調べられている。そこで、細胞上の糖鎖のモデル化として、脂質を用いた糖鎖分布の制御技術の開発を行った。本年度は、糖脂質を薄膜化するためのラングミュア-ブロッジェット(LB)膜作成装置 USI-3-22(株式会社ユーエスアイ)を導入し、単分子膜の指標を確かめた。また、ガングリオシドの発現変化による細胞膜環境の変化がインフルエンザウイルスの細胞への結合、侵入に与える影響を明らかにするために、ウシ脳由来の糖脂質等を用いて、ウイルスの各種糖脂質の糖鎖に対する結合特異性を調べた。

以上、デバイス化のための結合構造を検討し、グラフェンの表面制御や糖鎖分子の制御技術を開発している。そして、ウイルスの反応性を評価することで、異なる糖鎖への結合性の変化の評価や、薬剤物質との相互作用解析等が可能になる。引き続き、選択的反応性・感度等を調べて、バイオセンサーの高感度化につなげていく予定である。

香川大学グループでは、インフルエンザウイルスに結合する糖鎖(主に糖たんぱく質糖鎖)を生体資材から調製し、どのような構造の糖鎖がヒトや鳥由来のウイルスに感染するかを、近接場光を使った測定装置(エバネッセントスキャナー)を用いた糖鎖の機能性の評価を行った。また、得られた細胞表面の糖鎖情報をもとに、種々の糖鎖を単離精製し、デバイス化に適応した構造に末端の誘導体化し、阪大グループに供給できるように精密に構造決定された糖鎖ライブラリを構築した。

各種生体資材の糖鎖発現情報から、シアル酸が $\alpha 2-3$ 結合したラクトサミンと $\alpha 2-6$ 結合したラクトサミンをウシ及びヤギから抽出し、分離・精製後、単離した。また、多分岐型糖鎖に関しても同様に、最適な生体資材を選択し、糖鎖を得た。得られた糖鎖の末端部分を改変し、たんぱく質に導入した(Neoglycoproteinの作製)。これをスライドガラスに固定化することでエバネッセントスキャナーで測定可能な状態にした。作製したNeoglycoproteinに目的の糖鎖が結合しているかについて糖結合たんぱく質(レクチン)を使って計測したところ、目的の糖鎖に特異的に結合するレクチンとのみ反応することが分かった。これを使って、実際にウイルスを使った結合実験を行ったところ、ウイルスの特異性と一致した結果が得られた。また多分岐型糖鎖の結合についての測定もおこなうことができた。

今回選択した生体資材は、多分岐型糖鎖を調製するのに優れた材料であり、今後はこれを使って糖鎖の調製を行い、供給するための糖鎖調製についてもおこなう予定である。

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の準備を進めるため、多検体の臨床サンプルからH5亜型およびH9亜型インフルエンザウイルス株を分離した。また、鳥インフルエンザが蔓延しているエジプトにおいてフィールド調査を実施し、ウイルス材料と疫学情報を収集した。

さらに、ウイルス不活化について条件検討を実施し、本研究課題における他の研究機関(阪大、中部大、香川大)に不活化試料として提供を開始しており、事業の円滑化を推進している。

代表的な原著論文

[1] T. Kawahara *et.al.*, *Condens. Matter*, **1**, 7 (2016)

[2] Y. Arai *et.al.*, *PLoS Pathogens*, **12**, e1005583 (2016)