

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

ヒト型・鳥型の糖鎖で機能化したグラフェン FET を用いてインフルエンザウイルス(IFV)の感染性を鑑別することは、本プロジェクトの最大の目標の一つである。平成 29 年度、この目標を達成した。以下、大阪大学の成果を箇条書きする。

1. ヒト型糖鎖で機能化したグラフェン FET 上へのヒト感染性の IFV の特異的結合を電氣的に検出することに成功した(図1)。またその結合を、蛍光顕微鏡等を用いて直接観察・確認した。これらを通じ、29 年度当初の計画である 10 HAU を下回る 2.56 HAU の低濃度ウイルスのヒト・鳥感染性鑑別に成功した。

2. インフルエンザワクチン供給に際して重要となるウイルスの亜型鑑別では、感染性と亜型を同時・高感度に鑑別するグラフェン

電荷検出型 ELISA(ELISA: 酵素結合免疫吸着アッセイ)を提案している。平成 29 年度は、従来酵素反応検出の原理実証に用いてきた酵素に代わり、ELISA で汎用される酵素を適切な基質と組み合わせることで、グラフェン FET で検出・濃度定量が可能であることを見出した。

3. これまで本 CREST では、剥離によって得たグラフェンを主にデバイスに用いていたが、この方法ではグラフェンの位置が制御できず、またデバイスの作製効率も低いため、実用化には耐えない。平成 29 年度は、化学気相成長法(CVD 法)により合成したグラフェンを用いて、チップ上にグラフェン FET を集積化し、さらに、企業との協働により、ポータブルかつノート PC で駆動・計測可能なシステムを開発した。

以上の成果は、国際総合展示会 nanotech 2018 において産学連携賞を受けた。

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。様々な天然糖鎖を単離・精製して、末端の誘導體化、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。以下、中部大学の成果を箇条書きする。

1. 糖鎖展開時の複数吸着サイトの確率的反応のためのばらつきを抑えて反応活性の高い糖鎖プローブを探索するため、糖鎖を持たないタンパク質である BSA (Bovine serum albumin) への固定化を検討した。その結果、ウイルス濃度を 1/10 にしたときに、シアロ糖鎖ポリマー(sialylglycopolymer; SiaLacNAc-spacer-polyglutamic acid)を直接展開した場合と同様の反応性を示すことが分かり、高感度化と分布状態及び反応性の安定化が達成出来た。

2. 実際にヒトへの感染過程との対応を見るため、組織の中の糖鎖を詳細に分析することで糖鎖の分類を行った。ヒト肺の中の糖鎖には数多くの種類のシアロ酸含有糖鎖が分離・解析され、各種シアロ糖鎖とウイルスとの反応性を詳細に比較して反応活性を評価することで、センサーの高感度が期待できると思われる。

3. 反応評価実験に使用するウイルスの的確な定量が重要である。そこで、人工知能(AI)による定量化を目指して、プラーク写真の画像解析による定量化を検討した。色調変化処理、膨張処理等を用いてカウンティングしたが、今後、機械学習により大きさの閾値を最適化し、各種条件の

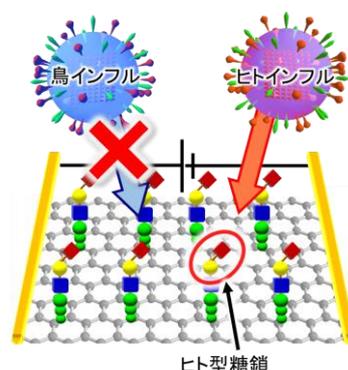


図1: グラフェン FET を用いたインフルエンザウイルス感染性の高感度鑑別の概要。

IFV に適用して精度を上げていきたい。

4. 細胞上の糖鎖のモデル化、および、プレート上糖鎖との比較実験として、脂質を用いた糖鎖分布の制御技術の開発を行った。糖脂質糖鎖に対するインフルエンザウイルスの反応性は、個々の糖鎖構造の詳細な差異に依るとともに、スフィンゴ糖脂質の細胞膜上での存在形態に影響されると考えられる(K. Furukawa *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861** 2479 (2017))。そこで、様々な糖脂質変異を有する糖鎖合成酵素遺伝子のノックアウトマウスの脳からガングリオシド画分を精製・展開して、生化学的に観察されている脂質ラフトの破壊状態に通じる所見が得られた。

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、IFV 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體体化し、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。以下、香川大学の成果を箇条書きする。

1. 各種生体資材の糖鎖発現情報から、シアル酸がラクトサミンと $\alpha 2-6$ 結合した糖鎖(二本型糖鎖)に7つのアミノ酸が結合した糖ペプチドをニワトリ卵黄から抽出し、溶媒抽出及び逆相カラムを使って精製した。また、昨年度調製したシアル酸がラクトサミンと $\alpha 2-6$ 結合した糖鎖(シアリル $\alpha 2-6$ ラクトサミン)及びシアル酸がラクトサミンと $\alpha 2-3$ 結合した糖鎖(シアリル $\alpha 2-3$ ラクトサミン)に架橋剤を使ってたんぱく質を導入した(Neoglycoprotein の作製)。
2. こうして調製した糖ペプチド、Neoglycoprotein をスライドガラスに固定化することによってエバネッセントスキャナーで測定可能な状態にした。これら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。しかしながら、糖ペプチドを用いた場合は、Neoglycoprotein を用いた場合よりも感度が低いことが分かった。

今後は Neoglycoprotein をデバイス用のリガンドとして調製し、利用可能かどうかについての検討を行う予定である。

京都府立医科大学のグループは、糖鎖修飾グラフェンを用いた IFV 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本研究課題における他の研究機関(阪大、中部大、香川大)に順次提供した。以下、京都府立医科大学の成果を箇条書きする。

1. ウイルス材料については、阪大からの要望に従い、グラフェンによるウイルス検出に影響する溶媒条件を適宜変更した試料を提供することで、事業の円滑な推進に貢献した。

H5N1 高病原性鳥 IFV を対象に解析を実施することで、ヒト細胞での複製過程で出現するシアロ糖鎖結合特異性変異ウイルス群を同定した。