

二次元機能性原子・分子薄膜の創製と利用に資する基盤技術の創出  
平成 27 年度採択研究代表者

2018 年度 実績報告書
------------------

松本和彦

大阪大学産業科学研究所  
特任教授

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. 研究成果の概要

大阪大学グループは、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)の感染性の鑑別を実施している(図1)。以下、本年度の成果を箇条書きする。

1. ポータブルなグラフェンセンサーシステムに対して鳥・ヒト型のシアロ糖鎖を個別修飾し、スワブに対して非特異吸着を抑制するブロッキング条件を導出した。
2. 上記の条件を元に作製したシステムを、鳥インフルエンザが蔓延するエジプトに持ち込み、現地で採材した臨床サンプルに初めて適用した。同時に、臨床応用における課題を抽出した。

以上の成果は、日経産業新聞等で報道された。

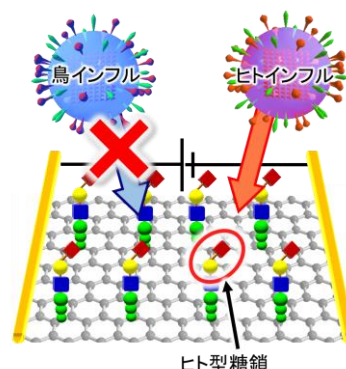


図 1: グラフェン FET を用いたインフルエンザウイルス感染性の高感度鑑別の概要。

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、末端の誘導体化、及び、結合構造の検討を行うことでデバイスの高感度化に繋げることを目指す。以下に平成 30 年度の成果をまとめる。

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さらに反応活性の高い糖鎖プローブを探索するため、長鎖・分岐構造を有する SGP (Sialylglycopeptide) を、糖鎖を持たないタンパク質である BSA (Bovine serum albumin) に固定化し、ウイルスに対する反応性を検討した。SGP-BSA はヒト及び鳥インフルエンザウイルスに対し、安定化と高感度化を示すことがわかった。また、インフルエンザウイルスは、末端のシアル酸結合様式のみならず、シアロ糖鎖の長さや分岐構造も厳密に認識していることを見出した。
2. 糖鎖合成酵素ノックアウトマウスの脳由来初代培養アストロサイトを樹立し、その細胞形質の特徴と、スフィンゴ糖脂質近傍の分子クラスター形成の異同を検討した。まず、GM2/GD2 合成酵素と GD3 合成酵素の両遺伝子を欠損するダブルノックアウトマウス(DKO)由来アストロサイトの増殖能を検討し、DKO 由来アストロサイトが明らかに高い増殖能を示し、GM1 が増殖抑制に働くことが示唆された (Y. Ohmi *et al.*, *PLOS One*, 13 e2006951 (2018))。さらに EMARS 反応により、GM3、GM1 周囲の膜タンパク質の同定を試み、野生型マウスアストロサイトで GM1 近傍分子が著明に標識されたことから、その機能発現機構の解明が期待される。
3. 樹立されたアストロサイトにインフルエンザウイルスを感染させ、得られた培養上清に対しプラークアッセイによる解析を行なったところ、鳥インフルエンザウイルスを感染させた場合のみに細胞傷害が見られた。さらに、ウイルス感染ステージを調べたところ、ヒト及び鳥インフルエンザも、アストロサイトに対して吸着までは成立していることがわかった。

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、種々の生体資材からシアル酸がラクトサミンと糖鎖を調製、加工することによって結合位置の異なる2種類の糖ペプチドを得た。この2種類の糖ペプチドをたんぱく質に導入し、これらを使ってインフルエンザウイルスとの結合活性について測定したところ、これまでの報告通り、調製した糖鎖はヒトに感染するインフルエンザウイルスに結合するものとトリに感染するインフルエンザウイルスに結合する糖鎖であることが分かった。この結果から、これらの糖鎖もインフルエンザウイルス測定用デバイスに利用可能な糖鎖であるということが示唆された。

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。
2. H5N1 亜型高病原性鳥 IFV と H9N2 亜型 IFV を対象に解析を実施することで、感染患者体内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。またエジプト地域において、両ウイルスが遺伝子交雑することでヒトに高い感染性を獲得した変異ウイルスが出現する高い潜在性を初めて示した。

#### 【代表的な原著論文】

1. Yasuha Arai , Madiha S Ibrahim, Emad M Elgendy , Tomo Daidoji , Takao Ono, Yasuo Suzuki, Takaaki Nakaya, Kazuhiko Matsumoto, Yohei Watanabe. “Genetic compatibility of reassortants between avian H5N1 and H9N2 influenza viruses with higher pathogenicity in mammals” Journal of Virology, 93:e01969-18, 2018

## § 2. 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 特任教授)
- 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氣的検出
  - ・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
  - ・創薬解析プラットフォームとしての適用性評価
  - ・海外との連携による有用性評価
  - ・不活化ウイルスサンプルの準備と供給