

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
2015 年度採択研究代表者

2019 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

大阪大学のグループは、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。以下、本年度の成果を箇条書きする。

1. 表面敏感なグラフェンバイオセンサーに対して、表面近傍に反応領域を限局するマイクロ流体デバイスを複合化し、さらに酵素反応計測に適用することで、電気的なバイオセンシングにおいて普遍的な課題であったデバイ遮蔽の問題を解決し、更に高感度と定量性を付与した新たな手法を開発し、論文・プレス発表を行った(図1、代表論文 1)。
2. グラフェンアレイ中の個々のトランジスタに対してレセプター分子を個別に修飾する技術を開発した。また、種々の測定項目に応じたレセプター分子を作製した。
3. グラフェンセンサーの社会実装・臨床応用を念頭に、ポータブルなグラフェン計測システムにマイクロ流体デバイスを実装した。また、システムへの適用を念頭に、電流ドリフトの少ないプロセスフローの検討や、量産性と品質を両立し得るグラフェンプロセスの検討を行った。

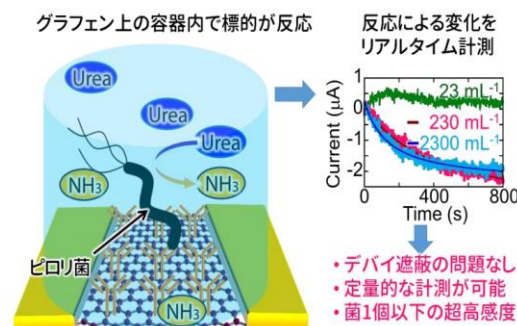


図1: マイクロ流体デバイスと複合化したグラフェン酵素アッセイの概要。原理実証としてヘリコバクターピロリを計測した。

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、末端の誘導体化、及び、分子的・幾何学的構造の検討を行うことでデバイスの高感度化につなげることを目指す。以下に 2019 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、さらに反応活性の高い糖鎖プローブを探索するため、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) に固定化した Neoglycoprotein を合成し、糖鎖の分岐の有無に対するインフルエンザウイルスの糖鎖結合性について比較検討を行なった(T. Kawahara *et al.*, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 58, SIID03 (2019)). その結果、Neoglycoprotein はヒト及び鳥インフルエンザウイルスの結合に対して、安定化と高感度化を示すことがわかった。さらに、鳥インフルエンザウイルス、新型を含むヒトインフルエンザウイルスは分岐を持たない糖鎖を固定化した Neoglycoprotein のほうが高い結合性を有していることが分かった。
2. 初代培養アストロサイト細胞を用いた EMARS 反応により、GM3、GM1 周囲の膜タンパク質の同定を試み、各々のガングリオシド周辺の膜タンパク質を MS により同定した。さらに、糖鎖合成酵素遺伝子を導入して樹立した、親株である SK-MEL-28 N1 細胞に加え、GD3 合成酵素、GM2/GD2 合成酵素、GM1 合成酵素、GD3 合成酵素と GM2/GD2 合成酵素の両者、等の cDNA を導入して、主たる発現ガングリオシドが異なる細胞群 (トランスフェクタント) を用いて、その細胞形質の特徴の比較検討と、糖脂質近傍の分子クラスター形成につき検討した。そして、初代培養アストロサイトにインフルエンザウイルスを感染させたとき、増殖はみられなかった

が吸着までは成立していた。

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、構造の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天然物及び糖転移酵素を使った方法を使うことで得た。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だけ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り、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。また、糖転移酵素を使わずに糖ペプチドを調製するために種々の生体資材から糖ペプチドの調製を行い、目的の糖鎖を得ることができた。

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. H9N2 亜型 IFV を対象に解析を実施することで、大陸伝播過程で出現したヒトに感染性を高めた変異ウイルス群を同定した。またエジプト域において、NA 阻害剤の標的分子である NA に欠損を獲得した H9N2 亜型 IFV 変異株をはじめて分離した。

【代表的な原著論文】

1. Takao Ono, Yasushi Kanai, Koichi Inoue, Yohei Watanabe, Shin-ichi Nakakita, Toshio Kawahara, Yasuo Suzuki, and Kazuhiko Matsumoto, "Electrical Biosensing at Physiological Ionic Strength Using Graphene Field-Effect Transistor in Femtoliter Microdroplet", Nano Letters, vol.19 No.6, pp.4004-4009, 2019.
2. Yasuha Arai, Norihito Kawashita, Madiha S Ibrahim, Emad M Elgendy, Tomo Daidoji, Takao Ono, Tatsuya Takagi, Takaaki Nakaya, Kazuhiko Matsumoto, Yohei Watanabe. "PB2 mutations arising during H9N2 influenza virus evolution in the Middle East confer enhanced replication and growth in mammals" PLoS Pathogens 15:e1007919, 2019. Selected as Featured Research (July 2019)

§ 2. 研究実施体制

(1) 阪大グループ

- 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
 - ・マイクロ流体デバイスと複合化したグラフェンセンサーの検討
 - ・高品質なグラフェンデバイスを量産可能なプロセスの検討
 - ・レセプター分子とその修飾方法の検討
 - ・社会実装を見据えた測定システム及び測定方法の検討

(2) 中部大学グループ

- ① 主たる共同研究者:河原 敏男 (中部大学生命健康科学部臨床工学科 教授)
- ② 研究項目
 - ・糖鎖の分布解析・制御によるデバイス化

(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・誘導體化と各種糖鎖の近接場光による評価
(プラットフォーム用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
 - ・臨床/組換えウイルスの性状解析とNA シアリダーゼ活性評価
 - ・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