

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了(年次)報告書

研究期間 2015年11月～2022年3月
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)
(新型コロナウイルスに係る研究開発の特別研究支援課題によ
り、2022年3月まで延長)

研究代表者: 松本 和彦
(大阪大学産業科学研究所 特任教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

グラフェン FET のチャンネル上に糖鎖を修飾し、糖鎖の違いによりインフルエンザウイルスの人感染性を高感度に検出することが研究目的である。

本研究は、FET や糖鎖、ウイルスなどの様々な要素があるために、一研究機関では達成困難であり、それぞれの専門家を擁する研究機関と連携を図って目標を達成した。本研究チームは、大阪大学、中部大学、香川大学、京都府立医科大学、村田製作所の5つの研究グループから構成されている。中部大学、香川大学は糖鎖に関する研究を、京都府立医科大学はウイルスに関する研究を行い、大阪大学がその糖鎖とウイルスに関する知見を統合して、糖鎖を修飾したグラフェン FET でインフルエンザウイルスを高感度に検出する研究開発を行った。その結果をもとに村田製作所は社会実装に関する開発を行った。これらが5つのグループの研究概要とその連携成果である。以下に各グループの研究成果の概要を述べる。

大阪大学はグラフェン FET でウイルスを電氣的に高感度に検出する技術を開発した。

実際のウイルスを扱うのは危険なため、研究開始初期には植物由来でウイルスと同等の反応を起こすレクチンや、ウイルスのエピトープであるヘマグルチニンを用いて、糖鎖を修飾した剥離グラフェン FET を用いてウイルスのヒト感染性の検出に成功した。京都府立医科大学グループがウイルスの不活化に成功して、安全性を確保できた時点から実際の H1N1, H9N2 などの実際のインフルエンザウイルスを使用し、 α 2-6 および α 2-3 糖鎖を修飾した剥離グラフェン FET を用いてインフルエンザウイルスのヒト感染性を鑑別することに成功した。さらに同様の糖鎖修飾した剥離グラフェン FET を用いて、インフルエンザ薬であるザナミビル薬の薬剤効果を電氣的に測定できることを初めて示した。オックスフォード大学との共同研究で、液中 AFM の観測結果と電氣的特性の比較からザナミビル薬の薬剤効果を裏付けることに成功した。また LiTaO₃ 基板上にグラフェン FET を形成し、両端に IDT を形成して弾性表面波を伝搬させることにより、グラフェン FET チャンネル上で、付着したウイルスの電荷とその質量を同時に測定できるシステムを三菱電機と共同で開発した。剥離グラフェンではそのサイズが限定されていて将来展望が困難な為、CVD グラフェンの開発を行い、1cm x2cm サイズのグラフェン基板を用いてデバイス開発を行った。その結果、82点のグラフェン FET を集積化したグラフェン FET アレイを形成し、82点の FET を同時に計測するシステムを構築した。これにより、作成したグラフェン FET アレイのばらつき、歩留まり、平均等を評価することが可能となり、より実用化に近づけつことができた。さらにバイオインクジェットを用いてグラフェン FET アレイの一点一点の FET に個別にレセプターを修飾する技術を開発した。これにより、様々なレセプターを修飾することにより多項目を同時に診断できるシステムへ展開可能となった。これらの知見を集大成して、村田製作所と共同で、ポータブル測定機器の開発を行い、これをラップトップコンピュータと接続するだけで、デスクトップタイプの測定系と同等の性能が出るシステムを構築した。このシステムは、今後のオンサイト測定に威力を発揮するものと期待される。本研究成果は、グラフェン FET に修飾するレセプターを変更するだけで、様々なウイルスに対応できるため、2020年に中国武漢市から発生した新型コロナウイルスへの展開を図りつつある。

本 CREST 研究におけるグラフェン FET を用いたウイルス 研究の手法を演繹展開して新型コロナウイルスの検出を行った。予備実験として簡便に光学測定で新型コロナウイルスと ACE2レセプターおよび抗体との結合特性を確認し、ついでグラフェン FET による新型コロナウイルスと抗体との結合を電氣的に計測した。また原子間力顕微鏡と電子顕微鏡による新型コロナウイルスの結合も確認し、新型コロナウイルスが検出可能であることを見いだした。

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・合成を行った。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した。糖鎖プローブの最適化として、まず、分岐構造等の異なる糖鎖で比較を行うために、天然物から単離した糖鎖のデバイス化のためのプレートやガラスへの結合構造を調べた。そして、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し、安定化と高感度化に成功した。初めてウイルスと

糖鎖の反応性を詳細に比較することが可能となり、鳥インフルエンザウイルス(H5N1)やパンデミック株を中心に構造の異なる糖鎖との反応性を比較した。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も行い、生体内構造のデバイス化プロセスの検討を行った。そして、糖鎖プローブとしての利用を想定し、インフルエンザウイルスの吸着状態を調べた。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、グラフェン上に分布制御糖鎖を構築し、また、その分子反応を評価することで最適化を行った。これらの結果を基に、バイオセンサーのさらなる高感度化を目指す。

香川大学グループはヒトの呼吸器に発現するインフルエンザウイルスレセプターシアロ糖鎖が質量分析により明らかにされた。これらの知見を利用し、鳥およびヒトインフルエンザウイルスが結合するレセプターシアロ糖鎖を検討する。次に、それらをデバイスに用いるため、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精製する。そして、大量調製可能な分岐構造を持つ糖鎖の選択を行い、アレイ化可能な構造に変換する。こうして調製した糖鎖を用いてウイルスとの反応性を、近接場光を用いて反応性を調べる。また、この糖鎖をデバイスに利用できるような構造に変換して供給を行う。

これまでに、Neu5Ac α 2-3LacNAc、Neu5Ac α 2-6LacNAc、シアリルバイアンテナ糖鎖、SGP (アミノ酸7つが繋がったペプチドにシアリルバイアンテナ糖鎖が結合した構造を持つ糖ペプチド)などをヤギミルクやウシ血清、ニワトリ卵黄、魚卵などから抽出し、プロテアーゼ消化、アルコール沈殿、ゲル濾過及び各種HPLCを使って精製-単離を行った。得られた糖鎖にスパーサーを介してBSAに結合させた糖鎖プローブを作製し、インフルエンザウイルス(ヒト型ウイルス及びトリ型ウイルス)との結合測定を行ったところ、ヒト型ウイルスは α 2-6結合したNeu5Acを持つ糖鎖(Neu5Ac α 2-6LacNAc、シアリルバイアンテナ糖鎖、SGP)にのみ結合し、トリ型ウイルスは α 2-3結合したNeu5Acを持つ糖鎖(Neu5Ac α 2-3LacNAc、Sia α 23型シアリルバイアンテナ糖鎖、 α 23SGP)にのみ結合した。このことから調製した糖鎖プローブはウイルスとの結合活性を測定することが可能なものであると判断し、これらの供給を行った。また、調製した糖ペプチドはインフルエンザウイルスが認識する糖鎖であることが確認できたので、グラフェン上に固定するために、これらにピレン残基を導入したものを作製し、供給を行った。

京都府立医科大学は、主にウイルスを取り扱う研究を担当し、様々なインフルエンザウイルス(臨床ウイルス・組換えウイルス)の性状を解析し、感染性やレセプター糖鎖結合親和性などの各パラメーターを明らかにした参照ウイルスとしてデバイス開発を推進する他の研究グループに供給する役割を担った。ウイルス性状解析においては、海外の鳥インフルエンザ常在地域(エジプトを中心とする中東域やベトナムを含む東南アジア地域)において、ヒト感染性を高めた多様な変異ウイルスが出現していることを世界に先駆けて見出した。ウイルスサンプルの供給においては、レセプター糖鎖結合性を保持したままでウイルス感染性を消失させる不活化技術を確立させ、研究期間を通じて計11回の不活化サンプル供給を行うことで、安全なデバイス開発に寄与した。また、海外地域におけるデバイスのオンサイト測定において、海外研究機関と事前調整を行うと共に、渡航先で現地研究者と連携してフィールド測定のコーディネートを担当し、デバイスの実用化に向けた改善点の明確化に貢献した。

COVID-19による延長期間においては、さらに不活化インフルエンザウイルスサンプルを計2回大阪大学グループへ供給すると共に、中国で近年発生した鳥インフルエンザウイルスがヒト感染性を高めて急速に感染拡大している事実を明らかにした。

さらに、インフルエンザウイルスを対象に実施してきた研究成果を新型コロナウイルスに応用することで、新型コロナウイルスを感染に不活化したサンプルとして調整して大阪大学グループへ供給した。さらに新型コロナウイルスのレセプター分子ACE2をデバイス利用に最適な部分断片として精製して、大阪大学グループに供給した。これらにより、新型コロナウイルスに対するデバイス開発にも寄与した。さらに、新型コロナウイルスに係る研究開発の特別研究支援を受け、ACE2の糖鎖付加パターンがウイルスとの結合性及びヒト感染性に与える影響を評価して現在論文として取りまとめている状況にある。

村田製作所グループは、持ち運び可能なグラフェン FET 計測装置の開発を行った。従来の計測装置はベンチトップサイズであり、ラボ環境外で測定することは極めて困難であった。そこで、計測器を手のひらサイズまで小型化し、USB ケーブルでモバイル端末に接続するだけで動作可能な計測器を開発した。本装置は集積化された FET アレイの電気特性を独立に測定し、かつ本装置のノイズレベルも従来計測器と同等である。本装置の開発により、ラボ環境外での測定が可能となった。2018 年 2 月に nano tech 2018 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議に、同年 8 月には JST フェア 2018 にて本装置を展示した。また、同年 12 月には本装置をエジプトに持っていき、現地で鳥インフルエンザウイルスのヒト感染性を調査する成果に繋がった。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 糖鎖修飾グラフェン FET で鳥インフルエンザの人感染性を超高感度に計測

概要: グラフェン FET チャンネルに α 2-6 人型糖鎖と α 2-3 鳥型糖鎖を修飾する技術を開発し、リン酸緩衝液中においてウイルスを導入し、鳥インフルエンザウイルス H1N1 のヒト感染性を判定できた。従来のクロマトグラフィーで検出できる 100 倍以上の 0.0256HAU の感度で検出に成功した。さらに AFM を用いてウイルスの数とディラックポイントのシフト量から外挿して、グラフェンチャンネルにウイルスが3個付着すれば検出できるという限界を示した。

2. インフルエンザ薬剤機序をグラフェン FET を用いて電氣的に初めて測定

概要: 糖鎖修飾グラフェン FET にノイラミニダーゼを導入し、糖鎖先端のシアル酸カットによる電荷減少に伴うドレイン電流の減少を測定することに成功した。この系にインフルエンザ薬剤であるザナミビルを投与した場合は、シアル酸カットが生じずにドレイン電流は一定であるが、投与しない場合は、ドレイン電流が減少することにより、薬剤機序をドレイン電流の変化で計測できることを初めて明らかにした。さらにオックスフォード大学との共同研究で、ザナミビルによるノイラミニダーゼのシアル酸カットの抑制効果を液中 AFM を用いて観測し、電氣的結果と一致することを確認した。これにより薬剤機序の効果を電氣的に計測できることを確認した。

3. ノイラミニダーゼの長さがインフルエンザウイルスのヒト感染性に影響することを解明

概要: インフルエンザウイルスの粒子表面には、レセプター分子への結合に関わる HA タンパク質と乖離に関わる NA タンパク質の 2 つが発現している。これまで、インフルエンザウイルスの感染性や宿主適応は、生体膜への結合に重要な HA の機能によって規定されると考えられてきた。本研究では、ウイルス粒子が生体膜に結合後に細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれるまでの間、細胞膜上を rolling する最近の知見に基づき、NA stalk 変化が NA の乖離活性を変化させ、HA—NA 機能バランス変化を介してインフルエンザウイルスのヒト感染性を規定する新しい宿主適応機序を明らかにした。本研究成果は、米国ウイルス学専門誌、Journal of Virology に掲載された (Arai Y et al. J Virol 2020)。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 多項目同時測定手法の開発

概要: インフルエンザウイルスの感染性で重要なことは、ヒト感染性の有無と、その亜型の鑑別であり複数項目を同時に診断する必要がある。このために 1 つの FET のみ形成可能な剥離グラフェンから、CVD グラフェンの成長技術を確認し、82基のグラフェン FET を集積アレイ化した。さらにこの集積アレイ化グラフェン FET にバイオインクジェットで、PBASE リンカーや、糖鎖、様々な抗体を塗布してグラフェン上に修飾する技術を開発に成功し、多項目を同時に測定できるシステムを構築し、より実用化に近い技術開発を行った。

2. インフルエンザウイルスのポータブル測定器

概要:鳥インフルエンザのヒト感染性を診断する際に、鳥インフルエンザ発生現場でその場で診断する必要が生じるが、研究室で使用しているデスクトップ型の大型機器では対応不可能である。村田製作所様のご協力を得て、手のひらサイズのポータブル測定機器を開発し、これを USB でパソコンと接続するだけで、デスクトップ型の大型機器と同等の感度が得られた。本装置は 32 点の同時多項目診断も可能としている。この装置を用いてエジプトで H9N2 と H5N1 のヒト感染性の実証実験を実行した。JST フェア 2018 にて展示し、nano tech 2018 では産学連携賞を受賞するなど高い評価を得た。

3. マイクロチャンバー ピロリ菌の測定

概要:グラフェン FET とマイクロチャンバーを組み合わせ、微小体積中に閉じ込めた化学反応で細菌を高感度に検出する手法を開発した。ウレア・ウレアーゼ反応を利用して、ピロリ菌が発生するアンモニアをグラフェン FET の電流変化で検知し、をわずか3個の個体の濃度で検出する技術を開発した。電気的検出で問題になるデバイ長の頸木を解放したものでより実用化に近い手法である。

<代表的な論文>

1. “Electrical Biosensing at Physiological Ionic Strength Using Graphene Field-Effect Transistor in Femtoliter Microdroplet” Nano Letters vol. 19, pp. 4004-4009 (2019). DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b01335

概要:グラフェンバイオセンサーは超高感度検出が可能だが、溶液中のイオンによるデバイ遮蔽のため、グラフェン表面から検出対象が数 nm 離れるだけで検出不能になってしまう。本研究では、検出対象自体ではなく、その酵素反応産物の電荷を検出することで、この問題を解決した。反応産物アンモニアを fL 体積の極微小液滴中に濃縮して検出し、全長約 15 nm の抗体分子で捕捉した *H. pylori* 菌を、菌体1個以下の超高感度で検出することに成功した。

2. ”State-space modeling for dynamic response of graphene FET biosensors “, Jpn. J. Appl. Phys. 59, SGGH04 2020

概要:本論文ではグラフェン FET の時系列データに状態空間モデルを適用し、ドリフトとターゲット分子への応答を分離するモデルを構築した。状態空間モデルは確立した理論や過去の知見を柔軟にモデルに組み込むことができる。複数の状態空間モデルを構築し比較検討した結果、ドリフトは2階差分の形式での記述が適切と判明した。さらに、マルコフ連鎖モンテカルロ法でモデルパラメータを推定し、時系列データを分離した結果も示した。

3. “H9N2 influenza virus infections in human cells require a balance between NA sialidase activity and HA receptor affinity” Journal of Virology, 94:e01210-20, 2020

概要:インフルエンザウイルスの粒子表面には、HA と NA の 2 つのウイルス蛋白質が発現しており、それぞれレセプター分子であるシアロ糖鎖への結合と乖離の相対する機能を有している。本研究では、インフルエンザウイルスがヒト適応化する過程において、HA の結合活性と NA の遊離活性のバランスを変化させることで、ヒト細胞膜への感染性を獲得する新しい分子機序を明らかにした。同機序はパンデミックインフルエンザの発生メカニズムに適用されうるものである。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

(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・誘導体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 (京都府立医科大学大学院医学研究科 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 (NA シアリダーゼ活性評価)
- ・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

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・ オックスフォード大学の Sonia Contera 教授と、グラフェン FET を用いたインフルエンザウイルスの薬剤機序の判定で共同研究を行った。大阪大学で糖鎖修飾グラフェン FET にインフルエンザウイルス薬のザナミビルを導入した際のノイラミニダーゼ活性を電氣的に測定し、この結果とオックスフォード大学の液中 STM で測定した結果と照合して、電氣的測定の結果を補強した。
- ・ エジプトダマンフル大学の協力を得て、村田製作所との共同研究で作成したポータブルインフルエンザ測定器を用いて、エジプトにおける鳥インフルエンザの人感染性を現場に出向いて測定した。
- ・ インフルエンザウイルスを中心としたウイルス感染症分野において、エジプトのダマンフル大学、ベトナムの国立獣医学研究所と大陸横断型の研究コンソーシアムを形成するために、共同研究の連携強化に向けた協議を進めている。主たる研究代表者である渡邊が、すでに個別に現地機関を訪れてカウンターパートの研究者と協議しており、新興ウイルス感染症の国際ネットワーク形成基盤を整備しつつある。(京都府立医科大学グループ)
- ・ 三菱電機と共同研究を行い、グラフェンの高感度特性を利用して、グラフェンの基板の半導体を最適なものを選択することにより、高感度な赤外線センサーになることを実証し、実用化を目指している。この結果について、2018 SSDM Young Research Award や応用物理学会論文

奨励賞、応用物理学会講演奨励賞、応用物理学会 Poster Award などを受賞している。

- 東芝と共同研究を行い、グラフェンの高感度特性を利用して特殊ガスの検出を行い、ppt(10^{-12})のガス検知感度を達成した。会社の方針が変わって、大変残念ながら社会実装には届かなかった。
- 中部大グループでは、ウイルス推移の比較のための新しいウイルスとして、国立感染症研等から分与を受けた。例えば、2020年度に分与を受けたウイルスは、A/Hawaii/70/2019、A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019、A/Hong Kong/45/2019、A/Hong Kong/2671/2019 等である。また、糖鎖とウイルスを用いた生体モデルプラットフォームでの分子反応評価系に関する共同研究を(有)バイオ研と進めた。応用としては、病院での実証実験が必要になることを想定し、東海大学医学部附属病院との共同研究として、臨床ウイルスの提供により、実用化のための汎用性の評価を進めた。名古屋掖済会病院とは、感染症検出技術の社会実装モデルの設計を進めた。今後のこれらの病院と本課題のセンサー開発の社会実装で連携していく予定である。