

未来社会創造事業 探索加速型  
「世界一の安全・安心社会の実現」領域  
終了報告書(探索研究期間)

令和3年度  
研究開発終了報告書

令和元年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：池袋 一典]

[東京農工大学大学院工学研究院・教授]

[研究開発課題名：ウイルスを気相で特異的に検出する基盤技術の開発]

実施期間：令和元年11月1日～令和4年3月31日

## § 1. 研究実施体制

### (1)「池袋」グループ(東京農工大学)

- ① 研究開発代表者:池袋 一典 (東京農工大学大学院工学研究院、教授)
- ② 研究項目
  - ・気相中でインフルエンザウイルスの外殻蛋白質を特異的に認識する DNA アプタマーの開発
  - ・DNA アプタマーと開発した検出デバイスとを組み合わせたインフルエンザウイルスの外殻蛋白質検出システムの開発

### (2)「水谷」グループ(東京農工大学)

- ① 主たる共同研究者:水谷 哲也 (東京農工大学農学部附属感染症未来疫学研究センター、センター長・教授)
- ② 研究項目
  - ・インフルエンザウイルスの外殻蛋白質を特異的に認識する DNA アプタマーの選択
  - ・得られた DNA アプタマーの特性評価

### (3)「前橋」グループ(東京農工大学)

- ① 主たる共同研究者:前橋 兼三 (東京農工大学大学院工学研究院、教授)
- ② 研究項目
  - ・グラフェン電界効果トランジスタ(FET)の高性能化
  - ・グラフェン FET による、アプタマー-インフルエンザ間相互作用検出の高感度化

## § 2. 研究実施の概要

探索研究では以下の研究項目を実施した。

- 1) 気相中でインフルエンザウイルスの外殻蛋白質を特異的に認識する DNA アプタマーの開発  
(担当:池袋、水谷)
- 2) インフルエンザウイルスの外殻蛋白質とアプタマーの結合を気相中で検出できる検出デバイスの開発  
(担当:前橋、池袋)
- 3) DNA アプタマーと、開発した検出デバイスとを組み合わせたインフルエンザウイルス検出システムの開発  
(担当:池袋、水谷、前橋)

1)については、インフルエンザウイルスの外殻蛋白質の代表的な蛋白質であるヘマグルチニンをターゲットとし、これまで報告されたヘマグルチニン結合 DNA アプタマーをすべてリストアップし、全て合成してそれぞれのアプタマーのヘマグルチニンに対する結合能を評価した。すると、ヘマグルチニンに対して高感度検出するのに十分な結合能を持つものが複数存在し、その中の一つのアプタマーは、高濃度のカリウムを添加することによりその結合能が 500 倍上昇することを見出した。これは現在利用されている最も結合能が高い抗体に匹敵し、その解離定数は pM レベルと推定される。更に疎水性の高い塩基を導入すれば格段に結合能を上げられることも確認できた。ここで得られた DNA アプタマーの構造と結合能の関係をまとめ、バイオセンサー分野で最高の学術誌である、Biosens. Bioelectron.(impact factor: 10.618)に発表した(業績 2)。2021 年度からは、SARS-CoV-2 の S1 蛋白質の Receptor Binding Domain(RBD)に結合する DNA アプタマーも探索し、獲得した。

更にこのアプタマーは乾燥させた後でも、標的蛋白質との結合を維持していることを確認した。水晶

振動子の金電極上に DNA アプタマーを固定化した場合も、そのアプタマーと標的蛋白質との結合を、水晶振動子の周波数変化として気相で検出できることを確認しており、更にインフルエンザウイルス水溶液を噴霧した場合も濃度依存的な周波数変化を得ることができ、検出に成功した。

また、気相中での標的分子とアプタマーの結合を、蛍光を利用して解析する手法も開発でき、添加量依存的に信号が得られることも確認できた。その上で、水相と気相で、標的蛋白質とアプタマーの結合を評価したところ、その結合特性が変化することを見出し、アプタマーの構造を固定する必要があると考察した。

2)については、インフルエンザウイルスの外殻蛋白質であるヘマグルチニンに結合する DNA アプタマーを、グラフェン電界効果トランジスター (FET) 上に固定化して、ヘマグルチニン水溶液を滴下し、乾燥したのちに気相中でヘマグルチニンが検出できることを確認した(業績1)。エタノールガスを気相中で、特定の塩基配列をもつ DNA を固定化したグラフェン FET に通気すると、その導電率が劇的に変化することは既に論文発表しており、気相中での蛋白質検出の可能性を確認した。

3)については、まず、インフルエンザ A 型ウイルス(H1N1 型)のイヌ腎臓由来 MDCK 細胞を用いたアッセイを簡便化し、安定性を得るため、ヒト型プロテアーゼ hTMPRSS2a 遺伝子を安定発現する細胞(PR-MDCK)を作製した。PR-MDCK 細胞を使用することにより、トリプシン非添加、FBS 添加条件でのアッセイが可能となり、従来の細胞への感染実験における不便が解消された。

また、リアルタイム PCR によるウイルス RNA 量の測定系を構築するとともに、グローブボックス内でウイルスを噴霧し、捕捉体に付着したウイルス量の測定も可能となった。

ウイルス噴霧実験のさらなる応用として、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を外套したシュードタイプレンチウイルスを作製した。スパイクタンパク質遺伝子のリアルタイム PCR 定量系を新たに構築し、作製したシュードウイルスの力価測定、及び TMPRSS2 発現 Vero 細胞への導入能の定量が可能となった。シュードウイルスの噴霧・検出実験、細胞への導入阻止実験が可能環境が整った。

## 業績

1. Electrical detection of influenza virus based on DNA-aptamer-modified graphene, Takematsu K, Ikuta T, Tsukakoshi K., Ikebukuro K, Maehashi K, 34th International Microprocesses and Nanotechnology Conference MNC 2021, October 26-29, 2021.
2. G-quadruplex: Flexible conformational changes by cations, pH, crowding and its applications to biosensing, Nishio M, Tsukakoshi K, Ikebukuro K, Biosens. Bioelectron., 178, 113030, 2021
3. Stochastic modelling of the effects of human-mobility restriction and viral infection characteristics on the spread of COVID-19, Ando S, Matsuzawa Y, Tsurui H, Mizutani T, Hall D, Kuroda Y, Sci. Rep., 11(1),6856, 2020.