

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01336

研究課題名（和文）DNA機能化グラフェン素子による空中浮遊ウイルスの特異的センシング技術の開発

研究課題名（英文）Development of specific airborne virus sensing technology using DNA-functionalized graphene-based devices

研究代表者

前橋 兼三（Maehashi, Kenzo）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：40229323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルス等の感染症は感染者からの飛沫が主な感染経路となっているため、社会経済活動のダメージを最小限にいとめるためには、飛沫中、または、室内等の大気中に浮遊するウイルスを特異的にその場でセンシングすることが必要である。本研究では、ウイルス外殻タンパク質を認識できるDNAをグラフェン素子上に化学修飾することによって、高感度ウイルス検出センサ開発を目指した。まず、様々な環境において一本鎖DNAの立体構造評価を行い、ヘマグルチニン検出におけるDNAの立体構造依存性を測定した。最後に、飛沫中のウイルスの検出を目指して、試薬スプレーでヘマグルチニン溶液をグラフェンデバイスに噴霧し、その応答特性を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新型ウイルス等による感染症は、世界中に多大な影響を与えている。それらの影響を抑制するため、飛沫中、または、室内等の大気中に浮遊するウイルスを特異的にその場でセンシングすることが必要である。本研究は、グラフェン素子にDNAを化学修飾することによって、非常に小型で簡便にウイルスを高感度に検出することを目指している。また、このセンサを用いることにより、種々のウイルス等を同時に検出することを可能にするため、社会に与える影響は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Since the main route of infection for viruses and other infectious diseases is droplets from infected individuals, in order to minimize damage to socio-economic activities, it is necessary to specifically sense viruses suspended in droplets or in the air indoors and elsewhere on the spot. In this study, we aimed to develop a highly sensitive virus detection sensor by chemically modifying a graphene element with DNA that can recognize the viral coat protein. First, we evaluated the three-dimensional structure of single-stranded DNA in various environments and measured the dependence of DNA on the three-dimensional structure in hemagglutinin detection. Finally, in order to detect viruses in droplets, we sprayed a hemagglutinin solution onto the graphene device with a reagent spray and evaluated its response characteristics.

研究分野：半導体物性、センサー開発

キーワード：グラフェン素子 DNA ウイルス 飛沫

1. 研究開始当初の背景

新型コロナウイルス感染症は、高齢者や基礎疾患を有する人を中心に重篤な症状を引き起こし、世界中の人々の日常や社会・経済活動に多大な影響を与えている。新型コロナウイルス、インフルエンザウイルス等の感染症は、感染者からの飛沫が主な感染経路となっている。したがって、ウイルス感染症による社会・経済活動のダメージを最小限に食い止めるためには、飛沫中のウイルス、または、室内等の大気中に浮遊するウイルスを特異的にその場でセンシングすることが必要であると考えられる。

現在、生活環境の大気中に存在するウイルスは、空気清浄機等のフィルターに捕捉されたウイルスを、一度水溶液に溶解させて免疫測定法により検出しており、非常に煩雑な操作と長い測定時間を必要とするので、その場でのモニタリングは不可能である。また、ウイルスを単なる粒子として気相中で検出することは可能だと考えられるが、特定のウイルスのみの特異的検出も不可能である。さらに、ウイルスを特異的にモニタリングするためには、ウイルスを気相中で特異的に分子認識する必要があるが、気相中での分子認識はまだ基礎研究としても研究されたことがなく、分子認識素子の設計に必要な知見がほとんどないのが現状である。

2. 研究の目的

ウイルスには、最表面に多数の突起上のタンパク質を有している。これらのタンパク質がヒトの細胞表面と結合することによって、ウイルスが体内に侵入する。したがって、大気中においても、ウイルスが有する最表面のタンパク質(ウイルス外殻タンパク質)を認識できれば、ウイルスを特異的に検出することが可能になると考えられる。本研究の目的は、グラフェンをチャンネルとした電子素子を作製し、そのグラフェンチャンネル表面上に1本鎖DNAを化学修飾することにより、唾液中に存在、または、大気中に浮遊するウイルスを特異的に認識し、電気的にセンシングすることである。

3. 研究の方法

グラフェンは、炭素1層のsp²混成軌道によって構成され、生体分子を電気的に検出する材料として以下のような特徴を有している。表面にダングリングボンドが存在しないため、絶縁膜無しに大気中、溶液中でも安定に存在し、素子動作のための電界を印加できる [1,2]。そのため、グラフェンをチャンネルにした素子は、絶縁膜を必要としないので、グラフェン表面上で直接検体を結合させることができる。さらに移動度が非常に高いために、図1に示すように検体との微小な相互作用に対しても十分な電流変化が得られ高感度なセンシングが期待される [3]。

しかしながら、図1のようなグラフェン素子を用いて、タンパク質等をセンシングするためには、グラフェン表面に受容体を修飾する必要がある。そのため、本研究では、ウイルスを特異的に認識する材料として1本鎖DNAに着目した。設計された1本鎖DNAは溶液中で3次元構造を有するため、抗体と同様に優れた分子認識能を持ち、種々のタンパク質を検出するDNAが開発されている(図2) [4-6]。抗体と比較して、1本鎖DNAは以下のような特徴を持つ。

- ・1本鎖DNAは塩基配列によって構成されているため、大量生産可能であり非常に安価になる。
- ・室温大気中で安定に存在するため、長期間大気中で使用可能となる。
- ・抗体と比べると、サイズが小さく、グラフェンの近くでウイルスを捕獲でき、高感度検出となる。
- ・1本鎖DNAは電荷を有するため、ターゲットが電荷を有しない場合でも、1本鎖DNAの構造変化でもターゲット検出可能となる。

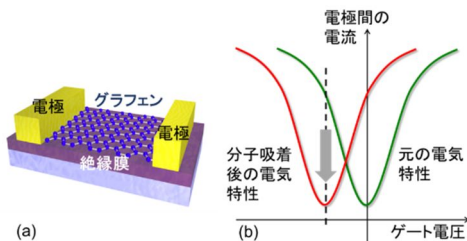


図1(a)グラフェン素子と(b)分子検出のメカニズム

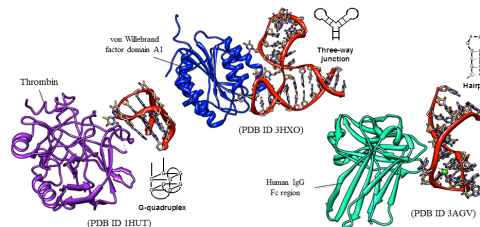


図2 タンパク質を特異的に認識する1本鎖DNA(赤色がDNA)

本研究では、ウイルス外殻タンパク質を認識できるDNAを、グラフェン素子上に化学修飾することによって、高感度ウイルス検出センサ開発を目指した。まず、様々な環境において一本鎖DNAの立体構造評価を行った。次に、外殻タンパク質であるヘマグルチニン検出におけるDNAの立体構造依存性を溶液中で行った。最後に、飛沫中(大気中)のウイルスの検出を目指して、試薬スプレーでヘマグルチニン溶液をグラフェンデバイスに噴霧し、その応答特性を評価した。

4. 研究成果

(1) グラフェン電界効果トランジスタの作製

はじめに、熱化学気相法により合成した高品質単層グラフェンを合成する条件を確立した。銅フォイルの表面処理を変化させ核形成密度を減少させることにより、グレインサイズの大きいグラフェンを合成することに成功した。また、得られたデバイスの電気的特性評価を行い、核形成密度が小さいほど、高移動度を有するデバイスが得られることを明らかにした。

(2) 一本鎖 DNA の立体構造評価

一本鎖 DNA をフォールディングする際、KCl の濃度を変化させ、円二色性(CD)測定で DNA の立体構造を評価した。図 3 に異なる KCl 濃度でフォールディングを行った一本鎖 DNA の CD スペクトルを示す。KCl の濃度が高い場合には、260 nm 付近および 240 nm 付近に非常に強度が強いピークを示し、パラレル型 G4 構造のみが形成されると考えられる [7]。一方、KCl の濃度が低くなるにつれ、DNA のランダム構造が増加することが分かった。したがって、G4 構造の形成には濃度の高い KCl 環境が必要であると言える。

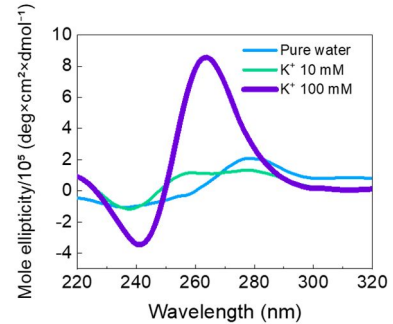


図 3 フォールディング条件 (溶媒の KCl 濃度) を変えた時の DNA の CD スペクトル

(3) ヘマグルチニン検出における DNA の立体構造依存性

G4 構造の割合異なる種々条件でフォールディングした DNA をグラフェンチャンネルに修飾し、溶液中で、インフルエンザウイルスの外殻タンパク質であるヘマグルチニンの検出を行った。KCl の濃度が高い環境でフォールディングした DNA を修飾した場合は、ヘマグルチニンの導入に対して、グラフェンデバイスの伝達特性は、負電圧側にシフトすることが示された。これは、負に帯電した DNA アプタマーは、ヘマグルチニンの正に帯電したポリペプチドを捕らえ、グラフェンチャンネルに負電荷が誘起された結果、デバイスの伝達特性が負方向にシフトしたと考えられる。ヘマグルチニンの濃度を 1-100 nM まで変化させたときの、デバイスの伝達特性の最小電流点 (ディラックポイント) での電圧値を、図 4 に示す。ヘマグルチニンの濃度が増加するに伴い、ディラックポイントの電圧値は負方向にシフトすることが観測された。図 4 の実験結果より、ヘマグルチニン濃度に対するディラックポイント電圧値シフト量の変化を、図 5 に示す。ここで、ラングミュア吸着等温式でフィッティングを行った結果を図 5 の赤線で示す。実験結果をうまくフィッティングすることができており、DNA とヘマグルチニンが 1 対 1 対応で吸着反応を示していることがわかる。この曲線より、解離定数が 17 nM と求めることができ、その結果、数 nM 程度のヘマグルチニンを検出できることが明らかになった。一方、KCl の濃度が低い環境でフォールディングした DNA を修飾した場合は、低濃度のヘマグルチニン導入によるシフトは観測されなかった。これは、DNA を KCl の濃度が低い環境でフォールディングした場合は、G4 構造を有する DNA が形成されず、その DNA とヘマグルチニンの結合力がより弱いために、低濃度のヘマグルチニンを検出できなかったと考えられる。また、G4 構造を形成した DNA を用いた場合にも、KCl の無い溶液環境下では G4 構造が崩れ、ヘマグルチニンの高感度検出が困難であることも明らかになった。

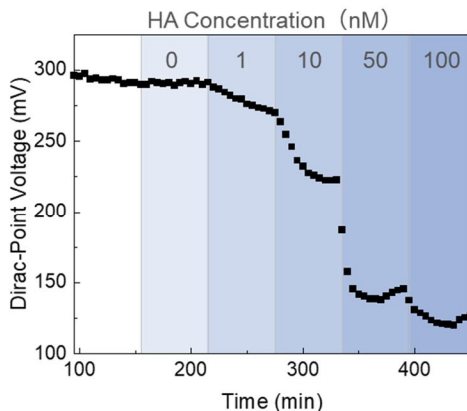


図 4 グラフェンデバイスのディラックポイント電圧値のヘマグルチニン濃度依存性

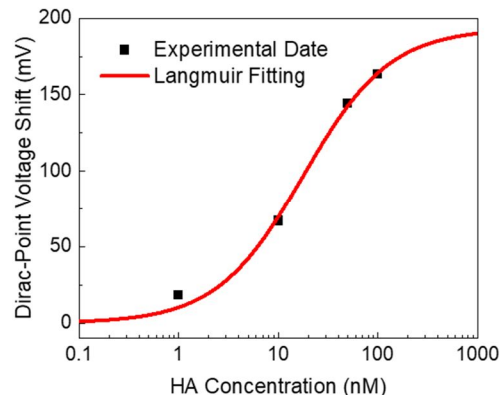


図 5 ヘマグルチニン濃度に対するグラフェンデバイスのディラックポイント電圧値シフト

(4) 大気中でのヘマグルチニンの検出

ここでは、罹患者から出た咳、くしゃみ等から、ウイルスを検出することを目指して、図6に示すように、G4構造を有するDNAアプタマー機能化グラフェンデバイスを大気曝露した状態で使用し、ヘマグルチニンに対する応答を評価した。まず、そのヘマグルチニン溶液をマイクロピペットでグラフェンデバイスを覆うように滴下し、その伝達特性を測定した。その結果、10 nMのヘマグルチニンの滴下でも伝達特性の負方向シフトが観測され、ヘマグルチニンが検出できることが示された。つぎに、図6に示すように、試薬スプレーでヘマグルチニン溶液をグラフェンデバイスに噴霧し、その応答特性を評価した。試薬スプレーから20 cm離してヘマグルチニン溶液をグラフェンデバイスに噴霧し、10分間静置した場合の結果について示す。図7に、ヘマグルチニン溶液噴射前後のグラフェンデバイスの伝達特性を示す。ヘマグルチニン溶液噴射後に、伝達特性の負電圧方向のシフトが観測されていることがわかる。これは、溶液中の場合と同じ方向のシフトであり、水溶液の微細な水滴中のヘマグルチニンに対しても応答が得られることが示された。さらに、ヘマグルチニンの付着量と伝達特性のシフト量が比例する可能性が示唆され、また、ヘマグルチニンを噴霧してから10分後には応答が見られることが分かった。以上により、DNAアプタマー機能化グラフェンデバイスを用いることにより、罹患者から出た咳、くしゃみ等から、簡便にウイルスを検出可能であることが明らかになった。

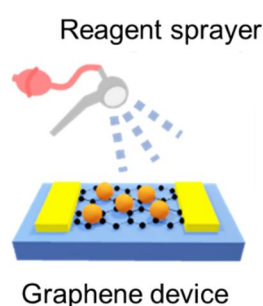


図6 試薬スプレーを用いたヘマグルチニンの検出方法

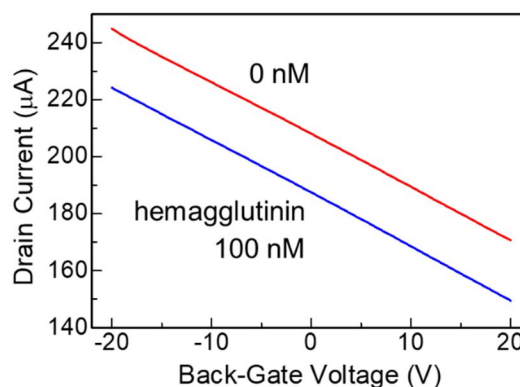


図7 ヘマグルチニン溶液噴射前後のグラフェンデバイスの伝達特性

引用文献

- [1] K. H. Novoselov and A. K. Geim, "Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films", *Science* **306**, 666 (2004).
- [2] M. Wang et al, "Single-crystal, large-area, fold-free monolayer graphene", *Nature* **596**, 519 (2021).
- [3] Y. Ohno, K. Maehashi, and K. Matsumoto, "Label-Free Biosensors Based on Aptamer-Modified Graphene Field-Effect Transistors", *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18012 (2010).
- [4] D. K. Nguyen and C.-H. Jang, "A Label-Free Liquid Crystal Biosensor Based on Specific DNA Aptamer Probes for Sensitive Detection of Amoxicillin Antibiotic", *Micromachines*, **12**, 370 (2021).
- [5] N. I. Khan and E. Song, "Detection of an IL-6 Biomarker Using a GFET Platform Developed with a Facile Organic Solvent-Free Aptamer Immobilization Approach", *Sensors* **21**, 1335 (2021).
- [6] H. Xi, M. Juhas and Y. Zhang, "G-quadruplex based biosensor: A potential tool for SARS-CoV-2 detection", *Biosens. Bioelectron.* **167**, 112494 (2020).
- [7] T. Yamazaki and A. Ti Tram TU, "Structural analysis of guanine quadruplex-forming oligonucleotides and their application to oligonucleotide therapeutics", *Drug Delivery System*, **36**, 360 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中村 日向子、生田 昂、北川 雄大、塚越 かわり、池袋 一典、前橋 兼三
2. 発表標題 グラフェンFETを用いたヘマグルチニン検出におけるDNAアプタマーの立体構造依存性
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前橋兼三
2. 発表標題 疾病の早期発見、安心安全社会の実現のためのナノカーボン次世代センサ開発
3. 学会等名 府中市教養講座（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kanna Takematsu, Takashi Ikuta, Kaori Tsukakoshi, Kazunori Ikebukuro and Kenzo Maehashi
2. 発表標題 Electrical detection of influenza virus based on DNA aptamer-modified graphene
3. 学会等名 34th Int. Microprocesses and Nanotechnology Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前橋兼三
2. 発表標題 グラフェンの合成とセンサを中心にした機能性デバイスの開発
3. 学会等名 サイエンス&テクノロジー(2022) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武末 菜奈、中村 日向子、光谷 健悠、生田 昂、塚越 かおり、池袋 一典、前橋 兼三
2. 発表標題 DNAアプタマー修飾グラフェンを用いたインフルエンザウイルスの電気的検出
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	生田 昂 (Ikuta Takashi) (80805929)	東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・助教 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------