

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：27101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656495

研究課題名（和文） 構造制御ポリマーと人工酵素を組み合わせたウィルス認識システム

研究課題名（英文） Detection system for the influenza virus by novel functional polymer and artificial enzyme

研究代表者

上江洲 一也 (UEZU KAZUYA)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：40253497

研究成果の概要（和文）：インフルエンザウイルスは細胞膜上にあるシアル酸を認識し、感染が引き起こされる。本研究では、インフルエンザウイルス認識システムを構築するため、放射線グラフト重合法により多孔性中空糸膜に導入したポリマーブラシに、イミノ二酢酸とカルボジイミド塩酸塩のカップリング分子を導入した後、シアル酸に変換した。ウイルスが認識されたときのシグナル物質として利用可能な銅イオンが、その機能性膜に吸着することを確認した。

研究成果の概要（英文）：The hemagglutinin protein on influenza virus can recognize the sialic acid on the cell membrane, and the virus infects the human cell. In this study, we utilize this mechanism to prepare the functional membrane, which can detect the influenza virus. This functional membrane was prepared by radiation-induced graft polymerization. To immobilize the sialic acid as the recognition site of the hemagglutinin protein on the influenza virus, the coupled iminodiacetic acid and 1-ethyl-3-carbodiimide hydrochloride was introduced onto the porous hollow fiber membrane. Copper ion as a signal substance was adsorbed on the sialic acid immobilized porous hollow fiber membrane, and it indicated the possibility of the sensor for influenza virus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：分子認識、ウィルスセンサー、ポリマーブラシ、シグナル変換

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスの直径は 80～120nm の大きさをしており、ウイルス表面の膜からヘマグルチニン(HA)とノイラミニダーゼ(NA)が突き出して存在している。このうち HA がシアル酸(NANA)部位と特異的な構造をしている。HA 単量体は分子量 7～8 万で 2 本のポリペプチドからなる構造で、実際には 3 量体として長さ 135 Å のスパイク状構造を形作って存在している。インフルエンザ

ウイルスにはヒトインフルエンザウイルス、豚や鳥インフルエンザウイルスが存在し、抗原性の違いから A 型、B 型、C 型の 3 種類に分類され、さらに HA と NA の違いにより分類され H1N1、H1N2、H5N1 などと表記されている。人でのパンデミックを引き起こすのは A 型のみとされており A 型での HA は 16 種類、NA は 9 種類の大きな変異が見つかっている。インフルエンザウイルス膜表面から突き出している HA と生物の細胞膜表面の多糖鎖未

端部位に存在する NANA が特異的吸着を起こすことで細胞内にインフルエンザウイルスが侵入し、感染が引き起こされることが分かっている。HA と NANA の結合を Fig. 1 に示す。

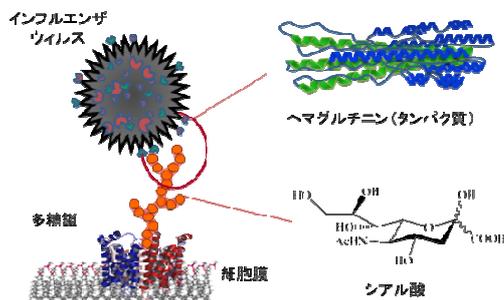


Fig.1 HA と NANA の結合

現在、ウイルスを検出する有効な手法として ELISA 法（酵素結合免疫吸着法）と PCR 法（ポリメラーゼ連鎖反応法）が挙げられる。しかし、ELISA 法は検出対象ごとに高感度な抗体を調製しなければならず、抗体の安定性、非特異的な反応による感度の低下などの問題点があり、一方で PCR 法は反応に時間がかかるため検出速度が遅い。これらの問題から、高速・高感度なウイルス検出法が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究では、①ウイルスを特異的に認識・捕捉、②ウイルス認識と同時に大量のシグナル物質を放出、③シグナルを化学発光に変換の機能を有すこれまでにない画期的な機能性材料を開発する。①では、構造制御および機能付与が容易なポリマーブラシを固定した膜を用いる。ポリマーブラシの構造的柔軟性は、数十 nm 程度の分子を捕捉するのに適しており、重合条件を変えることで空間制御も可能である。②は、本システムの優れた特徴である。このシグナル放出は、ウイルス認識部位に、相互作用の弱いシグナル物質を吸着させておき、その後相互作用の強いウイルスが置換吸着することで生じる。③では、膜から放出される大量のシグナルを検出することにより、ウイルス単体では測定不可能な濃度領域においてもウイルスの高感度リアルタイム検出を可能とする。また、ウイルス濃度測定領域をシグナル物質の量を変えることで自由に制御できる点も、本システムの大きな特徴である。

申請者らはこれまでに、ある種のアミノ酸配列を有する銅結合ペプチド錯体が、芳香族モノアミンと反応して活性酸素を生成することを見出した[1]。この銅結合ペプチド錯体は、触媒機能をもつ人工酵素である。また、この人工酵素を膜に固定しても、触媒機能を

発現することを確認した[2]。本研究で用いるポリマーブラシは、付与する官能基を適切に選択することによって酵素を積層吸着する機能を発現することから[3]、大量のウイルスを捕捉することが可能であると考えられる。本研究において創製する機能性材料は、これまでに培った分子認識材料の調製技術、活性酸素を生成する人工酵素の知見を用いて、ウイルスを特異的に認識・捕捉すると同時に大量のシグナル物質を放出し、そのシグナル物質をトリガーとして活性酸素を発生することで化学発光を誘起する、これまでにない新しい機能性材料である。病院等の閉鎖空間で感染拡大するウイルスや、屋内で飼育されている動植物に感染するウイルスのリアルタイムモニタリングセンサーとして本機能性材料を適用することで、悪性ウイルスによるパンデミックの予防および警告に威力を発揮すると期待される。

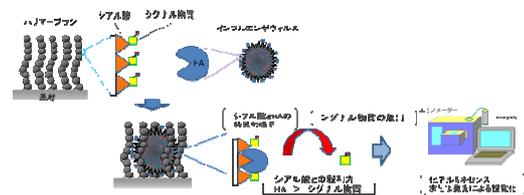


Fig.2 検出システム概要

## 3. 研究の方法

### 1) ウィルスを認識・捕捉するポリマーブラシの設計

数多く存在するウイルスの中で、既に立体構造や特性が明らかとなっているヒトインフルエンザウイルスの検出をモデルケースとして検討する。ヒトインフルエンザはヒト細胞表面のシアル酸を特異的に認識するレクチン（ヘマグルチニン）を有す。この特性を利用し、シアル酸を認識部位としてポリマーブラシへ導入する。ポリマーブラシへの導入は、放射線グラフト重合法を用いて行う。放射線グラフト重合は、基材の特性を損なうことなく機能化できる。

まず、ベースポリマー（基材）となるポリエチレン中空糸膜に電子線を照射し、ラジカルを発生させる。続いて、二重結合（ビニル基）を持つモノマーをラジカルと接触させることでポリマーブラシを得る。ここで、グラフトモノマーとしてグリシジルメタクリレート（GMA）を用いることで、側鎖にエポキシ環をもつポリマーブラシを得ることが可能である。このエポキシ環とシアル酸のアミノ基を反応させ、ポリマーブラシにシアル酸を導入する。

### 2) ウィルス認識時のシグナル放出機構の確立

ポリマーブラシにシアル酸を導入し、ウイルスが認識・捕捉されることを確認した後、

シグナル物質として銅(II)イオンがシアル酸に吸着するかを確認する。これは、シアル酸のカルボキシル基と銅(II)イオンとの錯体形成を予測したものである。

### 3) シグナル検出法の確立

本システムでは、申請者らが発見した活性酸素生成機構である芳香族モノアミン、銅結合型ペプチド、過酸化水素、酸素が反応して活性酸素を生成するメカニズムを検出機構として活用する。ポリマーブラシから放出されたシグナル物質が、上記の必要因子と反応して生成する活性酸素の生成量を、活性酸素と反応することで発光するCLA等の試薬を用い、ルミノメーターにて測定する。

## 4. 研究成果

### 1) ウィルスを認識・捕捉するポリマーブラシの設計

多孔性中空糸膜に放射線を当てることによりラジカルを発生させ、ラジカルにグリシジルメタクリレート(GMA)を反応させることによりGMA膜を作製した。シアル酸の付与のための官能基としてグリシン(Gly)とイミノ二酢酸ナトリウム(IDA)に次いで1-エチル-3-カルボジイミド塩酸塩(EDC)を反応させた2ステップのものと、IDAとGlyそれぞれをEDCとカップリング反応させた1ステップのものを用いてシアル酸(NANA)の高転化率になる方法を検討した。

Fig. 3にIDA-EDCカップリング反応を、Fig. 4にIDA-EDCカップリング分子を用いたシアル酸導入プロセスを示した。

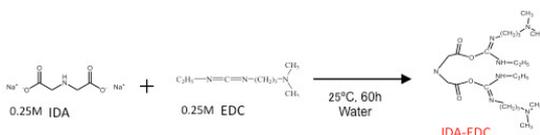


Fig.3 IDA-EDCカップリング反応

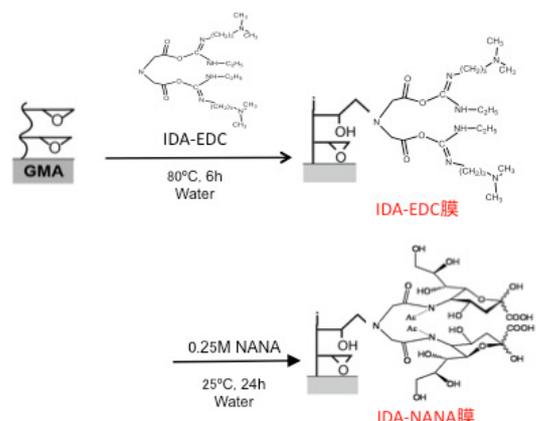


Fig.4 IDA-EDCカップリング分子を用いたシアル酸導入プロセス

Table 1 にそれぞれの反応経路によるシアル

酸転化率を示した。Gly および IDA を予め導入した膜では、EDCの導入率が2%程度となり、最終的なシアル酸転化率はほぼ0であった。それに対し、IDA-EDCカップリング分子を用いた反応経路では、カップリング分子が40%以上導入され、最終的なシアル酸転化率は30%以上となった。このシアル酸導入量は、シアル酸導入を試みた文献値[4]を大きく上回っており、本手法は高分子材料にシアル酸を導入するための非常に有効な方法であると考えられる。

Table 1 シアル酸転化率

	転化率 [%]		転化率 [%]		転化率 [%]
Gly	30	Gly-EDC	2.0	Gly-NANA	0
IDA	31	IDA-EDC	2.1	IDA-NANA	0
		IDA-EDC	44.2	IDA-NANA	31.1
※IDG32%GMA膜					

### 2) ウィルス認識時のシグナル放出機構の確立

作製したシアル酸膜に、0.1MPaの圧力で10ppmに調整した銅イオン水溶液を透過し、流出液を誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-OES)により測定した。銅イオンの破過曲線をFig. 5に示した。透過実験による結果から、グラフト率32%、55%、112%のそれぞれのシアル酸膜に対して、銅イオンの吸着が確認された。今後、作製した膜に対してヘマグルチニンの透過実験を行うことでシアル酸膜への吸着の有無を確認し、銅イオンとの置換が行われるか確認することで検知システムの確立を目指す。

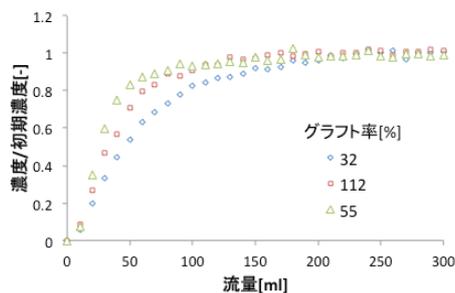


Fig.5 銅イオンの破過曲線

### 【参考文献】

- [1] T. Kawano, *Int. J. BiolSci.*, 2007 ; 3(1): 57-63
- [2] T. Okobira, et al., *J. Sensor. Mater.*,

Submit.

[3] M. Goto, et al. *JAACS*, 83 (3), 209-213 (2006)

[4] J. Chang, P. Lin, M. Yang, and C. Chien, *Polym. Adv. Technol*, 871-877 (2009)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① T. Kagenishi, K. Yokawa, T. Kadono, K. Uezu, and T. Kawano  
Copper-Binding Peptides from Human Prion Protein and Newly Designed Peroxidative Biocatalysts  
*Z. Naturforsch., C: Journal of Biosciences*, 66c, 182-190 (2011)

[学会発表] (計3件)

① Takeshi GOTO, Tadashi Okobira and Kazuya UEZU  
Functional film for detecting the influenza virus

The 25th International Symposium on Chemical Engineering (Okinawa Convention Center)

2012年12月14日～2012年12月15日

② 後藤健史、上江洲一也、大河平紀司  
インフルエンザウイルス検知のための機能性膜の開発

2012年 日本化学会西日本大会 (佐賀大学)

2012年11月10日～2012年11月11日

③ 後藤健史、上江洲一也、大河平紀司  
インフルエンザウイルスセンサーのための機能性膜の開発

第28回日本イオン交換研究発表会 (東京工業大学)

2012年10月18日～2012年10月19日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

上江洲 一也 (UEZU KAZUYA)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：40253497

##### (2) 研究分担者

河野 智謙 (KAWANO TOMONORI)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：20335699