

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14488

研究課題名(和文) 生体膜構造制御タンパク質を利用した感染能を指標としたウイルスセンシング

研究課題名(英文) Virus sensing based on infectivity using biological membrane structure control protein

研究代表者

田中 祐圭 (Tanaka, Masayoshi)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：60533958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜を模倣した生体膜で導電性素子を被覆することで、ウイルスの感染を指標とする新たな電気化学的ウイルスセンサの開発について研究を行った。当初の研究計画の通り、機能性ペプチド(センサ素子認識ペプチド、生体膜認識ペプチド、ウイルス認識ペプチド)をそれぞれ同定し、これらを統合的に利用したポアセンサデバイスにより、1インフルエンザウイルスを検出できることが示されるとともにウイルス種を判別できる可能性が示唆された。今後、活性をもつウイルスと不活化したウイルスとの比較解析を詳細に実施することで、偽陽性検出の問題を解決できる新たなデバイスが創出できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the development of a new electrochemical virus sensor with virus infection as an indicator by covering a conductive element with a biological membrane that mimics cell membranes. According to the original research plan, various functional peptides including sensor element binding peptide, biological membrane binding peptide and virus binding peptide were identified and applied for the sensor development. Using these peptides with pore sensor electrochemical device, it was successfully shown that one influenza virus can be detected with the potential of the species identification. By carrying out detailed comparative analysis between active and inactive viruses, new reliable virus sensing devices without false positive detection can be developed in near future.

研究分野：Functional biomolecular engineering

キーワード：Virus sensor cell membrane biomimetics peptide array

### 1. 研究開始当初の背景

シリコンナノワイヤー上に抗体を固定化した電界効果トランジスタ(FET)デバイスを利用することで、1分子レベルでのインフルエンザ抗原タンパク質の高感度検出技術が報告されている。一方で、このような既存のウイルスセンシング技術は、不活化ウイルスについても、ウイルス粒子や核酸の存在により陽性検出される可能性がある。確実に感染能を有するウイルスを検出する手法としては、ブランク形成法が知られるが、細胞の準備に加えて24時間程度の測定時間が必要である。そのため偽陽性検出の問題を回避し、感染能を持つウイルスを迅速かつ高感度に検出する手法の開発が求められる。一方で、生体膜近傍での生体反応の計測に関して、脂質膜で被覆したシリコンナノワイヤーを用いた静電容量の計測により、脂質膜中に存在するイオンチャンネルの活性評価に関する報告がなされている。しかしながら、生体膜機能を利用した、より高次な機能や生命現象を検出できるバイオセンサが開発された例は無い。

### 2. 研究の目的

膜構造制御タンパク質や生体膜結合性ペプチド、ウイルス結合性ペプチド、金やグラファイトなどの導電性センサ素子結合性ペプチドを統合的に活用することで、ウイルスが適切に認識し感染様態を示す細胞膜を模倣した生体膜で導電性素子を被覆する。これにより偽陽性検出の問題を回避できる新たなウイルスセンサデバイスを構築する。

### 3. 研究の方法

導電性材料表面に細胞膜を模倣した生体膜を安定的に配置するために、初年度にセンサ素子認識ペプチド、生体膜認識ペプチド、ウイルス認識ペプチドの探索を実施した。具体的にはそれぞれの対象に対して結合能をもつことが知られるタンパク質やペプチドを参考に、スポット状に多種類のペプチドを合成できるペプチドアレイ技術を利用し、これに対する結合試験から候補ペプチドを取得した。候補ペプチドに対して表面プラズモン共鳴(SPR)などを用いて結合特性を評価することで、ウイルスセンサデバイスの構築に用いるペプチド配列を選抜した。得られたペプチドを電気化学デバイスに適切に配することで、確実性の高い高感度なウイルスセンサを開発した。

### 4. 研究成果

導電性材料表面に細胞膜を模倣した生体膜を安定的に配置するため、センサ素子認識ペプチド、生体膜認識ペプチド、ウイルス認識ペプチドの探索し、最終年度にこれらのペプチドを統合的に利用したウイルス検出に向けた電気化学センサデバイスの開発を実施した。具体的な成果については下記の通りである。

### 導電性材料(金ナノ粒子)結合性ペプチドの探索

ファージディスプレイ法や細胞表面ディスプレイ法などにより、金ナノ粒子結合性ペプチドはすでに複数報告されている。そこで本研究では、より結合性の高いペプチド配列を取得するため、既知の配列中に存在するアミノ酸出現頻度を参考にランダムなペプチド配列から構成されるペプチドアレイを合成し、金ナノ粒子との結合試験を実施した。次に、この結合試験の結果により、金ナノ粒子に対して結合性を示すペプチドを選抜し、その配列中に存在するアミノ酸を参考にペプチド配列の改良を加えたランダムライブラリーを再度構築し、結合試験を行うことを繰り返した。その結果、ラウンドを重ねることで段

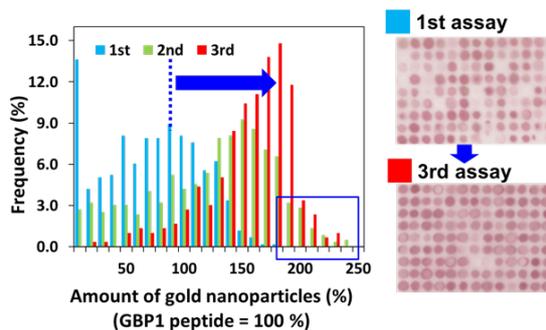


図1 ペプチドアレイを用いた金ナノ粒子結合性ペプチドの探索

高い結合性を示したペプチド中に存在するアミノ酸の出現頻度を参考に、さらに高い結合性を示す配列を探索

表1 探索された金ナノ粒子結合性ペプチド配列とその物性

配列内にあるトリプトファンを赤、ヒスチジンを青で表示

	Sequence	Intensity	MW(kDa)	pI	GRAVY
1(AuP1)	HFSSWETQQG	384446	1.21	5.24	-1.45
2(AuP2)	WTHRDASTPW	383659	1.24	9.76	-1.22
3(AuP3)	WYEKWQKANW	378302	1.44	8.50	-2.05
4	WMETKQARA	373760	1.31	8.75	-1.24
5	GTWSEHQNGW	372844	1.20	5.24	-1.78
6	ETWSMQQHEW	371294	1.36	4.51	-1.86
7	WRAGQAQMOW	367860	1.26	9.75	-1.17
8	WKPWMEPQHS	367310	1.33	6.75	-1.8
9	AMQQWEMSQ	363157	1.27	4.00	-1.36
10	RWQIEEHFAP	360512	1.31	5.40	-1.16
11	PEESQEGWMA	358214	1.16	3.67	-1.4
12	TGEWGMQGIH	356816	1.12	5.24	-0.66
13	EEPHWEEMAA	355438	1.23	4.09	-1.42
14	WVKVANIHSK	345972	1.27	10.00	-0.66
15	RHWHSWTWEI	344942	1.44	6.92	-1.41
16	MNWKWGLESM	342485	1.28	6.00	-0.63
17	NWTAKWTQTH	342381	1.27	8.76	-1.62
18	HWIKIPPWMW	341846	1.39	8.76	-0.21
19	HWKQKVHWG	341349	1.39	10.00	-1.66
20	WHKWWTHGHW	340044	1.46	8.77	-1.82

pIは等電点、GRAVYはペプチドの疎水性度を示す値(マイナスは親水性)であり、ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>)により算出

階的に結合能の高い配列を取得できることが示された(図1)。最終的に数百種類の金ナノ粒子結合性ペプチドが同定され、既知の配列と比較して結合能の高い金ナノ粒子結合性ペプチドが多数取得できた。また今回候補配列として用いた約1,800ペプチド配列のうち、特に高い結合能を示した50ペプチドのアミノ酸の出現頻度や配列情報を詳細に解析したところ、トリプトファンやヒスチジンが金ナノ粒子に対して高い結合能をもつことが示された(表1)。またそれらのアミノ酸は連続して存在するのではなく、間にその他のアミノ酸が挟まった配列(W[Xn]W, H[Xn]W, W[Xn]H, W: トリプトファン, H: ヒスチジン, X: いずれかのアミノ酸, n: 1から8アミノ酸)をとる際に、より高い結合能を示すことが示された。一方で、このようなモチーフは最も結合能が低い50ペプチド中には一つも存在しなかったことから、このモチーフは金ナノ粒子の結合に重要なモチーフであることが示唆された。

また本研究開発を進める過程で、得られた金ナノ粒子結合性ペプチドライブラリーの中に、金イオンを還元する二機能性ペプチド(金ナノ粒子結合能、金イオン還元能)が複数存在することが確認された(図2)。これまで、このような粒子合成を触媒するミネラルゼーションペプチドの探索は、ファージディスプレイ法により対象粒子に高い結合能を示すペプチドを探索し、それらの配列の中からミネラルゼーション活性のある配列を探索する手法が一般的であった。特にペプチドアレイにより対象粒子に高い結合能をもつペプチドを探索し、そこからミネラルゼーションペプチドを探索する手法はこれまでに報告例はない。この手法はペプチドアレイの画像解析から合成される粒子の物性を予測できるという特徴があることから、今後は、本手法を利用することで、金ナノ粒子にとどまらず磁性粒子や半導体粒子合成に利用できるミネラルゼーションペプチドの効率的な探索技術の開発へと

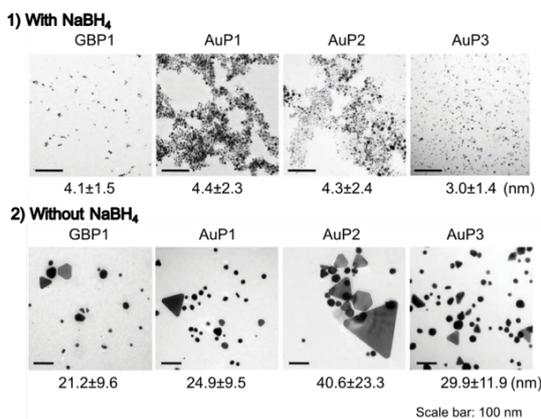


図2 探索された金ナノ粒子結合性ペプチド存在下での金ナノ粒子合成還元剤存在下及び非存在下で合成された粒子をTEM観察

研究を展開する。また金イオンとペプチドのみを混合することで、ナノ粒子が合成されることから、一般的な合成に利用される酸、アルカリ、界面活性剤などの毒性の高い夾雑物のない生体適合性の高い粒子が得られているものと考えられる。そのため得られた粒子はバイオイメージングなど、今後様々な用途への応用展開が期待される。

### 細胞膜結合性ペプチドの探索

研究代表者はナノ磁性粒子を生合成する微生物である磁性細菌に関する研究を通じて、菌体内で形成される小胞の形成駆動または安定化に寄与するタンパク質(MamY)を同定している。本研究では、このタンパク質のアミノ酸配列を断片化したペプチドから構成されるペプチドアレイを利用し、生体膜に結合するペプチドを探索した。その結果、複数の候補ペプチドが見つかり、SPRなどにより各ペプチドの解離定数が算出された。これらの配列の中には、様々な疾病に関与する陰イオン性脂質として広く注目されているカルジオリピンに高い結合能を示すペプチドの存在が示された(査読審査中)。

また、細胞膜やリポソームなどの人工生体膜に対して、より強固に結合するペプチドを探索するため、膜透過性ペプチドなど、生体膜との強い相互作用がすでに報告されているペプチドから構成されるペプチドアレイを合成し、細胞との結合試験を実施した。その結果、細胞膜に対して高い結合能をもつペプチドの存在が確認された。現在までにこれらのペプチド配列がグラファイトなどの導電性材料表面においても、生体膜を安定に固定できることが確認されている。

さらに、糖脂質に結合するペプチドの探索に向け、糖脂質を認識する受容体である Toll 様

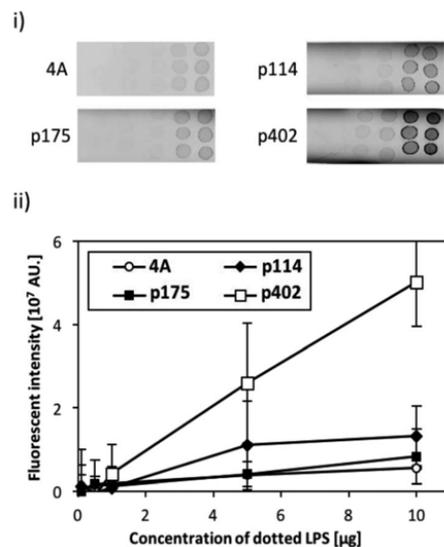


図3 探索された大腸菌結合性ペプチドのリポ多糖結合能評価濃度の異なるリポ多糖をドットプロットしたメンブレンに対する蛍光標識ペプチドを利用した結合試験

受容体4のアミノ酸配列を断片化したペプチドから構成されるペプチドアレイを合成し、これに対する大腸菌との結合性試験を行った。その結果、3種類の大腸菌結合性候補ペプチド (GRHIFWRRRLKALL, KLKSLKRLTFTS, RLHKLTLRNN) と共に、糖脂質に強く結合するペプチド (GRHIFWRR) が同定された。

### ウイルス結合性ペプチドの探索とウイルスセンシング

モデルウイルスとしてインフルエンザを用いて、これに結合するペプチドの探索を進めた。具体的には、インフルエンザの構成タンパク質の一つである Hemagglutinin タンパク質を認識する既知の抗 Hemagglutinin 抗体のうち、Hemagglutinin の STEM 領域を認識する抗体3種類、HEAD 領域を認識する抗体3種類を選抜し、それぞれの相補性決定領域のアミノ酸配列からなるペプチドアレイを構築した。このペプチドアレイに対して A 型インフルエンザウイルス (H1N1) を鶏卵中で培養し、これを回収、濃縮、精製し、結合試験を実施した。これにより複数のインフルエンザ結合性ペプチドの取得に成功した。

現在は、ここで得られたインフルエンザウイルス結合性ペプチドを用いて、ポアセンサによる電気化学的なウイルスセンシングに適した配列に改変し、鶏卵中で培養された活性のある1インフルエンザウイルスを検出できることが示されるとともに、ウイルスの種類を判別できる可能性が示唆されている(査読審査中)。今後は、センサ素子表面に生体膜を配し、不活化したウイルスとの比較検討を詳細に実施することで、偽陽性検出の問題を解決できる新たなセンサデバイスを創出する。

上記の通り、当初の計画の通り、本研究開発に必須な機能性ペプチド(センサ素子認識ペプチド、生体膜認識ペプチド、ウイルス認識ペプチド)をそれぞれ同定し、ウイルスセンサの開発を行った。その結果、ウイルス認識ペプチドで機能化されたポアセンサを利用することで、1インフルエンザウイルスを検出できることが示されるとともに、非常に似通ったウイルス種までも、数ウイルスを検出することで判別できる可能性が示唆されている。これを応用し、活性をもつウイルスと不活化されたウイルスから得られる電気化学的シグナルをより詳細に解析することで、偽陽性検出の問題を解決したセンサデバイスが開発できると考えられる。

また研究開発を進める過程で同定された複数の金ナノ粒子結合性ペプチドに金ナノ粒子の合成を触媒する配列が含まれることが明らかになった。また各配列に応じて、合成されるナノ粒子の物性が大きく異なることが示されたことから、今後温和な条件での物性選択的な機能性ナノ粒子の合成に利用できることが期待される。さらに、生体膜結合性ペプチドについては、指定難病の一つとして知られ

る原発性抗リン脂質抗体症などの疾病に関与するだけでなく、細胞膜の構造制御に重要な陰イオン性リン脂質であるカルジオリピンに高い結合性を示すことなどが本研究により始めて示され、当該ペプチド配列は今後、新たな脂質認識プローブとしての利用が期待される。以上のように、適切に研究計画に従いセンサデバイスの開発を推進するとともに、計画時には予想できなかった研究成果も複数取得でき、それぞれについて今後の発展が期待される。

### 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2件)

**Tanaka M.**, Harlisa I. H., Takahashi Y., Ikhsana N. A., and **Okochi M.** Screening of bacteria-binding peptides and one-pot ZnO surface modification for bacterial cell entrapment. (2018) Vol. 8 (16), p8795-8799 *RSC Adv.* (査読有り)

**Tanaka M.**, Hikiba S., Yamashita K., Muto M., and **Okochi M.**: Array-based functional peptide screening and characterization of gold nanoparticle synthesis. (2017) Vol. 49, p495-506 *Acta Biomater.* (査読有り)

[学会発表] (計6件)

- ① 第68回 日本生物工学会大会 (2016)  
富山国際会議場  
**田中 祐圭**、**大河内 美奈**  
金ナノ粒子合成に寄与する二機能性ペプチドのキャラクタリゼーション
- ② 電気化学会第83回大会 (2016)  
大阪大学  
**田中 祐圭**、引場 駿、山下 健仁、**大河内 美奈**  
ペプチドアレイにより選抜された金結合性ペプチドを利用した金ナノ粒子合成
- ③ 化学工学会第48回秋季大会 (2016)  
徳島大学  
**田中 祐圭**、武藤 正記、**大河内 美奈**  
複合機能性ペプチドを利用した金ナノ粒子合成法の開発
- ④ 第11回バイオ関連化学シンポジウム (2017)  
東京大学  
**田中 祐圭**、**大河内 美奈**  
合成される金ナノ粒子物性を選択できるペプチド触媒のスクリーニング
- ⑤ The 23<sup>rd</sup> Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community (2017)  
Jin Jiang International Hotel, Xi'an  
**Masayoshi Tanaka**, **Mina Okochi**  
Peptide screening for one-pot gold nanoparticle syntheses
- ⑥ 化学工学会第83年会 (2018)

関西大学

田中 祐圭、大河内 美奈

色調選択的に金ナノ粒子をワンポット合成できるバイオミネラリゼーションペプチドの探索

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 祐圭 (TANAKA, Masayoshi)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号： 60533958

### (2) 研究分担者

大河内 美奈 (Okochi, Mina)

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号： 70313301

早水 裕平 (Hayamizu, Yuhei)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号： 80443216

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

Stephen Evans

University of Leeds・School of Physics  
and Astronomy

Kevin Chritchley

University of Leeds・School of Physics  
and Astronomy