

平成30年6月15日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17498

研究課題名（和文）糖鎖特異性の違いを利用したインフルエンザウイルスの結合性変異の追跡デバイス

研究課題名（英文）Development of glycan-immobilized field effect transistor based biosensors toward the detection of mutated influenza viruses

研究代表者

秀島 翔 (Hideshima, Sho)

早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・次席研究員（研究院講師）

研究者番号：10580433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、インフルエンザウイルスの鳥やヒトへの結合性を司るタンパク質と特異性を有するシアロ糖鎖を利用した半導体バイオセンサデバイスを作製し、同センサが鳥およびヒトインフルエンザウイルスの検出に有用であることを検証した。また、構造や長さの異なる糖鎖を組み合わせて固定化することで、ウイルス表面に存在するヘマグルチニンと糖鎖の結合量が増加し、インフルエンザウイルス粒子の捕捉能が向上することが期待された。

研究成果の概要（英文）：In the project, a glycan-immobilized field effect transistor (FET) based biosensor toward the detection of mutated influenza viruses has been developed. The glycan-immobilized FET biosensors, which were modified with Sia 2,6'Gal and Sia 2,3'Gal, successfully detected human and avian influenza viral particles, respectively, suggesting that mutant influenza viruses, which has their recognition ability both to Sia 2,6'Gal and Sia 2,3'Gal, could be rapidly identified by the biosensors.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：電界効果トランジスタバイオセンサ インフルエンザウイルス 糖鎖 バイオセンシング ナノバイオ界面

### 1. 研究開始当初の背景

インフルエンザの脅威は、インフルエンザウイルス (IFV) が宿主依存性の不連続変異を起こすことに起因している。同ウイルスはその殻表面に二つのタンパク質、ヘマグルチニン (hemagglutinin: HA) とノイラミニダーゼ (neuraminidase: NA) を有しており、特に HA を介してシアル酸を末端に持つ糖鎖をレセプタとして認識し、宿主細胞に結合する。一般的に、ヒトと鳥のインフルエンザウイルスの HA では、宿主細胞の糖鎖への認識が異なる。ヒトインフルエンザウイルス (例えば H1N1) の HA は 2,6 結合型シアロ糖鎖 (ヒト型受容体) を主に認識する一方、鳥インフルエンザウイルス (例えば H5N1) の HA は 2,3 結合型シアロ糖鎖 (鳥型受容体) を認識する。過去に世界的流行となったウイルス株は鳥インフルエンザウイルスが起源であり、ヒト-ヒト間での流行を引き起こすように変異したパンデミック株は、鳥型受容体結合性からヒト型受容体結合性を新たに獲得することが報告されている。今後流行するパンデミック株をいち早く察知することは被害を最小限に止めることに繋がり、そのためには鳥型インフルエンザウイルスのヒト型受容体への結合性獲得変異を見分けることが重要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスのヒトへの結合性を司るタンパク質と特異性を有するシアロ糖鎖を利用した半導体バイオセンサデバイスを作製し、同センサがパンデミックウイルスの結合性変異を検知する手段として有用であることを示す。また、同ウイルス粒子の捕捉能を向上させるために、様々な構造を有する糖鎖をセンサ界面に三次元的に密集させて固定化し、固定化された糖鎖とウイルス表面の結合サイトとが多点的に結合するナノバイオ界面を創製する。

### 3. 研究の方法

種々の糖鎖を複合的に用いることでウイルス高捕捉能ナノバイオ界面を創製し、その界面を具備した FET バイオセンサがパンデミックウイルスの結合性変異の追跡デバイスとして有用であることを示す。研究代表者が提案したアミノオキシ基末端有機単分子膜を利用した高密度・高配向な単一糖鎖固定化界面はリコンビナント HA の特異的捕捉が可能であり、HA が約 500 個表面に存在するインフルエンザウイルスの捕捉へも適用可能であることが期待される。まずヒト型受容体である 2,6 結合型シアロ糖鎖および鳥型受容体である 2,3 結合型シアロ糖鎖を固定化したセンサ界面がヒトインフルエンザウイルス (H1N1 等)、鳥インフルエンザウイルス (H5N1 等) に対する捕捉能を有していることを、原子間力顕微鏡 (AFM) や水晶振動子マイクロバランス (QCM) 等の測定法を活用し

評価する。その上で、ウイルス粒子の捕捉に適した高捕捉能糖鎖複合固定化界面の設計として、測定対象であるウイルスのスケール (直径約 100 ナノメートル) や分子認識部位を考慮して、固定化する糖鎖の種類や密度、配向性を制御することで、ウイルス捕捉の向上を目指す。さらに、FET バイオセンサが無標識でのインフルエンザウイルス検出に適用可能であることを示し、同センサを用いたパンデミックウイルスの結合性変異の追跡可能性を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) インフルエンザウイルス高捕捉能糖鎖固定化界面の創製とそのデバイスへの応用

ヒト型受容体である 2,6 結合型シアロ糖鎖および鳥型受容体である 2,3 結合型シアロ糖鎖を固定化したセンサ界面が、ヒトインフルエンザウイルス (H1N1) 及び鳥インフルエンザウイルス (H5N1) に対する捕捉能を有することを評価した。まず、2,6 結合型シアロ糖鎖である 2,6 シアリルラクトースを固定化した界面、および 2,3 結合型シアロ糖鎖である 2,3 シアリルラクトースを固定化した界面に対する、H1N1 ヒト IFV 粒子及び H5N1 鳥 IFV 粒子の吸着を原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて観察したところ、2,6 結合型シアロ糖鎖固定化界面には H1N1 ウイルス粒子、2,3 結合型シアロ糖鎖固定化界面には H5N1 ウイルス粒子と考えられる 100 nm 程度の粒子の特異的吸着が確認された。また、糖鎖固定化界面に対する IFV 粒子の吸着を水晶振動子マイクロバランス (QCM) を用いて評価したところ、HA と糖鎖間の結合に伴うウイルス粒子の吸着に起因した共振周波数の変化が観測された。また、鳥インフルエンザウイルスを捕捉可能な糖鎖固定化界面の作製に向けて、シアリルルイス X ラクトース (SLeX Lac) の固定化条件 (反応溶液濃度や反応時間) を探索した。SLeX Lac 固定化 FET バイオセンサを用いて H5N1 鳥 IFV 検出を行ったところ、IFV の負電荷に由来する応答が観測された。一方、H1N1 ヒト IFV を添加したところ、ほとんど応答を示さなかった。また、各 IFV 添加後の糖鎖固定化表面状態を AFM により観察したところ、H5N1 鳥 IFV 添加後において IFV に由来する粒状物質が観測された一方、H1N1 ヒト IFV の非特異吸着は観測されなかったことから、IFV を特異的に検出することが示された。更に、Sia 2,3'Lac 固定化 FET による H5N1 鳥 IFV の検出結果と比較して、応答量の増加が確認された。これは、フコースの付加により HA の糖鎖認識部位内のアミノ酸と水素結合を形成する結合点が増えたことに起因すると考えられる。更に、IFV の捕捉に効果的な糖鎖の固定化条件を検討することを目的として、SLeX Lac 及び Sia 2,3'Lac を用いて作製した混合糖鎖固定化 FET による H5N1 鳥 IFV 検出を行った。その結

果、構造や長さの異なる糖鎖を組み合わせて固定化することで、ウイルス表面に存在するヘマグルチニン (HA) と糖鎖の結合量が増加し、IFV の捕捉能が向上することが期待された。

また、小型集積化が容易なデバイスである FET バイオセンサは、無線通信方式との結合やスマートフォンとの連携や制御を実現することで、使用場所を問わず流行地域の分布予測等に役立つことが期待される。そこで、スマートフォンで計測データを読み出す近距離無線通信による FET センサシステムを開発し、FET センサのキャリブレーション動作および FET センサによる IFV の検出を検討したところ、スマートフォンで制御して計測データを安定に取得することに成功した。本測定システムは測定部治具を付け替え可能で、IFV 以外に pH や食物アレルギーの検出にも適用可能となり、同 FET センサシステムが様々な現場で応用可能であることが示唆された。

## (2) 粘液中に存在する IFV 粒子の特異検出に向けた検討

作製されたデバイスの実用化を考える場合、鼻汁中に存在するウイルス検出が求められる。一般に同環境下は多糖類のムチンを多く含み粘度が高いため、センサ界面へのウイルス吸着が起こりにくくなると考えられる。気道、鼻腔等の粘液中のムチン (高い粘性の原因となる糖タンパク質) の重合体を気道粘液溶解剤の一種である L-エチルシステイン (L-cysteine ethyl ester; LCEE) 塩酸塩を用いて分解することで、ムチンを始めとする夾雑タンパク質の影響を大きく軽減して、FET バイオセンサによる鼻汁粘液中の IFV を特異的に検出することが容易になることが確認された。この処理方法は唾液等の生体由来粘液からの生体分子の検出に共通して適用可能であることが期待された。

## 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 4 件)

秀島翔、 “糖鎖を利用した半導体型ウイルスセンサ”, *BIO Clinica*, 2017, 32, 393-396; 査読無

K. Ohashi, S. Kuroiwa, S. Hideshima, T. Nakanishi, T. Osaka, “Review of Physiological Balance Sensing in an Unobtrusive Manner”, *Electronics and Communications in Japan*, 2017, 100, 50-55; 査読無  
DOI: 10.1541/ieejsmas.136.357

S. Hideshima, M. Saito, K. Fujita, Y. Harada, M. Tsuna, S. Sekiguchi, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Osaka,

“Label-free detection of allergens in food via surfactant-induced signal amplification using a field effect transistor-based biosensor”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 254, 1011-1016; 査読有

DOI: 10.1016/j.snb.2017.07.187

S. Hideshima, S. Wustoni, M. Kobayashi, H. Hayashi, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Osaka, “Effect of human serum on the electrical detection of amyloid-fibrils in biological environments using azo-dye immobilized field effect transistor (FET) biosensor”, *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2018, 17, 25-29; 査読有

DOI: 10.1016/j.sbsr.2018.01.003

### [学会発表](計 5 件)

林宏樹、秀島翔、比能洋、西村紳一郎、迫田義博、黒岩繁樹、中西卓也、門間聰之、逢坂哲彌、 “糖鎖固定化電界効果トランジスタバイオセンサによるインフルエンザウイルス粒子の高感度検出”、Conference for Biosignal and Medicine (CBSM) 2016、2016年9月29日、大分

S. Hideshima, S. Wustoni, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Osaka, “Signal Amplification Techniques By Effective Use of the Interfacial Region for Field Effect Transistor (FET) Based Biosensing”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science (PRIME) 2016, October 4, 2016, Honolulu, Hawaii, USA

秀島翔、 “健康モニタリングに資する半導体バイオセンサ技術”、特別講演、電気化学会第84回大会、2017年3月25日、東京

竹内亮、秀島翔、黒岩繁樹、中西卓也、門間聰之、逢坂哲彌、 “溶液中保存の安定性向上を目指した電界効果トランジスタバイオセンサゲート絶縁膜への酸化グラフェン被覆”、第62回化学センサ研究発表会、2017年9月11日、長崎

S. Hideshima, M. Saito, K. Fujita, Y. Harada, M. Tsuna, S. Sekiguchi, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, T. Osaka, “Development of semiconductor-based biosensor for detection of buckwheat allergenic protein in food products”, 232nd ECS meeting, October 4, 2017, National Harbor, MD, USA

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：半導体センシングデバイス  
発明者：逢坂哲彌、秀島翔、黒岩繁樹  
権利者：学校法人 早稲田大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-091787  
出願年月日：2017年5月2日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

（受賞）Poster presentation award 1st prize (232nd ECS meeting)

（報道）本研究課題の成果を含めた研究代表者のFETバイオセンサ研究開発に関する報道が、日経産業新聞（2017年7月24日）に掲載・紹介された。また、同研究内容がTBSテレビ「未来の起源」にて放映・紹介された（2017年9月24日）。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秀島 翔 (HIDESHIMA, Sho)  
早稲田大学・ナノ・ライフ創新研究機構・  
次席研究員（研究院講師）  
研究者番号：10580433

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者：なし