

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710136

研究課題名(和文) ウイルス検出に向けた糖鎖固定化技術の開発とデバイス応用

研究課題名(英文) Development of glycan immobilization technique for virus detection and its device applications

研究代表者

秀島 翔 (HIDESHIMA, SHO)

早稲田大学・ナノ理工学研究機構・講師

研究者番号：10580433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、糖鎖をプローブとして利用したバイオセンシングを考案することを目的として、糖鎖固定化技術を開発し、それを電界効果トランジスタ(FET)バイオセンサに適用することで、ウイルス検出の可能性を探索した。糖鎖の固定化には、アミノオキシ基を末端に有する有機単分子膜を利用し、センサ表面への糖鎖の高密度・高配向な固定化を実現した。その結果、インフルエンザウイルスの殻表面に存在するタンパク質であるヘマグルチニンに対して特異性を有する糖鎖を固定化したFETが、同タンパク質を aM (10^{-18} M)レベルで検出可能であることが確認され、ウイルス検出への糖鎖固定化FETの応用可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：I have developed a glycan immobilization technique for biosensing devices based on field effect transistors towards influenza virus detection. Highly dense and oriented glycan immobilization has been achieved by introducing an aminoxy-terminated self-assembled monolayer on the sensing surface. The glycan-immobilized FET could detect influenza virus hemagglutinin at attomolar-level sensitivity. The results suggest that the glycan-immobilized FETs developed in the project have potential to detect influenza virus with the high sensitivity.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノバイオ 糖鎖 バイオセンシング 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

1. 研究開始当初の背景

インフルエンザウイルスを迅速かつ高感度に検知することは、重症化やパンデミックを防ぐために重要であり、その技術開発が強く求められている。現在のインフルエンザの診断手法としては、病院等で簡便な診断が可能なインフルエンザ迅速診断キットが、日本において広く利用されている。しかし、同診断キットは感度が低いことが指摘されることがあり、感染初期の診断には問題がある。また、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) 法や酵素免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) などの高感度かつ再現性の高い測定が可能な診断法も用いられているが、これらの手法は計測機器や標識試薬が高価であることや測定に多段階の工程や長時間が必要であり、迅速性や簡便性に欠ける。このような現状において、インフルエンザ感染の迅速診断及び早期発見ができる、迅速性や簡便性、高い感度を併せ持った診断ツールの開発が求められていた。

2. 研究の目的

本課題では、インフルエンザウイルスを検知するバイオセンシングを提案し、高感度かつ迅速な診断の可能性を探索する。糖鎖を基板上に高密度かつ高配向に固定化する手法を確立して、インフルエンザウイルスを捕捉可能なバイオセンシングデバイスの開発を目指す。バイオセンシングデバイスの選定においては、電界効果トランジスタ (FET) バイオセンサを用いた迅速・高感度検出の可能性を見出す。FET バイオセンサは半導体素子であるトランジスタのゲート端子を認識・検出場として、そのセンサ表面に特異的に吸着される検出対象物質の電荷を検出するバイオセンサで、半導体微細加工技術を用いたセンサの小型集積化が可能であるため、利便性の高い医療機器としての可能性を秘めている。

3. 研究の方法

高密度糖鎖固定化方法を確立し、その技術を FET バイオセンサに適用し、インフルエンザウイルスを捕捉可能な糖鎖固定化 FET バイオセンサの開発を目指す。糖鎖の固定化には、基板上に導入したアミノオキシ基に対する糖鎖の直接固定化法を提案する。糖鎖の還元末端に存在するヘミアセタール基は基板表面のアミノオキシ基と化学選択的に反応することから、糖鎖を基板に直接固定することが可能となり、従来法として広く用いられている有機化合物を利用した架橋法とは異なり、高密度かつ高配向性を有する糖鎖固定化表面が期待される。また、一般的に糖鎖とタンパク質の相互作用は抗原抗体反応に比べて弱いことが知られているが、本系は糖鎖を高密度に集積させることで、糖鎖クラスター

効果を発現させ、その結合能が増強されることが期待される。

前述の糖鎖固定化方法の知見を得て、ウイルスを捕捉可能な糖鎖固定化 FET バイオセンサを作製する。インフルエンザウイルスはその殻表面に存在するタンパク質であるヘマグルチニン (HA) を介して、シアル酸を末端に持つ糖鎖を認識し、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 (Sia 2,6 Lac) 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 (Sia 2,3 Lac) を認識する。その 2 種類の糖鎖を用いて糖鎖固定化 FET を作製し、まず、糖鎖固定化 FET がターゲットの内在電荷を検出できることを確認するため、糖鎖 - タンパク質の組み合わせで FET 応用が得られることを確かめる。更に、検出能の評価や測定所要時間の検証や改良を踏まえた上で、糖鎖固定化 FET を用いたインフルエンザウイルスの検出を試みる。

4. 研究成果

(1) ウイルス検出に向けた高密度・高配向糖鎖固定化手法の検討と評価

高密度・高配向糖鎖固定化を実現するために、アミノオキシ基を利用する求核付加反応を利用し、固定化された糖鎖がターゲット分子に対する高い認識能及び選択性を有することを示した。基板表面上への糖鎖の固定化方法としてアミノオキシ基を末端に有する AOPTES (3-aminoxypropyltriethoxysilane) 由来の AOPS 膜を利用する方法を提案し、まず AOPS 膜及び AOPS 膜上への糖鎖固定化を評価した。基板上への AOPTES 由来の AOPS 膜の修飾を確認するため、分光エリプソメトリーを用いた膜厚測定及び X 線光電子分光分析法 (XPS) を用いた元素分析を行ったところ基板上への AOPS 膜の修飾が示唆された。更に、作製した AOPS 膜を介した基板上への糖鎖の固定化が可能であるかを評価するため、XPS を利用した解析を行った。AOPS 膜修飾基板上に Sia 2,6 Lac を反応させた基板表面の XPS スペクトルにおいて、シアリルラクトースの有する官能基由来のピークが観測されたことから、AOPS 修飾基板上への Sia 2,6 Lac の固定化が示唆された。以上の結果から、AOPTES を利用することで、アルデヒド基を有する糖鎖を基板上へ固定化可能であることが示唆された。

続いて、検出における S/N 比向上を目的として、ゲート表面上へのタンパク質添加後の洗浄条件及び糖鎖の固定化条件の探索を行った。Sia 2,6 Lac 固定化ゲート表面上へ非特異吸着したタンパク質の除去を目的として、Tween 20 を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-T) を用いたリンスを行い、Tween 20 濃度と HSA (ヒト血清アルブミン) の非特異

吸着の量の関係について評価したところ、1% Tween 20 含む PBS-T を利用することで非特異吸着した HSA の除去が可能であることが示唆されたため、洗浄条件として決定した。更に、糖鎖固定化条件と HSA の吸着量の関係を評価したところ、Sia 2,6 Lac 溶液の反応時間を増加させることにより HSA の非特異吸着の抑制が可能であることが示唆された。糖鎖を高密度に修飾可能な条件において非特異吸着の抑制が可能となったと考えられる。

(2) 糖鎖固定化 FET バイオセンサを用いたタンパク質の高感度検出

前項の糖鎖固定化法を FET バイオセンサのセンサに適用し、ヒトインフルエンザウイルスヘマグルチニン (H1 HA) 及び鳥インフルエンザウイルスヘマグルチニン (H5 HA) それぞれに対して特異性を有する 2 種類の糖鎖 (Sia 2,6 Lac 及び Sia 2,3 Lac) を FET のゲート絶縁膜上に固定化することで、糖鎖固定化 FET を用いた同タンパク質の検出を試みた。その結果、作製した 2 種類の糖鎖固定化 FET がヘマグルチニン (HA) の亜型を識別し、かつ対象の HA を aM (10^{-18} M) レベルで検出可能であることが確認された。また、抗 HA 抗体固定化 FET の H1 HA の検出感度と比較したところ、Sia 2,6 Lac 固定化 FET の検出感度が高いことが確認され、糖鎖固定化 FET の有用性が示唆された。また、鼻粘液中におけるインフルエンザウイルスの検出に向けた基礎検討として、鼻粘液に存在する夾雑タンパク質 (リゾチームやアルブミン等) がセンサ応答に及ぼす影響を評価した。続いて、作製した糖鎖固定化 FET を用いた、学外の研究機関から入手した H1N1 ヒトインフルエンザウイルスの検出を試みた。ターゲットである同ウイルスを FET センサ表面に添加したところセンサ応答が確認された一方で、対照実験として H5N1 鳥インフルエンザウイルスを添加したところ応答は確認されなかった。以上より、作製した糖鎖固定化 FET がインフルエンザウイルスを特異的に検出可能であることが示唆された。

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 3 件)

S. Hideshima, H. Hinou, R. Sato, D. Ebihara, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, S. Nishimura, T. Osaka, "Attomolar Detection of Influenza A Virus Hemagglutinin Human H1 and Avian H5 Using Glycan-Blotted Field Effect Transistor Biosensor", *Anal. Chem.*, 2013, 85, 5641-5644; 査読有
DOI: 10.1021/ac401085c

S. Hideshima, S. Wustoni, S. Kuroiwa,

T. Nakanishi, A. Koike, T. Osaka, "Monitoring Amyloid Sup35NM Growth with Label-Free Electrical Detection Using Field Effect Transistor Biosensor", *ChemElectroChem*, 2014, 1, 51-54; 査読有
DOI: 10.1002/celec.201300151

S. Hideshima, M. Kobayashi, T. Wada, S. Kuroiwa, T. Nakanishi, N. Sawamura, A. Toru, T. Osaka, "Label-Free Electrical Assay of Fibrous Amyloid Based on Semiconductor Biosensing", *Chem. Commun.*, 50, 3476-3479; 査読有
DOI: 10.1039/C3CC49460H

[学会発表](計 3 件)

S. Hideshima, H. Hinou, D. Ebihara, R. Sato, S. Kuroiwa, S. Nishimura, T. Osaka, "Carbohydrate Immobilization on the Surface of Field Effect Transistor Biosensor for Detection of Virus-related Protein", Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science (PRiME) 2012, October 9, 2012, Honolulu, Hawaii, USA

秀島翔、"糖鎖を用いた半導体バイオセンシング インフルエンザウイルス検出に向けた研究開発"、依頼講演、第 7 回 GFRG 研究会シンポジウム、2013 年 8 月 28 日、東京

海老原大介、秀島翔、比能洋、黒岩繁樹、中西卓也、西村紳一郎、逢坂哲彌、"糖鎖受容体を用いた電界効果トランジスタによるインフルエンザウイルスヘマグルチニンの検出"、第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013、2013 年 10 月 22 日、東京

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 糖化合物固定化半導体センシングデバイス及び生物学的物質の検出方法

発明者: 逢坂哲彌、秀島翔、黒岩繁樹、西村紳一郎、比能洋

権利者: 学校法人 早稲田大学

種類: 特許

番号: 特願 2012-191701 (特開 2013-152211)

出願年月日: 2012 年 8 月 31 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

[その他]

本研究課題の成果に関する報道が、日本経済新聞(2013 年 6 月 20 日、2013 年 11 月 23 日、

及び2014年3月25日)に掲載・紹介された。
また、同研究内容がブラジル全国ネットのテレビ局 RECORD TV にて放映・紹介された(2013年7月13日)。

ホームページ

<http://www.ec.appchem.waseda.ac.jp/INDEXJ.HTM>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秀島 翔 (HIDESHIMA, Sho)

早稲田大学・ナノ理工学研究機構・講師

研究者番号：10580433

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし