

課題番号 71

新型コロナウイルスのスパイクタンパク質不活化評価方法の 確立と光触媒活性 TiO₂ 膜の評価

[1] 組織

代表者：井越 翔太

(東北大学大学院工学研究科)

対応者：伊藤 甲雄

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

上田 恭介 (東北大学大学院工学研究科)

成島 尚之 (東北大学大学院工学研究科)

古泉 隆佑 (東北大学大学院工学研究科)

研究費：物件費13万円，旅費0円

[2] 研究経過

新型コロナウイルス(SARS-CoV2)は世界に蔓延し、基礎疾患のある患者や高齢者の感染では重篤化するケースも見られる。コロナウイルスの感染機構は、ウイルス表面上のスパイクタンパク質が細胞表面の受容体(ACE2)と結合することで感染のトリガーとなる。したがって、スパイクタンパク質を不活化すれば、ウイルスの感染を防ぐことができる。

申請者らはこれまで、チタニア(TiO₂)の光触媒活性に着目し、通常は紫外光でなければ発現しない光触媒活性を可視光応答化させるチタンの表面処理方法を開発し、大腸菌に対する抗菌性を明らかにしてきた。チタニアの光触媒活性は細菌のみならず、エンベロープ型ウイルスを不活化させることが知られている。

従来のウイルス不活化能の評価は、バクテリオファージを用いたものであり、JIS や ISO にも規格化されている。しかし、SARS-CoV2 とバクテリオファージの不活化条件は異なるのが妥当である。

SARS-CoV2 は P3 レベルの施設でしか扱えない。所内対応者である加齢研伊藤助教らは、SARS-CoV2 スパイクタンパク質を有する複合タンパク質の合成に成功している。

そこで本申請では、(1) SARS-CoV2 スパイクタンパク質を用いた、材料表面における SARS-CoV2 の不活化評価方法を確立する、(2) 確立した評価方法を活用

し、光触媒活性 TiO₂ によるスパイクタンパク質不活化能を評価する、ことを目的として研究を行った。

スパイクタンパク質の合成、タンパク質の定量方法確立、TiO₂による不活化評価方法確立の実験は、いずれも申請者が加齢研・小笠原研究室にて実施した。合成後のタンパク質は、拡散防止処置を講じた上での取り扱いとなることから、バイオハザードレベル P1 以上(伊藤助教の実験室はいずれも P2 以上)の実験室でのみ取り扱う必要があるためである。週の半分以上の頻度で加齢研にて実験を行った。タンパク質の取扱や実験方法確立においては、対応者である伊藤助教とディスカッションし手技を教授頂いた。

図1に、本年度に確立した評価方法の模式図を示す。

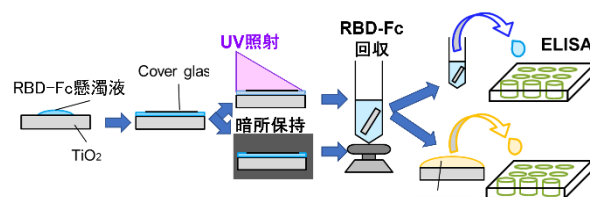


図1 本研究で確立した TiO₂ 上スパイクタンパク質不活化評価方法の模式図

[3] 成果

(3-1) 研究成果

融合タンパク質の定量方法として酵素結合免疫吸着法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)法に着目した。ELISA 法の確立にあたり、各種抗体、溶媒の種類・濃度について検討し、本融合タンパク質の定量方法を確立できた。

TiO₂ 表面での融合タンパク質不活化評価方法を検討した。光触媒活性 TiO₂ の抗菌性試験方法であるガラス密着法(JIS R1702)を参考にした。基板(TiO₂)上に融合タンパク質(RBD-Fc)懸濁液を滴下し、カバーガラスを被せた後、UV 照射および暗所保持した。その後、回収溶液にガラスカバーごと基板を浸漬し、融合タンパク質を回収した。回収溶液中の RBD-Fc 濃度は上記で確立した ELISA 法により定量分析した。一方、基板表面に吸着・残存した RBD-Fc についても、基板上

に抗体を直接播種し、定量分析する手法を確立した。
確立した手法を用いて評価した、TiO₂基板へのUV照射に伴う融合タンパク質分解能は、ルチル型 TiO₂基板では暗所保持と比較して有意な RBD-Fc 量の低下を確認でき、TiO₂の光触媒活性によるスパイクタンパク質の不活化が示された。

(3-2) 波及効果と発展性など

本タンパク質を用いることで、多くの研究者が安全に SARS-CoV2 不活化に関する研究を行うことができる。さらに、遺伝子組み換えにより、変異型スパイクタンパク質の作製も可能である。

一方、再現性や定量性、測定レンジ等、課題も明らかにかにすることができた。次年度以降、これらについては検討を進めていく。なお、本研究は申請者の同研究室、博士課程学生に引き継ぎ、令和5年度加齢研共同利用「光触媒活性 TiO₂ 膜による変異株を含む新型コロナウイルススパイクタンパク質不活化」研担当教員小笠原 康悦(採択番号 57)に採択されている。

[4] 成果資料

学会発表

- (1) 井越翔太、古泉隆佑、上田恭介、伊藤甲雄、小笠原康悦、成島尚之
「新型コロナウイルススパイクタンパク質の定量方法確立」
2022年度東北大学金属材料研究所共同研究ワークショップ・日本バイオマテリアル学会東北ブロック講演会「臨床応用へ向けたバイオマテリアルサイエンス」
東北大学金属材料研究所、オンライン 2022年10月26日
講演番号 P11 (ポスター発表)
- (2) 古泉隆佑、井越翔太、上田恭介、伊藤甲雄、小笠原康悦、成島尚之
「新型コロナウイルススパイクタンパク質の不活化評価法の確立」
日本金属学会 2023年春期(第172回)講演大会
東京大学駒場キャンパス、2023年3月7日~10日(10日)
講演番号 123
- (3) 上田恭介、古泉隆佑、伊藤甲雄、小笠原康悦、金高弘恭、目代貴之、成島尚之
「二段階熱酸化法による炭素・窒素共添加 TiO₂ 膜の作製および可視光照射下における抗菌性評価」
国際・産学連携インヴァースイノベーション材料

創出プロジェクト-DEJIMA プロジェクト-
Design & Engineering by Joint Inverse
Innovation for Materials Architecture (6大学
連携プロジェクト) 第1回公開討論会
早稲田大学西早稲田キャンパス、2023年3月11
日
P-37 (ポスター発表)

招待講演

(4) 上田恭介

「生体用セラミックス表面処理によるチタンの高機能化」
令和4年度軽金属学会東北支部講演会およびイブニングセミナー「医用材料における軽金属の役割」
東北大学工学部マテリアル・開発系、2023年3月6日
講演2