

新型コロナウイルス合成タンパク質を利用した 不活化評価方法の確立と可視光応答型光触媒 TiO₂ による ウイルス不活化表面の創製

[1] 組織

代表者：古泉 隆佑
(東北大学大学院工学研究科)

対応者：小笠原 康悦
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：
成島 尚之 (東北大学大学院工学研究科)
上田 恭介 (東北大学大学院工学研究科)
島田 啓太 (東北大学大学院工学研究科)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)は世界に蔓延し、世界経済への影響も大きい。SARS-CoV-2 は表面にスパイクタンパク質を含むエンベロープを有しており、このスパイクタンパク質が細胞膜の ACE2 受容体に結合することで感染する。SARS-CoV-2 は他のエンベロープウイルスと同様、紫外線や界面活性剤により不活化できるとされているが、空気中ではエアロゾルとして数時間分解されず、さらに金属やプラスチック等の表面では最長 3 日間、感染力を保持していることが明らかとなっている。そのため、咳やくしゃみにより材料表面に SARS-CoV-2 が付着した場合、感染リスクに晒されることとなる。感染予防のためには、人々の生活の中で手に触れる部分(手すり、ドアノブ)に付着したウイルスを、自然に不活化し、感染力を無くす方法が有効である。

TiO₂ は紫外光(UV)照射下で光触媒活性を発現する物質であり、UV 照射下で細菌やエンベロープ型ウイルスを不活化させることが報告されている。TiO₂ の利用範囲拡大には可視光応答化が有力であり、その手法として TiO₂ 中への炭素や窒素の導入が報告されている。我々はこれまでに、チタン表面への炭素含有 TiO₂ コーティングの作製に成功し、この TiO₂ が可視光照射下で大腸菌に対して抗菌性を発現することを明らかにしてきた。

従来のウイルス不活化能の評価は、対象とするウ

イルスを直接用いたものであり、SARS-CoV-2 は BSL3 レベルの施設でのみ扱えることから、ウイルス不活化評価は容易ではない。そこで我々は、人工合成した SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を用いた、材料表面における不活化能評価方法の確立を目的とした。確立した評価方法を活用し、SARS-CoV-2 に対して可視光照射下において不活化効果を有するチタンの表面処理方法の開発を目指して研究を遂行した。

加齢医学研究所伊藤は、新型コロナウイルススパイクタンパク質の人工合成を担当した。古泉を中心として、上田、島田、成島は、光触媒活性をもつ TiO₂ コーティング基板を作製した。TiO₂ コーティング基板に新型コロナウイルススパイクタンパク質溶液をのせ、分解について評価する実験は、加齢医学研究所で実施した。本年度は、1 週間に 2 回程度の実験を遂行した。これに加えて、2 週間に 1 回程度打ち合わせを行った。

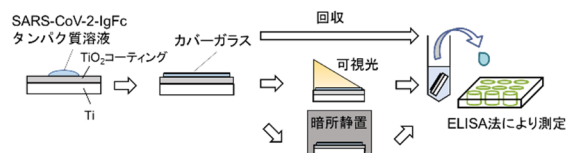


図1 SARS-CoV2スパイクタンパク質を用いたウイルス不活化能評価方法の流れ

[3] 成果

(3-1) 研究成果

スパイクタンパク質を人工遺伝子合成し、遺伝子組換えにより、マウスイムノグロブリン(Ig)G2a 定常領域(Fc)との融合タンパク質の発現プラスミドを作製した。これをヒト胎児腎細胞株(Expi293F 細胞)に遺伝子導入し、培養上清をプロテイン G カラムで精製した(SARS-CoV-2-IgFc)。この SARS-CoV-2-IgFc タンパク質を精製し、本実験に使用した。なお、この遺伝子組み換え実験は文部科学大臣確認実験となるが、2020 年 6 月に承認済みである。

一方、新規に合成した SARS-CoV-2-IgFc タンパク質は、その定量方法が確立されていない。そこで本年度は、定量評価法として ELISA 法に着目し、種々の捕捉抗体および標識抗体を検討した。SARS-CoV-2-

IgFc タンパク質の定量には、特定の抗体を用いることが必要であり、定量範囲を含めて定量評価方法を確立できた。

SARS-CoV-2-IgFc タンパク質の分解評価として、先述の ELISA 法を用いた新たな実験フローを構築した。なお、光触媒活性によるタンパク質分解の評価系を構築するため、可視光ではなく UV、TiO₂ コーティング基板ではなく TiO₂ 単結晶を用いて実験を行った。具体的な実験方法として、TiO₂ 単結晶基板を 3 つ用意し、精製した SARS-CoV-2-IgFc タンパク質溶液をそれぞれに滴下し、乾燥防止のため試料表面にカバーガラスをのせた。試料に対し、UV 照射あり、暗所静置、滴下後即時回収の処理をそれぞれ施した。その後、回収溶液中に浸漬させボルテックスミキサーにより SARS-CoV-2-IgFc タンパク質溶液を回収し、ELISA 法により定量評価を行った(図 1)。比較として SiO₂ 基板に対しても同様の実験を行った。その結果、UV 照射後の TiO₂ の回収率は減少しており、光触媒活性による分解が確認された。

TiO₂ コーティングについては、従来添加していた炭素に加えて、窒素も含有した TiO₂ コーティングの作製に成功し、この炭素・窒素含有 TiO₂ コーティングが可視光照射下において大腸菌に対して抗菌性を発現することを確認した。今後は、先述の ELISA を用いた定量評価と組み合わせて、可視光照射下における SARS-CoV-2-IgFc タンパク質分解評価を行っていく予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究は、変異株にも対応することが可能である。加えて、可視光応答化 TiO₂ コーティングによるウイルス不活化は蛍光灯等の微弱な光源においても抗ウイルス性を発現し、手摺りやドアノブ等の不特定多数が触るような部材に適用することで、新型コロナウイルスとの共存を余儀なくされる世界に対して、安心・安全な生活に貢献するものである。

次年度は本研究からテーマを、コロナウイルスの不活化評価法の確立および可視光応答型 TiO₂ の開発の 2 つに細分化し、共同研究に申請、採択された。テーマの細分化により研究進捗の更なる促進を目指す。

[4] 成果資料

解説記事

- (1) 成島尚之, 上田恭介, **古泉隆佑**: “チタン合金の抗菌化表面処理,” 表面技術, 72 (2021) 616-621.

DOI: <https://doi.org/10.4139/sj.72.616>

国際会議における発表

- (2) **R Koizumi**, K. Ueda, K. Ito, K. Ogasawara, M. Furuya, H. Kanetaka, T. Narushima: “Antibacterial functionalization of titanium surface by the formation of visible light responsive photocatalytic TiO₂ layer,” Interface Summer Seminar 2021 and the 16th International Workshop on Biomaterials in Interface Science, O-07, Online meeting, Sep. 28, 2021.

国内会議における発表

- (3) **古泉隆佑**, 島田啓太, 上田恭介, 伊藤甲雄, 小笠原康悦, 古谷真衣子, 金高弘恭, 成島尚之: “チタン表面に作製した炭素含有 TiO₂ 膜の短時間可視光照射条件における抗菌性評価,” 日本金属学会 2021 年秋期第 169 回講演大会, 講演番号 357, オンライン開催, 2021 年 9 月 14-17 日.
- (4) **古泉隆佑**, 上田恭介, 伊藤甲雄, 小笠原康悦, 成島尚之: “二段階法により作製した TiO₂ 膜の構造および光触媒活性に及ぼす酸化処理条件の影響,” 日本金属学会 2022 年春期第 170 回講演大会, 講演番号 357, オンライン開催, 2022 年 3 月 15-17 日.