

整理番号	—J—	報告者氏名	松原 輝彦
------	-----	-------	-------

研究課題名

新興感染症ウイルスを検出可能にする生体高分子材料の設計

<代表研究者> 機関名： 慶應義塾大学 職名： 准教授 氏名： 松原 輝彦

<共同研究者> なし

<研究内容・成果等の要約>

2020–2021年のシーズンでは、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 による COVID-19 の蔓延を許すこととなったが、同時に PCR 並みに精度の高いウイルス検出法が迅速に準備できない問題点が浮き彫りとなった。申請者はこれまでにインフルエンザウイルスの高感度検出が可能な電極を作製してきたが、この技術を SARS-CoV-2 を対象として迅速に設計する手法を開発する。

本研究では、ウイルス捕捉ペプチドをまず獲得し、電極やナノ粒子などに化学修飾することで、ウイルスの結合や粒子の凝集によって検出するデバイスを構築することを目指した。ペプチドはアジドとアルケンを用いたクリック化学などを用いて共有結合で固定化するほか、ペプチドの固定化の密度や分岐を検討し、高感度化に適したデバイスを開発することが期待できる。

課題期間内ではまず、外殻タンパク質（S1 タンパク質）発現と、ウイルスを捕捉するペプチド（SARS-CoV-2 結合性ペプチド）の設計を行なった。S1 タンパク質発現のためのベクターを調製する一方、動物細胞による発現を行うため、トランスフェクション試薬および細胞を検討し、最適な組み合わせを見出した。一方、SARS-CoV-2 結合性ペプチドは、S1 タンパク質に対してファージ提示法を用い、ランダムなペプチドライブラリーから親和性選択によって獲得した。得られたペプチドを化学合成し、S1 タンパク質に結合することを示した。さらに SARS-CoV-2 の偽ウイルスを作製し、ウイルスと細胞の相互作用を阻害することに成功した。これらの結果は、ウイルスの S1 タンパク質の受容体を機能的に模倣しているペプチドが得られたことを意味する。このウイルス捕捉ペプチドを電極や粒子などに化学修飾すれば、ウイルス検出が可能なデバイスを開発することが期待できる。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭

- (1) 松原輝彦、次世代のウイルス検出センサーおよびバイオリアクターの開発、第2回ヘルステック・デバイス・フォーラム、2022年8月（ヘルステック・イノベーション・ハブ、盛岡市）
- (2) 鈴木寧々・松原輝彦・佐藤智典、ファージ提示法による SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質に結合するペプチドの探索、日本化学会第103春季年会（2023）、2023年3月（東京理科大学）
- (3) 田中翔太・伊東謙吾・松原輝彦・佐藤智典、ペプチド修飾銀ナノプレート複合電極によるインフルエンザウイルスの電気化学的検出、日本化学会第103春季年会（2023）、2023年3月（東京理科大学）

ポスター

- (1) 鈴木寧々・松原輝彦・佐藤智典、(P19) ファージ提示法を用いた SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質を認識するペプチドの探索、第32回バイオ・高分子シンポジウム、2022年7月（東京工業大学）
- (2) 田中翔太・伊東謙吾・松原輝彦・佐藤智典、(P24) ペプチド修飾ナノプレート複合電極による電気化学的ウイルス検出法の開発、第32回バイオ・高分子シンポジウム、2022年7月（東京工業大学）
- (3) 鈴木寧々・松原輝彦・佐藤智典、ファージ提示法による SARS-CoV-2 スパイク糖タンパク質結合性ペプチドの探索、GlycoTOKYO2022 シンポジウム、2022年12月（cyber 東海大学）

誌上

- (1) T. Matsubara, A. Ogami, H. Kori, M. Hashizume, T. Sato, Detection of Influenza Virus by Agglutination of Microparticles Immobilized a Mixed Glycan Receptor Produced from Cells, **ACS Appl. Bio Mater.**, 5(5), 2130-2134 (2022)
- (2) T. Matsubara, Peptide mimotopes to emulate carbohydrates, **Chem. Soc. Rev.**, 51(19), 8160-8173 (2022).

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

[1] 背景と目的

(a) 背景 毎シーズン流行するインフルエンザに代表されるように、人類は常にウイルス感染症の脅威にさらされ続けており、2020–2021年のシーズンでは新型コロナウイルス SARS-CoV-2 による COVID-19 の蔓延を許すこととなった。ワクチンや抗ウイルス薬の開発に加え、PCR 並みに精度の高いウイルス検出法が迅速に準備できない問題点が浮き彫りとなった。申請者はこれまでにインフルエンザウイルスの高感度検出が可能な電極を作製してきた。まずウイルスに結合する（ウイルスを捕捉する）ペプチドを設計し、電極に固定化することでその実装をしてきた (ACS Sens. 2020; PNAS 2016 など)。ここで抗体ではなくペプチドを用いる理由は、抗体はウイルス変異に弱く（検出感度が下がる）、また生物を用いて生産するため高価であり（ワクチン並み）、さらに量産体制を整えるには時間がかかる（半年程度）からである。申請者が設計するペプチドであれば変異に強く、世界中で一斉に化学的に量産が可能である。

(b) 目的 本研究では、これまでの技術を駆使して SARS-CoV-2 ウイルス捕捉ペプチドをまず獲得し、電極やナノ粒子などに化学修飾することで、ウイルスの結合や粒子の凝集によって検出するデバイスを構築することを目指した。ペプチドはアジドとアルケンを用いたクリック化学などを用いて共有結合で固定化するほか、ペプチドの固定化の密度や分岐を検討し、高感度化に適したデバイスを開発することが期待できる。課題期間内ではまず、外殻タンパク質 (S1 タンパク質) 発現と、ウイルスを捕捉するペプチド (SARS-CoV-2 結合性ペプチド) の設計を行なった。SARS-CoV-2 結合性ペプチドは、S1 タンパク質に対してファージ提示法を用い、ランダムなペプチドライブラリーから親和性選択によって獲得した。さらに SARS-CoV-2 の偽ウイルスを作製し、ウイルスとの相互作用を阻害することで、ウイルスの S1 タンパク質の受容体を機能的に模倣しているペプチドが得られたことを示す。このウイルス捕捉ペプチドを電極や粒子などに化学修飾すれば、ウイルス検出が可能なデバイスを開発することが期待できる。

[2] 結果および考察

(a) ウイルス外殻タンパク質 S1 の発現

外殻タンパク質 S1 (図 1A) を発現させるベクターとして、精製用 His-tag を含んだ CMV プロモーターを持つベクター (pCMV3-C-His) に、S1 タンパク質の全長を発現する配列を挿入した pCMV3-2019-nCov-S1-His (code VG40591-CH, Sino Biological) を用いた。E. coli DH5α のコンピテントセルに S1 発現ベクターを加え、形質転換した大腸菌を大量培養した後、ペレットからプラスミドを精製することで調製した。

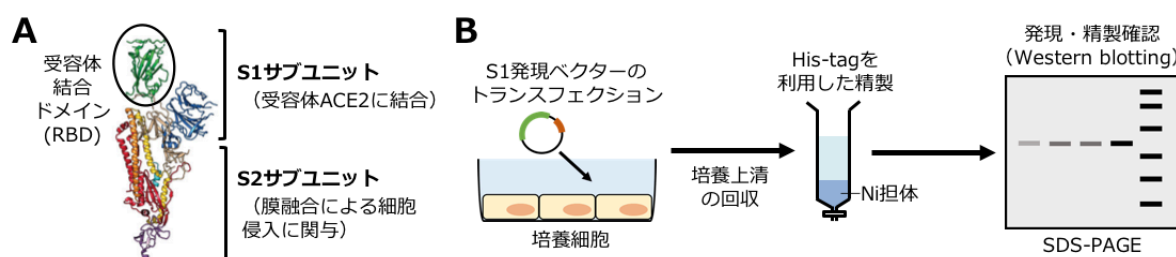


図 1 (a) SARS-CoV-2 の外殻タンパク質の構造と役割。(b) S1 タンパク質の発現、カラム精製およびウェスタンブロットングによる発現確認。

トランスフェクションは、S1 発現ベクターとのトランスフェクション試薬である Lipofectamine 2000 (Invitrogen) もしくはポリエチレンイミン (PEI) を Opti-MEM 培地でそれぞれ希釈した。希釈した S1 発現ベクター溶液とトランスフェクション試薬を穏やかに混合し、室温で 20 分静置することでプラスミド DNA (pDNA) 複合体を作製した。24 時間前に播種した HEK293 もしくは Freestyle 293-F 細胞に pDNA 複合体溶液を添加した。

37°C、5% CO₂ 下の無菌恒温槽内で 48 時間 (必要に応じてバルブプロ酸を添加、さらに 96 時間) インキュベートすることで S1 タンパク質を発現させた。回収した細胞および培養液を Ni-NTA agarose カラムで精製し、ウエスタンブロッティングを行った (図 1B)。抗体染色の結果、目的の分子量の S1 タンパク質を得ることができ、トランスフェクション試薬および細胞の最適の組み合わせは、PEI と Freestyle 293-F 細胞であることが示された。

(b) ファージ提示法による SARS-CoV-2 結合性ペプチドの獲得

SARS-CoV-2 結合性ペプチドは、S1 タンパク質に対してファージ提示法を用い、7 および 15 残基のランダムなペプチドライブラリーから親和性選択によって獲得した。

96 穴イムノプレートに SARS-CoV-2 の S1 タンパク質を固定化し、まず 7 残基のファージライブラリー (X₇, New England Biolabs 社) を加えて親和性選択を行った (バイオパニング、図 2a)。室温で 1 時間インキュベートした後、PBS で洗浄して非特異的に吸着したファージを取り除いた。溶出液には、酸性バッファー (pH2) またはガングリオシド GM3 を用いて溶出ファージを得た。溶出ファージ溶液から回収したファージの総量 (pfu 単位) を求め、残りの溶出ファージ溶液を増幅させて次のパニングに用いた。4 および 5 ラウンドからファージの 48 個のクローニングをし、ファージのゲノム解析により、ペプチド配列を同定した。

得られた配列のうち、出現頻度の高いファージクローンを用いて ELISA (酵素免疫測定法) を行ったところ、S1 タンパク質に結合する可能性のあるペプチド配列を 5 種類、得ることができた (図 2b)。これら 7 残基のペプチドの配列を化学合成し、S1 タンパク質との相互作用を評価した。しかしながら、どの配列も S1 タンパク質に結合しないことが明らかになった。

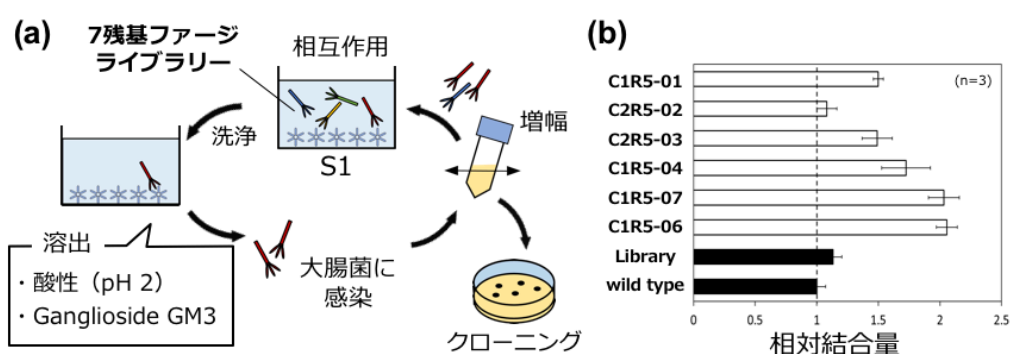


図 2 (a) ファージ提示法による S1 タンパク質に対するバイオパニング。(b) S1 タンパク質に対する 7 残基提示ファージクローンの結合量 (ファージ ELISA)。

そこで、**15残基**のペプチドライブラリーに切り替え、親和性選択を再度行った。**7残基から15残基**に長くすることで、相互作用する場所が増えるため、結合親和性の向上が期待できる。溶出液には、酸性バッファー (pH2)、ガングリオシド **GM1**、へパラン硫酸 (**HS**) を用いて溶出ファージを得た。どの溶出液の場合も、**4** もしくは **5** ラウンド目でファージプールの **S1** タンパク質への結合活性が向上した。また、**4** および **5** ラウンドからファージの **96** 個のクローニングをし、ペプチド配列を同定した。得られた配列のうち、出現頻度の高いファージクローンの **ELISA** を行ったところ、**S1** タンパク質に結合する可能性のあるペプチド配列を **4** 種類、得ることができた。これら **15** 残基のペプチド配列のうち **3** 種類を化学合成し、**S1** タンパク質との相互作用を評価した。その結果、**2** つの配列 (**C1R5-01** および **C1R4-06**) に結合活性があり、**S1** タンパク質結合ペプチドの獲得に成功した。

(c) SARS-CoV-2 偽ウイルスの作製

SARS-CoV-2 は患者検体から得ることができるが、その病原性と取り扱い施設の制限から、研究では偽ウイルスが頻用されている。偽ウイルスはレンチウイルスであり、ウイルス外殻となる **S** タンパク質を有し、細胞に感染する能力はあるが、**SARS-CoV-2** 遺伝子を含んでいないためにウイルス増殖や産生をしない (実験従事者に感染することがない)。

偽ウイルスの作製は、クロンテック社の作製キット (**Lenti-X SARS-CoV-2 Packaging Single Shots, code Z2668N**) および **Lenti-X 293T** 細胞を用いた (実験の詳細は省略する)。偽ウイルスの粒子数は、感染力価と相関する **p24** タンパク質の量を定量することで評価した。偽ウイルスが細胞に感染したかどうかは、レンチウイルスに含めたルシフェラーゼ遺伝子で評価することとした。

(d) 偽ウイルスの受容体認識をペプチドが模倣 (ウイルス捕捉ペプチドの獲得)

S1 タンパク質結合ペプチド (**C1R5-01** および **C1R4-06**) が、偽ウイルスが細胞に感染する過程を阻害できるか評価した。偽ウイルスの感染が阻害されれば、今回獲得したペプチドが「ウイルス捕捉」できる機能を有する、と判断することができる。

まず、**S1** タンパク質結合ペプチドにステアリン酸を化学修飾した (**C18** ペプチド)。この脂質修飾により、ペプチドはミセル形成が可能となり、 μM (10^{-6}M) 付近の低い濃度で感染阻害活性を評価することができる (T. Matsubara, *J. Med. Chem.* 2009)。偽ウイルスと **C18** ペプチドを混合し、**ACE2** を高発現させた **ACE2 293T** 細胞に投与した (図 3)。細胞を回収し、ルシフェラーゼ遺伝子 (偽ウイルスが感染すると細胞内に含まれる) をリアルタイム RT-PCR で検出した。その結果、**C1R4-06** 配列が感染阻害能力があることが明らかになった。つまり **C1R4-06** 配列はウイルス上の **S1** タンパク質に結合することで感染阻害したことが示唆され、ウイルス捕捉ペプチドとして利用できる可能性がある。

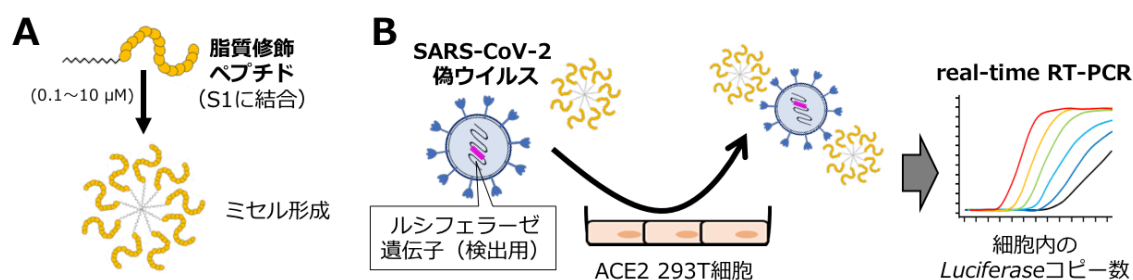


図 3 ステアリン酸を化学修飾した脂質修飾ペプチドによる偽ウイルスの感染阻害。