戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「異分野融合による新型コロナウイルスを
はじめとした感染症との共生に資する技術基盤の
創生」
研究課題「感染症を在宅で簡易診断する技術基盤
の開発」

研究終了報告書

研究期間 2021年02月～2024年03月

研究代表者：永井 健治
(大阪大学 産業科学研究所 教授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究の最終目標とした「新興・再興感染症との共生に必要となる迅速簡便検査法のためのシステムティックな技術基盤の確立」に対して以下の開発を行い、それぞれ成果を得た。

1. **HLH** ペプチドと高輝度化学発光タンパク質 **eNL** を組み合わせた化学発光検査薬の概念実証
 - 既に単離されている **HLH** ペプチドを用いて、化学発光タンパク質と融合する形で化学発光検査薬を開発した。**HLH** ペプチドによるセンサーが予想通り機能することを示した。(藤原・永井グループ)
 - **VEGF** 化学発光検査薬の発光をスマートフォンカメラで検出する際の条件を検討した。発光色変化による検出に成功した。(永井グループ)
2. 極微量対象を高効率に検出するためのシグナル増幅システムの開発
 - 実際のウイルスの濃度が、化学発光検査薬に用いる **HLH** ペプチドの解離定数より低い状況であっても高精度な検出を実現するために、シグナルを指数関数的に増幅するシステムを考案した。必要な要素をそれぞれ開発し組み合わせることで、シグナルを検出感度まで増幅できることを示した。(永井グループ)
3. **SARS-CoV-2** における認識部位の決定、**HLH** ペプチドの作製
 - 1の結果より **HLH** ペプチドを用いた化学発光検査薬が実証されたことから、本研究領域の研究対象である **SARS-CoV-2** を標的として化学発光検査薬の開発を進めた。最初に **SARS-CoV-2** のどの領域を **HLH** ペプチドの認識部位とするか、アミノ酸立体構造情報を元に検討した。結果、**RBD** を標的とした。(西野グループ)
 - **RBD** を標的として、ファージ表層提示 **HLH** ペプチドライブラリあるいは酵母表層提示ペプチド・ライブラリからスクリーニングを行なった。選抜した **HLH** ペプチド候補についてさらに変異を加えて新たなライブラリを構築し、結果、高い結合親和性をもつ **HLH** ペプチドを開発した。(藤原グループ)
4. **SARS-CoV-2** に対する **HLH** ペプチドの結合様式の解析
 - 3により開発した **HLH** ペプチドが **RBD** とどのように結合するか、スパイクタンパク質を用いたクライオ電子顕微鏡構造解析を行った。(西野グループ)
5. **SARS-CoV-2** に対する化学発光検査薬の開発
 - 3.により開発した **HLH** ペプチドを用いて **SARS-CoV-2** を特異的に検出する検査薬の開発を行った。その性能を **RBD** を用いて評価した。(永井グループ)
6. 多剤耐性細菌に対する **HLH** ペプチドの作製
 - **SARS-CoV-2** に対する化学発光検査薬開発プロセスを最終的に他の病原体に対しても適用することを見据えて、多剤耐性大腸菌を標的に挙げタンパク質を調製した。(西野グループ)
 - ファージ表層提示 **HLH** ペプチド・ライブラリあるいは酵母表層提示 **HLH** ペプチド・ライブラリが様々な対象に適用できるよう、スクリーニングの条件を最適化した。(藤原グループ)

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. **HLH** ペプチドのスクリーニングにより、非常に高い結合活性を示す分子の単離に成功した。高感度な結合分子を計画的に獲得する方法を確立した。
2. **HLH** ペプチドを利用した検査薬の開発に初めて成功した。本研究では検査薬の認識部位として **HLH** ペプチドの新たな利用方法を見出した。**SARS-CoV-2** など感染症源の検出へ広く展開が可能であることを示した。
3. 極微量対象を高効率に検出するためのシグナル増幅システムを開発した。抗体や **HLH** ペプチドの検出限界を下回る濃度の対象を検出するための戦略として、実際に発光シグナルと

して検出できることを示した。新規感染症に対する検査薬開発以外にも広く応用できる検出技術として期待できる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 検出標的に対する高感度 HLH ペプチドのスクリーニングプロセスを確立した。検出対象・部位の選定、HLH ペプチドスクリーニング、高感度化、結合様式解析、といった一連の流れをシステム化し実行できることを示した。
2. 化学発光検査薬を実際に感染症の確定前検査に使用することを想定し、スマートフォンカメラなど汎用カメラによる検出の手順を最適化した。

< 代表的な論文 >

1. Sugiura, K., and Nagai, T. Extension of the short wavelength side of fluorescent proteins using hydrated chromophores, and its application. *Commun. Biol.*, 5, 1172, 2022.

概要:これまで発表された中で最も短い波長の蛍光を発するβバレル型蛍光タンパク質「Sumire」の開発に成功した。この開発により、化学発光タンパク質と組み合わせる蛍光タンパク質の種類が増え、波長の区別により複数の検査薬を同時に使用することが可能になる。

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

①「永井」グループ

研究代表者：永井 健治 (大阪大学 産業科学研究所 教授)

研究項目

- ・化学発光検出原理の構築、HLH ペプチドによる検査薬の機能確認
- ・SARS-CoV-2 に対する化学発光検査薬の開発
- ・化学発光検査薬撮影の条件検討
- ・実用化に向けた検査薬材料の準備
- ・病原体変異に対応するための再スクリーニングプロセスの構築

②「藤原」グループ

研究代表者：藤原 大佑 (大阪公立大学 大学院理学研究科 講師)

研究項目

- ・HLH ペプチドのスクリーニング
- ・HLH ペプチドの改良、最適化
- ・病原体変異に対応するための再スクリーニングプロセスの構築

③「西野」グループ

研究代表者：西野 邦彦 (大阪大学 産業科学研究所 教授)

研究項目

- ・SARS-CoV-2 の特徴構造、HLH ペプチドとの複合体構造解析
- ・病原体変異に対応するための再スクリーニングプロセスの構築
- ・各種病原体に対する特徴構造のスクリーニング

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

同領域内において精製タンパク質の提供を受けて、HLH ペプチドとの複合体の構造解析を進めている。