

標的場所に噴霧してウイルスが 存在すると光る試薬の開発

東京農工大学 大学院工学研究院
生命機能科学部門

教授 池袋 一典

2022年5月20日

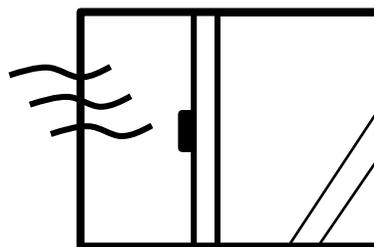
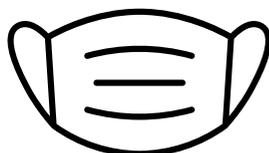
SARS-CoV-2等のウイルスの存在が疑われる場所に添加すると、ウイルスが存在する場合のみ化学発光し、ウイルスの有無が検出できる試薬をアプタマーと抗体を用いて開発した。

現在SARS-CoV-2の検出は、定量PCRか、ELISA(Enzyme Linked Immuno - Sorbent Assay)が主に用いられ、それぞれ、複数の精製や洗浄工程を含んでおり、これらの工程なしに、添加しただけで検出できる方法は、本発明だけである。

SARS-CoV-2の大流行において

感染経路： 飛沫感染、接触感染が主経路であるが、大気感染の可能性もある

感染対策： ワクチン以外は、消毒、マスク、換気、感染者の隔離、感染場所の隔離と回避



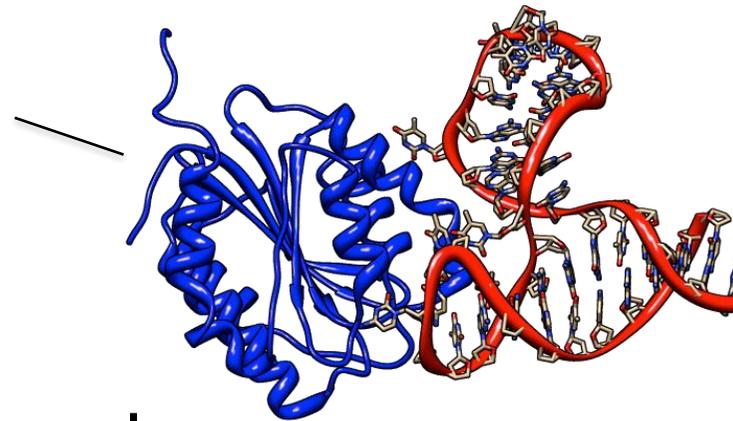
STAY HOME



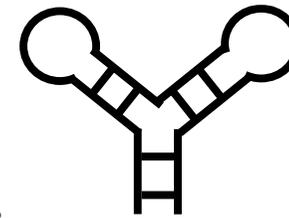
切実な要望： 身の回りの環境に存在するウイルスをその場で検出できれば、感染を防げる

DNAアプタマーは抗体と同じように ウイルスを検出できる

von Willebrand
factor domain
A1

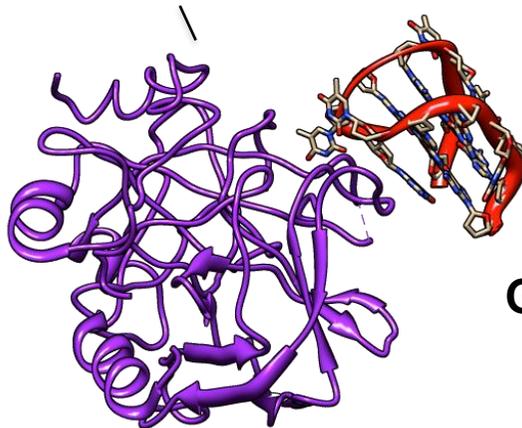


(PDB ID 3HXO)

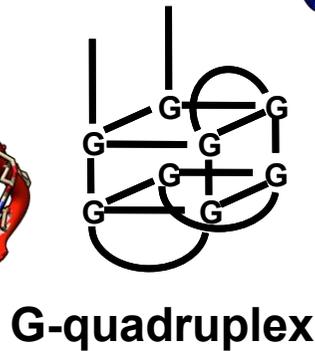


Three-way
junction

Thrombin

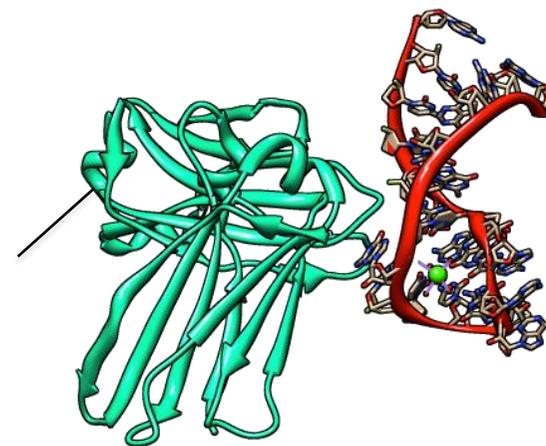


(PDB ID 1HUT)

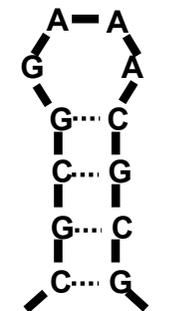


G-quadruplex

Human
IgG Fc
region



(PDB ID 3AGV)



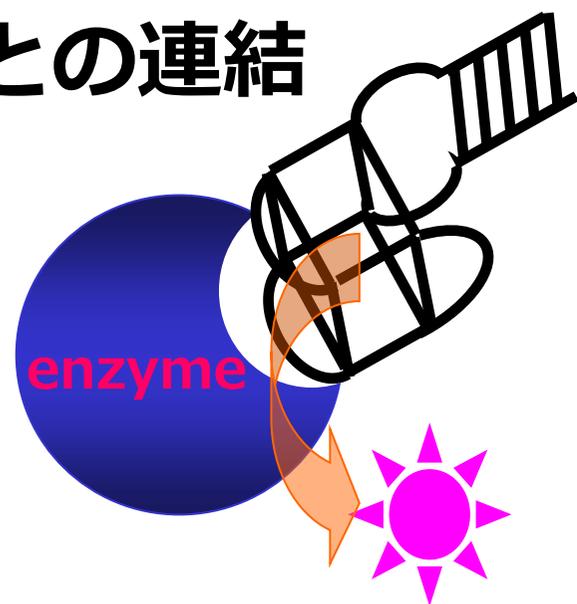
Hairpin

アプタマー：特定の分子を特異的に認識できる核酸

(Tuerk and Gold, *Science* 1990; Ellington and Szostak, *Nature* 1990).

発明者の独自技術： アプタマー酵素サブユニット (Aptameric Enzyme Subunit: AES)

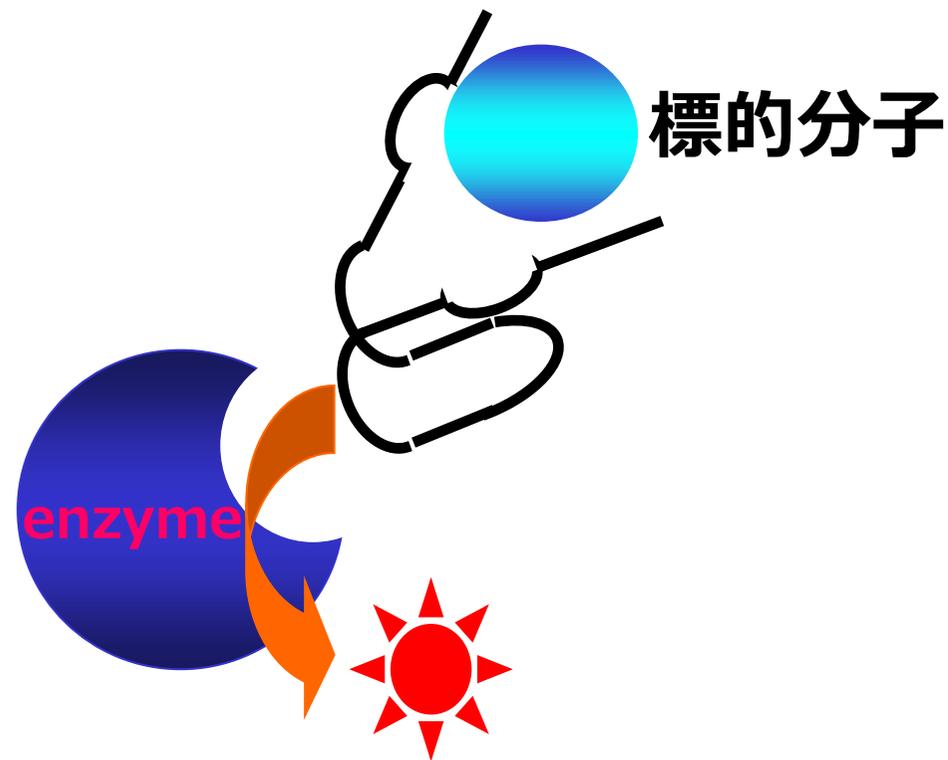
酵素阻害アプタマーと
標的分子結合アプタマー
との連結



AES

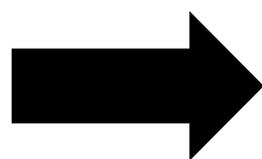


標的分子
の結合



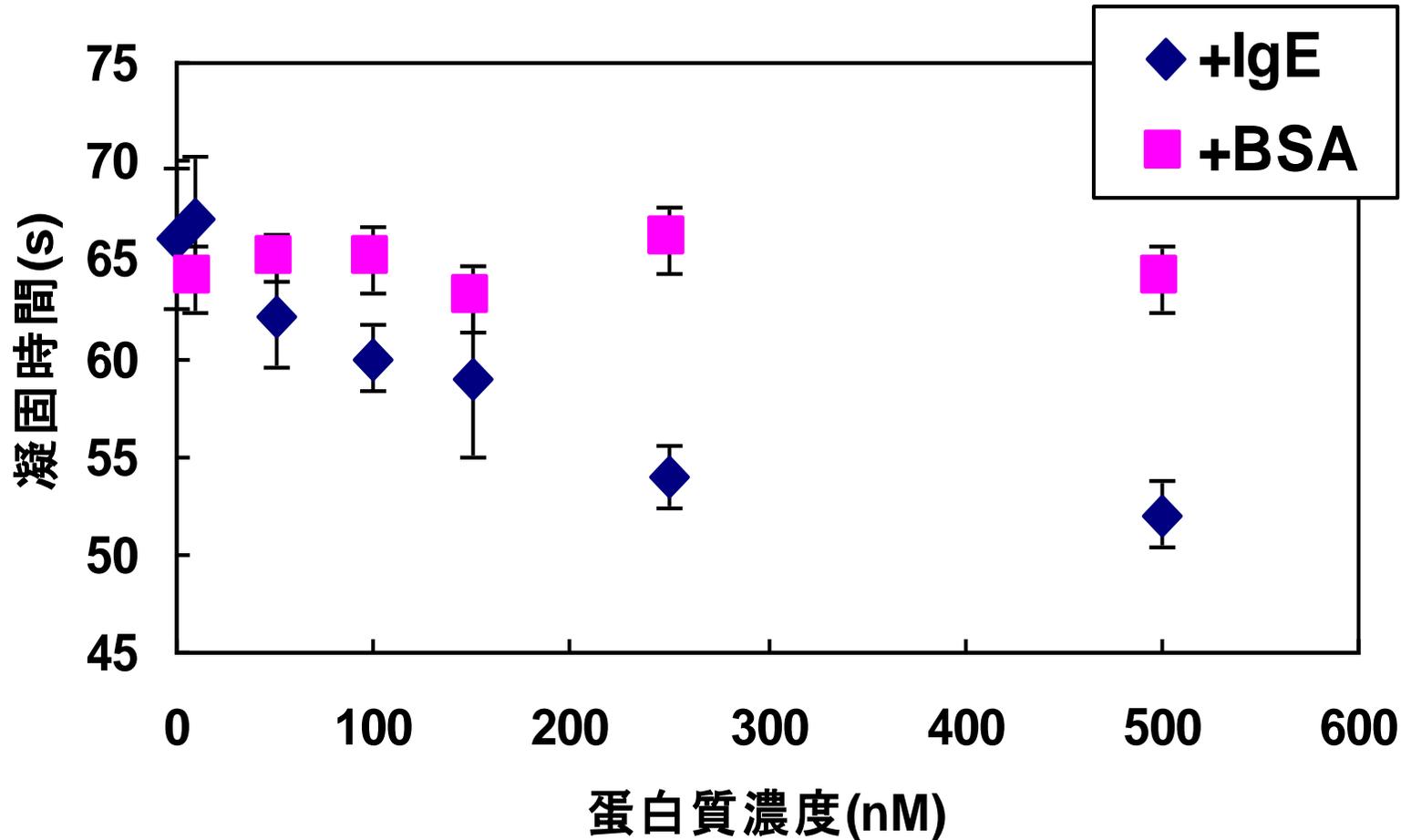
酵素阻害の変化

分離・洗浄
操作が不要



混ぜるだけで測れるから
その場検出できる

分割AESによるIgEの検量線



250 nM AES, 54 nM Thrombin, 0.34 mg / ml fibrinogen
In the presence of thrombin only, the clotting time is 26 s.

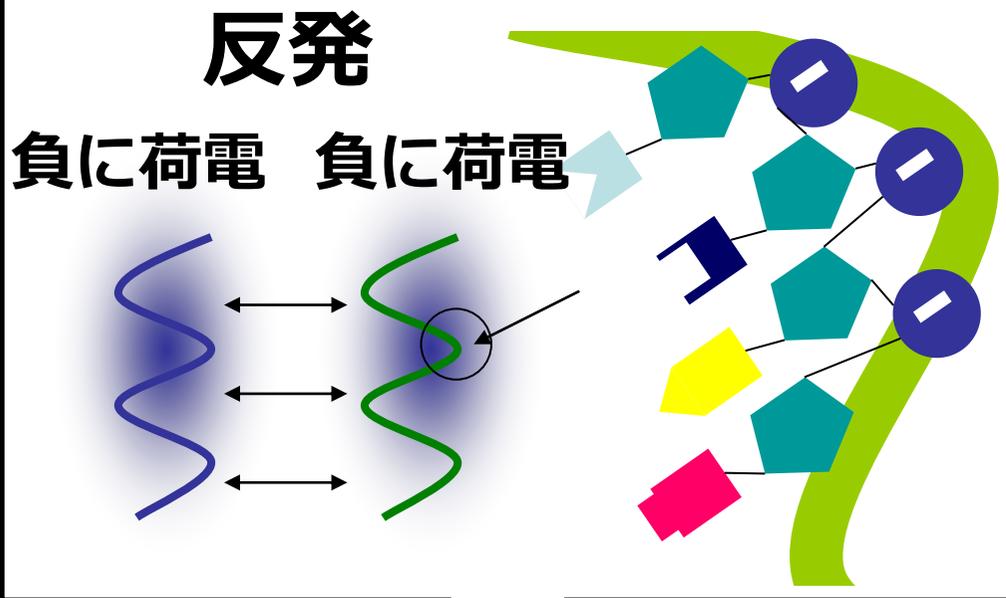
**分離・洗淨操作なしで標的分子を
濃度依存的に検出できる**

標的分子結合アプタマーを取り換えて
様々な分子を分離・洗浄操作なしで検出できる

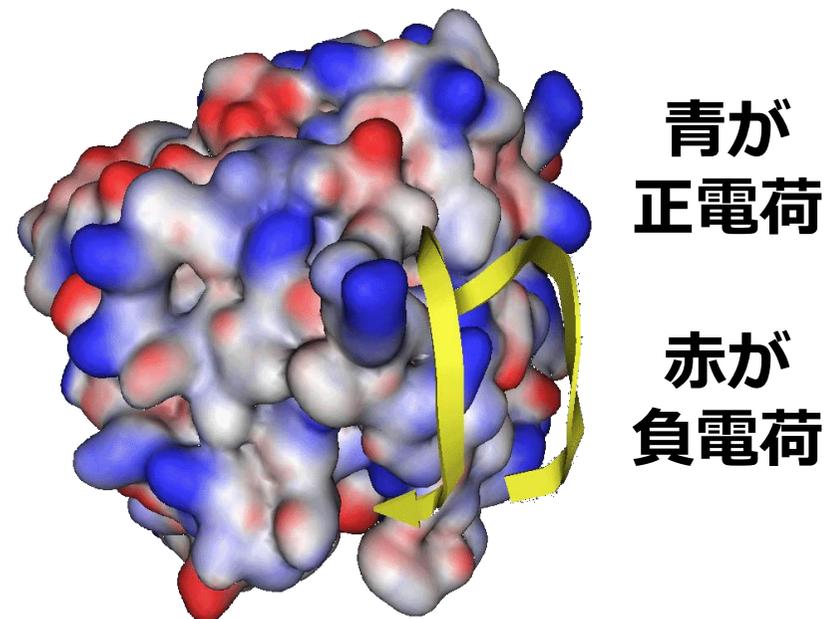
標的分子	検出下限
アデノシン	20 mM
IgE	250 nM
インシュリン	10 mM
C-reactive protein	1 mM

Anal. Chem, 2006, *BBRC*, 2006, *Biotechnol. Lett.*,
2008, *Biotechnol. Lett.*, 2008, *Biosens.*
Bioelectronics, 2008, *Nucleic Acids Res.*, 2021

リン酸骨格の負電荷



標的分子とアプタマーの結合



二次構造は
形成されにくい

標的分子との結合で
電荷が相殺される

標的分子との結合により
アプタマーの構造が変化する

AESはアプタマー
だから構築できる

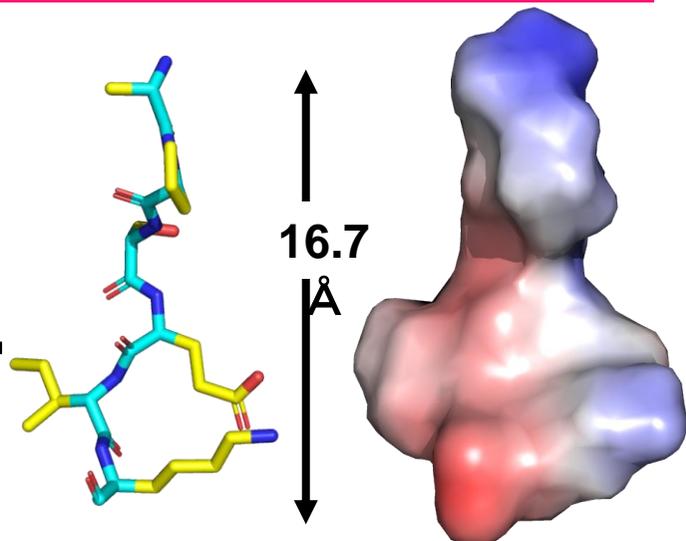
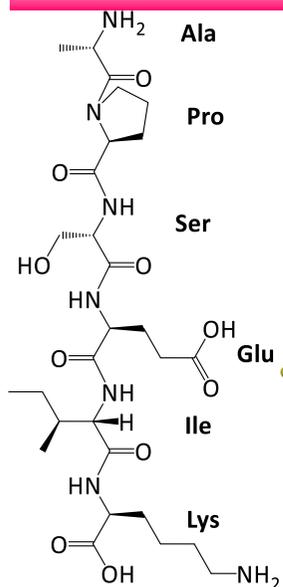
従来技術とその問題点

SARS-CoV-2の検出は、定量PCRか、ELISA (Enzyme Linked Immuno- Sorbent Assay)が主に用いられるが、両方とも複数の精製・洗浄操作を必要とし、ウイルスの存在が疑われる場所のその場での検出は不可能である。

ウイルスの感染予防において、その場所にいるウイルスを可視化することが必須なのは、誰もが**実感**している。

しかしアプタマー だけで検出すると特異性
が保証できないことがある。

Peptide

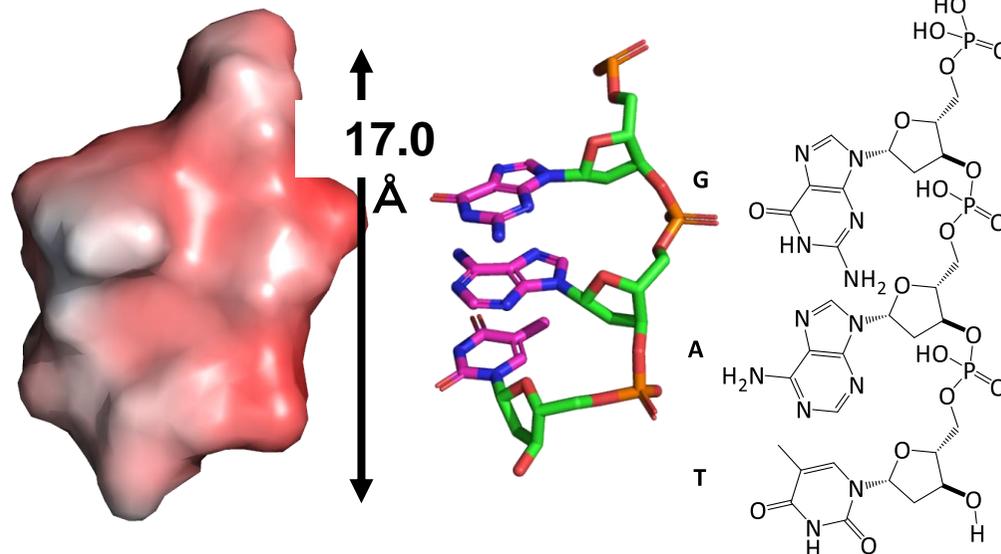


acidic



Electrostatic potential
($k_B T/e_c$)

DNA



basic

Amino acid sequence:

APSEIK

A part of Lactate oxidase from
Aerococcus viridans PDB ID:2E77

Nucleic acid sequence:

GAT

A part of Mucin 1 DNA aptamer
PDB ID:2L5K

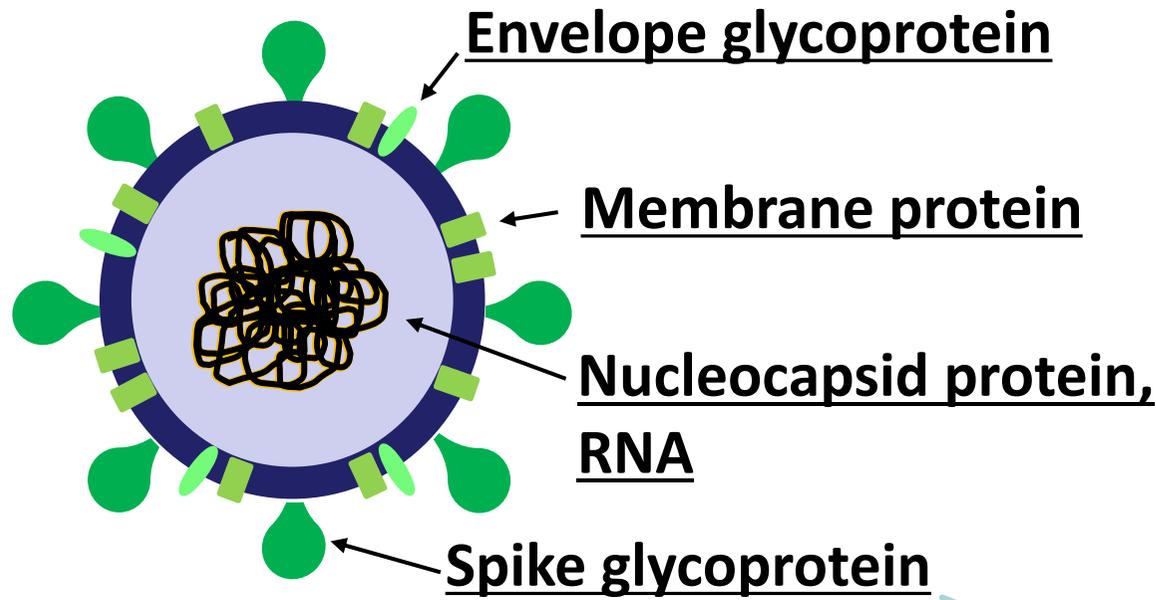
**DNAは大きな
負電荷を持つ**



**正電荷が集中している部位には
非特異的に結合する**

SARS-CoV-2のS1蛋白質の Receptor binding domain(RBD)

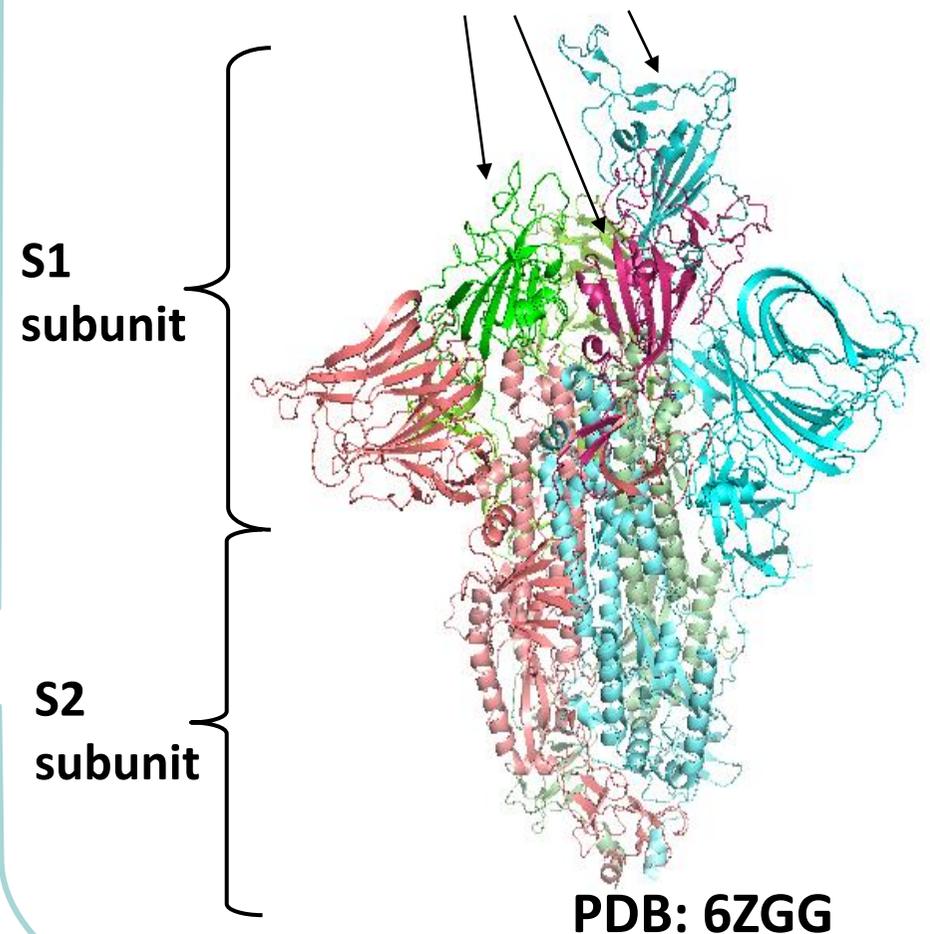
SARS-CoV-2の模式図



↑
主要な抗原

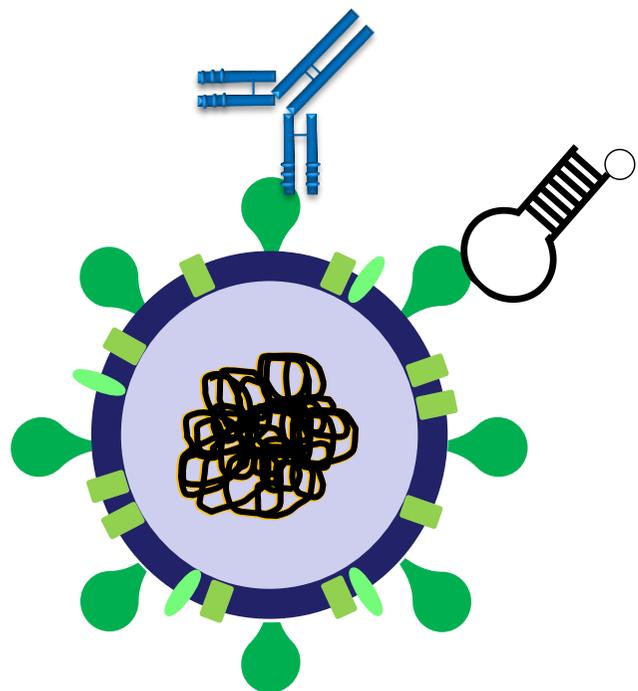
直径100 nm程度のウイルス
表面に20~30個のS1蛋白質
が存在する

S1蛋白質 Receptor binding domain(RBD)



抗体とアプタマーを併用する ことによる特異的検出

ウイルスの表面には多数のS1蛋白質が存在するので、アプタマーと抗体が同じウイルスの表面に同時に結合できる。



アプタマーと抗体の同一ウイルスへの同時結合を検出できれば、特異的に検出できる。

+

AESを利用して、分離・洗浄操作不要のその場検出が可能になる。

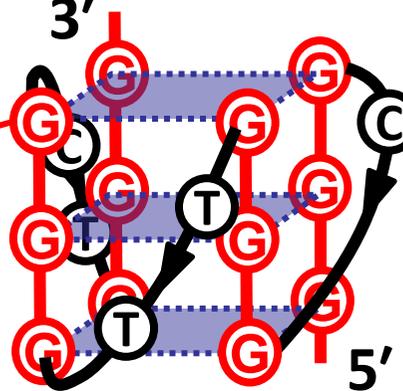
新技術の特徴・従来技術との比較

- これまで不可能だった、ウイルスのその場検出を可能にする試薬の開発に成功した。
- 従来はウイルスの可視化が不可能だったので、身の回りのどこにウイルスが付着しているかが不明だったが、見つけられるようになった。
- 本技術の適用により、身の回りのどこにウイルスが存在するのかが確認でき、ウイルスの感染対策が飛躍的に容易かつ効率的になることが期待される。

ミオグロビンに結合するとルミノール発光 反応を300倍以上増大させるアプタマー

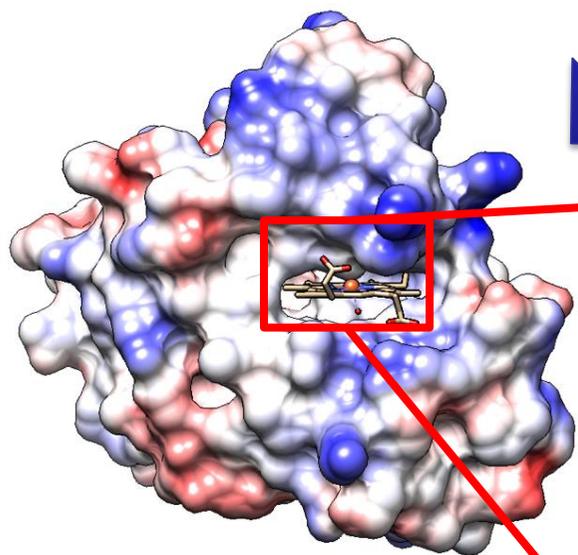
PEA3-01 5'- **GGGC**GGGGTTGGGCT**GGG** -3'

3つのG4平面が
重なっている



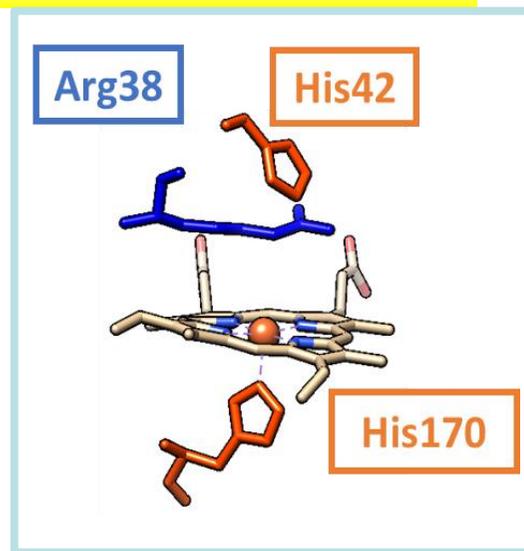
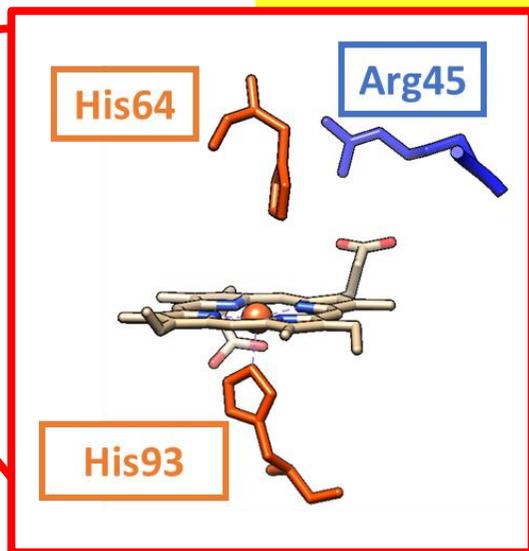
3つのG4平面が3
つのループで繋が
っている

ミオグロビン (PDB: 1MBN)

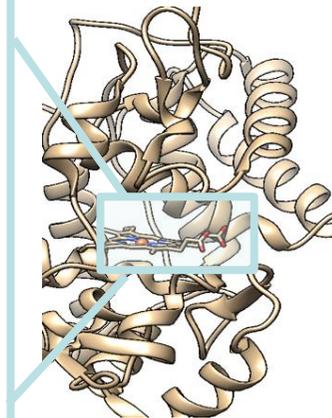


青: 正電荷
赤: 負電荷

ミオグロビンの構造
変化が起こっている



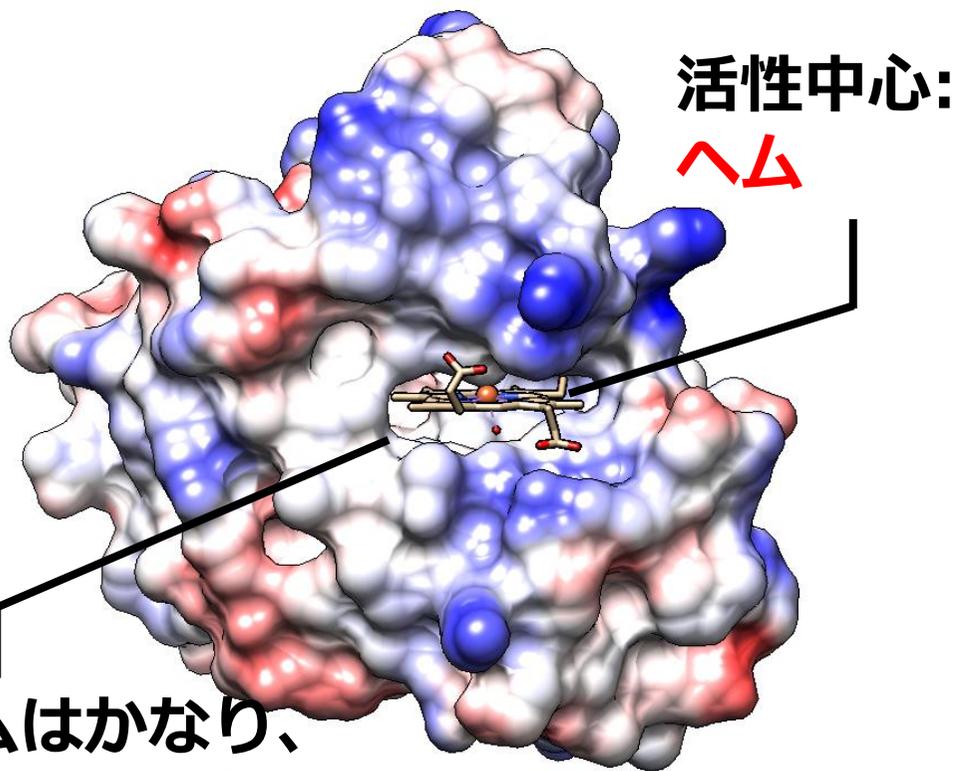
ペルオキシ
ダーゼ



(PDB: 1H5M)

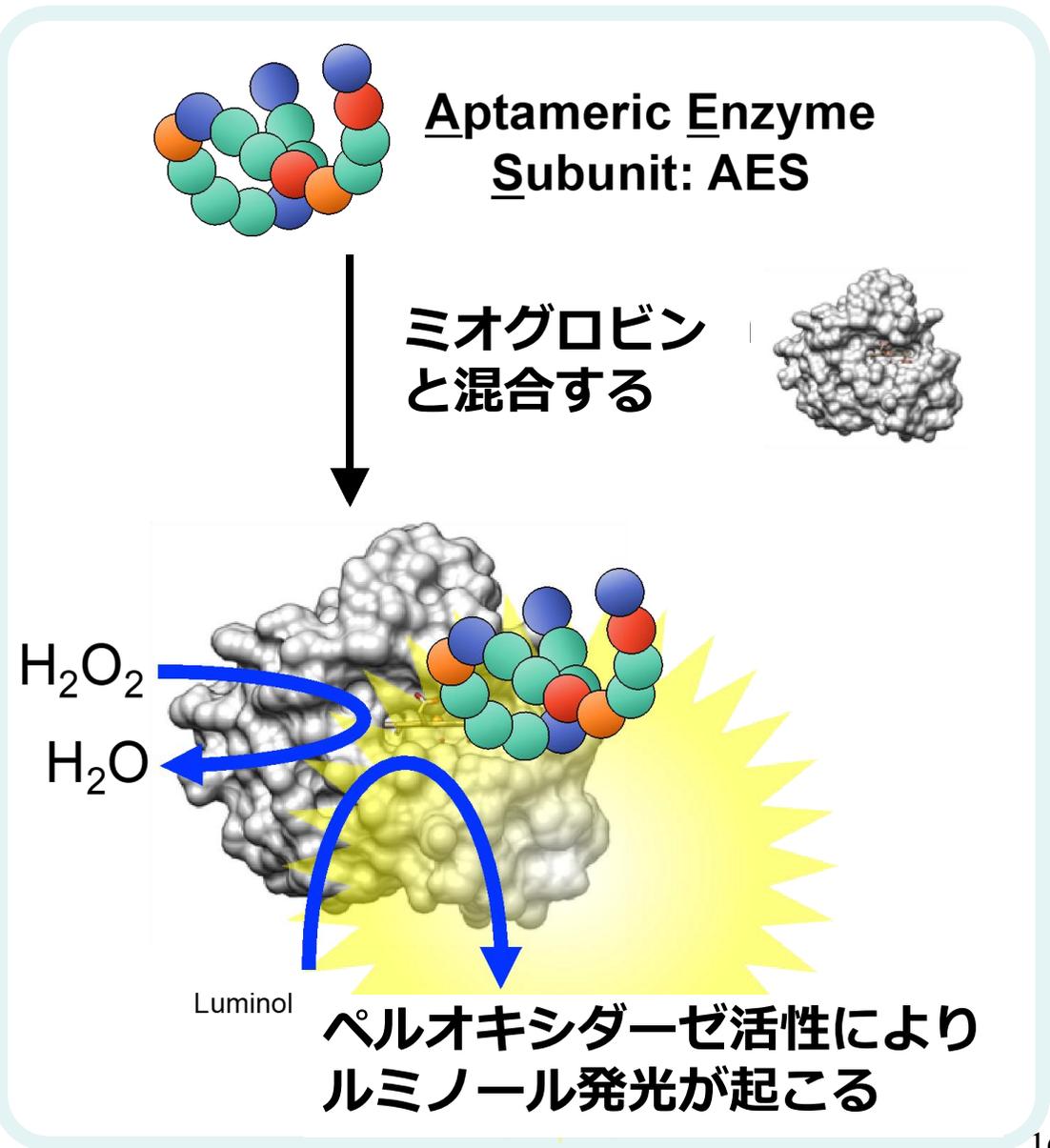
ミオグロビンのヘムの近くにアプタマーが結合すると、ルミノール発光が飛躍的に増強される

ミオグロビンは極めて弱い
ペルオキシダーゼ 活性をもつ



ヘムはかなり、
溶媒に曝され
ている。

青: 正電荷
赤: 負電荷 (PDB: 1MBN)

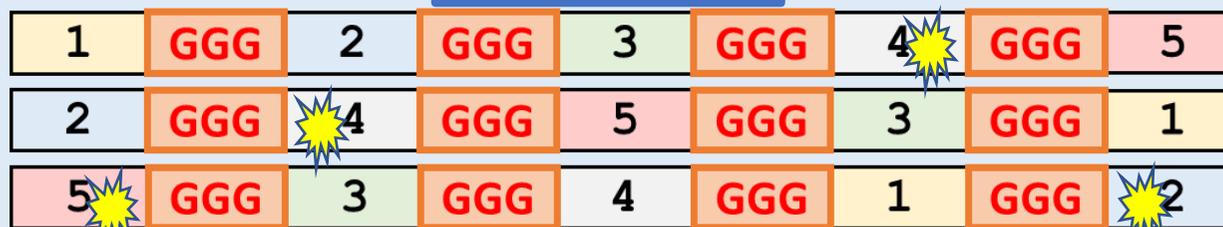


Name	Sequence (5' to 3')	Enhancement
Myo7N24#07	GGG T GGGTTTTCTTTGGG TT GGG C	13
Parent #1	GGGAAGGAGGG AGGAA GGG A GGG A GGG	8.4
Parent #2	GGG ATA GGG TT GGGCACTCACAGCTGAATGGG	6.2
Parent #3	GGG CC GGG A GGG TGCA GGG	2.4
Parent #4	GGG TGG GGG T GGG TTTCTT GGGGTAAAGTGGG	1.6

配列操作

In silico

シャッフル
&突然変異
(1~2塩基/
配列)



20配列を発生させる

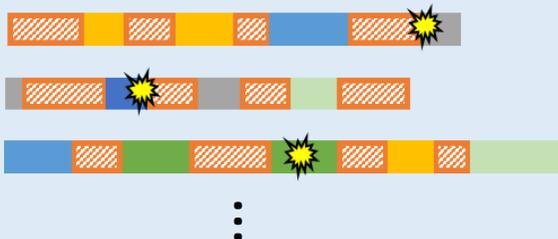
In vitro

順位づけ

機能評価

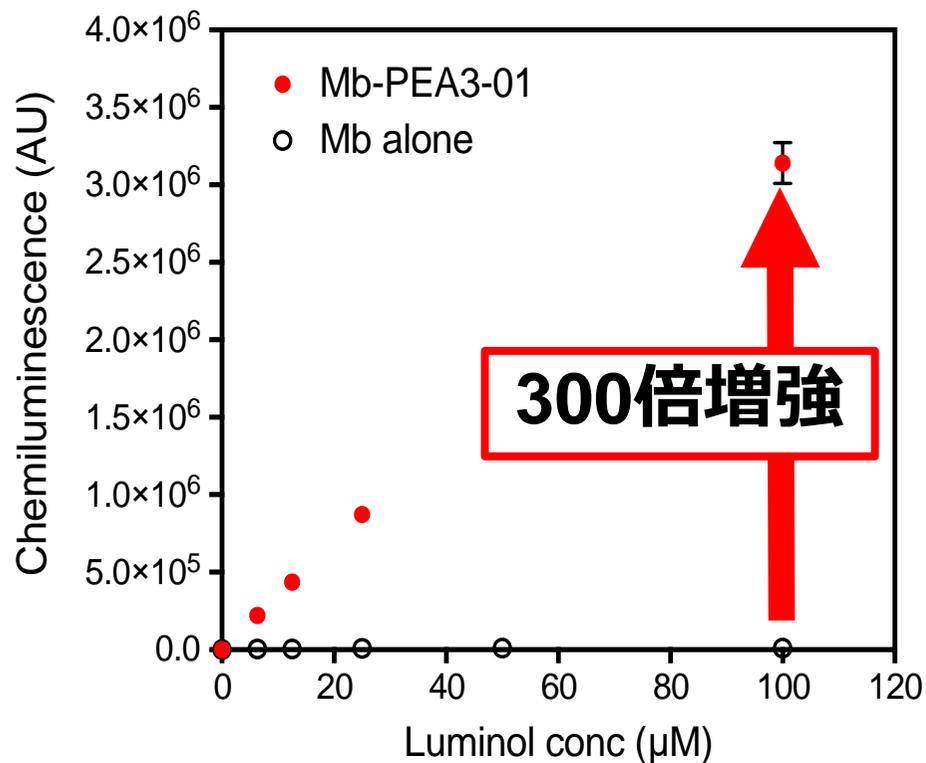
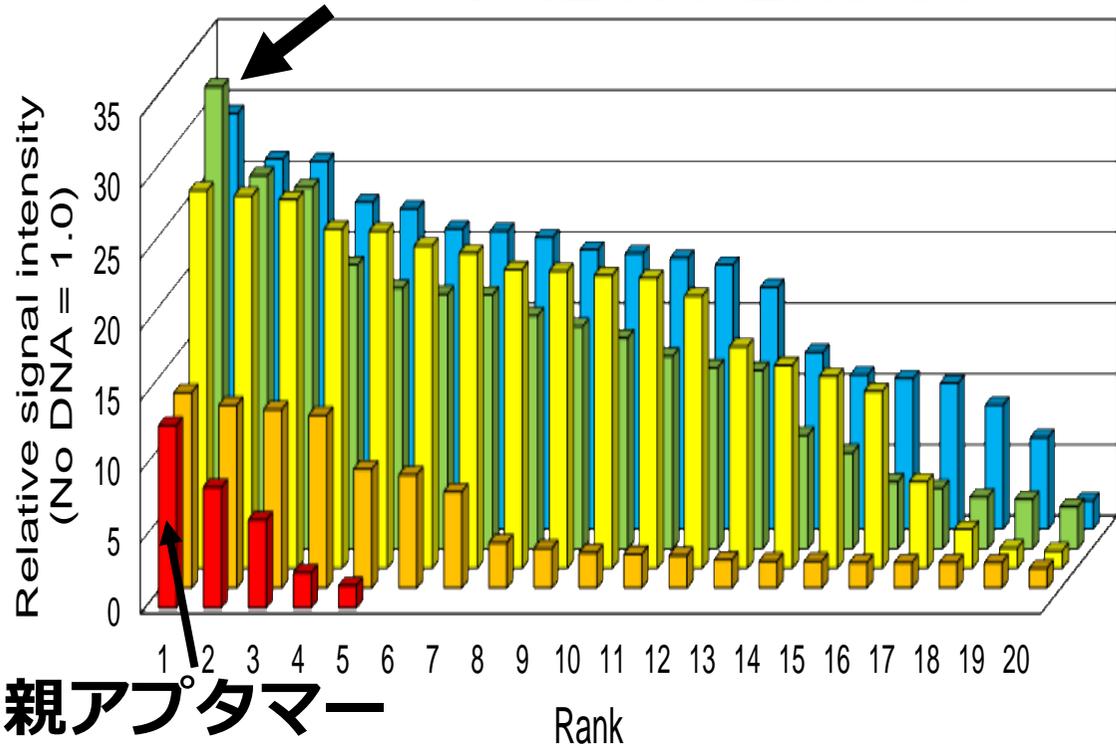
ルミノール発光測定

機能
高い
低い



in silico maturationによるアプタマーの進化

Best AES: PEA3-01



PEA3-01: GGGCGGGTTGGGCTGGG

PEA1-20: GGGTGGGTTGGGAGGG

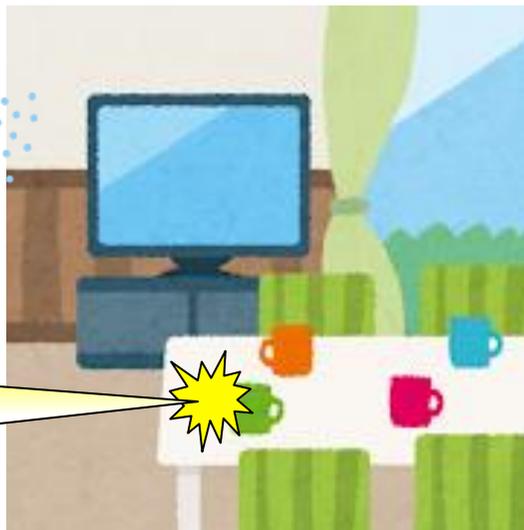
N24-07: GGGTGGGTTTTCTTTGGGTTGGGC

アプタマーがミオグロビンに結合するとルミノール発光強度が300倍以上になる。

想定される用途

- 周囲の、標的ウイルスの有無が気になるものや場所に噴霧すれば、標的ウイルスを発光により検出できる。
- MEMS/NEMSと組み合わせた、微小検出機器の検出試薬として利用できる。分離・洗浄が必要なく混ぜるだけで検出できるのが大きな利点である。
- 感染経路の同定や感染源の特定に利用できる。

1. 身の回りに噴霧してウイルスの有無を検知



ウイルスが付着
していると光る

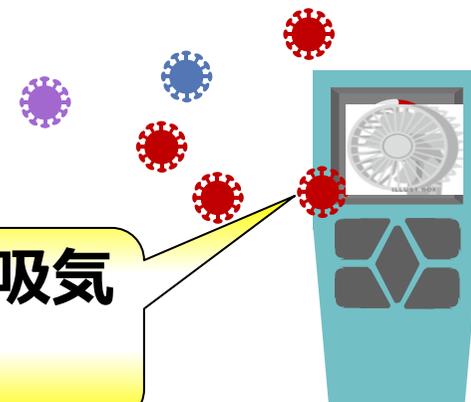
3. 空気清浄機への取り付け



SARS-CoV-2
detected!!!

2. ハンディタイプのウイルス検出器

しばらく吸気
して検知



4. 咳でウイルス感染を診断する装置

No
viruses



極めて多様な応用が可能であり、多様なビジネスが展開できる

実用化に向けた課題

- 現在、化学発光検出について通常のプレートリーダーで10デジタルコピー以下の検出が可能なことを確認済み。しかし、通常のデジタルカメラで検出するには感度が足りない。
- 今後、化学発光強度を上げる条件について検討し、デジタルカメラで検出できるようにしたい。
- 実用化に向けて、複数の標的ウイルスを特異的に検出できるよう試薬を開発する。

企業への期待

- **未解決の検出感度の向上については、微弱な化学発光を検出できるカメラ技術により克服できると考えている。**
- **高感度化学発光検出の技術を持つ、企業との共同研究を希望。**
- **また、ウイルス診断薬を開発中の企業、健康・衛生分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。**

本技術に関する知的財産権

- **発明の名称** : 標的物質の検出試薬及び
検出方法
- **出願番号** : 特願2022-061764
- **出願人** : 東京農工大学
- **発明者** : 池袋一典、浅野竜太郎、
三浦大明

産学連携の経歴

- **2018年-2020年** 複数の企業と共同研究実施
- **2019年-2022年** JST未来社会創造事業で研究開発を実施

お問い合わせ先

東京農工大学

先端産学連携研究推進センター

三浦 英靖

T E L 042-388-7550

F A X 042-388-7553

e-mail hmiura@cc.tuat.ac.jp