

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 官民による若手研究者発掘支援事業
(プログラム名) (英語) Intensive Support for Young Promising Researchers

実施期間: 令和 3 年 5 月 31 日 ~ 令和 5 年 3 月 31 日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 鶴澤 尊規
(英語) UZAWA Takanori

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員
(英語) RIKEN・Cluster for Pioneering Research・Senior research scientist

II 補助事業の概要

新型コロナウイルス感染症が全世界的に猛威を振るった当時、家庭で頻回（週に数回できれば毎日）新型コロナウイルス検査を行うことにより市中感染を抑制すべきであるという明確な医療ニーズがあった。家庭で毎日のようにウイルス等の検査が可能となれば、有症状・無症状を問わず感染者の早期発見・隔離が可能となり、市中におけるウイルスの伝搬を防ぐことが可能となると考えられている。将来的にも同様の感染症の蔓延が危惧されており、このようなニーズが存続すると考えられる。

新型コロナウイルス感染症に対して PCR 検査が非常に重宝されたが、感度が非常に高いものの数千円以上の費用が掛かるうえに自宅でできることは検体の採取までであり結果が出るまで時間が掛かるため、頻回検査には向いているとは言い難い。また、自宅で検査まで可能なイムノクロマト法においても一般市民が毎日使える価格ではないうえ、その操作性に関しては煩雑さを残している。科学的知識が乏しい方や身体に障害のある方を含む一般の方が、毎日使えるようにするためには、大幅な低価格化および操作の圧倒的な簡便化が求められている。

本補助事業担当者はこれまでに特定ターゲットに結合すると蛍光を発するようになるペプチド（Binding Enhanced Fluorogenic peptide; BEF ペプチド）を開発しており、このシード技術を使うことで安価かつ簡便に使える検査キットが作成できると考えた。具体的には、分子生物学研究で広く使われてきた抗体を用いたドットプロット法におけるメンブレンへのサンプル固定化後の一連の操作（アルコール親水化、バッファー交換、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応、Enhanced Chemi Luminescence 反応もしくは

Peroxidase 反応)を、BEF ペプチドをメンブレンに滴下するだけの操作で置き換えた「簡単ドットプロット法」の実現を目指して、本事業では物理・化学的原理の理解、要素技術開発、市場調査を主に進めた。

物理・化学的原理の理解するために、メンブレンに固定化されたターゲット分子の構造を検証するなどした。具体的には、メンブレン上に固定化されたターゲット分子の立体構造を検証するために、まず緑色蛍光タンパク質(GFP)をメンブレンに滴下し乾燥により固定化し、エタノールによる親水化後に再度水和し、それぞれの過程で蛍光強度を調べた。その結果、乾燥による固定化後は蛍光を発していたものの、エタノールによる親水化後には蛍光を失い、再度水和しても元の蛍光強度に戻ることはなかった。このことは、GFP 内の発色団近傍の構造、さらには GFP 全体のタンパク質構造は乾燥による固定化では大きくは変化していないものの、エタノール処理によって変化したことを示している。一般的なドットプロット法やウエスタンブロットティング法においても、メンブレンに固定化した後にアルコールを使った親水化処理をしたのち抗体反応を行っていることから、おそらくメンブレン上での固定化タンパク質の構造変化は溶液中のアグリゲーションのように複数のタンパク質分子に由来するものではなく、単一タンパク質の一部の構造変化に限定されると考えられた。一方でペプチドは、アルコールによって二次構造形成が促進される場合があり、エントロピー的に結合に有利な条件でターゲットのタンパク質に結合できる可能性が示唆され、この効果は抗体では得られないものであり、本手法において少ないステップ数でもターゲットが検出可能になった主要因であると考えられた。

要素技術開発としては、新型コロナウイルスおよびインフルエンザウイルスそれぞれに対する簡単ドットプロットに適したペプチドの選定を進めた。具体的には、環境応答性の蛍光色素を非天然アミノ酸として組み込んだペプチドライブラリーから、インフルエンザウイルス(H1N1)のNPに結合するペプチドを進化分子工学的に得た。複数の候補ペプチドについて結合特異性をBio-Layer Interferometry(BLI)法により調べた結果、最も良いペプチドの場合、一般的なヒトコロナウイルス(HKU1, 229E, NL63, OC43)の核タンパク質およびMERS、SARS-CoV-1、SARS-CoV-2の核タンパク質にはほぼ結合しないことが明らかとなった。このペプチドを簡単ドットプロット法に適用するために、蛍光色素やメンブレンの前処理などの最適化を行った。その結果、市販のイムノクロマトキットとおよそ同程度の検出限界を有し、一般的なコロナウイルスの核タンパク質にはほぼ反応せず、ターゲットであるインフルエンザNP特異的に検出可能な系の構築に成功した。

新型コロナウイルスの核タンパク質およびスパイクタンパク質を対象とした進化分子工学的ペプチドの選出を行い、スパイクタンパク質に結合するペプチドの候補を得た。BLI法によりペプチドの結合性を評価した結果、1つのペプチドがスパイクタンパク質の三量体に強く結合($K_d = 1\text{nM}$)することが明らかとなった。さらに、一般的なヒトコロナウイルスのスパイクタンパク質のNターミナルドメインよりも新型コロナウイルスのNターミナルドメインに強く結合することも明らかとなった。このペプチドについても簡単ドットプロット法に適用するために、蛍光色素やメンブレンの前処理などの最適化を行った。先のインフルエンザ用簡単ドットプロットで用いていたペプチドよりも、新型コロナ用のペプチドの方がターゲットへの結合力が高いことから、簡単ドットプロットの感度が高いことが期待された。実際、プレリミナリーな結果であるが、簡単ドットプロットでは検出できるサンプル量が市販のイムノクロマトキットでは検出できないことを確認した。以上より、ターゲットである新型コロナウイルス特異的に検出可能な系の構築に成功した。

市場調査としては、まず検査対象のニーズ調査を行った。世界的にみてインフルエンザは2025年において\$1Tの市場に成長することが予想されており、また新型コロナウイルスも同程度の市場規模になると予想されていることから、インフルエンザウイルスと新型コロナウイルスを検査の対象とし、上述の要素技術開発を進めた。また、医療機器として病院での利用を想定した場合と、家庭用での利用を想定した場合の2通りについてコンセプトを決定した。ワークフローについては特に家庭でのサンプル採取が重要となると考え、唾液を直接調べる方法を検討した。さらに、ワークフローで最も重要な検出系についても検討し、家庭用の場合は励起用LEDおよび励起光用のバンドパスフィルターを選定し、LEDライトへの実装を行った。また、

クリニックや病院での利用を目指したリーダー装置については、メンブレンの蛍光画像をカメラで撮影するリーダー本体および操作用アプリの開発を行った。最終的に、家庭用と病院・クリニック用それぞれのプロトタイプを作成した。

上述の原理の理解、要素技術開発、市場調査以外に、PMDA 相談、特許出願、開発サポートとのミーティングなどを行った。理化学研究所の知財部と連携し、「ペプチドアダプターを用いた標的分子の検出方法」として特許を出願した（特願 2023-058364）。PMDA の「医療機器・体外診断用医薬品全般相談」を通して、診断キットは体外診断薬試薬クラス III になり、診断用機器は機器クラス I となることが分かった。開発サポート主催のピッチ、ブートキャンプ、各月のメドテックサロン、1on1 ミーティング等を通して、多数の企業との面談やニーズおよびマーケットに対する新しい考え方に触れる機会を得られ、自身のビジネス人材としてのスキル向上に役立ったと考える。例えば、ブートキャンプで重要性を説かれたプロトタイプを蛍光リーダー開発で実践し、本補助事業担当者自身で蛍光リーダーを実装し企業の方にリーダーのプロトタイプを見せたことで、こちらの社会実装に向けた気概を示せた結果、補助事業終了後の共同研究に繋がったのではないかと考えている。

以上のように、本補助事業担当者が発想した「簡単ドットプロット法」が当初想定していた医療ニーズを解決できる手法として実現可能であることを、本補助事業を通して明確なものとしたと考える。今後は、引き続き本技術の社会実装を目指したいと考える。

The COVID-19 pandemic was the biggest threat for human being in the recent decade. To suppress COVID-19 transmission, at the early stage of the pandemic Mina and others pointed out that frequent and serial testing of large fractions of the population using at-home screening kits is potentially the most powerful strategy (*Science* (2021) 371, 126-127 & *the New England Journal of Medicine* (2020) 383;22, e120). Although PCR assays are highly sensitive and specific, these assays are not the best strategy for the screening of public health due to its high cost and time-consuming analysis. Even with the immunochromatography-based kits, which are the best home-use method so far, the price is not affordable for ordinary people including those with little scientific knowledge and those with physical disabilities to use ones every day, and the operability remains complicated.

Thus motivated, I proposed to use my seed technology “binding enhanced fluorogenic peptide (BEF peptide)”; BEF peptides emit fluorescence when it binds to a specific target. Specifically, by replacing antibodies in the dot blot method, which has been widely used in molecular biology research, I proposed “ultimately simplified dot blot assay” which required just three easy steps (spotting sample on a pre-hydrated membrane, immerse the membrane in a solution containing target-specific fluorogenic peptide and then observe the membrane under blue light irradiation).

In this project, we tackled to understand the physical and chemical principles and develop elemental technologies and conduct market research. In order to understand the physical and chemical principles, we verified the structure of the target molecule immobilized on the membrane. Specifically, green fluorescent protein (GFP) was first dropped onto the membrane, dried to immobilize it, hydrophilized with ethanol, and then hydrated again. Although fluorescence was emitted after immobilization by drying, fluorescence was lost after hydrophilization with ethanol, and the original fluorescence intensity was not restored even after rehydration. This indicates that the structure near the chromophore in GFP and/or the whole protein structure of GFP were not significantly changed by the immobilization by drying, but changed by the ethanol treatment. On the other hand, we found that alcohol promotes the formation of secondary structures in some BEF peptides, suggesting that binding to target proteins under such conditions is entropically favorable. This is considered to be the main reason why the target can be detected even with a small number of steps in this method.

As elemental technology development, we proceeded with the selection of peptides suitable for ultimately simplified dot blot assay against influenza virus and SARS-CoV-2. Specifically, we obtained peptides that bind to NP of influenza

virus (H1N1) by evolutionary molecular engineering from a peptide library that incorporated environment-responsive fluorescent dyes as an unnatural amino acid. The binding specificities of multiple candidate peptides were investigated using the Bio-Layer Interferometry (BLI) method. We found that it hardly binds to nuclear proteins of human corona viruses (HKU1, 229E, NL63, OC43), MERS, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. In order to apply this peptide to the ultimately simplified dot blot assay, we optimized the fluorescent dye and pre-modification conditions of the membrane. As a result, we demonstrated the ultimately simplified dot blot assay can detect the target influenza NP specifically with the detection limit effectively same as a commercially available immunochromatographic kit.

We also selected peptides for SARS-CoV-2, and obtained candidate peptides that bind to the spike protein. As a result of BLI assay, we found that one peptide strongly bound to the spike protein trimer ($K_d = 1$ nM). Furthermore, it binds more strongly to the N-terminal domain of SARS-CoV-2 spike protein than to the N-terminal domains of common human coronavirus. In order to apply this peptide to the ultimately simplified dot blot assay, we optimized fluorescent dye and pre-modification conditions of the membrane. Compared to the peptide used in influenza, the peptide for SARS-CoV-2 exhibits a higher binding capacity to the target, so it was expected that the sensitivity of the ultimately simplified dot blot assay would be higher. In fact, although it is a preliminary result, we found that the ultimately simplified dot blot assay required much less amount of target sample than a commercially available immunochromatographic kit. From the above, we demonstrated ultimately simplified dot blot assay can detect influenza virus and SARS-CoV-2.

Through a market survey, we determined two concepts (one for home use as we initially planned and the other for hospital use as a medical device) and fabricated prototypes for both. As described above, we believe that the ultimately simplified dot blot assay is a promising method to solve the originally envisioned medical needs. In the future, we would like to aim for social implementation of this technology.