

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)と結合する 人工 DNA アプタマーの開発に成功

～エアロゾルに含まれるウイルス検知を可能にし、空間センシングによる安全・安心な社会の実現への貢献に期待～

ポイント

- ・新型コロナウイルスと結合する人工 DNA アプタマーの開発に成功。
- ・開発したアプタマーは SARS-CoV-2 の RBD 領域に結合することを確認。
- ・空間センシングを行うバイオセンサーとしての利用や感染予防への有効性に期待。

概要

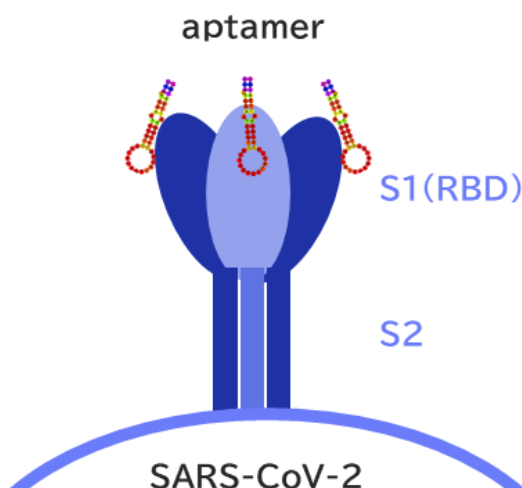
北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所の澤 洋文教授らと、NEC ソリューションイノベータ株式会社（本社：東京都江東区新木場、代表取締役 執行役員社長 石井 力、以下 NEC ソリューションイノベータ）の研究グループは、NEC ソリューションイノベータが保有するアプタマー開発技術を利用して、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に結合する人工 DNA アプタマー*¹（以下 アプタマー）の開発に成功しました。

このアプタマーは、SARS-CoV-2 表面のスパイクタンパク質（S タンパク質）の RBD 領域（受容体結合ドメイン）*² を標的として人工的に合成して作製しました。その結果、結合評価試験では、SARS-CoV-2 オリジナル株（WK521 株）及び、変異株（アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株）の全 5 株の S タンパク質の RBD 領域と結合することを確認しました。

本研究は北海道大学と日本電気株式会社（本社：東京都港区、代表取締役 執行役員社長 兼 CEO：森田 隆之、以下 NEC）が締結している連携協定の成果の一つです。

今後、連携協定の目的である、「空間センシングによる安全・安心な社会」の実現に向け、バイオセンサーとしての利用や、感染予防（感染阻害）への有効性が期待されます。

本研究成果は、2022 年 5 月 2 日（月）公開の、Biochemical and Biophysical Research Communications 誌にオンライン掲載されました。



S タンパク質 RBD 領域に結合するアプタマー概念図

【背景】

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、ウイルス表面にあるスパイクタンパク質の RBD がヒト細胞の表面にある Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2、アンジオテンシン変換酵素 II) 受容体*³ に結合することで、細胞に侵入します。

NEC ソリューションイノベータは、次世代シーケンサーのデータを用いた配列解析 (モチーフ分析) によるアプタマー候補の迅速な絞り込みと、アプタマーの小型化デザイン技術で効率的にアプタマー構造の最適化を行い、SARS-CoV-2 表面にある S タンパク質の RBD を標的としたアプタマーを短時間で開発しました。

【研究手法】

RBD を標的としたアプタマーは、Base appended Base という特徴のある修飾塩基 (特許第 6763551 号*⁴) を用いており、S タンパク質に対して強く結合することを確認しています。(分子間の結合の強さを示す解離定数*⁵ が数 100 pM)。

今回のアプタマー開発では、国立感染症研究所から分与して頂いた SARS-CoV-2 のオリジナル株 (WK521)、変異株 (アルファ株、ベータ株、ガンマ株、デルタ株) の全 5 株のウイルスを用いて、SARS-CoV-2 の取扱いが可能なバイオセーフティーレベル 3 (BSL3)*⁶ の実験室で、アプタマーとの結合評価試験を実施しました。結合評価試験は、SARS-CoV-2 をプレートに吸着させ、酵素標識したアプタマーで検出する Direct ELAA 法*⁷ で行いました。

【研究成果】

結合評価試験の結果、開発したアプタマー (図 1) は SARS-CoV-2 の各株に結合し、検出できることを確認しました (図 2、図 3)。さらに、論文に公開していませんがオミクロン株 BA.1 や BA.2 の RBD にも結合することを確認しています。その一方で、ヒトコロナウイルス (HCoV-OC43) の RBD やインフルエンザウイルスの HA タンパク質には結合が確認されませんでした。本研究より、このアプタマーは RBD を発現する SARS-CoV-2 を特異的に幅広く検出できる可能性があることが示唆されました。現在、感染予防にアプタマーが有効かを確認するための感染阻害実験も計画しています。

【今後への期待】

共同研究を通じ、感染阻害力を持つ SARS-CoV-2 用アプタマーの開発を継続すると同時に、今後パンデミックを引き起こす可能性のあるインフルエンザウイルスへ対応するアプタマーを開発するなど、パンデミックに対して迅速な対応が可能となるアプタマー開発の基盤構築を目指します。

なお、今回の研究成果は、2022 年 5 月 26 日に発表した北海道大学と NEC との連携協定*⁸ の目的である、「空間センシングによる安全・安心な社会」の実現に向けた活動に活用の予定です。

【論文情報】

論文名	A high-affinity aptamer with base-appended base-modified DNA bound to isolated authentic SARS-CoV-2 strains wild-type and B.1.617.2 (delta variant) (SARS-CoV-2 野生型及びデルタ変異体に強く結合する塩基付加型 DNA アプタマー)
著者名	皆川宏貴 ¹ , 澤 洋文 ² , 藤田智子 ¹ , 加藤信太郎 ¹ , 稲熊あすみ ¹ , 広瀬美和子 ¹ , 大場靖子 ² , 佐々木道仁 ² , 田畑耕史郎 ² , 野村直樹 ² , 新開大史 ² , 鈴木定彦 ² , 堀井克紀 ¹ (¹ NEC ソリューションイノベータ (株)、 ² 北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所)
雑誌名	Biochemical and Biophysical Research Communications
DOI	10.1016/j.bbrc.2022.04.071.
公表日	2022 年 5 月 2 日 (月) (オンライン公開)

お問い合わせ先

[研究全般に関すること]

北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 教授 澤 洋文（さわひろふみ）

T E L 011-706-5185 メール h-sawa@czc.hokudai.ac.jp

U R L <https://www.czc.hokudai.ac.jp/pathobiol/>

[アプタマー開発技術に関すること]

NEC ソリューションイノベータ株式会社 シニアプロフェッショナル 堀井克紀（ほりいかつのり）

T E L 03-5534-2746 メール bio-contact@nes.jp.nec.com

U R L <https://www.nec-solutioninnovators.co.jp/rd/thema/aptamer/index.html>

配信元

北海道大学社会共創部広報課（〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

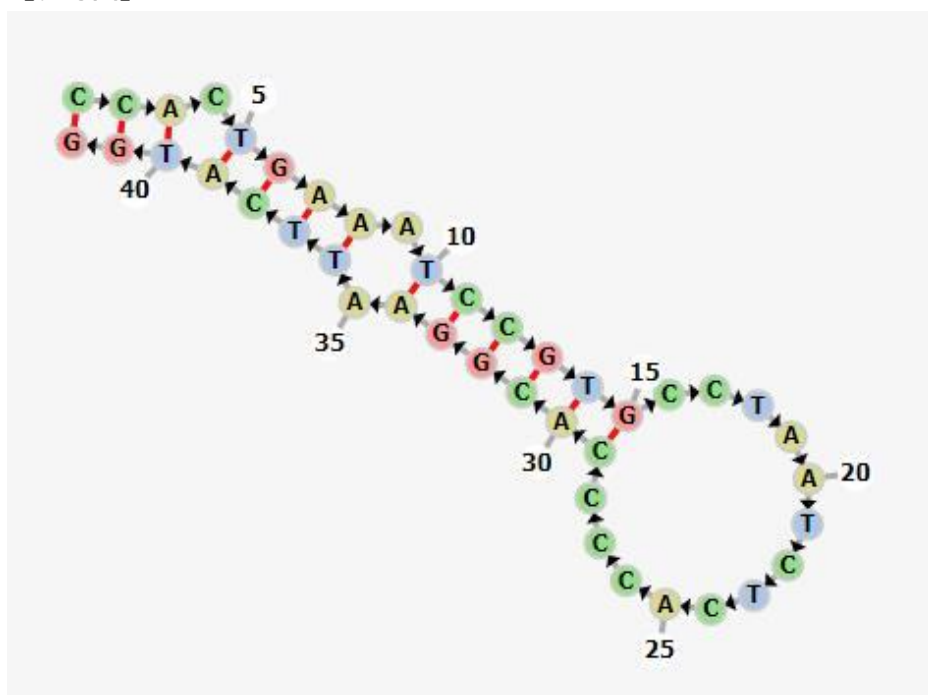


図 1. SARS-CoV-2 アプタマーの予測二次構造

A,G,C,T は DNA 塩基を示す。T に修飾塩基 BAB を導入。RNAfold*⁸ で構造予測を行い、Forna*⁹ で図を作成した。

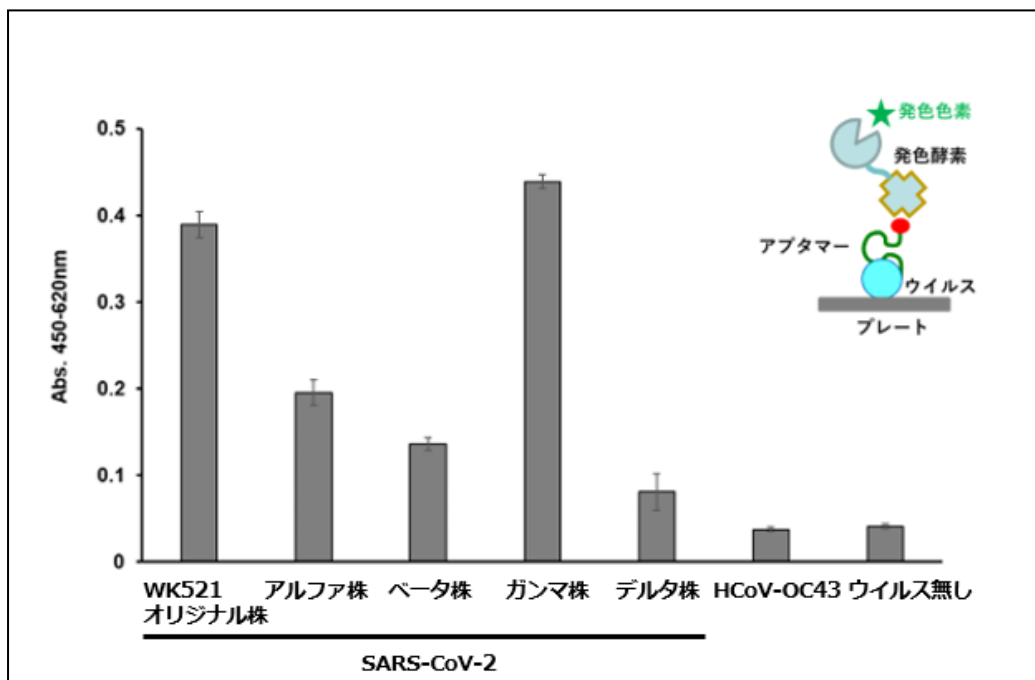


図 2. Direct ELAA 法によるアプタマーと SARS-CoV-2 との結合評価

【用語解説】

- * 1 人工 DNA アプタマー … ウイルスやタンパク質などの特定の標的分子の立体構造を認識し、特異的に結合する核酸(DNA や RNA)のこと。検査対象物にだけ強く結合する配列を探し出す技術(SELEX)に人工的に作製することが可能。
- * 2 RBD 領域 (受容体結合ドメイン) … Receptor Binding Domain の略。SARS-CoV-2 の S タンパク質は、細胞上に発現している ACE2 (Angiotensin-converting enzyme 2、アンジオテンシン変換酵素 II) を認識して結合。RBD とは、この S タンパク質上の ACE2 結合部位を含む領域のこと。
- * 3 Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) 受容体 … ACE2 は、アンジオテンシン II からアンジオテンシン-(1-7)へ変換する酵素として循環の制御に寄与する人体に重要な酵素。その一方で、SARS-CoV 及び SARS-CoV-2 が ACE2 に接着した後に細胞内に侵入することが報告されており、これらのウイルスの受容体として機能している。
- * 4 特許第 6763551 号 … DNA の反応性や構造多様性を高めるため、天然型の DNA 塩基にさらに塩基を付加した新しい修飾塩基に関する特許のこと。2014 年に NEC ソリューションイノベータと国立大学法人群馬大学で採択された独立行政法人 科学技術振興機構(JST)の「研究成果最適展開支援プログラム(A-STEP)」で開発しました。
- * 5 分子間の結合の強さを示す解離定数 … 化学、生化学、薬理学において、解離定数 (Kd 値)は、複合体がその構成分子へと分離する際に、あるいは塩がその構成イオンへと分かれる時に、より大きな方の対象物がより小さな構成要素へと可逆的に分離(解離)する傾向を測る特殊な平衡定数のこと。解離定数はモル [1 mol (モル)とは、 6.02×10^{23} 個の集団のことを表しており、例えば、コッ

プ1杯(約180g)の水には、約10molの水分子(H₂O)を含む物質の[濃度単位(M)を持ち、解離定数が小さくなるとリガンド(生体分子と複合体を形成して生物学的な目的を果たす物質のこと。薬剤など表す)はより強固に結合する。例えば、ナノモラー[10⁻⁹(nM)]オーダーの解離定数を有するリガンドは、マイクロモラー[10⁻⁶(μM)]オーダーの解離定数を有するリガンドよりも特定のタンパク質により強固に結合し、ピコモラー[10⁻¹²(pM)]より小さい解離定数は稀である。

*6 バイオセーフティーレベル(BSL) … 細菌・ウイルスなどの微生物・病原体等を取り扱う実験室・施設のレベル。WHO(世界保健機関)が制定した Laboratory biosafety manual(日本語訳:実験室生物安全指針)に基づき、各国で病原体の危険性に依りて4段階のリスクグループが定められており、それに依りた取り扱いレベル(バイオセーフティーレベル:BSL)が定められている。国立感染症研究所病原体等安全管理規定(第三版)

(https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_20200401.pdf)の別表2・別表3に記載されている。別冊1「病原体等のBSL分類等」(抜粋版)では病原体等のBSL分類について記載が有り、SARS-CoV-2はBSL3分類に属し、BSL3施設での取り扱いが規定されている。

*7 Direct ELAA(Enzyme-Linked Aptamer Assay)法 … プレートに検出したい標的タンパク質ウイルスを吸着させ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)やアルカリフォスファターなどの酵素をアプタマーに付加した試薬で、酵素活性により検出する方法のこと。

*8 北海道大学とNECとの連携協定 … 北海道大学とNECが「空間センシングによる安全・安心な社会」の実現に向けた連携協定を2022年5月25日に締結(参考:2022年5月26日発表の北海道大学プレスリリース https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/220526_pr4.pdf)

*9 RNAfold… R. Lorenz, S.H. Bernhart, C. Hoener zu Siederdisen, H. Tafer, C. Flamm, P.F. Stadler and I.L. Hofacker (2011), "ViennaRNA Package 2.0", Algorithms for Molecular Biology: 6:26 エネルギーパラメータはdna_mathews2004.parを使用して二次構造を予測。

*10 Forna… Kerpedjiev P, Hammer S, Hofacker IL (2015). Forna(force-directed RNA): Simple and effective online RNA secondary structure diagrams. Bioinformatics 31(20):3377-9.