

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640125

研究課題名(和文)人工ヌクレオタンパクを用いたRNAウイルスの高感度検出系の開発

研究課題名(英文)Development of a highly sensitive RNA virus detection method by artificial nucleoproteins

研究代表者

開発 邦宏(Kaihatsu, Kunihiro)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：70419464

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):RNAウイルスは細胞に感染すると、子孫ウイルスを構成するためのゲノムと蛋白質を複製する。その際、複製されたウイルスRNAは細胞内で分解されないように蛋白質と複合体を形成している。今回、インフルエンザウイルスのゲノムRNAに会合するヌクレオペプチドのRNA結合ドメインの配列を模倣した人工ペプチドを合成した。そして、人工ペプチドに金コロイドを修飾して、ウイルスゲノムを検出できるかを評価した。その結果、インフルエンザウイルスゲノムをラテラルフローストリップ上に捕獲後、金コロイド修飾人工ペプチドを加えたところ、インフルエンザウイルスをより高感度に検出することができた。

研究成果の概要(英文):As RNA viruses infect cells, the viral RNA and proteins are replicated within the cells to make its progeny viruses. During the infection process, the viral RNA makes a ribonucleoprotein complex with viral nucleoprotein to prevents it degradation by RNases in cells. In this study, we synthesized a series of artificial peptide those were inspired from influenza viral RNA binding ribonucleoprotein domain sequence.Their artificial peptides were modified with gold-nanoparticle to detect influenza viral RNA. As a result, we could succeeded to enhance the detection sensitivity of influenza virus RNA genome with gold-nanoparticle conjugated artificial peptides.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：遺伝子診断 人工核蛋白質 ゲノム目視検出

### 1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに、インフルエンザウイルスのゲノムに相補塩基配列を持つ核酸分子(ペプチド核酸:PNA)を合成し、このPNAを固定した基板上で、同ウイルスゲノムを捕獲するとともに、同ゲノムに随伴する核蛋白質(NP)を金コロイド修飾-NP抗体により標識することで、目視検出することに成功している。

このウイルスゲノム検出技術をインフルエンザウイルス以外の幅広いウイルス検出に適用するには、PNAで各種ウイルスゲノムを配列選択的に捕獲した後、当該ウイルスゲノムを配列非特異的に標識することが可能なペプチド分子を創製し、これに金コロイドを標識することを提案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、インフルエンザウイルスのゲノムRNAに随伴する核蛋白質のRNA結合部位のペプチド配列が塩基性アミノ酸に富むことに着目し、同ゲノムRNAに非依存的に結合するような新規人工ペプチドフラグメントを合成する。そして、これを用いて広範なRNAウイルスをに診断できる手法を提供することを目指した。

### 3. 研究の方法

インフルエンザウイルスのゲノムRNAには、ウイルスが複製する核蛋白質(NP)が随伴している。そのNPのRNA結合ドメインの181アミノ酸配列には、RNAのリン酸の酸性(アニオン性)残基に親和的に相互作用する塩基性(カチオン性)残基が複数存在する。

今回は、そのNP蛋白質のペプチド配列を25アミノ酸ごとにフラグメント化するとともに、全塩基性アミノ酸をリシンに、全酸性アミノ酸をグルタミン酸に、全中性アミノ酸をアラニンに、全芳香族アミノ酸をフェニルアラニンに置換した人工ペプチド分子をFmoc-固相合成法により複数合成した。各ペプチド末端には予めビオチンを修飾しておき、アビジンを修飾した金コロイドと反応させることで金コロイド表面に人工ペプチドを会合させるよう設計した。

次に、インフルエンザウイルスのゲノム配列に核酸塩基相補的なペプチド核酸(PNA)をFmoc-固相合成法により合成した。水晶発振子(QCM)の金基盤センサー表面上にジチオジプロピオン酸を修飾して、このカルボキシル末端にPNAをアミド結合により固定化してウイルスゲノムを捕獲するように設計した。

インフルエンザウイルス(Influenza A/Osaka/180/2008)を事前に発育鶏卵により増幅し、スクロース濃度勾配超遠心法により精製した。同ウイルスの感染能をイヌ腎臓培養(MDCK)細胞の細胞シートを用いたプラーク形成能により測定し、ウイルス検出感度を測定する際の濃度指標にすることとした。

ウイルス検出試験に際しては、インフルエンザウイルス溶液に界面活性剤を加えた溶解液を調整し、これを水晶発振子(QCM)上のPNAに作用させて、その発振子の振動数減少を測定することで、同ウイルスゲノムとPNAの相互作用を解析することとした。

さらに、前記のウイルスゲノムRNAを捕獲するように設計したPNAをラテラルフロ

ーstripp上に固定化し、インフルエンザウイルスのゲノム RNA を捕獲後、金コロイドを修飾した抗核蛋白質(NP)抗体を作用させることにより、ウイルスゲノム目視検出の感度向上を試みた。

#### 4. 研究成果

インフルエンザウイルス ( A/Puerto Rico/8/34(H1N1), A/Panama/2007/1999/ (H3N2), A/duck/Vietnam/LMB66/2011 (H5N2) )のゲノム RNA 結合蛋白質であるヌクレオペプチド(NP)の配列を比較し、それらの間で共通して保存されるペプチド配列を参考に人工ペプチドを合成した。またペプチドのカルボキシ末端にはビオチンを修飾し、アビジン修飾金コロイドの表面に固定化することを試みた。

しかしながら、アミノ酸側鎖の保護基を脱保護する際にビオチンが酸化型に変異することで、アビジンに対する反応性が落ちることが分かった。そのため、人工ペプチド分子の末端にはシステインを修飾し、金コロイドにはチオールを介して反応させて対応した。

次に、新型インフルエンザウイルスの非構造タンパク質をコードするゲノム配列のうち、3'-末端に保存される核酸塩基配列 5'-TCCTGGAAGAGAAGG-3' に相補的なペプチド核酸 (PNA, N-term H<sub>2</sub>N-CCTTCTCTCCAGGA-CONH C-term)を合成した。この PNA を QCM センサーグラムの金基板上にジチオジプロピオン酸を介して固定化した。

QCM 上のペプチド核酸に対してウイルスゲノムの溶解液を作用させ、水晶発振子の振動数変化をモニタした。その結果、同ウイルス

溶液を添加することで、振動数変化が現れたことから、インフルエンザウイルスのゲノムと PNA の相互作用があることが確認された。しかし、同ウイルスゲノムには多数の核蛋白質が結合している為、ウイルスゲノムを捕獲したことによる振動数変化を安定化かつ定量的に評価することが困難であった。

そこで、PNA の C-末端側に化学修飾し、ラテラルフローの検出ライン上に固定化した。続いて、ウイルス溶解液を作用させ、さらにウイルスゲノムに随伴する核蛋白質 NP に反応する金コロイド修飾抗 NP 抗体を作用させると、ウイルスゲノムを検出ライン上に捕獲できることを目視で確認した。

ここに核蛋白質の RNA 結合部位を簡略化して、その全塩基性アミノ酸をリシン、全酸性アミノ酸をグルタミン酸、全中性アミノ酸をアラニン、全芳香族アミノ酸をフェニルアラニンにした人工ペプチドと金コロイドのコンジュゲートを作用させ、ウイルス検出感度の向上を期待したが、期待通りには感度向上が確認されなかった。

一方、核蛋白質の RNA 結合部位のペプチド配列を簡略化せず、同じ配列からなる短い人工ペプチドを別途合成し、これに金コロイドを修飾したものをウイルスゲノムの検出感度向上に利用すると、ウイルスゲノムに対する検出感度は約 2 - 3 倍に向上することが明らかとなった。

以上のことから、インフルエンザウイルスの場合は、そのゲノム RNA に随伴する核蛋白質を簡略化するより、その配列と同じ配列を含む人工ペプチドを作用させるとウイルス

ゲノムへの親和的相互作用が高くなり、ウイルスゲノムを検出する感度が向上することがわかった。

## 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

1. K. Kaihatsu, S. Sawada, K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki, N. Kato, Rapid identification of RNA viruses by peptide nucleic acid chromatography, Pacifichem-2015, Dec. 14-19, 2015, Hawaii, USA. (Poser).
2. K. Kaihatsu, K. Takagi, T. Hayashi, M. Okazaki, S. Sawada, N. Kato, Single-base-pair mismatch discrimination in DNA by tolane-modified peptide nucleic acid. The 12th Bio-optics symposium. Nov. 27-28, 2015, Shizuoka, (Invited).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

開発 邦宏 (KAIHATSU, Kunihiro)

大阪大学・産業科学研究所・特任准教授

研究者番号：70419464