

戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)

日本－アメリカ共同研究

終了報告書 概要

- 研究課題名：「ACE2 受容体に結合する SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の分子振動スペクトル解析」
- 研究期間：令和 3 年 5 月～令和 5 年 3 月
- 主な参加研究者名：
日本側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	イザベラ・イレーナ・ジェズニチカ	教授	芝浦工業大学工学部	プロジェクト管理 振動スペクトルの取得
主たる共同研究者	ハリソン・ビンティ・ロザック	特任助教	芝浦工業大学工学部	振動スペクトルの取得と解析
研究参加者	堀野 秀幸	特任准教授	東北大学	データ解析と解釈および助言
研究期間中の全参加研究者数			3名	

相手側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	Yin-Ting Yeh	Assistant Research Professor	The Pennsylvania State University, USA	Microfluidic device and Raman data interpretation by machine learning
主たる共同研究者	Mauricio TERONNES	Professor	The Pennsylvania State University, USA	Carbon nanotubes arrays
研究期間中の全参加研究者数			2名	

4. 国際共同研究の概要

この共同研究の大きな目的は、ラベルフリーの新しいウイルス検出法を開発することである。この目的に向けて、日本側チームはヒトのアンジオテンシン変換酵素 2 (hACE2) に結合した SARS-CoV2 のスパイクタンパク質の振動特性の取得に挑戦している。US チームは、ウイルス捕獲・検出のためのマイクロ流体デバイスの開発、ラマンデータ解釈のための機械学習アルゴリズムを開発することに注力した。

日本側チームは、この大きな目的を達成するために、均一な配向を持つタンパク質単分子膜を作成し、表面および界面に特異的な振動分光法を用いて hACE2 と接触した SARS-CoV2 スパイクタンパク質の振動特性の取得を試みた。アメリカ側チームは、金で装飾されたカーボンナノチューブベースのマイクロ流体デバイスを構築し、異なるウイルス株の増強ラマンスペクトルを取得した。このデータを解析するために、研究グループはラマンスペクトルの分類に役立つ機械学習アルゴリズムを開発した。

5. 国際共同研究の成果

5-1 国際共同研究の学術成果および実施内容

日本側チームは、理化学研究所と共同でヘテロダイン検出振動和周波発生分光法（HD-VSFG）を用いて、スパイクタンパク質の SARS-CoV2 N501Y 領域結合ドメイン（RGB）が水/脂質界面でアンジオテンシン変換酵素 2（hACE2）に吸着する際の振動特性を観測することに成功した。その結果、スパイクタンパク質は脂質と接触して凝集体を形成し、hACE2 とはベータシートドメインが関与して相互作用することが明らかになった。理論的には、スパイクタンパク質のベータシートドメインが SARS-CoV2 と hACE2 の結合に関与している可能性が予測されていたが、実験的に実証されたのは今回が初めてである。

アメリカ側チームは、金ナノ粒子（AuNPs）で装飾されたカーボンナノチューブ（CN）アレイで構築された特別設計のマイクロ流体デバイスで、サイズによって捕捉したウイルスの振動ラマン分光の分析に基づき、異なるウイルス株を区別できることを実証した。研究チームは、複雑なラマンスペクトルの解釈を支援する機械学習（ML）アルゴリズムを開発した。ML の助けを借りて、研究グループは SARS-CoV2 と MERS-CoV2 RBD のラマンスペクトルを高い精度と正確さで区別することができた。

5-2 国際共同研究による相乗効果

この共同研究プロジェクトでは、日本側チームの界面・表面に特化した生物分光法とイメージング、米国側チームのサイズ選択性マイクロ流体デバイスの構築と機械学習によるラマン分光分析という 2 つのグループの強みを融合させた。両グループの研究成果は、ウイルス株の同定に使用されるポータブルなラベルフリー光学プラットフォームの開発に向けて重要な一歩を踏み出したといえる。また、パートナーとの共同討議により、ラベルフリーのウイルス検出に向けた長期的な共同研究目標の設定を可能にし、学際的なプロジェクトに取り組む能力を持つ次世代の科学者の育成にも貢献できた。

5-3 国際共同研究成果の波及効果と今後の展望

日本側チームの研究成果は、界面振動分光法の分野で科学的インパクトをもたらすことが期待される。具体的に今回の結果は、ウイルス由来タンパク質の吸着をモニターし、脂質結合同型 hACE2 受容体との関連性を調査するための HD-VSFG の潜在力を初めて実証した。米国側チームの研究成果は、機械学習アルゴリズムを用いたラマンデータ解釈の分野や、カーボンナノチューブを用いたサイズ選択性マイクロ流体デバイスの実証によるマイクロデバイス工学の分野で、科学的インパクトをもたらすだろう。

しかし、これらの成果を産業界に還元するのはまだ早い。これは、ラベルフリーのウイルス検出法を開発するには、まだ多くの基本的な課題解決や試行が必要だからである。それにもかかわらず、米国チームは、流体中のナノ粒子を捕捉するためのサイズ調整可能な濃縮プラットフォームに関する特許（US11022529B2）を既に取得している。

研究成果の社会的インパクトは、ポリメラーゼ連鎖反応や特定の蛍光標識を必要とせず、ラベルフリーで高感度にウイルスを迅速に同定する方法を社会に提供することである。また、携帯型ラマン検出器の開発により、スマートフォンでラマンスペクトルを収集することが実現するかもしれない。開発した機械学習アルゴリズムをスマートフォンのアプリケーションに組み込み、データバンクに登録されたラマンデータと比較することで、ウイルス株の同定に利用することもできるだろう。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)
Japan – United States Joint Research Program
Executive Summary of Final Report

1. Project title : 「Molecular vibrational signatures of SARS-CoV-2 spike protein binding to the ACE2 receptor」

2. Research period : May 2021 ~ March 2023

3. Main participants :

Japan-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Izabela Irena RZEZNICKA	Professor	Shibaura Institute of Technology	Project management Acquisition of vibrational spectra
Main Collaborator	Harison Binti ROZAK	Specially Appointed Assistant Professor	Shibaura Institute of Technology	Acquisition and analysis of vibrational spectra
Collaborator	Hideyuki HORINO	Associate Professor	Tohoku University	Data analysis and interpretation advice
Total number of participants throughout the research period:				3

US-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Yin-Ting YEH	Assistant Research Professor	Pennsylvania State University, USA	Microfluidic device and Raman data interpretation by machine learning
Co-PI	Mauricio TERRONES	Professor	Pennsylvania State University, USA	Carbon nanotubes arrays
Total number of participants throughout the research period:				2

4. Summary of the international joint research

The grand aim of the joint research is to develop a new label-free method for virus detection. Towards this aim, JP-side team has challenged obtaining vibrational signatures of SARS-CoV2 spike protein binding with human angiotensin-converting enzyme 2 (hACE2). US-team has focused on the developing of microfluidic device for virus capture and detection, and machine learning algorithms for Raman data interpretation.

To achieve the grand aim, JP-side team tried to prepare uniformly oriented protein monolayers and acquire vibrational signatures of SARS-CoV2 spike protein in contact with hACE2 using surface and interface-specific vibrational spectroscopy techniques. US-side team built a carbon nanotubes-based microfluidic device decorated with Au and acquired enhanced Raman spectra of different virus strains. To analyze the data, the group has developed machine learning algorithms that help to sort-out Raman spectra.

5. Outcomes of the international joint research

5-1 Scientific outputs and implemented activities of the joint research

JP team, in collaboration with RIKEN scientists has succeeded to obtain vibrational signatures of SARS-CoV2 N501Y region binding domain (RBD) of spike protein adsorption to angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) at the water/lipid interface using heterodyne-detected sum-frequency vibrational generation (HD-VSFG) spectroscopy technique. The results showed that spike proteins form aggregates in contact with lipids and interact with hACE2 involving β -sheet domains. Although, theoretically it has been predicted that β -domains of spike protein may be involved in the binding of hACE2 to SARS-CoV2, it has been the first experimental evidence to demonstrate it.

US team has demonstrated that it is possible to differentiate different virus strains based on the analysis of vibrational Raman spectra of viruses captured by size in a specially designed microfluidic device built of carbon nanotubes (CN) arrays decorated with gold nanoparticles (AuNPs). The team has developed machine learning (ML) algorithms to aid interpretation of complex Raman spectra. With the help of ML, the group could distinguish Raman spectra of SARS-CoV2 and MERS-CoV2 RBD with high accuracy and precision.

5-2 Synergistic effects of the joint research

In this joint research project, we combined the strength of the two groups i.e. interface and surface-specific biospectroscopy and imaging of JP team with the US team strength in building a size-selective microfluidic device and machine-learning aided Raman spectra analysis. The research outcomes of the two groups brought an important step towards development of a portable label-free optical platform used to identify virus strains. In addition, joint discussion with the partners made it possible to define long-term collaboration objectives towards label-free virus detection and helped in training new generation of scientist with capabilities to work on interdisciplinary projects.

5-3 Scientific, industrial or societal impacts/effects of the outputs

The research results of JP-team are expected to bring scientific impact in the field of interfacial vibrational spectroscopy. Specifically, the results demonstrated for the first time the potential of HD-VSFG to monitor the adsorption of virally-derived proteins and investigate their association with the lipid-bound hACE2 receptor. The research outputs of US team, are going to bring scientific impacts in the field of Raman data interpretation using machine learning algorithms and in the micro- device engineering field through demonstration of size-selective carbon-nanotubes based microfluidic device.

It is too early to envision industrial impacts of the obtained results. This is because, there are still many fundamental questions and tests that have to be done to develop label-free virus detection method. Nevertheless, US team has already obtained a patent for sizable tunable enrichment platform for capturing nano particles in a fluid.

The social impact of the research outputs is to equip society with the quick identification of viruses in a label-free manner with high sensitivity without need of polymerase chain reaction and specific fluorescent labels. With the development of portable Raman detectors, we may one day witness possibility of using smartphones to collect Raman spectra. The developed machine learning algorithms could be integrated into smartphone application and used to identify virus strains by comparing with the Raman data deposited in the data bank.

国際共同研究における主要な研究成果リスト

1. 論文発表等

* 原著論文 (相手側研究チームとの共著論文) 発表件数 : 計 0 件

・ 査読有り : 発表件数 : 計 0 件

・ 査読無し : 発表件数 : 計 0 件

* 原著論文 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文) : 発表件数 : 計 X 件

・ 査読有り : 発表件数 : 計 1 件

1. H. Rozak, S. Nihonyanagi, A. Myalitsin, S. Roy, M. Ahmed, T. Tahara and I. I. Rzeznicka, "Adsorption of SARS-CoV-2 Spike (N501Y) RBD to Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 at a Lipid/Water Interface", *J. Phys. Chem. B*, **2023**, 127, 20, 4406–4414.
DOI: 10.1021/acs.jpcb.3c00832

・ 査読無し : 発表件数 : 計 0 件

* その他の著作物 (相手側研究チームとの共著総説、書籍など) : 発表件数 : 計 0 件

* その他の著作物 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの総説、書籍など) : 発表件数 : 計 0 件

2. 学会発表

* 口頭発表 (相手側研究チームとの連名発表)

発表件数 : 計 0 件 (うち招待講演 : 0 件)

* 口頭発表 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表)

発表件数 : 計 1 件 (うち招待講演 : 0 件)

* ポスター発表 (相手側研究チームとの連名発表)

発表件数 : 計 0 件

* ポスター発表 (相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表)

発表件数 : 計 3 件

3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

1) Fluctuating-Interface Association (invitation by Dr. Aya M. Akimoto, University of Tokyo). "Vibrational spectroscopy of proteins at lipid monolayers" 16th January 2023, online event, 12 participants.

2) invited talk 日本表面真空学会・九州支部セミナー(オンライン)、Kyushu chapter seminar of The Japan Society of Vacuum and Surface Science (organized by Prof. T. Suzuki, Kyushu University) "Tip-enhanced Raman spectroscopy of organic layers on metal surfaces." 13th December 2022, online event, about 20 participants.

4. 研究交流の実績（主要な実績）

- ・ 2021 年 7 月 27 日：キックオフミーティング、online due to covid-19
- ・ 両国のチームメンバーを交えて zoom ミーティングを年 3 回開催した。

5. 特許出願

研究期間累積出願件数：2 件

6. 受賞・新聞報道等

- 1) 一般財団法人丸文財団 交流研究助成候 Harison Binti ROZAK

“ACE-2 受容体に結合する SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の分子振動スペクトル解析-平らな表面からマイクロ流体デバイスまで”

Vibrational signature of spike protein binding to ACE2 receptor—from flat surfaces to microfluidic device

2022 年 04 月 1 日 - 2023 年 03 月 31 日

- 2) Happy Valley Industry Online Platform, “Virolock’s mission? Prevent pandemics by trapping and identifying viruses quickly and easily” Online Article by Stephanie Kalina-Metzger, published on 12/27/2022.

<https://happyvalleyindustry.com/virolocks-mission-prevent-pandemics-by-trapping-and-identifying-viruses-quickly-and-easily/>

7. その他

特になし