

# インシリコ解析/LC-MS検出法に基づく新型コロナウイルス検査の実用性評価

辻村 和也, 松本 文昭, 吉川 亮, 田栗 利紹

近年、インシリコ解析により、SARS-CoV-2に特異的なペプチドを選抜して、直接イオン化し、LC-MSで検出するターゲットプロテオミクスがReverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)を補完する手法の1つとして提案されている。本研究では、地衛研の理化学検査で汎用的に使用している高速液体クロマトグラフ-質量分析装置 (LC-MS) を用い、RT-qPCRの結果を踏まえ、当該LC-MS法の実用性を陽性患者を含む鼻咽頭ぬぐい液40検体を用い検討した。ターゲットプロテオミクス標的のSARS-CoV-2を構成するウイルスタンパクとしてNucleocapsid protein (NCAP)とSpike protein (SPIKE)とした。その結果、RT-qPCR結果相当でCt値23.54以下の22検体でSARS-CoV-2特異ペプチドが検出され、臨床検体保存液別のLC-MSによるlog<sub>2</sub> SumAreas 値とRT-qPCRのCt値には、ウイルス輸送液で $r=-0.821$ 、生食もしくはPBSで $r=-0.863$ と高い相関性が確認された。また、Delta株NCAP中のD377Y変異もLC-MS分析で確認できた。今後、陰性判断する検査への適用は感度の課題があるが、ウイルスタンパク質を直接ターゲットにしたRT-qPCRを補完する技術の一つとして期待でき、SARS-CoV-2以外にも応用可能であると思われる。

キーワード：インシリコ解析、ターゲットプロテオミクス、LC-MS、SARS-CoV-2、RT-qPCR、新型コロナウイルス感染症

## はじめに

パンデミックとして猛威を振ったCOVID-19 は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2 (SARS-CoV-2)の爆発的な感染実態やRNAウイルス進化に基づくSARS-CoV-2変異株の頻出により、地方衛生研究所(地衛研)において常用される遺伝子検査の補完技術の検討は喫緊の課題となっている。近年、探求が進められている新しい診断法の中で、インシリコ解析により、SARS-CoV-2に特異的なペプチドを選抜して高速液体クロマトグラフ-質量分析計(LC-MS)で検出するターゲットプロテオミクス法が、Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)を補完する手法の1つとして提案されている。SARS-CoV-2の遺伝子変異のスピードの速さを考慮すると、一貫性が最も重要な臨床の現場において、ウイルスタンパク質由来の特異ペプチドを迅速に検出し、遺伝子探索では対応できないペプチド残基からのアプローチを可能にする本技術は魅力的な検出法である。

本研究では、内径 0.1 mmのナノカラムを用いたnano-LC/MS(MS)やMALDI(Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization)-MS等のタンパク質解析に特

化した質量分析装置でなく、残留農薬分析、違法薬物分析、健康危機管理等で地衛研の理化学検査で汎用している内径2 mm程度のセミマイクロカラムのシステムを用いた2種のLC-MS(高速液体クロマトグラフ三連四重極タンデム質量分析装置(LC-QqQ-MS)及び高速液体クロマトグラフ四重極飛行時間型質量分析装置(LC-QTOF-MS)を用い、RT-qPCRの結果を踏まえ、当該LC-MS法の実用性を検討した。

なお、本研究は日本公衆衛生学会新型コロナウイルス対策調査研究・実践開発推進助成(奨励賞)で実施した。

## 材料および方法

既報<sup>1)-9)</sup>を参考にし、概要として図1の流れで研究を実施した。各項目における詳細を以下に示す。

### 1 インシリコ解析

インシリコ解析のため、SARS-CoV-2構成タンパク質であるNucleocapsid protein (NCAP)とSpike protein (SPIKE)のアミノ酸配列をUniProt (NCAP: P0DTC9, SPIKE: P0DTC2)から入手し、トリプシン消化で生成されるペプチドをオープンソースのター

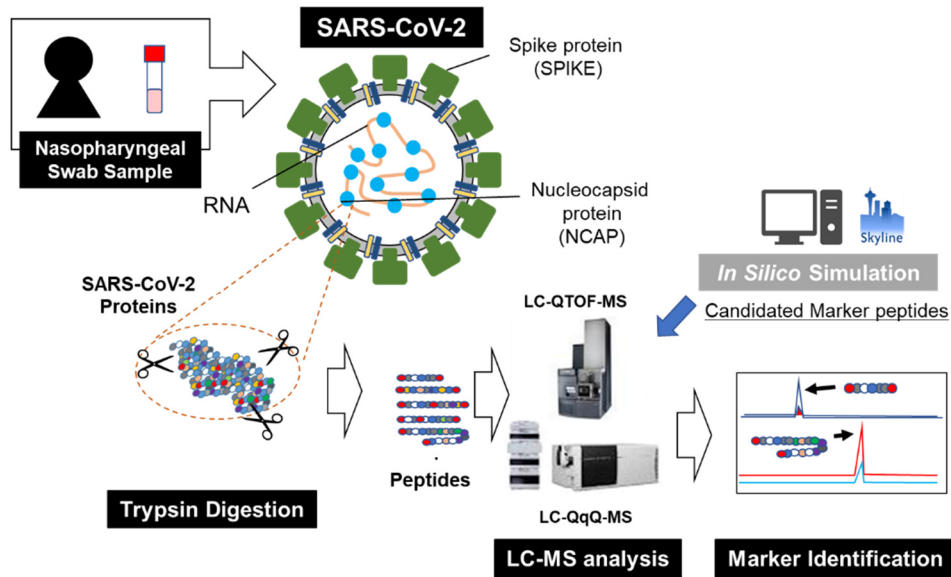


図1 LC-MSによるSARS-CoV-2検出系概要

ゲットプロテオミクスソフトウェアの Skyline (Developer(s): Brendan X. MacLean *et al.*) でシミュレーションした。また、ヒトタンパク質由来のペプチドをバックグラウンドと設定し、同じ配列のペプチドを除き、インシリコ解析でSARS-CoV-2検出分析の候補ペプチドを一次選定した。

インシリコで一次選定された各ペプチドと実験的なデータとの整合性を図るために、組換タンパク質によるトリプシン消化及びLC-MS分析を繰り返し行い、検出に必要なトランジションの選定及びその時の最適な電圧等を最適化した。また、溶出時間も確認し、各LC-QqQ-MS及びLC-QTOF-MS分析に必要なモニタリングメソッドを構築した。

## 2 試薬

SARS-CoV-2を構成する組換タンパク質として、Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein with His tag (ABclonal社)およびRecombinant SARS-CoV-2 S1+S2 ECD(S-ECD) Protein with His tag (Wild type, pre-fusion state plus post-fusion stage)(AB clonal社)を購入した。ウイルス不活化及び濃縮に用いたプロテオミクス用アセトンは、富士フィルム和光純薬製を用いた。ウイルス輸送培地 (VTM) は、極東製薬工業製を用いた。タンパク質消化に用いた消化酵素は、プロメガ社製のTrypsin / Lys-C Mix, Mass Spec Gradeを用いた。また、酵素消化及び溶解液として用いた緩衝液は、重炭酸トリエチルアンモニウムバッファー (TEABC) (Sigma社製) を希釈し用いた。その他LC-MS等に用いた試薬は、

質量分析グレードのものを用いた。

## 3 前処理

前処理操作には、タンパク質低吸着のマイクロチューブ (住友ベークライト社製)、フィルターチップ (Thermo Scientific社製) 及びLC-MSバイアル及びキャップ (AMR株式会社) を用いた。

前処理法を、図2に示す。組換タンパク質添加VTMまたは鼻咽頭ぬぐい液検体を50 µL分取し、氷冷したアセトン450 µLを添加混合し、ウイルスの不活化及びタンパク質を沈殿し、遠心分離 (0、16,000 g、10分) した。得られた沈殿タンパク質に再度アセトン450 µLを加え同様の操作を行った。40 乾燥でアセトンを蒸発させた後、500 mMに調製し

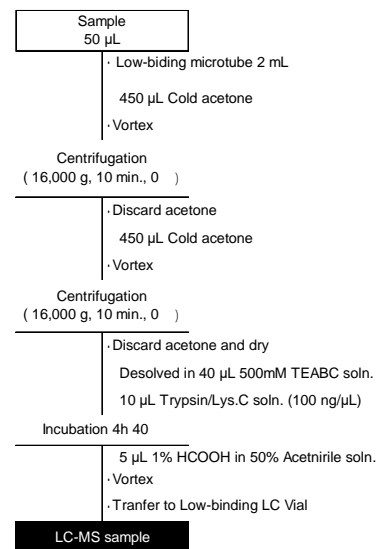


図2 前処理フロー

たTEABC溶液40 μLに溶解し、0.1 μg/μLに500 mM TEABC溶液に調製したTrypsin/Lys-C Mixを10 μL添加し、穏やかピペティングした後、ヒーティングブロック(HF200、アズワン社製)40 °Cで4時間酵素処理を行い、1%ギ酸含有50%アセトニトリル溶液5 μLを添加し反応を停止し、遠心分離後上清をLCバイアルに移し、これを各LC-MS装置に供した。

#### 4 LC-QqQ-MS及びLC-QTOF-MS分析

高速液体クロマトグラフ三連四重極タンデム質量分析計(LC-QqQ-MS)は、アジレント・テクノロジー(株)製1290 Infinity LC/6460を使用した。また、超高速液体クロマトグラフ四重極-飛行時間型タンデム質量分析計(LC-QTOF-MS)は、ウォータース(株)製 Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo G2-XS QToFを使用した。ペプチド分析カラムは、ウォータース(株)製のACQUITY Premier Peptide BEH C18 Column(300 μm, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm)に同社製ACQUITY Column In-Line Filterを連結し用いた。移動相Aとして0.1%ギ酸、移動相Bとして0.1%ギ酸含有アセトニトリルとし、流量0.6 mL/分でグラジエン

表1 LC-QqQ-MS及びLC-QTOF-MS分析条件

<Instrument>	
LC-Q-TOF-MS : Waters ACQUITY UPLC I-Class/Xevo G2-XS Qtof (Waters, Ltd.)	
LC-QqQ-MS : Agilent 1290/6460 LC-MS/MS (Agilent Technologies, Ltd.)	
<LC>	
Column: ACQUITY Premier Peptide BEH C <sub>18</sub> Column (300 μm, 1.7 μm, 2.1 x 50 mm, Waters, Ltd.)	
Mobile phase:	Gradient table
A) 0.1% Formic acid	Time (min) A (%) B (%)
B) 0.1% Acetonitrile	0 95 5
Column temperature: 40°C	5.5 67 33
Flow rate: 0.6 mL/min	5.5 10 90
Injection volume: 10 μL	7 10 90
Autosampler temperature: 10°C	7.1 95 5
	8 95 5
<Q-TOF-MS conditions>	
* Ionization mode: ESI (Positive)	<QqQ-MS conditions>
* Source temperature: 150°C	Ionization: AJS positive mode
* Desolvation temperature: 600 °C	Scan Mode: Dynamic MRM
* Capillary voltage: 0.5 kV	Gas temp: 350°C
* Cone voltage: 60 V	Gas Flow: 10 l/min
	Sheath gas Temp: 400 °C
	Sheath gas flow: 10 L/min
* Measurement mode:	
<data-independent MS/MS (MS <sup>2</sup> )>	
* Collision energy: low energy 0 V, high energy 20-50 V (ramping)	
* Scan range: m/z 100-800	
<TOF-MRM>	
* MRM window: Isotope cluster	

ト分析した。その他の条件を含め表1に示す。

#### 5 鼻咽頭ぬぐい液検体

行政検査のために搬入された患者鼻咽頭ぬぐい液を用いた。検体は、定量リアルタイムPCR (RT-qPCR) のCt値をもとに、『Ct 10-20』: 11検体、『Ct 20-30』: 15検体、『Ct 30-40』: 5検体及び『陰性試料』: 9検体の計40検体とした(表2)。また、表2の検体番号に下線を引いた検体は、鼻咽頭ぬぐい液がPBSもし

くは生理食塩水により懸濁・保存されていた。RT-qPCRは、「新型コロナウイルス感染症病原体検出マニュアル」(<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>) に準じて実施した。

なお、本研究は、「インシリコ解析/LC-MS検出法に基づく新型コロナウイルス検査の実用性評価(環保研倫10-1)」として当センターの倫理審査委員会において承認された。

表2 鼻咽頭ぬぐい液検体リスト及び各検体のRT-qPCRのCt値

Group	No.	Strain	Ct Value	Group	No.	Strain	Ct Value		
Ct 10-20 (11)	1	Delta	14.83	Ct 30-40 (5)	27	Delta	30.56		
	2	Omicron	16.43		28	Estimated Delta	33.85		
	3	Delta	16.72		29	Not Determinable	38.03		
	4	Omicron	17.26		30	Not Determinable	38.62		
	5	R1	18.32		31	Not Determinable	39.56		
	6	Alpha	18.35		Negative Sample		32	-	Undetermined
	7	Omicron	18.61		(9)	33	-	Undetermined	
	8	Omicron	18.73		34	-	Undetermined		
	9	Omicron	18.97		35	-	Undetermined		
	10	Alpha	19.13		36	-	Undetermined		
	11	Omicron	19.36		37	-	Undetermined		
Ct 20-30 (15)	12	Omicron	20.06	38	-	Undetermined			
	13	Omicron	20.34	39	-	Undetermined			
	14	Omicron	20.55	40	-	Undetermined			
	15	Delta	20.56	Undeline: PBS or Saline, Others: VTM					
	16	Alpha	21.14						
	17	Omicron	21.53						
	18	R1	21.56						
	19	Omicron	21.63						
	20	Omicron	21.73						
	21	Omicron	21.75						
	22	Delta	22.81						
	23	Omicron	23.10						
	24	Omicron	23.54						
	25	Alpha	26.13						
26	Delta	26.31							

#### 6 RT-qPCRとの比較

鼻咽頭ぬぐい液検体のLC-QqQ-MSデータは、Skylineに取り込み解析し、得られた各ペプチドの各ランジションのピークの面積和を用い、各Ct値グループの傾向を検討した。各検体のペプチドピーク面積合計値をシグナル(S)、同溶出時間の『陰性試料』の面積合計値をノイズ(N)とし、S/N比3以上のペプチドについて検出とし、検出された各ペプチドピーク面積の合計値のLog2値(log<sub>2</sub>\_SumAreas)とRT-qPCRのCt値の相関性を検証した。また、検体溶解液について、VTM以外のPBSもしくは生理食塩水の検体があったため、それぞれ鼻咽頭ぬぐい保存液ごとに相関性を検証した。

#### 7 LC-MS分析の変異株検出の可能性検討

モニタリングメソッド搭載のペプチド配列について、SARS-CoV-2変異株のアミノ酸情報のあるWebデータベースで探索し、実検体での検出可能性について検討した。データベースとして、スタンフォード大学のCORONAVIRUS ANTIVIRAL & RESISTANCE DATABASE (<https://covdb.stanford.edu/page/mutation-viewer/>) の“SARS-CoV-2 Variants”を参照した。

## 結果

1 インシリコ解析によるトリプシン消化ペプチド選定  
Skylineを用いたNCAP (419アミノ酸) 及びSPIKE (1273アミノ酸) タンパク質のインシリコトリプシン消化のフロースキームを図3に示す。酵素消化ミス、生成ペプチド長さ、イオン価、イオンタイプ及びバックグラウンド減算を条件とした。その後、既知のWEBデータベースと比較し、その結果、SPIKEとして36ペプチド、879トランジションが、NCAPとして39ペプチド、904トランジションが候補として挙げられた。

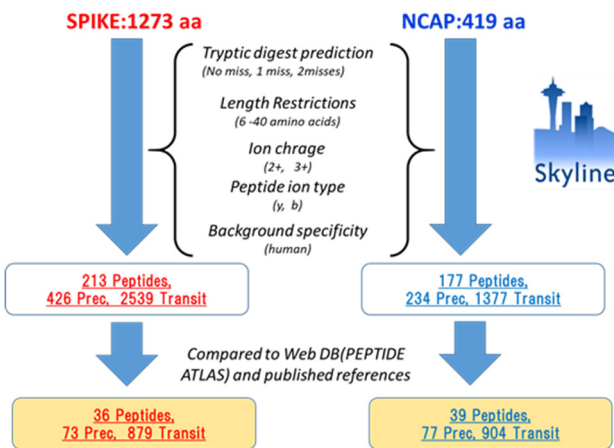


図3 インシリコ解析によるSARS-CoV-2 特異ペプチドマーカ―選択フロースキーム

## 2 組換タンパク質による検証

インシリコ消化で選定されたペプチドについて、図4のフロースキームでLC-QTOF-MS及びLC-QqQ-MSそれぞれで組換タンパク質による検証を行った。

LC-QTOF-MSについては、2段階の分析及びSARS-CoV-2検出ペプチドマーカ―選択を行った。1段階目は、データ非依存型のデータ取得法であるMSeモードで分析を実施し、各ペプチドのトランジションのピーク強度をもとに選択した。2段階目は、選択されたペプチドのトランジションに対し、MSeモード測定より、選択性と感度が良いTOF-MRM (Multiple Reaction Monitoring) モード分析を実施し、同じくピーク強度をもとにLC-QTOF-MSによるSARS-CoV-2検出マーカ―を選定した(図4A)。一方、LC-QqQ-MSについては、条件最適化のために3段階の分析を行い、SARS-CoV-2検出に有効なペプチドマーカ―を選択した(図4B)。1段階目は、インシリコで選択されたペプチドのトランジションすべてについてMRM条件を暫定的に設定し、LC-QTOF-MS同様に各ペプチド及びそのトランジションを選

択した。2段階目は、暫定的に設定していたMRM条件の最適化、3段階目にその確認分析を実施し、LC-QqQ-MSによるSARS-CoV-2検出マーカ―を選定した。

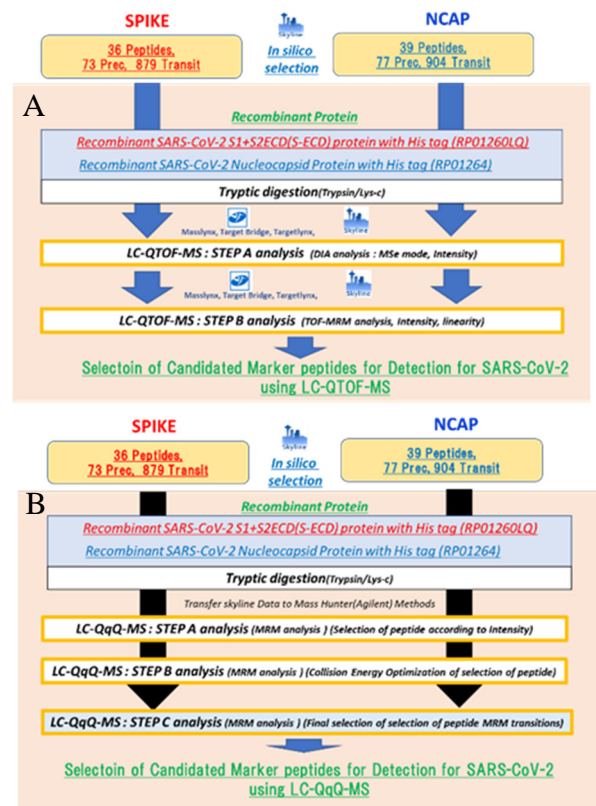


図4 LC-QTOF-MS(A)分析及びLC-QqQ-MS (B)によるSARS-CoV-2 特異的ペプチドマーカ―選択フロースキーム

それぞれの機器で選択されたSARS-CoV-2検出候補マーカ―について、組換タンパク質添加VTMを用いて、更なるマーカ―候補選定を実施した。その結果、NCAPとして、8ペプチド、8プレカ―サー、17トランジション、SPIKEとして、3ペプチド、3プレカ―サー、6トランジションを選択した。また、感度や機器の安定性等を考慮し、患者鼻咽頭ぬぐい液検体分析機器として、LC-QqQ-MSを選択した。この分析における各ペプチドのTransition、溶出時間、Fragmentor (V) 及びCollision Energy(eV)も表3に示す。また、今回選択されたペプチドのそれぞれのタンパク質上の位置について図5に青字で示す。

表3 特異的ペプチドマーカー及び分析条件情報

Protein	Peptide	Charge	Transition	RT (min)	Precursor Ion (m/z)	Fragmentor (V)	Product Ion (m/z)	Collision Energy (eV)
NCAP	DGIHWATEGALNTPK	842.9489++	V [y11] - 1100.5946+	4.35	842.9	135	1100.6	24.1
			A [y10] - 1001.5262+				1001.5	24.1
			T [y9] - 930.4891+				930.5	27.1
	NPANNAIVLQ.PQGGTTLPK	687.3881+++	P [y8] - 841.4778+	4.13	687.4	135	841.5	16.9
			V [b9] - 865.4526+				865.5	19.9
	LNQLESK	416.2322++	N [y6] - 718.3730+	0.82	416.2	135	718.4	10.9
			L [y4] - 476.2715+				476.3	10.9
			S [y2] - 234.1448+				234.1	13.9
	AYNVTAQAFGR	563.7856++	N [y8] - 892.4635+	2.59	563.8	135	892.5	15.5
			IGMEVTPSGTWLTYTGAIK				675.6836+++	L [y8] - 866.4982+
DQVILLNK	471.7846++	V [y6] - 699.4763+	2.50	471.8	135	699.5	9.6	
		L [y4] - 487.3239+				487.3	15.6	
ADETQALPQR	564.7858++	A [y5] - 584.3515+	1.17	564.8	135	584.4	21.5	
		P [y3] - 400.2303+				400.2	15.5	
QQTVTLPAADLDFSK	931.4807++	L [y11] - 1191.5892+	4.41	931.5	135	1191.6	26.9	
		P [y10] - 1078.5051+				1078.5	29.9	
SPIKE	GWIFGTTLDISK	612.8166++	I [y9] - 981.5251+	4.12	612.8	135	981.5	20.0
			F [y8] - 868.4411+				868.4	20.0
	FLPFQGFGR	570.3035++	P [y7] - 879.4472+	3.98	570.3	135	879.4	12.7
			F [y6] - 782.3944+				782.4	21.7
SFIEDLLFNK	613.3268++	E [y7] - 878.4618+	5.08	613.3	135	878.5	14.0	
		D [y6] - 749.4192+				749.4	20.0	

sp1|PDDTC9|NCAP\_SARS2 Nucleoprotein  
 MSDNGPQNRNAPRITFGPSPDSTGNSQNGERSGARSQRPPGLPNTASWFTALTOHGKEDLKFRGGQVPINTSSPDDQIGYY  
 RRASTRIRGGDGKMKDLSPRWYFYGTGPEAGLPYGANIKDGIHWATEGALNTPKDHIPTNANNAIVLQ.PQGGTTLPKFGYAEIGS  
 RGGSQASSRSRNRSPSSRTPSSRGTSPARMANGGDAALLLDRLNQLESKMSGGQQQQQVTKKSAEASKPRKQRTA  
 TKAYNVTAQAFGRGPEQTQGNFDQELQRQDKYHWPQIAQFAPSAAFGRMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPFKDQVIL  
 LNKAYHDAYFPTEPKDKKKKADETQALPQRQKQQTTLPAADLDFSKLQSQMSADSTQA

sp1|PDDTC2|SPIKE\_SARS2 Spike glycoprotein  
 MFVFLVLPVSSQCVLTLTRQLPPATNSFTFRGVYYPDKFRSSVLSHQDQLFFPSSVWFHAIHVSQGTNGKRFDPNPLVFNDDGVY  
 FASTEKSNIRGHWIFGTTLDISKTQLLNNNATVWVKVEFCQCNDFPLVYHYKNNVWSESERYSSANNCTFEYSQFLNIDLEGK  
 QGKFNKLRVFNKNDIGYFKYKSHPTINVDLPQGSFALEPVDLPIGINITRFQTLALHRSYVLPDSSSGWTAGAAAYVLYQPRFL  
 LYNNENGTDAVDCALDPLETKLTKFSVTEKGIQSFNRPQTESVIRFPNITLCPGEVFNATRFASVYAWNRKRSNCVADYSIVY  
 NSASFSFKCYGVSPTKLNDCFTWYVADSFVIRSDGVRQIAPGGTGKIAIDYKHLPPDFTGCVIAVNSNLDKXGNNHNYRFLRYSK  
 NLKPEERDSTETVAGSSTPCVGEFGNCFPLDSTGQPTINGVGYQYRVVYVLLFELLHAPATVCGPKSTLWUKKVCNENFTELTGT  
 VLTENKFLPFQGFGRDIADTDAVRDPQTELEIDITPCSGGVSIVITPNTNSQVAVLVQDVCNTEVPVIAHADQLTPTWRYVSTGNSV  
 FQTRAGCLIGAEHVNNSYECDDIPGAGICASYQTQNSPRRAERSASQSIATMSLGAENSVAVNSNIAIPNFITVTEILPMSMTKTSVD  
 CTMYGDSSTCSNLLQYGSCTQRLNRLTIAVQEDKHTQVGAQVQKQYKTPKDFGGNFSQILPDPSPKSKRSIEDLLNFKVNTLAD  
 AGFKYQGDCLDIAARLCAQKNSGLTYPLLLDIEAIAQYTSALLAGTTSWTFGAGAALQIPFAMQMAVRFNFGIVGQTVNLYENQK  
 LIANQFNSAIGKIQDLSLSASALGKLQDVVQNAQALNVLQKLSNFGAISVNLNLDLSLDKVEAEVQIDRLITRGLQSLVTVYQQIR  
 AEAIRASANLATKMSCEVLQSKRIVDFCGYVHLMSPQSAFHGVFLVHTVYVPAQENFTTAPAIHQDGAHFFRGEVGVSVNTHW  
 FVYQRNVEYQDITTDITFVSGCQDVIGHWNTYDQLPELDFSKSELDYKXWYKSPDQVLDLDSIGINASVWVWQKEDLNENKMLNE  
 SLIDQLGELQYKWPWYVWLVGFIAGLIAVMTLCCMSTSCSCLGKCCSCGSCCKFDDSDPEVLKGVKLHYT

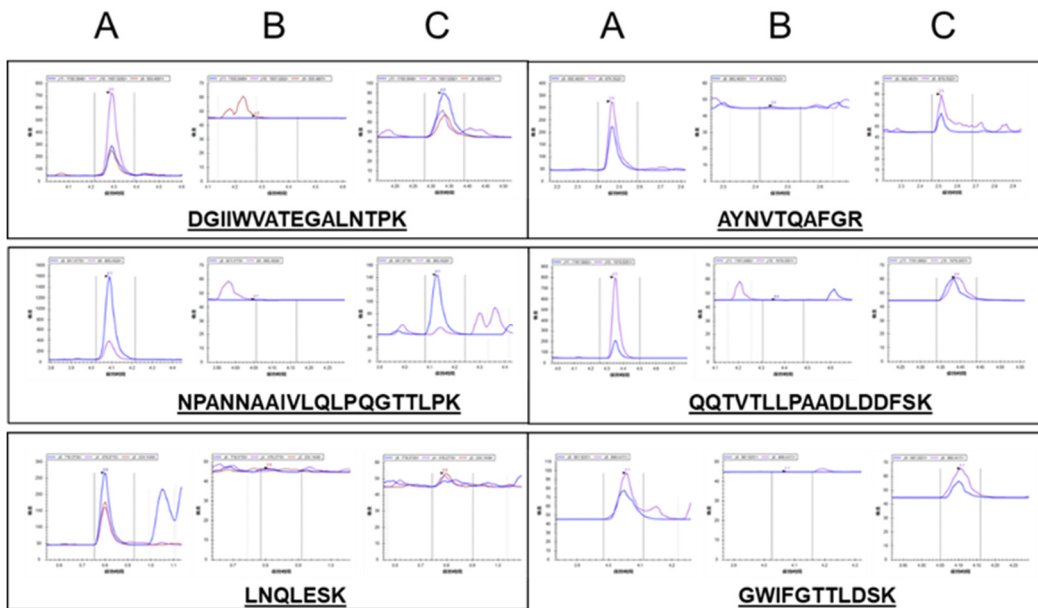
図5 SARS-CoV-2特異的ペプチドマーカーの各タンパク質上の位置

3 鼻咽頭ぬぐい液検体のLC-QqQ-MS分析及び RT-qPCR結果との比較  
 (1) 鼻咽頭ぬぐい液検体のLC-QqQ-MS分析  
 表1及び3の条件により、鼻咽頭ぬぐい液40検

体の分析を実施した。今回、LC-QqQ-MSによる SARS-CoV-2検出の判断として、少なくとも3種のペプチドの検出とし、また各ピーク検出の基準をネガティブコントロール検体の各ペプチドのトランジションにおける面積を用い、平均値を算出(N)し、その値に対してS/N > 3以上であればそのペプチドのトランジションは検出と判断した。その結果、40検体中22検体はLC-QqQ-MSにより、SARS-CoV-2検出と判断された。その内、RT-qPCRの結果と照らし合わせると<sup>1</sup>Ct 10-20<sub>3</sub>:11検体全て、また<sup>1</sup>Ct 20-30<sub>3</sub>:15検体の内11検体であり、それらの検体のCt値は、23.54以下であった。それ以上のCt値ではLC-QqQ-MS分析ではSARS-CoV-2検出と判断できなかった。各検体

表4 SARS-CoV-2検出検体及びその特異的ペプチド一覧

Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide	Sample	Date site of peptide		
1	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	6	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	10	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	14	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	18	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK	22	NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK
2	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	6	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	10	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	14	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR SFIEDLLFNK	18	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK DOVLLNK	24	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR
3	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	7	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	11	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK	15	NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK ATNVTQAFGR DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK	20	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR		
4	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	8	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	12	NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR	17	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR	21	DGRVATEGALNTPK NFANNAIVLQ.PQGGTTLPK LNQLESK ATNVTQAFGR IGMEVTPSGTWLTYTGAIK DOVLLNK ADETQALPQR DQTVTLPAADLDFSK GWIFGTTLDISK FLPFQGFGR		



A:Recombinant NCAP spiked VTM sample (4 fg/uL), B:Negative patient sample., C:Positive patient sample 7.

図6 代表的なSARS-CoV-2特異的ペプチドマーカにおけるMRMクロマトグラム

において検出されたペプチド一覧を表4に示す。また、図6にNCAP組換えタンパク質を添加したVTMサンプル、RT-qPCRで陰性検体(Ct値:>40). 及び陽性判断された検体7 (Ct値=18.61)のMRMクロマトグラムを示す。

(2) LC-QqQ-MS分析データとRT-qPCRとの比較

LC-QqQ-MS分析で検出された22検体(Ct値:14.83-23.54)について、検出された各ペプチドピーク面積の合計値のLog2値(log2\_SumAreas)とRT-qPCRのCt値の相関性を検証した(図7 A)。その時の相関係数(r)は、 $r=-0.636$ と相関性があることが確認された。更に、本研究における患者鼻咽頭ぬぐい液の保存液は、VTM以外にPBSもしくは生理食塩水(検体1, 4, 8, 11, 13, 14, 17, 20, 21, 24)が確認され、予備試験で組換えタンパク質を用いたLC-QqQ-MS分析においてバックグラウンドノイズも異なることから、保存液別に相関性についても検証した(図7 B)。その結果、保存液としてVTMを用いた検体グループ(Ct値:16.43-22.81)での相関係数は、 $r=-0.821$ 、PBSもしくは生理食塩水を用いた検体グループ(Ct値:14.83-23.54)では、 $r=-0.863$ と非常に高い相関性が確認された。

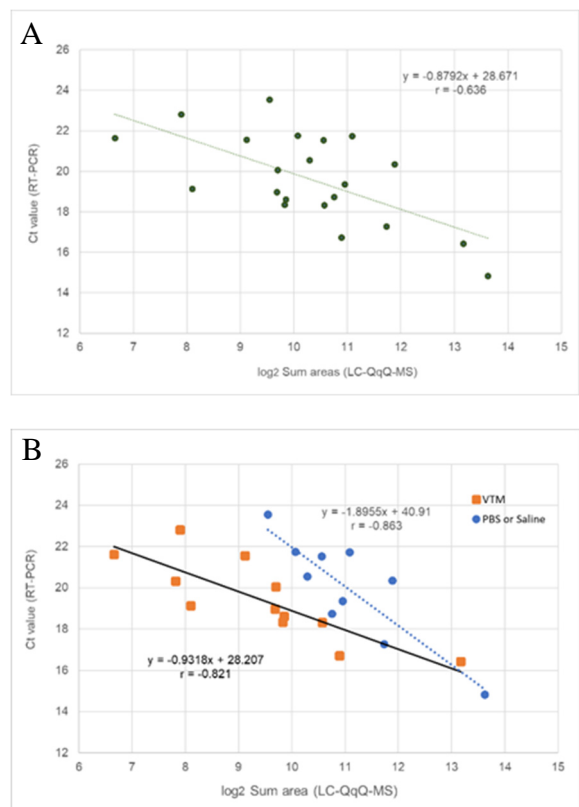


図7 NCAPにおけるLC-QqQ-MSとRT-qPCRとの相関 (A:22検体の相関、B:保存液別相関)

4 SARS-CoV-2変異への適用可能性

本研究で選択されたSARS-CoV-2検出ペプチドマーカー11種について、現在確認されている変異株におけるアミノ酸置換について探索した。その結果、NCAP由来の3ペプチドマーカーについて変異株検出の可能性がみいだされた(表5)。

表5 ペプチドマーカーとSARS-CoV-2変異株およびNCAPにおける変異部位

Peptide maker	SARS-CoV-2 variant	Mutation position on NCAP
N <sup>P</sup> ANNAIVLQLPQGTTLPK	BA4(Omicron)	P151S
IGMEV <sup>I</sup> P <sup>S</sup> GTWLTYYTGAIK	B.1.616	T325I
	AY5	S327L
A <sup>D</sup> ETQALPQR	B.1.617.1 B.1.617.2 and AY(Delta) B.1.617.3	D377Y

LC-QqQ-MS分析でSARS-CoV-2検出と判断された22検体のうち、表5に該当する変異株検体はSample 1、3及び15のDelta株であった。

そこで、NCAPの377位のアミノ酸をD(アスパラギン酸)からY(チロシン)に置換されたDelta株変異ペプチドである『AYETQALPQR』のLC-QqQ-MS分析条件をSkylineで再計算し、Sample 1、3について再度LC-QqQ-MS分析し、SARS-CoV-2変異への適用可能性を検証した。その結果、Sample 1、3においては、従来株由来の組換えNCAPとSample 13(Omicron株)で確認される『ADETQALPQR』ペプチドピークは検出されず、Delta株変異特有の『AYETQALPQR』のペプチドピークが検出された(図8)。

考 察

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2)は、重症呼吸器疾患であるコロナウイルス病2019(COVID-19)の原因物質であり、その検出手法のゴールドスタンダードは、RT-qPCRである。しかしながら、それを補完する検出技術の開発も必要であり、そのひとつが、プロテオミクス手法による質量分析(MS)である。

我々は、地方衛生研究所で残留農薬分析、違法薬物分析及び健康危機管理における原因物質特定等の理化学分野で汎用的に使用されている2種のLC-MS(LC-QTOF-MS、LC-QqQ-MS)を用い、患

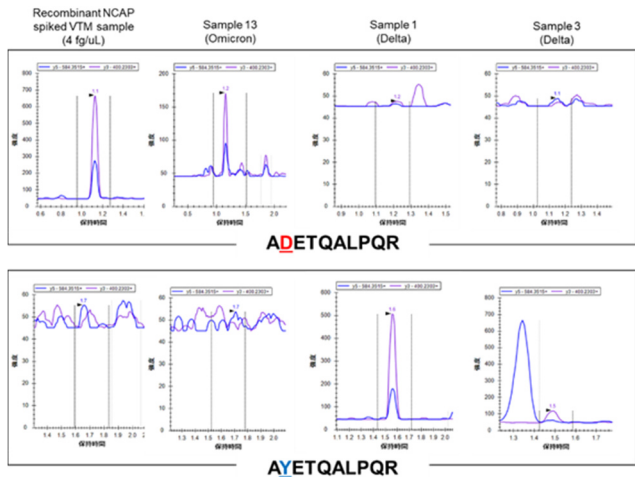


図8 Delta株 NCAP中変異ペプチドのLC-QqQ-MSクロマトグラム

者鼻咽頭ぬぐい液中のSARS-CoV-2を構成するNCAP及びSPIKEタンパク質をRT-qPCRにおける遺伝子増幅や特殊な試薬を用いることなく、それらタンパク質中のSARS-CoV-2特異的ペプチドのマーカー11種をインシリコ解析と実分析を組み合わせ選別及び検証した。最終検証として、陰性検体を含む鼻咽頭ぬぐい液40検体を用いた。

その結果、RT-qPCR相当でCt値23.54以下の鼻咽頭ぬぐい液22検体からSARS-CoV-2特異ペプチドが複数確認され、ウイルス検出陽性と判断できた。また、変異株の適用性検証の結果、ペプチドマーカーの一種『ADETQALPQR』がDelta株変異の検出が可能であった。

現状、陰性判断としてはRT-qPCRでCt値が40以上であり、感染能力の目安としての様々な報告<sup>10)-14)</sup>では、Ct値30~35付近で考察がされている。例えば、Obaらの報告<sup>15)</sup>では、社会活動範囲の目安としてCt値30未満で他者への感染リスクが極めて高いと考え、速やかに隔離及び接触者追跡を開始し、検査を受けた人には医療機関を受診し、必要な治療を受けるよう指導すると提唱している。現状、これらの点においても感度面で課題があると思われるが、Hoberらは、検体保存液にPBSを用い、SARS-CoV-2 NCAP特異的抗体を用い、NCAPタンパク質を精製、濃縮し、LC-QqQ-MS分析を実施することでCt値21~34の範囲で定量的に検出できるとしている<sup>5)</sup>。今後、試料量の増加や前処理法の改良、濃縮などの高感度化への更なる検討が必要と思われるとともに感染拡大防止と社会経済活動を両立させるための実質的なCt値の調査等も必要であると考えられる。しかしながら、ウイルスタンパク質を増幅や蛍光色素などを用いず、

直接イオン化し検出できるターゲットプロテオミクス LC-MS法は、RT-qPCRを補完する技術の一つとして期待でき、公衆衛生学分野だけでなく、その他の分野でも応用可能であると思われる。

### 参考文献

- 1) Bart Van Puyvelde. *et al.*, Cov-MS: A Community-Based Template Assay for Mass-Spectrometry-Based Protein Detection in SARS-CoV-2 Patients., *JACS Au*. 2021 Jun 28;1(6):750-765.
- 2) Benjamin C. Orsburn. *et al.*, In silico approach toward the identification of unique peptides from viral protein infection: Application to COVID-19. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.980383>.
- 3) Conor Jenkins, Ben Orsburn. In silico approach to accelerate the development of mass spectrometry-based proteomics methods for detection of viral proteins: Application to COVID-19. 2020. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.08.980383>.
- 4) Ofir Schuster. *et al.*, Specific and Rapid SARS-CoV-2 Identification Based on LC-MS/MS Analysis. *ACS Omega*. 2021 Jan 26;6(5):3525-3534.
- 5) Andreas Hober. *et al.*, Rapid and sensitive detection of SARS-CoV-2 infection using quantitative peptide enrichment LC-MS analysis. *Elife*. 2021 Nov 8;10:e70843.
- 6) COVID-19 を理解する : LC-MS に基づく SARS-CoV-2 検出のためのマルチプルリアクションモニタリングのトランジション選択および最適化戦略, Waters アプリケーションノート, 2020. 8.
- 7) COVID-19 を理解する : マルチプルリアクションモニタリングに基づく SARS-CoV-2 分析のために LC-MS 検出のダイナミックレンジの最大化, Waters アプリケーションノート, 2020. 8.
- 8) Praveen Singh. *et al.*, A rapid and sensitive method to detect SARS-CoV-2 virus using targeted-mass spectrometry. *J Proteins Proteom*. 2020;11(3):159-165.
- 9) Christian Ihling. *et al.*, Mass Spectrometric Identification of SARS-CoV-2 Proteins from Gargle Solution Samples of COVID-19 Patients. *J Proteome Res*. 2020 Nov 6;19(11):4389-4392.
- 10) Daniel F Gudbjartsson. *et al.*, Spread of SARS-CoV-2 in the Icelandic Population., *N Engl J Med*. 2020 Jun 11;382(24):2302-2315.
- 11) Bernard La Scola. *et al.*, Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards., *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020 Jun;39(6):1059-1061.
- 12) Anika Singanayagam. *et al.*, Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020., *Euro Surveill*. 2020 Aug;25(32) : 2001483.
- 13) Bullard J, *et al.* Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. *Clin Infect Dis* 2020 Dec 17;71(10):2663-2666.
- 14) Gniazdowski V, *et al.* Repeat COVID-19 molecular testing: correlation of SARS-CoV-2 culture with molecular assays and cycle thresholds. *Clin Infect Dis*. 2020 Oct 27.
- 15) Junna Oba, *et al.* RT-PCR Screening Tests for SARS-CoV-2 with Saliva Samples in Asymptomatic People: Strategy to Maintain Social and Economic Activities while Reducing the Risk of Spreading the Virus. *Keio J Med*. 2021 Mar 19.



## Evaluation of a novel SARS-CoV-2 detection method based on *in silico* prediction and LC-MS analysis

Kazunari TSUJIMURA, Fumiaki MATSUMOTO, Akira YOSHIKAWA and Toshitsugu TAGURI

Targeted proteomics, which involves the detection of specific peptides using *in silico* prediction and LC-MS analysis, has recently been proposed as a complementary method to RT-qPCR for SARS-CoV-2 detection. To assess the feasibility of this method, we tested 40 nasopharyngeal swab samples, including those from positive patients for SARS-CoV-2 infection, using RT-qPCR for viral RNA and high-performance liquid chromatography-mass spectrometer (LC-MS), which is commonly used at Public Health Institutes of Japan, for viral protein-derived peptides. The nucleocapsid protein (NCAP) and Spike protein were selected as the viral proteins of interest for targeted proteomic analysis. SARS-CoV-2-specific peptides were detected in 22 specimens with Ct values of 23.54 or less, which is consistent with the RT-qPCR results. The correlation study between “log<sub>2</sub>\_SumAreas” values obtained from LC-MS analysis of clinical specimens stored in different solutions and Ct values obtained from RT-qPCR revealed a strong negative correlation for specimens stored in virus transport solution ( $r = -0.821$ ) and for those in saline or Phosphate-Buffered Saline (PBS,  $r = -0.863$ ). LC-MS analysis also detected the D377Y mutation of NCAP in the Delta strain. Although the sensitivity of the technique needs to be improved for future applications in negativity testing, it is expected to be one of the complementary techniques to RT-qPCR for directly targeting viral proteins. The technique may also be applicable to other viruses besides SARS-CoV-2.

Key words: *in silico* analysis, Targeted proteomics, LC-MS, SARS-CoV-2, RT-qPCR, COVID-19