

■受領No.1311

医療、衛生、学術への応用を志向した ウイルス酵素イメージング技術の開発

代表研究者

高橋忠伸

静岡県立大学 大学院薬学研究院 生化学講座 准教授

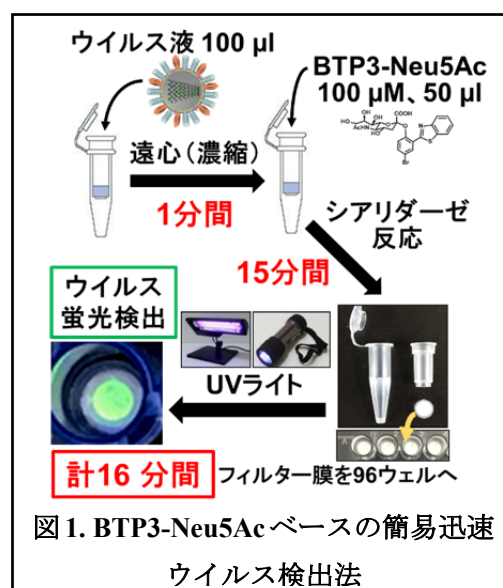


1. 研究目的

A型・B型インフルエンザウイルスや一部のパラミクソウイルス、そしてこれらの感染細胞には、糖鎖末端に存在するシアル酸 (Neu5Ac) を切断する酵素「シアリダーゼ」が発現している。研究代表者らは、これらのウイルスや感染細胞のシアリダーゼ活性を蛍光イメージングするプローブ『BTP3-Neu5Ac』を開発してきた (Takahashi, *Sci. Rep.* 4, 4877, 2014; Takahashi, *Virology* 464-465, 206-212, 2014; Takahashi, *Biol. Pharm. Bull.* 37, 1668-1673, 2014; Takahashi, *J. Virol. Methods* 209, 136-142, 2014; Takahashi, *Biol. Pharm. Bull.* 38, 1214-1219, 2015; Takahashi, *PLoS One* 10, e0144038, 2015)。また、抗インフルエンザ薬 (シアリダーゼ阻害剤) の存在下でBTP3-Neu5Acを反応させると、薬剤耐性インフルエンザウイルスやその感染細胞のシアリダーゼ活性が維持されることを利用して、薬剤耐性ウイルス感染細胞を選択的に蛍光イメージングし、薬剤耐性株を高効率に分離する方法を確立した (Takahashi, *PLoS One* 11, e0156400, 2016)。

感染者数、検査業務の従事者、研究者人口が極めて多いインフルエンザウイルスについて、医療、衛生検査、学術研究をマーケットに見据えて、蛍光イメージングプローブの画期的な応用技術を開発したい。医療・衛生検査への応用として、抗体に依存しないことから抗原性が大きく変化した新型ウイルスを検出可能で、現行の4種類の各抗イン

フルエンザ薬 (ザナミビル、オセルタミビル、ラニナミビル、ペラミビル) に対する耐性化を同時に判定できる簡易迅速インフルエンザ検出法を開発する。学術研究への応用として、感染細胞内のウイルスシアリダーゼ活性の局在性をイメージングする画期的解析手法を確立する。本研究は、これらの目標を達成するためにBTP3-Neu5Acベースの高感度、簡易、迅速なウイルス検出法の開発や、BTP3-Neu5Acをプロトタイプとするプローブ自体の構造改良により、画期的なシアリダーゼ蛍光イメージングの高性能化技術の開発を実施した。本研究成果は、シアリダーゼ蛍光プローブの高性能化における改良基盤、インフルエンザウイルス検出と共に薬剤耐性を同時判定する画期的検出法、およびウイルス感染におけるシアリダーゼ機能研究の「ブレイクスルー」技術を提供する。



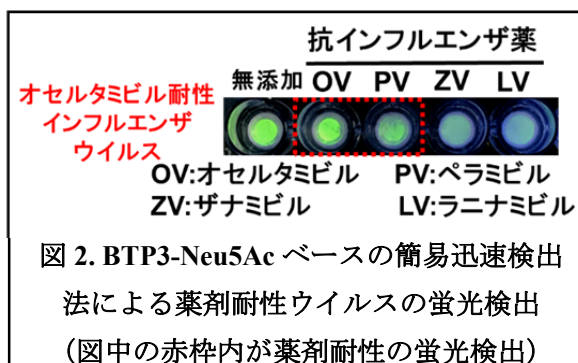
2. 研究概要

2.1. 薬剤耐性を同時検出するインフルエンザウイルスの簡易迅速検出法の開発

現在、薬剤耐性検出の主流であるオセルタミビル耐性H275Y置換の遺伝子検出法は、検査対象外の遺伝子配列や未知の薬剤耐性変異には対応できない。薬剤耐性ウイルスを簡易、迅速、高感度に検出できれば、薬剤耐性ウイルスの早期流行情報の取得、臨床における薬剤選択、未知の薬剤耐性変異の発見に貢献する。BTP3-Neu5Acの使用をベースとして、市販のインフルエンザ診断薬と同等な感度をめざす簡易迅速検出法を確立することにした。

ウイルス検出感度の向上と検出時間の短縮のため、タンパク質遠心濃縮膜フィルターを使用したウイルスの濃縮と、シアリダーゼ反応におけるカルシウムイオン濃度、pH、温度の最適化を行った。最終的に、ウイルス遠心濃縮に1分間、BTP3-Neu5Acを添加後のシアリダーゼ反応に15分間の計16分間で、携帯型UVライトの照射によりフィルター膜上のウイルスが蛍光検出された (図1)。

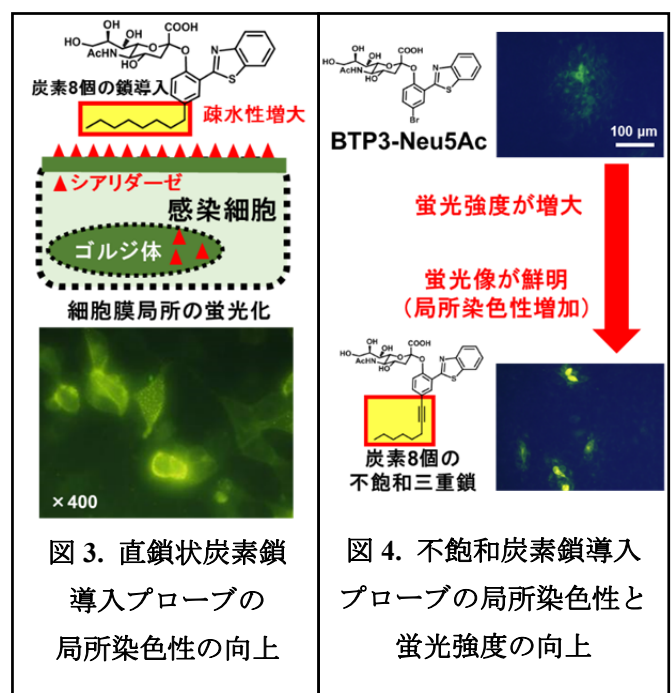
BTP3-Neu5Acベースの簡易迅速検出法により、薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出を試みた。10 μM抗インフルエンザ薬 (ザナミビル、オセルタミビル、ラニナミビル、ペラミビル) の存在下でBTP3-Neu5Acを反応させると、通常の薬剤感受性ウイルスのシアリダーゼ活性は阻害されて蛍光化しないが、薬剤耐性ウイルスのシアリダーゼ活性は阻害されずに蛍光化できる。BTP3-Neu5Acベースの簡易迅速検出法は、オセルタミビル耐性ウイルスのオセルタミビル耐性と新たにペラミビル耐性を蛍光検出できた (図2)。



2.2. シアリダーゼ蛍光イメージングプローブの性能改良基盤の確立

感染細胞内の局所的なシアリダーゼ活性を追跡するため、BTP3-Neu5Acの局所染色性を向上させたい。BTP3-Neu5Acの局所染色性は、BTP3の疎水性に大きく影響を受ける。BTP3の疎水性を増大させるため、BTP3構造のBr部位に直鎖状炭化水素鎖を導入し (広島国際大学薬学部池田潔先生と大坪忠宗先生との共同研究)、A型インフルエンザウイルス感染細胞 (感染16時間) に反応させた。炭素10個以上の鎖導入はイメージング性能自体が減少した。炭素8個の鎖導入が、シアリダーゼの局在する感染細胞表面を最も明確にイメージングした (図3)。

BTP3構造に不飽和三重結合鎖を導入して蛍光性に影響する共役構造を改良し、蛍光強度の増大と蛍光検出の高感度化を試みた。炭素8個の三重結合鎖の導入は、蛍光強度が増大し、感染細胞の蛍光像が鮮明になった (図4)。感染4~6時間後、シアリダーゼは細胞内ゴルジ体に局在している。炭素鎖導入プローブでは、感染細胞内のゴルジ体と思われる部位が蛍光化された。BTP3-Neu5Acの生細胞内移行性は十分ではなかったが、炭素鎖導入によるBTP3構造の疎水性増大は生細胞内移行性の向上をもたらした。



3. 発表 (研究成果の発表)

1. 高橋忠伸、紅林佑希、大坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆：薬剤耐性インフルエンザの蛍光検出単離法、*BIO Clinica* 33 (3), 38-44 (2018)
2. 高橋忠伸、大坪忠宗、池田 潔、和田裕久、紅林佑希、南 彰、鈴木 隆：薬剤耐性インフルエンザウイルスの簡易検出分離法の開発、USフォーラム2017 (静岡)、2017年4月20日
3. 高橋忠伸：インフルエンザウイルス感染とシアル酸分子種、第31回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム シンポジウムI「糖鎖とウイルス」セッション (静岡) (招待講演)、2017年6月8日
4. 加藤大介、紅林佑希、高橋忠伸、鈴木 隆：シアリダーゼ蛍光イメージング剤「BTP3-Neu5Ac」を用いた簡易・迅速・高感度ウイルス検出系の確立、第65回日本ウイルス学会学術集会 (大阪)、2017年10月24日
5. 高橋忠伸：インフルエンザウイルス形成を制御するスルファチド結合機構の解明と感染細胞を蛍光イメージングするシアリダーゼ蛍光化剤の紹介、薬力学研究会 講演会 (東京) (招待講演)、2018年2月8日
6. Daisuke Kato*, Yuuki Kurebayashi*, Tadanobu Takahashi* (*These authors contributed equally to this work), Tadamune Otsubo, Hitomi Otake, Mika Yamazaki, Chihiro Tamoto, Akira Minami, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki. An easy, rapid, and sensitive method for detection of drug-resistant influenza virus by using a sialidase fluorescent imaging probe, BTP3-Neu5Ac. *PLoS One* 13(7), e0200761 (2018)
7. 高橋忠伸、紅林佑希、加藤大介、大坪忠宗、池田 潔、南 彰、鈴木 隆：薬剤耐性インフルエンザの単離法と簡易高感度検出法、*BIO Clinica* 33 (9), 98-103 (2018)7