

ウイルス種や薬剤耐性を判定可能な高性能シアリダーゼ蛍光イメージング剤の開発

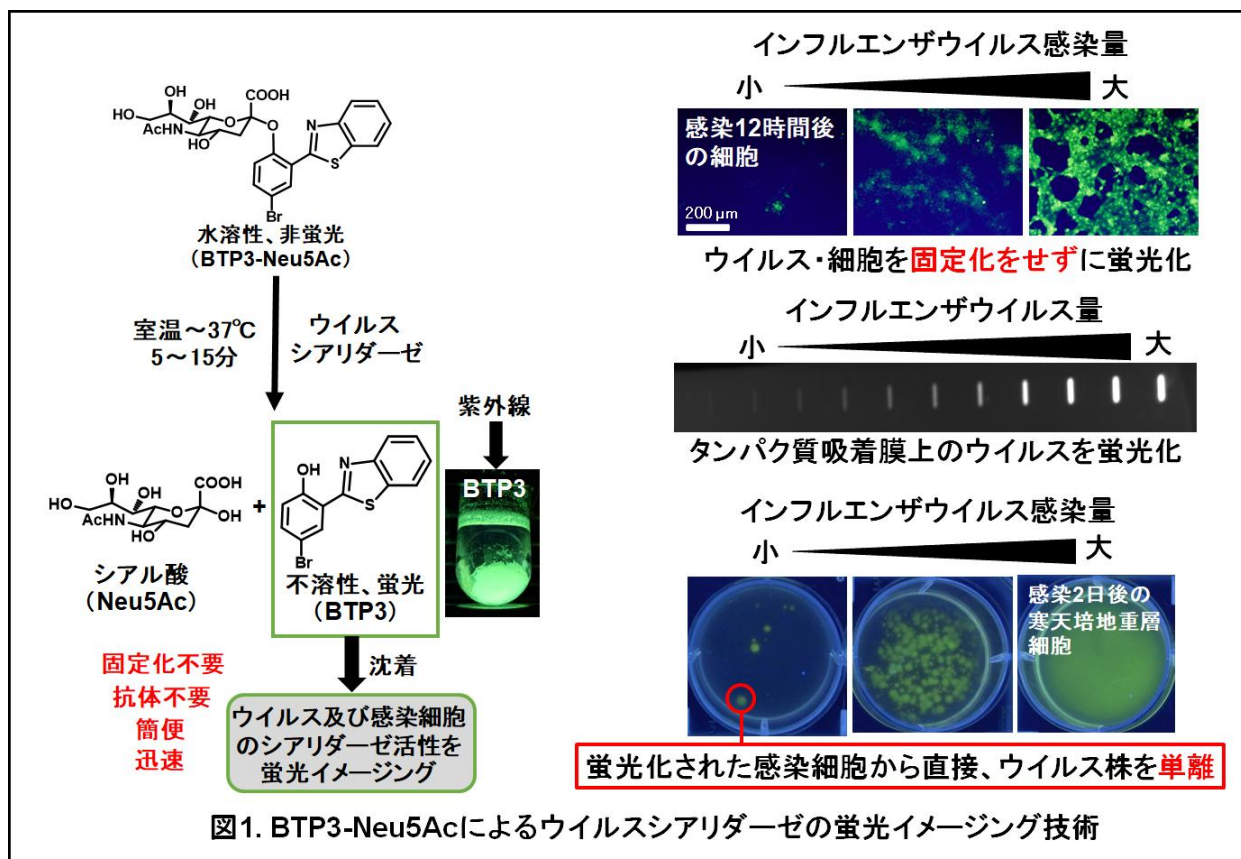
静岡県立大学 大学院薬学研究院

紅林 佑希

1. はじめに

インフルエンザウイルスは毎年季節性の流行を起こし、健康被害のみならず社会的・経済的に多大な影響を及ぼす。また、数十年に一度の頻度で起こる、他の宿主からヒトへの感染性を獲得した新型ウイルスのパンデミックも大きな問題となる。既存の治療薬やワクチンは存在するものの、その主な目的は重症化予防や症状の緩和であり、薬剤耐性の問題も生じていることから、今なお新たな治療薬の開発や、ウイルス流行状況と薬剤耐性化のサーベイランスといった警戒・対策が求められている。

申請者はこれまで、インフルエンザウイルス等のウイルスシアリダーゼの機能解析を行ってきた。申請者はウイルスシアリダーゼの研究の過程で A 型および B 型インフルエンザウイルスが持つシアル酸切断酵素「シアリダーゼ」を高感度、迅速（10 分以内）、簡便（試薬を添加するのみ）に蛍光可視化する試薬「BTP3-Neu5Ac」を開発した¹⁾ (図 1)。BTP3-Neu5Ac は水溶性の非蛍光物質であるが、ウイルスのシアリダーゼ活性によりシアル酸 (Neu5Ac) が切断されると、不溶性のベンゾチアゾリルフェノール蛍光誘導体 BTP3 が生成し酵素活性部位に沈殿・集積する。BTP3-Neu5Ac は、抗体反応や固定化などの余分な操作を必要とせず、試薬を添加するだけで迅速にウイルスやその感染細胞を蛍光可視化することを可能にした。



さらに申請者は、BTP3-Neu5Ac によりおたふくかぜ原因ウイルスのムンプスウイルスや小児ウイルス性肺炎の原因となるヒトパラインフルエンザウイルス等の様々なシアリダーゼ保有ウイルスの検出、薬剤耐性インフルエンザウイルスの選択的な検出分離技術の開発、誘導体化による感度向上型蛍光イメージング剤の開発を行い、シアリダーゼの蛍光イメージングによるウイルス検出技術を確立・発展させてきた²⁻⁷⁾。

一方で、BTP3-Neu5Ac をウイルス検出試薬として実用化するための懸念として特異性の問題が挙げられる。BTP3-Neu5Ac はインフルエンザウイルスをはじめ、ムンプスウイルスやヒトパラインフルエンザウイルスなど、ウイルス種に依らず全てのウイルスシアリダーゼと反応するためウイルスを特異的に検出することはできない。ウイルスシアリダーゼはウイルス種や型・亜型・株等の違いに依って酵素タンパク質のアミノ酸配列は異なり、本来の基質である Neu5Ac を認識する結合ポケットの構造はそれぞれ少しずつ異なっていることが知られている。例えばインフルエンザの治療薬として利用されるシアリダーゼ阻害剤はインフルエンザウイルスのシアリダーゼに対し特異的に反応し、ムンプスウイルスなど他のウイルスシアリダーゼに対する阻害作用は著しく低い。このことから、蛍光プローブの構造を部分的に改変することで、ウイルスに対する特異性を付与することが可能ではないかと考えられる。そこで本研究では、BTP3-Neu5Ac に対する構造改変を行い、ウイルス種や薬剤耐性ウイルスに対する特異性の付与と蛍光イメージング性能の向上を図ることとした。

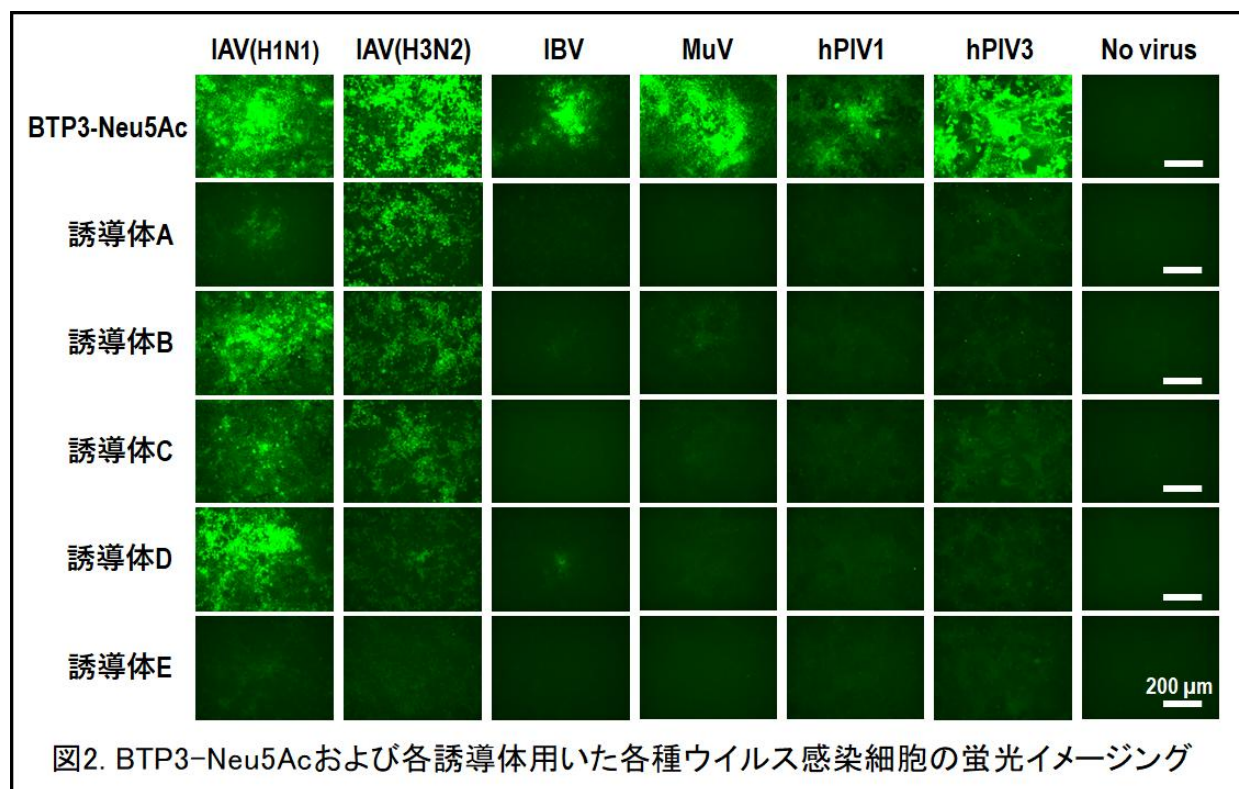
2. インフルエンザウイルス特異的なシアリダーゼ検出プローブの開発

臨床におけるインフルエンザウイルス検査で用いられる迅速抗原診断キットは A・B 型を分けて診断可能であるが、IAV の H1N1 型、H3N2 型といった亜型の区別はできない。また、ウイルスの NP 抗原性の変化により検出感度が低下または消失する可能性がある。RT-PCR 法は感度・特異度ともに良好な検出法であるが、特殊な機器が必要で手技が煩雑であり、また迅速性に欠ける。そこで、季節性インフルエンザ流行期における流行状況の把握や疫学的データの収集に資するインフルエンザウイルス特異的なシアリダーゼ蛍光剤の探索を行うとともに、A・B 型、あるいは H1N1 型、H3N2 型といった亜型の区別可能なインフルエンザウイルス特異的なシアリダーゼ蛍光剤の開発を目指し、蛍光プローブの誘導体化とその評価を実施した。

蛍光プローブの性能評価はウイルス感染細胞の蛍光イメージング解析により実施した。細胞に各種ウイルスを感染させたのち 24~48 時間後 37 度で静置し、感染細胞表面に各種ウイルス由来のシアリダーゼが発現するまで培養を行った。培養した感染細胞に対し、BTP3-Neu5Ac およびその誘導体を加えた。感染細胞上のシアリダーゼと蛍光プローブが反応することで感染細胞が蛍光色素により染色されるため、感染細胞の蛍光染色像を蛍光顕微鏡により観察して各ウイルスシアリダーゼに対する特異性の評価を行った。

BTP3-Neu5Ac および誘導体 A-E を用いた感染細胞の蛍光イメージング結果を図 2 に示す。BTP3-Neu5Ac を使用した場合はインフルエンザウイルスのみならずムンプスウイルスやヒトパラインフルエンザウイルス感染細胞も蛍光イメージングされた。一方で、誘導体 A-E はインフルエンザウイルス感染細胞を蛍光イメージングしたが、他のウイルス感染細胞に対する反応性は著しく低かった。同様の傾向はウイルスシアリダーゼ発現細胞やウイルスとの直接反応でも見られ、構造改変によりウイルス特異性を改変することができることが分かった。

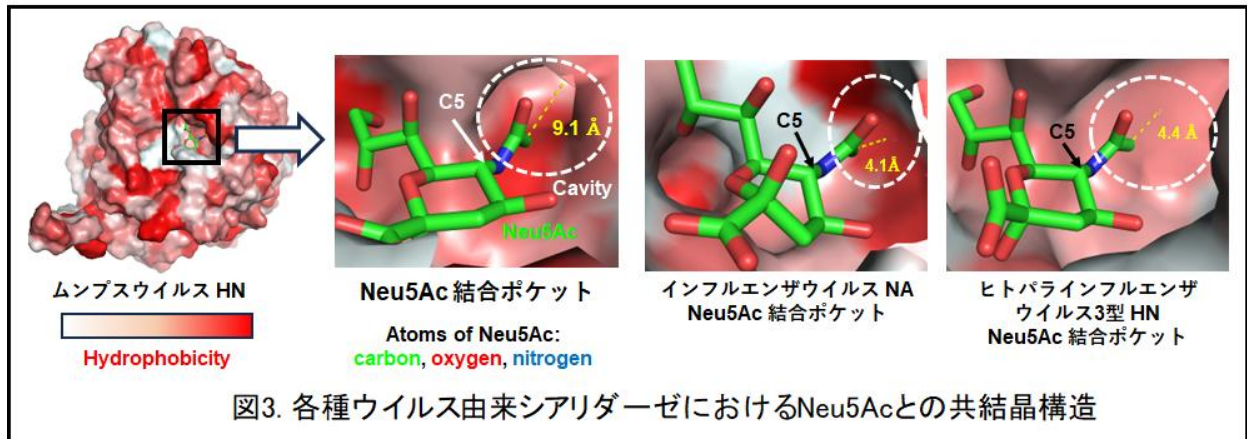
さらに、興味深いことに誘導体の種類によってインフルエンザウイルスの中でも型や亜型の違いで反応性に大きな差が見られることも確認された。今後、これら誘導体の構造を基にさらなる誘導体化を試行することで、インフルエンザウイルス特異的な蛍光プローブや、インフルエンザウイルスの型や亜型に対する識別性を持つ蛍光プローブの開発へと繋げていきたい。



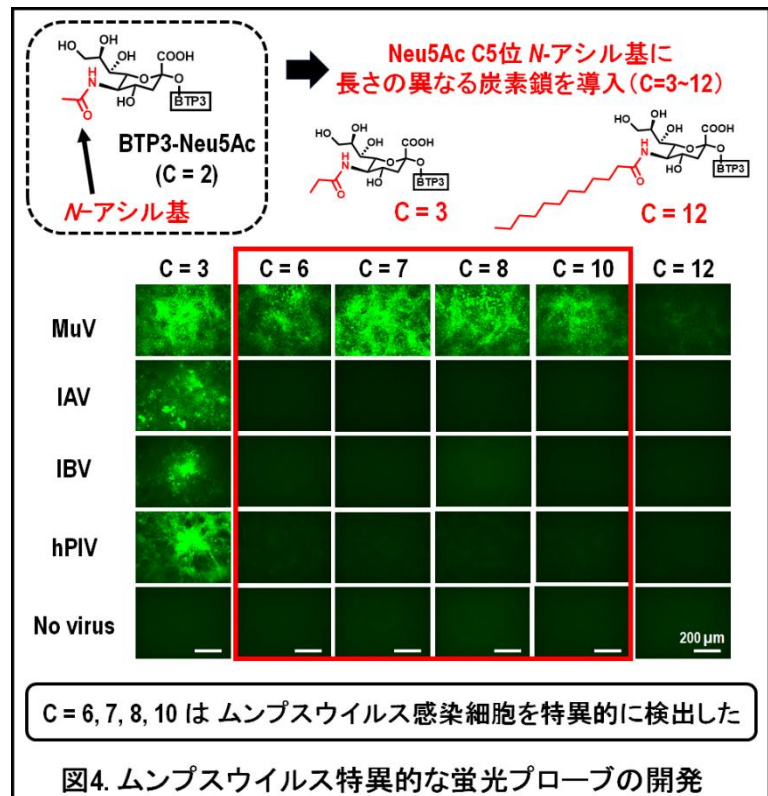
3. ムンプスウイルス特異的なシアリダーゼ検出プローブの開発

ムンプスウイルスは流行性耳下腺炎（おたふく風邪）の原因ウイルスであり、全世界で年間50万人が流行性耳下腺炎と診断されている。ムンプスウイルス感染者の60～70%では耳下腺炎を起こし、発症頻度は低いものの難聴、不妊などの重篤な後遺症を引き起こす場合もある。ムンプスウイルス感染性難聴は全患者の0.1%に発症しており、年齢の増加に伴い発生率は増加し、予後も不良である。一方で、臨床や衛生検査で簡易に利用可能な診断薬・検査薬は無いのが現状である。

ムンプスウイルスはウイルスエンベロープ膜上にヘマグルチニン-ノイラミニダーゼタンパク質（HN）とフュージオンタンパク質（F）を持ち、HNがこのウイルスのシアリダーゼ活性の本体となる。ムンプスウイルスに対する特異性を付与したシアリダーゼ検出剤を開発するため、既報のムンプスウイルスHNと α 2,3シアリルラクトースの共結晶構造を詳細に解析したところ、Neu5Ac C5位上のN-アセチル基近傍に疎水性が高く立体的に大きな空洞を確認した（図4）。興味深いことに同様の解析をインフルエンザウイルスのNAやヒトパラインフルエンザウイルスHNの結晶構造データを用いて試みたところ、いずれも同位置の空洞の大きさが小さいことがわかった。この構造的違いを利用することでムンプスウイルスに特異的に反応する蛍光プローブを開発できるのではないかと考え、BTP3-Neu5Ac構造中のNeu5Ac C5位に疎水性の高い構造を導入した誘導体を合成し、ムンプスウイルスや他のウイルスのシアリダーゼに対する反応性を比較することとした。



3種のウイルスの中でムンプスウイルスシアリダーゼのみに見られた Neu5Ac C5 位上の N-アセチル基近傍に見られた疎水性の高い立体的に大きな空洞にフィットする構造を導入することで、ムンプスウイルス特異性を付与できるのではないかと考えた。そこで BTP3-Neu5Ac の Neu5Ac 構造に対し、C5 位の N-アセチル基の炭素鎖を伸ばした N-アシル基に改変した蛍光プローブを合成し、各種ウイルス感染細胞に対する蛍光イメージング性能を評価した。結果を図4に示す。炭素数3に改変した蛍光プローブでは BTP3-Neu5Ac と同様にインフルエンザウイルスやヒトパラインフルエンザウイルスに対しても反応性を示した。炭素数6, 7, 8, 10に改変した蛍光プローブでは、ムンプスウイルス感染細胞のみが蛍光イメージングされ、インフルエンザウイルスやヒトパラインフルエンザウイルス感染細胞は蛍光イメージングされなかった⁸⁾。さらに炭素数を増やした炭素数12の蛍光プローブはムンプスウイルス感染細胞の蛍光も著しく弱くなり、炭素数12以上に伸ばすことでウイルスシアリダーゼにプローブが嵌らなくなっている可能性が考えられた。MuV-HN と Neu5Ac の共結晶構造において、Neu5Ac C5 位方向にみられる HN 構造中の空洞は N-Acetyl 基上のメチル基炭素原子から空洞の最奥のアミノ酸 267D の側鎖カルボニル酸素まで 9.1 Å の奥行きが見られた。C-C 結合間は約 1.5 Å であり、直鎖状炭素鎖における折れ曲がりも考慮すると、MuV-HN 構造中の空洞には計算上およそ炭素数 7、8の直鎖状 N-アシル基が入り込むことができると推定される。空洞の大きさから推定される収容可能な N-アシル基の炭素数と本研究で得られた結果はおおよそ一致する。今後、今回開発した新型蛍光プローブやその更なる改良型プローブを利用することで、ムンプスウイルスに対する特異的な検出を可能とする臨床診断や衛生検査で利用可能な診断薬・検査薬の開発へと繋げていきたい。



4. インフルエンザウイルスの薬剤耐性を識別可能なシアリダーゼ検出プローブの開発

インフルエンザの治療薬の中で、現在国内で主に使われる5種の内4種はインフルエンザウイルスのシアリダーゼを阻害してウイルスの増殖を抑制する「シアリダーゼ阻害剤」である。近年、このシアリダーゼ阻害剤に対する薬剤耐性ウイルスが出現しており、公衆衛生上の問題となっている。

2007~2009年にかけて、オセルタミビル耐性ウイルスが日本を含めて世界中に感染拡大し、これ以降薬剤耐性ウイルスの監視強化と対策が求められている。現在、国内では4種類のシアリダーゼ阻害剤が抗インフルエンザ薬として使用されており、ある薬剤に耐性であっても別の薬剤は有効という場合が多いことから、薬剤耐性の判定は、同時に、有効な薬剤の選択につながる技術であり、薬剤耐性の迅速検出法は薬剤耐性ウイルスの監視のみならず防疫・治療対策にも大きく貢献することが期待される。

インフルエンザウイルスのシアリダーゼ阻害剤に対する薬剤耐性はNAタンパク質の変異により生じる。市販化されているシアリダーゼ阻害剤は全てシアリダーゼに対する競合阻害剤であり、これまで報告されているほとんどの薬剤耐性変異はNAの酵素活性ポケット内やその周辺で起こり、酵素活性ポケットの構造変化によりシアリダーゼ阻害剤との親和性を低下させることで薬剤耐性を獲得している。そこで、BTP3-Neu5Acの構造改変により薬剤耐性による酵素活性ポケットの構造の違いを見分ける蛍光プローブを創出できないかと考え、NAの薬剤耐性により反応性の異なる蛍光プローブの探索を行った。

新たに開発したいくつかの蛍光プローブを用いて薬剤感受性インフルエンザウイルスおよび薬剤耐性インフルエンザウイルス感染細胞に対する反応性を評価したところ、薬剤感受性インフルエンザウイルス感染細胞は蛍光イメージングできるが薬剤耐性インフルエンザウイルスの場合には蛍光イメージングが減弱する興味深い蛍光プローブが見られた。薬剤耐性を識別する蛍光プローブは薬剤耐性の検出における非常に強力なツールとなる可能性を持ち、衛生検査や臨床検査での幅広い利用が期待される。今後、見出した蛍光プローブの様々な薬剤耐性に対する識別能の評価やさらなる誘導體化と評価を行い、薬剤耐性の判定を可能とする蛍光プローブの確立へとつなげていきたい。

5. まとめ

本研究では、以前に開発したシアリダーゼの蛍光イメージング剤BTP3-Neu5Acを基に、その構造改変によりウイルスに対する特異性や薬剤耐性の識別能を付与した新型イメージング剤の開発を試みた。本研究により、インフルエンザウイルスに対する特異性を向上させた蛍光プローブを開発することができた。また、シアリダーゼを保有するウイルスの中でも、インフルエンザウイルスやヒトパラインフルエンザウイルスに反応せず、ムンプスウイルスを特異的に検出可能な蛍光プローブを開発することができた。さらに、インフルエンザウイルスの薬剤耐性の有無により反応性の異なる蛍光プローブを見出すことに成功し、インフルエンザウイルスの薬剤耐性を判定可能な画期的蛍光プローブの開発基盤を開発することができた。今後、これらプローブやその更なる改良体を用いてウイルス特異的な検出試薬や薬剤耐性を判定可能なインフルエンザウイルス診断薬の開発へと繋げていきたい。

謝辞

本研究は（公益財団法人）天野工業技術研究所、2025年研究助成を受けて実施されました。本研究の実施にあたり BTP3-Neu5Ac 誘導体を合成頂きました広島国際大学薬学部大坪忠宗教授、静岡県立大学薬学部 池田 潔客員教授に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kurebayashi Y*, Takahashi T* (*They contributed equally as first authors), Otsubo T, Ikeda K, Takahashi S, Takano M, Agarikuchi T, Sato T, Matsuda Y, Minami A, Kanazawa H, Uchida Y, Saito T, Kawaoka Y, Yamada T, Kawamori F, Thomson R, Itzstein MV, Suzuki T. Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells. *Sci. Rep.*, **4**, 4877 (2014)
- 2) Takahashi T, Takano M, Kurebayashi Y, Agarikuchi T, Suzuki C, Fukushima K, Takahashi S, Otsubo T, Ikeda K, Minami A, Suzuki T. Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 1214-1219 (2015)
- 3) Takahashi T, Agarikuchi T, Kurebayashi Y, Shibahara N, Suzuki C, Kishikawa A, Fukushima K, Takano M, Suzuki F, Wada H, Otsubo T, Ikeda K, Minami A, Suzuki T. Easy and Rapid Detection of Mumps Virus by Live Fluorescent Visualization of Virus-Infected Cells. *PLoS One*, **10**, e0144038 (2015)
- 4) Kurebayashi Y*, Takahashi T* (*They contributed equally as first authors), Tamoto C, Sahara K, Otsubo T, Yokozawa T, Shibahara N, Wada H, Minami A, Ikeda K, Suzuki T. High-efficiency capture of drug resistant-influenza virus by live imaging of sialidase activity. *PLoS One*, **11**, e0156400 (2016)
- 5) Kato D*, Kurebayashi Y*, Tadanobu Takahashi* (*They contributed equally as first authors), Otsubo T, Otake H, Yamazaki M, Tamoto C, Minami A, Ikeda K, Suzuki T. 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**, e0200761 (2018)
- 6) Kurebayashi Y*, Takahashi T* (*They contributed equally as first authors), Miura T, Otsubo T, Minami A, Fujita Y, Sakakibara K, Tanabe M, Iuchi A, Ota R, Ikeda K, Suzuki T. Fluorogenic probes for accurate in situ imaging of viral and mammalian sialidases. *ACS Chem. Biol.*, **14**, 1195-1204(2019)
- 7) Amano K*, Kurebayashi Y*, Takahashi T*(*They contributed equally as first authors), Narimichi Y, Otsubo T, Ikeda K, Minami A, Takeuchi H. Visualizing intracellular sialidase activity of influenza A virus neuraminidase using a fluorescence imaging probe. *J. Virol. Methods*, **323**, 114838 (2024)
- 8) Nairmichi Y*, Takahashi T*, Kurebayashi Y* (*They contributed equally as first authors), Otsubo T, Ikeda K, Saito Y, Minami A, Takeuchi H. Development of mumps virus-specific sialidase imaging probes through chemical modifications of sialic acid. *Sci. rep.*, **15**, 42005 (2025)