

整理番号	H29-J-066	報告者氏名	紅林 佑希
------	-----------	-------	-------

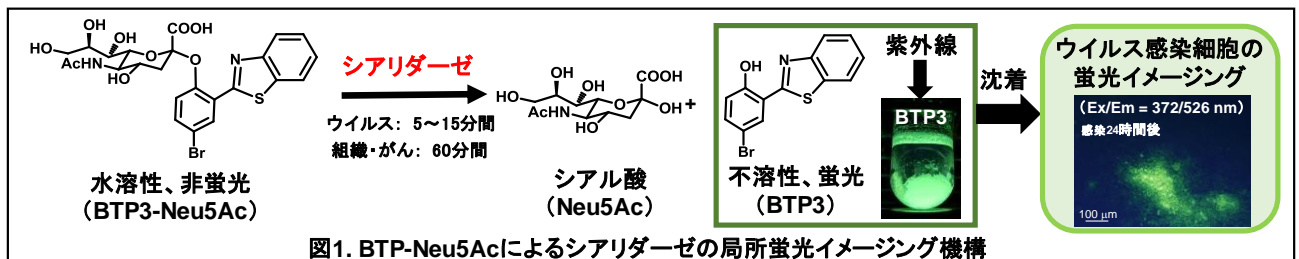
研究課題名

インフルエンザウイルス酵素の高精度ライブイメージング剤の開発

<代表研究者>	機関名：静岡県立大学大学院 薬学研究院	職名：助教	氏名：紅林佑希
<共同研究者>	機関名：広島国際大学薬学部	職名：教授	氏名：池田 潔
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：
	機関名：	職名：	氏名：

<研究内容・成果等の要約>

インフルエンザウイルスはシアリダーゼ酵素を有するウイルスであり、ウイルスシアリダーゼは細胞外でウイルスの遊離促進に働くことが良く知られている。近年、細胞内でもウイルスシアリダーゼが別の機能を示すことが示唆されているが、細胞内のシアリダーゼの働きは解析技術の乏しさから研究は進んでいない。申請者はシアリダーゼの活性を可視化する蛍光プローブ「BTP3-Neu5Ac」を開発しウイルスや感染細胞を可視化することに成功した(図1)が、BTP3の蛍光染色がわずかに拡散を示すために細胞内のシアリダーゼを高精度にイメージングするまでには至らなかった。



本研究では、BTP3-Neu5Acの蛍光部であるBTP3構造を改良することで、細胞内のウイルスシアリダーゼを高精度に蛍光イメージング可能な新規蛍光プローブの開発を目指した。BTP3構造に直鎖型炭化水素鎖を導入し、疎水性を向上させることで水溶液中での蛍光物質の拡散性を低下させ、高精度なイメージングを可能にすることを旨とした。炭化水素鎖の導入位置や不飽和度を変化させることで蛍光強度の向上が見られ、炭化水素鎖の鎖長を検討することで高精度イメージングに最適な導入炭化水素鎖の構造を決定した。改良型蛍光プローブはBTP3-Neu5Acと比較して蛍光イメージングの拡散が抑えられ、免疫染色法によるシアリダーゼの分布との高精度な一致が認められ、ウイルスシアリダーゼの高精度イメージングを達成することができた。

また、炭化水素鎖の導入により、細胞内のシアリダーゼを可視化することにも成功した。ウイルスシアリダーゼが細胞内のみで発現している感染4時間後に改良型蛍光プローブを用いてイメージングを行ったところ、細胞内のシアリダーゼを高精度にイメージング可能であった。今後、細胞内のシアリダーゼの活性をイメージングし、挙動解析を行っていくことで、ウイルスシアリダーゼの新たな機能の解明に繋げていきたい。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

口頭

- ・田邊桃子、紅林佑希、高橋忠伸、大坪忠宗、三浦知美、藤田優香、南彰、池田潔、鈴木隆：シアリダーゼを可視化する新規蛍光イメージング剤の開発、日本薬学会第139年会、千葉、平成31年3月23日
- ・三浦知美、紅林佑希、高橋忠伸、大坪忠宗、池田潔、南彰、鈴木隆：シアリダーゼの細胞内分布を可視化する新規蛍光イメージング剤の開発、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2018、静岡、平成30年11月4日

ポスター

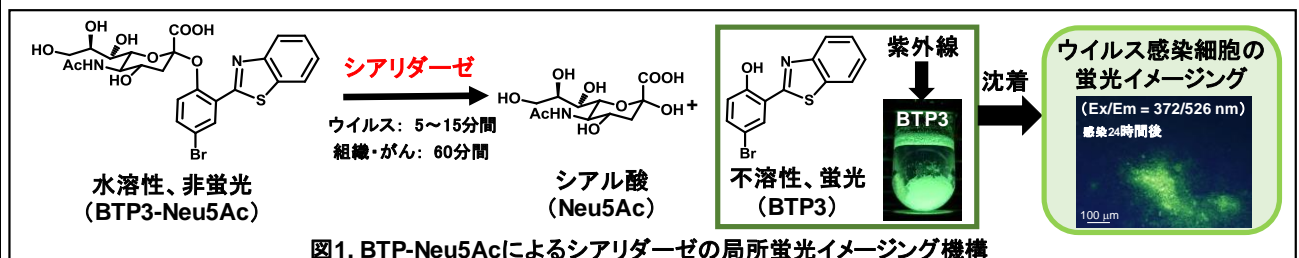
- ・紅林佑希：ウイルスの細胞内挙動を可視化する高性能バイオイメージング剤の開発、第24回コンニカミノルタ画像科学奨励賞授賞式・受賞テーマ概要報告、東京、平成30年2月26日
- ・三浦知美、紅林佑希、高橋忠伸、大坪忠宗、池田潔、南彰、鈴木隆：インフルエンザウイルス感染細胞を蛍光イメージングするプローブ BTP3-Neu5Ac の改良、日本薬学会第138年会、金沢、平成30年3月26日
- ・三浦知美、紅林佑希、高橋忠伸、大坪忠宗、池田潔、南彰、鈴木隆：シアリダーゼの細胞内局在を可視化する高精度イメージング剤の開発、糖鎖科学中部拠点第15回若手のカフォーラム、静岡、平成30年9月6日
- ・高橋忠伸、紅林佑希、三浦知美、加藤大介、大坪忠宗、南彰、池田潔、鈴木隆：インフルエンザウイルスの感染細胞やその薬剤耐性を検出するシアリダーゼ蛍光イメージングプローブの開発と性能改良、第92回日本生化学会大会、横浜、令和元年9月20日

誌上

- ・Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tomomi Miura, Tadamune Otsubo, Akira Minami, Yuka Fujita, Keiko Sakakibara, Momoko Tanabe, Ayano Iuchi, Ryohei Ota, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki. Fluorogenic Probes for Accurate in Situ Imaging of Viral and Mammalian Sialidases. ACS Chem. Biol. 14(6), 1195-1204 (2019)

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

インフルエンザウイルスは、ノイラミニダーゼ（NA）というシアリダーゼ酵素を有する。NAのシアリダーゼ活性は新生ウイルス粒子の宿主細胞からの拡散に重要であり、NAを標的としたシアリダーゼ酵素阻害薬がインフルエンザの治療薬として頻用されている。これまでのNA研究は細胞外での働きに注目したものが主であったが、近年NAの細胞内における未知の機能の存在が示唆されている。申請者はインフルエンザウイルスのシアリダーゼを検出可能な蛍光プローブ「BTP3-Neu5Ac」を開発した。水溶性非蛍光物質のBTP3-Neu5Acはシアリダーゼと反応すると不溶性蛍光物質のベンゾチアゾリルフェノール誘導体（BTP3）を生成する。BTP3はシアリダーゼ活性の存在部位に沈着して蛍光化する。BTP3-Neu5Acは、インフルエンザウイルスや感染細胞に豊富に発現する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）に蛍光イメージングする（図1）（Kurebayashi, Sci. Rep. 4, 4877, 2014）。BTP3-Neu5Acは生細胞内移行性が弱く、局所的な蛍光染色後は時間とともに蛍光物質BTP3の拡散性がやや見られる。そこで、本研究はシアリダーゼ活性プローブ「BTP3-Neu5Ac」の構造を改良することで、高感度化、蛍光イメージングの高精度化、生細胞内移行性の向上を目指した。将来的には、BTP3-Neu5Acやその改良体を利用して、感染細胞内のシアリダーゼ活性の挙動（局在性）を蛍光イメージングし、細胞内シアリダーゼ活性とウイルス感染に関わる細胞内シグナルとの関連を解析することを目指している。



BTP3-Neu5Acのシアリダーゼ反応後に生成するBTP3はやや拡散性があり、蛍光化後の時間経過とともに感染細胞内や周囲の非感染細胞も蛍光化される。この課題を克服するために、BTP3-Neu5Acの蛍光物質BTP3部分の疎水性を増加し、局所的な蛍光染色性の高精度化をめざした。BTP3-Neu5Ac構造中のBr部位付近への置換基導入は、BTP3の蛍光性を消失しないことが分かっている（Otsubo, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23, 2245-2249, 2013）。BTP3-Neu5AcのBr部位付近に炭化水素鎖を導入することで局所染色性の高精度化を達成した。また、生細胞内への移行性の向上も見られた。

そこで次に炭化水素鎖の付加位置および不飽和度を変化させたプローブを作り、蛍光イメージングへの影響について検討した。炭化水素鎖の導入位置や不飽和度の変化は蛍光イメージングの精度には大きな影響を示さなかったが、予想外の結果として炭化水素鎖の導入位置や不飽和度の違いに寄ってプローブの蛍光強度が変化する結果が得られた。まず、導入位置についてはBTP3のシアル酸に対してp位またm位の位置に炭化水素鎖を導入し、蛍光イメージングを行い、画像を比較した。その結果、m位に炭化水素鎖を導入したプローブの方がp位に炭化水素鎖を導入した場合と比較してやや強い蛍光強度を示すことが確認された。次に炭化水素鎖の不飽和度を変化させて、蛍光イメージングの結果を比較した。具体的には導入する炭化水素鎖を飽和型のアルカン、不飽和型のアルケン、アルキンの3種類とし、炭化水素鎖の長さは揃えた蛍光プローブを作製し蛍光イメージングの結果を比較した。意外なことに、炭化水素鎖の不飽和度の違いは蛍光強度に大きな影響を示した。アルキン型炭化水素鎖を導入したプローブでは非常に強い蛍光強度を示すことが分かった。蛍光強度が増大した理由は今のところ不明であるが、蛍光強度の強さはアルキン>アルケン>アルカンの順であり、不飽和度が大きいほど蛍光強度は増大することがわかった。このことから導入炭化水素鎖の不飽和度が蛍光強度に影響を与えていることが示唆された。

次に炭化水素鎖の炭素数を変えた蛍光プローブの合成を行った。炭素数5から12までの異なる炭素鎖数の直鎖型アルキンを導入した蛍光プローブを合成し、それぞれのプローブを用いて感染細胞の蛍光イメージングを行った。導入炭化水素鎖の長さが増えるほど、蛍光イメージングの拡散は減少し、

鮮明な蛍光イメージング画像が観察できるようになった。一方で炭化水素鎖の炭素数が 10 より増えた場合は、蛍光強度の減少が見られた。このことから導入する炭化水素鎖の炭素数は 9 が最適であることがわかった。以上の結果から改良型プローブとして、*m*位に炭素数 9 のアルキン型炭化水素鎖を導入したプローブを開発した。

この改良型プローブと初期型の BTP3-Neu5Ac との間で、いくつかの比較を行った。まず蛍光イメージングの強度に違いが見られたことから、蛍光波長の違いが生じているかの検討を行った。改良型プローブと BTP3-Neu5Ac との間で蛍光波長にはほとんど違いは見られず、蛍光イメージングの強度は蛍光プローブ自体の蛍光強度の違いによるものがあることがわかった。

次に、蛍光イメージングの精度を比較した。インフルエンザウイルス感染細胞および NA 発現細胞を BTP3-Neu5Ac および改良型蛍光プローブで蛍光イメージングし、蛍光プローブによる蛍光イメージング後に抗 NA 抗体による染色を行い、抗 NA 抗体による染色画像との比較を行った。BTP3-Neu5Ac では抗 NA 抗体による染色と比較して蛍光イメージングには拡散性が認められた。一方で、改良型蛍光イメージングによる蛍光イメージングでは、抗 NA 抗体による染色と同様の蛍光画像が得られ、抗体によるイメージングと同等の蛍光イメージングが可能であることがわかった。抗 NA 抗体による蛍光イメージングは高精度である一方でライブイメージングは出来ない。改良型蛍光プローブによる蛍光イメージングでは、抗 NA 抗体と同様の高精度でライブイメージングが可能であることがわかった。

さらに、炭化水素鎖の導入により疎水性を向上したことで蛍光イメージングの拡散性が抑えられたことから組織沈着性が高まっていると予想されたため、BTP3-Neu5Ac と改良型蛍光プローブによるイメージングを行った後に洗浄操作を行い、その後 37°C で細胞を培養して蛍光イメージングされた細胞がどうなるのかを比較した。BTP3-Neu5Ac では蛍光イメージングの後に洗浄を行い、37°C に細胞を置いておくと 5 分ほどで細胞を染めていた蛍光がほぼ消失してしまった。一方で、改良型蛍光プローブでは、洗浄後 30 分間 37°C で細胞を置いておいても、蛍光強度のわずかな減少が見られたのみで、細胞が蛍光イメージングされている様子が 30 分後でも観察できた。これは改良型蛍光プローブが高い組織沈着性を示し、蛍光イメージングが完了した後でも蛍光物質の拡散や減弱が起こりにくい化合物であることを示唆し、観察時における蛍光イメージングの状態保存がしやすい使い勝手の良い蛍光プローブとなっていることを示した。一方で BTP3-Neu5Ac が 5 分以内に蛍光を消失させたことは、一度蛍光イメージングを行った後でも洗浄により蛍光の除去が可能であり、同一の細胞を繰り返し蛍光イメージングすることが可能であることを示す。このことを利用して同一細胞において時間依存的なシアリダーゼ活性の変化を見たり、同一ウェル内でインフルエンザウイルスの感染がどのように広がっていくか時間を追って蛍光イメージングによる観察が可能となる可能性を示し、今後の応用法への検討が期待される結果であった。

また、シアリダーゼはウイルスのみならず、哺乳細胞をはじめとする動物に広く分布する酵素であり、当研究室ではこれまでに哺乳動物におけるシアリダーゼが神経組織やがん細胞において強く発現することや神経機能にシアリダーゼが関わることなどを報告してきた (Minami, PLoS One. 9(1):e81941, 2014; Minami, J Biol Chem. 292(14):5645-5654. 2017)。そこで改良型蛍光プローブの汎用性を確かめるべく、シアリダーゼが豊富に発現することが知られる脳組織切片の蛍光イメージングを、BTP3-Neu5Ac および改良型蛍光プローブを用いて行った。脳組織切片のシアリダーゼの蛍光イメージングにおいても、BTP3-Neu5Ac より改良型蛍光プローブはより鮮明な蛍光イメージングをすることが可能であった。

以上のように開発した改良型蛍光プローブは、炭化水素鎖を導入したことで BTP3-Neu5Ac と比較して蛍光イメージングの精度向上が見られた。さらに、アルキン型の炭化水素鎖を *m* 位に導入することで蛍光強度の向上に成功した。開発した改良型蛍光プローブは BTP3-Neu5Ac と比較して、インフルエンザウイルス感染細胞やウイルス NA の発現細胞を高精度に蛍光イメージング可能であることがわかった。

次に開発した改良型蛍光プローブを用いて細胞内のウイルスシアリダーゼの蛍光イメージングを試みた。炭化水素鎖の導入により蛍光プローブの疎水性が向上したことで、改良型蛍光プローブでは

細胞膜透過性が向上したものと考えられたため、以下の2つの方法により細胞内のウイルスシアリダーゼをイメージングすることが可能か検討した。一つ目はインフルエンザウイルス感染細胞をウイルスシアリダーゼの特異的阻害剤ザナミビルで処理した状態で、BTP3-Neu5Ac および改良型蛍光プローブを用いて、蛍光イメージングを行った。インフルエンザウイルス感染細胞において、ウイルスシアリダーゼ NA は細胞内と細胞膜表面の両方に発現し、蛍光プローブを細胞外から添加しても大部分は細胞外で膜表面の NA と反応してしまうことが予想された。ウイルスシアリダーゼ阻害剤のザナミビルは細胞膜を透過できないことが過去の報告からわかっており (Barman, J. Virol. 74, 6538-6545, 2000)、これを利用することで細胞膜表面の NA を阻害し、細胞内のみ NA の活性が残る状態を作り出せるのではないかと考えた。実際にザナミビル処理後のウイルス感染細胞をけいこういめーじんぐしたところ、BTP3-Neu5Ac では感染細胞の蛍光イメージングは起こらなかったが、改良型蛍光プローブでは細胞内が蛍光イメージングされた。BTP3-Neu5Ac で蛍光イメージングが起こらなかったのは細胞内への透過性が低いことと、蛍光強度が改良型プローブに比べて弱いことの2つが原因と考えられる。改良型蛍光プローブでは、細胞内透過性の向上と蛍光強度が増大したことでこれまで不可能であった細胞内のウイルスシアリダーゼ活性のライブイメージングに成功した。次にもう一つの実験として、ウイルス感染4時間後の細胞を改良型蛍光プローブによりイメージングを行った。インフルエンザウイルス NA は感染約4時間後から細胞内でタンパク質合成が行われ、感染6~8時間後には細胞膜表面に運ばれてくると言われている。そこで NA が細胞膜に運ばれる前の感染4時間後では細胞内にしか NA が無いはずであるため、感染4時間後に蛍光イメージングを行うことで細胞膜表面に発現した NA の影響を受けずに細胞内の蛍光イメージングが可能ではないかと考えた。実際に改良型蛍光プローブにより細胞内の蛍光イメージングができ、さらにその蛍光の局在は抗 NA 抗体による染色と一致した。前述のように抗 NA 抗体による染色はライブイメージングには利用できず、改良型蛍光プローブにより細胞内ウイルスシアリダーゼの活性をライブイメージングにより検出することが可能であると分かった。

以上のように改良型蛍光プローブは蛍光イメージングの精度向上、蛍光強度の向上、そして細胞内のウイルスシアリダーゼの活性のライブイメージングを可能にするといった、初期型の BTP3-Neu5Ac から大きな性能向上が認められた。今回開発した改良型蛍光プローブはシアリダーゼの機能解析において非常に強力なツールとなることが期待される。今後この改良型蛍光プローブを用いて、特に細胞内のウイルスシアリダーゼの挙動解析を行い、ウイルスシアリダーゼの道の機能解明に繋げていきたいと考えている。