

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460166

研究課題名(和文) 蛍光性顔料色素を用いた局所染色可能な分子プローブの開発と応用に関する研究

研究課題名(英文) Study on development and application of histochemically stainable probe using fluorescent pigment dye

研究代表者

大坪 忠宗 (Otsubo, Tadamune)

広島国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：30365879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光顔料色素である 2-benzothiazol-2-yl-phenol (BTP) を aglycone とする glycosidase 基質の開発過程で、特にシアリダーゼを標的とする基質開発を中心に実施した。開発したシアリダーゼ基質は、従来型ヒト型インフルエンザウイルスは勿論、トリ型インフルエンザや新型インフルエンザ、薬剤耐性ウイルスの検出が可能であることを明らかとした。また、抗インフルエンザ薬に耐性を持つウイルスの簡便な識別法を開発し、未知の変異による薬剤耐性ウイルスの検出も可能であることを実証した。この化合物は、和光純薬の協力で市販することができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the novel artificial sialidase substrate with 2-benzothiazol-2-yl-phenol skeltone, which is the fluorescent pigment dye. It was revealed that the influenza infected cells had been histochemically stained with the developed sialidase substrate, and the substrate could detect the infection of not only the human influenza virus but also the avian influenza virus, non-traditional type (H1N1) or drug-resistant viruses. And it was easily possible to detecte the drug-resistant virusese by additon of the novel sialidase substrate and anti-influenza-neuraminidase drug in a few minute. The drug resistance property was indicated by a fluorecent focus formed by an activity of the neuraminidase, so the unknown mutation resulting the new drug resistant viruse would be detected. The developed novel substrate is now commercially available under the support of WAKO JUNYAKU KOGYO.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：シアリダーゼ 蛍光イメージング シアル酸 組織染色 インフルエンザ

### 1. 研究開始当初の背景

生体内における分子プロセスの可視化を可能とする分子イメージングは、創薬研究や病理追求に新たな方法論を提供することができる。特に、蛍光タンパク質（例えば GFP）を用いた光学分子イメージング手法は、迅速性・簡便性の点からポジトロン断層法（PET）、単一光子放射断層法（SPECT）や核磁気共鳴画像法（MRI）よりも優れているため、組織・細胞レベルの分子イメージングに汎用されている。中でも人工基質を用いた光学分子イメージングは、構造が明確な低分子を用いることができるため、臨床法要への展開も容易であるなどメリットが多い。

従って、グルコシダーゼやガラクトシダーゼ以外の糖分解酵素活性の可視化や、ライブイメージングによる病原性ウイルスの検出・捕獲・培養を可能とする方法論の開発が重要である。

### 2. 研究の目的

従来の蛍光酵素基質は、水溶性色素（溶液状態で発光する色素）を用いているため、酵素活性の測定には適しているが、遊離した色素は細胞外や培養液中に拡散するため、活性部位の特定には不向きである。従って組織染色には、二次抗体を蛍光標識するなどして用いる免疫染色法が主流である。しかし免疫染色法は、生体への適用に制限が多く、また標的タンパク質の変異によっては目標を見失うことが懸念される。このため、標的酵素活性そのものを監視しつつ、同時に酵素部位を特定するためには、不溶性で且つ蛍光発光可能な色素を用いる必要がある。

本研究では、糖分解酵素の基質として適用可能な固体発光性色素の探索、導入基質の合成、及び開発基質を用いたインフルエンザウイルス感染細胞の検出を実証する。

### 3. 研究の方法

固体蛍光性色素は、これまでに有機 EL 材料分野で詳しく研究されており骨格の多様性や発色の多彩さの点では申し分ない。一方で、本研究目的に沿った蛍光のオンオフ機能や色素のコンパクトさの点は、材料として不適切な側面でもあり、既知の色素では配慮されていないことが多い。そうした中で候補色素として **2-benzothiazol-2-yl-phenol (BTP)** を選んだ。BTP は、蛍光メカニズムが一般の色素とは異なる過程（ESIPTプロセス）を辿るために、励起波長と蛍光波長の差（ストークスシフト）が大きい（一般色素が 10~50 nm 程度であるのに対して BTP は 150~200 nm 程度）のが特徴のひとつであり、光学イメージングに於いては大きな長所となりうる。

糖と BTP 類縁体を結合させ、対応する糖の加水分解酵素と反応するか確認した後、ウイルスの蛍光検出や、生体における酵素

分布調査に応用可能か検討する。

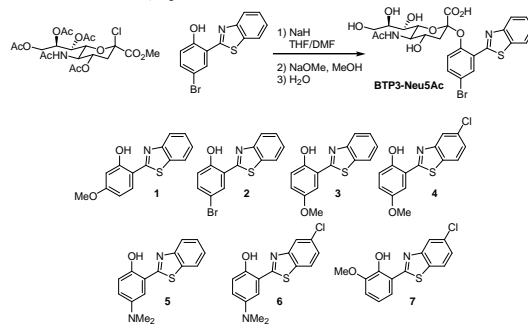
### 4. 研究成果

(1) BTP 及びその類縁体を合成し、糖（ガラクトース、グルコース、シアル酸）と結合させた化合物を合成した。酸化銀や有機アミン塩基などを用いる典型的な合成条件を検討したものの、一般的な蛍光色素を導入する条件では目的物が得られなかったため、水素化ナトリウムを用いる古典的なエーテル合成条件を適用して目的物を得た。

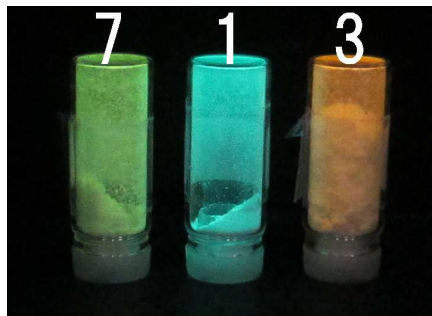
(2) グルコース誘導体とグルコシダーゼとの反応を行ったところ、BTP 部分の種類によって反応性に大きな差があることが分かった。特に一部の化合物は、植物由来のグルコシダーゼとカビ由来のグルコシダーゼを明確に区別することが可能であり、カビの検出に応用可能である可能性が示唆された。

#### (3)

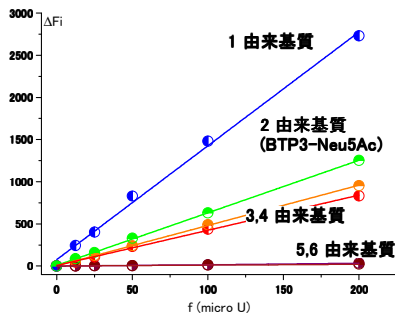
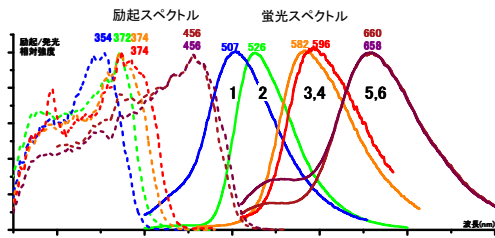
①シアル酸と BTP 誘導体とのカップリング反応とそれに続く脱保護の代表例を次のスキームに示す。



フェノール環上に様々な置換基を持つ BTP 類 **1-6** 等は、置換基の種類と位置によって異なる蛍光色を示した（次頁スペクトル参照）。例えばメトキシ基がフェノール酸素のオルト位 (**7**)、メタ位 (**1**)、パラ位 (**3**) に置換する誘導体の蛍光色は、それぞれ黄色、青緑色、橙色であった。

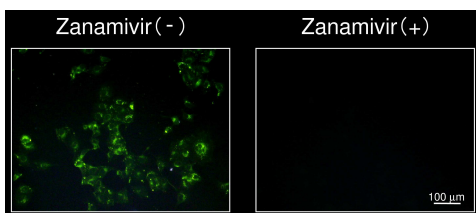


これらの多様な BTP 類を aglycone とする誘導体も同様の経路で合成し、市販シアリダーゼとの反応を行ったところ、何れも良好な基質であることが分かった（次頁グラフ参照）。

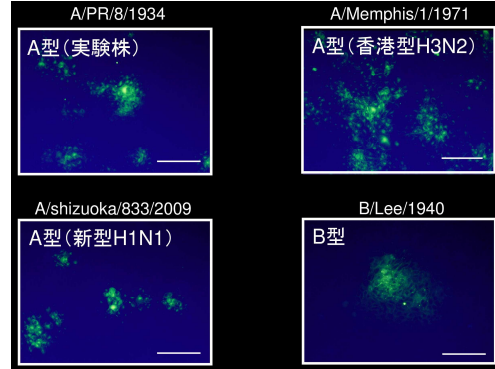


輝度と定着性のバランスから合成スキームに示す BTP3-Neu5Ac を中心にバクテリア由来シアリダーゼの容量と反応性との相関を調べたところ、酵素量と増加する蛍光強度との間に線形性が確認できたことから、BTP3-Neu5Ac は固体蛍光性色素を用いて標識しているにもかかわらず、酵素活性の検出のみならず酵素量の定量も可能であることが明らかとなった。

②明らかとなった容量蛍光相関を利用して病原性ウイルスが感染した細胞のライブイメージング（組織固定することなく細胞やウイルスを生かしたままで感染細胞をイメージング）を試みた。その結果、シアリダーゼを持つ各種病原性ウイルス（ヒトパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス、センダイウイルス、ニューカッスル病ウイルス）感染細胞の蛍光染色に成功した。ヒトパラインフルエンザウイルスは、感染した細胞に対する殺細胞性が低く、一般的なプラークアッセイではウイルス定量が困難であったが、フォーカスフォーミングアッセイ（FFA）により従来7～10日を要した感染確認を3日程度にまで短縮することに成功した。さらに、インフルエンザウイルス感染細胞を用いて FFA を試みたところ、ウイルス感染数時間で感染細胞を確認することに成功した。蛍光観察によって確認されるフォーカスは、インフルエンザウイルス選択的抗ノイラミニダーゼ薬であるザナミビル共存下で完全に消失した（下図参照）ことから、観察されたフォーカスはインフルエンザノイラミニダーゼ活性によるものであることを明らかとした。

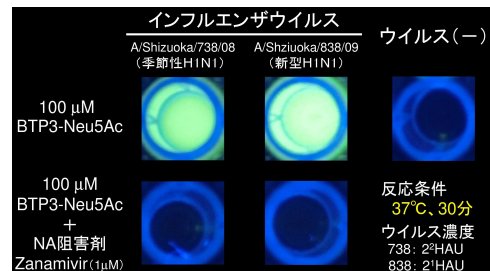


③さらに、型や亜型の異なるインフルエンザウイルス（B型ウイルス、ヒトA型ウイルス [1918年スペイン風邪NA、H3N2型、H1N1型（新型ウイルス）]、トリA型ウイルス [H7N9型、H5N3型、H5N1型（高病原性）]）を感染させた細胞を同様に FFA により調べたところ、いずれも効率よく感染細胞の検出が可能であった（下図参照）。



蛍光で確認された感染細胞（フォーカス）をピペットチップで刺してウイルスを捕獲したのち、改めて培養細胞に感染させたところ、フォーカス（ウイルスの増殖）を確認することができた。即ち、BTP3-Neu5Ac を用いたライブイメージングによって、目的の特性を持つウイルスを選別して生きたまま確保した後、改めて培養して特性や遺伝子変異を調べることが可能であることを実証した。

④成果の③および④を組み合わせると、オセルタミビルやザナミビル耐性型のインフルエンザウイルスを選別可能であることを確認した。



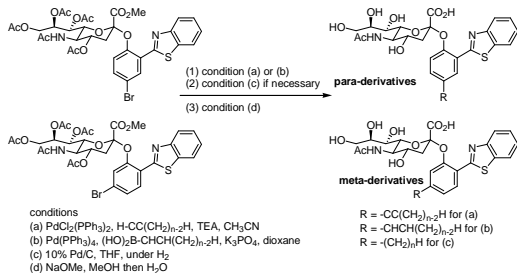
特に、オセルタミビル耐性型インフルエンザウイルスとオセルタミビル感受性インフルエンザウイルスを混合したものを培養細胞に感染させた後、タミフル共存下で BTP3-Neu5Ac を用いて FFA を行い、蛍光性のフォーカスからウイルスを取り出して遺伝子検査を行った。その結果、全ての蛍光性フォーカスからタミフル耐性遺伝子を検出した。

BTP3-Neu5Ac と抗ノイラミニダーゼ薬を組み合わせる本手法は、薬剤耐性ウイルスの検出に有効であることが示唆された。また本手法は、純粋に酵素活性に依存しているため、未知の遺伝子変異による薬剤耐性獲得株の検出にも有効であると考えられる。

## NA阻害剤耐性ウイルスの選択的分離法



⑤インフルエンザ感染細胞のライブイメージング画像を調べたところ、蛍光染色された細胞に隣接する細胞も染色されていることが分かった。この周辺細胞の染色は、時間の経過に伴った蛍光色素の拡散によるものであることが示唆された。従って、色素の定着性を改善した誘導体の合成 (下のスキーム参照) を行い、色素の拡散を抑制した誘導体の中で炭素数9個前後のものが総合的に最も優れていることを明らかとして、特許を出願した。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

(1) Akira Minami, Masakazu Saito, Shou Mamada, Daisuke Ieno, Tomoya Hikita, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda and Takashi Suzuki “Role of sialidase in long-term potentiation at mossy fiber-CA3 synapses and hippocampus-dependent spatial memory”, PLoS One 11, e0165257 (2016). 査読有  
 Doi: 10.1371/journal.pone.0165257

(2) Tadanobu Takahashi, Saori Unuma, Sawako Kawagishi, Yuuki Kurebayashi, Maiko Takano, Hiroki Yoshino, Akira Minami, Takashi Yamanaka, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki “Substrate specificity of equine and human influenza A virus sialidase to molecular species of sialic acid”, Biol. Pharm. Bull. 2016, 39(10), 1728-1733. 査読有  
 doi:10.1248/bpb.b16-00345

(3) Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Chihiro Tamoto, Keiji Sahara, Tadamune Otsubo, Tatsuya Yokozawa, Nona Shibahara, Hirohisa Wada, Akira Minami, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki “High-Efficiency Capture of Drug Resistant-Influenza Virus by Live Imaging of Sialidase Activity”, PLoS ONE 2016, 11(5), e0156400. 査読有  
 doi: 10.1371/journal.pone.0156400

(4) Tadanobu Takahashi, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Nona Shibahara, Chihiro Suzuki, Akiko Kishikawa, Keijo Fukushima, Maiko Takano, Fumie Suzuki, Hirohisa Wada, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki “Easy and Rapid Detection of Mumps Virus by Live Fluorescent Visualization of Virus-Infected Cells”, PLoS ONE 2015, 10(12), e0144038. 査読有  
 doi:10.1371/journal.pone.0144038

(5) Risa Taguchi, Akira Minami, Yukino Matsuda, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda and Takashi Suzuki “Preferential accumulation of 14C-N-glycolylneuraminic acid over 14C-N-acetylneuraminic acid in the rat brain after tail vein injection”, PLoS One, 2015, 10, e0131061. 査読有  
 doi: 10.1371/journal.pone.0131061

(6) Tadanobu Takahashi, Maiko Takano, Yuuki Kurebayashi, Takashi Agarikuchi, Chihiro Suzuki, Keijo Fukushima, Shunsaku Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki “Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses”, Biol. Pharm. Bull. 2015, 38(8), 1214-1219. 査読有

(7) Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki “Histochemical Imaging of Alkaline Phosphatase Using a Novel Fluorescent Substrate”, Biol. Pharm. Bull. 2014, 37(10), 1668-1673. 査読有



(8) Maiko Takano, Tadanobu Takahashi, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki “A novel method for detection of Newcastle disease virus with a fluorescent sialidase substrate”, J. Virol. Methods 2014, 209, 136-142. 査読有  
doi: 10.1016/j.jviromet.2014.09.010

(9) Tadanobu Takahashi, Maiko Takano, Yuuki Kurebayashi, Midori Masuda, Sawako Kawagishi, Masahiro Takaguchi, Takashi Yamanaka, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki “N-glycolylneuraminic Acid on Human Epithelial Cells Prevents Entry of Influenza A Virus with N-glycolylneuraminic Acid Binding Ability”, J. Virol. 2014, 88, 8445-8456. 査読有  
doi:10.1128/JVI.00716-14

(10) Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Shunsaku Takahashi, Maiko Takano, Takashi Agarikuchi, Tsubasa Sato, Yukino Matsuda, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Yuko Uchida, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Toshihiro Yamada, Fumihiko Kawamori, Robin Thomson, Mark von Itzstein, Takashi Suzuki “Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells”, Sci. Rep. 2014, 4, 4877. 査読有  
doi: 10.1038/srep04877

[学会発表] (計7件)

(1) 大坪 忠宗 “定着性を向上させたシアリダーゼプローブの合成” 第137回日本薬学会総会、2017年3月24日～3月27日 「仙台国際センター (宮城県・仙台市)」

(2) 大坪 忠宗 “ライブイメージングを指向した蛍光シアリダーゼ基質の合成と応用” 第42回反応と合成の進歩シンポジウム、2016年11月7日～8日 「清水文化会館マリナート (静岡県・静岡市)」

(3) 大坪 忠宗 “組織染色可能な蛍光シアリダーゼ基質の合成と応用” 第35回糖質学会、

(4) 2016年9月1日～3日 「高知市文化プラザ かるぼーと (高知県・高知市)」

(5) 大坪 忠宗 “高感度なβ-グルコシダーゼイメージング剤の合成と蛍光組織染色への応用” 第136回日本薬学会総会、

2016年3月26日～28日 「パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)」

(6) 大坪 忠宗 “異なる起源を持つグルコシダーゼの特異性定量化法の開発” 第135回日本薬学会総会、2015年3月25日～28日 「神戸サンボーホール (兵庫県・神戸市)」

(7) 大坪 忠宗 “蛍光性顔料色素を用いたシアリダーゼ基質の合成とシアリダーゼ活性の可視化” 日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会、2014年6月11日～13日 「大阪大学会館(大阪府・豊中市)」

[図書] (計1件)

大坪 忠宗、池田 潔、紅林 佑希、南 彰、高橋 忠伸、鈴木 隆 “シアリダーゼ蛍光イメージング試薬の開発”、BIO INDUSTRY, 2016, 33 (11), 70. (シーエムシー出版)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 新規化合物及び該化合物を含む蛍光組成物  
発明者: 鈴木 隆、高橋 忠伸、南 彰、池田 潔、大坪 忠宗  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特開 2016-141652  
出願年月日: 2015年2月2日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大坪 忠宗 (OTSUBO, Tadamune)  
広島国際大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 30365879

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )