

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08380

研究課題名(和文) インフルエンザウイルスの耐性薬剤を判別可能とするコンパニオン診断薬の開発

研究課題名(英文) Development of companion diagnostics for detection of influenza virus resistant drugs

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに開発したインフルエンザウイルスを蛍光検出できる試薬を発展させて、ビーズに固定化した新しい試薬を作成した。ビーズに固定化することにより、ウイルス検出試薬を高濃度に集積することができること、見かけ上大きな試薬となることから、高感度に検出できると同時に人の目で容易に確認できるようになる。作成した樹脂と抗インフルエンザ薬を混合して用いることで薬剤耐性ウイルスを高感度かつ簡便に検出することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インフルエンザ検出試薬を溶かした溶液を調製したり、適量添加するなどの手間をかけることなく検出操作を行うことができる。さらに、樹脂に固定化することによって、試薬を集積することができるため、高感度なインフルエンザ検出キットを作成することができる。

研究成果の概要(英文)：A new reagent was developed in which the previously developed reagent that can detect influenza virus by fluorescence, and it was immobilized on beads. Several reagents with different distances between the beads and the virus detection part were prepared.

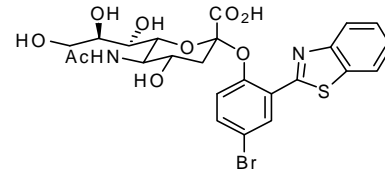
研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：インフルエンザ検出 薬剤耐性 ノイラミニダーゼ シアリダーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに (2S,4S,5R,6R)-5-acetamido-2-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-4-bromophenoxy)-4-hydroxy-6-((1R,2R)-1,2,3-trihydroxypropyl)tetrahydro-2H-pyran-2-carboxylic acid (BTP3-Neu5Ac) を開発して、インフルエンザ A 型ウイルスをはじめとする病原性ウイルスや哺乳類由来する各種シアリダーゼ活性を検出できることを報告してきた。時期を同じくして、インフルエンザノイラミニダーゼを標的とする抗インフルエンザ薬に耐性を有するインフルエンザの流行が報告されたことから、薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出・判定できる簡便な方法を開発して報告してきた。



BTP3-Neu5Ac

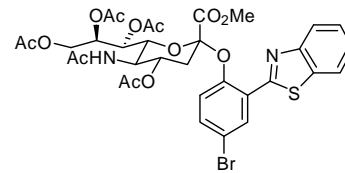
その一方で BTP3-Neu5Ac は、酵素活性発現部位で遊離した蛍光分子がそのまま集積して、酵素反応部位を特異的に蛍光染色できる特徴を持つことから、高感度プローブへの可能性が示唆されていた。

### 2. 研究の目的

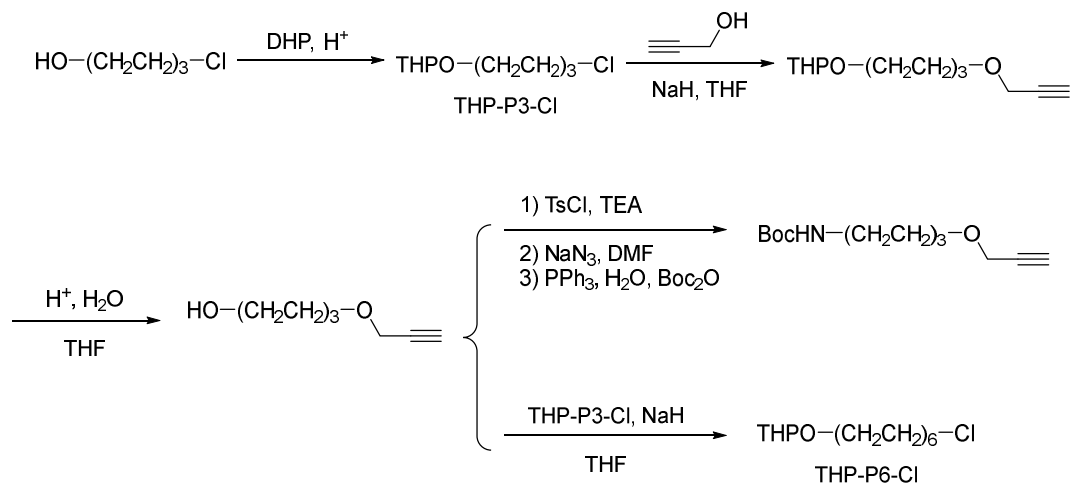
溶液状態で分散したプローブとインフルエンザウイルスの反応により、インフルエンザウイルス粒子を蛍光染色できることは予想されたが、ウイルス粒子は肉眼でとらえることができない。そのため、蛍光プローブを樹脂ビーズに固定化すると、インフルエンザウイルスとの反応によって遊離した蛍光色素が樹脂に定着して明るく光るビーズを確認することでインフルエンザノイラミニダーゼ活性を確認することができると期待できる。同時に、以前に報告した抗インフルエンザ薬とのカクテルを用いることによって、薬剤耐性インフルエンザウイルスを簡便に肉眼で判定できるツールを開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

官能基化のベースとなる化合物として BTP3-Neu5Ac の前駆体 (1S,2R)-1-((2R,3R,4S,6S)-3-acetamido-4-acetoxyl-6-(2-(benzo[d]thiazol-2-yl)-4-bromophenoxy)-6-(methoxycarbonyl)tetrahydro-2H-pyran-2-yl)propane-1,2,3-triyl triacetate (pro-BTP3-Neu5Ac) の臭素原子を足場として、樹脂ビーズとのスペーサーを導入することとして、大量合成を行った。スペーサーとして、長さの異なる PEG 鎖を導入するため、中間体の合成を試みた。



pro-BTP3-Neu5Ac

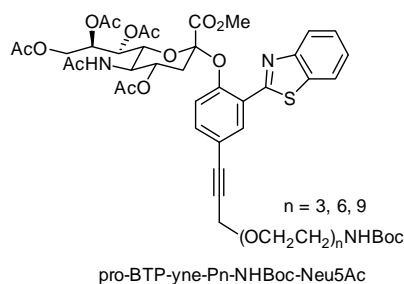


出発原料として 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethan-1-ol の水酸基を THP で保護して 2-(2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran (THP-P3-Cl) を合成したのち、NaH を塩基として propargyl alcohol とカップリングして、色素との接合部位を導入した 2-(2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)tetrahydro-2H-pyran (THP-P3-yne) を合成した。その後、THP 基の除去して 2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethan-1-ol (HO-P3-yne) を調整後、Ts 化、アジド化、還元、Boc 化を経て tert-butyl (2-(2-(2-(prop-2-yn-1-yloxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamate (BocNH-P3-yne) を PEG ユニット数 3 の

スペーサーを合成した。長さの異なるスペーサーは、HO-P3-yne と THP-P3-Cl とのカップリングに続いて、前述のスキームに従って BocNH-P6-yne を合成した。同様の手順で BocNH-P9-yne も用意した。

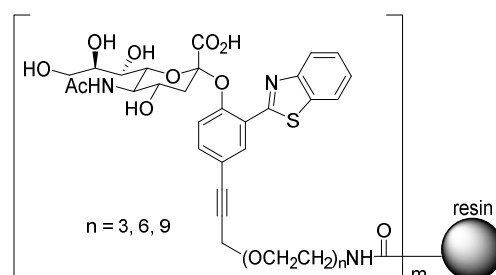
目的物合成に必要な部品を用意すると並行して、pro-BTP3-Neu5Ac と BocNH-Pn-yne (Pn = P3, P6, P9) との菌頭カップリングも行って、樹脂への導入前駆体となる pro-BTP-yne-Pn-NHBoc-Neu5Ac (Pn = P3, P6, P9) の合成を行った。菌頭カップリングは、pro-BTP3-Neu5Ac を基準すると中程度以上の効率で進行した。合成した BocNH-Pn-yne は Boc 基の除去した後、ペプチド固相合成法を用いてカルボン酸樹脂への導入を行った。反応後の樹脂は、加熱するとニンヒドリン反応に陽性であったこと、反応後に樹脂重量が増加していることから、シアリ酸ユニットの導入ができたものと判断した。

最終的に、プローブ部分の脱保護を行って目的とする樹脂の調整を行った。



#### 4. 研究成果

前述した PEG 長の異なるスペーサーを介して、プローブと樹脂を結合させたシアリダーゼ検出剤の合成を行った。合成した検出剤は、最終段階および保存過程でプローブの一部分解が見られ、樹脂が蛍光性を示すことが明らかとなり、バックグラウンドの蛍光が高くなった。シアリダーゼとの反応も行ったが、肉眼で識別するほどの違いは観測されなかった。最終段階における脱保護や樹脂の洗浄・乾燥を遮光条件下で行って再調製したのも、肉眼で蛍光が観測された。今後は、脱保護後に樹脂に導入する方法で再度調製したものを検討する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogata Makoto, Yamanaka Takashi, Koizumi Ami, Sakamoto Mao, Aita Rena, Endo Hiroyuki, Yachi Takehiro, Yamauchi Noriko, Otsubo Tadamune, Ikeda Kiyoshi, Kato Tatsuya, Park Enoch Y., Kono Hiroyuki, Nemoto Manabu, Hidari Kazuya I. P. J.	4. 巻 2
2. 論文標題 Application of Novel Sialoglyco Particulates Enhances the Detection Sensitivity of the Equine Influenza Virus by Real-Time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Applied Bio Materials	6. 最初と最後の頁 1255 ~ 1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsabm.8b00813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minami Akira, Ishii Ami, Shimba Sumika, Kano Takahiro, Fujioka Eri, Sai Saki, Oshio Nagisa, Ishibashi Sayaka, Takahashi Tadanobu, Kurebayashi Yuuki, Kanazawa Hiroaki, Yuki Nobuhiro, Otsubo Tadamune, Ikeda Kiyoshi, Suzuki Takashi	4. 巻 163
2. 論文標題 Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 273 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Daisuke, Kurebayashi Yuuki, Takahashi Tadanobu, Otsubo Tadamune, Otake Hitomi, Yamazaki Mika, Tamoto Chihiro, Minami Akira, Ikeda Kiyoshi, Suzuki Takashi	4. 巻 13
2. 論文標題 An easy, rapid, and sensitive method for detection of drug-resistant influenza virus by using a sialidase fluorescent imaging probe, BTP3-Neu5Ac	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0200761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200761	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 高橋 忠伸, 紅林 佑希, 加藤 大介, 大坪 忠宗, 池田 潔, 南 彰, 鈴木 隆	4. 巻 33
2. 論文標題 薬剤耐性インフルエンザの単離法と簡易高感度検出法	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 98-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shi Qing, Hashimoto Ryugo, Otsubo Tadamune, Ikeda Kiyoshi, Todoroki Kenichiro, Mizuno Hajime, Jin Dongri, Toyo 'oka Toshimasa, Jiang Zhe, Min Jun Zhe	4. 巻 149
2. 論文標題 A novel, simplified strategy of relative quantification N-glycan: Quantitative glycomics using electrospray ionization mass spectrometry through the stable isotopic labeling by transglycosylation reaction of mutant enzyme Endo-M-N175Q	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 365 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2017.11.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Otsubo Tadamune, Ikeda Kiyoshi, Kurebayashi Yuuki, Minami Akira, Takahashi Tadanobu, Suzuki Takashi	4. 巻 76
2. 論文標題 Development of Sialidase Live-imaging Probe Using a Solid Fluorescent Pigment Dye	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 1272 ~ 1280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.76.1272	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akira Minami, Ami Ishii, Sumika Shimba, Takahiro Kano, Eri Fujioka, Saki Sai, Nagisa Oshio, Sayaka Ishibashi, Tadanobu Takahashi, Yuuki Kurebayashi, Hiroaki Kanazawa, Nobuhiro Yuki, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki	4. 巻 163
2. 論文標題 Down-regulation of glutamate release from hippocampal neurons by sialidase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Biochem	6. 最初と最後の頁 273-380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Makoto Ogata, Ami Koizumi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Mao Sakamoto, Rena Aita, Tatsuya Kato, Enoch Y Park, Takashi Yamanaka, and Kazuya IPJ Hidari	4. 巻 81
2. 論文標題 Chemoenzymatic synthesis and characterization of N-glycolylneuraminic acid-carrying sialoglycopolypeptides as effective inhibitors against equine influenza virus hemagglutination	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1520-1528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2017.1325315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田優香、南彰、白鳥真子、金子雪子、澤谷俊明、大坪忠宗、池田潔、石川智久、鈴木隆
2. 発表標題 低血糖の副作用を回避する新しい作用機序を持った糖尿病治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田邊桃子、紅林佑希、高橋忠伸、大坪忠宗、三浦和美、藤田優香、南彰、池田潔、鈴木隆
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向原大貴、寺岡文照、鞠 千恵、左一八、大坪忠宗、池田潔
2. 発表標題 フッ素基導入型デングウイルス感染阻害剤の合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋由、土井彩加、福間彩加、三浦和美、紅林佑希、高橋忠伸、南彰、寺岡文照、大坪忠宗、鈴木隆、池田 潔
2. 発表標題 ヒトパラインフルエンザウイルス検出のための新規蛍光イメージング剤の開発研究（4）
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大坪忠宗、寺岡文照、池田 潔
2. 発表標題 拡散しにくい固体蛍光性色素の合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡 誠吾、大坪忠宗、寺岡文照、池田 潔
2. 発表標題 官能基化シアリダーゼプローブの合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紅林佑希、高橋忠伸、山中隆史、池田潔、大坪忠宗、南彰、鈴木隆
2. 発表標題 ノイラミニダーゼのシアル酸分子種に対する特異性の解析
3. 学会等名 第3 2回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 シアリダーゼ蛍光イメージング剤 BTP3-Neu5Ac を利用した高感度、簡易ウイルス検出系の確立
2. 発表標題 高橋忠伸、紅林佑希、加藤大介、大坪忠宗、池田潔、南彰、鈴木隆
3. 学会等名 第3 2回インフルエンザ研究者交流の会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩野孝裕、南彰、石井亜実、藤岡愛里、大坪忠宗、池田潔、鈴木隆
2. 発表標題 脳梗塞時におけるシアリダーゼ活性の増加と役割
3. 学会等名 第64回(平成30年度)日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山 喬太、南 彰、三上 靖代、吉村 満里菜 満里菜、海野 けい子 けい子、大坪 忠宗、池田 潔、鈴木 隆
2. 発表標題 老化脳に蓄積する希少糖分子種がアルツハイマー病に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第33回老化化促進モデルマウス・(SAM)学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩野 孝裕、南 彰、藤岡 愛里、大坪 忠宗、池田 潔、鈴木 隆
2. 発表標題 シアリダーゼの脳梗塞に伴う酵素活性変化のin vivo解析とその役割
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 優香、南 彰、白鳥 眞子、金子 雪子、澤谷 俊明、榛葉 すみか、関田 理沙、大坪 忠宗、池田 潔、石川 智久、鈴木 隆
2. 発表標題 シアリダーゼのマウス臓腑における活性分布とインスリン分泌における役割
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 狩野孝裕、南 彰、石井亜実、藤岡愛里、大坪忠宗、池田 潔、鈴木 隆
2. 発表標題 脳梗塞急性期におけるシアリダーゼ活性変化とその役割
3. 学会等名 第17回次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム ( pbf2018 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大坪忠宗、寺岡文照、池田 潔
2. 発表標題 フルオラス・タグを組み込んだ 2-(benzo[d]thiazol-2-yl)phenol 型固体発光性色素の合成と応用に関する研究
3. 学会等名 フルオラス科学研究会第 1 1 回シンポジウム ( 広島 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 含フッ素デングウイルス感染阻害剤の合成研究(II)
2. 発表標題 寺岡文照、向原大貴、佐藤理貴、大坪忠宗、池田 潔
3. 学会等名 フルオラス科学研究会第 1 1 回シンポジウム ( 広島 )
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋由、土井彩加、福間彩加、寺岡文照、大坪忠宗、池田 潔
2. 発表標題 ヒトパラインフルエンザウイルス検出のための新規蛍光イメージング剤の開発
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺岡文照、向原大貴、左一八、鞠千恵、大坪忠宗、池田 潔
2. 発表標題 含フッ素型デングウイルス感染阻害剤の合成研究
3. 学会等名 第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紅林 佑希、高橋 忠伸、大坪 忠宗、田本 千尋、南 彰、池田 潔、鈴木 隆
2. 発表標題 シアリダーゼ蛍光プローブを用いた薬剤耐性インフルエンザウスの検出・分離法の開発
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大坪忠宗、紅林佑希、高橋忠伸、南彰、鈴木隆、寺岡文照、池田潔
2. 発表標題 定着性を向上させたシアリダーゼプローブの合成
3. 学会等名 第137回日本薬学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福間彩加、山口千尋、大坪忠宗、寺岡文照、紅林佑希、南彰、高橋忠伸、鈴木隆、池田潔
2. 発表標題 ヒトパラインフルエンザウイルス検出のための新規蛍光イメージング剤の開発研究
3. 学会等名 第137回日本薬学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----