

## Imaging of sialidase activity and its clinical application

鈴木 隆 (Takashi SUZUKI)

静岡県立大薬 (School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

シアリダーゼは糖鎖末端からシアル酸残基を遊離する加水分解酵素である。哺乳動物のシアリダーゼには、細胞の局在性や基質特異性などが異なる4種類のアイソザイムが存在し、細胞の分化、増殖などに関与することが報告されている。また大腸がん等において一部のシアリダーゼアイソザイムの発現が異常に亢進することが判明している。一方、インフルエンザウイルス、ヒトパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス等のウイルスやコレラ菌、肺炎レンサ球菌等の細菌類もシアリダーゼ活性を有しており、ウイルスの細胞内への侵入過程や子孫ウイルスの遊離過程でシアリダーゼが機能することが知られている。このため、シアリダーゼの活性を高感度に可視化することができれば、細胞や組織におけるシアリダーゼの機能解明だけでなく、大腸がんなどの検査、インフルエンザウイルス等の検出や分離に貢献できるものと期待される。本講演では、固体状態で強い蛍光性を有する2-benzothiazol-2-yl-phenol (BTP) 誘導体にシアル酸を付加した新規蛍光基質 (BTP-Neu5Ac) の特徴と BTP-Neu5Ac を利用してこれまで行ってきた研究と最近取り組んでいる研究成果の一端を紹介したい。

シアリダーゼの基質としては、これまでに呈色基質である4-ニトロフェニル誘導体 (PNP-Neu5Ac) や5-ブロモ-4-クロロ-3-ヒドロキシインドール誘導体 (X-Neu5Ac)、蛍光基質である4-メチルウンベリフェロン誘導体 (4MU-Neu5Ac)、化学発光基質である1,2-ジオキサタン誘導体 (NA-Star®) が知られている。しかしながら、X-Neu5Ac 以外の合成基質は反応生成物が水溶性であるために、組織等のシアリダーゼ活性を可視化するための基質としては利用できない。また X-Neu5Ac から遊離する X は不溶性のインジゴ色素を呈するが、感度が低いため、細胞や組織のシアリダーゼ活性を可視化することは困難である。そこで、X-Neu5Ac にジアゾニウム化合物であるファーストレッドバイオレット LB を加えることで、ジアゾカップリングによる蛍光性アゾ色素を生成する方法が考案された。しかし、この反応は pH による影響を受け易く、二段階の反応を要するために特異性や感度に問題がある。一方、BTP 誘導体は水に難溶であり、固体状態で蛍光性を示す。また低い pH 条件でも強い蛍光を示し、ストークシフトが 150 nm 以上と大きく、励起光の影響を受けにくいために高い感度と特異性を示す。BTP-Neu5Ac を用いることで、ラット脳組織におけるシアリダーゼの可視化やラットの胎児のシアリダーゼ活性を全身蛍光イメージングすることに初めて成功した。また、大腸がんモデルマウスを作製し、BTP-Neu5Ac で染色したところ、がん部位を簡単に可視化できることが明らかになった。さらに、外科的手術によって摘出されたヒト大腸がん組織を用いた検討から、大腸がん部位を BTP-Neu5Ac により明瞭に検出できることを明らかにした。一方、インフルエンザウイルス感染細胞や NA 遺伝子発現細胞を BTP-Neu5Ac を用いて可視化した結果、ウイルスの亜型等に関係無く、検討したすべてのウイルス株 NA の検出が可能であった。さらに、ヒトパラインフルエンザウイルス、ムンプスウイルス感染細胞等の検出にも応用できることを明らかにした。このように本蛍光プローブは、細胞変性作用が弱くプラーク形成が困難なウイルスや増殖性が低いウイルスの検出にも有用である。また NA 阻害剤と BTP3-Neu5Ac を併用することで、薬剤耐性ウイルスやその感染細胞を選択的に検出可能であることも判明した。最後に、BTP3-Neu5Ac を用いて現在取り組んでいる記憶形成におけるシアリダーゼの研究成果についても紹介したい。

【謝辞】本研究は、静岡県立大学薬学部生化学分野のスタッフや学生諸君、さらに広島国際大学薬学部有機合成化学研究室 (池田 潔教授) の皆様をはじめとして、多くの共同研究者と共に行ったものであります。この場をお借りして謹んで感謝いたします。