

## 〈総 説〉

# 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの高感度検出分離法の開発

紅林佑希

静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座

(2016年11月24日受付)

インフルエンザA・B型ウイルスや一部のパラミクソウイルスは、ウイルス受容体であるシアル酸を糖鎖末端から切断する酵素「シアリダーゼ」を持つ。ウイルスの感染細胞上には、ウイルス由来のシアリダーゼが豊富に発現する。筆者らが開発したシアリダーゼ蛍光イメージング剤「BTP3-Neu5Ac」は、シアリダーゼ活性を組織化学的に蛍光イメージングする。BTP3-Neu5Acは、特異的抗体や細胞の固定化操作を必要とせず、ウイルスや感染細胞を簡便迅速に蛍光イメージングできる。インフルエンザ治療薬であるNeuraminidase (NA) 阻害薬をBTP3-Neu5Acと併用することで、薬剤耐性インフルエンザウイルスの感染細胞を選択的に蛍光イメージングして、薬剤耐性ウイルス株を高効率に単離することができる。本稿では、BTP3-Neu5Acを利用した、ウイルスの蛍光イメージングと薬剤耐性ウイルスの検出分離法への応用について概説する。

## はじめに

インフルエンザウイルスは感染に糖鎖が関与する代表的なウイルスであり、ウイルス粒子の表面には糖鎖利用に関わるスパイクタンパク質が存在する。インフルエンザA型ウイルス (Influenza A virus, IAV) およびインフルエンザB型ウイルス (Influenza B virus, IBV) はスパイクタンパク質として糖鎖結合タンパク質「ヘマグルチニン (Hemagglutinin, HA)」と糖代謝酵素タンパク質「ノイラミニダーゼ (Neuraminidase, NA)」の2種のタンパク質を持つ。NAは糖鎖末端のシアル酸を切断する「シアリダーゼ」酵素活性を有し、宿主への感染増殖機構における最終段階である感染

細胞からの遊離を促進する働きを示す。IAVの感染後期では、新生ウイルス粒子の部品としてHAやNAが感染細胞表面に大量に発現する。ウイルスのNAは、細胞が本来持つシアリダーゼより著しく高い活性を示し、ウイルスの粒子表面や感染後期の宿主細胞表面ではこのNAが大量に発現しているため、これを利用すればウイルスや感染細胞を容易に検出できるようになるのではないかと考えた。

我々の研究室では最近シアリダーゼを高感度に検出する蛍光検出試薬 (2-ベンゾチアゾール-2-イル)-4-ブromoフェノール ((2-Benzothiazol-2-yl)-4-bromophenol, BTP3) のシアル酸; N-アセチルノイラミン酸 (N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) 付

加体である「BTP3-Neu5Ac」を開発した。BTP3-Neu5Acはシアリダーゼと反応してシアル酸が外れ蛍光物質であるBTP3が遊離・沈着することで、シアリダーゼを高感度に蛍光イメージングすることが可能になる。我々はこのBTP3-Neu5AcによりIAVやIBV、およびその感染細胞を蛍光イメージングする方法を開発した。この蛍光イメージング法はIAV、IBVの「型」や「亜型」の違いに依らず検出が可能であり、BTP3-Neu5Acと反応させる簡単な操作により約10分程度で感染細胞を蛍光イメージングできる。さらに、我々はこのBTP3-Neu5Acを利用することでIAVのオセルタミビル耐性を検出し、検出した耐性ウイルスを直接的かつ選択的に感染細胞から単離する方法を開発した。本稿では、BTP3-Neu5Acによるウイルスや感染細胞の蛍光イメージング法の原理と薬剤耐性IAVの検出法および分離法への応用について概説する。

### シアリダーゼの検出試薬

シアリダーゼ活性を検出する試薬は、これまでにいくつか開発されている(表1)。4-メチルウンベリフェリル-*N*-アセチルノイラミン酸(2'-(4-Methylumbelliferyl)-*N*-acetylneuraminic acid, 4MU-Neu5Ac)は、シアリダーゼ活性を蛍光検出する試薬としてよく利用されている<sup>1)</sup>。4MU-

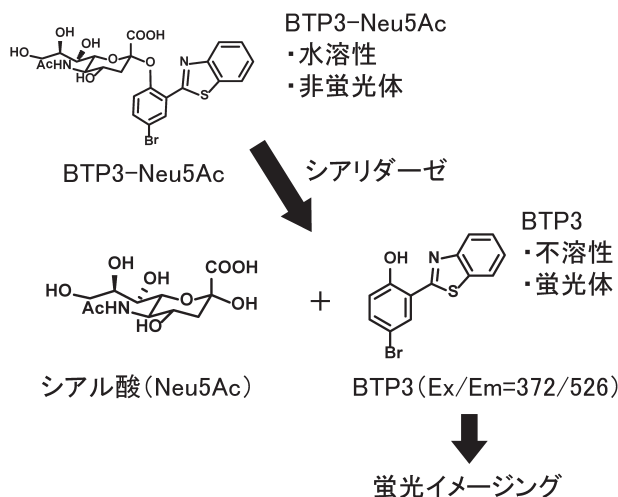
Neu5Acはシアリダーゼにより、酵素活性部位が認識するシアル酸の分子種Neu5Acと、水溶性の蛍光物質4-メチルウンベリフェロン(4-Methylumbelliferone, 4MU)に加水分解する。4MU-Neu5Acはシアリダーゼ活性を高感度に蛍光検出できる。4MUの蛍光性は酸性条件では減弱する<sup>2)</sup>。NA-Starは4MU-Neu5Acと同様にシアリダーゼによりNeu5Acが遊離することで化学発光物質が生成し、化学発光を検出することでシアリダーゼの酵素活性を検出することができる<sup>3)</sup>。4MU-Neu5AcやNA-Starは定量性に優れ、IAVを含むシアリダーゼ活性の測定や薬剤耐性化度の測定に使用される。しかし4MU-Neu5AcやNA-Starの反応生成物は、水溶性でありシアリダーゼ活性の存在部位を組織化学的に蛍光イメージングすることはできない。5-ブromo-4-クロロインドール-3-イル-Neu5Ac(5-Bromo-4-chloroindol-3-yl-Neu5Ac, X-Neu5Ac)は増感剤Fast Red Violet LBを併用することで、IAVのシアリダーゼ活性の存在部位を蛍光イメージングすることができる<sup>4,5)</sup>。しかしこの方法は、酵素活性の検出感度が十分ではなく、非特異的な蛍光も増感されやすいためIAVを特異的に蛍光イメージングすることは出来ない。

我々は、ベンゾチアゾリルフェノール誘導体(BTP)を利用して糖鎖やリン酸基に対する加水

表1. シアリダーゼ活性の主な検出試薬

	検出原理	感度	生成物
4MU-Neu5Ac	蛍光	高	水溶性
NA-Star	化学発光	高	水溶性
X-Neu5Ac	青色発色	低	不溶性
BTP3-Neu5Ac	蛍光	高	不溶性

図1. BTP3-Neu5Acによる蛍光イメージング



分解酵素の蛍光検出剤を開発してきた。BTPは、水に不溶性を示す結晶性の蛍光物質であり、その蛍光はpHの影響を受けにくく安定な蛍光を示す<sup>6)</sup>。150nm以上の大きなストークスシフトを示すため、蛍光検出時に励起光や細胞組織の自家蛍光の影響を受けにくい。BTPの最大の特徴は、フェノール性水酸基に水溶性の高い官能基を結合させることでBTPの蛍光性をオフに水溶性をオンに制御できる点である。BTPにガラクトース (Galactose, Gal) を結合させたBTP-Galやリン酸基 (Phosphate, Phos) を結合させたBTP3-Phosは、 $\beta$ -ガラクトシダーゼやフォスファターゼと反応して蛍光を示す<sup>7,8)</sup>。そこで同じく加水分解酵素のシアリダーゼを蛍光イメージングするため、BTP3のフェノール性水酸基にシアリダーゼが認識するシアル酸の分子種Neu5Acを結合させたBTP3-Neu5Acを開発した。「水溶性」の「非蛍光」物質BTP3-Neu5Acはシアリダーゼの反応により「不溶性」の「蛍光」物質BTP3を生成し、酵素活性の存在部位を組織化学的に蛍光イメージングする (図1)。この方法では、ウイルスや感染細胞をBTP3-Neu5Acと反応させる簡単な操作で高感度に感染細胞を蛍光イメージングできる<sup>9)</sup>。

### インフルエンザウイルスの蛍光イメージング

我々は最初にBTP3-Neu5AcがIAVと反応するかの確認を行った。ヒトIAVとBTP3-Neu5Acを水溶液中で反応させたところ、紫外線照射により緑色蛍光化が認められた。IAVおよびIBVのNA特異的シアリダーゼ阻害薬であるザナミビル<sup>10)</sup>の存在下では、BTP3-Neu5Acによる蛍光発色は阻害された。このことからBTP3-Neu5Acによるウイルスの蛍光化はIAVのシアリダーゼ活性に依存していることが確認された (図2A)。IAVを感染させたイヌ腎由来MDCK細胞をBTP3-Neu5Acと反応させたところ、IAV感染細胞は組織化学的に蛍光イメージングされた (図2B)。この感染細胞の蛍光イメージングは、特異的抗体等は不要であり、必要な操作はBTP3-Neu5Acの添加のみである。この蛍光イメージングは抗NAモノクローナル抗体で蛍光免疫染色した部位とほぼ同様であり、BTP3-Neu5Acにより蛍光イメージングされた細胞はIAV感染細胞であることが確認された。IAVには幅広い宿主域 (ヒト, トリ, ブタなど) と多くの表面抗原性 (亜型) がある。BTP3-Neu5Acは、IAVの宿主, 亜型, 分離年代の違いに

図2. BTP3-Neu5AcによるIAVの検出

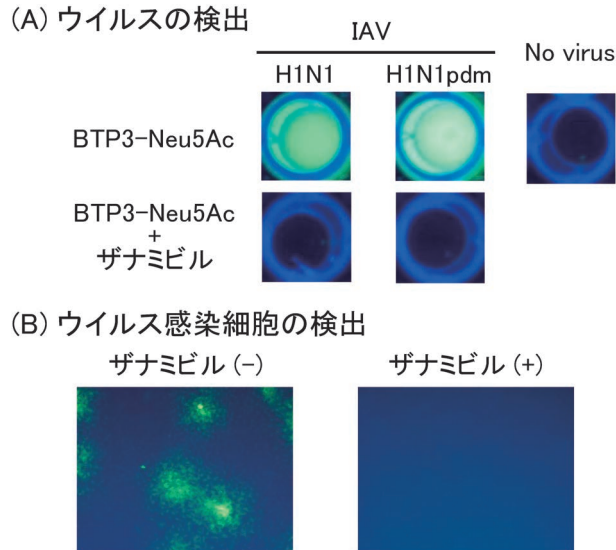
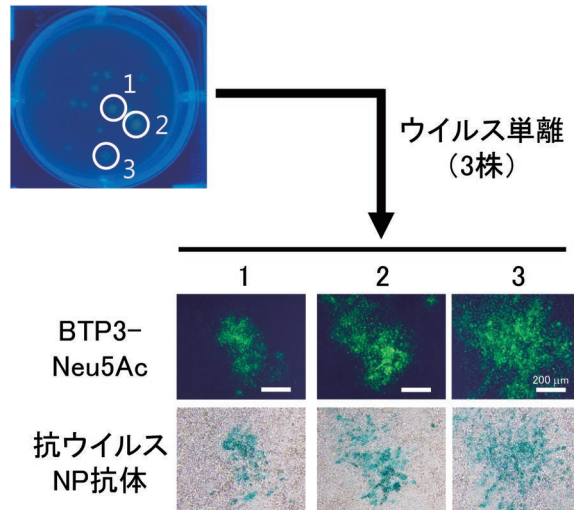


図3. BTP3-Neu5AcによるIAVの分離



関係なく、ウイルスを検出できる。IAV, IBVの他にパラミクソウイルスの一部がシアリダーゼを持つことが知られており、BTP3-Neu5Acはヒトパラインフルエンザ1型および3型ウイルス<sup>11)</sup>やセンダイウイルス<sup>12)</sup>、ニューカッスル病ウイルス<sup>13)</sup>、おたふく風邪の原因となるムンプスウイルス<sup>14)</sup>などのパラミクソウイルスを検出可能で

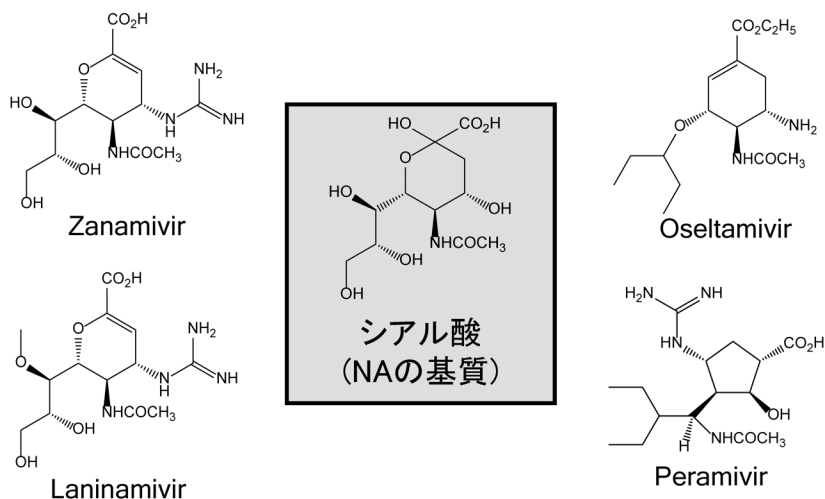
あった (表2)。

BTP3-Neu5Acによる感染細胞の検出の利点はライブイメージングという点であり、これはウイルス株を単離する際に特に効果を発揮する。一般的なウイルス株単離法は、寒天培地を用いて感染細胞を培養することで、一つのウイルスクローンに由来する感染細胞集団 (フォーカス) やアポ

表2. BTP3-Neu5Acにより検出したウイルス

インフルエンザA型ウイルス	H1N1、H1N1pdm、 H3N2、トリH5N3
インフルエンザB型ウイルス	
センダイウイルス	
ニューカッスル病ウイルス	D26株(弱毒型)、 Miyadera株(強毒型)
ヒトパラインフルエンザウイルス	1型、3型
ムンプスウイルス	

図4. NA阻害薬の構造



トース誘導により生じる細胞集団の脱落（プラーク）を形成させる。このプラークからウイルスを単離して、新しい細胞で培養することで単一のウイルス株を得ることができる。BTP3-Neu5Acはフォーカスをライブイメージングするため、蛍光化フォーカスからウイルス株を単離・培養することができる（図3）。フォーカスの蛍光検出によりプラークよりも高い視認性が得られ、

プラーク形成が起こるよりも早い時間でフォーカスを蛍光化できるため、従来のプラーク法よりも効率的にウイルス単離が可能になる。さらに、従来法ではウイルス単離が困難であったプラーク形成能の無い、あるいはプラーク形成能の低いウイルス株においても、BTP3-Neu5Acを利用することで容易にウイルス株の単離が可能になった。

### 薬剤耐性インフルエンザウイルス

現在、インフルエンザ治療薬として最も一般的に使用されるのはNA阻害薬であり、ザナミビル、オセルタミビル、ラニナミビル、ペラミビルの4種類が存在する。これらの薬はIAVおよびIBVのシアリダーゼ活性を特異的に阻害することでウイルス増殖を抑制する。NA阻害薬はいずれも本来の基質であるシアル酸Neu5Acの構造類似体であり(図4)、酵素活性を競合的に抑制する。IAVは非常に変異が起こりやすいため、過去に使用されていたM2チャンネル阻害薬に対しては現在の流行型であるH1N1型とH3N2型ではほぼ全てがM2のアミノ酸変異により耐性化している<sup>15)</sup>。一方、NA阻害薬はNeu5Acと同じ酵素活性ポケットに結合するため、NA阻害薬への耐性を獲得したNAは本来の基質であるシアル酸への親和性も低下し、一般的にNA阻害薬耐性IAVはシアリダーゼ活性やウイルスの増殖性が低下する<sup>16,17)</sup>。このため、NA阻害薬に対しては薬剤耐性化したウイルスは散発的に発生してもその拡大は起こりにくいと考えられていた。しかし、2008年に世界的に流行したH1N1(Aソ連)型IAVは、NAの275番目のアミノ酸が変異したことでオセルタミビルに対する感受性が低下したオセルタミビル耐性ウイルスであった<sup>18,19)</sup>。この耐性ウイル

スの流行により、いわゆる「薬剤耐性インフルエンザウイルス」の流行拡大の危険性が認知されるようになった。2008年の薬剤耐性インフルエンザウイルス流行の背景にはNAタンパク質上のいくつかのアミノ酸変異が重なり、NA阻害薬に対する耐性を獲得しつつシアリダーゼ活性やウイルスの増殖性が低下しない新しい耐性機構が寄与していたことが報告された<sup>20)</sup>。以後、薬剤耐性インフルエンザウイルスの流行拡大が起こり得るものと認識され始め、薬剤耐性ウイルスの検出と流行監視が行われている。

薬剤耐性インフルエンザウイルスの検査法には主に遺伝子検査法と酵素活性測定法がある<sup>21,22)</sup>(表3)。現状では薬剤耐性ウイルスの発生状況はH1N1型のオセルタミビル耐性ウイルスの出現率が毎年数パーセント程度で最も高く、その他の薬剤耐性出現率はごくわずかである<sup>23)</sup>。そのため、薬剤耐性の検査法はH1N1型IAVのH275Yの遺伝子変異を検査することが主流であり、実際に酵素活性を測定して薬剤耐性を判定する方法は少数の抜き取りサンプルについて行われているのみである。H1N1型と同様に毎年流行を起こすH3N2型IAVやIBVの検査体制や未知の薬剤耐性変異ウイルスの発生監視体制は十分ではない。酵素活性測定法には定量性の高い検出試薬が用いられ、検出が直接的で未知の耐性変異でも検出可能であ

表3. 薬剤耐性ウイルスの検査手法

遺伝子検査法	耐性化の遺伝子変異を検出 高感度、多検体に有効 既知の耐性変異のみ判定可能
酵素活性測定法	NA活性を測定して検出 直接的で未知の変異にも有効 操作が煩雑で多検体に不向き

るが、操作が煩雑で多検体の検査には不向きである。酵素活性検出法を簡易化しスクリーニング手法として確立することが出来れば、現在の手法と併せてスクリーニング陽性の検体のみを定量的に検査することで多数の検体であっても全数検査が

可能になることが期待される。BTP3-Neu5Acは酵素活性を検出可能な基質であり、ウイルスシアリダーゼの活性を蛍光イメージングするため、定性反応として簡易スクリーニングに利用できるものと考えられた。そこで、BTP3-Neu5Acによる

図5. BTP3-Neu5Acによる薬剤耐性IAVの検出

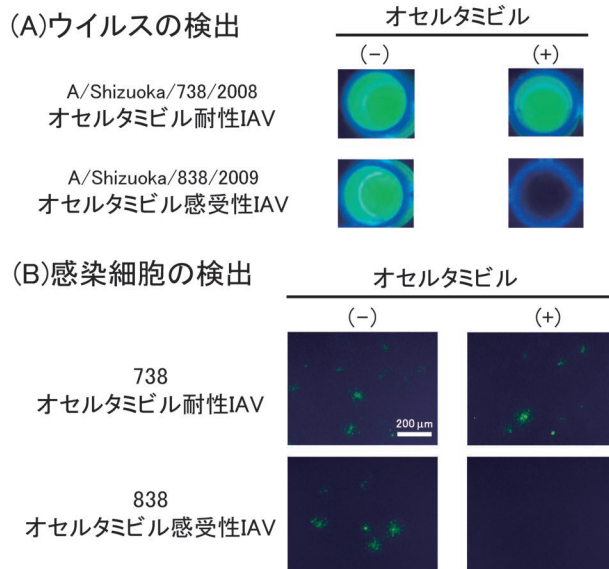
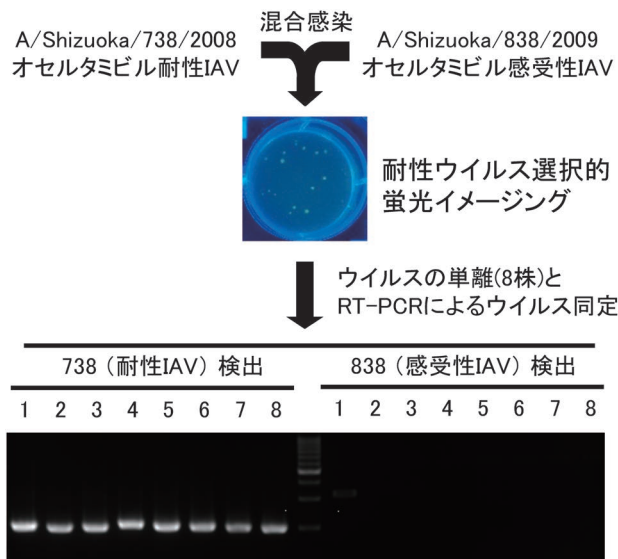


図6. 薬剤耐性IAVの選択的な分離



蛍光イメージングを薬剤耐性インフルエンザウイルスの検出技術として利用できるかについて検討を行った。

### 薬剤耐性ウイルスの検出分離法の開発

インフルエンザ治療薬であるNA阻害薬の存在下では、通常のIAVやIBVはシアリダーゼ活性が完全に阻害される。しかし、薬剤に耐性化したウイルスはシアリダーゼ活性を維持できる。これによりNA阻害薬の存在下では、BTP3-Neu5Acは薬剤耐性ウイルスやその感染細胞を選択的に蛍光イメージングできることが予想された。我々は2008～2009年のシーズンに分離されたオセルタミビル感受性IAV株のA/Shizuoka/838/2009 (H1N1pdm) とオセルタミビル耐性化IAV株のA/Shizuoka/738/2008 (H1N1) を使用して、BTP3-Neu5Acによる薬剤耐性の判別を試みた。BTP3-Neu5Acをオセルタミビル存在下でウイルスや感染細胞と反応させたところ、オセルタミビル耐性ウイルスやその感染細胞のみがオセルタミビル存在下で選択的に蛍光イメージングされた (図5)。薬剤耐性IAV感染細胞をBTP3-Neu5Acにより選択的にライブイメージングできたため、この蛍光化細胞からはウイルス株を単離することで、薬剤耐性IAV株が高効率に単離できるものと予想された。薬剤耐性ウイルスと感受性ウイルスを同量ずつ混合させウイルスサンプルを用いてオセルタミビルとBTP3-Neu5Acによりフォーカスを蛍光イメージングしたところ、オセルタミビル存在下で蛍光化されたフォーカスの数は、阻害剤が無い条件のおよそ半分であった。オセルタミビル存在下で蛍光化されたフォーカスが、オセルタミビル耐性化IAV株に由来することを確認するため、各フォーカスからウイルス株を単離培養し、そのNA遺伝子 (オセルタミビル耐性化275Y, オセルタミビル感受性275H) をRT-PCR法により検出した。8個の蛍光化フォーカスからそれぞれウイル

スを単離したところ、すべてオセルタミビル耐性化IAVが検出された (図6)。薬剤存在下でBTP3-Neu5Acによるフォーカスのライブイメージングを行うことにより、薬剤耐性ウイルス株の選択的なイメージングと分離が可能となった<sup>24)</sup>。BTP3-Neu5Acによる薬剤耐性ウイルス感染細胞の選択的イメージングは、未知の薬剤耐性化変異にも対応し、薬剤を段階希釈で使用することで耐性化度も同時に測定できる。本手法を用いることで薬剤耐性ウイルス感染細胞を迅速かつ選択的に蛍光イメージングすることが可能となり、さらに検出した薬剤耐性ウイルスは培養や分離を容易に行うことができる。

### おわりに

シアリダーゼの蛍光イメージング剤「BTP3-Neu5Ac」の開発により、IAV、IBVやその感染細胞を簡便な操作で迅速に蛍光イメージングできる。また、フォーカスをライブイメージングすることにより、ウイルス株の単離を容易にした。BTP3-Neu5Acを用いた検出技術は、インフルエンザ治療薬のNA阻害薬を併用することで、薬剤耐性インフルエンザウイルスを選択的に検出・分離することを可能にする。本技術は薬剤耐性ウイルスの流行拡大監視や薬剤耐性機構の解析の効率化に大きく貢献するものと期待される。今後、BTP3-Neu5Acの高性能化や応用利用法を確立することで、医療や衛生、研究といった各方面へ貢献していきたい。

### 謝辞

2016年度の日本感染症医薬品協会奨励賞受賞にあたり、これまで御指導頂いた静岡県立大学大学院薬学研究院生化学講座の鈴木 隆教授、高橋忠伸准教授、南 彰講師、BTP3-Neu5Acを合成頂いた広島国際大学薬学部薬品合成化学研究室の池田 潔教授、大坪忠宗准教授、ウイルス株を御提



供頂いた静岡県環境衛生科学研究所微生物部の佐原啓二部長および諸先生方、本賞の選考委員の先生方に心より感謝申し上げます。

### 利益相反自己申告

著者 紅林佑希は公益財団法人 日本感染症医薬品協会、公益財団法人 服部報公会、花王健康科学研究会から研究助成金を受けている。

[この総説は2016年度日本感染症医薬品協会奨励賞受賞者 紅林佑希氏より投稿したものです。2016年度奨励賞の対象研究について、2016年10月18日(火)に学会館にて受賞記念講演会が開催され(座長;藤村 茂先生),その内容をまとめたものです。]

### 引用文献

- 1) NAYAK, D. P.; U. REICHL: Neuraminidase activity assays for monitoring MDCK cell culture derived influenza virus. *J. Virol. Methods* 122: 9~15, 2004
- 2) GRABER, M. L.; D. C. DILILLO, B. L. FRIEDMAN, *et al.*: Characteristics of fluoroprobes for measuring intracellular pH. *Anal. Biochem.* 156: 202~212, 1986
- 3) BUXTON, R. C.; B. EDWARDS, R. R. JUO, *et al.*: Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal. Biochem.* 280: 291~300, 2000
- 4) FUJII, I.; Y. IWABUCHI, T. TESHIMA, *et al.*: X-Neu5Ac: a novel substrate for chromogenic assay of neuraminidase activity in bacterial expression systems. *Bioorg. Med. Chem.* 1: 147~149, 1993
- 5) SUZUKI, T.; T. TAKAHASHI, C. T. GUO, *et al.*: Sialidase activity of influenza A virus in an endocytic pathway enhances viral replication. *J. Virol.* 79: 11705~11715, 2005
- 6) KIM, T. I.; H. J. KANG, G. HAN, *et al.*: A highly selective fluorescent ES IPT probe for the dual specificity phosphatase MKP-6. *Chem. Commun.* 39: 5895~5897, 2009
- 7) OTSUBO, T.; A. MINAMI, H. FUJII, *et al.*: 2-(Benzothiazol-2-yl)-phenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside derivatives as fluorescent pigment dyeing substrates and their application for the assay of  $\beta$ -D-galactosidase activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23: 2245~2249, 2013
- 8) TAKAHASHI, T.; T. OTSUBO, K. IKEDA, *et al.*: Histochemical imaging of alkaline phosphatase using a novel fluorescent substrate. *Biol. Pharm. Bull.* 37: 1668~1673, 2014
- 9) KUREBAYASHI, Y.; T. TAKAHASHI, T. OTSUBO, *et al.*: Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells. *Sci. Rep.* 4: 4877, 2014
- 10) ITZSTEIN, M. von; W. Y. WU, G. B. KOK, *et al.*: Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* 363: 418~423, 1993
- 11) TAKAHASHI, T.; M. TAKANO, Y. KUREBAYASHI, *et al.*: Rapid fluorescent detection assay for human parainfluenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 38: 1214~1219, 2015
- 12) TAKANO, M.; T. TAKAHASHI, T. AGARIKUCHI, *et al.*: Histochemical fluorescent staining of Sendai virus-infected cells with a novel sialidase substrate. *Virology* 464~465, 424~431, 2014
- 13) TAKAHASHI, T.; M. TAKANO, T. AGARIKUCHI, *et al.*: A novel method for detection of Newcastle disease virus with a fluorescent sialidase substrate. *J. Virol. Methods* 209: 136~142, 2014
- 14) TAKAHASHI, T.; T. AGARIKUCHI, Y. KUREBAYASHI, *et al.*: Easy and rapid detection of mumps virus by live fluorescent visualization of virus-infected cells. *PLoS One* 10: e0144038, 2015
- 15) ISON, M. G.: Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr. Opin. Virol.* 1: 563~573, 2011
- 16) IVES J. A.; J. A. CARR, D. B. MENDEL, *et al.*: The H274Y mutation in the influenza A/H1N1 neuraminidase active site following oseltamivir phosphate treatment leave virus severely compromised both *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res.* 55: 307~317, 2002
- 17) ABED, Y.; N. GOYETTE, G. BOIVIN: A reverse

- genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir. Ther.* 9: 577~581, 2004
- 18) HAYDEN, F. G. & M. D. D. JONG: Emerging influenza antiviral resistance threats. *J. Infect. Dis.* 203: 6~10, 2011
- 19) BARANOVICH, T.; R. G. WEBSTER, E. A. GOVORKOVA: Fitness of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A viruses. *Curr. Opin. Virol.* 1: 574~581, 2011
- 20) BLOOM, J. D.; L. I. GONG, D. BALTIMORE: Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. *Science* 328: 1272~1275, 2010
- 21) BOIVIN, G.: Detection and management of antiviral resistance for influenza viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 7 Suppl. 3: 18~23, 2013
- 22) OKOMO-ADHIAMBO, M.; T. G. SHEU, L. V. GUBAREVA: Assays for monitoring susceptibility of influenza viruses to neuraminidase inhibitors. *Influenza Other Respir. Viruses* 7 Suppl. 1: 44~49, 2013
- 23) HATA, A.; R. AKASHI-UEDA, K. TAKAMATSU, *et al.*: Safety and efficacy of peramivir for influenza treatment. *Drug Des. Devel. Ther.* 8: 2017~2038, 2014
- 24) KUREBAYASHI, Y.; T. TAKAHASHI, C. TAMOTO, *et al.*: High-efficiency capture of drug resistant-influenza virus by live imaging of sialidase activity. *PLoS One* 11: e0156400, 2016

---

## High efficiency method of detection and isolation of neuraminidase inhibitor resistant influenza viruses by fluorescence sialidase imaging

YUUKI KUREBAYASHI

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences,  
University of Shizuoka

Influenza A and B viruses possess an enzyme “sialidase” that cleavages terminal sialic acid from glycochains. These viral sialidase proteins are highly expressed on the virus infected cells. We developed sialidase imaging probe “BTP3-Neu5Ac” that enables histochemical fluorescence staining of sialidase activity. BTP3-Neu5Ac was able to perform speedy and easy fluorescence imaging of these virus infected cells, with no needs of specific antibody and cell fixation. In addition, combination use of anti-influenza drugs (sialidase inhibitors) and BTP3-Neu5Ac resulted in selective fluorescence imaging for detection and high-efficiency isolation of drug-resistant virus. Fluorescence imaging of drug-resistant virus will be a powerful method for study of the drug-resistance mechanism, for monitoring of drug-resistant viruses. A novel tool for fluorescence imaging of viral sialidase activity is described in this review.