

感染症検査薬を目指した糖鎖担持カルボシラン dendrimer の創製とその評価に関する研究
Study on photoluminescent carbosilane dendrimer peripherally functionalized with carbohydrate as a novel biosensor

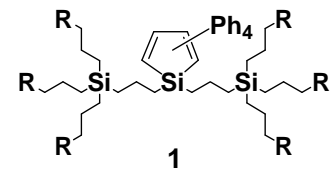
プロジェクト代表者：幡野 健 (理工学研究科・講師)

Ken Hatano (Graduate of Science & Engineering, Lecture)

1 研究背景および研究目的

毒素・ウイルスは細胞表層を形成している糖タンパク質・糖脂質の特定の糖鎖を特異的に認識・接着することが明らかにされ、現在では、この機構を応用した感染症の予防薬・治療薬の開発研究が国内外で活発に行われている。その基本となるのが“糖鎖クラスター効果”である。これは細胞表層の糖鎖のように高分子等の担体に機能性糖鎖をクラスター化させウイルスに対する接着効果を向上させる方法であり、糖鎖単体よりも接着作用が3桁も高められることが知られている。我々は、カルボシラン dendrimer を糖鎖の集積場に用い、病原性大腸菌 O-157 の産生するペロ毒素に対して強い阻害活性を示す糖鎖クラスター化合物の創製に成功した¹⁾。更にデングウイルス²⁾、インフルエンザウイルス³⁾ の引き起こす感染症に対し効果を示す糖鎖クラスター化合物の創製をこれまでにやってきた。

糖鎖クラスター化合物は、そのウイルス・毒素に対する特異接着能を活かした予防薬や治療薬として注目され、これまで多くの研究が行われてきた。しかし、糖鎖クラスター化合物をウイルス・毒素の検出に利用した研究報告例はこれまでに殆ど無い。本研究では糖鎖担持カルボシラン dendrimer を基本骨格とし、更に蛍光機能を付与した新たな化合物(1)を合成し、それをウイルス・毒素の蛍光検出に利用するための基盤研究を行うこととした。



R = Lac: Gal β (1 \rightarrow 4)Glc β 1-

2 研究方法と結果

ウイルス・毒素は病原性があるため有機合成の研究を主とする我々には取り扱えない。そこで安全なレクチンをウイルス・毒素の代替物として使い、下記の実験を実施した。用いるレクチンにはピーナッツ由来の *peanut agglutinin* (PNA) を選び、PNA に特異的に接着するラクトース [Lac: Gal β (1 \rightarrow 4)Glc β -] を担持したカルボシラン dendrimer (**1-Lac**: R = Lac) を我々が確立した方法に従って合成した⁴⁾。

発光性のシロール dendrimer (**1-Lac**) を HEPSE バッファー溶液 (5 μ M, pH 7.4) で希釈し、0.6 μ M とした。これを 3.0 mL 正確に量り取り、蛍光測定用セルに入れた。PNA 濃度を 20 μ M に調整した HEPSE バッファー溶液 (5 μ M, pH 7.4) を **1-Lac** の入った蛍光測定用セルに徐々に加えながら、蛍光スペクトルを 5 $^{\circ}$ C にて測定した (図 1)。PNA を添加しないとき、**1-Lac** は 474 nm に強い発光極大を有する蛍光スペクトルを示した。しかし、その発光強度は PNA の添加量の増加と共に徐々に減少していった。PNA を添加する前の **1-Lac** の発光強度を I_0 、PNA 滴下後の発光強度を I とし、PNA 添加量に対する相対発光強度変化量 $[(I - I_0) / I_0]$ を図 2 に示した。最終的に 50 μ L の PNA の HEPSE バッファー溶液を加え

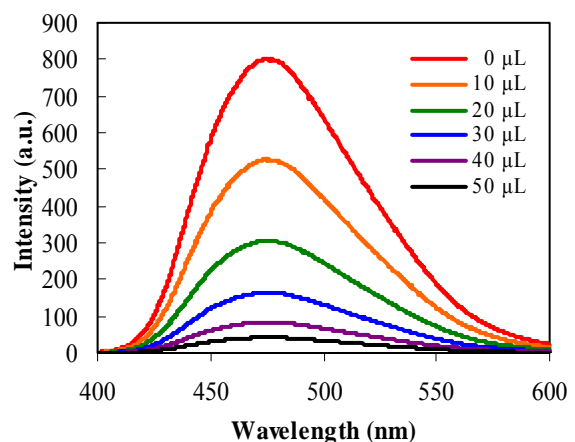


Figure 1. PL spectra of **1-Lac** in the presence of different amounts of PNA (from 0 to 50 mL). Concentration: 0.6 mM in HEPSE buffer (5 mM, pH = 7.4)

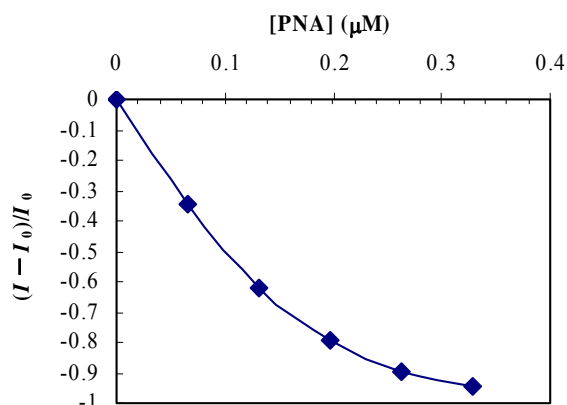


Figure 2. Plots of relative fluorescence intensity $[(I-I_0)/I_0]$ of solution of **1-Lac** at 474 nm vs concentration of PNA.

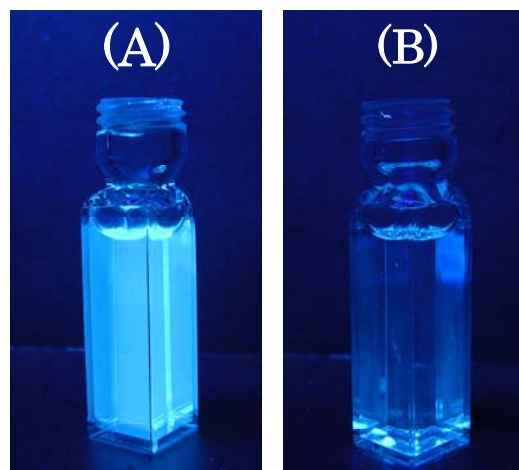


Figure 3. Pictures of photoluminescence of the HEPES buffer solution of **1-Lac** in the (A) absence and (B) presence of PNA. Excitation: 360 nm.

ることにより、**1-Lac** の発光強度は PNA 添加前の発光強度 (I_0) に比べて 5% まで蛍光が消光した。この際の蛍光強度変化は人の目にも明らかであり、容易にその違いを見極めることができた (図 3)。

また、ラクトースと接着しない小麦胚芽由来のレクチン *Wheat germ agglutinin* (WGA) およびブランク溶液 (レクチンなしの HEPES バッファー溶液) の滴下では **1-Lac** の相対蛍光強度変化は、いずれの場合もわずか 2% に止まることを別途確認した。これは上記の蛍光消光現象にはラクトースと PNA の特異的接着が強く関与していること、および蛍光消光現象が HEPES バッファー溶液による希釈効果でないことを示唆している。すなわち、**1-Lac** のフォトルミネッセンス (PL) を用いれば、溶液中に PNA が存在するか容易に検出 (診断) できることを今回の実験結果では明らかにした⁵⁾。

3 考察と今後の研究展開

今回の実験は安全性を考慮し PNA を検出対象に用いたが、同じレクチン類であるウイルスや毒素の検出を行なう場合には、検査するウイルス・毒素と相互作用する機能性糖鎖をシロールデンドリマー(**1**)へ修飾することにより検出 (診断) への応用が可能になると予想される。また、糖鎖を置換するだけで多くのウイルス・毒素の検出に対応可能であること、PL 用の紫外線ランプさえあれば特殊な機器を利用せずとも検査が可能であるため高い汎用性と利便性が期待される。

シロールデンドリマー (**1**) のレクチン接着時における蛍光消光現象は、凝集状態により発光強度が変化するシロール基の特性 (aggregation-induced emission: AIE) が利用されている^{4,6)}。AIE 特性を示す化合物は極めて少なく、シロール基はそのうちの 1 つである。AIE 特性をレクチン類の検出に応用した報告はこれまでには無く、本研究が初めての例となる。

4 参考文献

- 1) K. Nishikawa *et al.*, *J. Infect. Dis.*, **2005**, *191*, 2097-2105; 2) A. Yamada *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **2006**, *341*, 467-473;
- 3) K. Matsuoka *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 3327-3330; 4) K. Hatano *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 4365-4368; 5) 特願 2008-283976: “ウイルス、微生物の検出方法” 幡野 健, 松岡浩司, 照沼大陽; K. Hatano *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **2009**, *50*, 5816-5819; 6) B. Z. Tang *et al.*, *Chem. Comm.*, **2001**, 1740-1741.