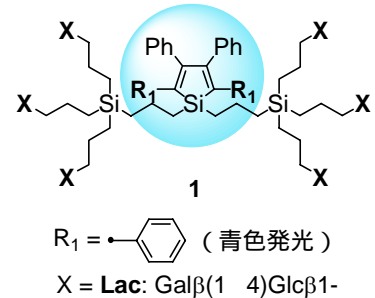


# 色調変化による多目的ウイルス検査を指向した糖鎖クラスター化合物群の創製とその評価に関する研究

プロジェクト代表者：幡野 健（理工学研究科・准教授）

## 1 研究背景および研究目的

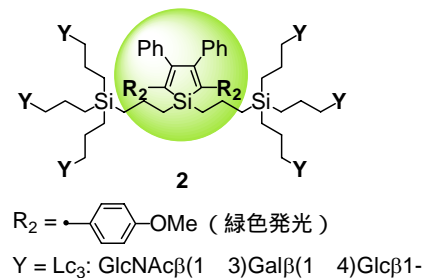
毒素・ウイルスは細胞表面を形成している糖タンパク質・糖脂質の特定の糖鎖を特異的に認識・接着することが明らかにされ、現在では、この機構を応用した感染症の予防薬・治療薬の開発研究が国内外で活発に行われている。その基本となるのが“糖鎖クラスター効果”である。これは細胞表面の糖鎖のように高分子等の担体に機能性糖鎖をクラスター化させウイルスに対する接着効果を向上させる方法であり、糖鎖単体よりも接着作用が3桁も高められることが知られている。我々は、カルボシラン dendrimer を糖鎖の集積場に用い、病原性大腸菌 O-157 の産生するベロ毒素に対して強い阻害活性を示す糖鎖クラスター化合物の創製に成功した<sup>1)</sup>。更にデングウイルス<sup>2)</sup>、インフルエンザウイルス<sup>3)</sup>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。また、最近我々は上述のカルボシラン dendrimer へ凝集状態により発光強度が著しく変化する 2,3,4,5-テトラフェニル-1-シラシクロペンタジエニル(以下シロールと略す)基を導入した化合物 1 を合成し、それがウイルス・毒素などのレクチン類の検出薬として有用であることを報告してきた<sup>4)</sup>。



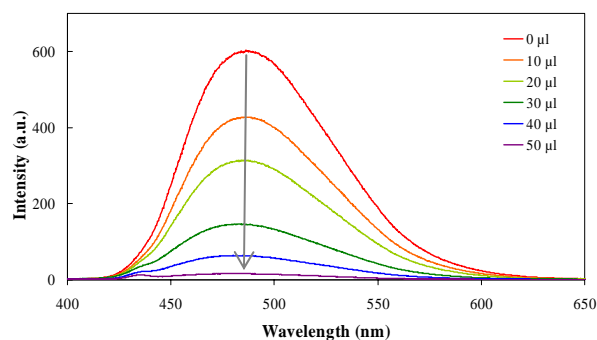
一方、玉尾らはシロール環の新たな合成方法を確立した。この方法により、シロール環の 2,5 位へ様々なアリール基導入が可能になり、青色発光の他に緑、黄、橙、赤色発光するシロール誘導体が合成可能になった<sup>5)</sup>。そこで本研究では、接着・認識するレクチン並びにフォトルミネッセンス (PL) 波長がそれぞれ異なるシロール dendrimer を合成し、それら混合物の PL 発光色調変化により投与したレクチンの種類を判別できる新しい検査薬の開発を目的としている。

## 2 研究方法と結果

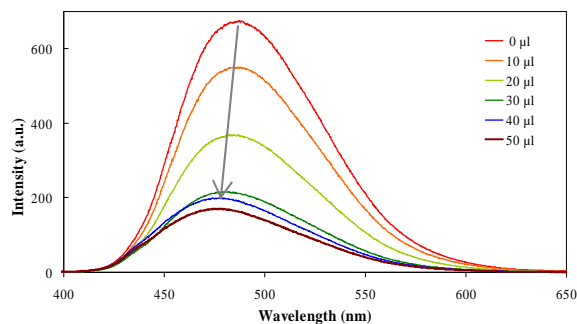
ウイルス・毒素は病原性があるため有機合成の研究を主とする我々には取り扱えないため、安全なレクチンをウイルス・毒素の代替物として使い、以下の実験を実施した。用いるレクチンにはピーナッツ由来の *peanut agglutinin* (PNA) およびコムギ胚芽由来の *wheat germ agglutinin* (WGA) を選び、PNA に特異的に接着するラクトース [Lac: Galβ(1-4)Glc1β-] を担持した青色に PL 発光するカルボシラン dendrimer (1-Lac: X=Lac) と WGA に特異的に接着するグルコサミン末端をもつラクトリオース [Lc<sub>3</sub>: GlcNAcβ(1-3)Galβ(1-4)Glc1β-] を担持した緑色に PL 発光するカルボシラン dendrimer (2-Lc<sub>3</sub>: Y=Lc<sub>3</sub>) をそれぞれ合成した。



まず、緑色に PL 発光するシロール dendrimer (2-Lc<sub>3</sub>) が青色に PL 発光するシロール dendrimer (1-Lac) と同様に認識するレクチンの添加により、蛍光消光することを確認した。2-Lc<sub>3</sub> を HEPSE バッファー溶液 (5 mM, pH 7.4) にて希釈し、0.7 μM 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。WGA 濃度を 10 μM に調整した HEPES バッファー溶液 (5 mM, pH 7.4) を 2-Lc<sub>3</sub> 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 にて測定した (図 1)。WGA を添加しないとき、2-Lc<sub>3</sub> は 494 nm に強い発光極大を有する蛍光スペクトルを示した。更に、その発光強度は WGA の添加量の増加と共に徐々に減少していった。最終的に 50 μL の WGA の HEPES バッファー溶液を加えることにより、2-Lc<sub>3</sub> の発光強度は WGA 添加前の発光強度に比べて 5% まで蛍光が消光することを確認した。

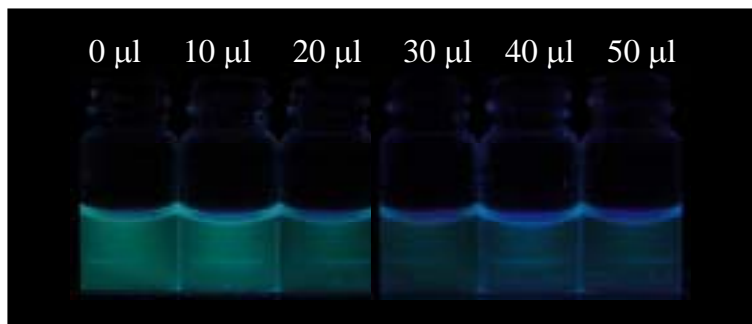


**Fig. 1.** PL spectra of 2-Lc<sub>3</sub> in the presence of different amount of WGA (from 0 to 50 µL). The dendrimer concentration: 0.7 µM in HEPES buffer (5 mM, pH = 7.4) Ex: 378 nm.



**Fig. 2.** PL spectra of 1-Lac and 2-Lc<sub>3</sub> mixture in the presence of different amount of WGA (from 0 to 50 µL). The dendrimers concentration: 0.35 µM in PBS buffer (10 mM, pH = 7.4) Ex: 378 nm.

次に青色に PL 発光する 1-Lac と緑色に PL 発光する 2-Lc<sub>3</sub> の混合物に対して、WGA の添加を行いながら同様に混合物の蛍光スペクトル変化を観察した。混合物の蛍光スペクトルでは、1-Lac の発光極大波長 475 nm と 2-Lc<sub>3</sub> の 494 nm のほぼ中間に値する 485 nm に吸収極大が観測された (図 2)。これに WGA 溶液を徐々に加えるとシロール dendrimer 混合物の発光スペクトルは、発光強度の減少とともに発光波長の短波長シフトが観測された。WGA 溶液を 50 µL 添加したときの発光波長は、青色発光のシロール dendrimer-1-Lac の発光波長と同じ 474 nm となった。このときの混合物の PL 発光の様子を図 3 に示した。図 3 の写真では混合物の PL 発光は WGA の添加に伴い、青緑色から徐々に青色発光へと変化していることが容易に分かる。これは WGA が添加されるとシロール混合物中の 2-Lc<sub>3</sub> が WGA と接着し凝集体の崩壊を起こすため、2-Lc<sub>3</sub> の緑色の蛍光が消光する。一方、WGA を認識しない 1-Lac は WGA を添加しても凝集状態を保持するため、1-Lac による青色発光が観察されることに起因している。すなわち、シロール dendrimer 混合物の PL 発光を利用すれば、その色調により複数のレクチンの検出 (診断) できることを今回の実験結果は示唆している。



**Figure 3.** Pictures of photoluminescence of the HEPES buffer solution of 1-Lac and 2-Lc<sub>3</sub> mixture with different amounts of WGA. Excitation: 365 nm.

### 3 今後の研究展開

今回、青色および緑色に PL 発光するシロール dendrimer の混合物を用いて、レクチン認識による青色への色調変化を確認することができた。このことを光の三原色 (R: 赤色、G: 緑色、B: 青色) に発光するシロール dendrimer に展開すれば、それら混合物の白色 PL 発光となり、レクチン検出時の色調変化は今回の実験結果よりも更に鮮明になり、より検出薬 (診断薬) として付加価値が高くなると期待している。

### 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.*, **2009**, *50*, 5816-5819; 幡野 健, 松岡浩司, 照沼大陽, “ウイルス、微生物の検出方法”, 特願 2008-283976; 5) Tamao *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 1683; 6) K. Tamao *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **2000**, *6*, 1683-1692.