

## シロールをコアとした糖鎖担持カルボシラン dendrimer の レクチン検査薬としての評価

Lectin detection based on photoluminescent silole-core carbosilane dendrimer peripherally  
functionalized with carbohydrate

佐伯 整, 幡野 健\*, 横田洋大, 相澤宏明, 小山哲夫, 松岡浩司, 照沼大陽

Hitoshi SAEKI, Ken HATANO, Hiroo YOKOTA, Hiroaki AIZAWA, Tetsuo KOYAMA,  
Koji MATSUOKA, Daiyo TERUNUMA

A glycocluster periphery functionalized with lactose derivative possessing a silole moiety as a luminophore was synthesized. The photoluminescence spectrum of the glycocluster showed extremely strong emission at 475 nm and the absolute quantum yield was estimated to be 92% in water. The emission intensity was decreased by increasing the amount of *peanut agglutinin* (PNA), lactose-binding lectin, eventually to be nearly one-twentieth of the intensity in the case of absence of PNA. The fluorescence quenching of the glycocluster on mixing with PNA can be easily distinguished with the naked-eye observation under UV irradiation. Whereas no distinct change in the fluorescence properties of the glycocluster was observed when *wheat germ agglutinin* (WGA) was employed.

**Keywords : Aggregation-induced emission, Biosensor, Carbohydrate, Fluorescence-quenching, Glycocluster, Lectin, Silole**

【序論】 近年、細胞の認識や情報伝達、分化・増殖、細胞接着、免疫応答や血液凝固など多様な生命現象において、糖鎖が深く関わっていることが明らかになってきている<sup>1)</sup>。その一つとして病原性細菌との相互作用が挙げられ、宿主の細胞への微生物の接着は糖鎖を介して行われることが見出されてきている<sup>2)</sup>。この発見は病原微生物の感染を防御するという点において不可欠であり、このメカニズムは、細胞と細胞の認識作用のモデルとして重要な役割を果たしている。

糖結合タンパク質との相互作用において、糖鎖分子単独では結合は弱い、糖鎖は集合体構造となることで非常に強く認識されるようになることが Lee らによって報告されている<sup>3)</sup>。この現象は糖鎖クラスター効果と呼ばれ、ポリペプチド<sup>4)</sup>や多糖<sup>5)</sup>などのポリマーに対してオリゴ糖が側鎖として結合しているような物質群への関心が高まってきている。そのため、人工的に生

理活性糖鎖を高分子に結合させることにより細胞への応用研究が盛んに行われている<sup>6),7)</sup>。

ウイルスや毒素の結合を阻害する医薬品や機能性材料グライコクラスターの研究分野発展の初期においては、糖鎖の集積化のための支持体として直鎖状高分子を用いたグライコポリマー<sup>8)</sup>がほとんどであった。直鎖状高分子を基本骨格とし糖鎖を集積化させた場合、非常に高い集積度を有するため、タンパク質との親和性は著しい向上を示すことが報告されている。しかし高分子化合物は一般に異なる分子量を有する化合物の集合体であり、分子の形状や分子量、糖鎖間距離を制御することは極めて困難である。

一方 1985 年に Tomalia ら<sup>9)</sup>と Newkome ら<sup>10)</sup>の二つのグループによって、これまでの直鎖状または 3 次元的に分岐した高分子とはまったく異なる、新たな高分子が提唱された。その高分子は単一の分子量で、なおかつ規則的な枝分かれ構造を持つ樹木状巨大分子である。このような精密構造を有する高分子は dendrimer と呼ばれるようになった。Dendrimer は一般には直径が数 nm から十数 nm の分子であり、世代数が増すほどその形状は球状に近づく。Dendrimer の骨格構造としてはポリ (アミドアミン)、ポリアミン、ポリアミド、ポリエーテル、ポリエステル、ポリカルボシランなど、様々なものがある<sup>11)</sup>。同じタイプの骨格構造を用いて

\*埼玉大学大学院 理工学研究科物理機能系専攻

Saitama University; Graduate School of Science and Engineering

Saitama University, 255 Shimo-Okubo, Sakura-ku, Saitama, Saitama, 338-0825, Japan

も、コアの構造や世代数が異なれば、 dendrimer のサイズも、内部の空隙も、末端基間の距離も変わる。つまり、分子表面に機能性基を導入したときに、機能性基間の距離や機能性基数を高い自由度で精密に設計・制御することが可能である。

dendrimer を支持体としたグライコクラスターは、1995 年に青井・岡田らによってポリ (アミドアミン) を骨格構造とした dendrimer が最初に報告された<sup>12)</sup>。このグライコクラスターはシュガーボールと名づけられ、このシュガーボールの報告を契機として様々なグライコ dendrimer の研究が行われるようになった。

カルボシラン dendrimer の合成は、二重結合へのヒドロシリル化とそれに続くアルケニル化を繰り返すことにより行われる。このとき用いるヒドロシランとして  $\text{Me}_2\text{SiHCl}$ ,  $\text{MeSiHCl}_2$ ,  $\text{HSiCl}_3$  を使い分けることにより分岐数を 1 から 3 まで選択することができ、アルケニル化に用いるグリニャール試薬のアルキル鎖を変化させることで鎖長を制御することも出来る。このようにカルボシラン dendrimer は明確な単一分子量を有する巨大分子でありながら分子の形状、分岐数およびサイズを自由に設計・制御することが可能である。また、これ以外の特徴としても下記のことが挙げられる。

1. 酸、アルカリ条件下でも比較的安定である。
2. 骨格が疎水性で、柔軟である。
3. 化学的に中性の分子である。
4. 生体に対して無害であることが予想される。

毒素やウイルスなどの糖結合性タンパク質と糖との相互作用の解析は様々な手法を用いて行われおり、そこから得られる接着様式などの知見は糖鎖製剤の実用

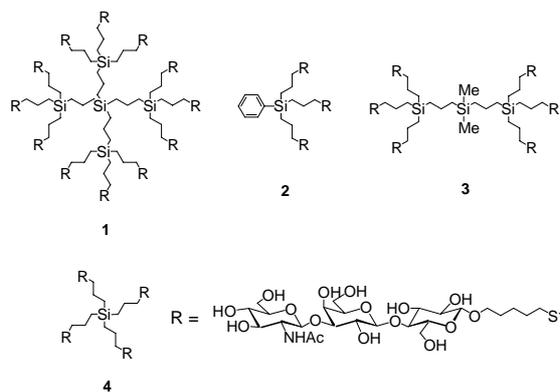
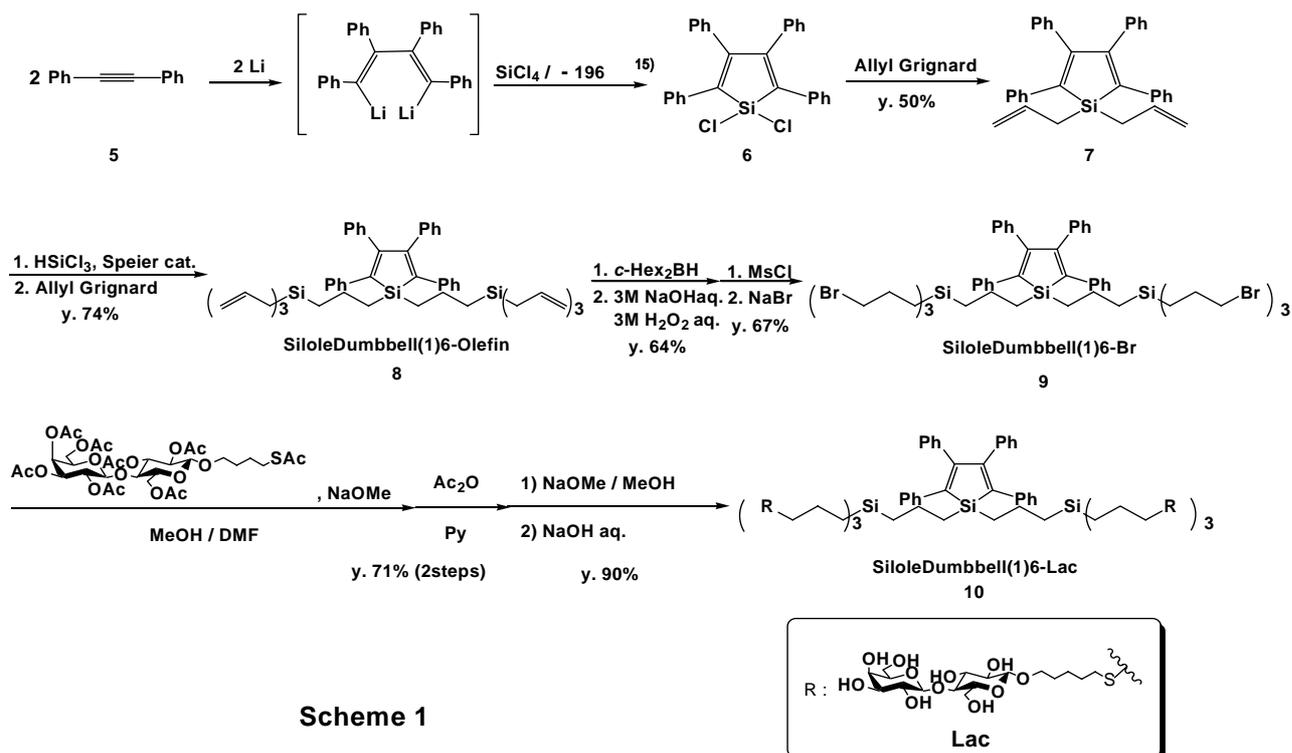


Fig.1 Dendrimers of different on structure

化に向け重要な役割を果たしている。

糖鎖担持カルボシラン dendrimer と糖鎖結合性タンパク質との相互作用を物理的な手法により明らかにするために、ラクトリアオース担持カルボシラン dendrimer 群を新たに合成し、コムギ胚芽レクチン WGA との相互作用を蛍光測定により求めた。その結果、クラスター化していないラクトリアオースでは親和定数  $K_a$  が  $1.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$  であったのが、糖鎖を集積化することにより親和定数が増大することが確認された。その増大幅は 3 分岐 **2** または 4 分岐化合物 **4** でおよそ 40 倍であり、さらに 6 分岐 **3** では 2500 倍となり、糖鎖のクラスター化により急激に結合定数が増大していた。これにより、糖鎖を集積化させる糖鎖クラスター化合物の合成という手法の有効性を明確に示すことができた。その一方で、さらに価数を増やした 12 分岐化合物 **1** の  $K_a$  値は、6 分岐化合物が示した  $K_a$  値よりも低下していた。これは、12 分岐にもなると糖鎖密度があまり



Scheme 1

に高くなるために、負の糖鎖クラスター効果が働いたものと考えられる。これらの結果から、WGA との接着には6分岐化合物が適していることが明らかとなった。また、Dumbbell(1)6型クラスター化合物が *in vitro* のみならず *in vivo* においても阻害活性を示すことが明らかとなった。この結果は、動物レベルで初めて抗 Dengue ウイルス活性を示す化合物の例となった<sup>13)</sup>。

蛍光性分子であるシロール基は有機溶媒中では弱い発光しか示さないが、水を添加しシロール基を凝集させることでその蛍光が強くなる AIE (Aggregation-Induced Emission)効果と呼ばれる性質をもつことが知られている<sup>14)</sup>。今回我々は、Dumbbell(1)6型と凝集状態で蛍光強度が変わるシロール基を組み合わせた新たな化合物を合成し、それによるレクチン(ウイルス・毒素の代替物として利用)の検出を目的として研究を行った。

#### 【合成方法】

5を出発物として Hong ら<sup>15)</sup>の手法を用いてシロール骨格を持つ 6 を合成し、アリルグリニヤール試薬との反応により 7 を 50 %の収率で合成した(Scheme 1)。7 と白金触媒 ( $H_2PtCl_6 \cdot H_2O$ ) を用いたトリクロロシランによるヒドロシリル化、それに続くアリルグリニヤール試薬との反応により第一世代の 8 を 74 %の収率で合成した。塩基性溶媒中、8 とジシクロヘキシルボランとの反応ののち、過酸化水素による酸化により末端ヒドロキシ化、塩化メタンスルホン酸による O-メシル化、臭化ナトリウムによるブロモ化を行い末端官能基化体の 9 を合成した。ヒドロシリル化や末端官能基化の際、シロール基での反応が予想されたが、位置選択性を持って反応が進行した。

末端に導入する糖鎖はピーナツレクチンと特異的に認識・接着を行うラクトース(Lac)を用いた。9 へのラクトース誘導体の導入は、メタノール溶媒中でナトリウムメトキドによるラクトース誘導体スペーサー末端の脱アセチル化により、デンドリマー末端への求核置換反応によって行われた。この反応中にラクトース部分も脱保護が行われるために後処理としてピリジン溶媒中で無水酢酸による再保護を行った。精製は分取用 GPC にて行い、全ての末端に糖鎖の導入を確認後、Zemplén 脱保護とそれに続く醜化により行い、糖鎖クラスター10を得た。

10 は以前我々が報告した 10 のグロボ三糖類縁体と同様に両親媒性物質であるため、類似の AIE 効果を示すことが予想された<sup>16)</sup>。Fig. 2(A)は水の割合が 100-75 %の割合のとき、Fig. 2(B)は水の割合が 20-0 %のときの蛍光強度変化の結果を表している。また、Fig. 2(A)と Fig. 2(B)の  $Em = 474 \text{ nm}$  における蛍光強度を水/アセトン混合比にプロットした結果を Fig. 2(C)示した。以前報告した 10 のグロボ三糖類縁体同様に 10 においても水の割合が最も高いとき(100%)、および最も低いとき

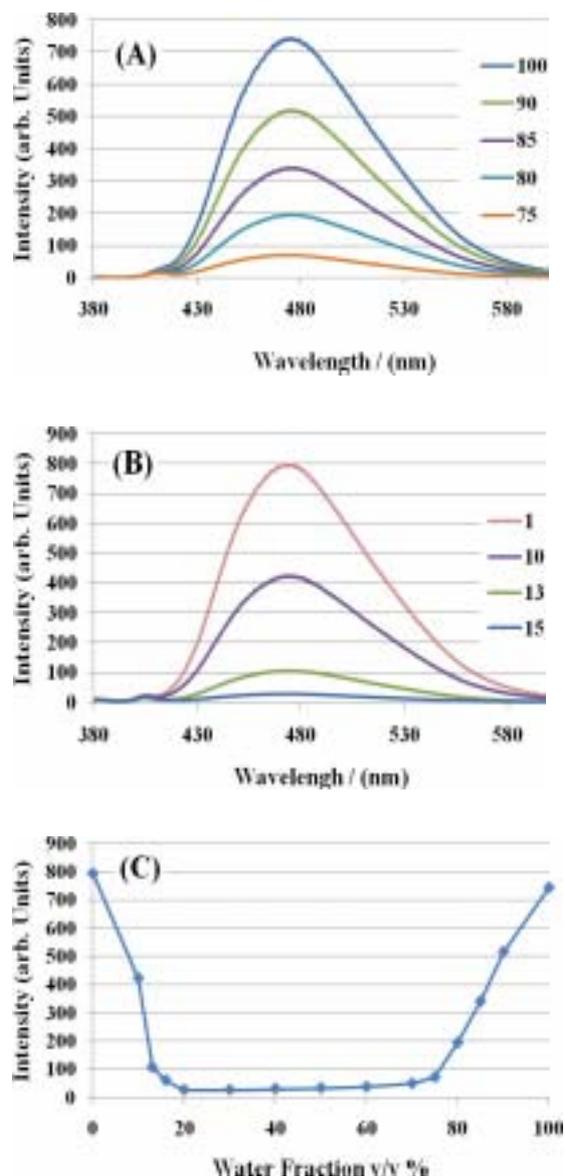
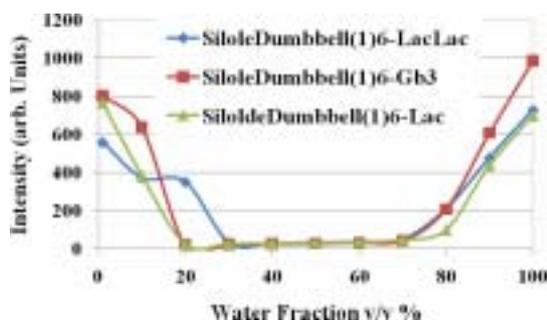


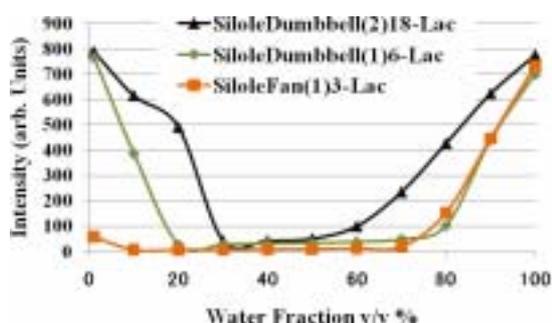
Fig. 2 (A) PL spectra of silole-dendrimer in water and water/acetone mixture with 90 %, 85 %, 80 %, 75 %water fraction. (B) PL spectra of silole-dendrimer in water/acetone mixture with 1 %, 10 %, 13 %, 15 %. (C) Emission intensity vs solvent composition of the water/acetone mixture.10: Conc 0.7  $\mu\text{M}$ , Ex =360 nm

(1%)に最も強い発光を示し、10でも AIE 効果が現れることが分かった。10 は水の割合が多い場合ではシロール環を内側に、逆にアセトンが多い場合ではシロール環を外側にしてシロール基部分が凝集することが AIE 効果の発現に深く関与しているものと考えられる。

AIE 効果の糖鎖依存性を調べるため、糖鎖の種類を変え SiloleDumbbell(1)6 の蛍光の溶媒比依存性の測定を行った。末端に種類異なる糖鎖(Gb3: Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$  4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$  4Glc $\beta$ 1-, LacLac: Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$  4Glc $\beta$ 1 $\rightarrow$  4Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$  4Glc $\beta$ 1-) を担持した SiloleDumbbell(1)6 型の蛍光測定結果



**Fig. 3** Emission-intensity of Silole dendrimers (Conc.0.7  $\mu$ M, Ex = 360 nm, Em = 474 nm)

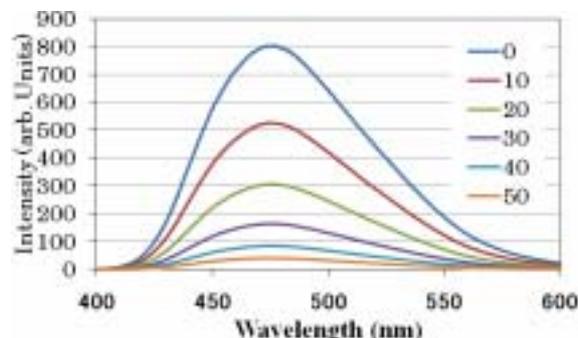


**Fig. 4** Emission-intensity of Silole dendrimers. (Conc.0.7  $\mu$ M, Ex = 360 nm, Em = 474 nm)

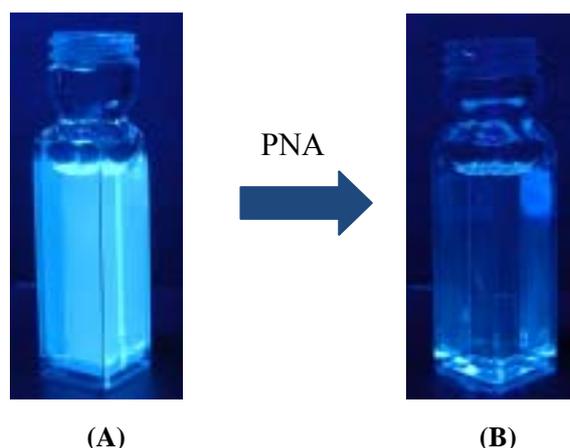
を Fig. 3 に示す。さらに、AIE 効果の dendリマー構造依存性を調べるために、 dendリマー構造の異なるラクトース担持カルボシラン dendリマーの蛍光測定を行った (Fig. 4)。これらの結果を総合して考えると、水が多い場合では糖鎖の種類にあまり影響されず、比較的安定な凝集状態を形成していることが分かった。水が少ない場合では、凝集体形成は糖鎖の種類・数に影響を受け、糖鎖数が少なすぎると凝集体が形成されないことが分かった。

阻害活性、蛍光強度が共に高い SiloleDumbbell(1)型の dendリマーを用いてウイルスとの相互作用を検討した。HEPES バッファの **10** の溶液を PL 測定用セルに 3 ml 入れ、これに PNA バッファ溶液を 10  $\mu$ l ずつ、蛍光の減少が確認されなくなるまで PL 測定を行った (Fig 5)。測定は 5  $^{\circ}$ C で行った。また、Fig. 6 の結果は測定前と後の紫外線を当てた蛍光写真である。これらは、**10** のラクトース基が PNA に接着するために、**10** の凝集体の崩壊が起こり AIE 効果による蛍光強度の増加が失われたと考えられる。この蛍光強度の減少が、末端のラクトースと PNA との特異的な相互作用であることを確認するため、ラクトースの認識・接着を行わない小麦胚芽レクチン (WGA) を用いて同様の実験を行った (Fig. 7)。その結果、蛍光強度の減少は見られなかった。これより Fig. 5 の結果はラクトースと PNA との相互作用による蛍光強度の減少であることが確認できた。

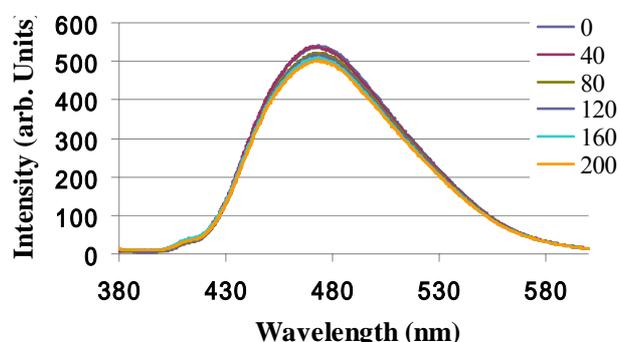
糖鎖とレクチンとの相互作用、およびシロール基の AIE 効果を融合した物質により、レクチンを特異的に検出するバイオセンサーを開発することができた。この原理をウイルスや微生物の分泌する毒素の検出に持ちれば、感染症の検査として広く利用することができ、社会貢献に繋がるものと現在は考えている。



**Fig. 5** PL spectra of **10**. The presence of different amount of PNA (from 0 to 50  $\mu$ L). SiloleDumbbell(1)6-Lac Conc. 0.6  $\mu$ M, PNA Conc. 20  $\mu$ M, Ex = 474 nm.



**Fig. 6** Pictures of the photoluminescence of the HEPES buffer solution of **10** (A): in the absence of PNA (B): in the presence of PNA. Ex = 360 nm, Em = 474 nm.



**Fig. 7** PL spectra of **10**. The presence of different amount of PNA (from 0 to 200  $\mu$ L). SiloleDumbbell(1)6-Lac Conc. 0.5  $\mu$ M, WGA Conc. 20  $\mu$ M, Ex = 360 nm, Em = 474 nm.

参考文献

- (1) Varki, *Glycobiology*, pp. 97, 1993
- (2) J.P. Dugid & D.C. Old, *Bacterial Adherence* (Beochey, E. H. ed), pp.185, 1980
- (3) Y.C. Lee, *Carbohydr. Res.*, vol.67, pp.509, 1976
- (4) U. Sprengard, M. Schudok, W. Schmidt, G. Kretzschmar, H. Kunz, *Angew Chem., Int. Ed. Engl.*, vol.38, pp.369, 1996
- (5) A.J. Varma, J.F. Kennedy, P. Galgali, *Carbohydr. Polym.*, vol.56, pp.429, 2004
- (6) G.B. Sigal, M. Mammem, G. Dahmann, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, vol.118, pp.3789, 1996
- (7) D.D. Manning, X. Hu, L.L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.*, vol.119, pp.3161, 1997
- (8) (a) Q. Wang, J. S. Dordick, and R. J. Linhardt, *Chem. Mater.*, vol.14, pp.3232–3244, 2002 (b) V. Ladmiraal, E. Melia, and D. M. Haddleton, *Eur. Polym. J.*, vol.40, pp.431–449, 2004
- (9) D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, and P. Smith, *Polym. J.*, vol.17, pp.117–132, 1985
- (10) G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, and V. K. Gupta, *J. Org. Chem.*, vol.50, pp.2003–2004, 1985
- (11) (a) F. Zeng, and S. C. Zimmerman, *Chem. Rev.* vol.97, pp.1681–1712, 1997 ; (b) J.-P. Majoral, and A.-M. Caminade, *Chem. Rev.*, vol.99, pp.845–880, 1999
- (12) K. Aoi, K. Itoh, and M. Okada, *Macromolecules*, vol.28, pp.5391–5393, 1995
- (13) A. Yamada, K. Hatano, K. Matsuoka, D. Terunuma *Tetrahedron*, vol.62, pp.5074-5083, 2006
- (14) J. Luo, Z. Xie, J.W.Y. Lam, L. Cheng, H.Chen, C. Qiu, H.S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu, B.Z. Tang, *Chem. Commun.*, pp.1740, 2001
- (15) Y.C. Lee, *Carbohydr. Res.*, vol.67, pp.509, 1978
- (16) K. Hatano, H. Aizawa, T. Koyama, K. Matuoka, D. Terunuma, *Tetrahedron lett.*, vol.48, pp.4365-4368, 2007