

# 蛍光色素含有糖鎖被覆オルガノシリカナノ粒子の 開発とウイルスセンサーへの応用

広島大学 大学院先進理工系科学研究科応用化学プログラム 河崎 陸

Development of Organosilica Nanoparticle Comprising Fluorophore and  
Saccharide Ligand for Virus Sensor

Riku Kawasaki

Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University

球状多糖であるグリコーゲンを基盤材料として合成するオルガノシリカナノ粒子へとウイルスなどの膜中でターンオン機能を有する蛍光色素を導入することで得られるシステムの蛍光性ウイルスセンサーとして応用可能性を検討するため、まず、その前駆体である蛍光色素含有グリコーゲンの蛍光センサーとしての機能について評価を行なった。蛍光色素として、4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD)を導入したグリコーゲンは人工細胞モデルであるリポソームと混合することで確かにターンオン型の蛍光センサーとして機能することを示した。また、ここへ膜との相互作用を高める疎水性官能基(ドデシル基)の導入により、その強度が強まることも明らかとした。これらの蛍光強度については、混合後、即時的に視認できるレベルであった。このシステムはペプチドグリカン層をもたないグラム陰性菌の一種である大腸菌を高感度で検出できることが明らかとなった。

In this work, we investigate the applicability of the organosilica nanoparticles synthesized from glycogen, a globular polysaccharide, as a base material, obtained by introducing a fluorescent dye with a turn-on function in the membrane of a virus. We first evaluated the function of the precursor, glycogen containing a fluorescent dye, as a fluorescent sensor. The fluorescent dye-containing glycogen, the precursor of the system, was evaluated for its function as a fluorescent sensor. Glycogen containing 4-chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD) as a fluorescent dye was shown to function as a turn-on type fluorescent sensor when mixed with liposomes, an artificial cell model. The introduction of a hydrophobic functional group (dodecyl group), which enhances the interaction with the membrane, was also found to enhance the intensity of the fluorescence. These fluorescence intensities were immediately visible after mixing. When this system was used with *E. coli*, a Gram-negative bacterium that does not have a peptidoglycan layer, it was found that the presence of *E. coli* could be detected with high sensitivity.

## 1. はじめに

2020年に新型コロナウイルスの世界的な感染爆発を引き起こして以降、生活様式は大きく変容した。その後、ワクチンの開発や衛生観念の向上によって、感染者数は減少傾向にあるものの、依然として、感染者の根絶には至っていない。<sup>1)</sup>また、今後、薬剤耐性菌

などによって引き起こされる新たな感染症による死亡者数のがんによる死亡者数を越えることが予想されていることからウイルスを簡便に迅速に高感度で検出することが可能なシステムの構築は必要不可欠となる。そのようななか、蛍光センサーは安価でその高い感度に加えて、簡便、迅速な検出を可能にするため、応用が可能となる。ここで、NBD<sup>2)</sup>や Nile Red<sup>3)</sup>のような蛍光分子はマイクロドメインの極性のセンサーとして用いられている。具体的には、これら分子は水中のような極性の高い溶媒中では蛍光を示さない。一方で脂質膜中のような疎水的な環境中で強い蛍光を発するターンオン型の性能を示す。このようにウイルスにおいて、ユニバーサルに存在している膜成分を認識して、蛍光を発するセンサーは簡便で効率的な検出を可能とする。しかし、これら蛍光分子のみでは特定のウイルスを検知することができず、選択性に乏しい。

これらの課題を解決するため、本研究では、オルガノシリカ表面へと蛍光センサーである NBD と膜成分と相互作用できるユニットや選択性向上を目指したりガンド修飾を行うことでその蛍光センサーとしての性能を評価することを目的とした。粒子表面へとこれら機能性ユニットを集積化させることによって、対象との相互作用点を多価で行うことができ、その結果、高感度化に期待できる。ここでは、まず、オルガノシリカのテンプレートとして用いるグリコーゲンへと膜成分と相互作用を強めるアルキル鎖と蛍光ユニットである NBD を導入したシステムの大腸菌センサーとしての性能について評価した結果について報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 NBD修飾疎水化グリコーゲンの合成と物性評価

目的とする NBD 修飾疎水化グリコーゲンは図 1 に示すスキームで合成した。まず、NBD をグリコーゲンへと導入するため、NBD-Cl へとリンカーを修飾させた。NMR により合成を確認したのち、グリコーゲンへとアルキル鎖を導入し、NBD を導入した。ここで NBD とドデシル基の修飾率が蛍光センサーとしての性能に与える影響について調査するため、これらの官能基の修飾率を変化させた NBD 修飾疎水化グリコーゲンを系統的に合成した。ドデシル基と NBD の修飾率はそれぞれ NMR、UV-Vis スペクトル測定により定量した。

合成した NBD 修飾疎水化グリコーゲンの基礎物性については、動的光散乱測定、 $\zeta$  電位測定により行なった。

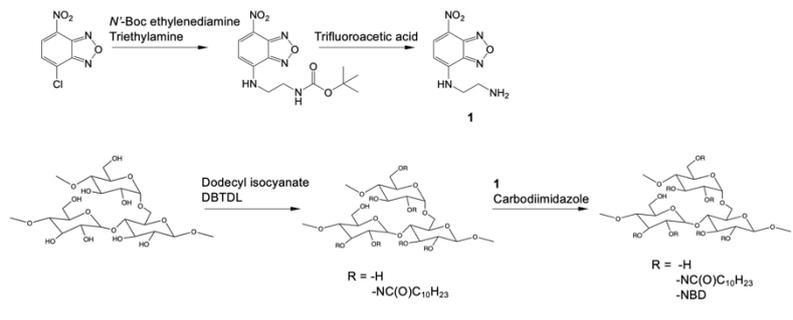


図 1 合成スキーム

### 2.2 人工細胞膜リポソームを用いた膜センサーとしての機能評価

2.1 で合成した NBD 修飾疎水化グリコーゲンと人工細胞膜モデルであるリポソームを混合することで蛍光性センサーとしての性能を評価した。NBD 修飾グリコーゲンとリポソームの量を変化させ、混合後の蛍光スペクトルの変化について経時的に評価を行なった。この際、目視でその蛍光を認識できるかどうかについても検討を行なった。また、脂質膜

の流動性の違いについても検討するため、DOPC と DMPC 二種類の脂質を用いてリポソームを形成させ、比較検討を行った。

## 2.3 大腸菌の検出

大腸菌をその細胞数を変化させて、NBD 修飾グリコーゲンと作用させ、NBD の蛍光について測定した。また、UV ランプ化における蛍光発光を確認した。これに加えて、大腸菌表面で蛍光を発しているかどうかについて、顕微鏡観察により観察を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 NBD修飾疎水化グリコーゲンの合成と物性評価

図2に示したスキームに従って、NBD をグリコーゲンへと修飾するために、スパーサーとしてエチレンジアミンを導入した。導入については<sup>1</sup>H-NMRにより確認した。まず膜との親和性を高めるためのアルキル鎖をスズ触媒存在下で導入した。合成は<sup>1</sup>H-NMRにより定量した結果、100単糖当たり1.2、3.8、12個のドデシル基が導入できた。グリコーゲンへこのNBD誘導体をCDIによる活性化により導入した。導入量については、DMSO中の蛍光スペクトルの測定により100単糖当たり1.5個のNBDが導入されたことを明らかとした。ここで得られたグリコーゲン誘導体のDLSとζ電位を測定した。その結果、直径30nm前後で電氣的に中性なナノ粒子を形成していることが確認された。その小さな粒子径は相互作用する表面積の増大に期待できる。さらに、電氣的に中性であることで、微生物との電氣的な反発を抑制することができ、効率的な相互作用を実現できる。

### 3.2 人工細胞膜リポソームを用いた膜センサーとしての機能評価

膜成分との相互作用による蛍光強度の変化について、人工細胞膜モデルであるリポソームを用いて評価を行った。まず、時間変化による蛍光強度の変化を確認した。リポソームを含まない系では蛍光はほとんど観測されなかっただけでなく、時間変化による蛍光強度の変化はほぼみられなかった。一方で、リポソームを添加することで蛍光強度の増大が観測され、その変化は時間依存的で脂質の種類の影響を受けた(図2)。さらに、リポソームの濃度を変化させて、

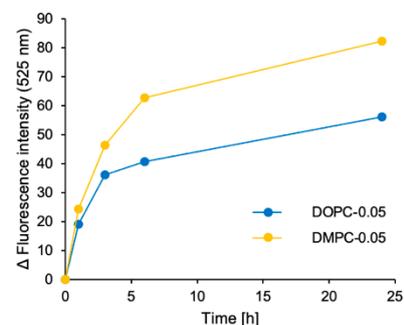


図2 NBDの蛍光強度変化

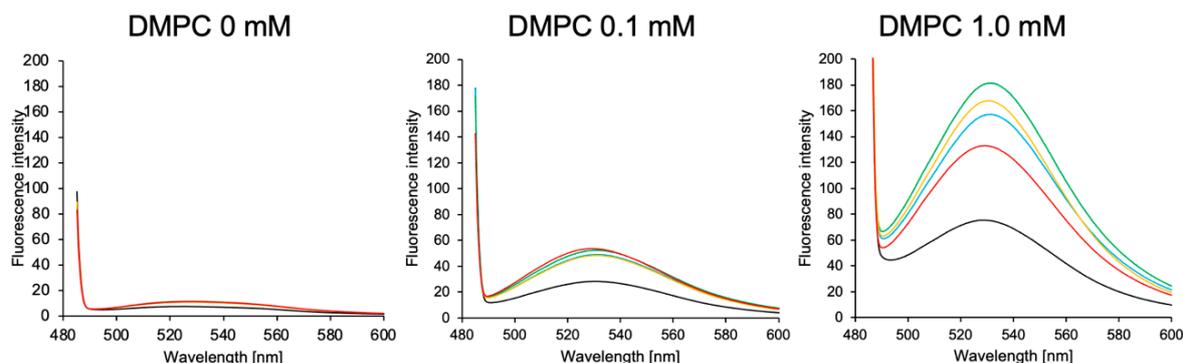


図3 NBDの蛍光強度変化における脂質濃度依存性(黒, 0h; 赤, 1h; 青, 3h; 黄, 6h; 緑, 24h)

NBD 修飾疎水化グリコーゲンを作用させたところ、その蛍光強度はリポソーム濃度依存的であった(図3)。これらの結果から、本システムは脂質膜成分と相互作用することでその蛍光強度を増大させることができるセンサーとしての機能を有していることを示した。また、UV ランプに晒した際に緑色の蛍光発光が視認できるレベルであることも確認した(図4)。

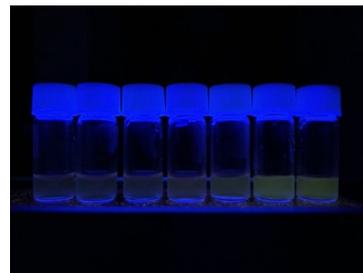


図4 NBD 修飾疎水化グリコーゲン-リポソーム複合体の蛍光発光

### 3.3 大腸菌の検出

グラム陰性菌のモデルとして大腸菌の検出について本システムを検討した。まず、大腸菌の濃度を変化させて、検出可能な大腸菌の濃度について確認した。0 から  $1 \times 10^7$  cells の間で変化させ、NBD 修飾疎水化グリコーゲンを添加し、蛍光測定を行なった。その結果、リポソームのときと同様に大腸菌濃度依存的に蛍光強度の増大が観測された。また、大腸菌の細胞数が  $10^5$  以上の時その蛍光発光は視認できた(図5)。またこれは混合後すぐの写真であることから、非常に鋭敏に大腸菌の膜センサーとして機能していることを表している。この蛍光が大腸菌の細胞膜との相互作用によるものであることを示すため、大腸菌を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、細胞膜だけでなく、その内部からも蛍光が観察され(図6)、確かに大腸菌とNBD 修飾疎水化グリコーゲンが相互作用することによって、蛍光発光が発現し、センサーとしての機能を示すことが明らかとなった。



図5 NBD 修飾疎水化グリコーゲンの大腸菌混合後の蛍光発光

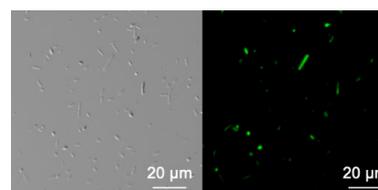


図6 NBD 修飾疎水化グリコーゲンの大腸菌混合後の蛍光発光(左明視野像、右NBDの蛍光像)

## 4. 結論

今回、作製したNBD 修飾疎水化グリコーゲンは生体膜モデルであるリポソームと混合することで、その蛍光強度を大きく増大させ、ターンオン型の膜センサーとして機能することを明らかとした。さらに、このセンサーとしての機能は大腸菌においても機能し、混合後すぐに蛍光を観測できたことから、その感度は非常に良好であることを示した。また、光照射に基づく活性酸素種の生成を利用することで大腸菌を殺傷できることを発見したため、現在、検討を進めている。そのため、検出と殺傷双方の機能を有する材料として期待できる成果を得た。ここへシラノール基を導入することで当初の目的であったオルガノシリカを作製することで更なる機能化に期待できる。

## 5. 謝辞

本研究は令和3年度日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けて行ったものである。同助成会に心より感謝いたします。

## 6. 参考文献

- 1) T. T. Le, Z. Andreadakis, A. Kumar, R. G. Roman, S. Tollefsen, M. Saville, S. Mayhew, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 19, 305-306, (2020).
- 2) S. Otake, K. Okuno, D. Boichichio, G. M. Pavan, T. Aida, *Bioconjugate Chem.*, 29, 2068-2073. (2018).
- 3) S. Guo, C. Li, L. Lian, Z. Le, Y. Ren, Y. X. Liao, J. Shen, J. T. Hou, *ACS Sens.*, 8, 3882-3891. (2023).