

「単一分子・原子レベルの反応制御」

平成9年度採択研究代表者

松本 和子

(早稲田大学理工学部 教授)

## 「生体分子解析用金属錯体プローブの開発」

### 1. 研究実施の概要

金属錯体は中心金属の種類と酸化状態、および配位子の構造と電子的性質により、多様な物理的、化学的性質を示す。本プロジェクトでは、特殊な配位子や異常酸化状態の金属を含む金属錯体を合成し、金属-配位子、あるいは金属-金属間の協同的相互作用を発現させることにより、

- ①生体分子のプローブとしての蛍光性希土類錯体、Zn、NO 検出用バイオプローブ
  - ②オレフィンの酸化触媒としての白金 (III) 二核錯体
  - ③小分子活性反応のための硫黄架橋ルテニウム二核錯体
- を合成する。これらの錯体の特徴とねらいは以下のように要約される。

#### ① 蛍光性希土類錯体の合成とバイオテクノロジーへの応用

強い蛍光、長い(数百マイクロ秒)蛍光寿命、大きなストークスシフト(～200nm)という特徴を持つユウロピウム、テルビウム、サマリウム等の錯体を合成し、これらを蛍光ラベルとして、イムノアッセイ、DNA ハイブリダイゼーション、DNA シークエンシング等に応用する。時間分解検出との組み合わせにより現在のところ、ユウロピウムラベル剤 BHHCT を用いてイムノアッセイの感度を従来法の 2-5 桁向上させているが、現在のラベル剤は水に不溶であるため低分子量の生体分子のラベルにむかない。そこでより広い分野での応用を目指して、水溶性で希土元素との錯体の安定性がより一層高いラベル剤の開発を目指している。さらに一波長励起多波長検出システムを目指してユウロピウム以外にテルビウム、サマリウム等の蛍光性錯体を合成する。

最終的に、これらのラベル剤をイムノアッセイ、DNA 分析、高速液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動等に用い、時間分解検出法を取り入れることにより従来法の感度を 2-5 桁向上させる。DNA 分析に関しては、ハイブリダイゼーションによる特定遺伝子断片の検出法として、二重鎖 DNA のみを特異的に検出する反応系を開発する。また、エイズ発症に対して遅延効果のある蛋白質、hSDF-1 の定量に対してユウロピウム-BHHCT をラベルとするイムノアッセイを応用し、世界初の血清 hSDF-1 の定量を試みる。

## ② 白金(III)二核錯体の有機金属化学

白金(III)は異常酸化状態であり、通常安定に存在しない。しかしある種の架橋配位子を用いると二核錯体を単離できる。この錯体は水溶液中でオレフィン、ケトン、アルデヒド、エポキシド、ジオールに触媒的に酸化する。その反応機構は白金の軸位へのオレフィンの配位に続き、水が配位オレフィンを親核的に攻撃することに始まる。この機構の中間体である $\beta$ -ヒドロキシアルキル-白金(III)二核錯体が単離され、結晶構造解析された。

この反応で注目すべき点は、多くの白金(II)核錯体でオレフィンは平面四角形の配位平面内に配位するのに対し、白金(III)では軸位に配位することである。さらに、中間体の $\beta$ -ヒドロキシアルキル白金(III)はさらに $\alpha$ -炭素部位に親核攻撃を受けることである。遷移金属アルキル化物の $\alpha$ -炭素は一般に親電子攻撃を受けるのがこれまでの反応性であり、白金(III)という強い電子求引性金属を用いることにより、このような逆の反応が実現できたことは今後の新しい展開を期待させるものである。

上記の反応は、ジオール生成で明白なように、二つの親核グループがオレフィンに付加することを示しており、本研究では多様な親核試剤との反応を試み、有用な触媒反応を開拓する。

## ③ 硫黄架橋ルテニウム二核錯体による C-H 活性化反応

無機体硫黄  $S_n^{2-}$  ( $n=1, 2 \dots$ ) は $\pi$ ドナー性の強い配位子で、他に見られない性質を金属錯体に付与する。天然では  $S^{2-}$  の鉄クラスター錯体が酵素の活性部位を占め、 $N_2$ 、 $NO$ 、 $H^+$  などの還元や電子伝達系に関与していることを見ても、この種の錯体の特異性が理解されよう。本研究では硫黄架橋ルテニウム二核錯体を新規に合成し、二核ルテニウム間あるいはルテニウム-硫黄間の複数配位座を利用する C-H 活性化反応を試みる。これまでに、ケトン、オレフィン、アルキン、アミド等の C-H 活性化およびそれに続く C-S 結合生成反応を見出している。これらの反応のメカニズムを解明するとともに、有用な反応へと展開させることを目標とする。

## 2. 研究実施内容

### 2-1 水溶性希土類錯体ラベル剤の合成

これまで開発してきたユウロピウムラベル剤、BHHCT、をさらに広い分野のバイオテクノロジーに応用できるようにするために、新規水溶性ラベル剤を合成した。BHHCT-ユウロピウム錯体の強い蛍光性を生かしてこれに水溶性を付加する目的で、グリシル-グリシル-グリシン、4-アミノ酸、DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid) に BHHCT を結合させた配位子、gly3(BHHCT)、BA(BHHCT)、DTPA(BHHCT)<sub>2</sub> を合成した。いずれも水溶性にはなったが、BHHCT の場合に比べ、そのユウロピウム錯体の蛍光強度は数分の一になった。

上記の BHHCT 及びその関連配位子の錯体を安定した形で存在させるには、水溶液中に少過剰の  $\text{EuCl}_3$  を存在させる必要がある。さらにキレート錯体が安定で過剰の金属イオンを共存させる必要がなく、蛍光強度の強い配位子として、ピリジンポリカルボン酸タイプの配位子 PPPTA を合成した。この配位子のテルビウム錯体は 545nm に強い蛍光を持ち、その寿命は  $2681\mu\text{s}$  であった。またこのユウロピウム錯体は強い蛍光を 615nm に示し、 $1379\mu\text{s}$  の蛍光寿命を示す。強度はテルビウム錯体より約一桁弱い。

## 2-2 BHHCT ユウロピウム錯体ラベルの DNA ハイブリダイゼーションおよび免疫アッセイへの応用

DNA ハイブリダイゼーションとは特定塩基配列が試料 DNA 中に存在するかどうかを検出する手法で、医療や食品のウイルス汚染の検出などに使われる。一般に目的とする塩基配列に相補的な塩基配列の DNA を作っておいて、これと試料 DNA を混ぜた後、ハイブリダイズして二重鎖となった DNA のみを蛍光を利用して検出する。本実験では、マイクロタイタープレートに DNA を吸着させ、あらかじめ BHHCT ユウロピウム錯体をラベルしておいた DNA を加えてハイブリダイゼーションさせることにより、特定の塩基配列の DNA を固相で検出する方法を開発した。時間分解蛍光測定により 4pg/well の検出限界を得た。

一方、均一溶液中で DNA ハイブリダイゼーションを検出する方法として、BHHCT ユウロピウムラベルから Cy5 ラベルへのエネルギー転送法を利用する方法を開発した。エネルギードナーである BHHCT-ユウロピウムの蛍光波長 615nm は、エネルギーアクセプターの Cy5 の吸収極大波長に近いので、両者が近傍に存在する時に紫外光で BHHCT-ユウロピウムを励起すると、ユウロピウムの蛍光は Cy5 の励起に使われ、結局 Eu の蛍光が消失して Cy5 の蛍光のみ (645nm) が観測されることになる。Cy5 の励起光は単独で存在する時は 615nm 付近であるが、両蛍光体が近接している場合には、紫外光 (Eu-BHHCT の吸収) による励起で、Cy5 の蛍光のみが 645nm に観測される。つまり、例えばある塩基配列の 31mer の標的 DNA が試料中に存在するかどうかを調べるためには、あらかじめ 31mer の塩基配列に相補的な配列を中央付近で 2 分割した二種の DNA を用意し、分割地点で一方には Eu-BHHCT を、他方には Cy5 をラベルしておく。これらと試料 DNA を混合すると、試料中に標的 31mer の DNA が存在すればハイブリダイゼーションにより Eu-BHHCT と Cy5 は近付き 645nm の蛍光が観測される。これが均一溶液中でのエネルギー移動を利用した標的 DNA の検出方法である。具体的には 31mer の標的 DNA に対して、15mer のピオチン化 DNA と Cy5 をラベルした 15mer DNA を合成した。これらの 15mer DNA は、標的 DNA にハイブリダイズさせた後、Eu 標識のストレプトアビジンを加えるとちょうど Eu から Cy5 へのエネルギートラ

ンスファーが起こり、Cy5 の蛍光が検出できるようにデザインした。Cy5 は単独では蛍光寿命数ナノ秒であるが、ユウロピウムからのエネルギー転送により数十マイクロ秒に蛍光寿命が延びる。これを通常の蛍光モードあるいは時間分解蛍光モードで測定したところ、50nM のプローブ DNA (二種の 15mer DNA) を用いた場合の検出限界は~500pM であった。プローブ DNA の濃度を下げることにより、さらに低濃度の検出も可能であると考えられる。

京都大学と早大との共同研究による血清中 hSDF-1 のイムノアッセイによる定量では、世界で初めて健康人の血清中にエイズ発症に対して遅延効果のある hSDF-1 を検出し、その濃度範囲が 0.4-1.6ng/ml であることを明らかにした。今後感染歴のわかっている多くのサンプルを測定し、hSDF-1 とエイズ発症の相関関係を明らかにしていく。

### 2-3 希土類ラベル剤を用いる高速液体クロマトグラフィー

BHHCT-Eu をラベルとして、環境ホルモン的一种であるエストロン、エストラジオール、エストリオールの分別定量を新たに試作した時間分解蛍光検出-高速液体クロマトグラフィーで行った。BHHCT は蛋白質のラベルとしてはゲル濾過クロマトグラフィーで高感度検出を可能とすることがわかっている。今回の実験では小分子を BHHCT でラベルすると、BHHCT のカラムへの吸着が強く、分離があまり容易でないこと、溶離液に TFA-アセトニトリルを用いるため蛍光検出時のミセル生成に不利なことなどがわかった。ラベル剤、溶離条件、蛍光検出の三者の条件をうまくマッチさせるために、今後ラベル剤のデザインと溶離条件の両方から検討していく。

### 2-4 白金(III)二核錯体とアルケン、アルキン、ケトンとの反応

白金(III)二核錯体を触媒としてオレフィンが 1,2-ジオールに酸化できることは昨年報告した。本年はシクロヘキセンとシクロペンテンの 1,2-ジオール化反応の立体選択性と反応メカニズムを検討した。シクロヘキセンではシス体 36%、トランス体 53%であり、シクロペンテンではトランス体のみ生成した。シス体の生成は中間体である  $\beta$ -ヒドロキシアルキル白金(III)錯体に二個目のヒドロキシル基が外部からトランス付加することを示しており、トランス体の生成はエカトリアル位の配位子がいったんヒドロキシルに置換した後、これがシス付加することを示している。つまり二つの反応経路が同時に進行するらしいことがわかった。

一方、白金(III)は、アルキンや CO とも容易に反応することを見出している。ケトンとの反応ではケトンの  $\alpha$  位で C-H 活性化が起こり、白金(III)の軸位にケトンの炭素が結合した錯体が多数単離され結晶構造解析を行った。このようなケトニル錯体はまた、水溶液中でアルキンと反応させることによっても得られる。上記のケトンとの反応では C-H 活性化はラジカル機構により進行することが確かめられた。

## 2-5 硫黄架橋ルテニウム二核錯体の硫黄上での C-H 活性化反応

ジスルフィド架橋ルテニウム二核錯体、 $\{\text{Ru}(\text{P}(\text{Ome})_3)_2\text{Cl}\}_2(\mu\text{-Cl})_2(\mu\text{-S}_2)$  は、ケトン、アルケン、アルキン、アミドなどの C-H や N-H 結合を切断した後、新たに C-S 結合を生成し、架橋ジスルフィド上にアルキル基の結合した各種の錯体を生成することを見出した。このような温和な条件下で多様な有機化合物が金属に配位したジスルフィドと反応する前例は無く、どのような機構で反応が進行するのか検討した。ケトンとの反応に及ぼす温度、ラジカルトラップ剤の添加等の影響から、この反応は硫黄上における C-H 結合の酸化的付加に続き、硫黄上の H がプロトンとして脱離する過程を経ていると考えられた。酸化的付加の段階ではラジカル種が関与するらしく、ラジカルトラップ剤を加えると反応速度は低下する。これらのジスルフィドアルキル配位子の反応性も興味のあるところである。なぜこの錯体ではこのような硫黄上の C-H 活性化反応が起こるのかを検討するとともに、これを利用してジスルフィドを含むアルキル基、つまりアルキルパーチオアルコールのようなものをルテニウムからうまく脱離させる方法を今後検討していく。

## 2-6 Lewis 式血液型の生後変化について— 時間分解蛍光測定による Lewis 抗原の定量的解析

Lewis 式血液型は 1946 年に発見された血液型で、抗 Lea と抗 Leb の 2 つの抗体を用いて検査され、Lewis(a+b-)、Lewis(a-b+)、Lewis(a-b-) の 3 つの表現型に分けられる。Lewis 式血液型を構成する主な 2 つの抗原である Lewis a、Lewis b 抗原は赤血球でつくられるのではなく、おそらく消化管上皮細胞などから血漿中に分泌された抗原が血球膜上に吸着されると考えられている。これまでの Lewis 式血液型の生後変化についての報告は、その多くが血清学的検査に基づくものであり、検出感度も十分でなく、定量的な研究はなされていなかった。そこで私たちはこの血液型を構成する Lewis a および Lewis b の 2 つの抗原の出現時期や、血液型変化の過程を正確に知るために、高感度時間分解蛍光測定法を用いて、臍帯血、新生児血、乳幼児血、成人血の抗原量の定量を行い、新たな知見を得た。

本法による Lewis a 抗原の検出感度は 1 ng/ml、抗 Lewis 抗体の検出感度は  $1 : 2 \times 10^{-6}$  であり、従来の ELISA より 2 桁以上高感度であった。この方法によって、臍帯血中に、Le(a+b-) の成人とほぼ等しい Lewis a 抗原と、少量の Lewis b 抗原がすでに存在するのを検出し、これは血漿中に存在すると考えられた。また、血漿と全血試料の測定結果から、Le(a-b+) においては、生後 5 日目くらいから血漿中の Lewis b 抗原量が上昇し始め、生後日数を経るほどその抗原量が増え、生後 1 カ月くらいまでの間に血球に吸着していくことがわかった。さらに、臍帯血血球上には、その約 7 割に遺伝子型から推測される本来の血液型と一致する血液型抗原の発現が認められた。この結果、臍帯血は分泌された抗原が吸着されるだけでなく、血球自

身も少量の抗原を発現しているのではないかと考えられた。これまでは生後間もなく Le 酵素が活性化されて Lewisa 抗原が出現し、さらに生後数カ月して Se 酵素が活性化されることにより血漿中に Lewisb 抗原が出現し、Lewis 式血液型が変化するとされていたが、本研究の結果からより早い時期に抗原が出現していることが示唆された。また、血球自身の抗原の発現も推測され、今後、糖転移酵素活性の検出も併せて検討し、Lewis 式血液型の変化の過程を明らかにしたい。

## 2-7 DNA 分析

本研究グループの目的は、希土類金属錯体を DNA 分析に応用し、超微量 DNA の検出ならびに配列解析の手法を確立することにある。具体的には、DNA ハイブリダイゼーションに基づく超高感度 DNA 検出系の開発、ならびに多色蛍光式 DNA シークエンシングシステムの開発を行う。

超高感度 DNA 検出系の開発研究においては、そのターゲットを食中毒の原因菌である腸管出血性大腸菌 O157 に絞り、染色体上に存在するベロ毒素タンパク質遺伝子の検出を試みることにした。微量 DNA のハイブリダイゼーションに際しては、マイクロプレートによるサンドイッチ法を用いることにより、時間分解蛍光検出器による検出が可能となる。平成 10 年度は、大腸菌 O157 ベロ毒素遺伝子のクローニングを行い、ハイブリダイゼーション用サブクローンの作成を目的とした。

大腸菌 O157 が産生するベロ毒素タンパク質は、VT1 型および VT2 型の二つの血清型に大別され、さらに VT2 には 5 種の亜型が存在する。いずれも A および B サブユニットから構成される。中でも VT2 に属する各亜型は毒性が強く、溶血性尿毒症症候群や脳障害を起こす可能性が高いとされている。大阪府堺市で分離された大腸菌 O157 染色体 DNA を鋳型として用い、ベロ毒素タンパク質遺伝子を PCR 増幅した後、ベクターにクローニングした。塩基配列決定により、本菌が産生するベロ毒素の血清型（亜型）は VT2 型であることが明らかとなった。

ここで得られたベロ毒素遺伝子を制限酵素で切断し、各サブユニット領域を毎に別々にクローニングすることにより、サンドイッチハイブリダイゼーション系を構成する 2 つのサブクローン（キャッチング DNA およびプローブ DNA）を作成した。次に、希土類金属錯体を用いた超高感度 DNA 検出系の構築に先立ち、両サブクローンの性質検討を行った。ドットプロット法を用いた解析により、キャッチング DNA とプローブ DNA がいずれもベロ毒素遺伝子とハイブリダイズすること、そしてこれらが互いにクロスハイブリダイズしないことが明らかとなった。以上より、これらのサブクローンを用いたサンドイッチハイブリダイゼーションの有効性が確認された。今後は、プローブ DNA の希土類金属錯体による標識を行い、サンドイッチハイブリダイゼーションによる大腸菌 O157 ベロ毒素遺伝子の超高感度検出系の確立をめざす。

## 2-7 生細胞蛍光プローブの開発と応用

本研究グループの目的はバイオイメージングを目的とした新規亜鉛プローブを開発し、それを用いて細胞系における作用機序を明らかにすることにある。

本年度は、この前段階として亜鉛蛍光プローブの設計原理である光誘起電子移動 (PET) の原理を用いて一酸化窒素 (NO) の蛍光プローブの開発に成功しバイオイメージングに成功した。NO は多様な生理作用を示すことが明らかにされてきたが、NO は生理的条件下不安定であり、機能している状態で直接測定できる方法がなく生理適役割解明については混沌としている。この状況下、当該グループは NO とアミンとの反応性に注目し、この反応による構造変換に PET の原理を組み込むことにより NO と反応して蛍光強度の増強する蛍光プローブをデザイン・合成した。このプローブは培養細胞や脳切片などの生体サンプルに応用し、細胞内でのバイオイメージングに初めて成功した。

今後、この PET の原理を亜鉛イオンの生細胞蛍光プローブ設計に応用し、有用な新規バイオイメージング試薬を創製する予定である。

## 3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

○J. Yuan, K. Matsumoto, and H. Kimura

A New Tetradentate  $\beta$ -Diketonate-Europium Chelate That Can Be Covalently Bound to Proteins for Time-Resolved Fluoroimmunoassay  
*Anal. Chem.*, 70, 596-601, (1998).

○J. Yuan, G. Wang, H. Kimura, and K. Matsumoto,

Sensitive Time-Resolved Fluoroimmunoassay of Human Thyroid-Stimulating Hormone by Using a New Europium Fluorescent Chelate as a Label  
*Anal. Sci.*, 14, 421-423, (1998).

○K. Matsumoto, Y. Nagai, J. Matsunami, K. Mizuno, T. Abe, R. Somazawa, J. Kinoshita, and H. Shimura

A Synthetic Route to Alkyl-Pt(III) Dinuclear Complexes from Olefins and Its Implication on the Olefin Oxidation Catalyzed by Amidate-Bridged Pt(III) Dinuclear Complexes  
*J. Am. Chem. Soc.*, 120, 2900-2907, (1998).

○K. Matsumoto, Y. Noguchi, and N. Yoshida

Synthesis and Antitumor activity of Platinum(II) Complexes of Amino-Cyclodextrin  
*Inorg. Chim. Acta*, 272, 162-167, (1998).

○I. Miyashita, K. Matsumoto, M. Kobayashi, A. Nagasawa and J. Nakayama

Synthesis and Crystal Structure of a Dinuclear Platinum (II) bis(N, N-diethylamino) carbeniumdithio-carboxylate Complex  $Pt_2\{m-(Et_2N)_2C_2S_2\} 2Cl_4 \cdot 0.5CH_2Cl_2$ : Structural Study of the Coordinated Inner Salt

*Inorg. Chim. Acta*, 283, 256-259 (1998).

○T. Furuhashi, M. Kawano, Y. Koide, R. Somazawa, and K. Matsumoto

Structural Studies of the Hydrazine and Ammine Complexes of the Dinuclear Ruthenium Polysulfide Complexes

*Inorg. Chem.*, 38, 109-114, (1999).

○H. Kimura, J. Yuan, G. Wang, K. Matsumoto, and M. Mukaida

Highly Sensitive Quantitation of methamphetamine by Time-Resolved Fluoroimmunoassay Using a New Europium Chelate as a Label

*J. Anal. Toxicol.*, 23, 11-16 (1999).

○K. Yoshikawa, J. Yuan, K. Matsumoto, and H. Kimura

Time-Resolved Fluorometric Detection of DNA Using a Tetradentate  $\beta$ -Diketonate Europium Chelate as a Label

*Anal. Sci.*, 15, 121-124 (1999).

○J. Yuan, G. Wang, H. Kimura, and K. Matsumoto

Highly Sensitive Detection of Bensulfuron-methyl by Time-Resolved Fluoroimmunoassay Using a Tetradentate  $\beta$ -Diketonate Europium Chelate as a Label

*Anal. Sci.*, 15, 125-128 (1999).

○K. Matsumoto

Inorganic and Organometallic Chemistry of Cisplatin-Derived Diplatinum(III) Complexes in "Cisplatin Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug" ed. by Bernhard Lippert, Wiley-VCH, Weinheim, 455-475 (1999).

その他 11 件