

「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、

- ・ 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
- ・ オレフィンの酸化触媒としての白金(Ⅲ)二核錯体
- ・ 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。
- ・ 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シーケ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。

- ・ 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をケトン、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 -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。

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。

- ・ 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 Sn^{2-} ($n=1, 2 \dots$)は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。

2. 研究実施内容

2.1 新規希土類錯体ラベル剤の合成

これまでイムノアッセイに用いてきたBHHCTは優れた蛍光性を示すが、錯体生成定数は 10^{10} 程度であるため測定時に少し過剰の EuCl_3 を共存させる必要があった。クロマトグラフィーへの応用を考えると、このままでも使用可能であるが、より錯生成定数が高くキレート力が強く、過剰の金属イオンを加える必要のないラベル剤が望まれる。新規に合成した水溶性ラベル用配位子BPTAは Tb^{3+} と錯体を形成し545nmに強い蛍光を示す。その Eu^{3+} 錯体も615nmに蛍光を持つが強度は Tb^{3+} 錯体の約十分の一である。

2.2 BHHCTを用いるエイズ発症関連蛋白質、hSDF-1の測定

これまでに確立してきたBHHCTを用いるイムノアッセイをヒト血清SDF-1の定量に応用し、世界で初めて測定に成功した。今後、健康人とエイズ患者の血清SDF-1濃度を測定し、エイズ発症のメカニズム解明のデータとする。

2.3 新規ラベル剤BPTA- Tb^{3+} のDNAへのラベルと電気泳動

数種のオリゴヌクレオチドの5'末端にリンカーを介してアミノ基をつけ、これにBPTAを結合させた。このDNAはゲル電気泳動により過剰の未反応ラベル剤を分離した。本操作によりBPTA- Tb^{3+} ラベル剤は、DNAに結合した状態で金属を分離することなく泳動することが確かめられた。

2.4 希土類ラベルを用いる時間分解高速液体クロマトグラフィーによるエストロゲン類の分析

昨年はBHHCT-Eu³⁺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試みたが、BHHCTのカラムへの強い吸着力と、BHHCTが分析対象に比べて大きい分子であるため分離は容易でなかった。本年はBHHCTに比べてやや蛍光強度が落ちるが、小さいラベル剤であるCDPPを新たに合成し、上記三種のフェノール性化合物の水酸基にCDPPを結合させクロマトのカラムを通した。ポストカラムでEuCl₃と錯生成させ、新規に浜松ホトニクス(株)で開発した時間分解蛍光検出器で測定した。現在、上記のエストロゲン類は0.3ngまで定量可能であり、GC-MSの感度とほぼ同等になっている。今後さらに条件を検討し、溶媒の精製を行うことによりさらに高感度となる可能性がある。

2.5 生細胞蛍光プローブの開発と応用

生理学的条件でZn²⁺に特異的に蛍光を発する亜鉛プローブとしてアザクラウンフルオロプローブが開発された。亜鉛プローブは以前にも存在したが、紫外光で蛍光を発するものやアルカリのpH領域で働くもののみであった。本プローブは生理学的pH下で可視光により働く初めてのプローブである。このプローブの蛍光強度は亜鉛濃度に比例し、Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺などの存在によって影響を受けないことが確かめられている。

2.6 白金(Ⅲ)二核錯体とケトンとの反応

昨年白金(Ⅲ)二核錯体が水溶液中室温で容易にアセトンと反応して、 β -炭素上のC-H結合を切断し、白金アセトニル錯体ができることを報告した。今年には各種のケトニルを同様に反応させ、いずれも β -炭素上のC-H結合が切断され白金ケトニル錯体が生成することが確かめられた。非対称ケトンのブタノンとの反応ではメチレン部での反応と末端メチル部での反応による生成物が1.7:1の割合で得られた。また、これらにアミンを反応させると β -アミノケトンが等量的に得られた。ラジカルトラップ剤や紫外光の影響を検討した結果、上記二種の反応性生物は前者がラジカル機構、後者は親核置換反応で得られるものと考えられた。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

Kazuko Matsumoto and Ken Sakai

"Structures and Reactivities of Platinum-Blues and the Related Amidate-Bridged Platinum(III) Compounds"

Adv. Inorg. Chem., 1999, 49, 375-427

Kazuko Matsumoto, Jingli Yuan, Guilan Wang, and Hiroko Kimura

"Simultaneous Determination of α -Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen in Human Serum by Time-Resolved Fluoroimmunoassay"

Anal. Biochem. 1999, 276, 81-87

Yong-Shou Lin, Shintaro Takeda, and Kazuko Matsumoto

"Functionalization of fluorescent lanthanide Complexes and their applications to biotechnology"

Jingli Yuan and Kazuko Matsumoto, Bunseki Kagaku, 48, 1999, 1077-1083

"Consecutive Double Nucleophilic Attacks on an Olefin Promoted by a Platinum(III) Dimeric Complex"

Organometallics, 1999, 18, 4897-4899

Kazuko Matsumoto, Tetsuya Koyama, and Yoshihiro Koide

"Oxidation of the Sulfide Ligands to SO_4^{2-} in the Dinuclear Complex $\{\text{RuCl}[\text{P}(\text{OMe})_3]_2\}_2(\mu\text{-S}_2)(\mu\text{-Cl})(\mu\text{-N}_2\text{H}_4)$: Synthesis and Characterization of $\{\text{RuCl}[\text{P}(\text{OMe})_3]_2\}_2(\mu\text{-S}_2)(\mu\text{-Cl})(\mu\text{-N}_2\text{H}_4)^+\text{HSO}_4^-$, $\{\text{RuCl}_2[\text{P}(\text{OMe})_3]_2\}_2(\mu\text{-S})(\mu\text{-N}_2\text{H}_4)$, and $\{\text{RuCl}[\text{P}(\text{OMe})_3]_2\}_2(\mu\text{-S}_2\text{O}_5)(\mu\text{-N}_2\text{H}_4)$ "

J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 10913-10923

Jun Mizutani and Kazuko Matsumoto

"Synthesis and Structure of a Diselenido-Bridged Dinuclear Ruthenium Complex $[\{\text{RuCl}(\text{P}(\text{OMe})_3)_2\}_2(\mu\text{-Se}_2)(\mu\text{-Cl})_2]$ "

Chem. Lett. 2000, 72-73

Md. Munkir Hossain, Yong-Shou Lin, Hiroyasu Sugiyama, and Kazuko Matsumoto

"Allylic C-H Bond Activation on a Sulfur Center of a Disulfide-Bridged Diruthenium Complex with Concomitant Formation of C-S Bonds"

J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 172-173

Md. Munkir Hossain and Kazuko Matsumoto

"Pentasulfide S_5^{2-} as the First Tridentate Chelating Ligand in $\text{Ru}(\text{P}(\text{OE})_3)_3\text{S}_5$ (E=Me and Et)"

Inorg. Chem. 2000, 39, 247-250

Akiko Sugio, Hidenori Tamanoi, Kyoko Namba, Takafumi Kubo, Ryuichiro Nakai, Kenji Wakabayashi and Satoshi Nakamura

"Separation and Characterization of Functional Domains of Xylanase J from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1" Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation" (ed. by K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura), Uni Publishers Co., Ltd., Tokyo, 1999, pp. 240-248.

Madoka Kikuchi, Kei-ichiro Ogawa, Takashi Yamazaki, Susumu Kajiwara, Akiko Sugio, Satoshi Nakamura and Kazuo Shishido

Secretional Expression of *Bacillus subtilis* Xylanase Gene in the Basidiomycete

Coprinus cinereus
FEMS Microbiol. Lett., 178, 277-282 (1999).

Rie Yatsunami, Tomonori Kawakami, Hiroyuki Ohtani and Satoshi Nakamura
Transcriptional Regulation of Cruxrhodopsin Gene from Extremely Halophilic Archaeon
Haloarcula japonica Strain TR-1
Nucleic Acids Symp. Ser., 42, 73-74 (1999).

Rie Yatsunami, Masaharu Iwamoto, Kunio Ihara and Satoshi Nakamura
Molecular Cloning of A1-ATPase Gene from Extremely Halophilic Archaeon
Haloarcula japonica Strain TR-1
Nucleic Acids Symp. Ser., 42, 75-76 (1999).

Ning Lu, Hideaki Moriyama, Satoshi Nakamura, Takao Sato and Nobuo Tanaka
Crystallization and Initial X-ray analysis of Alkaline Xylanase
Acta Cryst., D56, 464-465 (2000).

嵩 隆之, 杉森大助, 中村 聡
好アルカリ性細菌 GS-1 株によるテレフタル酸二ナトリウムの分解
日本化学会誌, 2000, 295-297.

Naoki Umezawa, Kumi Tanaka, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi
and Tetsuo Nagano
"Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen"
Angewandte Chemie Int. Ed., 38, 2899-2901 (1999).

Shin Mizukami, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi, Yasuteru Urano, Tetsuo Mashima,
Takashi Tsuruo and Tetsuo Nagano
"Imaging of Caspase-3 Activation in HeLa Cells Stimulated with Etoposide Using a
Novel Fluorescent Probe"
FEBS Lett., 453, 356-360 (1999).

Hirotsu Kojima, Yasuteru Urano, Kazuya Kikuchi, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo
Nagano
"Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production"
Angewandte Chemie Int. Ed., 38, 3209-3212 (1999).

Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo
Nagano
"Novel Zinc Fluorescent Probes Excitable with Visible Light for Biological
Applications" Angewandte Chemie Int. Ed., 39, 1052-1054 (2000).