

「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

白金(III)二核錯体の合成とアルケン、アルキンとの反応

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(～200 nm)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、HPLC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。すでに本イムノアッセイの応用としてヒト血清中のエイズ関連蛋白SDF-1を世界で初めて測定した。現在エイズ発症におけるSDF-1の役割を解明している。その他の応用として、運動と血清中のサイトカイン量の関係も本法により研究している。

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、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 β -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 β -ヒドロキシアルキル白金(III)はさらに α -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 α -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。オレフィン以外にもアルキンとの同様の反応性が期待される。アルケンやアルキン上に2個の同一あるいは異なる親核グループを付加する反応を開発する。

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 π 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 新規ラベル配位子の合成

生命科学の研究や、医療・診断におけるさまざまなバイオアッセイ法に用いられている蛍光検出法は、しばしば異なる対象物質を異なる波長の光を発する化合物でラベルして、同時多色検出することが求められる。昨年度までは、615nmの蛍光を発するユウロピウム錯体、545 nmの蛍光を発するテルビウム錯体をラベル剤として合成した。これらの錯体は、紫外部の同一波長で励起され、それぞれ異なる波長で発光するため、従来のCy3、Cy5やフルオロセインなどの有機色素系ラベル剤を用いる多色励起-多色蛍光システムと異なり、一色励起-多色蛍光検出が可能になる。しかしこれらの錯体は、配位子の構造が異なるためDNAシーケンシングなどに応用するには、同じ配位子を用い、配位させる金属によって

蛍光波長をコントロールするのが望ましい。

本年度は、同一配位子での多色化を目指し、一種の配位子でユウロピウム、テルビウム、ジスプロシウムの各希土類金属に配位させると強い蛍光を発する配位子を合成した。ユウロピウム錯体の励起極大は 354nm、蛍光極大は 611nm、pH9.0 ホウ酸緩衝溶液中の寿命は 1.164ms であった。また、テルビウム錯体の励起極大は 330nm、蛍光極大は 545nm、pH 9.0 ホウ酸緩衝溶液中の寿命は 1.973ms であった。一方、ジスプロシウム錯体の励起極大は 345nm、蛍光極大は 574nm、pH9.0 ホウ酸緩衝溶液中の寿命は 0.018ms であった。

2.2 イムノアッセイによるエストロジェンの分析

BHHCT-Euをラベル剤として用いて河川水中における17β- エストラジオール (E2)とエストリオール(E3)の時間分解蛍光イムノアッセイによる定量を行った。E2の測定ではまずE2-牛血清アルブミン(BSA)結合体を合成し、96穴ウェルにコーティングした。洗浄後、抗E2ポリクローナル抗体とE2標準溶液又はサンプルを等量混合した溶液を入れインキュベーション後、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体を加え、更にストレプトアビジン(SA)BSA-BHHCT-Eu結合体と反応させた後、時間分解蛍光測定を行った。E3の測定では、まずE3-BSA結合体にBHHCTを反応させてE3-BSA-BHHCT複合体を合成した。ヤギ抗ウサギIgG抗体をウェルにコーティングし、洗浄後抗E3ポリクローナル抗体を反応させインキュベーション、更にE3-BSA-BHHCT-EuとE3標準溶液又はサンプルを等量混合した溶液を反応させた後、時間分解蛍光測定を行った。サンプルはC18固相カートリッジで20倍濃縮して測定を行った。

本方法による検出限界はE2で45pg/ml、E3で85pg/mlとなり従来の方法より同程度かそれ以上の感度を得ることができた。また神田川におけるエストロジェン濃度はE2が31pg/ml、E3が5.1pg/ml検出され、本方法が環境分析に応用できることが確認された。

2.3 ユウロピウム蛍光ラベルを用いる時間分解高速液体クロマトグラフィーの開発と環境分析への応用

ユウロピウム錯体をHPLCのラベル剤として用い、時間分解蛍光検出器と組み合わせた新規HPLC法を開発した。測定対象として環境ホルモンと言われるノニルフェノールやエストロン、エストラジオール、エストリオールを選んだ。BHHCT-Euは優れたラベル剤であるが、HPLCに用いると吸着が強く、また分子が大きいいため、上記のような小分子のラベルには不向きである。そこで、より小さいラベル剤として、5-(4'-クロロスルホ-1,1'-ジフェニル-4'-イル)1,1,1,2,2-ペンタフルオロ-3,5-ペンタジオン(CDPP)を合成した。CDPPをあらかじめ対象分析物質にラベルして水溶液とし、逆相カラムを通した後、ポストカラム方式で

塩化ユウロピウムと反応させて生じる蛍光を新規開発の時間分解蛍光検出器で検出した。本法により現在のところ得られている検出限界は、エストロンとエストラジオールである。これらの値はLC/MSの検出限界と同程度であり、実用的な高感度分析法として期待される。本年度は、さらに河川水中のエストロゲン類を分析するため、プレカラム濃縮を組み合わせ、13.2ng/Lのエストロンを検出した。

本HPLCシステムは、ラベル剤が-NH₂-フェノール性の-OH、-SHにのみ結合するので、クロマトグラムにおけるピークの重なりが少なく、環境分析において試料の前処理が従来法に比べはるかに簡略化できる。今後、さらに応用面を検討する予定である。

2 4 ユウロピウム-Cy5のエネルギー移動を利用した新しいホモジニアス時間分解蛍光イムノアッセイによるメタンフェタミンの簡単な測定法

一般的な覚せい剤の証明はガスクロやガスマスで行われている。しかし、スクリーニングには抗体の特異性を利用したイムノアッセイが鋭敏度や操作の簡便性で有効な手段である。そこで、Methamphetamine(MA)を簡単な方法で迅速に定量検出することを目的とし、Euとcyanine dye(Cy5)蛍光共鳴エネルギー移動を利用した競合ホモジニアスイムノアッセイを開発し、この方法で尿検体や血清検体を測定するために必要な基本的検討を行った。分析上の問題を吟味し、尿や血清で検量線をひくことが可能となり、覚せい剤使用者の尿検体20検体を測定して、ガスクロマトグラフィーの測定値と比較したところ、高い相関が得られた。(r=0.94)この方法は全く洗浄操作を必要とせず、30分で測定値が得られるので、簡便迅速なMAやその他の薬剤のスクリーニングとして有用と思われる。

2 5 DNA分析(ベロ毒素遺伝子の検出)

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シーケンシングシステムの開発を行う。平成12年度は、VT1型ベロ毒素遺伝子を含むハイブリダイゼーション用サブクローンを作成し、それを用いたVT1遺伝子検出系の構築を行うこととした。

VT1遺伝子を含むDNA断片を制限酵素で切断した後、各サブユニット領域毎に別々にサブ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つのサブクローンを作成した。すなわち、Aサブユニット領域をファージベクターM13mp18およびmp19にサブクローニングし、96穴マイクロタイタープレート上にキャッチングDNAとして固定化する。一方、Bサブユニット領域はプラスミドベクターpBR322にサブクローニングした後、ニックトランスレーションによりピオチン化し、プローブDNAを作成する。次に、プローブDNA

と VT 1 遺伝子を含む検体とを混合した状態で系内に加え、ハイブリダイゼーションを行う。最後に、ユウロピウム錯体で標識したストレプトアビジンを系内に加え、時間分解蛍光測定を行いことにより、系内のユウロピウム錯体を定量した。その結果、100 ~ 10,000 amol/wellの濃度範囲でVT1遺伝子の定量が可能と考えられた。

2.6 バイオイメーシングを目的とした亜鉛蛍光プローブの開発とその生体系への応用

本研究グループの目的はバイオイメーシングを目的とした新規亜鉛プローブを開発し、それを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。

前年度は光誘起電子移動(photoinduced electron transfer: PET)を原理として、一酸化窒素(NO)の蛍光プローブ開発について紹介した。本年度はこの原理を亜鉛イオンに応用し、新たに亜鉛蛍光プローブとしてACF-1, ACF-2の開発に成功した。このプローブは従来知られていたZinquinやNewport Greenに比べ、感度および亜鉛特異性のいずれにおいても優れており、生細胞プローブとして有用であると思われる。この成果はAngewandte Chemie Int. Ed., に発表したが、重要な論文としてアメリカ化学会の会員誌であるChem. & Eng. Newsのトピックス欄に取り上げられた。また2000年6月にAndover, NHで開催されたGordon Research Conference, Bioorganic ChemistryでPfizer Awardがこの研究に対して授与された。

2.7

本研究で樹立した高感度イムノアッセイ法にて血中SDF-1濃度を測定・比較することにより、「内因性SDF-1タンパク量が、HIV感染者群と非感染者群で有意水準0.1%で有意差があること」及び、「内因性SDF-1タンパク量が、HIV感染症進行例(CD4値200以下でviral load10000以上)群とHIV感染症非進行例(CD4値200以上でviral load10000以下)群で有意水準0.1%で有意差があること」を見出した。これらは血中SDF-1タンパク濃度が後天的要因(この場合、ウイルス感染)によって制御されることを示す世界初のデータである。同時に、HIV感染症の各段階と血中SDF-1タンパク濃度が相関することを示して、「血中SDF-1タンパク濃度」がHIV感染症(エイズ)の進行度の第3の検査項目候補であることを示す学術的意義がある。

3. 主な研究成果の発表(論文発表)

"Synthesis of a Terbium Fluorescent Chelate and Its Application to Time-Resolved Fluoroimmunoassay", Jingli Yuan, Guilan Wang, Keisuke Majima, and Kazuko Matsumoto, *Anal. Chem.* 73, 1869-1876(2001)

"The [4+2] Cycloaddition of 2,3-Dimethylbutadiene to the Diselenido Ligand in

the Dicationic Dinuclear Ruthenium Complexes", Hiroyasu Sugiyama, Toshifumi Watanabe, and Kazuko Matsumoto, *Chem. Lett.* 306-307(2001)

"Synthesis of Ketonylplatinum (III) Dinuclear Complexes : Observation of the Competitive Radical vs Electrophilic Displacement in Pt(III)-Promoted C-H Bond Activation of Ketones" Yong-Shou Lin, Hanae Misawa, Jun Yamada, and Kazuko Matsumoto, *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 569-575(2001)

"Diels-lder Type Addition of 1, 3-Dienes to a Disulfide Bridging Ligand in Diruthenium Complexes" Hiroyasu Sugiyama, Yong-Shou Lin, Kazuko Matsumoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 4058-4061(2000)

"Homogeneous DNA Hybridization Assay by Using Europium Luminescence Energy Transfer" Shinji Sueda, Jingli Yuan, and Kazuko Matsumoto, *Bioconjugate Chem.* 11, 827-831(2000)

"Syntheses of ketonated Disulfide-Bridged Diruthenium Complexes via C-H Bond Activation and C-S Bond Formation" Hiroyasu Sugiyama, Md. Munkir Hossain, Yong-Shou Lin, and Kazuko Matsumoto, *Inorg. Chem.*, 39, 3948-3956 (2000)

"Syntheses, Antitumor Activity, and Molecular Mechanics Studies of cis-PtCl₂(pzH)₂ (pzH=pyrazole) and Related Complexes. Crystal Structure of a Novel Magnus-type Double-salt [Pt(czH)₂][PtCl₄][cis-PtCl₂(pzH)₂] Involving Two Perpendicularly Aligned 1D Chains" Ken Sakai, Yasushi Tomita, Takuma Ue, Koji Goshima, Masakatsu Ohminato, Taro Tsubomura, Kazuko Matsumoto, Kenji Ohmura, Kazuyuki Kawakami, *Inorg. Chim. Acta*, 297, 64-71(2000)

"Highly Sensitive Determination of Plasma Cytokines by Time-Resolved Fluoroimmunoassay -Effect of Bicycle Exercise on Plasma Level of Interleukin-1 α (IL-1 α), Tumor necrosis factor α (TNF α) and Interferon γ (IFN γ)", Hiroko Kimura, Masatoshi Suzui, Fumiko Nagao, and Kazuko Matsumoto, *Anal Sci*, 17, 593-597, 2001.

"Dual-Label time-resolved fluoroimmunoassay of psychopharmaceuticals and stimulants in serum.", Hiroko Kimura, Masahiro Mukaida, Guilan Wang, Jingli Yuan and Kazuko Matsumoto : , *Forens Sci Int*, 113, 345-351, 2000.

"Purification and Some Properties of a Basic Xylanase Produced by Thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. Strain TAR-1" , Hidenori Takahashi, Yutaka Ishiguro, Ryuichiro Nakai and Satoshi Nakamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64 ,887-890(2000)

"A Novel Bacteriorhodopsin-like Protein from *Haloarcula japonica* Strain TR-1 :

Gene Cloning, Sequencing and Transcription Analysis", Rie Yatsunami, Tomonori, Kawakami and Satoshi Nakamura, *Extremophiles*, 4, 109-114(2000)

"Purification and Characterization of a Ferredoxin from *Haloarcula japonica* Strain TR-1", Daisuke Sugimori, Toshiaki Ichimata, Akiko Ikeda and Satoshi Nakamura, *BioMetals*, 13, 23-28(2000)

“ グラム陰性土壌細菌 AS 株によるテレフタル酸二ナトリウムの微生物変換 ,” 杉森大助 ,豊田昌宏 ,中村 聡 ,*繊維学会誌* ,56, 210-213(2000)

"The Gene Encoding a Novel halorhodopsin-like Protein of Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica* Strain TR-", Rie Yatsunami, Shigetoshi Aono and Satoshi Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 44, 1-2(2000)

"Cloning and Sequencing of *ftsZ* Homolog from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica* Strain TR-1", Kazumichi Ozawa, Rie Yatsunami and Satoshi Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 44, 155-156(2000)

"Phage Display of Xylan-binding Module of Xylanase J from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41M-1", Hiroyuki Miyakubo, Akiko Sugio, Takafumi Kubo, Ryuichiro Nakai, Kenji Wakabayashi and Satoshi Nakamura, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 44, 165-166(2000)

"Microbial Degradation of Disodium Terephthalate by Alkaliphilic *Dietzia* sp. Strain GS-1", Takayuki Dake, Daisuke Sugimori and Satoshi Nakamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 64, 2709-2711(2000)

"Cloning and Expression of the Ferredoxin Gene from Extremely Halophilic Archaeon *Haloarcula japonica* Strain TR-1", Takatoshi Matsuo, Akiko Ikeda, Hiroto Seki, Toshiaki Ichimata, Daisuke Sugimori and Satoshi Nakamura, *BioMetals*, in press.

"Highly Zinc-Selective Fluorescent sensor Molecules Suitable for Biological Applications" Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 12399-12400(2000)

"Development of Time-resolved Fluorometric Detection System Using Diffusion-enhanced Energy Transfer" Mitsunori Koresawa, Kazuya Kikuchi, Shin Mizukami, Hirotatsu Kojima, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Analytical Chemistry*, 72, 4904-4907 (2000) .

"Design and Synthesis of Intramolecular Resonance Energy Transfer Probes for Use in Aqueous Solution" Yasutomo Kawanishi, Kazuya Kikuchi, Hideo Takakusa, Shin Mizukami, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano, *Angewandte Chemie, Int. Ed.*, 39, 3438-3440 (2000) .

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

"Elevated Plasma SDF-1 Protein Level in the Progression of HIV-1 Infection/AIDS", Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K., Herrmann, S., Iwamoto, I., Nakamura, T., Matsushita, S., Kimura, T., Honjo, T. and Tashiro, K., *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 587-595 (2001)