

「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 検出用バイオプローブ
- ② 白金(III)二核錯体の合成とアルケン、アルキンとの反応
- 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、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。またフルオレセインをベースとした Zn 検出蛍光試薬を開発し、細胞のイメージングに応用した。

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。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-} ($n=1, 2$) 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 時間分解蛍光イムノアッセイによる血清中のサイトカインの測定 長期の激しい運動がサイトカイン濃度に及ぼす影響

一過性の運動による変化ではなく、運動による疲労の蓄積が免疫応答に与える変化を調べるために、バレーボール大学リーグ戦強化合宿に参加した選手 8 人のサイトカイン濃度変化を新規蛍光ラベル剤 BHHCT-Eu³⁺ を用いた時間分解蛍光イムノアッセイで測定した。一般にサイトカインの血中濃度はきわめて低濃度であるが、新しいラベル剤 (BHHCT-Eu³⁺) を用いた時間分解蛍光イムノアッセイで高感度測定が可能になった。サイトカインのうち、急性期炎症反応に関与し身体運動によっても血液中に放出されることが知られている interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor-α (TNF- α), interferon-γ (INF-γ) の濃度を、トレーニング前、約 1 ヶ月にわたるトレーニングの始めと終わり、トレーニング終了 6 日後(回復期)の早朝安静時に採血し、Eu³⁺-BHHCT をラベル剤とした時間分解蛍光イムノアッセイで測定した。IL-1α濃度は、トレーニング前よりトレーニング終了日に有意に増加した。TNF-α濃度はトレーニング中に増加し、トレーニング終了日には、より有意に増加した。これらのサイトカイン濃度の変化は筋肉の小さな損傷(おそらく微小な筋断裂)の積み重ねによるものと考えられるが、筋肉の炎症が治まった後も血液中の TNF-α濃度は長期間増加したままであることを示し、運動後のリンパ球の分

布の変化に影響を及ぼす一因となることが考えられた。IL-1 β と IL-6 濃度の有意な変化は認められなかった。IFN- γ はトレーニング中増加し、トレーニング終了後減少する傾向にあった。一方、免疫応答の指標のひとつである natural killer (NK) 細胞の活性と数は一過性の運動と比較すると長期の激しい運動ではかなり異なった変化を見せた。NK 細胞の活性とIL-1 α や TNF α の濃度とは相関がみられ、おそらく、これらのサイトカインの増減が血管内皮細胞の接着分子の発現を変化させ、NK 細胞をはじめとするリンパ球の数の増減や活性の変動に関与している可能性が考えられる。

2-2 ユロピウム-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免疫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免疫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免疫アッセイを開発し、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。N-アミノブチル MA とウシ血清アルブミンの結合体(MA-BSA)に新規 Eu 蛍光ラベル剤(BHHCT-Eu³⁺)を標識し、抗 MA 抗体に対して MA と競合反応をさせた。ウサギに免疫して作製した抗体(抗 MA ウサギ IgG)には有機色素である Cy5 (Amersham Life Science)を標識した。エネルギードナーである BHHCT-Eu³⁺の蛍光波長 615 nm はエネルギーアクセプターである Cy5 の吸収極大波長 643 nm に近いので、これらは互いに近接して結合した時のみに、紫外光で励起されたエネルギードナーである Eu 錯体からのエネルギー移動が起こり、アクセプターである Cy5 の増感発光が観察される(図1)。蛍光測定用マイクロタイタープレートに標識抗原(MA-BSA-BHHCT-Eu³⁺)25 μ l, MA 標準液または検体希釈液 50 μ l, さらに Cy5 標識抗体溶液 25 μ l を同時に加えて混合し、37 $^{\circ}$ Cで 30 分反応させた。340 nm で Eu³⁺を励起し、680 nm における Cy5 の蛍光強度を時間分解蛍光測定で求めた。

緩衝液中の標準 MA の最小検出濃度は約 0.1ng/mL で、1 ng/mL 1 μ g/mL の濃度範囲で測定できた(図2)。測定誤差は 8 濃度の平均 CV が 1.98%であった。次に検体である尿や血清が測定に及ぼす影響を調べるために、覚せい剤を含まないことが明らかなヒトの尿および血清(100 倍、20、10 倍、5 倍希釈および未希釈)に、MA を 10² 10⁻² ng/mL の濃度になるように加えた。これらの尿および血清について Eu と Cy5 の蛍光強度を測定し、緩衝液で希釈した MA 溶液を測定した値との比較を行った。Cy5 の蛍光強度で表した MA の標準曲線は尿の希釈率が下がるほど Cy5 の蛍光強度が下がり、また、検量線の傾きも小さくなった。この原因のひとつはエネルギードナーである Eu の蛍光強度が尿や血清の濃度に依存して下がっていることによる。Eu の蛍光強度は尿や血清を 100 倍に希釈した時はほとんど影響を受けないが、未希釈検体の場合は緩衝液の時の約 85

50%程度に減少した。次にエネルギーアクセプターの Cy5 が受ける影響を調べるために、Cy5/Eu の蛍光強度比と尿および血清の濃度との関係を求めたところ、尿や血清を含まない緩衝液での Cy5/Eu の値を 100%とすると、未希釈の尿や血清では約 90%に下った。また、血清に血球を加えて溶血させ、溶血血清がどのような影響を与えるかについても検討した。溶血血清は溶血を含まない血清に較べると明らかに Eu の消光を強くしたが、Cy5/Eu の割合は溶血していない血清と変わらない

かった。これらの結果は検体による Cy5 の消光、あるいはエネルギー遷移の効率がほとんど影響を受けていないことを推測させた。Cy5 は時間分解測定をすれば、溶血血清のような検体でもバックグラウンドの蛍光を除外することができ、Cy5 に由来する蛍光のみを測定することが可能であった。しかし、検体の希釈率が低いほど Eu の蛍光強度が減少することがわかったが、これは尿や血清中の夾雑物が BHHCT と置換して Eu の蛍光を消光するためと推測される。消光の原因については今後のさらなる検討が必要であるが、実際の測定にあたっては、Cy5/Eu の蛍光強度の比は尿や血清の個体差には影響されず、検体の希釈率によってほぼ一定の値を示したので、この値をもとに得られた Eu の蛍光強度の値から補正值を得るか、あるいは同率希釈の MA を含まない尿や血清で検量線をひけば問題はなかった。これらの知見を基に、覚せい剤使用者の尿検体 20 検体を測定し、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。

2-3 本研究以前は、SDF-1 が試験管内実験データから期待されるように生体内 (*in vivo*) で実際に HIV 感染症進行に関わるかどうか不明であった。研究進展を妨げていた重要な要因の一つが血液を含めて生体試料内の SDF-1 タンパク濃度測定が不可能であったことである。そこで本研究の10年度の成果として世界に先駆けて成功した、「十分な感度と信頼性を備えた血中 SDF-1 タンパク濃度測定方法樹立」(これによって世界で初めて正常ヒト血中 SDF-1 濃度が明らかになった。Ikegawa ら、AIDS Research and Human Retroviruses; 東大医科研 岩本博士ら、熊本大学 松下博士ら、早稲田大学・CREST 松本博士らとの共著)に基づいて研究を発展させた。

SDF-1 タンパクが HIV 感染症進行に何らかの役割を果たし得ることを示唆する以下の具体的実験データを得た。a. 内因性 SDF-1 タンパク量が、HIV-1 感染補助受容体・CXCR4 の KD 値の数分の1以内ののぼる個体(ヒト)が、測定した100数10例の HIV 感染者のうち約20例実在することを明らかにした。b. 内因性 SDF-1 タンパク量に個体差が存在し、その個体差が数倍や10数倍にのぼることを明らかにした。CXCR4 の KD 値付近の個体と、その 1/10 以下の個体が実在することを明らかにした。c. CXCR4 の KD 値付近の濃度の SDF-1 タンパクが、実際に *vivo* で CD4 陽性細胞表面 CXCR4 をダウンモジュレートさせることをマウスを用いた実験で示した。(ヒトでは実験できないためマウスを用いた。)

本研究は、実はこれまで意外にも *vivo* での実験が極めて乏しかった「SDF-1 の HIV-1 感染症での役割とエイズ発症遅延の分子メカニズム」について、「SDF-1 タンパクが内因性の HIV 感染症病原性決定因子である」ことを示す具体的なデータを提示した学術的意義がある。もしも結果が「HIV-1 感染者の血中 SDF-1 濃度は非感染者に比べて有意に高い。」ということにとどまっていれば、インパクトはさほどではなく、「それが分かった。でもその先の展開がない。」ということになっていたのかもしれない。しかし、本研究のデータは、「個体間の差が 10 数倍に及ぶこと。」及び「CXCR4 の KD 値付近の SDF-1 タンパク濃度をもつ個体から、その 1/10 以下の個体までいること。」及び「*vivo* で CXCR4 の KD 値付近の SDF-1 タンパク濃度で CXCR4 のダウンモジュレ

ーションがおこることを世界で初めて示したこと。」という具体的データにより、「ヒト血中 SDF-1 タンパク濃度が CXCR4 のダウンモジュレーションを誘導し得るレベルに近く、HIV-1 感染補助受容体・CXCR4 を作用点として HIV ウイルス感染を制御し得る」ことを示した。すなわち、「内因性 SDF-1 タンパクが、HIV 感染症の病原性決定因子の一つであること」を世界で最初に明らかにして今後の展望を拓いた点に高い学術的意義がある。

2-4 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 型に大別される。これまでに、大阪府堺市で分離された大腸菌 O157 染色体からベロ毒素遺伝子 (VT1 型および VT2 型) をクローニングし、それらの塩基配列を明らかにした。また、サンドイッチハイブリダイゼーション法による VT2 遺伝子検出系を構築し、 $10\sim 10,000$ amol/well の濃度範囲で VT2 遺伝子の定量が可能であることを示した。この VT2 遺伝子検出系は VT1 遺伝子には反応せず、VT1 遺伝子および VT2 遺伝子の測り分けが可能であることも明らかとなった。

2-5 亜鉛 (Zinc) は生体内微量元素の一つであり、Zinc フィンガーによる転写制御や亜鉛含有酵素の活性発現または構造保持に働いていることが報告されてきた。最近では、これらのタンパク質に強く結合している亜鉛イオン (Zn^{2+}) のほかに、蛋白質に強く結合していない、すなわちフリーの Zn^{2+} の役割が注目されている。フリーの Zn^{2+} はアポトーシスに対する作用やアルツハイマー病の老人斑の形成を促進していること等が報告されている。

本研究は Zn^{2+} の局在が時間的にどのように変化していくかを明らかにすることにより、 Zn^{2+} の生体内における機能を調べることを目的とする。具体的には生きた細胞で Zn^{2+} を蛍光によって検出することが可能な、 Zn^{2+} のプローブ分子の開発を行った。

3. 研究実施体制

3.1 松本グループ

- ① 松本和子 (早稲田大学理工学部・教授)
- ② 金属錯体の合成と評価

3.2 田代グループ

- ① 田代 啓 (京都大学遺伝子実験施設・助教授)
- ② エイズ発症機構解明

3.3 木村グループ

- ① 木村博子 (順天堂大学医学部・講師)
- ② イムノアッセイへの応用

3.4 中村グループ

- ① 中村 聡 (東京工業大学大学院生命理工学研究科・助教授)
- ② DNA 解析への応用

3.5 長野グループ

- ① 長野 哲雄 (東京大学大学院薬学系研究科・教授)
- ② 亜鉛蛍光プローブ合成

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- “Homogeneous Time-resolved Fluoroimmunoassay of Bensulfuron-methyl by Using Terbium Fluorescence Energy Transfer”, Guilan Wang, Jingli Yuan, Kazuko Matsumoto, and Zhide Hu, *Talanta* 55, 1119–1125 (2001).
- “Immunoassay by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry Using a Metal Chelate as a Label”, Guilan Wang, Jingli Yuan, Benling Gong, Kazuko Matsumoto, and Zhide Hu, *Analytica Chimica Acta* 448, 165–172 (2001).
- “Homogeneous Time-Resolved Fluorescence DNA Hybridization Assaay by DNA-Mediated Formation of an EDTA-Eu(III)- β -Diketonate Ternary Complex, *Analytical Biochem.* 299, 169–172 (2001).
- “Activation of the Propargylic C-H Bond and Formation of the Unsaturated C₃S₂ Five-Membered Rings on the RuSSRu Core”, Hiroyasu Sugiyama, Yoshihiro Morita, and Kazuko Matsumoto, *Organometallics* 20, 5636–5641 (2001)
- “Detection of DNA Hybridization by Use of a Lanthanide Fluorescent Intercalator that Specifically Binds to Double Stranded DNA”, Takahiko Nojima, Yasumitsu Kondoh, Shigeori Takenaka, Teruhisa Ichihara, Makoto Takagi, Hideo Tashiro and Kazuko Matsumoto, *Nucleic Acids Research Supplement* No.1, 105–106 (2001).
- “Facile Allylic C-H Bond Activation on the Bridging Disulfide Ligand in the Ru^{III} Dinuclear Complex Having a Conjugated RuSSRu Core”, Hiroyasu Sugiyama, Yong-Shou Lin, Md. Munkir Hossain, and Kazuko Matsumoto, *Inorg. Chem.*, **40**, 5547–5552 (2001).
- “Kinetic and Equilibrium Study on the Axial-Ligand Substitution Reaction of the Head-to-Tail α -Pyridonate-Bridged *cis*-Diammineplatinum (III) Dinuclear Complex: trans Effect of the Axial Ligand through the Pt-Pt Bond to the Opposite Axial Ligand”, Nami Saeki, Yuji Hirano, Yasunari Sasamoto, Ichiro Sato, Tsuyoshi Toshida, Sousei Ito, Noriko Nakamura, Koji Ishihara, and Kazuko Matsumoto, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2081–2088 (2001).
- “Quantitative Measurement of p21 Protein in Human Serum by Time-Resolved Fluoroimmunoassay”, Guilan Wang, Jingli Yuan, Kazuko Matsumoto, and Hiroko Kimura, *Anal.Sci.*,**17**, 881–883 (2001).
- “Fluorescent Lanthanoid Labels for Time-resolved Fluoremetry in Biological Trace Analysis”, Kazuko Matsumoto, Keisuke Majima, Takashi Fukui, Shinji Sueda, and Jingli Yuan, *Riken Review* No. 35,105–106 (2001).
- “Kinetics and Mechanisms of the Axial Ligand Substitution Reaction of the Head-to-head 2-Pyridonato-bridged *cis*-Diammineplatinum (III) Dinuclear Complex”, Nami Saeki, Yuji Hirano, Yasunari Sasamoto, Ichiro Sato, Tsuyoshi Toshida, Sousei Ito, Noriko Nakamura, Koji Ishihara, and Kazuko Matsumoto, *Bull. Chem.Soc.Jpn.*, 74, 861–868 (2001).

- “Redox-Associated η^1 to η^2 Conversion of Disulfide Ligands in Dinuclear Ruthenium Complexes”, Kumiko Yoshioka, Hayato Kikuchi, Jun Mizutani, and Kazuko Matsumoto, *Inorg. Chem.*, 40 2234–2239 (2001).
 - “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).
 - “Elevated Plasma Stromal Cell-Derived Factor 1 Protein Level in the Progression of HIV Type 1 Infection/AIDS”, Masaya Ikegawa, Jingli Yuan, Kazuko Matsumoto, Steve Herrmann, Aikichi Iwamoto, Tetsuya Nakamura, Shuzo Matsushita, Tetsuya Kimura, Tasuku Honjo, and Kei Tashiro, *Aids Research and Human Retroviruses* **17**, 587–595 (2001).
 - “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).
- (2) 特許出願
H13 年度特許出願件数1件