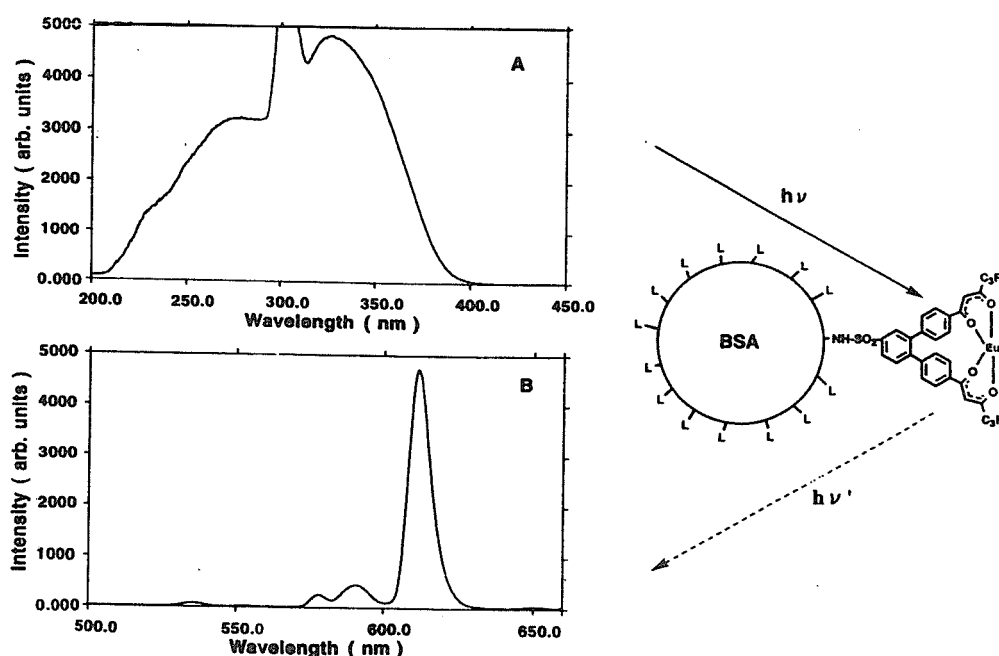


本プロジェクトでは、希土類蛍光錯体を蛍光ラベルとする各種の高感度分析法あるいはバイオテクノロジーの開発、および細胞中の生命活動で生ずる NO の生成を、生きた細胞で蛍光顕微鏡観察するための蛍光プローブの開発などを行っている。このような金属を含む蛍光プローブは他に類を見ないものであり、いずれも日本で開発された独自の技術である。以下の各項にこのような金属錯体プローブの合成と応用について述べる。

### 1. 蛍光性希土類錯体の合成と時間分解蛍光検出

ある種の希土類錯体は強い蛍光を発することが昔から知られている。このような希土類錯体は通常の有機蛍光色素と異なり、紫外部（～330nm）で励起し可視部の 500～650nm 付近に蛍光を出す、蛍光寿命が数百マイクロ秒から 2 ミリ秒と極めて長い、等の特徴を持つ。この特徴を時間分解蛍光測光と組み合わせるとバックグラウンド蛍光を従来法より 2 桁程度落とすことができ、S/N 比の飛躍的向上が得られることを数年前に見出している。いくつかの希土元素の錯体はいずれも同一波長の紫外光により励起され、それぞれの元素に固有の波長の可視光を発する。このときこの蛍光のプロフィールは半値幅約 10nm と分子の蛍光スペクトルとしては異例にシャープな発光である。これに対して励起スペクトルは通常の有機蛍光色素と同様にブロードなプロフィールを持つ。例として図 1 に四座配位β-ジケトン型配位子 BHHCT の  $\text{Eu}^{3+}$  錯体を BSA（ウシ血清アルブミン）に共有結合でラベルしたものの励起スペクトルと蛍光スペクトルを示す。



Excitation (A) and emission (B) spectra of BHHCT-labelled BSA in the presence of  $\text{Eu}^{3+}$ .  
 $[\text{BSA}(\text{BHHCT})]_0 = 1.8 \times 10^{-7} \text{ M}$ ,  $[\text{Eu}^{3+}] = 1.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ . Buffer was 0.1 M Tris-HCl of pH 8.5.

図 1 BHHCT- $\text{Eu}^{3+}$ をラベルした BSA の励起及び蛍光スペクトル

このように水溶液中で蛋白質のアミノ基に共有結合できる結合グループを配位子に持たせておくと、金属錯体を蛍光ラベルとして測定目的の分子に結合させることができる。図 1 の BSA を時間分解蛍光検出すると、通常の有機物を蛍光ラベルとする蛍光法に比べて 2 桁から 4 桁程度検出限界が向上される。図 1 の BSA は検出限界  $6.5 \times 10^{-15} \text{M}$  であった。図 2 には時間分解蛍光検出法の原理と、この方法がなぜバックグラウンド蛍光を除去するのに有効かを示した。

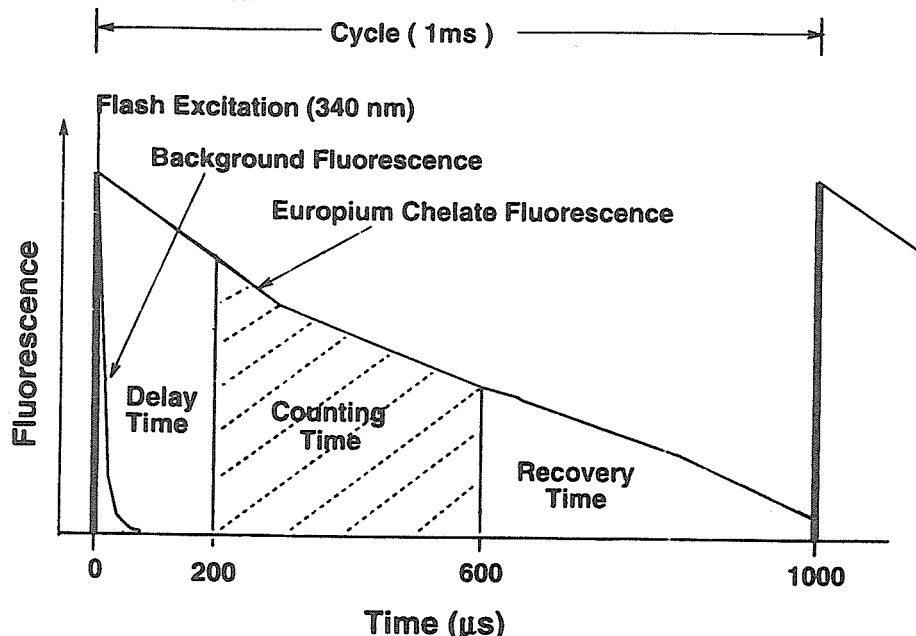


図 2 時間分解蛍光測定 の原理

本年度は主として BPTA-Tb<sup>3+</sup> をラベル剤として用いる DNA ハイブリダイゼーション検出と BPTA-Tb<sup>3+</sup> のゲル電気泳動挙動、および新たに開発した HPLC 用時間分解蛍光検出を用いるエストロジェンの分析を検討した。また同様のエストロジェンを希土類蛍光ラベル—時間分解蛍光検出を用いるイムノアッセイで測定する方法も検討した。

#### 1.1 テルビウムラベル剤 BPTA-Tb<sup>3+</sup> を用いる DNA ハイブリダイゼーションアッセイ

昨年度報告した BHHCT-Eu<sup>3+</sup> をドナーとし Cy3 をアクセプターとする共鳴エネルギー移動を利用する、均一溶液中での DNA ハイブリダイゼーションアッセイと同様のフォーマットで、BPTA-Tb<sup>3+</sup> と Cy5 を用いて分析を行った。BHHCT-Eu<sup>3+</sup> を用いた場合と同様、数十 pM レベルの DNA が検出できた。本法では BPTA を SA (ストレプトアビジン) にラベルし、ビオチン化した DNA と結合させて分析に用いている。しかし多くの DNA 分析では DNA の 5' または 3' 末端にリンカーを出し、その先端にアミノ基をもたせここに蛍光ラベル剤を結合させる方法が用いられている。本分析でも同様なラベル法が可能かどうか 31mer の DNA を用いて検討してみた。5' 末端に炭素数 のリンカーを出し、その末端のアミノ基に BPTA を結合させた。未反応のラベル剤とラベルされた DNA、ラベルされない未反応の DNA を分離するため各種のクロマトを試したが分離できなかった。ラベルされた DNA とされない DNA を分離できたのはアクリルアミドゲルの板状電気泳動であった。ゲルを泳動後 TLC 板上に起き紫外光照射したところ DNA が分離して二つのバンドとして見えた。一方ゲル板そのものだけに紫外光を照射して、Tb 錯体のある所だけを検出することもできた。この実験では、BPTA のみを Tb<sup>3+</sup> なしで DNA にラベル

して泳動したのちゲルを  $TbCl_3$  の水溶液につけて錯体を生成させた。別の実験ではあらかじめ BPTA- $Tb^{3+}$  錯体としてラベルさせておき電気泳動した。この方法でも問題なく分離することができた。以上の事件はこのような金属錯体ラベルが金属の脱離などを起こさず泳動することを示した最初の例であり、このようなラベル剤が今後広く DNA アッセイに用いうる可能性を示している。

## 1.2 希土類錯体ラベルー時間分解蛍光検出による高速液体クロマトグラフィー

高速液体クロマトグラフィー用には BHHCT や BPTA より小さいラベル剤を用いないと、目的物質の分離が困難になる。この目的で CDPP- $Eu^{3+}$  を開発し、HPLC に用いた。図 3 に示すようにエストロン (E1)、エストラジオール (E2)、エストリオールの分離定量を行った。昨年に引き続き分析条件を検討した結果、現在検出限界は  $E1=0.239ng$ 、 $E2=0.203ng$  となっており、これらは LS-MS (質量分析) と同等の値である。現在これら物質の環境中の濃度は検出限界に近く、LC-MS で広く分析が行われているが、定量値の信頼性は低い。今後、本蛍光検出法にも強いるラベル剤をさらに精製し、マイクロカラムを用いることによりさらに 1~2 桁の感度向上が期待される。もし、これが実現すれば、本法は真に環境分析の強力な武器となるであろう。

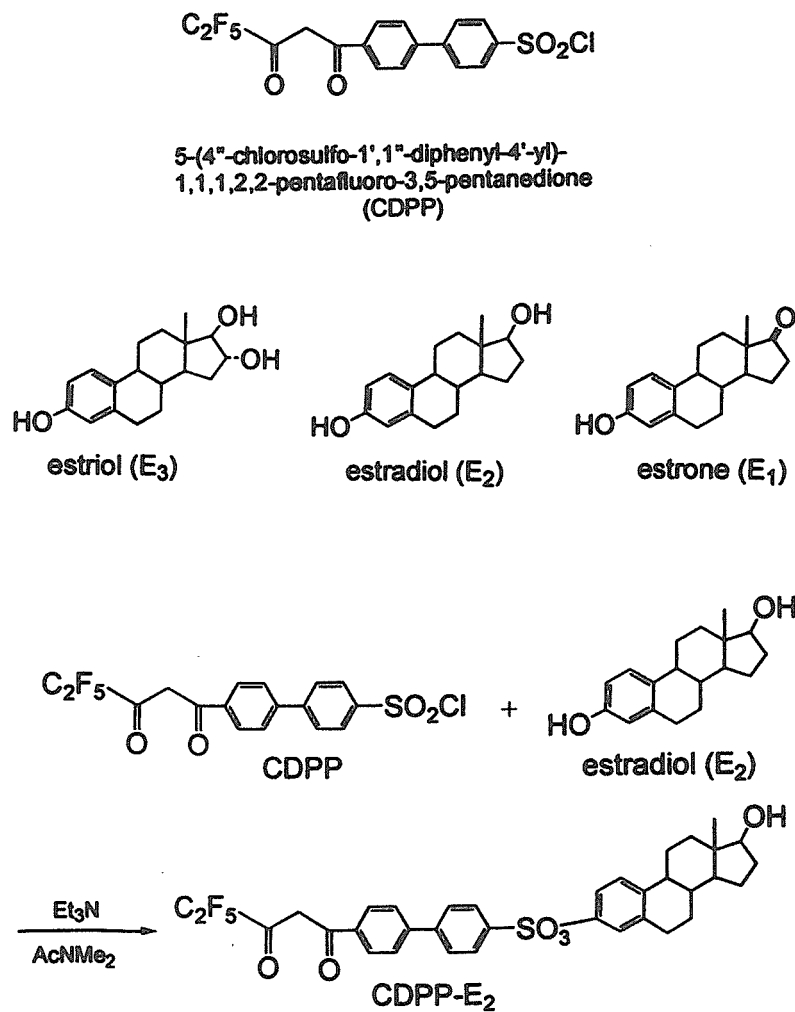


図 3 CDPP とエストロジェン