

早稲田大学理工学部 教授

松本 和子

「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

本研究では希土類蛍光錯体ラベルの開発を中心として以下のような項目につき研究をすすめ、希土類錯体をプローブとし時間分解蛍光測定を行うことにより、従来のあらゆるバイオテクノロジーや物理化学的分析法の感度を1桁から4桁も飛躍的に向上させる可能性を示した。本法の原理は、希土類蛍光錯体が数百ミリ秒以上の長い蛍光寿命を持つことを利用し時間分解蛍光測定を行うと、容器材質や共存物からのバックグラウンド蛍光を効率よく除去できるため、高いS/N比が得られるということに基づいている。本法は日本発のバイオテクノロジーの要となる貴重な技術であり、従来法では測定できなかった超極量の生体物質を定量可能とすることにより、生命科学・医療・診断の分野に広く波及効果を及ぼす技術である。

従来バイオテクノロジーの分野では有機蛍光色素がラベルとして使われてきたが、本研究ではこれに置き換わりさらに高感度化ができる希土類蛍光ラベルを開発し、1) イムノアッセイへの応用、2) 超高感度HPLCシステムの開発、3) DNAハイブリダイゼーションのFRET検出、4) 核酸のキャピラリー電気泳動分析システムの開発、等の研究を行った。またこれとは別に、NO検出用や亜鉛イオン検出用の有機蛍光プローブを開発した。これらのラベル剤やプローブは学術的にも実用的にも価値が高く、希土類蛍光ラベルと時間分解検出法の組み合わせは今後日本オリジンの技術として広範な波及効果を持つことが期待される。

## 2. 研究構想

本研究は早大理工学部松本和子をリーダーとして、早大で開発された希土類蛍光錯体のラベル剤を免疫分析法に応用しこれを用いてエイズ発症のメカニズムとSDF-1蛋白質の関係を研究している京大遺伝子治療実験施設の田代啓グループ、本免疫分析法を診断に役立つサイトカイン、コラーゲン等の分析法として開発する順天堂大医学部木村博子グループ、同様に免疫分析法を開発する東工大生命理工中村聡グループ、希土類ではないが有機の蛍光プローブを開発している東大薬学部長野哲雄グループで構成されている。本研究ではラベル剤の設計と合成、ラベル剤の生体分子へのラベル化反応と生成物の精製といった化学的手法を用いて開発を行う部分と、抗原-抗体反応やDNA分析等生化学的手法を必要とする部分とがあり、それぞれ異なる専門領域を持つグループの共同研究となっている。

ラベル剤の開発は本研究の要の一つであり、蛋白質、核酸、その他の合成化合物等というようにラベルする対象物質によってラベル剤に要求される条件が異なる。考慮すべき点は励起波長、蛍光収率、錯生成定数、ラベルグループの種類、pHへの蛍光依存性等々多数あり、合成は困難を極める。重金属を含むため蛍光特性の理論予想も正確ではない。しかし、本研究の5年間にラベル剤の改良を重ね、初期には常に金属イオンを過剰に共存させなければ蛍光が安定しなかったが、5年後には過剰の金属イオンを加える必要は全くなくなった。さらにこの考えを進めて現在は電場の存在下でも安定なラベル剤を開発している。

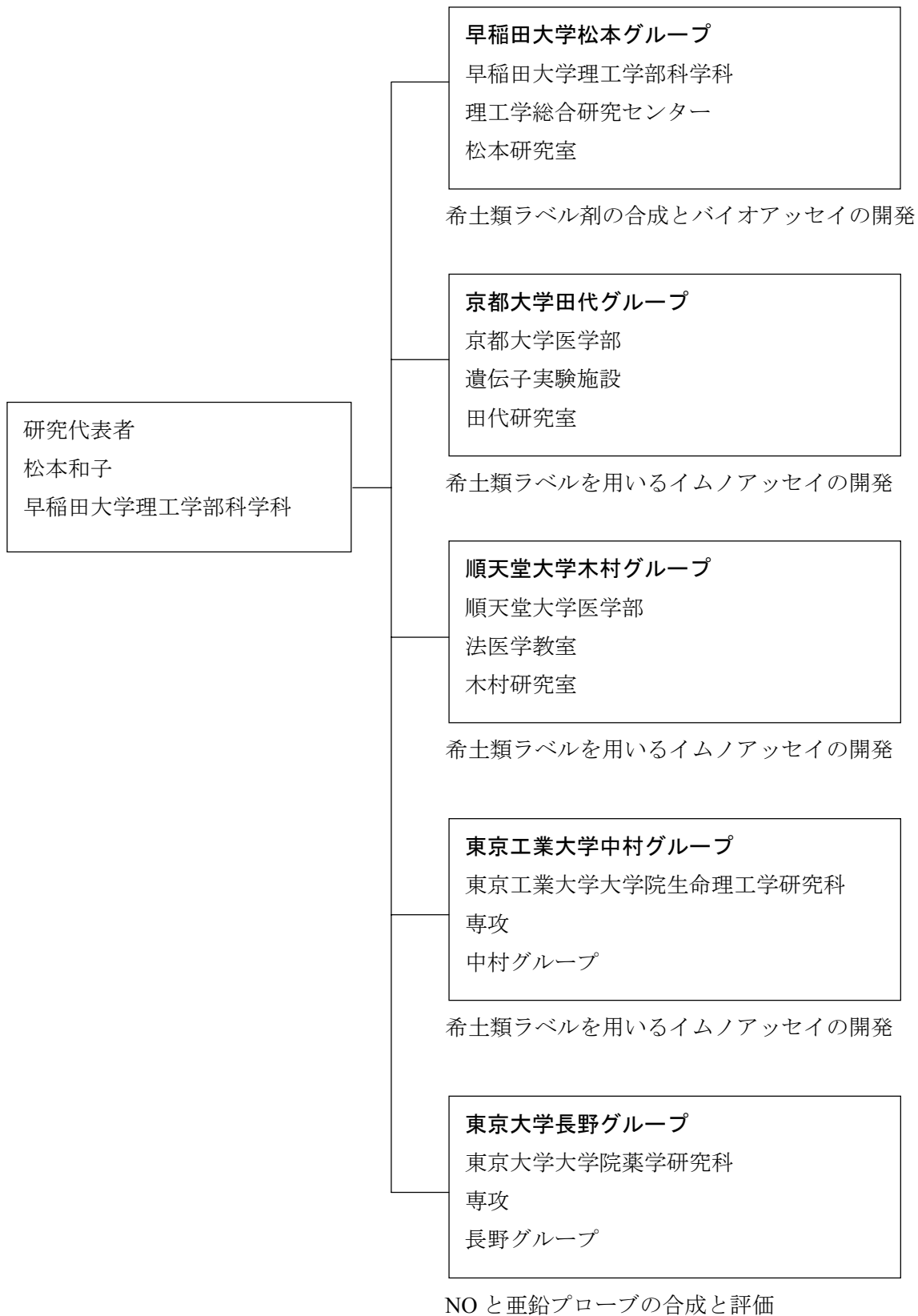
これらの改良により HPLC 用の安定な蛍光ラベル剤が誕生している。HPLC 用のラベル剤としてはラベル剤自体の大きさが分析対象に比べて大きすぎると分析対象物質のクロマト上での挙動がラベル剤によって主として規定されてしまい分離が悪くなる。従って HPLC ではラベル剤は小さい必要がある。また、希土類のイオンはリン酸基の酸素原子に対するアフィニティーが高いため、核酸のラベル剤として使用する際には配位子のキレート力が十分に高いことが要求される。このように使用目的によって異なる性質が要求されるため、ラベル剤は絶えず新しい開発が必要となる。

一方、検出器に関しても同様に新規の開発が要求される。というのは、これらの希土類錯体は紫外光で励起され可視部に蛍光を発するため紫外励起の装置を開発しなければならないのである。紫外域はバイオ分析には使われていなかった領域であるため新たに高感度な装置を開発しなければならない。“高感度な装置”は本法においては特に重要である。というのは従来の有機蛍光剤を用いる検出システムではシグナルは常に弱いバックグラウンド蛍光の上に乗っていたのでいくら高感度の装置を開発しても検出可能なシグナルの下限はバックグラウンドの大きさに決まってきた。一方、本法の時間分解測定ではバックグラウンドは除けるのであるから、装置が高感度であればある程システム全体の検出下限は下がり高感度化が達成できる。このようなことを念頭に置いて HPLC の時間分解蛍光検出器を開発した。

バイオ分析への応用としては免疫アッセイ、DNA ハイブリダイゼーションアッセイ、HPLC によるアミノ酸分析、キャピラリー電気泳動によるオリゴ DNA の分析を目指した。免疫アッセイの応用では、エイズ発症を遅延させる効果があると考えられている血清中の SDF-1 蛋白質を測定する方法の開発を目指した。本法は上記の他にも DNA チップ等のバイオチップや蛍光顕微鏡等への広範な応用が期待され今後のバイオへの波及が楽しみである。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 体制



#### 4. 研究期間中の主な活動

##### (1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名 称	場 所	人数	概 要
H13. 8. 10	ICAS 2001 Symposium “New Fluorescent Probes and Detection Systems in Bioscience”	早稲田 国際会議場	80	新規蛍光プローブ 及び検出システムの 開発と生体科 学・医学への応用

#### 5. 主な研究成果

##### 1. 論文発表

##### 松本和子グループ

1. “Elimination of HX (X=Cl, Br) from Halo-Alkenes on the Ru<sub>2</sub>Q<sub>2</sub> (Q=S, Se) Core Complex”, Shiho Hatemata, Hiroyasu Sugiyama, Saori Sasaki and Kazuko Matsumoto, *Inorg. Chem.*, accepted.
2. “Dehydration Reaction of Hydroxyl Substituted Alkenes and Alkynes on the Ru<sub>2</sub>S<sub>2</sub> Complex”, Kazuko Matsumoto, Yoshinori Moriya, Hiroyasu Sugiyama, Md. Munkir Hossain and Yong-Shou Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 13106-13113 (2002).
3. “Lanthanide Chelates as Fluorescence Labels for Diagnostics and Biotechnology”, Kazuko Matsumoto and Jingli Yuan, *Metal Ions in Biological Systems*, Vol.40, in press.
4. “Organometallic Chemistry of Platinum-Blue Derived Platinum<sup>III</sup> Dinuclear Complexes”, Kazuko Matsumoto and Masahiko Ochiai, *Coord. Chem. Rev.*, 231, 229-238 (2002).
5. “Organometallic-Like C-H Bond Activation and C-S Bond Formation on the Disulfide Bridge in the RuSSRu Core Complexes”, Kazuko Matsumoto and Hiroyasu Sugiyama, *Acc. Chem. Res.*, in press.
6. “Highly Sensitive Time-Resolved Fluorometric Determination of Estrogens by High-Performance Liquid Chromatography using a β-Diketonate Europium Chelate”, Kazuko Matsumoto, Yoshie Tsukahara, Tomonari Umehara, Kinichi Tsunoda, Hidehiro Kume, Seiji Kawasaki, Jutaro Tadano, Takeshi Matsuya, *J. Chromatogr.*, B 773, 135-142 (2002).
7. “A Homogeneous DNA Hybridization System by Using A New Luminescence Terbium Chelate”, Shinji Sueda, Jingli Yuan, and Kazuko Matsumoto, *Bioconjugate Chem.*, 13, 200-205 (2002).
8. “Elevated Plasma SDF-1 Protein Level in the Progression of HIV-1 Infections/ AIDS”, M. Ikegawa, J. Yuan, K. Matsumoto, S. Hermann, I. Iwamoto, T. Nakamura, S. Matsushita, T. Kimura, T. Honjo, K. Tashiro, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 17, 587-595 (2001).
9. “Homogeneous Time-Resolved Fluorescence DNA Hybridization Assay by DNA-Mediated Formation of an EDTA-Eu(III)-β-Diketonate Ternary Complex”, Guilan Wang, Jingli Yuan, Kazuko Matsumoto and Zhilde Hy, *Anal. Biochem.*, 299, 169-172 (2001).
10. “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).
11. “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).
12. “Diels-Alder 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.*, 39, 4058-4061 (2000).
  13. “Homogeneous DNA Hybridization Assay by Using Europium Luminescence Energy Transfer”, Shinji Sueda, Jingli Yuan, and Kazuko Matsumoto, *Bioconjugate Chem.*, 11, 827-831 (2000).

#### 木村博子グループ

1. “Measurement of Mouse Urinary Type IV Collagen using Time-Resolved Fluoroimmunoassay”, Kobayashi M, Kimura H, Liao J, Abe M, Hirose S, and Tomino Y, *Anal. Sci.*, in press.
2. “Highly sensitive determination of plasma cytokines by time-resolved fluoroimmunoassay; Effect of bicycle exercise on plasma level of interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), and interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ )”, Kimura H, Suzui M, Nagao F, Matsumoto K, *Anal. Sci.*, 17, 593-597 (2001).
3. “Lewis and secretor gene effects on Lewis antigen and postnatal development of Lewis blood type”, Ameno S, Kimura H, Ameno K, Zhang X, Kinoshita H, Kubota T, Ijiri I, *Biol. Neonate*, 79, 91-96 (2001).
4. “Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay of psychopharmaceuticals and stimulants in serum”, Kimura H, Mukaida M, Wang G, Yuan J, Matsumoto K, *Forens. Sci. Int.*, 113, 345-351 (2000).
5. “Highly sensitive quantitation of methamphetamine by time-resolved fluoroimmunoassay using a new europium chelate as a label”, Kimura H, Yuan J, Wang G, Matsumoto K, Mukaida M, *J Anal. Toxicol.*, 23, 11-16 (1999).

#### 田代啓グループ

- 1 “ESDN, a novel neuropilin-like membrane protein cloned from vascular cells with the longest secretory signal sequence among eukaryotes, is upregulated after vascular injury”, Kobuke, K., Furukawa, Y., Sugai, M., Tanigaki, K., Ohashi, N, Matsumori, A., Sasayama, S., Honjo, T. and Tashiro, K., *J. Biol. Chem.*, 276, 34105-34114 (2001).
- 2 “Plasma elevation of stromal derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells”, Hattori, K., Rafii, S., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Takeno, M., Shieh, J-H, Hackett, N. R., Crystal, R. G., and Moore, M. S., *Blood* 97, 3354-3360 (2001).
- 3 “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) .
- 4 “A Syndrome Involving Intrauterine Growth Retardation, Microcephaly, Cerebellar Hypoplasia, B Lymphocyte Deficiency, and Progressive Pancytopenia”, Revy, P., Busslinger, M., Tashiro, K., Lu, Z., Arenzana, F., Pillet, P, Fischer, A. and Durandy, A., *Pediatrics*, 105, 22476-22483 (2000) .

- 5 "Genetic Restriction of AIDS Pathogenesis by an SDF-1 Chemokine Gene Variant", Winkler, C., Modi, W., Smith, M.W., Nelson, G.W., Wu X., Carrington, M., Dean, M., Honjo, T., Tashiro, K., Yabe, D., Buchbinder, S., Vittinghoff, E., Goedert, J.J., O'Brien, T.R., Jacobson, L.P., Detels, R., Donfield, S., Willoughby, A., Gomperts, E., Vlahov, D., Phair, J., ALIVE, HGDS, MACS, MHCS, SFCC, and O'Brien, S.J., *Science*, 279, 389-393 (1998).

#### 中村聡グループ

1. "A Novel Chitinase from *Bacillus* sp. Strain K17: Gene Cloning and Expression in *Escherichia coli*", Rie Yatsunami, Yuri Sakihama, Mamie Suzuki, Tetsuya Fukazawa, Shinji Shimizu, Tomoko Sunami, Kimoko Endo, Akio Takenaka and Satoshi Nakamura, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 2, 227-228 (2002).
2. "Gene clusters encoding ATP synthase of *Haloarcula japonica* strain TR-1", Rie Yatsunami, Masaharu Iwamoto, Kunio Ihara and Satoshi Nakamura, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 1, 51-52 (2001).
3. "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*, 14, 135-142 (2001).
4. "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).
5. "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).

#### 長野哲雄グループ

1. "Design and synthesis of a novel magnetic resonance imaging contrast agent for selective sensing of zinc ion" Kenjiro Hanaoka, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano, Michiko Narazaki, Takashi Yokawa, Shigeru Sakamoto, Kentaro Yamaguchi and Tetsuo Nagano, *Chemistry and Biology*, 9, 1027-1032(2002).
2. "A Novel, Cell-Permeable, Fluorescent Probe for Ratiometric Imaging of Zinc Ion" S. Maruyama, K. Kikuchi, T. Hirano, Y. Urano and T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 10650-10651(2002).
3. "Mossy Fiber Zn<sup>2+</sup> Spillover Modulates Heterosynaptic N-methyl-D-aspartate Receptor Activity in Hippocampal CA3 Circuits" Sayaka Ueno, Masako Tsukamoto, Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Maki K. Yamada, Nobuyoshi Nishiyama, Tetsuo Nagano, Norio Matsuki and Yuji Ikegaya, *J. Cell Biology*, 158, 215-220 (2002).
4. "Improved Fluorescent Probes for Zinc, ZnAFs, Suitable for Biological Applications." Tomoya Hirano, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano, *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 6555-6562 (2002).
5. "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).