

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20750064  
 研究課題名（和文） ルテニウム-白金ヘテロ二核錯体の協同的形成を利用した高感度遺伝子解析法の開発  
 研究課題名（英文） Cooperative formation of ruthenium-platinum dinuclear complex and its application to gene detection  
 研究代表者  
 北村 裕介 (KITAMURA YUSUKE)  
 中央大学・理工学部・助教  
 研究者番号：80433019

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、反応部位が接近する事で自発的に起こる連結-脱離反応（プロテインスピライシング反応）に着目し、遺伝子解析用プローブの設計を行った。標的 DNA 存在下においてのみ、同反応を介してルテニウム-白金二核錯体が形成すれば、ルテニウムや白金は特徴的な同位体存在比を有しているため、いわゆる質量タグとしての応用が期待される。そこでこれらプローブの設計を行い、その合成に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

There has been growing recognition that the chemistries and platforms for the new SNP (Single Nucleotide Polymorphism) genotyping that provide quality signals with simple operation are quite beneficial for high-throughput gene analyses.

We report a study on the molecular design for the DNA probe carrying a ruthenium complex which has originally a characteristic relative isotopic abundance. The molecular approach used here for the detection of the target DNA relies on the principle of the DNA-templated release of the ruthenium complexes based on the protein splicing reaction. Each probe has the oligopeptide moiety which are essential elements for this reaction. Since the sequences of the two probes are designed so as to form a ternary tandem duplex with the target, where their auxiliary units face each other to provide a microenvironment for the release of the ruthenium complex. Therefore, it is expected that the mass of the ingredient with a characteristic pattern of ruthenium would change before and after a reaction. On the other hand, the target DNA containing one base miss match could not serve as an effective template. Finally, we succeeded the objective probes carrying ruthenium or platinum complexes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読が終了した現在、遺伝子科学は「構造解析」から「機能解析」に、また「種」から「個」に対象を移している。“必要な患者に、必要な量の、必要な薬剤を”といった理念に基づくテーラーメイド医療を展開する為に、ハイスループット、高感度、かつ安価で簡便な遺伝子解析法の開発が急務の課題と言われている。

従来の遺伝子解析法の多くはプローブの単純なハイブリダイゼーションを利用しているため、プローブの高性能、高機能化には限界があった。申請者は以前より超分子化学的な発想、即ち、複数のプローブの自発的相互作用を活用することにより、単一分子プローブでは実現出来ない高機能の達成を目指し、分子間協同性を活用した遺伝情報読み出しプローブの研究を進めてきた。

## 2. 研究の目的

高い確率（人口の1%以上）で見られる遺伝子内での一塩基の個体差を一塩基多型（SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms）という。SNPsは個人の身体的特徴、体質、疾病易罹患性、薬剤感受性等を識別する重要な遺伝子マーカーとして考えられている。現在、溶液ハイブリダイゼーション法をベースにした様々なSNPsのスクリーニング戦略が試みられている。しかし、代表的な手法においては、酵素反応（増幅、伸張、連結、切断）を利用しているため、操作が煩雑であるのみならず、測定条件が制限される（温度、塩濃度等）。そこで本研究では、膨大な遺伝情報を簡便かつ迅速に解析するために、「高選択的で高感度、ハイスループットでかつ酵素フリーなSNPs解析」システムの確立を目的とする。

## 3. 研究の方法

様々な生体関連物質が混在するサンプル溶液から標的遺伝子の情報を正確に得るために、ルテニウムおよび白金が有する特徴的な同位体存在比を質量タグとして利用する。即ち、目的の遺伝情報を錯体の質量とその同位体パターンに変換し、質量分析法によるアウトプットを目指したい。また、酵素フリーで簡便な検出系を達成する為に、自発的に進行するプロテインプライミング反応に着目した。

設計した2種のオリゴヌクレオチド（ODN）プローブ（ルテニウム錯体ラベル化プローブ、白金錯体ラベル化プローブ）の錯体部位とODNを結ぶリンカーは同スプライミング反応に必須なオリゴペプチドユニットによって構成されている。よって、両プローブが標的遺伝子に結合した際のみ修飾末端が互いに隣接する様に設計さえすれば、後は二核錯体が自発的に形成されると期待される。つまりここでは、プローブは二核錯体を合成するためのいわゆる「基質」、プローブと標的DNAが形成する二本鎖は「反応場」、そして標的DNAはその反応場を提供する為の「鋳型」としてみなすことができる。得られるルテニウム-白金二核錯体は両金属の同位体パターンが混合した特徴的なマスペクトルを示すと考えられる。

## 4. 研究成果

### (1) ルテニウム錯体ラベル化プローブの合成

ルテニウム錯体とODNを繋ぐリンカー部位にプロテインプライミング反応の必須部位であるシステインを導入したプローブの合成を行った。

当初はルテニウム錯体として[Ru(phen)<sub>2</sub>(phen-COOH)]錯体を予定していたが、[Ru(phen)<sub>2</sub>(phen-COOH)]錯体とシステイン-ODNコンジュゲートとのカップリング反応、[Ru(phen)<sub>2</sub>(phen-COOH)]錯体活性エステルと3'末端アミノ化ODNとのカップリング反応共に収率が非常に低かった。そこで、カルボニル基が直接芳香環に結合している事がカップリング反応の立体障害となっていると考え、[Ru(phen)<sub>2</sub>(Asp)]錯体を用いる事にした。

[Ru(phen)<sub>2</sub>(Asp)]錯体-システイン（側鎖チオール基はモノメトキシトリチル基保護）コンジュゲートのカルボン酸活性エステルを合成し、これと末端アミノ化ODNとのカップリング反応により目的とするプローブの合成を液相で行う予定であったが、[Ru(phen)<sub>2</sub>(Asp)]錯体-システインコンジュゲートと3'末端アミノ化ODNとの反応収率が低かったため、システイン-ODNコンジュゲートを先に合成し、その後[Ru(phen)<sub>2</sub>(Asp)]錯体を導入することで目的物前駆体を一定の収率で得ることに成功し

た。また、最終的に硝酸銀と DTT (ジチオスレイトール) を用い、側鎖保護基を除去した。

合成したプローブは各ステップにて逆相 HPLC を用い単離した。MALDI-TOFMS により質量分析を行った結果、目的物の理論値と同じ値を得たため、プローブの合成に成功したと考えられる。

## (2) 白金錯体ラベル化プローブの合成

白金錯体と ODN を繋ぐリンカー部位にプロテインプライミング反応の必須部位であるシステイン-アルギニンを導入したプローブの合成を行った。

[Pt(terpy)(systeamine)]錯体-システイン(側鎖モノメトキシトリチル基保護)-アルギニン(側鎖モノメトキシトリチル基保護)コンジュゲートを合成した。これと固相上の5'末端アミノ化ODNとの縮合反応により目的とするプローブ前駆体の合成を行った。硝酸銀と DTT を用い、システイン側鎖保護基を除去した後、80%酢酸にてアルギニン側鎖の脱保護を行った。最後に、28%アンモニア水を用い、ODN 成分を固相から切り出し回収した。

合成したプローブは各ステップにて逆相 HPLC を用い単離した。MALDI-TOFMS により質量分析を行った結果、目的物の理論値と同じ値を得たため、プローブの合成に成功したと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Yusuke Tsujimura, Yuka Osawa, Daisuke Sasahara, Mayumi Yamamoto, Kenji Okada, Masato Tazaki, Akinori Jyo, "Template-directed formation of luminescent lanthanide complexes: Versatile tools for colorimetric identification of single nucleotide polymorphism", *J. Inorg. Biochem.*, 102, 1921-1931 (2008).

[学会発表] (計 23 件)

① 宋慧珍, 北村裕介, 千喜良誠, "L-アルギニンを有する芳香族アミン三元系白金 (II) 錯体による DNA 塩基配列認識の評価", 第 59 回錯体化学討論会, 2009 年 9 月 27 日, 長崎大学文教キャンパス (長崎)

② 杉本匡, 宋慧珍, 石井猛, 吹浦和馬, 北村裕介, 千喜良誠, "計算化学によるオリゴヌクレオチドの構造揺らぎと遷移金属錯体の塩基認識性の解析", 第 59 回錯体化学討論会, 2009 年 9 月 27 日, 長崎大学文教キャンパス (長崎)

③ 中村雄祐, 北村裕介, 千喜良誠, "芳香族アミンと edda を有する亜鉛及び白金 (II) 錯体の合成と DNA との結合構造解析", 第 59 回錯体化学討論会, 2009 年 9 月 25 日, 長崎大学文教キャンパス (長崎)

④ 北村裕介, 富森岳, 戸田健太郎, 三田聡, 千喜良誠, "鑄型特異的ルテニウム-白金二核錯体の形成とその遺伝子解析への応用", 第 59 回錯体化学討論会, 2009 年 9 月 25 日, 長崎大学文教キャンパス (長崎)

⑤ 村田逸人, 北村裕介, 千喜良誠, "鑄型特異的に銅二核錯体を形成する新規 DNA コンジュゲートの開発", 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 九州大学医系キャンパス (福岡)

⑥ 野上礼美, 北村裕介, 井原敏博, 城昭典, 千喜良誠, "DNA コンジュゲートによる発光性希土類金属錯体の協同的形成とその遺伝子解析への応用", 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 九州大学医系キャンパス (福岡)

⑦ 海原喜彦, 北村裕介, 井原敏博, 城昭典, 千喜良誠, "発光性希土類金属錯体を鑄型特異的に形成する新規核酸プローブの設計とその遺伝子解析への応用", 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 九州大学医系キャンパス (福岡)

⑧ 富森岳, 三田聡司, 北村裕介, 千喜良誠, "白金-ルテニウム二核錯体を鑄型特異的に形成する新規核酸プローブの設計とその遺伝子解析への応用", 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 2009 年 9 月 14 日, 九州大学医系キャンパス (福岡)

⑨ Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Yoshihiko Kaihara, Takeshi Tomimori, Ayami Nogami, Satoshi Mita, Akinori Jyo, Makoto Chikira, "Development of novel gene probes based on DNA-templated formation of luminescent lanthanide complexes" XXII. International Conference on Coordination and Bioinorganic Chemistry, 2009 年 6 月 9 日, スモレニス城 (スロバキア)

⑩ 北島翔太, 杉本匡, 北村裕介, 千喜良誠, "サレン型カチオン性シッフ塩基 Cr (III) 錯

体の合成及びDNAとの相互作用”, 日本化学会第 89 回春季年会, 2009 年 3 月 28 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉)

⑪ 植原 渉, 東城 翠, 北村 裕介, 千喜良誠, “ピラゾール架橋カチオン性 Schiff 塩基異核二核錯体と DNA との結合構造解析”, 日本化学会第 89 回春季年会, 2009 年 3 月 28 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス (千葉)

⑫ Satoshi Mita, Takeshi Tomimori, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira, “Development of the DNA Conjugates which Release Ruthenium Complex in a Sequence-specific Manner”, The 4<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008 年 10 月 12 日, 済州島 (韓国)

⑬ Yusuke Kitamura, Toshihiro Ihara, Ayami Nogami, Nobuhiko Kaihara, Takeshi Tomimori, Makoto Chikira, “Template-directed Formation of Luminescent Lanthanide Complexes: Versatile Tools for Identification of Single Nucleotide Polymorphism”, The 4<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008 年 10 月 12 日, 済州島 (韓国)

⑭ Atsushi Yamada, Yusuke Iwasaki, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira, “Interaction of DNA with Ternary Copper(II) Complexes of 1,10-Phenanthrolines”, The 4<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008 年 10 月 12 日, 済州島 (韓国)

⑮ Yusuke Iwasaki, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira, “DNA Binding and Cleavage Activity of Ternary Amino Acid Schiff Base Copper(II) Complexes Having Planar Heterocyclic Ligands”, The 4<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008 年 10 月 12 日, 済州島 (韓国)

⑯ Midori Tojyo, Shimpei Tsuduku, Akane Tago, Yoshiteru Kakinuma, Yusuke Kitamura, Thean-Heng Tan, Sze-Tin Von, Chew-Hee Ng, Makoto Chikira, “DNA Cleavage and Cytotoxicity of Dicopper(II) Schiff Base Complexes with Cationic Substituents”, The 4<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008 年 10 月 12 日, 済州島 (韓国)

⑰ Hye-Jin Song, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira, “DNA Binding of a Ternary Pt(II) Complex with 1,10-Phenanthroline and L-arginine”, The 4<sup>th</sup> Asian Biological Inorganic Chemistry Conference, 2008 年 10 月 12 日, 済州島 (韓国)

⑱ 野上礼美, 北村裕介, 井原敏博, 城昭典,

千喜良誠, “リンカー部位にチオール基を有する金属配位性 DNA コンジュゲートの合成およびその遺伝子解析への応用”, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008 年 9 月 19 日, 東京工業大学すずかけ台キャンパス

⑲ 三田 聡司, 富森 岳, 北村 裕介, 千喜良 誠, “鑄型特異的にルテニウム錯体を放出する新規プローブの設計とその遺伝子解析への応用”, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008 年 9 月 19 日, 東京工業大学すずかけ台キャンパス

⑳ 村田逸人, 北村裕介, 千喜良誠, “二本鎖 DNA を介する電子移動反応を利用した新規遺伝子解析用プローブの開発”, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008 年 9 月 19 日, 東京工業大学すずかけ台キャンパス

㉑ 東城翠, 都竹新平, 多湖茜, 柿沼好映, 北村裕介, Thean-Heng Tan, Sze Tin Von, Chew Hee Ng, 千喜良誠, “ピラゾール架橋カチオン性 Schiff 塩基に核銅 (II) 錯体による DNA 切断と生理活性の検討”, 第 58 回錯体化学討論会, 2008 年 9 月 21 日, 金沢大学角間キャンパス (石川)

㉒ 岩崎祐介, 北村裕介, 千喜良誠, “複素環配位子を有する三元系アミノ酸 Schiff 塩基銅 (II) 錯体と DNA の結合及び切断能評価”, 第 58 回錯体化学討論会, 2008 年 9 月 21 日, 金沢大学角間キャンパス (石川)

㉓ 北村裕介, 井原敏博, 夏目真樹子, 城昭典, 千喜良 誠, “光学活性ルテニウム錯体を修飾した DNA コンジュゲートの二本鎖形成挙動”, 第 58 回錯体化学討論会, 2008 年 9 月 21 日, 金沢大学角間キャンパス (石川)

[その他]  
ホームページ等

<http://www.chem.chuo-u.ac.jp/~lbcc/member.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
北村 裕介 (KITAMURA YUSUKE)  
中央大学・理工学部・助教  
研究者番号: 80433019

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者