

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21550070

研究課題名（和文）遺伝情報の制御を目指した複合化金属錯体の合成と機能評価

研究課題名（英文）Synthesis and characterization of composite metal complexes aiming at regulations of genetic information

研究代表者

千喜良 誠 (CHIKIRA MAKOTO)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：70006328

研究成果の概要（和文）：

種々の混合配位子金属錯体や複核金属錯体を合成し、それらの錯体とDNAとの結合構造の解析、および結合親和性やDNA切断活性の評価を行った。その結果、金属錯体の複合化がDNAとの相互作用を効率的に強め、切断活性を増大させること、さらに、一部の錯体は新しい抗癌作用を示すことを見出した。また新たに、錯体修飾DNAコンジュゲートを合成し、プロテインプライシング反応を利用した効率的なDNA一塩基多形検出手法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

We have synthesized various mixed ligand and multinuclear metal complexes and analyzed the DNA binding structures, evaluating the DNA binding affinity and the cleavage activity. The results indicated that the composite metal complexes strengthened efficiently the interaction with DNA and enhanced the cleavage activity. In addition, some of the complexes have been found to show a new type of anticancer activity. We have also synthesized new DNA metal complex conjugates and succeeded in developing an efficient technique for the detection of DNA SNPs by making use of protein splicing reactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎科学・無機化学

キーワード：DNA、複合金属錯体、多核錯体、DNAコンジュゲート、抗癌活性、一塩基多形、

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体内の金属酵素には複数の金属活性中心が協同して触媒機能を発現している例が多く見られる。人工的な錯体系においても複数の金属イオンの協同効果によってDNAのリン酸エステル基の加水分解速度が

いちじるしく増加することが見出されている。一般に、複合化錯体ではDNAに対する多点認識による塩基認識機能の向上、加水分解や酸化的切断における協同効果、および活性中心への効率的な電子移動などが期待され、遺伝情報を制御する新しい機能分子とし

て、複合化錯体は大きな可能性を持っている。一方、ブレオマイシンなどをモデル化合物として、配位子の機能の複合化による生理活性錯体の構築も多く試みられてきた。さらにオリゴヌクレオチドに金属錯体を組み込んだ金属錯体修飾DNAプローブによるDNAの一塩基変異(SNP)の検出も活発に試みられている。

(2) 近年、ナノテクノロジーの発展に伴い、DNAは分子モーターや分子ワイヤ、さらにはコンピュータの素材としても注目され、それらの特異的な構造制御を目的とした金属錯体の役割が注目されている。従って、複合化金属錯体とDNAとの結合と反応に関する系統的な研究はこれらの問題に挑戦する重要な課題である。本申請者はこれまで、ブレオマイシン、デグリコペブレオマイシン、カチオン側鎖をもつ水溶性ポルフィリンなどのFe(III)、Co(II)、Cu(II)錯体、フェナントロリン-アミノ酸Cu(II)三元錯、側鎖を修飾したフェナントロリン誘導体、カチオン側鎖を持つシッフ塩基錯体、数種のトリアミン誘導体、種々のアミノ酸、ペプチドのCu(II)錯体などの種々の常磁性金属錯体とDNAとの結合構造と切断反応について調べ、いずれの場合も配位子構造のわずかな変化が結合構造と反応性に大きな影響を与えることを明らかにしてきた。また研究分担者の北村は、これまで、分析化学的な観点から多様なDNAコンジュゲートを合成し、SNP解析について多くの興味ある成果を挙げている。

## 2. 研究の目的

本研究では構造化学的な取り組みと分析化学的な手法を融合し、錯体の複合化や配位子の修飾により、上に述べたさまざまな分野において高度な機能を持つ新たな錯体の開発に取り組む。その目的を達成するために、多様な機能複合化金属錯体を合成し、DNAとの結合構造や反応が金属イオン種や原子価状態および複合化された配位子構造などによってどのように変化するかを、UV-vis、CDスペクトル、蛍光スペクトル、DNAファイバーESRスペクトル、オリゴヌクレオチドを用いた多次元NMRスペクトルなどの多様な分子分光学的測定と共に、MALDIおよびESI-質量分析、ECLを含めた電気化学的測定、分子動力学計算、電気泳動法による反応解析などにより、系統的に研究を行う。ここで“機能複合化”とはそれぞれ目的に応じて、DNA塩基配列または高次構造の認識能、DNA切断能、DNA変形能、プローブとしての情報変換機能、などを金属錯体1分子に集積化して付与することを意味する。金属錯体とDNAとの反応における金属活性部位の立体配置の制御や錯体とDNA塩基対と

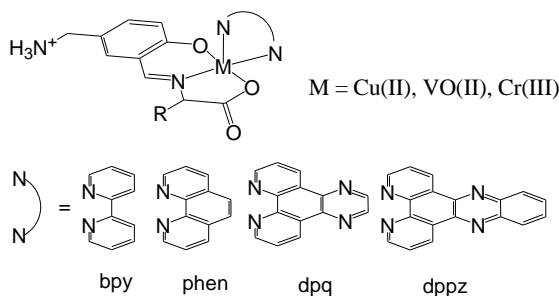
の特異的認識のために必要な要素を整理し、抗癌剤開発のための新奇な金属錯体リード化合物や高感度SNP解析のためのDNAコンジュゲート錯体の開発につなげていく。

## 3. 研究の方法

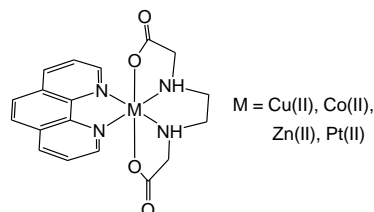
上記の目的を達成するために下記の(1)~(5)に示した金属錯体および核酸プローブを合成し、(1)~(4)の錯体についてはDNA結合構造、結合親和性、DNA切断活性を解析した。また、(2)の錯体については抗癌活性を評価した。(5)①の核酸プローブは、質量分析法により、②は蛍光測定により機能を評価する。

(1) フェナントロリンなどの複素芳香環アミン誘導体をインターカレータとする複合金属錯体。

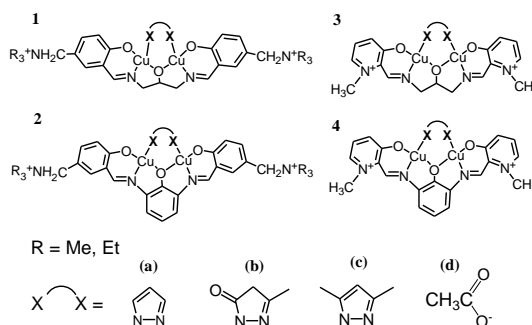
①カチオン性シッフ塩基との三元錯体



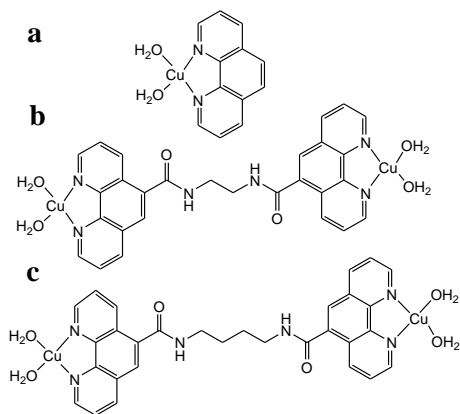
②フェナントロリン-エチレンジアミン二酢酸三元錯体[M(phen)(edda)].



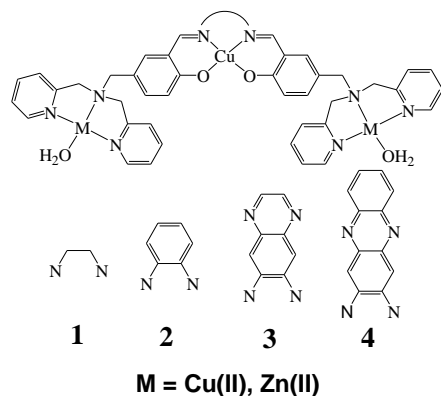
(2) カチオン性シッフ塩基銅(II)二核錯体。



(3) ジアミド架橋フェナントロリン銅(II)二核錯体。

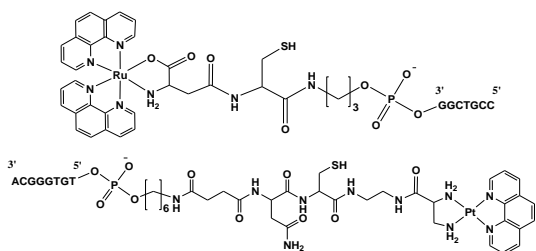


(4) シッフ塩基架橋ジピコリルアミン金属三核錯体。

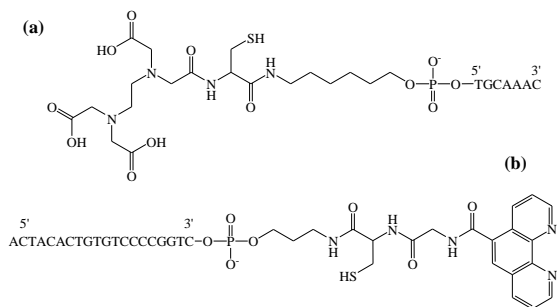


(5) SNPs 検出を目指した機能性核酸プローブ。

① プロテインプライミング反応を利用してルテニウム-白金二核錯体形成を形成する核酸プローブ。



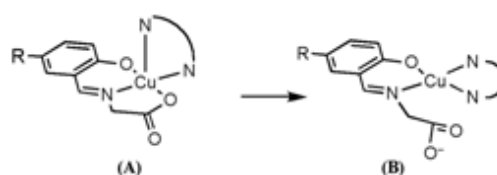
② リンカー部位にシステインを有する希土類金属配位性および光増感機能部位を有する核酸プローブ。



#### 4. 研究成果

(1) フェナントロリンなどの複素芳香環アミン誘導体をインターカレータとする複合金属錯体

①の錯体では、複素芳香環が大きくなるにつれて、挿入型の結合様式の割合が増加し、また DNA 光切断活性も向上する。過酸化水素を用いた酸化的切断活性については金属イオンが  $\text{Cu(II)} > \text{VO(II)} > \text{Cr(III)}$  の順に切断活性が変化した。DNA ファイバーの ESR の解析から、 $\text{Cu(II)}$  錯体では、DNA へ挿入型で結合する際、錯体の配位構造が変化し、複素芳香環部位が銅配位平面内に、シッフ塩基末端アセテート部位が配位面外に下図のようにシフトすることが明らかにされた。



また、 $\text{VO(II)}$  錯体は溶液中で徐々に構造が変化し、ESR サイレントな反磁性錯体種に変化するが、DNA と結合することによってその変化が抑えられることを見出した。これは溶液中での反磁性二核錯体の生成が DNA 上で抑制されていることによるものと推定された。

②の錯体は電気的に中性の分子で、細胞内のドラッグデリバリーシステムに乗りやすことが期待される。 $\text{Cu(II)}$ 、 $\text{Zn(II)}$ 、 $\text{Co(II)}$  錯体については、トポイソメラーゼ I 活性阻害、G-四重鎖構造の安定性、MCF7 乳がん細胞のミトコンドリア膜電位などに対する効果が検討された。その結果、 $\text{Zn(II)}$  錯体は G-四重鎖構造を著しく安定化することがわかり、これまで明らかにされていたこの錯体の抗癌活性との関連が推定された。また、 $\text{Cu(II)}$ 、 $\text{Zn(II)}$  錯体は自己相補オリゴヌクレオチド 5'-CATATG-3' と 5'-GTATAC-3' を区別して認識できるが、 $\text{Co(II)}$  錯体はできないことが示され、金属イオンにより塩基配列の認識に著しい差があることが明らかになった。同様な結果が  $\text{Zn(II)}$  錯体と  $\text{Pt(II)}$  錯体についても自己相補オリゴヌクレオチド 5'-CGCGAATTCGCG-3' (ODN1) と 5'-CGCGTATACGCG-3' (ODN2) との NMR による結合構造解析から明らかになった。すなわち、 $\text{Zn(II)}$  錯体は ODN1 にたいしては明確な塩基配列の識別はみられなかったが、ODN2 に対しては TATA 部位を認識すること、また  $\text{Pt(II)}$  錯体はどちらのオリゴヌクレオチドに対しても、末端の CGCG 部位に挿入型で結合することが明らかになった。 $\text{Pt(II)}$  錯体は平面構造が安定であ

ることから、溶液中では edda の軸配位子が配位せず、平面4配位構造になっていることが NMR の解析から明らかになった。

## (2) カチオン性シッフ塩基銅(II)二核錯体。

カチオン性側鎖 R、架橋部位  $N^+O^-N$  および  $X^+X^-$  がどのように DNA との相互作用に影響を及ぼすかを検討した。

①錯体 1 : R = Me では過酸化水素存在下での DNA 切断活性は  $b \approx c > d > a$ 、CD スペクトルから評価した結合定数は  $d > a > c > b$ 、EtBr の蛍光消光から評価した消光定数では  $d > c > a > b$ 、超遠心分離法による DNA 結合量評価では  $d > c > b > a$  という結果が得られた。

このように、DNA 切断活性は必ずしも DNA との結合親和性に直接依存しているわけではないこと、また結合親和性もその測定法によって幾分順序が変化し、単一の測定だけでは十分な評価ができないことなどが明らかになった。R = Et になると UV-vis スペクトルから見積もられた a の結合定数は R = Me に比べて増加し、蛍光消光定数は減少するが、酸化切断活性には顕著な違いは認められない。この結果もそれぞれの現象が多く要素の微妙な組み合わせで発現していることを示している。

②錯体 2 : この系統の錯体の酸化切断活性は錯体 1 に比べて低下する。これは二核錯体配位部位の平面性が増加し構造が安定化したため、活性酸素種の生成能が低下したためと推定される。しかし R = Me で a、d および OH 架橋の錯体では HeLa 細胞に対して 24h のイオンキューベーションで 20 ~ 30  $\mu\text{M}$  程度の  $IC_{50}$  が見積もられた。錯体 1 の系列ではこのような抗癌活性は認められないことから、DNA 切断活性が抗癌活性を誘導しているのではないと考えられる。詳細なメカニズムについては現在さらに検討を進めている。

③錯体 3 : カチオン性側鎖の違いが DNA との相互作用にどのような影響を持つかを調べるために芳香環内に正の電荷を有する錯体として a の架橋基を持つ錯体 3a を合成した。CD スペクトルから見積もられた結合定数と EtBr の蛍光消光定数は対応する錯体 1a の値より大きく、DNA との結合親和性は増加した。一方 DNA 切断活性については、過酸化水素を用いたときは錯体 1a より活性が強かったがアスコルビン酸を用いると逆に小さくなった。また活性酸素阻害剤も異なることから、錯体 1a と 3a では DNA 切断のメカニズムが異なることが明らかとなった。

④錯体 4 : この錯体については a 架橋錯体の合成が終了し、UV-vis スペクトルから結合

定数  $5.8 \times 10^5$ 、サイトサイズ 1.7 という値が得られた。対応した錯体 2a の値の測定値が得られないが、蛍光消光定数を比較するとほぼ倍増しており、DNA との親和性は増加していると思われる。この系統の錯体についてはさらに架橋基を変化させたものを合成し機能評価を進める予定である。

## (3) ジアミド架橋フェナントロリン銅(II)二核錯体。

DNA ファイバーの ESR スペクトルでは単核錯体 a は挿入型で DNA に結合することが明らかにされているが、ジアミド架橋により錯体配位面の配向はかなり傾くことが明らかになった。また b に比べ c は配向のばらつきが減少し、メチレン架橋長が配向性に関わりあっていることが明らかになった。また DNA の酸化切断活性は単核錯体 a に比べて両者とも増大したが、c は b より高い。これらのことから、フェナントロリン架橋部位の長さは配向性や切断活性の制御において重要であることが明らかとなった。

## (4) シッフ塩基架橋ジピコリルアミン金属三核錯体。

M = Cu(II) の三核錯体は単一のピコリルアミン銅(II)錯体に比べて酸化切断活性が増大し、とくに錯体 4 では二本鎖切断の効率が著しく増加した。M = Zn(II) の錯体については DNA ファイバーの ESR から複素芳香環部位が挿入型で結合していることが推定された。この結果にもとづき分子モデルを構築し、二つのピコリルアミン銅(II)錯体部位の配向を検討したところ、錯体 4 では切断活性部位が向かい合った糖リン酸骨格にそれぞれ近接して結合することが明らかになった。このような構造が二本鎖切断の効率を高めていると考えられる。

## (5) SNPs 検出を目指した機能性核酸プローブ。

①本研究では cH-RAS 配列を特異的に認識し、プロテインプライミング反応を利用してルテニウム-白金二核錯体形成を形成する核酸プローブを合成した。実際の合成は多くの各合成ステップについて反応条件を検討した。最終生成物について質量分析法により検討した結果、プロテインプライミング反応に由来するルテニウム-白金二核錯体の生成が確認できた。現在、測定感度は 5 pmol 程度であるが、今後反応条件を改善しさらなる感度向上を目指している。

②本研究ではリンカー部位にシステインを有する希土類金属配位性部位 (a) および光増感機能部位 (b) を有する核酸プローブを合

成した。これは二つの核酸プローブがターゲットと二本鎖形成を行う過程で、それぞれが有するリンカー部位のSH基がS-S結合を形成することにより、希土類金属配位部位と光増感機能部位を結合させ、生成したDNA二本鎖が安定化するとともに、過剰のプローブを添加することにより、連続したサイクリックな二本鎖形成が期待され、これにより測定感度が飛躍的に向上する。まだ、合成の収率が期待したところまでには達していないが、少量のプローブで時間分解蛍光スペクトル測定を行ったところ、あきらかにシステイン基が無いプローブに比べて蛍光強度の増加が観測され、この手法の有用性が確認できた。現在は合成の条件をさらに検討し反応収率の向上を目指している。

#### 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3件)

①Sze-Tin Von, Hoi-Ling Seng, Hong-Boon Lee, Seik-Weng Ng, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira, Chew-Hee Ng

DNA molecular recognition and cellular selectivity of anticancer metal(II) complexes of ethylenediaminediacetate and phenanthroline: multiple targets  
J. Inorg. Biol. Chem., 査読有、Vol.17 No.1、2012、pp57-69.

②Yusuke Iwasaki, Masato Kimura, Atsushi Yamada, Yuichiro Mutoh, Maiko Tateishi, Hidekazu Ariei, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

Conformational change of ternary copper(II) complexes of cationic Schiff-bases and N-heteroaromatic amines induced by intercalative binding to DNA  
Inorg. Chem. Commun., 査読有、Vol.14、2011、pp1461-1464.

③Hoi Ling Seng, Kong Wai Tan, Mohd Jamil Maah, Wee Tee Tan, Hirokazu Hamada, Makoto Chikira, Chew Hee Ng

Copper(II) complexes of methylated glycine derivatives: Effect of methyl substituent on their DNA binding and nucleolytic property  
Polyhedron, 査読有、Vol.28、No.11、2009、pp2219-2227

[学会発表] (計41件)

①Yoshie Hara, Akiyoshi Asahina, Yusuke

Kitamura, Makoto Chikira

「DNA binding affinity and cleavage activity of dicopper(II) Schiff base complex with cationic substituents」  
3rd Asian Conference on Coordination Chemistry

2011年10月19日、New Delhi、India

②Yoko Taruno, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

「Effect of asymmetric bridging group on the binding of cationic salen type Schiff base complexes of nickel (II) to DNA」  
3rd Asian Conference on Coordination Chemistry

2011年10月19日、New Delhi、India

③Shota Takakita, Masanobu Miyoshi, Akiyoshi Asahina, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

「Synthesis of N-methylpyridinium Schiff base copper (II) complexes and evaluation of the interaction with DNA」

3rd Asian Conference on Coordination Chemistry

2011年10月19日、New Delhi、India

④Yuji Sakurai, Atsushi Nakano, Ayami Nogami, Toshihiro Ihara, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

「Synthesis of the DNA conjugates with metal chelator through cysteine moiety and the application to SNPs analysis」

3rd Asian Conference on Coordination Chemistry

2011年10月19日、New Delhi、India

⑤Kazuya Takahashi, Asami Sano, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

「Interaction of Salicylidene Amino Acid Schiff-base Oxovanadium(IV) Complexes with DNA」

3rd Asian Conference on Coordination Chemistry

2011年10月19日、New Delhi、India

⑥Akiyoshi Asahina, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

「DNA cleavage activity of dipicolylamine copper (II) complex tethered to Schiff base copper (II) complex」

3rd Asian Conference on Coordination Chemistry

2011年10月19日、New Delhi、India

⑦Masato Kimura, Yusuke Iwasaki, Yusuke Kitamura, Makoto Chikira

「Effect of cationic side chains on the DNA binding and cleavage activity of Schiff base Copper(II) complexes having heterocyclic ligands」  
3rd Asian Conference on Coordination Chemistry  
2011年10月19日、New Delhi、India

⑧ Yusuke Kitamura、 Takeshi Tomimori、 Satoshi Mita、 Makoto Chikira  
「Development of noble gene probes based on DNA-templated formation of platinum-ruthenium dinuclear complex」  
[2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies](#)  
2010年12月17日、Honolulu、Hawaii

⑨ Nobuhiko Kaihara、 Yusuke Kitamura、 Takeshi Tomimori、 Toshihiro Ihara、 Makoto Chikira  
「Template-directed formation of luminescent lanthanide complex using the DNA probes and application to gene analysis」  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010年12月17日、Honolulu、Hawaii

⑩ Yusuke Nakamura、 Hoi-Ling Seng、 Chew-Hee Ng、 Makoto Chikira  
「DNA binding structure of zinc(II) and platinum(II) complexes with aromatic amine and edda」  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010年12月16日、Honolulu、Hawaii

⑪ Shota Kitajima、 Masato Kimura、 Yusuke Kitamura、 Makoto Chikira  
「Comparative study of the interactions of Schiffbase-N-heteroaromatic amine ternary complexes of Cr(III) and Cu(II) with DNA」  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010年12月16日、Honolulu、Hawaii

⑫ Jian Shi、 Midori Tojo、 Yusuke Kitamura、 Makoto Chikira  
「The synthesis, characterization and DNA modification of new dicopper Schiff-base complexes」  
2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies  
2010年12月16日、Honolulu、Hawaii

⑬ Masato Kimura、 Yusuke Iwasaki、 Yusuke

Kitamura、 Makoto Chikira  
「Effect of cationic side chains on the interaction between DNA and amino acid Schiff base copper(II) complexes having heterocyclic ligands」  
60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA、 JAPAN  
2010年9月27日、Osaka、Japan

⑭ Kazuya Takahashi、 Asami Sano、 Yusuke Kitamura、 Makoto Chikira  
「Interaction of salicylideneamino acid Schiff base oxovanadium(IV) complexes with DNA」  
60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry in OSAKA、 Japan  
2010年9月27日、Osaka、Japan

〔その他〕  
ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千喜良 誠 (CHIKIRA MAKOTO )  
中央大学・理工学部・教授  
研究者番号：70006328

### (2) 研究分担者

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