

ルテニウム(II)およびイリジウム(III)錯体の 電気化学発光による DNA 二重らせんの検出

櫻田伸一*, 木村友哉*, 小川ゆかり*, 有井秀和†,
北村裕介*, 芳賀正明*, 千喜良 誠*

Detection of Double-stranded DNA by Electrochemiluminescence of Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes

Shinichi Sakurada*, Tomoya Kimura*, Yukari Ogawa*, Hidekazu Arie†,
Yusuke Kitamura*, Masaaki Haga*, Makoto Chikira*

abstract

Various fluorescent ruthenium and iridium aromatic amine complexes have been known to bind to double stranded DNA(ds-DNA) and utilization of the property for DNA-chip technology has long been attempted. Among various methods of detecting complexes bound specifically to ds-DNA, electrochemiluminescence (ECL) has attracted much attention as a technique that affords low price and high-speed detection method. In this study, we have synthesized ruthenium(II) and iridium(II) complexes of bpy (2, 2'-bipyridine), phen(1,10-phenanthroline), and ppy (2-phenylpyridine) respectively with large N-aromatic diimine intercalators and investigated the DNA binding affinity by spectroscopic methods and the ECL behaviors by DNA modified ECL electrode. The results indicated that Λ -[Ru(bpy)₂(tpphz)]²⁺ (tpphz : tetrapyrido[3,2-a:2,3'-c:3'', 2''-h:2''',3'''-j]-phenazine) has high affinity and selectivity for recognition of ds-DNA compared to the Δ -form complex and the other similar ruthenium complexes. It was also revealed that [Ir(ppy)₂(tpphz)]⁺ recognized ds-DNA a little more efficiently than the ruthenium complexes though the affinity of the iridium complex to DNA was smaller than those of the ruthenium ones.

1 はじめに

現在、効率的な病気の治療や予防を目的としたテーラーメイド医療の重要性が広く認識されている。テーラーメイド医療とは、個人によって薬剤に対する効能や副作用が異なるため、あらかじめ個人の生体特性をしらべ、それに適合した治療や予防を進める医療である。個人の生体特性は遺伝情報を担っている DNA の塩基配列の特性の反映であり、DNA 塩基配列の違いによる体質の違いや薬の効能の違いが徐々にではあるが解明されてきている。また、種々の病気の原因となるウイルス、細菌、突然変異によって発生した癌細胞などの DNA 塩

*応用化学科

†現在の所属：学習院大学理学部化学科

基配列の検出は病気の診断とその治療に決定的な役割を果たすことになる [1-3]。しかし人間の遺伝子の解読に多大な労力と時間が費やされたことから分かるように、病気や体質に関連した大量の DNA の塩基配列を決定することは容易ではない。したがって、それぞれの状況に応じて DNA の塩基配列を迅速に解析する技術の開発はテーラーメイド医療を進めていくうえで欠かすことの出来ない課題である。この技術の確立のためにさまざまな手法の開発が試みられているが、そのような技術の一つとして DNA チップが考案された。

DNA チップは検出したい一本鎖 DNA を基板上に固定化し、それと相補的な DNA 鎖と二本鎖を形成したときに示す物性の変化を検出する技術である。多様な DNA 一本鎖を微小な基板上に固定化することにより、一度に多くの種類の遺伝子を短時間で検査することが可能となる。二本鎖形成に伴う物性の変化は主に蛍光色素でラベルしたプローブ DNA の発光強度の変化を利用した検出と [4,5]、基板を電極として用い二本鎖 DNA と特異的に結合する分子の酸化還元にとまなう微小電流の変化によって検出されている [6]。前者の手法は、近年の画像解析能力の向上により、精度が向上し、研究分野などで利用されてきている。しかし、臨床分野での応用に対してはレーザーを必要とする光学的な測定装置が高価なためになかなか普及できていない。一方、電気化学的応答の測定は装置が簡便で安価だが、測定感度の面でまだ課題が残されている。

本研究では、高感度の光学測定と簡便装置で可能な電気化学的測定の利点を両立させることが期待できる電気化学発光 (ECL: Electrochemiluminescence) [7] による DNA 二本鎖形成の検出を目指し、DNA とインターカレート型で結合し強い ECL 発光が期待される Fig. 1 に示したルテニウムおよびイリジウム錯体を合成し、これらの錯体の DNA への親和性と ECL 発光の特性を調べた。

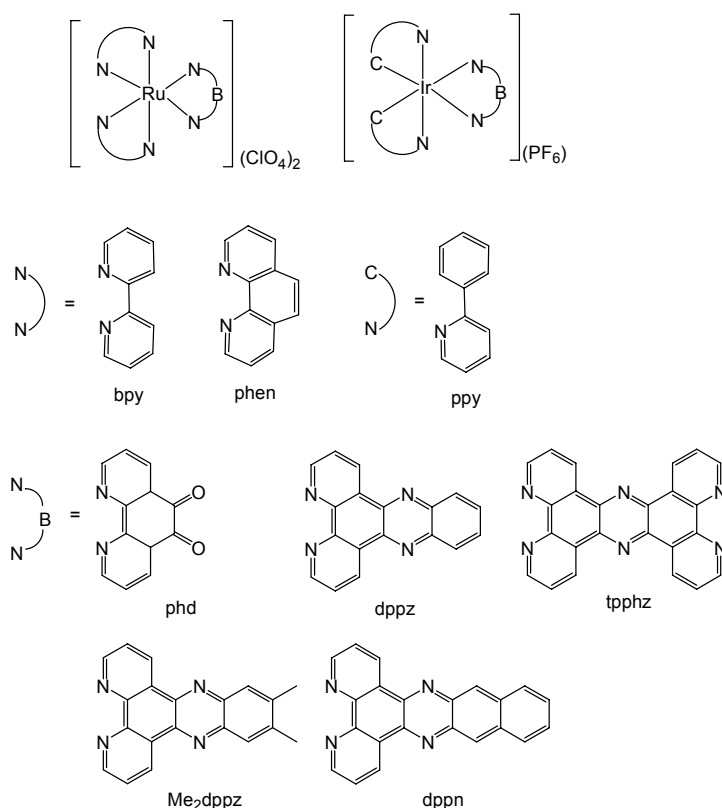


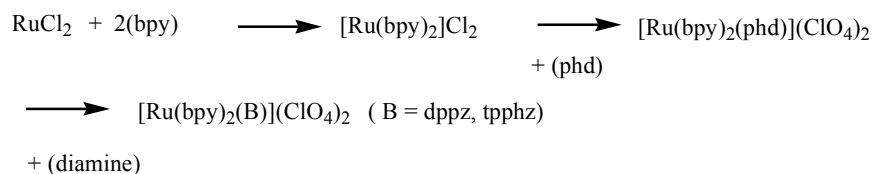
Fig. 1 Synthesized ruthenium (II) and iridium (III) complexes. Abbreviations: bpy=2, 2'-bipyridine, phen=1,10-phenanthroline, ppy=2-phenylpyridine, phd=1,10-phenanthroline-5,6-dione, dppz=dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine, tpphz=tetrapyrido[3,2-*a*:2,3'-*c*:3'',2''-*h*:2''',3''''-*j*]-phenazine, Me₂dppz=11,12-Dimethyldipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine, dppn=benzo[*d*]dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine).

2 実験

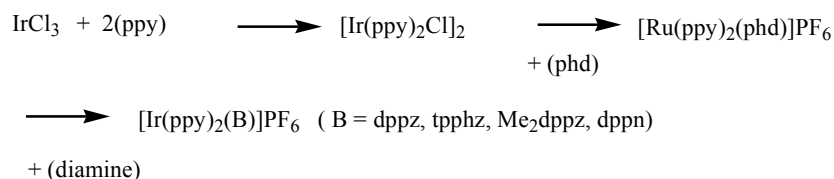
2.1 錯体の合成

Scheme 1 および 2 に示したようにそれぞれ bis-bpy および bis-ppy 錯体を経由して phd 錯体を合成し, o-フェニレンジアミンあるいは 5,6-ジアミノ-1,10 フェナントロリンと反応させて得た [8,9]. 得られた生成物はそれぞれ適当な溶媒の溶液から ClO_4^- あるいは PF_6^- 塩として析出¹させた後, ^1H NMR により同定した. Δ -, Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})]\text{Cl}_2$ は $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{phd})]\text{Cl}_2$ をジベンゾイル-D,L-酒石酸塩を用い, また, Δ -, Λ - $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{tpphz})]\text{Cl}_2$ は $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phd})]\text{Cl}_2$ をアルセニル (+) 酒石酸-(+) 塩を用いて光学分割を行い合成した [10]. 光学分割の結果はそれぞれの CD スペクトルが逆符号の鏡像関係にあることで確認した.

Scheme 1



Scheme 2



それぞれの錯体のラセミ型 (*rac*) の合成収率と NMR スペクトルの結果を以下に示す.

rac- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})](\text{ClO}_4)_2$: 収率 54.4%. ^1H NMR (CD_3OD) δ (ppm): 9.79 (dd, 2H), 8.75 (d, 2H), 8.72 (d, 2H), 8.50 (dd, 2H), 8.27 (dd, 2H), 8.20-8.06 (m, 6H), 7.98 (dd, 2H), 7.94 (d, 2H), 7.85 (d, 2H), 7.56 (ddd, 2H), 7.35 (ddd, 2H)

rac- $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})](\text{ClO}_4)_2$: 収率 42%. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 10.00 (dd, 2H), 9.95 (dd, 2H), 9.27 (dd, 2H), 8.91 (d, 2H), 8.88 (d, 2H), 8.31 (dd, 2H), 8.26 (t, 2H), 8.13 (t, 2H), 8.07-8.09 (m, 4H), 7.88 (d, 2H), 7.82 (d, 2H), 7.63 (t, 2H), 7.39 (t, 2H)

rac- $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{tpphz})](\text{ClO}_4)_2$: 収率 48.5%. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 9.98 (m, 4H), 9.30 (s, 2H), 8.81 (d, 4H), 8.42 (s, 4H), 8.32 (d, 2H), 8.25 (d, 2H), 8.11 (m, 4H), 7.98 (m, 2H), 7.80 (m, 4H)

rac- $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{tpphz})](\text{PF}_6)$: 収率 52%. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 6.32 (d, 2H), 6.98-7.02 (m, 4H), 7.10 (t, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.82 (t, 2H), 8.02 (t, 2H), 8.08 (t, 2H), 8.30 (m, 4H), 8.39 (d, 2H), 9.28 (t, 2H), 9.98 (t, 2H), 10.17 (d, 2H).

rac- $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{dppz})](\text{PF}_6)$: 収率 52%. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 6.30 (d, 2H), 6.97 (t, 2H), 7.05 (t, 2H), 7.09 (t, 2H), 7.65 (d, 2H), 7.92 (t, 2H), 7.98 (d, 2H), 8.22 (m, 4H), 8.30 (m, 4H), 8.53 (t, 2H), 9.78 (t, 2H).

rac- $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{Me}_2\text{dppz})](\text{PF}_6)$: 収率 38%. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 2.65 (s, 6H), 6.27 (d, 2H), 6.85 (t, 2H), 7.56 (d, 2H), 7.73 (d, 2H), 7.80 (d, 4H), 8.20-8.33 (m, 6H), 9.73 (d, 2H).

rac- $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{dppn})](\text{PF}_6)$: 収率 ^1H NMR (DMSO-d_6) δ (ppm): 6.30 (d, 2H), 6.98 (t, 2H), 7.07 (m, 4H), 7.70 (d, 2H), 7.81 (d, 2H), 7.92 (t, 2H), 7.98 (d, 2H), 8.20 (t, 2H), 8.30 (m, 4H), 8.47 (d, 2H),

9.26 (s, 2H), 9.75 (d, 2H).

2.2 X線結晶構造解析

rac-[Ir(ppy)₂(tpphz)](PF₆) ではアセトニトリル溶液をジエチルエーテル雰囲気下で数日放置することにより橙色の単結晶が得られた。結晶をガラスファイバー上に固定し、Rigaku Mercury CCD 単結晶自動X線構造解析装置で Mo-K α 線により -150°C で解析した。結晶構造解析の条件と得られた結晶データを Table 1 に示す。

Table 1 Crystallographic data for [Ir(ppy)₂(tpphz)](PF₆)

Empirical Formula	C ₄₆ H ₂₈ N ₈ F ₆ PIr	Z	4
formula weight	1029.96	D_{calc} (g cm ⁻³)	1.531
Temperature (°C)	-150.0	Absorption Coefficient (cm ⁻¹)	30.995
Wavelength	0.7107(Å)	$F(000)$	
Crystal size (mm)	0.45 x 0.25 x 0.15	Number of registered reflections	11957
Space group	P2 ₁ /a (#14)	Number of unique data (R_{int})	5327
Unit cell dimensions		Number of refined parameters	577
a (Å)	10.73(8)	R factor (all data)	0.139
b (Å)	5.9(3)	R_I factor [$I > 2.0 \sigma(I)$]	0.065
c (Å)	11.93(11)		
β (°)	103.8(2)		
V (Å ³)	4467(62)		

2.3 紫外可視スペクトル

子牛胸腺 DNA (*ct*-DNA, シグマ社製) を 70 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 30 mM NaCl) に溶解させ、超音波ホモナイザー (SONICS VCX-500) で約 300 塩基対ほどの断片に切断し、これを同じ緩衝液で適当に希釈して用いた。ルテニウム錯体も同様に 70 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 30 mM NaCl) に溶解させ 50 μM の溶液を調整した。イリジウム錯体はリン酸緩衝液に対する溶解度が低いことから、メタノールとの混合溶液 (70 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 30 mM NaCl) : メタノール = 7 : 3 (体積比)) に錯体を溶解させ 20 μM の溶液を調整した。

可視紫外吸収スペクトルは SHIMAZU UV-2400C スペクトロメーターにより 10 mm セルを用いて測定した。

2.4 蛍光測定

20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0, 30 mM NaCl) とメタノールの混合溶媒 (7:3) に錯体を 20 μM 溶解し、その後 *ct*-DNA を一定量ずつ添加し、それぞれの DNA 濃度において測定を行った。蛍光スペクトルは JOBIN YVON Instruments 製 Fluoro Max-2 を用いて、励起光波長 470 nm、温度 298 K において測定した。

2.5 ECL 測定 [11]

ECL の測定はマイクロテックニチオン社製、ECL-READER EL01 型を用いて測定した。また DNA 固定化電極による測定は以下のような手順で行った。

- ① 作用金電極表面の洗浄：ピランハ溶液 (30 %過酸化水素水 : 濃硫酸 = 1 : 3) を作用電極上に 5 μL のせ 1 分放置した後、電極に超純水を強めに掛け流して洗浄し、N₂ ガスを吹き付けて乾燥した。

- ② プローブ DNA の固定：還元 (DTT)・脱塩 (NAP5 カラム) した DNA 溶液を $10\text{ }\mu\text{M}$ に調製し、 98°C で 5 分間加熱してから 0°C で 5 分間急冷し、各作用極上に $5\text{ }\mu\text{L}$ のせた。この電極を湿度が飽和になっている容器内に、 60°C で 2.5 時間静置した。反応終了後、約 100 mL の洗浄液 (0.3M NaCl , 0.03M クエン酸ナトリウム) が入った密閉容器内に電極を投入し、10 分間振盪して洗浄し、 N_2 ガスを吹き付けて乾燥した。
- ③ ターゲット DNA のハイブリダイゼーションと錯体の挿入：還元 (DTT)・脱塩 (NAP5 カラム) したターゲット DNA 溶液を $0.01\sim 10\text{ }\mu\text{M}$ に調整した。錯体溶液 (ルテニウム錯体では $10\text{ }\mu\text{M}$, イリジウム錯体は $600\text{ }\mu\text{M}$) はそれぞれ紫外可視スペクトル測定で用いた溶媒を用いて調製した。調製した DNA 溶液と錯体溶液を混合し (1:1), 各作用極上に $5\text{ }\mu\text{L}$ のせた。湿度が飽和になっている容器内に、常温で 1.5 時間静置した。反応終了後、約 100 mL の洗浄液 (0.3M NaCl , 0.03M クエン酸ナトリウム) が入った密閉容器内に電極を投入し、10 分間振盪して洗浄し、乾燥せずに電解液を軽く流した。なお、ルテニウム錯体の測定では始めにターゲット DNA 溶液のみを作用電極上に乗せて 1 時間ハイブリダイゼーションを行い、電極を 10 倍に希釈した上記洗浄液にて洗浄後、錯体溶液を電極上に乗せて 30 分間挿入反応をおこなった。
- 以上のように調製した電極の作用極以外を N_2 ガスを吹き付けて乾燥してから作用極に電解液 (100 mM リン酸, 1 M 塩化ナトリウム, 100 mM トリプロピルアミン, $\text{pH } 8.6$) を $60\text{ }\mu\text{M}$ のせ、ECL を測定した。以降、発光強度とは $300\sim 650\text{ nm}$ の発光強度の積算値を指すものとする。なお、プローブ DNA としてはマイクロテック・ニチオン社から提供された $5'$ -SH 修飾, $\text{polyA}(10\text{mer})+30\text{mer}(5'-(\text{SH})\text{-aaaaaaaaaggcgacctggagcaaatccttaaaagtcgg-3'})$, ターゲット DNA としては (a) $5'\text{-ccgacttttaaggatttgctccaggtcgcc-3'}$ および (b) $5'\text{-ggcgacctggagcaaatccttaaaagtcgg-3'}$ を用いた。以後プローブとターゲット DNA が相補的な組み合わせ (a) を ds, 完全にミスマッチの組み合わせ (b) を ss と表示する。

3 結果と考察

3.1 *rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)](PF₆) の結晶構造

錯体構造と主な結合距離と結合角をそれぞれ Fig. 2 と Table 2 に示す。Ir(III) の配位構造は歪んだ 8 面体構造で、結晶中では Fig. 2 (b) に示したように Λ 体と Δ 体が大きな tpphz の芳香環分子面が $3.6\text{ }\text{\AA}$ 程度の距離で $\pi\text{-}\pi$ スタッキングし、二量体を形成している。このことから、この錯体は tpphz 部位で DNA 二重らせんにインターカレート型で結合することが容易に推定できる。

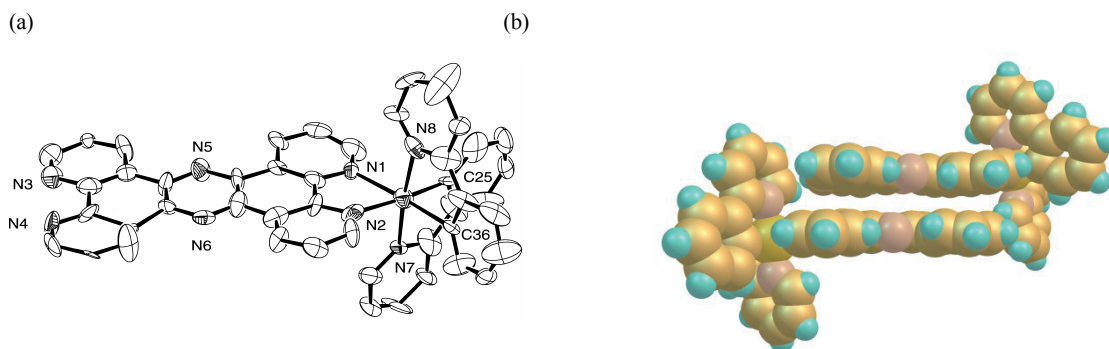


Fig. 2 (a) ORTEP view of $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{tpphz})](\text{PF}_6)$ and (b) the structure of Λ - Δ dimer in the crystal.

3.2 紫外可視スペクトル

Λ -[Ru(bpy)₂(tpphz)]Cl₂ および *rac*-[Ir(ppy)(tpphz)]Cl 溶液に *ct*-DNA 溶液を添加した時の紫外可視吸収スペクトルの変化を Fig. 3 (a), (b) に示す。それぞれ DNA 溶液の添加に伴い、吸光度の減少 (淡色効果) と吸収ピークの長波長シフトが観測されたが、*rac*-[Ir(ppy)(tpphz)] 錯体は等吸収点の無い複雑なスペク

Table 2 Bond lengths and angles of $[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{tpphz})](\text{PF}_6)$

Bond lengths (Å)					
Ir(1) - N(1)	2.173(10)	Ir(1) - N(2)	2.047(11)	Ir(1) - N(7)	2.007(8)
Ir(1) - N(8)	2.159(10)	Ir(1) - C(25)	1.980(12)	Ir(1) - C(36)	2.237(12)
Bond angles (°)					
N(1) - Ir(1) - N(2)	75.0(4)	N(1) - Ir(1) - N(7)	90.1(3)	N(1) - Ir(1) - N(8)	95.3(4)
N(1) - Ir(1) - C(25)	98.2(4)	N(1) - Ir(1) - C(36)	171.8(3)	N(2) - Ir(1) - N(7)	93.8(4)
N(2) - Ir(1) - N(8)	89.5(4)	N(2) - Ir(1) - C(25)	173.2(5)	N(2) - Ir(1) - C(36)	97.1(4)
N(7) - Ir(1) - N(8)	174.2(4)	N(7) - Ir(1) - C(25)	85.1(4)	N(7) - Ir(1) - C(36)	92.9(3)
N(8) - Ir(1) - C(25)	92.1(4)	N(8) - Ir(1) - C(36)	82.1(4)	C(25) - Ir(1) - C(36)	89.7(4)

トル変化を示した。これは DNA と錯体の結合が単一の平衡過程で進行していないことによるものである。今回合成された錯体について、それぞれの最大吸収波長における吸光度変化量を Bard の式 (1) を用いて、最小二乗法により解析し、結合定数 K_b 、サイトサイズ s を算出した [12,13]。ここで、 C_t は錯体の全濃度、 ε_A は各 DNA 濃度における錯体の見かけの吸光係数、 ε_B は DNA と結合した錯体の吸光係数、 ε_F は DNA に結合していない錯体の吸光係数、 $[\text{DNA}]$ は加えた DNA の塩基対濃度である。得られた結果をまとめて Table 3 に示す。

$$(\varepsilon_A - \varepsilon_F) / (\varepsilon_B - \varepsilon_F) = \left\{ b - (b^2 - 2K_b^2 C_t [\text{DNA}] / s)^{1/2} \right\} / (2K_b C_t) \quad (1)$$

$$b = 1 + K_b C_t + K_b [\text{DNA}] / 2s \quad (2)$$

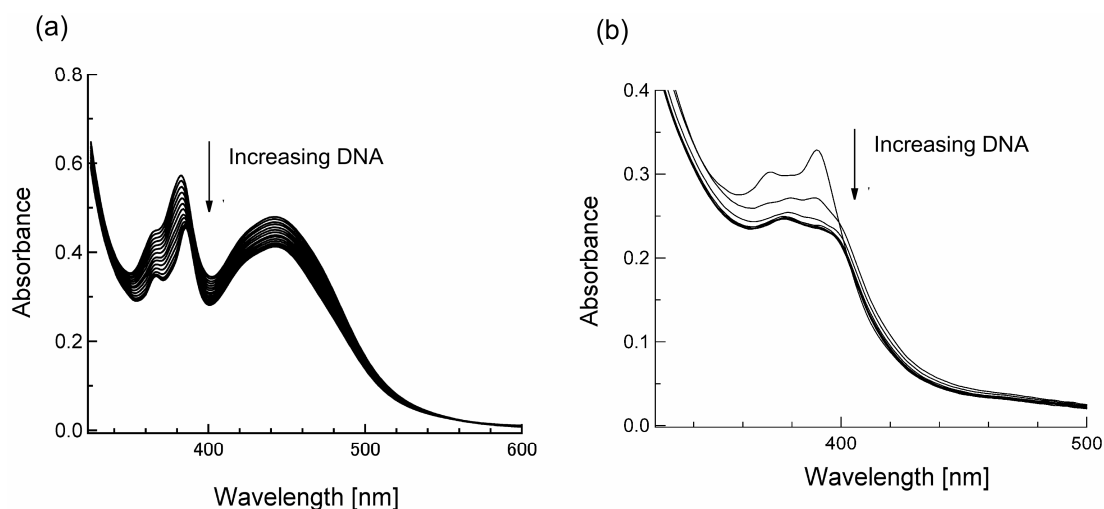


Fig. 3 Absorption spectra of the solution of (a) 50 μM Λ - $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})]\text{Cl}_2$ (70 mM phosphate buffer containing 30 mM NaCl, pH 7.0) and (b) 20 μM $[\text{Ir}(\text{ppy})(\text{tpphz})]\text{Cl}$ (20 mM phosphate buffer containing 30 mM NaCl, pH 7.0 : methanol=7 : 3). These spectra were collected with titration of DNA ([ct-DNA]: 0~90 μM -bp).

$[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})]^{2+}$ では Λ 体が Δ 体よりかなり大きな結合定数を持つが $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{tpphz})]^{2+}$ では逆の傾向が見られる。Barton 等は $[\text{Ru}(\text{phen})_3]^{2+}$ ではインターカレート結合のときは phen 部位と DNA 骨格との立体反発により、 Δ 体が優先すると結論付けているが、大きなインターカレート部位を有し、phen に比べて立体反発の少ない bpy 錯体では、結合親和性の立体特異性はまた異なった要因に支配されていることを示している [14,15]。 (1) 式は単一の結合平衡を仮定して誘導された式であるが、イリジウム錯体の場合、それ

Table 3 Binding constants (K_b) and site size (s).

complexes	$K_b \times 10^5$	s
Δ -[Ru(bpy) ₂ (tpphz)]Cl ₂	9.5	1.25
Λ -[Ru(bpy) ₂ (tpphz)]Cl ₂	33	1.30
Δ -[Ru(phen) ₂ (tpphz)]Cl ₂	120	1.00
Λ -[Ru(phen) ₂ (tpphz)]Cl ₂	5.5	1.30
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (tpphz)]Cl	14*	4.33*
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (dppz)]Cl	2.8	1.08
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (Me ₂ dppz)]Cl	2.0	0.53
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (dppn)]Cl	1.3	0.31

*The values calculated from fluorescence titration experiments

ぞれ 6 種類の立体異性体が考えられる。したがって、ここで求められた結合定数とサイトサイズはそれらの異性体の平均値と見なされる。イリジウム錯体の結合定数は対応するルテニウム錯体に比べて小さな値となったが、これは錯体の電荷の違いによる静電相互作用の差によるものと推定される。イリジウム錯体ではインターカレート部位の違いがとくにサイトサイズの違いに反映されている。サイトサイズ s が 1 より小さい値をとるものは、一つの塩基対に対して、一つ以上の錯体が結合することに対応し、錯体溶液に DNA を加えていく過程では、錯体と DNA との結合がインターカレート型の結合のみではなく、主溝内に錯体が会合して結合する様式などが無視できないことを示している。*rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl₂ は式 (1) へのフィッティングの誤差が大きく評価できなかったが、溶液内での錯体分子の二量体形成の影響も含めて、DNA への結合様式の複雑さを反映しているものと思われる。

3.3 蛍光スペクトル

一般に蛍光スペクトルは吸収スペクトルに比べて錯体濃度の低い領域で観測されるため、溶液内あるいは DNA 上での錯体の会合の影響が少ない。Fig. 4 に示したように *rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl の蛍光スペクトルは、*ct*-DNA の濃度の増加に伴い発光強度が大きく増大する。これは錯体の発光中心が極性の高い溶媒から疎水性の高い DNA 二重らせんに取り込まれたことにより発光量子収率が増大したことによるもので、インターカレート型結合に典型的な現象である。また、これらの一連の錯体はインターカレート部位である広い平面芳香環に窒素を有しており、バルク水溶液中では、これが水分子と水素結合するため、励起エネルギーが OH 伸縮振動により消費されてしまい、ほとんど発光しない。ところが、疎水性の高い塩基対間にインターカレーションすることで水分子と水素結合が出来なくなり、錯体は強く発光する。この現象は光スイッチング機能として広く知られている [16,17]。錯体の極大発光波長 608 nm における発光強度を I_A 、DNA と結合した錯体の発光強度を I_B 、DNA に結合していない錯体の発光強度を I_F として、(1) 式に示した Bard の式のそれぞれの吸光係数を相対発光強度に置き換えることにより、DNA 濃度と蛍光強度の変化から、結合定数とサイトサイズを算出できる。その結果、 $K_b = 1.4 \times 10^6$ 、サイトサイズ $s = 4.33$ となった。可視紫外スペクトルから求められた他の錯体のサイトサイズに比べて比較的大きな値が得られたが、これは蛍光スペクトルにインターカレート型結合によるもののみの発光が観測され、会合型の錯体種の寄与が無視できたためと推定される。

3.4 ECL 発光強度

プローブ DNA 固定化電極を用いて Δ 体と Λ 体および *rac*-[Ru(bpy)₂(tpphz)]Cl₂ と *rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl の ECL 発光強度のターゲット DNA 濃度依存性を Fig. 5 と Fig. 6 に示す。またその他のルテニウム錯体とイリジウム錯体の測定結果を Table 4 にまとめて示す。[Ru(bpy)₂(tpphz)] の Λ 体ではターゲット DNA

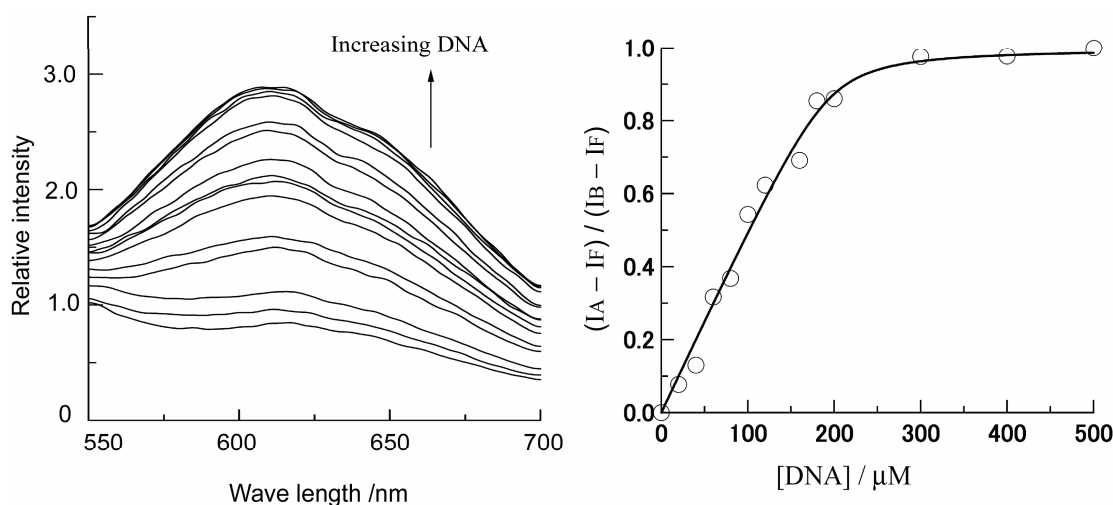


Fig. 4 (a) Emission spectra of the solution of 20 mM *rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl (20 mM phosphate buffer containing 30 mM NaCl, pH 7.0 : methanol=7 : 3) collected by the addition of DNA ([*ct*-DNA]: 0–500 μ M-bp) and (b) fitting curve for the plots of the emission intensities at 608 nm using Bard's equation (1). Excitation wavelength: 390 nm.

濃度が 0.1 μ M でも ss-DNA 存在下と ds-DNA 存在下の発光強度に顕著な違い ($ds/ss = 4.09$) が見られるが、 Δ 体ではターゲット DNA 濃度 1 μ M 以上で、またラセミ体では 10 μ M 以上で ss-DNA と ds-DNA の発光強度に差が生じた。このように [Ru(bpy)₂(tpphz)]Cl₂ の固定化電極における発光強度測定では、光学分割することによって ds-DNA 検出感度が異なることが明らかとなった。一方、[Ru(phen)₂(tpphz)]Cl₂ では ss-DNA、ds-DNA の間に顕著な差が見られるのは、ターゲット DNA 濃度が Δ 体で 1 μ M 以上、 Λ 体では 10 μ M 以上で、全体的に ds の識別能が [Ru(bpy)₂(tpphz)] 錯体比べて低下し、また Δ 体と Λ 体の序列が逆転している。このような Δ 体、 Λ 体間での発光強度の差異について、錯体の結合定数との一様な相関が確認されたが、より大きな結合定数を持つ Δ -[Ru(phen)₂(tpphz)]Cl₂ の ds/ss 値が低濃度で大きくならないことから、単に結合定数が多いことが識別能の向上につながるとも言えないことが判った。

同様な傾向がイリジウム錯体でも確認された。*rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl は蛍光スペクトルから見積もられた結合定数が Λ -[Ru(bpy)₂(tpphz)]Cl₂ に比べて小さいが、ターゲット DNA 濃度が 0.1 μ M における ds-DNA 識別能はより高いことがわかった ($ds/ss = 5.68$)。1 価の正電荷を有するイリジウム錯体は、2 価の正電荷を有するルテニウム錯体より、プローブ DNA の骨格中の負電荷を有するリン酸基に非特異的に結合しにくいと考えられる。よって当実験において、ルテニウム錯体溶液 (10 μ M) より遥かに濃い濃度のイリジウム錯体溶液 (600 μ M) を用いているが、これらの ss の値は比較的強く抑えられている。そのため、ターゲット DNA 濃度が 10 μ M において、一連の系の中で最も高い ds/ss 値を得た ($ds/ss = 21.32$)。

また、イリジウム錯体においてもインターカレート部位の構造と ds/ss 値に相関が確認された。*rac*-[Ir(ppy)₂(dppz)]Cl では、発光強度差がターゲット DNA 濃度 10 μ M で幾分見られるものの、その発光強度は全体的に小さかった。[Ir(ppy)₂(Me₂dppz)]Cl でも同様に発光強度が小さく、測定したターゲット DNA 濃度の範囲では *rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)] のように ds/ss 値に有意な差異が確認されなかった。*rac*-[Ir(ppy)₂(dppn)]Cl では、ターゲット DNA 濃度が 10 μ M で ds と ss にある一定の強度差を観測したが、*rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl に比べると ds 識別能は著しく低かった。

4 今後の課題

今回、もっとも ds 検出感度が高かったのは *rac*-[Ir(ppy)₂(tpphz)]Cl でおよそ 250 fmol(塩基対単位) である。実際に臨床検査で用いられる微量試料を直接検定するには 1 amol (10^{-18} mol) 程度の感度が必要である

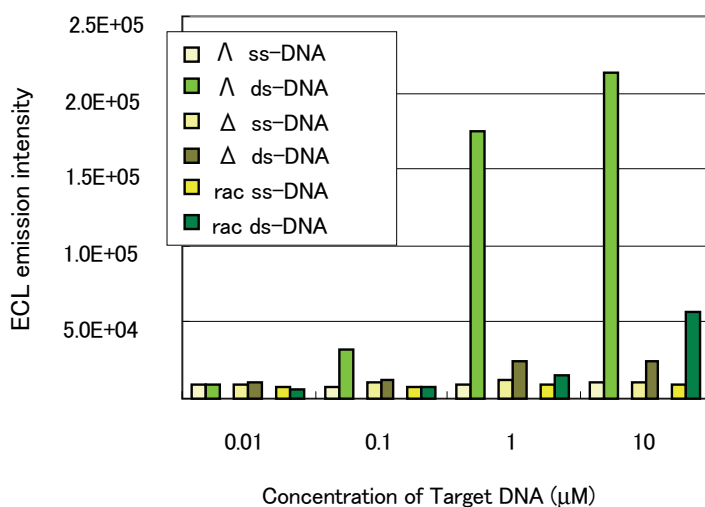


Fig. 5 ECL emission intensity of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{tpphz})]\text{Cl}_2$.

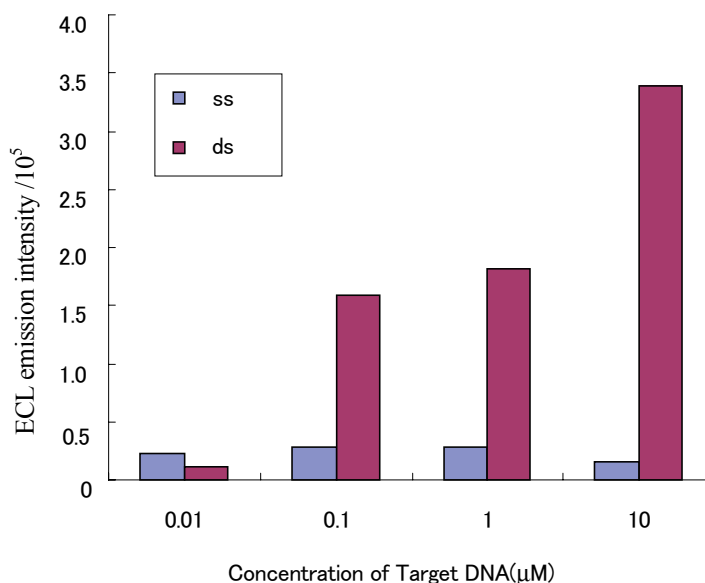


Fig. 6 ECL emission intensity of $\text{rac-}[\text{Ir}(\text{ppy})_2(\text{tpphz})]\text{Cl}$.

とされており、今回の条件では PCR 法などの補助的な手段で DNA を増幅する必要がある。これまでの実験結果からは、ECL による DNA 二重鎖の検出感度をさらに向上させるには錯体の DNA 結合親和性を高めるだけではなく、光スイッチング効率が高く、ss で観測される ECL 発光のバックグラウンドをできるだけ減少させることが重要であることが明らかとなった。このためには金電極に対する錯体の非特異的吸着が少なく、またできるだけ洗浄効率が高い錯体の開発が望まれる。今回は DNA を電極に固定化した後、メルカプトエタノールで DNA 未固定部分を被覆して非特異的吸着の除去と洗浄効率の向上を試みたが、ECL 発光強度が著しく減少し期待した効果は得られなかった。DNA 固定電極の表面処理によるバックグラウンドの減少も重要な課題である。本実験においては発光強度が小さく DNA 濃度に応じてスムーズに変化せず不規則な変化を示した場合は 2 回以上測定し、できるだけ連続的な変化を示すデータを採用した。このようなデータのばらつきは用いた金電極表面の不均一性によるものと推定され、これらの改善も重要である。

Table 4 Dependence of ECL emission intensity on target DNA concentration and ds/ss values.

	ターゲット DNA (μM)	0.01	0.1	1	10
Δ -[Ru(bpy) ₂ (tpphz)]Cl ₂	ss	8.46×10^3	1.09×10^4	1.20×10^4	1.05×10^4
	ds	1.01×10^4	1.26×10^4	2.43×10^4	2.50×10^4
	ds/ss	1.19	1.16	2.01	2.38
Λ -[Ru(bpy) ₂ (tpphz)]Cl ₂	ss	8.62×10^3	7.91×10^3	9.32×10^3	1.01×10^4
	ds	9.84×10^3	3.24×10^4	1.75×10^5	2.13×10^5
	ds/ss	1.14	4.09	18.77	21.09
Δ -[Ru(phen) ₂ (tpphz)]Cl ₂	ss	7.25×10^3	8.23×10^3	6.28×10^3	5.97×10^3
	ds	8.41×10^3	9.11×10^3	2.00×10^4	6.34×10^4
	ds/ss	1.16	1.11	3.18	10.62
Λ -[Ru(phen) ₂ (tpphz)]Cl ₂	ss	6.33×10^3	6.89×10^3	6.04×10^3	6.69×10^3
	ds	6.19×10^3	1.06×10^4	5.40×10^3	1.17×10^5
	ds/ss	0.98	1.54	0.89	17.49
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (tpphz)]Cl	ss	2.31×10^4	2.80×10^4	2.84×10^4	1.59×10^4
	ds	1.09×10^4	1.59×10^5	1.82×10^5	3.39×10^5
	ds/ss	0.47	5.68	6.41	21.32
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (dppz)]Cl	ss	0.88×10^3	0.70×10^3	8.86×10^3	7.75×10^3
	ds	0.37×10^3	1.00×10^3	1.20×10^4	1.44×10^4
	ds/ss	0.42	1.43	1.35	1.86
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (Me ₂ dppz)]Cl	ss	0.50×10^3	2.11×10^3	1.74×10^4	6.32×10^3
	ds	1.03×10^3	2.17×10^3	2.03×10^4	1.10×10^4
	ds/ss	2.06	1.03	1.17	1.74
<i>rac</i> -[Ir(ppy) ₂ (dppn)]Cl	ss	3.55×10^3	2.99×10^3	2.93×10^4	1.97×10^4
	ds	1.99×10^3	4.80×10^3	3.76×10^4	5.17×10^4
	ds/ss	0.56	1.61	1.28	2.62

また、本研究で用いた ECL 測定装置は光電子倍增管で ECL 発光を検出しているが、検出の最大感度の波長 (400 nm) はこれらの錯体の ECL 発光の最大発光波長 (ルテニウム錯体: 630–640 nm 付近, イリジウム錯体: 610 nm 付近) にくらべて大分短波長側にある。したがって、より短波長側に ECL 発光を持つ錯体の開発も今後の検出感度の向上に重要な課題となる。

謝辞

本研究において ECL 測定装置を提供し、DNA 固定化電極での測定を援助していただいたマイクロテック・ニチオン社社長本田周氏と主任研究員の秋元克美氏に感謝いたします。また X 線結晶解析でご援助をいただいた石井洋一教授、本研究の初期に応用化学科生物錯体化学研究室において関連した研究を行った西田聡子氏と小林忠一氏に感謝します。

参考文献

- [1] International Human Genome Sequencing Consortium, “*Initial sequencing and analysis of the human genome*”, Nature, **409**, 860–921 (2001).
- [2] J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. Q. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, and R. A. Holt. et al., “*The sequence of the human genome*”, Science,

- 291, 1304–1351 (2001).
- [3] G. S. Ginsburg, and J. J. McCarthy, “*Personalized medicine: revolutionizing drug discovery and patient care*”, *TRENDS Biotech.* **19**, 491–496 (2001).
- [4] P. O. Brown, and D. Botstein, “*Exploring the new world of the genome with microarrays*”, *Nat. genet.*, **21**, 33–37 (1999).
- [5] C. M. Niemeyer, and D. Blohm, “*DNA microarrays*”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2865–2869 (1999).
- [6] M. Inoue, R. Ikeda, M. Takase, T. Tsuru, and J. Chiba, “*Single-nucleotide polymorphism detection with “wire-like” DNA probes that display quasi “on-off” digital action*”, *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **102**, 11606–11610 (2005).
- [7] Richter, M. M., *Electrochemiluminescence (ECL)*, *Chem. Rev.* **104**, 3003–3036 (2004).
- [8] Bolger, J., Gourdon, A., Ishow, E., Launay, J.-P., “*Mononuclear and BinuclearTetrapyrido[3,2-a:2′,3′-c:3′,2′-h:2′′,3′′-j]phenazine (tpphz) Ruthenium and Osmium Complexes*”, *Inorganic Chemistry* **35**(10), 2937–2944 (1996).
- [9] Lowry, M. S., Hudson, W. R., Pascal Jr., R. A., Bernhart, S. J., “*Accelerated Luminophore Discovery through Combinatorial Synthesis*”, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14129–14135 (2004).
- [10] C. Hiort, P. Lincoln, and B. Norden, “*DNA binding of Δ and Λ -[Ru(phen)₂DPPZ]²⁺*”, *J. am. Chem. Soc.*, **115**, 3448–3454 (1993).
- [11] J. I. Kim, I.-S. Shin, H. Kim, and J.-K. Lee, “*Efficient electrogenerated chemiluminescence from cyclometalated iridium(III) complexes*”, *J. am. Chem. Soc.*, **127**, 1614–1615 (2005).
- [12] Carter, M. T., Rodriguez, M., Bard, A. J., “*Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2′-bipyridine*”, *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8901–8911 (1989).
- [13] Herebian, D., Sheldrick, W. S., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 966–974 (2002).
- [14] Barton, J. K., “*Metals and DNA: Molecular Left-Handed Complements*”, *Science* **233**, 727–734 (1986)
- [15] Liu, J. G., Ye, B. H, Zhang, Q. L., Zou, X. H., Zhen, Q. X., Ji, L. N., “*Enantiomeric ruthenium(II) complexes binding to DNA binding modes and enantioselectivity*”, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, **5**, 119–128 (2000).
- [16] R. M. Hartshorn, and J. K. Barton, “*Novel dipyridophenazine complexes of ruthenium(II): Exploring luminescent reporters of DNA*”, *J. am. Chem. Soc.*, **114**, 5919–8914 (1992).
- [17] K. E. Erkkila, D. T. Odom, and J. K. Barton, “*Recognition and reaction of metallointercalators with DNA*”, *Chem. Rev.*, **99**, 2777–3036 (1999).