

# 光スイッチング機能を有するインターカレーター型ルテニウム錯体による二本鎖DNA検出

## Detection of Double Stranded DNA by Intercalation of Ruthenium (II) Complexes with Light Switching Function on Electrochemiluminescence

応用化学専攻 櫻田 伸一  
SAKURADA Shinichi

インターカレート部位を有するルテニウム錯体を用いた電気化学発光により、二本鎖DNAの検出を試みた。その結果、フェナジン部位を有する錯体は、光スイッチング機能を有し、ターゲットDNAの検出限界が2.3 ngとなり、検出試薬としての有用性を示した。また、Ru(bpy)<sub>3</sub>誘導体である白金インターカレーターを有するRu錯体の合成に成功し、蛍光・ECLにおいて、DNA共存下で発光強度が増加することを示した。

### 1. 緒言

DNAチップは、塩基配列を迅速に解読できるため、テーラーメイド医療において大きな地位を占めている。その際、重要な役割を果たしているのが発光試薬である。芳香族アミンを有する様々なルテニウム錯体は電気化学発光を示すことが知られており、本研究では二本鎖DNA(ds-DNA)を識別し光スイッチング機能を持つフェナジン部位を有するインターカレーター型Ru錯体(1)<sup>1)</sup>を用いて、電気化学発光(ECL)強度の差よりds-DNAの検出を試みた。この検出法を利用することにより診断用DNAチップにおいての低価格で迅速な検出が期待される。また、DNAに対して有機物よりも強くインターカレート型で結合する白金錯体を発光部位のRu錯体と結合させた白金-ルテニウム

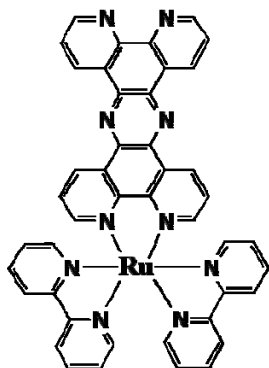


Fig. 1 Structure of cation part of 1.

三核錯体(2)を合成した。これらの錯体を用いてDNAへの結合親和性並びに電気化学発光を測定し、検出試薬としての有用性を検討した。

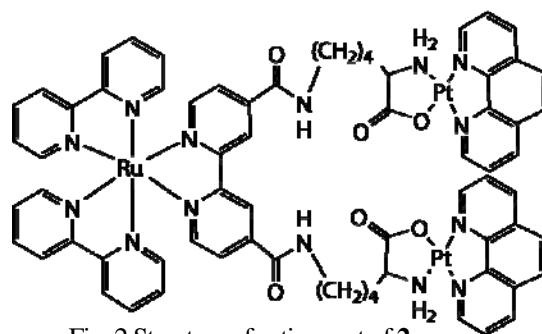


Fig. 2 Structure of cation part of 2.

### 2. 実験

#### Calf thymus DNA (ct-DNA)と錯体2との親和性

10 μM 錯体2溶液にct-DNA (20 mM リン酸緩衝溶液, 30 mM NaCl)を添加していったときのUV-vis スペクトル変化, ct-DNA 30 μMに錯体2溶液を添加していったときのCD スペクトル変化について解析を行った。

#### ECL発光強度測定 (均一系)

DNAchip reader (マイクロテック・ニチオン社製)を用い、発光強度測定を下記の条件で行った。

・DNA溶液: 50 mMトリプロピルアミンを含む70 mMリン酸緩衝液 (pH = 7.0, 30 mM NaCl)にDNA(10<sup>-3</sup>~10<sup>2</sup> μM)と錯体 (1, 10 μM)

・測定条件: 測定時間 3 s, CV, 設定電圧 0~1500 mV, 掃引速度 3 V/s

## DNA固定化電極 (不均一系)

次の DNA を用いて電極上に固定し、ハイブリダイゼーションさせた後、発光強度を測定した。

・電解液: 100 mM トリプロピルアミンを含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH = 8.5)

・測定条件: 測定時間 3 s, CA, 設定電圧 1500 mV

・DNA の種類

*Legionella pneumophila* における 16S Ribosomal RNA 遺伝子種特異的な領域由来の 30mer オリゴ DNA (5'-SH 修飾, polyA (10mer) +30mer) をプローブとして用いた。ターゲット DNA (30mer)

## 蛍光測定

1  $\mu$ M 錯体 **2** 溶液に ct-DNA (20 mM リン酸緩衝溶液, 30 mM NaCl) を添加していったときの蛍光スペクトルを測定した。  $\lambda_{ex}$  (nm) = 464 nm

## 3. 結果・考察

### Calf thymus DNA (ct-DNA) と錯体 **2** との親和性

ct-DNA を添加していった時の錯体 **2** の UV-vis スペクトルを測定した。その結果、280 nm 付近の phen 部位の  $\pi$ - $\pi^*$  由来の吸収ピーク、470 nm 前後の Ru 側の MLCT 由来の吸収ピークは、共にレッドシフトおよび淡色効果が観測された。このような変化は、インターカレート型で DNA に結合する小分子の特徴であることから、錯体 **2** は DNA に対し、インターカレート型で結合していると考えられ

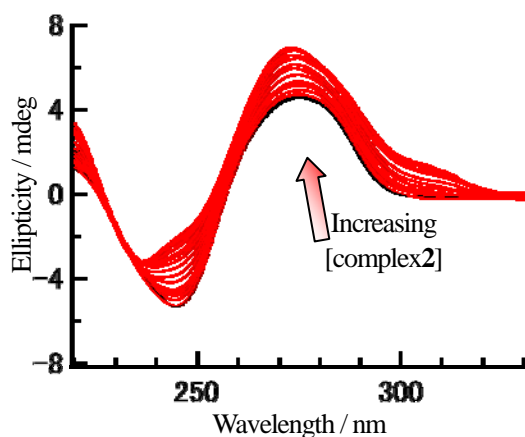


Fig. 3 CD spectra for the titration of **2** to the ct-DNA ([DNA] = 30  $\mu$ M).

る。しかし、DNA 濃度変化に伴い、複数の等吸収点を持つため、UV-vis 測定からは、結合定数  $K_b$  は算出できなかった。これは、錯体 **2** 自体の UV スペクトルは、DNA 増加に伴い、phen 部位の分子内スタッキングの解離、複数インターカレートモードによって変化するためと考えられる。そこで、ct-DNA に錯体を添加した時の DNA の CD スペクトル変化から  $K_b$ 、サイトサイズ  $s$  を算出した<sup>2)</sup> (Table 1)。その際のスペクトル変化を Fig. 3 に示す。

Table 1 Binding parameters of Pt complexes

Complex	$K_b/10^6 (M^{-1})$	$s$
Pt(phen)Lys	0.93	2.6
4,4'-{Pt(phen)-LysH}-NHCO <sub>2</sub> bpy	4.2	6.3
Complex <b>2</b>	90	4.9

錯体 **2** は、単核インターカレーターである Pt(phen)Lys や、その単核構造を 2 箇所有する 4,4'-{Pt(phen)-LysH}-NHCO<sub>2</sub>bpy に比べ、非常に強く DNA に結合していることがわかる。このような結合定数の増加は、インターカレート部位を 2 箇所有することによる疎水性相互作用の増加、および、4 価のカチオン分子であることによる静電的相互作用の増加に起因すると推測される。

## 蛍光測定

錯体 **2** のアセトニトリル中および、DNA を含むリン酸緩衝液中での蛍光スペクトルを測定した。その結果を Fig. 4 に示す。

錯体 **2** はアセトニトリル中で、同濃度の Ru(bpy)<sub>3</sub> に対して約 3 分の 2 の発光量を示した。このことから、錯体 **2** は白金-ルテニウム間での大きな電荷移動などは起こらずルテニウム部位での発光を可能していると考えられる。

また、白金部位とルテニウム部位をアミド結合で結んでいる錯体は、DNA 添加にともない発光強度が倍増することが報告されている<sup>3)</sup>。錯体 **2** も、DNA 添加に伴い、発光強度が増大していった。このことから、光スイッチングのような機能を有していることが示された。

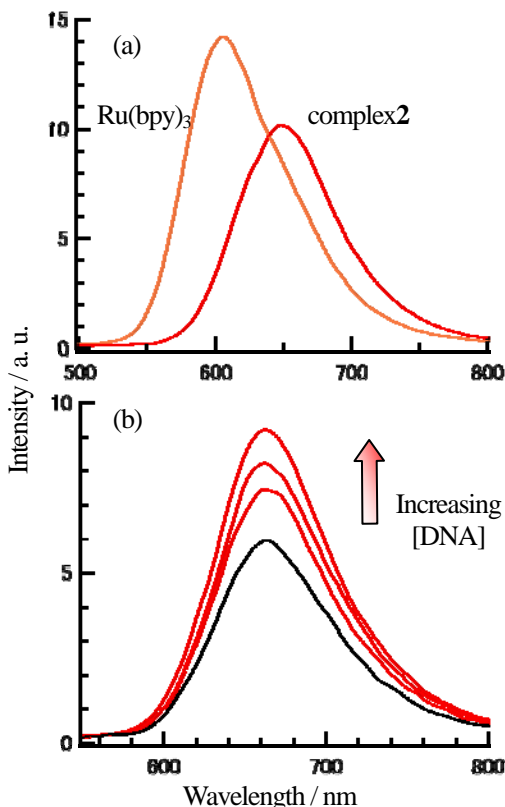


Fig. 4 (a)Emission spectra of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3 \cdot (\text{PF}_6)_2$  and  $2 \cdot (\text{PF}_6)_4$  (10  $\mu\text{M}$ ) in acetonitrile at 298 K,  $\lambda_{\text{ex}}$  450, 464 nm (b)Emission spectra of  $2 \cdot \text{Cl}_4$  (10  $\mu\text{M}$ ) in 20 mM phosphate buffer containing 30 mM NaCl (pH 7.0) at 298 K in the presence of 0, 5, 50 and 500  $\mu\text{M}$  ct-DNA,  $\lambda_{\text{ex}}$  470 nm.

### 錯体濃度変化におけるECL発光強度

錯体 **1**, **2** の濃度を変化させたときの発光強度変化を Fig. 5 に示す。

$\text{Ru}(\text{bpy})_3$  は、低濃度においても比較的大きな発光強度を示すが、錯体 **1**, **2** では発光強度が著しく減少する。錯体 **1**, **2** は光化学発光において、水溶液中では消光し非水溶液中では発光するという

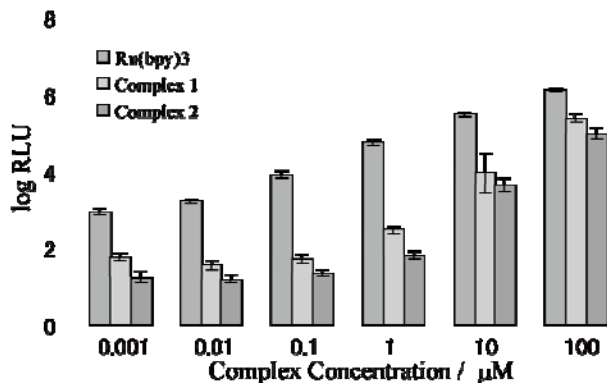


Fig. 5 RLU for the titration of the ruthenium complexes. 特性を持つことが知られており、電気化学発光においても水による消光が起こっていると考えら

れる。

### ECL発光強度のds-DNA濃度依存性

二本鎖DNA(ds-DNA)共存下での錯体 **1**, **2**, および  $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  の発光強度を測定した。DNA存在下での錯体の発光強度を、錯体だけの発光強度で割った発光強度比を算出した。その結果、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  は ds-DNAの有無による発光強度変化はあまり観測されなかった。一方、錯体 **1**, は ds-DNAが錯体濃度よりも低いと、 $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  と同様に発光強度変化は観測されなかったが、 $[\text{ds-DNA}]/[\text{Ru}] = 5$  以上では、著しく発光強度が増加した。したがって、錯体 **1** は ds-DNAの有無による発光のスイッチングができることを示した。また錯体 **2** は、 $[\text{ds-DNA}]/[\text{Ru}] = 50$  で発光強度が倍増した。

以上より、水による消光の影響が少なく、グループに結合する  $\text{Ru}(\text{bpy})_3$  では ds-DNAの有無による特異的発光は起こらず、若干の発光強度比の変化しか得られなかった。それに対して、水により消光する錯体 **1** は、ds-DNAにインターカレート型で結合することにより発光し、光スイッチング機能を有していることが証明できた。また、錯体 **2** では蛍光測定と同様な結果を得た。

### DNA固定化電極における錯体 **1** のECL発光強度

10  $\mu\text{M}$  のプローブ DNA を金電極上に固定化し、ターゲット DNA の濃度変化による錯体 **1** の発光強度変化を Fig. 6 に示す。以前は CV を用い、発光強度最大値を用いて評価していたが、電圧を一定に設定したことにより、錯体を連続発光させることが可能になった。そのため、発光強度積分値を取ることができ、その結果、再現性や S/N 比が向上した。

錯体 **1** の ds-DNA 形成電極上での発光は、ss-DNA 上での発光に比べて著しく大きな発光強度を示した。このことより、均一系の場合と同様に ds-DNA の有無による光スイッチング機能を示していると考えられる。さらに、連続発光することにより、ss-, ds-DNA 間で発光パターンの違いが見られた。ss-DNA 上の発光では、電圧をかけた直後に最大発光強度を示し、その後、指数関数的に減光していく。しかし、ds-DNA 上の発光では、

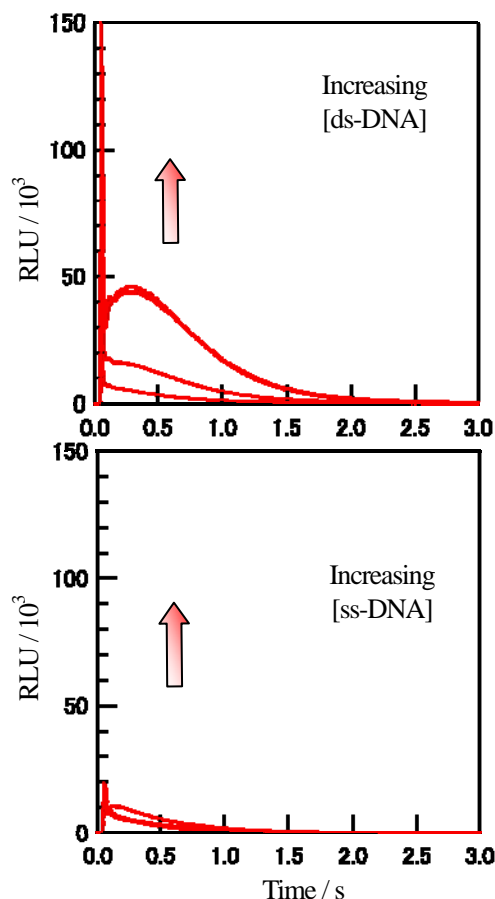


Fig. 6 Change in RLU on titration of target DNA with probe DNA [10 $\mu$ M].

ss-DNA 上と同様に、電圧をかけた直後に最大発光強度を示し減光するが、再び発光した後、指数関数的に減光していく。この実験系の場合、電解液として錯体溶液を用いて発光強度測定をしていないため、発光に係わる錯体は、電極 DNA 上に吸着した錯体のみとなり、バルクの液体に錯体は含まれていないと考えられる。錯体**1**の場合、DNA に共有結合してないので、電解液に浸した時点で平衡が成り立ち、DNA から脱離していく方向に平衡が傾き、脱離した錯体は拡散していく。このことから最大発光後に指数関数的に減光していくと考えられる。しかし、トリプロピルアミンを用いた電気化学発光過程には複数の過程が存在するため、最大発光時で優先されていた過程と異なる過程が2次発光時に主過程になり、2次発光が観測されたと考えられる。また、ds-DNA 上でのみ、このような現象が観測された理由は、錯体**1**は ds-DNA 塩基対間に挿入されており、安

定度、疎水的環境、隣接錯体間距離すべてにおいて、非特異的に吸着している ss-DNA に比べ発光する条件に適しているためと考えられる。他実験において、固定化された DNA は、発光に伴い、金電極からの脱離を観測している。そのため、2次発光は一時的発光にとどまり DNA の拡散に伴い、指数関数的に減光していくと考えられる。また、S/N 比、発光パターンより錯体**1**のターゲット DNA 検出感度は 2.3 ng (250 fmol) と評価した。

#### 4. 結言

錯体**1**は、電気化学発光においても光スイッチング機能を有し、DNA 固定化電極上で特有の発光パターンを持つことを明らかにした。これにより、target DNA 検出に発光強度のみならず、発光パターンを用いることにより、結果の信頼性を向上させた。錯体**2**は DNA に対し非常に強い結合力をもち、蛍光・ECL において、DNA の共存下での発光強度が倍増する特性を示した。

#### <参考文献>

- (1) J. Bolger, A. Gourdon, E. Ishow, J. -P. Launay, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2937-2944
- (2) A. Inase, T. S. Kodama, J. Sharif, Y. Xu, H. Ayame, H. Sugiyama, and S. Iwai *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11017-11023
- (3) K. Sakai, H. Ozawa, H. Yamada, T. Tsubomura, M. Hara, A. Higuchi and M. Haga *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2006**, 3300-3305

#### <発表・業績>

- (1) 日本化学会第 85 春季年会 (横浜)
- (2) 12th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (Ann Arbor, USA)
- (3) 第 55 回錯体化学討論会 (新潟)
- (4) 第 56 回錯体化学討論会 (広島)
- (5) 「遺伝子の電気化学的検出方法」  
特許出願済

#### <協賛>

マイクロテック・ニチオン社