

識別番号 P3

2012 年度完了学内共同研究

研究課題 ルテニウム錯体と生体分子との相互作用

研究代表者 長尾宏隆 (理工学部物質生命理工学科)

共同研究者 神澤信行 (理工学部物質生命理工学科)

Summary We have been investigating syntheses and reactions of ruthenium complexes to develop new functional compounds. Water-soluble ruthenium complexes bearing pyridyl- and carboxyl-containing ligands were synthesized and characterized. Interactions of ruthenium complexes with cells and biomolecules were studied by biological methods.

## 1. 研究の目的及び背景

遷移金属錯体はさまざまな分野において重要な役割を担い、それらの特徴を生かした機能創製を目指した研究が行われている。生体内における極微量の金属を含む化合物が関与する生体内反応が知られ、このような現象を研究する生物無機化学として発展している。生体分子に対して特異的な相互作用を示す生物活性金属錯体と呼ばれ、これらの開発は重要な課題のひとつである。これらの生物活性金属錯体が関与する生体内反応の理解やこれを模倣した新たな反応構築に関する研究が精力的に行われている。最近では抗腫瘍や制腫瘍性を有する金属錯体の研究が行われるようになり、金属錯体の生体分子への結合やインターカレーションなどに興味を持たれるようになってきた。我々はこれまでに多くの金属錯体を合成し、これらを利用した反応の開発を行っている。生体分子との相互作用を検討し、これらの結果を系統的に整理することにより新たな生物活性金属錯体の創製および特性を生かした医薬品やバイオセンサーとして展開することを目的としている。

## 2. 研究の方法・内容

生物活性金属錯体の創製を目的として、中心金属にルテニウムを用いて生体分子との相互作用を示す遷移金属錯体の合成と生物活性の評価法の確立を行った。

### (1) ルテニウム錯体の合成と性質

水溶性の高い配位子としてカルボン酸基を有する 2,6-ピリジンジカルボン酸 (pydcH<sub>2</sub>) およびメチル (ピリジルメチル) アミノ酢酸 (mpyaH) を用いてルテニウム錯体 ([RuXYZ(L)]<sup>m</sup>) を合成した。電荷の異なる錯体を合成するため、共存配位子 X, Y, Z の電荷や性質を考慮した。合成した錯体の水溶液中での安定性、溶液中に共存する化合物 (配位子) との置換反応などを電気化学および分光学的手法を用いて検討した。

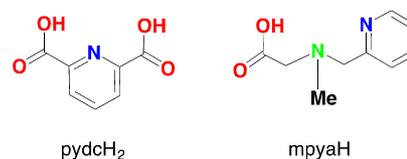


図1 支持配位子の構造

### (2) ルテニウム錯体の生物活性の評価

ルテニウム錯体と生体分子との相互作用は、正常および腫瘍細胞に対する毒性評価と DNA への結合性評価について行った。ルテニウム錯体存在下での細胞培養と DNA 形状の変化について検討した。

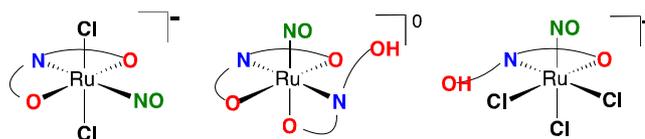
## 3. 研究の成果

### (1) ルテニウム錯体の合成と性質

#### 2,6-ピリジンジカルボン酸ルテニウム錯体の合成

2,6-ピリジンジカルボン酸と一酸化窒素 (ニトロシル; NO) を有する K<sub>2</sub>[RuCl<sub>5</sub>(NO)] との反応では、配位様式の異なる 3 種の錯体を合成した。2,6-ピリジンジカルボン酸イオンは 2 座 ( $\kappa^2$ 型) あるいは 3 座 ( $\kappa^3$ 型) 配位子としてルテニウム錯体に配位することがわかった (図 2)。3 種の錯体の構造を決定し、ニトロシル配位子をプローブとして錯体の性質について分光、電気化学的手法により検討した。錯体の電荷と電子状態には相関が見られた。

細胞に対する錯体の相互作用を系統的に評価するために、錯体の電荷と生物活性の相関を検討することが必要である。 $\kappa^3$ 型配位の錯体では支持配位子が2価陰イオンであることからRu(III)状態が安定である。クロリドイオンの配位が強く、支持配位子のピリジル基に対してトランス位にある共存配位子の種類を変化することができた(図3



3座配位( $\kappa^3$ )      3, 2座配位( $\kappa^3, \kappa^2$ )      2座配位( $\kappa^2$ )  
 図2 2,6-ピリジンジカルボン酸錯体の構造

左; X = Cl, H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, py, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, NH<sub>3</sub>など)。共存配位子Xは室温において容易に置換することができ、この電気的な性質により中心金属の酸化還元電位が変化する。これらの錯体は陰イオン性のルテニウム錯体であるため、中性あるいは陽イオン性の錯体を合成するため、Ru(II)状態を安定化することが考えられる $\pi$ -受容性2,2'-ビピリジン(bpy)を導入した。これらにより期待通りの電荷を有する錯体の合成が可能になる。

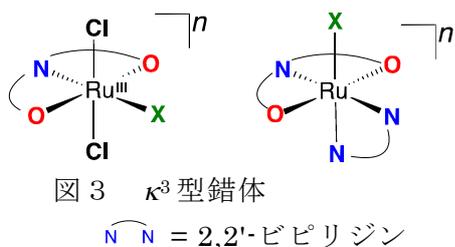
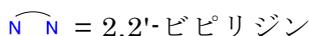


図3  $\kappa^3$ 型錯体



### メチル(ピリジルメチル)アミノ酢酸の合成と錯形成

これまでに2種類の配位様式が可能な対称中性三座配位子としてビスピリジルアミンを支持配位子とするルテニウム錯体を合成してきた。本研究では生物活性金属錯体の合成のため一つのピリジル基をカルボキシル基に変えたメチル(ピリジルメチル)アミノ酢酸(mpyaH)を合成した。ルテニウム錯体では、1価陰イオンとしてmpya配位子は*fac*型に配位していた(図4; X = NO, Cl)。

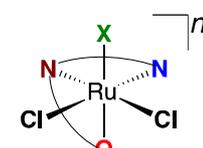


図4 mpya 錯体の構造

### (2) ルテニウム錯体の生物活性の評価

生物活性金属錯体を創製するために、細胞に対する毒性とDNAに対する相互作用の2つの段階に分けて評価を行う。

細胞に対する評価では正常細胞と腫瘍細胞にルテニウム錯体を曝露し、細胞の増殖について観察を行う。細胞の培養地にルテニウム錯体溶液を添加し、数日間細胞の培養を行った。培地交換後、MTT試薬を添加・4時間インキュベートし、550 nmの吸光度測定することにより細胞数をコントロールと比較することにより求めた。これにより用いた錯体の細胞に対する毒性を評価することができる。光悪性腫瘍剤として知られているシスプラチンを比較のため用いた。ルテニウム錯体の細胞増殖抑制効果を観測した。

DNAに対する相互作用では、pUC118DNAを用いて、ルテニウム錯体を添加した溶液をアガロース電気泳動により移動度変化を測定した。

評価を行うために、これまでにDNAとの相互作用が報告されている類似の錯体との比較が必要である。

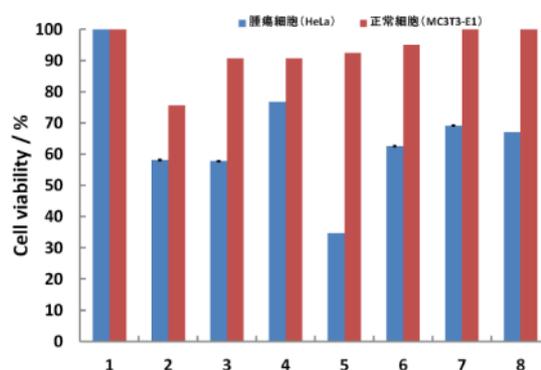


図5 MTT試験による生育率

1: control、2~4: (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>N[Ru(*k*<sup>3</sup>-pydc)Cl<sub>2</sub>(NO)] (500, 50, 5  $\mu$ M)、5~7: (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>N-[Ru(*k*<sup>3</sup>-pydc)Cl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)] (200, 20, 2  $\mu$ M)、8 シスプラチン[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (0.37  $\mu$ M)

### 4. 今後の展望

ルテニウム錯体の細胞毒性評価を系統的に評価するため、水溶性の高い錯体電荷が異なる錯体を合成し、濃度や共存イオンなどを考慮したさらなる検討を行う。本研究では、錯体化学と生物化学が融合することにより成果が得られ、さらに発展することが期待できる。