

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：84431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05095

研究課題名(和文) 分子認識化学を基盤としたキラルマススペクトロメトリーによる定量的キラリティー検出

研究課題名(英文) Quantitative detection of chirality by chiral mass spectrometry on the basis of molecular recognition chemistry

研究代表者

静間 基博 (Shizuma, Motohiro)

地方独立行政法人大阪産業技術研究所・森之宮センター・総括研究員

研究者番号：40416318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高感度分析法である質量分析のみでキラル分析を達成することを目的としている。本研究ではキラルアンモニウムイオンもしくはアミノ酸に対してキラル識別能を有するキラルポリエーテルホストおよびキラル金属錯体ホストを設計、合成した。そして、それらのホストの安定同位体標識物を合成した。同位体標識・非標識ホストペアに複数のゲスト混合物を一齐に加えて質量分析測定を行い、標識・非標識ホスト-ゲスト錯イオンのピーク強度比から、簡便迅速にキラルゲストの光学純度を決定できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生体内のD-アミノ酸がさまざまな疾病と関連していることやあるいは有用な作用をしていることなどが見いだされており、高感度で簡便なキラル評価方法が希求されている。本研究成果はこれらに対して高感度分析法である質量分析のみで迅速にキラル評価を行える手法を提案できた。また、分子間の相互作用およびイオン化部位の制御により質量分析でキラル評価ができるホスト-ゲスト系の分子設計について一つの指針を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is chiral analysis by mass spectrometry only. In this study, chiral polyether hosts and chiral copper complexes were designed and synthesized to discriminate the chirality of chiral ammonium ions and amino acids, respectively. Further, their enantiomer hosts labeled with deuterium atoms were synthesized. The pair of the labeled/unlabeled host were used after adding the guest mixture to estimate the enantiomeric excess of the multiple guests simultaneously, easily and quickly based on the relative peak intensity of the labeled/unlabeled host-guest complex ions by mass spectrometry only.

研究分野：有機化学

キーワード：キラリティー 質量分析 分子認識

1. 研究開始当初の背景

キラル化合物の鏡像異性体はそれぞれ生体に対して異なる作用をするため、有用な鏡像体のみを得る不斉合成が精力的に研究されている。これに伴い、鏡像体の分析、分離技術も着実に発展してきた。近年、生体内の微量のキラル化合物の鏡像異性化がさまざまな疾病に関与していることが明らかとなっている¹⁾。そのため、微量のキラル化合物の鏡像異性体過剰率 (*ee*) を簡便、迅速に決定する手法が希求されている。有機化合物の高感度分析法として広く認知されているマススペクトロメトリーを活用する試みが世界中で活発に行われている²⁾。現在、Taoらにより提案された Kinetics 法が高精度で *ee* 決定を行えるために広く活用されている³⁾。Kinetics 法では対象試料であるキラル化合物および標準キラル化合物と遷移金属との錯イオンをイオントラップ型のマススペクトロメーターを使って衝突分解し、鏡像異性体によりその分解速度が異なることを利用する。そのため、(i) 遷移金属と錯形成する試料しか分析対象とできない、(ii) 鏡像異性体毎に測定する必要がある、また、(iii) 分解速度の測定に時間を要するなどの問題がある。

一方、われわれのグループではこれまで分子認識化学を基盤としたマススペクトロメトリーによる *ee* 決定法を発展させてきた⁴⁾。この方法においてキラルホストの同位体標識鏡像異性体とその対となる鏡像異性体の非標識体との等モル混合物にキラルゲスト (分析対象) を加えてマススペクトルを測定する。そして、観測されるジアステレオマーの関係にある二本のホスト-ゲスト錯イオンの相対ピーク強度値がゲストの *ee* と定量的に相関することを見出した³⁾。本方法では、(i) 対象キラル化合物に適したホストを設計、合成でき、(ii) 分子量の異なる複数のホストの同位体標識・非標識鏡像異性体ペア混合物を同時に用いることができるため、(iii) たった一枚のマススペクトルから対象キラル化合物の *ee* と定量的な相関関係を示す錯イオンの相対ピーク強度値を複数得ることができるので、kinetics 法の問題点を克服して新しい高感度 *ee* 決定法を確立することができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下のとおりである。

中性キラル化合物への適用 遷移金属との錯形成が困難である中性キラル化合物およびキラル識別能が小さい単座配位子型化合物でも適用できる手法へと発展させる。

ee の測定精度の向上 高精度といわれる kinetics 法と同程度 (検量線の一次相関係数 $R^2 > 0.999$) の測定精度で *ee* 決定すること。

種々のイオン化法での適用 マススペクトロメトリーでは原理の異なるさまざまなイオン化法が利用されている。その中でホスト-ゲスト (非共有結合) 型錯イオンが検出可能なイオン化法である、高速原子衝撃 (FAB)、エレクトロスプレー (ES)、液体マトリクスレーザー脱離イオン化 (liquid-MALDI) イオン化法それぞれに適応できること。

それぞれの対象化合物、混合測定系およびイオン化法に適したキラルホストを設計、合成することで、kinetics 法の問題点をクリアした上で、これらを達成できる。炭化水素やアルコールなどの中性分子は遷移金属と錯形成しにくいので kinetics 法では分析できない。

本研究は、分子認識化学とマススペクトロメトリーという一見関係がないように思われる研究分野を融合させることにより、マススペクトロメトリーを一次構造分析法から、三次構造 (立体構造) 分析法へと高度化できる点で、学術的独自性が高く、また、創造性が高い。また、マススペクトロメトリーのみではキラル分子認識のメカニズムなどを明らかにできないので、溶液系での分子認識挙動 (錯形成能、錯構造) を調べ、分子計算により気相中の推定構造をしっかりと押さえながら研究を進めることで、マススペクトロメトリーの進歩にも寄与することができる。微量分析法の確立は生体試料などにも応用でき、波及効果も大きい。

3. 研究の方法

(1) キラルホストの設計・合成とそのキラル識別能評価

質量分析による *ee* 評価のためには、対象となるキラル化合物に対してキラル識別能を有するキラルホストが必須であるので、はじめに種々のキラルホストを設計、合成した。キラルゲストの同位体標識エナンチオマーとその対となる非標識エナンチオマーとの等モル混合物を調製した。過剰量のキラルゲスト混合物とキラルホストとを混合してマススペクトルを測定し、観測される標識分だけ m/z が分離したジアステレオマーイオンのピーク強度比でホストのキラル識別能を評価した。一方で、核磁気共鳴スペクトル (NMR) や紫外・可視吸収スペクトルなどの分光法を用いてキラルホストとキラルゲストとの錯安定度定数を評価して、質量分析で評価したキラル識別能を検証した。また、錯形成により誘起されるスペクトル変化を基にホスト-ゲスト錯体の錯構造を解析し、それをより性能の高いキラルホストの設計に活用した。

(2) 同位体標識キラルホストの合成と *ee* 評価

優れたキラル識別能を有することが明らかとなったホストの同位体標識エナンチオマーを合成した。そして、同位体標識キラルホストエナンチオマーと対となるエナンチオマーの非標識ホ

ストとの等モル混合物を調製した。これに任意の *ee* に調製したキラルゲストを混合して質量分析を行った。観測される標識分だけ *m/z* が離れたホスト-ゲスト錯イオンのピーク強度比とゲストの *ee* との定量的な相関関係を確認した。

(3) *ee* 決定のための質量分析評価系の拡張

以下の評価系について検証した。(i) 対象となるキラルホストおよびゲストの構造の影響、(ii) 種々のイオン化法のキラル識別能への影響、(iii) イオントラップ型質量分析装置を用いた気相系 (kinetics 法) でのキラル識別能評価との比較、(iv) 多成分系の一斉分析。

4. 研究成果

(1) キラルホストの選定

質量分析で検出するには試料をイオン化する必要があるため、キラルホストの設計にはキラル識別能の発現だけでなくイオン化反応についても考慮する必要があった。キラルアミン類に対してキラル識別能評価するにはポリエーテル型ホストが有用であった。イオン化についてはキラルゲスト (アミン) が容易にイオン化するため、ゲストをアンモニウムイオンとすることで感度よく錯形成を確認できた。分光法を用いた評価では非常に錯安定度定数が小さいものの、ジエチレングリコールの両末端に水酸基をアルキルエーテル化もしくはアセタール化したものをホストとした場合、高いキラル識別能と高い質量分析検出感度を得られることが分かった。

キラルアミノ酸およびキラルカルボン酸類に対しては、有機金属錯体が非常に優れたキラル識別能を有し、質量分析でも高い検出感度を示すことが見出された。

一方、カリックスアレーン、ピラーアレーン、および、シクロデキストリンの誘導体を用いて、イオンの中性のキラルアルコール類、キラル炭化水素類との錯イオンが質量分析で検出できるかを検証した。錯イオンはほぼ検出されなかった。芳香族を有するゲストではわずかに錯イオンが検出された。

(2) キラルアミン (アンモニウムイオン) 類に対するキラル識別能評価

ホストとして両末端にアセタール化ガラクトースを有するポリエーテル型化合物が良いキラル識別能を有することが確認された (Fig. 1)。本化合物は以前のわれわれのグループの研究で見出された類似化合物である

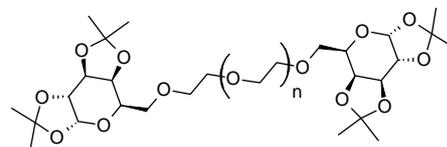


Fig. 1 キラルアンモニウムイオンにキラル識別能を示すキラルホスト ($n = 1, 2$ or 3)

5)。キラルゲストの同位体標識・非標識エナンチオマー等モル混合物とキラルホストとの混合濃度を変えて高速原子衝撃質量分析 (マトリクス: 3-ニトロベンジルアルコール) を行った。ここではゲスト濃度を一定にしてホスト濃度を変化させた。観測されるジアステレオマーの関係にあるホスト-ゲスト錯イオンのピーク強度比をホスト濃度に対してプロットすると、錯イオンピーク強度比はゲストのホストに対する相対濃度が小さくなるにつれて小さくなった。その変化曲線は錯安定度定数とホストおよびゲストの初期濃度で示される溶液中の錯イオン濃度比を示す式でフィッティングさせると、大変高い精度で一致することが明らかとなった (相関係数 $R^2 > 0.9$)。これは高速原子衝撃質量分析で観測されている錯形成挙動が溶液系を主に反映していることを示唆している。ホストをキラルクラウンエーテルにしても同様の挙動が確認された。

(3) キラルアミノ酸類に対するキラル識別能評価

ホストとしてアミノ酸を原料として合成したキラル四座配位子を含むキラル金属錯体を選択した。このキラル金属錯体に関しては大阪市立大学理学部 三宅弘之准教授らのグループと共同で研究を進めた。種々の金属イオンを評価した結果、銅イオンを中心金属とすることで、夾雑イオンが少なく、金属-キラル四座配位子-アミノ酸の 3 成分錯イオンが質量分析で高感度検出できることが明らかとなった。同位体標識 L-、非標識 D-アミノ酸等モル混合物を用いた実験で 20 種のアミ

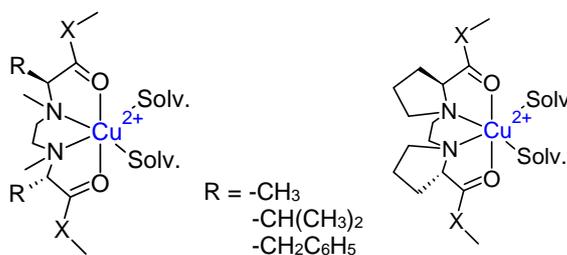
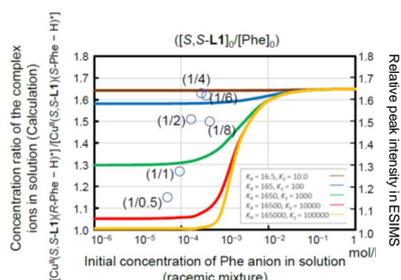


Fig. 2 キラルアミノ酸に対してキラル識別能を示すキラル金属錯体 ($X = O$ or NH)

ノ酸の中 16 種に対して一定以上のキラル識別能を有することが明らかとなった。キラル識別能はアミノ酸側鎖がかさ高い方が大きく、キラル識別の主要因が立体相互作用であることが示唆された。汎数密度関数分軌道計算の結果もこれを支持した。イオン化法として高速原子衝撃 (3-ニトロベンジルアルコール)、エレクトロスプレーイオン化 (メタノール/水系) および液体マトリクス支援レーザー脱離イオン化 (イオン液体) を用いたところ、高速原子衝撃とエレクトロスプレーイオン化で感度よく 3 成分錯イオンが検出された。イオン液体中で錯形成が維持できなかったため、レーザー脱離イオン化では錯イオンが検出できなかった。エレクトロスプレーイオン化では初期の金属イオン、配位子およびアミノ酸 (同位体標識・非標識等モル混合物) の濃度を 100 倍濃縮したと想定すると、それらの比率を変えて変化する 3 成分錯イオンの相対ピーク強度比が溶液中の錯形成挙動を示す変化と一致し、溶液中の錯形成挙動を質量分析で観測していることが示唆された (Fig. 3)。

(a)濃縮計算なし



(b)100倍濃縮計算値

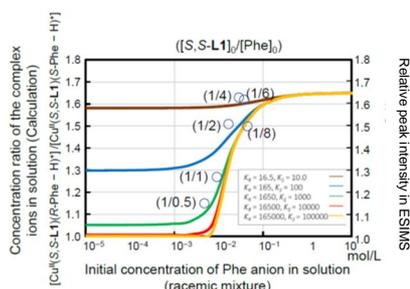


Fig. 3 ESIMS での錯イオン相対ピーク強度値 (○) と溶液中の錯イオン濃度比 (曲線)

(4) Kinetics 法を用いたキラル金属錯体によるキラルアミノ酸識別能評価

イオントラップ法を用いてエレクトロスプレーイオン化法で生成した銅キラル4座配位子アミノ酸の3成分錯イオンを選択し気相中にトラップし、一定のコリジョンエネルギーを与えてトラップ時間に対して錯イオン強度が減衰していく挙動を調べた (Fig. 4)。3成分錯イオンからアミノ酸が脱離した金属キラル4座配位子が観測された。配位子の末端構造により金属の酸化数変化 (Cu^{II} / Cu^{I}) もしくはプロトン移動を伴って脱アミノ酸錯イオンは1価のイオンとして質量分析で検出された。3成分錯イオンに対する脱アミノ酸錯イオンのピーク強度比をトラップ時間に対してプロットし、その勾配から見かけの速度定数を得た。アミノ酸のエナンチオマーそれぞれの速度定数を得てその比を基に気相におけるキラル識別能を評価した。先に得られたキラル識別能 (エレクトロスプレーイオン化) とは相関性がなかった。一方で、高速原子衝撃とエレクトロスプレーイオン化でもキラル識別能はほぼ同じであった。このことは本研究課題でわれわれが採用した同位体標識・非標識エナンチオマーを用いる方法が溶液系のキラル識別挙動を主に反映した結果であることを明確に示している。

(5) イオン化法による錯イオンピーク強度への影響

これまで種々の分光法により溶液中の錯形成挙動が明らかになっており、質量分析による評価も広範にわたってなされているキラルポリエーテルを用いて高速原子衝撃 (3-ニトロベンジルアルコール) エレクトロスプレーイオン化 (メタノール/アセトニトリル) および液体マトリクスレーザー脱離イオン化の異なるイオン化法で質量分析によるキラルアンモニウムイオンに対するキラル識別能評価を行った。高速原子衝撃では溶液挙動との相関が確認できたが、エレクトロスプレーイオン化では相関が認められなかった。この系ではイオン化プロセスにおける帯電液滴の濃縮過程でイオン性であるキラルアンモニウムイオンと疎水性であるキラルゲストとが相分離したためであると考えられる。一方、レーザー脱離イオン化ではイオン性液体を用いた場合は錯イオン自体が観測できなかったが、ゲンチジン酸を含む3-ニトロベンジルアルコールをマトリクスとした場合に錯イオンが観測され、その錯イオン強度比は絶対値こそ圧縮されるものの高速原子衝撃で得られた結果と同じキラル選択性が確認できた。3-ニトロベンジルアルコールのみでは錯イオンがほとんど観測できないことから、ゲンチジン酸がアンモニウムカチオンの近傍にあることでマトリクスとして有用な機能を果たしたことが推定された。

(6) キラル識別能一斉分析

アミノ酸に対してキラル識別能を示した銅-キラル四座配位子系で使用した配位子の一方のエナンチオマーを同位体標識した。そこに別のエナンチオマーの非標識体を加えて等モル混合物とした。この同位体標識・非標識エナンチオマー等モル混合四座配位子と銅イオンとの錯体に任意の ee に調製したアミノ酸を加えて質量分析 (エレクトロスプレーイオン化) を行った。観測された錯イオンピーク強度比はアミノ酸の ee と良い定量的相関関係を示した。分子量の近いアミノ酸を除くアミノ酸混合物を加えても、それぞれのアミノ酸を含む銅-キラル四座配位子-アミノ酸の標識・非標識イオンピークは観測された。いくつかのアミノ酸に関しては他のアミノ酸と比較して錯形成能が小さいためシグナルは小さくなったが、それぞれの ee を反映した錯イオンピーク強度比で検出できることが確認できた。Ee 決定においてのイオンサプレッション効果はほとんど無視できるほど小さいことが確認できた。

< 引用文献 >

(1) Fujii, N. et al, *Biochemistry*, **2011**, *50*, 8628-8635; (2) Yu, X. et al. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *968*, 1-20; (3) Tao, W. A. et al, *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 4427-29; (4) (a) Sawada, M. et al, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4405-6; (b) Takai, Y. et al. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 266-268; (c) Shizuma, M. *Chiral Recognition in the Gas Phase*, CRC Press, 2010, 61-8; (5) Shizuma, M. et al, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 4795-4807.

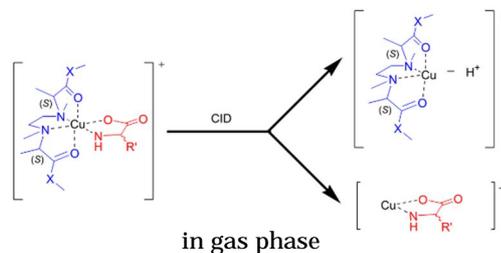


Fig. 4 銅キラル四座配位子アミノ酸三成分錯イオンを前駆イオンとした衝突誘導分解

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Nakakoji, H. Sato, D. Ono, H. Miyake, S. Shinoda, H. Tsukube, H. Kawasaki, R. Arakawa, M. Shizuma	4. 巻 56
2. 論文標題 Mass spectrometric detection of enantioselectivity in three-component complexation, copper(II)-chiral tetradentate ligand-free amino acid in solution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemComm	6. 最初と最後の頁 54-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9cc07231d	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 静間基博	4. 巻 66
2. 論文標題 非共有結合型錯イオン形成挙動と糖類の異性体識別	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Mass Spectrom. Soc. Jp.	6. 最初と最後の頁 190-196
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakakoji Takashi, Yoshino Kaori, Izutsu Kazuki, Sato Hirofumi, Miyake Hiroyuki, Mieda Eiko, Shinoda Satoshi, Tsukube Hiroshi, Kawasaki Hideya, Arakawa Ryuichi, Ono Daisuke, Shizuma Motohiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Enantioselectivity-Evaluation of Chiral Copper(II) Complexes Coordinated by Novel Chiral Tetradentate Ligands for Free Amino Acids by Mass Spectrometry Coupled With the Isotopically Labeled Enantiomer Method	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Chemistry	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fchem.2020.598598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中小路崇、佐藤博文、篠田哲史、川崎英也、荒川隆一、三宅弘之、静間基博
2. 発表標題 有機金属イオンを用いたアミノ酸に対するキラリ認識
3. 学会等名 第8回イオン移動度研究会 / 第72回イオン反応研究会 合同講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中小路崇、三宅弘之、篠田哲史、松崎剛、朝野芳織、鈴木健之、佐藤博文、静間基博
2. 発表標題 キラリ配位子を有する銅錯イオンへの配位挙動を利用したナノエレクトロスプレー質量分析によるアミノ酸の光学異性一斉検出
3. 学会等名 第67回質量分析総合討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中小路崇、佐藤博文、川崎英也、荒川隆一、篠田哲史、三宅弘之、静間基博
2. 発表標題 質量分析法を活用 質量分析法を活用 した光学活性銅錯体のキラリアミノ酸識別能評価
3. 学会等名 モレキュラー・キラリティー シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 静間基博
2. 発表標題 質量分析によるキラリティー検出法
3. 学会等名 第3回オレオマテリアル学術交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motohiro Shizuma
2. 発表標題 Chirality Detection by Mass Spectrometry Coupled with the Isotopically Labeled Method on the Basis of Molecular Recognition Chemistry
3. 学会等名 BIT's 7th Annual Conference of AnalytiX-2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 静間基博、佐藤博文、川野真太郎、松崎剛、朝野芳織、鈴木健之、小野大助
2. 発表標題 高速原子衝撃質量分析による化学修飾フルクトオリゴ糖類のキラルアミノ酸エステルアンモニウムイオンに対するキラル識別能評価
3. 学会等名 日本油化学会第57回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 静間基博、鈴木健之、朝野芳織、松崎剛、川野真太郎、佐藤博文、小野大助
2. 発表標題 高速原子衝撃質量分析による非環状キラルホストのキラルアンモニウムイオンに対するキラル識別能評価と錯安定度定数決定
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------