

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590036  
 研究課題名（和文） LC/MS/MS用高性能標識試薬の開発と生体分子の高感度分析への応用  
 研究課題名（英文） Development of the prominent labeling reagent for LC/MS/MS and its application to the analysis of the biomolecules  
 研究代表者  
 三田 智文（SANTA TOMOFUMI）  
 東京大学・大学院薬学系研究科・准教授  
 研究者番号：30187306

研究成果の概要：近年、高速液体クロマトグラフィー（LC）とタンデム型質量分析器（MS/MS）を組み合わせた LC/MS/MS 法が広く用いられている。本研究では、LC/MS/MS 法における検出感度および選択性の向上を目的とした標識試薬を合成した。また、合成した標識試薬を用いて疾患のマーカーとなる生体分子の高感度な分析法を開発した。本研究で開発した分析法は、新生児のマススクリーニング法として海外で用いられている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学

## 1. 研究開始当初の背景

生命現象を深く理解するためには、生命機能の維持に関与する生体分子の存在部位、生成や消長などの動態を正確に把握する必要がある。疾患の原因を解明し、その治療法、予防法を確立するためには、疾患に関わる生体分子を特定し、その機能および動態を解明しなければならない。また、有効で安全な薬物療法を行うためには、薬物の体内動態を正しく把握する必要がある。このような目的のためには、生体分子や薬物の高感度で選択的な分析法が不可欠であると考えられる。

研究代表者は、これまで、主に、高速液体

クロマトグラフィー（HPLC）/蛍光検出法を用いて、微量生体分子の高感度分析法の開発に取り組んできた。しかし、大部分の化合物は蛍光性を有さないため、蛍光検出法により分析する場合には、分析対象分子を蛍光標識試薬によって標識化する必要がある。そこで、分子サイズが小さく反応性に富み、蛍光波長が長波長域であるなど、蛍光標識試薬として優れた性質を有するベンゾフラザン骨格に着目し、優れた蛍光標識試薬の開発に取り組んだ。これまでに、カルボキシル基用、アルコール基用、過酸化検出用など、多数の蛍光標識試薬を開発し、さらに、開発した試薬

を用いて、活性酸素種や酸化ストレス関連分子、高血圧関連分子、糖尿病関連分子などの高感度分析法を開発し、これらの分子と疾患との関連を明らかにした。

近年、質量分析器 (MS) あるいはタンデム型質量分析器 (MS/MS) が開発され、これと HPLC とを組み合わせた LC/MS 法あるいは LC/MS/MS 法が、分析化学、生命化学、臨床化学、環境化学など広い分野で用いられるようになってきている。LC/MS 法においても、検出感度、選択性の向上のためには、優れた標識試薬が必要である。LC/MS 法に用いる標識試薬には、1) 分析対象物質のイオン化効率を高めるために容易にイオン化する構造を有している、2) 対象分子と選択的かつ高い反応性を有する、3) イオン化抑制物質である塩や高極性化合物と HPLC で分離するために適度な疎水性を有している、などの条件が必要である。このため、UV 検出法、蛍光検出法のために開発された標識試薬の中で、イオン化効率の高い親水性基を有する試薬が LC/MS 用の標識試薬として用いられている。研究代表者は、既に、親水性基を有するベンゾフラザン蛍光標識試薬を開発している。開発した標識試薬はイオン化効率が高く、またベンゾフラザン化合物は適度な疎水性を有するため、LC/MS 用標識試薬として適していると考えた。そして、これら試薬と LC/MS 法を用いて、ペプチド類、脂肪酸類などを高感度に分析できることを既に報告した。

LC/MS/MS 法は LC/MS 法と比較してさらに高感度で選択的な分析が期待できる。また、LC/MS/MS 用標識試薬と反応した分子は、MS/MS 法により特定のプロダクトイオンを生じるため、そのイオンを検出することにより、標識試薬が反応した分子のみを選択的に検出することができる。したがって、特定の官能基を有する生体分子のみを選択的かつ網羅的に解析することができる。このように、LC/MS/MS 法は、非常に有用であるが、LC/MS/MS 法に適した優れた標識試薬はきわめて少ない。このため、LC/MS/MS 法に適した標識試薬の開発が囑望されている。

## 2. 研究の目的

以上のような背景を基に、本研究では、まず、化合物の構造と MS/MS 法による解裂様式との関係を詳細に検討し、これに基づいて、LC/MS/MS 法に適した標識試薬を開発することを第一の目的とした。そして、開発した標識試薬を用いて、疾患のマーカーとなる生体分子の高感度分析法、さらには特定の官能基を有する低分子化合物の網羅的解析法を開発することを第二の目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、LC/MS/MS 法に適した高性能標

識試薬を開発することを第一の目的としている。一般に、LC/MS 法に用いる標識試薬には、1) 分析対象分子と高い反応性を有する、2) イオン化効率を高めるために容易にイオン化する構造を有している、3) イオン化抑制物質である塩や親水性化合物と逆相 HPLC で分離するために適度な疎水性を有している、などの条件が必要である。さらに、高感度な分析が期待される LC/MS/MS 法に用いる標識試薬には、4) MS/MS 法により特定のプロダクトイオンを選択的に高い収率で生じることが要求される。

現在、LC/MS/MS 用標識試薬として、アルコール基標識にはダンシルクロリド、カルボニル基標識にはダンシルヒドラジンがしばしば用いられている。これらの試薬との反応により生じるダンシル誘導体 (下図) は、MS/MS 法によりスルホン基と芳香環の間の結合が解裂し、 $m/z$  170 のプロダクトイオンを生じる。しかし、ダンシル誘導体はイオン化効率が低いため、高感度分析には適していない。最近、カルボニル基用標識試薬として、2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP) が報告された。HMP 誘導体 (下図) は、イオン化部位を有し、MS/MS 法により比較的容易に解裂し、特定のプロダクトイオンを与える優れた試薬である。しかし、現在に至るまで、LC/MS/MS 法に適した標識試薬はきわめて少ないのが現状である。この原因の一つとして、化合物の構造と MS/MS 法による解裂様式との関係が明らかにされていないことが挙げられる。

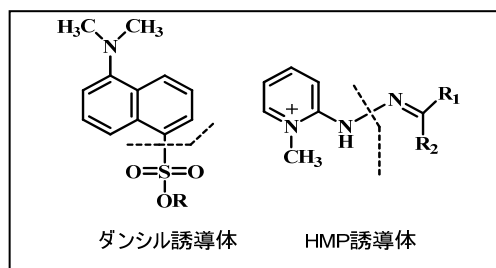
### (1) 化合物の構造と MS/MS 法による解裂様式との関係の検討

本研究では、まず、化合物の構造と MS/MS 法による解裂様式との関係を詳細に検討し、特定のプロダクトイオンを効率よく生成する構造を明らかにする。研究代表者は、これまでの検討において、ベンゾフラザン骨格と結合したスルホンアミド基の近傍で解裂が起き、選択的かつ高い収率でプロダクトイオンを生じることを明らかにしている。今後、さらに多数のベンゾフラザン化合物で検討を行い、化合物の構造と MS/MS 法による解裂様式との関係を明らかにし、MS/MS 法により特定のプロダクトイオンを選択的に高い収率で生じる構造を見出す。

### (2) LC/MS/MS 用高性能標識試薬の開発

上記で得られた知見を基に、LC/MS/MS 用高性能標識試薬を多数開発する。ベンゾフラザン化合物は適度な疎水性を有している。したがって、プロダクトイオンを選択的に高い収率で生じる構造を有するベンゾフラザン化合物に、特定の官能基と選択的に反応する反応部位、イオン化効率を高めるためのイオン

化部位を付与することにより LC/MS/MS 法に適した高性能標識試薬を開発できると考えられる。研究代表者は既に LC/MS/MS 法に適したカルボキシル基用標識試薬を報告しており、今後、優れた標識試薬をさらに多数開発できると考えている。



### (3) LC/MS/MS 用高性能標識試薬を用いた生体分子の高感度分析法の開発

開発した標識試薬を用いて、生体分子の高感度分析法を開発する。本研究では、主として、先天性代謝異常症検査（新生児マススクリーニング）におけるマーカー分子の高感度かつ迅速な分析法の開発をめざしている。現在、日本においては、フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、ガラクトース血症、甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成症の6疾患に対して新生児マススクリーニングが行われている。しかし、先天性代謝異常症は既に500種以上が報告されており、中には、有機酸代謝異常症のように乳幼児突然死症候群（SIDS）の原因となるものも知られている。米国においては、有機酸代謝異常症を中心として、MS/MS法を用いて30種程度の疾患のスクリーニングが普及している。日本においてもマススクリーニングに関する試験研究として、MS/MS法を用いて同様な検討が一部で進められている。現在、MS/MS法で分析されているのは、アミノ酸類、および、アシルカルニチンを形成している脂肪酸（有機酸）類（主にミトコンドリアで代謝される脂肪酸類）である。これらの分子は、ブタノール塩酸でエステル化した後に、MS/MS法で分析することにより特徴的なプロダクトイオンを生じる。この方法により、数十種類の生体分子の分析が可能であり、これら分子がマーカーとなっている疾患を診断することができる。

これに対して、アシルカルニチンを形成していない遊離型の有機酸類（超長鎖脂肪酸、多価有機酸類）、ケトン類、糖リン酸類などの高感度で簡便かつ迅速な分析法は確立していない。これらのうちの一部の分子は、現在、GC/MS法で分析されている。しかし、GC/MS法は前処理が煩雑であり、また分析に長時間を要するなど、マススクリーニング法として適しておらず、LC/MS法による高感度で簡便かつ迅速な分析法の開発が待たれている。

研究代表者は、既に、開発した試薬とLC/MS/MS法を用いて、有機酸代謝異常症の一つであるグルタル酸血症のマーカー分子の分析を行い、マーカー分子を高感度かつ迅速に分析できることを明らかにした。予備的検討であるが、従来のGC/MS法を使用した場合と比較して、検出感度も向上し、分析時間も1/10以下に大幅に短縮できた。

今後、開発した標識試薬とLC/MS/MS法を用いて、C22以上の極長鎖脂肪酸、メチルマロン酸やメチルクエン酸などの多価有機酸、サクニルアセトンなどのケトン類、グルコースリン酸などの糖リン酸類などをはじめ、多種類の疾患マーカー分子の高感度で簡便かつ迅速な分析法を開発する予定である。本研究は、新生児マススクリーニングのみならず臨床化学に大きく貢献すると思われる。

### (4) 低分子化合物の網羅的解析法（メタボローム解析法）の開発

LC/MS/MS用標識試薬と反応した分子は、MS/MS法により特定のプロダクトイオンを生成するため、そのプロダクトイオンを検出することにより、標識試薬が反応した分子のみを選択的に検出することができる。したがって、特定の官能基を有する一群の分子のみを選択的かつ網羅的に解析することが可能になる。この方法を用いて、生体内におけるアミノ酸類、脂肪酸類などの一群の生体分子の網羅的な動態解析、さらには、正常時と病態時における生体分子の量的変動解析法の開発に取り組む予定である。本法は、新たな疾患マーカー分子の同定に大きく貢献すると考えられる。

## 4. 研究成果

### (1) LC/MS/MS 用高性能標識試薬の開発

一般に、LC/MS法に用いる標識試薬には、1) 分析対象分子と高い反応性を有する、2) イオン化効率を高めるために容易にイオン化する構造を有している、3) イオン化抑制物質である塩や親水性化合物と逆相HPLCで分離するために適度な疎水性を有している、4) MS/MS法により特定のプロダクトイオンを選択的に高い収率で生じる、などの条件が必要である。

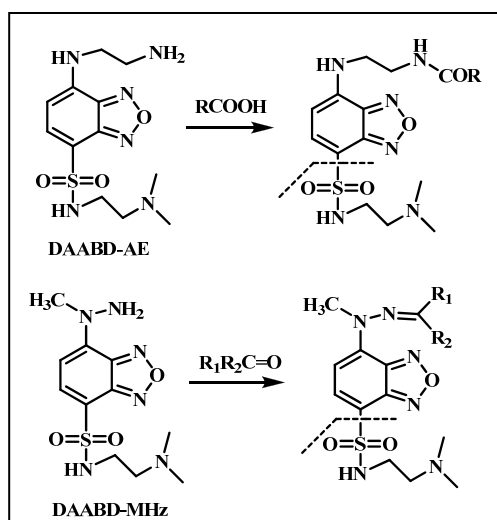
研究代表者は、これまでに、ベンゾフラザン骨格を有する標識試薬を多数開発し報告している（研究業績6）。ベンゾフラザン化合物は適度な疎水性を有している。したがって、プロダクトイオンを選択的に高い収率で生じる構造を有するベンゾフラザン化合物に、特定の官能基と選択的に反応する反応部位、イオン化効率を高めるためのイオン化部位を付与することによりLC/MS/MS法に適した高性能標識試薬を開発できると考えた。

特定のプロダクトイオンを選択的に高い

収率で生じる構造として、既に、エステル結合を有する化合物、urea および thiourea 骨格を有する化合物、ヒドラジン骨格を有する化合物、脂肪族4級アミンを有する化合物、芳香族スルホンアミド基を有する化合物などが報告されている（研究業績2）。本研究では、芳香族スルホンアミド基に着目し、この構造を有する標識試薬の開発を試みた。

まず、芳香族スルホンアミド基を有するベンゾフラザン化合物を数種類合成し、MS/MS法による解裂様式を検討した。その結果、ベンゾフラザン骨格の4位と7位に、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノスルホン基とアミノ基を有する化合物はMS/MS法により、*m/z* 151のイオンを高い収率で生じることが明らかになった。また、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノスルホン基は、3級アミンを有するため、イオン化部位としても適している。以上の結果を基に、2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノスルホン基を有するベンゾフラザン化合物に反応部位を付与し、DAABD-AE（下図）をはじめとするカルボン酸用の標識試薬を開発した。DAABD-AEは、縮合剤存在下、カルボン酸と、60℃、45分以内に反応した。生じた誘導体はLC/MS/MS法により分析した。誘導体は、MS/MS法により*m/z* 151のプロダクトイオンを高い収率で生じるため、高感度な分析が可能であった（研究業績1）。

次に、カルボニル基を有する化合物の標識試薬を開発した。2-(*N,N*-ジメチルアミノ)エチルアミノスルホン基を有するベンゾフラザン化合物に、カルボニル基との反応部位であるヒドラジン基を付与し、DAABD-MHz（下図）を合成した。DAABD-MHzは、アルデヒド類と、50℃、5分以内に反応した。生じた誘導体はLC/MS/MS法により分析した。誘導体は、MS/MS法により*m/z* 151のプロダクトイオンを高い収率で生じるため、高感度な分析が可能であった（研究業績4）。



(2)LC/MS/MS 用高性能標識試薬を用いた生体分子の高感度分析法の開発

DAABD-AEを用いて、生体分子の高感度分析法の開発に取り組んだ。本研究では、グルタル酸、エチルマロン酸、3-ヒドロキシグルタル酸、3-メチルグルタル酸をはじめとする二価カルボン酸の分析法を開発した。これらの分子は、グルタル酸血症タイプ1、グルタル酸血症タイプ2、エチルマロン酸血症、HMG-CoA リアーゼ欠損症などのマーカー分子であり、いずれも、炭素数が5あるいは6のジカルボン酸である。

濾過した尿5micro リットルに内部標準物質を加え、DAABD-AE および縮合剤を加えて60℃、45分反応を行った。生じた誘導体をLC/MS/MSで分析した。DAABD-AEはこれらのカルボン酸の2つのカルボキシル基のうち1方のみと反応した。いずれの誘導体もMS/MS法により*m/z* 151のプロダクトイオンを高い収率で生じたため、選択反応検出(SRM)により、これらカルボン酸を高感度に分析することができた。検出限界は、グルタル酸0.025 micro mol/L、3-ヒドロキシグルタル酸0.02 micro mol/Lであった。分析は1サイクル5分以内で終了した。（研究業績3）。

次に、DAABD-AEを用いて、ペルオキシソーム病のマーカー分子の分析法を開発した。ペルオキシソームは炭素鎖数22以上の極長鎖脂肪酸、プリスタン酸やフィタン酸などの分岐鎖脂肪酸、胆汁酸中間体の代謝などに関与している。ペルオキシソーム病では、代謝酵素の欠損またはペルオキシソーム形成に異常が生じるため、これら分子が代謝されずに体内に蓄積し、血液中濃度が上昇する。したがって、極長鎖脂肪酸、分岐鎖脂肪酸の血液中濃度を測定すればペルオキシソーム病の診断が可能である。そこで、先に述べた標識試薬 DAABD-AE を用いて血液中の極長鎖脂肪酸（アラキジン酸 (C20)、ベヘン酸 (C22)、リグノセリン酸 (C24)、セロチン酸 (C26) および分岐鎖脂肪酸（プリスタン酸、フィタン酸）を標識化しLC/ESI-MS/MSで分析した。DAABD-AEによるこれら脂肪酸の標識化は、縮合剤存在下、60℃、45分で行った。標識化した脂肪酸は逆相カラムで分離しESI-MS/MSにより検出した。標識化体はMS/MSにより*m/z* 151のプロダクトイオンを効率よく生じるため、SRMによる高感度な分析が可能であった。また、分析に要する時間は5分以下であった。本法は、従来のGC/MSによる方法と比較して、前処理が簡便であり分析時間も大幅に短縮できた。（研究業績5）

開発した方法は、現在、海外において、新生児のマスクリーニングに用いられている。

## 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6件)

- ① Santa T, Al-Dirbashi OY, Ichibangase T, Rashed MS, Fukushima T, Imai K. Synthesis of 4-[2-(*N,N*-dimethylamino) ethylamino sulfonyl]-7-*N*-methylhydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DAABD-MHz) as a derivatization reagent for aldehydes in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, 22, 115-118 (2008). (査読有)
- ② Al-Dirbashi OY, Santa T, Rashed MS, Al-Hassnan Z, Shimozawa N, Chedrawi AK, Jacob M, Al-Makhadab M Rapid UPLC-MS/MS method for routine analysis of plasma pristanic, phytanic and very-long chain fatty acid markers of peroxisomal disorders. *J. Lipid Res.*, 49, 1855-1862 (2008). (査読有)
- ③ Santa T, Fukushima T, Ichibangase T, Imai K. Recent progress in the development of derivatization reagents having a benzofurazan structure. *Biomed. Chromatogr.*, 22, 343-353 (2008). (査読有)
- ④ Santa T, Al-Dirbashi OY, Ichibangase T, Fukushima T, Rashed MS, Funatsu T, Imai K. Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for carboxylic acids in liquid chromatography/ electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). *Biomed. Chromatogr.*, 21, 1207-1213 (2007). (査読有)
- ⑤ Santa T, Al-Dirbashi OY, Fukushima T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for biomedical analysis. *Drug Disc. Ther.*, 1, 108-118 (2007). (査読有)
- ⑥ Al-Dirbashi OY, Santa T, Al-Qahtani K, Al-Amoudi M, Rashed MS. Analysis of organic acid markers relevant to inherited metabolic diseases by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry as benzofurazan derivatives. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 21, 1984-1990 (2007). (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① Al-Dirbashi OY, Santa T, Shimozawa N, Rashed MS. Development of benzofurazan derivatization reagents for LC-MS/MS and application to the analysis of bio-markers of peroxisomal disorders. Japan-China Joint Medicine Workshop on Drug

Discoveries and Therapeutics (Sep 29-Oct 01, 2008, Tokyo).

- ② Santa T, Osama Y Al-Dirbashi. Synthesis of benzofurazan derivatization reagent and analysis of fatty acids by LC/FL and LC/MS. ISLS 2008 (XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry) (Sep 7-11, 2008, Bologna).
- ③ 三田智文, Osama Y Al-Dirbashi : ベンゾフラザン骨格を有する LC/MS/MS 用標識試薬の開発と疾患マーカーの高感度分析. 第15回クロマトグラフィーシンポジウム 2008. 5. 29-31 静岡.
- ④ 三田智文, Osama Y Al-Dirbashi : ベンゾフラザン骨格を有する LC/MS/MS 用標識試薬の開発と応用. 日本薬学会第128年会 2008. 3. 28-30 横浜.
- ⑤ Al-Dirbashi OY, Rashed MS, Santa T, Al-Hassnan Z: Novel diagnostic methods for glutaric acidemia type 1. SSIEM2007 (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) (Sep 4-7, 2007 Hamburg).
- ⑥ Santa T, Al-Dirbashi OY, Rashed MS: Development of benzofurazan labeling reagents for LC/MS/MS and their application to biomarker analysis. 6<sup>th</sup> AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (July 08-11, 2007, Istanbul).
- ⑦ Santa T, Al-Dirbashi OY, Rashed MS: Development of benzofurazan labeling reagents for LC/MS/MS and their application to biomarker analysis. China-Japan Joint Medicine Workshop on Drug Discoveries and Therapeutics (May 26-30, 2007, Jinan).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三田 智文 (SANTA TOMOFUMI)  
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授  
研究者番号 : 30187306

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし