

平成22年 5月20日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750066
 研究課題名 (和文) F-trap 誘導体化による超高感度メタボロミクスと薬物治療効果判定法への展開
 研究課題名 (英文) Development of ultra high-sensitive metabolomics utilizing F-trap derivatization and its application to assessment of pharmacotherapeutic effects
 研究代表者 轟木 堅一郎 (TODOROKI KENICHIRO)
 福岡大学・薬学部・助教
 研究者番号：70341451

研究成果の概要 (和文)：F-trap 蛍光誘導体化法という生体内の内因性アミン代謝物を超高感度かつ網羅的に解析する方法を開発した。また、本法と統計学的手法を組み合わせることで抗癌剤の薬物治療効果判定法に繋がる方法論を確立した。さらに有機酸に対する分析法として、Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法を新たに開発し、有機酸代謝物の高感度・網羅的分析法を確立した。

研究成果の概要 (英文)：We have developed a F-trap fluorescence derivatization method which enables ultra-sensitive and comprehensive analysis of endogenous amino metabolites. By combining this method and statistical technique, we established an assessment method of pharmacotherapeutic effects of anticancer drugs on tumor cells. Furthermore, we have also developed a fluoruous scavenging derivatization (FSD) method which enables ultra-sensitive and comprehensive analysis of organic acid metabolites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：メタボロミクス、HPLC、蛍光、誘導体化、フルオラス

1. 研究開始当初の背景

メタボロミクスとは、薬物・環境等の外因的刺激、疾患等の影響を内因性代謝物レベルで網羅的に解析する手法であり、バイオマーカーの探索から疾病の診断、生活習慣や健康に関する研究に至るまで、様々な分野で利用されている。一般にメタボロミクスでは、数

十～数百種類もの生体試料中の低分子化合物を高感度かつ網羅的に分析する方法が要求されることから、分離手段としてマイクロHPLCや超高速HPLCが、検出手段としてUV検出や質量分析法が汎用される。しかし、UV検出法は生体試料分析に十分な感度を有しているとは言えず、さらには夾雑物の影響を受

けやすいといった欠点がある。また、質量分析法についても化合物ごとにイオン化効率が異なることや、共存する塩の影響によりイオン化が抑制されるといった問題点がある。これらに対し目的成分を蛍光物質へと変換し検出する蛍光誘導体化法は、フェムト (10^{-15}) モルレベルの検出が容易に可能となることから、微量生体成分の超高感度分析に適している。

これまでに様々な官能基に対応した数多くの蛍光誘導体化試薬が開発され、実用化されているが、これらの試薬ではいずれも生成した蛍光誘導体と過剰に加えた試薬とのHPLC分離が困難となる場合がある。そのため、固相抽出による煩雑な前処理操作や複雑なHPLC分離条件の設定、カラムスイッチング法による試薬除去等が必要となり、低分子化合物の網羅的解析には使用できないというのがこれまでの常識とされてきた。

一方で、試薬自身は無蛍光性でありながら、アミンと反応することで蛍光を発する『発蛍光型誘導体化試薬』が開発され、アミノ酸やペプチドの高感度分析等に利用されている。しかし、これらの試薬の蛍光特性(励起・発光波長、ストークスシフト)、感度、化学的安定性については、必ずしも満足できるものではなかった。

2. 研究の目的

研究代表者は内因性代謝物の中でも特にアミノ酸、ペプチド類、カテコールアミン類等といった生理活性アミン類、および有機酸に焦点を当て、『F-trap 蛍光誘導体化法』という新手法に基づいたこれら化合物群の超高感度網羅的分析法を確立することを目的とした。また本法を統計学的手法と組み合わせることで、各種疾患患者の臨床診断法、薬物治療効果判定法へと応用展開することを企てた。本研究の基盤技術となる『F-trap 蛍光誘導体化法』とは、従来、コンビナトリアル有機合成に利用されてきたフルオラス(親フッ素性)分離技術を生体分析化学の分野に応用したものであり、特許公開並びに論文公表済みの独自技術である。本誘導体化法は、反応後に未反応試薬のみを完全除去 (>99.9%) 可能であることから、試薬の妨害を受けることなく、生理活性アミン類や有機酸を HPLC により網羅的かつ超高感度に解析することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究では以下の項目について実施した。

- (1) F-trap 型蛍光誘導体化試薬の合成
- (2) 合成試薬の生理活性アミン類や有機酸に対する誘導体化反応条件の最適化
- (3) 誘導体化反応後の試薬除去条件の最適化

- (4) 分析法バリデーション
- (5) 有機酸に対する試薬ピークの検出されない新たな蛍光誘導体化-HPLC 分析法の開発
- (6) ヒト大腸癌細胞 (Colo201) を培養した栄養培地中アミノ酸の代謝解析および薬物治療効果の判定
- (7) ヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) を培養した栄養培地中アミノ酸の代謝解析および神経細胞分化パターンの判定

4. 研究成果

平成 20 年度は、蛍光団として Pyrene、Dansyl、FMOC 骨格をそれぞれ有する 3 種のアミン分析用 F-trap 型蛍光誘導体化試薬の合成に成功した。また、合成した各試薬のアミン類に対する誘導体化反応および試薬除去操作条件の最適化、分析法バリデーションなどを実施し、上記試薬群を用いたアミン類の高感度かつ網羅的分析法を確立することができた。

また、F-trap 蛍光誘導体化法による薬物治療効果判定法確立のための基礎検討として、ヒト大腸癌細胞 (Colo201) を培養した栄養培地中アミノ酸の代謝解析を実施した。培養培地中の 22 種のアミノ酸濃度は AccQ・Tag 法を用いた蛍光誘導体化-HPLC 法により高精度に分析できた。このとき得られたアミノ酸濃度の経時的変化データに主成分分析を施すことで、各試料中のアミノ酸代謝パターンの違いが与える影響を 2 次元グラフ (Score plot) の座標位置の違いとして反映させることができた。

平成21年度は、前年合成したF-trap pyreneの高性能化に成功した。また、オンライン固相抽出法を組み合わせることで、アミン類の高感度かつ網羅的な分析法を確立することができた。さらに有機酸に対する試薬ピークの検出されない蛍光誘導体化-HPLC分析法として、Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法を新たに開発し、同じく新規作製したマイクロF-SPEスピンカラムと組み合わせたTCAサイクル有機酸代謝物の高感度・網羅的分析法を確立した。さらに、F-trap法による薬物治療効果判定法確立のため、ヒト大腸癌細胞 (Colo201) およびヒト神経芽細胞 (SH-SY5Y) を培養した栄養培地中アミノ酸の代謝解析を実施した。その結果、Colo201を用いた解析では抗癌剤 (5-フルオロウラシル、塩酸イリノテカン、シスプラチン) 投与後の経過時間及び抗癌剤の作用機序の違いなどを、SH-SY5Yを用いた解析ではレチノイド誘導体を投与したときの神経細胞分化がアミノ酸代謝パターンに与える影響をそれぞれ2次元グラフ (Score plot) の座標位置の違いとして反映さ

せることができた。

以上、本研究により超高感度メタボロミクスのための画期的な方法論を確立することができた。

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 19 件)

- (1) A fluorour tag-bound fluorescence derivatization reagent, F-trap pyrene, for reagent peak-free HPLC analysis of aliphatic amines, Kenichiro Todoroki, Hidemichi Etoh, Hideyuki Yoshida, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 査読有、394、2009、321-327
- (2) Separation-oriented Derivatization of Native Fluorescent Compounds through Fluorous Labeling Followed by LC with Fluorous-phase, Yohei Sakaguchi, Hideyuki Yoshida, Kenichiro Todoroki, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Analytical Chemistry, 査読有、80、2009、5039-5045
- (3) Highly Selective and Simple Method for Determination of Polythiols Based on Liquid Chromatography with Post-column Excimer Fluorescence Derivatization, Hideyuki Yoshida, Maki Sudo, Kenichiro Todoroki, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Analytical Sciences, 査読有、25、2009、829-833
- (4) Determination of Histamine in Rat Plasma and Tissue Extracts by Intramolecular Excimer-forming Derivatization and LC with Fluorescence Detection, Fumio Ichinose, Takashi Yoshitake, Hideyuki Yoshida, Kenichiro Todoroki, Jan Kehr, Osamu Inoue, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Chromatographia, 査読有、70 巻、2009、575-580
- (5) Liquid Chromatographic Determination of Acetylcholine Based on Pre-column Alkaline Cleavage Reaction and Post-column Tris(2,2'-bipyridyl) ruthenium(III) Chemiluminescence Detection, Hideyuki Yoshida, Akifumi Yamada, Kenichiro Todoroki, Osamu Imakyure, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Luminescence, 査読有、24 巻、2009、306-310
- (6) Liquid Chromatographic Determination of Polythiols Based on Pre-column

Excimer Fluorescence Derivatization and Its Application to α -Lipoic Acid Analysis, Takashi Inoue, Maki Sudo, Hideyuki Yoshida, Kenichiro Todoroki, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi, Journal of Chromatography A, 査読有、1216 巻、2009、7564-7569

- (7) Determination of Polar Organophosphorus Pesticides in Water Samples by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Rapid Communication in Mass Spectrometry 査読有、22 巻、2008、2203-2210

[学会発表] (計 69 件)

- (1) アミノ酸メタボロミクスを用いた抗癌剤の治療効果判定法の開発(2)、富田陵子、轟木堅一郎、町田和之、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、中島学、山口政俊、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山大学
- (2) フルオラス蛍光誘導体化試薬 F-trap pyrene の改良とその機能評価、美川智彦、楠田和成、轟木堅一郎、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12 日、九州大学薬学部
- (3) 薬物治療効果の視覚化を指向した癌細胞のアミノ酸メタボロミクス解析、富田陵子、轟木堅一郎、町田和之、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、中島学、山口政俊、第 26 回日本薬学会九州支部大会、2009 年 12 月 12 日、九州大学薬学部
- (4) Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法による高極性有機酸の蛍光誘導体化 HPLC 分析、橋本裕輝、轟木堅一郎、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、山口政俊、フルオラス科学研究会第 2 回シンポジウム、2009 年 11 月 27 日、IT ビジネスプラザ武蔵(金沢)
- (5) フルオラスタグを導入した蛍光誘導体化試薬 F-trap pyrene の改良とアミン類の HPLC 分析、美川智彦、楠田和成、轟木堅一郎、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、山口政俊、フルオラス科学研究会第 2 回シンポジウム、2009 年 11 月 27 日、IT ビジネスプラザ武蔵(金沢)
- (6) フルオラス分離技術を利用する微量生体成分の高感度・高選択的 HPLC 分析法の開発【特別講演】、轟木堅一郎、フルオラス科学研究会第 2 回シンポジウム、2009 年 11 月 27 日、IT ビジネスプラザ武蔵(金沢)
- (7) 生理活性物質の高感度・高選択的蛍光誘導体化分析システムの開発【クロマトグラフィー科学会奨励賞受賞講演】、轟木堅一郎、第 20 回クロマトグラフィー科

- 学会議、2009年11月12日、新橋ヤクルトホール
- (8) Fluorous Scavenging Derivatization (FSD) 法による有機酸の蛍光誘導体化 HPLC 分析、橋本裕輝、轟木堅一郎、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 27 回九州分析化学若手の会夏季セミナー、2009年7月31日、宮崎観光ホテル
- (9) 蛍光誘導体化-HPLC 法による神経芽細胞メタボロミクス解析、近藤晋司、富田陵子、轟木堅一郎、町田和之、糸山美紀、巴山忠、吉田秀幸、能田均、中島学、山口政俊、第 27 回九州分析化学若手の会夏季セミナー、2009年7月31日、宮崎観光ホテル
- (10) 5-Fluorouracil 処理した癌細胞のアミノ酸メタボロミクス解析、富田陵子、轟木堅一郎、町田和之、吉田秀幸、能田均、中島学、山口政俊、第 16 回クロマトグラフィーシンポジウム、2009年5月29日、長崎大学文教キャンパス
- (11) Fluorous Scavenging Derivatization 法による試薬ピークを出さない有機酸の蛍光誘導体化-HPLC 分析、轟木堅一郎、美川智彦、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 16 回クロマトグラフィーシンポジウム、2009年5月29日、長崎大学文教キャンパス
- (12) Fluorous Scavenging Derivatization 法による有機酸の蛍光誘導体化-HPLC 分析、轟木堅一郎、美川智彦、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 70 回分析化学討論会、2009年5月16日、和歌山大学民谷キャンパス
- (13) アミン標識用蛍光誘導体化試薬 F-trap FMOC-Gly の開発とアミン類の分析、井上裕文、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、鶴田泰人、第 70 回分析化学討論会、2009年5月16日、和歌山大学民谷キャンパス
- (14) アミノ酸メタボロミクスを用いた抗癌剤の治療効果判定法の開発、富田陵子、上田知、轟木堅一郎、町田和之、吉田秀幸、能田均、中島学、山口政俊、日本薬学会第 129 年会、2009年3月26日、京都国際会議場
- (15) Development of Fluorous Tag-bound Fluorescence Derivatization Reagent, F-trap Pyrene, for Reagent's Peak-free HPLC Analysis of Biological Amines、Kenichiro Todoroki、Hidemichi Etoh、Hideyuki Yoshida、Hitoshi Nohta、Masatoshi Yamaguchi、HPLC 2008 Kyoto / The 33rd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques、2008年12月4日、京都大学船井哲良記念講堂
- (16) フルオラスタグ結合型蛍光誘導体化試薬 "F-trap dansyl" によるアミン類の HPLC 分析、美川智彦、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 19 回クロマトグラフィー科学会議、2008年12月1日、京都大学船井哲良記念講堂
- (17) フルオラス蛍光誘導体化試薬 F-trap ピレンによる生理活性アミン類の HPLC 分析、江藤英倫、鷺山真吾、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 19 回クロマトグラフィー科学会議、2008年12月1日、京都大学船井哲良記念講堂
- (18) アミン標識用蛍光誘導体化試薬 F-trap FMOC の開発、井上裕文、古謝景子、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、鶴田泰人、第 47 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2008年11月8日、岡山コンベンションセンター
- (19) フルオラスタグを導入したアミン用蛍光誘導体化試薬 "F-trap dansyl" の開発、美川智彦、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、フルオラス科学研究会第 1 回シンポジウム、2008年10月10日、新潟薬科大学
- (20) F-trap 蛍光誘導体化法による微量生理活性アミン類の高感度分析、轟木堅一郎、江藤英倫、吉田秀幸、能田均、山口政俊、フルオラス科学研究会第 1 回シンポジウム、2008年10月10日、新潟薬科大学
- (21) アミン標識用蛍光誘導体化試薬 F-trap dansyl の開発とその機能評価、美川智彦、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、日本分析化学会第 57 年会、2008年9月10日、福岡大学
- (22) 蛍光誘導体化試薬 F-trap ピレンによるアミノ酸・ポリアミン類の HPLC 分析、江藤英倫、鷺山真吾、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、日本分析化学会第 57 年会、2008年9月10日、福岡大学
- (23) F-trap 型蛍光誘導体化試薬 F-trap ピレンを用いるポリアミン類のエキシマー蛍光誘導体化-HPLC 分析、江藤英倫、鷺山真吾、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 26 回九州分析化学若手の会夏季セミナー、2008年7月28日、熊本勤労総合福祉センター
- (24) アミノ酸メタボロミクスによる癌薬物治療効果判定法の開発、富田陵子、上田知、轟木堅一郎、町田和之、吉田秀幸、能田均、中島学、山口政俊、第 26 回九州分析化学若手の会夏季セミナー、2008年7月28日、熊本勤労総合福祉センター

福岡大学・薬学部・助教
研究者番号：70341451

- (25) 新規アミン標識用 F-trap 型蛍光誘導体化試薬“F-trap dansyl”の開発、美川智彦、江藤英倫、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 26 回九州分析化学若手の会夏季セミナー、2008 年 7 月 28 日、熊本勤労総合福祉センター
- (26) 新規蛍光誘導体化試薬 F-trap ピレンの開発とアミン類の HPLC 分析、江藤英倫、轟木堅一郎、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 69 回分析化学討論会、2008 年 5 月 15 日、名古屋国際会議場
- (27) アミン標識用 F-trap 蛍光誘導体化試薬の開発とその機能評価、轟木堅一郎、江藤英倫、吉田秀幸、能田均、山口政俊、第 69 回分析化学討論会、2008 年 5 月 15 日、名古屋国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 薬学分析科学の最前線、山口政俊、能田均、吉田秀幸、轟木堅一郎(分担執筆)、52-53、日本薬学会物理系薬学部会・分析化学担当教員会議編集(じほう、東京)(2009)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：チオール化合物の同時連続分析方法およびそれに使用する同時連続分析装置
発明者：吉田秀幸、山口政俊、能田均、轟木堅一郎、井上高志
権利者：学校法人福岡大学
種類：特許
番号：特願 2008-210564
出願年月日：2008.8.19
国内外の別：国内

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/~bunseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

轟木 堅一郎 (TODOROKI KENICHIRO)