

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790112

研究課題名（和文） 質量分析法を用いた細胞内ニトロキシルの高感度検出法の開発

研究課題名（英文） Development of specific and highly sensitive method to detect nitroxyl by mass spectrometry

研究代表者

津元 裕樹（TSUMOTO HIROKI）

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号：00409385

研究成果の概要（和文）：

本研究では、質量分析法（MS）を用いて特異的かつ高感度にニトロキシル（HNO）を検出する分析手法の開発を目的とした。MSにおける高感度化のために塩基性骨格を有し、水溶性のチオール化合物を合成した。チオール化合物とHNOの反応生成物であるスルフィンアミドを特異的に検出するため、MRM法による検出法を確立し、スルフィンアミドがHNOのマーカ―として有用である可能性を示唆できた。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to develop specific and highly sensitive method to detect nitroxyl (HNO) by mass spectrometry (MS). A water-soluble thiol compound containing basic moiety to enhance MS signal intensity was synthesized. Sulfinamide produced by the reaction of thiol compound with HNO was detected by multiple reaction monitoring (MRM). Our results suggested that sulfinamide is a useful marker for detection of HNO.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質、ニトロキシル、質量分析

1. 研究開始当初の背景

生体内における一酸化窒素（NO）の恒常的な生成が発見されて以来、NOおよびその関連化合物に関する研究が盛んに行われてきた。それらの中の一つであるニトロキシル（HNO）は、NOの一電子還元体に相当する化合物であるが、ほかのNO関連化合物に比べて研究が遅れていた。しかし近年、NOとは異なる作用機序によるアルデヒド脱水素

酵素阻害作用、血管弛緩作用、心筋の収縮力増強作用などといった様々な薬理作用を示すことが明らかとなっており、医薬品候補化合物としてHNOの生物学的および薬理学的重要性が注目されている。しかしながら、生体内におけるHNO生成に関しては、いまだ確固たる証拠がないのが現状である。その理由は、特異的かつ高感度なHNO検出法が確立されていないことにある。

HNO の検出を困難にしている理由は、その高い反応性と反応の複雑さである。これまでに HNO の二量化反応、HNO と金属または金属タンパク質との反応などを利用した検出法が報告されていた。しかしながら、これらの検出法には選択性、検出感度、細胞への応用などの点で問題があった。

HNO は反応性の高い求電子剤として働き、求核剤であるチオール (R-SH) と非常に高い反応性を示すことも知られており、HNO の二量化反応や生理作用発現を抑制する。このことは HNO 特異的であり、HNO 生成の裏付けとして汎用されてきた。しかしながら、HNO と R-SH の反応生成物によって HNO 生成を確認するものではなかった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、HNO と特異的に反応し、質量分析法 (MS) による高感度検出が可能な R-SH を設計・合成し、HNO 特異的高感度検出プローブとして、生物学的環境における HNO の生成を、MS を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HNO 特異的高感度検出プローブの設計・合成

HNO はチオール (R-SH) と非常に高い反応性を示し、反応生成物としてスルフィンアミド (R-SONH₂) を生成することが知られていた。そこで、R-SONH₂ を効率的に生成する R-SH は HNO 特異的検出試薬になり得ると考え、MS において検出感度を向上させる骨格、MRM 法を行うために特徴的なフラグメントイオン、高い水溶性などの特徴を有する R-SH の設計・合成を行った。

(2) LC-ESI-MS/MS を用いた MS プローブと HNO の反応生成物の解析

合成した MS プローブと HNO を放出する化合物との反応を行い、LC-ESI-MS/MS を用いて反応生成物を解析した。さらに、三連四重極型質量分析装置を用い、MRM 法による定量法の開発を行なった。

4. 研究成果

(1) HNO 特異的高感度検出プローブの設計・合成

塩基性あるいは蛍光性を有する R-SH として 4 種類を合成した。また、細胞内移行性が向上することを期待し、ジスルフィド

(R-SS-R) 4 種類を合成した。

合成した化合物の中から、HNO 検出プローブとして MS における高感度化、および培養細胞への応用が期待できる水溶性を有する R-SH 1 (図 1) を用いることとした。

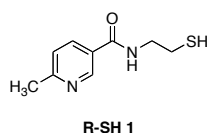


図 1

(2) LC-ESI-MS/MS を用いた MS プローブと HNO の反応生成物の解析

R-SH と HNO 放出化合物である Angeli's salt (AS) の反応を 25 mM Tris-HCl (pH 7.6) 中に行ない、反応生成物を LC-ESI-MS を用いて解析した。その結果、R-SH と HNO の反応生成物である R-SONH₂ に相当するシグナル m/z 228 を確認することができた。

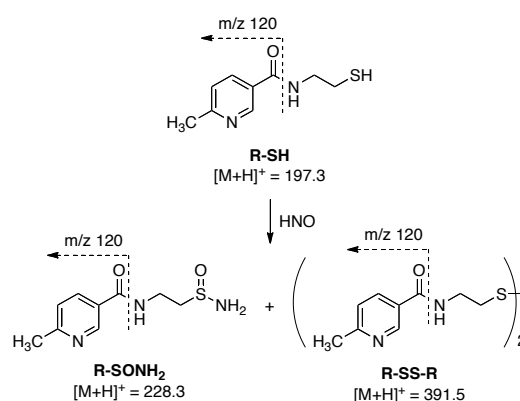


図 2

しかしながら、副生成物である R-SS-R に相当するシグナル m/z 391 も同時に検出されることがわかった (図 2)。

R-SH, R-SONH₂, および R-SS-R に対し、特異的かつ高感度な定量分析を行なうため、三連四重極型質量分析装置 (LCMS-8030S, Shimadzu 社製) を用いた MRM 法による分析条件の検討を行なった。LC 分離条件を表 1 にそれぞれまとめた。

表 1

分析カラム :	Cadenza CD-C18, 150 × 2 mm, 3 um (Intakt 社製)
流速 :	0.2 mL/min
移動相 A :	Water/ 0.1% Formic acid
移動相 B :	MeCN/ 0.1% Formic acid
B. Conc. :	2% (0.0 min) – 2% (2.0 min) – 60% (17.0 min) – 90% (17.1 min) – 90% (22.0 min) – 2% (22.1 min) – 2% (30.0 min)
カラム温度 :	40 °C

また、MRM 分析条件を表 2 にまとめた。R-SH、R-SONH₂、および R-SS-R の MS/MS において、プローブに由来する共通フラグメントイオンとしてアミド結合部分で解離した m/z 120 (図 2) が検出され、MRM 分析に有用であることがわかった。

このようなプローブに特徴的なフラグメントイオンが検出されたことは、複雑なサンプル中における特異性を向上させる化合物デザインに利用できるだけでなく、絶対的定量を行なうために安定同位体標識部位を考慮するために重要な情報であると考えられる。

表 2

Compound	RT (time)	Precursor > Product
R-SONH ₂	4.1	227.9 > 120.0
R-SH	7.4	196.9 > 120.0
R-SS-R	9.3	391.1 > 120.0

確立した LC 分離および MRM 分析条件を用い、R-SH と HNO 放出化合物である AS の反応生成物を分析した結果、出発物質である R-SH、反応生成物である R-SONH₂、および副生成物である R-SS-R の 3 化合物それぞれに対し、図 3 に示す MRM クロマトグラムが得られ、良好な分離条件を得ることができた。

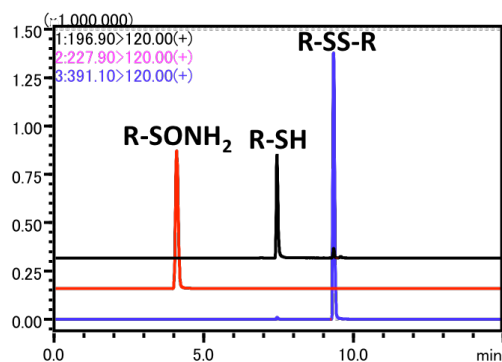


図 3

合成した R-SH および R-SS-R を標準品として用い、それぞれに対する MRM クロマトグラムから検量線を作成した。その結果、MRM 法では 0.1-100 pmol の範囲で良好な直線性が得られることがわかった。また、それぞれの検出限界は数十 fmol であることもわかった (図 4)。

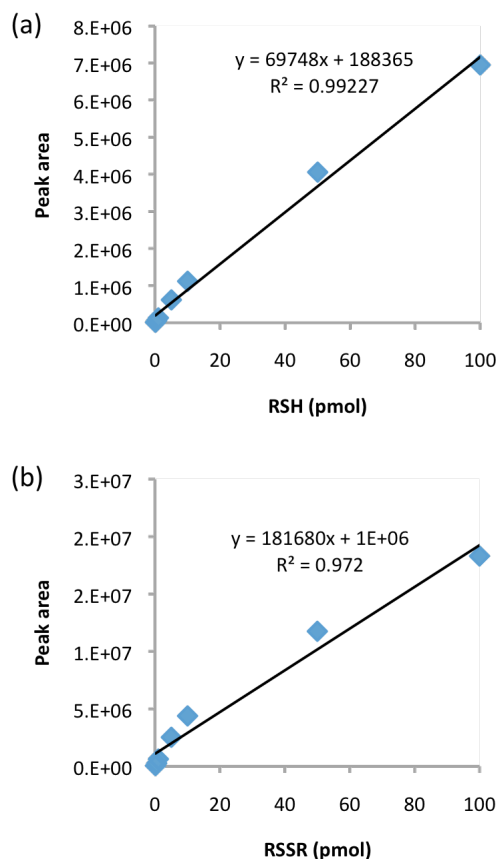


図 4

R-SH と HNO 放出化合物である AS の量比を変えて反応させ、その反応生成物を MRM 法で分析した。ピークエリアのプロット図を図 5 に示し、AS/R-SH = 0、0.1、1 の場合に得られた MRM クロマトグラムを図 6 に示す。これらの結果より、AS/R-SH = 1 以上の HNO 放出化合物存在下では RSH は消失することがわかった。また、検量線から R-SS-R が収率約 30% で生成することが分かった。これらの結果より、HNO マーカーである反応生成物 R-SONH₂ の収率は AS/R-SH = 1 以上の場合に約 70% と考えられる。

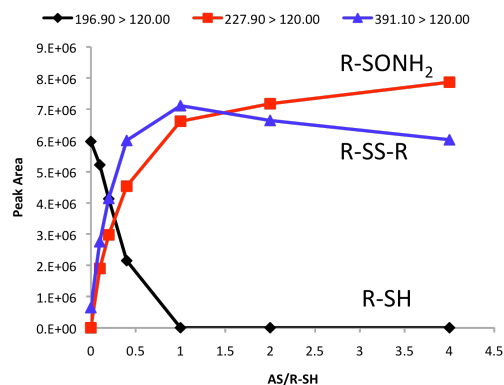


図 5

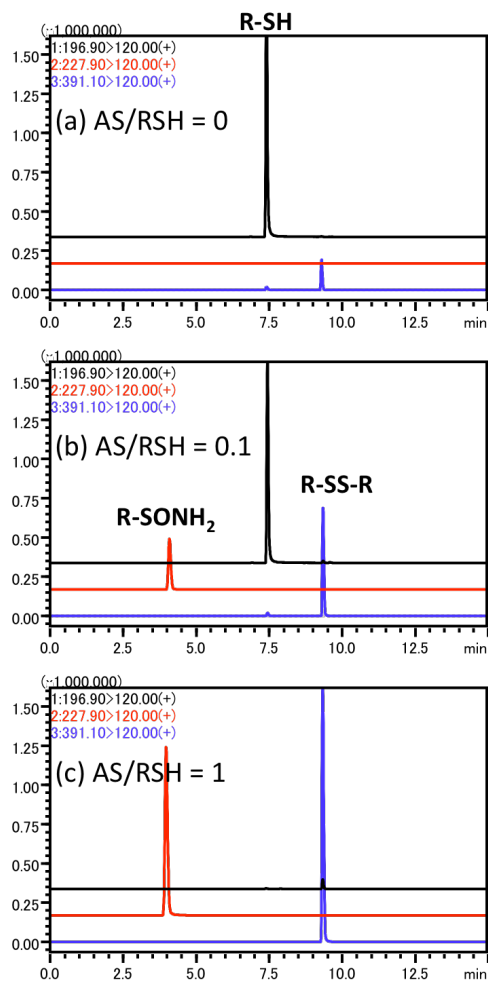


図 6

R-SONH₂ が HNO 特異的マーカーになり得るかを検討するため、R-SH と NO 関連物質放出化合物 (NOC7、GSNO、SIN-1) の反応生成物を MRM 分析した。その結果、HNO 放出化合物である AS 以外では R-SONH₂ のピークはほとんど検出されないことが得られた MRM クロマトグラムよりわかった (図 7)。よって、R-SONH₂ は HNO 特異的マーカーになり得ることが示唆された。

しかしながら、HNO 放出化合物 AS の場合と同様、NO 関連物質放出化合物の存在下でも R-SS-R が生成すること、また、その他の副生成物も生成することが高分解能質量分析装置 (LCMS-IT-TOF、Shimadzu 社製) を用いた分析により明らかとなった。

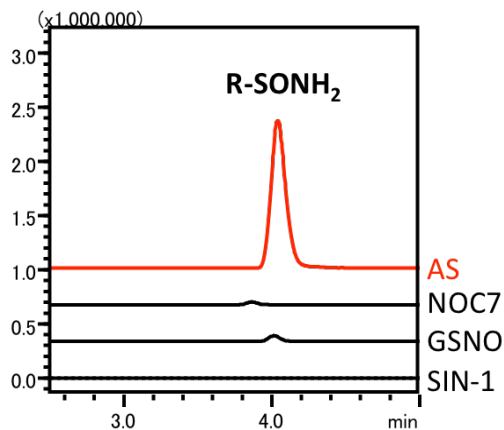


図 7

本研究により質量分析法を用いた HNO の検出法を開発した。しかしながら、培養細胞などの内在 HNO を検出するにはさらなる検出感度および反応特異性の向上が必要であると考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津元 裕樹 (TSUMOTO HIROKI)

京都大学・大学院薬学研究科・特定助教

研究者番号：00409385

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし