

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619008

研究課題名(和文) 自己組織性超分子の溶液質量分析を中心としたオミクス解析科学

研究課題名(英文) Studies on an omics-analytical science investigating self-assembly supramolecules in solution

研究代表者

山口 健太郎 (Yamaguchi, Kentro)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：50159208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：金属と非共有電子対をもつ有機配位子との錯形成から配位化合物が得られる。今回、金属と二種類の配位子を、配位子の割合を変化させながら混合し、得られる配位化合物を独自に開発した低温スプレーイオン化質量分析(CSI-MS)により追跡した。その結果、混合比の変化に伴って生成する錯体を捕捉でき、錯形成過程が解明された。CSI-MSは多成分系配位化合物の構築過程を追跡することができる手法である事が確認された。

研究成果の概要(英文)：The coordination compound is constructed from a metal and the organic ligand having an unshared pair of electron. Cold spray ionization mass spectrometry (CSI-MS) which we developed recently was adapted to the analysis of the resulting coordination compounds obtained from mixing a metal and two ligands. As the result, the coordination compound formation depending on the mixing ratio was detected. CSI-MS is probed to be a suitable method to analyze the construction pathways of the multiple ligand compounds.

研究分野：機器分析学

キーワード：質量分析 CSI-MS 溶液化学 錯体形成 構造解析

## 1. 研究開始当初の背景

従来、溶液中での分子およびその集合体の動的過程を直接観測する手法は殆ど知られていなかった。本研究者らはコールドスプレーイオン化質量分析法(CSI-MS)を開発し、これらの解析に取り組んできた。

タンパク質の構造と機能に関する探査は、現在 100 kDa をはるかに越える巨大分子の構造解析に達している。X線解析、NMR、および質量分析(MS)がこれを担っているが、依然として精密解析への難易度は高い。特に、質量分析(MS)は種々のソフトイオン化法の開発によりタンパク質分析への道が開かれたものの、巨大分子イオン化の簡便な手法は見出されていない。質量分析におけるソフトなイオン化としてMALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)とともに注目を集めているESI (Electrospray Ionization)は、大気圧下で非常に強い静電場により標的化合物をイオン化する方法であり、一般に標的化合物は多価イオンを与え易く、高分解能で標的高分子を測定できる。しかし、加熱を伴う急激な溶媒濃縮によって標的化合物を気化させるため、不安定な生体高分子の測定には不向きとされる。一方、本研究者の開発したCSI (Cold-Spray or CryoSpray Ionization)のイオン化機構はESIに類似する点も多いが、スプレーを冷却することで標的化合物の溶液の誘電率を上昇させ、溶媒和によるイオン解離を促進させる独自の手法である(*J. Mass Spectromet.*, **2003**, 38, 473)。これにより非常にソフトなイオン化が可能となり、近年、様々な不安定試料の測定に適用されている。本研究者は、アミノ酸であるL-prolineのクラスター形成に金属依存性があること、および、ヌクレオシドではデオキシグアノシンの金属カチオンによるクラスター形成及びナフチリジンダイマーによる崩壊までの様子をCSIにより明らかにした。さらに、2 ~ 4重鎖DNAの構造解析及び、生理的条件下に近い状態におけるタンパク質(ウシ血清アルブミン)-薬剤(サリチル酸)複合体解析が可能であることを明らかにした(*BUNSEKIKAGAKU*, **2004**, 53, 457)。しかし、ソフトなイオン化であるCSIでもなお、観測できる分子量に限界があり、100 kDa以上の生体高分子および、これらと低分子有機化合物複合体の解析は依然として困難である。

一方で化学分野における質量分析法の

用途は発展があまりなく、古くから行われている合成生成物の同定を主な用途としていた。その中で自己組織化という概念を用いて、巨大な錯体を合成することが行われてきた。これらのキャラクタリゼーションで、既存の質量分析法では、非共有電子対と金属との間に生じる配位結合を壊してしまうためにこれを用いることができなかった。しかし、CSI-MSにより、ESI法では壊れていた中空状の自己組織化錯体が、カウンターアニオンの数に応じた多価イオンを生じ、且つ、溶媒付加を伴った状態で壊れることなく検出することができるようになった。このように配位結合だけでなく、溶媒を保持したまま検出されたことから、本手法は溶液中の姿をすくい取ることのできるソフトなイオン化法にたとえることができる。現在までに、自己組織化で得られる錯体が数多く報告されてきた。たとえば、スクエア型や四面体型、正八面体構造、そして球体といった様々な形が構築され、それらのキャラクタリゼーションが行われてきた。また、ダンベルと棒構造を持つロタキサンや輪が互いに非共有結合的に貫通したカテナン構造体がわずかに数段階という短いステップで構築されてきた。そして、これらを無限に伸長させた構造体に相当するmetal-organic frameworkやcoordination polymerといった構造体も配位結合をもちいて構築されている。

## 2. 研究の目的

これらの自己組織化錯体は、配位結合という平衡反応を用いており、配位子の形状と配位位置を元に設計されている。設計指針と得られた構造体が異なった場合、その構造を解析することは大変複雑で困難となるために一般的に行われない。目的の錯体が得られた場合でさえ構造同定は主に<sup>1</sup>H NMRによるシグナルの変化、質量分析による質量数、そして、単結晶が得られた場合、単結晶X線構造解析によって行われる。しかしながら、その途中で得られる構造体の解析については<sup>1</sup>H NMRやX線構造解析では有益な情報が得られないことが多い。そのような状況下でCSI-MSによって、用いた配位子と金属、そしてそれらに付随するカウンターイオンや溶媒といったものの種類と数を同時に同定することを、ここでは目的とする。たとえば、単純なスクエア型錯体の構築過程を考えると、段階的に直線状配位子と金属がつながる過程やスクエアの半分の構造体を構築し

て、二量化によってスクエア錯体を構築する過程、また、金属と直線状配位子が一組組み上がった後、それらが一度に集合して四量化する過程が考えられる(図1)。このような単純な構造体の構築過程でさえ、現在、その詳細は明らかにされていない。

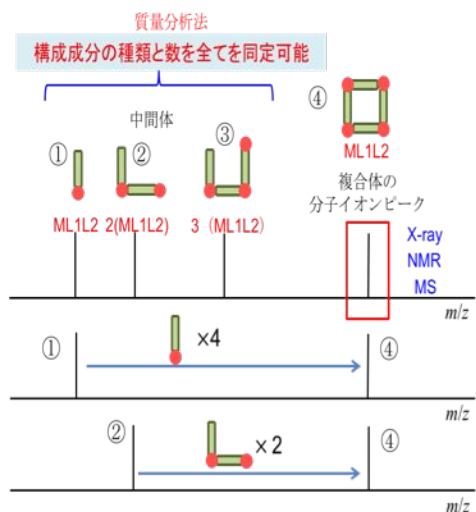


図1 自己組織化錯形成過程の複数錯形成経路の可能性と質量分析的検出の様子。

### 3. 研究の方法

本研究では、CSI-MSによって、自己組織化錯体のような多成分系錯形成における生成物を濃度および温度の条件から追跡可能か検討した。用いた配位子は金属の配位環境を保護する三座 Pybox 配位子誘導体とピラー状二座配位子、金属としては  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  を用いた。ピラー状配位子は金属同士をつなぎ止める役割があるため、配位化合物の成長とともに溶解性が下がる。一方で、配位環境を保護する配位子は配位化合物の溶解性を維持するのに役立つ、また、配位性金属として用いた Cd は複数の同位体を持つため、質量分析法において容易に金属含有化学種かどうか判別することができる。

### 3. 研究の方法

#### 1) 試料・装置

MS スペクトルは、Bruker daltonics 社のフーリエ変換質量分析装置 APEX-Qe 9.4T AS で測定した。CSI-MS 測定条件は、Capillary 3.5 kV, Spray Shield 3.0 kV, Neb Gas Flow 1.5 L/min, Dry Gas Flow 5.0 L/min, Dry Temp 20, シリンジの流速 180  $\mu\text{L}/\text{min}$ 。また ESI-MS 測定条件では Dry Temp 30 とした。Cadmium nitrate tetrahydrate, methanol, chloroform は和光純薬工業から購入し、精製せずにそのまま使用した。また 1,3-Di(4-pyridyl)propane(1,3

-DPP)は東京化成工業から購入し、精製せずにそのまま使用した。加熱にはオイルバスター( OBS - 200AM, アズワン)を購入し使用した。

#### 2) 試料の調製と測定

1,3-DPP(L2) (99.10 mg, 0.50 mmol)50.0 mL の  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  混合溶媒(4/1 v.v)へ溶解させ、1,3-DPP 10.0 mM 溶液を得た。Pybox-Cl(L1) (25.17 mg, 0.10 mmol)を 10.0 mL の  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  混合溶媒(4/1 v.v)へ溶解させ、Pybox-Cl 10.0 mM 溶液を得た。Cadmium nitrate tetrahydrate (CdA) (61.70 mg, 0.20 mmol)を 20.0 mL の  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  混合溶媒(4/1 v.v)へ溶解させ、Cadmium nitrate tetrahydrate 10.0 mM 溶液を得た。二種類の配位子を次のようにして混合した。二種類の配位子 L1、L2 の溶液を送液ポンプ(MINIPULS 3, GILSON, Co.Ltd.,France)を用いて順次送液し。混合した(図2)。混合した溶液は 15 分間ずつ試験管に取り分け。L1:L2 の割合を経時的に変化させた 12 本の溶液を調製した。取り分けた溶液を 2.0 mL とり。金属 M 溶液を 1.0 mL 入れて攪拌した。錯形成のためにオイルバス(OBS - 200AM、アズワン)で 50 5 日間加熱した。溶液攪拌直後と 5 日間加熱後の溶液について CSI-MS 測定を行った。

図2 溶液の混合方法の概略図(左)と用いた装置図(右)



#### 3) 溶液中における配位子比の計算

送液ポンプを用いて異なる二種類の溶液 A、B を混合した場合の濃度変化について考える。図3に示すように溶液 A、B の体積を  $V_a$ 、 $V_b$ 、ポンプの送液速度  $v$  L/h とする。ある時間  $t$  における溶液 B 中の溶液 A と B の濃度を  $C_A$ 、 $C_B$  とすると、次式が成り立つ。

$$\frac{dC_A}{dt} = -\frac{v}{V_b}C_A + -\frac{v}{V_b}C_{A0} \quad 1-2-1$$

$$\frac{dC_B}{dt} = -\frac{v}{V_b}C_B \quad 1-2-2$$

ここで  $V_b = V$ 、 $t = 0$  における濃度  $C_A = 0$ 、 $C_B = C_{B0}$  として微分方程式をそれぞれ解くと、

$$C_A = C_{A0} \left| 1 - \exp \left( -\frac{v}{V} t \right) \right| \quad 1-2-3$$

$$C_B = C_{B0} \exp \left( -\frac{v}{V} t \right) \quad 1-2-4$$

となる。実験的に流速を求めたところ、 $v = 10$  mL/h であった。実験時は  $V = 10$  mL だったので、そのときの濃度変化割合を求めると図 4 のようになった。さきの実験条件から  $C_{A0} = C_{B0} = 10$  mM であり、且つ 15 分おきに溶液を取り分けたので、その区間の溶液変化を直線であると見なし、平均値を各試料濃度とした。

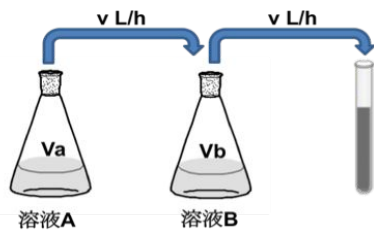


図3 溶液濃度計算を行った溶液混合。

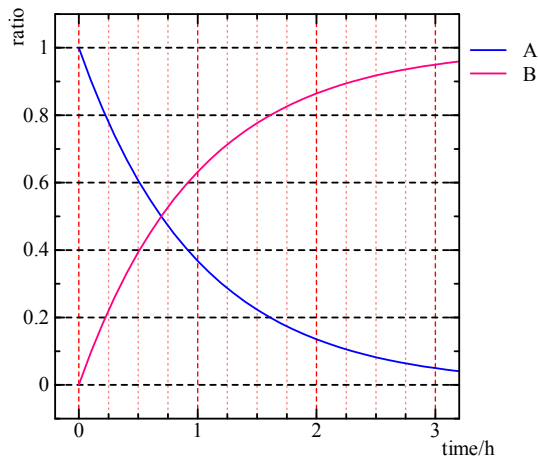


図4 溶液濃度変化の割合表示 実際の濃度はそれぞれ 10 mM 溶液を用いた。

#### 4. 研究成果

##### 1) 配位子比変化による CSI - MS スペクトルの帰属および推定構造

混合配位子溶液と金属溶液を混合させた後、配位子比の異なる 12 条件を 0 日目として CSI - MS 測定条件で測定した。その結果を図 5 に示す。配位子の割合に応じて観測されるイオンピークの数や種類が変化している様子が分かった。そこで  $L1/L2 = 3.6/6.4$  で観測されるイオンピークからイオンピーク群について帰属を行った(図 6)。帰属から Cd と Pybox 錯体および Cd と 1,3- DPP 錯体がそれぞれ生成しており、且つ Cd と Pybox、1,3-DPP が全て含まれる錯体の観測に成功した。実測スペクトルと同位体パターン

比較の 1 例(図 7)及び、得られた化学式から推定される構造式(図 8)を示す。しかしながら、複数の配位子と金属からなる構造体については、類推される構造がいくつかあるため、構造の同定はできなかった。例えば、 $m/z$  625 における構造は、図 8 (c)にあげるような構造体と複数考えられる。また、 $L1/L2 = 2.9/7.1$  の割合のとき、二種類の配位子を含む複合体ピークは最大値となった。

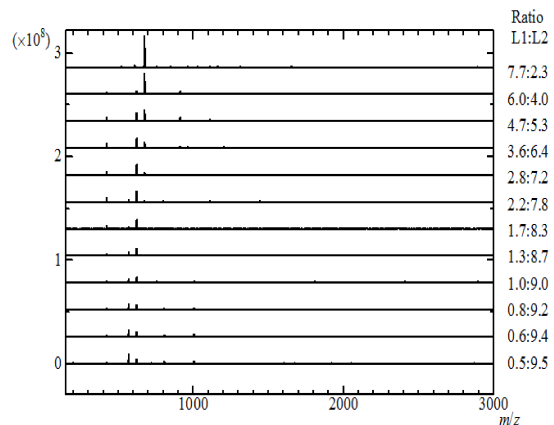


図5 二成分配位子混合比と錯形成を表す CSI - MS スペクトル(加熱前)。配位子の濃度を右に表記する。

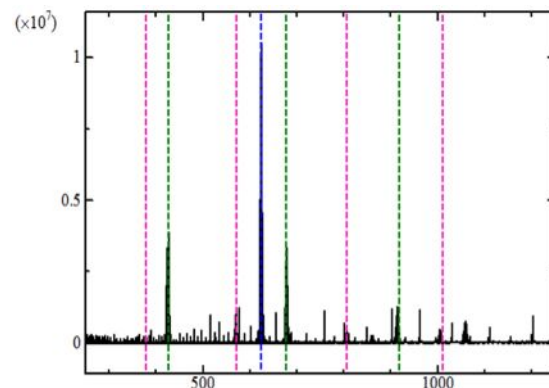


図6 攪拌直後 90min( $L1/L2=3.6/6.4$ )の CSI - MS スペクトルと解析に用いたイオンピークの表示: ピンクは直線状配位子のみを含む錯体、緑は Pybox 配位子のみを含む錯体、青は両方の配位子を含む錯体。

##### 2) 配位子変化による CSI - MS スペクトルのイオン強度解析と化学情報

配位子濃度変化に応じたイオンピーク強度変化について調べるために、各配位子比において帰属を行ったピークの強度を抽出し、それらの強度の総和を 1 として規格化した。

(a)  $m/z = 426$

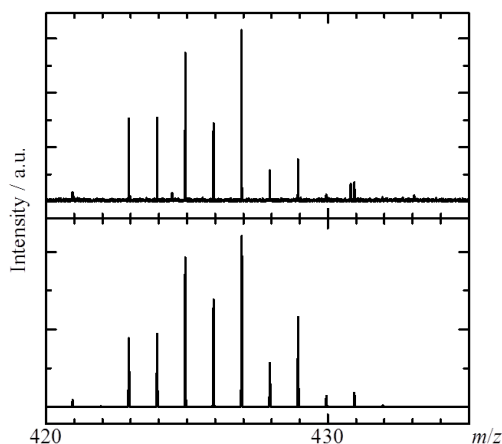
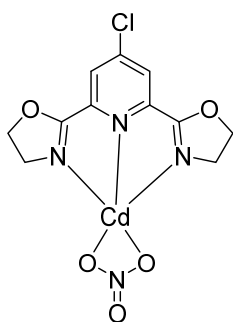
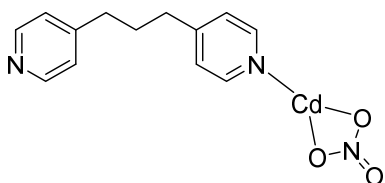


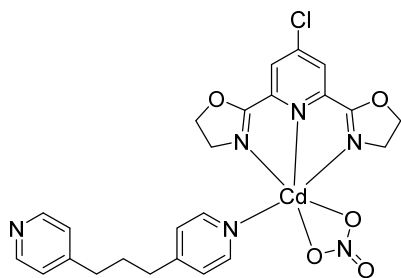
図7 実測スペクトルと同位体パターンの比較図。  
上に実測スペクトル, 下に同位体パターンを示す。



(a) [Cd(L1)A]<sup>+</sup>



(b) [Cd(L2)A]<sup>+</sup>



(c) [Cd(L1)(L2)A]<sup>+</sup>

図8 推定構造

### 3) 結果

本研究では、配位結合によって構築される自己組織化錯体の配位過程の追跡が可能かを検討するために、配位環境を保護する配位子と金属同士をつなぐ配位子と Cd 金属との錯形成過程を CSI - MS によって追跡した。配

位子の混合比を変えて、錯形成を行ったところ、二つの配位子が存在する条件下で二つの配位子を含む錯体が生成していることが CSI - MS でわかった。また、より詳細な溶液動態を調べるために、酸塩基の概念をそのまま用いて、存在率と濃度の関係を調べたところ、傾きの議論から平衡反応式を導出でき、得られた式は化学的に意味のある変化を示しており、ルシャトリエの法則に従うことがわかった。また、加熱を行うと二つの配位子を含んだ成分が減少したことから、CSI - MS により錯形成過程を追跡できることがわかった。さらに ESI で測定すると CSI - MS で観測された二種類の配位子を含む化学種が消失することがわかった。このことから、二種類の配位子を含む化学種はエネルギー的に弱い化学種であることがわかった。以上より、CSI - MS は多成分系配位化合物の構築過程を追跡することができる手法である事が確認された。

### 5. 主な発表論文

(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5件)

Double Helices of a Pyridine-Appended Zinc Chlorophyll Derivative, Shinozaki, Y.; Richard G.; Ogawa, K.; Yamano, A.; Ohara, K.

Yamaguchi, K.; Kawano S.; Tanaka, K.; Araki, Y.; Wada, T.; Otsuki, J.

*J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, 135, 5262-5265.

Cold-Spray Ionization Mass Spectrometry: Applications in Structural Coordination Chemistry, Yamaguchi, K.

*Mass Spec. Soc. J.*, **2013**, 2, S0012

Solvent-dependent Assembly of Discrete and Continuous CoCl<sub>2</sub> Adamantane-based Ligand Complexes: Observations by CSI-Mass Spectrometry and X-ray Crystallography

Ohara, K.; Tominaga, M.; Azumaya, I.; Yamaguchi, K.

*Anal. Sci.*, **2013**, 29(8), 773-776.

Coordination Oligomers and Polymers of an Oxazole-appended Zinc Chlorophyll Derivative Shinozaki, Y.; Yoshikawa, I.; Araki, K.; Ohara, K.; Yamaguchi, K.; Kawano, S.; Tanaka, K.; Araki, Y.; Wada, T.; \*Otsuki, J.

*Chem. Lett.*, **2014**, 43, 862-864.

Self-Assembly of an Organo-Palladium

Molecular Basket that Encapsulates  
Cobalticborane Anion in Water  
Mu, Y-J.; Yu, L-N.; \*Jiang, X-F.; \*Yu, S-Y.;  
Yamaguchi, K., *Inorg. Chem. Commun.*, **2014**, *44*,  
119-123.

〔学会発表〕(計 7件)

小原一郎, 山口健太郎 (2014). 錯体を対象としたコールドスプレーイオン化質量分析法における精密質量検出と組成式解析法. 日本化学会第94春季年会 3月27日~30日, 愛知

林侑加子, 小原一郎, 山口健太郎 (2014). CSI-MSによる二種類の多座配位子を用いた錯形成追跡. 日本薬学会第134年会, 3月27日~30日, 熊本

小原一郎, 綾野武司, 山口健太郎 (2014). 二成分配位子による Co 錯体の精密質量による追跡. 第 62 回質量分析総合討論会, 5月14日~16日, 大阪

小原一郎, 山口健太郎 (2014). 弱い相互作用からなるオリゴマー化学種の精密質量分析による追跡. 第 74 回分析化学討論会, 5月24日~25日, 福島

小原一郎, 山口健太郎 (2014). CSI-MS法による配位子比依存錯形成状態の溶液化学議論の可能性. 日本分析化学会第63年会, 9月17日~19日, 広島

Cold-Spray Ionization Mass Spectrometry of Coordination Complexes Ohara, K.; Yamaguchi, K., 5<sup>th</sup> Asia Oceania Mass Spectrometry Conference & 33<sup>rd</sup> Chinese Society for Mass Spectrometry Annual Conference (Beijing, China, 2014) Jul 16-19.

Continuous Complexation of CoCl<sub>2</sub> and Admantane-Based Ligands Observer by CSI-MS Ohara, K.; Tominaga, M.; Azumaya, I.; Yamaguchi, K., 20<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference (Geneva, Switzerland, 2014) Aug 24-29.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口健太郎 (YAMAGUCHI KENTARO)  
徳島文理大学・薬学部・教授  
研究者番号：50159208

### (2) 研究分担者

瀬高 渉 (SETAKA WATARU)  
首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授  
研究者番号：60321775

川幡正俊 (KAWAHATA MASATOSHI)  
徳島文理大学・薬学部・講師  
研究者番号：00441593

小原一郎 (KAZUAKI OHARA)  
徳島文理大学・薬学部・助教  
研究者番号：60581775

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：