

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24619010

研究課題名(和文) クリック反応を鍵とした標的分子選択的イオン化プローブの開発と展開

研究課題名(英文) Ionization chemical probes for selected target molecules with click reaction

## 研究代表者

山垣 亮 (Yamagaki, Tohru)

公益財団法人サントリー生命科学財団・その他部局等・研究員

研究者番号：40313209

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)：標的化合物を選択的にイオン化させるプローブを目指し、2つのモデル研究を行った。ひとつはMALDI-MSを念頭にして標的化合物にマトリックスを直接結合させて、イオン化効率が高まることを検討した。もう一つはホスト・ゲスト相互作用を利用し非共有結合で選択的に相互作用する化合物のイオン化効率を上げることを検討した。

2-アントラセンカルボン酸とサブスタンスPを結合させMALDI-MS測定でそれ自身でもイオン化した。アミノ・シクロデキストリンとセサミンを相互作用させESI-MSでイオン化させると、セサミンが分解せずにその複合体を観測することができた。

研究成果の概要(英文)：We designed two types of the chemical probes to induce the ionization of the target molecules. Matrix-like compound of 2-anthracenecarboxylic acid (2-AC) was directly bound to the target molecule of substance P (Sub-P). The complex compound (Sub-P/2-AC) was able to be ionized in MALDI-MS. In addition, 1-AC and 9-AC did not work. We could not identify that the complexes of Sub-P/1-AC and Sub-P/9-AC were synthesized or the complexes could be ionized in MALDI-MS.

In another way, the target molecules are selected with amino-cyclodextrin by the host-guest interaction, and the selected molecules can be ionized selectly because the amino group can be a charge center in amino-cyclodextrin. Sesamin is a labile compound and decomposes in (+)ESI-MS, but the complex of sesamin and amino-cyclodextrin can be detected in ESI-MS without the decomposition. In this case, the target molecules interacting with cyclodextrin can be ionized as the host-guest complex.

研究分野：生物有機科学

キーワード：質量分析 イオン化 ホスト・ゲスト 相互作用

### 1. 研究開始当初の背景

質量分析を中心としたオミクス解析では、標的物質の「イオン化」効率を上げることが成功の鍵となる。選択した化合物群のイオン化を劇的に向上させる化学プローブを、「クリック反応」を鍵として設計・合成し、オミクス解析、MS イメージングへと適用する。近年、健康食品として注目されるポリフェノール配糖体の植物内生合成過程や体内動態中の標的タンパク質の網羅解析へと応用し、従来ポリフェノール類の主活性と考えられている抗酸化作用とは異なる新たな生物活性の探索や、標的タンパク質、生体高分子との相互作用解明によりポリフェノール類の持つ全く未知の生物活性探索を行う。

### 2. 研究の目的

まず、化学プローブを利用して標的の化合物のイオン化効率上がるか？を確認する必要があった。MALDI-MS ではイオン化マトリックスがレーザー励起により自身が爆発的にイオン化すると考えられている。そこで(1)イオン化マトリックスを化学プローブとして直接標的化合物に共有結合させ、MALDI-MS でイオン化させることを試みた。また、(2)ホスト・ゲスト相互作用を利用して標的化合物を選択的に選び出し、直接イオン化させることをもコンセプトとして検討を行った。即ち、プロトン付加分子  $[M+H]^+$  の生成イオン化効率が高いアミノ化シクロデキストリンを利用して、シクロデキストリンの包摂能から化合物を選択し、複合体の形でイオン化させることを試みた。

### 3. 研究の方法

(1) ペプチドホルモンであるサブスタンス P(Sub-P) にアントラセンカルボン酸 (anthracene carbonic acid(AC)) を結合させ MALDI-MS で直接イオン化させる。

(2) セサミンをアミノ・シクロデキストリン(N-CyD)で包摂させセサミン・N-CyD 複合体として(+)ESI-MS にてイオン化させる。セサミンは(+)ESI-MS で容易に分解し、それ自体を観測することが難しい。N-CyD へ包摂させることで不安定な化合物もそのままイオン化させることを試みた。

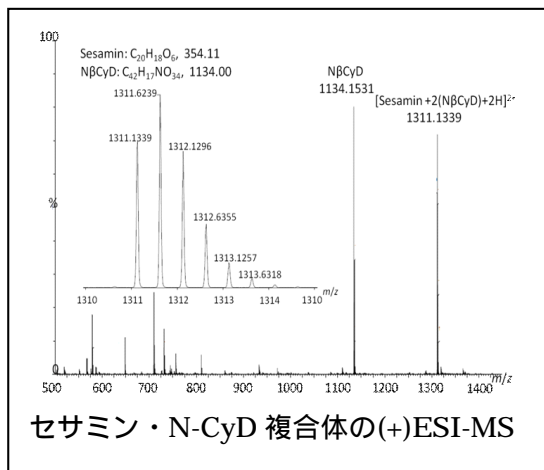
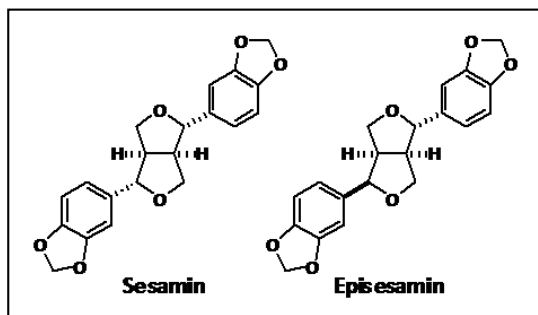
### 4. 研究成果

(1)イオン化マトリックスを入れずにサブスタンス P を MALDI-MS で直接観測してもイオン化はしない。そこで、アントラセンカルボン酸を結合させて MALDI-MS で観測した。アントラセンカルボン酸は UV 吸収能のあるベンゼン環が3つ連なった化合物でそれぞれは共役二重結合が共役している。またカルボン酸の位置の違いから3種類が存在する。(1-AC, 2-AC, 9-AC) そのうち、(2-AC/Sub-P) はイオン化されわずかに観測された。この研

究成果から、不揮発性のペプチドのような化合物にイオン化マトリックス様の化合物を共有結合させると、それ自身で直接イオン化することがわかった。

一方、(2-AC/Sub-P)以外の他の(1-AC/Sub-P)、(9-AC/Sub-P)はイオン化されなかった。

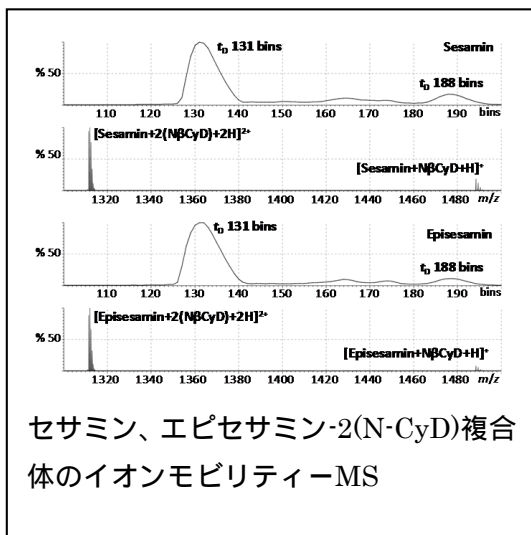
(2)セサミンはゴマの種子に含まれるリグナン類の天然物化合物で、これまで LC-MS による分析も広く行われているが、(+)ESI-MS ではイオン化の際どうしても脱水反応が進行してしまい、プロトン付加分子としては観測されていない。そこで、アミノ・シクロデキストリンをイオン化化学プローブとして不安定なセサミンを包摂させ、複合体の形としてイオン化させることを試みた。



セサミンは N-CyD に包摂させ 1:2 の複合体を形成させることがわかった。精密質量からセサミンは脱水されず、分子そのままイオン化されていることがわかった。また N-CyD それぞれがプロトン付加分子としてイオン化されており、全体の(1:2)複合体は電荷2価でイオン化されていた。アミノ基は(+)ESI-MS でプロトン付加され易いことがわかっており、その物性から N-CyD がイオン化効率を上げるイオン化化学プローブとして機能していることが明らかとなった。

さらに、セサミンにはエピセサミンという構造異性体があり、シクロデキストリンと相互作用させることで、構造異性体間の分子形状をさらに強調させることができないか？と

期待してセサミン、エピセサミン-2(N-CyD)複合体をイオンモビリティ分離を行った。イオンモビリティは窒素などのガスを封入したイオン・チューブ中をイオンを移動させ、イオンの分子形状で分離するという装置だ。残念ながらセサミン、エピセサミン-2(N-CyD)複合体をイオンモビリティMSで分離して観測することには至らなかった。



今後、マトリックスの直接結合によるプローブと非共有結合を利用した相互作用を利用する標的化合物選択性プローブのコンセプトを推し進めたい。

#### 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 1件)

Kohtaro Sugahara, Manabu HORIKAWA, Tohru YAMAGAKI,

“Amino-β-cyclodextrin complex assisted ionization for labile sesamins and their ion-mobility separation in ESI Q-TOF MS” *Mass Spectrometry Letters*, (査読あり) Vol. 6, No. 1, 17-20 (2015).

Tohru YAMAGAKI, Kohtaro Sugahara, Takehiro Watanabe.

“Amino and acetamide functional group effects on the ionization and fragmentation of sugar chains in positive-ion mass spectrometry.”

*Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (査読あり)

Vol. 25, 95-103 (2014).

Tohru YAMAGAKI, Takehiro Watanabe, Masaki Tanaka, Kohtaro Sugahara,

“Laser-induced hydrogen radical removal in UV MALDI-MS allows for the differentiation of flavonoid monoglycoside isomers.”

*Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, (査読あり)

Vol. 25, 88-94 (2014).

〔学会発表〕(計 4件)

Tohru Yamagaki, Kohtaro Sugahara, Takehiro Watanabe, Masaki Tanaka

“Laser-Induced Hydrogen Radical Removal in UV MALDI-MS Allows for the Differentiation of Polyphenol Isomers”

20th International Mass Spectrometry

Conference August 24–29 2014, Geneva

Kohtaro Sugahara, Takehiro Watanabe, Tohru Yamagaki

“Localization of Flavonoids Affects Blue Color Expression of Flower Petals”

20th International Mass Spectrometry

Conference 24–29 August 2014, Geneva

Kohtaro Sugahara, Takehiro Watanabe, Tohru Yamagaki

“Localization and Composition of Flavonoids Change in Petal Growth Steps of *Viola* sp.”

The XXVIIth International Conference on

Polyphenols & The 8th Tannin Conference

2–6 September 2014, Nagoya University

山垣亮、菅原孝太郎、脊川晶子、渡辺健宏.

「生体分子・金属付加イオンの電荷位置とフラグメンテーション」

第41回BMSカンファレンス 2014.7-9 (能登)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sunbor.or.jp/>

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

山垣 亮 (YAMAGAKI, Tohru)

公益財団法人サントリー生命科学財団

研究者番号：40313209

### (2)研究分担者

堀川 学 (HORIKAWA, Manabu)

公益財団法人サントリー生命科学財団

研究者番号：