

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659007

研究課題名(和文)新規MALDI-MSマトリックスの分子設計、合成、分子論

研究課題名(英文)Molecular design, synthesis, and molecular mechanism of MALDI-MS matrices

研究代表者

新藤 充 (SHINDO, MITSURU)

九州大学・先導物質化学研究所・教授

研究者番号：40226345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：MALDI-MSは高分子のみならず低分子化合物の高感度迅速分析にも適用が検討されているが、イオン化補助剤のマトリックスに関する研究は未開拓である。本研究では、系統的な有機合成による新規有機マトリックスの開発を目指した。汎用の9-アミノアクリジン(9-AA)を評価基準として、各種誘導体を合成し、それらをマトリックスとして200種類の生体代謝小分子に対してMALDI-MS測定を負イオンモードで行い評価した。その結果、アミノ基が、2級、1級が必須で、アクリジンをアントラセンに変換した化合物も良好なイオン化能を示し、更なる検討で9-AAよりイオン化能が優れたマトリックスの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, MALDI-MS has been used for low-molecular-weight metabolite analysis because it is a highly sensitive, high-throughput, and low sample-consuming technique. Although metabolites are predominantly organic acids, negative ionization mode has rarely been utilized due to poor sensitivity with commonly used matrices such as 9-aminoacridine (9-AA). Our purpose is synthesis and evaluation of new matrices for low-molecular metabolite MALDI-MS analysis in negative mode. More than 60 compounds including acridine, anthracene and quinoline derivatives were synthesized as MALDI-MS matrix candidates. Using these synthetic matrices, 230 kinds of low-molecular weight metabolites were measured by MALDI-TOF-MS in negative ionization mode. Several new synthetic matrices were found to be more efficient than 9-AA. Especially, aminoanthracene derivatives provided much better analyte signals allowing 51 kinds of amino acid derivatives to be detected in negative mode.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：質量分析 MALDI マトリックス 有機合成 負イオンモード アミノ酸

## 1. 研究開始当初の背景

MALDI-MS(マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法)はタンパク質、多糖、核酸など生体高分子の質量分析を実現したソフトイオン化質量分析法であり、生化学や分子生物学で極めて重要な分析機器として位置づけられている。本法で必要とされるサンプル量はピコモル(pmol)からフェムトモル(fmol)、最近ではアトモル(amol)レベルに迫るほどの超微量で分析可能であり、質量分析法の中で最も高感度なイオン化法とされている。さらに、ごく近年、MALDI-MSを用いた質量顕微鏡法によるマスイメージングが最先端の医療技術として注目され、応用範囲が一気に拡大している。こうした背景のもと、MALDI-MS法の特性を生かして、低分子有機化合物の分析への適用が近年進められている。微量生体内代謝物の網羅的解析を必須とするメタボローム解析にとって、MALDI-MSによる低分子の高感度迅速一斉分析は劇的な威力を発揮すると期待されている。さらに、マスイメージングに適用し、生体代謝小分子の組織内もしくは細胞内局在を明らかにすることができれば、MALDI-MSはメタボローム解析の切り札となりうる。MALDI-MSは対象サンプルをマトリックスと呼ばれるイオン化補助剤と混合し、レーザー光を照射してマトリックスおよびサンプルを気化・イオン化し質量分析する。装置開発を含めた一連の研究は分析化学領域であるが、ここでマトリックスに目を転じると、その大半が市販の既知化合物である。生体高分子および正イオンモードでの有機低分子測定に有効なマトリックスは汎用されているものもあるが、アニオン性生体内代謝産物を測定する負イオンモードに適した高性能マトリックスはまだ見出されていない。さらにマトリックスの分子構造と機能の相関に関する系統的研究はほとんど報告されておらず、イオン化機構に関しても仮説の域を出ていない。もしマトリックスを分子設計し自在に合成できれば研究の劇的な進展が望める。

## 2. 研究の目的

系統的かつ論理的にマトリックスを分子設計、有機合成し、その性能を精査することで新規高感度高性能マトリックスを開発することを研究目的とする。

## 3. 研究の方法

特に研究が遅れている負イオンモードでのマトリックスの開発を行う。生体内にはカルボン酸などの負イオンモードでの件  $k_y$  ずつに適した分子が多数存在しており、さらに付加イオンの影響もないことから解析が容易である。研究開始当初で唯一用いられているマトリックスである 9-aminoacridine (9-AA)を起点として、アミノ基、複素芳香環等を系統的に有機合成にて変換し、構造機能

相関を明らかにする。その知見を元に、レーザー励起基、イオン化補助基、試料親和性基(物性補助基)を精査し新規高感度マトリックスを合理的に分子設計したうえで有機合成する。一群の合成マトリックス(ライブラリー)と連携研究者が構築している生体小分子ライブラリー(400種超)との網羅的一斉MALDI-MS分析を行い、得られる膨大なデータから各種評価項目(感度、SN、生体試料親和性度、溶解性、結晶性等)を精査し対象化合物群とマトリックスの最適なコンビネーションを明らかにする。以上の結果から対象化合物特異的マトリックス、万能マトリックスを選択する。生体成分を対象とした質量分析イメージングへの適用も検討する。

## 4. 研究成果

9-アミノアクリジン(9-AA)を評価基準として、その誘導体合成から研究を開始した。まずは9-AAのアミノ基にアルキル基、アリール基、アルコキシカルボニル基等の置換基を導入し2級、3級アミノ基へと変換した化合物を20種類以上合成した。それらをマトリックスとして200種類の生体代謝小分子に対してMALDIMS測定を負イオンモードで行いそれらのイオン化能を評価した。その結果、アミノ基が3級の場合ほとんどイオン化能を示さなかったが、2級アルキル、2級アリール基ではイオン化能を示した。一方、2級でもカルバメートとするとまったくイオン化能を示さなかった。以上から、1級、2級アミノ基が必須であることが分かった。また、この結果はN-H基の存在が必須であることを示した。またアクリジン骨格をアントラセンやキノリンに変換した化合物も10種類以上合成したところ、いくつかの化合物で良好なイオン化能を示すことがわかり、アクリジンは必須でないことが分かった。以上の初期検討において生体代謝物の中でもアミノ酸が比較的感度良く検出されることが分かったので、次に分析対象をアミノ酸およびその誘導体の約50種に絞り、マトリックスの構造機能相関を詳細に検討した。

まずマトリックスの芳香環の重要性について精査した。アクリジンをアントラセンに置き換えたところ、9-アミノアントラセンが9-AAよりも高いイオン化能を示した。しかし9-アミノアントラセンは物性として不安定であったので、部分還元を行ったアミノテトラヒドロアントラセンやアミノ基の置換位置が異なるアミノアントラセン、アミノアントラセンの二量体などを合成し、マトリックスとしての機能を調べたところ、いくつかの化合物で感度および適用範囲の広い優れたマトリックスを見出すことができた。測定したアミノ酸誘導体51種のうち50種が最高100 fmol オーダーの検出感度で分子イオンピークを見出すことができた。それらのUV吸収とイオン化能とはある程度の相関がみられた。また、アミノ基の $^1\text{H-NMR}$ の化学シフト

とも相関がみられたことから、アミノ基の塩基性が強いことも重要であるとの示唆を得た。

以上のように本挑戦的萌芽研究では MALDIMS の負イオンモードでのアミノ酸の検出に有効なマトリックスを見出すことができた。マトリックスに関する研究のほとんどは市販の化合物を用いたスクリーニングと考えられ、ほとんど例のない合成化学を駆使した系統的な研究である。イオン化の機構に関してはいまだ解明されていないが、マトリックスの分子構造からのアプローチによってもその解明の糸口を探り当てることができると考えられる。今後、様々な生体代謝小分子の高感度検出が可能となり、マトリックスの開発を進め、メタボローム解析や質量分析分子イメージング分野へ応用されることが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

Synthesis and Reactions of Ynolates via a Stop-Flow Method with a Flow Microreactor, Toshiya Yoshiwa, Satoshi Umezu, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Mitsuru Shindo, J. Flow Chem. in press (査読有)

cis-Cinnamic acid selective suppressors distinct from auxin inhibitors. Katsuhiko Okuda, Keisuke Nishikawa, Hiroshi Fukuda, Yoshiharu Fujii, Mitsuru Shindo, Chem. Pharm. Bull. in press. (査読有)

Generation of Ynolates via Reductive Lithiation Using Flow Microreactors, Satoshi Umezu, Yoshiya Yoshiwa, Manabu Tokeshi, Mitsuru Shindo, Tetrahedron Lett. 55, 1822-1825 (2014). (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.01.147>

MALDI Efficiency of Metabolites Quantitatively Associated with their Structural Properties: A QSPR Approach, Daichi Yukihira, Daisuke Miura, Yoshinori Fujimura, Yoshikatsu Umemura, Shinichi Yamaguchi, Shinji Funatsu, Makoto Yamazaki, Tetsuya Ohta, Hiroaki Inoue, Mitsuru Shindo, Hiroyuki Wariishi, Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 25, 1-5 (2014). <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-013-0772-0> (査読有)

$\alpha$ -Substituent Effect on Olefination of Ester Carbonyl Groups with Ynolates, Satoshi Umezu, Mitsuru Shindo, Tetrahedron Lett. 54, 6871-6873 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.10.027> (査読有)

Design and Synthesis of Conformationally Constrained Analogues of cis-Cinnamic Acid and Evaluation of Their Plant Growth Inhibitory Activity, Keisuke Nishikawa, Hiroshi Fukuda, Masato Abe, Kazunari Nakanishi, Yuta Tazawa, Chihiro Yamaguchi, Syuntaro Hiradate, Yoshiharu Fujii, Katsuhiko Okuda, Mitsuru

Shindo, Phytochemistry 96, 223-234 (2013). <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.10.001> (査読有)

Substituent effects of cis-cinnamic acid analogues as plant growth inhibitors, Keisuke Nishikawa, Hiroshi Fukuda, Masato Abe, Kazunari Nakanishi, Tomoya Taniguchi, Takashi Nomura, Chihiro Yamaguchi, Syuntaro Hiradate, Yoshiharu Fujii, Katsuhiko Okuda, Mitsuru Shindo, Phytochemistry, 96, 132-147 (2013) <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.013> (査読有)

Asymmetric Total Syntheses of Xanthatin and 11,13-Dihydroxanthatin using a Stereocontrolled Conjugate Allylation to  $\gamma$ -Butenolide, Kenji Matsumoto; Kuniyoshi Koyachi; Mitsuru Shindo, Tetrahedron 69, 1043-1049 (2013). [doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.077](http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.11.077) (査読有)

Molecular design, synthesis, and evaluation of novel potent apoptosis inhibitors inspired from bongkreic acid, Katsuhiko Okuda, Keisuke Hasui, Masato Abe, Kenji Matsumoto, Mitsuru Shindo, Chem. Res. Toxicol. 25, 2253-2260 (2012). <http://dx.doi.org/10.1021/tx300315h> (査読有)

Key Structural Features of cis-Cinnamic Acid as an Allelochemical, Masato Abe, Keisuke Nishikawa, Hiroshi Fukuda, Kazunari Nakanishi, Yuta Tazawa, Tomoya Taniguchi, So-young Park, Syuntaro Hiradate, Yoshiharu Fujii, Katsuhiko Okuda, Mitsuru Shindo, Phytochemistry 84, 56-67 (2012). <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.001> (査読有)

Palladium-Catalyzed Fluoride-Free Cross Coupling of Intramolecularly Activated Alkenylsilanes and Alkenylgermanes: Synthesis of Tamoxifen as a Synthetic Application, Kenji Matsumoto, Mitsuru Shindo, Adv. Synth. Catal. 354, 642-650 (2012). DOI: 10.1002/adsc.201100627 (査読有)

〔学会発表〕(計 49 件)

アレンを用いた多置換共役ジエンの立体選択的合成法の開発、水品直之, 松本健司, 新藤充, 日本薬学会第 134 年会、熊本大学、2014.3.27-30

Stemona アルカロイド類の全合成、池永大, 西川慶祐, 酒井健太郎, 松本健司, 新藤充, 日本薬学会第 134 年会、熊本大学、2014.3.27-30

不均一系触媒を用いた芳香族アミン類の酸化的二量化反応、堂籠健斗, 石井孝典, 松本健司, 新藤充, 日本薬学会第 134 年会、熊本大学、2014.3.27-30

アミノ酸の微量検出に有効な負イオンモード用 MALDI-MS マトリックスの開発、石井孝典, 堂籠健斗, 行平大地, 三浦大典, 藤村由紀, 割石博之, 松本健司, 新藤充, 日本薬学会第 134 年会、熊本大学、2014.3.27-30

多置換トリプチセンの合成、梅津智、榮心勁、新藤充、日本薬学会第 134 年会、熊本大学、2014.3.27-30

アシル化を鍵反応とする有機合成、新藤充 帝京大学薬学部講演会、東京、2014.1.24(招待講演)

Total Synthesis of Stemonamine, Mitsuru Shindo, ISIS-8 (奈良) 2013.11.30(招待講演)

イノラートの反応と展開、新藤充、第 3 回大塚有機合成シンポジウム、徳島、2013.11.8(招待講演)

gem-ジアニオンの創製と新規連続反応の開発、松本健司、佐々木剛、横地敬太、新藤充 第 3 9 回反応と合成の進歩シンポジウム、福岡 2013.11.5-6

Design and Synthesis of Apoptosis Inhibitors, 新藤充 アライアンス G3 分科会、Technologies for Medical Diagnostic and Therapy Symposium、台湾台北 2013.10.21-22

アレロパシ のケミカルバイオロジー研究、新藤充、東北大学大学院薬学研究科講演会、仙台、2013.10.7

小分子測定用 MALDI-MS マトリックスの開発、新藤充、堂籠 健斗、石井孝典、寺井 康了、松本 健司、行平 大地、三浦 大典、藤村 由紀、割石 博之、第 8 回メタボロームシンポジウム、福岡 2013.10.3-4

Reactions of Ynolates and Synthetic Applications, M. Shindo, 10th International Symposium on Carbanion Chemistry, Kyoto, 2013.9.25(招待講演)

ボンクレキン酸を起点とするアポトーシス阻害剤の設計と活性評価、松本健司、陶山正樹、森脇拓也、蓮井啓祐、福永幸裕、奥田勝博、安部真人、狩野有宏、新藤充、第 55 回天然有機化合物討論会、京都、2013.9.18-20

メタボローム解析を指向した新規 MALDI-MS マトリックスの開発、石井 孝典、堂籠 健斗、寺井 康了、松本 健司、行平 大地、三浦 大典、藤村 由紀、割石 博之、新藤充、第 25 回若手研究者のためのセミナー、有機合成化学協会九州山口支部、2013.8.24

アミノ酸の高感度検出に有効な MALDI-MS マトリックスの開発 (九大院総理工・九大院生資環・九大レドックスナビ・九大バイオアーク・九大院農・九大先導研) 堂籠健斗・寺井康了・松本健司・行平大地・三浦大典・藤村由紀・割石博之・新藤充、第 50 回化学関連支部合同九州大会、2013.7.6、北九州国際会議場 (北九州市)

cis-桂皮酸の分子プローブを用いた蛍光イメージングと標的タンパク質の探索、福永幸裕、福田洋、西川慶祐、奥田勝博、新藤充、日本ケミカルバイオロジー研究会第 8 回年会、東京、2013.6.19-21

Stemonamine の全合成 (1). 分子内アシル

化による C 環の構築、池永大、西川慶祐、新藤充、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013.3.28-30

Stemonamine の全合成(2)、西川慶祐、池永大、松本健司、新藤充、日本薬学会第 1 3 3 年会、横浜、2013.3.28-30

cis-桂皮酸の分子プローブの合成、福田洋、西川慶祐、福永幸裕、新藤充、日本薬学会第 1 3 3 年会、横浜、2013.3.28-30

⑲ アポトーシス阻害活性を示す配座固定型トリカルボン酸の開発、陶山正樹、福永幸裕、奥田勝博、松本健司、新藤充、日本薬学会第 1 3 3 年会、横浜、2013.3.28-30

⑳ イノラートとベンザインとの環化付加反応によるトリプチセンの合成、梅津智、新藤充、日本薬学会第 1 3 3 年会、横浜、2013.3.28-30

㉑ 高機能性 gem-ジアニオンによるワンポット連続反応の開発、松本健司、佐々木剛、新藤充、日本薬学会第 1 3 3 年会、横浜、2013.3.28-30

㉒ cis-桂皮酸の植物組織内動態と相互作用タンパク質の探索、福永幸裕、福田洋、西川慶祐、新藤充、日本薬学会第 1 3 3 年会、横浜、2013.3.28-30

㉓ 植物他感作用を示す cis-桂皮酸の蛍光プローブの合成と分子イメージング、福田洋、西川慶祐、福永幸裕、新藤充、第 29 回日本薬学会九州支部大会 1C-10、熊本大学、2012.12.8-9、

㉔ アシル化をキーワードとする合成、新藤充、日本薬学会九州支部 特別講演会、長崎大学薬学部 2012.11.1(招待講演)

㉕ Total Synthesis of Stemonamine, Mitsuru Shindo, Cambodian Malaysian Chemical Congress, invited lecture, Siem Reap, Cambodia, 2012.10.21

㉖ イノラートを用いた stemona アルカロイド類の合成研究、西川慶祐、池永大、崔香花、八道健太郎、松本健司、新藤充、第 54 回天然有機化合物討論会、2012.9.20 東京農大

㉗ High-throughput analysis for metabolic dynamics and in situ metabolite imaging by MALDI mass spectrometry, Daisuke Miura, Yoshinori Fujimura, Shinichi Yamaguchi, Noriyuki Ojima, Mitsuru Shindo, Hiroyuki Wariishi, 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012), 2012.9.15-21, Kyoto International Conference Center

㉘ Development of MALDI-MS-based imaging technique for visualizing the green tea polyphenol EGCG in mammalian tissues, Yoshinori Fujimura, Yoon Hee Kim, Takatoki Hagihara, Daichi Yukihira, Ayumi Yamaguchi, Miho Irie, Diasuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Mitsuru Shindo, Hirofumi Tachibana, 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012), 2012.9.15-21, Kyoto International Conference Center

㉙ Design and synthesis of new efficient

MALDI-MS matrices for low molecular weight metabolites in negative ionization mode, Mitsuru Shindo, Yasuaki Terai, Daichi Yukihira, Daisuke Miura, Yoshinori Fujimura, Kenji Matsumoto, Hiroyuki Wariishi, 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012), 2012.9.15-21, Kyoto International Conference Center

③② Statistical Investigation of Metabolite Structure to Reveal the Principles for Preferred Ionization in MALDI using 9-aminoacridine, Daichi Yukihira, Yoshinori Fujimura, Mitsuru Shindo, Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, 19th International Mass Spectrometry Conference (IMSC2012), 2012.9.15-21, Kyoto International Conference Center

③③ アシル化をキーワードとする合成と展開、新藤充、日本薬学会北陸支部特別講演会、金沢大学、2012.7.6(招待講演)

③④ アレロパシー活性を示す cis-桂皮酸の蛍光及び赤色プローブの合成と分子イメージング、西川慶祐、福田 洋、福永 幸裕、奥田 勝博、新藤充、日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会、2012.6.7-8 京都大学

③⑤ イノラートの反応とその展開、新藤充、第10回次世代を担う有機化学シンポジウム、特別講演、2012.5.11、大阪大学

③⑥ 細胞死を制御する生体作用有機小分子の設計と合成、新藤充、附置研アライアンス H23 年度成果報告会、2012.4.24、東京工業大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：MALDI 質量分析用マトリックス  
発明者：新藤充、割石博之、三浦大典、藤村由紀

権利者：国立大学法人九州大学

種類：特許

番号：特願 2013-137028

出願年月日：2013/6/28

国内外の別：国内(国外申請中)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cm.kyushu-u.ac.jp/dv01/contents/research.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

新藤 充 (SHINDO, Mitsuru)

九州大学・先端物質化学研究所・教授

研究者番号：40226345

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

割石 博之 (WARIISHI, Hiroyuki)

九州大学・基幹教育院・教授

研究者番号：50253513

三浦 大典 (MIURA, Daisuke)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究

拠点・准教授

研究者番号：40532627

藤村 由紀 (FUJIMURA, Yoshinori)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究

拠点・准教授

研究者番号：20390304