

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26410166

研究課題名(和文) ペプチド・タンパクへの選択性に焦点を当てたフルオラス・分析化学の新機軸

研究課題名(英文) Innovation in fluororous chemistry focusing on selective analysis of peptides and proteins

研究代表者

能田 均 (Nohta, Hitoshi)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：20164668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生体試料中の生理活性ペプチド及びタンパク質の高感度分析のための高選択的かつ高効率な抽出法として、「フルオラスケミストリー」に基づいた次の2種方法論を開発した。(1)ペプチド中の特定官能基をパーフルオロアルキル基で修飾し、その誘導体をフルオラス溶媒抽出することにより、LC/MS分析に最適な前処理が可能となった。(2)配位結合能を持ったフルオラス性試薬を用いてリン酸化ペプチド補足してフルオラス溶媒抽出することにより、非リン酸化ペプチドと完全分離が可能となった

研究成果の概要(英文)：Highly selective and effective purification methods for peptides and proteins have been developed. One is for polyamino-containing peptides. The amino moieties of peptides are perfluoroalkylated with amine-reactive fluororous reagent, then the derivatives are highly selectively extracted to a fluororous solvent, followed by LC/MS/MS analysis. The other is for phosphorylated peptides. The Fe(III) immobilized fluororous reagent is designed and synthesized. The reagent reacts with phosphorylated peptides to form their fluororous chelates, those are extracted selectively into a fluororous solvent. The former is applied to the determination of brain peptides in rat brain samples, and the latter to the assay for protein kinase activity.

研究分野：分析化学

キーワード：フルオラス化学 前処理 ペプチド タンパク質 誘導体化 アミノ基 リン酸基

### 1. 研究開始当初の背景

分析対象物質への選択性を飛躍的に高めた方法論を構築するに当たり、従来コンビナトリアルケミストリーやグリーンケミストリーなどの分野で利用されていた「フルオラス」というツールは極めて有用であった。「フルオラス」とは、「親フルオロカーボン性」という意味の造語であり、極性には依存しないパーフルオロアルキル鎖同士がもつ特異な親和性のことを指す(フルオラス化合物はそれら同士、フルオラスな固相や溶媒とのみ親和性を示す)。申請者らは、これを利用し、「パーフルオロアルキル化した分析対象物質のみ」を、同じくパーフルオロアルキル基によって修飾された「フルオラス LC カラム」によって極めて選択的に保持させるという「フルオラス誘導体化-LC 分析法」を開発し、自然蛍光性の生理活性アミンや非ステロイド性抗炎症薬、シアル酸等の高選択的な分析に適用した。これらは、主に低分子化合物の選択的分析法として用いてきたが、今回その適用拡大を図るべく、「ペプチド・タンパクを対象とした選択的抽出・分析技術」として再構築・開発する。一般に、ペプチド・タンパクの分析には同定能の高い質量分析装置(MS)が利用される。しかしながら、生体内には数多くのペプチド・タンパクが存在しており、その中から目的のもののみを測定するためにはMS測定の前は何らかの抽出・精製技術を必要とする。従来より、その精製法として biotin-streptavidin の親和性を利用した古典的方法の他、immobilized metal affinity chromatography (IMAC) 法(例えば、*Anal. Chem.*, **71** (1999) 2883), lectin 法(例えば、*Anal. Chem.*, **75** (2003) 348A)などがしばしば用いられている。これらの方法は、確かに効果的ではあるものの、例えば、個々のペプチド・タンパクを認識し得る機能性分子・担体を個別に開発しなければならなかったり、対象によっては担体からの回収が不十分であったり、あるいはコスト面の問題であったり、改善すべき点が残っており、選択性を維持・向上させつつより有用な方法論を開発していくことが強く求められている。

### 2. 研究の目的

本研究において、新規かつ有用なペプチド・タンパク分析・抽出法として「フルオラスケミストリー」の概念を採り入れた方法論を提案する。すなわち本研究期間内に、(1)脳神経ペプチドをフォーカシングするマルチフルオラス誘導体化-LC-MS/MS 分析法、及び(2)配位結合能とフルオラスの選択性を融合したペプチド・タンパクの選択的抽出法の開発を試みる。

両方法は、培養細胞、小動物脳試料等の試料に適用し、その有用性を確認するとともに、適用可能なペプチド・タンパク質のサイズ、性質(極性、電荷、形状など)や試料の組成等を検討し、その適用範囲を見極める。

### 3. 研究の方法

#### (1) マルチフルオラス誘導体化による脳神経ペプチドのフォーカシング・LC-MS/MS 分析

脳神経・精神疾患に深く関与していると考えられている「ガラニン」、「ノシセプチン」、「バソプレシン」、「ニューロペプチドY」、「コレシストキニン」、「ニューロテンシン」、「サブスタンスP」などをモデルに、マルチフルオラスラベル化に関する基礎検討を行う。ラベル化試薬としては、フルオラス鎖長が  $CF_3(CF_2)_n-$  ( $n=2\sim4$ ) と短鎖で、かつペプチドが持つ官能基群を標識可能なものを用いる。単一官能基を複数個あるいは2つ以上の官能基を対象に誘導体化するなど、適宜調整しつつマルチラベル化の至適な条件を整える。具体的には、申請者らの先行研究において整えた条件をもとに、アミノ基には、アルデヒド型試薬による還元的アルキル化、カルボキシル基にはアミン型試薬によるアミド化反応、チオール基にはヨードアセトアミド型試薬によるアルキル化などを用いる。具体的には、例えば、ペプチドによっては Lys 含有数あるいは酸性アミノ酸含有数が異なり、その差を利用して各ペプチドのフルオラス導入数を調整する。バソプレシンについてはさらに Cys へとフルオラス基を導入することで他のペプチドとの差別化を図れる。フルオラス LC 分離後の検出には MS を利用する。

#### (2) IMAC 技術とフルオラスの融合によるペプチド・タンパクの選択的抽出

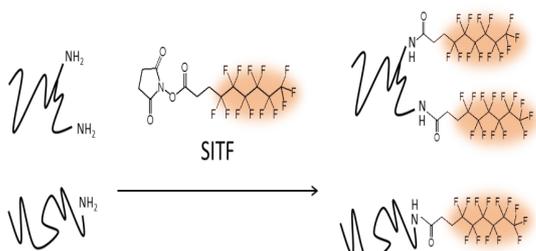
先ずは、イミノ二酢酸 (IDA) やニトリロ三酢酸 (NTA) などに代表される IMAC 用キレート試薬 (いずれも市販品を利用) へフルオラス基を導入・合成する。次いで、それらをフルオラス固相 (市販品) へ固定化する条件を整える。フルオラス相互作用による固相への脱着は、親フルオラス溶媒 (> 80% メタノールなど) 及び疎フルオラス溶媒 (< 50% メタノールなど) を調整することで容易に可能となる。キレート部位への金属類の固定化に関しては、既報(例えば、*J. Biochem. Biophys. Methods*, **49** (2001) 335, *Mol Cell. Proteomics*, **11** (2003) 1234, *Anal. Chem.*, **85** (2013) 8979 など) を参考に推奨される試薬を用いて行う。例えば、His-tag が導入されたタンパクの抽出・精製には Ni や Co を、リン酸化ペプチド・タンパクの抽出・精製には Fe, La, Zn などの金属類を利用する。固相カラム上に保持させたペプチド・タンパクは、適当な塩溶液で溶出可能ではあるが、その後の MS 分析を鑑み、塩を含まない親フルオラス溶媒で溶出させることもできる。

以上の方法のいずれも、実試料を用いたバリデーション試験を実施し、関連の疾患モデル動物試料や細胞試料などに各方法を適用し、実用化を指向した研究を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) マルチフルオラス誘導体化による脳神経ペプチドのフォーカシング・LC-MS/MS 分析

i) アミノ基 モデル化合物として、Insuline, glucagon, 前記脳内ペプチド (Dynorphin A, Galanin, Neurokinin A, Neurokinin B, Neuromedin C, Neurotensin, Orexin B, Somatostatine) を用い、アミノ基誘導体化用のフルオラス試薬として *N*-Succinimidyl-4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9-tridecafluorononanoate (SITF) を用い、四ホウ酸ナトリウム溶液下、40 45 分間反応させることにより、ペプチド内の全てのアミノ基にパーフルオロアルキル基が導入され(下図)、フルオラスカラムで導入個数に応じた保持が得られた。

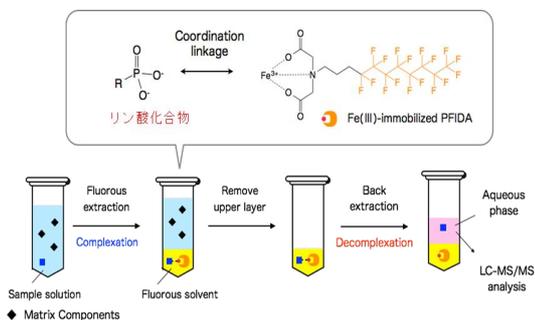


本法における標準品の検出限界は 0.4-40 nM であり、検量線の直線性 ( $r = 0.9993$ ) 及び再現性 (RSD 8.0%) は、共に良好な結果が得られた。さらに本法をマウス脳組織に適用したところ、Neurokinin A 及び Somatostatin を定量することができた。

チオール基 分子内ジスルフィド結合を有するペプチド (バソプレシン及びオキシトシン) を対象とした分析に応用した。具体的には、これらペプチド類のジスルフィド結合を還元剤にて切断し、パーフルオロアルキルヨードアセトアミド試薬によって多重にラベル化した。本誘導体の構造を MS スキャン測定にて確認したところ、目的のパーフルオロアルキル化体が生成されており、また、それらは期待通りフルオラス LC カラムにて選択的に保持・分離された。

##### (2) IMAC 技術とフルオラスの融合によるペプチド・タンパクの選択的抽出

本研究では、まず、イミノ二酢酸型フルオラス試薬(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-perfluoroalkyl-*n*-iminodiacetic acid, PFIDA)を合成し、これに金属イオン (Fe(III)) を配位結合させて固定して、次図の Fe(III)固定化 PFIDA を合成した。この試薬に分析対象のリン化合物は配位結合し、生成した錯体は、そのフルオラス性からフルオラス溶媒に高選択的かつ効率的に抽出される。本方法論は、主にヌクレオチド類を用いて原理確認を行い、生体試料中ヌクレオチド類の前処理に適用した。



更にペプチドへの適用性を検討するために、ペプチド・タンパク質のリン酸化を触媒するプロテインキナーゼ (Protein kinase; PK) の活性測定を試みた。その原理は、蛍光標識した基質ペプチドを PK によりリン酸化し、そのリン酸化体のみを Fe(III)固定化 PFIDA を用いてフルオラス抽出するものである。非リン酸化基質ペプチドは抽出されない (非フルオラス層に残存) ため、その蛍光強度の減少率 (または抽出液の同増加率) から PK の活性測定を行うことが可能となる。今回、PK の基質として知られている市販の Kemptide (TAMRA 標識化体) を用い、本法の原理確認と、実際にキナーゼの活性測定に供したところ、良好な結果を得ることができた。本方法がリン酸化ペプチドの選択的抽出に適用可能であることを示唆している。

本法は、前処理の困難なリン脂質への適用も可能であることを実証しつつあり、今後更なる適用拡大を検討したい。

#### 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 20 件)

Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction for Nucleotides Followed by HILIC-MS Analysis; Ena Kiyokawa, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Chromatography B*, **1074-1075** (1), 86-90 (2018). [DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.12.036] (査読有)

Multi-perfluoroalkyl Derivatization of Polyamines for Selective Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric Analysis Utilizing Fluorous Affinity; Tadashi Hayama, Erina Tamashima, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Chromatography*, **38** (3), 107-113 (2017). [DOI: 10.15583/jpchrom.2017.012] (査読有)

Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction Technique for

Analysis of Protein Kinase Activity; Tadashi Hayama, Ena Kiyokawa, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Talanta*, **156-157** (1), 1-5 (2016). [DOI: 10.1016/j.talanta.2016.04.058] (査読有)

Direct Tandem Mass Spectrometric Analysis of Amino Acids in Plasma Using Fluorous Derivatization and Monolithic Solid-phase Purification; Erina Tamashima, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **115** (1), 201-207 (2015). [DOI: 10.1016/j.jpba.2015.07.008] (査読有)

Selective Liquid Chromatographic Determination Method of 5-Hydroxyindoles with Fluorous and Fluorogenic Derivatization; Yohei Sakaguchi, Jun Ikenaga, Hideyuki Yoshida, Tadashi Hayama, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **114** (1), 348-354 (2015). [DOI: 10.1016/j.jpba.2015.06.003] (査読有)

Selective Extraction of Nucleotides with Fluorous Biphasic System Utilizing Perfluoroalkylamine as an Ion-pair Reagent; Tadashi Hayama, Ena Kiyokawa, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Chromatography*, **36** (1), 13-18 (2015). [DOI: 10.15583/jpchrom.2015.001] (査読有)

Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry with Fluorous Derivatization Method for Selective Analysis of Sialyl Oligosaccharides; Yohei Sakaguchi, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Miki Itoyama, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, **28** (23), 2481-2489 (2014). [DOI: 10.1002/rcm.7042] (査読有)

Fluorous Affinity-based Separation Techniques for the Analysis of Biogenic and Related Molecules; Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **101** (1), 151-160 (2014). [DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.035] (査読有)

[学会発表](計 50 件)

パーフルオロポリエーテルカルボン酸を用いたリン脂質のフルオラス金属キレートアフィニティー抽出; 清川恵奈, 田坂友里恵, 巴山忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 第 28 回クロマトグラフィー科学会議「京都大学吉田キャンパス(京都市)」(2017 年 11 月 17 日)

オンライン-フルオラス誘導体化によるクルクミンの高感度 LC-MS/MS 分析; 清川恵奈, 竹下阿紗子, 巴山忠, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 日本分析化学会第 66 年会「龍谷大学深草学舎(京都市)」(2017 年 9 月 10 日)

生理活性ペプチドのフルオラス誘導体化 LC-MS/MS 分析; 梶山彩乃, 清川恵奈, 巴山忠, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 第 54 回化学関連支部合同九州大会「北九州国際会議場(北九州市)」(2017 年 7 月 1 日)

LC-MS/MS Analysis of Peptides in Brain with Fluorous Derivatization; Ena Kiyokawa, Reiko Koga, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; HPLC 2017/ The 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques「プラハ(チェコ共和国)」(2017 年 6 月 21 日)

金属固定化フルオラス試薬を用いたリン脂質の選択的抽出法の開発; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 日本薬学会第 137 年会「仙台国際センター(仙台市)」(2017 年 3 月 27 日)

脳内ペプチド類の選択的 LC-MS/MS 分析法の開発とマウス脳組織への応用; 清川恵奈, 久保田桃子, 巴山忠, 川見祐介, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田均; 第 33 回日本薬学会九州支部大会「鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島市)」(2016 年 12 月 3 日)

Analysis of Protein Kinase Activity with Fluorous-assisted Metal Chelate Affinity Extraction of Phosphopeptide Followed by Fluorescence Detection; Ena Kiyokawa, Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Osamu Imakyure, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta; ISLS 2016/ The 17<sup>th</sup> International Symposium on Luminescence Spectrometry「台北(台湾)」(2016 年 11 月 24 日)

Analysis of Biogenic-related Compounds with HPLC-fluorescence Detection; Tadashi Hayama, Hideyuki Yoshida, Yohei Sakaguchi, Jun Ikenaga, Kenichiro Todoroki, Masatoshi Yamaguchi, Hitoshi Nohta;

ISLS 2016/ The 17<sup>th</sup> International Symposium on Luminescence Spectrometry「台北(台湾)」(2016年11月23日)  
アポトーシス誘導 Jurkat 細胞中モノヌクレオチド類の選択的抽出とその定量的解析; 清川恵奈, 巴山忠, 相川晃慶, 川見祐介, 糸山美紀, 小迫知弘, 吉田秀幸, 添田泰司, 山口政俊, 能田均; 日本薬学会第136年会「パンフィコ横浜(横浜市)」(2016年3月28日)  
細胞試料中ヌクレオチド類の選択的抽出とHILIC-MS/MS分析; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第26回クロマトグラフィー科学会議「九州大学馬出キャンパス(福岡市)」(2015年11月11日)  
Ion-pair fluoruous biphasic extraction 及びHILICによるヌクレオチド類の選択的分析法開発; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第13回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム「長崎ホテル清風(長崎市)」(2015年8月20日)  
フルオラス相互作用を利用したアミノ酸のタンデムマウス分析と病態モデルマウス試料への適用; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第13回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム「長崎ホテル清風(長崎市)」(2015年8月20日)  
フルオラスイオンペア抽出法によるヌクレオチド類の選択的分析と白血病由来細胞試料への適用; 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第22回クロマトグラフィーシンポジウム「近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)」(2015年5月29日)  
フルオラス誘導体化法によるポリアミン類の選択的LC-MS/MS分析; 巴山忠, 久芳未果, 玉嶋江莉奈, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第22回クロマトグラフィーシンポジウム「近畿大学東大阪キャンパス(東大阪市)」(2015年5月29日)  
フルオラス誘導体化法を利用したオキシトシンの高選択的LC-MS<sup>3</sup>分析; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第75回分析化学討論会「山梨大学甲府キャンパス(甲府市)」(2015年5月23日)  
フルオラスの選択性を利用した細胞試料中ヌクレオチド類の金属キレートアフィニティー抽出; 巴山忠, 薬師寺寿世, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第25回クロマトグラフィー科学会議「京都大学桂キャンパス

(京都市)」(2014年12月12日)  
亜鉛固定化Krytoxを利用したテトラサイクリン系薬剤の選択的フルオラス二相系抽出; 古森貴子, 清川恵奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第31回日本薬学会九州支部大会「第一薬科大学(福岡市)」(2014年12月12日)  
金属固定化フルオラス試薬を利用したテトラサイクリン系抗生物質の選択的抽出法の開発; 清川恵奈, 古森貴子, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム「帝京大学板橋キャンパス(東京都板橋区)」(2014年8月20日)  
フルオラス-金属キレートアフィニティー試薬を用いたリン酸基含有化合物の選択的抽出法の開発; 巴山忠, 井上裕也, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第21回クロマトグラフィーシンポジウム「名古屋市工業研究所(名古屋市)」(2014年6月6日)  
モノリス型フルオラス固相カラムを用いたパーフルオロアルキル化アミノ酸の選択的抽出とLC-MS/MS分析; 玉嶋江莉奈, 巴山忠, 川見祐介, 糸山美紀, 吉田秀幸, 能田均, 山口政俊; 第21回クロマトグラフィーシンポジウム「名古屋市工業研究所(名古屋市)」(2014年6月5日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

能田 均 (NOHTA, Hitoshi)  
福岡大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20164668

### (3) 連携研究者

山口政俊 (YAMAGUCHI, Masatoshi)  
福岡大学・薬学部・教授  
研究者番号: 50117280

巴山 忠 (HAYAMA, Tadashi)  
福岡大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 90549693