

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05543

研究課題名(和文) 質量分析のための高分子担持型光開裂性分子プローブの開発

研究課題名(英文) Design and Synthesis of Photo-cleavable Macromolecular Tag for LDI-MS

研究代表者

真木 俊英 (MAKI, Toshihide)

長崎大学・産学官連携戦略本部・准教授

研究者番号：10291535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：大きな分子量の分子標識とイオン化に耐えるイオン化標識剤を目指して研究に着手した。テトラフェニルポルフィリンの分子対称性を利用して、誘導化反応の収率を質量スペクトルとして読み出せることを示した。一方、分子タグを測定プレート上展開して乾燥させフィルム化することで、数十ピコモルの少量の試料量で表面での化学反応を評価できることを示した。これらの分子標識剤および分析手法を活用して、ポリマー表面等の限られた反応場における特異な反応生を評価できる基礎的な技術を開発することができた。

研究成果の概要(英文)：This research was aiming for establish of new molecular tag for LDI-MS which is not sensitive for molecular weight of target molecules. Tetraphenylporphyrine was found as a good motif to afford efficiently stable and detectable ion for LDI-MS. The symmetrical molecule reacted with sample amines in solution phase afforded statistical product distribution on mass spectrometry. That is reactivity of molecule or yield was able to read out from its mass spectra. When the organic film formed by the molecular tag lowered detection limit less than tens pico-mol for each film spotted. The result suggests the system can be used for assessment for surface reactivity and the system has a chance minimize diffusion area which is believed to lead lower resolution in imaging mass spectrometry.

研究分野：有機化学

キーワード：LID-MS 質量分析 分子タグ ポルフィリン 分子対称性 アミン

## 1. 研究開始当初の背景

質量分析法は、極めて高感度な分析法としてあらゆる分野の科学研究に欠くことができない方法として認識されている。マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) は、生体高分子の質量分析法として不可欠な測定法として主に発展してきた。MALDI-MS は、(1) 夾雑物の存在に寛容であり、(2) 測定試料を乾燥状態で長期間保存することが容易、(3) 質量分析イメージングが可能である。などの際だった特徴を有する。しかし、低分子領域での測定は、一般にマトリックス由来シグナルにより測定が困難であり、MALDI-MS の優れた特徴を低分子の測定に生かすための工夫が求められている。研究代表者は、これまでにレーザー脱離イオン化質量分析 (LDI-MS) により高感度に応答する光開裂性分子を開発している。このものは、レーザー照射により質量分析可能なイオン対を生じる機能性分子であり、その中の一つは既に質量分析用の検出試薬として上市されている。この試薬は、標的分子を誘導化することにより質量分析による検出を可能とし、標準物質を用いることにより定量的解析を行うことも可能である。しかし、市場での評価を経て、(1) 夾雑物の影響を受けやすい。(2) 標的分子が大きくなると著しく検出され難くなるという課題が浮き彫りになっている。

研究代表者らが開発した光開裂性イオン化剤は、中性の試薬自身がマトリックスの支援なしに、レーザー照射によりイオン対を生じる新しいタイプのイオン化剤である。しかし、レーザーパルスからのエネルギーを受ける光開裂性分子は、標的分子数しか存在しないために、エネルギーを吸収する分子が過剰に存在する MALDI-MS と比較して夾雑物の影響を受けやすいものと推定される。また、同じ理由から光開裂性イオン化剤は、分子量が約 1,000 を超えて大きくなると極端に応答シグナルが減衰するという回避し難い特徴がある。

研究代表者は、光開裂性イオン化剤を光エネルギーを捕集する能力を有する光増感剤を高分子中に分散させるという手法により、これらの課題を同時に克服し、より高感度に、より幅広い分子量領域で定量性のあるシグナルを与える、ハイスループットな質量分析法を確立し、更に質量分析イメージングへの応用が可能になるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

光開裂性イオン化剤の高分子領域でのシグナル減衰は、分子量に指数関数的に依存して減衰することから、発生するイオンの後続反応によるクエンチがその理由である可能性が推定された。そこで、本研究では、レーザ

ー照射により安定 (長寿命) で容易に検出されるイオンを発生させる光開裂性イオン化剤の検索を行い、このものを高分子へ導入するアプローチにより、従前を凌駕する機能な質量分析用デバイスとして確立するとともに、光開裂性イオン化標識剤を担持した高分子フィルムを用いる、新しい質量分析イメージング法の開拓を目指した。

## 3. 研究の方法

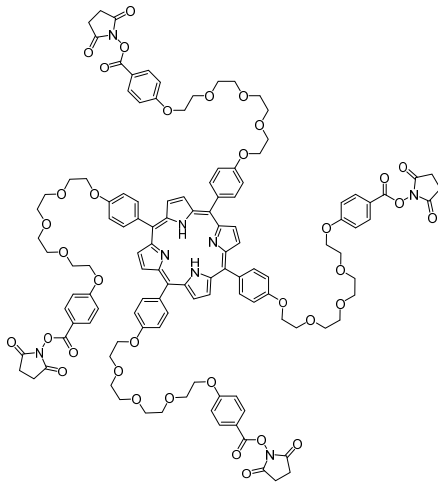
イオン化部位として大きな共役系を有する有機分子の探索を行った。見出された基本骨格に対して、効果的な分子タグへの誘導化、および誘導化後の反応性、物性等を検証するというサイクルを通じて、新しい分子標識剤の設計と合成を行う。

次いで、合成した分子標識剤を用いて、その基本的な反応特性、応答特性を評価する。多様な標的分子に対して、濃度限界、検出限界を探り、反応性を制御する因子を明らかにする。

更に、フィルムを形成し、標的分子の誘導化反応と検出限界・応答特性を解明する。

## 4. 研究成果

各種の共役系有機化合物について、LDI-MS における応答感度等を比較した。多くの共役分子が安定で検出可能なイオンを発生させるものの、炭素結合の開裂等を引き起こす、溶解性の低さなどが観察された。更に合成的な修飾の容易さ、標的分子を保護する波長領域での保護機能等を考慮し、テトラフェニルポルフィリンがイオン化モチーフとして優れていることを明らかにした。1本~4本の分子鎖を擁する分子タグの合成を行い、検出特性を比較したところ、分子鎖としてテトラエチレングリコール鎖と分子捕捉部位としてスクシンイミドエステルを備えた対称ポルフィリン分子タグの設計に至り、効率的な合成法を確立した。脂溶性の高い炭化水素を分子鎖として用いると、分子タグが極性溶媒に溶解した場合においても水溶性の標的分子の反応効率が極端に低下することが確認された。一方、エチレングリコール分子鎖を用いると水溶性分子が効果的に捕捉されることが見出された。また、イオン化モチーフと分子鎖を炭素-窒素結合を用いて接続した場合、レーザー照射で炭素窒素結合の切断が高い頻度で発生することを見出した。この切断反応は、新しい分子タグの設計に利用できる可能性がある。一方、アリールエーテル結合を用いて、エチレングリコール鎖を接続した場合、イオンが断片化することなく M+1 シグナルが検出されることを見出した。この様な検討を経て、新しい質量分析用分子タグ TPPI の設計と合成を行った。



TPPI の分子構造

合成した分子標識剤 TPPI を用いて、様々なアミン類の誘導化反応、および質量分析による生成物分布における応答特性の評価を行った。TPPI は、様々なアミン化合物に対してその分子量に大きな影響を受けることなく、安定なシグナルを与えることが判った。

TPPI は四方向に対称な構造をしており、その溶液中における反応は、4本の分子鎖に対してほぼ等しい確率で進行することが判った。その結果、生成物は反応率を反映した、ほぼ2項分布に一致することが観察された。例えば、図1に示す通り、TPPI に対して様々な比率のベンジルアミンを作用させた場合、TPPI-ベンジルアミンのモル比に応じて、質量スペクトルのシグナルパターンが変化すること、およびその変化が2項分布シミュレーションと一致していることを確認している(図1)。この結果は、反応性・あるいは反応収率の情報を  $m/z$  軸上に展開したことを示しており、これまで難しかった分子の反応性を、内部標準などの基準を用いることなく、LDI-MS における質量電比の分布パターンから反応収率等を知ることが出来ることを示した(図1)。

一方、TPPI の溶液をターゲットプレート上に滴下し、蒸発乾固させることでフィルム状にし、その上に試料としてトリプタミン溶液を重乗する方法による誘導化により、10pmol の TPPI によるフィルムに対してトリプタミン試料 100pmol (100  $\mu$  M, 1  $\mu$  L) まで低下させ誘導化・検出することができるを見出した。通常の化学反応は、試薬を過剰に用いた場合でも 1mM 程度の基質能が必要であるが、フィルム上でサンプル試料が濃縮されることにより反応するために、誘導化反応が効率的に進行すると推定している。この場合に生成物の分布は2項分布には従わず、TPPI 中の全てのスクシンイミド基が反応した生成物が優先して検出された。微小領域における特異的な反応が生じていることが示唆されている。

この結果は、TPPI を用いる解析システムが、表面等で生じる局所的な化学反応を解析するための有用なツールになり得ることを示唆している。

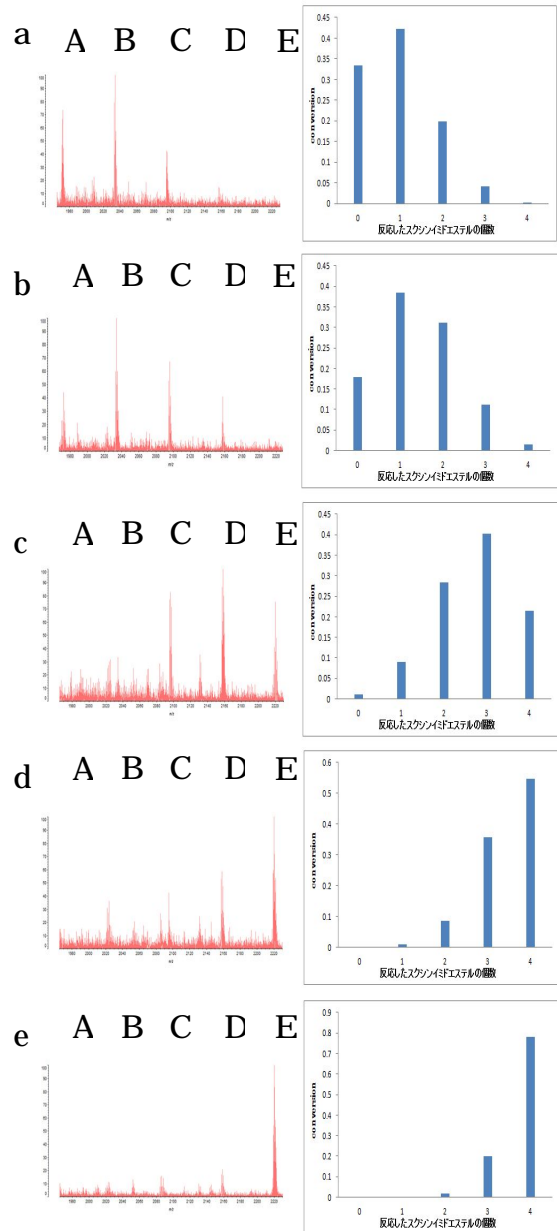


図1 分子タグ TPPI : benzylamine の各濃度比における LDI-MS, TPPI (mM) : benzylamine (mM) = a) 1 : 2.5, b) 1 : 3.5, c) 1 : 4.5, d) 1 : 5.5, e) 1 : 7 (左図) 最適二項分布モデル, 誘導化率 P = a) 24%, b) 35%, c) 68%, d) 86%, e) 94% (右図)

イメージング質量分析は、拡散現象が分解能の低下をもたらすと認識されている。一方、誘導化反応は拡散が早い分子に有利に働くとも考えられる。本システムではこれらの妥協を必要とするシステムに対して一つの解決策を提供する可能性があると考えている。より具体的なデバイスとして洗練する必要があるものの、本研究により見出された TPPI

は、高分子担持型質量分析用分子タグを開発することより、反応性と高分解能の両立を達成できる可能性を示すことができた。

## 5. 主な発表論文

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小浦修乙, 真木俊英, Boc anhydride によるカルボン酸の *t*-ブチルエステルへの変換反応、日本プロセス化学会 2017 サマーシンポジウム、2017 年 8 月 4 日、大阪国際交流センター

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

真木 俊英 (MAKI, Toshihide)  
長崎大学・産学官連携戦略本部・准教授  
研究者番号：10291535