

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590039

研究課題名（和文） LC/MS/MS用高性能標識試薬の開発と生体分子の高感度分析

研究課題名（英文） Development of the prominent labeling reagents for LC/MS/MS and sensitive analysis of the biomolecules

研究代表者

三田 智文（SANTA TOMOFUMI）

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：30187306

研究成果の概要（和文）：近年、高速液体クロマトグラフィー（LC）とタンデム型質量分析計（MS/MS）を組み合わせたLC/MS/MS法が広く用いられている。本研究では、LC/MS/MS法における検出感度および選択性の向上を目的として標識試薬を合成した。また、合成した標識試薬を用いて疾患のマーカーとなる生体分子の高感度な分析法を開発した。本研究で開発した分析法は、先天性代謝異常のスクリーニング法として有用であった。

研究成果の概要（英文）：Liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) is widely used method. In this research, several labeling reagents were synthesized to enhance the sensitivity and selectivity in LC/MS/MS. These reagents enabled sensitive analysis of the biomolecules such as diseases markers. These methods were useful for the screening of the inherited metabolic disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：分析化学

1. 研究開始当初の背景

生命現象を深く理解するためには、生命機能の維持に関与する生体分子の存在部位、生成や消失などの動態を正確に把握する必要がある。疾患の原因を解明し、その治療法、予防法を確立するためには、疾患に関わる生体分子を特定し、その機能および動態を解明しなければならない。また、有効で安全な薬物療法を行うためには、薬物の体内動態を正しく把握する必要がある。このような目的のためには、生体分子や薬物の高感度で選択的

な分析法が不可欠であると考えられる。

研究代表者は、これまで、主に、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）/蛍光検出法を用いて、微量生体分子の高感度分析法の開発に取り組んできた。しかし、大部分の化合物は蛍光性を有さないため、蛍光検出法により分析する場合には、分析対象分子を蛍光標識試薬によって標識化する必要がある。そこで、分子サイズが小さく反応性に富み、蛍光波長が長波長域であるなど、蛍光標識試薬として優れた性質を有するベンゾフラザン骨格に

着目し、優れた蛍光標識試薬の開発に取り組んだ。これまでに、カルボキシ基用、アルコール基用、エドマン分解用、過酸化物検出用など、多数の蛍光標識試薬を開発し、さらに、開発した試薬を用いて、活性酸素種や酸化ストレス関連分子、高血圧関連分子、糖尿病関連分子などの高感度分析法を開発し、これらの分子と疾患との関連を明らかにした。

近年、質量分析計 (MS) あるいはタンデム型質量分析計 (MS/MS) が開発され、これと HPLC とを組み合わせた LC/MS 法あるいは LC/MS/MS 法が、分析化学、生命化学、臨床化学、環境化学など広い分野で用いられるようになってきている。LC/MS 法においても、検出感度、選択性の向上のためには、優れた標識試薬が必要である。LC/MS 法に用いる標識試薬は、1) 分析対象分子と高い反応性を有する、2) 分析対象分子と高極性のイオン化抑制物質とを逆相 HPLC で分離するために適度な疎水性を有している、3) 分析対象分子のイオン化効率を高めるために容易にイオン化する構造 (プロトン親和性基) を有している、などの条件を満たすことが必要である。研究代表者は、既に、プロトン親和性基を有するベンゾフラザン蛍光標識試薬を多数報告している。これらの試薬はイオン化効率が高く、また適度な疎水性を有するため、LC/MS 用標識試薬として適している。これら試薬と LC/MS 法を用いて、ペプチド類、脂肪酸類などを高感度に分析できることを報告した。

LC/MS/MS 法に用いる標識試薬は、上記の 3 つの条件に加え、4) MS/MS 法により特定のプロダクトイオンを選択的に高い収率で生じることが必要である。現在、LC/MS/MS 法に適した標識試薬はきわめて少ない。この原因は、MS/MS 法によりプロダクトイオンを選択的に高い収率で生じる構造に関する報告が少ないため、LC/MS/MS 法に適する標識試薬を理論的に設計・開発することが困難だからである。研究代表者は、ベンゾフラザン骨格を有する化合物の MS/MS 法による解裂様式を検討し、ベンゾフラザン骨格と結合したスルホンアミド基の近傍で解裂が起き、高い収率でプロダクトイオンを生じることを見出した (Biomed. Chromatogr., 21, 1207-1213 (2007))。この結果に基づき、カルボキシ基、カルボニル基を有する化合物を対象とした LC/MS/MS 用標識試薬を開発した (Biomed. Chromatogr., 22, 115-118 (2008))。しかし、優れた LC/MS/MS 用標識試薬を多数開発するためには、ベンゾフラザン骨格のみならず様々な骨格を有する化合物を用いて、構造と MS/MS 法による解裂様式の関係を検討し、LC/MS/MS 用標識試薬として適した構造を見出すことが必要であると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

以上のような背景を基に、本研究では、化合物の構造と MS/MS 法による解裂様式の関係を検討し、LC/MS/MS 用標識試薬として適した構造を見出し、新たな高性能標識試薬を開発することを第一の目的とした。そして、得られた標識試薬と LC/MS/MS 法により、先天性代謝異常症のマーカー分子などの生体分子の高感度分析法を開発することを第二の目的とした。さらに、特定の官能基を有する低分子化合物の網羅的解析法を開発し、疾患マーカー分子の同定することを第三の目的とした。

3. 研究の方法

(1) LC/MS/MS 用高性能標識試薬の開発

LC/MS/MS 法に用いる標識試薬は、1) 分析対象分子と高い反応性を有する、2) 分析対象分子と高極性のイオン化抑制物質とを逆相 HPLC で分離するために適度な疎水性を有している、3) イオン化効率を高めるために容易にイオン化する構造を有している、4) MS/MS 法により特定のプロダクトイオンを選択的に高い収率で生じる、などの条件を満たすことが必要である。

現在、LC/MS/MS 用標識試薬として、アルコール基標識にはダンシルクロリド、カルボニル基標識にはダンシルヒドラジンがしばしば用いられている。生じるダンシル誘導体は、MS/MS 法によりスルホニル基と芳香環の間の結合が解裂し、 m/z 170 のプロダクトイオンを生じる。しかし、ダンシル誘導体はプロトン親和性が低いためイオン化効率が低く、検出感度は十分ではない。最近、カルボニル基用標識試薬として、2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP) が報告された (J Chromatogr B, 825, 214-222 (2005))。HMP 誘導体は、イオン化効率は高いが、MS/MS 法によるプロダクトイオンの収率が低く MS/MS 法での検出感度が十分ではない。このように、現在に至るまで、LC/MS/MS 法に適した標識試薬はきわめて少ないのが現状である。

研究代表者は、ベンゾフラザン化合物の解裂様式を検討し、ベンゾフラザン骨格と結合したスルホンアミド基の近傍で解裂が起き、選択的かつ高い収率でプロダクトイオンを生じることを明らかにした。この結果を基に、カルボキシ基標識用試薬として DAABD-AE (4-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethylaminosulfonyl]-7-(2-aminoethylamino)-2,1,3-benzoxadiazole) を、カルボニル基用標識試薬として DAABD-MHz (4-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethylaminosulfonyl]-7-*N*-methylhydrazino-2,1,3-benzoxadiazole) を報告した。これらの試薬は、LC/MS/MS 用試薬としての上記 4 つ

の条件を満たしており、ダンシル誘導体と比較すると約 10 倍のイオン強度が得られ、さらに、MS/MS 法により効率よく m/z 151 のプロダクトイオンを与えるなど、MS/MS 法での検出に適していた。

以上の結果を踏まえ、本研究では、アミノ基、アルコール基などの官能基を対象とした標識試薬を開発する。また、ベンゾフラザン骨格のみならず様々な骨格を有する化合物を用いて構造と MS/MS 法による解裂様式との関係を詳細に検討し、LC/MS/MS 用標識試薬として適した構造を見出し、新たな高性能標識試薬を開発する。

(2) 先天性代謝異常症のマーカ分子の高感度分析法の開発

開発した標識試薬を用いて生体分子の高感度分析法を開発する。本研究では、先天性代謝異常症のマーカ分子の高感度かつ迅速な分析法を開発する。現在、日本においては、フェニルケトン尿症、メープルシロップ尿症、ホモシスチン尿症、ガラクトース血症、甲状腺機能低下症、先天性副腎過形成症の 6 疾患に対して先天性代謝異常検査（新生児マススクリーニング）が行われている。しかし、先天性代謝異常症は既に 500 種以上が報告されており、中には、有機酸代謝異常症のように乳幼児突然死症候群（SIDS）の原因となるものも知られている。

米国では、既に、有機酸代謝異常症を中心として、MS/MS 法を用いて 30 種程度の疾患のスクリーニングが普及している。日本ではマススクリーニングに関する試験研究として、MS/MS 法を用いて同様な検討が進められている。現在、MS/MS 法で分析されているのは、アミノ酸類およびミトコンドリアで代謝されるアシルカルニチンを形成している脂肪酸（1 価の有機酸）である。これらの分子は、ブタノール塩酸でエステル化した後に、MS/MS 法で分析することにより特徴的なプロダクトイオンを生じる。この方法により、数十種類のマーカ分子の分析が可能である。

これに対して、アシルカルニチンを形成していない遊離型の有機酸類（超長鎖脂肪酸、多価有機酸類）、ケトン類、糖リン酸類などの高感度で簡便かつ迅速な分析法は確立していない。これらのうちの一部の分子は、現在、GC/MS 法で分析されている。しかし、GC/MS 法は前処理が煩雑であり、また分析に長時間を要するなど、マススクリーニング法として適しておらず、LC/MS 法による高感度で簡便かつ迅速な分析法の開発が待たれている。

研究代表者は、これまでに、DAABD-AE と LC/MS/MS 法を用いて、グルタル酸血症をはじめとする有機酸代謝異常症のマーカ分子及び副腎白質ジストロフィー（ALD）などのペルオキシソーム病のマーカ分子（C20 以

上の極長鎖脂肪酸）の分析法を開発した。従来の GC/MS 法と比較して、前処理が簡便であり、検出感度も向上し、分析時間も 1/10 以下に大幅に短縮できた。開発した方法は、海外において新生児マススクリーニング法に用いられており、これらの方法の実用性が高いことが示されている。

本研究では、サクシニルアセトンなどのケトン類（チロシン血症のマーカ分子）、17-ヒドロキシprogesteron、4-アンドロステンジオン（先天性副腎過形成症のマーカ分子）、ガラクトース-1-リン酸（ガラクトース血症のマーカ分子）などをはじめ、多種類の疾患マーカ分子の高感度で簡便かつ迅速な分析法を開発する。これらの方法が確立すれば、現在、イムノアッセイ法で行っている分析をほとんど全て LC/MS/MS 法で行うことができる。LC/MS/MS 法は選択性が高いため、偽陽性の判定は大きく減少すると考えられる。

(3) 低分子化合物の網羅的解析法の開発と疾患マーカ分子の同定

LC/MS/MS 用標識試薬と反応した分子は、MS/MS 法により特定のプロダクトイオンを生成するため、そのプロダクトイオンを検出することにより、標識試薬が反応した分子のみを選択的に検出できる。したがって、特定の官能基を有する一群の分子のみを選択的かつ網羅的に解析することが可能になる。この方法を用いて、生体内におけるアミノ酸類、脂肪酸類など一群の生体分子の網羅的な動態解析、さらには、正常時と病態時における生体分子の量的変動解析法の開発に取り組む予定である。本法は、新たな疾患マーカ分子の同定さらには個別化医療に大きく貢献すると考えられる。

4. 研究成果

(1) LC/MS/MS 用高性能標識試薬の開発

研究代表者は、既に、DAABD-AE を用いた血漿中極長鎖脂肪酸（炭素鎖 20 ~ 26）の高感度分析法を報告している。本研究では短鎖脂肪酸の分析に適した標識試薬の開発に取り組み、DAABD-AB (4-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethylaminosulfonyl]-7-(2-aminobutylamino)-2,1,3-benzoxadiazole) および DAABD-AP (4-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethylaminosulfonyl]-7-(2-aminopentylamino)-2,1,3-benzoxadiazole) を合成した。これらの試薬は、標識化部位の炭素鎖が 4 ~ 5 であり、DAABD-AE よりも炭素鎖が長く疎水性が高いので、短鎖脂肪酸の分析に適していると考えた。DAABD-AB および DAABD-AP は、短鎖脂肪酸と、縮合剤存在下、60°C、60 分で反応し

た。標識化した脂肪酸は、逆相カラムで分離し、ESI-MS/MS で検出した。標識化した脂肪酸はMS/MSにより m/z 151のイオンを効率よく生じるため、SRM (selected reaction monitoring) による高感度な分析が可能であった。検出限界は、0.1-0.12 pmol/注入であり、DAABD-AB および DAABD-AP は短鎖脂肪酸の分析に有用であることが示された(雑誌論文⑤)。また、これまでの研究結果から、thiourea 骨格を有する化合物はMS/MS用試薬として適していることが明らかになったので、thiourea 骨格とともに、反応部位としてアミンまたはヒドラジンを有する化合物を合成した。*N*-(Pyridin-3-yl)hydrazine-carbothioamide など、5種類の化合物を合成したところ、いずれも、カルボン酸用標識試薬として適していることが明らかになった(雑誌論文②)。

しかし、これらの試薬類は現在市販されていないため、開発した分析法を利用できる施設は限られている。そこで、より汎用性の高い分析系を開発するために、市販の試薬の中からLC/MS/MSに適したものを探索した。LC/MS/MS用標識試薬に適する構造を有する試薬として、3-pyridyl isothiocyanate、*p*-(dimethylamino)phenyl isothiocyanate、*m*-nitrophenyl isothiocyanateを候補として選択し、アミノ基用標識試薬としての有用性を検討した。これらの試薬は、いずれも、脂肪族アミンと、60°C、20分以内に反応した。生じた標識化体はイオン化効率が高いため、MSで強いシグナルが観測された。また、標識化体はthiourea構造を有するため解離しやすく、衝突誘起解離により、ほぼ単一のプロダクトイオンを生じることが明らかになった。以上の結果から、上記の化合物はLC/MS/MS用標識試薬として優れていることが明らかになった。今後、これらの試薬を用いて、先天性代謝異常症のマーカ分子の分析法を確立する予定である。(雑誌論文④)

(2) 先天性代謝異常症のマーカ分子の高感度分析法の開発

LC/MS/MSによる極長鎖脂肪酸の分析法と遺伝子解析法を用いて、先天性代謝異常症であるペルオキシソーム病の一種、Zellweger syndromeの遺伝子の異常について検討を行った。その結果、PEX13遺伝子上の従来の報告とは異なる部位に変異を生じている患者を見出した(雑誌論文⑥)。また、DAABD-AEを用いて、新生児の尿スポット中のグルタル酸および3-ヒドロキシグルタル酸の定量法を開発した。DAABD-AEは、これら化合物と、60°C、45分で反応した。得られた誘導体はLC/MS/MSで高感度に分析できた。本法は、

グルタル酸尿症タイプ1の診断に有用であった。(雑誌論文③)

(3) 低分子化合物の網羅的解析法の開発と疾患マーカ分子の同定

開発した標識試薬およびLC/MS/MSに適した市販の試薬を用いて、現在、アミノ基を有する生体分子の網羅的な解析法の開発に取り組んでいる。本法は、新たな疾患マーカ分子の同定等に大きく貢献すると思われる。

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6件)

- ① Santa T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 25, 1-10 (2011). (査読有)
DOI: 10.1002/bmc.1548
- ② Inoda H, Nishiyama T, Yoshikado T, Suwanai Y, Santa T. Compounds having thiourea moiety as derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS): Synthesis of derivatization reagents for carboxylic acids. *Biomedical Chromatography*, 25, 635-640 (2011). (査読有) DOI: 10.1002/bmc.1501
- ③ Al-Dirbashi OY, Kölker S, Ng D, Fisher L, Rupar T, Lepage N, Rashed MS, Santa T., Goodman SI, Geraghty MT, Zschocke J, Christensen E, Hoffmann GF, Chakraborty P. Diagnosis of glutaric aciduria type 1 by measuring 3-hydroxyglutaric acid in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disorders*, 34, 173-180 (2011). (査読有)
DOI: 10.1007/s10545-010-9223-2
- ④ Santa T. Isothiocyanates as derivatization reagents for amines in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). *Biomedical Chromatography*, 24, 915-918 (2010). (査読有) DOI: 10.1002/bmc.1352
- ⑤ Santa T., Al-Dirbashi OY, Yoshikado T, Fukushima T, Imai K. Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for short chain carboxylic acids in

liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). Biomedical Chromatography, 23, 443-446 (2009). (査読有) DOI: 10.1002/bmc.1124

- ⑥ Al-Dirbashi OY, Shaheen R, Al-Sayed M, Al-Dosari M, Makhseed N, Abu Safieh L, Santa T, Meyer BF, Shimozawa N, Alkuraya FS. Zellweger Syndrome Caused by PEX13 Deficiency: Report of Two Novel Mutations. American Journal of Medical Genetics Part A, 1219-1223 (2009). (査読有)
DOI: 10.1002/ajmg.a.32874

[学会発表] (計4件)

- ① 西山泰平、猪田浩隆、吉門崇、三田智文. LC/ESI-MS/MS 用標識試薬の開発: thiourea 構造を有する標識試薬. 日本薬学会第131年会 2011.3.28-30 静岡.
- ② Al-Dirbashi OY, Kölker S, Ng D, Fisher L, Rupar T, Lepage N, Rashed MS, Santa T, Goodman SI, Geraghty MT, Zschocke J, Christensen E, Hoffmann GE, Chakraborty P. Analysis of 3-hydroxyglutalic acid in dried urine spots by LC-MS/MS; application for the diagnosis of glutaric aciduria type 1. SSIEM (Society for the Study of Inborn Error of Metabolism) annual symposium, Geneva, Switzerland, Aug 30-Sep 2, 2011.
- ③ Al-Dirbashi OY, McIntosh N, McRoberts C, Rashed MS, Geraghty MT, Fisher L, Santa T, Chakraborty P. Novel approach for the determination of methycitrate in dried blood spots (DBS) by liquid chromatography tandem mass spectrometry. SSIEM (Society for the Study of Inborn Error of Metabolism) annual symposium, Geneva, Switzerland, Aug 30-Sep 2, 2011.
- ④ 三田智文. LC/ESI-MS/MS 用標識試薬の開発: -NHCSNH- 構造を有する標識試薬. 第24回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2011.8.31-9.2 大山.

[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.f.u-tokyo.ac.jp/~kaiseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三田 智文 (SANTA TOMOFUMI)
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授
研究者番号: 30187306

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし