

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15264

研究課題名（和文）On-tissueジアステレオマー誘導体化によるキラル分子の選択的イメージング

研究課題名（英文）On-tissue Diastereomeric Derivatization for Selective Imaging of Chiral Molecules

研究代表者

杉山 栄二（Sugiyama, Eiji）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：90806332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、研究代表者は生体組織切片中キラル分子の選択的イメージングを実現する新たな誘導体化法の開発を進めた。以前より開発を進めてきたキラルな有機酸のイメージング法に関する論文を発表した。また、キラルなアミンのイメージング法開発を進めるために、部分構造の異なる種々のアミノ酸誘導体を新たに測定し、重要な部分構造を明らかとした。さらに、生体試料から目的分子を高効率かつ高選択的に検出するために、イオン化効率と分離能の両立が可能な新規誘導体化試薬を2種合成した。各試薬は種々のキラルアミンと良好に反応することを確認しており、更なる研究により各分子の選択的イメージングが実現すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、種々の疾患に関連する光学異性体の存在が明らかとなっており、それらの病理学的解析を実現する手法の開発が関連分野の研究者から切望されている。本研究で創出された手法は、関連疾患の病態解明に有用であると共に、同様のアプローチが他のキラル分子の解析にも有効なことを実証している。エナンチオ選択的な生理作用を示す内因性分子や医薬品分子は多数知られており、本研究の成果はそれらを対象とした幅広い研究の推進へと波及すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we advanced the development of a new derivatization method for the selective imaging of chiral molecules in biological tissue sections. A paper was published on the imaging method for a pair of chiral organic acids. To further the development of imaging methods for chiral amines, various amino acid derivatives with different substructures were measured, revealing key substructures. In addition, two new derivatization reagents, expected to be capable of efficient ionization and separation, were synthesized. These reagents showed high reactivity with various chiral amines, promising the utility for selective imaging in future studies.

研究分野：質量分析イメージング

キーワード：質量分析 キラル イメージング イオンモビリティ 誘導体化 ジアステレオマー

1. 研究開始当初の背景

生理活性分子の多くはキラルであり、薬効を示す分子のエナンチオマーが重篤な毒性を示す場合もあるため、それらの識別は病態解明や創薬における重要課題の一つである。また、生体試料を対象とする分析技術の進歩により、それまで見過ごされていた微量でキラルな内因性低分子が存在することや、それらの含量変化が種々の疾患のバイオマーカーとなり得ることが明らかとなった。対照的に、各分子の体内動態や含量変化が生じるメカニズムの理解は進んでおらず、病態との因果関係や新規創薬標的の有無は不明なままである。

病理組織のスライス標本を用いて標的分子の分布を調べ、局在する部位や細胞を同定することで、病態の理解や疾患の克服が進むと考えられる。しかし、キラルな低分子を直接かつ選択的にイメージングすることは技術的に難しい。例えば内因性低分子のイメージングに広く用いられる免疫組織化学は還流固定等の操作を要し、低分子の正確な分布解析に適さない。キラル分子の分布をエナンチオマーの影響を排して可視化するのは特に困難であり、未だに解析できない分子が数多く存在する。

質量分析イメージングは、組織試料の各位置から得たマススペクトルを基に様々な分子の分布を調べる手法である。この方法は還流固定等の操作が不要であり、低分子の動態解析に適する手法として利用が進んでいる。また、イオンモビリティスペクトロメトリー (IMS) を組み合わせた質量分析イメージングの開発が徐々に進んでおり、 m/z が等しい異性体を識別した分布解析も徐々に可能となっている。

研究開始当初、キラル分子とそのエナンチオマーを IMS で分離する手法として、キラル誘導体化法を用いた成功例が増え始めていた。この手法は標的分子に分離を促す構造を付与するものであり、様々な IMS 装置を用いた測定に利用できる。ただし、当時報告されていた手法の大半はジアステレオマーを複合体イオンとして分離するものであり、多量の夾雑成分存在下でイオン化を行うイメージングへの利用に適していなかった。

研究代表者は、以前より MALDI-質量分析イメージングに有用な高感度化手法の開発と応用を進めていた (Sugiyama *et al.*, *Anal. Chem.*, 87, 11176–11181, 2015; Sugiyama *et al.*, *iScience*, 20, 359–372, 2019)。また、この知識・経験に基づき、分離を促す構造に加えて高いイオン化効率を与える構造を付与することで MALDI-IMS-質量分析によるエナンチオ選択的イメージングが可能になると着想した。研究開始当初までに、キラルな有機酸やアミノ酸に種々のキラル誘導体化試薬を反応させて測定し、分離に適する構造を調査した。その成果として、例えば D 体と L 体が異なる疾患に關与する 2-ヒドロキシグルタル酸をジアステレオマー誘導体として IMS で分離することに成功した (Fukui and Sugiyama *et al.*, *J. Sep. Sci.*, 44, 3489–3496, 2021)。また、更なるイオン化効率向上が期待できる新規誘導体化試薬を合成し、マウス組織に含まれる同キラル分子のイメージングを可能とした。一方、その他の分子、特に生理学的重要性が認められているキラルなアミノ酸を同様にイメージングすることが出来ておらず、適切な化学構造の追求や誘導体化条件の改善が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、下記 2 点を目的に研究を進めた。

- (1) IMS によるジアステレオマー誘導体の分離に重要なキラルアミノ酸部分構造の推定
- (2) 組織中のキラルアミンを対象とするエナンチオ選択的イメージングの実現

3. 研究の方法

(1) 本研究以前に自ら取得したキラルアミノ酸誘導体の測定結果を基に、D,L-Asn, D,L-Asp と D,L-Asp の 1 位カルボン酸がエステル化された化合物 2 種 (メチルエステル, tert-ブチルエステル) を種々のキラル誘導体化試薬と反応させ、生じた誘導体を測定して部分構造の差がもたらす分離度の変化を調べた。

(2) マウス組織の新鮮凍結切片上にキラルアミノ酸溶液を滴下して自然乾燥後、種々の組成で準備した誘導体化試薬溶液を滴下あるいは噴霧し、生成した誘導体を測定した。また、これまでに蓄積した測定データに基づきイオン化効率と分離度の両立が期待できる誘導体化試薬 2 種をデザインした。それぞれについて合成法を構築後、得られた試薬をキラルアミノ酸と反応させ、誘導体の生成を質量分析により確認した。

4. 研究成果

下記成果を得る間に、研究開始当初までに予備的データが得られていたキラルな有機酸のイメージング法について論文を発表した (Sugiyama *et al.*, *Chem. Commun.*, 59, 10916–10919, 2023)。本成果は専門家から高く評価されており、*Chemical Communications* 誌の Inside front cover に選出された。

(1) 測定した各種誘導体の分離度は 1 位に結合した部分構造の違いにより大きく変化し、この部位が立体構造 (衝突断面積) の差に大きく寄与することが支持された。

(2) IMS において高い分離度が得られた誘導体化試薬を用いて種々の反応条件を検討したものの、マウス組織切片から誘導体由来するイオンを検出することは出来ないことが明らかとなった。そこで新たに誘導体化試薬 2 種をデザインし、その合成法を開発した。また、各試薬が種々のタンパク質構成キラルアミノ酸と良好に反応することを確認した。

以上の成果は、種々の疾患に関連するキラル分子を対象とした病理学的解析の実現に資すると思われる。また、本研究で創出した新規試薬の分離能とイオン化効率を評価し、それらの構造を適宜改変した上で on-tissue 誘導体化条件を精査することで、様々なキラル分子の選択的イメージングが実現すると期待できる。

なお、本研究を進める過程で、アミノ酪酸異性体全種を液体クロマトグラフィー(LC)や IMS で良好に分離できるキラル誘導体化法を見出した。この意外な知見を基に生体試料中の各異性体を LC/MS で一斉に定量する分析系を構築し、シロイヌナズナに含まれる異性体種やマウスにおける各種異性体の体内動態を調査して発表した (Sugiyama *et al.*, *Anal. Sci.*, 39, 463–472, 2023)。また、D,L-システインを LC や IMS で良好に分離できるキラル誘導体化法を見出し、両異性体のマウスにおけるエナンチオ選択的な体内動態を LC/MS で調査し発表した (Sugiyama *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 222, 115088–115088, 2023)。さらに、マウス組織のイメージングを行う過程でジアステレオマー(エピマー)の関係にある UDP-GlcNAc および UDP-GalNAc が特徴的分布を示すことを見出し、これらを LC で分離する新手法を構築して発表した (Sugiyama *et al.*, *Anal. Methods*, 16, 1821–1825, 2024)。これらの成果は、それぞれの分子に関する基礎的新知見であると共に、現在開発中のエナンチオ選択的イメージング法を将来的に利用する際の重要知見になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugiyama Eiji, Higashi Toru, Nakamura Mao, Mizuno Hajime, Toyo 'oka Toshimasa, Todoroki Kenichiro	4. 巻 222
2. 論文標題 Precolumn derivatization LC/MS method for observation of efficient hydrogen sulfide supply to the kidney via d-cysteine degradation pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 115088 ~ 115088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpba.2022.115088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugiyama Eiji, Nakamura Mao, Mizuno Hajime, Furusho Aogu, Todoroki Kenichiro	4. 巻 39
2. 論文標題 Simultaneous determination of all aminobutyric acids by chiral derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 463 ~ 472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s44211-023-00293-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugiyama Chanudporn, Furusho Aogu, Todoroki Kenichiro, Sugiyama Eiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Selective analysis of intracellular UDP-GlcNAc and UDP-GalNAc by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Analytical Methods	6. 最初と最後の頁 1821 ~ 1825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d4ay00122b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugiyama Eiji, Nishiya Yuki, Yamashita Kenji, Hirokawa Ryo, Iinuma Yoshiteru, Nirasawa Takashi, Mizuno Hajime, Hamashima Yoshitaka, Todoroki Kenichiro	4. 巻 59
2. 論文標題 Charged chiral derivatization for enantioselective imaging of D-,L-2-hydroxyglutaric acid using ion mobility spectrometry/mass spectrometry	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 10916 ~ 10919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3cc01963b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 質量顕微鏡法によるキラル分子のエナンチオ選択的イメージング
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第78回学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野由梨、杉山栄二、飯沼賢輝、唐川幸聖、原田真志、古庄 仰、水野 初、中山 聡、轟木堅一郎
2. 発表標題 ジアステレオマー誘導体化とイオン移動度質量分析によるDL-アミノ酸分離法の開発
3. 学会等名 第34回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 ジアステレオマー誘導体化によるキラル分子のエナンチオ選択的イメージング
3. 学会等名 第47回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野晴貴、Chanudporn Sumpownon-Sugiyama、杉山栄二、古庄 仰、轟木堅一郎
2. 発表標題 MALDI-MSイメージング用自動スプレイヤーを用いたマトリックス塗布量の最適化
3. 学会等名 第47回日本医用マススペクトル学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山栄二、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 イオン移動度質量分析によるキラル分子のエナンチオ選択的イメージング
3. 学会等名 第33回クロマトグラフィー科学会議（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野由梨、杉山栄二、飯沼賢輝、唐川幸聖、原田真志、古庄 仰、水野 初、岩畑大悟、轟木堅一郎
2. 発表標題 ジアステレオマー誘導体化とイオン移動度質量分析によるDL-アミノ酸分離法の開発
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野 初、古庄 仰、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC/MS/MS法による生体試料中アミノ酪酸異性体全種の一斉定量分析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野 初、古庄 仰、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC/MS/MS法による生体試料中アミノ酪酸異性体全種の一斉定量分析
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会・第22回高山フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青山洋平、杉山栄二、山下賢二、古庄 仰、濱島義隆、轟木堅一郎
2. 発表標題 キラルアミンの選択的なイメージングを可能とする新規誘導体化試薬の開発
3. 学会等名 「分析中部・ゆめ21」若手交流会・第22回高山フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仲村茉緒、杉山栄二、水野 初、古庄 仰、轟木堅一郎
2. 発表標題 誘導体化LC/MS/MS法による生体試料中アミノ酪酸異性体全種の一斉定量分析
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第12回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝香達稀、杉山栄二、古庄 仰、轟木堅一郎
2. 発表標題 D, L-アミノ酸の質量分析イメージングを目指したカチオン型キラル誘導体化試薬合成法の開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第12回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村美優菜、杉山栄二、仲村茉緒、古庄 仰、水野 初、轟木堅一郎
2. 発表標題 コアシェルカラムを用いたアミノ酪酸全異性体高速一斉分析法の開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第12回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eiji Sugiyama, Yuki Nishiya, Hajime Mizuno and Kenichiro Todoroki
2. 発表標題 Enantioselective Imaging of D-, L-2-hydroxyglutaric acid By Chiral Derivatization and Ion Mobility Spectrometry/Mass Spectrometry
3. 学会等名 第6回京都生体質量分析研究会国際シンポジウム・国際質量分析イメージングシンポジウム2023京都（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山 栄二、坂根 巖、今村 美優菜、仲村 茉緒、水野 初、古庄 仰、轟木 堅一郎
2. 発表標題 アミノ酪酸全異性体の定量とイメージングに有用な高効率分離法の開発
3. 学会等名 第83回分析化学討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今村 美優菜、杉山栄二、仲村 茉緒、水野 初、古庄 仰、轟木 堅一郎
2. 発表標題 キラル誘導体化 LC/MS/MS によるアミノ酪酸全種の効率的分析法の開発
3. 学会等名 第 30 回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山 栄二、青山 洋平、朝香 達稀、山下 賢二、古庄 仰、濱島 義隆、轟木 堅一郎
2. 発表標題 イオン移動度質量分析によるD-, L-セリンのエナンチオ選択的イメージングに適した新規キラル誘導体化法の開発
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大竹 夏希、鈴木 郁海、Chanudporn Sumpownon-Sugiyama、杉山 栄二、内野 智信、古庄 仰、宮崎 靖則、賀川 義之、轟木 堅一郎
2. 発表標題 質量分析イメージングによる外用製剤中ナノ粒子構成成分の可視化
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山栄二、朝香達稀、青山洋平、山下賢二、古庄 仰、濱島義隆、轟木堅一郎
2. 発表標題 キラル誘導体化イオン移動度質量分析によるD-,L-セリンのエナンチオ選択的イメージング法の開発
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析化学シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山栄二
2. 発表標題 細胞や組織における局所代謝解析に有用な質量分析イメージング関連技術の開発
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析化学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 亀川 竜暉、杉山 栄二、古庄 仰、轟木 堅一郎
2. 発表標題 LC/MSにおいて気相イオンの温度をモニターする測定法の開発
3. 学会等名 第34回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朝香 達稀、杉山栄二、山下 賢二、古庄 仰、濱島 義隆、轟木堅一郎
2. 発表標題 D,L-アミノ酸の質量分析イメージングを目指した新規誘導体化試薬の開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第13回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青山 洋平、杉山栄二、山下 賢二、古庄 仰、濱島 義隆、轟木堅一郎
2. 発表標題 キラルアミンのエナンチオ選択的イメージングに適した新規キラル誘導体化試薬の開発
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第13回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山栄二
2. 発表標題 組織内低分子のエナンチオ選択的イメージングを可能とするon-tissueキラル誘導体化イオン移動度質量分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------