

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550104

研究課題名(和文)分子認識型光開裂性イオン化プローブの構築と機能

研究課題名(英文)Construction and function of photo cleavable molecular tag for molecular recognition

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析法に課された課題の一つは、分析試料の分子識別・立体識別情報を得ることである。申請者らは、レーザー光線により効率的にイオンを発生する機能性分子の開発を目指して研究を行い、以下の成果を得た。

- 1) マトリックスの支援なしにレーザー脱離イオン化を受け、効率的に検出可能であるポルフィリン誘導体を質量分析用の標識剤として開発した。
- 2) ポルフィリン骨格を有する分子認識能を有するイオン化プローブを構築し、標的物質を選択的に検出する手法を開拓した。

研究成果の概要(英文)：One of the challenges in mass spectrometry is molecular recognition and stereo recognition in analysis. The research had been carried out to develop new functional molecules as molecular tag for mass spectrometry, which can generate detectable ions upon irradiation of laser pulse.

- 1) Porphiline derivatives were developed as molecular tag which is detectable under laser desorption ionization mass spectrometry.
- 2) Method for LDI-MS for labeled molecule with this functional molecule had been exploited.

研究分野：有機化学

キーワード：質量分析 レーザ 脱離イオン化 分子標識 ポルフィリン 光開裂 LDI-MS 分子タグ 選択的検出

## 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。多様なイオン化法、解析法が開発される中において、質量分析による分子認識は、重要なフロンティアとして活発に研究されている。<sup>1)</sup> また、分子認識機能の創造・評価を通じた科学技術の集積は、医薬・工学に渡る基礎的な課題の一つとして、化学の全領域における関心事である。質量分析法は、分子認識能のハイスループットな評価法としてもまた、重要な役割を担っている。

私達は、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。<sup>2)</sup> 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。<sup>3)</sup> 誘導化型の試薬は、強固な化学結合が形成されるために、誘導化後の取扱が容易である反面、反応条件の設定が難しく、操作が煩雑になりやすいという重大な欠点を持っている。例えば、目的物が微量しか含まれていない多くの実践例では、クロマトグラフィーによる精製プロセスが必要となり、LDI-MS 法の利点であるスループットの低下をもたらす要因となっている。

研究着手当時において、類似の分子認識型の質量分析法には、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI 法) が採用されて、これまでに数多くの優れた知見が得られている。<sup>4),5)</sup> 本方法は、分子認識と電荷付与 (イオン化) を分離して観察・議論することが可能であることから、既存の ESI 法との結果と比較することにより、未解決のイオン化プロセスへの知見が数多く得られるものと考えている。例えば、ベタイン構造による 2 つの相補的な電荷による強固な分子認識を利用しつつ、これまで全体的に中性化するために検出され難かったイオン種が検出できる可能性がある。もちろん、その性能の面においても、標的分子は抽出と質量電荷比 ( $m/z$ ) によって分離されることから、LC-MS の様なクロマトグラフによる分離が不要であるなどの利点が期待できる。

申請者らが開発した光開裂性のイオン化剤は、中性の試薬自身が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。そのイオン化機構への理解は未だ十分に深まっていない。そのイオン化過程が明らかにできれば、これまで明確に定義できなかった分子認識と電荷付与過程の関連を明かにすることができる。

LDI-MS による質量分析は、位置情報を含んでおり、既に優れた研究が多くなされているエレクトロスプレーイオン化法とは異なる

り、イメージング等への分析へと展開可能である。この様な背景の下、私達が開発した光開裂型イオン化剤に、分子識別能を有する官能基群を連結することにより、標的分子を選択的に抽出・検出する新しい質量分析システムが確立できるのではないかとこの着想から、本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

生命活動は、微量な低分子量成分により制御されていることが知られている。簡便な計測技術の確立は、生命科学における重要なブレークスルーを引き出す可能性を秘めている。質量分析法に課された課題の一つは、分析試料の分子識別・立体識別情報を得ることである。本研究課題で、申請者らは、独自に開発した質量分析用光開裂性分子に、分子認識部位を組み込んだ分子認識型光開裂性イオン化プローブを合成する。標的とする分子は、主に水溶性低分子とし、試料溶液から抽出した有機層をそのまま LDI-MS ターゲットプレートにアプライする手法により、簡便な操作性で、高感度に標的分子を定性・定量するための質量分析法の確立を目指す。これらの研究を通じて、LDI-MS 法のイオン化機構に関する理解を深め、分子識別・立体識別可能な質量分析法への応用展開を目指す。

## 3. 研究の方法

私達が既に開発して上市した光開裂性イオン化剤に、既存の分子認識能を有する化合物へ、分子認識を行うための部分構造を導入し、質量分析での評価に着手した。

光開裂性分子は、レーザー脱離イオン化質量分析の条件下において、ベンジルエーテルの炭素酸素結合が開裂し、負イオン検出モードではアシルフェノレートとして、正イオン検出モードではアシルフェノールのナトリウム付加体として検出される。このものは、スクシンイミドエステル基を有しており、求核性のアミンに対して容易にアミド結合形成を経て導入することができる。

そこで、四酢酸エチレンジアミン、トリス (2-アミノエチル) アミン等の配位能力を有する分子をアシル化反応を利用して導入し、様々な条件下において LDI-MS 応答への特性を検討を行った。

トリフルオロ酢酸等による酸性条件、三級アミン共存したでのサンプリング、プレート上での重層化などの条件を適用して、応答特性の変化を検討した。ところが、光開裂性分子へイオン性官能基を導入することにより、一般的にシグナル強度が著しく減弱することが判明した。

これは、恐らく、レーザー照射時の光イオン化過程において、安定イオン対の運動が緩衝するためであろうと考えている。

光開裂性分子は、中性条件から光開裂（恐らく中性ラジカルへの均等開裂）を引き続き電子移動により、発生するアニオン種を検出する機能性分子である。様々な分子構造を検討した結果、開裂する結合を電子吸引性置換基により電子欠乏状態にすることにより、開裂速度が向上して、ひいては検出感度向上に寄与したと考えている。

検出されるにはイオン化が必須であるが、光反応であることから均等開裂による中性ラジカルの発生が反応の初期ステップであると推定される。そして引き続く電子移動による付着化が素早く進行することが、イオン化がうまく行く条件であると理解できる。ところが、実験結果は、恐らくその電子移動によるイオン生成に、共存するイオン対が緩衝していると考えられる結果であった。

これまで、中性の低分子検出で良好な結果を得てきた光開裂性分子であったが、このままでは極性分子、分子認識を目指す様な分子への適用は困難であることが判明した。

そこで、従来とは異なるイオン化機構有するイオン化分子の探索・検討に着手した。これまで、ダイレクトで高速な結合開裂を目指していたが、先の研究結果を得て、一転してレーザーパルスのエネルギーを大量に吸収して、大きく分極することが可能な分子候補を探索することにした。

すなわち、極性分子にはイオン化し得る構造が大量に含まれている。従って、その分子に優先して、イオン化し、気相へ入り分子モチーフの探索が必要であるとの認識に至った。

恐らく、光エネルギーの吸収による色素構造の分極を経て、脱イオン対を生じ、電場からのエネルギーを得て気相中へ飛び出すことが可能になるのではないかと想定した。

可視光へ及び吸収波長と疎水性・塩基性の性質を有する分子を探索した結果、ポルフィリンが良好な応答特性を有していることが判明した。分極型色素を用いることにより、否応なく分子量が大きくなり、分子標識として導入する困難さは増すことになったがものの、それを埋め合わせるメリットも期待できる。

1) イオン化のための十分なエネルギーが確保される。比較的大きな分子までの適用を視野に入れることができるようになった。

2) 色素によりレーザーが優先的に吸収されるために、標的分子が保護されることが期待できる。

3) 大きな色素分子はクラスターを形成し安く、標的分子に応じて特異的なシグナルパタ

ーンを形成し得ることが見いだされた。

以上の理点を最大限に活用するために、分子を捕捉する、反応活性部位の検討を行った。代表的なヒドロキシスクシンイミドエステルは、取扱安く、アミン類に対して良好な反応性を示すことが確認できたために、一次選択としての検討を行った。

しかし、アミノ酸等の水溶性基質に対しては、反応性の低下が観察された。恐らく、分子タグの水相への親和性が乏しいためであると推定された。同時に、中性条件で比較的疎水性の大きなポルフィリンが、水性の反応溶液で相分離を生じているものと考えられた。エタノールをはじめとする一般的な両親媒性の溶媒の添加を試みたものの、反応の進行は満足いく水準になることはなかった。

そこで、トリエチレングリコールを親水性の中性スペーサーとして導入したところ、アミノ酸とヒドロキシスクシンイミドエステルとの反応効率が著しく向上することが観察された。化学反応性における相分離の影響を実証することができた。

但し、トリエチレングリコール分子鎖は、LDI-MS条件下で切断されやすく、標識化率そのものを格段に向上させるのは困難な状況であり、応用可能性が高いとは言いがたい結果であった。

そこで、「ポルフィリン環からただちに誘導可能で、単純な構造であること」を条件に、各種分子捕捉様の反応活性基を合成により探索を行った。結果的に、イソチオシアネートが私達の目的に最も適した反応性、安定性を有していることが判明した。

新しい、誘導化試薬は、水溶性分子との反応も良好であり基質に応じた応答特性を示した。標的分子に依存する部分があるものの sub pmol/well 水準の検出が可能である。

#### 4. 研究成果

質量分析法に課された課題の一つは、分析試料の分子識別・立体識別情報を得ることである。申請者らは、レーザー光線により効率的にイオンを発生する機能性分子の開発を目指して研究を行い、以下の成果を得た。

1) 既存の光開裂性分子では、極性官能基、およびイオン性官能基の存在により、イオン化に対する緩衝作用が生じることが明らかになった。

2) マトリックスの支援なしにレーザー脱離イオン化を受け、効率的に検出可能であるポルフィリン誘導体分子標識剤を新たに質量分析用の標識剤として開発した。

3) ポルフィリン骨格を有する分子認識能を有するイオン化プローブを構築し、標的物質

を sub pmol/well 水準で選択的に検出することに成功した。

今回開発された分子は、機能性（分子認識力）とともに、アクセスの良い分子であることが、科学研究へのインパクトになると期待している。

既存の光開裂性分子が、中性の低分子についての適用に限られることが判明したことが、新たなプローブモチーフの開拓へと繋がった。

ポルフィリンを基本骨格とした分子標識剤は、会合体を形成しやすく、新たな分子認識と質量分析への応答パターンを示すことが期待できる。

デメリットと思われていた分子の巨大化により、むしろ新しい分子認識 検出機構の確率へ繋がる可能性を拓くことができたと考えている。

#### <引用文献>

1) *Mass Spectrometry Reviews*, 2001, 20, 253- 309.

2) *J.Org.Chem.* 2007, 72, 6427-6433.

3) *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35 (9) 1413-1416.

4) *Anal. Chem.*, 2011, 83, 7115-7122.

5) *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, 132, 2309-2320.

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 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