

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590047

研究課題名(和文) 質量分析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 derivatization reagents for mass spectrometry and sensitive analysis of the biomolecules

研究代表者

三田 智文 (Santa, Tomofumi)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30187306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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が広く用いられている。そこで、LC/MS/MSにおける検出感度および選択性の向上を目的として、LC/MS/MS用の標識試薬を作製することを目的として研究を行った。また、作製した標識試薬を用いて疾患のマーカ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、先天性代謝異常症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, the labeling reagents were synthesized to enhance the sensitivity and selectivity in LC/MS/MS. The reagents for LC/MS/MS enabled sensitive analysis of the biomolecules such as diseases markers. These methods were useful for the screening of the inherited metabolic disorders.

研究分野：分析化学

キーワード：標識試薬 質量分析 クロマトグラフィー 生体分子 新生児マススクリーニング LC/MS/MS

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、生命機能の維持に關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、疾患に關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、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) / 蛍光検出法を用いて、生体分子や薬物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を有さないため、HPLC/蛍光検出法を用いる場合には、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、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、過酸化物用、チオール基用など、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關連分子、高血圧關連分子、糖尿病關連分子などの高感度分析法を開発し、これら分子と疾患との關連を明らかにした (引用文献)。

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 あるいは LC/MS/MS 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た。LC/MS 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 に用いる標識試薬は、1) 分析対象分子と速やかに反応する、2) 適度な疎水性を有し分析対象分子を逆相 HPLC による分離に適した構造に変換できる、3) 容易にイオン化する構造 (プロトン親和性基など) を有し分析対象分子のイオン化効率を高めることができる、などの条件を満たすことが必要である。また、LC/MS/MS に用いる標識試薬は、上記の3つの条件に加え、4) MS/MS 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 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關する報告が少ないため、LC/MS/MS 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 による開裂様式を検討し、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開裂が起き、高い収率でプロダクトイオンを生じることを見出した (引用文献)。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 (DAABD-AE、DAABD-MHz) を開発した (引用文献)。しかし、今後 LC/MS/MS に適した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 による開裂様式の關係を検討し、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。さらに、新生児マススクリーニング (先天性代謝異常症検査) のように、多数の検体を分析する場合には、LC を用いずに MS/MS のみで分析できることが望まれる。MS/MS 用の優れた標識試薬を開発できれば、当該領域に大きく貢献できると考え、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 による開裂様式の關係を検討し、MS/MS 用および 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、得られた標識試薬を用いて、先天性代謝異常症のマーカ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、疾患マーカ分子の同定に取り組む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 に用いる標識試薬は、1) 分析対象分子と速やかに反応する、2) 適度な疎水性を有し分析対象分子を逆相 HPLC による分離に適した構造に変換できる、3) 容易にイオン化する構造 (プロトン親和性基など) を有し分析対象分子のイオン化効率を高めることができる、4) MS/MS 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、アルコール基の標識にはダンシルクロリド、カルボニル基の標識にはダンシルヒドラジンがしばしば用いられる。生じるダンシル標識化体は、MS/MS 法によりスルホン基と芳香環の間の結合が開裂し、 m/z 170 または m/z 171 のプロダクトイオンを生じる。しかし、ダンシル標識化体はプロトン親和性がやや低いため、イオン化効率が低く、検出感度は十分ではないという欠点がある。また、カルボニル基用標識試薬として、2-hydrazino-1-methyl-pyridine (HMP) が報告されている。HMP 標識化体は、イオン化効率は高いが、MS/MS によるプロダクトイオンの収率が低く MS/MS 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。そこで、研究代表者は、ベンゾフラザン化合物の開裂様式を検討し、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開裂が起き、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(引用文献、)。この結果を基に、カルボキシ基用標識試薬として DAABD-AE を、カルボニル基用標識試薬として DAABD-MHz を報告した(引用文献、)。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、ダンシル標識化体と比較すると約 10 倍のイオン強度が得られ、さらに、MS/MS 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、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 による開裂様式との関係を詳細に検討し、MS/MS 用および 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症検査(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。

欧米では、既に、有機酸代謝異常症を中心として、MS/MS 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 を用いて同様な検討が進められている。現在、MS/MS 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 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。この方法は LC での分離を要しないため、分析時間が短く、多数の検体の分析に適している。

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 で分析されている。しかし、GC/MS 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、MS/MS 法あるいは LC/MS 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た。研究代表者は、これまでに、DAABD-AE と LC/MS/MS 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(引用文献、)。この方法は、GC/MS 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、実用性が高いことが示されている。さらに、合成した標識試薬を用いて、サクシニルアセトン(チロシン血症のマーカ分子)、17-ヒドロキシprogesterone、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)などをはじめとする、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 MS/MS および LC/MS/MS で行うことができる。MS/MS を用いた方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 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

ベンゾフラザン以外の骨格にも着目し、さらに高性能な標識試薬を開発することをめざして研究を行った。文献を調査した結果、構造中に、芳香族スルホンアミド、ヒドラジン、アミド、エステル、ウレア、チオウレアなどの構造を有する化合物は、MS/MS 法により容易に開裂し、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明らかになった。今後、これらの構造を有する標識試薬を設計し合成する予定である。(主な発表論文等・雑誌論文、図書)

(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

ベンゾフラザン骨格を有する LC/MS/MS 用標識試薬である DAABD-AE を用いて、2-メチルクエン酸の高感度かつ簡便な分析法の開発し、新生児の先天性代謝異常症のスクリーニング(マススクリーニング)に応用した。従来のスクリーニングでは、濾紙血液試料中のプロピオニルカルニチンを測定し、プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症、コバラミン代謝異常症を検出している。しかしこの方法では偽陽性がしばしば認められることが知られている。患者(n=20)およびコントロール(n=377)の濾紙血液中 2-メチルクエン酸を測定したところ、2-メチルクエン酸濃度は患者血液中の方が明確に高かった。本法は、従来のスクリーニングの二次スクリーニングに用いることができると考えられる。(主な発表論文等・雑誌論文、学会発表)

(3) ナノ粒子内包薬物定量法の開発

開発した標識試薬を用いて、ナノ粒子内包薬物を標識化し、分離定量することを試みた。近年、薬物を標的部位に送達することを目的として、薬物を内包したナノ粒子が用いられており、有効で安全な薬物療法を実施するためには、これらの薬物を正確に定量することが必要であると考えた。最初に、ナノ粒子の精製法の開発に取り組んだ。これまで、ナノ粒子の精製には、超遠心、透析、サイズ排除クロマトグラフィー等の方法が報告されている。しかし、これらの方法は手順が複雑であり長時間を要するなどの問題点があった。そこで、ナノ粒子を簡便に精製するために、モノリスシリカディスクを用いる方法を検討した。その結果、ナノ粒子を、2分間遠心により分散溶液中から精製することが可能となった。この方法は様々な大きさのナノ粒子に適用できる。次に、薬物内容ナノ粒子をモノリスカラムで分離した。ナノ粒子は、内包薬物の種類にかかわらず、ハイドロダイナミックモードで分離された。今後、分離された薬物を標識化し、LC/MS/MSにより高感度に分析する予定である。(主な発表論文等・雑誌論文、)

<引用文献>

Santa T, Fukushima T, Ichibangase T, Imai K. Recent progress in the development of derivatization reagents having a benzofurazan structure. *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 343-353 (2008).
DOI: 10.1002/bmc.945
Santa T, Al-Dirbashi OY, Ichibangase T, Fukushima T, Rashed MS, Funatsu T, Imai K. Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for carboxylic acids in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC/ESI-MS/MS). *Biomed. Chromatogr.*,

21, 1207-1213 (2007).

DOI: 10.1002/bmc.878

Santa T, Al-Dirbashi OY, Ichibangase T, Rashed MS, Fukushima T, Imai K. Synthesis of 4-[2-(*N,N*-dimethylamino)ethylamino sulfonyl]-7-*N*-methylhydrazino-2,1,3-benzoxadiazole (DAABD-MHz) as a derivatization reagent for aldehydes in liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **22**, 115-118 (2008).

DOI: 10.1002/bmc.903

Santa T. Derivatization reagents in liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **25**, 1-10 (2011).

DOI 10.1002/bmc.1548

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. *Am. J. Med. Genet.-A*, **149A**, 1219-1223 (2009).

DOI 10.1002/ajmg.a.32874

Al-Dirbashi OY, Kölker S, Ng D, Fisher L, Rupaar 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. *J. Inher. Metab. Dis.*, **34**, 173-180 (2011).

DOI 10.1007/s10545-010-9223-2

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)

Itoh N, Santa T, Kato M. Rapid evaluation of the quantity of drugs encapsulated within nanoparticles by high-performance liquid chromatography in a monolithic silica column. *Anal. Bioanal. Chem.*, **407**, 6429-6434 (2015). (査読有)

DOI:10.1007/s00216-015-8805-0

Itoh T, Santa T, Kato M. Rapid and mild purification method for nanoparticles from a dispersed solution using a monolithic silica disk. *J. Chromatogr. A*, **1404**, 141-145 (2015). (査読有)

DOI:10.1016/j.chroma.2015.05.047

Al-Dirbashi OY, McIntosh N, McRoberts

C, Fisher L, Rashed MS, Makhseed N, Geraghty MT, Santa T, Chakraborty P. Analysis of methylcitrate in dried blood spots by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *JIMD Rep.*, **16**, 65-73 (2014). (査読有)

DOI:10.1007/8904_2014_321

Santa T. Recent advances in development and application of derivatization reagents having a benzofurazan structure: a brief overview. *Biomed. Chromatogr.*, **28**, 760-766 (2014). (査読有)

DOI:10.1002/bmc.3115

Santa T. Recent advances in analysis of glutathione in biological samples by high-performance liquid chromatography: a brief overview. *Drug Disc. Ther.*, **7**, 172-177 (2013). (査読有) DOI:10.5582/ddt.2013.v7.5.172

Santa T. Derivatization in liquid chromatography for mass spectrometric detection. *Drug Disc. Ther.*, **7**, 9-17 (2013). (査読有)

DOI:10.5582/ddt.2013.v7.1.9

東京大学・大学院薬学系研究科・特任教授
研究者番号：30187306

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

〔学会発表〕(計 1 件)

Al-Dirbashi OY, McIntosh N, McRoberts C, Geraghty MT, Santa T, Chakraborty P. Methylcitrate in DBS improves newborn screening for propionic and methylmalonic acidemia. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism (ICIEM 2013). 2013.9.3-6. Barcelona, Spain.

〔図書〕(計 1 件)

Santa T. Derivatization in LC-MS Bioanalysis. Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols, and Regulations, chapter 19, pp239-248. edited by Wenkui Li, Jie Zhang, Francis LS Tse (John Wiley and Sons 2013) (Online 30 AUG 2013 Online ISBN: 9781118671276) (Print ISBN: 9781118159248)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

三田 智文(SANTA, Tomofumi)