

高感度高選択的二次元蛍光HPLC-タンデム質量分析法 を可能とする新規試薬の設計とキラルアミノ酸分析 への適用

大山, 翼

<https://hdl.handle.net/2324/1500662>

出版情報：九州大学，2014，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）



氏 名	大山 翼
論 文 名	高感度高選択的二次元蛍光 HPLC-タンデム質量分析法を可能とする新規試薬の設計とキラルアミノ酸分析への適用
論文調査委員	主 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 瀧瀬 健司 副 査 九州大学大学院 薬学府 教授 王子田 彰夫 副 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 山田 健一 副 査 熊本大学大学院 生命科学研究部 教授 大槻 純男

論文審査の結果の要旨

近年、分析技術の進歩に伴いヒトを含む高等動物からも D-アミノ酸が発見され、新規機能性物質やバイオマーカーとして創薬や診断への利用が期待されている。特に D-Ser や D-Asp は生理機能の解明が進んでおり、海馬や小脳に存在する D-Ser が学習記憶や運動記憶に関与していることや、下垂体、松果体、精巣等に含まれる D-Asp がホルモン分泌に関与していることが報告されている。また疾患と D-アミノ酸の関連についても研究が進められ、ALS モデルマウスで脊髄中の D-Ser が有意に増加することや、腎障害モデルマウスにおいて血清中の D-Ser が有意に増加することが明らかにされている。しかし、D-Ser、D-Asp を除くほとんどの D-アミノ酸は生体内含量が微量であり、分析法の感度・選択性不足により分布や機能解明が進んでいない。

この課題に対して論文提出者の大山翼氏は、D-アミノ酸研究の飛躍的な進展を可能とするためには、「高い感度と高い選択性の双方を有する分析法の開発」が必要と考えた。選択性向上の鍵は、二次元蛍光 HPLC-タンデム質量分析法（二次元蛍光 HPLC-MS/MS）を構築することである。本法は高い分離能を有する二次元 HPLC に質量分離という新しい次元を導入することにより、選択性の向上を可能とする。一方で従来の誘導体化試薬では蛍光・MS/MS 双方で高感度分析を可能とする試薬は報告されておらず、本法の開発に際し、新規誘導体化試薬（FL/MS/MS 試薬）の設計合成が必要である。

新規試薬は、当研究室で発見した 6-メトキシ-4-キノロン（6-MOQ : 6-methoxy-4-quinolone）を基盤骨格として選択している。本骨格は水中でモル吸光係数 $\varepsilon = 9350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、蛍光量子収率 $\phi = 0.5$ の強い蛍光を示し、光や熱に対する安定性が高い蛍光団である。試薬設計に際して 1 位にアルコール、アミン、カルボン酸の側鎖を有する 1 位置換 6-MOQ 誘導体を合成し、逆相 HPLC を用いて蛍光と MS/MS の感度比較を行った。その結果、何れの 6-MOQ 誘導体においても蛍光及び MS/MS で fmol レベルの高感度分析が可能であり、1 位置換 6-MOQ が優れた FL/MS/MS 試薬の基盤になることが示唆された。そこで新たに 6-MOQ 骨格を有する新規試薬（2,5-dioxopyrrolidin-1-yl(2-(6-methoxy-4-oxoquinolin-1(4H-yl)ethyl) carbonate : 6-MOQ-EtOCOOSu）を合成した。本試薬を用いたアラニン誘導体（6-MOQ-Ala）は、逆相 HPLC-蛍光で 1 fmol/injection、MS/MS で 0.5 fmol/injection の検出下限（LOD）を有していた。また、Chiral-HPLC を用いた場合では、蛍光で 50 fmol/injection、MS/MS で 0.5 fmol/injection の検出下限を有しており、何れの分離検出条件においても高感度分析が可能であった。

一方で、我々はこれまでに 6 位置換 4-キノロンの蛍光特性も明らかにしており、メトキシ基（6-MOQ）以外にもエトキシ基やジメチルアミノ基を有する化合物においても強い蛍光を示すことを見出している。大山翼氏はこれらの知見から、6 位をエトキシ基やジメチルアミノ基に置換した 4-キノロンにおいても FL/MS/MS 試薬としての可能性を検討するため、同様にアミノ酸誘導体化試薬を合成した。3 種の試薬を用いて Ala 誘導体を Chiral-HPLC-蛍光-MS/MS で分析した際の LOD は、蛍光検出において何れの Ala 誘導体も LOD が 50 fmol/injection であった。一方で MS/MS 検出ではメトキシ体が最も高感度分析を

可能とし、その LOD は 0.5 fmol/injection であった。

次に、6-MOQ-EtOCOOSu を用いてタンパク質構成全アミノ酸に Ile と Thr のアロ体を含めた 22 種の逆相分離及び光学分割の検討を行い、二次元蛍光 HPLC-MS/MS 法の構築を試みた。一次元目の逆相分離は、キャピラリーモノリス型 ODS カラムを用いて検討を行った。その結果、移動相に 0.01%ギ酸 (FA) を含有する 6%MeCN 水溶液及び、0.02% FA、8 mM ギ酸アンモニウム (NH_3FA) を含有する THF 水溶液の 3-13%のグラジエント溶離により 22 種のアミノ酸分離を達成した。二次元目の光学分割は、パークル型キラル固定相 12 種とキニンアルカロイド型キラル固定相 3 種類を用いて検討を行った。その結果、移動相に FA もしくは NH_3FA を含有する MeCN-MeOH の混液を、光学分割カラムに Chiralpak QN-AX、Chiralpak ZWIX(+)及び KSAASCP-001S を用いることで、タンパク質構成全アミノ酸に Ile と Thr のアロ体を加えた全ての光学異性体の分離を達成した。これらの結果をもとに二次元蛍光 HPLC-MS/MS を構築した。MS/MS 検出においては何れのアミノ酸誘導体 (6-MOQ-AAs) も試薬由来と考えられる 176 Da のプロダクトイオンが観察され、MS/MS における検出下限はインジェクトあたり 0.05-100 fmol であった。

さらに本研究では MS/MS 特性を活かし、定量性の向上、分析の迅速化を目的として同位体標識した 6-MOQ-EtOCOOSu (6-MOQD₃-EtOCOOSu)を設計し、二次元蛍光 HPLC-MS/MS 法を用いたディファレンシャル解析を行っている。同位体標識試薬の設計に際し、重水素導入部位は、合成の容易さ、試薬原料の有無、また 6-MOQ-AAs で確認された 176 Da のフラグメントイオン (6-MOQ 由来) の存在から、6-MOQ 骨格のメトキシ基としている。6-MOQD₃-EtOCOOSu のアミノ酸誘導体 (6-MOQD₃-AAs) を 6-MOQ-AAs と同様の分離条件でアミノ酸分析を行った結果、逆相 HPLC を用いた親水性アミノ酸の分離では 6-MOQD₃-AAs の方が 6-MOQ-AAs よりもわずかに早い保持時間を示した。一方で二次元目の MS/MS 検出における検出下限についてはインジェクトあたり 0.1-50 fmol であり、6-MOQ-AAs と同程度の感度を有していた。そこで、6-MOQ-EtOCOOSu 及び 6-MOQD₃-EtOCOOSu を用いて二次元蛍光 HPLC-MS/MS 法を構築し、ノックアウトマウスと野生型マウスのディファレンシャル解析に適用した。ノックアウトマウスにはセリンラセマーゼノックアウト (SRR-KO) マウスを使用した。セリンラセマーゼ (SRR) は L-Ser から D-Ser を合成する酵素であり、SRR を欠損することで D-Ser 濃度が顕著に低下することが報告されている。本法を用いた野生型マウス (C57BL/6) と SRR-KO マウスのディファレンシャル解析では、野生型及び SRR-KO マウス中の D,L-Ser の同時解析・比較を達成し SRR-KO 中の D-Ser 濃度の減少を観察可能であった。

本研究では、蛍光及び MS/MS の双方で高感度検出を可能とする新規蛍光 MS/MS 誘導体化試薬 (FL/MS/MS 試薬) の設計を行い、新規試薬を用いた二次元蛍光 HPLC-MS/MS 法の構築を達成している。さらに定量性の向上、分析の迅速化を目的として同位体標識した FL/MS/MS 試薬を設計し、ノックアウトマウスと野生型マウスの D-アミノ酸含量変化を、二次元蛍光 HPLC-MS/MS 法を用いてディファレンシャル解析が可能であることを示した。本研究は、D-アミノ酸研究を飛躍的に推進する分析法として有用であり、新規性も高く研究成果の価値は高い。従って、博士 (創薬科学) の学位に値すると認める。