

質量分析用ラベル化試薬 (MS プローブ) の創製とバイオへの応用

本田 亜希, 鈴木 祥夫, 鈴木 孝治

1 はじめに

質量分析法は、既存の分析方法の中で最も検出感度が高く、多くの微量物質の検出法として、医学、薬学、化学工業、環境科学など幅広い分野で普及しているニーズの高い分析手法である。特に、1980年代末に相次いで実用化され、ノーベル賞の受賞の対象になったエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) やマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) は、非常にソフトなイオン化法であるため、DNA やタンパク質などのような生体分子を壊すことなく検出することができ、遺伝子、生理的または病的環境における特定要因の構成分子を網羅的に解析することに大きく貢献している^{1)~7)}。さらに ESI-MS と液体クロマトグラフィー (LC) とを組み合わせることにより、数百から数千分子の同定を可能とし、生理的現象に深く関与する生体分子の同定が飛躍的に進歩した^{8)~12)}。

しかし、すべての検体が ESI-MS 測定によって検出されるわけではなく、溶液相から気相へのイオン化過程には、その検体の分子構造等によって制約がある^{13)~15)}。ESI-MS において効率の良いイオン化を行うために、通常、試料溶液あるいは移動相にプロトン性溶媒や無機塩を添加する方法が採られている。しかしこれらの溶媒や添加剤により、逆にイオン化効率が低下するといった問題点がある^{16)~18)}。

今回開発した分析試薬は、質量分析用のラベル化試薬であり、MS プローブと呼ぶ。MS プローブを用いたイオン化法を、筆者らは MPAI 法 (MS-probe aided ionization) と呼んでいる。この試薬を作ることで、これまで障害となっていたイオン化の問題を根本的に解決することができ、質量分析計を用いて多様な対象物質を、極めて高感度、高精度に検出することが可能になる。

2 MS プローブの有用性¹⁹⁾²⁰⁾

開発した試薬の構造を図1に示す。基本的にはイオン化試薬であり、イオン性官能基としての4級アンモニウム基を有している。測定対象物質との結合部位は、様々な官能基に自在に付け替えることが可能であるため、幅広い物質に適用することができる。さらに、室温で穏和に、選択的に、かつ短時間でラベル化できる。これらの試薬は、ベンゼン環とアルキル基を持っているため、適度な脂溶性があり、極性溶媒だけでなく非極性溶媒にも溶解する。従来検出することが困難であった対象物質も高感度の測定が可能となる。以下では、合成した質量分析用 MS プローブの特性を、誘導体化の前後で ESI-MS を用いて評価し、各質量分析用 MS プローブの有用性について概説する。**KAP-CA01** は、カルボキシル基を含むサンプルと図1に示したように結合する。**KAP-CA01** によるカルボン酸化合物の誘導体化の例として、図2に胆汁酸の成分の一つであ

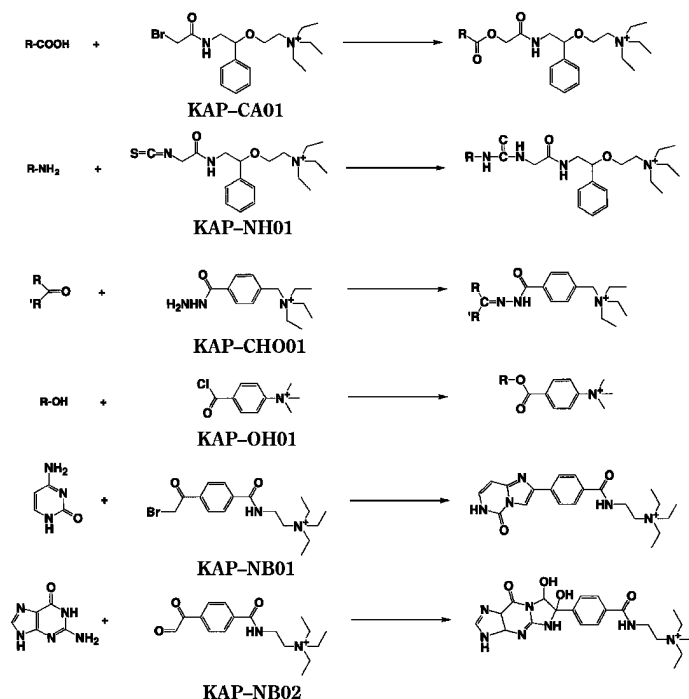


図1 MS プローブ (KAP シリーズ) とラベル化反応

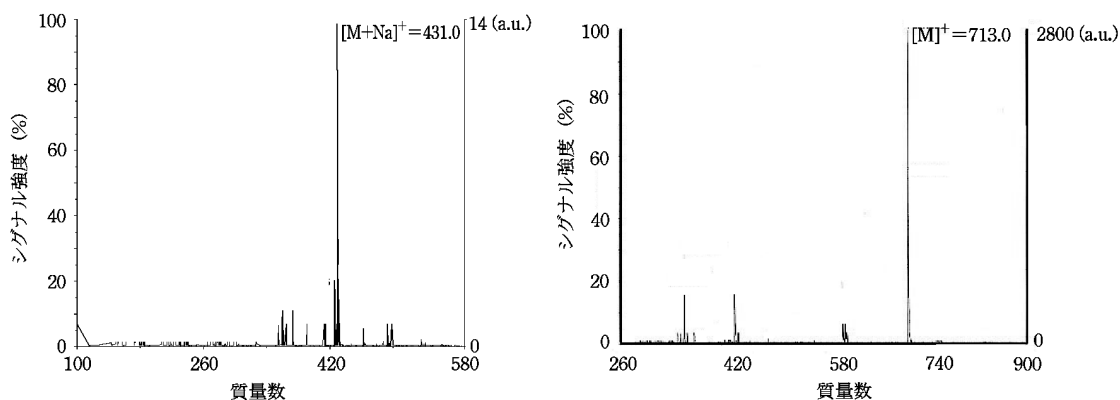


図2 KAP-CA01でラベルする前後のコール酸のマススペクトル（左：ラベル化前，右：ラベル化後）

るコール酸単独および KAP-CA01 でラベル化した後のマススペクトルを示す。左側に示すようにコール酸単独では、分子イオンピークは観察されず、Na⁺ が付加した極めて強度の弱いピーク ($m/z=431.0399$) しか観察されなかった。一方、右側に示すように、コール酸を KAP-CA01 でラベル化すると、誘導体化合物の分子イオンピーク ($m/z=713.0755$) が明瞭に観察され、その強度はコール酸単独のときと比較して大幅に増加した。また、ピコモルオーダーの微量サンプルでも検出することができた。以上の結果から、今回開発した試薬は電荷を有しているため、MS 測定に不向きな試料の高感度測定に大きく寄与していることが分かった。

先に記述したように、移動相の溶媒の組み合わせによっては質量分析の感度が低下したり、また無機塩を溶媒に添加する場合、非極性の溶媒には無機塩が溶解しないといった問題がある。そこで次に、安息香酸を KAP-CA01 で誘導体化した化合物において、移動相に様々な極性を持つ溶媒を流して MS 測定を行った。まず安息香酸を KAP-CA01 でラベル化した化合物は、極性の高いメタノールや極性の低い酢酸エチルといった様々な有機溶媒に溶解した。これは電荷を持つ4級アミン部位とサンプルと結合する部位との間が、ベンゼン環を含む構造で構成されているため、適度な脂溶性を持っているからである。次に移動相にメタノール、アセトニトリル、アセトン、THF、酢酸エチルおよびクロロホルムを用いて、各々の溶媒を流したときの誘導体の分子イオンピーク [$m/z=426.56$] の強度を測定したところ、ピーク強度は溶媒の極性に依存することなく、ほぼ一定の値が得られた。通常、ESI-MS の移動相には、溶媒から試料への電荷の移行がスムーズに行われるため、極性の高いメタノール、水を基本とし、これにアセトニトリル、酸性溶媒などが添加される。しかし、本試薬は既に電荷を有しているため、溶媒から試料への電荷の移行は無関係である。そのため、極性の低い酢酸エチル、クロロホルムを用いても、極性の高い溶媒を用いたときと同様のピーク強度が観察されたと考えられる。

コール酸のほかにも種々のアミノ酸を測定したところ、コール酸と同様の結果を得ることができた。また、KAP-CA01 以外にも、カルボニル基、アミノ基、水酸基をラベル化する試薬を合成しその特性を評価したところ、KAP-CA01 と同様、試料を誘導体化することにより、誘導体化前と比較してピーク強度の増加、検出限界の向上を達成することに成功した。また、

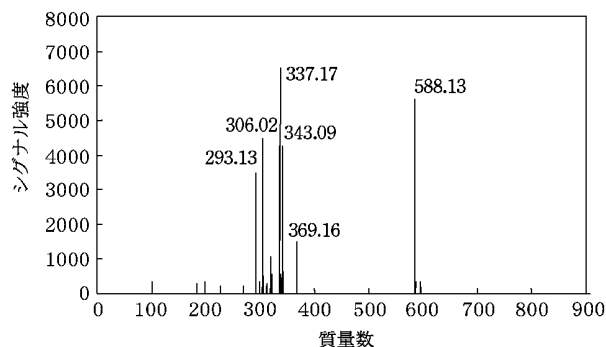


図3 KAP-NB02でラベル化した8-OHdGのマススペクトル

核酸の誘導体化に用いるラベル化試薬として KAP-NB シリーズ (KAP-NB01, KAP-NB02) を作製した。これらはそれぞれシトシン塩基、グアニン塩基と特異的に反応し、それらの塩基を有する核酸分子の MS 測定の感度を向上する。

3 質量分析用 MS プローブを用いた酸化ストレスマーカーの検出

上述の核酸分子用の誘導体化試薬である KAP-NB シリーズは、酸化ストレスのマーカーである酸化損傷 DNA の定量測定に有効に用いることができる。酸化ストレスとは、生体内で生成する活性酸素群の酸化損傷力と生体内の抗酸化ポテンシャルの差のことである。DNA は酸化ストレスにより切断、欠失、修飾などを受ける。これらの一部は尿中に排出され、生活習慣病との相関を示す。中でも代表的なものとして8-ヒドロキシデオキシグアニン (8-OHdG) が知られる²¹⁾。これらのストレスマーカーはこれまで HPLC, ELISA 法等により定量がされているが、夾雑物の除去、手間がかかる、高価である、などの欠点がある。質量分析による測定を高感度に行えれば、当然に分子量の情報を得ることができるため、複数のストレスマーカーを同時に定量することができ、有利と考えられる。KAP-NB02 と 8-OHdG は 45°C で 60 分間反応し、ESI-MS で測定を行ったところ目的のピークを得ることができた (図3)。内部標準としてベンジルトリエチルアンモニウムを用いて測定を行ったところ nM レベルの検出が可能であった。KAP-NB シリーズを用いることで、ラベル化をしない場合と比較し約 10 倍感度は上昇する。これらを用いて尿等における核酸関連物質の感度を選択的に向上することができ、有用性が期待される。

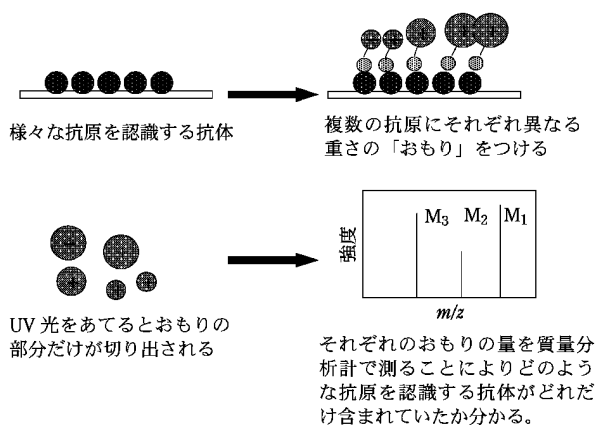


図4 切断部位をもつMSプローブを用いたタンパク質の網羅的定量

4 切断部位を持つMSプローブ

質量分析は混合物の測定ができ、また微量な試料の測定が可能であることから、生体試料の同時定量に用いられることが期待される。しかし、以上で示したラベル化剤は低分子化合物の誘導體化に適しており、タンパク質などの巨大分子はこれらのラベル化剤を用いても高感度の測定をすることは困難である。そこでDNAやタンパク質等の生体試料の同時定量を質量分析で行うために、切断部位を持つプローブを作製した。これらのプローブは紫外線の照射により切断される光開裂部位と、試料に特異的にラベル化するための結合部位、それに質量分析計にて観測される検出部位よりなる。検出部位の分子量を様々に変えることで、同時に複数の試料の測定が可能である。このようなプローブを用いて、図4のようにタンパク質を網羅的に同時定量することが可能となる。すなわち、あらかじめリガンドとなるタンパク質を種類ごとに異なる分子量の検出部位を有するプローブでそれぞれラベル化しておき、これを固定した試料と相互作用した後にUV照射により検出部位のみを切り出し、質量分析計で測定することにより、試料中に含まれる各タンパク質の量を知ることができる。このような方法に基づき検出部位の分子量をラベル化剤として用いれば、バリエーションを無数に増やすことができ、網羅的定量が可能となる。

5 おわりに

質量分析は高感度かつ簡便な測定が可能である。有効なMSプローブで非常に効率的なイオン化ができれば、分子量情報を得るためだけでなく、検出端として用いて感度の高い定量に用いることができる。本稿で述べた以外にも、現在、重金属イオン検出用のMSプローブの開発、さらにはオンラインでMSプローブと試料を反応させ、質量分析計に導入するシステムの構築を検討している。このようにMSプローブを有効な分析ツールとして、バイオ分析、さらには環境分析などの幅広い分野に用いられることが期待される。

文 献

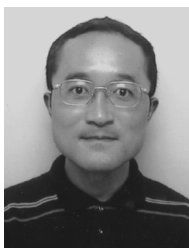
- 1) S. Barnes, L. Coward, M. Kirk, J. Sfakianos : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **217**, 254 (1998).

- 2) J. F. Stevens, A. W. Taylor, M. L. Deinzer : *J. Chromatogr. A.*, **832**, 97 (1999).
- 3) T. Okada, T. Takechi, H. Wakiguchi, T. Kurashige, K. Sugahara, H. Kodama : *Arch. Biochem. Biophys.*, **305**, 385 (1993).
- 4) J. Karolina, L. Pirjo, V. Pirjo : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 231 (1998).
- 5) D. N. Buchanan, J. Muenzer, J. G. Thoene : *J. Chromatogr.*, **534**, 1 (1990).
- 6) M. Yamashita, J. B. Fenn : *J. Phys. Chem.*, **88**, 4451 (1984).
- 7) M. Yamashita, J. B. Fenn : *J. Phys. Chem.*, **88**, 4471 (1984).
- 8) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. K. Wong, C. M. Whitehouse : *Science*, **246**, 64 (1989).
- 9) J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. K. Wong, C. M. Whitehouse : *Mass Spectrom. Rev.*, **9**, 37 (1990).
- 10) R. D. Smith, J. A. Loo, C. G. Edmonds, C. J. Barinaga, H. R. Udseth : *Anal. Chem.*, **62**, 882 (1990).
- 11) E. C. Huang, T. Wachs, J. J. Conboy, J. D. Henion : *Anal. Chem.*, **62**, 713A (1990).
- 12) M. Mann : *Org. Mass Spectrom.*, **25**, 575 (1990).
- 13) M. G. Ikonomou, A. T. Blades, P. Kebarle : *Anal. Chem.*, **63**, 1989 (1991).
- 14) D. S. Ashton, C. R. Beddell, D. J. Cooper, B. N. Green, R. W. A. Oliver : *Org. Mass Spectrom.*, **28**, 721 (1993).
- 15) Z. L. Cheng, K. W. M. Siu, R. Guevremont, S. S. Berman : *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **3**, 281 (1992).
- 16) K. Mitamura, K. Shimada : *Yakugakuzasshi.*, **118**, 206 (1998).
- 17) G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, G. L. Glish : *Anal. Chem.*, **63**, 2064 (1991).
- 18) G. J. Van Berkel, S. A. McLuckey, G. L. Glish : *Anal. Chem.*, **64**, 1586 (1992).
- 19) 鈴木祥夫, 鈴木孝治 : ナノモル・ピコモル分析を可能とする質量分析プローブの開発, *化学工業*, **54**, 433-438 (2003).
- 20) Y. Suzuki, N. Tanji, C. Ikeda, A. Honda, K. Ookubo, D. Citterio, K. Suzuki : *Anal. Sci.*, **20**, 475 (2004).
- 21) H. Kasai, S. Nishimura : *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2137 (1984).



本田亜希 (Aki HONDA)

慶應義塾大学理工学部鈴木グループ, 科学技術振興機構CREST (〒223-8522 横浜市港北区日吉本町3-14-1)。東京大学大学院農学生命科学研究科修了。博士(農学)。<現在の研究テーマ>環境中のアレルゲン検出, 生化学分析用プローブの創製。<趣味>旅行, 小説, つなひき。



鈴木祥夫 (Yoshio SUZUKI)

財神奈川科学技術アカデミー (〒213-0012 川崎市高津区坂戸3-2-1 KSP西棟614)。九州大学大学院工学研究科博士課程修了。工学博士。<現在の研究テーマ>新規機能性分子材料の設計・合成, 環境分析への応用など。<趣味>プロ野球観戦, 鉄道模型。
E-mail : yoshio@educ.cc.keio.ac.jp



鈴木孝治 (Koji SUZUKI)

慶應義塾大学理工学部 (〒223-8522 横浜市港北区日吉3-14-1)。慶應義塾大学大学院工学研究科博士課程修了。工学博士。<現在の研究テーマ>化学センシング材料・機能の創製と分析化学への応用。<主な著書>“分析化学I(基礎化学コース)”(丸善)。<趣味>旅行, 金魚すくい。
E-mail : suzuki@applc.keio.ac.jp