

氏名	きよかわ えな 清川 恵奈		
学位の種類	博士（薬学）		
報告番号	甲第 1728 号		
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 15 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）		
学位論文題目	フルオラスアフィニティーによる生体内リン酸化合物を対象とした選択的前処理法の開発		
論文審査委員	（主査） 福岡大学	教授	能田 均
	（副査） 福岡大学	教授	山口 政俊
	福岡大学	教授	藤岡 稔大
	福岡大学	准教授	吉田 秀幸

## 内容の要旨

### 【諸論】

生体内リン酸化合物は、エネルギー産生などの生命現象に深く関与している。それらの生体内挙動を明らかにするためには、高選択的かつ高感度な分析法の開発が必要不可欠である。一方、リン酸化合物は、その種類と性質が多岐に渡ることから、他の生体関連物質との分離が困難である場合がある。そこで本研究では、パーフルオロアルキル基をもつ化合物同士のみが示す特異的な親和性（フルオラス）を利用し、リン酸化合物の高選択的な抽出法を開発を行った。一般に生体関連物質は、パーフルオロアルキル基を有していない。そのため、フルオラスを分析学的に利用するためには、パーフルオロアルキル基を測定対象物質に標識する誘導体化の操作が必要であり、不可逆的であった。そこで、本研究では、リン酸基の高いイオン性及び金属配位性に着目し、誘導体化を行わずともフルオラスの親和性を利用できる方法論の構築を試みた。

第1章ではヌクレオチド類を分析対象とし、イオンペアの概念をフルオラス溶媒抽出法に取り入れた。さらに、第2章そでは、その方法を細胞試料中ヌクレオチドの定量へと適用した。また、第3章では、フルオラスと金属キレートアフィニティーとを組み合わせた抽出法を開発を行い、ヌクレオチド類の選択的抽出へと適用した。第4章では、第3章で開発した方法をリン酸化ペプチドの抽出へと適用し、プロテインキナーゼ活性測定法としての本法の有用性を確認した。

## 【第1章】フルオラスイオンペア法によるヌクレオチド類の選択的抽出とLC分析

本研究では、パーフルオロアルキルアミン試薬（4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Heptadecafluoro-*n*-undecylamine, HFUA）をフルオラスイオンペア剤として利用し、ヌクレオチド類の選択的抽出法の開発を試みた (Fig. 1)。本法の原理は、HFUA とヌクレオチド類との間で形成するイオンペア体をフルオラス溶媒中へと抽出し、さらにヌクレオチド類のみを測定機器へと導入可能な溶媒中へと逆抽出することに基づく。ヌクレオチド類6種（AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP）を対象とし本法の有用性を検証したところ、それらを選択的かつ定量的に抽出可能であった（回収率 70.4%）。次に、本法の実試料への有用性を確認するため、乳がん細胞試料（MCF7 及び MCF10A）に本法を適用した (Fig. 2)。その結果、細胞試料中からも対象としたヌクレオチド類を抽出でき、本法によって夾雑成分からの精製が可能であった。

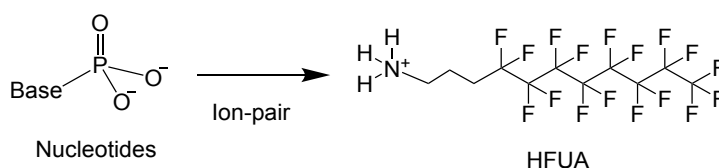


Fig. 1 The principal of ion-pair extraction method.

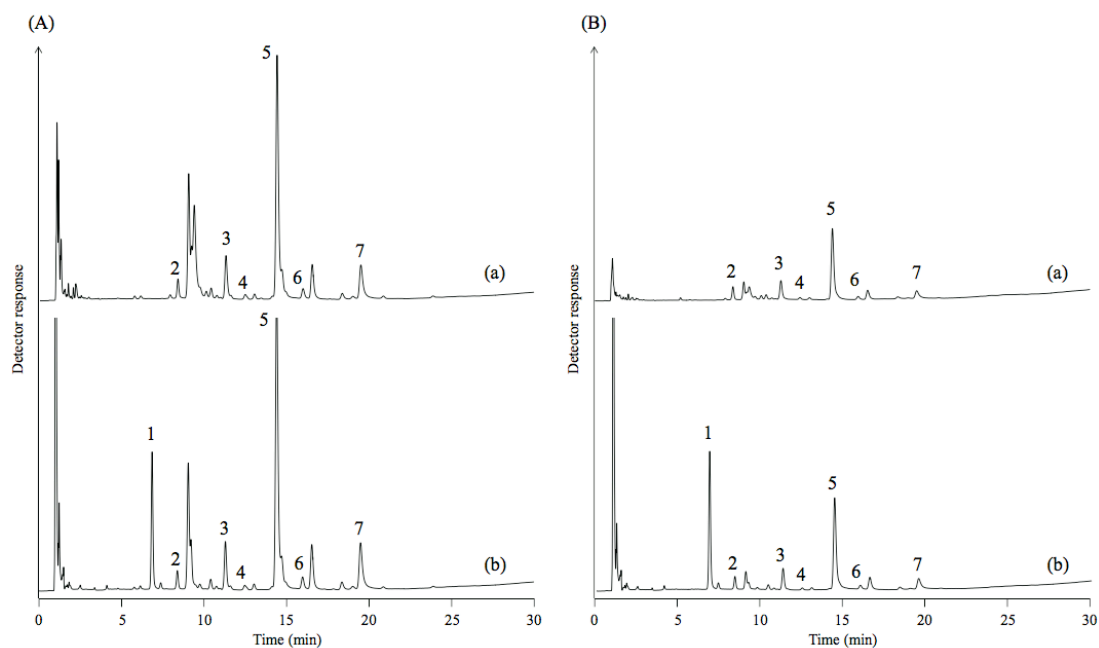


Fig. 2 Chromatograms obtained from (A) MCF-7 and (B) MCF-10A cell samples. (a) Non-extracted cell sample; (b) extracted cell sample with the present method. Peaks: 1; 6-Cl-PuDP (IS), 2; AMP, 3; ADP, 4; GMP, 5; ATP, 6; GDP, 7; GTP.

## 【第2章】フルオラスイオンペア法の白血病由来細胞試料中ヌクレオチド類分析への応用

第1章にて開発した、フルオラスイオンペアによるヌクレオチド類抽出法の実用研究として、白血病由来細胞試料（Jurkat 細胞, HL60 細胞及び MT-2 細胞）に本法を適用し

た。本研究では 18 種のヌクレオチド類 (AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, IMP, ITP, UMP, UDP, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc 及び UTP) を対象とした。本法により, 細胞 3 種の試料中対象ヌクレオチド類を良好に定量することができた。さらに, 各細胞におけるヌクレオチド濃度を 24 時間ごと (0, 24, 48 及び 72 時間) に測定し, 培養時間ごとの継時的なヌクレオチド濃度の変動を観察すべく, 得られた定量値に対し主成分分析を施した。結果より, HL60 細胞・Jurkat 細胞群と MT-2 細胞群との 2 群間の差異を可視化することができた (Fig. 3)。このことから, 各細胞中ヌクレオチド類の濃度変化を追うことで, 細胞種差の解析等に適用可能であることが示唆された。

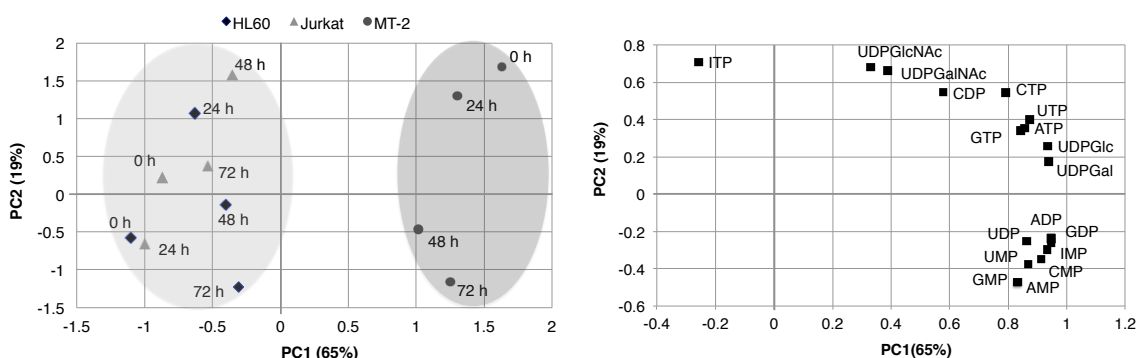


Fig. 3 The PCA (A) score and (B) loading plots obtained during quantitation of the nucleotides in cell samples.

### 【第 3 章】フルオラス金属キレートアフィニティー法によるヌクレオチド類の選択的抽出と LC-MS/MS 分析

本研究では, 金属キレートアフィニティーの概念をフルオラス溶媒抽出法にとり入れた方法を開発した。本法は, 新たに合成したイミノ二酢酸型フルオラス試薬 (4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Perfluoroalkyl-*n*-iminodiacetic acid, PFIDA) を合成し, それに金属イオン (Fe(III)) を固定化後, さらにその金属イオンにリン酸化合物が配位することで, その複合体ごとフルオラス溶媒に抽出するという方法である (Fig. 4)。本法をヌクレオチド類の抽出へと適用したところ, 対象としたヌクレオチド類を選択的かつ再現性よく抽出することができた (Fig. 5A)。さらに, Jurkat細胞へと適用したところ, 細胞中からもヌクレオチド類を抽出することができた (Fig. 5B)。また,

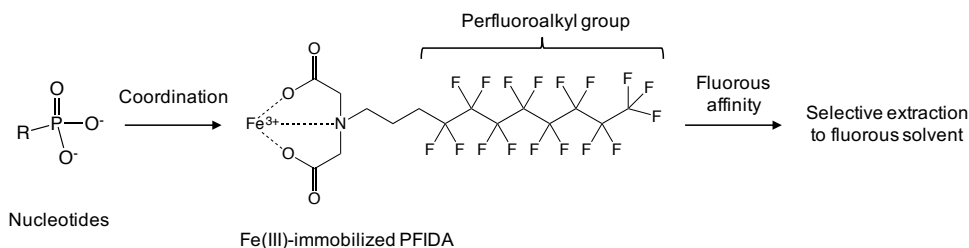


Fig. 4 The principal of fluoros metal chelate affinity extraction method.

Anti-Fas抗体処理によってアポトーシスを誘導したJurkat細胞に対して本法を適用し、時間経過ごとの細胞内ヌクレオチド類濃度の変動を観察した。また、得られた定量値に対して主成分分析を施したところ、ヌクレオチド類の濃度変化から、アポトーシスによる細胞状態を可視化することが可能であった。以上の結果から、ヌクレオチド類の濃度変化を追うことによって、細胞状態の変化を観察できる可能性が示唆された。

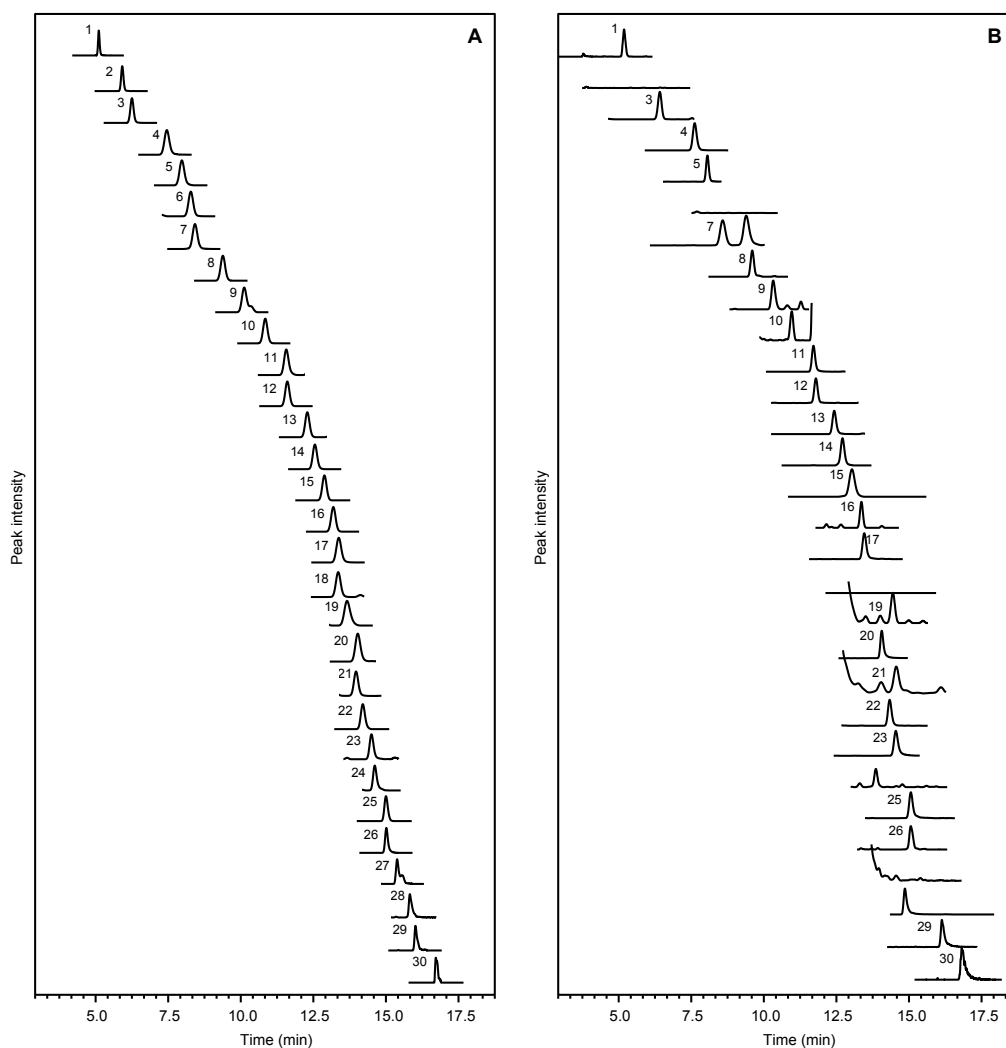


Fig. 5 Chromatograms obtained for (A) standard solution and (B) cell samples treated with this method. Peaks: 1, dTMP; 2, dUMP; 3, dAMP; 4, AMP; 5, UMP; 6, dIMP; 7, dTDP; 8, dCMP; 9, IMP; 10, dGMP; 11, ADP; 12, CMP; 13, UDP; 14, dTTP; 15, GMP; 16, dCDP; 17, dATP; 18, dUTP; 19, IDP; 20, ATP; 21, dGDP; 22, CDP; 23, UTP; 24, dITP; 25, GDP; 26, dCTP; 27, ITP; 28, dGTP; 29, CTP; 30, GTP.

【第4章】フルオラス金属キレートアフィニティー法によるプロテインキナーゼ活性測定への応用

本研究では、フルオラス金属キレートアフィニティー法の適用範囲拡大のため、本法をリン酸化ペプチドの前処理に適用し、それによるプロテインキナーゼ（PK）活性

測定を試みた。本法は、Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) でプレ蛍光標識化した基質ペプチド (S-kemptide) をPKA酵素反応によってリン酸化し、生成したリン酸化体 (P-kemptide) のみをFe(III)固定化PFIDAを用いて、フルオラス溶媒へと抽出するという原理に基づく (Fig. 6)。このとき、水層には、S-kemptideが残存していることから、

その抽出前後の蛍光強度の減少率からPKA活性の測定が可能となる。さらに、段階的に調整したPKAを用いてその活性測定を行ったところ、PKAの濃度依存的に蛍光強度が減少していたことから、本法によるPK活性の測定が可能であることが確認できた (Fig. 7)。

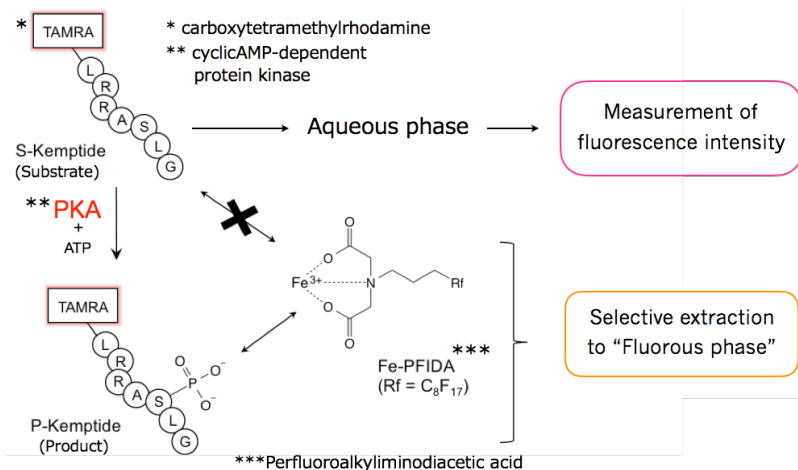


Fig. 6 The principal of fluoros metal chelate affinity extraction method.

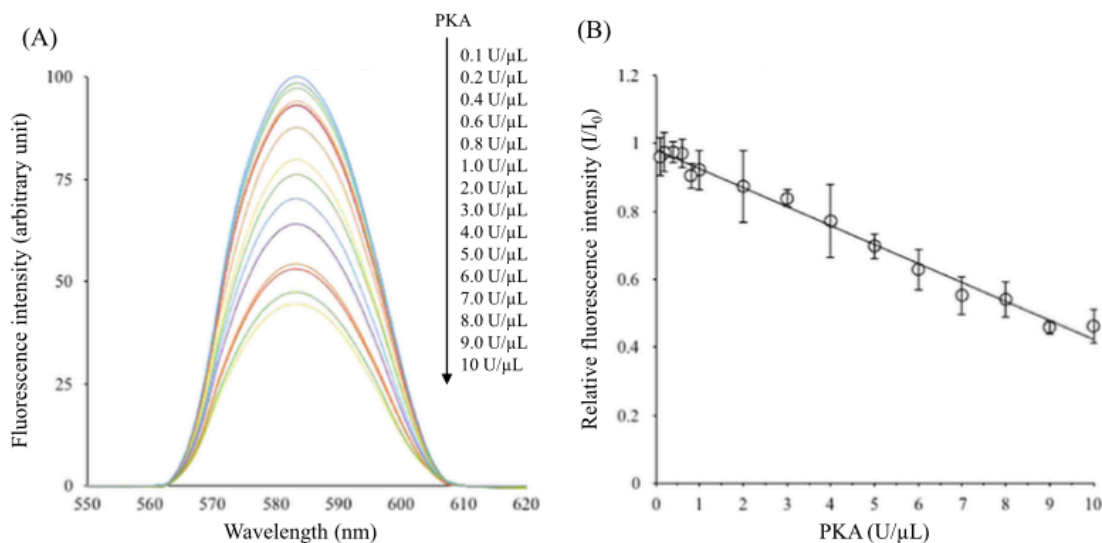


Fig. 7 (A) Fluorescence emission spectra of aqueous phases and (B) the relative fluorescence intensity changes at 585 nm obtained before ( $I_0$ ) and after ( $I$ ) fluoros extraction of enzymatic reaction solutions with different concentrations of PKA (0–10 U/mL).

### 【総括】

本研究では、生体内リン化合物の選択的分析法を構築すべく、フルオラスアフィニティーによる選択的抽出法の開発及びその実試料への応用を行った。

第 1 章では、ヌクレオチド類の選択的前処理の確立を目指し、フルオラスイオンペア抽出法を開発した。さらに、乳がん細胞に対して本法を適用したところ、細胞試料中ヌクレオチド類を選択的に抽出できることが確認でき、試料夾雑成分に妨害されることなく測定できることが示された。第 2 章では、白血病由来細胞試料へとフルオラスイオンペア法を適用することで、本法の実試料分析における有用性についても証明できた。さらに、各細胞におけるヌクレオチド類濃度を 24 時間毎に測定し、得られた定量値に対し多変量解析を施したところ、各細胞及び各時間におけるヌクレオチド濃度の相関関係を可視化し、細胞間の差異を確認することができた。第 3 章では、フルオラス金属キレートアフィニティー抽出法を開発を行った。本法をヌクレオチド類の抽出へと適用したところ、対象としたヌクレオチド類を選択的かつ再現性よく抽出することができた。さらに、Jurkat 細胞へと本法を適用したところ、細胞中ヌクレオチド類を選択的に抽出し、測定することができた。また、Anti-fas 抗体によってアポトーシスを誘導した白血病細胞において、本法を用いて時間経過毎の細胞試料中ヌクレオチド類濃度を測定したところ、その継時変化を捉えることができ、本法の実試料分析における実用性も証明できた。第 4 章では、フルオラス金属キレートアフィニティー法の適応範囲を拡張すべく、リン酸化ペプチドの選択的抽出へと適用し、PK 活性測定へと応用した。この結果から本法は、リン酸化ペプチドの抽出に対しても有用な方法であり、本法によって PK 活性の測定が可能であることが確認できた。

以上の結果から、本研究において確立したフルオラスアフィニティーを介した前処理法はいずれも生体内リン酸化合物の選択的な分析に有用であることが確認できた。今後、関連するあらゆる分野の進展に大きく貢献できるものと確信している。

## 審査の結果の要旨

生体内リン酸化合物は、エネルギー産生などの生命現象に深く関与しており、それらの高選択的かつ高感度な分析法は数多く提出されている。一方、生体内のリン酸化合物は、その種類と性質が多岐に渡ることから、相互分離や他の生体関連物質との分離が困難である場合がある。申請者は、一般に生体には存在しないフルオラス親和性に着目し、独創的な発想により、以下の新規かつ有用な前処理技術を開発し、その方法の有用性と実用性を実証した。

### 第1章 フルオラスイオンペア法によるヌクレオチド類の選択的抽出とLC分析

本研究では、パーフルオロアルキルアミン試薬(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Hep-tadecafluoro-*n*-undecylamine, HFUA)をフルオラスイオンペア剤として利用し、ヌクレオチド類の選択的抽出法の開発を試みた。本法の原理は、HFUAとヌクレオチド類との間で形成するイオンペア体をフルオラス溶媒中へと抽出して夾雑物と分離した後、逆抽出を行うことによって目的物質を精製するといったものである。ヌクレオチド類6種(AMP, ADP, ATP, GMP, GDP及びGTP)を対象とし本法の有用性を検証したところ、それらを選択的かつ定量的に抽出可能であった(回収率 $\geq 70.4\%$ )。次に、本法の実試料への有用性を確認するため、乳がん細胞試料(MCF-7及びMCF-10A)分析への適用を試みた。その結果、細胞試料中ヌクレオチド類の抽出が可能であり、試料夾雑成分の妨害を受けることなくLCによる測定を行えることが確認された。

### 第2章 フルオラスイオンペア抽出法の白血病由来細胞試料中ヌクレオチド類分析への応用

第1章において開発した、フルオラスイオンペアによるヌクレオチド類抽出法の実用研究として、白血病由来細胞試料(Jurkat細胞, HL60細胞及びMT-2細胞)の分析に本法を適用した。本研究では18種のヌクレオチド類(UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc, AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, IMP, ITP, UMP, UDP, UDP-Glc, UDP-Gal及びUTP)を対象とした。本法により、種々の細胞試料中の対象ヌクレオチド類を抽出し、定量することができた。さらに、各細胞におけるヌクレオチド類濃度を24時間毎に測定した。培養時間ごとの継時的濃度変動を可視化すべく、得られた定量値に対し多変量解析を施した。その結果、HL60細胞・Jurkat細胞群とMT-2細胞群との2群間には、明らかな差が確認された。

### 第3章 フルオラス金属キレートアフィニティー法によるヌクレオチド類の選択的抽出とLC-MS/MS分析

本研究では、金属キレートアフィニティー法の概念をフルオラス抽出法に取り入れた方法論を開発した。本法は、イミノ二酢酸型フルオラス試薬（4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Perfluoroalkyl-*n*-iminodiacetic acid, PFIDA）を合成し、それに金属イオン（Fe(III)）を固定化後、その金属イオンにリン酸化合物が配位することで、その複合体ごとフルオラス溶媒に抽出されるという方法である。本法をヌクレオチド類の選択的抽出へと適用したところ、対象としたヌクレオチド類を選択的かつ再現性よく抽出することが可能であった。さらに、本法をJurkat細胞へと適用したところ、細胞中ヌクレオチド類を選択的に抽出し、測定することができた。さらに本法を応用すべく、Anti-Fas抗体処理によってアポトーシスを誘導したJurkat細胞を用いて培養時間経過毎の細胞内ヌクレオチド類の抽出及び定量解析を行ったところ、時間経過ごとの細胞状態の変化と細胞内ヌクレオチド濃度との間に存在する相関関係を可視化することができた。

#### 第4章 フルオラス金属キレートアフィニティー法のプロテインキナーゼ活性測定への応用

この章では、フルオラス金属キレートアフィニティー法の適用範囲拡大のため、本法をリン酸化ペプチドの前処理に適用し、それによるプロテインキナーゼ（PK）の活性測定を試みた。本法は、Carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) で蛍光標識した基質ペプチド（S-kemptide）をPKA酵素反応によってリン酸化し、生成したリン酸化体（P-kemptide）をFe(III)固定化PFIDAを用いてフルオラス溶媒へと抽出するという原理に基づく。このとき、水層には、S-kemptideが残存していることから、その抽出前後の蛍光強度の減少率からPK活性の測定が可能となる。段階的に調製したPKAを用いてその活性測定を行ったところ、PKAの濃度依存的に非フルオラス層の蛍光強度が減少していたことから、本法によるPK活性の測定が可能であることが確認できた。

以上、申請者の開発した前処理法は、独創的で画期的なものであり、かつ実用性が極めて高く、学会発表や学術論文でも高い評価を得ている。更に、公聴会においても研究をわかりやすく効果的にアピールし、質疑応答も適切なものであったので、申請者は学位授与に値する能力・資質を有するものと評価した。