

平成 29 年度 博士学位論文

論題 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

指導教授

能田 均

福岡大学大学院 薬学研究科

薬学専攻

学籍番号 PD141001

氏名 清川 恵奈

目次

緒論

【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

- 1 基準操作
- 2 クロマトグラム
- 3 抽出条件の検討
- 4 選択性の確認
- 5 バリデーション
- 6 乳がん細胞試料中 AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP の分析
- 7 小括

【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

- 1 基準操作
- 2 標準品を用いた分析条件最適化
- 3 白血病由来細胞試料の分析
- 4 添加回収率と再現性
- 5 ヌクレオチド類 18 種の定量
- 6 小括

【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

- 1 基準操作
- 2 クロマトグラム
- 3 LC-MS/MS 分析条件の検討
- 4 抽出条件の検討
- 5 バリデーション
- 6 Jurkat 細胞試料中ヌクレオチド類の測定
- 7 小括

【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

- 1 基準操作
- 2 基礎検討
- 3 定量性の確認
- 4 PKA 活性測定への適用
- 5 小括

総括

実験の部

参考文献

謝辞

略語表

以下の略号を使用した。

| | |
|-----------|--|
| 6-Cl-PuDP | 6-Chloropurine riboside-5'- <i>O</i> -diphosphate |
| DMF | <i>N,N</i> -dimethylformamide |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DMT-MM | 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride |
| F-SPE | Fluorous-solid phase extraction |
| HFUA | 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Heptadecafluoro- <i>n</i> -undecylamine |
| HILIC | Hydrophilic interaction liquid chromatography |
| HTLV-1 | Human T-cell Leukemia Virus Type 1 |
| MRM | Multiple reaction monitoring |
| MCA | Metal chelate affinity |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PCA | Principal component analysis |
| PFCs | Perfluorinated compounds |
| PFIDA | 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Perfluoro- <i>n</i> -alkyl-iminodiacetic acid |
| PFOS | perfluorooctane sulfonates |
| PK | Protein kinase |
| PKA | CyclicAMP-dependent protein kinase |
| PTMs | Functional post-translational modifications |
| SPE | Solid phase extraction |
| TAMRA | Carboxytetramethylrhodamine |
| TDFH | <i>n</i> -Tetradecafluorohexane |
| TFA | Trifluoroacetic acid |
| TFE | 2,2,2-Trifluoroethanol |
| TFO | 1 <i>H</i> ,1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,2 <i>H</i> -Tridecafluoro-1- <i>n</i> -octanol |
| THF | Tetrahydrofuran |

【緒論】

生体関連物質の分析は、薬物動態解析や疾患マーカーの探索など、医療の発展に欠かせない研究テーマのひとつである。一方、生体試料は多量の夾雑物を含み、測定対象とする物質の分析が妨害される場合もある。すなわち、より信頼性の高い分析を行うためには、測定対象物質に高選択的かつ効率の良い前処理・精製を施す必要がある。そこで、我々は、生体内に存在する測定対象物質に選択的な前処理法を開発すべく、「フルオラスアフィニティー」を用いることとした (Fig. 1)。

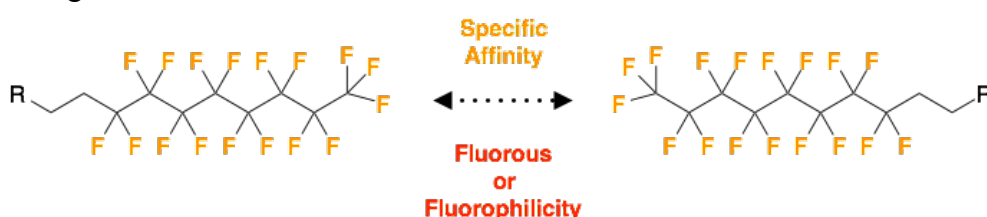
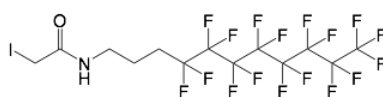


Fig. 1 Fluorous interaction

フルオラスアフィニティーとは、多数のフッ素が結合したアルキル基（パーフルオロアルキル基）同士が示す特異的な親和性のことを指す。パーフルオロアルキル化合物（フルオラス化合物）同士は極性に依存せず強い親和性を示すが、非フルオラス化合物とは親和性を持たない。よって、フルオラス化合物は、水とも有機溶媒とも混合せず、それら同士で特異的に引き合い、その他の物質から分離するという特徴をもつ[1,2]。これまで、このフルオラスの特異的な性質を利用するために「フルオラス誘導体化法」が用いられてきた[3-11]。フルオラス誘導体化法は、ヨードアセト

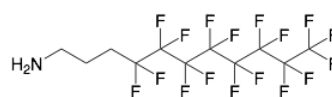
アミド基やアジド基、スクシンイミド基やアミノ基といった反応性官能基を持つフルオラス化合物 (Fig. 2) を誘導

• For thiol groups



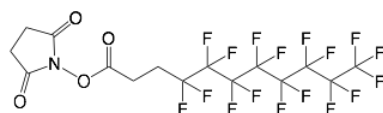
N-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Heptafluoro-*n*-undecyl)iodoacetamide

• For carboxyl groups



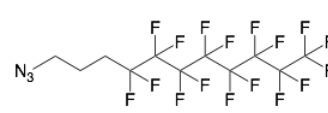
4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Heptafluoro-*n*-undecylamine

• For amino groups



N-Succinimidyl-4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Heptafluoro-*n*-undecanoate

• For alkyne groups



4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-Heptafluoro-*n*-undecyl azide

Fig. 2 Structures of some fluororous compounds

体化試薬として用い、測定対象物質にパーフルオロアルキル基を化学的に修飾し、フルオラス標識するといった方法である。実際に、測定対象物質の高選択的分析法の確立を指向した、フルオラス誘導体化法と固相抽出法や溶媒抽出法とを組み合わせた前処理法が報告されている[12-14]。フルオラス固相抽出(F-SPE)では、フルオラス誘導体化された測定対象物質は、同じくパーフルオロアルキル基で修飾されたフルオラスシリカゲル固定相に特異的に保持される。その後、疎フルオラス溶媒(水、*N,N*-ジメチルホルムアミドやジメチルスルホキシド等)を用いて固定相を洗浄することで、非フルオラス化合物を除去できる。さらに、親フルオラス溶媒(メタノール、アセトニトリルやテトラヒドロフラン等)を用いることで、フルオラス誘導体のみを回収することが可能となる(Fig. 3)[14]。例えば、高極性がゆえに夾雑成分からの精製が困難であった糖類に対してフルオラス誘導体化を施し、F-SPEにて精製することによって、糖鎖の高感度かつ高選択な分析が達成できたという報告がある[15]。さらに、F-SPEに用いられるフルオラス固定相を充填剤としたフルオラスLCカラムも市販されている。誘導体化された測定対象物質は、このフルオラスカラムに選択的に保持されるため、LC上にてその他夾雑成分と分離することができる[5]。この方法では、精製や抽出等の前処理が不十分な試料であっても、測定対象に選択的な分析を行うことができる。しかしながら、これらF-SPEを用いた前処理法では、シリカゲルとの疎水性相互作用やカラム及び固定相に不純物として含まれる金属類への配位性といった、フルオラス親和性以外の相互作用の影響が考えられ、フルオラス化合物への選択性という点において改善点が指摘されている。フルオラス溶媒抽出法では、*n*-tetradecafluorohexane (TDFH)などに代表されるパーフルオロアルカン類(フルオラス溶媒)を抽出溶媒として用いる。フルオラス溶媒は、常温にて水や有機溶媒と混合することなく容易に分離されることから、

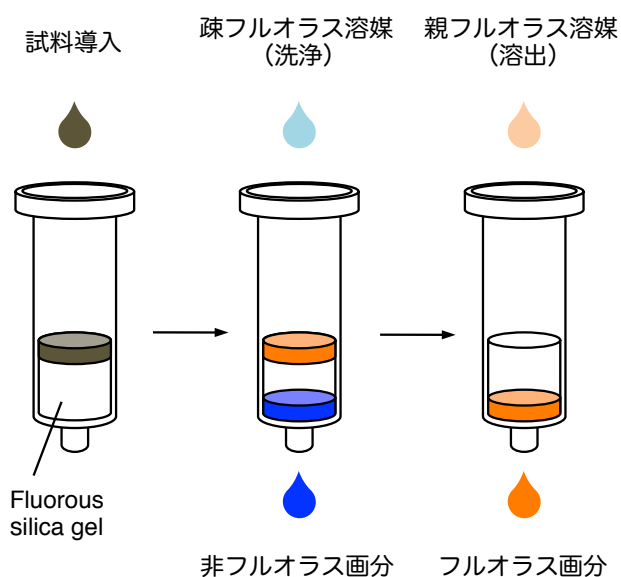


Fig. 3 Standard operation of the F-SPE procedure.

その他相互作用の影響を受けることなく、簡便な操作によってフルオラス化合物のみを溶媒中へと選択的に抽出することができる。フルオラス化合物は、パーフルオロアルキル基の鎖長によって、同一分子内に39個以上のフッ素原子を持つ「ヘビーフルオラス化合物」と同一分子内に9-17個程度のフッ素原子を持つ「ライトフルオラス化合物」とに分類される。このうち、強いフルオラス親和性を有し、フルオラス溶媒中へと効率良く分配されるヘビーフルオラス化合物が溶媒抽出法の対象となる。しかし、ヘビーフルオラス化合物は、選択性が高い反面、疎フルオラスな一般の有機溶媒への溶解性が極めて低く、汎用性に欠けるといった問題点が挙げられた。そのため、汎用性の高いライトフルオラス化合物を溶媒抽出法において用いるべく、「solvent tuning」と呼ばれるフルオラス溶媒抽出法の開発が行われた[16,17]。この方法では、抽出に用いるフルオラス溶媒として、パーフルオロアルカン類とともに、極性基を有するパーフルオロエーテル類やパーフルオロアルコール類といったフルオラス溶媒を使用する。同時に疎フルオラス溶媒を用いて試料溶液を調製し、さらにその組み合わせや割合を調整することによって、ライトフルオラス化合物のフルオラス溶媒中への抽出効率を向上させる。すなわち、solvent tuningによって、ライトフルオラス化合物を用いた選択的抽出が可能となる。この原理を、残留性有機汚染物質として世界的に規制されているパーフルオロオクタンスルホン酸 (perfluorooctane sulfonates; PFOS) などのパーフルオロ関連化合物 (PFCs) 分析のための前処理として利用している例がある[18]。この研究では、ライトフルオラス化合物に分類されるPFCsをフルオラス溶媒中へと選択的かつ効率よく抽出するために、solvent tuningによるフルオラス溶媒抽出法が用いられた。このように、一般的な固相抽出や溶媒抽出法では、選択的な精製が困難である場合でも、F-SPEやフルオラス溶媒抽出を用いることで、測定対象物質のフルオラス誘導体に対して選択的な前処理を行うことができる。

我々は、上述のフルオラスアフィニティーの特性を生体関連物質に対する前処理法として応用した。一般に生体内や環境中にはフルオラス化合物はほとんど存在しないことから、フルオラスアフィニティーの生体成分分析への適用は高い選択性と広い適用性が期待できる。本研究では、生体関連物質のうち、生体内リン酸化合物を対象とした。ヌクレオチドやリン酸化ペプチドのような生体内リン酸化合物は、エネルギー産生やシグナル伝達といった生命現象に深く関与しており、生体機能調節において大きな役割を果たしている。そのため、

生体内リン酸化合物は、疾患マーカーや病態進行度の指標となると考えられている[19-21]。これらの生体内挙動についてさらに解析を進めるためには、リン酸化合物により選択的かつ高感度な分析法の導入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、リン酸化合物の選択的前処理や類縁化合物同士の相互分離は困難な場合も多く、分析結果が複雑化し、正確な定量や同定が妨害されることがある。これまで、生体内リン酸化合物の前処理には、溶媒抽出法や固相抽出法などの技術が用いられてきたが[22-31]、より信頼性の高い分析を行うためには、リン酸化合物に対して高選択的な前処理法の開発が求められる。本研究では、対象とするリン酸化合物により選択的な前処理を行うべく、ライトフルオラス化合物を試薬として用い、フルオラス溶媒抽出の原理に基づいた選択的抽出法の開発を試みた。さらに、これまでフルオラスの特異性を利用するために用いられてきた誘導体化の操作は、リン酸化合物をターゲットとした場合、一般に煩雑化することが多い。また、目的物質の構造情報を変化させることは、分析を行う上で必ずしも好ましくはない。そこで、本研究では、誘導体化を介することなく、可逆的な反応を用いることで、フルオラスの選択性を利用できる方法論の開発を行った。本法は、リン酸基のイオン性及び金属配位性に着目し、その可逆的な相互作用とフルオラスの特異性とを組み合わせた、リン酸化合物に高選択的な抽出法である。本法の原理は、対象とするリン酸化合物と対の電荷を持つ化合物、もしくは金属配位性官能基を持つ化合物をフルオラス試薬として用い、対象物質を選択的に捕捉し、フルオラス溶媒中へと選択的に抽出することに基づく (Fig. 4)。本抽出法により、リン酸化合物が選択的に精製され、分析の妨害となる夾雑成分から効率よく分離することができる。一方、フルオラス溶媒は水や有機溶媒と混合しない性質から、そのまま測定機器へと導入することはできない。そのため、抽出後、目的物質を非フルオラス溶媒中へと逆抽出し、LCなどの機器分析へと供することで選択的な分析を行うことが可能となる。

第1章から第3章では、生体内リン酸化合物のうち、ヌクレオチドを対象とした選択的抽出法の開発を行った。ヌクレオチド類は、様々な生体内伝達機構において、決定的な役割を果たしている。例えば、ヌクレオチド類は、生体機能におけるエネルギー伝達物質であり、生体内合成経路の迅速な活性化において酵素のような役割を果たす他、RNA合成の前駆体としても知られている[32-34]。また、セカンドメッセンジャーにもなりうることから、シグナル伝達経路にお

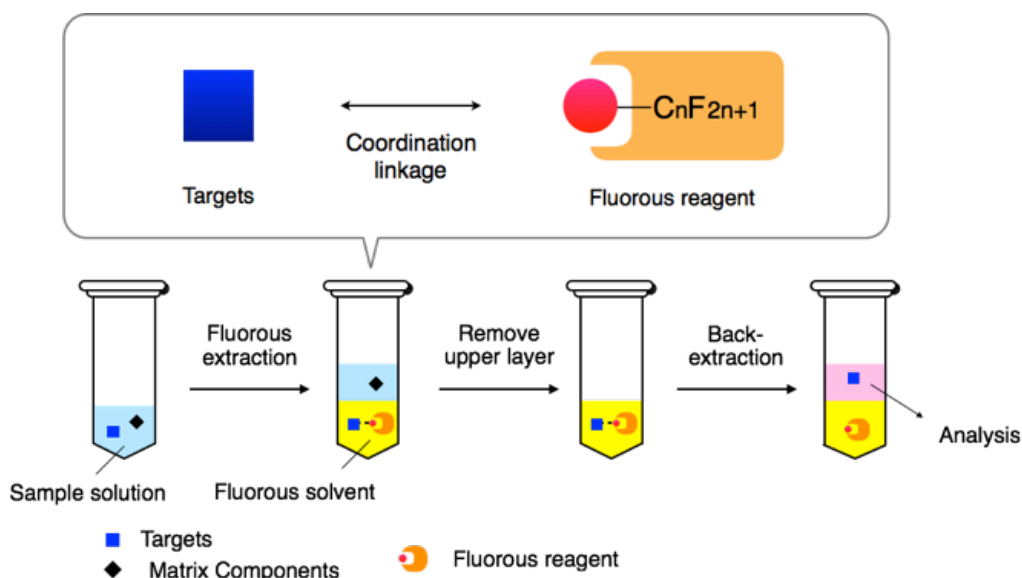


Fig. 4 Selective extraction method with a specific partitioning technique of fluorosolvent *via* non-covalent interaction.

いても重要な役割を果たしている[35-37]。ヌクレオチド類は、グアノシン、シチジン、ウラシル（チミン）及びアデノシンを基本骨格とし、さらに構造内リン酸基の個数によって、モノリン酸、ジリン酸及びトリリン酸が存在する。それぞれ異なる細胞状態変化に関与しているが、主にアデノシントリリン酸（ATP）からのリン酸基の授与によって平衡が保たれている。その際、ATPは脱リン酸化されAMPもしくはADPになるが、その他ヌクレオチド類についても、状態変化に合わせて同様の脱リン酸化が起こっている。このことから、細胞や動物のエネルギー状態をモニターするためには、網羅的なヌクレオチド類の測定が必要となる[33]。また、近年、デオキシヌクレオチド類の定量も必要とされている。デオキシヌクレオチド類の分析は、核酸製剤の同定や品質管理、DNAメチル化の判定に必要とされる[38,39]。以上のことから、ヌクレオチド類及びデオキシヌクレオチド類の選択的分析法の開発は、臨床学的な意義が非常に高い。これまで、生体試料中ヌクレオチド類の抽出法として、溶媒抽出法や固相抽出法、グラファイトカーボンを用いた抽出法が用いられてきた[4-6]。一方、これらの方法では、生体試料中ヌクレオチド類の選択的な回収のためには、再現性や回収率において、改善が必要であった。以上のことを鑑み、第1章では、ヌクレオチド類への選択性をさらに向上させた抽出法として、フルオラスイオンペア抽出法を開発を行った。本研究において、ヌクレオチド類6種（AMP, ADP, ATP, GMP, GDP及びGTP）を対象とし有用性を検証した。さらに、本法を乳がん細

胞試料へと適用し、その実用性の検証を行った。第2章では、第1章で開発したフルオラスイオンペア法のさらなる応用として、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。さらに、各細胞におけるヌクレオチド濃度を24時間ごとに測定し、細胞間のヌクレオチド濃度変化を観察した。第3章では、フルオラス金属キレートアフィニティー法の開発及びその応用を行った。金属キレートアフィニティー法（Metal Chelate Affinity; MCA）とは、金属イオンの金属配位能を用いて、目的物質のみと選択的に結合させる手法のことである[40, 41]。本研究では、そのMCAにフルオラスの特異的な性質を組み合わせ、より選択性の高い方法論の構築を行った。本法は、配位性フルオラス試薬に金属イオンを固定化後、さらにその金属イオンに対してリン酸化合物が配位することによって、その配位体ごとフルオラス溶媒に抽出するといった方法である。本研究では、開発したフルオラス金属キレートアフィニティー法のヌクレオチド類抽出に対する有用性の検証を行った。今回、30種のヌクレオチド類（AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, IMP, IDP, ITP, UMP, UDP, UTP, dAMP, dATP, dCMP, dCDP, dCTP, dGMP, dGDP, dGTP, dIMP, dITP, dTMP, dTDP, dTTP, dUMP及びdUTP）を対象として本法の有用性の検証を行った。さらに、本研究では、ヌクレオチド類のLC-MS/MSにおける分離条件についても検討した。従来、ヌクレオチド類のLC分離には、イオンペアクロマトグラフィー[42-44]やイオン交換クロマトグラフィー[45,46]、グラファイトカーボンとの相互作用を利用した方法[46-48]が用いられてきた。一般に市販されている逆相カラムを用いた場合、カラム上またはHPLC配管上に残存する活性金属（例えばFe(III)など）とリン酸基とが強力なキレートを形成するため、ピークのテーリングが起こる[49]。このようなLCにおけるヌクレオチド類のピーク形状改善のため、リン酸緩衝液といった不揮発性の塩を含む移動相が用いられる。しかし、MS検出におけるイオン化の効率を下げ、再現性を著しく低下させるばかりか、不揮発性の塩が析出することでイオン源の汚染を引き起こし、クリーニングを頻回に行わなくてはならず、適切とは言えない[50,51]。以上の問題点を改善すべく、近年、ヌクレオチド類を含めた様々な高極性化合物の分析にHydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) が用いられている[52-54]。通常の逆相分配クロマトグラフィーでは、

低極性固定相と目的物質との疎水性相互作用による分配により、カラムに保持される。一方、HILICでは、水系の移動相を使用した逆相系LCの条件で、極性の高いものほど保持されるという特徴を持つ。HILIC固定相には、親水基を持つ官能基が担持されており、移動相中の水によって、固定相上に水和相が形成される。その水和相／移動相と目的物質との親水性相互作用による分配の程度が変化するため、高極性物質を保持することができる。すなわち、リン酸化合物は、高いpH条件下においてイオン化し、HILICカラムに良好に保持される。本研究では、塩基性の移動相条件下においてHILIC-MS/MSを用いたヌクレオチド類の分離・検出条件を構築した。第4章では、第3章で開発したフルオラス金属キレートアフィニティー抽出法をリン酸化ペプチドの前処理に用い、プロテインキナーゼ活性測定法としての有用性について検証を行った。タンパク質の翻訳後修飾 (Functional post-translational modifications; PTMs) は、生体機能において、重要な役割を果たしている [55,56]。その中でも、タンパク質のリン酸化は最も重要とされており、哺乳類の細胞におけるおよそ30%のタンパク質がプロテインキナーゼによってリン酸化されている。よって、リン酸化修飾は、健康状態と密接に関与すると考えられており [57-60]、これまで、電気化学検出や蛍光検出、イムノアッセイを基盤とした検出技術を用いたプロテインキナーゼ活性測定法が開発されてきた [7-13]。本研究では、新規プロテインキナーゼ活性測定法としてフルオラス金属キレートアフィニティー抽出法の導入を試みた。本研究では、段階的に調製したPKAを用いてその活性測定を行うことによって、本法の有用性の検証を行った。

1 基準操作

(1) 操作手順

試料溶液 100 μL をとり、100 μM 6-Chloropurine riboside-5'-*O*-diphosphate (6-Cl-PuDP, 内標準物質) 10 μL , 水 300 μL , 100 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 100 μL 及び 40 mM HFUA (メタノール溶液) 500 μL を加えて混合した。次いで、フルオラス溶媒 TDFH : 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-tridecafluoro-1-*n*-octanol (TFO) の混液 (3 : 1, v/v) 100 μL を加えて 10 分間振とうした。遠心分離 (17,500 \times g, 15 min) 後、上層を除去したのち、メタノール:20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液の混液 (1 : 1, v/v) 100 μL を用いて下層を洗浄した。その後、1%アンモニアを含む 70%アセトニトリルを 100 μL 加え、10 分間振とうした。遠心分離 (17,500 \times g, 15 min) 後、上層の一部 (5 μL) を LC に注入した。

(2) LC 条件

カラムには XBridge[®] BEH Amide (150 \times 3.0 mm I.D., 粒径 2.5 μm , Waters) を使用し、移動相 A として 2% のアンモニア及び 20 mM 炭酸アンモニウムを含むアセトニトリル : 水 (80:20, v/v) 移動相 B として 2% のアンモニア及び 20 mM 炭酸アンモニウムを含むアセトニトリル : 水 (40:60, v/v) を使用し、流速 0.6 mL/min でグラジエント溶離を行った (0 min, 15% B; 0–30 min, linear change from 15% to 40% B; 30–30.01 min, linear change from 40% to 15% B; and run time, 40 min)。カラム温度は 35°C, UV 検出は 254 nm に設定した。

(3) 乳がん細胞試料前処理

MCF-7 及び MCF-10A 細胞を 15 mL のチューブに 1.0×10^6 個になるよう分取し、生理食塩水を加えて細胞を 3 回洗浄した。洗浄液を捨て、残渣に氷冷メタノール 320 μL を加えて 1 分間振とうし、次に氷冷水 220 μL を加えてさらに 30 秒振とうした。遠心分離後 (17,500 \times g, 10 min, 4°C), 得られた上清のうち 100 μL を試料溶液とした。

2 クロマトグラム

AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP の標準混合液 (各 10 μM) を LC にて分析したときのクロマトグラムを Fig. 1-2 (a) に示す。本条件により、ヌクレオチド類は HILIC カラム上で完全に分離され、良好に分析することができた。さらに、同標準混合液を基準操作に従い抽出し、得られたクロマトグラムを Fig. 1-2 (b) に示す。内標準物質及び対象とするヌクレオチド類をすべて検出することができた。さらに、blank の抽出液を測定して得られた結果である Fig. 1-2 (c) には、ヌクレオチド類のピークは確認できなかった。これらの結果から、本法によって、ヌクレオチド類を抽出できることが確認できた。

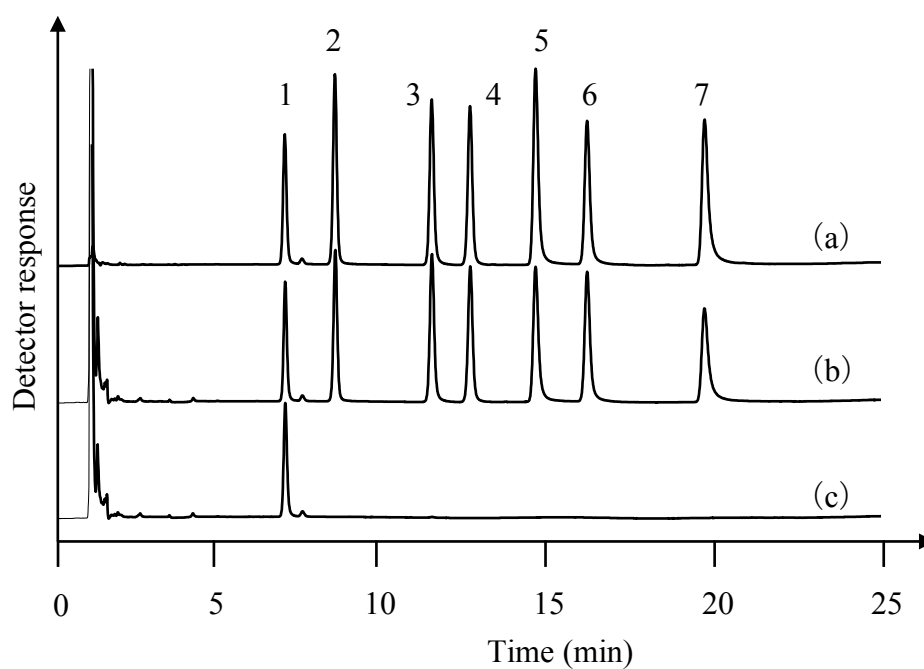


Fig. 1-2 Chromatograms of (a) non-extracted, (b) extracted standard solution, and (c) blank solution with this method. Peaks: 1, 6-Cl-PuDP; 2, AMP; 3, ADP; 4, GMP; 5, ATP; 6, GDP; and 7, GTP (each 10 μM).

3 抽出条件の検討

AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP の標準混合液 (各 10 μ M) を用いて, 抽出条件の最適化を行った。

(1) HFUA 濃度の検討

HFUA 濃度が抽出に及ぼす影響について検討した (Fig. 1-3)。HFUA の濃度を 0, 10, 20, 40, 60, 及び 80 mM と変化させて抽出を行った。その結果モノリン酸 (AMP 及び GMP) については, HFUA 濃度の増加に伴い, 回収率は向上した。一方, ジ, トリリン酸については, HFUA 濃度の増加に伴い, 回収率は低下した。抽出後の非フルオラス層 (ヌクレオチド類が含まれていた試料溶液) からはヌクレオチド類を検出できなかったことから, ヌクレオチドと HFUA とのイオンペア体はフルオラス溶媒中に抽出されていることが確認できた。このことから, ジ, トリリン酸 (特に ATP 及び GTP) は HFUA との強いイオンペア相互作用を示すことにより, 逆抽出されることなくフルオラス溶媒中に留まっているものと考えられる。以上より, 本研究では, 対象としたすべてのヌクレオチド類を効率よく抽出すべく, HFUA の濃度を 40 mM とした。

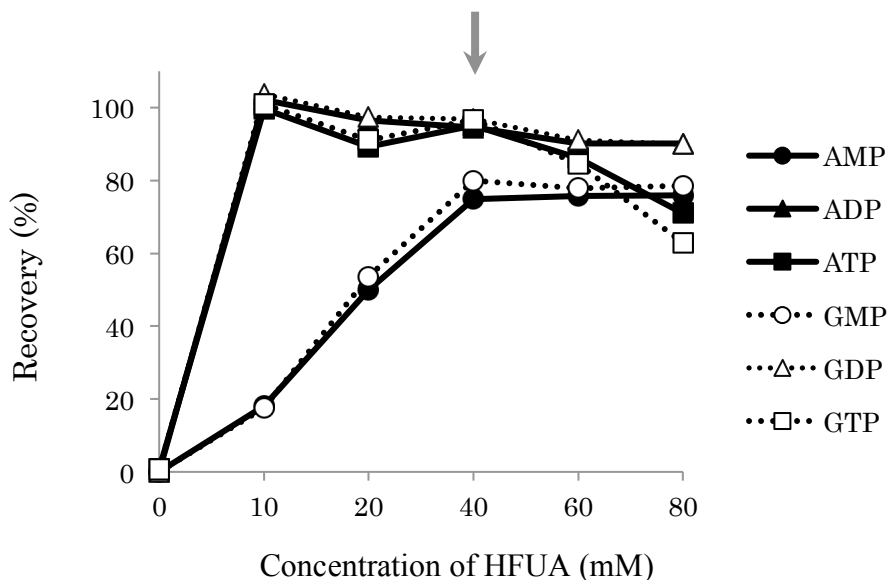


Fig. 1-3 Effect of the concentration of HFUA on the peak area of examined nucleotides.

(2) 緩衝液濃度の検討

フルオロスイオンペア抽出を行うにあたり，溶液の液性はその抽出効率に大きく影響する。本法では，HFUA 及びリン酸基の pKa を鑑み，酢酸ナトリウム緩衝液を用いることとした。さらに，酢酸ナトリウム緩衝液濃度が抽出に及ぼす影響を検討した (Fig. 1-4)。緩衝液濃度 0-250 mM の範囲において検討を行ったところ，濃度の増加に伴い，モノヌクレオチド類の回収率低下が確認された。以上の結果より，酢酸ナトリウム緩衝液の濃度は 100 mM とした。

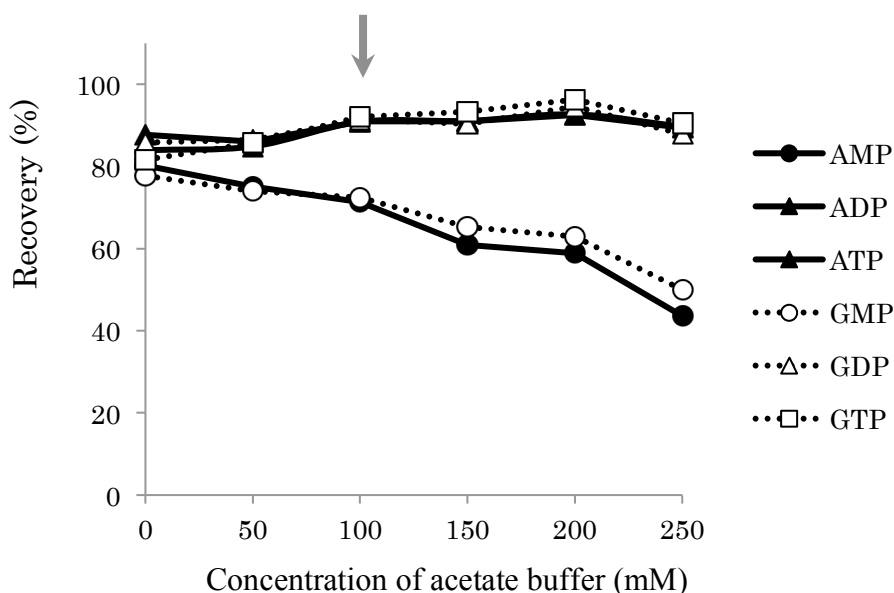


Fig. 1-4 Effect of the concentration of acetate buffer on the peak area of examined nucleotides.

(3) フルオラス溶媒の検討

本研究にて、使用するフルオラス溶媒の検討を行った。一般に、フルオラス抽出法で利用される TDFH を用いた場合、HFUA 及びそのイオンペア体を抽出することができなかつた。このことから、イオンペア体の回収率を向上させるべく solvent tuning [16,17]の原理を用い、極性基を有するフルオラスアルコールを TDFH へと添加した。今回、2,2,2-trifluoroethanol (TFE), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol 及び TFO の 3 種の溶媒を用いて検討を行った結果、TFO を用いた場合、最も良好な結果が得られた。さらに、TDFH に添加する TFO の比率を検討した (Fig.1-5)。その結果、TDFH : TFO = 3:1 (v/v)の比率の時、最も良好な結果が得られた。一方、TDFH : TFO = 2:1 (v/v)の比率を用いた場合、非フルオラス層とフルオラス層とが分離せず、抽出を行うことができなかった。以上の結果から、本研究では TDFH と TFO の混合比を 3:1 (v/v)とすることとした。

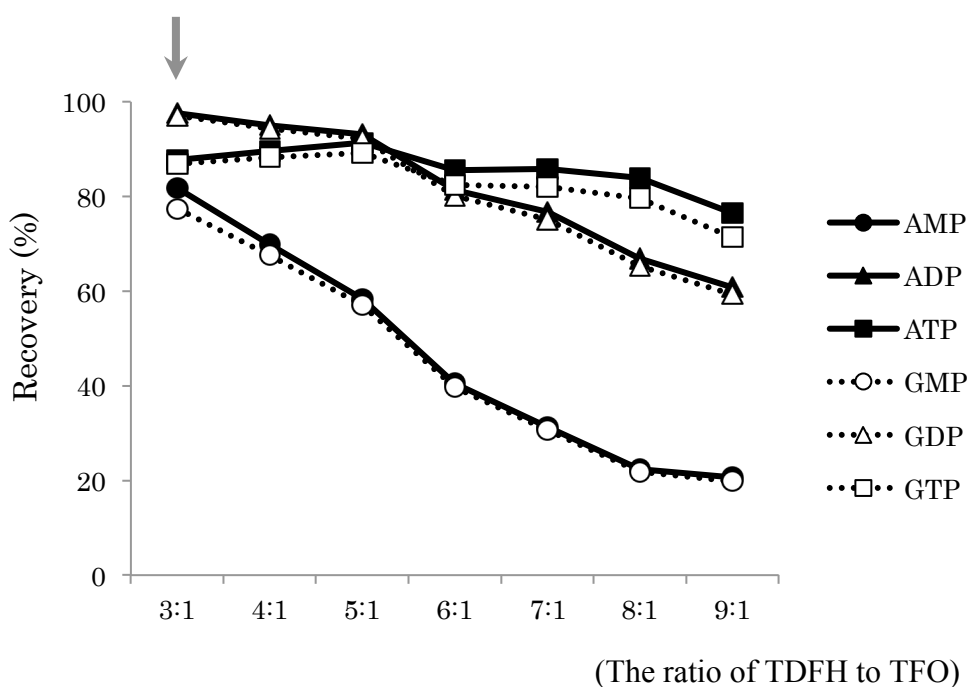


Fig. 1-5 Effect of the ratio of TDFH to TFO with extraction solution on the method.

(4) アンモニア水濃度の検討

本法では、アンモニアを脱イオンペア剤として用いて、フルオラス試薬とヌクレオチド類とのイオンペアを解消させることで、ヌクレオチド類を逆抽出することができた。そこで、抽出の溶液に添加するアンモニア水濃度の検討を行った (Fig. 1-6)。その結果、全てのヌクレオチド類が効率よく抽出できた、1%アンモニアの水溶液を逆抽出溶媒として用いることとした。

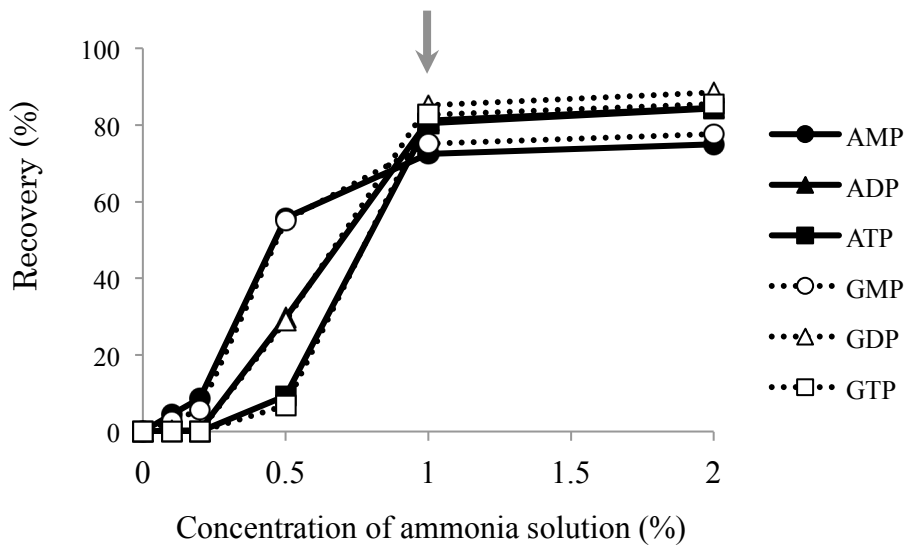


Fig. 1-6 Effect of the concentration of ammonia solution on the peak area of examined nucleotides.

4 選択性の確認

(1) ヌクレオチド類への選択性

AMP の類似体である cAMP 及びアデノシン, また HFUA とイオンペアを形成しうるカルボン酸類であるシアル酸及びオキザロ酢酸に対し, 本法を適用したところ, それらリン酸基をもたない化合物は, いずれも抽出されなかったことから (回収率 \leq 17%), ヌクレオチド類への選択性が確認できた。

(2) HFUA の有用性

本法のフルオラスによる選択性を確認すべく, フルオラス性を持たないアミン系イオンペア試薬として *n*-オクチルアミンを選択し抽出操作を行い, HFUA を用いた場合の結果と比較した (Fig. 1-7)。*n*-オクチルアミンを用いた場合, ヌクレオチド類はほぼ抽出されなかったのに対し, HFUA を用いた場合, 良好な回収率が得られた。以上の結果から, 本法が HFUA とフルオラス溶媒とを同時に用いた場合にのみ達成されることが示された。

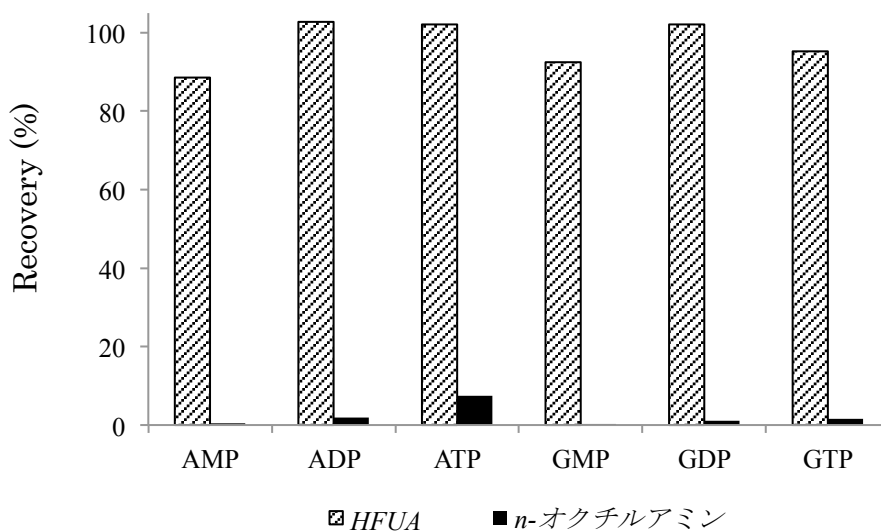


Fig. 1-7 Effect of ion-pair reagent with this method.

5 バリデーション

標準品を用いて得られた検量線, 検出限界, 回収率及び繰り返し再現性を Table 1-1 に示す。AMP, ADP, GMP 及び GDP 検量線は少なくとも 0.05 μM から 10 μM (0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 及び 10 μM) の範囲で良好な直線性 ($r \geq 0.9998$) を示した。また, ATP 及び GTP の検量線は, 少なくとも 0.1 μM から 20 μM (0.1, 0.5, 1, 5, 10 及び 20 μM) の範囲で良好な直線性 ($r \geq 0.9995$) を示した。さらに, 各濃度が 0.5, 1 及び 10 μM となるよう調製したヌクレオチド類の標準混合液を用いた場合, 回収率は 70.4%から 96.8%の範囲にあり, また, 再現性についても良好な結果を得ることができた。また, $S/N=3$ における検出限界は, 24 nM 以下であった。

Table 1-1 Validation data of standard nucleotides.

| | Linearity ^{a)} (<i>r</i>) | LOD ^{b)} (nM) | Mean recovery \pm SD (% , <i>n</i> = 6) | | |
|-----|---|---------------------------|---|-----------------|------------------|
| | | | 0.5 μM | 1 μM | 10 μM |
| AMP | 0.9999 | 11 | 74.4 \pm 3.2 | 78.6 \pm 3.0 | 75.7 \pm 2.0 |
| ADP | 0.9999 | 9.7 | 88.9 \pm 3.3 | 85.0 \pm 1.6 | 84.5 \pm 2.4 |
| ATP | 0.9996 | 24 | 70.4 \pm 2.6 | 77.6 \pm 2.6 | 75.9 \pm 2.3 |
| GMP | 0.9998 | 12 | 76.3 \pm 3.6 | 77.4 \pm 2.9 | 78.8 \pm 2.9 |
| GDP | 0.9998 | 11 | 96.8 \pm 2.1 | 89.5 \pm 3.5 | 90.3 \pm 2.1 |
| GTP | 0.9995 | 24 | 72.3 \pm 2.7 | 75.3 \pm 4.7 | 73.8 \pm 2.2 |

- a) Correlation coefficient of calibration curve in the range from 0.05 to 10 μM for AMP, ADP, GMP, and GDP, and that from 0.1 to 20 μM for ATP and GTP.
- b) Defined as the concentration yielding a signal-to-noise ratio of 3.

6 乳がん細胞試料中 AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP の分析

本法の実試料分析への有用性を検証すべく、本法を MCF-7 及び MCF-10A 中ヌクレオチド類 6 種の定量に適用した。細胞試料中 AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP を基準操作に従い抽出した後、LC 分析を行った。結果のクロマトグラムを Fig. 1-8 に示す。また、得られた定量結果を Table 1-2 に示す。本法により、細胞試料中ヌクレオチド類の抽出は可能であり、それらは LC で分析することが可能であった。また、本法を適用しなかった場合のクロマトグラム (Fig. 1-8 (a)) と比較すると、本法適用後のクロマトグラム (Fig. 1-8 (b)) では、いくつかの妨害ピークを除去できていることから、本法によって夾雑成分からの精製が可能であった。以上より、本法の実試料に対する有用性を確認することができた。

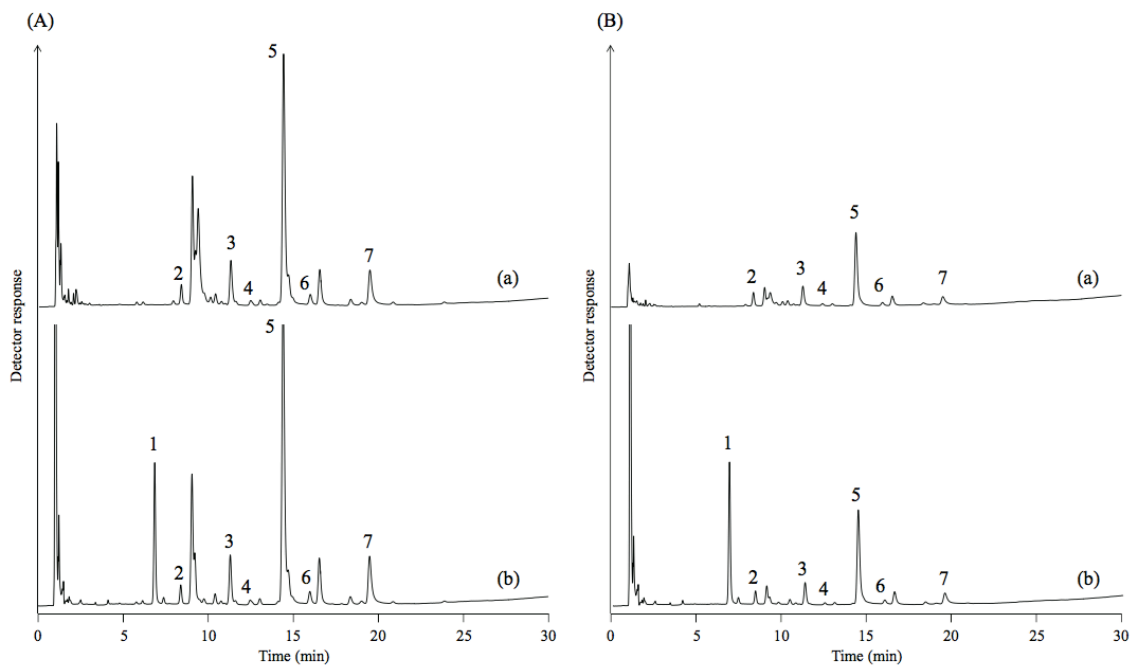


Fig. 1-8 Chromatograms obtained from (A) MCF-7 and (B) MCF-10A cell samples. (a) Non-extracted cell sample; (b) extracted cell sample with the present method. Peaks 1-7; see Fig. 1-2.

Table 1-2 Determination results of examined nucleotides in cell extract samples.

| | Concentration (nmol/1×10 ⁶ cell) | |
|-----|---|---------|
| | MCF-7 | MCF10-A |
| AMP | 0.62 | 0.44 |
| ADP | 1.7 | 0.79 |
| ATP | 9.9 | 3.4 |
| GMP | 0.14 | 0.08 |
| GDP | 0.45 | 0.14 |
| GTP | 2.3 | 0.56 |

7 小括

本研究では、生体内リン酸化合物の選択的抽出法の構築を目指し、フルオラスイオンペア法の開発を行い、ヌクレオチド類（AMP, ADP, ATP, GMP, GDP 及び GTP）の抽出へと適用した。本法では、フルオラスアミン試薬である HFUA を用いることで、ヌクレオチド類とイオンペアを形成させ、そのイオンペア体のみをフルオラス溶媒中に選択的に抽出することが可能であった。さらに、脱イオンペア剤を含む溶液を用いることで、ヌクレオチド類をその水溶液中へと逆抽出することもできた。本法によるヌクレオチド類 6 種の回収率は 70.4% から 96.8% の範囲にあり、検量線の直線性 ($r \geq 0.9995$) 及び再現性も良好な値が得られた。さらに、乳がん細胞試料中ヌクレオチド類の抽出へと本法を適用したところ、細胞試料中からも対象とするヌクレオチド類を抽出することができ、定量値を算出することができた。また、試料中夾雑成分の影響を受けることなく、LC にて分析可能であったことから、本法が細胞試料中ヌクレオチド類の抽出法として有用であることが確認できた。

【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

本章では、第 1 章において開発したフルオラスイオンペア法をさらに応用すべく、対象とするヌクレオチド類を 18 種 (AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, IMP, ITP, UMP, UDP, UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc 及び UTP) へと拡張した。また、本法によるヌクレオチド類抽出の実用研究として、細胞内ヌクレオチド類の分析を行った。本研究では、細胞内ヌクレオチド類濃度変化が細胞状態の変化を反映しているのかどうかの確認を行うべく、細胞内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、培養時間経過ごとの細胞内ヌクレオチド濃度の定量を行った。なお、今回、ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T-cell Leukemia Virus Type 1, HTLV-1) 非感染性の急性全骨髄性白血病細胞である HL60 細胞, HTLV-1 非感染性の急性リンパ性白血病細胞である Jurkat 細胞及び HTLV-1 感染性の成人 T 細胞性白血病細胞である MT-2 細胞を用いて検討を行った。

1 基準操作

(1) 操作手順

第1章 1-(1)に従って操作した。

(2) LC 条件

カラムにはXBridge[®] BEH Amide (150 × 3.0 mm I.D., 粒径2.5 μm, Waters) を使用し、移動相Aとして20 mM炭酸アンモニウムを含むアセトニトリル：水 (80:20, v/v) , 移動相Bとして40 mM炭酸アンモニウムを含むアセトニトリル：水 (40:60, v/v) を使用し、流速0.6 mL/minでグラジエント溶離を行った (0-22 min, linear change from 15% to 37% B; 22-30 min 37% B; 30-30.01 min, linear change from 37% to 15% B; and run time, 40 min) 。カラム温度は35°C, UV検出は254 nmに設定した。

(3) 細胞試料

ヒト白血病由来細胞株であるHL60細胞, Jurkat細胞及びMT-2細胞を24時間ごとに 1.0×10^6 個になるよう回収し、細胞試料として用いた。採取した細胞ペレットに氷冷メタノールを320 μL加え、1分間振とう後、氷冷水220 μLを加え1分間振とうし、遠心分離 (17,500 × g, 15 min) を行った。上清を試料溶液として用いた。

2 標準品を用いた分析条件最適化

(1) クロマトグラム

分析対象としたヌクレオチド類 18 種の標準混合液（各 10 μ M）を基準操作に従い抽出した後、LC 分析を行った。結果のクロマトグラムを Fig. 2-1 に示す。得られた結果から、本条件下において、対象としたヌクレオチド類を分離・検出することができた (Fig. 2-1 (a))。さらに、同標準混合液を基準操作に従い抽出して得られたクロマトグラムを Fig. 2-1 (b) に示す。本法によって、対象とするヌクレオチド類をすべて抽出することができた。一方、blank の抽出液を測定して得られた結果である Fig. 2-1 (c) には、ヌクレオチド類のピークは確認されなかったことから、本法によって、ヌクレオチド類を抽出できることが確認できた。

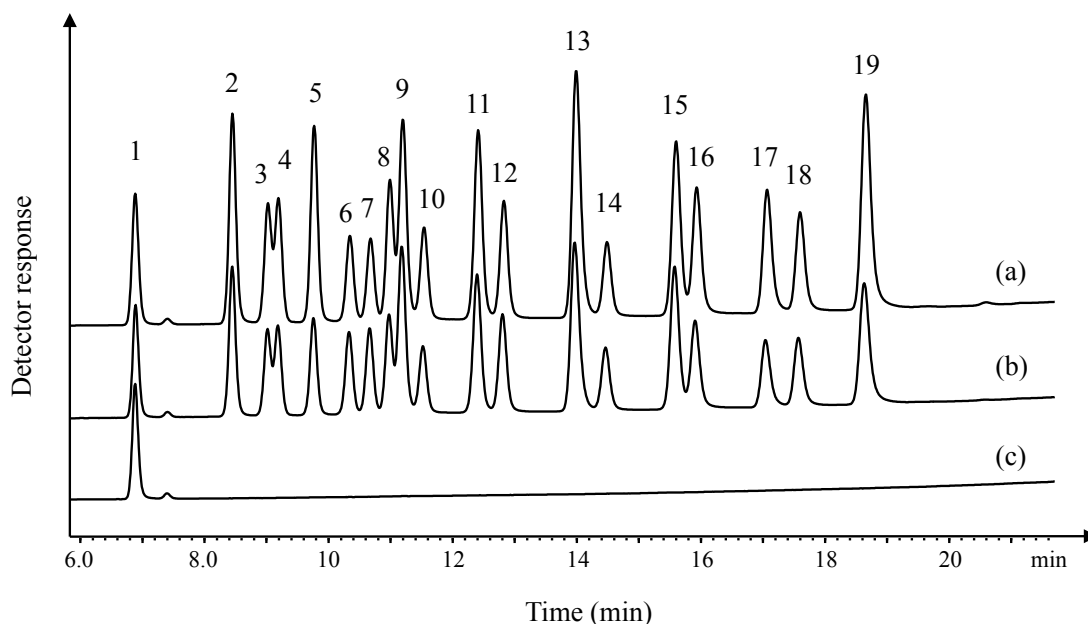


Fig. 2-1 Chromatograms of (a) non-extracted, (b) extracted standard solution, and (c) blank solution with this method. Peaks: 1, 6-Cl-5'-PuDP; 2, AMP; 3, UDP-GlcNAc; 4, UDP-GalNAc; 5, UMP; 6, UDP-Glc; 7, UDP-Gal; 8, IMP; 9, ADP; 10, CMP; 11, GMP; 12, UDP; 13, ATP; 14, CDP; 15, GDP; 16, UTP; 17, ITP; 18, CTP; 19, GTP.

(2) バリデーション

標準混合液を用いて得られた検量線，検出限界，回収率及び繰り返し再現性を Table 2-1 に示す。検量線は，少なくとも 0.1 μM から 20 μM (0.1, 0.5, 1, 5, 10 及び 20 μM) の範囲で良好な直線性 ($r \geq 0.9925$) を示した。さらに，各濃度が 0.5, 1 及び 10 μM となるよう調製したヌクレオチド類 18 種の標準混合液を用いて，回収率及び繰り返し再現性を測定したところ，回収率は 44.7% から 117% の範囲にあり，良好な再現性を得ることができた。また， $S/N=3$ における検出限界は，17 nM 以下であった。

Table 2-1 Validation data of standard nucleotides.

| | Linearity ^{a)} (<i>r</i>) | LOD ^{b)} (nM) | Mean recovery \pm SD (% , <i>n</i> = 6) | | |
|------------|---|---------------------------|---|-----------------|------------------|
| | | | 0.5 μM | 1 μM | 10 μM |
| AMP | 0.9996 | 3.9 | 67.4 \pm 1.2 | 66.8 \pm 0.78 | 69.6 \pm 1.1 |
| UDP-GlcNAc | 0.9992 | 3.3 | 68.3 \pm 2.8 | 71.4 \pm 1.4 | 75.9 \pm 1.2 |
| UDP-GalNAc | 0.9999 | 3.8 | 74.4 \pm 1.9 | 71.2 \pm 1.2 | 75.5 \pm 1.1 |
| UMP | 0.9999 | 8.0 | 47.7 \pm 1.0 | 45.7 \pm 0.89 | 53.9 \pm 0.8 |
| UDP-Glc | 0.9999 | 4.7 | 101 \pm 2.3 | 100 \pm 0.94 | 96.7 \pm 2.8 |
| UDP-Gal | 0.9999 | 4.3 | 117 \pm 2.6 | 113 \pm 0.94 | 103 \pm 3.9 |
| IMP | 0.9999 | 7.0 | 70.4 \pm 0.87 | 68.1 \pm 1.2 | 71.3 \pm 1.2 |
| ADP | 0.9998 | 1.7 | 59.4 \pm 1.3 | 72.5 \pm 0.94 | 83.3 \pm 1.1 |
| CMP | 0.9997 | 6.0 | 69.4 \pm 2.3 | 69.6 \pm 0.93 | 73.9 \pm 1.2 |
| GMP | 0.9997 | 2.0 | 75.3 \pm 0.85 | 71.0 \pm 1.0 | 74.4 \pm 1.1 |
| UDP | 0.9999 | 4.0 | 84.6 \pm 2.3 | 81.3 \pm 1.9 | 86.9 \pm 1.4 |
| ATP | 0.9976 | 9.0 | 58.3 \pm 4.8 | 68.7 \pm 4.5 | 77.7 \pm 5.0 |
| CDP | 0.9993 | 17 | 71.3 \pm 2.3 | 81.0 \pm 2.3 | 87.4 \pm 1.4 |
| GDP | 0.9999 | 16 | 83.6 \pm 2.0 | 82.3 \pm 1.2 | 89.3 \pm 1.5 |
| UTP | 0.9971 | 13 | 64.3 \pm 4.6 | 70.8 \pm 4.9 | 87.7 \pm 5.7 |
| ITP | 0.9925 | 16 | 48.4 \pm 5.7 | 56.4 \pm 3.7 | 65.8 \pm 5.3 |
| CTP | 0.9970 | 15 | 63.3 \pm 4.2 | 69.8 \pm 4.8 | 79.0 \pm 4.9 |
| GTP | 0.9967 | 13 | 50.4 \pm 4.1 | 61.2 \pm 2.1 | 68.0 \pm 5.2 |

- a) Correlation coefficient of the calibration curve of nucleotides in the concentration range 0.1-20 μM .
- b) Limit of detection, defined as the sample concentration giving a signal-to-noise (S/N) ratio of 3.

3 白血病由来細胞試料の分析

HL60細胞, Jurkat細胞及びMT-2細胞からヌクレオチド類を抽出し, LCにて分析して得られたクロマトグラムをFig. 2-2に示す。(a)は除タンパクを施した後の試料溶液をそのまま測定した場合, (b)は本法適用後の抽出液を測定した場合のクロマトグラムである。抽出の前後を比べると, いずれ細胞においても, 抽出前のクロマトグラムに見られた妨害ピークを抽出後のクロマトグラムでは除去することができた。これらの結果から, 本法によって, 細胞試料中ヌクレオチド類を抽出可能であることが確認できた。

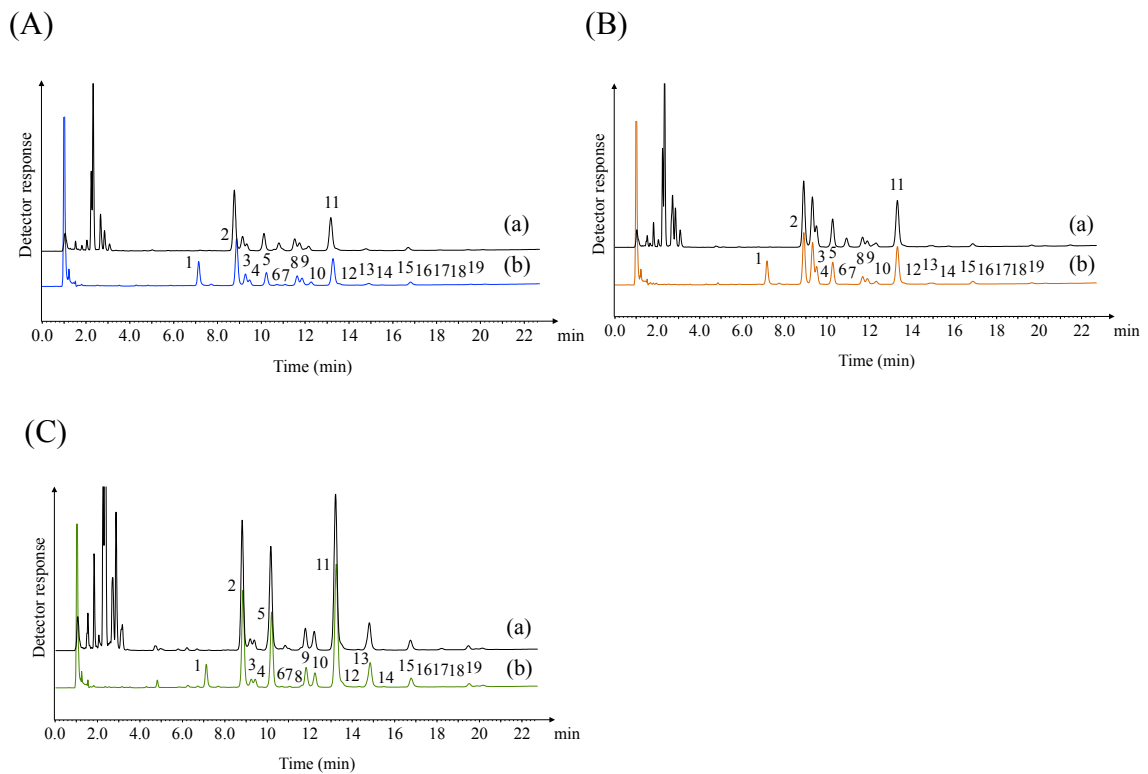


Fig. 2-2 Chromatograms obtained from (A) HL60, (B) Jurkat and (C) MT-2 cell samples. (a) Non-extracted cell sample; (b) extracted cell sample with this method. Peaks 1-19; see Fig. 2-1.

4 添加回収率と再現性

培養開始から 24 時間後の MT-2 細胞の試料溶液を用いて得られた添加回収率及び再現性を Table. 2-2 に示す。添加量 0.5, 1 及び 10 μM の試料溶液を 3 回繰り返し前処理, 抽出及び測定したとき, 回収率は 43.8% から 138 の% 範囲にあり, 良好な再現性を得ることができた。これらの結果より, 本法が白血病細胞試料中ヌクレオチド類の抽出法として有用であることが示された。

Table 2-2 Mean recoveries of nucleotides in cell sample.

| | Mean recovery \pm SD (% , $n = 6$) | | |
|------------|---------------------------------------|-----------------|------------------|
| | 0.5 μM | 1 μM | 10 μM |
| AMP | 56.9 \pm 1.2 | 66.9 \pm 3.6 | 77.5 \pm 3.1 |
| UDP-GlcNAc | 88.3 \pm 16 | 89.0 \pm 3.2 | 86.4 \pm 1.3 |
| UDP-GalNAc | 85.3 \pm 5.2 | 76.5 \pm 2.6 | 88.1 \pm 1.4 |
| UMP | 46.3 \pm 6.2 | 43.8 \pm 5.3 | 56.2 \pm 4.0 |
| UDP-Glc | 124 \pm 11 | 112 \pm 6.2 | 115 \pm 3.2 |
| UDP-Gal | 138 \pm 7.8 | 129 \pm 6.7 | 132 \pm 4.0 |
| IMP | 74.0 \pm 0.7 | 76.2 \pm 1.2 | 83.4 \pm 1.3 |
| ADP | 68.4 \pm 3.1 | 83.4 \pm 1.4 | 107 \pm 2.0 |
| CMP | 78.6 \pm 1.9 | 83.9 \pm 0.5 | 85.3 \pm 2.8 |
| GMP | 85.2 \pm 1.9 | 80.9 \pm 0.4 | 84.7 \pm 2.4 |
| UDP | 116 \pm 8.0 | 103 \pm 1.8 | 105 \pm 3.3 |
| ATP | 95.7 \pm 19 | 82.8 \pm 3.3 | 87.0 \pm 1.1 |
| CDP | 106 \pm 6.1 | 106 \pm 2.6 | 108 \pm 1.1 |
| GDP | 103 \pm 3.8 | 97.8 \pm 1.2 | 103 \pm 3.7 |
| UTP | 113 \pm 17 | 95.8 \pm 2.2 | 111 \pm 10 |
| ITP | 95.8 \pm 2.8 | 90.0 \pm 2.4 | 95.8 \pm 2.9 |
| CTP | 117 \pm 5.0 | 99.2 \pm 2.0 | 103 \pm 6.6 |
| GTP | 105 \pm 5.5 | 91.1 \pm 0.9 | 99.3 \pm 7.5 |

5 ヌクレオチド類18種の定量

(1) 定量結果

HL60 細胞, Jurkat 細胞及び MT-2 細胞におけるヌクレオチド濃度を培養開始 24 時間ごとに測定した。その定量結果を Table 2-3 に示す。

Table 2-3 Determination results of examined nucleotides in cell extract samples.

| | HL60 (fmol/cell) | | | | Jurkat (fmol/cell) | | | | MT-2 (fmol/cell) | | | |
|------------|------------------|--------|-------|-------|--------------------|--------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------|
| | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h | 0 h | 24 h | 48 h | 72 h |
| AMP | 0.032 | 0.063 | 0.30 | 1.8 | 0.049 | 0.079 | 0.22 | 0.44 | 1.3 | 3.7 | 2.2 | 3.3 |
| UDP-GlcNAc | 0.98 | 2.6 | 0.57 | 0.79 | 2.2 | 0.26 | 3.8 | 3.2 | 2.8 | 2.4 | 2.1 | 2.1 |
| UDP-GalNAc | 0.25 | 0.86 | 0.16 | 0.20 | 0.6 | 0.071 | 1.1 | 0.91 | 0.84 | 0.74 | 0.66 | 0.67 |
| UMP | 0.044 | 0.06 | 0.10 | 0.38 | 0.05 | 0.032 | 0.13 | 0.24 | 0.68 | 1.8 | 1.2 | 1.6 |
| UDP-Glc | 0.22 | 0.37 | 0.38 | 0.30 | 0.29 | 0.29 | 0.38 | 0.31 | 0.99 | 0.62 | 0.61 | 0.64 |
| UDP-Gal | 0.075 | 0.11 | 0.11 | 0.10 | 0.095 | 0.083 | 0.10 | 0.081 | 0.30 | 0.18 | 0.20 | 0.21 |
| IMP | 0.0068 | 0.0025 | 0.049 | 0.29 | 0.0018 | 0.0040 | 0.034 | 0.092 | 0.59 | 0.64 | 0.76 | 0.90 |
| ADP | 0.35 | 0.42 | 1.1 | 1.5 | 0.47 | 0.45 | 0.84 | 0.94 | 2.1 | 2.1 | 2.0 | 2.5 |
| CMP | 0.041 | 0.05 | 0.20 | 0.20 | 0.055 | 0.067 | 0.11 | 0.14 | 0.35 | 0.62 | 0.46 | 0.61 |
| GMP | 0.0077 | 0.0028 | 0.066 | 0.40 | 0.0063 | 0.0090 | 0.041 | 0.15 | 0.29 | 0.88 | 0.61 | 0.74 |
| UDP | 0.022 | 0.17 | 0.18 | 0.34 | 0.12 | 0.073 | 0.31 | 0.4 | 0.46 | 0.69 | 0.67 | 0.96 |
| ATP | 3.0 | 5.0 | 5.6 | 4.0 | 3.3 | 3.3 | 4.8 | 3.6 | 16 | 8.9 | 8.9 | 6.4 |
| CDP | 0.18 | 0.33 | 0.52 | 0.14 | 0.22 | 0.26 | 0.51 | 0.16 | 0.68 | 0.37 | 0.33 | 0.40 |
| GDP | 0.045 | 0.074 | 0.22 | 0.36 | 0.062 | 0.088 | 0.17 | 0.21 | 0.51 | 0.55 | 0.50 | 0.63 |
| UTP | 0.97 | 2.6 | 1.9 | 1.4 | 1.7 | 1.3 | 2.4 | 1.7 | 6.9 | 4.2 | 4.1 | 3.0 |
| ITP | 0.0036 | 0.095 | 0.023 | 0.022 | 0.045 | 0.011 | 0.12 | 0.078 | 0.026 | 0.020 | 0.015 | 0.019 |
| CTP | 0.46 | 0.94 | 0.73 | 0.55 | 0.69 | 0.50 | 1.0 | 0.64 | 2.2 | 1.3 | 1.2 | 0.87 |
| GTP | 0.78 | 1.1 | 1.7 | 1.2 | 0.88 | 0.89 | 1.3 | 1.1 | 3.1 | 1.9 | 1.9 | 1.4 |

(2) 定量結果を用いた多変量解析

(1) にて得られたヌクレオチド類の定量値から、総合的指標（主成分）を合成し、スコアプロットとローディングプロットを作成した。主成分分析の結果、得られたスコアプロットをFig. 2-3 (A) に、ローディングプロットをFig. 2-3 (B) に示す。スコアプロットにおいて、HL60細胞とJurkat細胞のプロットは横軸負側に位置し、MT-2細胞のプロットは横軸正側に位置した。このことから、HL60細胞・Jurkat細胞群とMT-2細胞群の2群間の差異を可視化することができた。一方、HL60細胞とJurkat細胞間には細胞種による差異を確認することができなかった。さらに、ローディングプロットの結果から、第1主成分の寄与率のほうが高いことから、横軸の1に近い代謝物ほど2群の差異に大きく関与していると考えられ、横軸正の位置に分布する物質は、MT-2細胞において、その他2種の細胞より高濃度に含まれることが示唆された。

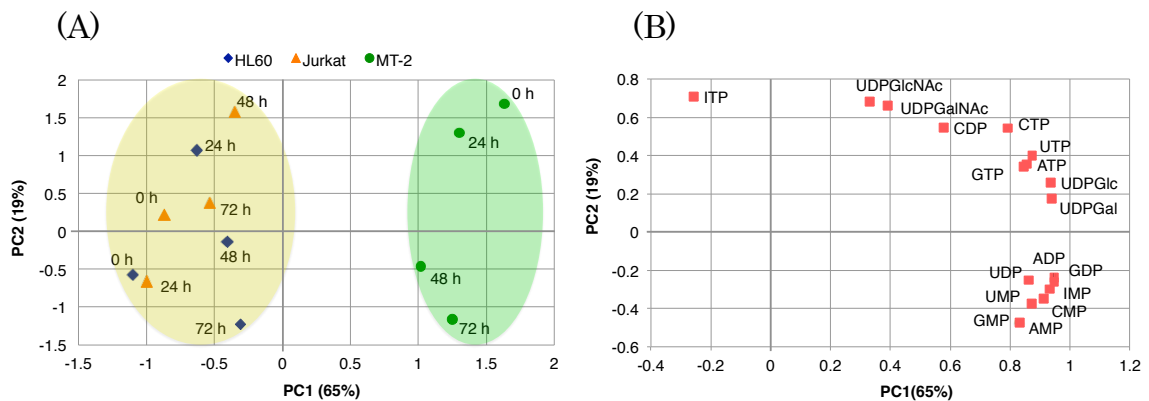


Fig.2-3 The PCA (A) score and (B) loading plots obtained with quantitation of the nucleotides in cell samples.

6 小括

フルオラスイオンペア法により，細胞試料中ヌクレオチド類 18 種を選択的に抽出することが可能であった。本抽出液を LC にて測定した結果，ヌクレオチド類の回収率は，43.8～138%の範囲にあり，直線性 ($r \geq 0.9925$) 及び再現性 (RSD < 8.0%) はともに良好な結果が得られた。次に本法を，白血病由来細胞試料 (HL60 細胞，Jurkat 細胞及び MT-2 細胞) へと適用したところ，試料中ヌクレオチド類を測定することができた。また，MT-2 細胞を用いて添加回収試験を行ったところ，回収率は 43.8%から 138%の間にあり，再現性においても良好な値が得られた。さらに，HL60 細胞，Jurkat 細胞及び MT-2 細胞におけるヌクレオチド類濃度を培養開始から 24 時間ごと，72 時間までの各細胞内ヌクレオチド類濃度の定量を行った。その定量結果に対して多変量解析を施したところ，HL60 細胞・Jurkat 細胞群と MT-2 細胞群の 2 群間の差異を可視化することができた。一方，HL60 細胞と Jurkat 細胞の間には経過時間ごと及び細胞種の違いによる差異は確認できなかった。以上より，フルオラスイオンペア法を応用したヌクレオチド類解析によって，各細胞中ヌクレオチド類の濃度変化を追うことで，細胞種差の解析及び細胞種の判定に適用可能であることが示唆された。

【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

第1章及び第2章では、リン酸化合物を対象とした選択的な抽出を行うべく、フルオラス溶媒抽出にイオンペアの概念を取り入れた。本章では、さらにリン酸化合物への選択性の向上を目指し、金属キレートアフィニティー法 [40,41]をフルオラス溶媒抽出法に取り入れた方法論を開発した。本法は、まず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) 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する。次いで脱キレート剤を含む溶媒を用いて逆抽出を行い、その溶媒中に含まれる対象物質を測定するという方法である (Fig. 3-1)。さらに本研究では、本法をヌクレオチド類の抽出へと適用し、30種 (AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, IMP, IDP, ITP, UMP, UDP, UTP, dAMP, dATP, dCMP, dCDP, dCTP, dGMP, dGDP, dGTP, dIMP, dITP, dTMP, dTDP, dTTP, dUMP及びdUTP) を対象としてLC-MS/MS分析を行った。また、アポトーシスを誘導 (Anti-Fas抗体添加) させた急性リンパ性白血病細胞 (Jurkat細胞) 中ヌクレオチド類の分析に本法を適用した。

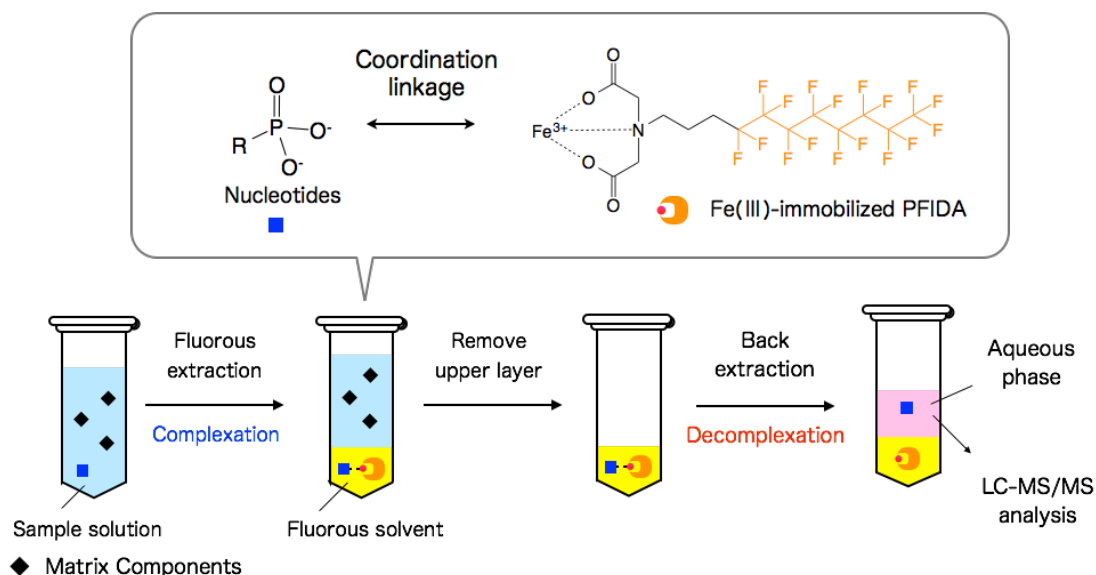


Fig. 3-1 The principal of the extraction method for nucleotides with Fe(III)-immobilized PFIDA by fluorous-assisted metal chelate affinity technique.

1 基準操作

(1) Fe(III)配位 PFIDA の調製

40 mM PFIDA 溶液 (TFE 溶液) 100 μ L に, 1 M 塩化鉄(III) 100 μ L を加え, 室温で 30 分間放置した。その後, TDFH : TFO = 3 : 1 (v/v) 100 μ L 及び 50%メタノール 100 μ L を加え振とうした。遠心分離 (17,500 \times g, 10 min) 後, 上層 (非フルオラス層) を除去し, 50%メタノール 200 μ L を加え, 上層が着色しなくなるまで下層 (フルオラス層) の洗浄 (振とうと上層の除去) を複数回繰り返した。得られたフルオラス層を濃縮乾固し, 残渣に TDFH : TFO = 3 : 1 (v/v) を加えて目的濃度に用時調製した。

(2) 抽出手順

試料溶液 (AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, IMP, IDP, ITP, UMP, UDP, UTP, dAMP, dATP, dCMP, dCDP, dCTP, dGMP, dGDP, dGTP, dIMP, dITP, dTMP, dTDP, dTTP, dUMP 及び dUTP の 0.2%TFA を含む 60%CH₃OH 溶液) 400 μ L をバイアル (1.5 mL コニカル型) にとり, 50 mM Fe(III)配位 PFIDA 溶液 (TDFH : TFO = 3 : 1, v/v) 20 μ L を加え, 室温で 10 分間振とうした。遠心分離 (17,500 \times g, 10 min) 後, 上層 (非フルオラス層) を除去し, 0.2% trifluoroacetic acid (TFA) を含む 60%メタノール 50 μ L で下層 (フルオラス層) を洗浄した。次いで, フルオラス層に 1%アンモニアを含む 70%アセトニトリル 50 μ L を加え, 室温で 10 分間振とうした。遠心分離 (17,500 \times g, 10 min) 後, 得られた上層 (非フルオラス層) の一部 (5 μ L) を LC-MS/MS に注入した。

(3) LC-MS/MS 条件

LC 条件

カラムには Acquity UPLC[®] BEH Amide (100 × 3.0 mm I.D., 粒径 1.7 μm, Waters) を使用し, 移動相 A として 250 mM 炭酸水素アンモニウムを含むアセトニトリル : 水 (80:20, v/v), 移動相 B として 250 mM 炭酸水素アンモニウムを含むアセトニトリル : 水 (60:40, v/v) を使用し, 流速 0.6 mL/min でグラジエント溶離 (0–10 min, linear increase from 20 to 30% B; 10–12 min, linear increase from 30 to 60% B, 12–25 min, linear increase from 60 to 100% B, 25–25.01 min, linear decrease from 100 to 20% B; and 25.01–40 min, 20% B) を行った。カラム温度は 35°C に設定した。

MS/MS 条件

装置には, LCMS-8050 (島津製作所製) を使用し, イオン化は ESI ネガティブモードで行った。各 MRM トランジション, Q1 pre bias, CE 及び Q3 pre bias を Table 3-1 の通りに設定し, MRM モードによる測定を行った。

(4) 細胞試料

白血病由来細胞である Jurkat 細胞に対し, アポトーシス誘導剤である 100 ng/mL Anti-Fas mAb を添加し, 0 (未添加), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 及び 18 時間ごとに回収し細胞試料として用いた。一定量採取した細胞ペレット (1.0×10^6 個) に氷冷メタノールを 320 μL 加え, 1 分間振とう後, さらに氷冷水 220 μL を加え 1 分間振とうした。遠心分離 ($17,500 \times g$, 15 min) 後の上清を試料溶液として用いた。

Table 3-1 MRM conditions of nucleotides.

| Nucleotides | Precursor ions (<i>m/z</i>) | Product ions (<i>m/z</i>) | Q1 pre bias | CEs | Q3 pre bias |
|-------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------|-----|-------------|
| dTMP | 321.0 | 195.0 | 12 | 16 | 21 |
| dUMP | 307.1 | 195.2 | 11 | 11 | 11 |
| dAMP | 330.0 | 134.1 | 25 | 24 | 14 |
| AMP | 346.2 | 78.9 | 13 | 46 | 14 |
| UMP | 323.0 | 78.9 | 12 | 37 | 14 |
| dIMP | 331.1 | 135.1 | 13 | 23 | 14 |
| dTDP | 401.1 | 159.1 | 15 | 25 | 30 |
| dCMP | 306.0 | 79.0 | 12 | 47 | 15 |
| IMP | 347.0 | 78.8 | 13 | 45 | 14 |
| dGMP | 346.0 | 78.9 | 13 | 21 | 15 |
| ADP | 426.1 | 158.9 | 16 | 26 | 29 |
| CMP | 322.0 | 78.8 | 12 | 46 | 15 |
| UDP | 402.9 | 159.0 | 15 | 26 | 30 |
| dTTP | 481.0 | 159.1 | 23 | 31 | 30 |
| GMP | 362.0 | 78.9 | 27 | 41 | 15 |
| dCDP | 386.1 | 78.9 | 15 | 45 | 15 |
| dATP | 490.0 | 159.0 | 18 | 31 | 30 |
| dUTP | 467.0 | 159.1 | 18 | 35 | 30 |
| IDP | 426.0 | 159.0 | 16 | 27 | 30 |
| ATP | 506.0 | 159.1 | 20 | 30 | 30 |
| dGDP | 426.0 | 78.9 | 16 | 49 | 14 |
| CDP | 401.9 | 159.0 | 15 | 26 | 30 |
| UTP | 482.8 | 159.0 | 18 | 30 | 30 |
| dITP | 491.0 | 159.0 | 11 | 35 | 16 |
| GDP | 441.9 | 158.9 | 11 | 35 | 16 |
| dCTP | 466.0 | 159.0 | 18 | 30 | 30 |
| ITP | 506.8 | 159.0 | 38 | 31 | 30 |
| dGTP | 506.0 | 159.0 | 20 | 30 | 29 |
| CTP | 481.9 | 159.0 | 18 | 27 | 30 |
| GTP | 521.7 | 159.0 | 38 | 33 | 30 |

2 クロマトグラム

対象としたヌクレオチド類の標準混合液（各 1 μM ）を基準操作に従い抽出した後、LC-MS/MS 分析を行った。得られたクロマトグラムを Fig. 3-2 に示す。今回対象とした 30 種のヌクレオチド類は、いずれも HILIC カラムに十分に保持され、18 分以内にすべての物質を検出できた。

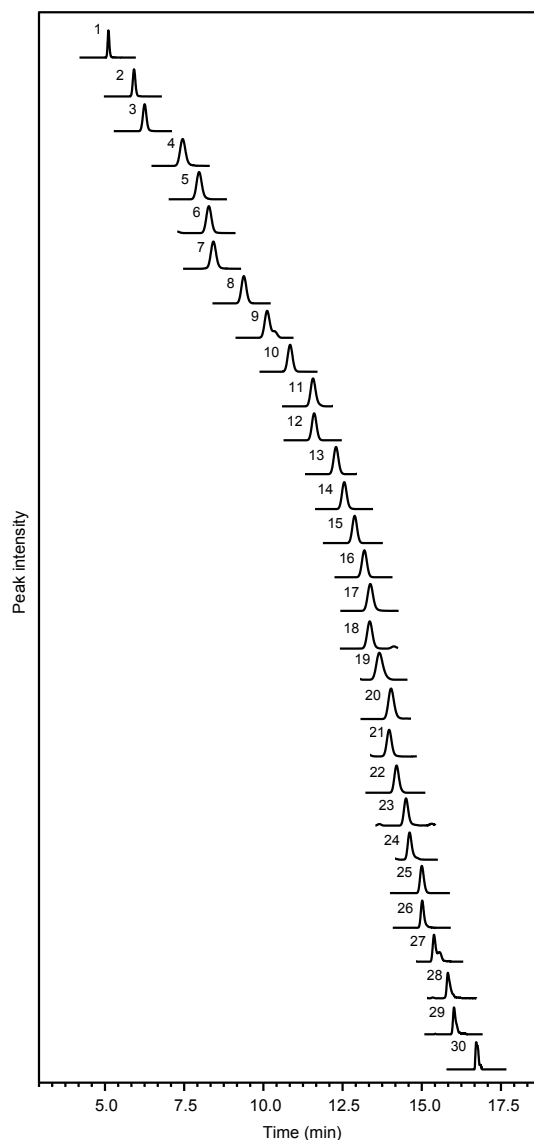


Fig. 3-2 Chromatograms obtained for standard solution treated with this method.

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 and 30, GTP.

3 LC-MS/MS分析条件の検討

まず、ヌクレオチド類30種をより最適な条件にて保持・分離すべく、HILICカラムの再検討を行った。ヌクレオチド類は酸性化合物であり、LCにおいて塩基性移動相を使用した場合、HILICカラムへと効率よく保持させることができる。よって、塩基性条件下でも使用できるふたつのカラムに絞り、アミド型のカラムとポリマーベースのカラムについて検討を行った。本研究では、より良好な分離が得られたアミド型のHILICカラムを選択した。アミド型HILICカラムは、電荷的にニュートラルであり、イオン交換的な相互作用が少ないことから、揮発性塩の水溶液とアセトニトリルとを組み合わせた緩和な溶離条件で分析を行うことができる。本研究においても、炭酸水素アンモニウムを含む水とアセトニトリルの混液を用いることによって、ヌクレオチド類に対して良好な保持及び分離を達成することができた。

次に、移動相に含まれる炭酸水素アンモニウムの濃度と分離の相関について検討を行った。HILICカラムでは、移動相において塩濃度が上昇することで固定相表面の水和層が増加し、さらに極性化合物と固定相との相互作用が増加し、結果的に保持が向上することが知られている。そこで、移動相に添加する炭酸水素アンモニウムの濃度を0, 10, 30及び50 mMとし分離を行い、それぞれのクロマトグラムを比較した。炭酸水素アンモニウムの濃度が増加するにつれ、ピーク形状、保持及び分離がいずれも改善されているのが確認できた。この結果より、移動相中に炭酸水素アンモニウムが50 mM含まれるよう調製することとした。

4 抽出条件の検討

ヌクレオチド類の標準混合液（各 10 μM ）を用いて、抽出条件の最適化を行った。

(1) Fe(III)固定化 PFIDA 濃度の検討

本検討において、Fe(III)固定化 PFIDA 濃度が抽出に及ぼす影響について検討した (Fig. 3-3)。Fe(III)固定化 PFIDA 濃度を 0, 5, 10, 20, 30, 40, 及び 50 mM と変化させて抽出を行ったところ、試薬濃度が増加するにつれて、抽出率が増加する傾向にあった。本研究では、試薬の溶媒への溶解性を考慮し、50 mM を選択した。

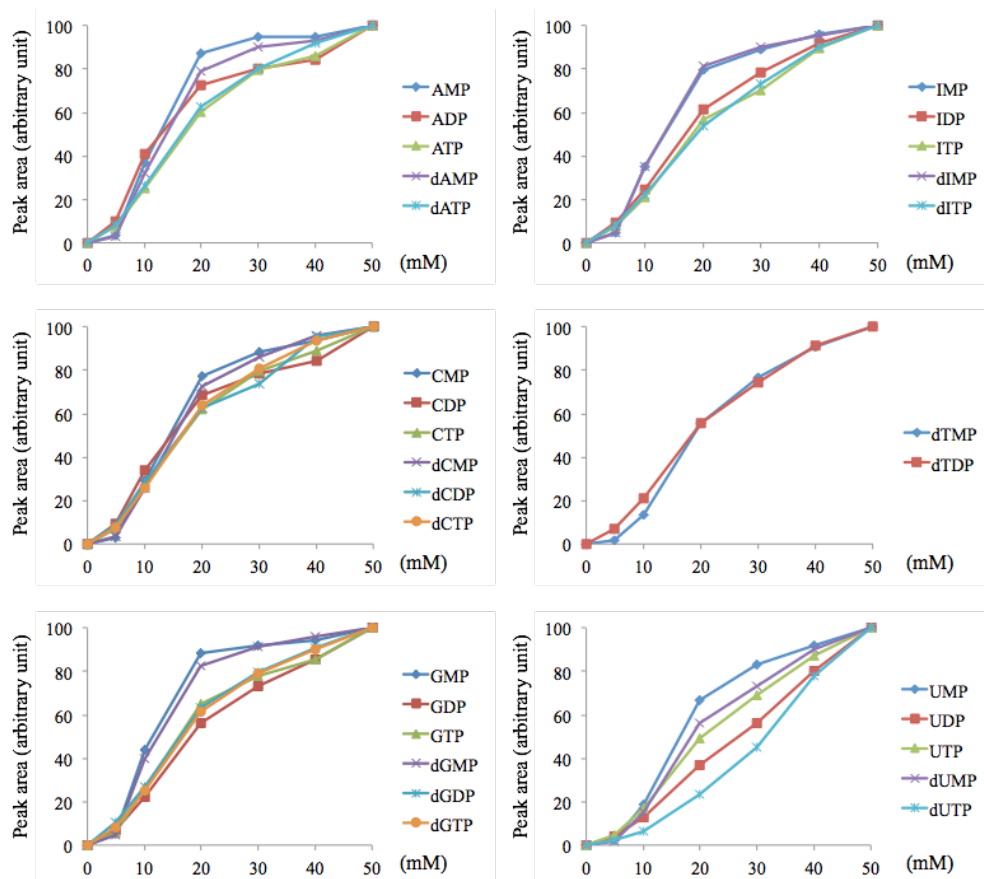


Fig. 3-3 Effect of the concentration of Fe(III)-immobilized PFIDA on the peak area of examined nucleotides.

(2) 抽出に用いる TFA 濃度の検討

ヌクレオチド類に選択的な抽出を行うべく、試料溶液に TFA を添加することとした。試料溶液に TFA を添加した場合、ヌクレオチド類に選択的な抽出が達成できたのに対し、TFA を添加しなかった場合、カルボン酸化合物といったその他の配位性化合物も抽出された。一方、試料溶液に添加する TFA 濃度が至適条件を超えた場合、ヌクレオチド類の抽出までもが妨害されることから、フルオラス溶媒への抽出時試料溶液に添加する TFA の至適濃度の検討を行った (Fig. 3-4)。0%から 0.6%の TFA を用いて回収率を確認したところ、0.2%で最もよい回収率を示し、それ以上の濃度では回収率が TFA の濃度依存的に低下したことから、本研究では、抽出に用いる TFA の濃度として、0.2%を選択した。

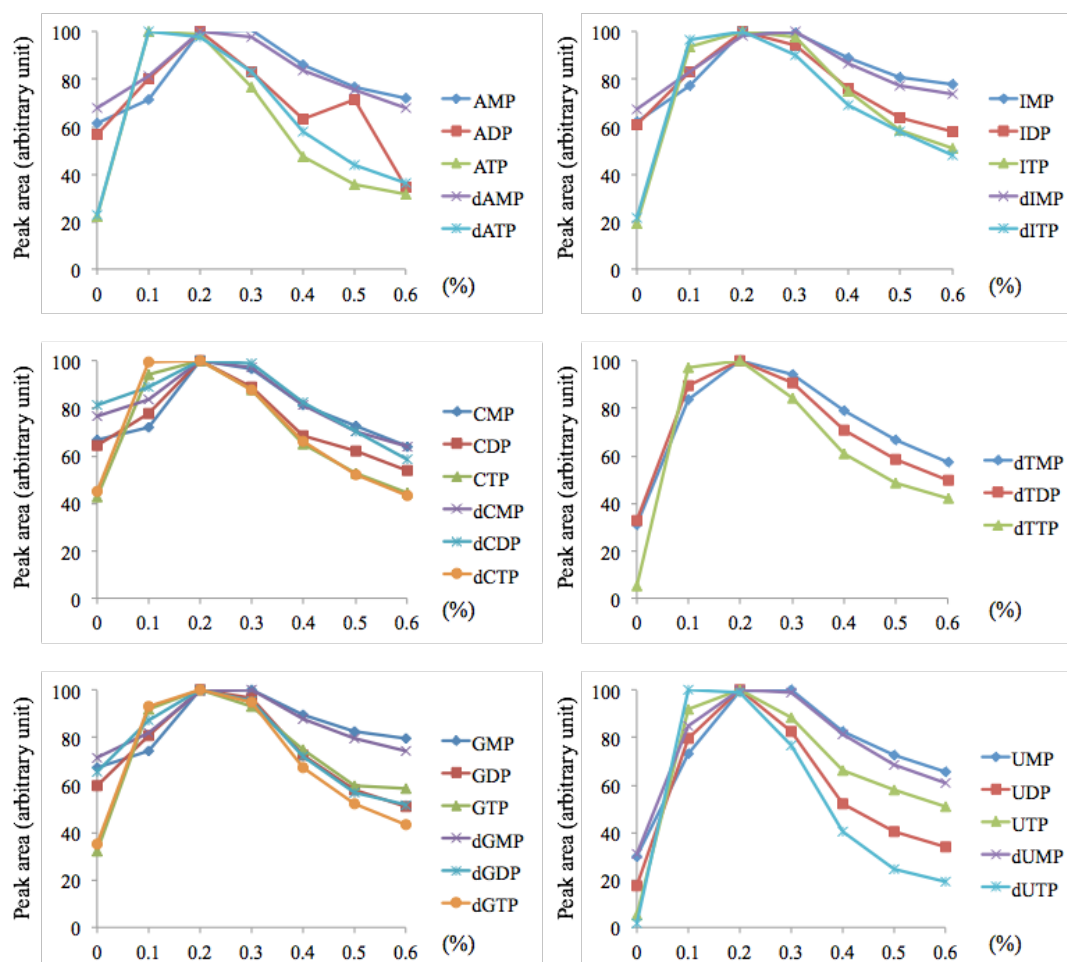


Fig. 3-4 Effect of the concentration of TFA in the extraction solvent.

5 バリデーション

標準品を用いて得られた検量線, 検出限界, 回収率及び繰り返し再現性を Table 3-2 に示す。対象としたヌクレオチド類の検量線は, 少なくとも 0.1 μM から 10 μM (0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 及び 10 μM) の範囲で良好な直線性 ($r \geq 0.9911$) を示した。さらに, 各濃度が 0.5, 1 及び 10 μM となるよう調製した標準混合液を用いて, 回収率及び繰り返し再現性を測定したところ, 回収率は 43.2% から 94.7% の範囲にあり, 良好な再現性 ($\text{RSD} \leq 6.6\%$) を得ることができた。また, $S/N = 3$ における検出限界は, 0.37 nM 以下であった。さらに, 本法を生体内カルボン酸類 (乳酸, オロチン酸, ケトグルタル酸, マロン酸, リンゴ酸, アコニット酸, クエン酸) に対して適用したところ, これらカルボン酸類の抽出率は, 8.3% 以下であったことから, 本法のヌクレオチド類への選択性が確認できた。

Table 3-2 MRM transitions and method validation data for target nucleotides in this study.

| | t_R (min) | LOD ^{a)} (nM) | LOQ ^{b)} (nM) | Linearity (<i>r</i>) | RSD ^{c)} (% , <i>n</i> = 3) | | | Mean recovery ^{e)} (% , <i>n</i> = 3) |
|------|----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------|------------|---|
| | | | | | 0.5 μ M | 1.0 μ M | 10 μ M | |
| dTMP | 6.0 | 0.90 | 3.0 | 0.9987 | 3.4 | 2.7 | 6.3 | 76.4 |
| dUMP | 6.9 | 3.8 | 13 | 0.9996 | 2.8 | 1.9 | 4.7 | 89.8 |
| dAMP | 7.3 | 0.37 | 1.2 | 0.9999 | 1.2 | 0.82 | 3.1 | 91.4 |
| AMP | 8.7 | 1.8 | 6.0 | 0.9997 | 3.8 | 3.3 | 2.3 | 69.9 |
| UMP | 9.2 | 22 | 72 | 0.9990 | 2.8 | 1.1 | 5.3 | 94.1 |
| dIMP | 9.5 | 4.6 | 15 | 0.9991 | 3.5 | 0.94 | 2.4 | 94.7 |
| dTDP | 9.7 | 0.81 | 2.7 | 0.9965 | 4.8 | 1.6 | 3.9 | 89.1 |
| dCMP | 10.8 | 5.5 | 18 | 0.9993 | 3.9 | 2.0 | 2.7 | 91.3 |
| IMP | 11.6 | 19 | 64 | 0.9995 | 2.2 | 14 | 3.6 | 77.9 |
| dGMP | 12.1 | 3.4 | 11 | 0.9991 | 3.7 | 5.5 | 1.9 | 88.9 |
| ADP | 12.8 | 9.2 | 30 | 0.9988 | 2.5 | 1.2 | 1.5 | 62.9 |
| CMP | 12.9 | 3.3 | 11 | 0.9993 | 2.1 | 6.5 | 3.0 | 68.8 |
| UDP | 13.2 | 4.1 | 14 | 0.9911 | 5.7 | 17 | 7.9 | 58.8 |
| dTTP | 13.3 | 4.8 | 16 | 0.9986 | 6.6 | 1.4 | 6.1 | 48.8 |
| GMP | 13.5 | 12 | 38 | 0.9967 | 6.6 | 5.3 | 3.4 | 74.1 |
| dCDP | 13.9 | 12 | 39 | 0.9979 | 1.0 | 6.4 | 4.8 | 87.1 |
| dATP | 13.9 | 6.7 | 22 | 0.9962 | 7.2 | 2.8 | 4.8 | 66.0 |

Table 3-2 (Continued)

| | t_R (min) | LOD ^{a)} (nM) | LOQ ^{b)} (nM) | Linearity ^{c)} (r) | RSD ^{d)} (% , $n = 3$) | | | Mean recovery ^{e)} (% , $n = 3$) |
|------|----------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-------------|------------|---|
| | | | | | 0.5 μ M | 1.0 μ M | 10 μ M | |
| dUTP | 14.0 | 3.9 | 13 | 0.9911 | 3.4 | 3.1 | 13 | 43.2 |
| IDP | 14.3 | 9.3 | 31 | 0.9990 | 4.7 | 0.91 | 3.9 | 75.3 |
| ATP | 14.6 | 14 | 45 | 0.9992 | 1.0 | 5.8 | 6.6 | 54.0 |
| dGDP | 14.6 | 2.9 | 9.4 | 0.9968 | 7.9 | 1.9 | 7.5 | 79.7 |
| CDP | 14.9 | 17 | 56 | 0.9992 | 4.8 | 3.2 | 7.5 | 62.8 |
| UTP | 15.1 | 17 | 57 | 0.9994 | 4.7 | 4.3 | 7.7 | 46.9 |
| dITP | 15.2 | 5.4 | 18 | 0.9989 | 9.9 | 6.6 | 7.6 | 58.3 |
| GDP | 15.6 | 22 | 71 | 0.9978 | 9.7 | 7.2 | 7.4 | 70.3 |
| dCTP | 15.6 | 7.4 | 24 | 0.9979 | 5.7 | 3.4 | 3.7 | 60.5 |
| ITP | 16.1 | 8.0 | 26 | 0.9989 | 4.2 | 8.4 | 2.0 | 50.9 |
| dGTP | 16.4 | 6.2 | 20 | 0.9983 | 1.4 | 1.7 | 3.2 | 68.2 |
| CTP | 16.7 | 9.8 | 32 | 0.9984 | 9.2 | 2.2 | 1.0 | 52.0 |
| GTP | 17.4 | 15 | 49 | 0.9987 | 17 | 6.6 | 1.2 | 66.5 |

- a) Limit of detection, defined as the sample concentration giving a signal-to-noise (S/N) ratio of 3.
- b) Limit of quantification, defined as the sample concentration giving a signal-to-noise (S/N) ratio of 10.
- c) Correlation coefficient of the calibration curve of nucleotides in the concentration range 0.1-10 μ M.
- d) Relative standard deviation of peak area of nucleotide.
- e) (Peak area obtained from after extraction / Peak area obtained from before extraction) $\times 100$

6 Jurkat 細胞試料中ヌクレオチド類の測定

(1) クロマトグラム

Jurkat 細胞試料中ヌクレオチド類を基準操作に従い抽出した後, LC-MS/MS 分析を行った。得られたクロマトグラムを Fig. 3-5 に示す。この結果から, 本法は細胞内ヌクレオチド類の抽出にも適用可能であることが示された。さらに, 得られた結果から定量値を算出することができ (Table 3-3), 細胞内には $0.0016 \sim 1.5 \text{ nmol}/10^6 \text{ cells}$ の範囲でヌクレオチド類が存在することが確認できた。

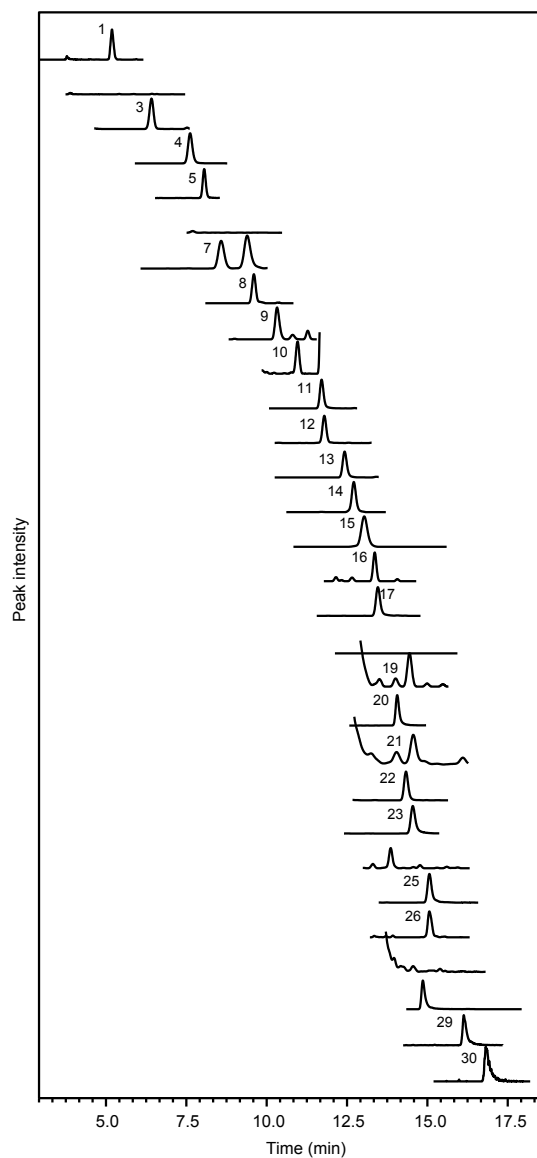


Fig. 3-5 Chromatograms obtained for Jurkat cell samples treated with this method.

Peaks 1-30; see Fig. 3-2.

Table 3-3 Determination results of nucleotides in Jurkat cells.

| | Concentration (nmol/10 ⁶ cells) | RSD ^{a)} (%, <i>n</i> = 3) |
|------|---|--|
| dTMP | 0.0016 | 8.9 |
| dUMP | < LOD ^{a)} | – |
| dAMP | 0.0028 | 3.4 |
| AMP | 0.14 | 1.0 |
| UMP | 0.046 | 4.1 |
| dIMP | < LOD ^{a)} | – |
| dTDP | 0.0038 | 3.9 |
| dCMP | < LOD ^{a)} | – |
| IMP | 0.017 | 2.5 |
| dGMP | < LOD ^{a)} | – |
| ADP | 0.35 | 5.3 |
| CMP | 0.061 | 1.0 |
| UDP | 0.12 | 1.8 |
| dTTP | 0.021 | 1.7 |
| GMP | 0.028 | 5.5 |
| dCDP | < LOD ^{a)} | – |
| dATP | 0.034 | 11 |
| dUTP | < LOD ^{a)} | – |
| IDP | < LOD ^{a)} | – |
| ATP | 1.5 | 4.4 |
| dGDP | 0.017 | 4.4 |
| CDP | 0.041 | 6.7 |
| UTP | 0.33 | 10 |
| dITP | < LOD ^{a)} | – |
| GDP | 0.074 | 11 |
| dCTP | 0.0085 | 7.3 |
| ITP | < LOD ^{a)} | – |
| dGTP | < LOD ^{a)} | – |
| CTP | 0.31 | 4.9 |
| GTP | 0.13 | 11 |

a) Limit of detection.

(2) アポトーシス誘導 Jurkat 細胞試料中ヌクレオチド類の定量

Jurkat 細胞に Anti-Fas 抗体を添加しアポトーシスを誘導させ、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。抗体未添加, 添加後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 及び 18 時間後のヌクレオチド類の定量結果を Fig. 3-6 に示す。この結果から, Anti-Fas 抗体添加 1 時間後において, 大部分のヌクレオチド類の細胞内濃度は増加し, その後時間経過ごとに減少していることが確認できた。

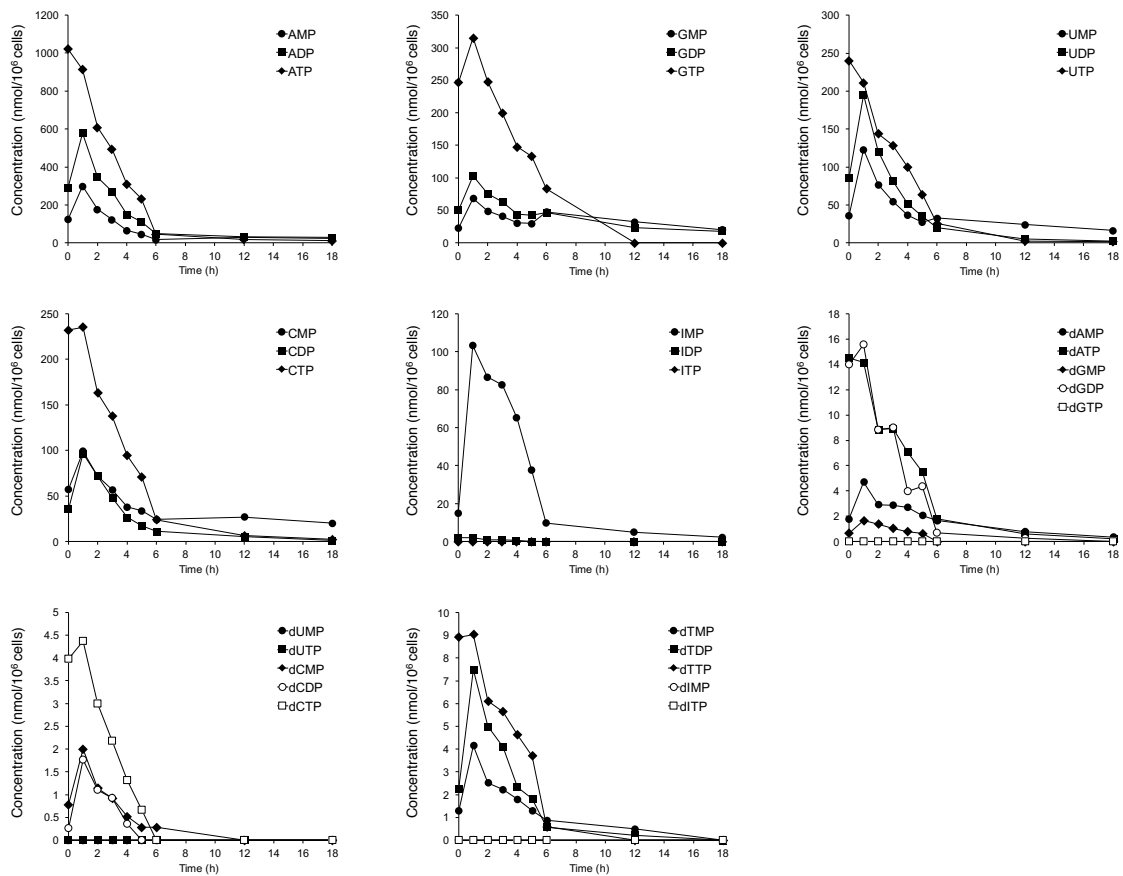
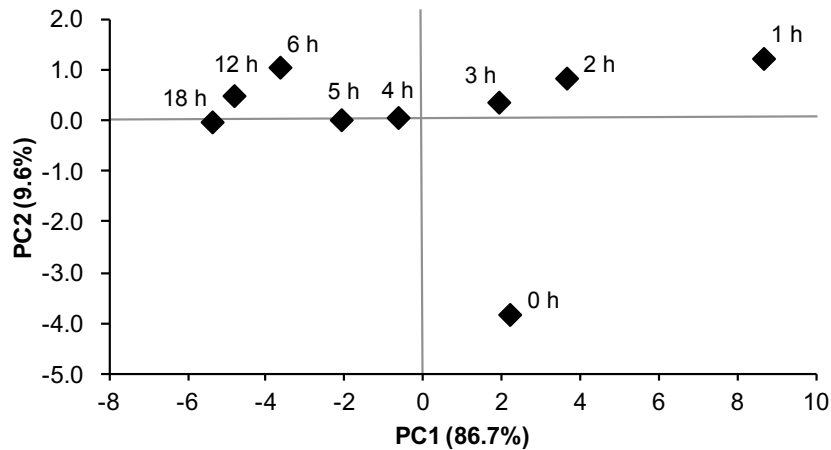


Fig. 3-6 Intracellular concentrations of nucleotides in apoptosis-induced Jurkat cells.

(3) 定量結果を用いた多変量解析

アポトーシス誘導細胞の変化を可視化すべく，得られた定量値に対して多変量解析（主成分分析; PCA）を施した。結果を Fig. 3-7 に示す。スコアプロットの結果から，Anti-Fas 抗体添加後のプロットは，未添加細胞のプロットと明確に区別することができた。さらに，薬剤の添加後時間経過ごとにプロットが左へとシフトする傾向を示した。また，ローディングプロットの結果から，これらの差異に関与しているヌクレオチド類を確認することができた。以上の結果から，細胞内ヌクレオチド濃度変化の観察は，アポトーシス進行度の可視化に有用であることが示唆された。

(A) スコアプロット



(B) ローディングプロット

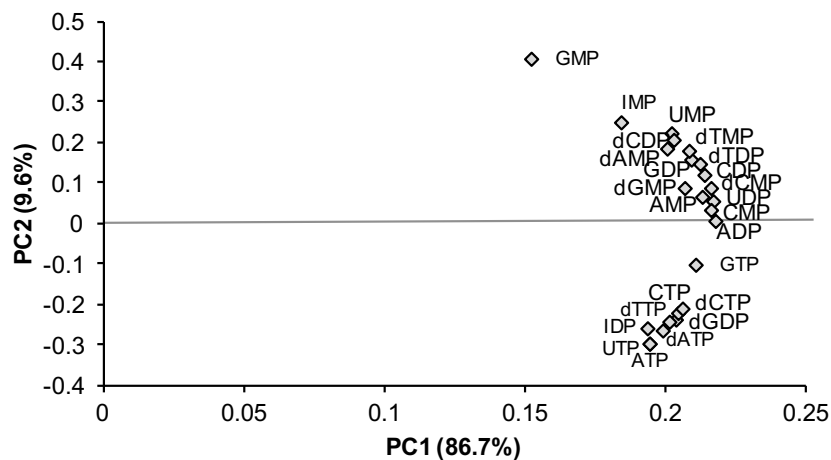


Fig. 3-7 The PCA (A) score plot and (B) loading plot obtained with of the quantitatively value of nucleotides in Jurkat cell.

7 小括

本研究において、フルオラス金属キレートアフィニティー法を用いたヌクレオチド類の選択的抽出法の開発を行った。本法によって選択的に抽出されたヌクレオチド類は、HILIC-MS/MS 分析において、塩基性移動相条件下で良好な分離を達成できた。さらに、本法は、細胞内ヌクレオチド濃度の定量にも有用であることが確認できた。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、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。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。

【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

本章では、フルオラス金属キレートアフィニティー法をリン酸化ペプチドの選択的抽出へと応用し、プロテインキナーゼ (Protein kinase; PK) 活性測定へと適用した。PK とは、ホルモンの刺激に応じて、ペプチドなどのタンパク質のリン酸化を触媒し、遺伝子発現や細胞増殖など、様々な細胞機能をコントロールする酵素である。さらに、PK の活性異常はがんに代表されるような様々な疾患の発症メカニズムに深く関与し、それら疾患の診断やマーカーとして有用であるとされている[61,62]。すなわち、PK 活性測定は臨床学的意義が極めて高い。今回、CyclicAMP-dependent protein kinase (PKA) 及びその基質ペプチドである Kemptide (NH₃-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-COOH)を用いて、本法の有用性の確認を行った (Fig. 4-1)。本法は、carboxytetramethylrhodamine (TAMRA, Fig. 4-2) 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、そのリン酸化体 (P-kemptide) のみを Fe(III)配位 PFIDA で捕捉し、フルオラス溶媒中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。本研究では、標準品を用いて PK 活性測定のための基盤整備を行った。

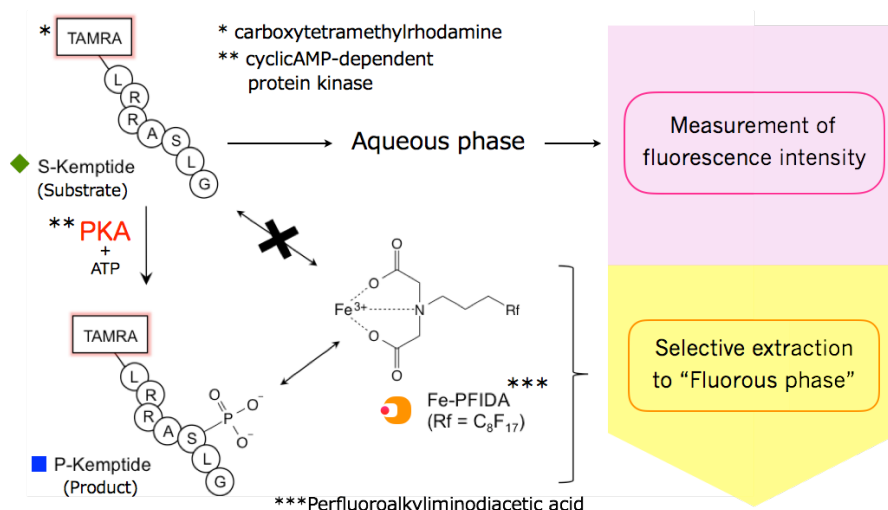


Fig. 4-1 The removing extraction method for P-Kemptide with Fe(III)-immobilized PFIDA by fluorine-assisted metal chelate affinity technique and measurement of protein kinase activity assay.

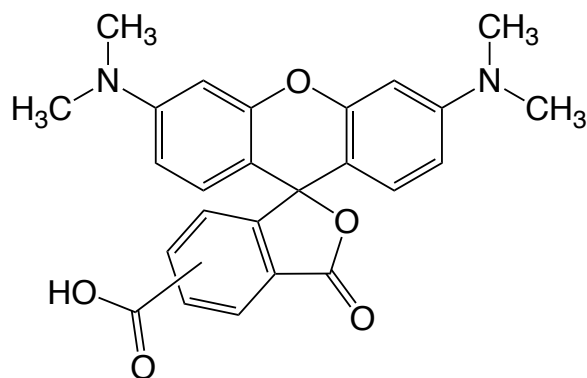


Fig. 4-2 The structure of TAMRA.

1 基準操作

(1) Fe(III)配位 PFIDA の調製

第3章 1-(1)に従って調製した。

(2) PKA 酵素反応

40 μ M S-Kemptide 75 μ L に、400 μ M ATP を含む PKA 溶液 (0-10 U/ μ L) 75 μ L を加え、30 $^{\circ}$ C で 2 時間放置した。得られた溶液を試料溶液として用いた。

(3) 抽出操作

試料溶液 30 μ L に、Fe(III)配位 PFIDA 溶液 (TDFH : TFO = 3 : 1, v/v) 20 μ L 及び 0.2% TF A を含むアセトニトリル 20 μ L を加え、室温で 10 分間振とうした。遠心分離 (17,500 \times g, 10 min) 後、上層 (非フルオラス層) の蛍光強度を測定した。

2 基礎検討

(1) Fe(III)配位 PFIDA 濃度の検討

Fe(III)配位 PFIDA の濃度が抽出に及ぼす影響について検討した (Fig. 4-3)。Fe(III)配位 PFIDA の濃度範囲を 0-50 mM とし, S-Kemptide 及び P-Kemptide の標準品 (各 40 μ M) に対してフルオラス金属キレートアフィニティー法を適用し, 上層 (非フルオラス層) の蛍光強度を測定した。Fe(III)配位 PFIDA を用いた場合, S-Kemptide では上層の蛍光強度に変化が見られなかったのに対し, P-Kemptide では試薬の濃度依存的に上層の蛍光強度が減少した。このことから, P-kemptide のみを選択的に抽出除去できたことが確認できた。また, 20 mM 以上で一定の抽出効率が得られたため, 抽出に用いる Fe(III)配位 PFIDA 濃度として 40 mM を選択した。

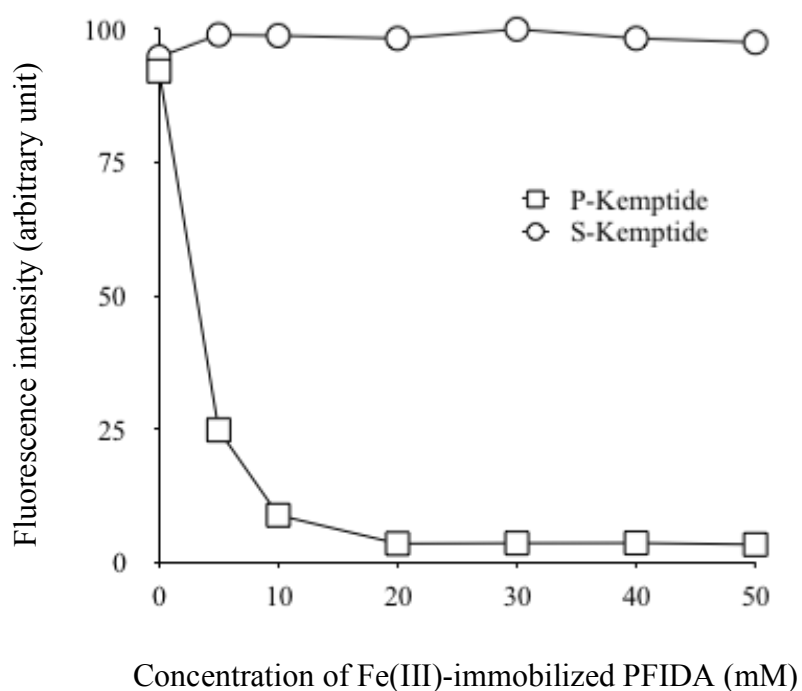


Fig. 4-3 Effect of the concentration of Fe(III)-immobilized PFIDA for extraction of P-Kemptide.

(2) TFA 濃度の検討

本検討において、TFA 濃度が抽出に及ぼす影響について検討した。TFA の濃度範囲を 0-0.6%とし、S-Kemptide 及び P-Kemptide の標準品 (各 40 μ M) に対する抽出を行い、上層 (非フルオラス層) の蛍光強度を測定した (Fig. 4-4)。この結果から、TFA 濃度が 0.2%以上では、S-Kemptide の抽出が行えず、P-Kemptide のみを選択的に抽出できたのに対し、TFA 濃度が 0.2%を下回ると P-Kemptide のみならず S-Kemptide もまた抽出された。一方、TFA 濃度が 0.3%以上になると P-kemptide の抽出が妨害されることが確認できたため、本研究では抽出に用いる TFA 濃度として 0.2%を選択した。

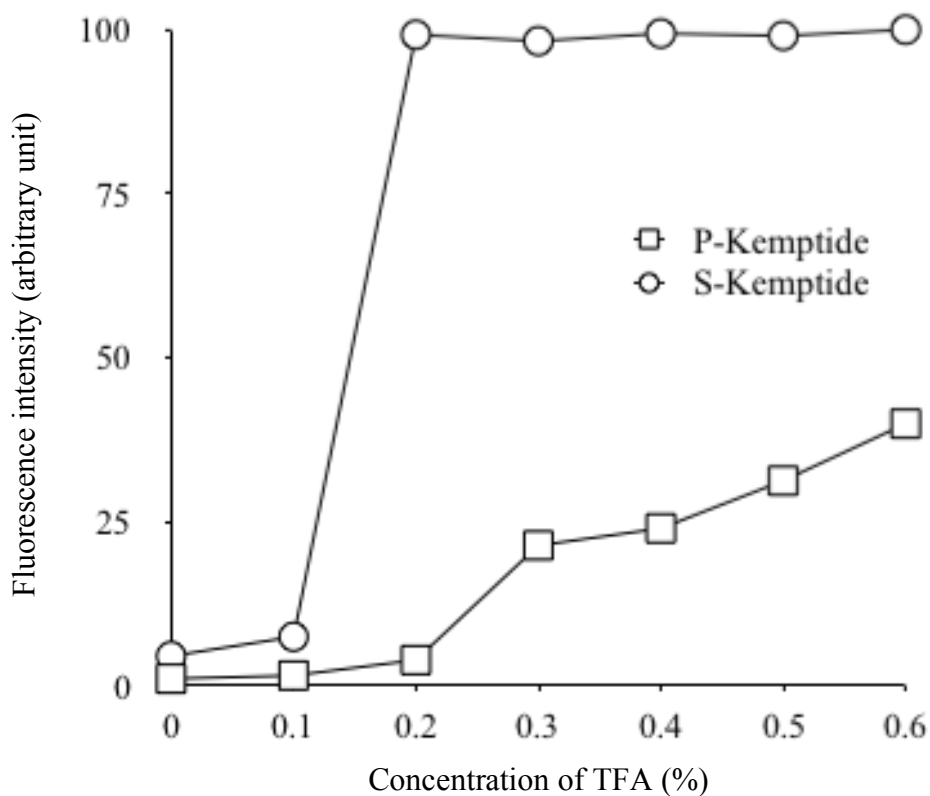


Fig. 4-4 Effects of the concentrations of TFA for selective removing extraction of P-Kemptide.

3 定量性の確認

本検討において、S-Kemptide 及び P-Kemptide の標準品を適当な比率 (S : P = 10:0-0:10) で混合し、本法を適用した。上層の蛍光強度を測定した結果を Fig. 4-5 に示す。本法により、P-Kemptide のみがフルオラス溶媒へと抽出除去されており、P-Kemptide の含有率依存的に上層の蛍光強度が減少することが確認できた。この結果から、本法によって P-Kemptide を定量的に抽出できることが示された。

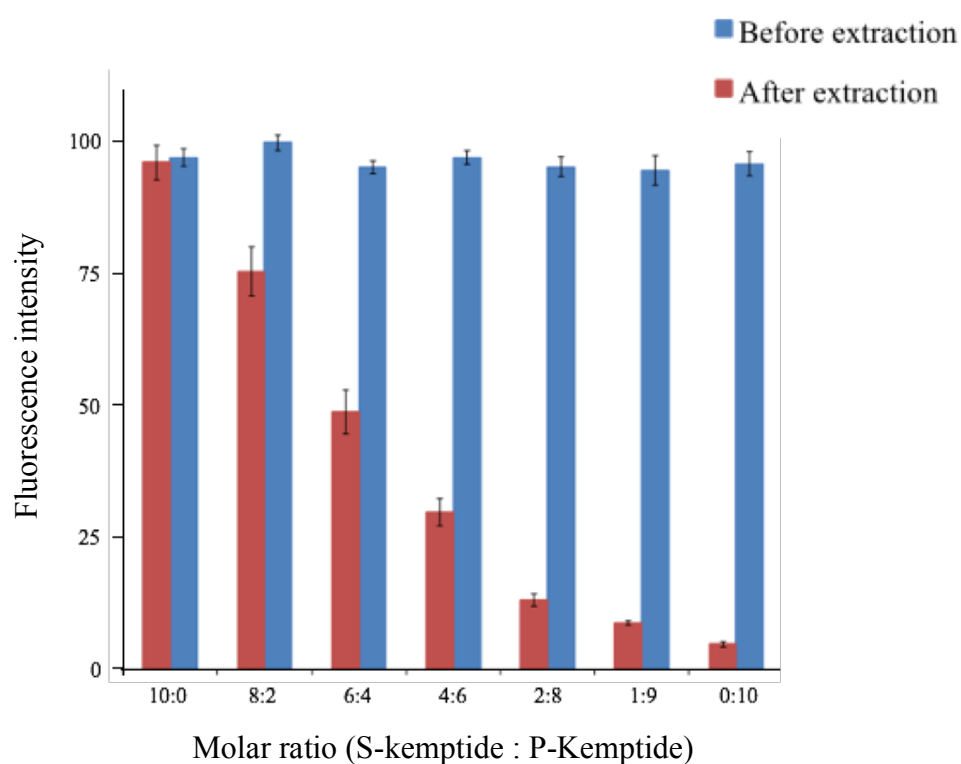


Fig. 4-5 The fluorescence intensity of the non-fluorous aqueous phase before and after fluoruous extraction.

4 PKA 活性測定への適用

一定濃度の S-Kemptide に対し、段階的な濃度となるように調製した PKA (0.1-10 U/ μ L) を加えてリン酸化を行った後、得られた反応溶液に本法を適用した。上層の蛍光強度を測定した結果を Fig. 4-6 (A)に示す。PKA の濃度上昇に伴い P-Kemptide が増加した分、上層に残存する S-Kemptide が減少した結果、上層の蛍光強度が減少したことが確認できた。さらに、抽出前後の蛍光強度比を PKA の濃度ごとにプロットした結果を Fig. 4-6 (B)に示す。この結果から、PKA の濃度依存的に上層の蛍光強度が減少していることが示された。以上より、非フルオラス層の蛍光強度の減少率が PKA 濃度 (活性化) に依存していることが確認でき、本法によって、PKA の活性を測定可能であることが示唆された。

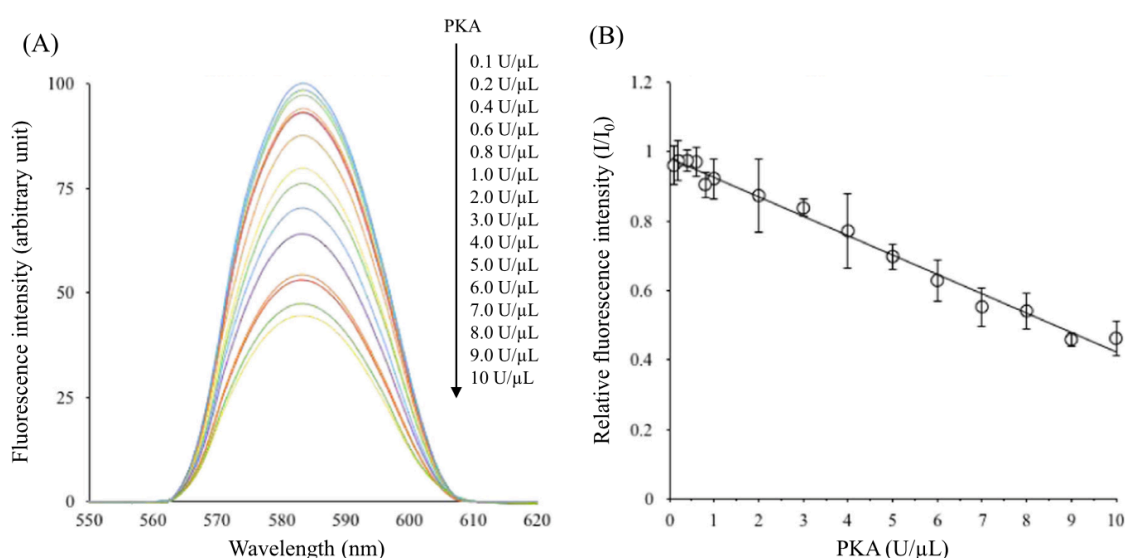


Fig. 4-6 (A) Fluorescence emission spectra of non-fluorous phases and (B) the relative fluorescence intensity changes at 585 nm obtained before (I_0) and after (I) fluorous extraction of enzymatic reaction solutions with different concentrations of PKA (0–10 U/ μ L).

5 小括

本研究では、第 3 章で開発したフルオラス金属キレートアフィニティー法をリン酸化ペプチドの抽出へと応用し、PK 活性測定へと適用した。本法により、リン酸化体である P-Kemptide のみがフルオラス溶媒へと抽出され、非リン酸化体である S-Kemptide は抽出されなかった。また、S-Kemptide に対し PKA 酵素反応を用いてリン酸化を行い、本法を適用した。その結果、PKA の濃度上昇に伴い P-Kemptide が増加した分、上層に残存する S-Kemptide が減少した結果、上層の蛍光強度が減少したことが確認できた。以上より、本法によって、PKA の活性を測定可能であることが示唆された。本法は、酵素阻害剤のスクリーニングなどへと応用可能であると考えられる。

【総括】

本研究では、フルオラスアフィニティーによる生体内リン酸化合物の選択的前処理法の開発及びその実試料への応用を行った。

第 1 章では、フルオラスイオンペア試薬を用いたリン酸化合物の選択的抽出法として、フルオラスイオンペア法の開発を行った。6 種のヌクレオチド類を対象に HFUA をイオンペア剤として基本条件を検討したところ、回収率は 70.4% から 96.8% の範囲にあり、直線性及び再現性も良好な値が得られた。さらに、乳がん細胞試料 (MCF-7 細胞及び MCF-10A 細胞) に本法を適用したところ、対象とするヌクレオチド類を抽出でき、LC にて夾雑成分の影響を受けることなく分析することができた。これらの結果から、本法の細胞試料中ヌクレオチド類抽出への有用性を確認することができた。

さらに、第 2 章では、フルオラスイオンペア抽出法をさらに発展させるべく、対象とするヌクレオチド類を 18 種へと拡張し、白血病細胞試料 (Jurkat 細胞, HL60 細胞及び MT-2 細胞) 中ヌクレオチド類の分析へと適用した。細胞試料を用いた場合の添加回収率は、43.8% から 138 の% 範囲にあり、良好な再現性を得ることができた。また、本法を用いて、3 種の細胞試料におけるヌクレオチド濃度を 24 時間ごとに 72 時間まで測定し、得られた定量値に対して多変量解析を施した。その結果、HL60 細胞・Jurkat 細胞群と MT-2 細胞群の 2 群間の差異を可視化することができた。以上の結果から、フルオラスイオンペア法を応用したヌクレオチド類解析によって、細胞種差の解析及び細胞種の判定に応用可能であることが示唆された。

第 3 章では、リン酸化合物への選択性をさらに向上させた抽出法を開発すべく、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フルオラス金属キレートアフィニティー法の開発を行った。本法をヌクレオチド類 30 種の抽出へと適用したところ、本法における回収率は 43.2% から 94.7% の範囲にあり、直線性及び再現性においても良好な値を得ることができた。一方、リン酸化合物と同様に金属配位性を持つカルボン酸類に対して本法を適用したところ、その回収率は 8.3% 以下であり、本法のリン酸化合物への選択性が確認できた。また、本法を白血病細胞である Jurkat 細胞中ヌクレオチド類の抽出へと適用したところ、細胞試料中ヌクレオチド類を再現性よく抽出・定量することができた。

さらに、Anti-Fas 抗体によってアポトーシスを誘導した Jurkat 細胞において、本法を用いて時間経過ごとの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。以上の結果から、本法はヌクレオチド類の選択的抽出及び解析において非常に有用であることが確認できた。

第 4 章では、第 3 章で開発したフルオラス金属キレートアフィニティー法をリン酸化ペプチドの抽出へと応用し、PK 活性測定に適用した。その結果、非リン酸化体 (S-Kemptide) とリン酸化体 (P-Kemptide) の混合液から、P-Kemptide のみがフルオラス溶媒へと抽出されたことから、P-Kemptide への選択性が確認できた。また、S-Kemptide に対し PKA 酵素反応を用いてリン酸化を行い、本法を適用し得られた非フルオラス層の蛍光強度を測定した。その結果、PKA の濃度上昇に伴い P-Kemptide が増加した分、非フルオラス層に残存する S-Kemptide が減少したことから、非フルオラス層の蛍光強度が減少したことが確認できた。以上より、本法によって PKA の活性を測定可能であることが示唆された。

以上の研究結果から、本研究で開発されたフルオラスアフィニティーによる生体内リン酸化合物の選択的抽出法は、測定対象物質の構造情報を変えることなく、高い選択性が得られる画期的な前処理法であると言える。本研究が、臨床検査や生体機能解析などの関連分野の発展に寄与し、医療の前進及び社会の健康に大きく貢献してくれることを期待する。

【実験の部】

各章に共通の事項

(1) 水(精製水)

水道水をElix-3 UV 純粋製造装置(Millipore 製)及びMilli-Q Gradient-A 10超純水製造装置(Millipore 製)により精製して使用した。

(2) ガラス器具

SCAT 20X-PF(Nacalai tesque 製)で洗浄後、市販の硝酸(60% (v/v), $d = 1.38$) を水で2倍希釈した液に少なくとも一晩浸し、浄水及び精製水で洗浄し、乾燥して使用した。

(3) 試薬

特記しない限り、市販の特級品をそのまま使用。試薬溶液は特記しない限り、常法に従って調製して使用した。

(4) 機器

- ・ 反応恒温槽: Genius Dry Bath Incubator, Major Science 製
- ・ 遠心分離機: Kubota1720及び6200, Kubota 製

(5) 移動相

水は精製水を使用。メタノール、アセトニトリルはKanto chemical 製のHPLC用を使用した。炭酸水素アンモニウムはSigma-Aldrich 製のLC/MS 用を使用した。炭酸アンモニウム、ギ酸アンモニウム、酢酸、酢酸ナトリウム及び TFA は Kanto chemical 製、TFE は Tokyo chemical industry 製の特級品を使用した。

(6) 装置

LC/UV 装置 (第1章及び第2章)

- ・ システムコントローラー: CBM-20A, Shimadzu 製
- ・ 低圧グラジエントユニット付きポンプ: NexeraX2 LC-30AD, Shimadzu 製
- ・ デガッサ: DGU-20A5R, Shimadzu 製

- ・ オートサンプラー: NexeraX2 SIL-30AC, Shimadzu 製
- ・ カラムオーブン: CTO-20A, Shimadzu 製
- ・ UV 検出器: SPD-20A, Shimadzu 製
- ・ 解析ソフト: Labsolutions, Shimadzu 製

HILIC-MS/MS 装置 (第3章)

- ・ システムコントローラー: CBM-20A, Shimadzu 製
- ・ 低圧グラジエントユニット付きポンプ: NexeraX2 LC-30AD, Shimadzu 製
- ・ デガッサ: DGU-20A5R, Shimadzu 製
- ・ オートサンプラー: NexeraX2 SIL-30AC, Shimadzu 製
- ・ カラムオーブン: CTO-20A, Shimadzu 製
- ・ 質量分析計: LC-8050, Shimadzu 製
- ・ 解析ソフト: Labsolutions LCMS, Shimadzu 製

蛍光分光光度計 (第4章)

- ・ Nanodrop 3300 fluorescence spectrometer, Thermo 製

励起光には、白色LEDを利用し、蛍光波長は585 nmに設定した。

第1章及び第2章に関する実験

(1) ヌクレオチド類標準液

ポリプロピレンチューブ (1.5 mL) に精製水で10 mMに調製したヌクレオチド類及び6-Cl-PuDP (いずれもSigma-Aldrich 製) の標準液を目的の濃度に精製水で希釈し使用した。また、調製後の溶液は使用する直前まで冷蔵保存した。

(2) 40 mM HFUA

HFUAはSigma-Aldrich 製 を使用し使用する直前にCH₃OHを用いて調製した。

(3) 抽出用フルオラス溶媒

TDFH及びTFO (いずれもSigma-Aldrich 製) を3 : 1の割合で混合したものを使用した。

(4) 逆抽出用水溶液

30%アンモニア水 (Kanto chemical 製) を使用直前に70%アセトニトリル水溶液を用いて1%に希釈して使用した。

(5) 乳がん細胞試料

MCF-7 と MCF-10A 細胞は, American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)から購入した。MCF-7細胞は, 1% Penicillin-Streptomycin-Neomycin Antibiotic Mixture (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) と10% heatinactivated fetal bovine serum (FBS) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan) を含むDulbecco's Modified Eagle Medium中で培養された。MCF-10A細胞は, ATCCの説明書に従い, SingleQuots Kit (Lonza, Walkersville, MD, USA)を用いて Mammary Epithelium Basal Medium (MEBM) 中で培養された。どちらの細胞も37°C (5% CO₂) 条件下で培養された。培養したMCF-7 とMCF-10A細胞を15 mLのチューブに 1.0×10^6 個になるよう分取し, 得られた細胞ペレットに対し, 生理食塩水を加えて細胞を洗浄した。3回洗浄後, 氷冷メタノールを加えて1分間振とうし, 次に氷冷水を加えてさらに30秒振とうした。遠心分離後 (17,500 × g, 10 min, 4°C), 得られた上清のうち100 μLを試料溶液とした。

(6) 白血病細胞試料

白血病細胞には, HTLV-1非感染性の急性全骨髄性白血病細胞株であるHL60, HTLV-1非感染性の急性リンパ性白血病細胞株であるJurkat 細胞及びHTLV-1感染性の成人T細胞性白血病細胞株MT-1を用いた。細胞は, 37°C (5% CO₂) 条件下において100 U/mL penicillin-streptomycin-glutamine mixed solution (Nacalai 製) と10% heat-inactivated foetal calf serumとを添加したRPMI-1640 medium中で培養された。培養した細胞を15 mLのチューブに 1.0×10^6 個になるよう分取し, 得られた細胞ペレットに対し, Phosphate buffered saline (PBS) を1 mL加えて細胞を洗浄。2回洗浄後, 0.2%のTFAを含む氷冷メタノールを加えて1分間震とうし, 次に氷冷水を加えてさらに1分間震とう。遠心分離後 (17,500 × g, 10 min), 得られた上清のうち400 μLを試料溶液とした。

第3章に関する実験

(1) ヌクレオチド類標準液

ポリプロピレンチューブ (1.5 mL) に、精製水で10 mMに調製したヌクレオチド類 (Sigma-Aldrich 製) の標準液を目的の濃度に精製水を用いて希釈し使用した。また、調製後の溶液は使用する直前まで冷蔵保存した。

(2) PFIDA

ポリプロピレンチューブ (1.5 mL) に、HFUA 472 μ L (1.5 mmol) を取り、DMF 5 mL, *N,N*-diisopropyl ethylamine 465 μ L (3.6 mmol) , benzyl bromoacetate 570 μ L (3.6 mmol) 及びヨウ化ナトリウムを加えて、40°Cで混ぜながら20 時間放置した。次に、精製水5 mLを加え、生成物を*n*-hexane (10 mL \times 3) 中へと抽出した。この有機層に硫酸マグネシウムを加えて脱水し、ろ過した後、減圧気流下で蒸発乾固した。残渣を tetrahydrofuran (THF) を用いて再溶解し、約200 mgの水酸化ナトリウム及び少量の精製水を加え、40°Cで混ぜながら1日放置した。さらに、25 mL THFと5 mL精製水を加えて50 mL *n*-hexaneで3回洗浄した。この水層を1 M塩酸で中和し、diethyl ether (50 mL \times 3) 中へと抽出した。この抽出液に硫酸マグネシウムを加えて脱水し、ろ過した後、減圧気流下で蒸発乾固し、PFIDAとして用いた。[Yield: 0.4575 g (62.7%). $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): δ 1.95 (m, 2H), 2.33 (m, 2H), 3.18 (m, 2H), 3.86 (s, 4H).]抽出に使用する際は、ポリプロピレンチューブ (1.5 mL) に PFIDAをとり、TDFH及びTFO (いずれもSigma-Aldrich 製) を3 : 1の割合で混合した溶液を用いて、20 mMになるように調製して使用した。また、調製後の溶液は使用する直前まで冷蔵保存した。

(3) 白血病細胞

白血病細胞には、慢性骨髄性白血病細胞株である Jurkat 細胞を用いた。細胞は、37°C (5% CO_2) 条件下において 100 U/mL penicillin-streptomycin-glutamine mixed solution (Nacalai 製) と 10% heat-inactivated foetal calf serum とを添加した RPMI-1640 medium 中で培養された。培養した細胞を 15 mL のチューブに 1.0×10^6 個になるよう分取し、得られた細胞ペレットに対し、PBS を 1 mL 加えて細胞を洗浄した。2 回洗浄後、0.2%の TFA を含む氷冷メタノールを加えて 1 分間振とうし、次に氷冷水を加えてさらに 1 分間振とうした。遠心分離後 (17,500 \times g, 10 min), 得られた上清のうち 400 μ L を試料溶液とした。

(4) 逆抽出用水溶液

30%アンモニア水（Kanto chemical 製）を使用直前に70%アセトニトリル水溶液を用いて1%に希釈して使用した。

第4章に関する実験

(1) Kemptide標準液

ポリプロピレンチューブ（1.5 mL）に，精製水で10 mMに調製したS-Kemptide及びP-Kemptideの標準液（いずれもSigma-Aldrich 製）をPK bufferで目的の濃度に希釈して使用した。また，調製後の溶液は使用する直前まで冷蔵保存した。

(2) 40 mM PFIDA

第3章と同様に調製した。

(3) Fe(III)固定化

第3章と同様に調製した。

【参考文献】

- [1] J. A. Gladysz, D. P. Curran, I. T. Eds. Horváth, *Handbook of Fluorous Chemistry*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004.
- [2] K. Uneyama, *Organofluorine Chemistry*, Blackwell Publishing: Oxford, U.K., 2006.
- [3] T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24** (2010) 2868-2874.
- [4] T. Hayama, Y. Sakaguchi, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, *Anal. Chem.* **84** (2012) 8407-8414.
- [5] Y. Sakaguchi, T. Hayama, H. Yoshida, M. Itoyama, K. Todoroki, M. Yamaguchi, H. Nohta, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28** (2014) 2481-2489.
- [6] M. Zhao, C. Deng, *Proteomics* **16** (2016) 1051-1058.
- [7] W. Yuan, Y. Zhang, Y. Xiong, T. Tao, Y. Wang, J. Yao, L. Zhang, Gu. Yan, H. Bao, H. Lu, *Anal. Chem.* **89** (2017) 3093-3100.
- [8] S. M. Brittain, S. B. Ficarro, A. Brock, E. C. Peter, *Nat. Biotechnol.* **23** (2005) 463-468.
- [9] E. P. Go, W. Uritboonthai, J. V. Apon, S. A. Trauger, A. Nordstrom, G. O'Maille, S. M. Brittain, E. C. Peters, G. Siuzdak, *J Proteome Res.* **6** (2007) 1492-1499.
- [10] J. K. Kim, J. R. Lee, J. W. Kang, S.J. Lee, G. C. Shin, W. S. Yeo, K. H. Kim, H. S. Park, K. P. Kim, *Anal Chem.* **83** (2011) 157-163.
- [11] E. Tamashima, T. Hayama, H. Yoshida, O. Imakyure, M. Yamaguchi, H. Nohta, *J Pharm Biomed Anal.* **115** (2015) 201-207.
- [12] D. P. Curran, *Science* **321** (2008) 1645-1646.
- [13] W. Zhang, *Chem. Rev.* **109** (2009) 749-795.

- [14] T. Hayama, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 151-160.
- [15] L. Li, J. Jiao, Y. Cai, Y. Zhang, H. Lu, *Anal Chem.* **87** (2015) 5125-5131.
- [16] M. S. Yu, D. P. Curran, T. Nagashima, *Org Lett.* **7** (2005) 3677-3680.
- [17] Q. Chu, M. S. Yu, D. P. Curran, *Tetrahedron.* **63** (2007) 9890-9895.
- [18] V. Bailey, D. Clark, A. Routledge, *J. Fluor. Chem.* **131** (2010) 691-697.
- [19] T. Qian, Z. Cai, M.S. Yang, *Anal. Biochem.* **325** (2004) 77-84.
- [20] S. Yang, M. Sadilek, R. E. Synovec, M. E. Lidstrom, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3280-3289.
- [21] I. J. del Val, S. Kyriakopoulos, K. M. Polizzi, C. Kontoravdi, *Anal. Biochem.* **443** (2013) 172-180.
- [22] J. Klawitter, V. Schmitz, J. Klawitter, D. Leibfritz, U. Christians, *Anal. Biochem.* **365** (2007) 230-239.
- [23] J. Czarnecka, M. Cieslak, K. Michal, *J. Chromatogr. B* **822** (2005) 85-90.
- [24] S. Cohen, M. Megherbi, L. P. Jordheim, I. Lefebvre, C. Perigaud, C. Dumontet, J. Guitton, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 3831-3840.
- [25] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, *Proteomics* **4** (2004) 1633-1649.
- [26] M. K. Tarrant, P.A. Cole, *Annu. Rev. Biochem.* **78** (2009) 797-825.
- [27] S. Kane, H. Sano, S. C. Liu, J. M. Asara, W. S. Lane, C. C. Garner, G. E. Lienhard, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 22115-22118.
- [28] J. R. Sportsman, E.A. Gaudet, A. Boge, *Assay. Drug. Dev. Technol.* **2** (2004) 205-214.

- [29] M. D. Shults, K.A. Janes, D.A. Lauffenburger, B. Imperiall, *Nat. Methods* **2** (2005) 277-284.
- [30] C. J. Hastie, H.J. McLauchlan, P. Cohen, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 968-971.
- [31] Z. Wang, R. Levy, D. G. Fernig, M. Brust, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 2214-2215.
- [32] T. P. Begley, C. Kinsland, R. A. Mehl, A. Osterman, P. Dorrestein, *Vitam. Horm.* **61** (2001) 103-119.
- [33] F. I. Ataulakhanov, V. M. Vitvitsky, *Biosci. Rep.* **22** (2002) 501-511.
- [34] C. von Ballmoos, J. Brunner, P. Dimroth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 11239-11244. T. Hayama, H. Yoshida, M. Yamaguchi, H. Nohta, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **101** (2014) 151-160.
- [35] J. Sebestik, J. Hlavacek, I. Stibor, *Curr. Protein Pept. Sci.* **6** (2005) 133-142.
- [36] S. H. Francis, J. D. Corbin, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **36** (1999) 275-328.
- [37] S. J. Ashcroft, *Adv. Exp. Med. Biol.* **426** (1997) 73-80.
- [38] P. R. Brown, C. S. Robb, S. E. Geldart, *J. Chromatogr. A* **965** (2002) 163-173.
- [39] I. Yang, I. Y. Park, S. M. Jang, L. H. Shi, H. K. Ku, S. R. Park, *Nucleic Acids Res.* **34** (2006) e61.
- [40] C. Pan, M. Ye, Y. Liu, S. Feng, X. Jiang, G. Han, J. Zhu, H. Zou, *J. Proteome Res.* **5** (2006) 3114-3124.
- [41] Y. C. Li, Y. S. Lin, P. J. Tsai, C. T. Chen, W. Y. Chen, Y. C. Chen, *Anal. Chem.* **79** (2007) 7519-7525.
- [42] R. L. Cordell, S. J. Hill, C. A. Ortori, D. A. Barrett, *J. Chromatogr. B* **871** (2008) 115-124.

- [43] R. M. Seifar, C. Ras, J. C. van Dam, W. M. van Gulik, J. J. Heijnen, W. A. van Winden, *Anal. Biochem.* **388** (2009) 213-219.
- [44] K. Nakajima, S. Kitazume, T. Angata, R. Fujinawa, K. Ohtsubo, E. Miyoshi, N. Taniguchi, *Glycobiology* **20** (2010) 865-871.
- [45] N. Tomiya, E. Ailor, S. M. Lawrence, M. J. Betenbaugh, Y. C. Lee, *Anal. Biochem.* **293** (2001) 129-137.
- [46] J. B. Ritter, Y. Genzel, U. Reichl, *J. Chromatogr. B* **843** (2006) 216-226.
- [47] J. Xing, A. Apedo, A. Tymiak, N. Zhao, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18** (2004) 1599-1606.
- [48] J. Wang, T. Lin, J. Lai, Z. Cai, M. S. Yang, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 2019-2024.
- [49] J. Zhang, Q. G. Wang, B. Kleintop, T. Raglione, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **98** (2014) 247-252.
- [50] R. Tuytten, F. Lemiére, W.V. Dongen, E. L. Esmans, H. Slegers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16** (2002) 1205-1215.
- [51] R. L. Claire III, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14** (2000) 1625-1634.
- [52] M. Pabst, J. Grass, R. Fischl, R. Léonard, C. Jin, G. Hinterkörner, N. Borth, F. Altmann, *Anal. Chem.* **82** (2010) 9782-9788.
- [53] G. S. Philibert, S. V. Olesik, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 8222-8230.
- [54] D. Carcia-Gomez, E. Rodriguez-Gonzalo, R. Carabias-Martinez, *Trends Analyt. Chem.* **47** (2013) 111-128.
- [55] M. Mateos-Vivas, E. Rodríguez-Gonzalo, D. García-Gómez, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A* **1414** (2015) 129-137.
- [56] M. Mann, O. N. Jensen, *Nat. Biotechnol.* **21** (2003) 255-261.

[57] Y. L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** (2010) 666-672.

[58] P. B. Jensen, T. Hunter, *Nature* **411** (2001) 355-365.

[59] P. Tan, C. Lei, X. Liu, M. Qing, Z. Nie, M. Guo, Y. Huang, S. Yao, *Anal. Chim. Acta* **780** (2013) 89-94.

[60] B. Li, X. Shi, W. Gu, K. Zhao, N. Chen, Y. Xian, *Analyst* **138** (2013) 7212-7217.

【謝辞】

本研究は、福岡大学薬学部薬品分析学教室 能田 均 教授の始終変わらざる温かいご指導，ご鞭撻のもとに行われました。謹んで感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり，始終ご懇篤なご指導，激励を賜りました同教室 山口政俊 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり，丁寧かつ熱心なご指導を賜りました同教室 吉田秀幸 准教授に深謝致します。

本研究に際し，ご多忙の中，非常に多くのご助言とご指導を頂きました福岡大学薬学部機器分析学教室 巴山 忠 准教授に深く感謝申し上げます。

本研究にて，数多くの討論に御参加頂き，多くの有益なご助言とご協力を賜りました福岡大学薬学部薬品分析学教室 古賀鈴依子 助教，福岡大学薬学部機器分析学教室 糸山美紀 助教に深く感謝致します。

また，細胞試料をご提供いただきました福岡大学薬学部生化学教室 小迫知弘 准教授，相川晃慶 助教に謹んで感謝致します。

本研究において，惜しめないご協力を頂きました福岡大学薬品分析学教室 梶山彩乃，久保田桃子，竹下阿紗子，田坂友里恵，濱岡祐司の諸氏，ならびに数々の討論にご参加頂きました同教室卒業生 坂口洋平 博士（現・独立行政法人産業技術総合研究所），玉嶋江莉奈 博士（現・株式会社東京化成工業），そして特別実習生の皆様に感謝致します。

そして，これまでの大学院生活の支えとなった友人達，並びにお世話になった全ての方々に感謝の意を表します。

最後になりましたが，私に修学の機会を与えてくれ，厳しくも温かく見守って下さいました家族に心より感謝申し上げます。