

## 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

清川 恵奈

福岡大学薬学部薬品分析学教室 〒814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

**Selective pretreatment methods for biological phosphate-containing compounds based on fluorous affinity****Ena Kiyokawa**Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Johnan, Fukuoka 814-0180, Japan**Abstract**

Phosphate-containing compounds are involved in biological systems such as production of energy. Thus, selective and sensitive analysis methods are highly required to clarify their functions in our body. However, it's difficult to extract phosphate-containing compounds selectively because of their various properties. Therefore, fluorous affinity was used for selective pretreatment to extract phosphate-containing compounds from biological samples. In this study, we have developed some methods for selective extraction of phosphate-containing compounds by fluorous affinity in conjunction with 'ion-pair' and 'metal chelate affinity'. These methods were applied to extract nucleotides and a phosphopeptide. We believe that these methods are useful and helpful for analyzing variety of phosphate-containing compounds.

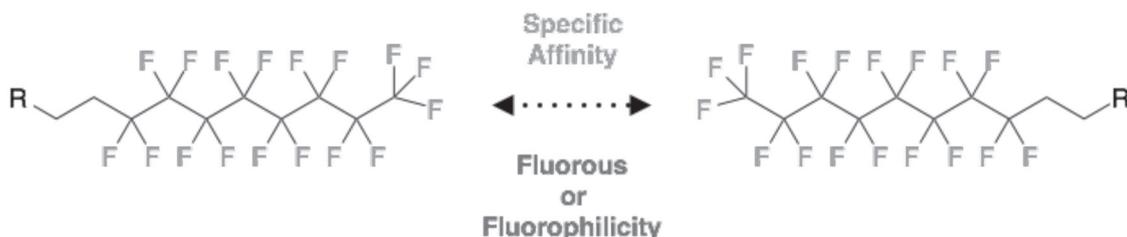
**keywords** : Selective pretreatment, Biological phosphate-containing compounds, Fluorous affinity, Ion-pair, Metal chelate affinity

**【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的な前処理・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を対象とした有用性の高い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。

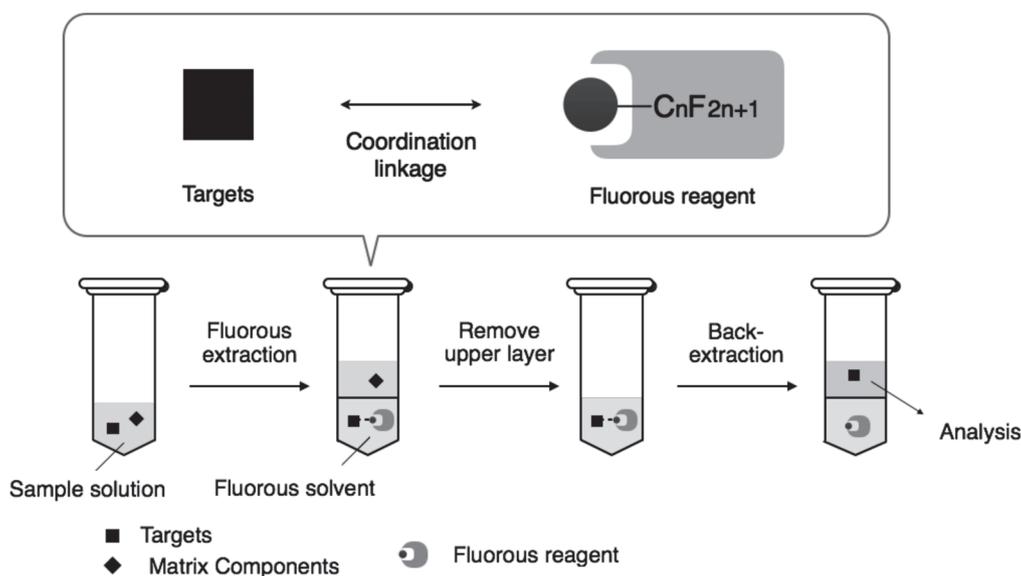
フルオラスアフィニティーとは、多数のフッ素が結合したアルキル基（パーフルオロアルキル基）同士が示す特異的な親和性のことを指す (Fig. 1)。パーフルオロアルキル化合物（フルオラス化合物）同士は極性に依存せず強い親和性を示すが、非フルオラス化合物とは親和性を持たない。よって、フルオラス化合物は、水とも有機溶媒とも混合せず、それら同士で特異的に引き合い、その他の物質から分離するという特徴をもつ [1,2]。これまで、このフルオラスの特異的な性質を分析学的領域で利用するために「フルオラス誘導体化法」が用いられてきた [3-11]。この方法は、反応性官能基を持つフルオラス化合物を誘導体化試薬として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



**Fig.1** Fluorous interaction

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前処理法の構築を試みた。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、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 [15-17]。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、それらに対する選択的前処理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 [18-27] が、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より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極めて選択的な前処理を行うべく、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。一方、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、可逆的な反応のみを用いることで、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。本法の原理は、対象とするリン酸化合物とイオン



**Fig.2** Selective extraction method with a specific partitioning technique of fluorous *via* non-covalent interaction.

ペアを形成する化合物，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し，その後逆抽出の操作によって選択的な抽出を行うことに基づく (Fig. 2)。本抽出法により，リン酸化合物が選択的に捕捉され，分析の妨害となる夾雑成分から効率よく精製することができる。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章及び第2章では，生体内リン酸化合物のうち，ヌクレオチド類を対象とした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。第3章では，さらにリン酸化合物への選択性を指向した抽出法として，フルオラス金属キレートアフィニティー法の開発を行い，細胞内ヌクレオチド類の抽出へと適用した。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 [28-31] としての有用性について検証を行った。

### 【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

<目的>

本研究では，可逆的な反応を介してフルオラスの特異性を利用し，ヌクレオチド類の選択的な抽出を達成すべく，フルオラスイオンペア法の開発を行った。これまでに，イオンペア抽出法にフルオラスの特異性を組み合わせた方法論をヌクレオチド類の抽出法へと適用した例はない。本法の原理は，負の電荷を示すリン酸化合物と対の電荷を示すフルオラス試薬とのイオンペアをフルオラス溶媒中へと選択的に抽出し，その他夾雑成分と分離した後，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。本研究では，パーフルオロアルキルアミン試薬である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. 3)。HFUAとヌクレオチド間で形成するイオンペア体はフルオラス溶媒中へと選択的に抽出される。一方，フルオラス溶媒は疎水・疎油性であることから，そのままLCへと導入することはできないため逆抽出を行う。逆抽出では，抽出操作を行った後，夾雑成分を含む上層を除去し，下層 (フルオラス層) に脱イオンペア剤を含む水溶液を加え，ヌクレオチド類をその水溶液中へと再度抽出する。

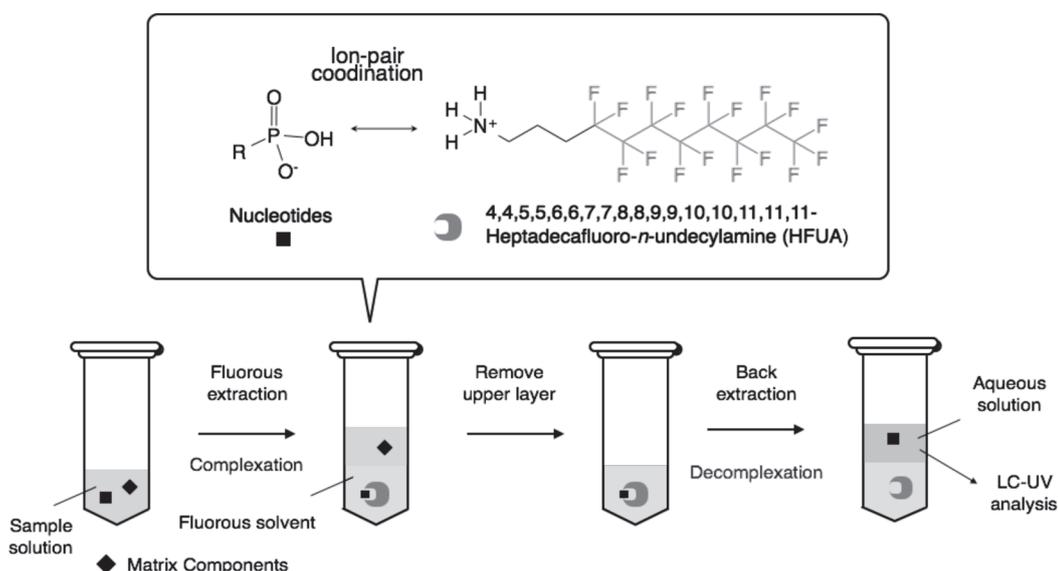


Fig.3 The principal of the ion-pair extraction method for ncleotides with HFUA.

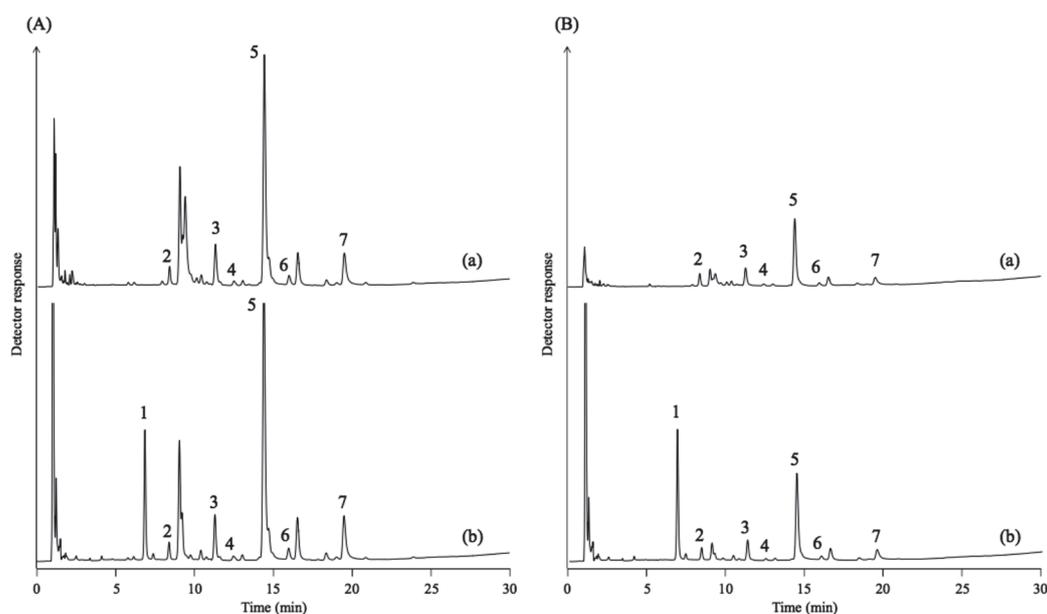
得られた逆抽出液をそのままLCへと導入し測定を行う。本研究において、ヌクレオチド類6種（AMP, ADP, ATP, GMP, GDP及びGTP）を対象とし基礎的條件の検討を行った。さらに、本法の有用性を検証すべく、乳がん細胞（MCF-7）及びそのコントロール細胞として知られる乳腺上皮細胞（MCF-10A）へと本法を適用した。

#### <実験方法>

操作手順：試料溶液100  $\mu\text{L}$ をとり、100  $\mu\text{M}$  6-Chloropurine riboside-5'-O-diphosphate (6-Cl-PuDP, 内標準物質) 10  $\mu\text{L}$ , 水300  $\mu\text{L}$ , 100 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) 100  $\mu\text{L}$ 及び40 mM HFUA (メタノール溶液) 500  $\mu\text{L}$ を加えて混合した。次いで、フルオラス溶媒Tetradecafluorohexane (TDFH) : 1*H*,1*H*,2*H*,2*H*-Tridecafluoro-1-*n*-octanol (TFO) の混液 (3 : 1, v/v) 100  $\mu\text{L}$ 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 (pH 4.0) の混液 (1 : 1, v/v) 100  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ ) をLCに注入した。

LC条件：カラムにはXBridge® BEH Amide (150  $\times$  3.0 mm I.D., 粒径2.5  $\mu\text{m}$ , 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 (0–30 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。

細胞試料前処理：MCF-7及びMCF-10A細胞を15 mLのチューブに $1.0 \times 10^6$ 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  $\mu\text{L}$ を加えて1分間振とうし、次に氷冷水220  $\mu\text{L}$ を加えてさらに30秒振とうした。遠心分離 (17,500  $\times g$ , 10 min, 4°C) 後、得られた上清のうち100  $\mu\text{L}$ を試料溶液とした。



**Fig.4** 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; 2, AMP; 3, ADP; 4, GMP; 5, ATP; 6, GDP; and 7, GTP.

### <結果及び考察>

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、脱イオンペア剤を用いることで、ヌクレオチド類を非フルオラス層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、それらを定量することができた (Fig. 4)。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前処理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**

### <目的>

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の実用性を検証すべく、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、細胞を24時間ごと (0, 24, 48 及び72時間) に前処理・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。本章の検討では、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細胞を用いた。

### <実験方法>

操作手順：第1章の操作手順に従って操作した。

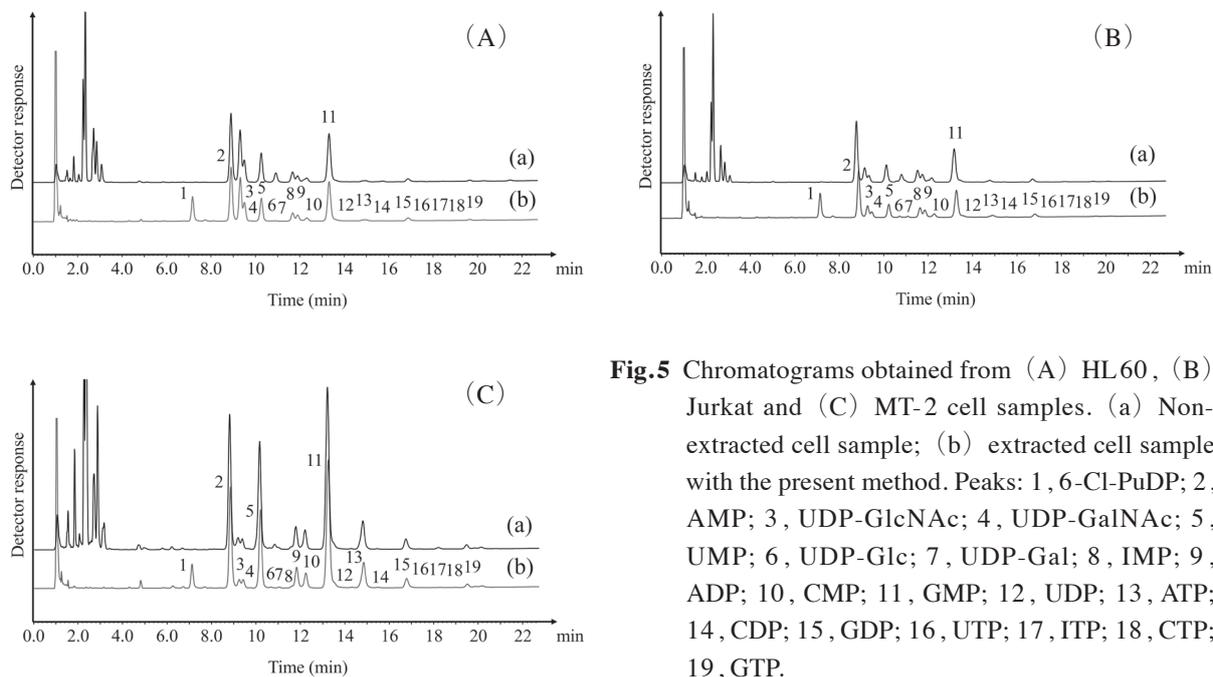
LC条件：カラムにはXBridge® BEH Amide (150 × 3.0 mm I.D., 粒径2.5 μm, Waters) を、移動相Aとして20 mM炭酸アンモニウムを含むアセトニトリル：水 (80:20, v/v)、移動相Bとして40 mM炭酸アンモニウムを含むアセトニトリル：水 (40:60, v/v) を使用し、流速0.6 mL/minでグラジエント溶離を行った (0-22 min, linear change from 15% to 37% B; 22-30 min 37% B; 30-30.01 min, linear change from 37% to 15% B; and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

細胞試料前処理：対象とした細胞を24時間ごとに $1.0 \times 10^6$ 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加えて、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。得られた上清を試料溶液として用いた。

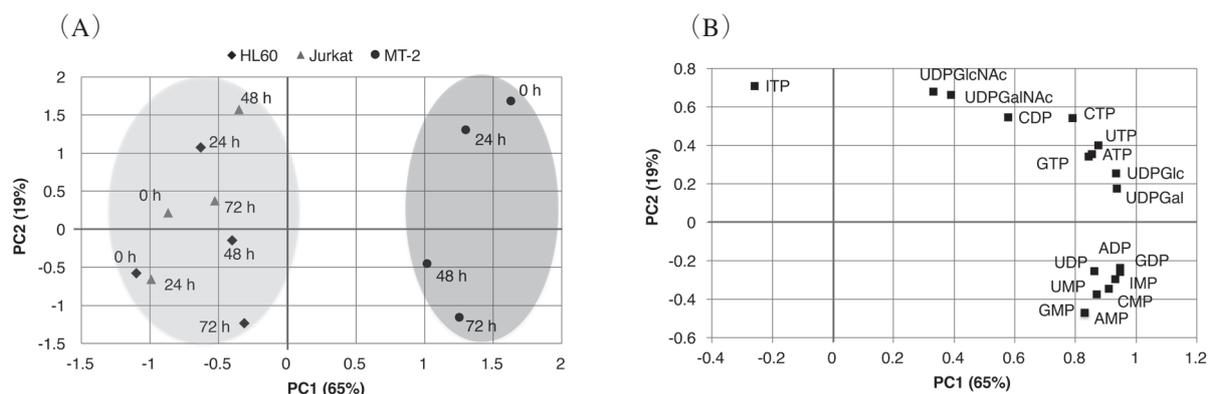
### <結果及び考察>

フルオラスイオンペア法により、白血病由来細胞試料 (HL60細胞, Jurkat細胞及びMT-2細胞) 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 (Fig. 5)。さらに、また、MT-2細胞を用いて添加回収試験を行ったところ、ヌクレオチド類の回収率は、43.8~138%の範囲にあり、検量線の直線性 ( $r \geq 0.9925$ ) 及び再現性 (RSD < 8.0%) はともに良好な結果が得られた。

さらに、HL60細胞, Jurkat細胞及びMT-2細胞について培養開始から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、スコアプ



**Fig.5** Chromatograms obtained from (A) HL60, (B) Jurkat and (C) MT-2 cell samples. (a) Non-extracted cell sample; (b) extracted cell sample with the present method. Peaks: 1, 6-Cl-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.



**Fig.6** The PCA (A) score and (B) loading plots obtained with quantitation of the nucleotides in cell samples.

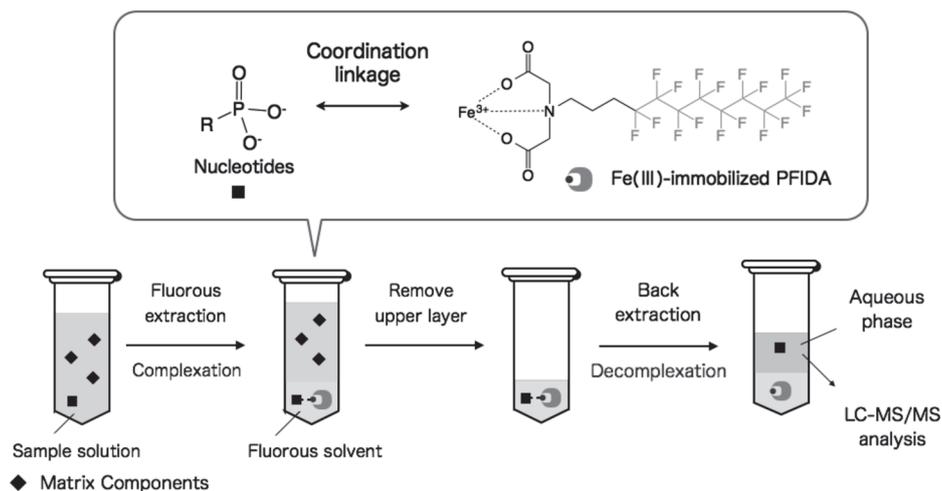
ロットの結果から、HL60細胞・Jurkat細胞群とMT-2細胞群の2群間の差異を可視化することができた (Fig. 6A)。また、ローディングプロットの結果から、細胞間差に関与するヌクレオチド類を確認することができた (Fig. 6B)。これらの結果から、フルオラスイオンペア法を応用したヌクレオチド類解析によって、各細胞中ヌクレオチド類の濃度変化を追うことで、細胞種差の解析及び細胞種の判定に適用可能であることが示唆された。

### 【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

#### <目的>

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に導入し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-Perfluoro-n-alkyliminodiacetic

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用いて逆抽出を行い, 非フルオラス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. 7)。さらに本研究では, 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. 7** The principal of the extraction method for nucleotides by fluorous-assisted metal chelate affinity technique with Fe (III) -immobilized PFIDA.

#### <実験方法>

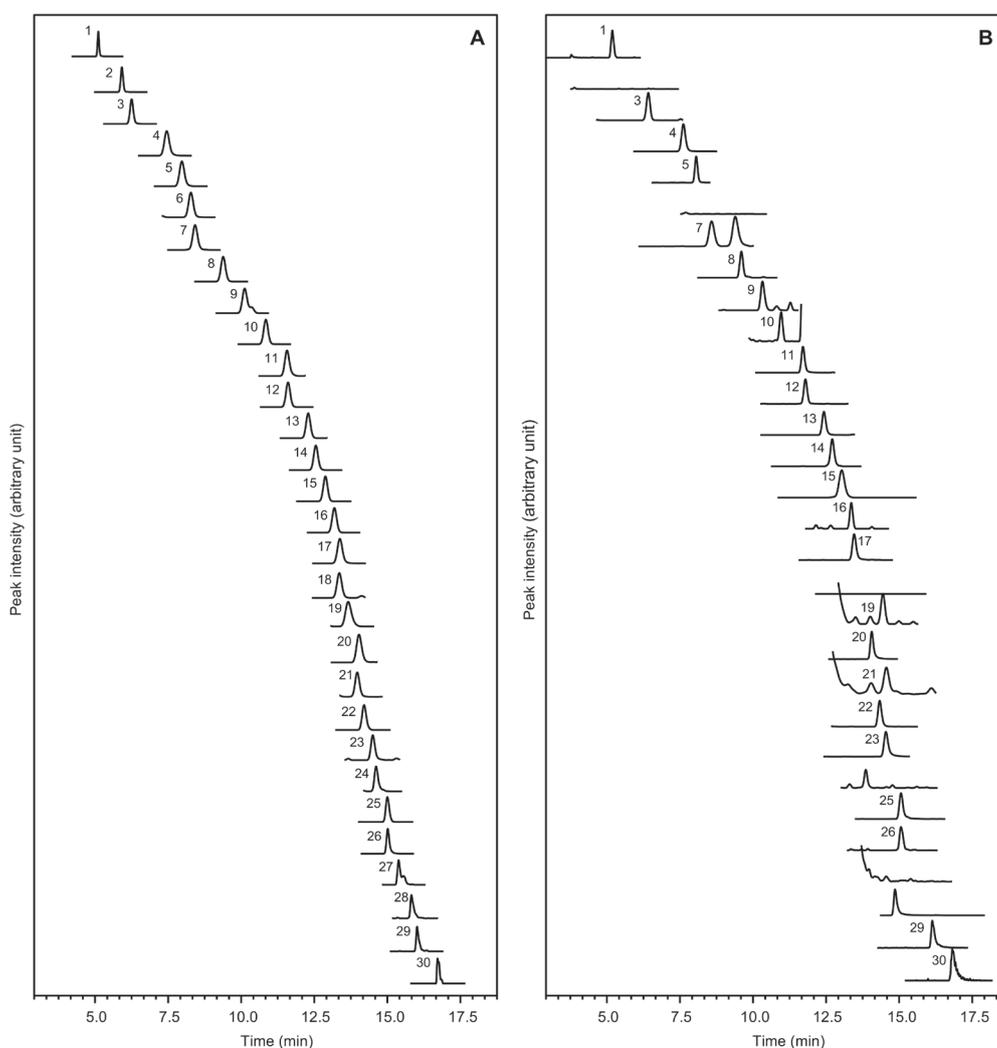
**操作手順**：試料溶液 400  $\mu\text{L}$  に, 50 mM Fe (III) 配位 PFIDA 溶液 (TDF H : TFO = 3 : 1, v/v) 20  $\mu\text{L}$  を加え, 室温で 10 分間振とうした。遠心分離 (17,500  $\times g$ , 10 min) 後, 上層 (非フルオラス層) を除去し, 0.2% trifluoroacetic acid (TFA) を含む 60% メタノール 50  $\mu\text{L}$  で下層 (フルオラス層) を洗浄した。次いで, フルオラス層に 1% アンモニアを含む 70% アセトニトリル 50  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ ) を LC-MS/MS に注入した。

**LC-MS/MS 条件**：カラムには Acquity UPLC® BEH Amide (100  $\times$  3.0 mm I.D., 粒径 1.7  $\mu\text{m}$ , 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 change from 20 to 30% B; 10–12 min, linear change from 30 to 60% B, 12–25 min, linear change from 60 to 100% B, 25–25.01 min, linear change from 100 to 20% B; and run time, 40 min) を行った。カラム温度は 35°C に設定した。また, MS 装置には LCMS-8050 (島津製作所) を使用し, イオン化は ESI ネガティブモードで行った。

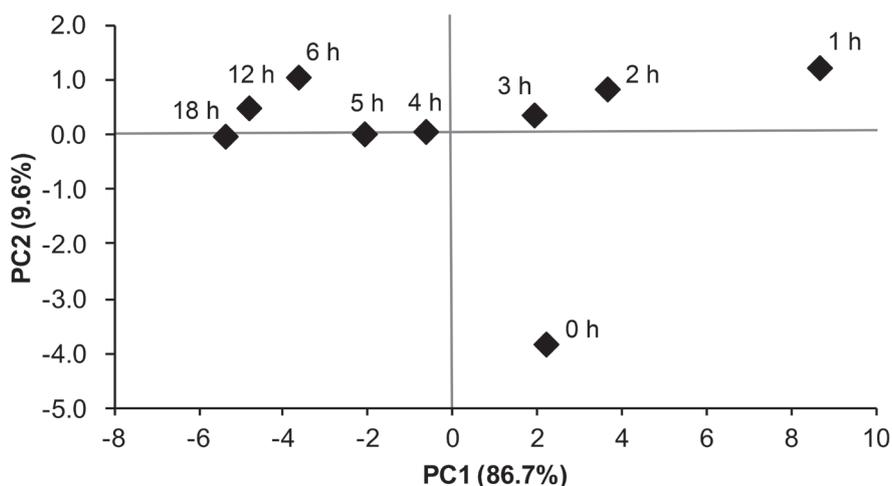
**細胞試料前処理**：白血病由来細胞である Jurkat 細胞に対し, アポトーシス誘導剤である 100 ng/mL Anti-Fas mAb を添加し, 0 (添加前), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 及び 18 時間後に回収し細胞試料として用いた。一定量採取した細胞ペレット (1.0  $\times 10^6$  個) に氷冷メタノールを 320  $\mu\text{L}$  加え, 1 分間振とう後, さらに氷冷水 220  $\mu\text{L}$  を加え 1 分間振とうした。遠心分離 (17,500  $\times g$ , 15 min) 後の上清を試料溶液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

### <結果及び考察>

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が可能であった。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 (Fig. 8A)。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 (Fig. 8B)。次に、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濃度の変動を観察した。得られた定量値に対し多変量解析を施したところ、スコアプロットの結果から、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 (Fig. 9)。このことから、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。以上の結果から、本法がヌクレオチド類の選択的抽出法として有用であることが確認できた。



**Fig.8** Chromatograms obtained from (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.

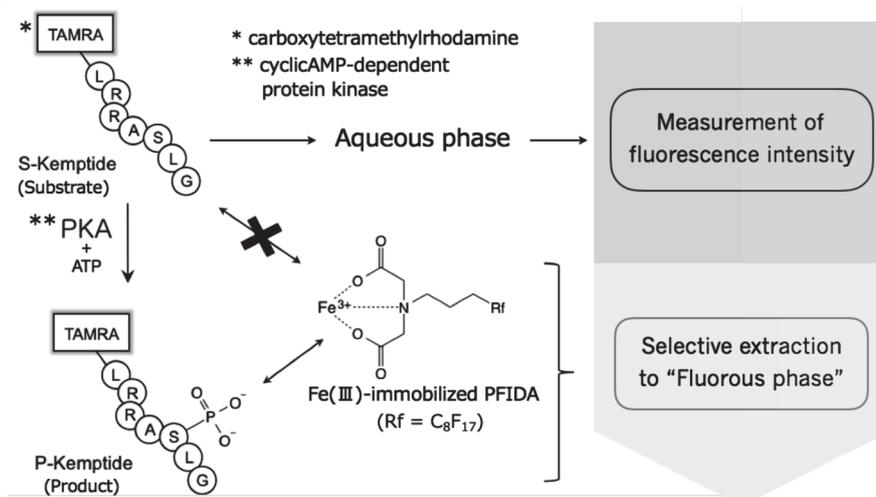


**Fig.9** The PCA (A) score plot obtained with the quantitatively value of nucleotides in Jurkat cell.

#### 【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

<目的>

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適用し、プロテインキナーゼ (Protein kinase; PK) 活性測定を試みた。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の活性異常はがん为代表的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。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 ( $H_2N\text{-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-COOH}$ ) を用いて、本法の有用性の確認を行った (Fig. 10)。本法は、Carb-oxytetramethylrho-damine (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、そのリン酸化体 (P-kemptide) のみを Fe (III) 配位 PFIDA で捕捉し、



**Fig.10** The removing extraction method for P-kemptide with Fe (III) -immobilized PFIDA by fluorous-assisted metal chelate affinity technique and measurement of protein kinase activity assay.

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、水層にはリン酸化されなかった 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。

#### <実験方法>

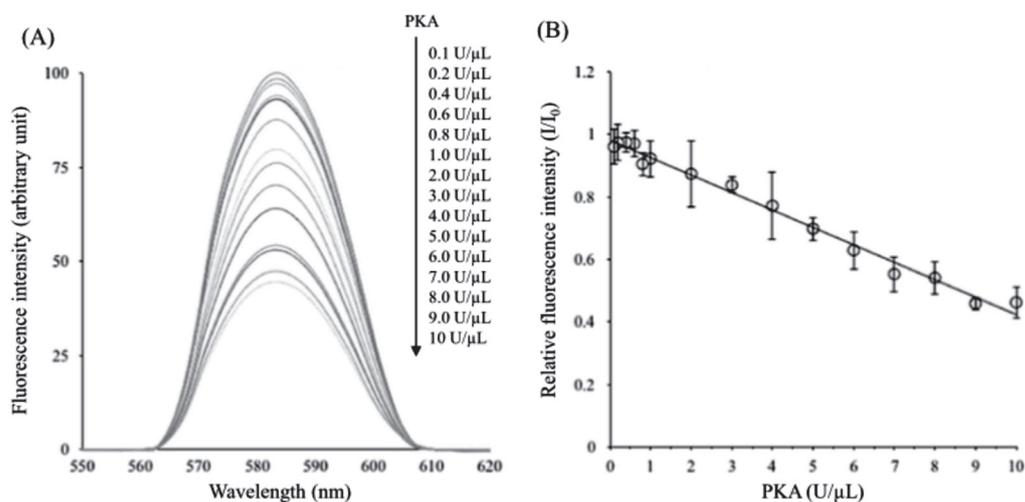
**PKA 酵素反応：**40  $\mu$ M S-Kemptide 75  $\mu$ L に、400  $\mu$ M ATP を含む PKA 溶液 (0-10 U/ $\mu$ L) 75  $\mu$ L を加え、30 $^{\circ}$ C で2時間放置した。得られた溶液を試料溶液として用いた。

**操作手順：**試料溶液 30  $\mu$ L に、40 mM Fe (III) 配位 PFIDA 溶液 (TDFH : TFO = 3 : 1, v/v) 20  $\mu$ L 及び 0.2% TFA を含むアセトニトリル 20  $\mu$ 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) の一部 (2  $\mu$ L) を用いて蛍光強度を測定した。

**蛍光測定条件：**蛍光測定装置には Nanodrop 3300 fluorescence spectrometer (Thermo) を使用した。また、励起光として白色 LED を用い、蛍光波長を 550 nm から 620 nm の範囲に設定した。

#### <結果及び考察>

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除去され、非リン酸体である S-Kemptide は抽出されず上層 (非フルオラス層) に残存していた。また、S-Kemptide に対し PKA 酵素反応を用いてリン酸化を行い、抽出を導入した。その結果、PKA の濃度上昇に伴い P-Kemptide の生成量が増加した分、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 (Fig. 11)。以上より、本法により PKA 活性を測定でき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。



**Fig. 11** (A) Fluorescence emission spectra of aqueous phase and (B) the relative fluorescence emission intensity changes at 585 nm obtained before (I<sub>0</sub>) and after (I) fluoruous extraction of enzymatic reaction solutions with different concentrations of PKA (0-10 U/ $\mu$ L).

#### 【総括】

本研究では、生体内リン酸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技術

の確立を目指し、フルオラスイオンペア抽出法を導入した。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、リン酸化合物を対象としたフルオラス金属キレートアフィニティー抽出法の開発を行った。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。

#### 【参考文献】

- [1] J. A. Gladysz, D. P. Curran, I. T. 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, G. 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] T. Qian, Z. Cai, M. S. Yang, *Anal. Biochem.* **325** (2004) 77-84.
- [16] S. Yang, M. Sadilek, R. E. Synovec, M. E. Lidstrom, *J. Chromatogr. A* **1216** (2009) 3280-3289.
- [17] I. J. del Val, S. Kyriakopoulos, K. M. Polizzi, C. Kontoravdi, *Anal. Biochem.* **443** (2013) 172-180.
- [18] J. Klawitter, V. Schmitz, J. Klawitter, D. Leibfritz, U. Christians, *Anal. Biochem.* **365** (2007) 230-239.
- [19] J. Czarnecka, M. Cieslak, K. Michal, *J. Chromatogr. B* **822** (2005) 85-90.
- [20] S. Cohen, M. Megherbi, L. P. Jordheim, I. Lefebvre, C. Perigaud, C. Dumontet, J. Guitton, *J. Chromatogr. B* **877** (2009) 3831-3840.
- [21] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, *Proteomics* **4** (2004) 1633-1649.
- [22] M. K. Tarrant, P. A. Cole, *Annu. Rev. Biochem.* **78** (2009) 797-825.
- [23] 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.
- [24] J. R. Sportsman, E. A. Gaudet, A. Boge, *Assay. Drug. Dev. Technol.* **2** (2004) 205-214.
- [25] M. D. Shults, K. A. Janes, D. A. Lauffenburger, B. Imperiali, *Nat. Methods* **2** (2005) 277-284.
- [26] C. J. Hastie, H. J. McLauchlan, P. Cohen, *Nat. Protoc.* **1** (2006) 968-971.
- [27] Z. Wang, R. Levy, D. G. Fernig, M. Brust, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 2214-2215.
- [28] Y. L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** (2010) 666-672.
- [29] P. B. Jensen, T. Hunter, *Nature* **411** (2001) 355-365.
- [30] P. Tan, C. Lei, X. Liu, M. Qing, Z. Nie, M. Guo, Y. Huang, S. Yao, *Anal. Chim. Acta* **780** (2013) 89-94.
- [31] B. Li, X. Shi, W. Gu, K. Zhao, N. Chen, Y. Xian, *Analyst* **138** (2013) 7212-7217.