

東北医科薬科大学  
審査学位論文（博士）

氏名（本籍）	コマツ サチコ 小松 祥子（福島県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	薬科第7号
学位授与の日付	令和6年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条2項該当
学位論文題名	生体内分子の効率的な測定法の開発に関する研究
論文審査委員	主査 教授 細野 雅祐
	副査 教授 山口 芳樹
	副査 教授 藤村 務

博士学位論文

生体内分子の効率的な測定法の開発に関する研究

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

臨床分析化学教室

小松 様子

## 目次

緒論.....	1
第一章 蛍光標識エストラジオールを用いた受容体結合アッセイ.....	4
第一節 序論.....	4
第二節 実験方法.....	7
第三節 BD-E2 の合成および蛍光特性の評価.....	17
第四節 ヒト組換えエストロゲン受容体を用いた飽和結合アッセイ.....	20
第五節 ヒト組換えエストロゲン受容体を用いた競合結合アッセイ.....	23
第六節 小括.....	27
第二章 ニトロキシラジカルを用いたアルコールの電気化学検出.....	28
第一節 序論.....	28
第二節 実験方法.....	31
第三節 ニトロキシラジカル化合物のアルコール酸化評価.....	33
第四節 NNO による CSA の電気化学検出.....	38
第五節 小括.....	40
第三章 4-ピリジンボロン酸誘導体化を用いたジオール化合物の FAB-MS 測定 .....	41
第一節 序論.....	41
第二節 実験方法.....	45
第三節 ボロン酸誘導体化の FAB-MS 性能の評価.....	47
第四節 FAB-MS マトリックスの性能比較.....	52
第五節 単糖類の FAB-MS 測定.....	54
第六節 小括.....	59
総括.....	60

謝辭.....	62
論文目錄.....	63
引用文献.....	64

## 緒論

ヒトの生体は、非常に数多くの化合物によって生化学反応や代謝経路が制御されている。生物学的役割を持つと認知される化合物の内、低分子化合物 (分子量 1000 以下) は有機酸, 脂質, 核酸, アミノ酸, 糖, ペプチド, ステロイドなど多岐にわたり, Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) や Human metabolome database (HMDB) などのデータベースには数万から数十万種類の低分子化合物が登録されている。しかし, 生命現象に関与する低分子化合物の生体内分布や機能, 相互作用などの全容は未だ明らかにされていない。

生体内に存在する代謝物はセントラルドグマの下流にあることから, 上流である DNA やタンパク質よりも表現型に近いとされている<sup>1)</sup>。主に低分子代謝物を対象とした網羅的解析 (メタボロミクス) は, 生命活動の解明のみならず, 医療や農業, 食品産業など様々な分野において重要性が増している。メタボロミクスでは核磁気共鳴 (NMR) 法, ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS) 法, 液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) 法, キャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS) 法などを用いた分析手法が盛んに開発されている。しかし, メタボロミクスの測定対象となる化合物は幅広い化学特性を持ち, 単一の分析手法で測定したデータによりすべての成分を解析することはできない。また質量分析では, 対象化合物のイオン化効率が低い場合, 多様な成分が共存している生体試料を測定する際に十分な検出感度が得られないことがある。さらに, 研究施設ごとに様々な分析手法が研究されているため, 同一の基準となる前処理方法, 装置, およびデータ解析方法が確立されていない<sup>1)</sup>。このように, タンパク質を対象とするプロテオミクスとは異なる困難さがメタボロミクスには存在する。

一方で, 生物学的役割が解明されていない化合物を同定, 評価する技術も, 創薬および品質管理において不可欠である。薬理学的研究において, 天然物や

医薬品候補化合物の生理活性は生物学的標的 (タンパク質, 酵素, 抗体, 受容体など) に対する相互作用によって評価されることが多い<sup>2)</sup>。化合物-タンパク質複合体の検出は, 放射活性測定, 分光学的分析, 質量分析, 等温滴定カロリメトリー (ITC), 表面プラズモン共鳴 (SPR) などで実施され, 作用メカニズムに関する情報を分子レベルまたは細胞レベルで調査することができる。しかし, 標的として使用されるタンパク質または細胞の安定性や, 測定効率と費用対効果などの面に欠点を持つ。

生体試料 (血液, 尿, 組織, 培養細胞など) 中の低分子化合物の定性および定量は, 疾患バイオマーカーの探索, 薬物動態解析, 治療薬物モニタリング (TDM) などに密接に関連し, 医療分野において非常に重要な研究課題である。特にバイオマーカー研究では, 前立腺がん<sup>3-7)</sup> や尿路上皮がん<sup>8)</sup> で従来の診断値を補完しうる新規バイオマーカーが発見されるなど, 臨床診断の精度向上に寄与することが期待される。また, COVID-19 の重症化を予測するバイオマーカーの発見<sup>9,10)</sup> にみられるように, 生体試料を用いた研究の展開には迅速性が求められている。一方で, メソッドの複雑化やランニングコストの高騰を解消するため, より簡便な測定原理や低コストの装置を利用する分析法の開発も重要である。費用対効果が高い測定法の開発が盛んになることで, 現在普及している分析技術や素材の開発にも影響を与えるものと期待される。生体試料は試料構成要素 (マトリックス) が複雑で, 対象化合物の濃度が試料ごとに異なる。したがって実試料の測定には, 前処理ごとの回収率, 化学誘導体化 (標識) を行う場合の反応効率, 蛍光測定における消光や質量分析中のイオン化抑制による測定装置のレスポンス低下, 共存物質によるタンパク質の失活など多くの問題が予想される。これらの特徴はメソッドの信頼性と堅牢性に関わるため, 試料の特性に応じた分析方法の検討およびバリデーションを実施する必要がある。

本研究では, 生体試料中の低分子化合物の測定について, 簡便かつ効率的に検出・評価できる手法の開発を目的とした。いずれの研究も, 現在普及してい

る分析手法に対し、実験操作の簡略化やデータ解析時間の短縮、ランニングコストの低減等を試みたものである。本論文の第一章では、エストロゲン受容体結合アッセイに有用な蛍光標識エストロゲン誘導体の開発を検討した。第二章ではニトロキシラジカル化合物を用いたアルコールの電気化学検出、第三章ではボロン酸試薬を用いたジオール化合物の高速原子衝撃質量分析 (FAB-MS) 測定についてそれぞれ検討した。さらに、今回開発した手法と従来法のデータと比較し、性能および妥当性を検証した。

# 第一章 蛍光標識エストラジオールを用いた受容体結合アッセイ

## 第一節 序論

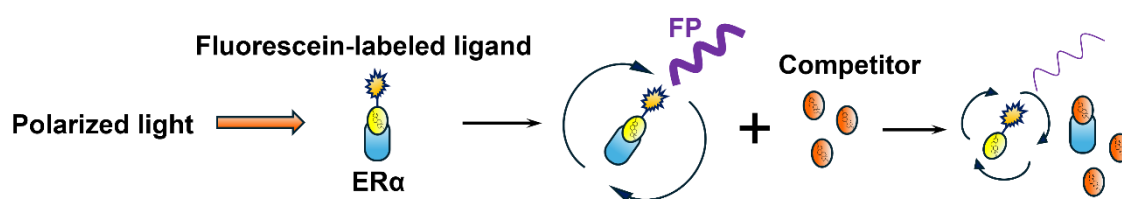
エストロゲンは、核内受容体であるエストロゲン受容体 (ER) を介して、細胞の成長および分化過程に関与する。ER には、異なる遺伝子をコードする2つのサブタイプである ER $\alpha$  (66 kDa) および ER $\beta$  (59 kDa) が存在する。エストロゲンが ER に結合すると、エストロゲンと ER 複合体はホモ二量体 ( $\alpha\alpha$  または  $\beta\beta$ ) あるいはヘテロ二量体 ( $\alpha\beta$ ) を形成した後、DNA 配列のエストロゲン応答配列 (ERE) に結合する<sup>11-13</sup>。2つの ER の組織分布は多少異なり、ER $\alpha$  は主に乳腺、子宮、卵巣、骨、精巣、前立腺間質、肝臓、脂肪組織に含まれている。一方、ER $\beta$  は主に卵巣、前立腺上皮、腸、脂肪組織、免疫系に存在している<sup>14</sup>。また、ER は脳においても発現することが知られている<sup>15</sup>。エストロゲン活性の検出と評価は、乳がん<sup>13</sup>、骨粗鬆症<sup>13</sup>、II型糖尿病<sup>16</sup>、アルツハイマー病<sup>14,15</sup>などのエストロゲン関連疾患の創薬および病理学的解析において重要である。

過去数十年の間に、様々な合成化学物質が生産され、環境中に放出されている。これらの化学物質の中には、正常な生物学的プロセスを阻害し、野生生物やヒトの発育や生殖機能に悪影響を及ぼすものがあり、内分泌かく乱化学物質 (EDC) と呼ばれている<sup>17,18</sup>。環境中のエストロゲン様化合物は、ER に結合し、アゴニスト作用やアンタゴニスト作用を通じて、生物のステロイドシグナル伝達をかく乱する。我が国では、環境省が保健・化学物質対策の一環として「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2022—」を策定している<sup>19</sup>。国際的な動向においても、経済協力開発機構 (OECD) では、引き続き内分泌かく乱作用に関する試験・評価法の開発が進められており、継続的に取り組むべき課題であることが広く認知されている。

現在までに、エストロゲン様化合物の同定および活性評価の手法として、ER



を用いた *in vitro* 結合アッセイ<sup>20-23)</sup> や ER 転写アッセイ<sup>24)</sup> に基づくスクリーニング法が数多く考案されている。結合アッセイはリガンド-受容体の相互作用のパラメーターを解析する飽和結合アッセイ、および試験化合物とリガンド間の競合により結合親和性を評価する競合結合アッセイの主に 2 つから構成される<sup>25)</sup>。従来型の放射性同位体標識リガンドを用いた結合アッセイ<sup>20-23)</sup> は、現在においても様々な環境化合物の ER への結合親和性を特徴付けるために利用されている。一方、放射性試薬の代替として、蛍光偏光 (FP) 法を用いた結合アッセイも開発されている<sup>26-29)</sup>。溶液中の蛍光分子が直線偏光で励起されると、蛍光寿命中にブラウン運動により自由回転し、配向が乱れることで蛍光の偏光度 ( $P$ ) が失われる。これに対し、タンパク質などの大きな分子に結合した蛍光分子は回転速度が遅いため、遊離の蛍光分子より  $P$  値は大きくなる。この現象を利用して、FP 法による結合アッセイでは蛍光標識リガンドと受容体の結合能を評価する。フルオレセイン標識エストラジオール (F-E2)<sup>28,29)</sup> を用いた ER 結合アッセイの概略を Figure 1-1 に示す。FP 法は、リガンド-受容体複合体 (Bound,  $B$ ) の遊離リガンド (Free,  $F$ ) を分離する必要がないため操作が簡便で、ハイスループットスクリーニングによく適している。しかし、蛍光偏光度測定に対応した専用機器が必要である。

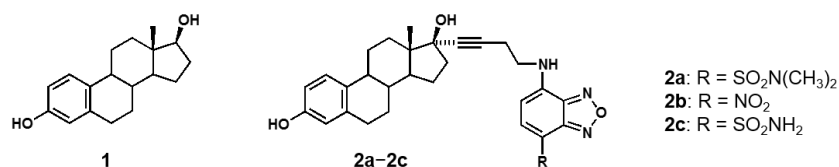


**Figure 1-1. Fluorescence polarization-based competitive binding assay for ER and F-E2.**

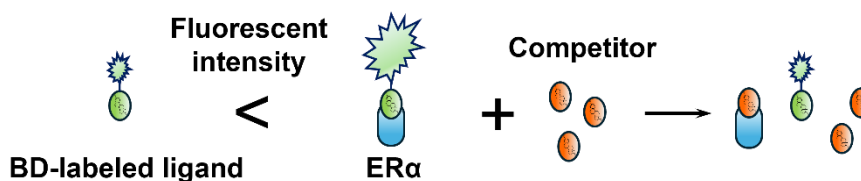
そこで FP 法の原理を応用し、より簡便にリガンド-受容体結合を評価する方法として、蛍光偏光度の代わりに蛍光強度を測定する結合アッセイの開発を検討した。一般的に使用される蛍光色素 (フルオレセイン, ローダミンなど) は、

測定条件や分子環境によって励起・蛍光スペクトルおよび蛍光強度が変化することが知られている<sup>30)</sup>。ベンゾフラザン (2,1,3-benzoxiazole, BD) 系の蛍光試薬は、ストークスシフトが大きい誘導体を与えることが知られている。生体試料中に存在する多数の蛍光妨害物質は、励起波長 300 – 350 nm, 蛍光波長 360 – 430 nm 程度であるとされ, BD 誘導体は生体マトリックス由来の干渉を防ぐのに理想的である<sup>31)</sup>。また, BD 誘導体の蛍光強度は通常, 溶媒の極性が低くなるにつれて急激に増加し<sup>32)</sup>, 水溶液中では蛍光を発しない特性を示す。BD のような特性を持つ蛍光プローブをリガンドとして利用することで, *B/F* 分離フリーの結合アッセイが開発できると期待される。

本章では, 既存の ER 結合アッセイの欠点を克服するために, 測定原理が簡便で信頼性の高いレポーターとなる蛍光標識リガンドの開発を検討した。まず, ベンゾフラザン標識エストラジオール (BD-E2) を合成し (Figure 1-2), 水系および疎水性環境下での蛍光特性を評価した。その後, 蛍光強度測定によりヒト組換えエストロゲン受容体  $\alpha$  (hr-ER $\alpha$ ) との結合親和性を評価した。さらに, BD-E2 と非標識エストロゲン化合物を用いた ER 競合結合アッセイを行った (Figure 1-3)。



**Figure 1-2. Chemical structures of 17 $\alpha$ -estradiol (1) and the benzofurazan-labeled fluorescent ligands (2a–2c).**



**Figure 1-3. Fluorescence binding assay for ER and BD-E2.**

## 第二節 実験方法

### 1. 試薬および材料

17 $\beta$ -エストラジオール (E2), エストロン (E1), エストリオール (E3), 4-ニトロ-7-フルオロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール (NBD-F), 4-(*N,N*-ジメチルアミノスルホニル)-7-フルオロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール (DBD-F), ジエチルスチルベストロール (DES), および 2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン (bisphenol A, BPA) は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した. 4-フルオロ-7-スルファモイルベンゾフラザン (ABD-F) および 4-*n*-ノニルフェノール (4NP) は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Osaka, Japan) から購入した. 17 $\alpha$ -エストラジオール (17 $\alpha$ -E2) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から, 17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール (EE2) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. TLC プレート (TLC silica gel 60 F254 plates) およびカラムクロマトグラフィー用シリカゲル (silica gel 60, 0.063–0.200 mm) は Merck (Darmstadt, Germany) から購入した.

### 2. 装置

合成した化合物の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルは JMN-ECZ400S/L1 (JEOL, Tokyo, Japan) で測定した. NMR データでは次の略語を使用した; s: singlet, d: doublet, dd: double doublet, t: triplet, m: multiplet. 質量分析 (MS) および高分解能質量分析 (HR-MS) は JMS-700 V 質量分析計 (JEOL) で, グリセロールをマトリックスとして使用する FAB-MS 測定で実施した. UV-Vis スペクトルは MPS-2450 紫外可視分光光度計 (Shimadzu, Kyoto, Japan) または V-730 紫外可視分光光度計 (JASCO, Tokyo, Japan) で, 蛍光スペクトルは RF-5300PC 蛍光光度計 (Shimadzu) で測定した. 結合アッセイは infinite M1000 マイクロプレートリーダー (Tecan, Männedorf, Switzerland) で評価した.

### 3. 17 $\alpha$ -(4-アミノブチニル)エストラジオールの合成

BD-E2 の受容体結合部位について、合成手順の概要を Figure 2-1 に示す。反応の各段階 (Scheme a-f) の詳細は以下の通りである。反応生成物 3-9 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルデータは文献<sup>28)</sup> に記載された値と一致した。

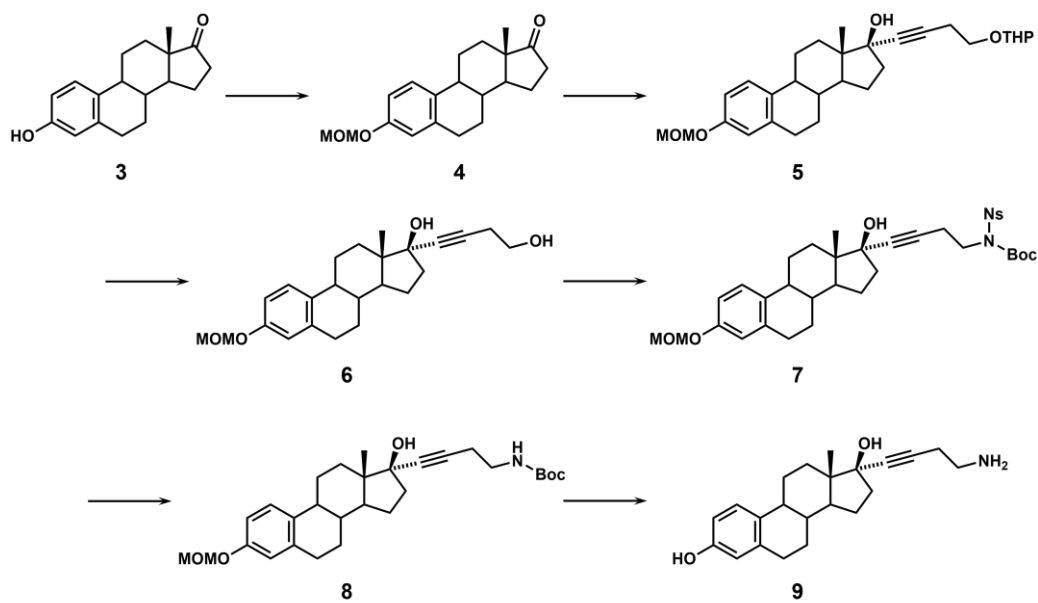


Figure 2-1. Preparation of the 17 $\alpha$ -substituted E2 derivatives 9.

**Scheme a:** E1 (3, 998.0 mg, 3.69 mmol) のジクロロメタン (脱水) (10 mL) 溶液にメトキシメチルクロリド (806  $\mu\text{L}$ ) および *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (973  $\mu\text{L}$ ) を 0  $^{\circ}\text{C}$  で加え、室温まで温めながら 16 時間攪拌した。反応混合物をジエチルエーテルで希釈後、有機層を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 6:1) で精製し、4 を無色固体として得た (916.8 mg, 79%)。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.91 (3H, s), 3.48 (3H, s), 5.15 (2H, s), 6.79 (1H, d,  $J = 2.7$  Hz), 6.85 (1H, dd,  $J = 8.5, 2.7$  Hz), 7.21 (1H, d,  $J = 8.3$  Hz)。

**Scheme b:** 3-ブチン-1-オール テトラヒドロピラニルエーテル<sup>33)</sup> (972.0 mg, 6.31 mmol) の無水テトラヒドロフラン (THF, 4 mL) 溶液に *n*-ブチルリチウム

(3.8 mL, 1.6 M *n*-ヘキサン溶液) を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 窒素気流下で加え 1 時間攪拌した. 次いで, **4** (916.8 mg) の無水 THF (15 mL) 溶液を加え, 室温まで温めながら 16 時間攪拌した. 反応混合物に水を加え, ジエチルエーテルで抽出後, 有機層を水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を留去した. 得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 6:1) で精製し, **5** を黄色油状物質として得た (928.3 mg, 68%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.86 (3H, s), 2.56 (2H, t,  $J=6.9$  Hz), 3.48 (3H, s), 3.54 (2H, m), 3.85 (2H, m), 4.66 (1H, br s), 5.15 (2H, s), 6.77 (1H, d,  $J=2.7$  Hz), 6.83 (1H, dd,  $J=8.5, 2.7$  Hz), 7.21 (1H, d,  $J=8.5$  Hz).

**Scheme c:** **5** (928.3 mg, 1.98 mmol) のメタノール (10 mL) 溶液に (+)-10-カンファースルホン酸 (92.3 mg) を加え, 室温で 30 分攪拌した. 反応混合物を酢酸エチルで希釈後, 有機層を水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を留去した. 得られた残留物をアセトンで再結晶し, **6** を無色固体として得た (712.1 mg, 94%).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.87 (3H, s), 2.54 (2H, t,  $J=6.2$  Hz), 3.48 (3H, s), 3.75 (2H, t,  $J=6.3$  Hz), 5.15 (2H, s), 6.77 (1H, d,  $J=2.7$  Hz), 6.84 (1H, dd,  $J=8.5, 2.7$  Hz), 7.21 (1H, d,  $J=8.3$  Hz).

**Scheme d:** **6** (100.8 mg, 0.26 mmol), *N*-(*tert*-ブトキシカルボニル)-2-ニトロベンゼンスルホンアミド<sup>34,35</sup> (700.2 mg), およびトリフェニルホスフィン (417.1 mg) をベンゼン (脱水) (5 mL) に溶解し混合した. 次いでアゾジカルボン酸ジエチル (685  $\mu\text{L}$ , 40% トルエン溶液) を加え, 室温で 16 時間攪拌した. 反応混合物に水を加え, 酢酸エチルで希釈後, 有機層を水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を留去した. 残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 2:1) で精製し, **7** を無色固体として得た (561.5 mg).

**Scheme e: 7** (561.5 mg) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF, 10 mL) に溶解後、ベンゼンチオール (105  $\mu$ L) および炭酸セシウム (826.2 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出後、有機層を 5% 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、および水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 1) で精製し、**8** を黄色油状物質として得た (119.3 mg, 94%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.87 (3H, s), 1.42 (9H, s), 2.45 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.29 (2H, t, *J* = 5.9 Hz), 4.79 (1H, br s), 6.56 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 6.63 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.9 Hz), 7.16 (1H, d, *J* = 8.4 Hz)。

**Scheme f: 8** (57.8 mg, 0.12 mmol) にトリフルオロ酢酸 (2.14 mL) を加え、室温で 20 分攪拌した。反応混合物の溶媒を留去し、**9** を褐色固体として得た (60.6 mg, トリフルオロ酢酸塩として)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.86 (3H, s), 2.40 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.10–3.20 (2H, m), 4.80–4.90 (1H, br s), 6.47 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.54 (1H, dd, *J* = 8.3, 2.7 Hz), 7.08 (1H, d, *J* = 8.3 Hz)。

#### 4. BD-E2 誘導体の合成

蛍光標識リガンド (BD-E2) は、前項で合成した 17 $\alpha$ -(4-アミノブチニル)エストラジオールにフルオロベンゾフラザン試薬 (BD-F) を反応させ合成した。試薬ごとの反応手順 (**Procedure A, B**) は以下の通りである。

**Procedure A: 9** (0.04 mmol) をピリジン (0.5 mL) に溶解後、DBD-F (5.7 mg) のアセトニトリル (1.1 mL) 溶液を加え、60 °C で 4 時間加熱した。反応混合物を冷却後、5% 塩酸を加え、酢酸エチルで希釈した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液 および水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を留去した。得

られた残留物を分取 TLC (ヘキサン:酢酸エチル = 1:1) で精製した。回収した黄色油状物質をさらに精製するため、固相カートリッジに Bond Elut C18 (200 mg, 3 mL) (Agilent Technologies, CA, USA), 移動相にアセトニトリル-水を用いた固相抽出 (SPE) を行った。

**17 $\alpha$ -[4-(*N,N*-Dimethylaminosulfonyl)-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-yl]amino-1-butynyl]estra-1,3,5(10)-trien-3-ol (DBD-E2, 2a)**

黄色固体 (Procedure A による回収率 0.4%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.96 (3H, s), 2.76 (2H, t, J=6.5 Hz), 3.64 (2H, br s), 6.19 (1H, d, J= 8.1 Hz), 6.56 (1H, d, J= 2.7 Hz), 6.63 (1H, dd, J= 8.4, 2.8 Hz), 7.15 (1H, d, J= 8.5 Hz), 7.91 (1H, d, J= 7.8 Hz). FAB-MS *m/z*: 565 ([M +H]<sup>+</sup>), 587 ([M + Na]<sup>+</sup>). HR-MS *m/z*: 565.2261 (Calcd for C<sub>30</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S: 565.2485).

**Procedure B: 9** (0.07 mmol) を DMF (0.2% トリエチルアミン含有, 11.1 mL) に溶解後, NBD-F または ABD-F (14.3 mg) を加え, 室温で 2 時間攪拌した。反応混合物に水を加え, 酢酸エチル-ジクロロメタン (1:1) で抽出後, 有機層を水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥後, 溶媒を留去した。得られた残留物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン:アセトン = 3:1) で精製した。回収した黄色油状物質を, 固相カートリッジに Bond Elut C18 (200 mg, 3 mL), 移動相にアセトニトリル-水を用いた SPE で精製した。

**17 $\alpha$ -[4-(7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)amino-1-butynyl]estra-1,3,5(10)-trien-3-ol (NBD-E2, 2b)**

黄色固体 (Procedure B による回収率 1%)。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.77 (3H, s), 2.77 (2H, t, J= 6.4 Hz), 3.72 (2H, br s), 6.43 (1H, d, J= 2.6 Hz), 6.45 (1H, d, J= 8.8 Hz), 6.50 (1H, dd, J= 8.4, 2.6 Hz), 6.88 (1H, d, J= 8.8 Hz), 8.48 (1H, d, J= 8.4 Hz). FAB-MS

$m/z$ : 503 ( $[M + H]^+$ ), 525 ( $[M + Na]^+$ ). HR-MS  $m/z$ : 503.2301 (Calcd for  $C_{28}H_{30}N_4O_5$ : 503.2294).

**17 $\alpha$ -{4-(7-Aminosulfonylbenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-yl)-amino-1-butynyl}estra-1,3,5(10)-trien-3-ol (ABD-E2, 2c)**

黄色固体 (Procedure B による回収率 4%).  $^1H$ -NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.80 (3H, s), 2.71 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 3.62 (2H, t,  $J = 6.6$  Hz), 6.30 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz), 6.45 (1H, d,  $J = 2.6$  Hz), 6.54 (1H, dd,  $J = 8.4, 2.6$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 8.4$  Hz), 7.89 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz). FAB-MS  $m/z$ : 537 ( $[M + H]^+$ ), 559 ( $[M + Na]^+$ ). HR-MS  $m/z$ : 537.2164 (Calcd for  $C_{28}H_{32}N_4O_5S$ : 537.2172).

## 5. スペクトル測定

精製した BD-E2 (**2a** – **2c**) の吸収スペクトルを紫外可視分光光度計で測定し、以下のモデル化合物のモル吸光係数 ( $\epsilon$ ) の値を参照し濃度を決定した; DBD-E2 (**2a**): DBD-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> メタノール溶液 ( $\epsilon = 1.06 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  at 442 nm)<sup>36</sup>, NBD-E2 (**2b**): NBD-NHCH<sub>3</sub> アセトニトリル溶液 ( $\epsilon = 2.30 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  at 458 nm)<sup>37</sup>, および ABD-E2 (**2c**): ABD-NHCH<sub>3</sub> アセトニトリル溶液 ( $\epsilon = 1.49 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$  at 426 nm). 定量後 BD-E2 溶液は溶媒を窒素気流で留去し、遮光して 4 °C で保存した.

疎水性環境における BD-E2 の蛍光強度変化を評価するため、メタノール–水における BD-E2 の蛍光強度を測定した. BD-E2 (最終濃度 0.5  $\mu M$ ) をエッペンチューブに入れ、溶媒を窒素気流で留去し、メタノール–水 (メタノール 0 – 100%) で溶解した. 各サンプルは Fluotrac 96 ウェルマイクロプレート (高結合, 平底) (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria) に 100  $\mu L$  ずつ入れた. 蛍光強度はマイクロプレートリーダーで測定した. 装置条件は以下の通りである; 測定温度: 25 °C, 励起波長: 428 nm (DBD-E2 および ABD-E2) または 465 nm (NBD-E2), 蛍



光波長: 546 nm (DBD-E2 および ABD-E2) または 533 nm (NBD-E2), 上方蛍光測定モード, Gain: 125, Flash frequency: 100 Hz, Number of flashes: 20.

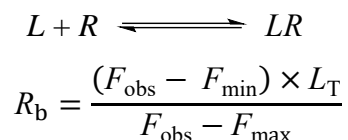
## 6. エストロゲン受容体結合アッセイ

BD-E2 と hr-ER $\alpha$  の結合アッセイを行うための full-length ER $\alpha$  は Thermo Fisher Scientific (MA, USA) から購入した. hr-ER $\alpha$  は  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し, 取り扱い中はボルテックスによる混合は行わなかった. 結合アッセイ用バッファーには 50 mM 塩化カリウム, 10% グリセロール, 0.1 mM ジチオスレイトール, 0.02% アジ化ナトリウム, および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ウシ $\gamma$ -グロブリンを添加した 10 mM トリス塩酸バッファー (pH 7.4) を使用した. すべての BD-E2 および競合物質はメタノールで標準溶液として調製し, 溶媒を窒素気流で除去した後, 結合アッセイ用バッファーに溶解した. マイクロプレートは, ブロックエース (1 % (w/v), Yukijirushi Co., Tokyo, Japan) に 0.1% アジ化ナトリウムを添加した液 200  $\mu\text{L}$  を入れ室温で 1 時間ブロッキング後, 結合アッセイ用バッファー 200  $\mu\text{L}$  で洗浄した. マイクロプレートリーダーの測定条件は以下の通りである; 測定温度:  $25^{\circ}\text{C}$ , 励起波長: 428 nm (DBD-E2 および ABD-E2) または 465 nm (NBD-E2), 蛍光波長: 546 nm (DBD-E2 および ABD-E2) または 533 nm (NBD-E2), 上方蛍光測定モード, Gain: 180, Flash frequency: 100 Hz, Number of flashes: 20.

## 7. 飽和結合試験

BD-E2 と hr-ER $\alpha$  の親和性を調べるために直接結合アッセイを実施した. BD-E2 (最終濃度 1 nM) に対し, hr-ER $\alpha$  の最終濃度を 0.8 – 160 nM (0.8, 1.6, 4, 6, 8, 16, 40, 60, 80, 120, および 160 nM) に調製した. マイクロプレートに BD-E2 溶液を 50  $\mu\text{L}$  ずつ分注し ( $n = 3$ ), 異なる濃度の hr-ER $\alpha$  溶液 50  $\mu\text{L}$  を加えた後, 遮光し室温で放置した. 反応開始後 20, 30, 40, 50, および 60 分後に各サンプルの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した. 蛍光強度の測定値 ( $F_{\text{obs}}$ ) の平均

値を，以下の式を用いて BD-E2-hr-ER $\alpha$  複合体濃度 ( $R_b$ ) に変換した．飽和結合曲線は， $F_{obs}$  対 総受容体濃度 ( $R_T$ ) をプロットした．



$L$ : 遊離リガンド (Free)

$R$ : 遊離受容体

$LR$ : リガンド-受容体複合体 (Bound)

$F_{max}$ : 飽和結合時のリガンドの蛍光強度

$F_{min}$ : リガンド単独の蛍光強度 (negative control)

$L_T$ : 総リガンド濃度

これらの計算に基づいて Scatchard および Hill 解析を行った．Scatchard プロットは， $B/F$  対  $B$  の式を元に， $-([LR] - [B_{max}])/K_d$  対  $R_f$  をプロットした．

$$\frac{[LR]}{[L]} = -\frac{1}{K_d} [L] = -\frac{1}{K_d} ([LR] - [B_{max}])$$

$$R_f = R_T - R_b$$

$$B/F = \frac{R_b}{R_f} = -\frac{1}{K_d} ([LR] - [B_{max}])$$

$K_d$ : 解離定数

$B_{max}$ : リガンド-受容体複合体の最大濃度

$R_f$ : 遊離受容体濃度

受容体が  $n$  量体であり，リガンドが個々の  $n$  個の結合部位に結合するとき，以下の Hill の式が成立する．Hill プロットは， $[LnR]/[L]$  対  $R_f$  を元に， $\log(B/B_{max} - B)$  対  $\log [L]$  をプロットした．Hill プロットにおいて，非線形最小二乗フィッティングの近似式が  $y = ax^b$  のとき， $b$  は Hill 係数 ( $n$ ) に相当する．リガンドの解離定数 ( $K_d$ ) は  $(1/a)^{1/b}$  から算出した．

$$nL + R \rightleftharpoons LnR$$

$$\frac{[LnR]}{[R_T]} = \frac{B}{B_{\max}} = \frac{[L]^n}{K_d + [L]^n}$$

$$\log \frac{B}{B_{\max} - B} = n \log [L] - \log K_d$$

## 8. 競合結合試験

試験化合物が BD-E2 を hr-ER $\alpha$  から置換する能力を評価するために、競合結合アッセイを実施した。最初に hr-ER $\alpha$  (最終濃度 16 nM) と BD-E2 (最終濃度 10 nM) をガラス試験管中で混合し、BD-E2-hr-ER $\alpha$  複合体を形成させた。マイクロプレートに異なる濃度の競合物質溶液を 50  $\mu$ L ずつ分注し ( $n = 3$ ), BD-E2-hr-ER $\alpha$  複合体溶液 50  $\mu$ L を加えた後、遮光し室温で放置した。反応開始後 20, 30, 40, 50, および 60 分後に各サンプルの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。 $F_{\text{obs}}$  の平均値を、以下の式を用いて阻害率 (%Inhibition) に変換した。阻害曲線は、%Inhibition 対 総競合物質濃度 ( $C_T$ ) をプロットし、非線形最小二乗曲線フィッティングにより解析した。

$$\% \text{Inhibition} = \frac{F_0 - F_{100}}{F_{\text{obs}} - F_{100}} \times 100$$

$F_0$ : リガンド-受容体複合体の蛍光強度 (positive control)

$F_{100}$ : リガンド単独の蛍光強度 (negative control)

競合物質-受容体複合体濃度 ( $B_c$ ) と遊離競合物質濃度 ( $F_c$ ), および  $B/F$  比を以下の式を用いて算出した。リガンド-受容体複合体の総濃度 ( $B_T$ ) は、飽和結合試験で求めた数値を参照した。

$$B_c = \frac{\% \text{Inhibition}}{100} \times B_T$$

$$F_c = C_T - B_c$$

$$B/F = \frac{B_T - B_c}{B_c}$$

$B_T$ : リガンド-受容体複合体の総濃度

$C_T$ : 総競合物質濃度

これらの計算に基づいて pseudo-Hill 解析を行った。Pseudo-Hill プロットは、競合物質の  $B/F$  比対  $F_c$  をプロットした。Pseudo-Hill プロットにおいて、非線形最小二乗フィッティングの近似式が  $y = ax^b$  のとき、 $b$  は Hill 係数 ( $n$ ) に相当し、 $(1/a)^{1/b}$  から 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) が算出される。各競合物質の相対結合親和性 (relative binding affinity, RBA) は、E2 の  $IC_{50}$  を競合物質の  $IC_{50}$  で割ることにより算出した。競合物質の阻害定数 ( $K_i$ ) は、以下に示す Kenakin<sup>38)</sup> の相関式を用いて求められた。

$$K_i = \frac{0.5B_T \times IC_{50} \times K_d}{[L_T \times R_T] + 0.5B_T \times (R_T - L_T + 0.5B_T - B_T)}$$

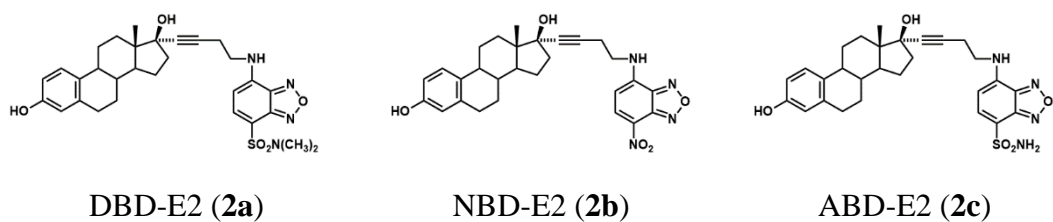
$K_d$ : リガンドの解離定数

### 第三節 BD-E2 の合成および蛍光特性の評価

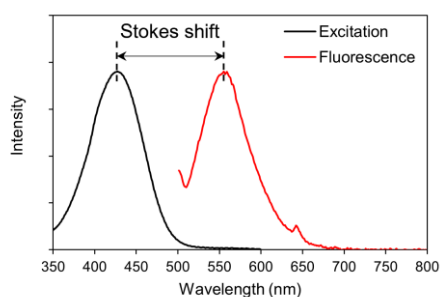
はじめに、蛍光標識リガンド BD-E2 の合成を行った。受容体結合部位であるエストラジオールの構造は F-E2<sup>28,29)</sup> を参考とし、末端にアミノ基を有する C4 のスペーサーを結合したものを合成した (Figure 2-1)。リガンドに導入するフルオロフォアは、励起・蛍光特性や試薬のアミノ基との反応性を考慮し、フルオロベンゾフラザンである DBD-F, NBD-F, および ABD-F を使用した。合成した 17 $\alpha$ -置換エストラジオール (9) に対し、各フルオロベンゾフラザン試薬を反応することで BD-E2 誘導体 2a–2c を得た (Figure 3-1)。

上記の BD-E2 (2a–2c) について、各種溶液中における蛍光特性を調べた。メタノール中の ABD-E2 の励起および蛍光スペクトルを Figure 3-2 に示す。また、アセトニトリル、エタノール、およびメタノール中の BD-E2 (5  $\mu$ M) の励起・蛍光波長を Table 3-1 にまとめた。一般に、ストークスシフトの大きい蛍光物質ほど励起・蛍光スペクトルの重なりが小さくなり、励起光によるバックグラウンドを抑制できるとされている。BD-E2 のストークスシフトは約 120 nm (DBD-E2 および ABD-E2)、または 70 nm (NBD-E2) であった。

BD-E2 が受容体と相互作用した場合の蛍光強度の変化を推定するため、メタノール–水の混合溶液中における BD-E2 (0.5  $\mu$ M) の蛍光強度を測定した。Figure 3-3 に示すように、BD-E2 の蛍光測定値 ( $F_{\text{obs}}$ ) は溶液中のメタノールの割合に比例して増加した。水溶液中で遊離 BD-E2 の蛍光強度は小さく、疎水性環境下では蛍光強度の増加が確認できたことから、BD-E2 と ER の相互作用に伴う蛍光強度の変化量から ER との結合親和性が推定できる可能性がある。



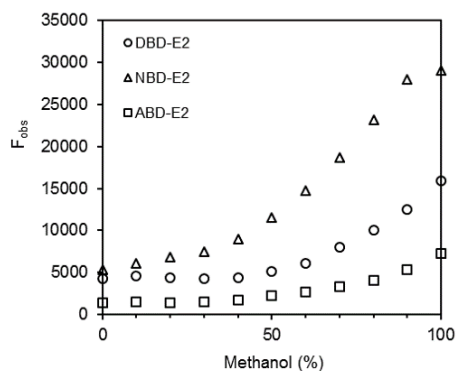
**Figure 3-1. Structures of BD-E2 derivatives.**



**Figure 3-2. Excitaion and fluorescence spectra of ABD-E2 in methanol.**

**Table 3-1. Absorption and emission data of benzofurazan-labeled compounds in three solvents.**

Solvent	Acetonitrile		Ethanol		Methanol	
	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)
DBD-E2	427	542	430	544	429	552
NBD-E2	462	533	467	529	466	537
ABD-E2	427	548	428	555	428	555



**Figure 3-3. The fluorescence intensities of BD-E2 compounds (0.5  $\mu$ M) were measured using fixed excitation and fluorescence wavelength for various proportions of methanol in water. The excitation wavelengths used were 428 (DBD-E2, ABD-E2) or 465 nm (NBD-E2) and emission was detected at 546 (DBD-E2, ABD-E2) or 533 nm (NBD-E2), respectively.**

#### 第四節 ヒト組換えエストロゲン受容体を用いた飽和結合アッセイ

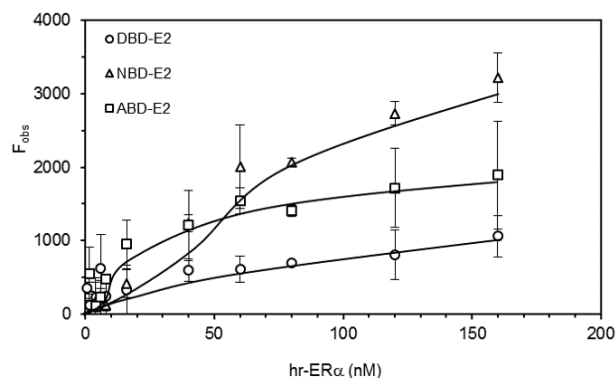
合成した BD-E2 と ER の相互作用のパラメーターを評価するため、hr-ER $\alpha$  を用いた飽和結合試験を実施した。飽和結合試験は、リガンドと受容体を定常状態までインキュベートすることで、リガンドの親和性および受容体結合部位数などを測定する方法である<sup>39)</sup>。放射性同位元素で標識したリガンドを用いる場合、高濃度のリガンドで受容体を飽和させた全結合と、非放射性リガンド存在下の結合（非特異的結合）を差し引くことで特異的結合を算出する。一方、FP法では前述した通り  $B/F$  分離せずに偏光度を測定するため、蛍光標識リガンド濃度を固定し高濃度の受容体で飽和させて結合能を評価する<sup>28)</sup>。BD-E2 の飽和結合試験は後者に準拠して実施した。

BD-E2 と hr-ER $\alpha$  の複合体が形成されると、遊離 BD-E2 (hr-ER $\alpha$  非存在下) と比較して  $F_{\text{obs}}$  が増加した。Figure 4-1 に BD-E2 を用いた飽和結合試験の結果を示す。いずれの BD-E2 においても、hr-ER $\alpha$  の濃度依存的に  $F_{\text{obs}}$  が増加するシグモイド曲線を示した。NBD-E2 (1 nM) の  $F_{\text{obs}}$  は、同じ濃度の DBD-E2 および ABD-E2 より高かった。一方、ABD-E2 の  $F_{\text{obs}}$  は hr-ER $\alpha$  濃度 160 nM 付近でほぼ飽和結合しているのを確認した。

次いで、BD-E2 と hr-ER $\alpha$  間の結合部位数と  $K_d$  を求めるため Scatchard 解析を実施した。Figure 4-2A に ABD-E2 の Scatchard プロットを示す。本研究で合成した BD-E2 の Scatchard 曲線はいずれも凸型の形状を示した。Scatchard プロットが直線とならない場合、複数の受容体が存在する（高親和性部位と低親和性部位が存在する）、またはリガンド結合により受容体の結合定数が変化することが考えられる<sup>39)</sup>。BD-E2 と hr-ER $\alpha$  の相互作用には協同性があると考えられるが、凸型の Scatchard 曲線から  $K_d$  を算出することはできないため、引き続き Hill 解析を行った。ABD-E2 の Hill プロットを Figure 4-2B に示す。Hill 解析から得られた BD-E2 の  $K_d$  と Hill 係数を Table 1-2 にまとめた。

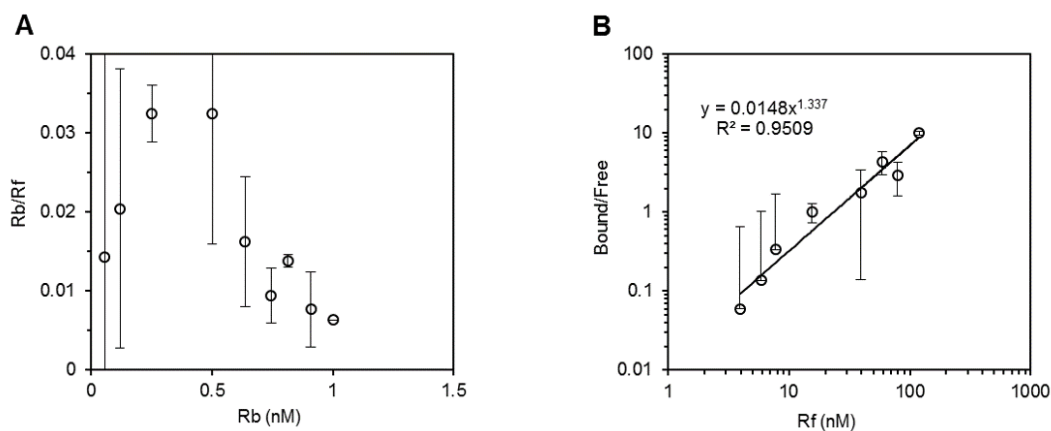


BD-E2 の hr-ER $\alpha$  に対する親和性は、F-E2 ( $K_d = 10.4$  nM)<sup>28,29)</sup> と比較してやや弱い程度であった。本研究で合成したリガンドの Hill 係数は NBD-E2 > ABD-E2 > DBD-E2 だった。これらの結果は、BD-E2 のベンゾフラザン骨格の置換基 (R) の電子受容能 ( $\text{NO}_2 > \text{SO}_2\text{NH}_2 > \text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ )<sup>37)</sup> に関連していることが示唆される。Hill 係数が 1 より大きいことは、受容体にリガンドの結合部位が 2 つ以上あり、最初のリガンド結合によりタンパク質の構造変化が誘導され、別のリガンドの親和性が増加することを示している (正の協同性)。また、リガンド結合により ER の立体構造変化と二量体化が誘導されることが報告されている<sup>28,40,41)</sup>。今回合成した NBD-E2 および ABD-E2 の Hill 係数は、トリチウム標識 E2 や F-E2 より低値であった。



**Figure 4-1. Saturation binding assay using BD-E2 compounds.**

Increasing concentrations of hr-ER $\alpha$  were incubated with 1 nM of each BD-E2 compound for 1 hr. Fluorescence was then measured. The binding isotherms of hr-ER $\alpha$  and BD-E2 compounds (DBD-E2, NBD-E2, and ABD-E2) are represented. Data represent means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).



**Figure 4-2. Scatchard (A) and Hill plot (B) analyses of ABD-E2-hr-ER $\alpha$  interactions.** Data represent means  $\pm$  standard deviations. ( $n = 3$ ).

**Table 4-1. Binding parameterd of benzofurazan-labeled compounds.**

Compound	$K_d$ (nM)	Hill coefficient
DBD-E2	32.0	0.73
NBD-E2	47.0	1.39
ABD-E2	23.4	1.34

## 第五節 ヒト組換えエストロゲン受容体を用いた競合結合アッセイ

今回合成した BD-E2 を用いた競合結合試験を行うため、最初に適切なリガンドと測定条件の検討を行った。理想的には、蛍光リガンドは受容体に対する結合親和性と検出可能な蛍光強度を保持する必要がある。そこで、Hill 係数が 1 より大きい NBD-E2 と ABD-E2 を用いて、hr-ER $\alpha$  (16 nM) におけるリガンド-受容体複合体の蛍光強度 ( $F_0$ ) と遊離リガンドの蛍光強度 ( $F_{100}$ ) の差を比較した。その結果、ABD-E2 使用時の  $F_0$  と  $F_{100}$  の差は NBD-E2 の場合よりも大きかった。したがって蛍光強度の低下が、試験化合物が BD-E2 を hr-ER $\alpha$  からの置換に基づくかを確認するため、競合結合アッセイに使用する蛍光リガンドとして ABD-E2 を選択した。

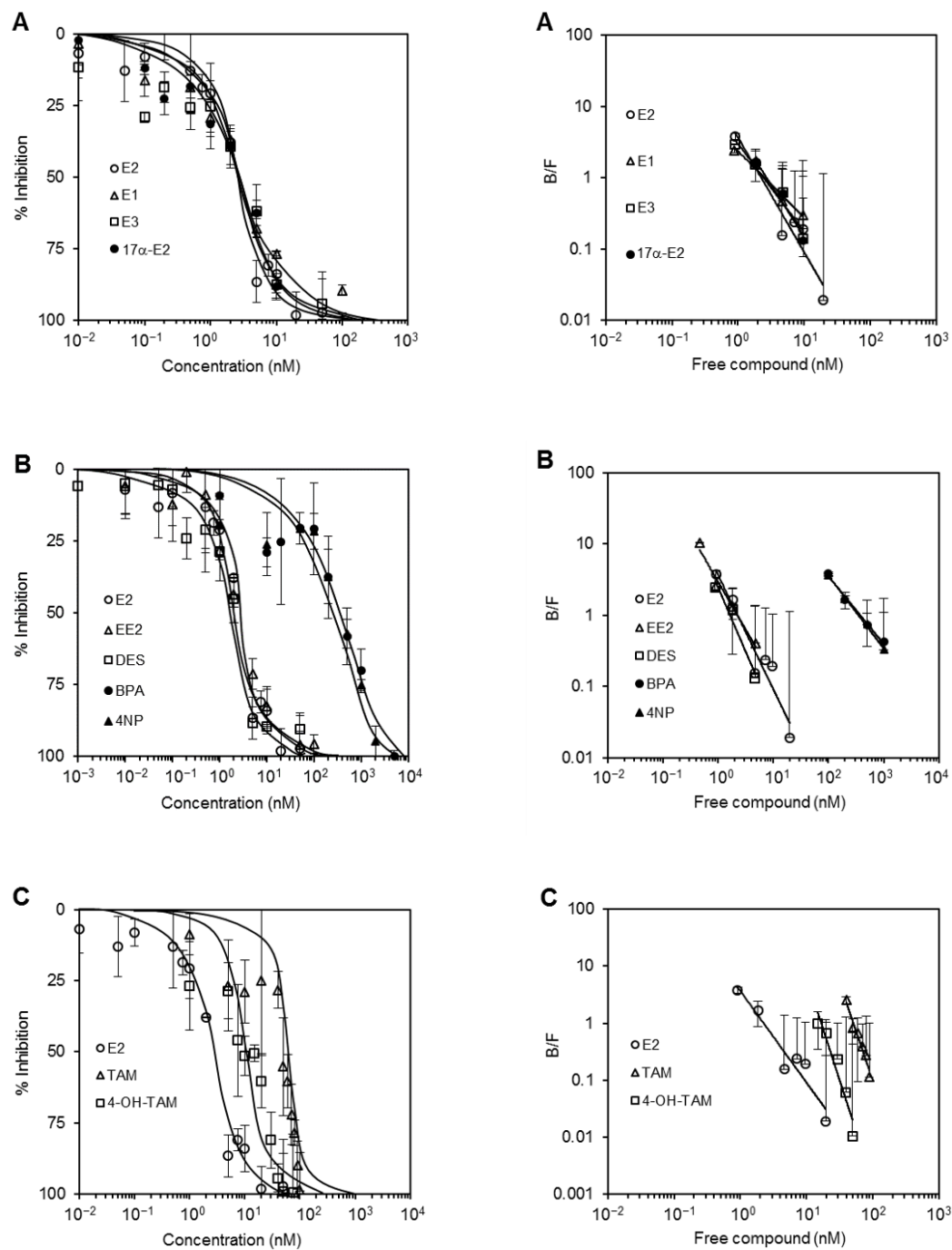
ABD-E2 と非標識 E2 の競合結合アッセイの結果を Figure 5-1A に示す。左図の阻害曲線が示すように、競合物質の濃度の上昇に伴い BD-E2-hr-ER $\alpha$  複合体から BD-E2 が置換されると、 $F_{obs}$  の減少が観察された。右図の pseudo-Hill プロットから競合物質の IC<sub>50</sub> を求めた後、飽和結合アッセイで得られた ABD-E2 の  $K_d$  を用いて競合物質の  $K_i$  を算出した<sup>38)</sup>。本研究で得られた非標識 E2 の  $K_i$  は 0.10 nM であり、放射性リガンドを用いた既報の  $K_i$  と同程度であった<sup>20)</sup>。この結果から、ABD-E2 は非標識 E2 によって hr-ER $\alpha$  結合部位から明らかに置換されたことが示している。また、非標識 E2 の hr-ER $\alpha$  への結合で得られた Hill 係数は 1.61 であり、F-E2 による競合結合試験で得られた値と類似していた<sup>28,29)</sup>。このことから、ABD-E2 の正の協同性が hr-ER $\alpha$  に対して F-E2 の場合と同様の構造変化を引き起こすことが示唆された。

次に、競合結合アッセイを使用して、内因性エストロゲン、医薬品および工業用化学物質を含む計 10 種類の化合物の hr-ER $\alpha$  に対する親和性を調べた。試験化合物の阻害曲線および pseudo-Hill プロットを Figure 5-1A – C に示す。今回試験した化合物のほとんどはシグモイド曲線を示し、これらが hr-ER $\alpha$  から

ABD-E2 を置換したことを示唆している。試験した化合物の阻害パラメーターを Table 5-1 にまとめた。

本研究で得られた競合結合試験の結果を既報の値と比較するため、E2 の IC<sub>50</sub> を基準とする 9 種類の試験化合物の相対結合親和性 (RBA) を算出した。内因性エストロゲン (E2, E1, E3, 17 $\alpha$ -E2) の結合活性について RBA を基に比較すると E2 > E3 > E1 > 17 $\alpha$ -E2 であった。本研究における E1 と E3 の IC<sub>50</sub> は、F-E2 で得られた値よりも低値だった (E1 = 9.9 nM, E3 = 5.0 nM)<sup>28,29</sup>。また、医薬品 (EE2, TAM, 4-OH-TAM) と工業用化学物質 (DES, BPA, 4NP) の結合活性は DES > EE2 > 4-OH-TAM > TAM > 4-NP > BPA であった。ABD-E2 で得られた RBA, および文献で報告されている F-E2 の RBA の対数を比較することで、本法の妥当性を検討した (Figure 5-2A)。その結果、両者には明確な相関関係が認められた。

Ohno らの報告<sup>29)</sup> では、エストロゲン様化合物の化学構造とエストロゲン様活性の関係が検討され、各化合物の Hill 係数 ( $n$ ) に基づいてアゴニスト ( $n \approx 1.6$ ), 部分的アゴニスト ( $n \approx 1$ ), およびアンタゴニスト ( $n > 2$ ) に分類することができる結論付けた。そこで、本研究で得られた Hill 係数を用いて同様の評価を行った。DES と EE2 は強力なエストロゲン様化合物として知られ、今回得られた Hill 係数はそれぞれ 1.80, 1.34 だった。Hill 係数の大小関係は F-E2 で得られた値と反対 (DES = 1.59, EE2 = 1.73) であるが、これらの結果はリガンド構造の違いに起因すると考えられる。対照的に、TAM および 4-OH-TAM は、エストロゲン依存性乳がんの治療に使用される抗エストロゲン薬である。本研究で得られた TAM の Hill 係数 (3.42) は、F-E2 で評価した値より 40% 増加したが、Ohno らの分類におけるアンタゴニストの基準を満たしている。したがって、全体として、ABD-E2 を用いた競合結合アッセイの結果は以前に発表されたものを再現していると結論付けた。ABD-E2 および F-E2 で得られた Hill 係数の相関関係を Figure 5-2B に示す。以上の結果から、ABD-E2 による競合結合アッセイで得られた値と FP 法の文献値との間に明確な相関関係が確認された。

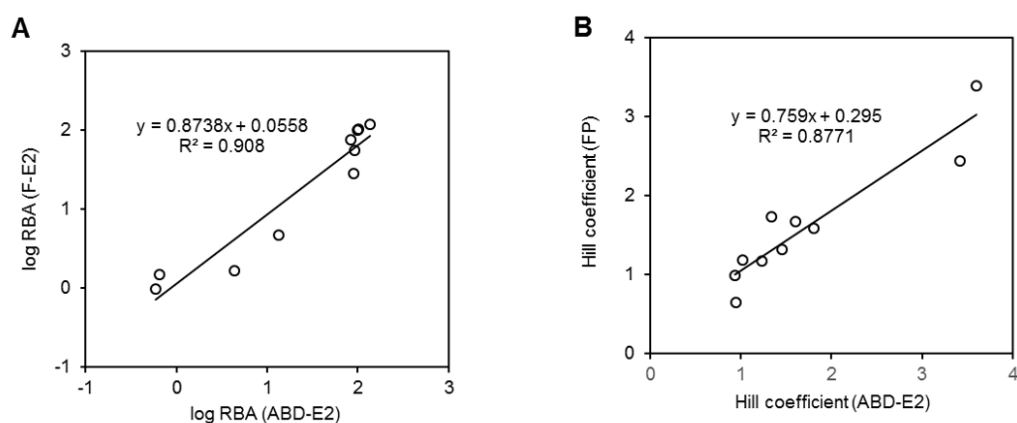


**Figure 5-1. Inhibition curves (left) and pseudo-Hill plots (right) of estrogenic compounds by the proposed competitive binding assay using ABD-E2.**

(A) Physiological estrogens, (B) agonists, (C) antagonists. Data represent means  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ).

**Table 5-1.** Binding parameters of the tested compounds.

Compound	IC <sub>50</sub> (nM)	RBA (%)	Log RBA	K <sub>i</sub> (nM)	Hill coefficient
E2	2.24	100	2.00	0.11	1.61
E1	2.53	88.71	1.95	0.13	0.93
E3	2.43	92.33	1.97	0.12	1.23
17 $\alpha$ -E2	2.70	82.99	1.92	0.13	1.46
EE2	2.23	100.54	2.00	0.11	1.34
DES	1.64	136.64	2.14	0.08	1.80
BPA	377.56	0.59	-0.23	18.71	0.95
4NP	347.96	0.64	-0.19	17.24	1.02
TAM	51.04	4.39	0.64	2.53	3.42
4-OH-TAM	16.70	13.43	1.13	0.83	3.60



**Figure 5-2.** Correlations between the binding affinity (A) or Hill coefficient (B) of competitors obtained for hr-ER $\alpha$  and ABD-E2 interactions, and the FP method using F-E2<sup>29</sup>). The log RBA and Hill coefficient obtained with ABD-E2 and those obtained with F-E2 are plotted on the X and Y axes, respectively.

## 第六節 小括

本章では、測定原理が簡便かつ高効率な ER 結合アッセイの開発を目的として、ベンゾフラザン標識蛍光リガンドの合成, および結合活性を評価した. **BD-E2** は、水溶液中ではほとんど蛍光を発しない一方で、疎水性環境では高い蛍光強度と大きなストークスシフトを伴う分光特性を示した. 蛍光強度の変化に基づく結合リガンドの評価により、簡単、迅速、かつ信頼性の高い ER 結合アッセイを確立した. この蛍光ベースの ER 結合アッセイを通じて得られた結合特性は、FP 法および放射線活性リガンドを使用する従来法によって得られた結果と良好な相関関係を示した. 一方、ベンゾフラザン骨格の電子受容性の向上は、**BD-E2** の ER への結合親和性の増加に寄与すると予想される. さらに転写活性、すなわち ER のアゴニズム/アンタゴニズムを評価するには、**BD-E2** と ER の結合メカニズムのさらなる研究が必要である.

本研究で開発した結合アッセイによるアプローチは、エストロゲン化合物のハイスループットスクリーニングだけでなく、薬剤の発見や細胞イメージングの研究にも役立つ貴重なツールとなることが期待される.

## 第二章 ニトロキシラジカルを用いたアルコールの電気化学検出

### 第一節 序論

免疫抑制薬であるシクロスポリン (cyclosporin A, CSA) は、主に骨髄移植における拒絶反応の抑制、ベーチェット病、再生不良性貧血、ネフローゼ症候群などの自己免疫疾患の治療に使用される。CSA は 11 個のアミノ酸を含む親油性の環状ペプチド<sup>42)</sup> で、T 細胞受容体タンパク質のシクロフィリンに結合し、この複合体はサイトカインの産生を抑制するカルシニューリン阻害剤として作用する。CSA は有効な治療範囲が狭いため TDM の対象とされており、免疫抑制療法中は血中濃度と臨床所見の対比が必要である。

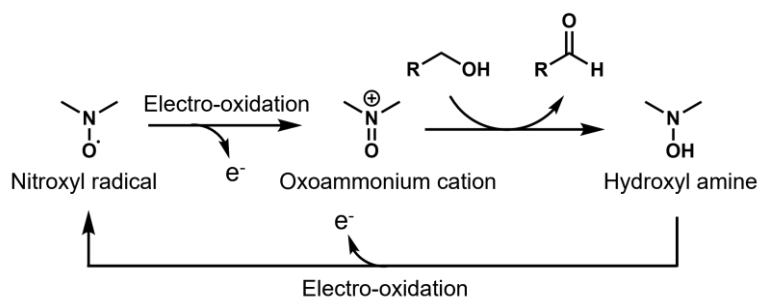
臨床現場における TDM の多くは、イムノアッセイまたは液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC-MS/MS) によって実施されている。全血中 CSA 濃度を測定するための主な市販キットは、酵素多重免疫測定法 (EMIT)、アフィニティーカラム媒介免疫測定法 (ACMIA)<sup>43)</sup>、化学発光免疫測定法 (CLIA)<sup>44)</sup> などの免疫測定法、および電気化学発光イムノアッセイ (ECLIA)<sup>45,46)</sup> に基づいて開発されている。これらのイムノアッセイは簡単で信頼性が高い一方で、得られる血中薬物濃度は抗体と各方法の検出原理に依存する。さらに、イムノアッセイは交差反応により、LC-MS/MS と比較して血中濃度の過大評価が引き起こされることがしばしばある。これに対し、LC-MS/MS 法は感度と特異性が高く、免疫抑制薬とその代謝産物を同時にモニタリングできる利点がある<sup>47-49)</sup>。しかし、LC-MS/MS は装置の操作プロトコルを習得する必要がある、これらの維持管理も重要な課題となる。

電気化学分析は、臨床化学において迅速、簡便に分析対象物質を測定するのに適した技術として応用されている。現在、酵素を電極表面に固定化した酵素電極 (バイオセンサー) は、グルコース、尿素、乳酸、アミノ酸、およびアルコ



ールの定量などに用いられている。バイオセンサーでは、電極上の酵素反応で生成される過酸化水素の電気分解、または NADH を酸化・還元することで得られる電流値から基質濃度が決定される<sup>50,51)</sup>。直接、電極応答を示さない化合物であっても、対応する酵素を電極表面に固定化することで選択性の高いバイオセンサーを構築することができる。しかし、一般に酵素は高価であり、長期安定性や製造ロットの不均一性に問題があり、酵素反応を起こさない分子を対象としたバイオセンサーの構築は困難、などの課題が認知されている。

そこで酵素反応に依らず、電気信号に基づいて基質濃度を決定するために、Sato らは 2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル (TEMPO) などの有機触媒の使用を検討した<sup>52)</sup>。TEMPO は安定したフリーラジカル触媒であり、有機合成においてアルコールの酸化に適切な再酸化剤と組み合わせて使用される<sup>53-55)</sup>。電気化学において、アルコール酸化は塩基性水性条件下または有機溶媒中で電位を印加することによって触媒される<sup>56,57)</sup>。ニトロキシルラジカル触媒を用いたアルコールの酸化反応の概略を Figure 6-1 に示す。一連の反応で得られる酸化電流は溶液中のアルコール濃度に比例するため、アルコールや分子内にヒドロキシ基を持つ化合物の定量が可能である<sup>58)</sup>。



**Figure 6-1. Alcohol detection scheme using nitroxyl radical compounds.**

本章では、最初にさまざまなニトロキシルラジカル化合物について、有機溶媒中のアルコールの電気化学的酸化能力を評価した。ニトロキシルラジカルとアルコールが共存する溶液中に電極を配し、電位を繰り返し掃引するサイクリックボルタンメトリー (CV) を行うことで、アルコール酸化における触媒特性

を評価した。その結果、最も活性の高かったノルトロピン-*N*-オキシル (NNO) を使用し、分子内にヒドロキシ基を持つ医薬品である CSA の電気化学検出について検討した。

## 第二節 実験方法

### 1. 試薬および材料

TEMPO, 4-アセトアミド-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル (A-TEMPO), 2-ヒドロキシ-2-アザアダマンタン (AZADOL), および *N*-ヒドロキシフタルイミド (NHPI) は Tokyo Chemical Industry から購入した. AZADOL は酸化によって 2-アザアダマンタン-*N*-オキシル (AZADO) に変換され, アルコールに対して AZADO と同等の酸化活性を有することが報告されている<sup>59-61)</sup>. NNO<sup>52)</sup> およびノル-2-アザアダマンタン-*N*-オキシル (Nor-AZADO)<sup>62)</sup> は文献に従って合成された. CSA は Nacalai Tesque から購入した. 本章で使用したニトロキシルラジカル化合物と NHPI の化学構造を Figure 7-1 に示す.

### 2.2 電気化学測定

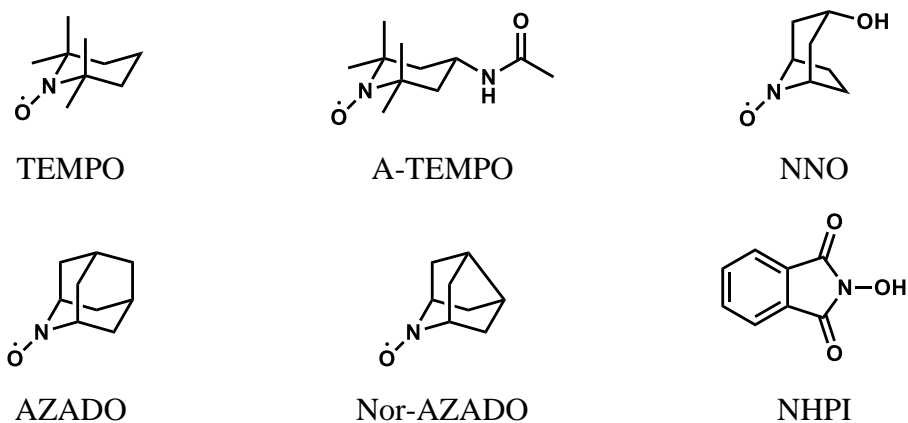
CV は電気化学分析装置 (ALS660B, BAS, Tokyo, Japan) を用いて測定した. 電極は GC 電極 (直径 3 mm) を作用電極, 白金線を対電極, Ag/AgCl (3 M KCl) を参照電極とする 3 電極系で測定した. 試験溶液は 100 mM 過塩素酸テトラブチルアンモニウム (TBAP) のアセトニトリル溶液 (TBAP バッファー) を溶媒として使用した. 電位の補正は, 1 mM フェロセン (Fc) の TBAP バッファー溶液の測定データを基準とした. すべての測定は室温 (約 20 °C) で実施した.

ニトロキシルラジカルの酸化電流測定では, アルコール (最終濃度 10 mM), 2,6-ルチジン (最終濃度 20 mM) の TBAP バッファー溶液に対し, 触媒 (最終濃度 1 mM) の TBAP バッファー溶液を加えた後, 電極を入れて電位を印加した. 掃引速度は 10, 50, 100 mV/s のいずれかに設定し, 第 3 週のサイクリックボルタモグラムにおける酸化電流のピーク値を記録した. 触媒のアルコール酸化活性は, アルコールの存在下と非存在下での酸化電流値の差 ( $\Delta I_p$ ) として評価した. CSA の定量では, 触媒として NNO (最終濃度 0.1 mM) の TBAP バッファー溶液

を使用した. CSA と 2,6-ルチジン (最終濃度 20 mM) を 0.1 mM NNO の TBAP バッファー溶液に溶解した後, 電極を入れて電位を印加した. 掃引速度は 50 mV/s に設定し, CSA 存在下と非存在下での酸化電流値の差を  $\Delta I_p$  とした. 検量線は,  $\Delta I_p$  対 CSA 濃度をプロットした.

### 2.3 ニトロキシラジカルと再酸化剤の使用によるアルコール酸化

ニトロキシラジカルのアルコール酸化における触媒効率を評価するため, 再酸化剤を用いた検討を以下の手順に従って実施した. アルコール (3-フェニル-1-プロパノールまたは 4-フェニル-2-ブタノール; 1.0 mmol) およびニトロキシラジカル化合物 (TEMPO, AZADO, または NNO; 10  $\mu$ mol) のジクロロメタン (0.50 mL) 溶液に, ジアセトキシヨードベンゼン (1.1 mmol) を室温で加えた. その後, 反応混合物を室温で攪拌し続けた. 反応生成物のモニタリングは, HP-5 capillary column (0.32 mm  $\times$  30 m, 0.25  $\mu$ m, Agilent Technologies) を装備した 7890A GC システム (Agilent Technologies) によって実施した.



**Figure 7-1. Chemical structures of the nitroxyl radical compounds and NHPI used in this study.**

### 第三節 ニトロキシラジカル化合物のアルコール酸化評価

はじめに、代表的なニトロキシラジカル化合物および NHPI の触媒活性を、5 種類のアルコールを用いて評価した。アルコール存在下における NNO のサイクリックボルタモグラムの Figure 8-1 に示す。使用したアルコールは第一級アルコール (エタノール, ベンジルアルコール) および第二級アルコール (2-プロパノール, シクロヘキサノール, 1-フェニルエタノール) で、掃引速度 10, 50, 100 mV/s で CV 測定を実施した。アルコールの存在下では, Fc/Fc<sup>+</sup> 電位に対して +0.4 V の酸化電流値 ( $\mu\text{A}$ ) が増加した。酸化能力は、アルコールの存在下と非存在下での酸化電流値の差 ( $\Delta I_p$ ) で評価した。Figure 6-1 で先述した通り、電位を印加すると、NNO のニトロキシラジカルは酸化されてオキソアンモニウムイオンになり活性化される<sup>63,64</sup>。オキソアンモニウムイオンは溶液中のアルコールによって還元された後、電極で再酸化を受けオキソアンモニウムイオンが再生される<sup>57</sup>。このサイクルが CV 掃引速度に比べて十分に速い場合、 $\Delta I_p$  は増加する<sup>65,66</sup>。種々のニトロキシラジカル化合物の反応性を評価するために、アセトニトリル中でアルコール存在下における CV を測定した結果を Table 8-1 にまとめた。

NNO は中性 pH におけるエタノールや 2-プロパノールの検出で、TEMPO より高い触媒活性を示すことが報告されている<sup>52</sup>。アセトニトリル中における測定で、NNO は今回測定した触媒の中で最も高い反応性を示し、第一級だけでなく第二級アルコールに対しても高い電流応答性を示した。一方、掃引速度を 50 から 100 mV/s に増加しても、NNO では  $\Delta I_p$  の有意な変化は観察されなかった。

既存の方法で広く使用されている TEMPO についても同じ条件で測定を行ったが、いずれのアルコールに対しても酸化電流に有意な変化は見られなかった。TEMPO はニトロキシ基の近傍の立体障害が大きく、酸化反応が進みにくいことが指摘されている。対照的に、TEMPO の 4 位にアセトアミド基が置換した

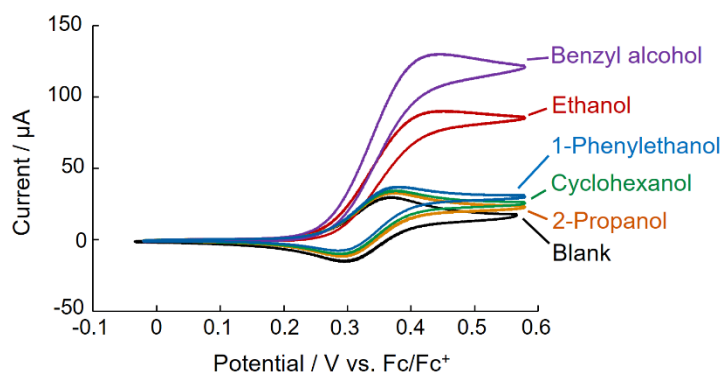
A-TEMPO では、すべてのアルコールで酸化電流の変化が確認された。TEMPO にアセトアミド基を導入することで、有機溶媒中でニトロキシラジカルの反応性が増加し、一連の電解酸化が進行したことが示唆される。

AZADO<sup>61)</sup> は、TEMPO の立体障害を低減した二環式ニトロキシラジカルであるが、電気化学的条件下での AZADO の触媒性能についてはほとんど報告されていない。今回の検討結果から、アセトニトリル中で AZADO の触媒により第一級アルコールは酸化が進行するが、第二級アルコールでは酸化が進行しないことが判明した。AZADO から炭素が 1 つ減少した Nor-AZADO では  $\Delta I_p$  の増加を示した。しかし AZADO と同様に、第二級アルコールでは酸化が起らず、掃引速度が増加するにつれて酸化電流が減少した。N,N-ジアシル型ヒドロキシラジカルである NHPI は、他のニトロキシラジカル化合物とは異なる反応経路でアルコールを酸化することが知られている<sup>67,68)</sup>。今回の検討では、NHPI 触媒によりエタノールを除くすべてのアルコールで酸化が進行した。

今回検討した 6 種類のニトロキシラジカル化合物の触媒活性について、ベンジルアルコールを掃引速度 50 mV/s で測定した  $\Delta I_p$  を用いて比較した。TEMPO ではベンジルアルコールの酸化は進行しなかったが、A-TEMPO ( $\Delta I_p = 3.4 \mu\text{A}$ ) < AZADO (3.9  $\mu\text{A}$ ) < NHPI (5.8  $\mu\text{A}$ ) < Nor-AZADO (12.4  $\mu\text{A}$ ) と、反応性の改善が認められた。しかし、NNO は今回検討したすべてのアルコールで高い酸化反応性を示し、ベンジルアルコールでは最も高い  $\Delta I_p$  を示した (108.8  $\mu\text{A}$ )。また、NNO の第二級アルコールに対する触媒活性を掃引速度 50 mV/s で比較すると、2-プロパノール ( $\Delta I_p = 4.7 \mu\text{A}$ )、シクロヘキサノール (7.3  $\mu\text{A}$ )、1-フェニルエタノール (11.0  $\mu\text{A}$ ) であり、第一級に比べて反応性は低いものの第二級アルコールでも電流変化が観察された。これらの結果から、NNO は水系だけでなく有機溶媒中においてもアルコール酸化の触媒活性が高いことが明らかになった。

ニトロキシラジカル部分の立体障害が少ない AZADO および Nor-AZADO は、有機合成におけるアルコール酸化に対して高い触媒活性を示すことが報告

されている<sup>60-62)</sup>。しかし興味深いことに、今回の CV 条件下で AZADO はほとんど酸化電流を示さず、Nor-AZADO は NNO よりもはるかに小さい酸化電流を示した。そこで、ニトロキシラジカルアルコール酸化について、電位の印加の代わりに再酸化剤を用いた場合の触媒活性を評価した。NNO, AZADOL, および TEMPO のアルコール酸化反応について、ジアセトキシヨードベンゼン<sup>69)</sup>を再酸化剤として使用した結果を Table 8-2 にまとめた。第一級アルコールである 3-フェニル-1-プロパノールの酸化では、NNO は最短の 2 時間で収率 99% に到達した (entry 1)。AZADO と TEMPO は、それぞれ 6 時間 (entry 2) および 9 時間以内 (entry 3) に同基質の酸化を完了した。一方、第二級アルコールである 4-フェニル-2-ブタノールの酸化において、NNO は 3 時間の時点で失活が確認された (entry 4)。AZADO は同じ基質の酸化を 4 時間以内に完了した (entry 5)。TEMPO は、第二級アルコールの酸化反応速度が遅く、18 時間で 67% の変換率を示した (entry 6)。これらの結果は、再酸化剤を使用した場合でも NNO は AZADO よりも高い触媒活性を有するが、第二級アルコールの酸化の場合には NNO の失活が競合する可能性があることを示唆している。この不活性化は、NNO が逆マイケル反応の起こりやすいケト型に酸化されるためであると考えられる (Figure 8-2)。



**Figure 8-1.** Cyclic voltammograms for NNO (1 mM) in the absence and presence of 10 mM alcohols in acetonitrile containing 20 mM 2,6-lutidine, 100 mM TBAP. The scan rate was 100 mV/s.

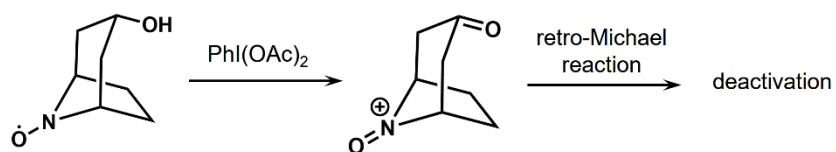
**Table 8-1.** Change in oxidation current ( $\Delta I_p/\mu A$ ) for alcohols using various nitroxyl radical compounds. 1 mM Nitroxyl radical and 10 mM alcohol in acetonitrile with 2 equivalents of 2,6-lutidine and 100 mM TBAP.

Alcohol	Scan rate (mV/s)	$\Delta I_p$ ( $\mu A$ )					
		NNO	AZADO	Nor-AZADO	TEMPO	A-TEMPO	NHPI
Ethanol	10	64.9	1.0	7.6	–	2.9	–
	50	69.0	–	4.7	–	3.6	–
	100	62.2	–	4.3	–	2.4	–
2-Propanol	10	7.0	–	–	–	3.1	1.3
	50	4.7	–	–	–	3.8	1.3
	100	3.8	–	–	–	3.4	1.3
Cyclohexanol	10	10.2	–	–	–	2.9	2.0
	50	7.3	–	–	–	3.5	1.4
	100	6.0	–	–	–	3.2	1.4
Benzyl alcohol	10	94.0	6.0	19.8	–	3.5	9.4
	50	108.8	3.9	12.4	–	3.4	5.8
	100	104.8	4.4	10.2	–	3.5	5.0
1-Phenylethanol	10	15.7	–	–	–	3.2	7.1
	50	11.0	–	–	–	2.7	4.3
	100	8.8	–	–	–	2.1	3.7



**Table 8-2. Comparison of catalytic efficiencies of nitroxyl radicals with an organic oxidant.**

Entry	Substrate	Catalyst	Time (h)	GC conv. (%)	Note
1		NNO	2	>99	–
2		AZADOL	6	>99	–
3		TEMPO	9	>99	–
4		NNO	18	71	64% (3 h)
5		AZADOL	4	>99	–
6		TEMPO	18	67	10% (3 h)



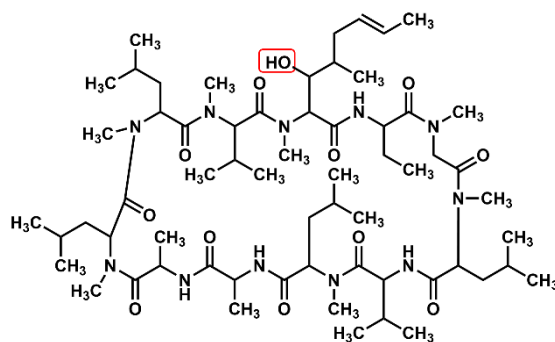
**Figure 8-2. A plausible pathway for deactivation of NNO.**

#### 第四節 NNO による CSA の電気化学検出

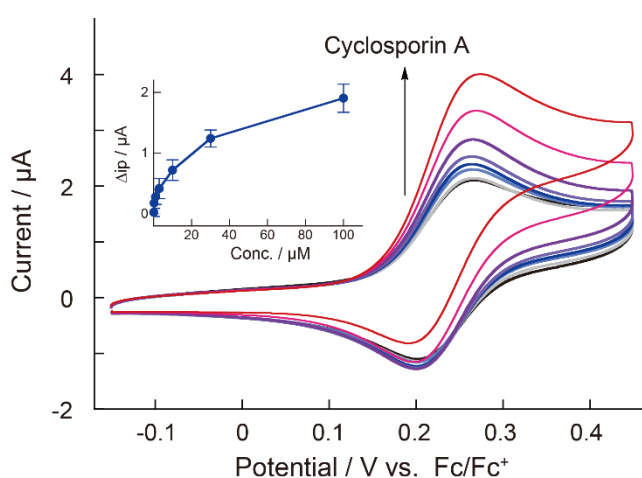
CSA は分子内に 1 箇所のヒドロキシ基を有している (Figure 9-1). しかし, ヒドロキシ基周辺の構造が複雑なため反応性が低く, 通常の化学反応による検出は困難である. 第三節で, NNO がアセトニトリル中のアルコールに対して高い酸化能力を有することが確認された. そこで, 電気化学測定による定量分析の可能性を検討するため, CSA に NNO を添加した溶液の CV 測定を行った.

CSA 存在下における NNO のサイクリックボルタモグラムを Figure 9-2 に示す. 異なる濃度の CSA 溶液において,  $\text{Fc}/\text{Fc}^+$  電位に対して +0.4 V 付近の酸化電流値が濃度依存的に増加した. CSA 濃度が 1  $\mu\text{M}$  を超えると酸化電流が増加し,  $\Delta I_p$  は 10  $\mu\text{M}$  で 0.72  $\mu\text{A}$ , 100  $\mu\text{M}$  で 1.90  $\mu\text{A}$  となった. CSA の有効血中濃度は, 疾患の種類や臓器移植後の経過時期によって異なるため, 約 50 – 1200 ng/mL (0.042 – 0.998  $\mu\text{M}$ ) の範囲での検出が必要である<sup>70,71</sup>. 本研究で得られた CSA 検量線における検出可能範囲は 1 – 100  $\mu\text{M}$  (1202 – 120261 ng/mL) だった.  $\Delta I_p$  と CSA 濃度の間には 1 – 10  $\mu\text{M}$  の直線関係が得られた一方で, CSA 濃度 10 – 100  $\mu\text{M}$  の検量線は直線的ではなかった. これは, NNO と CSA の反応が触媒 EC 反応 (E は電極表面での電子移動, C は均一な化学反応) によって進行するためである (Figure 6-1). 高濃度の CSA では, オキシアンモニウムイオンと CSA の間の均一な化学反応が律速となる.

Table 9-1 は, これまでに報告されている CSA の検出方法との比較を示している. 電気化学的方法は, これまでに報告されている方法よりも感度が低いものの, 高価な測定装置を必要としない簡便で安価な方法であるという利点がある. 一方, NNO は第一級, 第二級アルコールに感応性があり,  $\Delta I_p$  の増加がどの被験物質に対する応答であるか検証する必要がある. したがって, 他成分が存在する混合液を測定に供する場合, 事前に試料を精製する必要があると考察する.



**Figure 9-1. Chemical structure of CSA.**



**Figure 9-2. Cyclic voltammograms for NNO (0.1 mM) in the presence of CSA at a scan rate of 50 mV/s. The inset shows a calibration curve for CSA created changes in the oxidation current for NNO. Data represent means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).**

**Table 9-1. Comparison with previously reported methods for detection of CSA.**

Method	Detection range (ng/mL)	Sensitivity	Reference
ACMIA	25 – 500	–	43)
ECLIA	30 – 961	–	46)
LC-MS/MS	4.5 – 1500	LOD: 0.05 ng/mL	47)
LC-MS/MS	12.5 – 1825	LLOQ: 12.5 ng/mL	49)
CV (NNO)	1202 – 120261	LOD: <i>ca.</i> 360.8 ng/L	This work

LOD: limit of detection, LLOQ: lower limit of quantification. A hyphen means that a data was not shown.

## 第五節 小括

本章では、有機溶媒中のアルコール検出を目的とし、ニトロキシラジカル化合物のアルコールに対する電気化学的酸化性能を評価した。今回測定したニトロキシラジカル化合物の中で **NNO** は、第一級、第二級アルコールのいずれも最も効率よく酸化した。これにより、アセトニトリル中で **CSA** の電気化学的測定に成功した。**NNO** 触媒による **CSA** の検出範囲は 1–100  $\mu\text{M}$  であり、適切な前処理法と組み合わせることで分析の高感度化を目指す。今後、本研究をより複雑な構造を持つ医薬品やその代謝物の測定に応用することで、医薬品の濃度分析の迅速化が期待される。

### 第三章 4-ピリジンボロン酸誘導体を用いたジオール化合物の FAB-MS 測定

#### 第一節 序論

フェニルボロン酸 (PBA) は水溶液中で糖などのジオール化合物と環状エステルを形成する (Fig. 10-1)<sup>72)</sup>. PBA とその類縁体は, 比色分析<sup>73-75)</sup>, 蛍光測定<sup>76-79)</sup>, および電気化学検出<sup>80-82)</sup> によってジオール化合物を検出するセンサーとして広く利用されている.

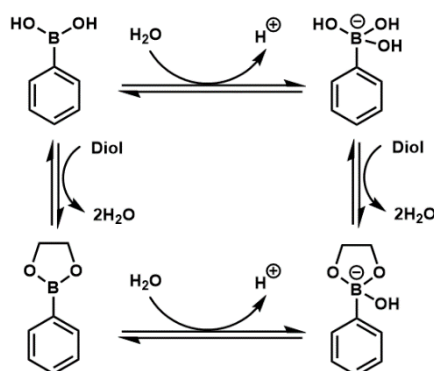


Figure 10-1. Complexation reaction of PBA with diols.

ボロン酸に関連する近年の研究動向として, ボロン酸を基に合成された機能性分子ならびに生化学的ツールの開発が盛んに行われている. 例えば, インスリン自己調節システムとして機能するポリマー<sup>83,84)</sup>, グルコース応答性ナノフィルム<sup>85,86)</sup>, 腫瘍集積用ナノ粒子<sup>87)</sup>, 糖タンパク質や糖ペプチドの濃縮効率を向上させる固相抽出基材<sup>88)</sup> など様々な生化学的ツールが開発されている. さらに, 糖認識能を利用したボロン酸結合型ポリマー製のカラムやフィルターが開発されている. 現在, ボロン酸化合物は機能性素材として様々な分野で注目を集めている.

糖は多くの生物のエネルギー源であり, かつ生体の基本的な構成要素として

機能している。特に D-グルコースをはじめとする単糖は、代謝を通じてヒトの身体機能の維持に不可欠である。また、タンパク質や脂質に糖鎖が結合した複合糖質は細胞の重要な構造的特徴を形成し、細胞表面や抗体において多種多様な機能を調節または媒介する。糖および糖化産物に関する研究は医療、創薬だけでなく、材料素材、食品工学分野などにも密接に関わっている。

糖分子は発色団を持たず、容易にプロトン化または脱プロトン化できる部分がないため、質量分析での検出感度は低い。糖タンパク質の構造解析の方法として、糖鎖を単糖に分解して行う単糖分析、ペプチド-N-グリコシダーゼ (PNGase) などで切り出した糖鎖を測定するオリゴ糖分析、トリプシン消化などで得られた糖ペプチドを解析する糖ペプチド分析、および糖タンパク質分析がある。切り出された単糖やオリゴ糖は、2-アミノベンズアミド、2-アミノピリジン、プロカインアミドなどで蛍光標識した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) やキャピラリー電気泳動 (CE) で分析される。さらに、糖鎖・糖ペプチドの構造解析、糖タンパク質の糖鎖パターン (グリコフォーム) の解析は LC-MS<sup>89,90)</sup> や CE-MS<sup>89-91)</sup> で実施される。MS/MS では、グリコシド結合の解離により単糖やオリゴ糖に対応する特徴的なイオンを生成するため、プロテオミクスにおけるペプチド解析と同様に糖の配列を明らかにすることができる<sup>92)</sup>。しかし、糖化されていないペプチドが糖ペプチドのイオン化を抑制する傾向にあり、ピーク強度が高い  $m/z$  から順にプリカーサーイオンを自動的に選択するデータディペンデント MS/MS では、糖ペプチドの検出は相対的に不利になる。グリコミクスを目的に様々な分析アプローチや質量分析装置、解析用ソフトウェアが開発されているにも関わらず、そもそも糖鎖修飾が翻訳後修飾であり、PCR による増幅やリコンビナントの作成ができない点、および糖鎖構造の複雑さと不均一性がグリコミクスをより複雑化している。

ボロン酸を用いたグルコース測定法としては、蛍光試薬や金属錯体を組み合わせた分光学的・電気化学的な認識系、シクロデキストリンとの分子間相互作用

用を利用した超分子型認識系などが開発されている<sup>93,94)</sup>。一方、ボロン酸エステル化は可逆反応であるため、水溶液中では安定性に乏しく、LC-MS 分析においてボロン酸でプレカラム誘導体化を行った報告は少ない<sup>95)</sup>。ボロン酸エステルの分解を抑制しながら高感度分析を行うために、ポストカラム誘導体化<sup>96)</sup> やアンビエント脱離イオン化<sup>97,98)</sup>、インソース ESI-MS<sup>99)</sup> などのオンライン誘導体化システムが検討されている。しかしこれらの方法は専用システムを必要とするため、装置の設置や測定の簡便性に限界がある。

そこでボロン酸エステルの分解を抑えつつ、既存の質量分析システムでボロン酸誘導体化を利用するための分析手順を検討した。従来型の蛍光試薬による遊離糖鎖のラベル化には、糖鎖の切り出し、遊離グリカンの還元アミノ化、クリーンアップなど複数の工程が必要とされる。これに対し、ボロン酸によるジオールラベル化は一工程で完了するため、試料の前処理法としてスループットが高い。ボロン酸試薬は、電子供与性の置換基が結合したものや複素環式など多様な構造を持つものが合成されており、市販のボロン酸化合物を用いたステロイドジオールの誘導体化<sup>100)</sup> が報告されている。

本章では、質量分析用の新規標識試薬の開発を目的とし、ジオール化合物のボロン酸エステル誘導体化が検出感度に及ぼす影響を調査した。まず、モデルジオールとして 2-ヒドロキシエストロン (2-OHE1) を用い、種々のボロン酸試薬との混合物を FAB-MS で測定した (Figure 10-2)。FAB-MS スペクトルで最もイオン化効率の良かった 4-ピリジンボロン酸 (4-PyBA) については、測定に使用するマトリックスを最適化した。さらに、D-(-)-フルクトース (D-Fru) と D-(+)-グルコース (D-Glc) の 4-PyBA エステルを測定し、糖との結合性、エステル誘導体の安定性、および質量分析におけるイオン化効率を評価した。

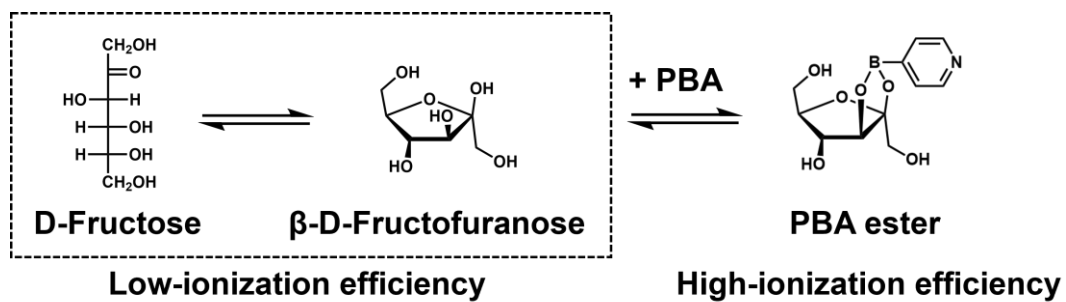


Figure 10-2. PBA ester derivatization approach for FAB-MS measurement.



## 第二節 実験方法

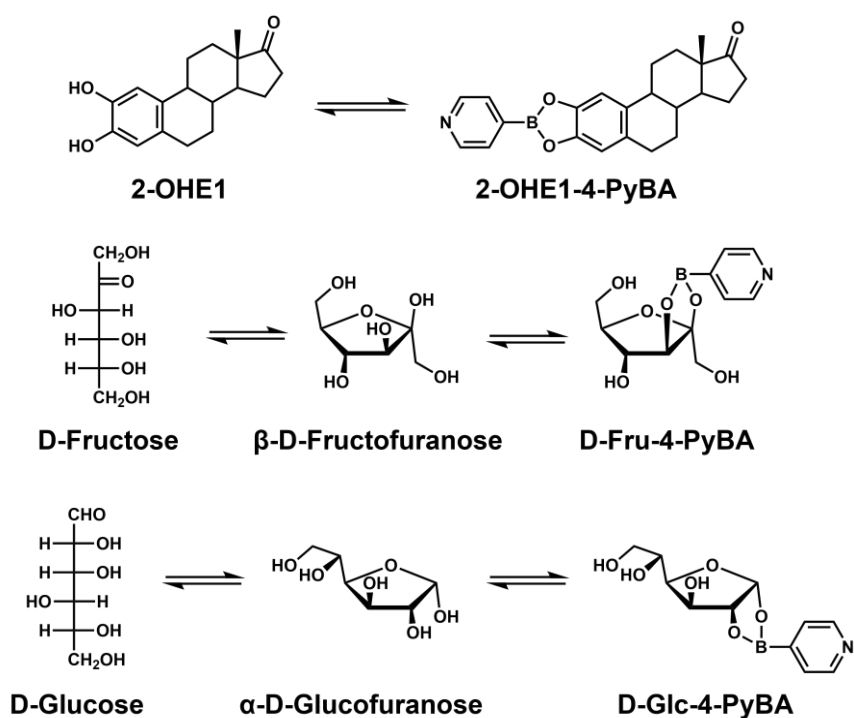
### 1. 試薬および材料

PBA, D-Glc, D-Fru は Nacalai Tesque から購入した. 4-ヒドロキシフェニルボロン酸 (4-HPBA), 3-アミノフェニルボロン酸一水和物 (3-APBA·H<sub>2</sub>O), 4-アセトアミドフェニルボロン酸 (4-AAPBA), 3-ニトロフェニルボロン酸 (3-NPBA), 4-ニトロフェニルボロン酸 (4-NPBA), および 5-ピリミジルボロン酸 (5-PymBA) は Tokyo Chemical Industry から購入した. 3-ホルミルフェニルボロン酸 (3-FPBA), 3-カルボキシフェニルボロン酸 (3-CPBA), 4-カルボキシフェニルボロン酸 (4-CPBA), 3-ピリジンボロン酸 (3-PyBA), および 4-PyBA は FUJIFILM Wako Chemicals から購入した. 3-[(*N*-プロピルアミノ)カルボニル]フェニルボロン酸 (3-PACPBA), および 4-[(*N*-プロピルアミノ)カルボニル]フェニルボロン酸 (4-PACPBA) は Combi-Blocks (San Diego, CA, USA) から購入した. 4-アミノフェニルボロン酸塩酸塩 (4-APBA·HCl), フェロセンボロン酸 (FeBA), および 3-(დანსილამინო)フェニルボロン酸 (3-DAPBA) は Sigma-Aldrich から購入した. 2-OHE1 は Steraloids (Newport, RI, USA) から購入した. 本章で使用した 2-OHE1, D-Fru, D-Glc およびその 4-PyBA エステルの化学構造を Figure 11-1 に示す.

### 2. 質量分析測定

FAB-MS スペクトルは JMS-700V 質量分析計 (JEOL) を用いて測定した. すべての試料溶液のマスマスペクトルはポジティブモードで測定した. マトリックスは FABMS Matrix Kit (JEOL) のグリセロール, 3-ニトロベンジルアルコール (NBA),  $\alpha$ -チオグリセロール, Magic Bullet (ジチオスレイトール・ジチオエリスリトール混合物, DTT: DTE = 3: 1), YOKUDEL-FAB-Matrix (DTT: NBA = 1: 1), ジエタノールアミン (DEA), トリエタノールアミン (TEA), 2,2'-ジチオジエタノール (DTDE), または 2-ニトロフェニル-*n*-オクチルエーテル (NPNO) である.

ボロン酸試薬の質量分析における性能評価には、2-OHE1 のメタノール溶液、D-Glc または D-Fru のメタノール-水 (9: 1, pH 7) 溶液に、各ボロン酸試薬を加えた混合物を測定試料とした。FAB-MS, 電子イオン化質量分析 (EI-MS), および化学イオン化質量分析 (CI-MS) には試料を直接導入した。エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) は TSQ Quantum Discovery (Thermo Fisher Scientific) を用いて、シリンジポンプによる試料の直接導入で測定した。



**Figure 11-1. Chemical structures of 4-pyridineboronic acid esters**

### 第三節 ボロン酸誘導体化の FAB-MS 性能の評価

一般にステロイドはイオン化効率が低いため、質量分析における検出感度を向上させるために化学的誘導体化が広く用いられている<sup>101,102)</sup>。ステロイド化合物の化学誘導体化では、それぞれの分子量に関連したイオンとして検出されやすい、永久荷電試薬またはプロトン親和性試薬を使用する。当研究室では、ステロイドの LC-ESI-MS/MS におけるプレカラム誘導体化として、プロトン親和型試薬を用いた誘導体化法に関する研究を長年行ってきた。2-ピリジンカルボン酸 (ピコリン酸)<sup>103-106)</sup>、メチルピコリン酸<sup>107)</sup>、5-*n*-ブチル-2-ピリジンカルボン酸 (フザリン酸)<sup>108,109)</sup>、キノリンカルボン酸など窒素を含む複素環のカルボン酸は、窒素の非共有電子対によりプロトン親和力が大きく、これらをステロイドのヒドロキシ基とエステル誘導体化することで質量分析の検出感度が数倍から数十倍に増加する。また、有機酸をピコリン酸誘導体化することで ESI-ポジティブモード測定による高感度検出が達成された<sup>110)</sup>。以上のように、ピコリン酸およびその類縁体は LC-ESI-MS/MS 用の標識試薬として優れた性能を発揮する。

通常、化学誘導体化のプロトコルは分析コストの増加を招くが、ボロン酸エステル誘導体化は溶液中で試薬を混合するだけの簡単なステップで実施できる。本研究では、ステロイド化合物としては比較的イオン化効率の高い 2-OHE1 をモデルジオールとして用い、ステロイドカチオンのピーク強度に対する各種ボロン酸試薬の影響を調べた。

FAB-MS はソフトイオン化法であり、分子量関連ピークから試料の分子量情報を得ることができる。FAB-MS の特徴は分析時間が短く、固体試料と液体試料の両方を測定できることである。ボロン酸試薬を含む混合試料を直接測定するのに適していることから、本研究では FAB-MS の使用を選択した。

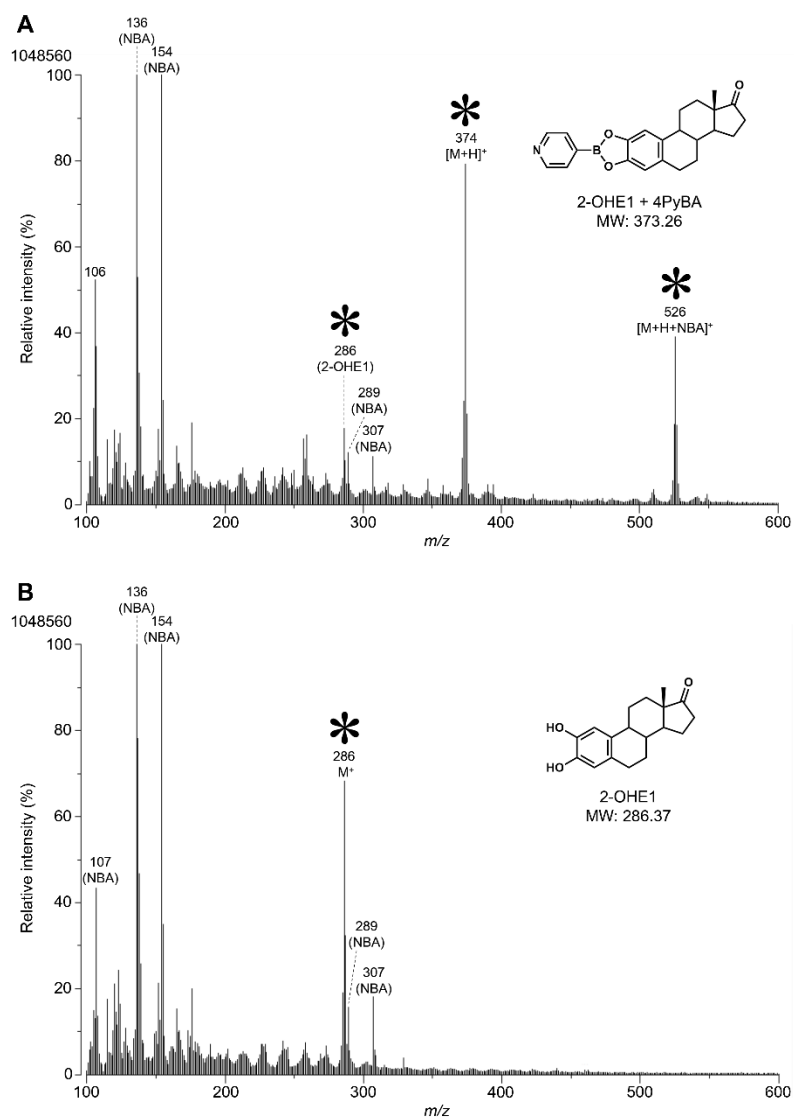
Figure 12-1 は、2-OHE1 と 4-PyBA (メタノール中、各 1 mM) を含む試料溶液を NBA で測定した FAB-ポジティブモードのマスペクトルである。4-PyBA が

存在するスペクトル (Figure 12-1A) には, 2-OHE1 分子のカチオン ( $M^+$ ,  $m/z$  286), 2-OHE1 と 4-PyBA から 2 つの水分子が喪失したエステルのプロトン化分子イオン ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  374), および 4-PyBA エステルの NBA 付加体プロトン化分子イオン ( $[M + H + NBA]^+$ ,  $m/z$  526) のピークが含まれていた. ベースピークに対する 2-OHE1 ( $m/z$  286) とその 4-PyBA エステル ( $m/z$  374) のピークの相対強度はそれぞれ 22% と 79% であった. 一方, 4-PyBA を含まない試料のスペクトル (Figure 12-1B) では,  $m/z$  286 と 374 の相対強度はそれぞれ 68% と 1% であった. これらの結果から,  $m/z$  374 のピークは 2-OHE1 への 4-PyBA の付加に由来することが示唆された. 4-PyBA によるエステル化は可逆反応であり, 試料溶液中には未反応の 4-PyBA と 2-OHE1 が共存していた. 予想通り, 4-PyBA エステルを単離精製することはできなかったが, FAB-MS のデータから試料溶液中にボロン酸エステルが生成していることが証明された.

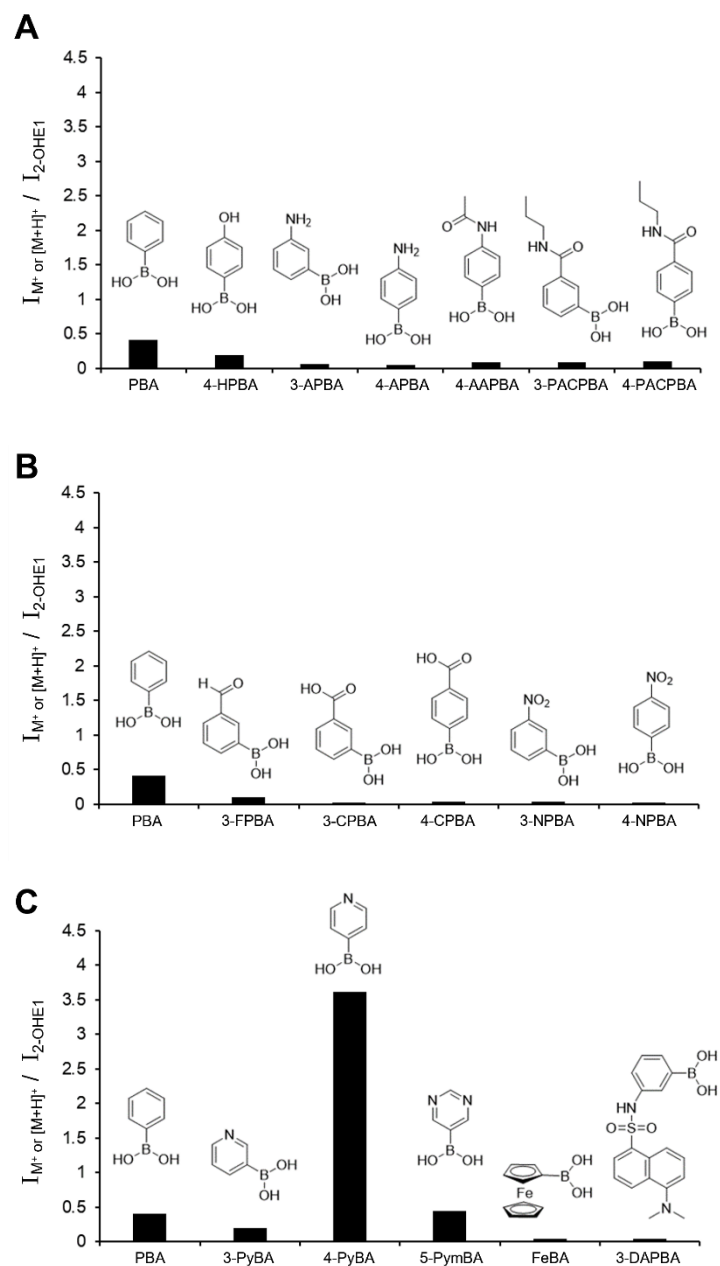
同様に, エステル化 2-OHE1 のピーク強度に対する各試薬の影響を調べるため, 同じ実験条件で 17 種類のボロン酸試薬を用いて 2-OHE1 の FAB-MS 測定を行った. ボロン酸エステルのピーク強度は, 各マススペクトルのベースピークに対するボロン酸エステル分子のカチオン ( $M^+$ ) またはエステルのプロトン化分子イオン ( $[M + H]^+$ ) の相対強度 (%) で評価した (Figure 12-2). 2-OHE1 と未修飾 PBA との反応により形成されたエステル ( $M^+$ ,  $m/z$  372) のベースピークに対する相対強度は 33% であった. ボロン酸とジオール化合物の錯体形成反応の速度定数は, ボロン酸部位の酸解離定数 ( $pK_a$ ) から推定可能である<sup>11)</sup>. PBA の場合, 電子吸引性基が置換するとボロン酸部位の  $pK_a$  が低下し, 無置換の PBA と比べて錯体の生成定数が増加する. しかし Figure 12-2A と B の結果は, ポジティブモード測定において電子供与性基置換 PBA と形成されたエステルのピーク強度が電子吸引性基置換 PBA よりも大きいことを示している. 全体を通して, 4-PyBA エステル ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  374) の相対強度は 79% と最も高く, 4-PyBA のイオン化効率が他の修飾ボロン酸試薬よりも高いことが示唆された. ベンゼン,

ピリジン, ピリミジン, ナフタレンおよびフェロセンのプロトン親和力はそれぞれ 179.3, 222.3, 211.7, 191.9, 206.4 kcal/mol である (NIST Chemistry Webbook, <https://webbook.nist.gov/>). 予想通り, ボロン酸のピリジン部分はポジティブモード検出の感度を向上することが明らかとなった. しかし, ピリジンボロン酸である 3-PyBA とのエステルでは, ピークの相対強度は 9%であった. ヒノキチオールを用いた実験から, ピリジンボロン酸および PBA の  $pK_a$  の関係は 4-PyBA < 3-PyBA < PBA であり, 4-PyBA とジオールの結合は中性 pH で有利に進行することが示唆されている<sup>112)</sup>. 加えて, ピリジンボロン酸の酸解離がピリジン窒素に置換基を導入しても保持されることを示唆する報告<sup>97)</sup> から, ピリジンボロン酸をベースとした分子は, より特異的な標識試薬の開発に有用であると期待される.

2-OHE1-4-PyBA エステルのピーク強度は測定ごとに大きなばらつきを示し, 3回測定した  $[M + H]^+$  ( $m/z$  374) のピーク強度は  $52.52 \pm 26.26\%$ であった. エステルのピーク強度のばらつきは, サンプルングエラーだけでなく, エステルを精製せずに混合物を用いた FAB-MS 測定プロトコルに起因するものと考えられる. 未反応のボロン酸と 2-OHE1 が共存する試料溶液では, MS に導入されるエステルの絶対量が増加することが予想される. 将来的には, 安定同位体で標識した内部標準物質を用いることで, 定量的な測定が可能になるとと思われる.



**Figure 12-1. Positive FAB-MS spectra of 2-OHE1 in the (A) presence and (B) absence of 4-PyBA (matrix: NBA).**



**Figure 12-2. Peak intensities of ions associated with the molecular weight of 2-OHE1 boronic esters in positive FAB-MS spectra (matrix: NBA).**

(A) Boronic acids with electron-donating substituents, (B) boronic acids with electron-withdrawing substituents, (C) heterocyclic or other arylboronic acids.

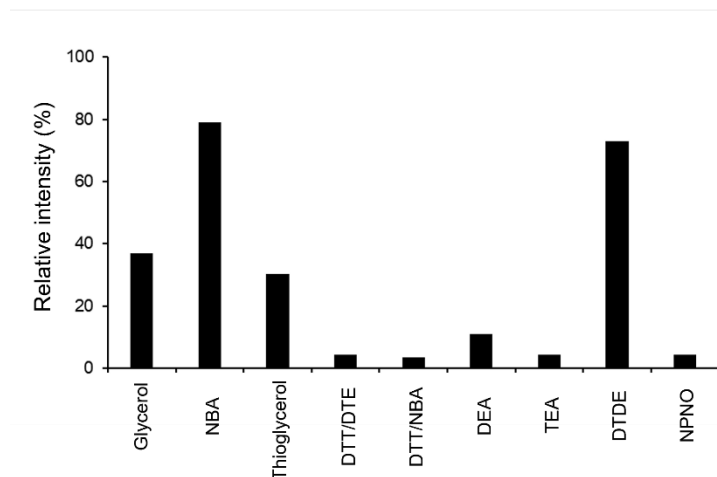
#### 第四節 FAB-MS マトリックスの性能比較

次に、本研究で最も性能の良いボロン酸であった 4-PyBA の分析条件を最適化した。2-OHE1 と 4-PyBA (メタノール中, 各 1 mM) を含む試料溶液を, 9 種類のマトリックスを用いて FAB-MS で測定した。異なるマトリックスで測定したスペクトルにおいて, 2-OHE1-4-PyBA エステル ( $m/z$  374) のピーク強度を比較した (Fig. 13-1)。

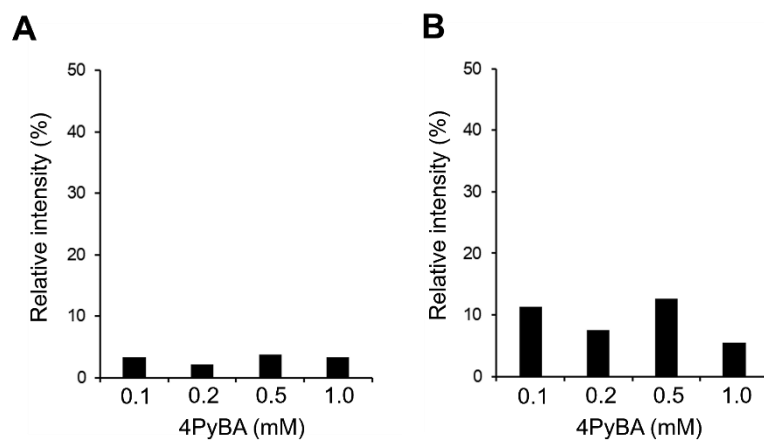
NBA と DTDE を用いたスペクトルでは,  $m/z$  374 のベースピークに対する相対強度はそれぞれ 79%, 73% と高い値を示した。グリセロールのように隣接するジオール構造を有するマトリックスは, 分析対象と競合することが予想される。NBA はモノアルコールであり, DTDE は 2 つのヒドロキシ基が離れているため, エステル誘導体の安定性は他のマトリックスよりも高かったと考えられる。

ボロン酸試薬の最適濃度を調べるため, 2-OHE1 (メタノール中 0.1mM) と 4-PyBA (メタノール中 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM) の混合物の FAB-MS 測定を行った。NBA と DTDE をマトリックスとして, スペクトル中の 2-OHE1-4-PyBA エステル ( $m/z$  374) のピーク強度を比較した。NBA (Figure 13-2A) および DTDE (Figure 13-2B) スペクトルにおける  $m/z$  374 のベースピークに対する相対強度は, 4-PyBA 濃度によって大きく変化しなかった。FAB-MS 測定では, 2-OHE1 に対して等モル量の 4-PyBA を添加すれば十分であった。4-PyBA はメタノールへの溶解性が悪く, 1 mg/mL の濃度で試料溶液は懸濁した。





**Figure 13-1. Peak intensities of 2-OHE1-4-PyBA ester derivatives in positive FAB-MS spectra using various matrices.**



**Figure 13-2. Peak intensities of 2-OHE1-4-PyBA ester derivatives ( $m/z$  374) at different 4-PyBA concentrations. Matrix of (A) NBA and (B) DTDE.**

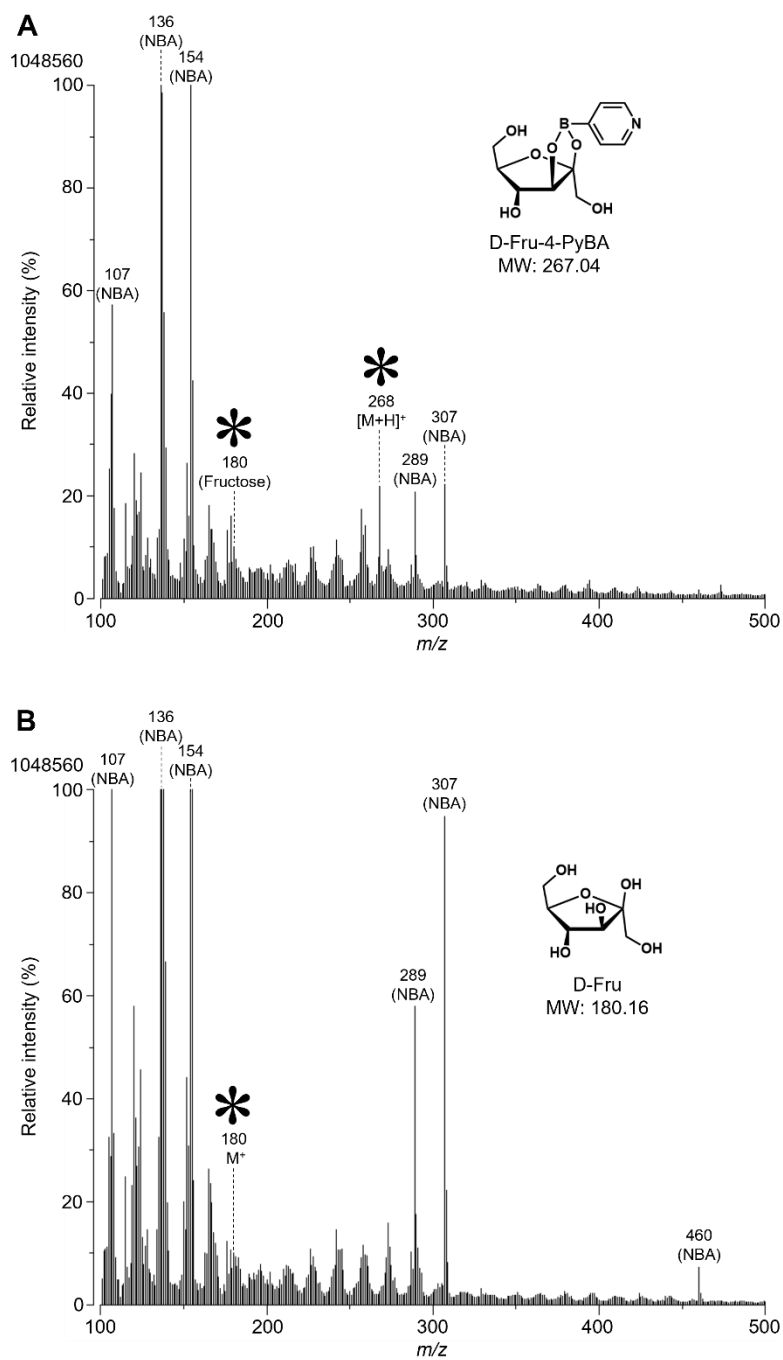
## 第五節 単糖類の FAB-MS 測定

第三・四節の結果に基づき、糖に対する 4-PyBA エステル誘導体化の適合性を評価した。先述した通り、糖分子は容易にプロトン化または脱プロトン化される部位を持たないため、質量分析では検出感度が低い。したがって質量分析で高感度測定を行うには、糖および糖化産物を誘導体化する必要がある<sup>91,113</sup>。

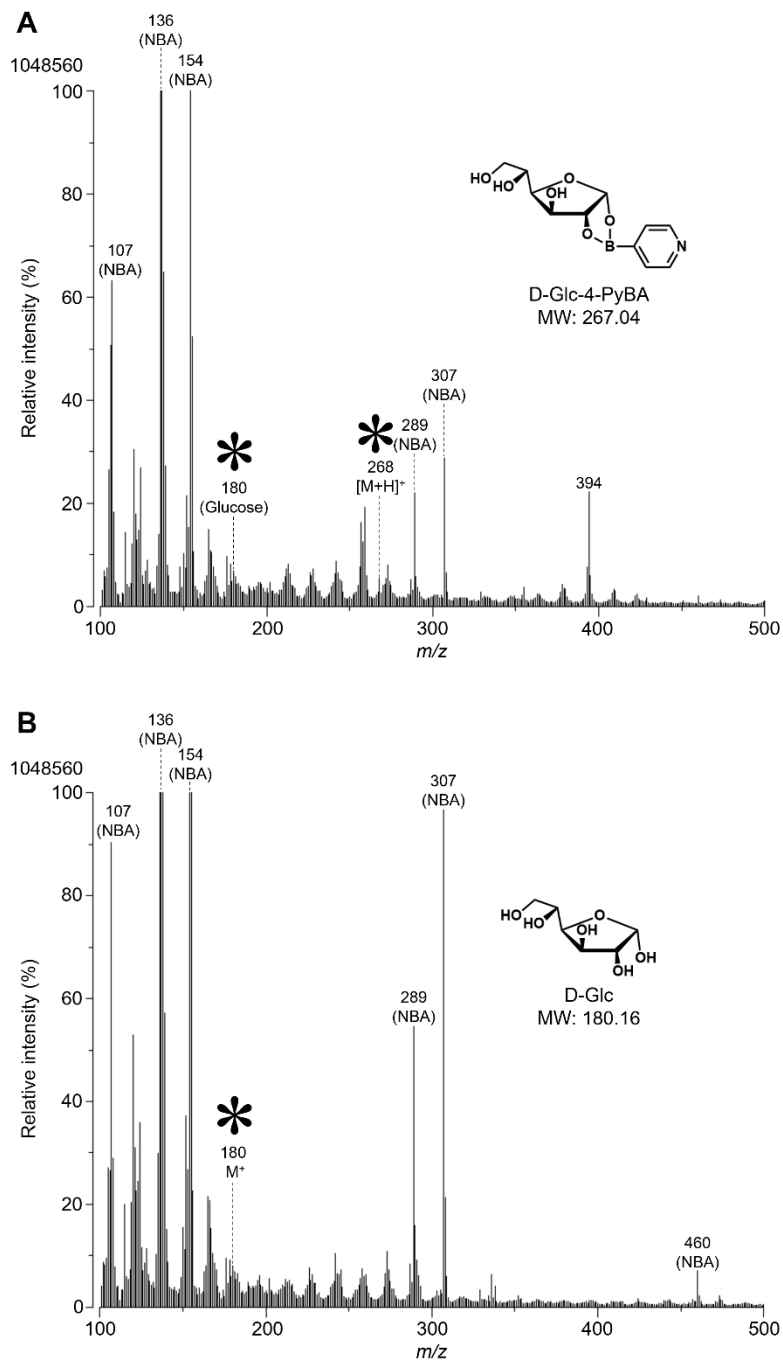
まず、D-Fru の存在下および非存在下の FAB-MS スペクトルを比較した。Figure 14-1 は、D-Fru と 4-PyBA (90%メタノール中、各 1 mM) を含む混合物の FAB-MS スペクトルである。D-Fru のカチオン ( $M^+$ ,  $m/z$  180) と D-Fru-4-PyBA エステルのプロトン化分子イオン ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  268) が観測された (Figure 14-1A)。 $m/z$  180 と 268 の相対強度はそれぞれ 3%と 22%であった。一方、D-Fru のみを含む溶液の FAB-MS スペクトル (Figure 14-1B) では、D-Fru ( $M^+$ ,  $m/z$  180) の相対強度は 10%であった。これらの結果から、D-Fru に 4-PyBA を添加すると、2-OHE1 の場合と同様に FAB-MS での検出感度が向上することが示唆された。

同様に、D-Glc を含む溶液を用いて FAB-MS 測定を行った (Figure 14-2)。D-Glc と 4-PyBA (90%メタノール中、各 1 mM) を含む混合物の FAB-MS スペクトル (Figure 14-2A) では、D-Glc のカチオン ( $M^+$ ,  $m/z$  180) と D-Glc-4-PyBA エステルのプロトン化分子イオン ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  268) が観察された。しかし、 $m/z$  180 と 268 の相対強度はそれぞれ 7%と 5%であった。また、4-PyBA 非存在下での D-Glc ( $m/z$  180) の相対強度には変化がなかった (Figure 14-2B)。ボロン酸と糖の結合定数は、ボロン酸・ジオール双方の  $pK_a$ 、立体障害、ボロン酸中心の安定性など様々な要因から影響を受ける。D-Glc は水溶液中での平衡において *cis*-ジオール構造を有する  $\alpha$ -D-グルコフラノースの存在量が少なく、D-Fru と比べて PBA との結合親和性が小さいとされている<sup>114,115</sup>。したがって、D-Glc と 4-PyBA の結合は、PBA と同様に D-Fru の結合よりも弱い可能性がある。本研究の FAB-MS スペクトルから得られた結果は、糖分子とボロン酸試薬の結合の性質と一致している。

質量分析における 4-PyBA エステル誘導体化の特徴を明らかにするため、FAB 以外のイオン化法を用いて同様の質量分析測定を行った。D-Fru と 4-PyBA を含む混合液 (90%メタノール中, 各 1 mM) を測定したデータを Table 14-1 にまとめた。EI-ポジティブモードマススペクトルでは、D-Fru のフラグメントイオン ( $[C_6H_{12}O_4]^+$ ,  $m/z$  148) と D-Fru-4-PyBA エステルのカチオン ( $M^+$ ,  $m/z$  373) を検出し、複数のフラグメントイオンを同定した。しかし、EI-MS で検出された D-Fru-4-PyBA エステルのカチオン ( $m/z$  373) のピーク強度は、FAB-MS ( $m/z$  374) の強度に対し 32%であった。また、EI-MS スペクトルでは D-Fru ( $m/z$  148) のピーク強度が大きく検出されたが、試料溶液中には未反応の D-Fru が共存しているため D-Fru-4-PyBA エステル由来のフラグメントと区別がつかない。したがって、EI-MS はエステルを精製しない試料溶液の測定に適しておらず、検出感度も不十分であると考えられる。同様に、イソブタンを用いた CI-ポジティブモードで測定したマススペクトルでは、D-Fru-4-PyBA エステル ( $[M + H]^+$ ,  $m/z$  374) のピーク強度は FAB-MS ( $m/z$  374) の 11%だった。これらの結果は、FAB-MS が 4-PyBA エステル誘導体の分析に適していることを示唆している。さらに、LC-MS で汎用されている ESI-MS におけるピーク強度を評価するため、2-OHE1 と 4-PyBA を含む混合溶液 (90%メタノール中) のポジティブ ESI マススペクトルを測定した。しかし、2-OHE1-4-PyBA エステル分子に関連するピークはほとんど検出されなかった。したがって、4-PyBA エステル誘導体化を LC-MS 分析に用いるためには、移動相として使用される溶媒系におけるエステルの結合安定性を向上させることが必要である。



**Figure 14-1. Positive FAB-MS spectra of D-Fru in the (A) presence and (B) absence of 4-PyBA (matrix: NBA).**



**Figure 14-2. Positive FAB-MS spectra of D-Glc in the (A) presence and (B) absence of 4-PyBA (matrix: NBA).**

**Table 9-1. Comparison of peak detection in various mass spectrometers.**

MS	D-Fru-4-PyBA			Other ions		
	<i>m/z</i>	Intensity	Relative intensity	<i>m/z</i>	Intensity	Relative intensity
FAB	268	229097	22%	180	101331	10%
EI	267	72980	11%	148	668048	100%
				236	157188	24%
				218	95435	14%
				249	39297	6%
CI	268	25993	21%	250	18715	15%

## 第五節 小括

本章では、ジオール化合物を簡便かつ高感度に検出するための化学誘導体化として、ボロン酸エステル化を用いた FAB-MS 測定について検討した。4-PyBA はジオール化合物とよく反応し、分子量関連ピークを強く検出することで FAB-MS 測定の誘導体化試薬に適していることを示した。しかし FAB-MS は多成分の同時分析に不向きであり、ボロン酸エステル誘導体化を生体試料中の糖および糖鎖測定に応用するには、LC-MS を用いた分離分析が望ましい。ボロン酸エステル安定性の向上には、溶液の pH や測定条件で安定な構造を有するボロン酸の開発が必要である。さらに、複数のボロン酸からなるオリゴマーやポリマーを設計することで、構造中に複数のジオールを持つ化合物の検出が可能になると予想される。本研究で開発したボロン酸エステル誘導体化は、ジオール化合物の質量分析の発展のみならず、ボロン酸ベースの分析ツールや製材技術の開発にも影響を与えるものと期待される。

## 総括

本研究では、現在普及している生体内分子の分析技術を基に、より簡便な測定原理を利用し効率的な測定法の開発を目指した。本論文において、蛍光標識エストロゲン誘導体を用いたエストロゲン受容体結合アッセイ、ニトロキシルラジカル化合物を用いたアルコールの電気化学検出、およびボロン酸試薬を用いたジオール化合物の FAB-MS 法に関し、多くの新たな知見が得られたことを記述したが、生体試料の測定に応用するには課題が残っている。

第一章では、ベンゾフラザン標識エストラジオールを合成し、hr-ER $\alpha$  との結合親和性を評価した。最も性能の良かった ABD-E2 ( $K_d = 23.4$  nM) は、hr-ER $\alpha$  と複合体を形成すると遊離 ABD-E2 より蛍光強度が増加した。その結果、従来の FP 法と同様の性能で B/F 分離フリーの結合アッセイを達成した。また、今回 10 種類のエストロゲン様化合物と競合結合アッセイを行った結果、得られた競合阻害のパラメーターは FP 法や放射活性アッセイによる文献値と明確な相関関係を示した。ABD-E2 はストークスシフトが大きいいため、ABD-E2-hr-ER $\alpha$  複合体の蛍光は生体試料中の蛍光妨害物質による影響をある程度回避することが期待される。一方、生体試料または環境水を測定する場合、試料中に共存する物質に起因する hr-ER $\alpha$  の失活、およびリガンド結合の妨害などを検討する必要があると考察する。

第二章では、ニトロキシルラジカル化合物に電位を印加することで、有機溶媒中に共存するアルコールの酸化性能を評価した。NNO は水系と同様、アセトニトリル中でもアルコール酸化の触媒性能が高いことが示唆され、CSA を 1 – 100  $\mu$ M の範囲で検出した。生体試料中にはヒドロキシ基を持つ化合物が多数存在するため、クロマトグラフィーなどの分離技術を組み合わせて化合物を精製した後に電気化学検出を行うのが現実的であると考えられる。これにより、電気化学応答に干渉する物質の除去も期待される。



第三章では、ジオール化合物のボロン酸エステル誘導体について質量分析におけるイオン化効率を評価した。4-PyBA は D-Fru または D-Glc (1 mM) 存在下、FAB-MS 測定により分子量関連ピークを強く検出したことで、非誘導体では検出感度が低い単糖の高感度分析に適していることが示唆された。こちらも第二章と同様に、生体試料の測定にはクロマトグラフィーと組み合わせた分析メソッドの開発が望ましい。しかし、ボロン酸エステル化についてはポストカラム誘導体化やアンビエント脱離イオン化など測定法が開発されており、今後は糖との結合定数が強いボロン酸試薬の開発、または複数のボロン酸で構成されるオリゴマーやポリマーの設計など既存と異なるアプローチも必要である。なお、第一から三章の研究のいずれも、既存の分析技術や報告値との相関関係について検証を適宜実施していくものとする。

臨床・非臨床に関わらず、生体試料の測定の重要度は今後ますます増大することが予想される。生体内分子の研究に関しては、迅速、簡便、低コストで多成分を同時分析する測定法が開発が盛んに行われている現状があり、そのことがメタボロミクスや生理活性研究を複雑にしている。多様な化学特性を持つ化合物を対象とする以上、施設間で同一の基準となるゴールドスタンダードの手法を確立することは困難であると考察するが、本研究で得られた様々な知見がその開発戦略に貢献することを期待するものである。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり，終始多大な御指導，御協力を頂きました本学大学院薬学研究科 臨床分析化学教室 藤村 務 教授に深く御礼申し上げます。

本論文を御高閲，ならびに御助言を頂きました本学大学院薬学研究科 分子認識学教室 細野 雅祐 教授，糖鎖構造生物学教室 山口 芳樹 教授に深く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり，電気化学分析の専門家として数々の御指導，御協力を頂きました本学大学院薬学研究科 臨床分析化学教室 佐藤 勝彦 准教授に深く御礼申し上げます。また，本学大学院在籍時に御協力を頂きました熊野 征行 氏，大学院生 杉山 恭子 氏ならびに臨床分析化学教室の皆様にご心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，本学在籍時に数々の御指導，御協力を頂きました帝京平成大学薬学部 大野 賢一 准教授に深く御礼申し上げます。また，本学大学院薬学研究科 臨床分析化学教室の元教授である沼澤 光輝 先生，山下 幸和 先生にご心より感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，共同研究者として御助言，御協力頂きました本学大学院薬学研究科 医薬合成化学教室 渡邊 一弘 准教授，東北大学大学院薬学研究科 岩渕 好治 教授，笹野 裕介 講師，ならびに奥羽大学薬学部 柏木 良友 教授，小野 哲也 准教授，吉田 健太郎 講師に深く感謝いたします。

本研究の諸スペクトルデータを測定して頂きました本学中央機器センター 佐藤 真一 氏，松木 智之 氏に深く感謝いたします。

最後に，本研究を進める機会を与えてくださり，終始御激励を賜りました本学理事長 高柳 元明 先生，学長 大野 勲 先生，本学大学院薬学研究科長 吉村 祐一 先生に謹んで感謝の意を表します。

## 論文目録

本論文の第一章から第三章までの内容は、それぞれ以下の雑誌に公表した。

1. Binding assays using a benzofurazan-labeled fluorescent probe for estrogen receptor-ligand interactions  
Sachiko Komatsu, Ken-ichi Ohno, Tsutomu Fujimura  
*Chem. Pharm. Bull.* 2020, **68**, 954–961
2. Electrochemical evaluation of nitroxyl radical catalysts and electrochemical detection of cyclosporin A  
Sachiko Komatsu, Yusuke Sasano, Kyoko Sugiyama, Kazuhiro Watanabe, Masayuki Kumano, Kentaro Yoshida, Tetsuya Ono, Yoshiharu Iwabuchi, Tsutomu Fujimura, Katsuhiko Sato, Yoshitomo Kashiwagi  
*Int. J. Electrochem. Sci.* 2021, **16**, 20127
3. FAB-MS measurement of 2-hydroxyestrone and monosaccharides assisted by 4-pyridineboronic ester derivatization  
Sachiko Komatsu, Katsuhiko Sato, Kyoko Sugiyama, Masayuki Kumano, Kazuhiro Watanabe, Tsutomu Fujimura  
*Heterocycles* 2022, **104**, 1074–1084

## 引用文献

1. 西海 信, 吉田 優. メタボロミクスバイオマーカー研究において課題とされる血中代謝物分析に影響を与える要因について. *Proteome Lett.* 2020, **5**, 45–53.
2. Fu, Y., Luo, J., Qin, J., Yang, M. Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, **168**, 189–200.
3. Fujimura, T., Shinohara, Y., Tissot, B., Pang, P.C., Kurogochi, M., Saito, S., Arai, Y., Sadilek, M., Murayama, K., Dell, A., Nishimura, S., Hakomori, S. Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate disease or normal subjects. *Int. J. Cancer* 2008, **122**, 39–49.
4. Saito, S., Murayama, Y., Pan, Y., Taima, T., Fujimura, T., Murayama, K., Sadilek, M., Egawa, S., Ueno, S., Ito, A., Ishidoya, S., Nakagawa, H., Kato, M., Satoh, M., Endoh, M., Arai, Y. Haptoglobin- $\beta$  chain defined by monoclonal antibody RM2 as a novel serum marker for prostate cancer. *Int. J. Cancer* 2008, **123**, 633–640.
5. Kazuno, S., Fujimura, T., Arai, T., Ueno, T., Nagao, K., Fujime, M., Murayama, K. Multi-sequential surface plasmon resonance analysis of haptoglobin-lectin complex in sera of patients with malignant and benign prostate diseases. *Anal. Biochem.* 2011, **419**, 241–249.
6. Kazuno, S., Furukawa, J., Shinohara, Y., Murayama, K., Fujime, M., Ueno, T., Fujimura, T. Glycosylation status of serum immunoglobulin G in patients with prostate diseases. *Cancer Med.* 2016, **6**, 1137–1146.
7. Kazuno, S., Fujimura, T., Fujime, M., Miura, Y., Ueno, T. O-glycosylated clusterin as a sensitive marker for diagnosing early stages of prostate cancer. *Prostate* 2021, **81**, 170–181.
8. Matsumura, E., Kosuge, N., Nakanishi, S., Suda, T., Sugawa, A., Fujimura, T.,

- Miyagi, R., Yoshimi, N., Saito, S. Urine lactoferrin as a potential biomarker reflecting the degree of malignancy in urothelial carcinoma of the bladder. *Tohoku J. Exp. Med.* 2020, **252**, 225–244.
9. Gomez-Gomez, A., Rodríguez-Morato, J., Haro, N., Marín-Corral, J., Masclans, J.R., Pozo, O.J. Untargeted detection of the carbonyl metabolome by chemical derivatization and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in precursor ion scan mode: Elucidation of COVID-19 severity biomarkers. *Anal. Chim. Acta* 2022, **1196**, 339405.
  10. Kimura-Ohba, S., Asaka, M.N., Utsumi, D., Takabatake, Y., Takahashi, A., Yasutomi, Y., Isaka, Y., Kimura, T. D-Alanine as a biomarker and a therapeutic option for severe influenza virus infection and COVID-19. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2023, **1869**, 166584.
  11. Brown, M., Sharp, P.A. Human estrogen receptor forms multiple protein-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**, 11238–11243.
  12. Wang, C., Li, C., Zhou, H., Huang, J. High-throughput screening assays for estrogen receptor by using coumestrol, a natural fluorescence compound. *J. Biomol. Screen.* 2014, **19**, 253–258.
  13. Gruber, C.J., Tschugguel, W., Schneeberger, C., Huber, J.C. Production and actions of estrogens. *N. Engl. J. Med.* 2002, **346**, 340–352.
  14. Paterni, I., Granchi, C., Katzenellenbogen, J.A., Minutolo, F. Estrogen receptors alpha (ER $\alpha$ ) and beta (ER $\beta$ ): Subtype-selective ligands and clinical potential. *Steroids* 2014, **90**, 13–29.
  15. Boyle, C.P., Raji, C.A., Erickson, K.I., Lopez, O.L., Becker, J.T., Gach, H.M., Kuller, L.H., Longstreth Jr, W., Carmichael, O.T., Riedel, B.C., Thompson, P.M. Estrogen, brain structure, and cognition in postmenopausal women. *Hum. Brain Mapp.* 2021, **42**, 24–35.

16. Palmer, J.R., Castro-Webb, N., Bertrand, K., Bethea, T.N., Denis, G.V. Type II diabetes and incidence of estrogen receptor negative breast cancer in African American women. *Cancer Res.* 2017, **77**, 6462–6469.
17. Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 1993, **101**, 378–384.
18. Metcalfe, C.D., Bayen, S., Desrosiers, M., Muñoz, G., Sauvé, S., Yargeau, V. An introduction to the sources, fate, occurrence and effects of endocrine disrupting chemicals released into the environment. *Environ. Res.* 2022, **207**, 112658
19. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応－EXTEND2022－，環境省ウェブサイト，令和4年（2022年）10月
20. Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 1997, **138**, 863–870.
21. Nakai, M., Tabira, Y., Asai, D., Yakabe, Y., Shimyoze, T., Noguchi, M., Takatsuki, M., Shimohigashi, Y. Binding characteristics of dialkyl phthalates for the estrogen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, **254**, 311–314.
22. Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* 2000, **54**, 138–153.
23. Harris, H.A., Bapat, A.R., Gonder, D.S., Frail, D.E. The ligand binding profiles of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  are species dependent. *Steroids* 2002, **67**, 379–384.
24. Shanle, E.K., Xu, W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 2011, **24**,

6-19.

25. 新規試験法評価会議 (JaCVAM 評価会議) 評価会議報告書 “エストロゲン受容体 (ER) 結合親和性化学物質の検出のための、ヒト組み換えエストロゲン受容体 (hrER) *in vitro* 試験法に関する性能準拠試験法ガイドライン (TG493)”, 国立医薬品食品衛生研究所, 令和 2 年 (2020 年) 6 月 25 日
26. Parker, G.J., Law, T.L., Lench, F.J., Bolger, R.E. Development of high throughput screening assays using fluorescence polarization: Nuclear receptor-ligand-binding and kinase/phosphatase assays. *J. Biomol. Screen.* 2000, **5**, 77–88.
27. Adamczyk, M., Reddy, R.E., Yu, Z. Synthesis of a novel fluorescent probe for estrogen receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2002, **12**, 1283–1285.
28. Ohno, K., Fukushima, T., Santa, T., Waizumi, N., Tokuyama, H., Maeda, M., Imai, K. Estrogen receptor binding assay method for endocrine disruptors using fluorescence polarization. *Anal. Chem.* 2002, **74**, 4391–4396.
29. Ohno, K., Suzuki, S., Fukushima, T., Maeda, M., Santa, T., Imai, K. Study on interactions of endocrine disruptors with estrogen receptor using fluorescence polarization. *Analyst* 2003, **128**, 1091–1096.
30. Leopoldo, M., Lacivita, E., Berardi, F., Perrone, R. Developments in fluorescent probes for receptor research. *Drug Discov. Today* 2009, **14**, 706–712.
31. Uchiyama, S., Santa, T., Okiyama, N., Fukushima, T., Imai, K. Fluorogenic and fluorescent labeling reagents with a benzofurazan skeleton. *Biomed. Chromatogr.* 2001, **15**, 295–318.
32. Uchiyama, S., Santa, T., Fukushima, T., Homma, H., Imai, K. Effects of the substituent groups at the 4- and 7-positions on the fluorescence characteristics of benzofurazan compounds. *J. Chem. Soc. Perkin Trans., 2*, **1998**, 2165–2173.
33. Bernady, K.F., Floyd, M.B., Poletto, J.F., Weiss, M.J. Synthesis of prostaglandins via conjugate addition of lithium *trans*-1-alkenyltrialkylalanate reagents. A novel

- reagent for conjugate 1,4-additions. *J. Org. Chem.* 1979, **44**, 1438–1447.
34. Fukuyama, T., Cheung, M., Kan, T. *N*-Carboalkoxy-2-nitrobenzenesulfonamides: A practical preparation of *N*-Boc-, *N*-Alloc-, and *N*-Cbz-protected primary amines. *Synlett* 1999, **8**, 1301–1303.
  35. Kan, T., Fukuyama, T. New strategies: a highly versatile synthetic method for amines. *Chem. Commun.*, **2004**, 353–359.
  36. Uchiyama, S., Matsumura, Y., de Silva, A.P., Iwai, K. Fluorescent molecular thermometers based on polymers showing temperature-induced phase transitions and labeled with polarity-responsive benzofurazans. *Anal. Chem.* 2003, **75**, 5926–5935.
  37. Uchiyama, S., Santa, T., Imai, K. Fluorescence characteristics of six 4,7-disubstituted benzofurazan compounds: an experimental and semi-empirical MO study. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1999**, 2525–2532.
  38. Kenakin, T., “Pharmacologic Analysis of Drug/Receptor Interaction,” 2th ed., Raven, New York, 1993, pp. 385–410.
  39. 長友 孝文. リガンド結合の解析法. *ファルマシア* 1992, **28**, 747–749.
  40. Sasson, S., Notides, A.C. Estriol and estrone interaction with the estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 1983, **258**, 8118–8122.
  41. Brooks, S.C., Skafar, D.F. From ligand structure to biological activity: modified estratrienes and their estrogenic and antiestrogenic effects in MCF-7 cells. *Steroids* 2004, **69**, 401–418.
  42. Tedesco, D., Haragsim, L. Cyclosporine: A review. *J. Transplant.*, **2012**, 230386.
  43. Kagawa, Y., Yanagawa, M., Muraki, Y., Iwamoto, T., Mizutani, H., Sugimura Y., Kojima, M. Comparison of cyclosporine concentrations in renal transplant recipients using ACMIA and mFPIA methods. *Clin. Biochem.* 2004, **37**, 1016–1021.



44. Lee, Y.W. Comparison between ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and a chemiluminescence immunoassay in the determination of cyclosporin A and tacrolimus levels in whole blood. *Exp. Ther. Med.* 2013, **6**, 1535–1539.
45. Vogeser, M., Shipkova, M., Rigo-Bonnin, R., Wallemacq, P., Orth, M., Widmann, M., Verstraete, A.G. Multicenter analytical evaluation of the automated electrochemiluminescence immunoassay for cyclosporine. *Ther. Drug Monit.* 2014, **36**, 640–650.
46. Fung, A.W.S., Knauer, M.J., Blasutig, I.M., Colantonio, D.A., Kulasingam, V. Evaluation of electrochemiluminescence immunoassays for immunosuppressive drugs on the Roche cobas e411 analyzer. *F1000Research* 2017, **6**, 1832.
47. Ceglarek, U., Lembcke, J., Fiedler, G.M., Werner, M., Witzigmann, H., Hauss, J.P., Thiery, J. Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 2004, **346**, 181-190.
48. McShane, A.J., Bunch, D.R., Wang, S. Therapeutic drug monitoring of immunosuppressants by liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 2016, **454**, 1–5.
49. Polledri, E., Mercadante, R., Fusarini, C.F., Maiavacca, R., Fustinoni, S. Immunosuppressive drugs in whole blood: validation of a commercially available liquid chromatography/tandem mass spectrometry kit and comparison with immunochemical assays. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2017, **31**, 1111–1120.
50. Clark, L.D., Lyons, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, **102**, 29–45.
51. Updike, S.J., Hicks, G.P. The enzyme electrode. *Nature* 1967, **214**, 986–988.
52. Sato, K., Ono, T., Yoshida, K., Ito, T., Kashiwagi, Y. Electrochemical

- determination of D-Glucose using nortropine-*N*-oxyl under physiological conditions. *Electroanalysis* 2015, **27**, 2272–2274.
53. Golubev, V.A., Rozantsev, E.G., Neiman, M.B. Some reactions of free iminoxyl radicals with the participation of the unpaired electron. *Izv. Akad. Nauk USSR. Ser. Khim.* 1965, **11**, 1927–1936.
54. Bobbitt, J.M., Flores, M.C.L. Organic nitrosonium salts as oxidants in organic chemistry. *Heterocycles* 1988, **27**, 509–533.
55. Cella, J.A., Kelly, J.A., Kenehan, E.F. Nitroxide-catalyzed oxidation of alcohols using *m*-chloroperbenzoic acid. New method. *J. Org. Chem.* 1975, **40**, 1860–1862.
56. Semmelhack, M.F., Chou, C.S., Cortes, D.A. Nitroxyl-mediated electrooxidation of alcohols to aldehydes and ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, **105**, 4492–4494.
57. Semmelhack, M.F., Schmid, C.R., Cortes, D.A. Mechanism of the oxidation of alcohols by 2,2,6,6-tetramethylpiperidine nitrosonium cation. *Tetrahedron Lett.* 1986, **27**, 1119–1122.
58. Yamauchi, Y., Maeda, H., Ohmori, H. Amperometric detection of alcohols and carbohydrates coupled with their electrocatalytic oxidation by 2,2,6,6-tetramethylpiperidiny-1-oxyl (TEMPO). *Chem. Pharm. Bull.* 1996, **44**, 1021–1125.
59. Sasano, Y., Sato, H., Tadokoro, S., Kozawa, M., Iwabuchi, Y. Safe and scalable aerobic oxidation by 2-azaadamantan-2-ol (AZADOL)/NO<sub>x</sub> catalysis: Large-scale preparation of Shi's catalyst. *Org. Process Res. Dev.* 2019, **23**, 571–577.
60. Iwabuchi, Y. Discovery and exploitation of AZADO: The highly active catalyst for alcohol oxidation. *Chem. Pharm. Bull.* 2013, **61**, 1197–1213.
61. Shibuya, M., Tomizawa, M., Suzuki, I., Iwabuchi, Y. 2-Azaadamantane *N*-oxyl (AZADO) and 1-Me-AZADO: Highly efficient organocatalysts for oxidation of alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, **128**, 8412–8413.

62. Hayashi, M., Sasano, Y., Nagasawa, S., Shibuya, M., Iwabuchi, Y. 9-Azanoradamantane *N*-oxyl (Nor-AZADO): A highly active organocatalyst for alcohol oxidation. *Chem. Pharm. Bull.* 2011, **59**, 1570–1573.
63. Sümmermann, W., Deffner, U. Die elektrochemische oxidation aliphatischer nitroxyl-radikale. *Tetrahedron* 1975, **31**, 593–596.
64. Kaifer, A.E., Bard, A.J. Polymer films on electrodes. 20. An ESR study of several spin probes incorporated into Nafion. *J. Phys. Chem.* 1986, **90**, 868–873.
65. Murray, R.W. *Electroanalytical Chemistry*, vol. 13, (1984) Marcel Dekker, New York, USA.
66. Murray, R.W. *Techniques of Chemistry*, vol. 22, (1992) Wiley-Interscience, New York, USA.
67. Ishii, Y., Sakaguchi, S., Iwahama, T. Innovation of hydrocarbon oxidation with molecular oxygen and related reactions. *Adv. Synth. Catal.* 2001, **343**, 393–427.
68. Recupero, F., Punta, C. Free radical functionalization of organic compounds catalyzed by *N*-hydroxyphthalimide. *Chem. Rev.* 2007, **107**, 3800–3842.
69. De Mico, A., Margarita, R., Parlanti, L., Vescovi, A., Piancatelli, G.A. A Versatile and highly selective hypervalent iodine (III)/2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy-mediated oxidation of alcohols to carbonyl compounds. *J. Org. Chem.* 1997, **62**, 6974–6977.
70. Barakat, O., Peaston, R., Rai, R., Talbot, D., Manas, D. Clinical benefit of monitoring cyclosporine C2 and C4 in long-term liver transplant recipients. *Transplant. Proc.* 2002, **34**, 1535–1537.
71. International Neoral Renal Transplantation Study Group (Perner, F.). Cyclosporine microemulsion (Neoral®) absorption profiling and sparse-sample predictors during the first 3 months after renal transplantation. *Am. J. Transplant.* 2002, **2**, 148–156.
72. Springsteen, G., Wang, B. A detailed examination of boronic acid-diol

- complexation. *Tetrahedron* 2002, **58**, 5291–5300.
73. Egawa, Y., Miki, R., Seki, T. Colorimetric sugar sensing using boronic acid-substituted azobenzenes. *Materials* 2014, **7**, 1201–1220.
74. Pandya, A., Sutariya, P.G., Menon, S.K. A non enzymatic glucose biosensor based on an ultrasensitive calix[4]arene functionalized boronic acid gold nanoprobe for sensing in human blood serum. *Analyst* 2013, **138**, 2483–2490.
75. Bajgrowicz-Cieslak, M., Alqurashi, Y., Elshereif, M.I., Yetisen, A.K., Hassan, M.U., Butt, H. Optical glucose sensors based on hexagonally packed 2.5-dimensional photonic concavities imprinted in phenylboronic acid functionalized hydrogel films. *RSC Adv.* 2017, **7**, 53916–53924.
76. Kim, Y.J., Kim, K.O., Lee, J.J. D-Glucose recognition based on phenylboronic acid-functionalized polyoligomeric silsesquioxane fluorescent probe. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, **95**, 286–291.
77. Ngo, Y.-L.T., Choi, W.M., Chung, J.S., Hur, S.H. Highly biocompatible phenylboronic acid-functionalized graphitic carbon nitride quantum dots for the selective glucose sensor. *Sens. Actuators B Chem.* 2019, **282**, 36–44.
78. Xu, S., Sedgwick, A.C., Elfeky, S.A., Chen, W., Jones, A.S., Williams, G.T., Jenkins, A.T.A., Bull, S.D., Fossey, J.S., James, T.D. A boronic acid-based fluorescent hydrogel for monosaccharide detection. *Front. Chem. Sci. Eng.* 2020, **14**, 112–116.
79. Sato, K., Nakajima, T., Yasukawa, Y., Anzai, J. Sugar-dependent solubility and fluorescence property of copolymers consisting of phenylboronic acid and 2-hydroxyethyl methacrylate moieties. *Polym. Bull.* 2010, **65**, 807–814.
80. Takahashi, S., Anzai, J. Phenylboronic acid monolayer-modified electrodes sensitive to sugars. *Langmuir* 2005, **21**, 5102–5107.
81. Su, L., Chen, T., Xue, T., Sheng, A., Cheng, L., Zhang, J. Fabrication of

- pH-adjusted boronic acid–aptamer conjugate for electrochemical analysis of conjugated *N*-glycolylneuraminic acid. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, **12**, 7650–7657.
82. Matsumoto, A., Osawa, S., Arai, T., Maejima, Y., Otsuka, H., Miyahara, Y. Potentiometric determination of circulating glycoproteins by boronic acid end-functionalized poly(ethylene glycol)-modified electrode. *Bioconjugate Chem.* 2021, **32**, 239–244.
83. Seno, M., Yoshida, K., Sato, K., Anzai, J. pH- and sugar-sensitive multilayer films composed of phenylboronic acid (PBA)-modified poly(allylamine hydrochloride) (PBA-PAH) and poly(vinyl alcohol) (PVA): A significant effect of PBA content on the film stability. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016, **62**, 474–479.
84. Elshaarani, T., Yu, H., Wang, L., ul-Abadin, Z., Ullah, R.S., Haroon, M., Khan, R.U., Fahad, S., Khan, A., Nazir, A., Usman, M., Naveed, K.-u.-R. Synthesis of hydrogel-bearing phenylboronic acid moieties and their applications in glucose sensing and insulin delivery. *J. Mater. Chem. B* 2018, **6**, 3831–3854.
85. Sato, K., Takahashi, M., Ito, M., Abe, E., Anzai, J. Glucose-induced decomposition of layer-by-layer films composed of phenylboronic acid-bearing poly(allylamine) and poly(vinyl alcohol) under physiological conditions. *J. Mater. Chem. B* 2015, **3**, 7796–7802.
86. Watahiki, R., Sato, K., Suwa, K., Niina, S., Egawa, Y., Seki, T., Anzai, J. Multilayer films composed of phenylboronic acid-modified dendrimers sensitive to glucose under physiological conditions. *J. Mater. Chem. B* 2014, **2**, 5809–5817.
87. Wang, X., Wei, B., Cheng, X., Wang, J., Tang, R. 3-Carboxyphenylboronic acid-modified carboxymethyl chitosan nanoparticles for improved tumor targeting and inhibitory. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017, **113**, 168–177.
88. Sajid, M.S., Jabeen, F., Hussain, D., Gardner, Q.-t.-A.A., Ashiq, M.N.,

- Najam-ul-Haq, M. Boronic acid functionalized fibrous cellulose for the selective enrichment of glycopeptides. *J. Sep. Sci.* 2020, **43**, 1348–1355.
89. Wilkinson, H., Saldova, R. Current methods for the characterization of *O*-glycans. *J. Proteome Res.* 2020, **19**, 3890–3905.
90. Delafield, D.G., Li, L. Recent advances in analytical approaches for glycan and glycopeptide quantitation. *Mol. Cell. Proteomics* 2021, **20**, 100054.
91. Krenkova, J., Liskova, M., Cmelik, R., Vigh, G., Foret, F. Multi-cationic aminopyrene-based labeling tags for oligosaccharide analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2020, **1095**, 226–232.
92. Hu, H., Khatri, K., Klein, J., Leymarie, N., Zaia, J. A review of methods for interpretation of glycopeptide tandem mass spectral data. *Glycoconj. J.* 2016, **33**, 285–296.
93. Adeel, M., Rahman, M.M., Caligiuri, I., Canzonieri, V., Rizzolio, F., Daniele, S. Recent advances of electrochemical and optical enzyme-free glucose sensors operating at physiological conditions. *Biosens. Bioelectron.* 2020, **165**, 112331.
94. Egawa, Y., Seki, T., Miki, R., Seki, T. Sugar-responsive smart materials based on phenylboronic acid and cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro.* 2019, **94**, 1–10.
95. Zhu, M., Xu, X., Hou, Y., Han, J., Wang, J., Zheng, Q., Hao, H. Boronic derivatization of monoacylglycerol and monitoring in biofluids. *Anal. Chem.* 2019, **91**, 6724–6729.
96. Li, S., Cai, W.-J., Wang, W., Sun, M.-X., Feng, Y.-Q. Rapid analysis of monosaccharides in sub-milligram plant samples using liquid chromatography-mass spectrometry assisted by post-column derivatization. *J. Agric. Food Chem.* 2020, **68**, 2588–2596.
97. Zhang, Y., Chen, H. Detection of saccharides by reactive desorption electrospray ionization (DESI) using modified phenylboronic acids. *Int. J. Mass Spectrom.*

- 2010, **289**, 98–107.
98. van Geenen, F.A.M.G., Franssen, M.C.R., Zuilhof, H., Nielen, M.W.F. Reactive laser ablation electrospray ionization time-resolved mass spectrometry of click reactions. *Anal. Chem.* 2018, **90**, 10409–10416.
99. Heiss, D.R., Badu-Tawiah, A.K. In-source microdroplet derivatization using coaxial contained-electrospray mass spectrometry for enhanced sensitivity in saccharide analysis. *Anal. Chem.* 2021, **93**, 16779–16786.
100. Higashi, T., Kawasaki, K., Matsumoto, N., Ogawa, S., Mitamura, K., Ikegawa, S. LC/MS/MS of steroids having vicinal diol as electrospray-active boronates. *Chem. Pharm. Bull.* 2013, **61**, 326–332.
101. Higashi, T., Ogawa, S. Chemical derivatization for enhancing sensitivity during LC/ESI–MS/MS quantification of steroids in biological samples: a review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016, **162**, 57–69.
102. Zhao, X.-E., Zhu, S., Liu, H. Recent progresses of derivatization approaches in the targeted lipidomics analysis by mass spectrometry. *J. Separation Science* 2020, **43**, 1838–1846.
103. Yamashita, K., Kobayashi, S., Tsukamoto, S., Numazawa, M. Synthesis of pyridine-carboxylate derivatives of hydroxysteroids for liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. *Steroids* 2007, **72**, 50–59.
104. Yamashita, K., Okuyama, M., Nakagawa, R., Honma, S., Satoh, F., Morimoto, R., Ito, S., Takahashi, M., Numazawa, M. Development of sensitive derivatization method for aldosterone in liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry of corticosteroids. *J. Chromatogr. A* 2008, **1200**, 114–121.
105. Yamashita, K., Nakagawa, R., Okuyama, M., Honma, S., Takahashi, M., Numazawa, M. Simultaneous determination of tetrahydrocortisol,

- allotetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone in human urine by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Steroids* 2008, **73**, 727–737.
106. Honda, A., Miyazaki, T., Ikegami, T., Iwamoto, J., Yamashita, K., Numazawa, M., Matsuzaki, Y. Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2010, **121**, 556–564.
107. Ohno, K., Hasegawa, T., Tamura, T., Utsumi, H., Yamashita, K. Proton affinitive derivatization for highly sensitive determination of testosterone and dihydrotestosterone in saliva samples by LC-ESI-MS/MS. *Anal. Sci.* 2018, **34**, 1017–1021.
108. Yamashita, K., Yamazaki, K., Komatsu, S., Numazawa, M. Fusaric acid as a novel proton-affinitive derivatizing reagent for highly sensitive quantification of hydroxysteroids by LC-ESI-MS/MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, **21**, 249–253.
109. Nakamura, Y., Satoh, F., Morimoto, R., Kudo, M., Takase, K., Gomez-Sanchez, C.E., Honma, S., Okuyama, M., Yamashita, K., Rainey, W.E., Sasano, H., Ito, S. 18-Oxocortisol measurement in adrenal vein sampling as a biomarker for subclassifying primary aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 2011, **96**, E1272–E1278.
110. Miyazaki, T., Honda, A., Ikegami, T., Iwamoto, J., Monma, T., Hirayama, T., Saito, Y., Yamashita, K., Matsuzaki, Y. Simultaneous quantification of salivary 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyisobutyrate, 3-hydroxy-3-methylbutyrate, and 2-hydroxybutyrate as possible markers of amino acid and fatty acid catabolic pathways by LC-ESI-MS/MS. *SpringerPlus* 2015, **4**, 494.
111. Yan, J., Springsteen, G., Deeter, S., Wang, B. The relationship among  $pK_a$ , pH, and



binding constants in the interactions between boronic acids and diols—it is not as simple as it appears. *Tetrahedron* 2004, **60**, 11205–11209.

112. 岩月 聡史, 大原 秀隆, 金光 優希, 石原 浩二. 高い酸解離能を有する 4-ピリジルボロン酸誘導体の反応性に関する溶液化学的研究. *Bunseki Kagaku* 2012, **61**, 1041–1047.
113. Gaunitz, S., Nagy, G., Pohl, N.L.B., Novotny, M.V. Recent advances in the analysis of complex glycoproteins. *Anal. Chem.* 2017, **89**, 389–413.
114. Lorand, J.P., Edwards, J.O. Polyol complexes and structure of the benzenboronate ion. *J. Org. Chem.* 1959, **24**, 769–774.
115. Wu, X., Li, Z., Chen, X.-X., Fossey, J.S., James, T.D., Jiang, Y.-B. Selective sensing of saccharides using simple boronic acids and their aggregates. *Chem. Soc. Rev.* 2013, **42**, 8032–8048.