

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）要旨

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

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 祥子

現在、生体内の低分子化合物を対象とする研究は、医療や農業、食品産業など様々な分野で広く実施されている。特に疾患バイオマーカーの探索に活用されるメタボロミクスや、薬物の標的タンパク質に対する相互作用を評価する薬理学的研究では、生体試料（血液、尿、組織、培養細胞等）を測定対象とすることが多く、手法としては主にガスクロマトグラフィー質量分析 (GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) などの質量分析計を用いた分析方法が盛んに開発されている。しかし、分析対象である低分子化合物は幅広い化学特性を持ち、それぞれの対象ごとまたは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、データ解析方法は確立されていないケースが多い。一方、分析方法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安価な装置を利用する分析法の開発も重要である。本研究の目的は、生体試料中の低分子の測定法として現在普及している分析技術を基に、簡便かつ信頼性の高い測定原理を利用し効率的に検出・評価できる測定法を開発することである。

第一章では、エストロゲン受容体 (ER) 結合アッセイに有用な蛍光標識リガンドの開発について述べる。エストロゲン様化合物の同定および活性評価法として、ヒト組換え ER を用いた *in vitro* 結合アッセイに基づくスクリーニング手法が数多く考案されている。放射活性アッセイの代替として開発された蛍光偏光 (FP) 法は、*B/F* 分離操作が不要で操作が簡便でありハイスループットな分析には適しているが、FP 測定に対応した専用機器が必要である。そこで第一章で

は、より検出原理が単純な蛍光強度の測定で評価を行う結合アッセイの開発を検討した。蛍光試薬であるベンゾフラザン (BD) はストークスシフトが大きく、水溶液中では蛍光を発しない性質を持つ。今回合成した BD 標識リガンド (BD-E2) は、ヒト組換えエストロゲン受容体 α と複合体を形成し、ER 濃度に依存して蛍光強度が増加した。これにより、本法は蛍光強度の変化量からリガンドと受容体の結合親和性を推定することで、FP 法と同等の性能で B/F 分離フリーの結合アッセイが可能となった。飽和結合アッセイの結果から、BD-E2 が ER に対し正の協同性を持つことが推測され、リガンド結合が ER の立体構造変化を誘導していることが示唆された。また、10 種類のエストロゲン様化合物と競合結合アッセイを実施した結果、BD-E2 法で得られた競合阻害のパラメーターは FP 法の文献値と良好な相関関係を示した。

第二章では、ニトロキシラジカル触媒を利用したアルコールの電気化学検出について検討した。電気化学分析は臨床分野において迅速、簡便な測定法として利用されている。また、生理活性物質や医薬品などの電気応答を示さない化合物の検出に対応した測定系として、酵素等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の構築が可能である。そこで第二章では、酵素反応に依らず電気信号に基づいて医薬品濃度を評価する手法の開発を検討した。TEMPO に代表されるニトロキシラジカル型の酸化触媒は、電位を印加することで活性化し、溶液中に共存するアルコールを酸化する。このとき得られる酸化電流値を計測することで、アルコール濃度を定量することが可能である。今回、水酸基を持つ化合物とニトロキシラジカルを含む溶液についてサイクリックボルタンメトリー (CV) 測定を実施し、得られた酸化電流値を比較した。6 種類のニトロキシラジカルの中で最も酸化効率の高かったノルトロピン-N-オキシルを用いて、第二級アルコールを持つシクロスポリンの定量を検討したと

ころ、CV 測定による検出可能範囲は 1 – 100 μM だった。この結果から、本法は水酸基を持つ低分子化合物の定量においてイムノアッセイや質量分析の文献値よりも感度が低かったものの、簡便で安価な測定方法として応用可能であることが示された。

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) 測定について解析した。フェニルボロン酸 (PBA) は水溶液中で糖などの *cis*-ジオールと環状エステルを形成するため、PBA に基づいた機能性分子や生化学的ツールの開発が盛んに行われている。一方、移動相に水系溶媒を用いる LC-MS において PBA 誘導体は加水分解を受けやすいため、ジオール化合物の測定に PBA 誘導体化を利用するには専用のシステムを構築する必要がある。そこで第三章では、ジオール化合物の定量における PBA 誘導体化の有用性を調査する目的で、種々の PBA との混合溶液について FAB-MS 測定を検討した。モデル化合物として 2-ヒドロキシエストロンを選択し、17 種類のボロン酸と混合し誘導体のピーク強度を評価した。その結果、4-ピリジンボロン酸 (4-PyBA) はプロトン親和力が大きいイオン化効率が高く、ジオールとの結合性にも優れていることが推測され、ポジティブモード質量分析において有用な誘導体化試薬であることが明らかになった。4-PyBA を用いてジオールを持つ単糖の検出を検討した結果、D-フルクトースにおいて $[\text{M}+\text{H}]^+$ ピーク強度の増加が認められた一方、D-グルコースでは検出感度の向上に至らなかった。今後は 4-PyBA 誘導体化による糖類の定量について、LC-ESI-MS 分析への適用など幅広い検討を行い、本法の有用性を追究したいと考えている。

以上、本論文では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 法について述べた。

いずれの方法も実試料の測定に適用するには、試料中の共存物質に起因する反応系の妨害や測定装置のレスポンス低下など多くの課題を抱えている。生体内分子の研究において、本研究で得られた知見は現在利用されている測定法において、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に役立つと考えられる。また費用面のみならず、既存の方法との相同性からデータの信頼性を検証し、繰り返し測定におけるメソッドの堅牢性が担保された測定法の開発と発展に貢献するものと期待する。

<参考文献> 主論文 (原著論文)

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