

Title	核酸構造解析のためのMALDI-TOF MS新規マトリックスの探索及び核酸構造がISDに与える影響に関する研究
Author(s)	木村, 聡
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76486
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (木村 聡)

論文題名

核酸構造解析のためのMALDI-TOF MS新規マトリックスの探索及び核酸構造がISDに与える影響に関する研究

論文内容の要旨

近年、様々な修飾核酸の医薬品としての開発が進み、複数の核酸医薬品が承認されている。医薬品として開発される核酸は、有効性の向上や酵素への耐性、DDSを目的として種々の化学修飾が施され、構造が複雑化している。医薬品としてこれらの核酸を利用するためには、既存の医薬品と同様に、その品質を管理しなければならない。有効成分としての核酸や、類似構造をもった核酸不純物の構造を正確に解析、定量する手法の確立は必須となる。核酸は低分子合成化合物と比べると分子量が大きく、特定のアミノ酸からのみ構成される抗体等のタンパク質と比べて構成成分が複雑であり、また種々の新規化学修飾が構造をより複雑化させている。そのため、既存の医薬品と比較して、その構造解析の技術的な難易度は高くなっている。

有効成分や不純物の構造解析に関しては、液体クロマトグラフィー 質量分析 (LC-MS) やマトリックス支援レーザー脱離質量分析計 (MALDI MS) が有用な手法となる。LC-MSとMALDI MSを比較すると、LC-MSはLCと接続されていることから不純物を分離しながら分析することができる利点があるが、核酸ではElectrospray Ionization (ESI)により複数の価数のイオンが生成することから、得られるスペクトルが非常に複雑であり、解析の難易度が高くなる。それに対して、MALDIでは主に1価のイオンが生成されることから、得られるスペクトルがシンプルであり、複雑な前処理なく測定できれば、特に医薬品の品質管理においては有用な方法であると考えられる。MALDIではIn-Source Decay (ISD) と呼ばれる質量分析計内のフラグメンテーションが可能であり、前処理なく構造解析を行うことも可能となる。

MALDIの測定では、マトリックスの選択が最も重要な要素となる。MALDIのイオン化原理は、複数のモデルが提唱されているが、まだ明確に解明されていないことから、理論的に測定対象化合物に最適なマトリックスを選択することは難しい。理論的にマトリックスを探索することはできないが、サンプル中で測定対象とマトリックスの距離も近い方が好ましいとされている。そのため、本研究では、測定対象との構造の類似性から、核酸塩基の誘導体がイオン化効率、ISDの切断効率が優れた核酸測定のマトリックスになるのではないかと考え、16種類の核酸塩基誘導体をマトリックスとして検討した。その結果、6化合物をマトリックスとして用いた時、6塩基長の核酸由来のイオンが検出された。その中でも6-チオグアニン (TG) と2-アミノ-6-クロロプリン (ACP) は核酸の分子イオン及びISDフラグメントイオンが高いイオン強度で検出された。両新規マトリックスを用いて、各塩基1種類のみで構成される6もしくは10塩基長のRNA及びDNAを測定したところ、各サンプルにおいてw/dイオン (DNAではa-Bイオン) を中心にしたフラグメントイオンが検出され、TGの方がノイズが少なくISDフラグメントイオンを生成することが示された。また、TGを用いて全ての塩基が含まれた10塩基長のRNAを測定したところ、10塩基分の配列解析に必要なフラグメントイオンが検出され、配列解析が可能であった。マトリックスとしての物性を評価するため、各化合物のUV吸収スペクトル、気相中でのプロトン親和力及びラジカルの供給能力の3項目について測定もしくは計算した。UV吸収スペクトルについては、今回マトリックスとして作用した化合物は、そうでない化合物と比べて、用いたMALDI TOF MS装置のレーザー波長である337 nmに近い極大吸収波長を示した。TGは検討した化合物の中で高いプロトン親和力及びラジカルの供給能力を示した。

TGの使用により明確なISDフラグメントイオンが検出できることから、チミンを中心とした 10塩基DNAの一カ所について、塩基、糖及びリン酸結合を他の構造に置き換えることにより、それぞれの構造の違いがISDに与える影響について、Collision Induced Dissociation (CID) によるフラグメンテーションと併せて検証した。両フラグメンテーションを比較すると、CIDによるフラグメンテーションの方が、構造変化による影響が大きく、変更箇所で生成されるフラグメントイオンが異なるだけでなく、変更箇所にイオンが集中する、もしくは該当イオンが見られなくなるなど、フラグメントイオンのプロファイルに大きな変化が見られた。この傾向は塩基、糖もしくはリン酸

結合の各変化全てについて認められており、構造変化の部位に依存していなかった。CIDと比較すると、ISDは構造変化に対する感度が低かった。塩基の変化に対しては、大きく全体的なフラグメンテーションパターンを変えたが、糖及びリン酸結合の変化に対しては、検出されるイオン（a-d、w-z イオン）には変化があるものの、CIDのように特定のイオンに集中することはなかった。塩基の変化のみが大きく影響を与えたことから、ISDは塩基を介して起こっている可能性が示唆される。ISDのメカニズムの一つとして、マトリックスと測定対象物との間で生じたラジカルがISDを引き起こしていると考えられている。発生したラジカルが特定の塩基に局在することにより、開裂の起点となっている可能性が考えられる。しかし、スパーサーを用いて、塩基を持たない状態を模したが、スペクトルへの影響は見られなかったことから、開裂メカニズムは塩基を介したラジカルによるだけでなく、複数のメカニズムの組み合わせで起きていると考えられる。

本研究において、複数の核酸塩基誘導体が実際にマトリックスとして作用することを示し、核酸に対する新規のマトリックスとしてTGを見出した。TGは核酸に効率的にISDを引き起こし、フラグメントイオンからDNAやRNA等の配列を解析できることを示した。また、塩基、糖及びリン酸結合の構造の違いによるISD及びCIDフラグメンテーションの影響を検証し、CIDでは構造変化に対して、大きくスペクトルパターンが変化するのに対して、ISDでは塩基の違いのみが大きく全体に影響を与えることを示した。本研究の結果より、MALDIは構造の変化に対する影響が少ないことから、核酸塩基誘導体のように核酸分析に適したマトリックスを使用することで、MALDIが構造解析においてより有用な手法となることを示した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (木村 聡)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 小比賀 聡
	副 査 教授 大久保 忠恭
	副 査 教授 井 上 豪

論文審査の結果の要旨

近年、数多くの核酸医薬品が日米欧を中心に承認されている。有効性や生体内での安定性の向上、薬物動態の改善を目的として、これら核酸医薬品には種々の化学修飾が施されており、その化学構造は複雑化している。一方で、医薬品の開発においては、有効性・安全性の確保に加えて、品質の管理方法の確立が重要となる。核酸医薬品は従来の低分子医薬品に比べ分子量が大きく構造が複雑である。また、主に天然のアミノ酸から構成される抗体医薬品と比べた場合でも、新規の化学修飾が用いられることが多い核酸医薬品では、やはりその構造は複雑化していると言える。そのため、既存の医薬品に比べ、核酸医薬品の構造解析の技術的難易度は高い。申請者は、マトリックス支援レーザー脱離質量分析計 (MALDI MS) を駆使し、In-Source Decay (ISD) と呼ばれる質量分析計内でのフラグメンテーションにより、各種化学修飾を含む一定の配列長の核酸分子の構造解析を実施した。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

- 1) MALDI MSで核酸分子を分析するために適したマトリックスを探索し、6化合物が優れたISD効率を示すことを見出した。
- 2) その中で、6-チオグアニン (TG) と2-アミノ-6-クロロプリン (ACP) がマトリックスとして良い結果を与え、特にTGをマトリックスとして用いた場合では10塩基程度のRNAの配列解析が可能であることを確認した。
- 3) これら新規マトリックスの物性とISD効率の相関について評価を実施するとともに、ISD効率と測定対象となる核酸の配列や化学修飾の有無・種類についての相関を精査し、今回見出したマトリックスによるISD機構を考察した。

以上、本論文は、今後益々重要になると予想される核酸医薬品の品質管理や構造解析のための基盤研究の成果をまとめたものであり、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。