

FIA-高分解能質量分析によるチミジンの逐次的なリン酸化反応の観測

徳島大学大学院先端技術科学教育部 小林拓真

医薬品開発において、投薬後の体内代謝に関わる様々な酵素反応を理解することは重要である。三リン酸化されたヌクレオシドにはウイルスの増殖を抑制する作用があり、そのために HIV 治療薬などへの応用が期待されている。この化合物の一例としてチミジン三リン酸 (dTTP) が挙げられる。dTTP は、キナーゼの作用に基づくチミジン (dT) の逐次的なリン酸化により、チミジン一リン酸 (dTMP)、チミジン二リン酸 (dTDP) を経て生成することが知られている (Scheme 1)。この反応は、従来、吸光度法やキャピラリー電気泳動法 (CE) を用いて、アデノシン三リン酸 (ATP) の消費量から観測されていたが、感度が不足していることに加え、基質や酵素の消費量が多いという問題があった。また、これまで単一の酵素反応の観測例はあるが、複数の酵素反応が関与する逐次的なリン酸化の直接的なモニタリングには至っていなかった。

Ferey らは、この酵素反応の解析のための新しい手段として、UHPLC システムに ESI-MS を接続し、カラムを取り外した FIA モードにおける高分解能質量分析 (HRMS) を提案した^[1]。この方法では、異なる質量電荷比に基づいて酵素反応の各生成物を区別し、そのシグナル強度から直接定量することができる (Scheme 1)。測定は、水/アセトニトリル (65/35) のキャリヤー溶媒 (流量 200 $\mu\text{L min}^{-1}$) に 1 μL の測定試料を注入し、得られる MS スペクトルを観測することで行われた。

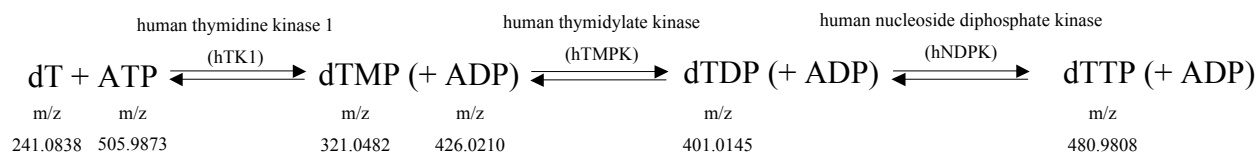
本研究では、基質溶液に酵素溶液を直接添加する場合と、磁性ナノ粒子に固定化した酵素を用いた場合の 2 種類の実験における反応を観測の対象とした。まず酵素を活性化させ、0.48 g L^{-1} の hTK1 存在下で 50 μM の dT と 350 μM の ATP と反応させ、これに引き続き 0.04 g L^{-1} の hTMPK の存在下、さらに 0.04 g L^{-1} の hNDPK 存在下で反応させた。各段階の酵素反応は 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間行い、さらに 90 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間加熱して酵素反応を停止させた後、上澄みを採取して別のサンプルチューブ内で次段階の酵素反応を行った。各酵素反応のミカエリス・メンテン解析を行い、CE で測定した結果と比較したところ、双方とも

$10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ オーダーのほぼ同等の触媒効率 ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) の値が得られた。これは、クロマトグラフィーのような物質分離の過程を含まない本法においても、信頼のできる結果が得られていることを示している。

次に、逐次的な複数の酵素反応を直接観測するために、上述の反応と同様に dT と ATP を hTK1 共存下で反応させ、その後、上澄み液を別のサンプルチューブに移して hTMPK 共存下で ATP と反応させた後、上澄み溶液をさらに別のサンプルチューブに移して hNDPK 共存下で ATP と反応させた。ここでは、各酵素反応を停止させるための加熱操作は行わず、複数の酵素反応が起きている状況で観測した。その結果、酵素を固定しない場合には生成量はわずかであり、酵素を固定化した場合のみで dTTP の生成が観測された。これは、溶液中での酵素の相互干渉が、酵素の固定化によって抑制されたためと考えられる。

分離過程を伴わない FIA モードで HRMS を利用することの新しい分析方法は、 μM レベルでの高い感度で反応生成物をわずか 1 分で直接定量できる。本法は、酵素反応の解析のための有用な測定方法であり、体内での薬品の代謝経路の解明に大きく役立つと考えられる。

[1] J. Ferey, D. Da Silva, C. Colas, R. Nehme, P. Lafite, V. Roy, P. Morin, R. Daniellou, L. Agrofoglio, B. Maunit, *Anal. Chim. Acta*, **1049**, 115-122 (2018).



Scheme 1 チミジンからチミジン 3 リン酸が生成されるまでの反応