

イミダゾール C-ヌクレオシドホスホロアミダイトのマススペクトル測定の実際

藤嶽美穂代*, 春沢信哉

Practical MS Determination of Imidazole C-Nucleoside Phosphoramidites

Mihoyo FUJITAKE* and Shinya HARUSAWA

Osaka University of Pharmaceutical Sciences, 4-20-1 Nasahara, Takatsuki, Osaka 569-1094, Japan

(Received October 12, 2010; Accepted November 23, 2010)

Imidazole C-nucleoside phosphoramidites (ICN-PAs) are key building blocks for probing general acid and base catalysis in ribozyme and are used in contemporary solid-phase synthesis of oligonucleotides. The accurate molecular weight measurements of ICN-PAs, which contain acid and base-labile functional groups, may be easily determined by mass spectrometry (MS) using a novel matrix system, triethanolamine (TEOA)-NaCl, on liquid secondary ion (LSI) MS or fast atom bombardment (FAB) MS equipped with a double-focusing mass spectrometer. The present method measures rapidly and easily the accurate molecular weights of various ICN-PAs as adduct ions $[M+Na]^+$ with average mass error smaller than 0.8 ppm, allowing the formulas of the PAs in place of elemental analysis. It also becomes a powerful tool for MS identification of various PAs. We herein describe two protocols for the mass spectra measurements of PAs.

Key words—imidazole C-nucleoside, phosphoramidite, molecular weight, mass spectrometry, matrix

1. はじめに

様々なヌクレオシド及び非ヌクレオシドホスホロアミダイト (PAs) は、オリゴヌクレオチド固相合成のビルディングブロックとして重要な化合物である¹⁾。PAs の結晶化は、一般に困難である場合が多く、PAs の構造確認のためにナノ (10^{-9}) グラム単位の超微量試料で測定できるマススペクトル測定が通常用いられている (本論文ではマススペクトルピークは、マススペクトルと表記し、測定方法及び技術を意味する mass spectrometry を MS と以下省略する)。しかしながら、PAs 分子は酸や塩基に対して不安定な結合を多く含むため

MS による分子量関連イオン (MRIs) を検出できないことが多い。そのため新たに合成された PAs では MS による構造決定が行われないまま DNA/RNA 自動合成機に付される場合が見られる。これまでの PAs の MS の研究例は、わずかに Szabó²⁾ がナノエレクトロスプレー MS を用いて一般的な 6 つの 2'-デオキシヌクレオシド PAs を測定した例が見られるにすぎない。

一方、我々はここ数年イミダゾール C-ヌクレオシド (ICNs) の生体機能性分子への応用研究の中で、イミダゾール ($pK_a = 7.1$) が酸-塩基触媒であることに着目し、リボザイムの反応機構³⁾を解明するためのイミダゾール改変 RNA プローブ (イミ

*大阪薬科大学 MS 室, e-mail: fujitake@gly.oups.ac.jp

ダゾールリボザイム)の合成研究を進めてきた。⁴⁾ RNAへのイミダゾールの導入は、PAsとして行うため、これまでに種々のC4-イミダゾールC-ヌクレオシドホスホロアミダイト(ICN-PAs)を合成した(Fig.1, 3)。これらのICN-PAsを用いてRNA自動合成機でリボザイムの重要塩基にイミダゾールを挿入する事でイミダゾール改変リボザイムを合成することが出来る。我々は、合成したイミダゾールリボザイムがリン酸ジエステル結合の切断-連結反応に対して触媒活性を保持することで元の核酸塩基が一般酸-塩基触媒としてリボザイムの反応機構に直接関与することを強く支持するchemogenetic methodを開発した。⁹⁾ 現在までに、この手法によりVSリボザイムのA756,⁹⁾ G638⁷⁾及びヘアピンリボザイムのG8¹⁰⁾が一般酸-塩基触媒の中心塩基であることを報告している。

PAsの中で最初に合成したICN-PA(1)は、RNA合成のためのイミダゾール-Nの保護基として我々が独自に開発したピバロイルオキシメチル(POM)

基を持ち、⁵⁻⁶⁾ 2'-水酸基には、最も一般的なtert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)基、5'-水酸基にはジメトキシトリチル(DMT)基、3'-水酸基にはホスフィチル基を持つ(Fig.1)。これらのうちPOM基は、塩基性下(28%アンモニア水/メタノール=1/3, v/v)、室温で容易に除去され、⁵⁻⁶⁾ 一方、TBDMS、DMT、ホスフィチル基は、酸に弱い官能基である。特に1は、天然型の核酸塩基をもつN-ヌクレオシドPAsに比べ酸に敏感であり、通常の合成研究で用いられるTLC(Merck 60 F₂₅₄; pH 5.5)上で分解してしまう(1の不安定さは、代表的な有機塩基触媒であるイミダゾールが分子内に存在するため、イミダゾール-Nが分子内あるいは分子間反応で2'-O-TBDMS基のSiを攻撃し、O-Si結合を活性化することで、加水分解を促進するためと説明できる)。そのため、最初に1を合成した時点では¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMRなどの各種スペクトルデータは、その構造をよく支持したが、構造決定に必要なMSによる精密質量とそれに基づ

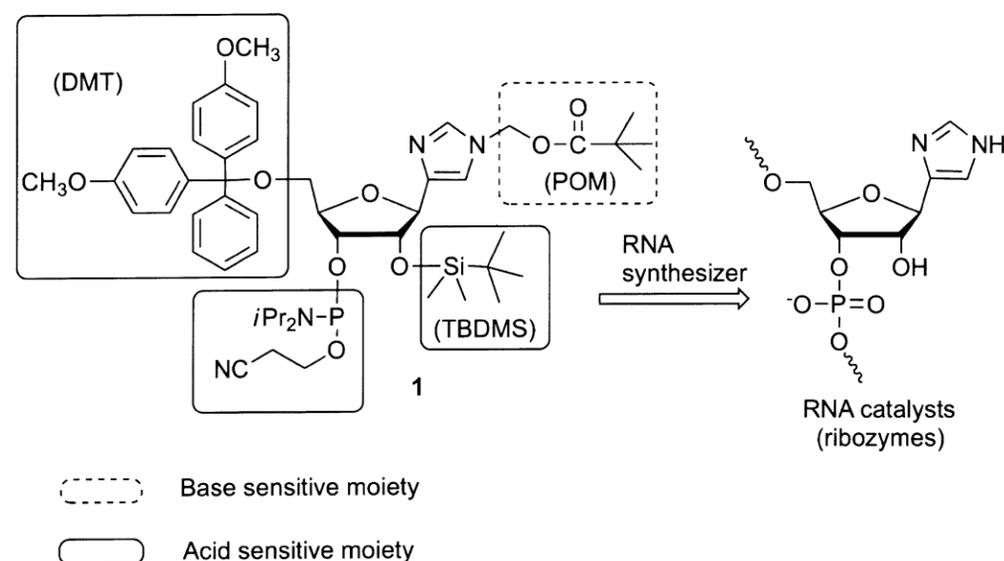


Fig. 1. Chemical steps to incorporate imidazole base into RNA sequence.

く組成決定は、種々のイオン化法を用いても成功しなかった。

そこで、PA 1に対して汎用型の二重収束質量分析計のイオン源として熱に不安定な化合物などの測定に適したソフトイオン化法であるLSI (liquid secondary ion)法あるいはFAB (fast atom bombardment)法を用いて、種々のマトリックスを検討することで、1のマススペクトル測定を試みた¹¹⁻¹²⁾。マトリックスとして、

グリセロール(G), meta-ニトロベンジルアルコール(NBA), ジエタノールアミン(DEOA), ジチオスレイトール/ジチオエリスリトール 3:1混合物(マジックビュレット, MB), ジチオスレイトール/ α -チオグリセロール 1:1混合物(DTT/TG), トリエタノールアミン[TEOA: N(CH₂CH₂OH)₃]を試みたが、いずれも分子量関連イオンは観測されず、化合物1の同定は出来なかった(Table 1, entries 4-9)。そこで、マトリックスにNa⁺を添加するこ

Table 1. MS conditions for imidazole C-nucleoside phosphoramidite (ICN-PA) 1

Entry	Ionization Method	Matrix ^a	MRI ^b	RI ^c (%)	Observed mass ^d (m/z)	Error ^e (ppm)
1	EI (70eV)		-	ND ^f		
2	(20eV)		-	ND		
3	CI		-	ND		
4	LSIMS	G	-	ND		
5		NBA	-	ND		
6		DEOA	-	ND		
7		MB	-	ND		
8		TEOA	-	ND		
9		DTT/TG	-	ND		
10		G + NaCl	[M+Na] ⁺	0.2		
11		NBA + NaCl	[M+Na] ⁺	0.6		
12		DEOA + NaCl	[M+Na] ⁺	0.7		
13	MB + NaCl	[M+Na] ⁺	0.4			
14	DTT/TG	[M+Na] ⁺	0.3			
15	TEOA + NaCl	[M+Na] ⁺	20.1		953.4625 ^g	0.4
16	FAB	G	-	ND		
17		G + NaCl	-	ND		
18		TEOA + NaCl	[M+Na] ⁺	2.6		
19	ESI		-	ND		
20	MALDI-TOF	THAP	[M+Na] ⁺	25.2	953.5199 ^g	60.6

^a G, glycerol; NBA, m-nitrobenzyl alcohol; DEOA, diethanolamine; MB, dithiothreitol/dithioerythritol (3/1); TEOA, triethanolamine; DTT/TG, dithiothreitol/thioglycerol (1:1); THAP, 2',4',6'-trihydroxyacetophenone.

^b MRI; Molecular-related ion.

^c RI; Intensity relative to the base peak ion (100%).

^d The mass was measured by HRMS.

^e The error can be calculated using the following equation:

$$\text{Error(ppm)} = 10^6 \times (\text{observed mass} - \text{theoretical mass}) / \text{theoretical mass}$$

^f ND; < 0.1%.

^g 1: C₅₀H₇₁N₄O₉PSi, [M+Na]⁺, Theoretical mass (m/z) = 953.4621.

Table 2. RIs and errors on LSIMS or FABMS measurements of ICN-PAs under Protocol 1

ICN-PAs	Formula	Theoretical mass ^a	Observed mass ^a	RI(%) ^b	Error (ppm)
1	C ₅₀ H ₇₁ N ₄ O ₉ PSi	953.4621	953.4625	20.1	0.4
2	C ₅₀ H ₇₁ N ₄ O ₉ PSi	953.4621	953.4618	14.6	-0.3
3	C ₅₂ H ₇₅ N ₄ O ₉ PSi	981.4934	981.4935	1.6	0.1
4	C ₅₂ H ₇₅ N ₄ O ₉ PSi	981.4934	981.4932	0.4	-0.2
5	C ₄₄ H ₅₇ N ₄ O ₈ P	823.3809	823.3801	3.5	-1.0
6	C ₄₇ H ₆₁ N ₄ O ₉ P	879.4070	879.4069	2.2	-0.1
7	C ₄₇ H ₆₀ N ₅ O ₉ P	892.4027	892.4025	9.9	-0.2
8	C ₄₈ H ₆₂ N ₅ O ₉ P	906.4183	906.4204	17.9	2.3
9	C ₄₉ H ₆₄ N ₅ O ₉ P	920.4339	920.4336	8.4	-0.3
10	C ₅₀ H ₆₆ N ₅ O ₉ P	934.4495	434.4490	70.0	-0.5

^a[M+Na]⁺^bIntensity of [M+Na]⁺ relative to the base peak ion (100%).

持つヌクレオシド及び非ヌクレオシド PAs の 50 例以上について MS を行ったところ、そのすべてにおいて平均質量誤差 0.8 ppm 以下で簡便かつ迅速にマススペクトル測定に成功し、その一般性を実証した。¹¹⁾

本稿では、ICN-PAs のために開発した TEOA-NaCl マトリックスを用いるマススペクトル測定法の実験を 2 つのプロトコルとして詳細に報告する。¹⁴⁾

2. TEOA-NaCl を用いる ICN-PAs の精密マススペクトル測定

2.1. ICN-PAs のマススペクトル測定

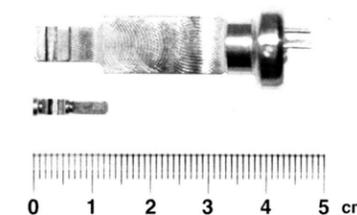
PAs のマススペクトル分析は特別なシステム構成を必要とせず、LSI または FAB イオン源を備えた一般的な二重収束質量分析計を用いて測定を行うことができる (Fig. 4)。LSIMS では、一次イオンに 15 keV に加速された Cs⁺ を用いイオン化された試料を 6 kV で加速した。一方、FABMS では 5-6 keV のエネルギーを持つ高速中性 Xe 原子を発生させ、その衝撃によりイオン化された試料を 8-10 kV で加速した。またエミッション電流

は 1-5 mA で行った。LSI, FAB ともに試料はイオン源に直接導入し、低分解能測定に対しては m/z 0~1500 を 8-10 秒スキャンにてスペクトルを得、約 10 スキャンを積算した値を用いた (分解能 2000~3000, 10% 谷定義)。高分解能測定においては、ポリエチレングリコール (PEG) 600 と PEG 1000 およびこれらの Na⁺ 付加体を正確な組成式を得るための質量校正標準化合物として用い、ICN-PAs の [M+Na]⁺ ピークを、その m/z 付近に観測される PEG (+Na) の 2 本のピークで挟み、連続した加速スキャン (10-20 秒) によって精密質量を求めた (抜き差し法による測定)。高分解能測定時の分解能は LSIMS においては 3000, FABMS では 3000-8000 (いずれも 10% 谷定義) とした。また、すべての低分解能及び高分解能測定は、正イオンモードで行った。

ICN-PAs のマススペクトル測定は、以下の 2 つのプロトコルによって行うことができる。

プロトコル 1 :

二重収束分析計の LSIMS または FABMS におけるマトリックスとして、TEOA と生理食塩水 (NaCl) の組合せによって ICN-PAs の精密質量測定を行う。¹¹⁾

**Fig. 4.** JMS-700 質量分析計 (JEOL : 大阪薬科大学 MS 室)**Fig. 5.** LSIMS ターゲット (上) と FABMS ターゲット (下)

プロトコル 2 :

一定量の TEOA に対し、PA : NaCl のモル比が 1 : 6 となるように試料を調整し、[M+Na]⁺ のピーク強度を最大とする。¹¹⁾

2.2. プロトコル 1

プロトコル 2 に比べて、Na⁺ 付加分子の相対強度が低下するものの、通常の精密質量測定には十分な強度が得られ、操作も簡便であり迅速に測定できる。

準備するもの

PA (分析対象化合物)

クロロホルム : > 99% (GC)

TEOA : FABMS and LSIMS grade

生理食塩水 (0.9% NaCl) : 超純水

2 μl- 使い捨てマイクロキャピラリーピペット (minicaps, HIRSCHMANN[®] LABORGERATE)

サンプルチューブ (ガラス製)

1) 2 μl- 使い捨てマイクロキャピラリーピペットで TEOA を約 0.5 μl 吸い取り、FAB または LSIMS ターゲットに塗布する (Fig. 5)。

2) PA 試料の約 0.02 - 1 mg をサンプルチューブに秤取り、2 μl- 使い捨てマイクロキャピラリーピペットで吸い取ったクロロホルム約 1 μl を加え溶解後、素早く同じピペットでその半量を吸い上げ、操作 1) のターゲット上の TEOA に加える。

3) 2 μl- 使い捨てマイクロキャピラリーピペットで生理食塩水約 2 μl を取り、操作 2) の PA と TEOA の混合物に加えるとともに、そのキャピラリーピペットを用いて均一に混合する。

(TEOA に対して添加する金属イオンに K⁺ (KCl) を用いた場合にも Na⁺ と同程度の [M+metal]⁺ のピーク強度が得られる。¹²⁾

4) このように調整したターゲットを測定に用いるプローブに装着し LSIMS または FABMS 測定を行う (測定条件は 2.1. に記載)。

5) 低分解能測定を行った後、高分解能測定用に調整した装置で抜き差し法により精密質量を測定する (測定条件は 2.1. に記載)

2.3. プロトコル 2

TEOA に対して PA : NaCl が 1 : 6 (モル比) の最適濃度に調整されたプロトコル 2 で分析を行った場合、[M+Na]⁺ ピークは最大となる。¹¹⁾ 従って、

プロトコル 1 で十分な感度が得られなかった場合、プロトコル 2 を行う。

準備するもの

PA (分析対象化合物)

クロロホルム：>99% (GC)

TEOA：FABMS and LSIMS grade

生理食塩水 (0.9% NaCl)：超純水

0.001 mg まで秤量可能な天秤

1 μ l, 2 μ l- 使い捨てマイクロキャピラリーピペット

(minicaps, HIRSCHMANN^R LABORGERATE)

サンプルチューブ (ガラス製)

マイクロピペット (0.2 - 2 μ l, 0.5 - 10 μ l, 5 - 50 μ l)

1 ml メスピペット (measuring pipette)

安全ピペッター

- 1) マイクロピペットで TEOA を 0.5 μ l 量り取り、LSIMS または FABMS ターゲットに塗布する。
- 2) 0.01 μ mol/0.5 μ l の試料を作成する。
PA 試料 10 μ mol を 1 μ g まで計測可能な天秤で量り取り、サンプルチューブの底に入れ、CHCl₃ 0.5 ml をメスピペットで入れる。
(実際には試料を正確に量り取ることは困難なので、0.01 μ mol/0.5 μ l となるように CHCl₃ の量で調整する。)
- 3) このように調整した試料 0.5 μ l と 0.9% NaCl 0.4 μ l をマイクロピペットで量り取り、操作 1) のターゲット上の TEOA に加え、均一に混合する。
(TEOA に対して添加する金属イオンに K⁺(KCl) を用いた場合にも Na⁺ と同程度の [M+metal]⁺ のピーク強度が得られる。¹²⁾)
- 4) ターゲットを、測定に用いるプローブに装着し、LSIMS または FABMS 測定を行う (測定条件は 2.1. に記載)。
- 5) 低分解能測定を行った後、高分解能測定用に調整した装置で抜き差し法により精密質量を測定

する (測定条件は 2.1. に記載)

2.4. 測定時間および注意事項

プロトコル 1 を用いて LSIMS 及び FABMS を行う場合、一試料につき低分解能測定と高分解能測定を両方を測定しても約 30 分で結果が得られる。一方、プロトコル 2 を用いて測定する場合は、操作が多くなるため 3 時間から 4 時間を要する。ここで考慮しなければならないことは、PAs の精密質量を得るためには必ずしも [M+Na]⁺ のピーク強度が最高になる必要はなく、高分解能測定に十分な強度を得ることである。PAs の精密分子量の確認は、簡便迅速に結果が得られるプロトコル 1 で通常は充分に対応できる。

また、測定に供する ICN-PAs は、一般的な *N*-ヌクレオシド-PAs よりも不安定であるため塩基性カラムで精製を行った。単離された ICN-PAs は、-20°C で数ヶ月保存してもスペクトル的には変化が見られなかった。

3. まとめ

我々の合成した ICN-PAs は、不安定な化合物であったため、通常の MS による構造確認が出来なかった。そこでイオン化法および測定条件を詳細に検討した結果、汎用型の二重収束質量分析計のイオン源として LSI 及び FAB を用い、マトリックスを TEOA + NaCl (KCl) とすることで ICN-PAs の精密質量及び組成決定が出来ることを見いだした。さらにこの手法は、様々なヌクレオシド及び非ヌクレオシド PAs にも適用可能であることが判明した。¹¹⁾ 我々の報告後、PAs のマススペクトル測定に関して、数種類のマトリックスに LiCl を添加し、ESI/MS により精密質量を得る方法、¹⁵⁾ HPLC の検出器として ESI/MS が有用であることが報告されている。¹⁶⁾ 一方、本法は特別な装置や特殊な測定法を用いることなく汎用型の測定装置で実施可能であるため、通常のマススペクトル測定が出来な

い PAs に対する第一選択法になり得ると考えられる。¹⁷⁾ また、ここで用いたマトリックスシステムは、PAs 以外の不安定な化合物に対しても適用可能なものと期待される。

謝辞 ICN-PAs のマススペクトル測定について有益なご助言を賜りました神戸薬科大学、齋木加代子元准教授に深く感謝致します。また、各種 ICN-PAs 測定試料をご提供いただき、有益なご教示を賜りました大阪薬科大学、箕浦理佐博士、Dundee 大学、David M. J. Lilley 教授、Birmingham 大学、Zheng-yun Zhao 博士に深謝致します。さらに、FAB/MS 測定にご協力頂きました武庫川女子大学薬学部、堀山志朱代博士に厚くお礼申し上げます。最後に、終始温かく励まして頂いた大阪薬科大学、栗原拓史名誉教授に心より感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) For reviews, see: (a) Caruthers M. H., Barone A. D., Beaucage S. L., Dodds D. R., Fisher E. F., McBride L. J., Matteucci M., Stabinsky Z., Tang J. -Y., *Methods in Enzymology*, **154**, 287-315 (1987). (b) "Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry," eds. by Beaucage S. L., Bergstrom D. E., Glick, G. D., Jones R. A., John Wiley & Sons, New York, 2000, 2.1.1-2.9.14. (c) Reese C. B. *Tetrahedron*, **58**, 8893-8920 (2002).
- 2) Kele Z., Kupihár Z., Kovács L., Janáky T., Szabó P. T., *J. Mass Spectrom.*, **34**, 1317-1321 (1999) and references cited therein.
- 3) "Ribozymes and RNA Catalysis," eds. by Lilley D. M. J., Eckstein F., Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- 4) Minoura L., Harusawa S., *Yakugaku Zasshi*, **130**, 1707-1724 (2010).
- 5) Araki L., Harusawa S., Yamaguchi M., Yonezawa S., Taniguch N., Lilley D. M. J., Zhao Z., Kurihara T., *Tetrahedron Lett.*, **45**, 2657-2661 (2004).
- 6) Araki L., Harusawa S., Yamaguchi M., Yonezawa S., Taniguch N., Lilley D. M. J., Zhao Z., Kurihara T., *Tetrahedron*, **61**, 11976-11985 (2005).
- 7) Araki L., Morita K., Yamaguchi M., Zhao Z., Willson T. J., Lilley D. M. J., Harusawa S., *J. Org. Chem.*, **74**, 2350-2356 (2009).
- 8) Araki L., Zhao Z., Lilley D. M. J., Harusawa S., *Heterocycles*, **81**, 1861-1869 (2010).
- 9) Zhao Z., McLeod A., Harusawa S., Araki L., Yamaguchi M., Kurihara T., Lilley D. M. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 5026-5027 (2005).
- 10) Willson T. J., Ouellet J., Zhao Z., Harusawa S., Araki L., Kurihara T., Lilley D. M. J., *RNA*, **12**, 980-987 (2006).
- 11) Fujitake M., Harusawa S., Araki L., Yamaguchi M., Lilley D. M. J., Zhao Z., Kurihara T., *Tetrahedron*, **61**, 4689-4699 (2005).
- 12) Fujitake M., Harusawa S., Zhao Z., Kurihara T., *Bull. Osaka Univ. Pharm. Sci.*, **1**, 107-112 (2007).
- 13) (a) Teesch L. M., Adams., *J. Org. Mass Spectrom.*, **27**, 931-943 (1992). (b) Madhusudanan K. P., *J. Mass Spectrom.*, **30**, 703 (1995).
- 14) Harusawa S., Fujitake M., Kurihara T., Zhao Z., Lilley D. M. J., "Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry," eds. by Beaucage S. L., Bergstrom D. E., Herdewijn P., Matsuda A., John Wiley & Sons, New York, 2006, 10.11.1-10.11.15.
- 15) Kupihár Z., Timár Z., Darula Z., Dellinger D. J., Caruthers M. H., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 533-540 (2008).
- 16) Capaldi D. C., Scozzari A. N., "Antisense Drug Technology," 2nd ed., Chap. 14, ed. by Crooke S. T., CRC Press, New York, 2008, pp. 401-434.
- 17) Banoub J. H., Miller-Banoub J., Jahouh F., Joly N., Martin P., "Mass Spectrometry of Nucleosides and Nucleic Acids" Chap. 1, eds. by Banoub J. H., Limbach P. A., CRC Press, New York, 2010, pp. 1-90.