

## 生体物質の高精度な分離を志向した高性能分析法の構築

加藤 大

## Development of High Efficiency Separation Method for Biomolecules

Masaru KATO

Center for NanoBio Integration, Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering,  
The University of Tokyo, Room 251A, The Faculty of Engineering Building No. 3,  
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656, Japan

(Received July 5, 2007)

It is becoming increasingly important to separate mixed samples, such as bio- and environmental samples. For the analysis of a target compound in a mixed sample, a highly efficient and selective separation method is required. We have developed columns of high resolution, very selective columns, and highly efficient analytical methods using integrated techniques and biomolecules. These developed methods save analytical time, sample volume, *etc.* We are now interested in nano scale materials which many people are now focusing on. Although excellent nano materials have been developed by many researchers, there are few efficient separation, purification or evaluation methods for these compounds. In this review, we introduce our recent achievements concerning the separation of nano compounds.

**Key words**—biomolecule separation; integrated chemistry; amyloid; hydrogel; sol-gel

## 1. はじめに

近年、分析技術の発展により、既存の分析法では測定できなかった生命情報の解析が可能となり、新しい知見の発見や学問領域の開拓が行われている。例えば、生体内に存在する多数の物質の動態や機能を明らかにするゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス等の研究が可能となり、新しい生体物質の調節機能などが報告されている。

高性能な分離法としてクロマトグラフィー法や電気泳動法等が利用され、特に生体物質のような不揮発性物質の分離計測には主に HPLC 法やキャピラリー電気泳動 (CE) 法が利用されている。さらに HPLP と CE とを組み合わせたキャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) 法、超高压液体クロマトグラフィー法やマイクロチップを用いた分析法など新しい手法が開発され、迅速に、より多成分の解析が可能となっている。しかし、現在報告されている中で最も優れた分析法を用いても、地球上に存在

する数十万種類以上の合成化合物はおろか、細胞に含まれている数千種類の物質を 1 回の分析で測定することはできない。したがって、混合試料中の各成分を迅速、正確に測定するには、より高分離能若しくは高選択な分離カラムや手法の開発が必要である。

分子量の小さい化合物と比較して、高分子化合物、ナノ粒子、分子機械等の比較的大きな物質を、その構造を維持した状態で効率的に分離精製することは難しいと考えられる。今後ナノテクノロジーの研究で、機能の優れた新しいナノ材料が創出されると期待されていることから、ナノサイズの物質の分離精製法の開発は急務である。そこでこれらの物質の分離に関するわれわれの研究についても簡単に紹介する。

## 2. ゴルゲル反応を利用した高分離能カラム

近年、モノリス型カラムと呼ばれる一体型の多孔質体を固定相としたカラムが開発され、市販されるようになってきている。<sup>1-3)</sup> モノリス型カラムは、汎用されている球状の粒子を充填したカラムとは異なった特性を持つカラムとして注目を集めている。その大きな特徴は、充填型カラムの場合は充填剤がカラムから流出しないようにフリットと呼ばれる栓をカラムの両端に作製し、2つのフリット間に充填剤を

東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点/大学院工学系研究科応用化学専攻 (〒113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)

e-mail: kato@cnbi.t.u-tokyo.ac.jp

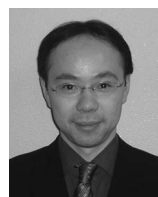
本総説は、平成 19 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

隙間なく充填する必要がある。そのため、粒子間の空隙の大きさは充填する粒子の大きさによって決定される。それに対し、モノリス型のカラムでは、固定相を形成する骨格と空隙を形成する貫通孔の大きさを任意に制御できることから、目的の大きさの貫通孔を有するカラムの作製が可能である。骨格や貫通孔の大きさの調製には、一般的にスピノーダル現象が利用されている。スピノーダル現象とは、均一な溶液内で生じた濃度ゆらぎが自発的にその振幅を増していく現象である。生じた濃度ゆらぎをそのまま固定することで、同一孔径の貫通孔を有する多孔質体が調製される。モノリス型カラムを調製する材料として、シリカなどの無機物質<sup>2)</sup>やアクリルアミドやグルタルアルデヒドのような有機化合物<sup>3)</sup>が利用されているが、筆者らは耐圧性に優れたシリカを主に利用している。シリカ製モノリス型カラムは、アルコキシシランを出発原料とし、加水分解し、重合する過程でポロジェンと呼ばれるポリエチレングリコール (PEG) 等の物質を共存させることで調製される。充填型カラムは、粒子径数  $\mu\text{m}$  の粒子を必要な長さ充填する必要があるのに対し、モノリス型カラムは溶液を充填したのち、必要な領域のみを光や熱で重合反応を行うことで固定相が調製できることから、非常に簡便であり実用的なカラムの調製法である。したがって細管内に長い固定相を作製するときこの特徴は有効である。

ヒトゲノム配列の解読が終了した現在、生命科学の次の研究ターゲットは、ゲノムにより制御されているタンパク質や情報伝達物質などの生体内物質の動態や機能に移ってきた。これらの生体内物質は遺伝子と酵素の発現量に基づいて産出されており、一方で遺伝子の発現を制御している。そのため、遺伝子やタンパク質の発現量のみならず、タンパク質が生産する全代謝物を網羅的に測定し、遺伝子発現や酵素活性との関係を解明し、生体内での物質の動態や機能を解明するメタボローム研究に注目が集まっている。

しかし、代謝物質の多くはイオン性が高く、UV 吸収もなく不揮発性である。また物理的・化学的性質が類似しており、さらに細胞内に千種類以上が低濃度で存在するため、これらの代謝物を網羅的に分析するのは非常に困難である。現在、利用されている代謝物の測定法には、GC-MS,<sup>4)</sup> NMR,<sup>5)</sup> フーリ

エ変換共鳴質量分析計 (FT-ICR-MS),<sup>6)</sup> キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS)<sup>7)</sup> などがある。しかしいずれの手法でも、生体内物質を網羅的に測定することはできず、限定された化合物しか測定できない。その中で CE-MS 法<sup>7)</sup> は、一度の分析で測定できる化合物の種類や数が比較的多いため、メタボローム解析には最も適していると考えられる。この手法の問題点は、陽イオン性物質と陰イオン性物質の分析を異なった分析条件で別々に測定する必要がある点であり、さらに陰イオン性物質でも核酸類は別の条件で分析しているのが現状である。それに加えて、CE では分離できない非イオン性物質の測定には LC-MS を用いて補完している。<sup>8)</sup> したがって、既存の優れた手法で網羅的な測定を行うには、1つの試料を少なくとも4種類の条件で測定する必要があることから、超微量試料の網羅的測定には利用できず、手間を要するなどの問題があった。そこで筆者らは、イオン性・非イオン性物質が一斉に分離可能な測定法の開発を行っている。CE は、同じ荷電を有する化合物の分離には適しているが、異なった荷電を有する化合物は、異なった方向に移動するため、質量分析装置などカラムで分離され溶出してきた物質を連続的に検出する手法では検出することができない。そこで CEC 法に注目した。CEC 法は、固定相を有するキャピラリーカラム内で電気泳動を行い、さらに必要に応じて圧力を利用して分離溶液を送液する分析法である。電気泳動の優れた分離能を維持しながら、圧力を利用することで異なった荷電を有する化合物も一緒に分析し、オンラインで質量分析装置等の装置に導入することが可能である。また非イオン性化合物も、固定相との相互作用や親和性の違いによって分離され、分離溶液の流れによって移動するため、同一条件で分離することができると期待された。つまり、CE では不可能なイオン性・非イオン性物質の一斉分離が可能となる。



加藤 大

東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点、大学院工学系研究科特任准教授。東京都生まれ。東京大学薬学部卒業、同大学院薬学系研究科博士課程修了、博士(薬学)。1999年スタンフォード大学化学科博士研究員、2000年静岡県立大学講師、2006年より現職。2002-2006年さきがけ研究代表者(JST)を兼任

そこで CEC 用の高分離能を示すモノリス型カラムの開発を行った。<sup>9-14)</sup> 多数のカラムを調製し、最適な固定相の構造を明らかとし、さらに分離条件を検討することで、陽イオン、陰イオン、非イオン性化合物を一斉に分離するカラム、及び分離条件を開発した (Fig. 1).<sup>15)</sup> 移動相に 1M ギ酸溶液を用いることで、アミノ酸はカルボキシル基の解離が抑制されアミノ基のみが解離するため、陽イオンとして振舞い、7-8 分付近に検出された。それに対して、中性物質である尿素やチオウレアは 10 分付近に、リン酸基を有し陰イオンとして振る舞う ATP は 14 分付近に検出された。現在、さらに多数の物質の同時分析に成功し、実際に細胞内の生体物質の網羅的測定を行っている。

### 3. 高含水ゲルを用いて生体物質を固定化した選択性の優れたカラム

上記のような幅広い化合物に対して高分離能を示し、混合試料中の成分を網羅的に測定可能なカラムに加えて、標的化合物に対して高選択性を示す分離カラムの開発も行っている。選択性の優れたカラムを作製するために、タンパク質をカラムの認識部位に利用することにした。タンパク質は、大きさは約 10 nm 以下のものがほとんどであり、生体内で正確かつ効率的に物質を認識し、さらに物質変換や情報伝達など生体内で様々な機能を司っている。タンパク質を固定化したカラムとして、既に、光学分割用や精製用カラムなどが市販されているが、そのほとんどは化学結合を用いてタンパク質をカラム内に固

定化している。しかし化学結合で固定化した場合、主にタンパク質のアミノ基やチオール基が固定化に利用されるため、それらの官能基が活性部位に存在する場合には、固定化によってタンパク質の機能が変質、消失する可能性があることから、固定化して利用できるタンパク質は限られている。そこで筆者らは、ゾル-ゲル反応を用いたタンパク質の固定化法を開発した。<sup>16)</sup> ゾル-ゲル反応とは、溶液のゾルがゲルへと相転移する反応である。ゾル-ゲル反応によって生体物質を固定化するには、生成したゲルが生体物質を保持するような網目構造を有し、さらに緩和な生理的な条件で相転移反応が進行する必要がある。そこでモノマー物質として、室温若しくは低温条件でも重合反応が進行し、さらに加水分解の過程で生じるアルコールが最も極性の大きいテトラメトキシシラン (TMOS) を選択した。タンパク質の中には、有機溶媒によって変性するものもあるため、TMOS をモノマーに用いることで固定化するタンパク質に与えるダメージを最低限に抑えることができる。重合条件などを調節することで、緩和な条件で生成する高含水ゲルを利用してタンパク質を固定化するカラムの作製法を開発した (Fig. 2)。固定化に利用する高含水ゲルの含水量が生体内の水分量に類似しているため、固定化されたタンパク質は長期間その機能をゲル内で保持していた。目的のタンパク質の効率的な固定化には、タンパク質毎に条件を変化させる必要があるものの、分子量や等電点の異なる 6 種類のタンパク質 (アルブミン、オボムコイド、トリプシン、ペプシン、グルクロン酸トランスフェラーゼ、チトクロム P450) の固定化に成功した。<sup>17-26)</sup> アルブミンを固定化したカラムでは Trp が、オボムコイドを固定化したカラムでは塩基性薬物であるクロロフェニラミンやエペリゾンが光学分割された (Fig. 3).<sup>16,19)</sup> 光学異性体を光学分割用カラムで分離した場合、分離は溶質と固定相との間で形成される光学活性な相互作用の安定化エネルギーの差によって行われる。そこで光学異性体の泳動時間の差から結合エネルギーの差を計算した結果、他の方法で求めた結合エネルギーの差の値に近似していた。このことから本カラムは、溶質の分離に加えて結合エネルギーの差の測定にも利用できることが示唆された。

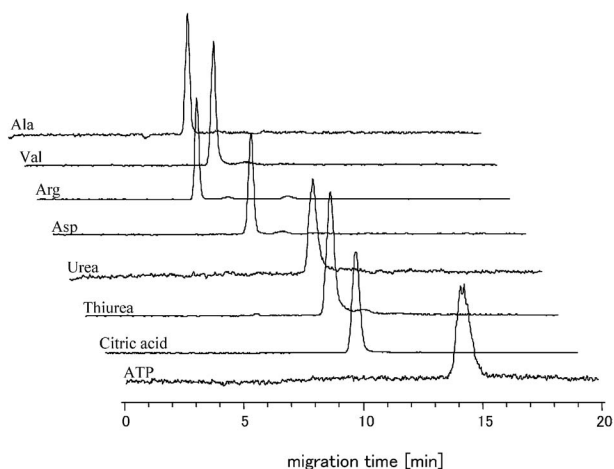


Fig. 1. Selected Ion Electropherograms for a Mixture Sample (cationic, anionic, and neutral compounds) on Monolith Capillary Column

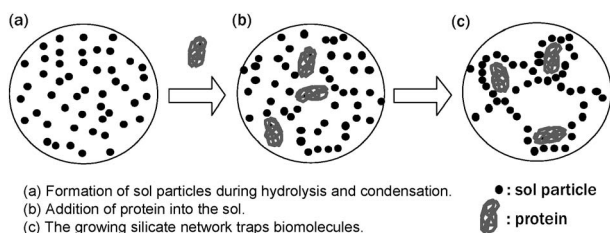


Fig. 2. Schematic Representation of Protein Immobilization Using the Sol-gel Reaction

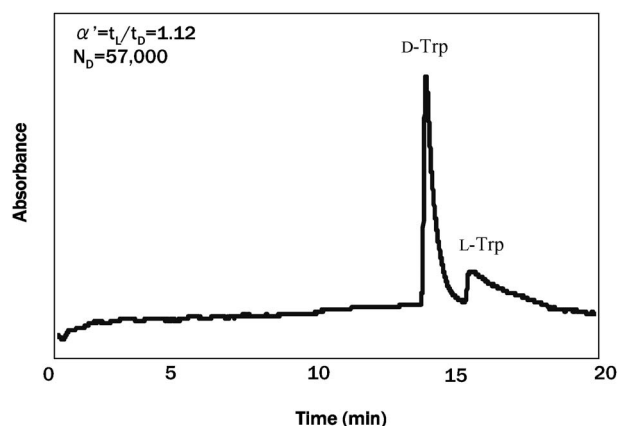


Fig. 3. Enantiomeric Separation of Trp Using Albumin Immobilized Column

#### 4. 酵素反応, 分離, 検出を集積化したカラム

上記のタンパク質固定化カラムを用いることで, 低分子化合物の光学分割に成功した. しかし高含水ゲルが形成する網目より大きい化合物は, 網目構造を透過できないため, 分析することができなかった. そこでカラム内に試料が移動するための貫通孔を有するモノリス型カラムを作製することにした. まず, 調製条件を調節してキャピラリー内に試料が十分透過できる, 大きさ数  $\mu\text{m}$  の貫通孔を有する多孔質体を作製した. 次に, その多孔質体表面に前記の高含水ゲルを用いて生体物質を被覆し, カラムを調製した.

カラムに固定化する酵素として, タンパク質の消化酵素であるペプシンを選択した. ペプシンは胃の中に存在するタンパク質分解酵素であり, 酵素活性の至適 pH は強酸性である. 分離溶液を強酸性とすることでカラム内壁に存在するシラノール基の解離を抑制でき, タンパク質などの試料がカラム内壁へ吸着するのを抑制することができる. ペプシン固定化カラムの調製は, まず光反応を利用して細管の一端 5 cm に多孔質体を調製した. その後, 多孔質体

表面に TMOS を利用してペプシンを被覆し, カラムを調製した. カラムの残りの領域は中空とし, 電気泳動によって生成物や未反応物を分離するカラムとして利用した. 調製したカラムでは, 固定化したペプシンよりも大きな物質の分析も可能となり, 多孔質体を通過する過程で, その表面に存在する固定化されたペプシンと相互作用し酵素反応による加水分解が効率的に進行した. 本カラムでタンパク質やペプチドなどを分析した場合, まず試料を細管に導入すると (Fig. 4(a)), 多孔質体に固定化されたペプシンにより酵素消化され (Fig. 4(b)), 多数のペプチド断片が生成する. 次に, 生成したペプチド断片や未消化の試料などがカラムの残りの領域で電気泳動により分離される (Fig. 4(c)). 最後にカラム内で分離された試料が, UV 検出器若しくは MS などにより検出される. ペプチドやタンパク質を分析した結果, 固定化したペプシンの酵素活性は非常に高く, タンパク質が 5 cm のペプシン固定化領域を通過するだけで, 同定に必要なペプチド断片が生成した.<sup>22)</sup> 繰り返し分析した場合にも活性の大幅な減少はみられず, 30 回以上の測定が可能であった.

インスリン  $\beta$  鎖とリゾチームを分析した結果, それぞれアミノ酸配列の 100 及び 73% が検出され, 試料の同定に成功した (Fig. 5).<sup>22)</sup> 本論文では, 紙面の都合上, 酵素を固定化したカラムとしてペプシン固定化カラムのみについて紹介したが, その他にもトリプシン<sup>18)</sup> やグルクロン酸トランスフェラーゼ<sup>17,23)</sup> を固定化したカラムも作製した. これらの酵素固定化カラムを用いることで, 1 本の細管内で酵素反応, 分離, 検出, さらには競合反応の解析等を迅速, 簡便に行うことに成功した.

筆者らは, このように高分離能を示すカラムや選択性の優れたカラム等を多数開発してきた. それらのカラムの詳細については, 筆者らが最近執筆した総説に記載したのでそちらを参照して頂きたい.<sup>27)</sup>

#### 5. 酵素固定化多孔質体

開発した固定化法は, カラム以外の支持担体への生体物質の固定化にも利用できると考え, 多孔質シリカへの応用を試みた. 多孔質体シリカは, 無機質のシリカより構成されるため, 物理的な衝撃に強く, また表面積が大きいことから固定化酵素の優れた支持担体である. 多孔質シリカは, スピノーダル現象を利用することで簡便に調製でき, さらに調製

条件を変化させることで骨格と貫通孔の大きさを任意に調製することができる。本検討では、表面に固定化するタンパク質としてトリプシンを用いた。トリプシン固定化多孔質体の酵素活性や耐久性を効率的に評価するために、市販の96穴マルチウエルプレートの各ウエルに適合するように直径4.5 mm程度の円筒形多孔質体を調製し、プレートリーダーで酵素活性を測定した。<sup>28)</sup>

Figure 6に、調製条件を変化させて作製した多孔質シリカの電子顕微鏡写真を示した。このように反応溶液中の水やPEGの量を変化させることで、多孔質体の形状が変化し、調製条件によっては多孔質が生成しない、若しくは脆くて酵素活性の評価に利用できない条件もあった。調製した多孔質体の表面は、塩基で再融解することで数nmの微細孔が調製

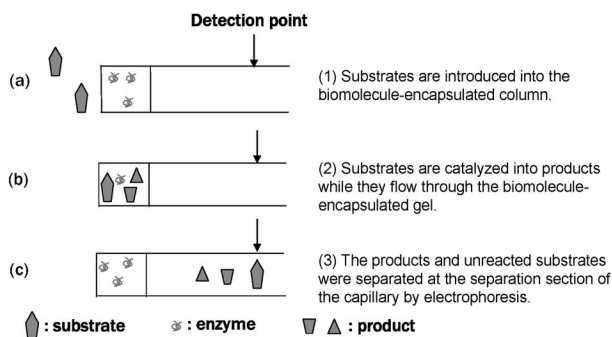
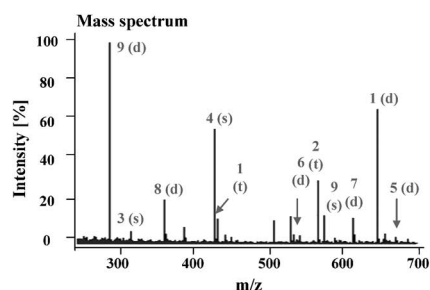


Fig. 4. Schematic Representation of Separation, Enzyme Reaction, and Detection by Enzyme-encapsulated Column

できるため、固定化する生体物質に適合した微細孔を作製することも可能である。

初めにPEGの量や添加するメチルトリメトキシシラン (MTMS) の割合などを変化させた多孔質体を調製し、固定化に適した多孔質体の構造を調べた。最適化した固定化トリプシンの  $K_m$  と  $V_{max}$  は、同量のトリプシンを溶解して反応させた際の  $K_m$  及び  $V_{max}$  の値と類似していた。しかし、トリプ



List of peptides from the on-line digestion of insulin

peak	peptide	sequence	MH <sup>+</sup> (MH <sup>+</sup> calc), Da
1	1-11	(-)FVNQHLC(SO <sub>3</sub> H)GSHL	1302.7 (1302.6)
2	1-15	(-)FVNQHLC(SO <sub>3</sub> H)GSHLVEAL	1715.2 (1714.8)
3	12-14	(L)VEA	318.2 (318.2)
4	12-15	(L)VEAL	431.2 (431.3)
5	15-25	(A)LYLVC(SO <sub>3</sub> H)GERGFF	1351.4 (1351.6)
6	16-24	(L)YLVC(SO <sub>3</sub> H)GERGF	1091.6 (1091.5)
7	16-25 or 17-26	(L)YLVC(SO <sub>3</sub> H)GERGFF or (Y)LVC(SO <sub>3</sub> H)GERGFFY	1238.6 (1238.6)
8	25-30	(F)FYTPKA	726.4 (726.4)
9	26-30	(F)YTPKA	579.3 (579.3)

Conditions: Sample: 0.4 mM insulin. PSG monolith: 5 cm. Total length: 90 cm.

Fig. 5. Insulin Analysis Using Pepsin Immobilized Column

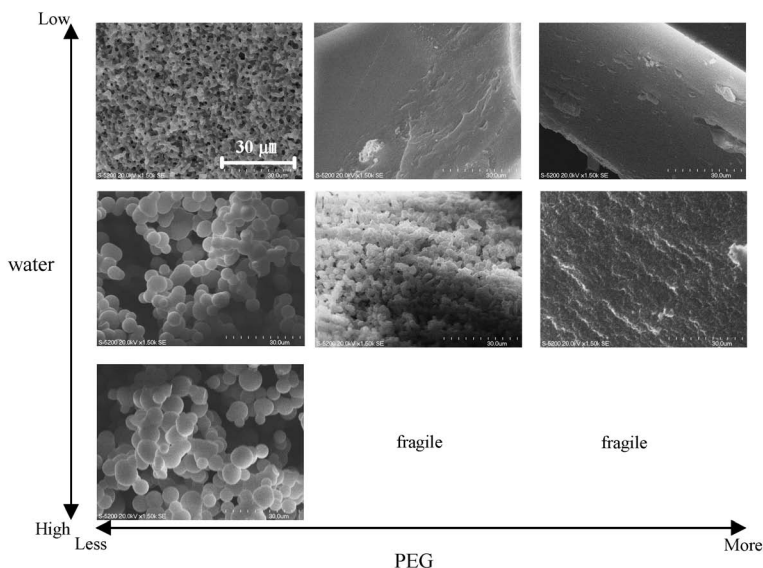


Fig. 6. Effect of Preparation Conditions on the Monolith Structure

シンは、タンパク質の加水分解酵素であるため、溶解すると自己消化反応が進行し、活性が1日以内でほぼ消失するのに対し、固定化した酵素は繰り返し使用できた。これは高含水ゲルに固定化されることで、トリプシン同士の接触が抑えられ、自己消化反応が抑制されたためと考えている。酵素固定化素子は、洗浄するだけで1週間以上活性が変化することなく、再利用可能であった。また、必要に応じて有機溶媒で洗浄しても活性の低下はみられなかったことから、耐久性や有機溶媒に対する耐性が上昇した。さらに冷蔵庫で保管した場合には、数ヶ月以上酵素活性を維持していた。

## 6. アミロイドの分離

上記のようにアミノ酸などの低分子化合物から、タンパク質等の高分子化合物までは、既存の手法や筆者らの開発した手法を用いることで良好に分離することができるようになってきている。しかし、さらに大きな数 nm から十数  $\mu\text{m}$  の物質に対して優れた分離法があまり存在しないのが現状であると筆者らは考えている。一般的にこのような大きな物質を分離するには、超遠心やセルソーターなどが汎用されているが、これらの手法では対象物質の微小な差異で高精度に分離することは難しい。そこで現在、筆者らは時間とともに構造が変化し、数  $\mu\text{m}$  の線維状物質に成長するアミロイド重合体の分離法を開発している。

アルツハイマー病患者の脳内には、 $\beta$ アミロイド ( $A\beta$ ) 等が重合し生成する老人斑と呼ばれる沈着物が存在していることから、 $A\beta$ の重合とアルツハイマー病とは密接な関連が存在すると考えられている。<sup>29)</sup>  $A\beta$ は、健常人にも存在する膜タンパク質(アミロイド前駆体タンパク質, APP)が $\beta$ 及び $\gamma$ セクレターゼによって加水分解されることで生成する約40アミノ酸のペプチドである (Fig. 7)。 $A\beta$ を生理的な条件に放置すると非常に速やかに重合し、断面が数 nm の線維状の物質に変化し、その長さは時間とともに成長し数  $\mu\text{m}$  に達すると報告されている。<sup>30)</sup> この重合反応の過程で、オリゴマー、プロトフィブリルなどの複数の異なった構造を経ていると言われているが、重合反応が非常に速やかに進行するため各段階の重合体の物性や動態についての詳細はよく分かっていない。<sup>31)</sup> したがって重合の過程を詳細に解明するには、重合体の迅速な測定法の

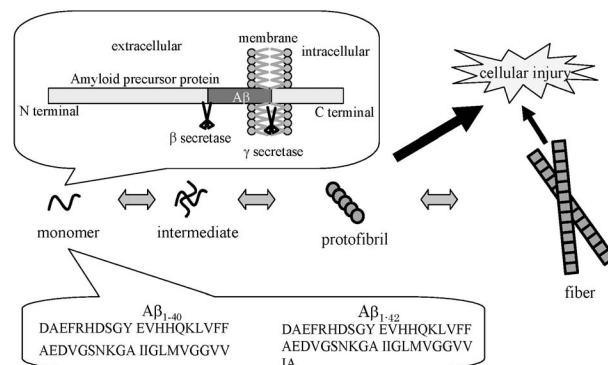


Fig. 7. Sequence of  $A\beta$  and Aggregation Scheme of the  $A\beta$

開発が必要である。アルツハイマー病患者から  $A\beta$  が重合した老人斑が検出されることから、この生成を阻害する物質がアルツハイマー病の治療薬になる可能性が高く、重合体の詳細な解析はアルツハイマー病治療薬の開発につながると期待される。

筆者は、重合過程で生成する微量成分を高感度に検出するためにレーザー蛍光検出を選択し、 $A\beta$  重合体を選択的に検出するために蛍光試薬に Thioflavin T (Th T) を用いることにした。Th T は、 $A\beta$  重合体が形成する  $\beta$  シート構造と結合することで蛍光波長 (445 nm から 485 nm) が変化することが知られていた。したがって Th T によって重合した  $A\beta$  のみが選択的に高感度に検出される。しかし、Th T は、 $A\beta$  の重合反応を阻害する物質としても知られていたため、 $A\beta$  のモノマーを溶解させた反応溶液には Th T を添加せず、分離溶液のみに Th T を添加することで、Th T が重合反応に与える影響を排除し、より生理的な条件下で重合反応を測定する手法を開発した。分離には、中空のキャピラリーを用いた CE を用いた。まず初めに分離溶液のみに Th T を添加したときに、カラム内で  $A\beta$  重合体の蛍光標識及び分離が速やかに進行するかを確認した。あらかじめ重合させた  $A\beta$  を試料に用いて分析した結果、 $A\beta$  の重合体は速やかに標識され、5分以内に鋭いピークとして検出されたことから、蛍光標識及び分離を極めて短時間で行うことができた。<sup>32)</sup>

次に、重合反応のシード依存性について検討した。 $A\beta$  は、モノマー溶液を生理的な条件に放置すると重合体が生成するが、反応液にシードと呼ばれる、既に重合したアミロイドを添加すると重合速度が加

速されることが知られており、この性質をシード依存性と呼ぶ。A $\beta$ のモノマー溶液にシードを添加すると、その直後から鋭いピークが検出されたのに対し、シード無添加のモノマー溶液では重合体の生成に時間を要したことから (Fig. 8)、本法でも A $\beta$ のシード依存性が確認された。<sup>32)</sup>

上記のように重合反応を阻害する物質は、アルツハイマー病の治療薬として利用できる可能性が大きいことから、開発した手法を用いて生成する重合体のピークの変化を調べ、その変化量を比較することで、効率的に治療薬のシード化合物が探索できると考えた。阻害作用の測定は、まずモノマー溶液に阻害効果が期待される物質を添加し、その後重合反応を加速するためにシードを添加し 37°C に加温し、経時的に CE で生成した重合体を測定した。測定法の有効性を検証するために、阻害作用が報告されているメラトニン、3-インドールプロピオン酸、ダウノマイシンを阻害剤としてモノマー溶液に添加した。その結果、これらの化合物を添加することで、鋭いピークが検出されるまでに要する時間が延長し、また生成するピーク強度が減少した (Fig. 9)。<sup>32)</sup> このことは添加した化合物によって重合反応が阻害され、重合体の形成に時間を要し、またその量も減少したことを示していると考えられる。特にダウノマイシンを添加した場合には、24 時間以内に鋭いピークは検出されず、重合体の生成が強く阻害された。今回使用した 3 種類の化合物では、阻害作用が強い化合物ほど、生成する重合体由来のピークが小さくなったことから、本手法は阻害剤、治療薬の探索に有効であることが示唆された。汎用されている A $\beta$ の重合体の測定法は、まず A $\beta$ のモノ

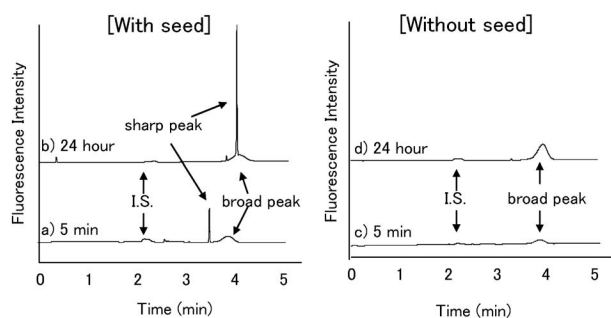


Fig. 8. Electropherograms of Fibrils (a, b) with and (c, d) without Seed for Different Incubation Times (a) and (c): 5 min, (b) and (d): 24 h.

マー溶液を重合し、その後反応液に Th T を添加し、重合体に由来する蛍光強度をプレートリーダーや分光光度計などで測定している。しかしこの手法では、重合体の総量しか測定できず、重合度や構造の異なった重合体を区別して測定することはできない。それに対し本法は、2 種類以上の重合体を分離し、それらを 5 分程度で測定することに成功している。したがって分離した各ピークの変化量を解析することで、重合体の種類に応じた阻害剤の探索が可能になると期待している。

## 7. 澱粉誘導体を利用した分離

近年、分析等の化学操作をマイクロチップといわれる微細加工した基板上に集積する試みに注目が集まっている (Fig. 10(a)).<sup>33,34)</sup> 化学操作を集積化することで、分析時間の短縮や環境負荷の低減等に加えて、最近では微小空間ならではの現象を利用した高効率な抽出など、既存のマクロスケールとは異なった物性を利用した化学操作を行う場として利用され始めている。<sup>35)</sup> 筆者らも、マイクロチップを用いることで、より迅速に簡便に生体試料が分析できると考え、マイクロチップを用いた分析法の開発を行っている。

分離等の化学操作を行うマイクロチップには、石英等のガラス類とポリメチルメタクリレート (PMMA) やポリシロキサン等のプラスチック類の大きく分けて 2 種類の材料が利用されている。プラスチック製マイクロチップは、ガラス製マイクロチップと比較して、安価であり、軽く、物理的な衝撃にも強いことから、使い捨てでの利用や試料採取現場での測定などに適しており、より実用化に適して

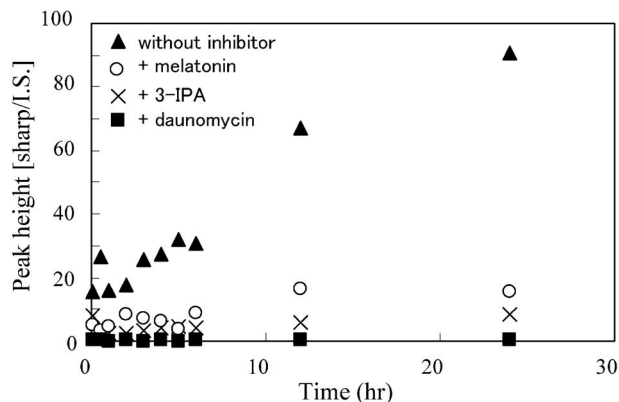


Fig. 9. Inhibitory Activity Assay Using the Three Inhibitors

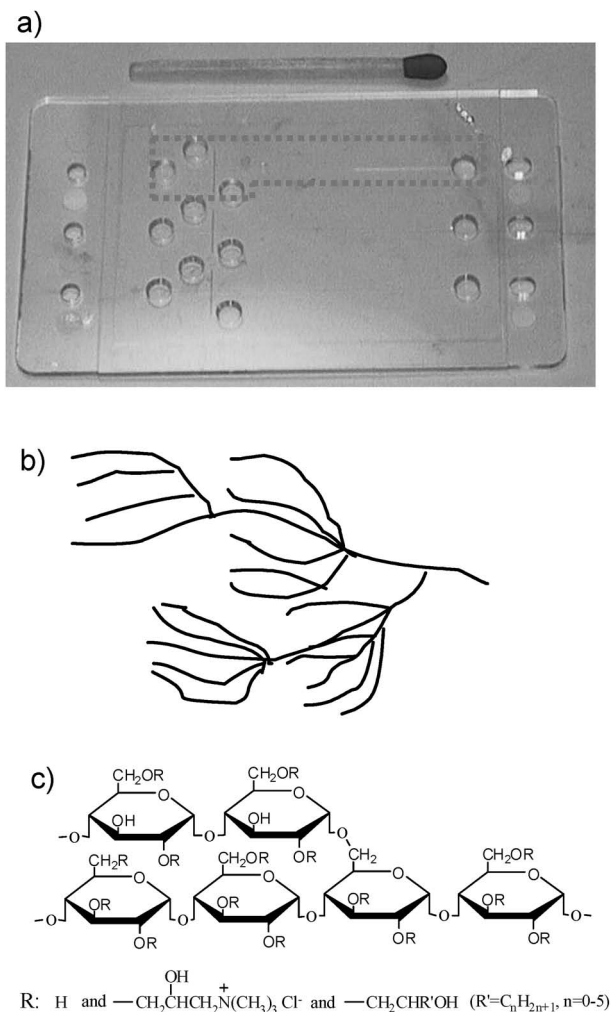


Fig. 10. Photo Image of PMMA Chip (a), Schematic Representation of Amylopectin (b), and Chemical Structure of a Cationic Starch Derivative (c)

いると考えられる。しかし、一般的にプラスチック表面は疎水的なため生体試料などを分析したときには、試料がチップ表面に吸着し、測定が困難であった。生体内に存在する親水的な化合物であるアミノ酸なども高感度検出のために蛍光標識化すると、チップ表面に吸着し、良好に分析することができなかった。このようなプラスチック製マイクロチップの欠点を克服するために、マイクロチップ表面の性質を改変する試みが行われている。その手法として、プラズマ照射や化学物質によるプラスチック表面の修飾、分離溶液に吸着抑制剤を添加するなどの手法が利用されていた。<sup>36)</sup>

筆者らは、特別な装置が必要でなく、簡便に再現よくチップ表面の物性を改変できる分離溶液に吸着抑制剤を添加する手法を用いることにした。プラス

チック製マイクロチップ表面への吸着を抑制する物質として、既にメチルセルロースやヒドロキシプロピルセルロース等が知られており、生体物質の分離に応用した例も報告されていた。<sup>36)</sup>しかしこれらの物質はCEでタンパク質などの分離に利用されていた高分子化合物であり、水に対する溶解性が悪く、また粘度が高いためマイクロチップ内に溶解した溶液を充填することは困難であった。そこでマイクロチップでの利用に適した新しい抑制剤を探索する必要があると考えた。澱粉は、セルロースと同様にグルコースを基本単位とする高分子化合物であり、冷水には溶解しづらいが、沸騰した水には良好に溶解し、澱粉誘導体の中には濃度が10%程度の溶液も調製可能であった。さらに、澱粉はその構造によって $\alpha$ -1,4結合によって直鎖構造を有するアミロースと $\alpha$ -1,6結合による分岐を有するアミロペクチンに分類することができる。特に、アミロペクチンは、合成高分子として調製することが難しい房形構造と呼ばれる特徴的な2次構造を形成していることから(Fig. 10(b))、ナノサイズの分離基材として特徴的な機能を示す可能性を秘めていると考えている。また、澱粉は、多種類の誘導体が商品化されていることから、目的に適合した澱粉誘導体が容易に入手できる可能性が高いと考えた。

筆者らは、カチオン、中性、アニオン澱粉(計20種類)を用い、蛍光試薬である4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)で標識化したアミノ酸の泳動挙動を調べた。<sup>37)</sup>澱粉誘導体を添加していない分離溶液を用いると良好なピーク形状が検出されなかったのに対し、カチオン性澱粉を添加した溶液を用いることでNBD-アミノ酸が良好に泳動された。Figure 11(a)には、3%のカチオン澱粉を溶解した10 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)を分離溶液に用いてアミノ酸を分析したときのエレクトロフェログラムを示した。カチオン性澱粉の中では修飾基に2-hydroxy-3-(trimethylammonio)propyl ether, chloride, 2-hydroxypropyl etherを有する澱粉誘導体(Fig. 10(c))が優れた吸着抑制能を有し、NBD-アミノ酸を良好に分離した。アミロースとアミロペクチンの比率を比較した結果、アミロースとアミロペクチンが2:8程度の混合比のときに最も良好な分離結果が得られ、アミロースのみやアミロペクチンのみでは、混合した澱粉よりよい分離結果を得るこ



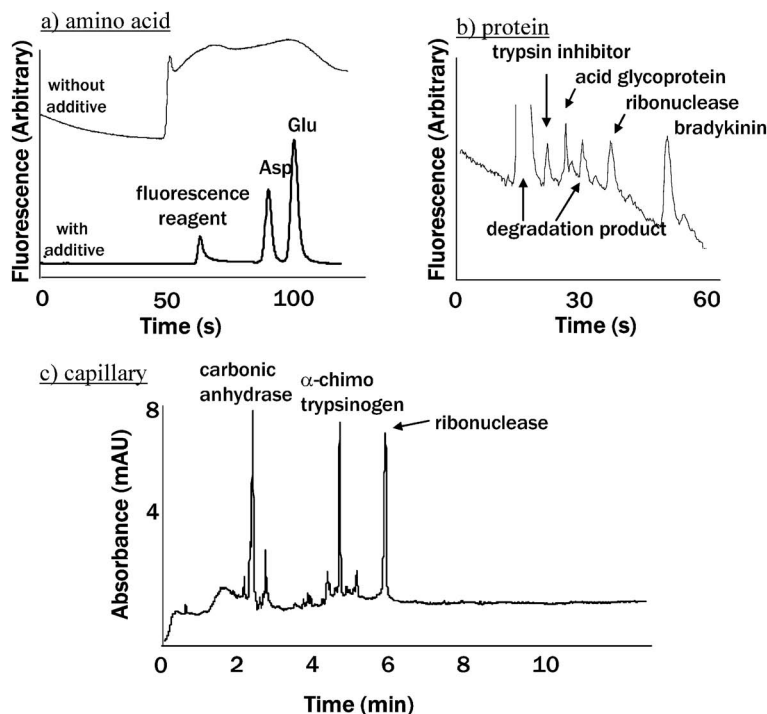


Fig. 11. Separation of Amino Acids and Proteins Derivatives Using Separation Solution Containing Starch Derivatives

とができなかった。また、カチオン澱粉の中でも、植物より抽出した澱粉を加水分解し分子量を小さくした澱粉の方が優れた吸着抑制能を示した。溶液の粘度が高いと、チップの流路に溶液を導入することが困難となり、また、分離に悪影響を及ぼす泡やゴミ等の除去が難しく、効率的に分析できないという問題があった。アミノ酸の中では酸性アミノ酸、続いて中性アミノ酸の順に検出部位まで泳動された。塩基性アミノ酸は、電圧を印加する方向を逆転（出口側が陰極，入口側が陽極）させることで検出された。澱粉誘導体を用いることで、プラスチック製マイクロチップでアミノ酸を2分以内に分析する手法を開発した。実際に緑茶の茶葉のアミノ酸を2分以内に分析することに成功している。<sup>38)</sup>

カチオン澱粉を分離溶液に添加することでNBD-アミノ酸が良好に分離されたことから、より疎水性が高い生体物質であるペプチドやタンパク質の蛍光標識体の分離を試みた。タンパク質試料としてTrypsin inhibitor, Acid glycoprotein, Ribonuclease, Bradykinin等を用いた結果、これらを1分以内に分析することに成功した (Fig. 11 (b)).<sup>39)</sup>

マイクロチップでカチオン澱粉を溶解した溶液を用いることでタンパク質が良好に分離されたことか

ら、この分離溶液をCEによるタンパク質の分離に利用した。CEでは、特に分離溶液のpHより高いpIを有するタンパク質、塩基性タンパク質を分離すると、試料の吸着が起り、良好に分離することが難しかった。この問題の解決法として、前記のペプシン固定化カラムのときに用いた強酸性溶液を分離溶液として用いシラノール基の解離を抑え電気的な相互作用による吸着を抑制する方法、若しくはカラムの内壁を被覆し表面の官能基を変化させる方法などが利用されている。Figure 11 (c)に0.1%のカチオン澱粉を溶解した10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) を分離溶液に用いて塩基性タンパク質を含む異なるpIを持つ3種のタンパク質混合物 (carbonic anhydrase II,  $\alpha$ -chymotrypsinogen A, ribonuclease A) をCE法により分離した結果を示した。<sup>40,41)</sup>このように非常に鋭いピーク形状 (理論段数560000段/m)で、短時間にタンパク質混合液を分離することに成功した。このようにカチオン澱粉溶液は、プラスチック製マイクロチップや融解シリカ製キャピラリーを用いたタンパク質分離において、非常に優れた性質を有することが明らかとなった。

## 8. まとめ

以上のように、複雑な生命現象を解析するために、より優れた分析法の開発を目指し、高分離能を有する分離カラムや高選択性を有する分離カラムの開発などを行ってきた。今までの研究によって、短時間で目的成分を分析する手法の開発に成功してきたが、生体内の物質を網羅的に測定することは成功していない。これからも優れた分析法の開発とともに、開発した手法を用いて生命現象の解明を試みたい。

**謝辞** 本研究は、主に静岡県立大学薬学部薬品分析学教室にて行ったものであり、終始暖かくご指導頂きました豊岡利正教授に深く感謝いたします。また東京大学薬学部時代より御指導頂き、分析化学の基礎を御教授頂いた東京大学名誉教授・今井一洋先生、北里大学薬学部教授・本間 浩先生、東京大学准教授・三田智文先生、静岡県立大学准教授・福島 健先生に感謝いたします。その後のポストドク時代から現在まで様々な御指導、御助言を頂いているStanford 大学教授・Richard N. Zare 先生、東京大学教授・北森武彦先生に感謝いたします。最後に、東大院薬、Stanford 大化学、静岡県大薬、東大院工、東大CNBI などにおける多くの共同研究者の方々に感謝いたします。本研究の一部は、日本学術振興会科学研究補助金、科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業により遂行いたしました。ここに謝意を表します

## REFERENCES

- 1) Kato M., Sakai-Kato K., Toyooka T., *J. Sep. Sci.*, **28**, 1893–1908 (2005).
- 2) Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N., *Anal. Chem.*, **68**, 3498–3501 (1996).
- 3) Hjertén S., Li Y.-M., Liao J.-L., Mohammad J., Nakazato K., Pettersson G., *Nature*, **356**, 810–811 (1992).
- 4) Fiehn O., Kopka J., Dörmann P., Altmann T., Trethewey R. N., Willmitzer L., *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1157–1161 (2000).
- 5) Reo N. V., *Drug Chem. Toxicol.*, **25**, 375–382 (2002).
- 6) Kruppa G., Schnier P. D., Tabei K., Orden S. V., Siegel M. M., *Anal. Chem.*, **74**, 3877–3886 (2002).
- 7) Soga T., Ohashi Y., Ueno Y., Naraoka H., Tomita M., Nishioka T., *J. Proteome Res.*, **2**, 488–494 (2003).
- 8) Kato N., Soga T., *Bunseki*, **11**, 658–660 (2004).
- 9) Kato M., Dulay M. T., Bennett B., Chen J.-R., Zare R. N., *Electrophoresis*, **21**, 3145–3151 (2000).
- 10) Kato M., Dulay M. T., Bennett B. D., Quirino J. P., Zare R. N., *J. Chromatogr. A*, **924**, 187–195 (2001).
- 11) Dulay M. T., Quirino J. P., Bennett B. D., Kato M., Zare R. N., *Anal. Chem.*, **73**, 3921–3926 (2001).
- 12) Kato M., Sakai-Kato K., Toyooka T., Dulay M. T., Quirino J. P., Bennett B. D., Zare R. N., *J. Chromatogr. A*, **961**, 45–51 (2002).
- 13) Kato M., Jin H.-M., Sakai-Kato K., Toyooka T., Dulay M. T., Zare R. N., *J. Chromatogr. A*, **1004**, 209–215 (2003).
- 14) Oguri S., Tanagaki H., Hamaya M., Kato M., Toyooka T., *Anal. Chem.*, **75**, 5240–5245 (2003).
- 15) Kato M., Onda Y., Sakai-Kato K., Toyooka T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 572–577 (2006).
- 16) Kato M., Sakai-Kato K., Matsumoto N., Toyooka T., *Anal. Chem.*, **74**, 1915–1921 (2002).
- 17) Sakai-Kato K., Kato M., Toyooka T., *Anal. Biochem.*, **308**, 278–284 (2002).
- 18) Sakai-Kato K., Kato M., Toyooka T., *Anal. Chem.*, **74**, 2943–2949 (2002).
- 19) Kato M., Matsumoto N., Sakai-Kato K., Toyooka T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **30**, 1845–1850 (2003).
- 20) Sakai-Kato K., Kato M., Nakakuki H., Toyooka T., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**, 299–309 (2003).
- 21) Sakai-Kato K., Kato M., Toyooka T., *Anal. Chem.*, **75**, 388–393 (2003).
- 22) Kato M., Sakai-Kato K., Jin H.-M., Kubota K., Miyano H., Toyooka T., Dulay M. T., Zare R. N., *Anal. Chem.*, **76**, 1896–1902 (2004).
- 23) Sakai-Kato K., Kato M., Toyooka T., *J. Chromatogr. A*, **1051**, 261–266 (2004).

- 24) Kato M., Saruwatari H., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., *J. Chromatogr. A*, **1044**, 267–270 (2004).
- 25) Sakai-Kato K., Kato M., Homma H., Toyo'oka T., Utsunomiya-Tate N., *Anal. Chem.*, **77**, 7080–7083 (2005).
- 26) Sakai-Kato K., Kato M., Utsunomiya-Tate N., Toyo'oka T., "Frontiers in Drug Design & Discovery, Vol. 2," ed. by Bentham Science Publishing, Bentham, 2006, pp. 273–294.
- 27) Kato M., Toyo'oka T., *Bunseki Kagaku* **56**, 607–616 (2007).
- 28) Kato M., Inuzuka K., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., *Anal. Chem.*, **77**, 1813–1818 (2005).
- 29) Dobson C. M., *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 329–332 (1999).
- 30) Petkova A. T., Ishii Y., Balbach J. J., Antzutkin O. N., Leapman R. D., Delaglio F., Tycko R., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 16742–16747 (2002).
- 31) Ban T., Hoshino M., Takahashi S., Hamada D., Hasegawa K., Naiki H., Goto Y., *J. Mol. Biol.*, **344**, 757–767 (2004).
- 32) Kato M., Kinoshita H., Enokita M., Hori Y., Hashimoto T., Iwatsubo T., Toyo'oka T., *Anal. Chem.*, **79**, 4887–4891 (2007).
- 33) Kato M., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 50–52 (2006).
- 34) Sakai-Kato K., Kato M., Ishihara K., Toyo'oka T., *Lab. Chip*, **4**, 4–6 (2004).
- 35) Hisamoto H., Saito T., Tokeshi M., Hibara A., Kitamori T., *Chem. Commun.*, **24**, 2662–2663 (2001).
- 36) Dang F., Zhang L., Jabasini M., Kaji N., Baba Y., *Anal. Chem.*, **75**, 2433–2439 (2003).
- 37) Kato M., Gyoten Y., Sakai-Kato K., Nakajima T., Toyo'oka T., *Anal. Chem.*, **76**, 6792–6796 (2004).
- 38) Kato M., Gyoten Y., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., *J. Chromatogr. A*, **1013**, 183–189 (2003).
- 39) Kato M., Gyoten Y., Sakai-Kato K., Nakajima T., Toyo'oka T., *Electrophoresis*, **26**, 3682–3688 (2005).
- 40) Sakai-Kato K., Kato M., Nakajima T., Toyo'oka T., Imai K., Utsunomiya-Tate N., *J. Chromatogr. A*, **1111**, 127–132 (2006).
- 41) Kato M., Imamura E., Sakai-Kato K., Nakajima T., Toyo'oka T., *Electrophoresis*, **27**, 1895–1899 (2006).