



Title	キャピラリー内反応を利用するキャピラリー電気泳動の応用拡大に関する研究
Author(s)	多賀, 淳
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42757
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	多賀 淳
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15703 号
学位授与年月日	平成12年9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	キャピラリー内反応を利用するキャピラリー電気泳動の応用拡大に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 大森 秀信 (副査) 教授 小林 祐次 教授 小林 資正 教授 高木 達也

論文内容の要旨

キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE) は、内径10~100 μm のキャピラリーを使用し、これに種々の物質を添加した電解質溶液を満たして100~1,000V/cm の高い電場をかけて行う分析法であり、イオン性物質だけでなく中性物質にも適用できるきわめて応用範囲の広い分析法である。

自由溶液CEにおいては、キャピラリー内腔は分離の場として用いられるが、その一部または全体を反応の場としても利用することができる。本論文においてはこれまであまり顧みられなかったこの特長を活かして、物理的相互作用および化学反応を伴うCEについて検討を行った。

先ず物理的相互作用を伴うCEについて検討を行った結果について述べる。生体内ではリガンドとタンパク質との間の特異的相互作用が無数に存在し生命現象において重要な役割を果たしているが、著者は糖鎖-タンパク質相互作用を伴うCEについて検討した。この場合、糖鎖を泳動液に添加し、これに導入されたタンパク質試料の動きを観察する系 (normal system) と、その逆にタンパク質を添加した泳動液中で糖鎖の動きを観察する系 (reverse system) の2つの系があり、それぞれが独自の問題点および利点をもっている。

ガラクトース残基およびカルボキシル基をもった酸性糖であるラクトビオニ酸 (lactobionic acid, LA) を糖鎖モデル、ガラクトース認識レクチンであるヒママメレクチン (*Recinus communis* agglutinin, RCA₆₀) をタンパク質モデルとして normal system について基礎検討を行った。両者の反応は、タンパク質の等電点付近で強く起こる。この条件下ではLAは陽極側へ引き寄せられる。RCA₆₀はそれ自体はほとんど泳動しないが、LA存在下では平衡的に複合体を形成し、LAの負電荷が加わるため陽極側へ泳動し、その泳動速度の増加の度合はLA濃度に依存した。そこで理論的解析を行い、RCA₆₀の移動時間とLA濃度の関係を逆数同士の1次式として示すことができた。すなわち、LA添加時と無添加時の移動時間の差の逆数をLA濃度の逆数に対してプロットすることにより得られる直線の傾き (A) およびY軸切片 (B) から、結合定数 (K_a) を再現性良く求めることができた。

この結合定数測定法においては、泳動液への添加物である糖鎖リガンドがイオン性をもつことが前提になっているが、本法の適用を中性糖にまで拡張するため、中性糖を化学的にイオン性リガンドに導く方法を探査した。その結果、ジチオアセタール反応を利用した2-メルカプトエタンスルホン酸 (2-mercaptopethanesulfonate, MerES) 法が好結果を与えた。この方法は簡便な操作で、還元オリゴ糖を定量的にイオン性リガンドに導くことができ、中性糖鎖に広く適用できることが示された。

次に reverse mode について検討を行った。先ずガラクトシルグルコース類とグルコビオース類から 5 種類の二糖類異性体を選び、それらの 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) 誘導体のアフィニティー電気泳動 (affinity electrophoresis, AE) モードによる分離を観察した。特異性の異なるレクチン類を添加した泳動液を用いて、二糖類 PMP 誘導体混合物を分析したところ、それぞれの特異性の違いにより異った分離が得られた。また、2 種類レクチンを同時に泳動液に添加すると、両者の特異性が協調し合って分離が改善されることを観察することができた。

Reverse system においては、泳動液に添加した 1 つのタンパク質に対して複数のリガンドを分離させつつ相互作用させることができる。そこで、同一タンパク質に対する複数リガンドの結合定数を一斉に測定する方法について検討した。RCA₆₀含有泳動液を用いて上記二糖類誘導体を分析したところ、ガラクトシルグルコース類は互いに良く分離され移動時間の変化は RCA₆₀濃度に依存した。RCA₆₀濃度の逆数に対してそれぞれの誘導体の移動時間の増分を逆数としてプロットしたところ、いずれも良好な直線を与える、それぞれの二糖誘導体の対 RCA₆₀結合定数を同時測定することができた。また、重合度の異なるイソマルトオリゴ糖混合物を 8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonate (ANTS) の誘導体とし、グルコース認識レクチンであるレンズ豆レクチン (*Lens culinaris agglutinin, LCA*) を添加した泳動液中で泳動させ、同様の解析を行ったところ、結合定数の一斉測定が可能であり、重合度の高いイソマルトオリゴ糖ほど LCA に対する親和性が強いことがわかった。

このように物理的相互作用を起こさせながら分析するという考え方により CE を極めて広角的な分析法に発展させることができた。

続いて化学反応を伴うキャピラリー電気泳動について検討した結果について述べる。自由溶液 CE においては、"インキャピラリー誘導体化"が可能であるが、著者はこれを行う方法として、キャピラリー入り口において誘導体化し反応物を直ちに分析する at-inlet 法、キャピラリー中に試薬ゾーンを形成させ試料がそのゾーンを通過する間に誘導体化する zone-passing 法、および試薬含有泳動液中で試料成分を電気泳動させながら誘導体化する throughout-capillary 法の 3 つの方法をとり上げ、それぞれについてアミノ酸をオルトフタルアルデヒド (*o*-phthalaldehyde, OPA) で標識する反応をモデルとして長所・短所を調べ、また問題点を探った。

At-inlet 法においては、試料溶液 (S) および試薬溶液 (R) を導入する方式として S および R を層積導入するタンデム方式および S を R で挟み込むサンドイッチ方式を考えた。それぞれについて混合効率および反応効率を精査したところ、R (3sec) - S (1sec) - R (3sec) のサンドイッチ方式で導入し 20min 反応させた場合が最も良い結果を与えた。この条件でアミノ酸混合物をインキャピラリー誘導体化して分析したところ、効率よく誘導体が生成し、それらは互いによく分離された。そしていずれのアミノ酸も直線性の良い検量線を与え、繰り返し分析による再現性も高かった。また、at-inlet 法においては反応液とは異なった泳動液を使用することも可能であるので、上記条件で反応させ両性界面活性剤を添加した中性のリン酸緩衝液を泳動液として分析したところ、15種類のアミノ酸を分離することができた。さらに検討する余地はあるが、本法は多成分の自動分析に適した方法であることが示された。

次に zone-passing 法によるインキャピラリー誘導体化について検討した結果について述べる。OPA 試薬は反応の至適条件では電気的に中性であり、中性および塩基性アミノ酸は負電荷を帯びる。したがって、陽極から陰極へ向かう電気浸透流が存在する場合、アミノ酸試料溶液、次いで試薬溶液を導入し、電圧を印加すれば、試料が試薬ゾーンを通過しその間に誘導体化反応が起こる。試薬濃度が試料濃度に対して十分である場合には、誘導体の生成量は試料が試薬ゾーンに入ってから通り過ぎるまでの時間に依存するため、泳動速度の違いにより誘導体の生成率が異なることがわかった。しかし、反応条件を一定に保てば直線性の高い検量線が得られ、定量の再現性も高かった。Zone-passing 法においては試薬溶液の導入時間を変化させることにより反応時間を変化させることができるために、種々の反応時間について得られたデータから反応速度定数を容易に算出することができる。そしてこの測定は速度の速い反応の速度論的解析にも適している。

Throughout-capillary 法においては OPA 濃度が十分高ければ短時間で反応は完結し検出されるまでには反応が終了する。この方法においては紫外部吸収の強い試薬を泳動液に添加すると、バックグランドが高くなるため、添加濃度には限界があった。しかし、最適化した条件でアミノ酸を誘導体化することにより直線性の良い検量線を得ることができた。また、本法は調査した 3 法の中で操作が最も簡便であり、総分析時間も短くて済む。しかし、概して分析条件の選択が制約されるため、成分数の限定された試料のルーティン分析等に向いている。一方、この方法におい

ては、誘導体と未反応物の移動速度の違いに基づくピーク形状の変化を解析することにより、反応速度定数を測定することも可能であった。このように、とり上げたインキャピラリー誘導体化の3つの方法はそれぞれ異なった特徴をもっており、目的に応じてこれらを使い分けることが必要であることが示された。しかし、いずれにおいても試料量は通常のCE分析に比べて3~4桁少なくて済む点は強調されてよい。

以上のように、自由溶液中で行うCEにおいて物理的相互作用や化学反応をキャピラリー内で行わせることにより、これまでになかった新しい分析の分野を開拓し、CEの用途を拡張することができた。著者はそれぞれのモデル系について種々の角度から実験および解析を行い考察したが、これらの結果や考察は用いたモデル系に対してだけでなく種々の系について広く適用でき一般化できるものであるため、得られた研究の成果は薬学をはじめとして、生命科学の領域において広く応用されるものと期待している。

論文審査の結果の要旨

キャピラリー電気泳動(CE)は、近年その理論および装置面で大きく進展し、HPLC法と並ぶ有力な分離分析法としての地位を築いている。本研究は、CEの特長を生かした、薬学領域における新規な応用の開発を目指したものであり、以下に概略する成果を得ている。

1. キャピラリー内での物質間相互作用に基づく移動速度の変化を理論的に解析することにより、これら相互作用の強さが見積もられることを示した。生体内物質間相互作用のモデルとして、蛋白質-糖間の相互作用を選び、その結合定数が容易に求められることを示している。
2. 試料の量が限られる生体内物質の分析においては、超微量分析が要求され、このための分析対象の誘導体化が行われる場合も多い。本研究では、通常系外で行われる誘導体化をキャピラリー系内で行い、分析の微量量化を計るために三種の方法を考案し、それぞれの特徴と有効性を実証するとともに、対象物質間の反応速度解析への応用が可能であることをも明らかにしている。

これらの成果は、当初の研究目的を充分実現したものであり、博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認められる。