

Title	代謝産物プロファイリングに資するキャピラリー電気泳動/質量分析法の開発に関する研究
Author(s)	原田, 和生
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48687
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、 〈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

氏名	原 田 和 生
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 9 7 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	代謝産物プロファイリングに資するキャピラリー電気泳動/質量分析法 の開発に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福崎英一郎 (副査) 教 授 小林 昭雄 教 授 福井 希一 教 授 清水 浩 教 授 原島 俊 教 授 大竹 久夫 教 授 卜部 格 教 授 仁平 卓也 教 授 塩谷 捨明 教 授 金谷 茂則

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は生体内代謝産物を網羅的に解析し、代謝の総合的理解や種々の応用を目指すメタボロミクスに必要な代謝産物プロファイリング技術の一つとしてキャピラリー電気泳動/質量分析 (CE/MS) の新規手法の開発と応用をまとめたものである。

第一章は緒論として、メタボロミクス研究の近年の動向をまとめ、現在、当該研究分野が直面している分析技術における問題点を提示した。その後、これを解決する手法として CE/MS が非常に有用である理由、および本研究の目的を記述した。

第二章では、従来まで困難であったアニオン性代謝産物の一斉プロファイリングを可能にする新規 CE/MS 分析手法の開発を行った。解糖系、TCA サイクル等の生命活動に必須である基幹代謝の中間体である糖リン酸、有機酸、ヌクレオチド、CoA 体といったアニオン性代謝産物は機器分析による測定が困難であった。そこで、極性反転と未修飾フューズドシリカキャピラリー、高 pH の電解質を用いた高速電気浸透流を特徴とする新規 CE/MS 法を開発し、当該代謝産物の標準物質を一つの分析条件で同時に測定することに成功した。

第三章では、第二章で開発した分析手法にさらに改良を加え、生体試料中に含まれるアニオン性代謝産物の測定を行った。上述の分析手法を生体試料の代謝産物プロファイルに適用するためには、再現性、感度、選択性を向上させる必要があった。分析対象化合物の移動時間の再現性を向上させる為に、スルホン化キャピラリーを使用し、検出の感度と選択性を向上させる為に、タンデム四重極型質量分析計を用いた Multiple reaction monitoring 法を採用した。これらの改良により、植物培養細胞中に含まれるアニオン性代謝産物の測定に成功した。

第四章では、¹⁵N 標識無機塩を生体試料に取り込ませ、細胞内代謝産物の ¹⁵N 標識率を CE/MS により測定することで、代謝産物のターンオーバー解析を試みた。異なる光条件下で培養したシロイヌナズナ培養細胞で、ヒスチジンや芳香族アミノ酸のターンオーバーが大きく変動している事が示唆される結果が得られ、本手法の有用性を示すことができた。さらに、ベルベリンを大量に蓄積し、従来から二次代謝の研究に用いられてきたオウレン培養細胞においてポリアミンの生合成が抑制されている事を示唆する結果も得られた。

第五章では、以上の研究成果と意義をまとめ、今後の課題と展望について記述した。

論文審査の結果の要旨

本論文は生体内代謝産物を網羅的に解析し、代謝の総合的理解や種々の応用を目指すメタボロミクスに必要な代謝産物プロファイリング技術の一つとしてキャピラリー電気泳動/質量分析 (CE/MS) の新規手法の開発と応用をまとめたものである。

主な成果は以下の通りである。

- (1) 生命活動に必須である基幹代謝の中間体であるアニオン性代謝産物の一斉プロファイリングを可能にする新規 CE/MS 分析手法を考案し提示している。基幹代謝中間体は糖リン酸、有機酸、ヌクレオチド、CoA 体があり、当該化合物群を同時に一斉測定することは従来の分析手法では不可能であった。本研究で考案された分析手法は極性反転という新しい原理に基づいた手法であり、当該化合物群を一斉測定可能な当該分析法は非常に有用である。
- (2) 新規 CE/MS 分析法が様々な夾雑物を含む生体試料を対象としても運用可能であることを示している。さらに、当該手法によって取得された二次代謝生合成を誘導する処理を行った植物培養細胞において詳細な一次代謝産物プロファイルデータを提示しており、この知見は植物生理学的にも有用である。
- (3) *in vivo* ^{15}N 標識による代謝産物ターンオーバー解析の手法を提示している。代謝産物の ^{15}N 標識率を CE/MS により簡便に測定できる当該手法は、代謝反応の大きさ (代謝フラックス) を推測し、細胞内の代謝状態を解析することを可能にする非常に強力な手法である。さらに当該手法を用いた解析により薬用成分ベルベリンを大量に蓄積するオウレン培養細胞においてポリアミンの生合成が抑制されている事を示唆した。本知見は生理学的、あるいは代謝工学的に有用である。

以上のように、本論文は CE/MS を用いた 2 種類の分析手法を提示し、これらを運用することにより様々な有用な知見を獲得することが可能であることを示している。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。