

平成22年 6月11日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19550088
 研究課題名(和文) 親水性相互作用型液体クロマトグラフィーによる糖鎖の超高性能分離法の開発
 研究課題名(英文) Development of highly efficient separation methods of saccharides using hydrophilic interaction liquid chromatography
 研究代表者
 池上 亨 (IKEGAMI TOHRU)
 京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
 研究者番号：20301252

研究成果の概要(和文)：内径100-200ミクロンのキャピラリー内に調製した網目状シリカモノリス担体上でメタクリレート系モノマーを重合させることにより、ポリマーコート型修飾を施し、液体クロマトグラフィーによる糖鎖の超高性能分離媒体を開発した。親水性相互作用型、弱カチオン交換型、弱アニオン交換型のマイクロHPLC用カラムを調製し、性能評価を行なった。これらは、現在市販されている高極性物質分離用カラムを上回る性能を示し、高性能および高速分離条件下で、糖鎖や核酸誘導体を効率よく分離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Monolithic silica columns in fused silica capillaries of 100-200 mm diameters were functionalized by on-column radical polymerization of methacrylates possessing various hydrophilic/ion-exchange functions. These columns with hydrophilic, weak cation exchange, and weak anion exchange functions, were provided for the separation of mono- and oligosaccharides and their derivatives using microHPLC systems to evaluate their separation efficiencies. They could provide higher separation efficiencies than commercial particle-packed columns in terms of plate numbers of the HPLC system, and separation speed, in the separation of saccharides, nucleosides, and nucleotides.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2007年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：分析化学・有機合成化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：(1) HPLC (2) カラム (3) 精密分離 (4) 糖鎖 (5) 高速分離

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は高い水溶性と不揮発性を特徴とするため、ガスクロマトグラフィー(GC)よりは液体クロマトグラフィー(HPLC)やキ

ャピラリー電気泳動(CE)による分離、定量、同定が好適な対象である。糖鎖は分離科学の観点からは極めてチャレンジングな分離対象である。すなわち、構成要素が同じであり

ながら結合様式、結合位置が異なる糖鎖同士の分離分析を達成するためには、極めて高い構造選択性と分離性能、及び糖鎖の取り扱いが容易な水系での分離、検出を可能にする必要があることによる。現状では、HPLCと質量分析装置を連結した分離-検出系が主力であるが、HPLCによる糖類の分離性能はまだ改善の余地が大きく、極めて複雑な糖鎖の分離分析研究の推進力としては不十分である。特に、単糖やオリゴ糖など、小糖の分離は困難であった。

2. 研究の目的

本研究は、グライコーム解析およびメタローム解析の発展に寄与する、超高性能親水性相互作用型キャピラリーHPLC用カラムを調製し、既存の粒子充填型カラムの性能限界を超えた糖鎖分離システムを構築することが目的である。具体的には、(1) シリカモノリスの表面修飾に用いる重合反応の反応条件とカラム性能の関係を精査し、最適な修飾条件を決定する(2) カラムの理論段高 5-10 ミクロンを発生させる親水性相互作用 (HILIC) 型、弱カチオン交換 (WCX) 型、弱アニオン交換 (WAX) 型の修飾を施したカラムを調製する(3) 数種類の糖を数分以内に分離する、高速条件下で利用可能なカラムを調製する(4) 未修飾糖の検出・定量法の検討(5) ミクロカラムの特性である高感度分析の限界について精査する(6) 糖鎖のトラップカラムとして利用可能なホウ酸修飾型カラムを調製し、多次元分離の基礎的技術とする(7) 疾病のバイオマーカーとなる糖の分離分析法の基礎的技術を確立する(8) 質量分析計との連結で未修飾糖の検出法を検討する、などを挙げた。

3. 研究の方法

(1) シリカモノリスの表面修飾に用いる重合反応の反応条件とカラム性能の関係を精査し、最適な修飾条件を決定する。

カラム上のポリマー結合量を段階的に変えたモノリスカラムをセットで調製し、糖鎖等高極性化合物に対するそれぞれの分離性能(分離時間、圧力当たりの理論段数、ピーク対称性など)について検討する。更に、分離性能の線速度依存性について調査し、最適の分離条件を与えるカラムの調製条件を明らかにする。イオン交換型 HPLC は、良い分離を得るためにはグラジエント分離を行なうのが普通であるが、本申請のイオン交換型キャピラリーカラムはアイソクラティック分離でも充分な分離性能を与えるため、上記の分離性能を詳細に検討することが可能である。重合条件の変更により、固定相結合量を調整可能である点を利用して、糖鎖の精密分離及び高速分離に必要とされるカラムの

性能を発現させる手法を確立する。

(2) 超高性能の HILIC 型、WCX 型、WAX 型の修飾を施したカラムを調製する。

一般的に、HILIC 型やイオン交換型等、逆相型より強い分子間相互作用(クーロン相互作用、水素結合型相互作用)を用いる系では、理論段高は逆相型より高くなり、線速度の上昇に伴い著しい分離性能の低下が起こることが予想される。基材となるシリカモノリスの性能向上と、(1)の修飾方法の改良によって、理論段高 5-10 ミクロンの極性化合物分離カラムを調製する。それぞれについて理論段数 5-10 万段のカラムを調製する。本申請により糖鎖など高極性化合物に対して世界最高の分離性能と実用性を提供する。

(3) 数種類の糖を数分以内に分離する、高速条件下で利用可能なカラムを調製する

糖分離用に市販されている HILIC 型カラムは、分離性能の線速度依存性が高く、最適使用流速が 0.5 ml/min と遅く、5.0 ml/min では 15 MPa の背圧で理論段高が 60 ミクロンに達する。一方、モノリス型では同じ圧力で 12 ミクロンの理論段高に抑えられており、高速分離の実現が可能であることを示している。この特徴を活用するカラムの修飾方法を開発する。

(4) マイクロ HPLC 系で未修飾糖検出法を検討する

糖類の精密分離と定量を視野に入れると、誘導体化なしに分離・定量することが望ましい。設備備品として申請する電気化学検出器は、未修飾の糖を高感度で検出するための手段を確立するために使用する。シリカモノリスカラムで分離後、高い pH で検出することで、未修飾の糖類が電気化学的に検出可能である。

(5) ミクロカラムの特性である高感度分析の限界について精査する

キャピラリーカラムの特徴の一つに、試料のバンドが希釈を受けにくく、結果として検出感度が高くなる点がある。例えば内径 100 ミクロンのカラムは、通常よく用いられている内径 4.6 mm のカラムに比べて、希釈率は 2100 分の 1 に抑えることができる。準備的に行なったキャピラリー LC-MS/MS システムの検討では、スクロースやトレハロースの検出感度は nM レベルであることが分かっており、粒子充填カラムでは不可能な微量成分の分離と検出が可能であることを示唆している(未発表)。研究室で所有している microQTOF-MS/MS システムでどの程度の濃度の糖鎖を検出可能か、詳細に検討する。HPLC の移動相やイオン化の条件を種々変更して、最高の検出感

度を調査する。

(6) ボロン酸修飾型カラムを調製し、多次元分離の基礎的技術とする

糖のジオール構造を認識する分子素子として、ボロン酸の利用が古くから検討されて来ており、様々な知見が蓄積されている。ボロン酸を含むメタクリレートモノマーなどを合成、シリカモノリスにポリマーコートすることで、糖鎖と非常に大きい相互作用をすると予測される分離媒体を調製する。

(7) 疾病のバイオマーカーとなる糖の分離分析法の基礎的技術を確立する

アロースやプシコース等の希少な単糖の生理活性が明らかになりつつあり（香川大学希少糖研究センター等）、糖のリン酸化合物が癌のバイオマーカーとして着目されている。これらの糖を分離、定量する基礎的技術を確立する。このためには(1)(5)(6)の課題を達成することが必要であるが、(6)による試料のオンラインクリーンアップが可能になれば実現の可能性があると考える。

(8) LC-MS での未修飾糖の検出法を検討する

LC-MS は糖の有力な検出方法の一つであり、ネガティブモードでの脱プロトン体の検出、あるいはアルカリ金属の糖付加体の検出が一般に行なわれている。申請者らは酢酸イオン存在下でLC-MSを行なうと、未修飾糖が高感度で検出可能なことを見いだしている（未発表）。この方法の検出限界を詳細に調査し、電気化学検出および紫外可視検出（ピリジルアミノ化糖等、修飾糖）との検出感度の比較を行なう。アニオン交換カラムでは、保持されるサンプルを流出させるために高濃度の塩化ナトリウムを使用するが、この方法はLC-MSには適用しにくい面があるので、よりLC-MSに好適な分離条件の探索も併せて行なう。

4. 研究成果

2007年度

従来より相比の大きいシリカモノリスキャピラリーカラムを、ポリアクリルアミドの重合により修飾した。線速度1~7 mm/secの条件下で、理論段高7-20 ミクロンが達成された。これは従来のHILIC型カラムでは達成できなかった分離性能であり、相比の大きいシリカモノリスキャピラリーカラムの利点が証明された。20 MPa 以下でkinetic plot analysisを行ない、このHILIC型モノリスカラムが粒子充填型カラムの3倍速い分離を提供可能なことを示した。

また、シリカモノリスキャピラリーカラムにアクリル酸を重合修飾して調製した親水

性相互作用型（HILIC）カラムの性能を評価した。重合修飾後も多孔性モノリスの特徴である高い液体透過率を示した。理論段高も最高性能で10 ミクロン以下を達成した。カラム通過時間が20秒の分離で理論段数1万段を達成すると共に、ペプチドの分離において10分間でピークキャパシティ100程度を実現した。HILICでも逆相型と同程度の分離性能が達成可能であることを示した。

2008年度

「ミクロカラムの特性である高感度分析の限界について精査」「LC-MSでの未修飾糖の検出法を検討」に関して検討を行ない、成果を発表した。キャピラリーカラムの特徴の一つに、試料のバンドが希釈を受けにくく、結果として検出感度が高くなる点がある。例えば内径100ミクロンのカラムは、通常よく用いられている内径4.6 mmのカラムに比べて、希釈率は2100分の1に抑えることができる。キャピラリーLC-MS/MSシステムの検討で、スクロースやトレハロースの検出感度はnMレベル（MSにおいて、数百atto mol）であることが分かっており、粒子充填カラムでは不可能な微量成分の分離と検出が可能であることを示した。この系をトウモロコシやシロイヌナズナの抽出物中の二糖の分析に適用し、存在量の小さい糖の分離と検出に成功した。

市販のカラムに、粒子径3ミクロンのものが発売され始め、理論段高による比較ではモノリスカラムと同程度の性能が提供可能となった。しかし、カラム背圧の上昇も含めてkinetic plot解析を行なうと、モノリス型カラムは約2倍速く同程度の分離性能を与えることが示された。

酢酸緩衝液を移動相に混入し、HPLC分離後の検出をネガティブモードでESI-MS（Electrospray Ionization Mass Spectrometry）で行なうと、未修飾の糖が効率よく検出できることが分かったので、これも併せて報告した。

2009年度

超高性能のHILIC型、WCX型、WAX型の修飾を施したカラムを調製した。基材となるシリカモノリスの性能向上と、(1)の修飾方法の改良によって、理論段高5-10ミクロンの極性化合物分離カラムを調製する。それぞれについて理論段数5-10万段のカラムを調製すると計画したが、長いカラムを製作することはできなかった。反面、理論段高10ミクロンを下回る高性能イオン交換型カラムの調製と評価に成功した。また、ホスホニウム塩を修飾した「弱い」アニオン交換型カラムを調製し、従来保持が大きく分離時間がかかっていた化合物を、より短時間で分離するこ

とを可能にした。これについて投稿準備中である。

マイクロHPLC系で未修飾糖検出法を検討した。糖類は大きい紫外可視吸収を持たないため、通常誘導体化して紫外可視検出器で検出される。将来の精密分離、糖の定量を視野に入れると、誘導体化なしに分離・定量することが望ましい。従来マイクロHPLCの検出系は紫外可視検出に限られて来たので、電気化学検出法を導入することにより、両者の検出性能の比較を検討した。電気化学検出法は、カラム分離後に、溶出体積の30%の水酸化リチウム水溶液を混和して検出するため、総合的な分離性能は決して高くなかったが、それでも7分の分離時間でピークキャパシティ24が実現でき、より長いHILIC型カラムを用いた高性能分離の可能性が示された。

ボロン酸修飾型カラムを調製し、多次元分離の基礎的技術とした。糖のジオール構造を認識する分子素子として、ボロン酸の利用が古くから検討されて来ており、様々な知見が蓄積されている。ボロン酸を含むメタクリレートモノマーなどを合成、シリカモノリスにポリマーコートすることで、糖鎖と非常に大きい相互作用をすると予測される分離媒体を調製した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

① K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, Test compounds for detecting the silanol effect on the elution of ionized amines in reversed-phase LC. *Journal of Separation Science*, 査読有, 33, 2010, 348-358.

② M. Iwasaki, S. Miwa, T. Ikegami, M. Tomita, N. Tanaka, Y. Ishihama, One - Dimensional Capillary Liquid Chromatographic Separation Coupled with Tandem Mass Spectrometry Unveils the Escherichia coli Proteome on a Microarray Scale. *Analytical Chemistry*, 査読有, 2010, Accepted

③ T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, The performance of hybrid monolithic silica capillary columns prepared by changing feed ratios of tetramethoxysilane and methyltrimethoxy silane. *Journal of Chromatography A*, 査読有, 1217, 2009, 89-98.

④ Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Horie, T. Hara, J. Jaafar, N. Tanaka, Improvement of separation

efficiencies of anion-exchange chromatography using monolithic silica capillary columns modified with polyacrylates and polymethacrylates containing tertiary amino or quaternary ammonium groups. *Journal of Chromatography A*, 査読有, 1216, 2009, 7394-7401.

⑤ W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak, Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography, A*, 査読有, 1216, 2009, 5868-5874.

⑥ J. Jaafar, K. Konishi, S. Terabe, T. Ikegami, N. Tanaka, Field Enhanced Sample Injection for the CE Determination of Arsenic Compounds Using Successive Multiple Ionic Polymer Layer Coated Capillaries. *Chromatographia*, 査読有, 69, 2009, 1437-1441.

⑦ T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography, A*, 査読有, 1184, 2008, 474-503.

⑧ K. Miyamoto, T. Hara, H. Kobayashi, H. Morisaka, D. Tokuda, K. Horie, K. Koduki, S. Makino, O. Núñez, C. Yang, T. Kawabe, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ishihama, N. Tanaka, High-efficiency liquid chromatographic separation utilizing long monolithic silica capillary columns. *Analytical Chemistry*, 査読有, 80, 2008, 8741-8750.

⑨ J. Jaafar, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Miyamoto, N. Tanaka, Anion Exchange Silica Monolith for Capillary Liquid Chromatography. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. 査読有, 391, 2008, 2551-2556.

⑩ T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC, *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 査読有, 391, 2008, 2533-2542.

⑪ J. Jaafar, Z. Irwan, R. Ahamad, S. Terabe, T. Ikegami, N. Tanaka, Field Enhanced Sample Injection for the Separation and Indirect Detection of Arsenic Compounds by Capillary

Electrophoresis Using Successive Multiple Ionic Polymer Layer Coated Capillary. Chromatographia, 査読有, 30, 2007, 391-398.

⑫ O. Núñez, T. Ikegami, K. Miyamoto, N. Tanaka, Study of a monolithic silica capillary column coated with poly(octadecyl methacrylate) for the reversed-phase liquid chromatographic separation of some polar and non-polar compounds. Journal of Chromatography, A, 査読有, 1175, 2007, 7-15.

⑬ K. Horie, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography. Journal of Chromatography, A, 査読有, 1164, 2007, 198-205.

⑭ O. Núñez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase HPLC by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate. Journal of Chromatography, A, 査読有, 1156, 2007, 35-44.

⑮ K. Horie, H. Kimura, T. Ikegami, A. Iwatsuka, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, Calculating optimal modulation periods to maximize the peak capacity in two-dimensional HPLC. Analytical Chemistry, 査読有, 79, 2007, 3764-3770.

〔学会発表〕(計7件)

① 池上 亨・友松公樹・田窪宏貴・河内佑介・田中信男 糖の精密分離に向けた親水性相互作用型 HPLC-電気化学検出システムの開発 第20回クロマトグラフィー科学会議 2009年11月11日 ヤクルトホール(東京都)

② 池上 亨, 渡邊優太, 益田文雄, 堀江勘太, 一丸 淳, 田中信男 イオン交換型シリカモノリスカラムの高性能化に関する研究 第16回クロマトグラフィーシンポジウム 2009年5月29日 長崎大学(長崎市)

③ T. Ikegami, H. Takubo, Y. Watanabe, K. Tomomatsu, K. Horie, H. Fujita, N. Tanaka, Preparation and Evaluation of Monolithic Silica Columns for Hydrophilic Interaction (HILIC) Chromatography, The 33rd International Symposium on High

Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2008年12月4日, 京都市

④ Horie Kanta, Miyamoto Kosuke, Hara Takeshi, Kobayashi Hiroshi, Morisaka Hironobu, Tokuda Daisuke, Koduki Kodai, Makino Satoshi, Núñez Oscar, Yang Chun, Ikegami Tohru, Tanaka Nobuo. Monolithic silica capillary columns for ultrahigh efficiency separations. 31st International Symposium on High-Performance Liquid Chromatography and Related Techniques (HPLC 2007), 2007年6月18日, Ghent市(ベルギー王国)

⑤ Miyamoto Kosuke, Hara Takeshi, Kobayashi Hiroshi, Morisaka Hironobu, Tokuda Daisuke, Horie Kanta, Koduki Kodai, Makino Satoshi, Núñez Oscar, Yang Chun, Ikegami Tohru, Tanaka Nobuo, High-efficiency liquid chromatographic separation utilizing long monolithic silica capillary columns, 30th International Symposium on Capillary Chromatography, 2007年6月5日, 大連市(中華人民共和国)

⑥ 田窪宏貴, 堀江勘太, 渡邊優太, 宮本晃輔, 池上 亨, 細矢 憲, 田中信男 親水性相互作用液体クロマトグラフィー型カラムの分離特性の評価 第14回クロマトグラフィーシンポジウム 2007年5月11日 富山市

⑦ 池上 亨, 堀江勘太, 濱田博之, 田窪宏貴, 細矢 憲, 田中信男 親水性相互作用クロマトグラフィー用シリカモノリスカラムによる糖類の精密分離 第14回クロマトグラフィーシンポジウム 2007年5月11日 富山市

〔図書〕(計2件)

① T. Ikegami, H. Aoki, H. Kimura, K. Hosoya, N. Tanaka, Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences, John and Wiley and Sons, 2008 (共著) pp. 147-176

② 池上 亨 丸尾雅啓 ベーシック機器分析化学 化学同人 2008 (共著) pp. 39-50

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池上 亨 (IKEGAMI TOHRU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・

准教授

研究者番号：20301252

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：