

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05162

研究課題名(和文)オルガノゲル電気泳動とオンライン試料濃縮技術の結合に基づく生体高分子の高性能分析

研究課題名(英文) High Performance Analysis of Biomacromolecules by combining organogel electrophoresis and on-line sample preconcentration techniques

研究代表者

北川 文彦 (Kitagawa, Fumihiko)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：20362452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：試料リザーバーから目的成分を供給しながらカラム全体に注入した試料溶液も濃縮するLVSEP-FASIとオルガノゲルに基づくNACGEを組み合わせることにより、80%メタノール-20%DMSO系で141000倍の高効率な濃縮を達成した。一方、アニオン種のNACGE分析において、アミン類を添加剤として検出側から泳動させることによってグラジエント溶離を実現でき、カチオン種のグラジエント溶離ではホウ酸がグラジエント剤としてより有効であることが明らかとなった。したがって、LVSEP-FASI-NACGEによる高感度分析とグラジエント溶離による高性能分離を結合した分離分析が実現できるものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LVSEP-FASI-NACGEにおいて、80%メタノール-20%DMSO系で141000倍の高効率な濃縮を達成できた。これはポリマーおよび20%DMSOの添加により泳動液の粘性が適度に上昇したことやEOFが効果的に抑制されたことを反映して、試料のピーク広がりが抑制されたために、高い濃縮率が得られたものと考えられる。一方、グラジエント溶離において、DMSO系ではグラジエントにより泳動時間が大きく短縮されたのに対し、水系では全く変化しなかった。これはDMSO系では効果的な水素結合により粘性が変化するのに対して、水系では強い溶媒和によりグラジエント剤との水素結合が働かないことに起因している。

研究成果の概要(英文)：By combining LVSEP-FASI, which can concentrate target analytes both in a whole capillary and supplied from a sample reservoir, and NACGE based on organogel, a highly efficient enrichment up to 141000-fold improvement was achieved in 80% methanol-20% DMSO system. It was found that, on the other hand, gradient elution in NACGE can be attained for cations and anions by migrating amines and boric acids, respectively, from the detector sides. Therefore, separation analyses combining highly sensitive LVSEP-FASI-NACGE and highly effective gradient elution in NACGE can be performed in CE and MCE.

研究分野：分析化学

キーワード：分離分析 チップ分析 電気泳動分析 オンライン試料濃縮 グラジエント溶離

1. 研究開始当初の背景

近年のオミクス分析の進展に伴い、キャピラリー電気泳動 (CE) やマイクロチップ電気泳動 (MCE) による生体分析の高性能化・高感度化はますます重要な課題となっている。特に CE や MCE においては、感度不足が微量な生体試料の分析において問題となることが多く、高感度化を実現するための様々なオンライン試料濃縮技術が開発されてきた。しかし、生体成分のオンライン濃縮法においては、どの手法も一長一短を有しており、改良の余地を残している。一方、生体高分子のミクروسケール電気泳動、特に MCE 分析においては、水系におけるキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) モードの適用が成熟しつつあるが、マイクロカラムへの充填が可能となる粘性の低い直鎖ポリマーマトリックスの利用が専らであるために、分離能が不十分となる場合がある。したがって、さらなる分離能の向上のために、オルガノゲルのような新規マトリックスが導入されてきたが、十分な検討が行われたとは言い難い。以上の背景より、濃縮率と分離性能を両立できる手法の開発が求められているが、一般的なオンライン試料濃縮法と CGE 分離を結合するには、分離媒体の粘性の高さが問題となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、非水系キャピラリーゲル電気泳動 (NACGE) における新規なゲルマトリックス制御技術と極めて高効率なオンライン試料濃縮法である large volume sample stacking with electroosmotic flow pump-field amplified stacking injection (LVSEP-FASI) 法を組み合わせることで、生体高分子の高感度かつ高性能な分離技術の開発を目指した。この目的達成のためには、LVSEP による濃縮時には泳動液の粘性が低く、CGE 分離時には粘性を高くする必要があり、特に CE においては実現が難しい。この問題を解決するために、新たに見出された電気泳動に基づくオルガノゲルマトリックス制御技術を利用できるものと着想した。NACGE 法では、泳動液中の Li^+ と親水性ポリマー間の水素結合を介してオルガノゲルが形成し、ゲルマトリックスのポアサイズや粘性を Li^+ 濃度により制御できることが明らかとなっており、 Li^+ を泳動液バイアルから供給することによって初めて、分析中にキャピラリー内の粘性を増加させることができ、LVSEP 法による濃縮と NACGE による分離が達成されるものと考えられる。

この LVSEP-FASI-NACGE 法においては、試料バイアル側から圧力を印加しながら LVSEP による濃縮を行う(図 1-1)。このとき、低い電気伝導度の試料により速い電気浸透流 (EOF) が生じるため、濃縮成分は試料バイアル側へと向かう。濃縮成分が注入側に近づき、キャピラリー内が泳動液で満たされると、EOF は遅くなり、注入側からの圧力が釣り合った時点で濃縮成分の移動が停止する(図 1-2)。この停止した濃縮ゾーンに対して、FASI により試料成分を濃縮しながら注入することで、感度不足の問題を解決できる。濃縮終了後、圧力の印加を停止し、検出側のバイアルを Li^+ を含む泳動液に交換すると、 Li^+ が泳動してポアサイズの小さなゲルゾーンが形成する(図 1-3)。このゾーンで分子ふるい効果による NACGE 分離が達成される(図 1-4)。この手法の実現には、LVSEP による濃縮時には速い EOF が発生し、NACGE 分離時には Li^+ と水素結合して大きく粘性が上昇(ポアサイズが減少)するようなオルガノゲルマトリックスの選択が不可欠であるが、 Li^+ -親水性ポリマー-オルガノゲルを利用することで初めて可能になるものと考えられる。

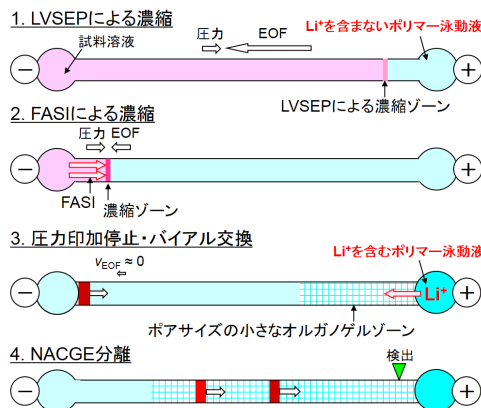


図 1. LVSEP-FASI-NACGE 法

3. 研究の方法

(1) LVSEP-FASI と NACGE の結合

ポリビニルアルコール (PVA) およびヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) などの有機溶媒中で Li^+ を加えるとオルガノゲルを形成するポリマーを用いて泳動液を調製した。溶媒で希釈した試料溶液を陰極側バイアルおよびキャピラリー全体に注入した後、補助圧力を印加するためにキャピラリーの注入端を 5~15 cm 高くしながら -15 kV の電圧を印加し試料を注入することで試料濃縮を行った。一定時間経過後、補助圧力を停止し、陰極バイアル内の試料溶液を泳動液へと交換した後、電圧を印加して分離を行った。この LVSEP-FASI 分析で得られたピーク高さを通常の NACGE 分析の結果と比較して濃縮率を算出した。

(2) NACGE とグラジエント溶離の結合

分析中に粘性を変えられる泳動液を用い、グラジエント溶離の手法を NACGE に適用する。キャピラリー内にポリマー/ Li^+ 溶液を充填し、ポアサイズの小さなゲルを形成させる(図 2-1)。ここで

検出側のバイアルに水素結合を阻害するイオン種 (HI^+) の溶液を充填して電圧を印加すると、 HI^+ が陽極側から泳動し、ポリマーと Li^+ の水素結合が断たれ、ポアが広がり、試料成分は速く泳動できるようになる(図 2-3)。このグラジエント溶離により、速く泳動する成分の分離を維持しながら、遅く泳動する成分を速く溶出することが可能となる。この目的を実現するために、水素結合阻害剤を網羅的に検討し、その濃度や泳動液組成がオルガノゲルのポアサイズを即座に拡張できる因子について検討した。

4. 研究成果

(1) LVSEP-FASI と NACGE の結合

試料リザーバーから目的成分を供給しながらカラム全体に注入した試料溶液も濃縮する LVSEP-FASI と NACGE を組み合わせるため、CE における検討を行った。はじめに比較のために水系において LVSEP-FASI の濃縮性能を検討したところ、注入側の落差 15 cm・濃縮時間 0.5 min としたとき、従来の NACGE 分析と比較して 2600 倍の高感度化が達成された。次にメタノール系において LVSEP-FASI 分析を行ったところ、落差 10 cm・濃縮時間 5 min で濃縮率は 14000 倍と向上したが、ポリマーの溶解度が悪く、NACGE 分析へ展開できなかった。そこでメタノール-DMSO 混合溶媒系について検討したところ、HPMC を 0.1% の濃度で溶解できるようになった。そこで 0.1% HPMC を含む 10% DMSO を用いてアニオン性試料の濃縮を行ったところ、約 30000 倍の濃縮率が得られたのに対し、20% DMSO では濃縮時間 10 分で 141000 倍と非常に高効率な濃縮を達成した(図 3)。これは 0.1% HPMC および 20% DMSO の添加により泳動液の粘性が適度に上昇したことや EOF がさらに抑制されたことを反映して、試料のピーク広がりが抑制されたために、高い濃縮率が得られたものと考えられる。

このようにメタノール-DMSO 混合溶媒系で非常に高効率な濃縮が達成されたものの、DMSO 濃度を 15% 以上とすると粘性が高くなるために、再現性が低く、ピークが検出されないことが問題となっていた。そこで、キャピラリー出口側から補助圧力を印加する改良型 LVSEP-FASI による分析について検討を行ったところ、15% DMSO 系で濃縮された鋭いピークが観測され、濃縮率 9000 倍を達成した。さらに粘性の高い 30% DMSO でも分析が可能となり、3600 倍の濃縮率を達成した。このように DMSO 濃度が高い混合溶媒での LVSEP-FASI-NACGE 分析が可能となったことで、グラジエント溶離を結合した高性能分離を実現できるものと考えられる。

一方、マイクロチップ電気泳動において、ポリマーとして HPMC を添加したメタノール泳動液を用いて LVSEP-FASI-NACGE 分析を行ったところ、試料リザーバーの液面を 1 mm 高くしたときには、早い時間に鋭いピークが観測され、濃縮率は 1170 倍となったのに対し、液面差を 5 mm とすると、ピーク形状は悪くなり、泳動時間も大きく遅くなったものの、濃縮率は 2100 倍に達した。このような液面差による圧力流の流速制御により、泳動時間・ピーク形状・濃縮率を調整可能であることがわかった。また、カチオン性成分の MCE 分析についても検討を行い、カチオン性ポリマーを修飾したマイクロチップにおいて NACGE 法と LVSEP 法を結合することができ、生体内アミンの高感度分析を実現できたことから、マイクロチップ上においても LVSEP-FASI と NACGE を結合でき、アニオン性・カチオン性の生体試料を分析できることが示された。

(2) NACGE とグラジエント溶離の結合

NACGE とグラジエント溶離の結合について、アニオン種の分析を可能とするために DMAP や DABCO などのアミン類をグラジエント剤として検討した。PVA, HPMC, PVP をポリマーとして、アニオン性金属錯体を通常の NACGE により分析した結果と DMAP および DABCO を用いたグラジエント溶離を比較したところ、すべてのポリマーと添加剤の組み合わせでグラジエント溶離の効果により鉄錯体の検出時間が大きく短縮された。例えば、1.0% PVA (Mw 85000, DS 99%) と 0.25% LiBr を含む DMSO 溶液を用いた場合、通常の NACGE 分析では鉄錯体は 14.7 min に検出されたのに対し、0.25% の DMAP を用いるグラジエント溶離では検出時間は 6.9 min までに減

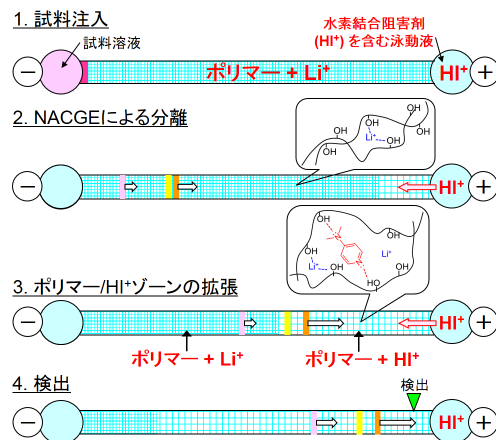


図 2. NACGE におけるグラジエント溶離

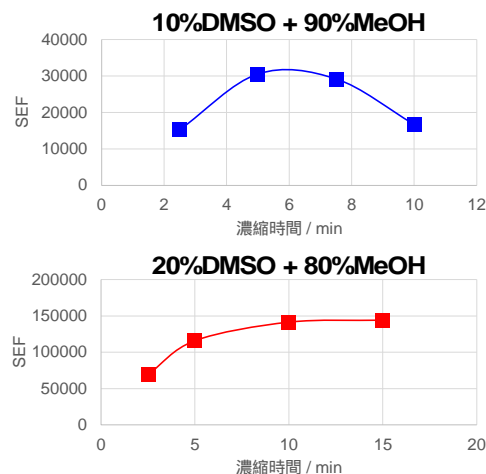


図 3. 濃縮率の濃縮時間依存性

少した。したがって、アニオン種の NACGE 分析においても、アミン類を添加剤として検出側から泳動させることにより、グラジエント溶離を実現できることがわかった。

一方、カチオン性試料のグラジエント溶離を可能とするために、新規グラジエント剤を探索した。これまでに有効性が明らかとなっているマロン酸を基準とし、種々の有機酸を検討したところ、ホウ酸がより有効であることが明らかとなった。通常の NACGE 分析では+1 価の Ir 錯体のピークが 23.6 min に検出され、1.0%のマロン酸を用いるグラジエント溶離では検出時間は 18.1 min までに減少し、短縮時間は 5.5 min となった。これに対し、1.0%のホウ酸を用いるグラジエント溶離では検出時間は 13.3 min、短縮時間は 13.3 min となり、マロン酸よりも大きな時間短縮に成功した(図 4)。これは、ホウ酸は糖のようなポリオール化合物と強い相互作用することが知られており、PVA とも強く相互作用した結果であると考えられる。

さらに NACGE とグラジエント溶離の結合における水素結合の効果について検討を行った。カチオン性金属錯体を通常の NACGE により分析した結果とマロン酸を用いたグラジエント溶離を比較したところ、DMSO 系ではグラジエント溶離の効果により錯体の検出時間が大きく短縮されたのに対し、水系では検出時間が全く変化しなかった。これは DMSO 系では効果的な水素結合により大きく粘性が変化するのに対して、水系では強い溶媒和によりグラジエント剤との水素結合が働かないことに起因しており、DMSO に水を少量添加した泳動液を用いることでグラジエントを調整できることも見いだされた。

以上の結果より、DMSO-メタノール混合溶媒とホウ酸を組み合わせることで、改良型 LVSEP-FASI-NACGE による高感度かつグラジエント溶離を結合した分離分析が実現でき、さらに水添加によるグラジエント強度の調整を組み合わせることで、高性能な分離を実現できるものと期待される。

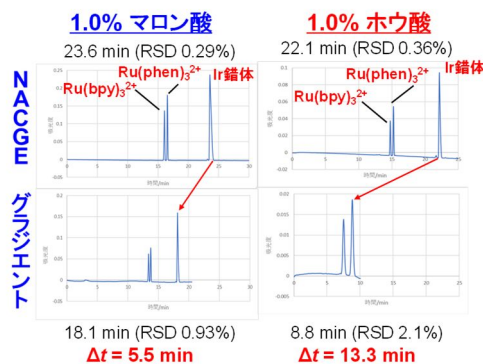


図 4. マロン酸とホウ酸の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fumihiko Kitagawa, Mika Ohashi, Reo Naraoka, Haruna Kondo, Naotsugu Kudo, Masaaki Okazaki, Isoshi Nukatsuka	4. 巻 41
2. 論文標題 Non-aqueous capillary gel electrophoretic analysis of metal nanoclusters in polymeric-DMSO-Li+ systems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Electrophoresis	6. 最初と最後の頁 1400-1404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elps.202000099	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 KITAGAWA Fumihiko, OSANAI Osamu, NUKATSUKA Isoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 LVSEP Analysis of Cationic Analytes in Non-Aqueous Capillary Electrophoresis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 CHROMATOGRAPHY	6. 最初と最後の頁 79 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2019.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fumihiko Kitagawa, Shinichiro Wakagi, Yuuki Takegawa, Isoshi Nukatsuka	4. 巻 35
2. 論文標題 Highly sensitive analysis in capillary electrophoresis using large-volume sample stacking with an electroosmotic flow pump combined with field-amplified sample injection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 889-893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/analsci.19P106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitagawa Fumihiko, Tanigawa-Joh Kana, Terashita Satomi, Fujiki Ryohei, Nukatsuka Isoshi, Sueyoshi Kenji, Otsuka Koji	4. 巻 40
2. 論文標題 On-line sample preconcentration by polarity switching in floating electrode-integrated microchannel	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ELECTROPHORESIS	6. 最初と最後の頁 2478-2483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/elps.201800501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa Fumihiko, Otsuka Koji	4. 巻 1906
2. 論文標題 Sample Preconcentration Protocols in Microfluidic Electrophoresis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8964-5_4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 北川文彦
2. 発表標題 ポリマー/DMSO/Li+系における非水系キャピラリーゲル電気泳動法の開発
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィー科学会議 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川文彦
2. 発表標題 Developemnt of non-aqueous capillary gel electrophoresis in polymeric-DMSO-Li+ systems
3. 学会等名 令和2年度化学系学協会東北大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川文彦, 青山丈一郎, 若城慎一郎, 糠塚いそし
2. 発表標題 LVSEP-FASI法による非水系キャピラリーゲル電気泳動の高感度化
3. 学会等名 日本分析化学会第69年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川文彦, 青山丈一郎, 若城慎一郎, 糠塚いそし
2. 発表標題 LVSEP-FASI法による非水系キャピラリー電気泳動の高感度化
3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川文彦, 山崎綾花, 原 和希, 糠塚いそし
2. 発表標題 LVSEP-FASI法による生体分子の高感度マイクロチップ電気泳動分析
3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北川文彦, 田澤 遥, 糠塚いそし
2. 発表標題 グラジエント溶離・非水系キャピラリーゲル電気泳動分析によるアニオン性金属錯体分析
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumihiko Kitagawa, Haruka Tazawa, Isoshi Nukatsuka
2. 発表標題 Analysis of Anionic Metal Complexes by Gradient Elution-Non-aqueous Capillary Gel Electrophoresis
3. 学会等名 HPLC2019 Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川文彦, 田澤 遥, 奈良岡礼朗, 糠塚いそし
2. 発表標題 グラジエント溶離 - 非水系キャピラリーゲル電気泳動法の開発
3. 学会等名 第39回キャピラリー電気泳動シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川文彦, 高橋 優梨絵, 新宮 祐香, 糠塚いそし
2. 発表標題 非水系マイクロチップ電気泳動 - LVSEP法によるカチオン分析の高感度化
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川文彦, 高橋 優梨絵, 新宮 祐香, 糠塚いそし
2. 発表標題 LVSEP法によるカチオン種の非水系マイクロチップ電気泳動分析の高感度化
3. 学会等名 第26回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川文彦, 佐藤李香, 奈良岡礼朗, 糠塚いそし
2. 発表標題 金属錯体のグラジエント溶離 - 非水系キャピラリーゲル電気泳動分析
3. 学会等名 第38回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川文彦, 佐藤李香, 奈良岡礼朗, 糠塚いそし
2. 発表標題 グラジエント溶離 - 非水系キャピラリーゲル電気泳動による金属錯体の高性能分離
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川文彦, 佐藤李香, 奈良岡礼朗, 糠塚いそし
2. 発表標題 グラジエント溶離 - 非水系キャピラリーゲル電気泳動による金属錯体の高性能分離
3. 学会等名 日本分析化学会第67年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumihiko Kitagawa, Ayaka Yamazaki, Misaki Tateyama, Tatsuya Ishiguro, Isoshi Nukatsuka
2. 発表標題 Highly-sensitive Microchip Electrophoretic Analysis by LVSEP-FASI
3. 学会等名 25th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原和希, 山崎綾花, 館山美咲, 石黒達也, 糠塚いそし, 北川文彦
2. 発表標題 LVSEP-FASI法によるマイクロチップ電気泳動分析の高感度化
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田澤遥, 佐藤李香, 奈良岡礼朗, 大橋弥香, 糠塚いそし, 北川文彦
2. 発表標題 グラジエント溶離 - 非水系キャピラリーゲル電気泳動法の開発
3. 学会等名 第25回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 井上満, 植田郁生, 齊戸美弘, 高橋隆子, 深澤亮一, 堀江正一, 北川文彦, 竹内豊英	4. 発行年 2019年
2. 出版社 オーム社	5. 総ページ数 200
3. 書名 超微量分析入門	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------