

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550094

研究課題名（和文）分子特異的要素を指標としたタンパク質・核酸の高感度分析法の開発

研究課題名（英文）Development of sensitive analytical method for protein and nucleic acid using natural elemental tags

研究代表者

高津 章子（TAKATSU AKIKO）

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究科長

研究者番号：10357361

研究成果の概要（和文）：元素選択的な検出が出来る誘導結合プラズマ（ICP）質量分析装置に低流速で試料を効率よく導入するためのインターフェースを開発し、キャピラリー液体クロマトグラフィー（LC）やキャピラリー電気泳動（CE）と ICP 質量分析装置を直接接続することを可能にした。この分析システムを用いて、核酸分子を分子種ごとに分離し、リンを検出することで、高感度かつ選択的に検出できることを確認し、生体分子のスクリーニング法としての応用の可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A high performance interface device was developed for sample introduction to inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) at low flow rate. Using this interface device, hyphenation of capillary liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis with ICP-MS was achieved. DNA molecules separated with CE or capillary LC were sensitively and selectively detected with ICP-MS in quantification of phosphorus as an elemental tag. We have concluded that this system can provide a fast screening method for various bio-molecules in biological samples.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析、核酸、タンパク質、誘導結合プラズマ質量分析、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動

1. 研究開始当初の背景

ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどの“-omics; オミックス”研究では、配列や構造情報などのインフォマティクスが創成され、多くのテクノロジーへと利用されている。網羅的な機能解析研究において

は、信頼性の高い定量情報と検出対象の絞り込みが今後ますます重要である。これまで、分子同士のハイブリダイゼーションや蛍光色素でのラベリングなどの間接的な分子分析手法や、質量分析法による構造解析などから得られる情報が利用されてきたが、大量の

情報を処理するためには、分子の特性を最大限に活用した直接的な分析手法が有効であると考えられる。そこで着目したのが ICP 質量分析法 (ICP-MS) のもつ高感度かつ元素選択測定能である。すなわち、“分子特異的元素を指標とする計測 (エレメンタルタグ)” によって、得られる測定データを単純化することによる、タンパク質や核酸などの生体分子の定量分析の高感度、高精度及び高確度化の可能性である。

2. 研究の目的

本研究では、“分子特異的元素を指標とする計測”を可能とすることで、対象分子そのものから得られる測定データを単純化し、タンパク質・核酸の分析の高感度、高精度及び高確度化を実現することを目的とする。具体的には、(1)タンパク質や核酸などの試料に含まれる特異的元素を指標とした高精度かつ信頼性の高い定量システムの構築、(2)分子特性を利用した元素標識化による高精度かつ信頼性の高い分析技術の開発、およびそれらの、(3)ゲノム・プロテオーム解析における高確度ファーストスクリーニングメソッド等への可能性の評価を行う。

3. 研究の方法

ゲノムないしプロテオーム解析においては、微量試料を取り扱うため、キャピラリー液体クロマトグラフィー (LC) やキャピラリー電気泳動 (CE) といったナノ・マイクロ分離技術を利用する必要がある。一方、汎用 ICP-MS 装置の試料導入系 (試料導入流速 約 1 mL/min が基本設計) では、適応流速のミスマッチングやプラズマへの低試料導入効率 (数%) 等により、ナノ・マイクロ分離技術との結合が極めて難しいのが現状である。そこで、これらの結合を可能とするための、全量消費型高効率フォーカス試料導入インターフェースを新たに設計開発する。開発するインターフェースは、高効率の試料導入効率をもち、高感度分析が達成できるよう最適化をはかる。

さらに、開発したインターフェースを用いて、キャピラリー LC やキャピラリー電気泳動 (CE) と ICP-MS 装置とを結合したシステムを構築し、核酸やタンパク質などの生体分子の分析に応用する。最終的には、ファーストスクリーニングメソッドとしての適用の可能性を評価する。

4. 研究成果

(1) 全量消費型高効率フォーカス試料導入

インターフェースの開発

キャピラリー液体クロマトグラフィーやキャピラリー電気泳動 (CE) といったナノ・マイクロ分離技術と誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を結合するための全量消費型高効率フォーカス試料導入インターフェースの設計開発を行った。図 1 には開発した試料導入インターフェースの概念図と中心管部分の拡大写真を示す。

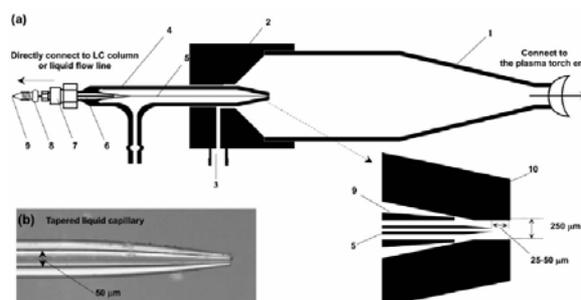


図 1. 全量消費型高効率フォーカス試料導入インターフェースの概念図 (a) 及び送液キャピラリーの写真 (b)

(1:軸上シリンダーチャンバー、2:アダプター、3:シーガス導入口、4:特注ネブライザー本体、5:中心管、6:FEP スリーブ、7:PTFE 接続アダプター、8:PEEK フィッティング、9:送液キャピラリーチューブ、10:ネブライザーノズル先端)

ネブライザーノズルの拡大写真

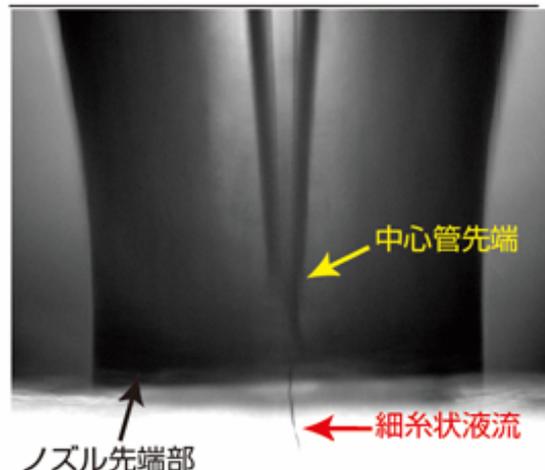


図 2. ネブライザーノズルの拡大写真

(フローフォーカススプレー効果による細糸状液流の形成: 試料液はネブライザーノズル内で細糸状液流を形成する。液流はノズル外で破碎され、90 %以上が 10 μm 以下の液滴になる。)

本研究で開発した試料導入インターフェースは、三重管構造ネブライザーと低容量気化室で構成されており、ネブライザー中心管をテーパ加工する手法を確立することで、図2に示すようなフォーカススプレーを可能とし、キャビティ内壁での試料衝突ロスやプラズマ内拡散を抑制し、試料の全量を消費する効率の良い試料導入を可能とした。

(2) 全量消費型高効率フォーカス試料導入インターフェースの改良

開発した全量消費型高効率フォーカス試料導入インターフェースを改良し、さらに試料導入の効率を上げ、検出感度の向上を目指した。ネブライザーに関しては、先端テーパ部分の構造などをさらに最適化することにより、試料導入効率を高めることが可能であることがわかり、分析感度も向上させることができた。

さらなる高効率化と感度向上を図るために、本インターフェースの気化室形状、特に、試料の壁面衝突を抑制した気化室の形状について検討を行った。具体的には、シーガス導入手法を検討するため、異なる形状・容積の気化室を試作し、高速度カメラによる液滴動態観察と ICP-MS に接続した際に得られる感度及び信号安定性に基いて評価し、最適な気化室形状を選択することにより、高効率試料導入を可能とした。

(3) キャピラリー液体クロマトグラフィーと ICP-MS との接続

開発した全量消費型高効率フォーカスインターフェースを用いて、キャピラリー液体クロマトグラフィー（キャピラリーLC）と ICP-MS とを接続した分析システムの構築を行った。開発した試料導入インターフェースを用いることで、キャピラリーLCからの低流量の溶出液を ICP-MS に効率よく導入することができた。

本システムを、DNA を構成する核酸モノマーであるヌクレオチド類の分離分析に用いたところ、それぞれの分子種の分離を保ったまま、リンの検出により、選択的かつ高感度に分析することができた（図3）。その際、水をプラズマモディファイヤーに用いる分子ガス混合プラズマでリンの検出限界を1桁下げることにも成功した。

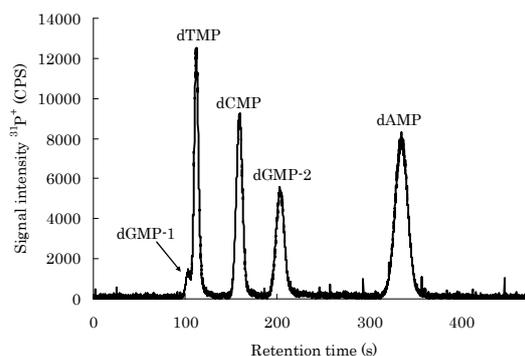


図3. LC-ICP-MS で得られたヌクレオチド試料のクロマトグラム（リンイオン測定結果）

(4) キャピラリー電気泳動と ICP-MS との接続

開発したインターフェースを利用して CE と ICP-MS を接続した分析システムを構築した。試料として DNA を酵素消化して得られたヌクレオチドの混合溶液を用いて、キャピラリー電気泳動（CE）-ICP-MS で分析したところ、それぞれのヌクレオチドを分離し、リンイオンを用いて検出・定量することができた（図4）。また、リンの定量値から、DNA の定量をすることが可能であった。

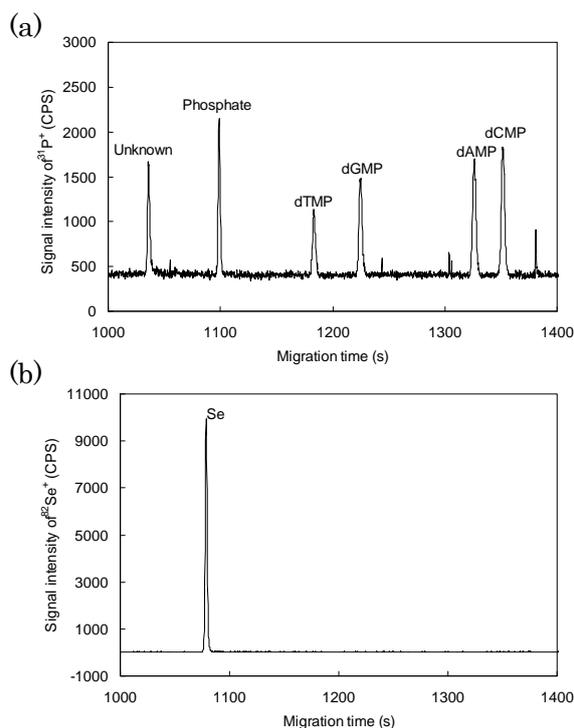


図4. DNA 酵素消化物の CE-ICP-MS で得られたエレクトロフェログラム (a) リンイオン測定結果、(b) 内標準として利用したセレンイオン測定結果

CE との接続においては、低流量の試料送液による試料溶液の効率的な噴霧とプラズマへの導入及び、特にゲル充填キャピラリー電気泳動 (CGE) を行う際の高粘性溶液の噴霧による目詰まりが問題となる。本インターフェースを用いることにより、これらの問題点は全て解決可能で、特に、低流量域における効率的な噴霧と試料導入、及び高粘性液体の噴霧については、他の従来製品では実現できない性能を示した。本システムでは、これらの特性を活用し、ゾーン電気泳動やミセル動電クロマトグラフィーに加えて、生体高分子の分離に適した CGE と ICP-MS の接続も可能であった。

ゲル充填キャピラリー電気泳動 (CGE) を用いる本分析システムで、DNA の分子量マーカーである DNA ラダー(分子量の異なる DNA の混合物)を測定したところ、高分子である核酸分子を分子構造を維持したまま分離し、分子量ごとにリンイオンを用いて検出・定量することに成功した。また、この方法は、分子種によらず、一定の感度で検出ができることを確認した。これまでに、ゲル電気泳動と ICP-MS による DNA 分析は報告されているが、ゲル充填キャピラリー電気泳動で実現した例はこれまで報告されておらず、特に高分子の DNA や RNA、また、タンパク質を対象とした分離分析技術を用いて、より汎用的に利用可能な新規検出手法としてプラズマ分光分析に関する国際学会で報告し、注目を集めた。

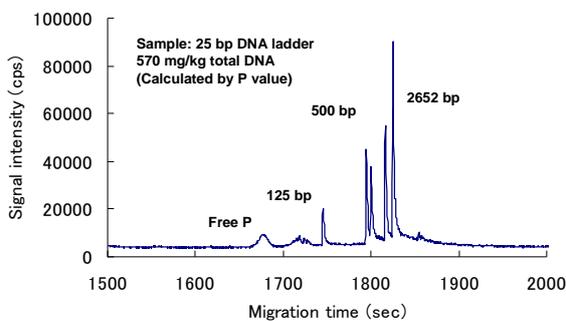


図 4. CGE-ICP-MS で得られた DNA ラダーを試料としたエレクトロフェログラム (リンイオン測定結果)

(5) 高確度ファーストスクリーニングメソッドとしての応用の可能性

CE やキャピラリー LC と ICP-MS を接続した分析システムは、極微量の試料の分析が可能であり、生体試料について、分子特異的要素を指標とした分析を実現することが可能である。

本システムによる、リンを指標とする検出

は、核酸だけでなく、リン酸化タンパク質やペプチド等の生体分子に対して幅広い応用が可能であり、リンが含まれる対象化合物を一定の感度で検出することができる。また、LC や CE などの分離法や分離モードも対象にあわせて設定可能である。リン以外の元素の適用も可能であることから、今後、本法は、ゲノム・プロテオーム解析における幅広い物質に対する高確度ファーストスクリーニングメソッドとしての応用が期待される。

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 2 件)

- ① 稲垣和三、藤井紳一郎、高津章子、千葉光一、High Performance Concentric Nebulizer for Low-Flow Rate Liquid Sample Introduction to ICP-MS、Journal of Analytical Atomic Spectrometry、査読有、Vol. 26(3)、2011、623-630
DOI: 10.1039/C0JA00128G
- ② 藤井紳一郎、稲垣和三、千葉光一、高津章子、Quantification of phosphorus in DNA using capillary electro-phoresis hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry、JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A、査読有、Vol. 1217(50)、2010、7921-7925
DOI: 10.1016/j.chroma.2010.10.066

[学会発表] (計 7 件)

- ① 藤井紳一郎、核酸分子の微量定量法および質量分析法を用いた ATP 放射線障害の分析、第 461 回基礎科学セミナー、2012 年 1 月 10 日、茨城県、日本原子力研究開発機構
- ② 藤井紳一郎、稲垣和三、千葉光一、高津章子、DNA Analysis by Using Capillary Gel Electrophoresis Hyphenated with ICP-MS、2011 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry、2011 年 2 月 3 日、Zaragoza, Spain
- ③ 藤井紳一郎、稲垣和三、千葉光一、高津章子、微量試料導入系を用いた CE-誘導結合プラズマ質量分析装置による核酸の分析、第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、2010 年 11 月 17 日、岐阜県岐阜市
- ④ 藤井紳一郎、稲垣和三、千葉光一、高津章子、分子内リンを指標としたキャピラリー電気泳動-ICP-MS による DNA 定量技術の開発、日本分析化学会第 59 年会、2010 年 9 月 15 日、宮城県仙台市

- ⑤藤井紳一郎、稲垣和三、千葉光一、高津章子、Determination of Phosphorus Content in DNA Using Capillary Electrophoresis Hyphenated with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry、Microscale Bioseparations (MSB) 2010、2010年3月22日、Prague, Czech
- ⑥稲垣和三、高機能試料導入系が切り開く ICP-MS の新展開、第6回茨城地区分析技術交流会、2009年12月4日、那珂、茨城
- ⑦稲垣和三、微少試料導入系が切り開く LC-ICP-MS の新展開、第222回液体クロマトグラフィー研究懇談会、2009年6月23日、神田、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高津 章子 (TAKATSU AKIKO)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究科長
研究者番号：10357361

(2) 研究分担者

稲垣 和三 (INAGAKI KAZUMI)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究室付
研究者番号：50356490

藤井 紳一郎 (FUJII SHIN-ICHIRO)
独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・研究員
研究者番号：10415739