

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 4日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750069

研究課題名（和文） ナノ粒子を利用した生体試料のマイクロチップ電気泳動-質量分析法の開発

研究課題名（英文） Development of Microchip Electrophoresis-Mass Spectrometry Analysis of Biomolecules Using Nanoparticles

研究代表者

北川 文彦 (KITAGAWA FUMIHIKO)

弘前大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：20362452

研究成果の概要（和文）：新規なキラル固定相として、有機ナノ結晶を表面に固定化したキャピラリーおよびマイクロチップを作製し、電気泳動分析へ応用した。エマルション法により結晶化したシンコニジンを固定相に用いることで、アミノ酸類の良好なキラル分離および質量分析検出への適用に成功した。一方、酸化チタンナノ微粒子によるリン酸化ペプチドのオンライン濃縮-電気泳動分離法の開発についても検討を行い、酸化チタンナノ微粒子分散液を部分的に注入することで、アデノシン三リン酸やリン酸化ペプチドの濃縮に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study, nanoparticles were applied to capillary electrophoresis (CE) and capillary electrochromatography (CEC) analysis of enantiomers and phosphopeptides, respectively. For the CEC analysis of enantiomers, cinchonidine (CCND) nanocrystals were prepared by an emulsion method to immobilize onto the inner surface of fused silica capillaries and microchips. By using the CCND nanocrystals stationary phase, the CEC enantioseparations of racemic amino acids were successfully achieved. In the CE analysis of phosphopeptides, on the other hand, an on-line preconcentration technique using partially injected titania nanoparticles was developed to improve the detection sensitivity. By injecting a short plug of the titania dispersion into the separation column, ATP and phosphopeptide released from β -casein were well concentrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：マイクロチップ電気泳動，質量分析，有機ナノ結晶，酸化チタンナノ粒子，キラル分離，リン酸化ペプチド

1. 研究開始当初の背景

(1) 有機ナノ結晶修飾チップの開発

近年のオミクス分析の進展に伴い、高速に分離した試料を質量分析 (MS) 検出により分析するシステムの構築が求められており、分離の手段としてのマイクロチップ電気泳

動 (MCE) とエレクトロスプレーイオン化 (ESI)-MS 検出との結合が期待されている。しかしながら、MCE-ESI-MS の開発は 1990 年代の終わりから今世紀初頭にかけて活発になされてきたものの、最近では報告例が減少傾向にあり、応用分野の進展もあまり進んで

いない。これは MCE-MS におけるイオン化のインターフェースの作製が困難であることや検出感度が低いことに加え、微小な分離カラムの作製が困難なことによるものである。特に光学異性体の MCE-MS 分析に関しては、キラル分離カラムを適用した例はほぼ皆無であり、早急な開発が望まれる。

MCE によるキラル分析においては、分離モードとして動電クロマトグラフィーが主に利用されているが、硫酸化シクロデキストリンなどの不揮発性の擬似固定相が検出を妨害するために、MCE-MS への適用は不向きである。また、分離流路にキラル固定相を充填する方法も考えられるが、均一に充填することが難しい。したがって、MCE-MS によるキラル分析においては、表面をキラル固定相で修飾した分離流路を用いる中空型マイクロチップ電気クロマトグラフィー (OT-MCEC) の適用が最も有効である。しかし、OT-MCEC では十分な固定相量が得られずに分離が不十分となることが予想されるうえに、キラルセクターを流路表面に結合させるために適当な官能基を導入する必要があり、煩雑な合成操作が必要となる。以上の背景より、修飾操作が簡便で高い固定相量を有するキラル OT-MCEC チップの開発が望まれている。

(2) 酸化チタン微粒子を用いるオンライン試料濃縮法の開発

MCE-MS による生体試料分析においては高感度化が重要なテーマである。これまでに高感度分析を目指して様々なアプローチがなされてきたが、MCE-MS に適した手法の開発は立ち後れているのが現状である。特に簡便な操作で高感度化が可能なオンライン試料濃縮技術の開発が注目されているものの、MCE-MS に適した試料選択的かつ効率のよい濃縮の実現には至っていない。特に選択的な濃縮技術については、従来の固相抽出カラムの利用に頼らざるを得ないのが現状であり、MCE との結合には不向きである。例えば、リン酸化ペプチドの分析においては、非リン酸化ペプチドとの分離および濃縮のためにチタニアカラムによる固相抽出が不可欠であり、微量な生体試料を分析する際にはハンドリングの点で問題となる。したがって、微量な生体試料をオンラインで固相抽出してから MCE 分離・MS 検出を行うシステムを開発できれば、痕跡量の生体物質を選択的かつ高感度に分析することが可能になると期待される。

2. 研究の目的

(1) 有機ナノ結晶修飾チップの開発

本研究では有機ナノ結晶を表面に修飾した分離チャンネルを有するマイクロチップを

開発し、光学異性体の OT-MCEC 分離-ESI-MS 検出システムによる光学異性体分析の実現を目的とした。

(2) 酸化チタン微粒子を用いるオンライン試料濃縮法の開発

酸化チタンナノ微粒子を用いるリン酸化ペプチドの選択的なオンライン試料濃縮法を開発し、MCE-ESI-MS 分析に適用することで、高感度かつ高速なリン酸化修飾解析システムの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 有機ナノ結晶修飾チップの開発

本研究では、疎水性が高いために電気泳動分析への適用が困難なキラルセクターであるシンコナルカロイド類に着目し、ナノ結晶化したアルカロイドをチャンネル表面に修飾した OT-MCEC-ESI-MS 分析用マイクロチップを開発することで、質量情報の取得が可能な高速キラル分析システムの構築を目指した。

マイクロチャンネルの表面をナノ結晶化したキラルセクターで修飾すると、①表面積の大きなナノ結晶により十分な固定相量が得られ、②高いゼータ電位の発生によりナノ結晶を静電的に表面に固定化でき、③広範な試料に適用できるうえに高いキラル分離性能を有するにもかかわらず、高い疎水性のために利用が制限されてきたアルカロイド類を MCE-MS 分析へ適用できるようになると期待される。キラルセクターのナノ結晶化およびマイクロチャンネル内への固定化法を開発し、ナノ結晶修飾 OT-MCEC-ESI-MS の基礎的検討を行った。

(2) 酸化チタン微粒子を用いるオンライン試料濃縮法の開発

本研究においては、酸化チタンナノ微粒子を用いるリン酸化ペプチドの選択的なオンライン試料濃縮法を開発し、MCE-ESI-MS 分析に適用することで、高速かつ高感度なリン酸化修飾解析システムの実現を目指した。酸化チタンは酸性溶液中においてリン酸基と特異的に錯形成することが知られており、リン酸化ペプチドの固相抽出などに利用されている。したがって、アルカリ性泳動液を満たしたマイクロチャンネル内に対し、酸性溶液に分散した酸化チタンを注入した後、リン酸化ペプチド溶液を長いプラグとして注入すると、試料分子は酸化チタン粒子表面に固相抽出され、細いプラグへと濃縮されると予想される (図 1)。電圧を印加し続けると、泳動液により酸化チタン分散液の pH が上昇するため、濃縮されたリン酸化ペプチドは酸化チタン表面から溶出され、MCE-MS により分離検出できると期待される。本法の特徴として、

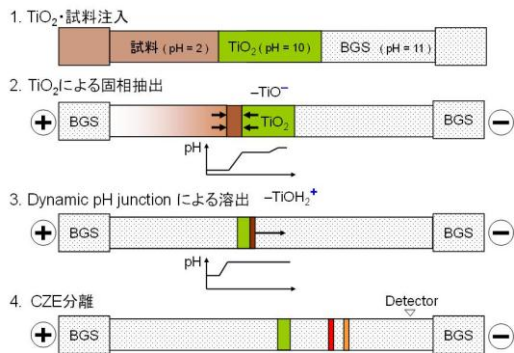


図1 オンライン試料濃縮の原理

リン酸化ペプチドはナノ粒子ゾーンを必ず追い越してから検出部に到達するために酸化チタンによるMS検出の妨害を防げる点が挙げられ、酸化チタン分散液を注入するだけで高感度化が達成できるうえに、分離溶液の入替や電圧の切替操作なしに分離カラム内で固相抽出と溶離を連続的に行えるものと期待される。分析条件の最適化および濃縮機構の解明を通して、リン酸化ペプチド分離の高性能化と高感度化を目指した。

4. 研究成果

(1) 有機ナノ結晶修飾チップの開発

有機ナノ結晶修飾 MCE チップの作製を目指し、キラルセクターとなるシンコナルカロイド類のナノ結晶化について検討を行った。有機ナノ結晶の作製法としまして、再沈殿法、マイクロ波照射法、エマルジョン法などが報告されており、はじめに最も容易な操作で結晶化が可能な再沈殿法を適用した。60°C の水に対し、攪拌下で シンコニジン (CCND) のアセトニトリル溶液をマイクロシリンジで滴下し、室温まで冷却して、結晶を調製した。その結果、調製直後には乳白色の均一な分散液が得られたものの、すぐに凝集が進行し、キャピラリーへの通液は難しいことがわかった。そこで、安定なナノ結晶分散液が得られるエマルジョン法の適用について検討を行った。エマルジョン法においては、60°C の水に対し、20 mM CCND のトルエン溶液をマイクロシリンジで少量ずつ滴

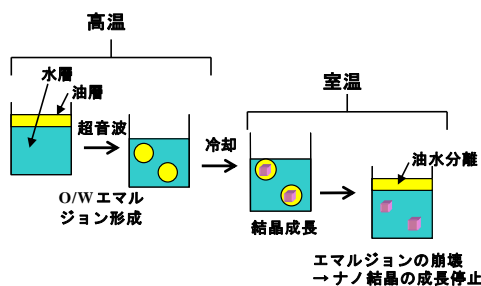


図2 エマルジョン法によるナノ結晶化

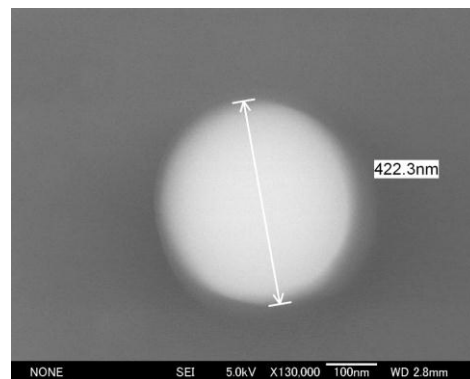


図3 CCND ナノ結晶のSEM像

下し、20 分間超音波処理を行うことで、エマルジョンを調製した (図 2)。このエマルジョンを室温まで冷却すると、エマルジョンの崩壊とともにナノ結晶が生成し、乳白色の均一な分散液が得られた。100 時間静置しても凝集・沈降は認められず、非常に安定な分散液の調製に成功した。得られた分散液中には直径 400~600 nm の結晶が観測されたことから、CCND ナノ結晶が作製できたことを確認した (図 3)。

そこで得られたナノ結晶の表面固定化について検討を行った。フューズドシリカキャピラリーにカチオン性ポリマーであるポリジアリルジメチルアンモニウム (PDDAC) を通液して、表面を正に帯電させた後、負に帯電しているナノ結晶分散液を通液して、ナノ結晶を固定化した。PDDAC 修飾キャピラリーで観測された陽極向きの EOF がナノ結晶の修飾により反転したことから、負のゼータ電位を有する CCND がキャピラリー内表面に固定化されたことが確認された。

このシンコニジンナノ結晶修飾キャピラリーを用いて、*N*-(3,5-ジニトロベンゾイル)-ロイシン (DNB-Leu) およびフェニルアラニン (Phe) の光学異性体分析を行ったところ、pH 5~6 の泳動液を用いると良好なキラル分離が達成された。また、Phe の分析において、測定温度を 15°C から 35°C まで変化させたところ、15°C で最も高い分離度が得られた (図 4)。このことは、温度が低下すると、分離係数に対するエンタルピーの寄与が大きくなり、分離度が増加するという報告にも合致する。なお、キラル CEC 分析の検出時間の RSD ($n = 5$) は 7% 以下となったことから、有機ナノ結晶の静電的な表面修飾により、安定な固定相が得られることもわかった。

以上の検討より、CCND をナノ結晶化しても、キラル認識能が失われておらず、本手法をマイクロチップに適用することで、キラル MCE-MS 分析の高性能化が期待された。そこで有機ナノ結晶修飾 MCE チップの作製を目指して、キラルセクターとなるシンコナルカロイド類ナノ結晶のチャンネル内固定化

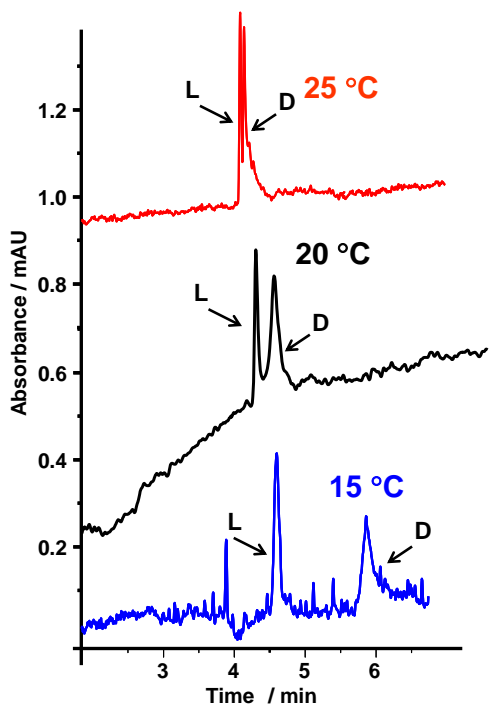


図4 CCNDナノ結晶修飾キャピラリーにおけるPheの光学異性体分離

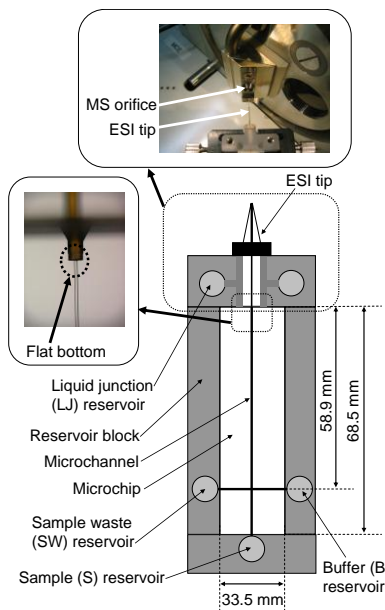


図5 MCE-MS用石英製チップ

について検討を行った。流路幅 $50\ \mu\text{m}$ のチャンネル末端部に先細キャピラリーナノスプレー (外径 $365\ \mu\text{m}$, 先端径 $10\ \mu\text{m}$) の接続口を有する石英製チップに対し、一般的な熔融石英キャピラリーを接続し、キャピラリー側から 7.5% PDDAC / Tris-HCl buffer (pH 8.0) 修飾溶液を通液することでチャンネル表面を正に荷電させた後、CCND ナノ結晶分散液を通液すると比較的安定な修飾層が得られた。

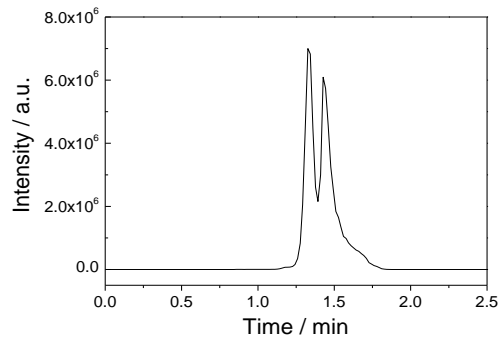


図6 CCNDナノ結晶修飾マイクロチップにおけるPheのMSクロマトグラム

この CCND ナノ結晶修飾石英チップにおいて、ピンチドインジェクション法を用いて MCE 分析したところ、FITC 修飾した Phe がキラル分離される様子が蛍光検出により観測された。そこで MCE-MS 測定への応用について検討したところ、図6に示すエレクトロクロマトグラムが得られ、キラル分離した Phe 光学異性体由来の MS シグナルの検出に成功した。しかしながら、修飾表面における電気浸透流速、すなわちナノ結晶の固定量の再現性に難を残しており、より安定で粒子径分布の狭いナノ結晶分散液の調製法や、修飾手順のさらなる改善が望まれる。

本法により、水に難溶性のためにこれまで MCE に適用が困難であったキラルセクターをナノ結晶化することで、簡便な操作でのキラル固定相の作製が可能となった。キラルセクターをナノ結晶化しても光学認識能が失われないことを示した点で画期的であり、MCE-MS 分析における新規キラル固定相としてのさらなる発展が期待される。

(2) 酸化チタン微粒子を用いるオンライン試料濃縮法の開発

TiO_2 ナノ微粒子によるリン酸化ペプチドのオンライン濃縮法の開発にあたり、モデル試料として adenosine triphosphate (ATP) を使い、ナノ粒子による固相抽出について検討した。10 ppm ATP の trifluoroacetic acid (TFA) 溶液に対して、分散濃度 0.05 ppm となるように TiO_2 ナノ粒子 (粒径 25 nm) を添加し、一定時間放置した後、 TiO_2 ナノ粒子を除去した。このときの吸収スペクトルを測定すると、 TiO_2 の添加により ATP の吸光度が大きく減少し、濾液中の ATP 濃度はほぼゼロとなった。したがって、リン酸化化合物が酸性条件下において TiO_2 ナノ粒子の表面に強く保持されることが確認された。

そこで、オンライン試料濃縮について検討を行った。泳動液 (BGS) には 0.1% アンモニウム水溶液 (pH 11.1) を用いた。 TiO_2 粉末を 0.01% アンモニウム水溶液 (pH 10.1) に超音波処理により分散し、1% TiO_2 分散液を得た。

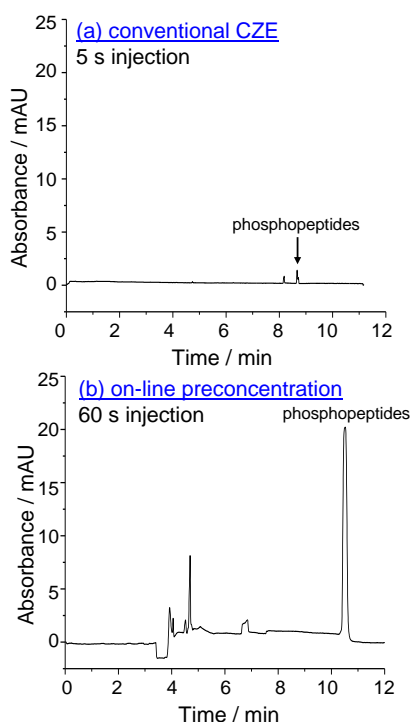


図7 TiO₂ナノ粒子によるリン酸化ペプチドのオンライン試料濃縮

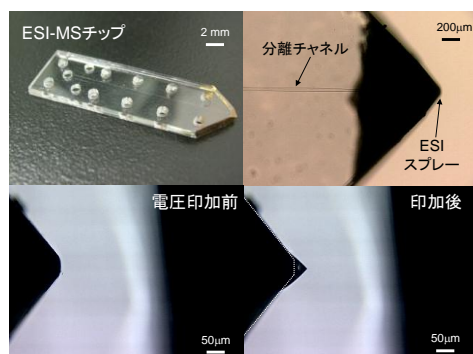


図8 MCE-MS用COP製チップ

ATP および β -casein 由来のリン酸化ペプチドを TFA (pH 2.3) に溶解し、試料とした。BGS を満たしたキャピラリーに、TiO₂分散液を 30 秒間注入した後、試料を 60 秒間注入した。その結果、ATP ならびにリン酸化ペプチドの鋭いピークが検出された。一般的な CE 分析と比較すると、ATP ではピーク高さが 10–40 倍に、リン酸化ペプチドでは 20 倍に増大していることが確認された (図 7)。また、リン酸化ペプチドのピーク高さを注入時間に対してプロットしたところ、注入時間が 15 秒から 60 秒ではピーク高さが徐々に増加し、60 秒以上で一定になることがわかり、キャピラリー内において、固相抽出と溶離が連続的に進行していることが示唆された。

そこで MCE-MS 分析への適用を目指し、

流路幅 50 μm のクロス型チャンネルと分離チャンネル終端部に MS ナノスプレーを有するシクロオレフィンポリマー (COP) 製チップ (図 8) を用いて、ダブルゲートインジェクション法による TiO₂ 分散液とフルオレセイン修飾 ATP 試料溶液の連続注入について検討した。デキストラン硫酸で表面修飾し、速い電気浸透流が発生するようにしたチップにおいて 3 箇所への注入口およびナノスプレー部に印加する電圧の制御により、分離流路内に TiO₂ 分散液と ATP 試料溶液が部分的かつ連続的に注入される様子が蛍光測定から観測され、濃縮された試料ゾーンの蛍光検出に成功した。そこで MCE-MS 測定への応用について検討したところ、リン酸化ペプチドの濃縮は達成されなかった。これは、MS 部の陰圧の影響を受け、TiO₂ ゾーンおよび試料ゾーンがともに広がってしまうことが原因と考えられる。したがって、陰圧の影響を排除しやすい長流路チップを適用することで、高感度かつ高性能なリン酸化ペプチド分析システムの構築が期待される。

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 5 件)

① Kitagawa, F.; Kawai, T.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: Recent Progress of On-line Sample Preconcentration Techniques in Microchip Electrophoresis, *Anal. Sci.* **2012**, 28, 85–93. (査読あり)

② Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Recent progress in capillary electrophoretic analysis of amino acid enantiomers, *J. Chromatogr. B* **2011**, 879, 3078–3095. (査読あり)

③ Kitagawa, F.; Otsuka, K.: Recent progress in microchip electrophoresis–mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 55, 668–678. (査読あり)

④ 北川文彦, 篠原秀敏, 水野潤, 大塚浩二, 庄子習一: ナノスプレー一体型ポリマー製マイクロチップにおける電気泳動分離–質量分析検出, *電気学会論文誌E* **2010**, 130-E(8), 351–355. (査読あり)

⑤ Kitagawa, F.; Kubota, K.; Sueyoshi, K.; Otsuka, K.: One-step Preparation of Amino-PEG modified Poly(methyl methacrylate) Microchips for Electrophoretic Separation of Biomolecules, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, 53, 1272–1277. (査読あり)

[学会発表] (計 8 件)

① 北川文彦: ミクロスケール電気泳動における高感度化技法の開発, 第 18 回クロマトグ

ラフォーシンポジウム, 福岡大学, 福岡,
2011年6月2-4日.

② Fumihiko Kitagawa: Application of nanoparticles to capillary electrophoresis, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011), Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan; 22-26 May 2011.

③ Asako Matsuo: Selective on-line preconcentration of phosphopeptides by partially injected titania nanoparticles in capillary electrophoresis, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), 15-20 December 2010, Honolulu, HI, USA.

④ 北川文彦: 高性能ミクロスケール電気泳動分析システムの開発, 日本分析化学会第59年会, 2010年9月15-17日, 東北大学川内キャンパス, 仙台.

⑤ Koji Otsuka: Enantioseparations by capillary electrophoresis using organic nanocrystals, 22nd International Symposium on Chirality (Chirality 2010; ISCD-22), 12-15 July 2010, Sapporo Convention Center, Sapporo.

⑥ 北川文彦: 有機ナノ結晶を用いる電気泳動分析 (7), モレキュラー・キラリティ 2010, 2010年7月11-12日, 札幌コンベンションセンター, 札幌.

⑦ 北川文彦: 有機ナノ結晶を用いる電気泳動分析 (6), 第17回クロマトグラフィーシンポジウム, 2010年6月3-5日, 広島県情報プラザ, 広島.

⑧ 北川文彦: 有機ナノ結晶を用いる電気泳動分析 (5), 第71回分析化学討論会, 2010年5月15-16日, 島根大学松江キャンパス, 松江.

[図書] (計 1 件)

① 北川文彦, 大塚浩二: 電気泳動分析 (分析化学実技シリーズ・機器分析編 11), 共立出版, 東京, 2010, pp.1-201.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 文彦 (KITAGAWA FUMIHIKO)
弘前大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号: 20362452

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし