

論文の内容の要旨

論文題目 逆相 LC/ICP-MS の開発による有機化合物の高感度元素特異的検出と
金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析

氏名 岩畑 大悟

序章

バイオロジーを含むサイエンス一般において、高感度で選択的な分析法は研究の基盤として最も重要な要素の 1 つである。例えば代表的な生体内代謝物であるアミノ酸は、タンパク質を構成する栄養素や代謝反応の制御物質、神経伝達物質としての役割等、重要な機能を有しており、生体内の濃度を測定する意義が非常に高い。このため、1958 年に Rockefeller 研究所の Moore と Stein が液体クロマトグラフィー (LC) とニンヒドリン発色法を組み合わせた全自動アミノ酸分析装置を開発すると、食品、飼料、医薬など様々な分野で使われ、科学の発展に大きく貢献してきた。更に、より高感度な分析法として蛍光検出法や、質量分析装置 (MS) と組み合わせたプレカラム誘導体化 LC/MS/MS 法が開発され、1 pmol 以上含まれる殆どのアミノ酸を一度に定量する事が可能となった。

ところが最近の生命科学研究では、10 μ L 以下の微量かつ 1 nmol/L 以下の低濃度での正確な分析が求められている。例えば、ヒト疾患モデルとして使われるショウジョウバエは体液量が約 1 μ L のため、体内の遊離アミノ酸量は数 nmol 以下と推定され、HPLC 蛍光分析法等では検出ができない。また最近注目されているヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を含む幹細胞研究では、96 ウェルプレートによる小スケール実験が必要になっているが、この分析には 1 fmol 以下の超高感度分析法が必要であり、新しい高感度かつ選択的な分析法が望まれている。そこで本研究では、最も高感度な検出法の 1 つであるが、主に無機化合物の分析に使われる誘導結合プラズマ質量分析装置 (Inductively coupled plasma mass spectrometer: ICP-MS) に着目し、新たに試料導入インターフェイスや金属タグ化試薬を開発することで、リン脂質を 30 fmol から高感度かつ元素特異的に検出でき、更にアミノ酸の検出限界が 50 amol という高感度かつ選択的な分析法を開発した。そして開発した分析法を用い、アルブミン抽出液中のリン化合物や、iPS 細胞およびショウジョウバエ中の遊離アミノ酸の定量分析を行った。

第一章 逆相 LC/ICP-MS の開発による有機化合物の高感度元素特異的検出法の開発

多成分の有機化合物を含む微量試料の分析には高い分離能と感度が必要である。そのためには、高分離能の逆相 LC で物質を分離した後、高感度な ICP-MS で化合物を検出する装置が最適である。しかし ICP-MS は導入できる溶媒に制限があり、特に逆相 LC で使うアセトニトリルやメタノールの使用が困難である。そこで逆相 LC と ICP-MS を連結する試料導入インターフェイスの開発を行った。

試料導入インターフェイスは、移動相を噴霧して液滴にするネブライザと、液滴の選別を行う気化室から構成される。その後、移動相はアルゴンプラズマにて燃焼/イオン化され、分析対象が質量検出器で検出される。ICP-MS への有機溶媒導入を困難にする主な理由には、①高い蒸気圧によるプラズマの消灯、②インピーダンス差によるプラズマの不安定化、③発生する煤による流路詰まりの3点が挙げられる。これらの課題を解決するため、低流速型ネブライザによる有機溶媒量の削減と有機溶媒導入時における気化室容積の最適化を行った。

まずネブライザの低流速化のため、試料管内にフューズドシリカキャピラリーを挿入し、試料管内径の細径化を図った。これにより試料管内での拡散を防止しつつ、移動相流速が 400 μ L/min から 50 μ L/min に低下し、有機溶媒量が削減された。またキャピラリー先端を可動式にしてアルゴンガスとの混合距離を最適化し、微細液滴の生成効率を向上させた。開発した低流速型ネブライザは、アセトニトリル(アセトニトリル/水 : 99/1 = v/v) 導入時の検出感度が Li は 10 pmol/L、Tl は 0.5 pmol/L であり、水溶液導入時も、既存ネブライザの検出感度を 10 倍から 25 倍上回った。

次に容積が 8、25、75、100 mL の各気化室を用い、有機溶媒導入時のプラズマ安定性を調査した。その結果、8~100 mL の間で容積と流速に逆相関があることが明らかになった。そして容積が 8 mL の気化室では、低流速型ネブライザの最適流速である 50 μ L/min で、アセトニトリル、メタノール、エタノールが全て導入可能であった。そこで流速 10~150 μ L/min で有機溶媒が導入可能な新規インターフェイスを設計/作製した。

続いて作製したインターフェイスを使って逆相 LC と ICP-MS を連結し、有機化合物の高感度元素特異的検出を行った。

血清アルブミンは血漿タンパク質の約 60 %を占め、生体中で脂肪酸やホルモン、ミネラル等と結合して運搬する重要な物質である。そこでアルブミンをメタノールで抽出し、移動相に 5 mM ギ酸アンモニウム水溶液と、5 mM ギ酸アセトニトリル溶液を用いた逆相 LC/ICP-MS でリンを検出した。その結果、抽出液中に 6 種類以上のリン化合物を特異的に検出した。検出限界は 30 fmol で、既存の LC/MS/MS に比べて 10 倍向上した。また親水性化合物である含硫アミノ酸は、AccQ・Tag で誘導体化後に逆相 LC/ICP-MS でイオウを検出し、システインとメチオニンを 1 pmol の検出限界で測定可能になった。

第二章 金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法の開発

最新のプレカラム誘導体化 LC/MS/MS 法の検出限界は 10 fmol と非常に高感度である。しかし、iPS 細胞をはじめとする細胞培養実験では、96 ウェルプレート程度の小スケール培養が必須であり、その細胞数は $1\sim 3\times 10^4$ 個程度であるため、1 fmol 以上の高感度分析法が必要である。そこで開発した逆相 LC/ICP-MS 法と誘導体化試薬(金属タグ化試薬)を組み合わせ、アミノ酸分析の高感度化を試みた。

AccQ・Tag を使った逆相 LC/ICP-MS による含硫アミノ酸分析は、ICP-MS によるイオウの検出感度が低いため検出限界は 1pmol であった。このため高感度検出が可能な新しい金属タグ化試薬を設計した。金属タグ化試薬は、①迅速にアミノ基と反応する反応基、②ICP-MS での検出が高感度かつ生体内濃度が低い金属、③適度な疎水性の付加と金属の安定化を行うキレート骨格から構成される。そこで、アミノ基と迅速に反応する *N*-succinimidyl ester と、ICP-MS で高感度に検出でき、生体中に殆んど存在しないルテニウム (Ru) を含み、強固な疎水性キレートを形成する新規化合物 (Bis(ethylenediamine)-4'-methyl-4-carboxybipyridine-ruthenium *N*-succinimidyl ester (=ECRS)) をデザイン/合成した。

開発した金属タグ化試薬はホウ酸緩衝液中でアミノ酸と定量的に反応し、各金属タグ化アミノ酸は逆相 LC/ICP-MS で分離/検出された。金属タグ化試薬とアミノ酸の反応は、金属タグ化ロイシンの分子イオンが QTOF LC/MS で $m/z = 547.1812$ に観測され、Exact mass ($m/z = 547.1839$) と一致したことで確認された。検出限界は $m/z = 102$ (Ru) を検出し、アミノ酸量で 50 amol であった。また検量線の直線性から、定量範囲は 200 amol から 7 pmol であった。

第三章 iPS 細胞およびショウジョウバエ中の遊離アミノ酸分析

開発した金属タグ化試薬を使った高感度アミノ酸分析法を用いて、iPS 細胞とショウジョウバエ中の遊離アミノ酸の定量分析を行った。iPS 細胞は①あらゆる組織を得ることが可能な万能性、②均質な細胞を大量に得ることが可能な利便性、③倫理的な問題を生じない社会性の観点から、現在、幹細胞による再生医療で最も現実的だと考えられている。そして、ショウジョウバエは全ゲノムが解読され、多様なノックアウト体によるヒト疾患モデルが数多く存在する重要なモデル生物である。

微量な iPS 細胞中のアミノ酸を分析するため、96 ウェルプレート相当の培養液 (30 μ L) から 3×10^4 個の細胞を回収し、遊離アミノ酸をアセトニトリル/水混合溶液 (80/20 = v/v) で抽出した。また培養液中の線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を除き、分化させたモデル分化細胞を作成して未分化の iPS 細胞とともに遊離アミノ酸量を測定した。未分化細胞と分化細胞を比較すると、Ala, Pro, Lys, Arg は未分化細胞に多く、Val, Leu, Ile, Thr, Met, Phe, Tyr, Asp, Glu は分化細胞に多かった。

またショウジョウバエについて、ピルビン酸および 2-オキソグルタル酸脱水素酵素活性が低下する *lipT2* 変異体に注目し、野生型と遊離アミノ酸量を比較した。ショウジョウバエは 1 個体ずつ約 1 μ L 相当の体液をアセトニトリル/水混合溶液 (50/50 = v/v) で回収して測定した。野生型と *lipT2* 変異体を比較すると、Gly, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg は変異体で少なかった。

終章

本研究では、有機溶媒が導入できる ICP-MS 用の試料導入インターフェイスを開発し、高感度元素特異的な分析が可能な逆相 LC/ICP-MS 法を構築した。また新規に金属タグ化試薬を開発し、逆相 LC/ICP-MS と併用することでアミノ酸の検出限界が 50 amol になった。これは既存のアミノ酸分析法で最も検出感度が高いプレカラム誘導体化 LC/MS/MS 法の約 20~5,000 倍、汎用的なニンヒドリン発色法によるアミノ酸アナライザの約 1,000,000 倍であった。

開発した分析法により、リン脂質の検出感度がLC/MS/MSよりも10倍向上し、アルブミン抽出液中のリン化合物を高感度かつ特異的に検出する事ができた。また iPS 細胞中の遊離アミノ酸分析では、96 ウェルプレート相当の細胞数(細胞数: 3×10^4 個)で未分化細胞と分化細胞のアミノ酸バランスを比較し、Pro 等で有意な変化が発見できた。ショウジョウバエ中の遊離アミノ酸分析では、*lipT2* 変異体は TCA サイクルのピルビン酸下流で代謝される Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys と、2-オキソグルタル酸下流で代謝される Val, Ile, Met, Phe, Tyr が、野生型よりも減少している事が明らかとなった。

本研究は、無機化合物の分析装置を有機化合物の分析に用いるというアイデアによって、高感度元素特異的な新しい分析法を開発することができた。金属タグ化試薬はアミノ酸分析用にデザインしたが、本分析法はアミノ酸に限らず、分析条件や金属タグ化試薬の変更によって、誘導体化可能な官能基を持つ全ての有機化合物に適用できる拡張性を持っている。また ICP-MS の濃度検出限界は磁場型の高感度装置では 1 ppq (10 fmol/L) であり、更に高感度化が期待できる。このため本分析法を発展させることで、代謝物解析や未知化合物の探索など幅広く生化学の発展に貢献できると考える。