

親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー質量分析法の特性理解と機能拡張

池田, 和輝

<https://hdl.handle.net/2324/7182325>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (工学) , 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 池田 和輝

論文名 : 親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー質量分析法
の特性理解と機能拡張

区 分 : 甲

論文内容の要旨

生体分子の総体を解析する学問であるオミクス研究の中で、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスについては、近年の測定技術の進歩によりスループットと深度が大幅に向上した。一方、物理・化学的性質が多様な代謝物を測定対象とするメタボロミクスは、複数の液体クロマトグラフィー質量分析法 (liquid chromatography mass spectrometry, LC/MS) を組み合わせることで従来よりも包括的な計測ができるようになった。しかし、他のオミクスで達成されたスループットや網羅性に比べると未だ低い水準にとどまっている。今後、希少な試料や大規模な検体を用いたメタボロミクス研究を推進していくためには、単一分析で包括性の高い新たなメタボローム分析法の開発が急務である。申請者が所属するメタボロミクス分野では、極性代謝物の包括的測定を目的とした、親水性相互作用/陰イオン交換クロマトグラフィー質量分析法 (unified-hydrophilic interaction/anion exchange liquid chromatography mass spectrometry, unified-HILIC/AEX/MS) を昨年度発表した (Nakatani K et al, *Anal. Chem.*, 2022)。本手法は異なる電荷特性 (陽イオン性, 両性イオン性, 陰イオン性) をもつ幅広い極性代謝物に対して、ポリマーゲルに 1-4 級アミンを修飾した特殊な固定相と 2 つの移動相を用いて HILIC モードと AEX モードを連続的かつ段階的に作用させることに成功した。当該分野では画期的なクロマト分離・検出技術であった。Unified-HILIC/AEX/MS は、95%のアセトニトリル移動相条件から 40 mM の重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 9.8) へと置換していくことで移動相の親水性と塩濃度を変更する。その結果、従来技術では達成できなかった陽イオン性, 非荷電, 両性イオン性, 陰イオン性の極性代謝物の一斉分析を可能にした。しかし、本分析法における固定相や移動相の詳細な最適化には未だ課題が残されており、汎用的なメタボローム分析法として認知されるためには検出感度および網羅性のさらなる向上が必要であった。

第二章では、unified-HILIC/AEX/MS 法における移動相と固定相条件の重要性、並びに検出感度低下の要因を明らかにすることを目的とした。比較検証のために、単一メタボローム分析の目的で開発された既報の移動相条件と unified-HILIC/AEX/MS で用いた移動相条件を比較した。また、耐アルカリ性ポリマー基材に対して級数の異なるアミノ基を修飾した 2 種のカラム (Gelpack GL-HilicAex, 第 1-4 級アミン修飾ポリグリセロールジメタクリレートゲル, Asahipak NH2P-50 2D, 第 2 級アミン修飾ポリビニルアルコールゲル) を比較し、保持挙動とクロマト分離性能を評価した。その結果、unified-HILIC/AEX/MS の 2 段階分離・保持機構に必要な要素、特に、アセトニトリルから水へのグラジエントと、40 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 9.8) を用いたアイソクラティック溶出による AEX の移動相条件が、当該クロマト分離機構に必須であることを再確認した。さらに、耐アルカリ性親水性ポリマーをアミンで修飾した場合、少なくとも 1 つの 2 級アミンが存在すれば unified-HILIC/AEX 分離が再現できることも明らかにした。さらに、unified-HILIC/AEX/MS の AEX モードにおいて、HILIC モードと比較して検出感度を向上させるいくつかの改善点が考えられた。

具体的には、i) HILIC における水和層形成を維持したまま陰イオン交換容量を低減させた固定相の開発と重炭酸アンモニウム水溶液の濃度低減、ii) カラムブリードの低い固定相開発、が挙げられた。

第三章では観測可能な代謝物のさらなる拡張、すなわち包括的な脂質分子の測定であるリピドーム分析と極性メタボローム分析の同時分析法の開発および前処理法の最適化に取り組んだ。はじめに、リピドームと極性メタボロームの単一同時分析を実現するため、unified-HILIC/AEX の移動相条件を検討した。その結果、初期移動相のアセトニトリル比率を 95% から 99% に高めることで、脂質の部分的な極性構造と相互作用が効果的に働き、分析前半の HILIC モードにおいてリピドームのクロマト分離・MS 検出を達成した。その後、40 mM 重炭酸アンモニウム水溶液 (pH 9.8) の割合を高めたグラジエント溶出を行うことで極性メタボロームのクロマト分離・溶出・MS 検出も問題なく実施できることを見出した。続いて、前処理においては、各種抽出溶媒を用いて、抽出効率・再溶解性の詳細な検討を行った。その結果、イソプロパノールと水を 7:3 の割合で混合した抽出溶媒が最も低極性から高極性までの幅広い脂質・極性代謝物の同時抽出・溶解を達成できることが分かった。実際に HepG2 細胞に APAP を曝露した試料を用いて分析を行ったところ、薬物代謝物、脂質・極性代謝物を含む内生代謝物の一斉検出に成功した。改良された unified-HILIC/AEX/MS 法は、メタボロミクス分野において達成されていなかった真の意味での単一メタボローム分析を達成した。

本博士論文では、unified-HILIC/AEX/MS 法の特性理解とさらなる機能拡張という 2 つの課題を解決するための比較検討と技術開発を行った。今後、本知見に基づいて固定相をさらに改良できれば、リピドームと極性メタボローム分析の網羅性と検出感度がさらに向上し、希少な試料や大規模コホート検体を用いた次世代メタボローム解析への応用が期待できる。