

論文の内容の要旨

論文題目

ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化を利用した液体クロマトグラフ法の開発

氏名 合田 竜弥

<序論>

ポリペプチド(タンパク質及びペプチドの総称として使用)は、発現遺伝子群の最終産物であり、細胞の形態や機能を直接制御している。そのため、癌化等により細胞の形態や機能に変化する過程で、個々のポリペプチドの発現量、翻訳後修飾なども変化する。この変化したポリペプチドを、例えば疾患関連バイオマーカーとして捉えることで、疾患の早期診断や原因解明を目指したプロテオミクス研究が、逆相液体クロマトグラフィー(LC)-質量分析計(MS)を用いて盛んに行われている。その一方で、LC-MSを用いた生体試料中の対象ポリペプチドの高感度定量の報告例は極めて少ない。この主たる要因として、ポリペプチドの容器等に対する吸着が挙げられる。これまで、この吸着を回避するために、アルブミンのようなポリペプチドや界面活性剤の添加が有効であることが示されてきた。しかし、これら添加物の効果を測定対象毎に確認しなければならない一方で、これらのLCへの導入は、カラムの詰まりや劣化を促進すると共に感度低下を引き起こすために、これらを含む試料のLCへの導入量は大きく制限される。そのため、従来報告されているLC-MS法の定量下限はnMレベルであり、一般的に定量下限が数pMである免疫学的手法と比較して千倍程度低い。本研究では、ポリペプチドの容器等に対する吸着を詳細かつ網羅的に評価し、LCへ導入可能な溶液を用いてポリペプチドの容器等に対する吸着を回避できる方策を見出し、そのような試料溶液を大量にLCへ導入することで、pMレベルのポリペプチドを定量可能なLC-MS法の開発を研究目的として設定した。

1. ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化の発見と一般性の確認

低分子化合物の測定においては、アセトニトリル等の有機溶媒を試料溶液へ添加することにより、

低分子化合物の容器等への吸着を回避することが一般的に行われている。まず、LC で汎用される有機溶媒の 1 種であるアセトニトリルと、容器等に対する吸着が強い urocortin (アミノ酸残基数 40、分子量 4696) をモデルポリペプチドとして用い、試料溶液中のアセトニトリルが urocortin の容器等に対する吸着に与える影響を評価した。その結果、試料溶液中のアセトニトリルは、urocortin の容器等に対する吸着を抑制する効果を発揮するために、アセトニトリル含量の増加 (0%~30%) と共に urocortin のピーク面積は増加した。しかし、アセトニトリル含量が 40% 以上の溶液中の urocortin を測定した場合に、カラムに全く保持されない urocortin のピークを発生させた (Fig 1)。同様の現象は、アセトニトリルの代わりにエタノール、メタノール、酢酸及びギ酸を用いた場合や、urocortin の代わりに分子量 1007~45k の 27 種 (urocortin を含む) のポリペプチドを測定した場合にも認められた。

カラムに保持したポリペプチドに加えてカラムに全く保持されないポリペプチドが、共に良好な形状のピークとしてクロマトグラム上に現れる今回の現象は、疎水性固定相と親水性移動相から成る逆相分離での主な相互作用である疎水的相互作用に基づいて説明することは困難である。そこで、カラム充填剤に対するポリペプチドの吸着能がある特定の有機溶媒含量 (臨界含量) を境に急激に変化すると仮定した。複数の有機溶媒を含む溶液中の urocortin を用いた検討から、複数の有機溶媒を含む溶液中のポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能は、単独の有機溶媒が示す臨界値 (X_i) に対する溶液中のその含量 (x_i) の比 (x_i/X_i) の総和 ($f_n = \sum_{i=1}^n x_i/X_i$) で示され、 f_n 値が 1 となる点を臨界値として急激に変化することが示唆された。

2. 臨界値を境としたポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化に基づくポリペプチドの溶出機構

カラムに保持されたポリペプチドのカラムからの溶出機構を評価するために、まず、カラムに保持されたポリペプチドが、カラムから溶出する時の溶離液中の総有機溶媒含量 V_T (%) を、測定時のグラジエント勾配値及びその時得られた保持時間を用いて算出する方法を検討した。その結果、各ポリペプチドは、グラジエント勾配と無関係に特定の有機溶媒含量の溶離液にて溶出されることが示された。この時得られた V_T (%) は、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能を変化させる試料溶液中有機溶媒の臨界含量とほぼ同等の値を示し、また、各ポリペプチドは、 $f_n = 1$ を示す溶離液にて溶出されることが明らかになった。さらに、保持時間とグラジエント勾配との間にはべき乗則が認められた。従って、溶離液中のポリペプチドは、グラジエント溶出法によって形成される有機溶媒勾配を有する溶離液中に存在する臨界値 ($f_n = 1$) を挟んでカラム充填剤に対する吸着能を急激に変化させており、カラム充填剤に対する吸脱離を繰り返すことで、最終的に臨界値 ($f_n = 1$) を示す溶離液中に濃縮されてカ

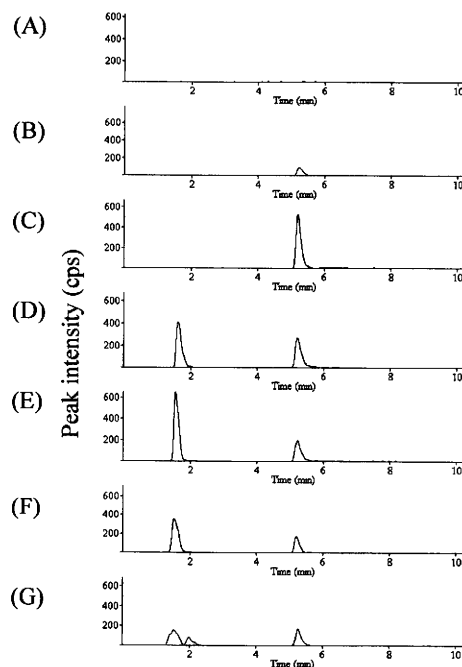


Fig. 1. Mass chromatograms of urocortin prepared in one of the following water-acetonitrile (v/v) solutions containing 4% acetic acid. (A) 10:0, (B) 8:2, (C) 7:3, (D) 6:4, (E) 5:5, (F) 4:6, or (G) 2:8.

ラムから溶出していることが示唆された。

最後に、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化の要因を検証するために、アセトニトリル含量の異なる urocortin 溶液の円偏光二色性スペクトル解析を行った。その結果、ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化は、溶液中のアセトニトリルによって惹起されるポリペプチドの高次構造変化に起因するものであることが示唆された。また、この高次構造変化は可逆的であることも明らかとなった。

3. ポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の変化を利用した LC システムの開発

臨界値を境にしたポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の可逆性を利用することで、容器等に対する吸着を回避できる有機溶媒含量の溶液中のポリペプチド全てを、カラムに保持した 1 本のピークとして溶出できる新規グラジエントシステム(以後、新規 LC システムと略す)を考案した(Fig. 2)。

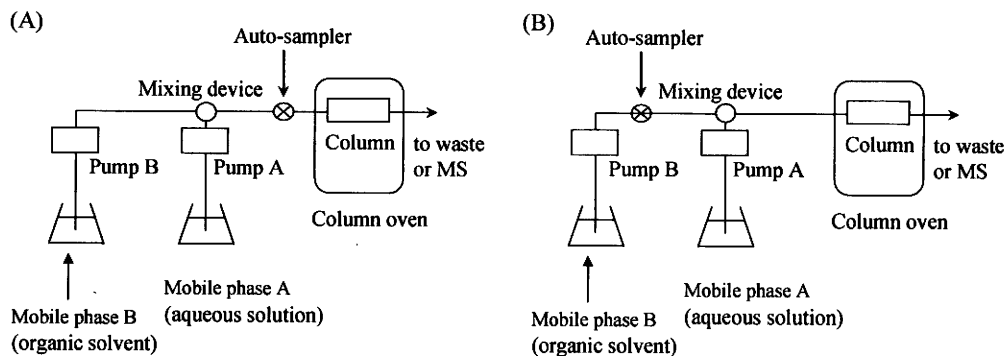


Fig. 2. Flow diagrams of (A) a standard gradient system and (B) a new gradient system

この新規グラジエントシステムでは、導入されたポリペプチド溶液に対して、カラム入口より前で水系移動相を混合させることで、カラムに流入する溶離液中の有機溶媒含量をポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の臨界値 ($f_n = 1$) より小さくすることができる。そのため、有機溶媒含量が $f_n > 1$ を示す溶液中でカラム充填剤に対する吸着能を失っていたポリペプチドでも、カラム入口前の混合により生じる $f_n < 1$ の溶離液中で、カラム充填剤に対する吸着能を瞬時に回復するために、全てカラムへ保持すると考えられた。

実際に、アセトニトリル含量の異なる urocortin 溶液を用いた検討から、適切に設定された新規 LC システムでは、アセトニトリル含量にかかわらず urocortin をカラムに保持した 1 本のピークとして検出できることが明らかになった(Fig. 3)。この新規 LC システムのポリペプチドの高感度定量における性能を、

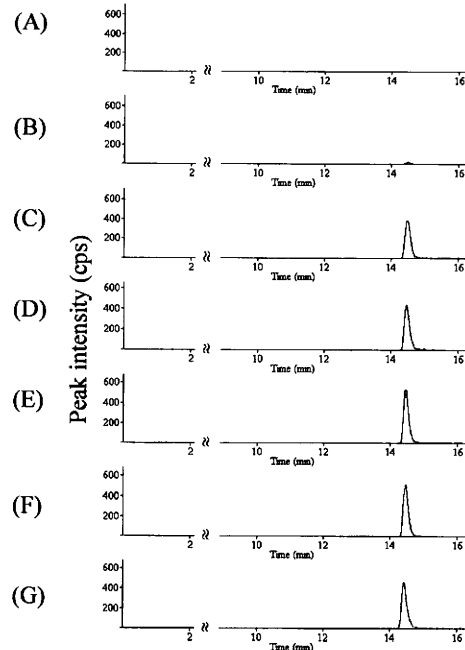


Fig. 3. Mass chromatograms of urocortin prepared in one of the following water-acetonitrile (v/v) solutions containing 4% acetic acid. (A) 10:0, (B) 8:2, (C) 7:3, (D) 6:4, (E) 5:5, (F) 4:6, or (G) 2:8.

従来のグラジエントシステムの性能と比較検討した。その結果、新規 LC システムは、標準 LC システムと比較して、測定精度、試料導入量、定量感度、多成分同時測定の点で極めて優れていることが明らかとなった。この時、ポリペプチドの容器等に対する吸着とポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能は基本的に同質のものであり、同じ臨界含量を示すことが明らかになった。

4. 新規グラジエントシステムを用いたマウス血漿中 amyloid β -protein 同時定量法の開発

新規グラジエントシステムの生体試料への応用例として、マウス血漿中 amyloid β -protein 1-38、1-40、1-42 及び 1-43 fragment (A β) の同時定量法の確立を試みた。

まず、血漿中夾雑ポリペプチドから微量の各 A β を分離可能とする前処理法として、アセトニトリル及びメタノールを用いた血漿除タンパク法を検討した。この時得られた低い回収率から、除タンパク操作時の A β の自己凝集又は A β と他の血漿ポリペプチドとの凝集が示唆された。そこで、有機溶媒添加によって凝集した血漿ポリペプチドを溶解させる方策を検討したところ、酢酸をある一定量以上加えることで血漿ポリペプチドを完全溶解できた。この知見に基づき、分画分子量 10,000 の限外ろ過膜を用いて、血漿ポリペプチドから各 A β を分離回収する前処理法を考案し、その性能を評価した。その結果、最適化された条件下では、全ての A β について 90% 程度の回収率を得ることができた。この時、酢酸は、限外ろ過膜上に保持される夾雑ポリペプチドと各 A β との結合を阻害する効果を有していることも示唆された。

最後に、限外ろ過膜を用いた前処理法及び新規 LC システムを用いたマウス血漿中 A β 同時定量法の再現性を確認した。その結果、0.5~20 nM の濃度範囲で、低分子化合物と同様の基準で再現性よく同時定量可能であることが明らかになった (Table 1)。

Table 1. Accuracy and precision of the method for the simultaneous determination of amyloid β -protein fragments in mouse plasma by the new gradient system

Nominal conc. (nM)	Amyloid β -protein 1-38			Amyloid β -protein 1-40		
	Mean conc. (nM)	Accuracy (%)	CV (%)	Mean conc. (nM)	Accuracy (%)	CV (%)
0.5	0.53	105.6	12.52	0.53	106.0	12.37
1	1.08	107.6	10.19	1.05	104.8	6.66
5	5.35	107.1	5.82	4.75	95.0	6.79
15	15.2	101.1	5.99	13.6	90.6	4.61
Nominal conc. (nM)	Amyloid β -protein 1-42			Amyloid β -protein 1-43		
	Mean conc. (nM)	Accuracy (%)	CV (%)	Mean conc. (nM)	Accuracy (%)	CV (%)
0.5	0.51	102.0	12.63	0.45	89.6	1.87
1	0.94	93.6	3.26	1.00	100.0	12.29
5	4.66	93.2	8.09	4.96	99.2	8.17
15	14.0	93.3	2.52	13.7	91.5	6.17

<総括>

以上、本研究において、有機溶媒によって惹起されるポリペプチドのカラム充填剤に対する吸着能の可逆性を利用した新規 LC システムを開発すると共に、血漿ポリペプチドの溶解及びポリペプチド間の結合に与える酢酸の効果を利用した血漿前処理法を開発した。この新規 LC システムは、標準 LC システムと比較して、測定精度、試料導入量、定量感度、多成分同時測定の点で優れていることから、今後、免疫学的手法に匹敵もしくは凌駕する感度を有する生体試料中ポリペプチドの特異性に優れた LC-MS 高感度定量法の開発が可能であると考えられた。また、本新規 LC システムは、未知ポリペプチドを含めたポリペプチドの網羅的解析においても強力なツールに成り得ると考えられた。