

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬学)	氏名	堀江 勘太
論文題目	高速液体クロマトグラフィーにおける高分離能モノリス型シリカカラムの開発とその応用に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>モノリス型シリカカラムは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) における従来の粒子充填型カラムと比較して高い透過性を有するため、メートル長カラムフォーマットによる高分離能の実現が可能であり、次世代のHPLC用分離媒体として注目を集めてきた。しかし、現在、市場で広く活用されているHPLCカラムの長さは数センチから数十センチであり、1メートルを超えるカラム長での実際の活用例は、その製造及び分析条件設定の困難さに起因して、依然少ない状況にある。本研究では、メートル長モノリス型シリカカラムの有する分離性能を最大限に発現させるため、ピークキャパシティー (PC) を指標とするシミュレーションモデルを確立し、HPLC条件の最適化を行った。メートル長モノリス型シリカカラムによるトリプシン消化ペプチド分離系での検証の結果、PCの最大化が予測された10時間超の長時間グラジエント溶出条件下において分離効率およびペプチド同定数が最大化されることを確認した。</p> <p>次に、モノリス型シリカカラムを用いた高分離能二次元HPLCに関して、最大のPCを得るための条件最適化法の検討を行った。高い透過性を有するモノリス型シリカカラムを二次元目に使用することにより、圧力負担が少ない高速条件下で高いPCが得られることは知られていたが、定量的な考察はされていなかった。本研究では、二次元HPLCにおけるPCの最適化を行うために、一つのピークから一回又は複数回のフラクションを取るにより生じる見かけ上のバンド広がり存在を考慮に入れた、拡張シミュレーションモデルの構築を行った。その結果、PC最大化の最適条件が得られ、適切な分画時間並びにカラム長を選択する事により、一時間あたり1,600以上のPCの発現が、汎用HPLC条件下にて達成可能であることが示された。</p> <p>続いて、逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) 用カラムでは十分な保持が得られない高極性化合物群、並びに複雑な消化ペプチド群に代表される様々な性質を有する複雑な化合物群に対する高分離能カラムの開発を行った。分離モードとして親水性相互作用液体クロマトグラフィー (HILIC) を選択し、モノリス型シリカ基材に親水性の新規固定相を修飾した新規モノリス型シリカカラムを開発した。用いた手法は、①親水性のウレイドプロピル基を有するシリル化剤をシリカモノリスキャピラリー管内に送液し、熱縮合させることにより極性官能基を固定化するシリル化修飾法、並びに②アクリルアミドやアクリル酸等のモノマー剤を、二重結合を有するアンカー官能基を予め修飾したシリカモノリスキャピラリー管内に、ラジカル重合開始剤と共に送液し、熱的に共重合させることにより管内で生成されるポリマーで表面修飾する重合修飾法の二種類の方法である。これらの手法を用いることにより、モノリス型シリカカラムの低圧並びに高性能を維持したHILIC用キャピラリー</p>			

カラムを得ることが可能であった。更に、これらのキャピラリーカラムを用いたHPLCと、エレクトロスプレーイオン化（ESI）を介した質量分析（MS）をオンラインで結合させたHPLC-ESI-MSシステムを構築し、従来法では困難であった極微量の糖類に代表される高極性化合物群に適用した結果、未標識状態での分離検出に成功した。また、これらのカラムはペプチドやタンパク質に対しても高い分離能を示した。特に、ウレイドプロピル基修飾シリカモノリスキャピラリーカラムを用いたHILICによるペプチドに対する保持挙動は、一般に用いられるC18修飾カラムを用いたRPLCの保持挙動と比較して高い直交性を示した。本カラムをメートル長カラムフォーマットで用いたHILIC-ESI-MSシステムのショットガンプロテオミクスへの応用により、従来のRPLC-ESI-MSシステムでは同定されないユニークなペプチド群の同定が可能であり、本システムの相補的活用による生体試料中の消化ペプチド及びタンパク質の同定数の向上が示唆された。

以上、HPLC分析における高分離能モノリス型シリカカラムの開発に成功した。高分離能モノリス型シリカカラムは、従来の粒子充填型カラムでは達成することができない高いPCの発現を可能とし、その分離モードや分析条件の最適化により、複雑成分の分離分析を必要とする応用研究の更なる円滑な推進が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

著者は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用の高分離能モノリス型シリカカラムの開発およびその応用研究を行った。

第1章では、C18修飾を施した逆相クロマトグラフィー用のメートル長ロングモノリス型シリカカラムにおける分離性能の向上を目的とし、理論段数ならびにピークキャパシティー (PC) を指標とするシミュレーションを実施することにより、HPLC条件の最適化を行った。その結果、最大のPCを得るためのカラム長およびグラジエント時間に関する知見が得られ、当該シミュレーションを用いることにより、実際のショットガンプロテオミクスにおけるペプチドおよびタンパク質の同定数が最大化されることが確認された。また、高いPCを得るためのもう一つの手段である二次元HPLCに関して、最大の分離能PCを発現するための条件最適化法に関する検討を実施した。その結果、適切な条件選択により更なる高性能分離の可能性を示唆する知見が得られた。

第2章では、ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム、ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラム、およびウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムの開発を行い、主に親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) モードにおける応用例を取得すると共に、その有用性を確認した。

ポリアクリルアミド修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、一般に用いられる逆相HPLCでは分離検出が困難である非誘導体化糖類を良好に分離検出し、その性能は粒子充填型カラムと比較して高速領域下でも抜群に優位であった。また、ポリアクリル酸修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、その固定相表面の解離性かつ高極性の特性を利用して、イオン交換クロマトグラフィー並びにHILICの両モードで活用することが可能であり、タンパク質やペプチド、糖類など様々な化合物に対して粒子充填型カラムと比較して優位な分離性能を示すことが確認された。これら2種のカラムは、ポリマーで基材表面を被覆する重合修飾法により調製されており、調製条件の変更により固定相量をコントロールすることが可能で、モノリス型シリカカラムの弱点であった低保持の側面を補うことが可能であった。

ウレイドプロピル修飾モノリス型シリカキャピラリーカラムに関しては、モノリス基材の性能を維持したメートル長フォーマットでの調製が可能であり、HILIC用カラムとしては世界で始めて数十万段の超高理論段数を発現する高性能カラムの作成に成功した。本カラムを用いたHILICモードは、ペプチド分離において逆相HPLCモードと高い保持直交性を有することから、現在主に実施されている逆相HPLCモードをベースとするプロテオーム解析に相補的な価値を与えるものと考えられる。さらに、本カラム

を用いたHILICモードは質量分析におけるエレクトロスプレーイオン化プロセスでの効率を向上させ、ペプチドの検出感度を劇的に向上させたことから、今後、相補的な活用のみならず、逆相HPLCとの二次元化等を通じてプロテオーム解析における主力分析ツールになり得ると考えられる。

以上、著者はメートル長のモノリス型シリカカラムの分離能を最大化させるための条件を適切に設定するための手段を開発し、モノリス型シリカカラムの分離能を最大化させることに成功した。さらに、モノリス型シリカをベースとした3種類の新規固定相を開発し、タンパク質やペプチド、糖類の分離系に応用した。特にウレイドプロピル修飾型カラムを用いたHILICによるプロテオーム解析では従来法にはない様々な特徴を有する分離系の確立に成功した。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年10月30日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降