

氏名	え さか ゆき ひろ 江 坂 幸 宏
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学位記番号	論 農 博 第 2031 号
学位授与の日付	平 成 7 年 11 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Development of Separation Methods for Biological Substances by Capillary Electrophoresis and Liquid Chromatography (キャピラリー電気泳動及び液体クロマトグラフィーによる生体関連物質の分離分析法の開発)
論文調査委員	(主 査) 教 授 池 田 篤 治    教 授 上 野 民 夫    教 授 松 野 隆 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

生体関連分野の研究において、液体クロマトグラフィー(LC)および電気泳動法は、必要不可欠かつ相補的な分離分析手法であり、新しい分離モードの開発や状態分析への展開の重要性がますます高まっている。特に最近開発されたキャピラリー電気泳動(CE)は、卓越した分離能が期待できるため、新しい分離分析法として精力的な研究が行われている。本論文では、CEにおける新しい分離モードの開発を行うとともに、LCやCEの分離分析手法を駆使して、生体関連物質の状態分析、環境分析におけるその有用性を明らかにしている。主な研究成果は次の通りである。

1. ポリエーテル化合物のプロトン受容能に着目し、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)に、水素結合に基づく新しい分離モードの導入を検討している。マトリックスとしてポリエチレングリコール(PEG)を用いた結果、水酸基、アミノ基、アミド基を有する試料の分離挙動が特異的に変化することを見いだした。種々の溶質とPEGとの相互作用に関して、CEの理論に立脚した平衡論的解析を行い、溶質のプロトン供与能が大きくなるほど相互作用が強くなることを確認した。NMRによる相互作用の観察、測定温度の上昇や高濃度尿素の添加効果の検討を行い、分離系に水素結合が機能していることを明らかにした。この分離モードにおいては、マトリックスとしてのPEGの濃度によって分離条件の制御が可能となることも明らかにした。さらにミセル動電クロマトグラフ法(MEKC)においても、ポリエーテル構造を有する界面活性剤を含む混合ミセルを用いることで、同様に水素結合による高い分離能が得られることを実証した。分配系の熱力学的考察により、本分離能の理論的裏付けも行っている。また具体例として、水素結合能を有する4種のヌクレオチドの分離にも成功している。

2. 蛋白質の精密分離分取の観点から、クロマトホーカシング(CF)の高い分離能に着目し、この方法でマッコウ鯨由来のミオグロビン試料が9つの成分に分離されることを見いだした。この試料は、等電点電気泳動法では3成分に分離されるのみであり、サイズ排除クロマトグラフィー、原子吸光分析、可視紫外吸収スペクトルなどの他の手法では差異が認められなかった。このように、CF法が等電点のわずかに異なる成分の分離に卓越していることを実証した。CF法は注入できる試料量が多く、分取も容易である

ことから、精密分離分取の手法として大変有用であると結論している。

3. 酸化還元コファクターであるピロロキノリンキノン (PQQ) が、生理活性、薬理活性の面においても注目され、生体内での安定性、存在状態をも含めた分析法が要求されている点に着目し、まず、遊離 PQQ の高感度高選択的検出法を検討している。LC 法に電気化学触媒反応に基づく検出法を導入した結果 0.2pmol レベルでの検出が出来ることを明らかにした。この方法で、各種食品中の PQQ の定量を試みたが、PQQ は検出されなかった。PQQ は生体中で何らかの誘導体に変化すると予想のもとに、各種アミノ酸との反応性を詳細に調べ、PQQ がアミノ酸と反応してオキサゾロピロロキノリン (OPQ) 類を形成することを明らかにした。その反応速度の測定を行い、速度が溶液の pH およびアミノ酸の種類によって異なることを明らかにするとともに、生成物であるオキサゾロピロロキノリン (OPQ) 類の CE による一斉分離を達成した。状態分析のモデル系として PQQ を添加したウシ血清試料を分析した結果、PQQ は試料中で時間の経過とともに、それぞれの反応速度に応じて OPQ 類へと変化していくことを見いだした。

4. 環境分析の観点から、天然水中に見られるアルカリホスファターゼ (APase) 活性の簡便な検出法の開発を行った。蛍光基質を用いて酵素反応を行わせ、サイズ排除 LC に蛍光検出器を組み込んだ分析システムを構築した。反応時間、温度、蛍光基質濃度などの最適化を行い、この方法によって無濃縮あるいは数倍の濃縮で、天然水中の APase 活性の測定が出来ることを示した。APase は起源によって分子量が異なるが、本法では APase 活性と同時にその分子量が測定できる。この方法によって、ある池水中の APase の検出、分析を行い、その APase 活性を定量するとともに、活性を示す酵素の分子量が大腸菌由来の APase と同じであることを確認した。

### 論文審査の結果の要旨

液体クロマトグラフィーおよび電気泳動法は、生体関連分野の研究において必要不可欠かつ相補的な分離分析手法であり、新しい分離モードの開発や状態分析への展開の重要性がますます高まっている。本論文は近年特に注目されているキャピラリー電気泳動法に新しい分離モードを導入し、その有用性を実証するとともに、これらの分離分析手法を駆使して、生体関連物質の状態分析、環境分析におけるその有用性を明らかにした結果を取りまとめたもので、評価すべき主な点は以下の通りである。

1. ポリエーテル化合物のプロトン受容能に着目し、キャピラリーゾーン電気泳動法に、マトリックスとしてポリエチレングリコールを導入した。その結果、水素結合に基づく新規分離モードが可能であることを見いだした。さらにミセル動電クロマトグラフ法にこの分離モードを導入することに成功し、水素結合による高い分離能が得られることを実証した。分配系の熱力学的考察により、分離機能の理論的裏付けも行っている。また具体例として、水素結合能を有する 4 種のヌクレオチドの分離にも成功している。

2. 蛋白質の精密分離分取の観点から、クロマトホーカシングの高い分離能に着目し、サイズ排除クロマトグラフィーなどの他の手法では分離できないマッコウ鯨由来のミオグロビン試料が、本法を用いることによって等電点のわずかに異なる 9 つの成分に分離されることを見いだした。

3. 酸化還元コファクターである PQQ が、生理活性、薬理活性の面においても注目され、その検出分

析法が要求されている点に着目し、遊離 PQQ の高感度高選択的検出法を検討した。LC 法に電気化学触媒反応に基づく検出法を導入すれば 0.2pmol レベルでの検出が出来ることを明らかにした。また PQQ の各種アミノ酸との反応性を詳細に調べ、アミノ酸の種類に依存して反応速度が異なることを明らかにするとともに、生成物である OPQ 類の一斉分離を達成した。状態分析のモデル系として PQQ を添加したウシ血清試料を分析した結果、PQQ は試料中で時間の経過とともに、それぞれの反応速度に応じて OPQ 類へと変化していくことを見いだした。

4. 環境分析の観点から、天然水中に見られる APase 活性の簡便な検出法の開発をめざし、LC 法に蛍光検出器を組み込んだ高感度高選択的検出法を実現した。この方法によって無濃縮あるいは数倍の濃縮で、天然水中の APase 活性の測定が出来ることを示した。

以上のように、本論文は CE 法における新しい分離様式の導入に成功し、CF 法の優れた分離能を検証するとともに、これら手法の適切な利用によって生体試料中の状態分析や環境分析が可能であることを実証したもので、分析化学、生物物理化学、および生物工学の分野に寄与するところが大きい。

よって本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 7 年 10 月 16 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。