

エマルジョン電気泳動法による脂質異性体の高性能分離法

Development of the separation method for lipid isomers by capillary electrophoresis with emulsion

助成年度 令和4年度研究助成
助成番号 MZR2022006
研究期間 2022/04/01~2023/03/31
代表研究者 岡本 行広 (Okamoto Yukihiro)
大阪大学 大学院基礎工学研究科 物質創成専攻 化学工学領域
共同研究者 設けていない

キーワード 脂質分子, キャピラリー電気泳動分離, エマルジョン, 抽出

1. 研究の背景と目的

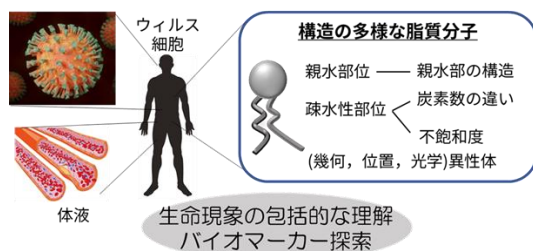


Fig. 1 Importance of lipidomics research.

細胞や生体内における脂質分子の代謝物の変化を網羅的に探索し、生命現象を包括的に理解しようとする研究『リポミクス』が重要となっている (Fig1)。現状、リポミクスでは液体クロマトグラフィー (LC) の分離後、質量分析 (MS) による構造解析という LC-MS 法が使用されている。しかし、LC では、構造が多様な脂質の中でも特に、構造・幾何・光学異性体の分離が困難なケースが多い。さらに MS は分子量が同じである異性体の区別が不可能である。つまり、LC-MS 法は、特に異性体のリポミクス研究において問題を有している。言い換えると、リポミクスの研究の発展

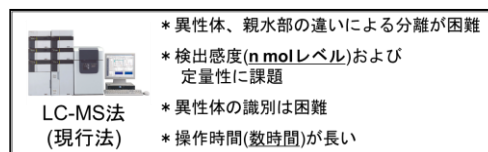


Fig. 2 Problems of LC-MS in the lipidomics.

には、脂質分子の異性体の優れた分離手法が必須項目となっている (Fig2)。

ところで、キャピラリー電気泳動法は、水溶液中の試料に対して短時間で優れた分離分析を可能とする手法の一つである。その中でも、異性体の様な試料に対しても優れた分離性能を示す。キャピラリー電気泳動で、異性体、特に光学異性体を分離するには固定相を泳動液に添加、もしくは充填剤・キャピラリー壁面に固定化して用いる。泳動的に添加する手法は簡便であるため、これまでもシクロデキストリンなどの固定相を用いたキャピラリー電気泳動分離法が報告されている。しかし、今回の目的分子である脂質分子は難水溶性であるため、水に溶解しているキラルセクタ

一を用いることは不可能である。このため、有機溶媒もしくは有機溶媒を含む水溶液に溶解可能な固定相を用いる必要がある。そこで、本計画ではエマルジョンを固定相に用いた電気泳動法を用いて、脂質分子の分離法の開発を目指した(Fig3)。

さらに、一般的に生体試料を扱う場合、夾雑成分と目的成分を抽出などの前処理を行った後に、精密分離そして分析を実施する。このため、前処理の効率化(操作時間、回収率/選択率/濃縮率などの項目)は重要である。

そこで、本研究期間では、まずは、脂質分子の抽出やキャピラリー電気泳動分離を可能とするエマルジョンの検討を行うことを目的とした。(以下の記述では現時点で公表不可の箇所はXという名称を用いている)

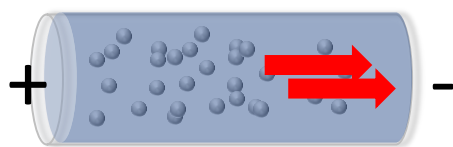


Fig.3 Schematic illustration of capillary electrophoretic separation with emulsion. Emulsion plays the role of the stationary phase.

2. 研究の内容・方法

(1) エマルジョンXの作製およびその評価

組成比を変えて、エマルジョンXを作製した。そのエマルジョンの粒子径に関して、動的光散乱法を用いて評価した。また、生体試料を想定しているため、水溶液の塩濃度に対する安定性を同じく動的光散乱法による粒子系の変化として評価した。また、エマルジョンの安定性や、抽出分離に影響を及ぼすゼータ電位に関して、ゼータ電位測定装置を用いて評価した。さらに、電気泳動分離において、バルク溶液の電気伝導度も重要な項目となる。このため、バルクの電気伝導度に関しては、電気伝導計を用いて評価した。また、バルク懸濁液の粘度も電気泳動分離に影響を及ぼす因子の一つである。このため、バルク溶液の粘度を粘

度計を用いて評価した。

(2) エマルジョンXを用いた抽出分離

エマルジョンXを用いることで、細胞から脂質分子の抽出が可能になると考えられる。そこで、疑似細胞として蛍光色素を含むリポソームを作製した。DPPCリポソームを凍結融解法により作製し、内水相にカルセイン水溶液を内封した。リポソームの溶解は、内水相のカルセインが放出され、コバルトイオンにより消光されることで確認した。また、エマルジョンからの脂質の抽出は二相分離を誘起させ、DPPCに対してUV-VISスペクトル解析を行い、抽出能の評価を実施した。

最後に、脂質分子のキャピラリー電気泳動分離の可能性を検討した。現段階では、脂質分子を用いた分離を検討する段階には至っておらず、難水溶性物質をモデルとしてキャピラリー電気泳動分離を検討した。

3. 研究の成果

エマルジョンXの形成を動的光散乱測定から確認できた(Fig4)。また、塩濃度の増加により粒子径の増大が観測されたため、生体試料の様な高塩濃度の試料の場合は、エマルジョンの粒径の肥大化もしくは二相分離が起こる恐れがあることが予測された。

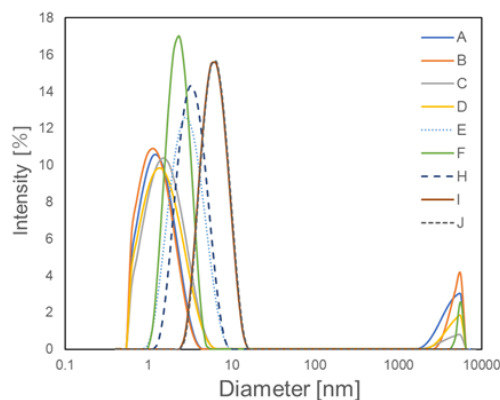


Fig.4 Size distribution of different composition of emulsion X measured by DLS.

また組成が変化するにつれて電気伝導度の上昇が観測された。この結果より、組成の変化によりw/oからo/wへの変化が観測された(Fig5)。また、各組成における粘度を測定した結果、粘度はどの組成でもほぼ一定であることが判明した。以上より、エマルジョンの形成の確認ならびに分離抽出に影響を及ぼすエマルジョンの特性を明らかとした。

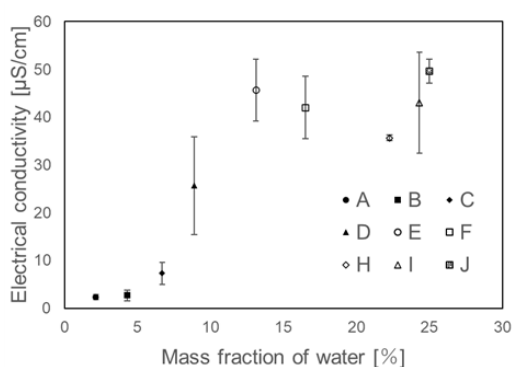


Fig.5 Conductivity measurement of different composition of emulsion X

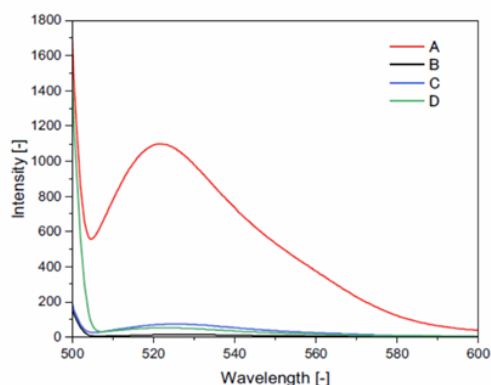


Fig.6 confirmation of liposome collapse with emulsion X by fluorescence quenching.

続いて、エマルジョンによる抽出・キャピラリー電気泳動分離を試みた。その結果、Fig6に示す様に、リポソームとエマルジョンXを混合すると、リポソームの蛍光の消光を確認した。つまりリポソームが溶解したことが確認された。これに

要する時間は数分であるため、このエマルジョンは脂質分子の抽出に有用であると期待できる。さらに、脂質分子の抽出という観点で、抽出性能を評価した結果、濃縮率は100~150倍程度であった。この点に関して、今後、組成比や抽出操作の最適化を行い、回収率、濃縮率、選択性の向上を目指していきたい。以上より、エマルジョンを

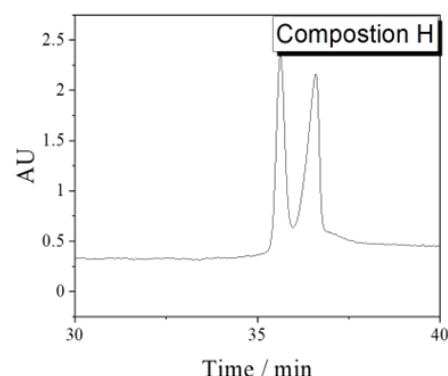


Fig.7 Capillary electrophoretic separation of model compounds with emulsion X.

用いると、細胞から脂質分子の抽出の可能性を示唆する結果を得ることに成功した。

最後にエマルジョンXを用いたキャピラリー電気泳動分離を実施した。難水溶性物質と水溶性色素をモデルとしてキャピラリー電気泳動分離を試みた結果、特定の組成でこの2成分の分離に成功した(Fig7)。キャピラリー電気泳動分離に関しては、未知な点が多いため、分離機構の解明はもちろん、分離性能の向上のため、分離に影響する因子の解明を今後行っていく予定である。

4. 結び

リポドミクスを指向した脂質分子の抽出およびキャピラリー電気泳動分離法に関して、エマルジョンを適用した新規手法の開発を目的として研究を実施した。その結果、エマルジョンXの作製に成功するとともに、抽出・キャピラリー電気泳動分離へ影響するエマルジョンXの特性を明

らかとした。最後に、エマルジョンXを用いて、細胞を模倣したリポソームからの脂質分子の抽出および脂質分子を模倣した分子を用いたキャピラリー電気泳動分離を実施し、抽出に成功するとともに、脂質分子のキャピラリー電気泳動分離の可能性を示唆する結果を得ることに成功した。

5. 今後の研究方向性・課題

この一年間で、エマルジョンXの作製および物性測定を行い、物性を明らかとした。そして、抽出やキャピラリー電気泳動による精密分離への適用の可能性を示唆する結果を得ることに成功した。

そこで、今後の研究の方針として、細胞からの脂質分子の抽出の最適化およびキャピラリー電気泳動法を用いた分離性能の評価を行っていく予定である。そして、研究案を策定した段階の目標である、現状のLC-MS法の問題点を改善し、そしてLC-MS法を凌ぐ性能の実現を課題として研究を実施していく予定である。

6. 参考文献

リポミクスに関して

1. 有田誠, 脂質クオリティ研究の基礎と臨床, 医学の歩み, 269, 2019

リポミクス解析に関して

2. 中西広樹, オレオサイエンス, 14巻, 321 (2014)

キャピラリー電気泳動分離に関して

3. キャピラリー電気泳動基礎と実際, 本田進/寺部茂・編, 講談社サイエンティフィク, 1995/04/01

7. 論文・発表

1. 岡本 行広, ヤヌス粒子の熱泳動に対する基材表面の効果, ぶんせき, 2023,5,205
2. 岡本 行広, キャピラリー電気泳動法の測定原理と装置活用のコツ, キャピラリー洗浄での留意点, 「キャピラリー電気泳動のデータ解析と分析テク

ニック」, (技術情報協会), in press

3. 岡本 行広, イ ジョンフ, 大城 敬人, ナノポア解析のための脂質抽出法の開発, 第 83 回分析化学討論会(富山), 2023.05
4. Yukihiro Okamoto, Jungu Lee, Takahito Ohshiro, in preparation.

6. その他

謝辞

本研究は、向科学技術振興財団の研究助成により実施可能なものでありました。誌上を借りて、御礼を申し上げます。