

氏名（本籍）	RADHIA PUTRI（インドネシア共和国）
学位の種類	博士（工学）
学位授与番号	甲第534号
学位授与日付	平成30年3月25日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	Development of monolithic columns for digestion of proteins and separation of dansyl amino acid enantiomers in capillary liquid chromatography (キャピラリー液体クロマトグラフィーにおけるタンパク質消化およびダンシルアミノ酸対掌体の分離のためのモノリスカラムの開発)
学位論文審査委員	(主査) 教授 瀬瀬 守 (副査) 教授 竹内 豊英 准教授 リム リーワ

論文内容の要旨

クロマトグラフィーはロシアの植物学者 Mikhail Semonovich Tswett によって 1903 年に発明された。彼は炭酸カルシウムでクロロフィルを分離したが、吸着機構に基づいた最初の分離であった。それ以来、多くの分離技術が登場し開発されてきた。クロマトグラフィーは分析分野では欠くことのできない方法となっている。クロマトグラフィーは移動相と固定相間の相互作用を利用した分離方法である。これらの相は物理的状態によって分類される。すなわち、固体、液体、気体である。液体クロマトグラフィーでは試料成分はキャリヤーに溶解しなければならないが、液体移動相は他の何よりもよく適合する。

キャピラリー液体クロマトグラフィーの開発以来、同じ分析がより少量の溶媒と試料の消費で可能になっている。それに対し、液体クロマトグラフィーの性能はシステムのダウンサイジングによって低下している。たとえば、温度変化などの周囲の変化によって容易に影響を受ける。それにもかかわらず、キャピラリー液体クロマトグラフィーの利点、すなわち移動相および固定相の消費量の減少、廃液の減少を有する。その低コストおよび環境にやさしい特徴は、研究が実験室で行われるところでは新規の固定相の開発を促す。キャピラリーに基づいた技術の達成は、科学者にクロマトグラフィーの手法の開発や改善を容易に研究させる。

本研究は、キャピラリー液体クロマトグラフィーにおけるモノリス型固定相を開発し、タンパク質の消化およびダンシルアミノ酸対掌体の分離について検討している。モノリスカラムはスルーポアとスケルトン上のメソポアをもち、この二重細孔の特徴がクロマトグラフィーの測定において背圧を減少させる。モノリスカラムは一般的に2つのタイプに分類される。すなわちポリマーベースとシリカベースである。ポリマーベースモノリスカラムは簡単な重合によって合成され、広い pH 範囲で使用できる。ポリマーベースモノリスカラムはモノマー、架橋剤および細孔形成剤によって調製される。本研究ではメタクリル酸系のポリマーをキャピラリー内に合成し、タンパク質の消化およびダンシルアミノ酸対掌体の分離のための固定相を調製している。トリプシン酵素を固定化し、牛血清アルブミンの消化の迅速化を図り、ポリマーの合成条件の最適化および酵素消化の条件について検討している。さらに、ポリマーモノリスに β -シクロデキストリンを導入することにより、ダンシルアミノ酸対掌体の分離に適用し、ポリマー合成条件の最適化を図っている。研究では、移動相条件についても検討を加えている。

論文審査結果の要旨

本論文は、キャピラリー液体クロマトグラフィーにおけるモノリス型固定相を開発し、タンパク質消化およびダンシルアミノ酸対掌体の分離に適用したもので4章からなる。

第1章では、クロマトグラフィー、キャピラリー液体クロマトグラフィーの特徴について述べ、液体クロマトグラフィーにおけるモノリス型固定相、固定化酵素カラム、キラル固定相について言及し、本研究の目的を述べている。

第2章では、タンパク質消化のためのトリプシン酵素を固定したモノリス型カラムからなるマイクロ反応器を開発している。マイクロ反応器は、あらかじめメタクリル酸 3-(トリメトキシシリル)プロピルで前処理したフューズドシリカキャピラリーにメタクリル酸グリシジル、エチレンジメタクリレートおよび細

孔形成剤の混合溶液を満たし、アゾビスイソブチロニトリルを開始剤として 60°C, 24 時間で重合した後、メタノールで洗浄してモノリス型固定相を調製している。その後、トリプシンのリン酸緩衝液を 4°C, 12 時間送液することで、モノリス型固定相にトリプシンを導入している。調製後、10 mM 塩化カルシウムおよび 0.02% アジ化ナトリウムを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.0)を満たして冷蔵庫に保管している。調製したマイクロ反応器を用いて牛血清アルブミンの消化に応用している。牛血清アルブミンはあらかじめ 8 M 尿素で 4°C, 24 時間かけて変性させてから消化している。変性させることでより多くのペプチドに基づくシグナルを観察している。モノリス型固定相は走査型電子顕微鏡で観察している。また、調製したモノリスカラムは透過性もよく、100×0.32 mm I.D.に 6 μL/min で送液したところ圧力損失は 2 MPa であった。消化の際の溶液の流量について 1~4μL/min の範囲で検討したところ、流量が小さいほど多くのペプチドに基づくシグナルが増大することを見いだしている。緩衝溶液について検討したところ、トリス塩酸緩衝溶液(pH8.3)の方が、リン酸緩衝溶液(pH8.1)よりも消化が進行することを見いだしている。さらに緩衝溶液の pH について 5.4~8.3 で検討したところ、pH が高いほど多くのペプチドに基づくシグナルが観察されている。

第 3 章では、グルコニルグルコシル β-シクロデキストリン (GUG-β-CD) を化学結合したモノリス型固定相を開発し、ダンスルアミノ酸対掌体の分離を検討している。あらかじめメタクリル酸 3-(トリメトキシシリル)プロピルで前処理したフューズドシリカキャピラリーにメタクリル酸グリシジル、エチレンジメタクリレート、GUG-β-CD および細孔形成剤の混合溶液を満たし、アゾビスイソブチロニトリルを開始剤として 60°C, 18 時間で重合した後、メタノールで洗浄してモノリス型固定相を調製している。重合条件について検討したところ、メタクリル酸グリシジルと GUG-β-CD の比が 2:1 が最適であることを見いだしている。移動相について検討したところ、酢酸トリエチルアンモニウム(TEEA)または酢酸アンモニウム(AMAC)緩衝溶液とアセトニトリル混合溶液(70:30)を移動相として用いることによってダンスルアミノ酸対掌体を分離している。pH4.1 の TEEA 緩衝溶液を移動相として、各種ダンスルアミノ酸対掌体の分離に成功している。いずれも L-アミノ酸が D-アミノ酸よりも先に溶出することを見いだしている。AMAC 緩衝溶液を移動相とするとダンスルアミノ酸対掌体の溶出時間が増加し、分離度も悪くなった。移動相の pH の影響を検討し、pH6.5~3.4 について検討したところ、pH が低い方が保持が増大することを見いだしている。これはカルボキシル基の解離に関係しており、低 pH ではカルボキシル基の解離が抑えられていることに関係している。

第 4 章では本論文の結論および将来の展望について述べられている。

最終試験結果の要旨

3 名で構成する審査委員会は、本論文および論文別刷り等を慎重に検討した結果、提出された発表論文 2 編は国際論文誌に掲載予定であり、2 編とも申請者が各論文の主要な部分に携わっている。また、本論文は学位論文として十分に完成された内容を有していることを確認した上で、最終試験（公聴会）を 2 月 13 日に開催し審査した結果、合格と判定した。

発表論文（論文名、著者、掲載誌名、巻号、ページ）

1. Development of Immobilized Enzymatic Trypsin Micro-reactor on Polymer Monolith Column for Biocatalytic Reactions in Capillary Liquid Chromatography. R. Putri, L. W. Lim, T. Takeuchi: Global Research Journal of Chemistry, accepted for publication.

2. Separation of Dansyl Amino Acids in Capillary Liquid Chromatography Using Cyclodextrin-Bonded Chiral Monolithic Stationary Phases. R. Putri, L. W. Lim, T. Takeuchi: Global Research Journal of Chemistry, accepted for publication.