



TITLE:

Fundamental studies on electrophoretic methods with poly(ethylene glycol)-based materials(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Liu, Chenchen

CITATION:

Liu, Chenchen. Fundamental studies on electrophoretic methods with poly(ethylene glycol)-based materials. 京都大学, 2021, 博士(工学)

ISSUE DATE:

2021-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k23513>

RIGHT:

許諾条件により本文は2022-09-01に公開

京都大学	博士 (工学)	氏名	劉 晨晨
------	---------	----	------

論文題目	Fundamental studies on electrophoretic methods with poly(ethylene glycol)-based materials (ポリエチレングリコールを基盤材料とする電気泳動手法に関する基礎的研究)
------	---

(論文内容の要旨)

本論文は、分離分析手法の一つである電気泳動において、poly(ethylene glycol) (PEG) を分離場の基盤材料に用いて新たな分離機構の創出を目指し、その応用の可能性を探る基礎的研究に関する成果をまとめたものであり、序論、本編4章及び総括からなっている。

序論では、本論文に収載されている各研究を始めるに至った経緯、各研究の目的と分離科学における位置付けについて述べている。

第1章では、蛍光検出を用いるキャピラリー電気泳動における非平衡光退色の問題について、問題点と解決策とを論じている。蛍光検出を用いる従来のキャピラリー電気泳動では、分析対象試料の速度が一樣でないことに起因する非平衡光退色が発生するため、一般に正確な定量分析は困難であるとされてきた。特に内部標準を使用する場合、非平衡光退色が抑制されていなければ、試料の蛍光強度を内部標準のそれと比較することは困難である。そこで、非平衡光退色の影響を低減するための実用的手法として、内部標準法と組み合わせたオンライン蛍光イメージングシステムを提案し、検出窓内の分割アレイで蛍光強度を取得し、それらの積算によってエレクトロフェログラムを構築することで、一定の露光時間の下で異なる試料の蛍光信号をリアルタイム検出することを可能とした。DNA-色素複合体の検出ではピーク面積比の相対誤差0.3~3.2%と、実用的な検出法であることも示している。

第2章では、キャピラリー電気泳動によるDNA断片分析のための新規分子ふるい材料として、架橋 copoly(poly(ethylene glycol) acrylate/poly(ethylene glycol) diacrylate) (copoly(PEGA/PEGDA))ヒドロゲルの利用について検討している。開始剤濃度、モノマーの総濃度、PEGAとPEGDAの比率、架橋剤の長さなど、種々のパラメーターを調整することで、分子ふるい効果、すなわち分離性能の制御が可能であることを示した。最適化されたゲルを使用することで、移動時間の再現性について、相対標準偏差(RSD) < 0.9% (繰り返し10回)、RSD < 5.9% (5本のカラム間)、RSD < 5.2% (5日間25テスト)の結果を得た。応用例として、20~140 bp DNA断片の高分離能迅速分離が示されている。この copoly(PEGA/PEGDA)ヒドロゲルは、キャピラリー電気泳動分析において従来のポリアクリルアミドゲルよりも高い再現性・分離性能が得られることが明らかとなった。

第3章では、タンパク質の電気泳動分析用分子インプリントポリマー (MIP) の作

製について議論している。この MIP の基材には copoly(PEGA/PEGDA)ヒドロゲルを用い、標的タンパク質であるシトクロム c をテンプレートとして使用することで、タンパク質の選択的電気泳動分離を目指している。MIP ヒドロゲル及び非インプリントポリマー (NIP) ヒドロゲルを作製し、機能性モノマーとテンプレートの比率、イオン強度、PEGA/PEGDA の架橋剤の長さ及び架橋剤の比率等を制御して、高選択的認識を目指した。シトクロム c インプリント copoly(PEGA/PEGDA)ヒドロゲルをポリアクリルアミドゲルとハイブリダイズさせ、得られたゲルをスラブゲル電気泳動に適用することで、ネイティブシトクロム c の選択的分離が可能であることを示した。

第 4 章では、架橋ヒドロゲルに対して MIP をグラフトすることによってタンパク質認識構造を構築する新規手法について議論している。ヒドロゲルネットワーク上への MIP 構造グラフトでは、2 段階の合成手順を用いている。すなわち、まずフリーラジカル重合によりヒドロゲルネットワークを合成して足場を形成し、続いて原子移動ラジカル重合によりテンプレート周囲のイニマーから MIP 構造を成長させる。このようにして創製された MIP ゲルは、トリプシンまたはシトクロム c をテンプレートとして使用した場合、NIP ゲルと比較して標的分子に対するより高い吸着性能を示すことが明らかとなった。

最後は総括であり、本論文のまとめとして、PEG を基盤材料とする電気泳動手法について、その新規性・重要性を述べるとともに、将来の応用に向けた課題についても言及している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、分離分析手法の一つである電気泳動において、poly(ethylene glycol) (PEG) を分離場の基盤材料に用いて新たな分離機構の創出を目指し、その応用の可能性を探る基礎的研究に関する成果をまとめたものであり、主な内容は次のとおりである。

- 1) 蛍光検出を用いるキャピラリー電気泳動 (CE) においては、分析対象試料の速度が一様でないことに起因する非平衡光退色が起こるため、一般に正確な定量分析は困難であるとされてきた。この問題を解決するため、オンライン蛍光イメージング検出法を導入し、移動中の試料の蛍光強度をリアルタイムに測定することで、全ての対象試料について等しい光露光時間での蛍光強度収集が可能となり、CE による定量分析の正確さを大幅に向上させることに成功した。
- 2) CE による DNA 断片の高性能分離のための新規分子ふるい材料として、copoly(PEG diacrylate/PEG acrylate) (copoly(PEGDA/PEGA)) ヒドロゲルを開発し、その分離性能の評価と応用の可能性について詳細に検討した。その結果、copoly(PEGDA/PEGA) ゲルは、従来の polyacrylamide ゲルと比較して同等の分子ふるい能力と高い再現性を有することが明らかとなり、さらに同ゲルの分子ふるいサイズが容易に調整できることを示して、その有用性を実証した。
- 3) 新規分子インプリントポリマー (MIP) 材料への copoly(PEGDA/PEGA) ヒドロゲルの適用と、そのスラブゲル電気泳動 (SGE) 分析への応用について検討した。高い特異的分子認識能を発現するためのゲル組成を詳細に評価すると共に、SGE 分析用新規分離場として MIP ゲル及び PA ゲル各ゾーンを含むハイブリッドスラブゲルを開発し、標的タンパク質である cytochrome c の高選択的分離を達成した。
- 4) PEGDA を骨格とする架橋ヒドロゲルに対して原子移動ラジカル重合を行うことによって、タンパク質に対する特異的認識能を発現する MIP ヒドロゲルの作製が可能であることを示し、その応用の可能性を示唆した。

以上要するに、本論文は、PEG を基盤材料とする電気泳動手法に関する新たな知見をまとめたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 3 年 8 月 9 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。