

[研究助成 (A)]

構造多様な分子の精密分離と情報工学の融合による バイオマーカー探索法の確立

Development of a biomarker finding method by combining separation and information engineering for the molecules in structural diverse group



2231007

研究代表者 大阪大学 大学院基礎工学研究科 准教授 岡本 行 広
(助成金受領者)
共同研究者 大阪大学 産業科学研究所 特任准教授 大 城 敬 人

[研究の目的]

バイオマーカー分子の発見ならびに定量法は、疾患診断の性能を飛躍的に向上する。バイオマーカー分子として、核酸・タンパク質に加えて、ある種の脂質分子はバイオマーカーとして認知され、脂質のバイオマーカー分子の探索も重要な研究分野となっている。

現在、バイオマーカーとしての脂質分子の探索法として、細胞溶解や除タンパク質などの前処理、次に、液体クロマトグラフィー (HPLC) による精密分離、そして最後に質量分析 (MS) 測定による構造解析が汎用される手法である。

しかし、脂質分子は、光学/幾何/構造異性体を始め、わずかに構造の異なる分子が天文学的な数 (10 万種以上) 存在し、しかも微量で存在している。それゆえ、現状の HPLC-MS 測定は、脂質バイオマーカー探索研究において求められる性能を満たしていないといえる。

表1 現状の手法の問題点

	LC/MS法(現行法)
分離操作/性能	分離性能に難あり
構造解析	異性体の識別困難
検出限界	n molレベル/定量性に課題
操作時間	数時間レベル

そこで、脂質バイオマーカー探索において新たな原理に基づく手法が必要と考えられる。この新たな手法として、膨大な数の脂質分子の

データを活用した機械学習による構造判定と、機械では現状不可能な高性能分離操作および前処理を融和した手法の開発により、現状法とは一線を画す『脂質のバイオマーカー探索法』の確立を目指す。

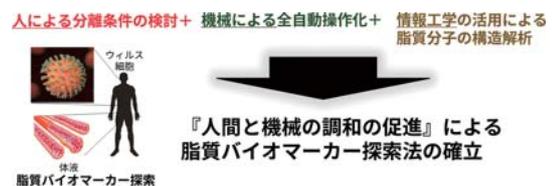


図1 本提案の目指す内容

[研究の内容, 成果]

1. 抽出法に関する研究

前述の目的のために、今年度は、精密分離を行う前処理として、細胞から脂質分子を抽出する手法に関して検討を行った。

抽出を行う方法として、液液抽出、固液抽出の2通りが考えられる (表2)。そこで、本研究期間で2通りの手法でそれぞれ取り組んだ内容と成果に関して報告する。

液液抽出は、操作自体は簡便であるが、振盪

表2 固相抽出と液液抽出の比較

	利点	問題点
液液抽出	様々な液液組成を選べる/特殊な装置は不要・簡便/温度・圧力などの操作条件の制限も多くない	振盪が必要/多量の有機溶媒を使用/濃縮率が低くなる
固相抽出	再利用可能・流れ系の実験との相性が良い	濃縮率を大きく上げられない

操作が必要であり、有機溶媒の使用量が多いうえ、濃縮率は高くない。そこで、細胞を溶解可能であり、抽出率および濃縮率の高い溶液および操作法の検討を実施した。

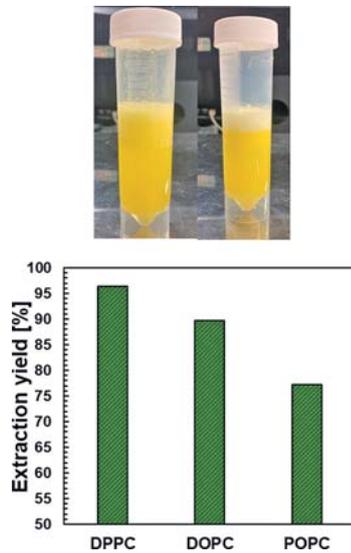


図2 上段：溶媒 Y による脂質抽出の写真
下段：各種リン脂質の抽出率

溶媒 Y に着目し、この溶媒 Y を用いて脂質抽出の評価を実施した。脂質は代表的なリン脂質を 3 種選定し、このリン脂質から構成されるリポソームを薄膜水和、凍結融解、エクストルージョン法により作製した。そして、この溶媒 Y を用いて、溶媒 Y 中に抽出された脂質を逆相 HPLC モードにて定量を行った。その結果、写真に示す様に、有機 Y 相を簡単に回収可能であることを実証し、最適化は今後の検討であるが、90% 台の抽出率を実現した。

固相（固液）抽出は、試料から目的とする物質を吸着させるため、抽出操作、回収操作が容易である利点がある。また、オンライン抽出・分離での操作の場合、液液抽出よりも適応性が高い。一方で、オンライン抽出・分離の場合、流路に固相を固定化する操作が必須となる。

様々な固相抽出剤が開発されているが、モノリス構造体は、カラム状および粒子状として成型可能であり、高い通液性、高い比表面積を有しているため、オフライン・オンライン抽出に

適した構造である。そこで、本申請期間内では、まず多孔質粒子（クライオゲル）の作製を検討した。

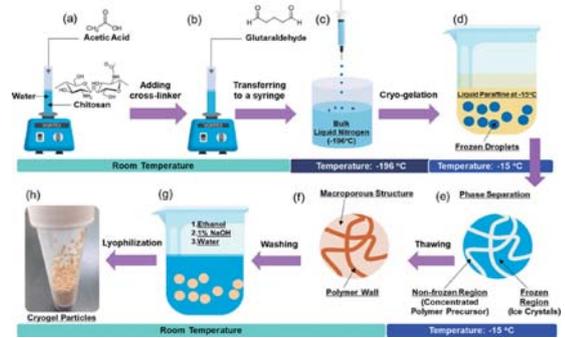


図3 クライオゲル作製の手順

多孔質粒子（クライオゲル）は、低温パラフィン中でのキトサンの架橋、そして温度を上げて、ポロゲンの氷晶を融解させることで作製した。

得られたクライオゲル粒子の外観と SEM 画像を図 4 に示す。外観より、凡そ 2 mm 程度の粒子の作製に成功し、SEM 画像から、多数の空孔の形成が確認できた。以上から、多孔質粒子の作製に成功した。続いて、この様なクライオゲルは、加圧・減圧により形状の変化・復元が観察される場合がある。そこで、このクライオゲル粒子をシリンジに充填し、加圧・減圧を行った。その結果、クライオゲルの粒子径は、圧縮により形状が変化し、減圧により元の形状に復元することを確認した。

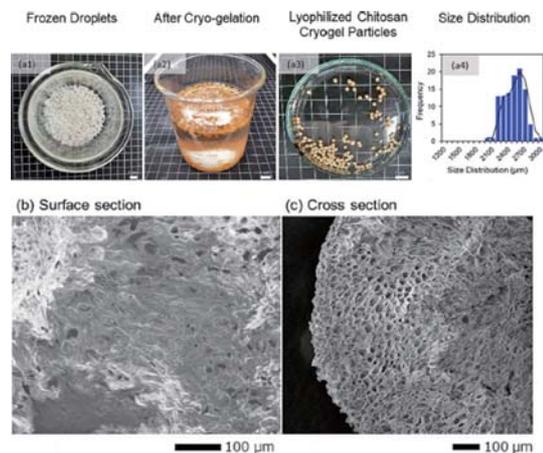


図4 クライオゲル粒子の外観および SEM 画像

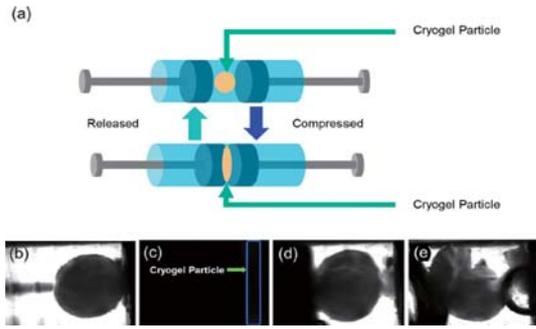


図5 クライオゲルの形状復元

今後の計画として、現在は粒子径が2 mm程度、ポア（孔）サイズが数 mm程度であるため、抽出担体として粒子径およびポアサイズの微小化を目指す予定である。さらに、キトサンはそれ自体がイオン交換担体として機能するとともに、アミノ基を有しているため様々な機能性分子を表面に修飾することが容易である。このため、脂質分子の抽出に適した表面設計を併せて行う計画である。

2. 抽出デバイスの作製に関する研究

細胞溶解、脂質分子の抽出を行うためには、デバイス内での温度制御および温度勾配の作製は重要である。そこで、抽出用の温度勾配デバイスの設計を行い、温度勾配デバイスの作製を行った。その結果、今回の測定条件下では、20-25℃での温度勾配を有するデバイスの作製に成功した（図6）。今後は、前述の抽出をこ

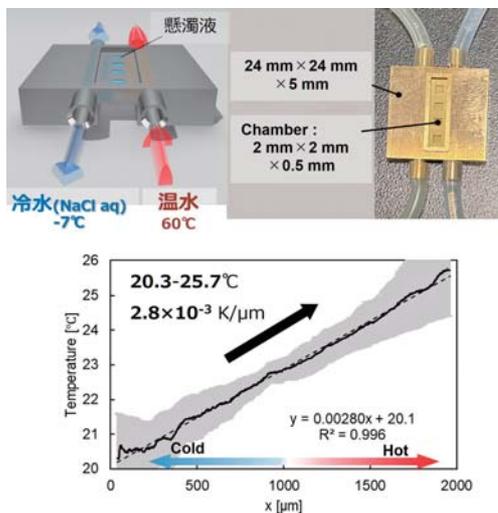


図6 温度勾配デバイスと温度勾配の評価結果

のデバイス中で実施し、抽出性能の評価ならびに、後続の脂質構造解析とのオンライン化を目指していく計画である。

3. 脂質構造解析に関する研究

電気化学検出を用いた単1分子検出の研究を行った。特に、1成分のみ含む溶液ではなく、混合溶液中での脂質分子の識別および構造解析に焦点を当てた研究を実施した。そして、得られた電気化学シグナルに関して、深層学習技術の一つである長短期記憶（LSTM）ネットワークを利用した時系列データ解析手法を導入し、脂質分子の構造に関わる電気化学的シグナルの解析を試みた。その結果を以下に記載する。

申請前には、すでに本アプローチの有用性を示すことに成功しているが、今年度は、さらに高い識別精度を実現するために、さまざまなアルゴリズムの最適化に取り組んだ。その結果、あるXという解析により67.5%（精度0.675）という最も高い識別精度を達成した（図8）。

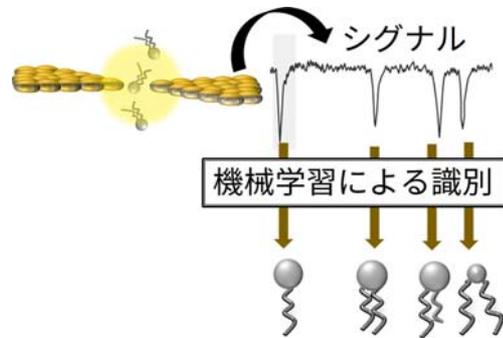
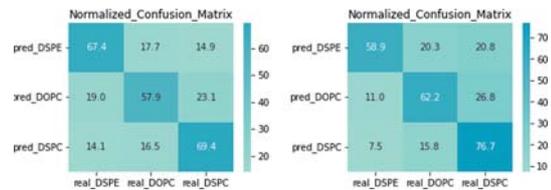


図7 脂質構造解析法の概念図



左：従来法、右：X解析法

図8 各種手法による識別精度

さらに、精度向上を目指してディープラーニングの手法に目を向けた。まずは畳み込みニューラルネットワーク（CNN）を用いた評

価を行った。その結果、X 解析法と比較しても顕著な精度向上は見られなかった。つまり、CNN は画像認識やパターン識別に非常に強力なモデルであるにも関わらず、時系列データの解析や、本研究のような複雑な化学構造の識別には最適な解ではないと判断できる。

そこで、時系列データやシーケンスデータの処理に特化したディープラーニングモデルである長短期記憶 (LSTM) ネットワークの導入により、さらなる精度向上を目指した。そして、LSTM の能力を活かし、脂質分子の電気化学的シグナルのような時系列データを含む複雑なデータセットの解析に取り組んだ結果、これまででない精度の高い識別が可能となった。

これらの成果から、炭素二重結合の存在に伴う電気伝導度の変化が顕著に観察されたと判断できる。そして、これらの成果は、今後の研究における有用な指標となるものと考えられる。また、LSTM による時系列データの解析手法の導入は、電気化学検出に基づく単 1 分子検出技術のさらなる発展に貢献することが期待される。

今後は、前述のとおり、細胞からの抽出、精密分離、脂質構造解析を人力と機械の融和により実現する。

[今後の研究の方向, 課題]

今回の助成期間で、本手法の有効性の実証に

成功したと考えられる。また、それに伴い、課題も明らかとなった。そこで、今後は、引き続き、抽出条件の最適化、脂質分子の検出および機械学習の最適化を行っていく予定である。また、今年度は実現可能性の実証の至っていない精密分離に関する検討を行っていく計画である。

[成果の発表, 論文など]

1. Engang Ciptawati, Hayato Takase, Nozomi Morishita Watanabe, Yukihiro Okamoto, Hadi Nur, Hiroshi Umakoshi: Preparation and Characterization of Biodegradable Sponge-like Cryogel Particles of Chitosan via the Inverse Lidenfrost (iLF) Effect, ACS Omega, 9(2), 2383-2390 (2024).
2. Takashima Y, Komoto Y, Ohshiro T, Nakatani K, Taniguchi M, Quantitative Microscopic Observation of Base-Ligand Interactions via Hydrogen Bonds by Single-Molecule Counting, J. Am. Chem. Soc. 145, 2, 1310-1318 (2023)
3. Ohshiro T, Bio-molecular Sensing for Medical Applications Based on Single Molecule Electrical Measurement by Nanodevices Towards Medical Applications, Bunseki Kagaku. 72, 3, 87-95 (2023)
4. 岡本行広, キャピラリー電気泳動法・イオンクロマトグラフィーの分析テクニック〜サンプルの種類や目的に応じた最適な条件設定のコツ〜, 第一章, 第四節, 技術情報協会 (分担執筆), (2023)
5. 岡本行広, イジヨンフ, 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, 2023
6. 岡本行広, ぶんせき, 4, 138, (2024)