九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

代謝関連キラルアミノ酸の高選択的二次元 HPLC 一斉分析法開発と生体内含量解析

古賀，鈴依子

https://hdl.handle.net/2324/1654811

出版情報：九州大学，2015，博士（創薬科学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

代謝関連キラルアミノ酸の高選択的二次元 HPLC 一斉分析法開発と生体内含量解析

創薬育薬産学官連携分野　3PS12016K　古賀 鈴依子

【序論】

長い間、高等生物の体内にはL-アミノ酸のみが存在していると考えられていたが、分析技術の進歩に伴い、ヒトを含む哺乳類体内に様々なD-アミノ酸が存在することが次第に明らかになってきた。比較的生体内含量の高い、セリンやアラニン、アスパラギン酸などのタンパク質構成アミノ酸に関しては、D体がL体とは異なる生理機能を有することに加え、体内分布や代謝経路も異なることが解明されている。また、神経疾患や腎疾患に伴うD-アミノ酸の含量変化も報告されており、これらのD-アミノ酸は新規生理活性物質やバイオマーカーの候補として注目されている。

生体内にはタンパク質構成アミノ酸の他にも、多彩な機能を有する代謝関連アミノ酸が多数存在する。しかし、これらの非タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体の生体内含量はD体L体ともにごく微量であるため、生体内に多量に存在する夾雑成分の妨害を受け易く、正確な検出及び分析は極めて困難である。そのため、鏡像異性体を区別したこれらのアミノ酸の生体内含量や代謝経路などはほとんど明らかにされておらず、キラルメタボロミクスを可能とする高感度選択的な分析法の開発と、体内分布及び合成・代謝経路の解析が切望されていた。そこで本研究では、アミノ酸及びその代謝化合物を対象とするキラルメタボロミクスにおける分析対象拡大の第一段階として、非タンパク質構成アミノ酸を分析対象に含むキラルアミノ酸二次元 HPLC 一斉分析法を構築し、生体内含量の解析を行った。また、生体内における微量アミノ酸鏡像異性体の内在を確実に評価するため、質量分析計を検出器に用いた二次元 HPLC-MS 法及び二次元 HPLC-MS/MS 法についても併せて開発し、生体試料における各アミノ酸鏡像異性体含量を解析した。

【実験】

採取した各組織にメタノールを加えてホモジナイズし、上清を減圧乾固して誘導体化に用いた。マウス尿試料については水で希釈した後、誘導体化に使用した。試料に 200 mM ホウ酸塩緩衝液と 40 mM 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole（NBD-F）溶液を加えて 60℃ で 2 分間加熱し、反応液にトリフルオロ酢酸水溶液を加えて反応を停止させ、二次元 HPLC で分析した。二次元 HPLC の一次元目においては、逆相分離により分析対象の NBD-アミノ酸を他の夾雑成分から単離し、各アミノ酸画分を二次元目のキラルカラムに導入して光学分割を行う（Fig. 1）。逆相分離には、キャピラリーモノリス型 ODS カラム（0.53 mm i.d. x 1000 mm）を用いた。光学分割には Pirkle 型カラム及び陰イオン交換型カラムを用いて分析対象アミノ酸の光学分割条件を精査し、各分析系に適したキラルカラムを選択した。NBD-アミノ酸の検出は励起波長 470 nm における 530 nm の蛍光発光及び質量分析により行った。

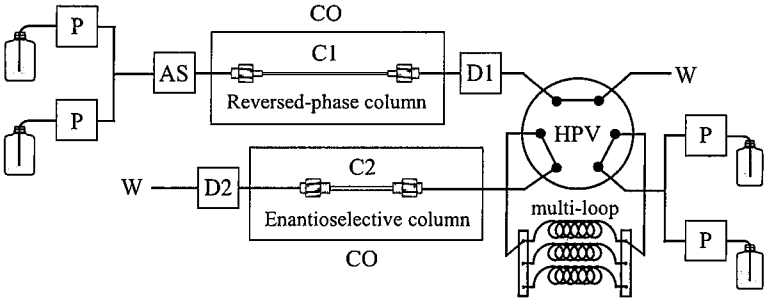

Fig. 1　Flow diagram of the 2D-HPLC system.　AS, auto sampler; C, column; CO, column oven; D, detector; HPV, high pressure valve; P, pump; W, waste.

【結果および考察】

NMDA 類縁化合物の二次元 HPLC 一斉分析法開発と生体内含量解析

神経活性 D-アミノ酸である *N*-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）及びその鏡像異性体である *N*-メチル-L-アスパラギン酸（NMLA）、構造類似体である *N*-メチルグルタミン酸（NMG）鏡像異性体を分析対象とする二次元 HPLC 一斉分析法を開発した。分析法構築に際し、生体試料を用いて一次元目の逆相分離条件を精査した結果、6%アセトニトリル 0.05% TFA 水溶液を移動相として用いた際に、各鏡像異性体の溶出時間に夾雑成分がほとんど認められず、良好な分離が得られた。二次元目の光学分割については、Pirkle 型カラムである Sumichiral OA-2500S、OA-2500R、KSAACSP-001S、KSAACSP-001R 及び陰イオン交換型カラムである Chiralpak QN-2-AX カラムの計 5 種のカラムにおいて両アミノ酸の良好な光学分割が可能であった。これらの 5 種の光学分割カラムより、Sumichiral OA-2500S カラムをメインカラムとして選択し、二次元 HPLC 一斉分析法を構築した。また、Sumichiral OA-2500R 及び Chiralpak QN-2-AX を用いて定量値の確認を行い、生体試料中の NMDA 類縁化合物の正確な同定・定量を可能とした。哺乳類及び二枚貝における含量解析を行った結果、ラット試料中には NMA、NMG 鏡像異性体が存在しなかったのに対し、アカガイには 170.1 nmol/g と高濃度の NMDA が内在した他、NMG 鏡像異性体も D 体 L 体共に存在した（Fig. 2）。ハマグリにおいても 29.3 nmol/g と比較的高濃度の NMDA が存在し、NMLG の内在も確認されたが、アサリには NMLG のみが存在し、貝によって NMDA 類縁化合物の含量に差が認められた（Fig. 3）。また、得られた結果を、更に高い選択性を有する二次元 HPLC-MS/MS システムを構築し確認した結果、夾雑成分の影響を受けることなく極めて良好な分析が可能であり、これらの生体試料において各鏡像異性体の内在が明確に確認された。今回の結果は、我々が食事を通して神経活性アミノ酸を摂取していることを示しており、今後は吸収や体内分布などの解明が期待される。

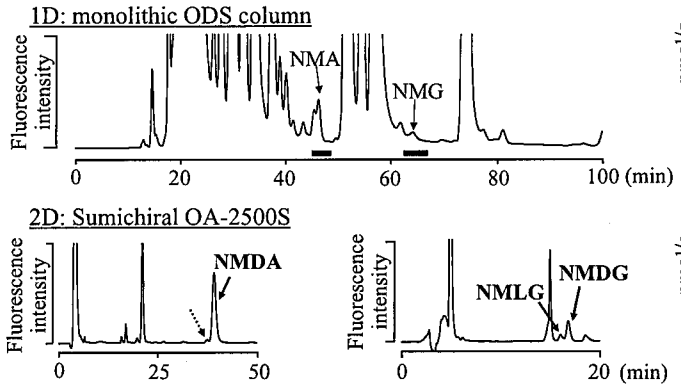

Fig. 2 2D-HPLC separation of NMA and NMG enantiomers in the mantle of S. broughtonii.

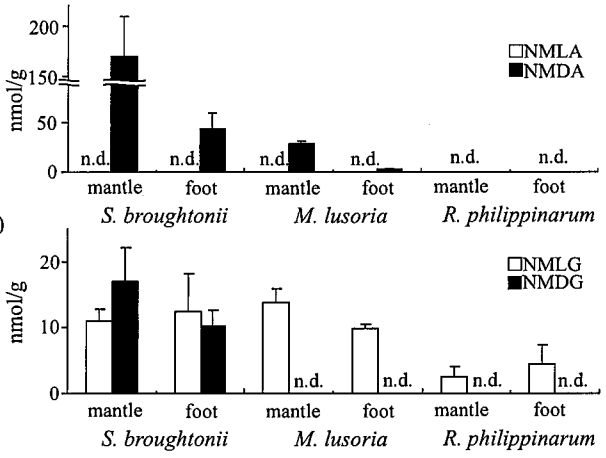

Fig. 3 Amounts of NMA and NMG enantiomers in the mantle and the foot of bivalves.

Phe、Tyr 及び DOPA 鏡像異性体の二次元 HPLC 一斉分析法開発と D-アミノ酸酸化酵素欠損に伴う含量変化解析

フェニルアラニン（Phe）、チロシン（Tyr）及びその代謝物である 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン（DOPA）鏡像異性体を対象とする二次元 HPLC 一斉分析法を開発した。一次元目の逆相分離は、移動相中アセトニトリル濃度のグラジエント溶離を使用することにより、分析対象の NBD-アミノ酸を 90 分以内で分離することが可能であった。二次元目の光学分割については、Sumichiral OA-2500S、-3100S、-3200S、-4100SR、-4700SR、KSAACSP-001S 及び Chiralpak QN-AX の計 7 種のカラムにおいて Phe、Tyr

及び DOPA 鏡像異性体のベースライン分離が可能であり、最も高い理論段数を有する KSAACSP-001S をメインカラムとして選択した。また、Sumichiral OA-2500S 及び Chiralpak QN-AX を用いて定量値の確認を行うことにより、生体試料中の Phe、Tyr 及び DOPA 鏡像異性体の正確な同定・定量を可能とした。本分析法によりマウス尿中含量の解析を行った結果、Phe 及び Tyr 鏡像異性体の存在が示された（Fig. 4）。一方、DOPA 鏡像異性体は検出されず、DL-DOPA 水溶液の腹腔内投与 2 時間後の尿中で、D-DOPA のみが検出された。また、D-アミノ酸酸化酵素（DAO）欠損に伴うマウス尿中の含量変化を解析した結果、コントロールマウスの尿において、Phe の%D（D-Phe/ Phe x 100）は 9.7±0.6%であったのに対し、DAO 欠損マウス尿中では 30.3±7.3%であり、有意な増加が認められた。また、コントロールマウス尿中における Tyr の%D は 4.4±0.4%、DAO 欠損マウス尿中では 10.1±2.5%であり、DAO 欠損に伴う%D の増加傾向が認められた（Fig. 5）。%D 値を用いることで、濃度による影響を受けることなく尿中アミノ酸含量変化を比較することが可能であり、キラル解析は尿試料分析において極めて有用であると考えられる。また、DAO は統合失調症や ALS など様々な疾患との関連が報告されていることから、生体内での DAO 活性変化を示す非侵襲的な指標が求められている。今回の検討で得られた D-Phe の含量変化は、その指標の 1 つとして活用できると考えられる。

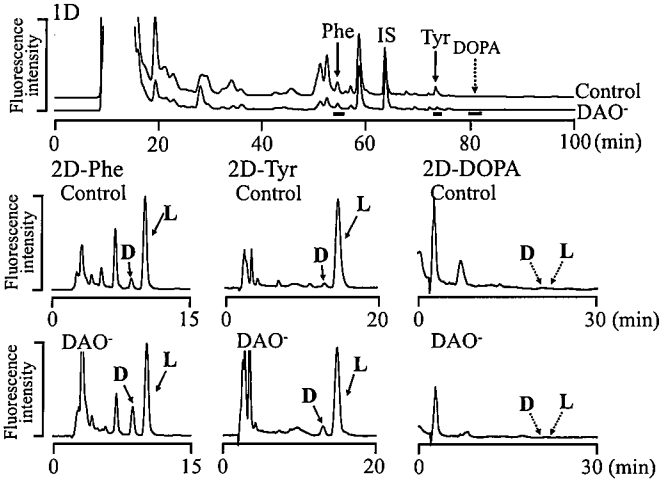

Fig. 4　2D-HPLC separation of Phe and Tyr enantiomers in the urine of control mouse and DAO deficient mouse.

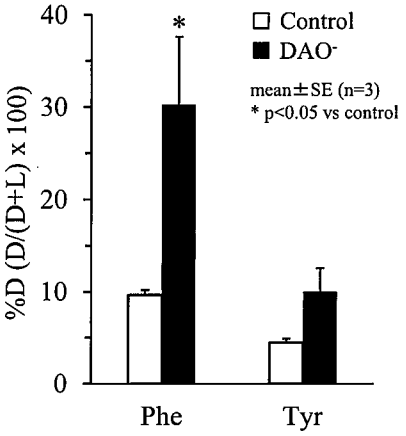

Fig. 5　%D-Phe and Tyr in the urine of control mice and DAO deficient mice.

<u>Cit 及び Orn 鏡像異性体の二次元 HPLC 一斉分析法開発と D-アミノ酸酸化酵素欠損に伴う含量変化解析</u>

尿素回路を構成するシトルリン（Cit）及びオルニチン（Orn）鏡像異性体を分析対象として二次元 HPLC 一斉分析法を構築した。一次元目の逆相分離には移動相中アセトニトリル濃度のグラジエント溶離を使用することにより、他のタンパク質構成アミノ酸からの良好な分離が得られた。二次元目の光学分割には、マウス尿試料において夾雑成分との良好な分離が可能であった KSAACSP-105S カラムを用いた。本分析法を用いて、DAO 欠損に伴う尿中含量変化の解析を行った結果、コントロールマウス及び DAO 欠損マウスの双方において、Cit 及び Orn 鏡像異性体の存在が示された（Fig. 6）。これらの結果を確認するため、更に高選択的な分析を可能とする二次元 HPLC-MS システムを構築して同試料の分析を行った結果、マウス尿中に Cit 及び Orn 鏡像異性体が存在することが明確に示された。コントロールマウスの尿中において、Cit の%D は 11.2±2.9%であったのに対し、DAO 欠損マウスの尿中では、42.9±2.8%であり、DAO 欠損に伴う $p<0.01$ の有意な増加が認められた。また、Orn に関しては、コントロールマウス尿中

における%D が 38.8±10.8%、DAO 欠損マウス尿中における%D は 67.2±0.8%であり、Orn についても、DAO 欠損に伴う尿中%D の増加傾向が確認された（Fig. 7）。D-Cit の含量変化は D-Phe の含量変化とともに生体内における DAO 活性評価のための非侵襲的な指標の１つとして活用することが可能であると考えられる。

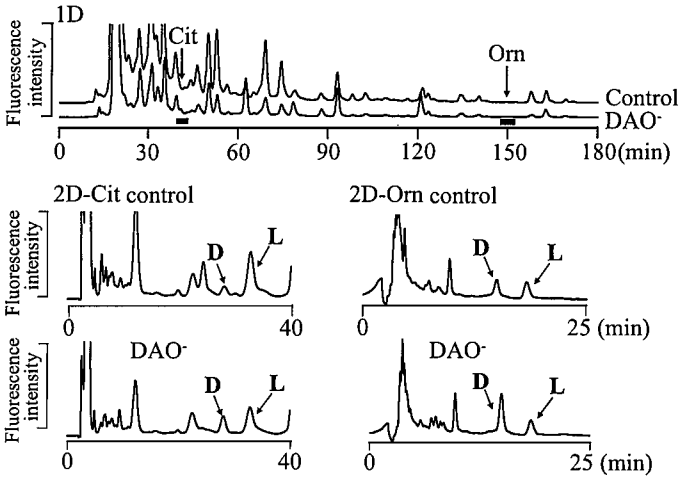

Fig. 6　2D-HPLC separation of Cit and Orn enantiomers in the urine of control mouse and DAO deficient mouse.

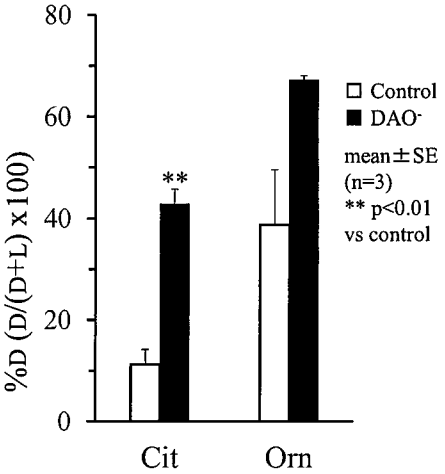

Fig. 7　%D-Cit and Orn in the urine of control mice and DAO deficient mice.

【結語】

本研究では、非タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体を分析対象に含む二次元 HPLC 一斉分析法、二次元 HPLC-MS 法及び二次元 HPLC-MS/MS 法を開発し、多量の夾雑成分が存在する生体試料において高感度かつ高選択的な代謝関連キラルアミノ酸の分析を可能とした。構築した分析法を用いて含量解析を行った結果、生体内に非タンパク質構成 D-アミノ酸が存在することが示された。また、DAO 欠損に伴う尿中 Phe 及び Cit の%D が有意に増加することが明らかになり、生体内 DAO の活性変化を示す非侵襲的な指標としての活用が可能であると考えられる。今後は更なる分析対象の拡大とともに、これらのアミノ酸鏡像異性体の生理的意義、体内分布や合成・代謝経路、疾患による含量変化解析など、キラルアミノ酸メタボロミクスへの幅広い貢献が期待できる。

【発表論文】

・**Reiko KOGA**, Yurika MIYOSHI, Eiichi NEGISHI, Tsuneaki KANEKO, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE: Enantioselective two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of *N*-methyl-D-aspartic acid and its analogues in mammals and bivalves, *Journal of Chromatography A*, **1269**, 255-261 (2012).

・**Reiko KOGA**, Yurika MIYOSHI, Yu SATO, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE: Enantioselective determination of phenylalanine, tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in the urine of D-amino acid oxidase deficient mice using two-dimensional high-performance liquid chromatography, *Chromatography*, **37**, 15-22 (2016).

・**Reiko KOGA**, Yurika MIYOSHI, Yu SATO, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Kenji HAMASE: High-sensitive two-dimensional HPLC determination of citrulline and ornithine enantiomers in the urine of D-amino acid oxidase deficient mice, *Journal of Chromatography A*, in preparation.