

## 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）

氏 名	古賀 鈴依子
論 文 名	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
論文調査委員	主 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 瀧瀬 健司 副 査 九州大学大学院 薬学府 教授 植田 正 副 査 九州大学大学院 薬学府 准教授 山田 健一 副 査 慶應義塾大学 薬学部 教授 金澤 秀子

### 論文審査の結果の要旨

分析技術の向上に伴い、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。比較的体内含量の高い D-セリンや D-アスパラギン酸などのタンパク質構成アミノ酸については、D 体が L 体と異なる生理機能を有することに加え、体内分布や代謝も異なることが報告されている。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。これらの非タンパク質構成アミノ酸鏡像異性体は、タンパク質構成アミノ酸と比較して D 体、L 体ともに体内含量が極めて低いことから分析が一層困難であり、鏡像異性体を区別した体内含量や合成・代謝経路などについて詳細な検討が進んでいないのが現状である。一方で近年、タンパク質構成アミノ酸については神経疾患や腎疾患など様々な疾患において D 体と L 体が異なる含量変化を示すことも報告されており、タンパク質構成アミノ酸及び代謝関連アミノ酸光学異性体を網羅したキラルアミノ酸メタボロミクスを基盤とする創薬や診断への展開が期待されている。そこで申請者は、アミノ酸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、*N*-メチルアスパラギン酸 (NMA) 及び *N*-メチルグルタミン酸 (NMG) 鏡像異性体、フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr) 及び 3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) 鏡像異性体、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する三つの二次元 HPLC 一斉分析法を開発した。生体試料中の微量アミノ酸鏡像異性体の検出及び定量には高い感度と選択性が要求されるため、アミノ酸を 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) で蛍光誘導体化し、逆相分離と光学分割を組み合わせた二次元 HPLC を用いて分析法の構築を行った。一次元目の逆相分離には、キャピラリーモノリス型 ODS カラムを用い、光学分割カラムについては複数の Pirkle 型及び陰イオン交換型カラムを用いて光学分割条件を検討し、各分析系に適した光学分割カラムを選択した。各分析法についてそれぞれ定量性、再現性及び真度の評価を行った結果、いずれも良好な値を示し、高選択的二次元 HPLC 一斉分析法開発が達成された。

*N*-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) はホルモン分泌制御などの多彩な機能を有する神経活性 D-アミノ酸であり、鏡像異性体である NMLA や構造類似体である NMG 鏡像異性体とともに、種々の海洋生物や哺乳類における内在が報告されている。しかしながら、これらの NMDA 類縁化合物の体内含量はごく微量であることから正確な検出や定量は困難であり、その詳細な体内分布や挙動は未だほとんど明らかにされておらず、高感度高選択的分析法の開発が望まれていた。構築した分析法を用いて二枚貝及び哺乳類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。一方、アカガイには高濃度の NMDA が内在した他、NMG 鏡像異性体も存在し、貝により NMDA 類縁化合物の含量に差があることも示された。また、これらのアミノ酸鏡像異性体の内在を確認するため、更に高い選択性を有する二次元 HPLC-MS/MS 法を構築して分析を行った結果、夾雑成分の影響を受けることなく良好な分析が可能であり、二枚貝における

NMDA 類縁化合物の内在が明確に示された。

Tyr 及び DOPA は哺乳類体内において Phe の代謝によって生合成される。これらのアミノ酸は、いずれも D 体と L 体を区別することなく診断や治療の指標として用いられているが、鏡像異性体を区別した生体内分布や合成・代謝経路などは未だほとんど明らかにされておらず、鋭敏な新規診断指標の探索へつながるキラルメタボロミクス解析を可能とする分析法の開発が切望されていた。構築した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。DOPA 鏡像異性体に関しては検出されず、DL-DOPA 水溶液の腹腔内投与 2 時間後の尿中において、D 体のみが検出された。また、生体内における代謝経路解明の一端として、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、DAO 欠損により、Phe の %D ( $D\text{-Phe} / \text{Phe} \times 100$ ) の有意な増加が認められ、D-Phe が生体内において DAO による含量制御を受けていることが明らかにされた。

尿素回路を構成する Cit 及び Orn はサプリメントなどとしても利用されている身近な機能性アミノ酸であり、アミノ酸代謝障害の一種である尿素サイクル異常症において診断指標として用いられている。しかしながら、これまでに述べた代謝関連アミノ酸と同様に、鏡像異性体を区別した生体内分布や合成・代謝経路などは未だほとんど明らかにされておらず、その解析を可能とする分析法が望まれていた。構築した分析法を用いて DAO 欠損に伴う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、尿中に Cit 及び Orn 鏡像異性体の存在が認められた。また、二次元 HPLC-MS システムを構築し分析を行った結果、これらの鏡像異性体がマウス尿中に存在することが明確に示された。また、DAO 欠損に伴い、尿中 Cit の %D が有意に増加し、生体内において D-Cit が DAO による含量制御を受けていることが示された。

本研究において構築した分析法により、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分析が達成された。構築した分析法を用いて含量解析を行った結果、NMDA や NMDG、D-Phe、D-Tyr、D-Cit、D-Orn などの代謝関連アミノ酸の D 体が実際に生体内に存在することが示され、今後は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貢献が期待できる。また、DAO 欠損に伴いマウス尿中の Phe 及び Orn の %D が有意に増加することが明らかとなり、生体内においてこれらのアミノ酸が DAO による含量制御を受けていることが示唆された。また、これらの尿中含量変化は、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生体内 DAO の活性変化を反映する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。以上のことから、申請者は博士 (創薬科学) の学位を取得するのにふさわしいと判断した。