

哺乳類におけるD-アラニンの昼夜変動解析とD, L-アミノ酸迅速一斉分析法の開発

唐川, 幸聖

<https://hdl.handle.net/2324/1470550>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 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）

哺乳類における D-アラニンの昼夜変動解析と D,L-アミノ酸迅速一斉分析法の開発

創薬育薬産学官連携分野 3PS11012W 唐川 幸聖

【序論】

タンパク質構成アミノ酸には、グリシンを除き、D 体、L 体のエナンチオマーが存在するが、一般にアミノ酸と言われるものは L 体のアミノ酸を示し、D 体のアミノ酸は細菌などの下等生物を除き生体内に存在しないと考えられていた。しかし近年、光学分割および微量分析技術の進歩により、哺乳類やヒトにおいても D-アミノ酸が存在し、生体内で L-アミノ酸とは異なる新規の生理活性を有することが次々と明らかにされている。現在、D-アミノ酸研究においては、機能解明と合わせて生体内での由来や取り込み、代謝、排泄機構を明らかにしていくことが切望されている。

これまでに当研究室では D-Ala 研究に有用な分析技術として生体試料中微量 D-Ala を高感度かつ選択的に定量可能な二次元 HPLC (2D-HPLC) システムを開発し、ラット血漿及び組織中 D-Ala が明期 (休息期) に高く暗期 (活動期) に低い日内変化を示すことを明らかにしている。しかし、この D-Ala の昼夜含量変化の調節機構は未解明であった。そこで本研究ではまず D-Ala の昼夜変動に着目し、D-Ala の由来及び含量制御メカニズムの解明を行った。また、D-アミノ酸の生体内での有用な機能が明らかになると D-アミノ酸を摂取するための食品開発も必要となる。そこで、様々な食品中の D-アミノ酸含量をスクリーニングするための D,L-アミノ酸迅速一斉分析法 (CD 法) を開発した。さらに、食品だけでなく生体内の微量な D-アミノ酸もより迅速に分析するための高感度、高選択的な D,L-アミノ酸迅速一斉分析法 (LC-MS/MS 法) についても併せて開発を行った。

【方法】

D-Ala の昼夜変動解析においては、ラットおよびマウスの血漿/血清、組織試料にメタノールを加えてホモジナイズ、遠心分離して除タンパクを行い、得られた上清を回収して減圧乾固し、ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH 8.0) に再溶解した。アセトニトリルに溶解した誘導体化試薬 NBD-F を加え、60℃で 2 分間反応させた後、5% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を加えて反応を停止させ HPLC 分析用の試料とした。本試料を逆相マイクロカラムとキラルカラムを連結した二次元 HPLC システムにより分析した。

超高速 HPLC-円二色性検出器を用いる分析法においては、食品サンプルをスルホサリチル酸処理と 10 K フィルターろ過により、除タンパクと脱脂を行い、固相抽出カラム (カチオン交換樹脂) を用いてアミノ酸を抽出、濃縮した。ホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH9.0) にサンプル溶液を加え、NBD-F/アセトニトリル溶液を加えて混合し、60℃で 1 分間反応させた後、1M HCl 水溶液を加えて分析試料とした。

LC-MS/MS を用いる分析法においては、ラット血漿および組織にアミノ酸安定同位体混合液 (内標準) を加えてアセトニトリルまたはメタノールで除タンパクした。上清を回収してホウ酸-NaOH 緩衝液 (pH8.8) および AccQ-Tag™ または TAHS/アセトニトリル溶液を加えて、55℃で 10 分間反応させた後、0.1%ギ酸水溶液を加えて分析試料とした。

【結果および考察】

哺乳類における D-アラニンの由来及び昼夜変動の制御因子解析

これまでにラット血漿及び組織中 D-Ala が明期（休息期）に高く暗期（活動期）に低い昼夜変動を示すことが明らかとなっているが、この変動メカニズムは未解明である。そこで本研究では、D-Ala の由来ならびに昼夜変動の制御機構を解析した。まず大腿静脈カニューレラットを用い、同一個体のラットにおいて D-Ala 昼夜変動が規則正しく継続されることを確認した。さらに、絶食条件下においても本変動が維持され、食餌による影響を受けないことを明らかにした。次に、D-アミノ酸化酵素 (DAO) の影響を検討するため、DAO 活性を欠損したマウス (ddY/DAO⁻マウス) を用いて昼夜変動を解析した。その結果、ddY/DAO⁻マウスにおいても明確な昼夜変動を認め、DAO 活性が昼夜変動に関与していないことが明らかとなった。さらに、腸内細菌の影響を検討するため、無菌マウスの昼夜変動を解析した結果、無菌マウスにおいては D-Ala 含量が顕著に低く、昼夜変動も認められないことが明らかとなった (Fig. 1)。本結果から腸内細菌が内在性 D-Ala の主な由来であり、昼夜変動の発現に必須であることを示した。また、腸内細菌から D-Ala が生体内に取り込まれる段階に着目し、腸管における D-Ala 昼夜含量を解析した結果、腸管内容物中 D-Ala 含量には昼夜で明確な差を認めなかったのに対し、腸組織においては明確な昼夜変動が存在し、D-Ala が腸管に取り込まれる段階で昼夜変動が発現していることを明らかにした (Fig. 2)。今後、腸管における D-Ala 取り込みに関わるトランスポーターの同定やその発現制御機構の解明により、D-Ala 昼夜変動の発現メカニズム、生理的意義の解明に有用な知見が得られると考えている。

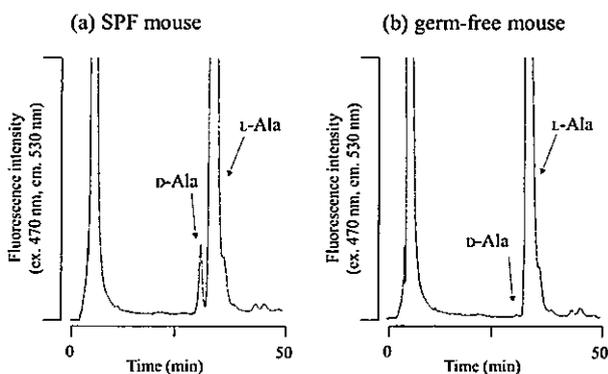


Fig. 1 Determination of D-Ala in the plasma at 13:00 of an SPF mouse (a) and a germ-free mouse (b)

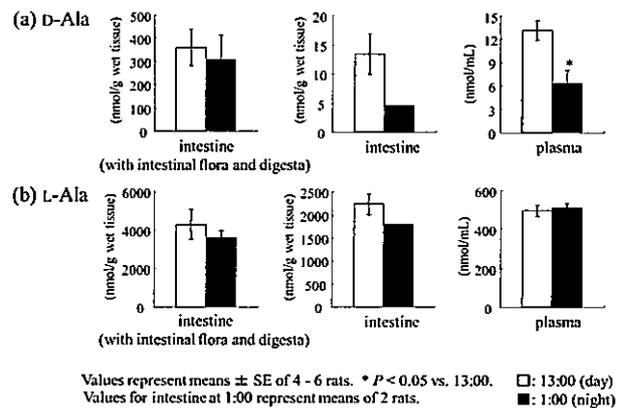


Fig. 2 Day-night changes of D-Ala (a) and L-Ala (b) amounts in the rat intestine (including intestinal flora and digesta), intestinal tissue, and plasma

超高速 HPLC-円二色性検出器を用いる D,L-アミノ酸迅速一斉分析法の開発

D-アミノ酸を摂取するための D-アミノ酸高含有食品の探索ならびに D-アミノ酸含有食品の開発において、様々な食品中の D-アミノ酸をスクリーニングするための迅速一斉分析法が必要となる。本研究では、円二色性検出器 (CD 検出器) と超高速 HPLC (UHPLC) を組み合わせ、タンパク質構成アミノ酸 20 種を一斉かつ短時間で D 体 L 体の情報を加味して分析可能な方法を開発した。

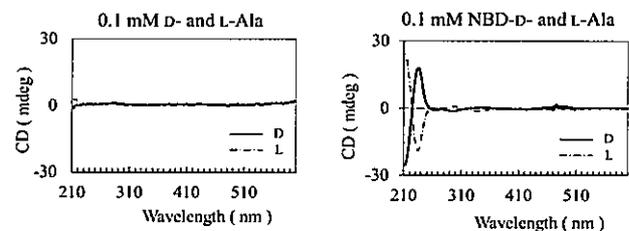


Fig. 3 CD spectra of free and NBD-derivatized amino acids

CD 検出器でのアミノ酸検出感度を向上させるため、プレカラム誘導体化試薬を検討し、NBD 誘導体で CD 検出感度を向上させることができた (Fig. 3)。CD 検出器を用いることでカラムでの光学分割が不要となる。そこで、高速分析用の逆相カラ (Ascentis Express C18 (2.1 mm I.D.×100 mm, 2.7 μm)) を用いて分析条件を検討し、短時間 (5.5 分) で 20 種のアミノ酸を一斉分離する条件を確立した (Fig. 4)。また、本分析法を食品に適用するための前処理条件を確立し、D-アミノ酸が多く含まれることが知られている発酵食品の分析を行った。その結果、%D が 5% 以上のアミノ酸を良好に定量することが可能であり、黒酢、乳酸菌飲料、ヨーグルト中の D-アミノ酸 (D-Ser, D-Asp, D-Glu, D-Ala, D-Met) について、既存の D-アミノ酸分析 (OPA 法) とよく一致する結果が得られた。本分析法は、発酵食品のような D-アミノ酸含量の多い食品中の D,L-アミノ酸を簡便かつ迅速に一斉分析可能であり、今後、様々な食品中の D-アミノ酸スクリーニングに適用することで、D-アミノ酸含有食材の探索、新規機能性食品の開発に貢献できると考えている。

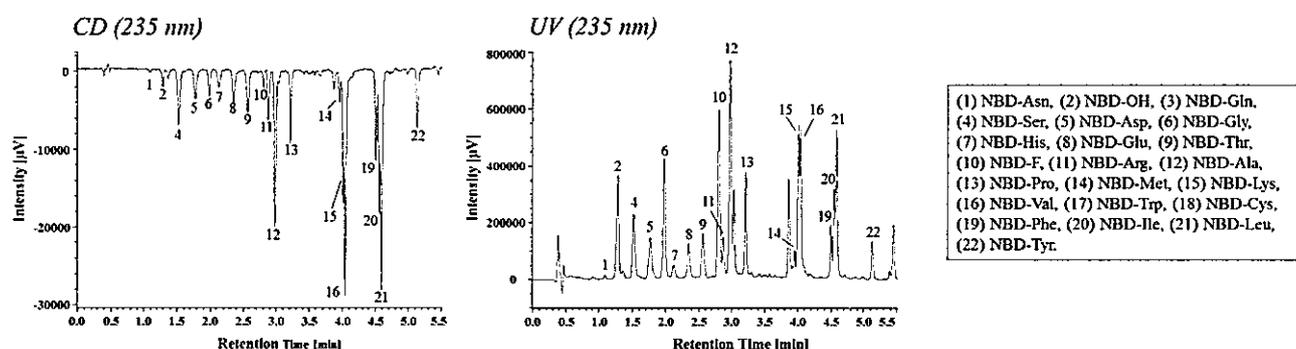


Fig. 4 Chromatograms of NBD-amino acids in Japanese black vinegar

LC-MS/MS を用いる D,L-アミノ酸高感度分析法の開発

生体内における D-アミノ酸機能研究をさらに加速させるためには、生体内の D-アミノ酸を高感度かつ高選択的に迅速分析する方法が必要になる。本研究では、生体内における機能が着目されている D-Ala, D-Asp, D-Ser とその L 体について LC-MS/MS 法による分析法を開発した。まず、MS/MS 分析に適した誘導体化試薬 3 種 (APDS, AccQ-TagTM, TAHS) を用いて D,L-アミノ酸をプレカラム誘導体化し、各 D,L-アミノ酸誘導体の光学分割に適したキラル固定相を検討した。その結果、CHIRALPAK[®] ZWIX (+) カラムを用いることで AccQ-TagTM 誘導体を 10 分、TAHS 誘導体を 20 分で一斉分析する条件が確立できた (Fig. 5)。

確立した分析法について性能を評価した結果、まずアミノ酸混合標準液を用いる評価において良好な精度、直線性が確認できた。D 体の定量下限濃度 (LLOQ) は 0.1 μM、定量範囲は 0.1 – 500 μM であった。次に、血漿分析に適用した結果、精度、添加回収率ともに良好な結果を得た。また、最も感度の良かった TAHS 誘導体を用いてラット血漿および組織中の D,L-アミノ酸含量を解析し (Fig. 6)、これまでに報告されている D-アミノ酸含量

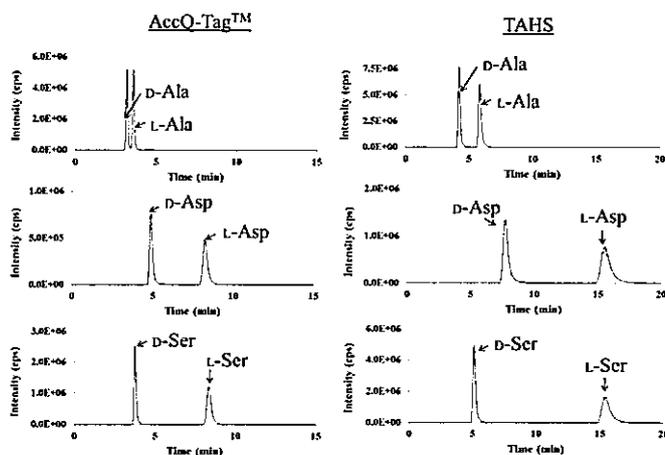


Fig. 5 Mass chromatograms of amino acids derivatized with AccQ-TagTM, TAHS

と一致する結果が得られた。

今後、本分析法は生体内における D-アミノ酸の機能解析や疾病における含量変化解析などに活用できると考えている。

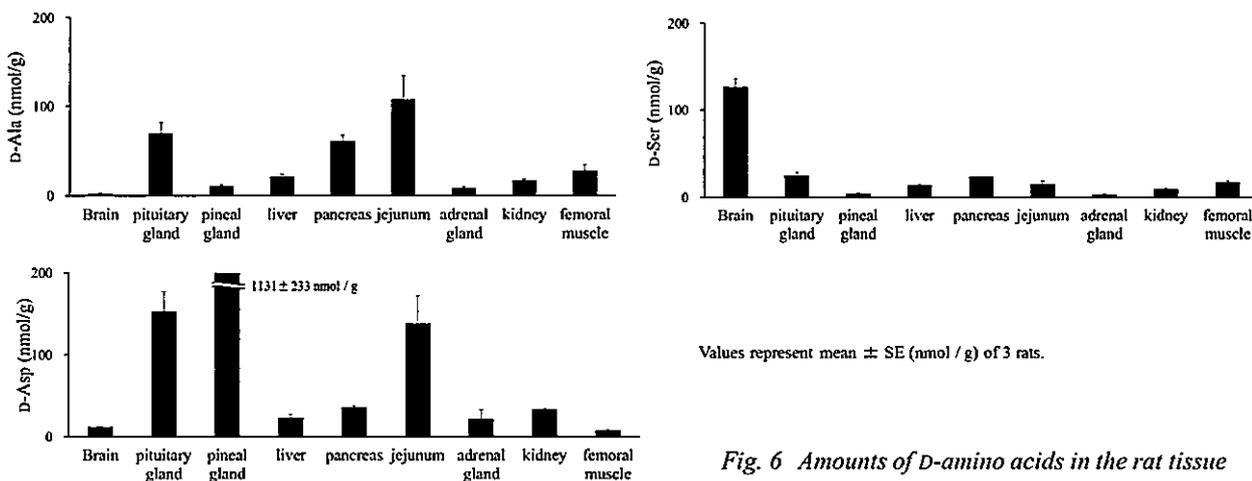


Fig. 6 Amounts of D-amino acids in the rat tissue

【発表論文】

1) High-throughput comprehensive analysis of D- and L-amino acids using ultra-high performance liquid chromatography with a circular dichroism (CD) detector and its application to food samples.

Eto S, Yamaguchi M, Bounoshita M, Mizukoshi T, Miyano H.

J. Chromatogr. B, 879 (2011) 3317-3325.

2) Two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of day-night variation of D-alanine in mammals and factors controlling the circadian changes.

Karakawa S, Miyoshi Y, Konno R, Koyanagi S, Mita M, Ohdo S, Hamase K.

Anal. Bioanal. Chem. 405 (2013) 8083-8091.

3) High-throughput analysis of D- and L-amino acids using pre-column derivatization and LC-MS/MS system and its application to rat plasma and tissue.

Karakawa S, Shimbo K, Yamada N, Miyano H, Mita M, Lindner W, Hamase K.

J. Pharmaceut. Biomed. Anal. in preparation.