

# キラルアミノ酸の二次元LC-MS/MS精密定量法開発と D-アミノ酸酸化酵素欠損および腎機能低下による内 在性含量変化

石井, 千晴

<https://hdl.handle.net/2324/4475050>

---

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	石井 千晴			
論文名	キラルアミノ酸の二次元 LC-MS/MS 精密定量法開発と D-アミノ酸酸化酵素欠損および腎機能低下による内在性含量変化			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	濱瀬 健司
	副査	九州大学	教授	植田 正
	副査	九州大学	教授	小柳 悟
	副査	北里大学	名誉教授	本間 浩

### 論文審査の結果の要旨

生体はL-アミノ酸のみを利用すると考えられてきたが、近年ヒトを含む哺乳動物において種々の微量 D-アミノ酸が発見されている。D-セリン (Ser) をはじめ比較的高濃度存在する D-アミノ酸については、L 体と異なる体内分布や含量制御機構、生理機能を有することに加え、疾患の進行に伴う含量変化を示すものも報告されていることから、新規生理活性物質および診断マーカーとして注目されている。近年では微量分析技術の進歩によって、哺乳類中で様々なタンパク質構成アミノ酸の D 体が極めて微量に存在することも明らかにされており、幅広いアミノ酸を対象とした含量制御機構や疾患との関連解析が期待されている。しかし内在性微量 D-アミノ酸の分析に際しては、多種多様な生体成分の共溶出による定量妨害が頻繁に発生するため正確な定量が困難な場合が多い。このような選択性の問題を解決する手段としては、複数の異なる分離モードを用いる多次元分析が有効である。特に逆相分離と光学分割を組み合わせる多次元のクロマトグラフィー分離および質量分離を統合することで更なる選択性向上が期待でき、すべての装置をオンラインで接続することで試料損失による感度低下を起こさずに一度のインジェクト操作で対象アミノ酸の全自動一斉分析が可能である。そこで申請者は哺乳類で D 体の存在が認められている代表的な 10 種のアミノ酸を対象として、全自動精密定量を可能とする二次元キラル LC-MS/MS 法の開発を行い、哺乳類における血中キラルアミノ酸含量を解析した。

分析対象としてはアラニン (Ala)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、ロイシン (Leu)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、プロリン (Pro)、Ser およびバリンを選択し、血漿試料はメタノールを用いて除タンパク操作を行った後に分析に使用している。アミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)による誘導体化の後、HPLC で分析した。全自動二次元 LC-MS/MS システムは、微粒子充填型マイクロ ODS カラム Singularity RP18 (1.0 x 500 mm)およびPirkle型セミマイクロ光学分割カラム Singularity CSP-001S (1.5 x 150 mm)を用いた LC 分離と、三連四重極型質量分析装置 (Triple Quad 5500, Positive ion mode, MRM) を用いた検出を接続することにより構築した。

10 種のアミノ酸を対象とした全自動二次元 LC-MS/MS システムの構築に際しては、各次元の分離、検出条件を精査している。その結果、一次元目では 0.05%トリフルオロ酢酸を含む 10-30%アセトニトリル水溶液 (30  $\mu$ L/min) を移動相として、270 分以内にすべての分析対象 NBD-アミノ酸の相互分離および他の夾雑成分からの粗精製が可能であった。六方バルブの切替えにより分取した各アミノ酸画分を自動で二次元目へ導入した結果、0.075-0.2%ギ酸を含むアセトニトリルとメタノールの混液 (50/50 または 75/25、200  $\mu$ L/min) を移動相として、30 分以内に各アミノ酸の良好な光学分割が可能であった ( $R_s \geq 1.38$ )。MS/MS による検出条件を検討した結果すべての NBD-アミノ酸が十分な感度で検出され、一度のインジェクション操作でキラルアミノ酸の高選択的一斉分析を可能とする二次元 LC-MS/MS システムを構築可能であった。本分析法を用いて標品アミ

ノ酸およびヒト血中キラルアミノ酸の分析を行った結果、定量性、再現性および真度について良好な値が得られた。Ala、Pro および Ser については明瞭な D 体のピークが認められ (%D=0.5, 0.3, 1.7%)、Asp、Leu、Lys および Phe についても D 体の溶出時間に定量下限以下のピークが確認された。

また、申請者は哺乳類内在性 D-アミノ酸の含量制御機構として D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) に着目し、開発した二次元 LC-MS/MS 法を用いて様々なモデル動物の血中キラルアミノ酸含量を測定した。モデル動物としては、正常な酵素活性を有する C57BL/6J マウスと F344 ラットおよび酵素活性を欠損した B6DAO<sup>-/-</sup>マウスと F344-*Dao*<sup>ldao</sup> ラットを用いている。その結果、すべての試料において夾雑成分による妨害を受けずにキラルアミノ酸の高選択的一斉分析が達成された。DAO 活性を欠損した B6DAO<sup>-/-</sup>マウスの血中では、正常な酵素活性を有する C57BL/6J マウスと比較して D-Ala、D-Leu、D-Met、D-Phe、D-Pro および D-Ser においてそれぞれ 4-40 倍程度の有意な含量増加が認められた (P<0.01)。これらの D-アミノ酸は DAO 活性を欠損した F344-*Dao*<sup>ldao</sup> ラットの血中においても正常な酵素活性を有する F344 ラットと比較して 2-20 倍程度の有意な含量増加を示すことが確認された (P<0.01)。従来報告では、偶発的に DAO 活性を欠損した変異個体から樹立された ddY/DAO<sup>-/-</sup>マウスや LEA/Tohm ラットを用いて内在性キラルアミノ酸の含量解析が行われてきたが、今回の検討では DAO 活性を有する動物および活性を欠損した動物について DAO 以外の遺伝的バックグラウンドを同一にしたモデル動物を使用した。従って、今回の結果から DAO 活性の有無により生じる内在性キラルアミノ酸の含量変化を正確に評価可能であり、上述した 6 種の中性 D-アミノ酸について内在性含量調節に DAO が大きく寄与していることが明らかになった。

更に申請者は D-アミノ酸の臨床利用を目的とし、幅広いキラルアミノ酸を対象として慢性腎臓病 (CKD) との関連解析および新規診断マーカー候補の探索を行うため、二次元 LC-MS/MS 法を用いて健常人および CKD 患者の血中キラルアミノ酸含量を解析している。10 種のアミノ酸について、健常人 5 名を対象として異なる 4 日間の血中含量を解析した結果、すべての D-アミノ酸含量が一定の低濃度範囲内に制御されていることが確認された。これに対し軽度 (I)、中程度 (II) および重度 (III) 腎障害群に分類した CKD 患者の血中では、すでに報告されている D-Ser、D-Ala および D-Pro について今回の検討でも腎機能低下に伴う %D 値の増加が認められ、二次元 LC-MS/MS 法が腎機能診断に適用可能であることが示された。加えて今回の検討では数種の微量 D-アミノ酸についても腎機能低下に伴う %D 値の増加または増加傾向が新たに認められ、中程度 (II) または軽度 (I) 腎障害群においても健常人群との有意な含量差が認められたキラルアミノ酸も存在した。これらの D-アミノ酸は腎機能診断における鋭敏な指標として利用価値が高いと考えられ、今後は検体数を増加させた更なる検討および臨床応用が期待される。

以上のように、本論文は新規機能性分子やバイオマーカーとして着目されるキラルアミノ酸について、世界に先駆けて四次元の分離軸を有する分析法を開発したもので、超微量な D-アミノ酸について精密定量を可能としている。内在性含量の制御についての新知見を得ると共に、腎機能低下時における血中含量変化を解析し、世界で初めてとなる鋭敏な腎機能バイオマーカーの発見も報告している。本研究の学問的価値は極めて高く、申請者は博士 (創薬科学) の学位に値すると認める。