

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20721

研究課題名（和文）加齢性疾患の診断・治療標的探索を目指した異性化アミノ酸残基の四次元LC分析法開発

研究課題名（英文）Development of a multi-dimensional LC method for the analysis of D-amino acid residues in proteins focusing on the screening of new diagnostic marker/therapeutic target in age-related diseases

研究代表者

石井 千晴 (Ishii, Chiharu)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90905308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：白内障やアルツハイマー病を始めとする加齢性疾患の新規診断法・治療標的を探索するため、病変タンパク質中D-アミノ酸残基の網羅的精密定量を可能とする分析法開発を行った。所属研究室が有する独自技術（特許4980740号、6296382号、US-9266826等）を駆使して本研究で新たに開発した分析法は、従来法の課題であった分析対象の網羅性や測定値の正確性不足を解決可能であった。九州大学病院眼科と協力して白内障患者の水晶体検体を収集し、実際の老化組織におけるD-アミノ酸残基の含量解析を行った結果、これまで測定困難であったアミノ酸残基についても精密定量が達成され、異性化したアミノ酸残基を新たに発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白内障・アルツハイマー病などの加齢性疾患は根本的治療法が未確立なものが多く、早期診断法や新規治療標的の発見が人々の健康寿命延長・患者のQOL向上につながる。アミノ酸残基異性化は当該タンパク質の変性・機能変化を惹起することから、加齢性疾患の診断指標・治療標的候補として近年注目を集めているが、網羅的かつ正確な分析法の欠如により研究は停滞していた。本研究の遂行により、従来は測定困難であった残基を含め、世界に先駆けて加齢性疾患の病変タンパク質におけるアミノ酸残基の網羅的キラル識別分析が達成された。新たに発見した異性化残基は、今後疾患の診断マーカー・治療標的としての利用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The analytical method for the comprehensive and precise determination of D-amino acid residues in peptides/proteins was developed to find new diagnostic markers and/or therapeutic targets of age-related diseases, such as cataract and Alzheimer's disease. Using the newly developed method (containing previously-established our patents, no. 4980740, 6296382, US-9266826 etc.), the enantioselective analysis of various amino acid residues in proteins could be achieved. And the presence of several D-amino acid residues was demonstrated in proteins derived from human cataract patients, which is the possible diagnostic markers and/or therapeutic targets of age-related diseases.

研究分野：分析化学

キーワード：加齢性疾患 タンパク質 アミノ酸残基異性化 多次元HPLC 質量分析

1. 研究開始当初の背景

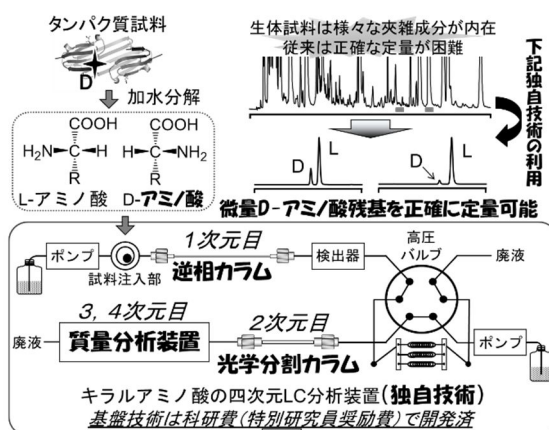
生体内のタンパク質は、L-アミノ酸のみによって構成されると考えられてきた。しかし近年、分析技術の進歩により白内障やアルツハイマー病、動脈硬化等の病変タンパク質中で D 型のアスパラギン酸 (Asp) 残基が発見されている。加齢に伴うアミノ酸残基の異性化はタンパク質の構造・機能変化を惹起することから様々な疾患に関連すると考えられており (Nature 262 (1976) 279, Nature 268 (1977) 71 等)、D-アミノ酸残基は加齢性疾患の新たな診断マーカー・治療標的候補として注目されている。一方で、従来の分析法は対象アミノ酸の網羅性や測定値の正確性に課題を有し、殆どの研究は D-Asp 残基のみに焦点が当てられていた。Asp 以外のアミノ酸についても、D 型残基の生成はタンパク質の機能変化や劣化・老化を招くと考えられ、タンパク質構成アミノ酸を網羅的にキラル識別可能な精密分析法の開発が切望されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「加齢性疾患の新規診断法・治療標的を探索するためにタンパク質中 D-アミノ酸残基の網羅的精密分析法を開発し、人々の健康寿命延長に貢献すること」である。我々はこれまで、幅広い D 型残基の精密定量を可能とする分析技術を開発しており (J. Chromatogr. A 1570 (2018) 91, Chromatography 41 (2020) 1 等)、様々な劣化モデルタンパク質中で D-Asp のみならず D-セリン (D-Ser) の存在も確認している。また、予試験的に九州大学病院眼科との共同研究により白内障患者の水晶体組織を分析した結果、これまで未報告であった D-アミノ酸残基を認めた。そこで我々は、タンパク質構成全アミノ酸を対象とする精密一斉分析法の開発が停滞する当該研究領域における突破口となり、白内障やアルツハイマー病をはじめとする様々な加齢性疾患の診断マーカー・治療標的の探索に貢献できると確信し、本研究の着想に至った。詳細な原因が未解明で根本的治療法の欠如するこれらの加齢性疾患において、D 型残基はタンパク質の変性・機能変化に関与する可能性が高く、全てのアミノ酸残基を対象とした一斉キラル分析が切望される。本研究の推進は、現代社会の課題である加齢性疾患に全アミノ酸残基の異性化という従来に無い視点を与え、新たな診断法・治療標的の探索に貢献できる。

3. 研究の方法

D-アミノ酸残基の生成とタンパク質の劣化および加齢性疾患との関連を解析するため、研究前半では申請者等が有する独自技術 (特許 4980740 号、6296382 号、US-9266826 等) をさらに発展させ、D 型残基を網羅的かつ正確に定量可能な四次元 LC 分析法 (図 1) を新たに開発した。予備検討の結果、二次元キラル HPLC と重塩酸加水分解および質量分析を統合した四次元 LC 分析技術は、従来法の課題であった分析対象の網羅性および測定値の正確性不足を解決可能であると期待された。そこで、分析対象アミノ酸残基の網羅性向上を図るとともに、分析困難だったアミノ酸の試料前処理法や光学分割カラムの高性能化を検討した。研究後半では開発した方法を用いて実際のタンパク質試



対象アミノ酸残基の網羅性向上、加齢性疾患への適用が切望

図 1 研究方法の概略

料を分析し、実用性の評価と問題点の抽出、改良を行うことで、様々なタンパク質構成アミノ酸残基を対象とした精密一斉キラル分析を実現した。また、臨床検体から採取した病変・老化タンパク質試料の分析を行い、加齢性疾患の新規診断マーカーや治療標的となり得るアミノ酸残基の探索を行った。

4. 研究成果

タンパク質中 D-アミノ酸残基の網羅的精密定量を可能とするため、代表的なタンパク質構成アミノ酸について四次元 LC 分析技術を構築するとともに、これまで測定困難であったアミノ酸残基（アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、システイン（Cys）、ロイシン（Leu）連鎖異性体）について各種分析条件を精査した。これらのアミノ酸はペプチドや劣化タンパク質中で D 型残基として存在が報告されているものもあり、創薬・診断領域において正確な分析法開発が期待されている。

代表的なタンパク質構成アミノ酸を対象とする四次元 LC 分析システムの構築

アミノ酸残基の一斉分析に際して、本研究ではタンパク質を酸加水分解し、得られた遊離アミノ酸を高感度・選択的に検出可能な四次元 LC 分析システムを開発した。哺乳類試料中で D 体の存在が確認されている 10 種のアミノ酸（アラニン、Asp、グルタミン酸、Leu、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、Ser、バリン）を対象とし、四次元 LC システムにおける各次元の条件検討を行った。対象アミノ酸は NBD-F を用いたプレカラム誘導体化を行った後、キラルなカルボン酸として分析した。その結果、一次元目では微粒子充填型 ODS カラム（Singularity RP18, 1.0 x 500 mm, 3 μ m）を固定相とし、10-30% アセトニトリル 0.05% トリフルオロ酢酸水溶液を移動相に用いることで、対象 NBD-アミノ酸の逆相分離が可能であった。一次元目で溶出した対象アミノ酸画分は、バルブの切替えにより二次元目へ導入した。二次元目ではオリジナル Pirkle 型カラム（Singularity CSP-001S, 1.5 x 150 mm, 5 μ m）を固定相とし、ギ酸を含むアセトニトリルとメタノールの混液を移動相として、すべての対象アミノ酸の光学分割が可能であった。検出には三連四重極型質量分析装置（MS/MS）をポジティブイオンモードで用い、条件を精査した結果、対象アミノ酸を高感度で定量可能であった。開発した方法を用いて、D-Ser 残基の存在が報告されている鶏卵白アルブミン（Ovalbumin）を分析した結果、すべての対象 L-アミノ酸および D-Ser（%D = 2.3）のピークが認められ、本分析法が実際のタンパク質試料に適用可能であることが示された。

Asn、Gln および Cys 残基のキラル識別分析に向けた前処理法の検討

代表的なタンパク質構成アミノ酸について四次元 LC 分析技術を構築するとともに、酸加水分解に伴う構造変化に起因して一斉分析が困難なアミノ酸について前処理条件を検討した。Asn および Gln 残基は加水分解時に Asp およびグルタミン酸（Glu）に変換されるため、これらを区別したキラル識別定量は不可能であった。本研究では加水分解前にホフマン転位反応を行うことで Asn、Gln の構造を変化させ、Asn/Asp/Gln/Glu 残基を区別可能なキラル分析技術を構築した。光学分割条件の検討に際しては、対象アミノ酸それぞれの鏡像異性体分離に適したカラムを精査し、従来は定量困難であった微量 D-アミノ酸残基の一斉定量を達成した（日本薬学会第 142 年会、第 33 回クロマトグラフィー科学会で発表）。

側鎖の反応性が高い Cys 残基は加水分解中に容易に定量値が変化するため、本研究では還元カルボキシメチル化により側鎖を保護し、加水分解・四次元 LC 技術を統合した分析法開発を行

った。カルボキシメチル Cys は定量的・再現的に分析可能であり、実際のタンパク質試料において D-Cys 残基を検出した（日本薬学会第 142 年会、第 33 回クロマトグラフィー科学会で発表）。

開発した新規分析法を用いて白内障患者の水晶体組織を分析した結果、これまで報告のあった D-Asp のみならず新たに D-Asn、D-Cys 残基の存在が示された（図 2）。今後、多検体分析を行うと同時に、これらの D-アミノ酸残基とタンパク質機能、加齢性疾患との関連解析が強く期待される。

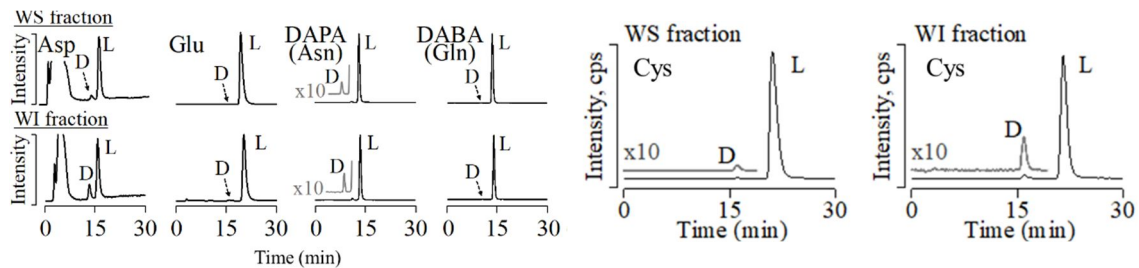


図 2 白内障患者水晶体組織における D-アミノ酸残基の分析。

WS, water soluble; WI, water insoluble

Leu 連鎖鏡像異性体の相互分離を可能とする光学分割カラムの探索

Leu、イソロイシンおよびアロイソロイシンは構造が酷似しているため、キラルを識別した一斉分離は困難であった。本研究では、これまでに我々が設計・開発してきたオリジナル Pirkle 型カラムライブラリーの中から Leu 連鎖異性体およびそれぞれの鏡像異性体を一斉に分離可能な光学分割カラムの探索を行った。その結果、光学認識部位に L-Phe を有する Singularity CSP-003S を用いることで Leu 連鎖鏡像異性体を一斉分離可能であることを明らかにした（日本薬学会第 142 年会、第 29 回クロマトグラフィーシンポジウムで発表）。また、充填剤を複数回合成し、それぞれをステンレス管に充填して合成・充填日の異なる Singularity CSP-003S を作製した結果、いずれのカラムにおいても再現的に対象アミノ酸の一斉分離が達成された。今後は様々な実試料における D-アミノ酸残基分析への適用が期待される。

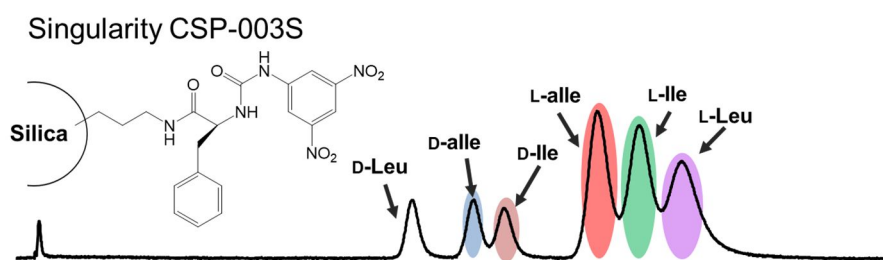


図 3 Leu 連鎖鏡像異性体の一斉分離を可能とする固定相の発見

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mai OYAIDE, Chiharu ISHII, Akira FUJII, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Masanobu NAGANO, Kenji HAMASE	4. 巻 43
2. 論文標題 Enantioselective determination of hydroxy amino acids in Japanese traditional amber rice vinegars	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 59-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15583/jpchrom.2022.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Chiharu ISHII, Noburo TAKIZAWA, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Ryuichi KONNO, Kenji HAMASE	4. 巻 219
2. 論文標題 Off-line two-dimensional LC-MS/MS determination of tryptophan enantiomers in mammalian urine and alteration of their amounts in D-amino acid oxidase deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis	6. 最初と最後の頁 114919
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2022.114919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hsin-Miao TSAI, Chin-Ling HSIEH, Chiharu ISHII, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Jen-Ai LEE, Kenji HAMASE	4. 巻 43
2. 論文標題 Two-dimensional chiral HPLC analysis of lactate, hydroxybutyrates and malate in human plasma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 119-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15583/jpchrom.2022.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Chiharu ISHII, Rin MORINAGA, Miho TAKAHASHI, Masashi MITA, Takeyuki AKITA, Kenji HAMASE	4. 巻 1
2. 論文標題 Development of a three-dimensional HPLC system for acidic amino acid enantiomers and determination of their amounts in mice lacking D-aspartic acid oxidase activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Open	6. 最初と最後の頁 100004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jpba.2023.100004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chiharu ISHII, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Kenji HAMASE	4. 巻 44
2. 論文標題 Chiral amino acid analysis in the plasma of B6DA0-/- mice lacking D-amino acid oxidase activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 39-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2023.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuri NAGATA, Takeyuki AKITA, Aogu FURUSHO, Chiharu ISHII, Masashi MITA, Kenji HAMASE	4. 巻 44
2. 論文標題 Design of novel mixed-mode columns for analysis of amino acids derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole and the evaluation of retention properties	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chromatography	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15583/jpchrom.2023.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 三ノ宮悠介、石井千晴、竹島華菜子、三田真史、秋田健行、浜瀬健司
2. 発表標題 アスパラギン/グルタミン鏡像異性体および類縁体を含有するペプチドの分離挙動
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 末吉里絵、石井千晴、秋田健行、三田真史、村上祐介、植田正、浜瀬健司
2. 発表標題 二次元LC-MS/MSを用いるD-システイン残基の微量分析法開発とペプチド・タンパク質中の含量解析
3. 学会等名 第33回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島華菜子、石井千晴、秋田健行、浜本洋、三田真史、関水和久、村上祐介、植田正、浜瀬健司
2. 発表標題 高分離能二次元キラルLC-MS/MSを用いるタンパク質中Asn/AspおよびGln/Glu残基分析
3. 学会等名 第33回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井千晴、古庄仰、山崎千夏、秋田健行、三田真史、井手友美、木村友則、浜瀬健司
2. 発表標題 多次元キラルHPLC法による慢性腎臓病の新規診断マーカー探索と実用化の展開
3. 学会等名 第62回日本臨床化学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chiharu Ishii, Yukiko Shimizu, Takeyuki Akita, Masashi Mita, Tadashi Okamura, Kenji Hamase
2. 発表標題 Selective determination of D-amino acids in the rat plasma and urine using a two-dimensional LC-MS/MS system and their regulation by D-amino acid oxidase
3. 学会等名 32nd International symposium on pharmaceutical and biomedical analysis (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chiharu Ishii, Yukiko Shimizu, Takeyuki Akita, Masashi Mita, Tadashi Okamura, Kenji Hamase
2. 発表標題 Simultaneous determination of chiral amino acids in the plasma and brain of DAO deficient rats using a highly selective twodimensional LC-MS/MS system
3. 学会等名 The 5th International conference of D-amino acid research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末吉里絵、石井千晴、秋田健行、三田真史、植田 正、浜瀬健司
2. 発表標題 システイン残基のキラル識別微量分析を可能とする二次元LC-MS/MS法開発とタンパク質試料への適用
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島華菜子、石井千晴、秋田健行、浜本 洋、三田真史、関水久、植田 正、浜瀬健司
2. 発表標題 二次元LC-MS/MSを用いるAsn/AspおよびGln/Glu残基のキラル識別微量分析法開発とペプチド試料への適用
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山部真弓、石井千晴、秋田健行、三田真史、浜瀬健司
2. 発表標題 Pirkle型キラル固定相を用いるロイシン/イソロイシン/アロイソロイシン鏡像異性体の一斉分析
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下愛絵、石井千晴、古庄仰、秋田健行、根岸栄一、井本啓史、三田真史、浜瀬健司
2. 発表標題 光リアクター搭載二次元HPLCを利用するNBD-Trp鏡像異性体の高感度分析法開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山部真弓、石井千晴、秋田健行、三田真史、浜瀬健司
2. 発表標題 各種Pirkle型キラル固定相におけるロイシン連鎖異性体の分離挙動解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島華菜子、石井千晴、秋田健行、浜本洋、三田真史、関水久、植田正、浜瀬健司
2. 発表標題 Asn/AspおよびGln/Glu残基を対象とする二次元キラルLC-MS/MS微量分析法開発と実試料における含量解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 末吉里絵、石井千晴、秋田健行、三田真史、植田正、浜瀬健司
2. 発表標題 二次元LC-MS/MSを用いるシステイン残基のキラル識別微量分析法開発とタンパク質・ペプチドへの適用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹島華菜子、石井千晴、秋田健行、三田真史、植田正、浜瀬健司
2. 発表標題 タンパク質中Asn/AspおよびGln/Glu残基の微量分析を可能とする高分離能二次元キラルLC-MS/MS法開発
3. 学会等名 クロマトグラフィー次世代技術セミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井千晴、清水有紀子、秋田健行、三田真史、井手友美、岡村匡史、浜瀬健司
2. 発表標題 内在性キラルアミノ酸の選択的定量を可能とする二次元LC-MS/MSシステムの開発と哺乳類血中における含量解析
3. 学会等名 クロマトグラフィー次世代技術セミナー2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井千晴、清水有紀子、秋田健行、三田真史、井手友美、岡村匡史、金野柳一、浜瀬健司
2. 発表標題 哺乳類血中キラルアミノ酸の精密定量を可能とする二次元LC-MS/MS法の開発とD-アミノ酸酸化酵素欠損による含量変化
3. 学会等名 第16回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末吉里絵、石井千晴、秋田健行、三田真史、植田正、浜瀬健司
2. 発表標題 タンパク質中のシステイン残基を対象とするキラル識別微量分析法開発
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiharu ISHII, Yukiko SHIMIZU, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Tadashi OKAMURA, Kenji HAMASE
2. 発表標題 Development of a two-dimensional LC-MS/MS system for the selective determination of intrinsic chiral amino acids and application to mammalian plasma
3. 学会等名 31st International symposium on pharmaceutical and biomedical analysis (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井千晴、清水有紀子、秋田健行、三田真史、井手友美、岡村匡史、浜瀬健司
2. 発表標題 二次元LC-MS/MSシステムを用いる哺乳類血中キラルアミノ酸の精密含量解析
3. 学会等名 第28回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	濱瀬 健司 (Hamase Kenji)		
研究協力者	植田 正 (Ueda Tadashi)		
研究協力者	井手 友美 (Ide Tomomi)		
研究協力者	村上 祐介 (Murakami Yusuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------