

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390007

研究課題名（和文） 光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法の開発と医療への展開

研究課題名（英文） Development of an enantioselective amino acid metabolome analysis method and its clinical applications

研究代表者

濱瀬 健司（HAMASE KENJI）

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：10284522

研究成果の概要（和文）：二次元 HPLC を利用し、臨床化学診断に汎用される様々な代謝関連アミノ酸を網羅する「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法」を開発した。様々な疾病モデルマウス及びヒト臨床検体におけるキラルアミノ酸メタボローム解析を行った結果、筋萎縮性側索硬化症において D-セリン含量が特異的に上昇することが示され、先天性アミノ酸代謝異常症において光学異性体の識別定量が早期・高精度診断に有用である可能性が示された。ヒト臨床検体についても、血液、尿共に D-セリン、D-アラニンなど種々の D-アミノ酸が認められ、キラルアミノ酸メタボロミクスの有用性を示した。

研究成果の概要（英文）：A highly sensitive and selective 2D-HPLC method for the simultaneous and enantioselective determination of all proteinogenic and clinically used amino acids has been established. The system was applied to various disease model animals and also to human clinical samples. As a result, the amount of D-Ser was higher in the spinal cord of ALS model mouse than that in the control mouse, and the usefulness of chiral amino acid metabolomics was also shown in the metabolic disorders of amino acids. In human plasma and urine, various D-amino acids such as D-Ser and D-Ala were observed, and further studies are in progress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	7,700,000	2,310,000	10,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、メタボローム、アミノ酸、光学分割

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸分析は 1940-50 年頃から世界各国で臨床化学診断に利用され、フェニルケトン尿症やメープルシロップ尿症など様々な疾病の診断、病態解析に威力を発揮してきた。

アミノ酸には D 体と L 体の光学異性体が存在するが、従来のアミノ酸分析装置では両異性体を識別できず、アミノ酸含量は DL 体の混合物として評価されている。これは高等動物体内のアミノ酸は大部分が L 体であるという

知見に基づくもので、D体は半世紀にも亘り殆ど着目されていなかった。しかし、1990年頃からヒトを含む哺乳類中でもD-アミノ酸の存在が報告され、神経伝達やホルモン分泌を制御する生理活性分子であることが明らかにされてきた。また、D体を特異的に生合成・代謝する酵素の存在も報告されている。

これらの知見は生体がD-アミノ酸とL-アミノ酸を明確に区別して制御することを示しており、両光学異性体の含量変化を区別して評価・解析することで、これまで不可能であった疾病診断や新たな創薬基盤の構築につながると考えられる。そこで本研究では、世界で初めてタンパク質構成全アミノ酸および代謝関連アミノ酸を網羅した「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法」を開発し、新たな疾病診断法の構築、新規機能分子の探索を展開する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、タンパク質構成全アミノ酸および代謝関連アミノ酸を対象として「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法」を世界で初めて開発し、D体とL体を切り分けてバイオマーカーと新規機能分子を探索することである。本研究は従来のアミノ酸分析では不可能であった新たな疾病診断や治療評価、創薬等につながり、薬学分野の発展に貢献出来る。応募者はこれまでの研究において、臨床化学診断に汎用される「尿試料」中には無視できない量のD体が存在することを明らかにし、光学異性体の個別定量が病態との関連を正確に把握する上で必須であることを示した。これらの研究成果を踏まえ、本研究ではタンパク質構成全アミノ酸および代謝関連アミノ酸を網羅したキラルアミノ酸一斉分析法を開発するとともに、尿・血液、組織試料におけるメタボローム解析を行い、新規疾病診断法と新規機能分子の探索を展開する。

## 3. 研究の方法

臨床化学診断に汎用されるタンパク質構成アミノ酸および代謝関連アミノ酸を選定し、平成22年度に「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法」を開発する。分析法としては、微量成分の高選択的分析を可能とする二次元HPLCを利用する。本法を用い、平成23から24年度には現代社会の解決課題となっている疾患を中心として、光学異性体を区別したメタボローム解析を行う。光学異性体の区別により有意差が認められた疾病については、ヒト臨床検体での検討を進めると共に病変タンパク質・劣化タンパク質中のアミノ酸残基異性化解析を行う。

アミノ酸メタボローム光学分割条件の確立（二次元目）では、タンパク質構成アミノ酸19種（光学異性体の存在しないグリシンを除く）、および代謝マップ上に存在するアロ体やホモ体、メチル化体並びに各種修飾体などについて、光学分割条件を決定する。また、アミノ酸メタボローム逆相分離条件の確立（一次元目）では、上記のアミノ酸についてマイクロODSカラムを用いる逆相分離条件を決定する。更に、上記の光学分割システムおよび逆相分離システムを統合し、二次元HPLCによる「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析システム」を構築する。タンパク質構成アミノ酸のL体を除いて殆どの成分は生体内に微量しか存在しない。従ってこのメタボローム分析には高い選択性を有する方法が要求され、二次元化は必須である。

上記で開発した分析法により、疾病モデルマウスを用いて光学異性体を区別したアミノ酸メタボローム解析を行う。疾病モデルとしては癌やアルツハイマー、糖尿病、アレルギー、肝硬変、睡眠障害、神経障害などを中心に検討し、正常マウスとのディファレンシャル解析を行う。また、モデルマウスでの検討により有意差の認められた疾患を中心として、連携研究者である相磯貞和（慶應大学医学部）を通してヒト臨床検体を収集し、実際のヒト検体におけるキラルアミノ酸メタボローム解析を行う。

本研究成功の鍵は各種疾病モデルマウス中でアミノ酸光学異性体含量が変化することである。特に本研究での焦点はD-アミノ酸の含量変化であるが、哺乳動物にはD-アミノ酸を分解するD-アミノ酸酸化酵素（DAO）とD-アスパラギン酸酸化酵素（DDO）が存在し、この両酵素で全種類のD-アミノ酸が代謝される。そのため、両酵素の存在により疾患に伴うD-アミノ酸含量変化が確認困難となる場合も想定される。そこで本研究では通常のマウスを用いる検討に加え、両酵素を共に欠損したモデルマウスを作出し、メタボローム解析を検討する。

## 4. 研究成果

タンパク質構成アミノ酸に加え、臨床化学診断に汎用される様々な非タンパク質構成遊離アミノ酸を選定し、「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法」を開発した。これらの非タンパク質構成アミノ酸の生体内含量は極めて低いいため、分析法としては微量成分の高選択的分析を可能とする二次元HPLCを利用した。二次元HPLC法の構築に際し、タンパク質構成アミノ酸19種（光学異性体の存在しないグリシンを除く）、および代謝マップ上に存在するアロ体やホモ

体、N-メチル化体、 $\alpha$ -メチル化体などを含む類縁アミノ酸の光学分割条件を決定した。これらのアミノ酸は高感度分析を行うため、また二次元 HPLC での分離を容易にするためにアミノ基を NBD-F により修飾し、蛍光誘導体とした。キラル固定相としてはパークル型キラル固定相 10 種、陰イオン交換型キラル固定相 4 種によるキラルスクリーニングシステムを構築し、これらの組み合わせにより検討した全化学種の光学分割を達成した。また、一次元目の逆相分離については、極めて高性能なマイクロ逆相カラムが必要であり、内径 1 mm のマイクロモノリス ODS カラム、内径 0.53 mm のキャピラリーモノリス ODS カラムにより逆相分離条件の設定を行った。なお、タンパク質構成アミノ酸の中で最も感度が低く、メタボローム解析推進の障害となっていた NBD-トリプトファンについては、移動相組成の最適化に加えてオンラインリアクターを導入することで 120 倍の高感度化を達成した。

上記の光学分割システムおよび逆相分離システムをオンラインで統合し、二次元 HPLC による「光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析システム」を構築した。本システムにより、微量な D-アミノ酸や非タンパク質構成アミノ酸を含め、生体内における微量アミノ酸を対象としたメタボローム解析が可能となった。また、この蛍光二次元 HPLC 法に加え、ギ酸含有移動相を導入することにより二次元 HPLC-FL-MS/MS 分析法の構築を行った。本法ではアミノ酸を NBD-F により修飾し、N-修飾体として二次元 HPLC 分離と蛍光・MS/MS 検出を行う。一次元目の逆相カラムについては改良型キャピラリーモノリス ODS カラムによる高性能分離を行い、各アミノ酸を D 体、L 体の混合物として分離する。光学分割についてはパークル型キラル固定相及び陰イオン交換型キラル固定相計 23 種の検討から、良好な結果が得られたカラムをオンラインで連結して全光学異性体の全自動二次元分離を達成した。

開発した二次元 HPLC 分析装置を用い、疾病モデルマウスとして腫瘍細胞移植マウス、各種神経疾患モデルマウス、先天性代謝異常モデルマウスなどを作成して光学異性体を区別したアミノ酸メタボローム解析を行った。分析対象試料は血液、尿及び疾病組織を中心として選択し、各アミノ酸光学異性体の含量変化を検討した。その結果、運動神経障害である筋萎縮性側索硬化症において他の D-アミノ酸含量には大きな変化が認められない中で D-セリン含量が特異的に上昇することが示された（連携研究者である慶應大学医学部・相磯貞和との共同研究成果）。また、先天性アミノ酸代謝異常症において光学異性体の識別定量が早期・高精度診断に有用である可能性が示された。

平成 24 年度にはヒト試料におけるキラルアミノ酸メタボローム解析を行った。ヒト試料としては全身の情報が見られる血液に加えて非侵襲採取が可能な尿を使用した。その結果、血液においては、多量な L-アミノ酸の存在下で微量な D-セリンおよび D-アラニンが恒常的に認められ、D-プロリンおよび D-ロイシンが認められる試料も存在した。尿については血液と比較すると D-アミノ酸の存在量は多く、L-アミノ酸と同程度またはそれ以上に存在するアミノ酸も認められた。特に D-アスパラギン、D-アルギニン、D-セリン、D-アラニン、D-バリンなどは高濃度に存在し、D-アロスレオニン、D-アロイソロイシンの存在も認められた。これら血中および尿中に存在する D-アミノ酸は、平成 23 年度までに明らかにしたマウスおよびラット試料に存在する D-アミノ酸と良く一致した。本分析法を用いて腎障害、心血管障害および自己免疫疾患における D-アミノ酸含量変化を解析した結果、腎障害時に D-セリンや D-アラニン含量が増加する傾向が認められ、今後さらにヒトキラルアミノ酸メタボロームの正常値決定や大規模スクリーニングによるバイオマーカー評価、診断法の開発が期待される。

また、D-アミノ酸含量増幅型モデルマウスの作出も行った。哺乳類には中性および塩基性 D-アミノ酸を分解する D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) と、酸性 D-アミノ酸を分解する D-アスパラギン酸酸化酵素 (DDO) が存在し、この両者で全 D-アミノ酸を分解する。そこで、本研究では両酵素を共に欠損する DAO/DDO 二重欠損マウスを作成した。その結果、本マウスは中性、塩基性、酸性の様々な D-アミノ酸含量が劇的に増加しており、今後 D-アミノ酸含量解析の強力なツールになると期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① 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* 【査読有】, 1269, 255-261 (2012). DOI:10.1016/j.chroma.2012.08.075
- ② Yurika MIYOSHI, Ryuichi KONNO, Jumpei SASABE, Kyoko UENO, Yosuke TOJO,

- Masashi MITA, Sadakazu AISO, Kenji HAMASE, Alteration of intrinsic amounts of D-serine in the mice lacking serine racemase and D-amino acid oxidase, *Amino Acids*【査読有】 , 43, 1919-1931 (2012). DOI:10.1007/s00726-012-1398-4
- ③ Masataka SUZUKI, Jumpei SASABE, Shigeki FURUYA, Masashi MITA, Kenji HAMASE, Sadakazu AISO, Type 1 diabetes mellitus in mice increases hippocampal D-serine in the acute phase after streptozotocin injection, *Brain Research*【査読有】 , 1466, 167-176 (2012). DOI:10.1016/j.brainres.2012.05.042
- ④ Jumpei SASABE, Yurika MIYOSHI, Masataka SUZUKI, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Masaaki MATSUOKA, Kenji HAMASE, Sadakazu AISO, D-Amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*【査読有】 , 109, 627-632 (2012). DOI:10.1073/pnas.1114639109
- ⑤ Hai HAN, Yurika MIYOSHI, Tsubasa OYAMA, Ryoko KONISHI, Masashi MITA, Kenji HAMASE, Enantioselective micro-2D-HPLC determination of aspartic acid in the pineal glands of rodents with various melatonin contents, *Journal of Separation Science*【査読有】 , 34, 2847-2853 (2011). DOI:10.1002/jssc.201100609
- ⑥ Naoko YOSHIKAWA, Waka ASHIDA, Kenji HAMASE, Hiroki ABE, HPLC determination of the distribution of D-amino acids and effects of ecdysis on alanine racemase activity in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*, *Journal of Chromatography B*【査読有】 , 879, 3283-3288 (2011). DOI:10.1016/j.jchromb.2011.04.026
- ⑦ Hai HAN, Yurika MIYOSHI, Kyoko UENO, Chieko OKAMURA, Yosuke TOJO, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Kiyoshi ZAITSU, Kenji HAMASE, Simultaneous determination of D-aspartic acid and D-glutamic acid in rat tissues and physiological fluids using a multi-loop two-dimensional HPLC procedure, *Journal of Chromatography B*【査読有】 , 879, 3196-3202 (2011). DOI:10.1016/j.jchromb.2011.01.023
- ⑧ Yurika MIYOSHI, Kenji HAMASE, Tadashi OKAMURA, Ryuichi KONNO, Noriyuki KASAI, Yosuke TOJO, Kiyoshi ZAITSU, Simultaneous two-dimensional HPLC determination of free D-serine and D-alanine in the brain and periphery of mutant rats lacking D-amino-acid oxidase, *Journal of Chromatography B*【査読有】 , 879, 3184-3189 (2011). DOI:10.1016/j.jchromb.2010.08.024
- ⑨ Wataru KAKEGAWA, Yurika MIYOSHI, Kenji HAMASE, Shinji MATSUDA, Keiko MATSUDA, Kazuhisa KOHDA, Kyoichi EMI, Junko MOTOHASHI, Ryuichi KONNO, Kiyoshi ZAITSU, Michisuke YUZAKI, D-Serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the  $\delta 2$  glutamate receptor, *Nature Neuroscience*【査読有】 , 14, 603-611 (2011). DOI:10.1038/nm.2791
- ⑩ Jung Hoon YANG, Akira WADA, Kazuyuki YOSHIDA, Yurika MIYOSHI, Tomoko SAYANO, Kayoko ESAKI, Masami O. KINOSHITA, Shozo TOMONAGA, Norihiro AZUMA, Masahiko WATANABE, Kenji HAMASE, Kiyoshi ZAITSU, Takeo MACHIDA, Albee MESSING, Shigeyoshi ITOHARA, Yoshio HIRABAYASHI, Shigeki FURUYA, Brain-specific *Phgdh* deletion reveals a pivotal role for L-serine biosynthesis in controlling the level of D-serine, an N-methyl-D-aspartate receptor co-agonist, in adult brain, *The Journal of Biological Chemistry*【査読有】 , 285, 41380-41390 (2010). DOI:10.1074/jbc.M110.187443
- [学会発表] (計 18 件)
- ① Kenji HAMASE, Chiral amino acid metabolome analysis for biomarker assay in clinical diagnosis using enantioselective 2D-HPLC, 39<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Amsterdam, The Netherlands, 2013 June).
- ② 浜瀬健司, 二次元 HPLC 分析を基盤とするキラルアミノ酸メタボロミクスの展開, 日本薬学会第 133 年会(横浜, 2013 年 3 月).
- ③ 浜瀬健司, 新しい分析法が切り拓く新しい世界 - キラルアミノ酸分析法の開発と創薬・診断の展開 -, 第 30 回九州分析化学若手の会夏季セミナー (指宿, 2012 年 7 月).
- ④ 浜瀬健司, D-アミノ酸の二次元キラル HPLC 分析を基盤とする創薬・診断の展開, 第 28 回分析化学緑陰セミナー・旭川 (旭

川, 2012年6月).

- ⑤ Kenji HAMASE, Two-dimensional chiral HPLC analysis of all proteinogenic amino acids in mammals and its diagnostic value, 38<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Anaheim, CA, USA, 2012 June).
- ⑥ 浜瀬健司, アミノ酸分析のニューフロンティア - キラルアミノ酸メタボロミクスの可能性 -, 新アミノ酸分析研究会第1回学術講演会 (東京, 2011年12月).
- ⑦ Kenji HAMASE, Enantioselective micro-2D-HPLC analysis of all proteinogenic amino acids and its clinical applications, 37<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Dalian, China, 2011 October).
- ⑧ 浜瀬健司, 哺乳類体内における微量 D-アミノ酸の選択的分析法開発と創薬・診断の展開, 第84回日本生化学会大会 (京都, 2011年9月).
- ⑨ Kenji HAMASE, Enantioselective and simultaneous 2D-HPLC determination of all proteinogenic amino acids: a new frontier of the metabolomics study focusing on amino acid enantiomers, 18<sup>th</sup> International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques (Tbilisi, Georgia, 2011 August).
- ⑩ Kenji HAMASE, Selective determination of all D-amino acids in mammalian brain, 12<sup>th</sup> International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins (Beijing, China, 2011 August).
- ⑪ Kenji HAMASE, Simultaneous enantioselective analysis of all proteinogenic amino acids in mice lacking enzymes metabolizing D- amino acids, 36<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Budapest, Hungary, 2011 June).
- ⑫ 浜瀬健司, キラル識別分析による内在性 D-アミノ酸の新たな創薬・診断への可能性探索, 第6回トランスポーター研究会年会 (仙台, 2011年6月).
- ⑬ Kenji HAMASE, Integrated two-dimensional HPLC determination of all proteinogenic amino acid enantiomers and its clinical applications, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (Kyoto, Japan, 2011 May).
- ⑭ 浜瀬健司, 高等動物体内における遊離 D-アミノ酸の存在と高感度選択的分析法の開発, 生命の起源および進化学会第36回学術講演会 (福岡, 2011年3月).
- ⑮ 浜瀬健司, 光学異性体を区別する全アミノ酸二次元 HPLC 一斉分析法の開発と創薬・診断への展開, 第23回バイオメディカル分析科学シンポジウム (松島, 2010年7月).
- ⑯ Kenji HAMASE, Simultaneous enantiomer separations of all proteinogenic amino acids using a fully-automated 2D-HPLC system and the study on accumulation of D-form in the D-amino-acid oxidase deficient animals, 22<sup>nd</sup> International Symposium on Chirality (Sapporo, Japan, 2010 July).
- ⑰ 浜瀬健司, 光学異性体を区別するアミノ酸次世代分析装置の開発と医療展開, 第47回化学関連支部合同九州大会 (北九州, 2010年7月).
- ⑱ Kenji HAMASE, Two-dimensional HPLC determination of all proteinogenic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids, 35<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques (Boston, MA, USA, 2010 June).

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ①名称: 疾患サンプル分析装置、分析システム及び分析方法  
発明者: 浜瀬健司, 東條洋介, 三田真史, 水本智恵子  
権利者: 浜瀬健司, 東條洋介, 三田真史, 水本智恵子  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-061305  
出願年月日: 2012年3月18日  
国内外の別: 国内・国外

- ②名称：分離剤及びその製造方法  
発明者：浜瀬健司，三田真史，東條洋介，  
隅田如光  
権利者：浜瀬健司，三田真史，東條洋介，  
隅田如光  
種類：特許  
番号：特願 2012-018838  
出願年月日：2012年1月31日  
国内外の別：国内・国外

[その他]

○ホームページ

[http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/  
index.html](http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/index.html)

○新聞記事

- ①ALS発症 仕組み解明  
読売新聞  
2011年12月28日

- ②注目はD型 アミノ酸分析に新兵器  
読売新聞  
2010年9月16日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜瀬 健司 (HAMASE KENJI)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：10284522

### (2) 研究分担者

小柳 悟 (KOYANAGI SATORU)  
九州大学・大学院薬学研究院・准教授  
研究者番号：60330932

植田 正 (UEDA TADASHI)  
九州大学・大学院薬学研究院・教授  
研究者番号：90184928

### (3) 連携研究者

相磯 貞和 (AISO SADAKAZU)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：60138013