

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670015

研究課題名(和文)高理論段マイクロキラルカラムの開発

研究課題名(英文)Development of high performance micro-chiral columns

研究代表者

濱瀬 健司(Kenji, Hamase)

九州大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10284522

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):創薬や診断分野で注目されるキラルアミノ酸一斉分析法について、高性能化の鍵となる「高理論段かつ微小内径の高性能マイクロキラルカラム」開発を達成した。陰イオン交換モードを有する市販の20種以上のセクターについて分離特性を解析し、新規セクターとして3,5-ジニトロフェニル基とL-ロイシンを有する高性能カラムを開発した。合成条件及び充填条件等を精査した結果、内径1.5 mm、全長250 mmのカラムについて再現的作製に成功した。また、内径1.0 mmの高性能カラム作成も成功した。これらのカラムはタンパク質構成全アミノ酸に加えて様々な代謝関連アミノ酸の光学分割が可能であり、幅広い利用が期待される。

研究成果の概要(英文): High resolution micro-enantioselective columns have been designed and realized. The newly developed high-performance enantioselective columns are the key tools for the “chiral amino acid metabolome analysis”, a currently recognized area for drug discovery and diagnosis. By the screening of more than 20 commercially available chiral selectors, we have designed a new selector having “3,5-dinitrophenylaminocarbonyl-L-leucine”. Reaction conditions and packing conditions were investigated, and we have been succeeded in making high-performance enantioselective columns with 1.5 mm ID x 250 mm length. The micro-enantioselective column with 1.0 mm ID x 250 mm length could also be prepared with sufficient resolution and sensitivity. These newly designed micro-enantioselective columns enables the simultaneous analysis of all proteinogenic chiral amino acids and wide applications are expected.

研究分野: 医歯薬学

キーワード: 分析化学 クロマトグラフィー 光学分割 アミノ酸

1. 研究開始当初の背景

長い間、高等動物体内のアミノ酸は全て L 体であると考えられてきた。しかし近年、ヒトを含む哺乳類において光学異性体である D 体の存在が明らかにされ、新規機能分子・疾病マーカーとして期待されている。一方、現在のアミノ酸分析装置は D 体と L 体を区別できず、光学異性体を区別するアミノ酸メタボローム分析法、特にその高性能化の鍵となる「高理論段かつ微小内径の高性能マイクロキラルカラム」の開発が切望されている。

応募者はこれまでに D 体 L 体の個別定量により実際に新規バイオマーカーが発見できること、パークル型やイオン交換型キラル固定相で多くのアミノ酸が光学分割できることを示してきた。本研究ではこれらの成果を踏まえ、哺乳類体内に存在する様々な代謝関連アミノ酸について光学分割を可能とする高性能マイクロキラル固定相開発に挑戦する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規機能分子・疾病マーカー候補として D-アミノ酸に着目し、研究展開の鍵となる「全てのタンパク質構成アミノ酸を含む様々な代謝関連アミノ酸の光学分割を可能とする高理論段マイクロキラルカラム」を世界で初めて開発することである。具体的には、パークル型およびイオン交換型固定相を中心に、キラルセクターの設計・合成を行うとともに粒子の物性を制御することで高性能カラムを作製する。キラルセクターの設計においては多数の市販カラムを用いる光学分割特性解析からオリジナルな構造を提案する。この技術革新は、本カラムを用いる二次元 HPLC 装置の開発、新規疾病診断法開発や創薬の展開を通して人類社会に貢献できると考える。

3. 研究の方法

タンパク質構成全アミノ酸に加えて様々な代謝関連アミノ酸を対象とし、市販及びオリジナルキラルセクターの光学分割特性を精査する。この解析結果から最適光学認識部位を設計するとともに、充填剤の物性最適化によりカラム自体の理論段数向上を行って高理論段マイクロキラルカラムを作製し、単一のカラムを用いて幅広いアミノ酸の光学分割を達成する。

平成 25 年度は様々なキラルセクターをアミノプロピル化シリカゲルに化学結合させ、各セクターの光学分割特性を精査する。キラルセクターとしては、陰イオン交換モードを有するパークル型キラル固定相を中心とし、20 種以上の市販キラルセクターを検討する。また、シリカゲル自体の物性も考慮し、カラム自体の高性能化を行う。理論段数向上は、特に類似した保持を示す化合物の分離に有用であり、アミノ酸光学異性体の分離に威力を発揮すると思われる。

分離対象としては、哺乳類内在性アミノ酸

として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、メチル化体などを含む様々な類縁アミノ酸を選定する。なお、アミノ酸は高感度化と併せて固定相への適切な保持を与えるため、アミノ基をラベル化した蛍光誘導体として検討する。

これらの解析結果に基づいて平成 26 年度には最適光学認識部位を最適基材に修飾し、全アミノ酸の一斉光学分割を可能とする高理論段マイクロキラルカラムを開発する。キラルアミノ酸メタボロミクスでの継続的利用を可能とするため、内径 1.5 mm、全長 250 mm のカラムを用いて高性能カラムの再現的作成を行う。また、高理論段かつ 1mm 以下の微小内径を有するマイクロキラルカラムの設計・作製も行う。併せて、作製した高性能キラル固定相を二次元 HPLC に搭載し、有用性を評価する。

4. 研究成果

(1) 市販のパークル型カラムのスクリーニング

アミド型またはウレア型リンカーを有する様々な Pirkle 型キラル固定相を用い、各種 NBD-アミノ酸に対する光学分割特性を検討した。スクリーニングに使用するアミノ酸としては、第一段階として親水性アミノ酸である Ser、脂肪族アミノ酸である Ala、環状アミノ酸である Pro、芳香族アミノ酸である Phe、酸性アミノ酸である Glu を選択した。アミノ酸は NBD 蛍光誘導体として分析を行った。移動相としては LC-MS/MS の利用を可能とするため、揮発性の酸であるギ酸を含有するアセトニトリルとメタノールの混液を使用した。

検討したカラムのうち、Sumichiral OA-2000S は(S)-Phenylglycine、OA-2500S は(S)-Naphthylglycine を有しているアミド型カラムである。Sumichiral OA-2000S を固定相として用い、NBD-Ala は 0.10%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(10/90, v/v) 溶液を移動相とすることで分離係数 $\alpha = 1.04$ の光学分割が得られた。また、NBD-Phe は 0.15%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(15/85, v/v) を移動相とすることで光学分割 ($\alpha = 1.05$) されたが Pro、Ser、Glu の 3 種の NBD-アミノ酸は光学分割されなかった。光学異性体の溶出順に関しては、NBD-Ala と NBD-Phe のいずれも D 体が先に溶出した。Sumichiral OA-2500S においては 0.25%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(25/75, v/v) を移動相として選択し、Ser、Ala、Phe の 3 種の NBD-アミノ酸光学異性体の分離を検討した。その結果、これら 3 種のアミノ酸はいずれも分離係数 1.1 以上の良好な光学分割が得られ、特に NBD-Phe に関しては分離係数 1.18 のベースライン分離が達成された。NBD-Glu については移動相に 0.80%ギ酸を含むアセトニトリル

ル/メタノール(80/20, v/v)を利用することで分離係数 1.12 の良好な光学分割が達成された。上記 4 種の NBD-アミノ酸は全て D 体が先に溶出した。一方、NBD-Pro に関しては L 体が先に溶出し、その分離係数は 1.05 であった。

構造内にウレア型のリンカーを有するキラル固定相についてもモデルアミノ酸の光学分割特性を解析した。Sumichiral OA-3100S は(S)-Val、Sumichiral OA-3200S は(S)-tert-Leu、Sumichiral OA-3300S は(S)-Phenylglycine を不斉中心にそれぞれ有している。Sumichiral OA-3100S では移動相に 0.20%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(20/80, v/v)を用いて Pro、Ser、Ala、Phe の NBD 誘導体の光学分割を検討した。その結果、Ser、Ala 及び Phe の 3 種のアミノ酸について分離係数 1.3 以上の良好なベースライン分離が得られた。NBD-Pro については、分離係数が 1.06 であり良好な光学分割は得られなかった。NBD-Glu は 0.50%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(50/50, v/v)を移動相とし、分離係数 1.10 の光学分割が得られた。また、今回検討を行った全ての NBD-アミノ酸において D 体が先に溶出した。Sumichiral OA-3200S では 0.20%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(20/80, v/v)を移動相として Ser、Ala、Phe については分離係数 1.3 以上の良好な光学分割が達成されたが、Pro の光学分割は認められなかった。Glu は 0.60%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(60/40, v/v)を移動相とすることで、分離係数 1.25 の良好な光学分割が得られた。また、光学分割が達成された 4 種のアミノ酸は全て D 体が先に溶出した。Sumichiral OA-3300S においては移動相に 0.20%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(20/80, v/v)を用いて Pro、Ser、Ala、Phe は分離係数 1.13、1.19、1.18、1.17 で良好な光学分割が達成された。また、Glu は 0.50%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(50/50, v/v)を移動相とし、分離係数 1.08 の光学分割が得られた。また本キラル固定相における各アミノ酸光学異性体の溶出順は、Pro を除いて全て D 体が先に溶出した。

以上の結果から不斉中心として(S)-Leu を有する新規固定相 KSAACSP-001S をデザインした。本固定相を設計し、上記のモデルアミノ酸の分離挙動を検討した結果、Pro、Ser、Ala、Phe の 4 種の NBD 誘導体は、いずれも 0.25%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(25/75, v/v)を移動相として分離係数 1.2 以上の良好なベースライン分離が達成された。Glu については移動相に 0.80%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(80/20, v/v)を用いることで、分離係数 1.11 の光学分割が達成された。また、全てのアミノ酸光学異性体について D 体が先に溶出した。以上の結果から、本検討で使用したウレア型リンカーを有するキラル固定相はいずれも多種のアミノ酸に対して良好な光学分割能が得られ、特に

KSAACSP-001S では優れた分離能が認められた。また、全ての NBD-アミノ酸について D 体を先に溶出させることが可能であった。これらのキラル固定相は、多様な構造を示すタンパク質構成及び代謝関連アミノ酸の一斉光学分割において有用なツールとなると考えられ、今後の利用が期待される。

(2) KSAACSP-001S の高性能化と再現的作製法の構築

KSAACSP-001S の高性能化及び再現的作製を目的とし、充填剤作製の条件検討を行った。キラル充填剤は物性値の異なる各種シリカゲルに DNP-L-Leu を共有結合させることで合成し、その後スラリー法によりステンレス管に充填した。作製した充填剤のキラルセクター(CS)導用量及び残存アミノプロピル(AP)基量は元素分析の窒素値を基に算出した。またカラムの性能評価には、親水性アミノ酸である Ser、脂肪族アミノ酸である Ala、環状アミノ酸である Pro、芳香族アミノ酸である Phe、酸性アミノ酸である Glu の 5 種のアミノ酸を使用した。移動相にはギ酸を含有するアセトニトリルとメタノールの混液を使用し、検出は励起波長 470 nm、蛍光波長 530 nm の蛍光発光で行った。

検討の第一段階として、無作為に作製した 2 ロットの KSAACSP-001S による NBD-アミノ酸の光学分割を比較した。Pro、Ser、Ala、Phe に関しては 0.25%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(25/75, v/v)溶液、Glu は 0.80%ギ酸を含むアセトニトリル/メタノール(80/20, v/v)溶液を移動相とした。その結果、作製した 2 本のカラムにおいて NBD-アミノ酸の分離係数と保持時間に大きなロット差が認められた。例えば、Ala の分離係数に関しては lot A が 1.27、lot B が 1.08 であり、L 体の保持時間には 3 分以上の差が認められた。Glu に関しては lot B ではほとんど光学分割が認められなかったのに対し、lot A では分離係数 1.14 の良好な光学分割が達成されている。Glu の保持時間については、lot A と lot B の間で 15 分程度の差が認められた。

二つの充填剤の元素分析値を比較すると lot A は CS 導用量が 0.40 mmol/g、残存 AP 基量が 0.21 mmol/g であるのに対し、lot B は CS 導用量が 0.29 mmol/g、残存 AP 基量が 0.64 mmol/g であったことから、充填剤間でキラルセクターの導用量及び残存 AP 基量に差が認められた。CS 導用量と分離係数の結果から、NBD-アミノ酸を良好に光学分割させるためには、APS に対してより多くのキラルセクターを修飾させる必要があると考えた。また、酸性アミノ酸である Glu の分析において他の 4 種のアミノ酸よりも酸性度の高い移動相を要したことから、NBD-アミノ酸の保持には残存 AP 基による陰イオン交換作用が寄与していると考えられる。これはより多くの残存 AP 基を有する lot B のカラムにおいてアミノ酸の保持が強いことと矛盾しない。従って、

KSAACSP-001S の高性能化及び再現的作製のためには、分離及び保持に最適な CS 導入量と残存 AP 基量を明らかにし、それらの物性値を厳密に制御する必要があると考えられる。

様々な物性の AP 化シリカゲルに対して CS の導入を行った結果、CS 導入量の増加に伴って各アミノ酸光学異性体の分離係数は向上する傾向にあり、その値が 0.4 mmol/g 程度のときにいずれのアミノ酸に対しても分離係数 1.1 以上の良好な光学分割が多くのカラムで達成された。また、CS 導入量が 0.4 mmol/g 以上になると各アミノ酸光学異性体の分離係数が低下する傾向が認められた。一方で保持時間は残存 AP 基の増加に伴って延長する傾向にあり、0.3 mmol/g 程度で各アミノ酸に対し 20 分以内の適切な保持を達成した。以上の結果より、CS 導入量が 0.4 mmol/g、残存 AP 基量が 0.3 mmol/g 程度のキラル充填剤において良好な光学分割が可能であることが示された。そこで、上記のパラメータ値を示す充填剤の作製を目指し、原料シリカゲル及び合成条件の更なる検討を行った。その結果、0.7 mmol/g 程度の AP 基を有する APS を原料とし、N-Ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) を縮合剤として用いることで、目標の CS 導入量を示す充填剤の作製を達成した。

上記の条件でキラル固定相を N=4 で作製し、アミノ酸の分離係数及び保持時間を比較した。その結果、Pro 及び Ser の光学異性体に関しては 20 分程度で、Ala、Glu、Phe については 10 分程度で分離係数 1.1 以上の良好な光学分割が可能であった。また、カラム性能の再現性を評価した結果、分離係数に関しては全アミノ酸に対して RSD 値 2% 以内であり、保持時間についても RSD 値 5% 程度の良好な再現性が得られた。本研究で作製した KSAACSP-001S を用いてタンパク質構成全アミノ酸の分析を行った結果、全てのキラルアミノ酸に対して優れた光学認識能を有することが示された。さらに内径 1.0 mm、全長 250 mm の KSAACSP-001S カラムを作成した結果、良好に充填可能であった。また、カラムの分離能を検討した結果、内径 1.5 mm のキラル固定相と同様に全アミノ酸の良好な光学分割が認められた。今後、2D-HPLC システムによるキラルアミノ酸メタボロミクス展開に大きく貢献できると考えられる。

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 3 件)

Shoto ISHIGO, Eiichi NEGISHI, Yurika MIYOSHI, Hirohisa ONIGAHARA, Masashi MITA, Tetsuya MIYAMOTO, Haruhiko MASAKI, Hiroshi HOMMA, Tadashi UEDA, Kenji HAMASE, Establishment of a

two-dimensional HPLC-MS/MS method combined with DCI/D₂O hydrolysis for the determination of trace amounts of D-amino acid residues in proteins, *Chromatography*, 査読有, in press.

DOI:10.15583/jpchom.2015.017

Kenji HAMASE, Yusuke NAKAUCHI, Yurika MIYOSHI, Reiko KOGA, Nao KUSANO, Hirohisa ONIGAHARA, Hiroshi NARAOKA, Hajime MITA, Yasuhiko KADOTA, Yasuhiro NISHIO, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Enantioselective determination of extraterrestrial amino acids using a two-dimensional chiral high-performance liquid chromatographic system, *Chromatography*, 査読有, 35, 103-110 (2014). DOI:10.15583/jpchom.2014.014

Yurika MIYOSHI, Masanobu NAGANO, Shoto ISHIGO, Yusuke ITO, Kazunori HASHIGUCHI, Naoto HISHIDA, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes, *Journal of Chromatography B*, 査読有, 966, 187-192 (2014).

DOI:10.1016/j.jchromb.2014.01.034

[学会発表](計 7 件)

前田佑樹, 鬼ヶ原弘久, 三次百合香, 門田靖彦, 西尾康弘, 三田真史, 浜瀬健司, 新規パークル型光学分割カラムのマイクロ化とキラルアミノ酸の高感度分析, 日本薬学会第 135 年会 (神戸, 2015 年 3 月).

Hirohisa ONIGAHARA, Nao KUSANO, Yurika MIYOSHI, Yasuhiko KADOTA, Yasuhiro NISHIO, Masashi MITA, Akio OJIDA, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Design and development of novel high-performance Pirkle-type stationary phases for chiral amino acid metabolomics studies, 30th International Symposium on Chromatography (Salzburg, Austria, 2014 September).

Hirohisa ONIGAHARA, Nao KUSANO, Yurika MIYOSHI, Yasuhiko KADOTA, Yasuhiro NISHIO, Masashi MITA, Akio OJIDA, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Development of novel high-performance Pirkle-type chiral stationary phases having branched aliphatic amino acids, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (Utsunomiya, Japan, 2014 September).

鬼ヶ原弘久, 草野 尚, 三次百合香, 門田

靖彦, 西尾康弘, 三田真史, 浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスの推進を可能とする新規高性能 Pirkle 型キラル固定相の開発, 日本薬学会第 134 年会(熊本, 2014 年 3 月).

鬼ヶ原弘久, 草野 尚, 三次百合香, 門田靖彦, 西尾康弘, 三田真史, 浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスの推進を加速する新規パークル型キラル固定相の設計開発, 第 31 回九州分析化学若手の会夏季セミナー(長崎, 2013 年 7 月).

Nao KUSANO, Jumpei SASABE, Hirohisa ONIGAHARA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Sadakazu AISO, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Simultaneous two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of all proteinogenic amino acid enantiomers in human serum using high performance Pirkle-type chiral stationary phases, 39th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Amsterdam, The Netherlands, 2013 June).

草野 尚, 鬼ヶ原弘久, 三次百合香, 門田靖彦, 西尾康弘, 三田真史, 浜瀬健司, 高性能パークル型キラル固定相を用いるタンパク質構成全アミノ酸光学異性体の二次元 HPLC 一斉分析, Symposium on Molecular Chirality 2013 (京都, 2013 年 5 月).

〔その他〕

ホームページ等

<http://soyaku.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱瀬 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