

令和元年5月25日現在

機関番号：37111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07299

研究課題名(和文)代謝関連アミノ酸のキラルメタボロミクスを実現する多次元分析法開発と診断指標の探索

研究課題名(英文)Development of enantioselective multi-dimensional HPLC systems for searching biomarkers with chiral metabolomics of metabolic-related amino acids

研究代表者

古賀 鈴依子 (Koga, Reiko)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：20804545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、代謝関連アミノ酸であるシトルリン、オルニチン及びホモシトルリンを対象とし、D体L体を区別した含量解析が可能な分析装置の開発を達成した。

生体内の微量代謝関連キラルアミノ酸の正確な検出・定量を可能とするため、アミノ酸を蛍光誘導体化し、異なる分離モードを組み合わせた多次元HPLCを用いて分析システムを構築した。開発した分析法を用いて生体試料の分析を行った結果、夾雑成分の影響をほとんど受けることなく極めて良好な分析が可能であり、様々な代謝関連キラルアミノ酸がヒト及びマウス生体試料中に含まれていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、代謝関連アミノ酸として尿素回路関連アミノ酸を対象とし、多次元HPLCシステムにより、D体とL体を区別した高選択的分析法を開発を達成した。本分析法により、従来困難であった生体試料中の微量代謝関連アミノ酸の正確な検出・定量が可能となり、生体試料中に様々な代謝関連アミノ酸が存在することを明らかにした。今後、本分析法を用いた代謝関連アミノ酸のキラル識別定量を通じて、新規診断指標・診断法の開発により人々の健康維持やQOL向上への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Highly selective analytical systems for the enantioselective determination of metabolic-related amino acids, citrulline, ornithine and homocitrulline were designed and developed. Amino acids were fluorescent-derivatized and determined by multi-dimensional HPLC systems combining different separation modes. By using the systems, the peaks of metabolic-related chiral amino acids were clearly observed without interference and various metabolic-related chiral amino acids were found in the biological samples of mice and healthy volunteers.

研究分野：分析化学

キーワード：分析化学 アミノ酸 光学分割

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸代謝障害は、代謝関連酵素の欠損、または正常な活性を示さないために生じる疾患であり、フェニルケトン尿症などの芳香族アミノ酸代謝障害やシトルリン血症などの尿素サイクル障害など、様々な疾患が存在する。症状としては発育障害、嘔吐および痙攣などが主に挙げられ、発見の遅れにより生涯に渡る QOL の低下を招く。一方、早期に障害部位を特定し、治療を開始することにより大幅に症状を軽減することが可能であるため、早期診断と早期の治療開始が強く求められている。

アミノ酸代謝障害は、発育障害、痙攣及び嘔吐などと似通った症状を示すものも多く、症状により鑑別することは難しいため、臨床化学診断が不可欠である。現在、アミノ酸代謝障害の診断には D 体と L 体を区別しないアミノ酸分析が広く用いられている。重篤な症例においては有効であるものの、早期の鑑別や障害部位の特定、軽症時の診断は困難であり、それらを可能とする鋭敏な診断・鑑別法の開発が切望されている。

これまでにアミノ酸代謝障害モデルマウスにおいて、従来のアミノ酸分析と比較して数倍もの鋭敏な変動を示す代謝関連キラルアミノ酸が存在することが明らかになっている。従って、多数の代謝関連キラルアミノ酸を対象として高選択的分析法を開発し、キラルメタボロミクスの適用範囲を拡大することで、アミノ酸代謝障害の鋭敏な新規診断指標の提案・導入につながり、人類の健康に貢献できると考え本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、代謝関連アミノ酸を対象とする高選択的キラルメタボローム分析法を開発し、アミノ酸代謝障害等の早期診断につながる鋭敏な新規指標の探索を行うことである。

アミノ酸代謝障害の多くは早期の診断や鑑別・治療開始による症状の大幅な軽減が可能であり、鋭敏な診断法の開発が切望されている。D 体と L 体を切り分けるキラルアミノ酸分析による予試験の結果、アミノ酸代謝障害において新規バイオマーカーの発見に繋がる知見を得ている。しかし、代謝関連キラルアミノ酸は微量成分であるため、正確な含量評価には分析法の高性能化が不可欠であった。

そこで本研究では、生体内の微量代謝関連キラルアミノ酸の高選択的分析を可能とする多次元 HPLC 分析法を開発し、アミノ酸代謝障害に伴う含量変化を解析することにより、早期診断指標を探索・評価し、人類の健康に貢献する。

3. 研究の方法

申請者がこれまでに開発した三次元 HPLC 分析法を基盤として、代謝関連アミノ酸の高選択的キラルメタボローム分析法を新たに開発する。代謝関連アミノ酸の網羅的キラルメタボローム分析法開発の第一段階として、尿素回路関連化合物を中心に分析対象アミノ酸を選択する。

アミノ酸は 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole 試薬によりプレカラム蛍光誘導体化を行い、多次元 HPLC システムで光学分割・定量を行う。本システムは逆相分離、陰イオン交換分離、光学分割といった複数の異なる分離モードにより構成される。分析対象として選択した代謝関連アミノ酸について各分離系における最適な分離条件を精査し、得られた条件を統合して多次元 HPLC 分析システムを構築する。

代謝関連キラルアミノ酸の生体内含量は他のタンパク質構成アミノ酸と比較して極めて微量であるため、生体試料由来の夾雑成分によって正確な検出・定量が困難となることも想定される。そこで、生体試料としてマウス尿及び血漿試料を用いて、生体試料由来の夾雑成分と分離するための移動相条件の精査を行う。また、疾患としてアミノ酸代謝障害に着目し、生体試料における代謝関連アミノ酸のキラル識別定量による鋭敏な新規診断指標の探索を行う。

4. 研究成果

代謝関連アミノ酸の網羅的キラルメタボローム法の第一段階として、尿素回路関連化合物であるシトルリン鏡像異性体を分析対象に選択し、三次元 HPLC を用いる高選択的分析法を開発を行った。本三次元 HPLC 分析法ではまず、一次元目のモノリス型マイクロ ODS カラム (内径 0.53 mm、全長 1000 mm) により、シトルリンを D 体と L 体の混合物として疎水性相互作用を用いて他の内在性化合物から分離する。オンラインで分取したシトルリン画分を、二次元目の陰イオン交換カラムの静電相互作用により更に分離した後、三次元目のパークル型光学分割カラムに導入して鏡像異性体の分離を行う。

一次元目の逆相分配については移動相に含まれるアセトニトリル濃度を、二次元目および三次元目の陰イオン交換分離、光学分割についてはそれぞれ移動相中のギ酸濃度とメタノール、アセトニトリルの組成比を変化させて分離条件を精査した。その結果、一次元目および二次元目において、共に約 60 分でシトルリンを他の内在性化合物から分離し、三次元目においては KSAACSP-001S カラム (内径 1.5 mm、全長 250 mm) により約 40 分で $\alpha=1.19$ の良好な光学分割を達成した。構築したシステムについて定量性を検討した結果、シトルリン鏡像異性体はいずれもインジェクト量当たり 10 fmol から 5 pmol の範囲において相関係数 0.9998 以上の直線性を示した。また、標品シトルリンおよびマウス尿試料における再現性は日内・日間変動のいずれも RSD 4.0% 以下であり、生体試料としてマウス尿試料を用いた回収率についても良好な結果が得られた。本分析法をマウス、ラット及びヒト尿試料へ適用した結果、いずれの生体試料

においても夾雑成分の影響を受けることなく尿中微量シトルリン鏡像異性体の極めて良好な分析が可能であり、三次元 HPLC を用いるシトルリン鏡像異性体の高選択的分析法の構築が達成された。

また、シトルリンに加え、分析対象をオルニチン及びホモシトルリンへと広げ、多次元 HPLC を用いる高選択的分析法の開発を行った。シトルリンおよびホモシトルリンを分析対象とする二次元キラル HPLC 分析法の構築に際しては、一次元目に微粒子充填型 ODS カラム（内径 1.0 mm、全長 250 mm）を用いた。二次元目の光学分割については生体内の夾雑成分との良好な分離が可能であった KSAACSP-105S カラム（内径 1.5 mm、全長 250 mm）を選択した。構築した二次元キラル HPLC システムは相関係数 0.9999 以上の直線性を示し、再現性及び回収率についても良好な結果が得られた。ヒト血漿、尿の分析を行った結果、血漿中に L-ホモシトルリン及び L-シトルリンが、尿中に L-ホモシトルリン及び D,L-シトルリンが明瞭に認められ、シトルリンの %D 値は 7.3% であった。二次元 HPLC によるヒト臨床検体分析において、夾雑成分の影響を受ける試料が存在したため、更に高選択的な分析法として三次元 HPLC システムを開発した。分析対象はシトルリン、ホモシトルリン及びオルニチンとした。一次元目の逆相分配においては 150 分以内に、二次元目の陰イオン交換分離においてはそれぞれ 60 分以内に分析対象のアミノ酸を他の内在性化合物から分離した。三次元目の光学分割には KSAACSP-001S カラム（内径 1.5 mm、全長 250 mm）を用い、各分析対象アミノ酸について分離度 1.96 以上の良好な光学分割が得られた。構築した三次元 HPLC システムをヒト臨床検体として血漿及び尿分析へ適用した結果、二次元 HPLC システムを用いた分析では夾雑成分の影響を受けていた試料についても、微量尿素回路関連キラルアミノ酸の明瞭な検出が可能であり、極めて高い選択性を有する三次元 HPLC システムの構築に成功した。今後、本システムを用いたアミノ酸代謝障害モデルマウス試料におけるアミノ酸のキラル識別定量アミノ酸を行うことにより、新規診断指標の開発が期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Hiroaki SAKAUE, Kenji HAMASE, Ryuich KONNO, Mouse D-amino-acid oxidase: distribution and physiological substrates, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 査読有, (2017). DOI: 10.3389/frmolb.2017.00082

Aogu FURUSHO, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Kenji HAMASE, Development of a highly-sensitive two-dimensional HPLC system with narrowbore reversed-phase and microbore enantioselective columns and application to the chiral amino acid analysis of the mammalian brain, *Chromatography*, 査読有, 39, 83-90 (2018). DOI: 10.15583/jpchrom.2018.007

Chin-Ling HSIEH, Reiko KOGA, Aogu FURUSHO, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Jen-Ai LEE, Kenji HAMASE, Enantioselective and simultaneous determination of lactate and 3-hydroxybutyrate in human plasma and urine using a narrowbore online two-dimensional HPLC system, *Journal of Separation Science*, 査読有, 41, 1298-1306 (2018). DOI: 10.1002/jssc.201701283

[学会発表] (計 13 件)

古賀鈴依子, 代謝関連キラルアミノ酸の多次元 HPLC 分析法開発と生体内含量解析, 第 29 回クロマトグラフィー科学会議, 2018 年 11 月 7 日 ~ 9 日 (豊橋).

古賀鈴依子, 甲斐永美里, 篠島朋子, 三田真史, 井手友美, 坂口洋平, 吉田秀幸, 能田 均, 濱瀬健司, 多次元 HPLC を用いる代謝関連キラルアミノ酸の高選択的分析法開発, 第 14 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 2018 年 9 月 5 日 ~ 6 日 (富山).

Reiko KOGA, Ena YANO, Tomoko SHINOJIMA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Hideyuki YOSHIDA, Hitoshi NOHTA, Kenji HAMASE, Enantioselective and simultaneous 2D-HPLC determination of citrulline and homocitrulline in human clinical samples, 47th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2018 July 29-August 2 (Washington, DC, USA).

Kenji HAMASE, Reiko KOGA, Aogu FURUSHO, Chin-Ling HSIEH, Nutchaya SEREEKITTIKUL, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Jen-Ai LEE, Wolfgang LINDNER, Three-dimensional chiral HPLC analysis of amino acids and related compounds in complex biological matrices including human clinical samples, 47th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2018 July 29-August 2

(Washington, DC, USA).

Aogu FURUSHO, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomonori KIMURA, Kenji HAMASE, Three-dimensional HPLC analysis of chiral amino acids in the plasma of patients with chronic kidney disease, 47th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2018 July 29-August 2 (Washington, DC, USA).

Aogu Furusho, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomonori KIMURA, Kenji HAMASE, Development of a three-dimensional HPLC system and application to the chiral amino acid analysis in the plasma of patients with kidney dysfunction, 2018 Sino-Japanese Joint Symposium on Separation Sciences, 2018 July 11-12 (Dalian, China).

古賀鈴依子, 矢野恵奈, 篠島朋子, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 濱瀬健司, 二次元 HPLC を用いるシトルリン及びホモシトルリン鏡像異性体の一斉分析法開発とヒト尿中含量解析, 第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2018 年 6 月 13 日 ~ 15 日 (弘前).

古庄 仰, 古賀鈴依子, 秋田健行, 三田真史, 井手友美, 木村友則, 濱瀬健司, 臨床試料におけるキラルアミノ酸高精度分析を可能とする選択的三次元 HPLC 法の開発, 第 25 回クロマトグラフィーシンポジウム, 2018 年 6 月 13 日 ~ 15 日 (弘前).

古賀鈴依子, 三田真史, 清川恵奈, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, 濱瀬健司, 三次元キラル HPLC を用いるシトルリンの高選択的分析法開発および哺乳類尿中含量解析, 第 28 回クロマトグラフィー科学会議, 2017 年 11 月 15 日 ~ 17 日 (京都).

伊豆拓真, 古賀鈴依子, 秋田健行, 門田靖彦, 西尾康弘, 三田真史, 井手友美, 濱瀬健司, 芳香族アミノ酸をキラルセクターに有する新規パークル型キラル固定相のデザインとヒト臨床試料の二次元 HPLC 分析, 第 28 回クロマトグラフィー科学会議, 2017 年 11 月 15 日 ~ 17 日 (京都).

Kenta SAKAI, Kenji UEKI, Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Tomomi IDE, Kenji HAMASE, Development of a two-dimensional chiral HPLC system for leucine structural isomers and determination of their urinary levels, 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2017 November 5-9 (Jeju, Korea).

Aogu FURUSHO, Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Kenji HAMASE, Design and development of a three-dimensional HPLC system for chiral amino acid analysis in human clinical samples, 46th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 2017 November 5-9 (Jeju, Korea).

古賀鈴依子, 門田靖彦, 西尾康弘, 三田真史, 清川恵奈, 吉田秀幸, 山口政俊, 能田 均, 濱瀬健司, 三次元 HPLC を用いる生体内シトルリン鏡像異性体の高選択的分析法開発, 第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 2017 年 8 月 28 日 ~ 29 日 (東京).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名 : 濱瀬 健司

ローマ字氏名 : HAMASE Kenji

研究協力者氏名：三田 真史
ローマ字氏名：MITA Masashi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。