

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16343

研究課題名（和文）代謝関連アミノ酸の多次元キラルHPLC法構築と精神・神経疾患の早期診断法開発

研究課題名（英文）Development of multidimensional chiral HPLC methods for metabolic related amino acids and search for early diagnostic markers for psychiatric and neurological disorders

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：精神・神経疾患の早期診断を可能とする客観的診断指標を探索するため、代謝関連アミノ酸のキラル識別定量を可能とする分析法を新たに開発した。本研究で構築した分析法は、複数の異なる分離系を組み合わせることにより従来法の課題であった選択性の不足を解消し、生体試料中の微量代謝関連D-アミノ酸の精確な定量を達成した。臨床試料分析への適用により生体内に様々な代謝関連D-アミノ酸が存在することを示し、精神・神経疾患の病態への関与が報告されているD-アミノ酸酸化酵素（DAO）の活性変化に伴い一部のアミノ酸について血漿および尿試料中の%D値が有意に変化す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

精神・神経疾患の多くは早期の診断と適切な治療の開始により症状の大幅な軽減が可能であるため、早期および客観的診断を可能とする指標の発見は人々のQOL向上につながる。統合失調症などの病態へのD-アミノ酸酸化酵素（DAO）の関与が報告され、その活性変化を反映し得る指標として代謝関連D-アミノ酸が注目を集めているが、分析法の欠如により研究が停滞していた。本研究の遂行により、種々の代謝関連アミノ酸のキラル識別分析が達成され、生体内におけるD体の存在が明らかとなった。また、一部のD-アミノ酸についてはDAOの活性変化に伴う有意な変化が認められ、今後疾患の診断指標としての利用に向けた更なる研究が期待される。

研究成果の概要（英文）：The novel analytical methods for the enantioselective determination of metabolic-related amino acids were developed to search for early diagnostic biomarkers of psychiatric and neurological disorders, such as schizophrenia. The developed methods addressed the lack of selectivity in the analysis of biological samples by combining several different separation modes, and achieved precise quantification of trace amounts of metabolic-related D-amino acids in biological samples. Various metabolic-related D-amino acids were found in clinical samples and it was also revealed that the %D values of some amino acids in plasma and urine samples showed significant changes depending on the alteration of the activity of D-Amino acid oxidase (DAO), which is reported to be involved in the pathogenesis of psychiatric and neurological disorders.

研究分野：分析化学

キーワード：キラルアミノ酸 多次元HPLC 代謝関連アミノ酸 分析化学 光学分割

1. 研究開始当初の背景

精神・神経疾患の多くは早期の治療開始により大幅な症状改善が見込まれるが、早期診断を可能とするバイオマーカーの欠如が課題として挙げられる。近年、統合失調症などの精神・神経疾患の病態に D-アミノ酸の代謝酵素である D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) の活性変化が関与していることが報告され、D-アミノ酸は精神・神経疾患の新たな診断指標の候補として注目されている。なかでも、代謝関連アミノ酸はタンパク質構成アミノ酸と比較して食事や生活環境など外的要因による含量変化を受けにくく、鋭敏な DAO の活性評価指標になる可能性が高い。しかしながら、代謝関連アミノ酸の生体内含量はごく微量であること、生体成分による検出および定量の妨害を受けやすいことからいまだ詳細な解析が進んでいないのが現状であり、生体試料における代謝関連アミノ酸の精確なキラル識別定量を可能とする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、「精神・神経疾患の早期かつ客観的な診断を可能とする新規指標を探索するために、代謝関連アミノ酸の網羅的かつ高選択的なキラル識別分析法を開発し、人々の QOL 向上に貢献すること」である。これまでの研究により、数種の代謝関連 D-アミノ酸が生体内に存在することを明らかにし、マウス尿試料を用いた予試験によって生体内の DAO 活性変化に伴う代謝関連 D-アミノ酸の尿中含量変化を見出している。代謝関連アミノ酸の高選択的なキラル識別分析法を開発し、DAO の活性変化に伴う尿中・血中キラルメタボローム解析を行うことにより、精神・神経疾患の鋭敏かつ客観的な新規診断指標の提案につながる可能性が高いと考え本研究の着想に至った。

3. 研究の方法

生体内に微量にしか存在しない代謝関連アミノ酸のキラルメタボローム解析を可能とするため、異なる 3 種の分離系を組み合わせることで開発した三次元 HPLC システムを基盤として分析法を構築した。予試験において DAO 活性変化に伴う含量変化が認められたシトルリンの他、尿素回路構成アミノ酸、リシン代謝物、チロシン構造異性体およびアミノ酪酸構造異性体を分析対象として選択し、各分離系に用いるカラムおよび分離条件の精査を行った。その結果、生体試料中に多量に存在する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、代謝関連キラルアミノ酸分析の課題であった選択性不足の解消を実現した。開発した分析法を用いて、臨床検体、正常な DAO 活性を有するコントロールマウスおよび DAO 欠損マウス試料を用いてキラルアミノ酸メタボローム解析を行い、生体内 DAO の活性評価指標となり得る代謝関連 D-アミノ酸の探索を行った。

4. 研究成果

精神・神経疾患の診断指標となり得る生体内 DAO 活性評価指標の探索に向けて、代謝関連アミノ酸である尿素回路構成アミノ酸、リシン代謝物、チロシン構造異性体およびアミノ酪酸構造異性体を対象として精確な検出・定量を可能とする多次元キラル HPLC システムを用いた分析法を構築し、尿中・血中キラルメタボローム解析を行った。

尿素回路構成アミノ酸 (シトルリン、オルニチン) を対象とする分析法の構築

予試験において、DAO 欠損に伴うマウス尿中における含量変化が認められたシトルリン (Cit) に加え、オルニチン (Orn) を分析対象に加えて分析法の構築を行った。4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) を用いて対象アミノ酸をプレカラム誘導体化し、励起波長 470 nm における 530 nm の蛍光発光により検出した。三次元 HPLC システムの構築に際し、一次元目の逆相分配に Singularity RP18 カラム (1.0 mm i.d.×250 mm) を用い、トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル水溶液を移動相として使用したグラジエント溶離により、対象アミノ酸をタンパク質構成アミノ酸から良好に分離することが可能であった。一次元目において分取した各アミノ酸画

分をループへ分取し、それぞれ二次元目へと導入した。二次元目の分離系として陰イオン交換分離を選択し、Singularity AX カラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を用いることにより一次元目の逆相分配のみでは分離が不十分であった夾雑成分より再び対象アミノ酸を分離・分取し、三次元目へと導入した。三次元目の光学分割カラムとして Singularity CSP-001S カラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を選択し、ギ酸を含むメタノールとアセトニトリルを移動相として用いることにより対象とする全てのアミノ酸鏡像異性体についてベースライン分離 (分離度 ≥ 3.7) を達成した。また、構築した分析法は良好な直線性 ($r^2 \geq 0.999$)、再現性 ($RSD \leq 6.7\%$) および回収率 (100.1–109.7%) を示した。

リシンおよび代謝物 (ピペコリン酸、2-アミノアジピン酸) を対象とする分析法の構築

尿素回路構成アミノ酸と同様に NBD-F を用いて対象アミノ酸をプレカラム誘導体化し、蛍光検出した。一次元目に Singularity RP18 カラム (1.0 mm i.d.×250 mm) を、二次元目に Singularity AX カラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を、三次元目に Singularity CSP-001S カラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を用いて三次元 HPLC システムを構築し標品アミノ酸を分析した結果、三次元目において全てのアミノ酸鏡像異性体のベースライン分離 (分離度 ≥ 2.5) が得られた。また、構築した分析法は良好な直線性 ($r^2 \geq 0.995$)、再現性 ($RSD \leq 7.0\%$) および回収率 (90.8–106.2%) を示した。

チロシン構造異性体 (*o*-, *m*-, *p*-チロシン) を対象とする分析法の構築

一次元目の逆相分配に Singularity RP18 カラム (1.0 mm i.d.×250 mm)、二次元目の光学分割に Singularity CSP-001S カラム (1.5 mm i.d.×250 mm) を用いて二次元 HPLC システムを構築し、NBD-F により誘導体化したチロシン (Tyr) 構造異性体を導入した。構築した二次元 HPLC システムを用いて標品アミノ酸を分析した結果、全てのアミノ酸鏡像異性体について良好な分離 (分離度 ≥ 1.4)、直線性 ($r^2 \geq 0.999$)、再現性 ($RSD \leq 6.2\%$) および回収率 (91.1–104.5%) が得られた。

アミノ酪酸構造異性体 (α -, β -, γ -アミノ酪酸) を対象とする分析法の構築

一次元目に Singularity RP18 カラム (1.0 mm i.d. × 250 mm) を、二次元目に Singularity AX カラム (1.5 mm i.d. × 250 mm) を、三次元目に Singularity CSP-013S カラム (1.5 mm i.d. × 250 mm) を用いて三次元 HPLC システムを構築し、NBD-F により誘導体化したアミノ酪酸構造異性体を分析した。三次元目において、鏡像異性体を有する α -アミノ酪酸 (AABA) および β -アミノ酪酸 (BABA) のベースライン分離 (分離度 ≥ 2.3) が得られ、不斉炭素を持たない γ -アミノ酪酸 (GABA) についても十分に保持された。また、構築した分析法は良好な直線性 ($r^2 \geq 0.999$)、再現性 ($RSD \leq 6.2\%$) および回収率 (90.7–104.1%) を示した。

血漿および尿中代謝関連アミノ酸のキラル識別含量解析

構築した分析法を健常人の尿および血漿試料分析へ適用した結果、いずれの分析法においても生体成分による妨害をほとんど受けることなく高選択的な分析が可能であった。ヒト血漿中の尿素回路構成アミノ酸、リシン代謝物およびアミノ酪酸構造異性体について調査した結果、Cit、Orn、2-アミノアジピン酸 (2-AAA) については L 体のみが存在したのに対し、リシン (Lys)、ピペコリン酸 (PA)、AABA、BABA については D 体 L 体ともに存在することが示された。また、尿中の尿素回路構成アミノ酸、リシン代謝物、チロシン構造異性体およびアミノ酪酸構造異性体を同様に分析した結果、Cit、Orn、2-AAA、Lys、PA、*p*-Tyr、AABA および BABA 鏡像異性体の存在が示された。更に、リシン代謝物およびアミノ酪酸構造異性体を対象として日中の含量変化を解析したところ、Lys、PA および BABA が食事などの影響を受けることなく一定の血漿・尿中 %D 値を示したのに対し、2-AAA および AABA については 1 日を通して %D 値の変化が認められた。また、Cit および Orn を対象として正常な DAO 活性を有するコントロールマウスと DAO 欠損マウスの血漿・尿中含量解析を行った結果、尿中の Cit、Orn および血漿中の Orn について DAO 欠損に伴い %D 値が有意に増加することが明らかとなった。今後更なる臨床試料分析と、これらの代謝関連 D-アミノ酸と精神・神経疾患の病態との関連解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aogu FURUSHO, Reiko KOGA, Takeyuki AKITA, Masashi MITA, Tomonori KIMURA, Kenji HAMASE	4. 巻 91
2. 論文標題 Three-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of Asn, Ser, Ala, and Pro enantiomers in the plasma of patients with chronic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 11569-11575
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b01615	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 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 古賀鈴依子, 川添奈倫, 石井千晴, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 アミノ酪酸構造異性体を対象とする三次元キラルHPLC分析法の開発とヒト尿中含量解析
3. 学会等名 第17回D-アミノ酸学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新井杏奈, 古賀鈴依子, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 エキシマー蛍光誘導体化を用いた実試料中カルノシンおよびヒスチジンの高選択的二次元キラルHPLC分析
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 翁美月, 宮里ちひろ, 古賀鈴依子, 秋田健行, 浜瀬健司, 吉田秀幸, 能田 均
2. 発表標題 フルオラスキラル誘導体化LC-MS/MS法による飲料中キラルアミノ酸の分析
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Reiko KOGA, Masashi MITA, Tomomi IDE, Hideyuki YOSHIDA, Hitoshi NOHTA, Kenji HAMASE
2. 発表標題 Enantioselective Determination of Ornithine and Lysine in Human Physiological Fluids Using a Highly Selective Two-dimensional HPLC System Based on Intramolecular Excimer-forming Fluorescence Derivatization
3. 学会等名 51st International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江頭美咲, 古賀鈴依子, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 チロシンおよびニトロチロシンを対象とする高選択的三次元キラルHPLC分析法の開発
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川添奈倫, 古賀鈴依子, 石井千晴, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 高選択的三次元キラルHPLCを用いるアミノ酪酸構造異性体の生体内含量解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松尾あかり, 古賀鈴依子, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 三次元キラルHPLCを用いるリシンおよび代謝物のヒト血漿・尿中における含量解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 守田衣織, 古賀鈴依子, 石井千晴, 三田真史, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 三次元HPLCを用いるシトルリンおよびオルニチンのキラル識別生体内含量解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古賀鈴依子, 守田衣織, 三田真史, 石井千晴, 浜瀬健司, 吉田秀幸, 能田 均
2. 発表標題 三次元HPLCを用いるシトルリン・オルニチン鏡像異性体の体内分布およびD-アミノ酸酸化酵素欠損による含量変化解析
3. 学会等名 第31回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上田潔奈, 古賀鈴依子, 川末慎葉, 坂口洋平, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 アミノ酸構造異性体を対象とする高選択的多次元キラル HPLC 分析法の開発
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 清水美優, 川末慎葉, 古賀鈴依子, 三田真史, 井手友美, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 酸性アミノ酸およびN-メチル酸性アミノ酸鏡像異性体を対象とする高感度・高選択的一斉分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮里ちひろ, 中武樹, 川末慎葉, 古賀鈴依子, 秋田健行, 浜瀬健司, 吉田秀幸, 能田 均
2. 発表標題 フルオラスキラル誘導体化LC-MS法による高選択的アミノ酸分析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古賀鈴依子
2. 発表標題 多次元HPLCを用いる代謝関連D-アミノ酸の分布および含量制御機構の解析
3. 学会等名 第16回D-アミノ酸学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀鈴依子, 荒牧雄也, 三田真史, 井手友美, 坂口洋平, 吉田秀幸, 能田 均, 濱瀬健司
2. 発表標題 三次元キラルHPLCを用いるリジンおよび代謝物の生体内含量解析
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 中武樹, 坂口洋平, 古賀鈴依子, 吉田秀幸, 能田 均
2. 発表標題 タンパク質加水分解アミノ酸を対象としたフルオラスキラル誘導体化LC-MS分析
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reiko KOGA, Nao KIMURA, Yoshiki SUMI, Yohei SAKAGUCHI, Masashi MITA, Tomomi IDE, Kenji HAMASE, Hideyuki YOSHIDA, Hitoshi NOHTA
2. 発表標題 Highly selective 2D-HPLC analysis of ornithine and lysine enantiomers in human physiological fluids based on intramolecular excimer-forming derivatization
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 守田羽吟, 川末慎葉, 古賀鈴依子, 坂口洋平, 三田真史, 濱瀬健司, 吉田秀幸, 能田 均
2. 発表標題 二次元キラルHPLCを用いるカルノシンの高選択的分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀鈴依子, 木村奈生, 坂口洋平, 三田真史, 井手友美, 濱瀬健司, 吉田秀幸, 能田 均
2. 発表標題 エキシマー蛍光誘導体化を用いるリジンおよびオルニチンの高選択的二次元HPLC分析法開発と尿中含量解析
3. 学会等名 第27回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀鈴依子, 三田真史, 吉田秀幸, 能田 均, 濱瀬健司
2. 発表標題 多次元HPLCを用いる内在性微量キラルアミノ酸分析と医療応用
3. 学会等名 第79回分析化学討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reiko KOGA, Haruka KAJIKI, Yohei SAKAGUCHI, Masashi MITA, Tomomi IDE, Hideyuki YOSHIDA, Hitoshi NOHTA, Kenji HAMASE
2. 発表標題 Determination of urea-cycle-related amino acid enantiomers in human physiological fluids using a three-dimensional HPLC system
3. 学会等名 The 4th International Conference of D-Amino Acid Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Reiko KOGA, Yohei SAKAGUCHI, Masashi MITA, Tomomi IDE, Hideyuki YOSHIDA, Hitoshi NOHTA, Kenji HAMASE
2. 発表標題 Development of a three-dimensional HPLC system for the enantioselective determination of urea-cycle amino acids in mammalian urine
3. 学会等名 49th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀鈴依子, 坂口洋平, 三田真史, 吉田秀幸, 能田 均, 浜瀬健司
2. 発表標題 シトルリン及びオルニチンを対象とする三次元キラルHPLC分析法の開発とD-アミノ酸化酵素欠損に伴う尿中含量変化解析
3. 学会等名 第30回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2019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

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
---------	---------