

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293007

研究課題名(和文)キラルアミノ酸メタボロミクスを基盤とするアミノ酸代謝障害の網羅的早期診断法開発

研究課題名(英文)Early diagnosis of the defect in amino acid metabolism using chiral amino acid metabolomics

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：D体とL体を識別するキラルアミノ酸分析により、アミノ酸代謝障害の鋭敏な診断を可能にする高感度選択的な分析法を開発し、モデル動物を用いて有用性を検証した。キラルアミノ酸プロファイルは疾病時に劇的に変化する場合がある。本研究ではタンパク質構成アミノ酸に加えて代謝マップ上の様々な微量アミノ酸を対象とし、芳香族アミノ酸、分岐鎖アミノ酸、含硫アミノ酸の代謝障害、尿素サイクル異常などにおいて、光学異性体を識別する多次元HPLC分析法の開発を行った。その結果、いずれの疾患においても対象アミノ酸が血中・尿中で良好に分析可能であり、従来のアミノ酸分析では得られない新たなバイオマーカー候補が発見された。

研究成果の概要(英文)：By using chiral amino acid analysis discriminating the enantiomers, highly sensitive and selective analytical methods have been designed and applied to various animal models. Chiral amino acid profiles sometimes drastically change in the tissues and physiological fluids under disease conditions. In the present study, various metabolic related amino acids were selected as the analytical targets, and enantioselective multi-dimensional HPLC systems have been developed for the diagnosis of the metabolic disorders of aromatic amino acids, branched aliphatic amino acids, sulfur-containing amino acids and urea cycle. As a result, target amino acid enantiomers could be determined without severe interference in the plasma and urine, and possible biomarkers were found.

研究分野：物理系薬学

キーワード：分析化学 メタボロミクス アミノ酸 光学分割

1. 研究開始当初の背景

アミノ酸代謝障害は、代謝関連酵素が欠損または正常な活性を示さないために生じ、フェニルケトン尿症などの芳香族アミノ酸代謝障害、メープルシロップ尿症などの分岐鎖アミノ酸代謝障害、ホモシスチン尿症などの含硫アミノ酸代謝障害、シトルリン血症などの尿素サイクル障害といった様々な疾患が存在する。これらは代謝上流のアミノ酸蓄積や、下流のホルモンなどの不足が原因で発症するが、症状はいずれも発育障害、知能障害、嘔吐、痙攣など極めて類似しており、外見での鑑別は困難である。一方でアミノ酸代謝障害は、代謝マップでの障害部位が特定されると適切な食事療法が著効を示すことが多く、重篤な知能障害、発育障害などの発症を防止するため一刻も早い診断と早期治療の開始が切望される。

現在、アミノ酸代謝障害の診断にはアミノ酸分析が世界中で汎用されており、重篤な症例には有効である。一方で出生時は正常と診断されながらアミノ酸蓄積と共に発症する症例も多く、軽症期、発症早期の診断を可能とする鋭敏な指標が求められている。従来のアミノ酸分析装置はアミノ酸の光学異性体(D体とL体)を区別できないが、最近、分析技術の進歩に伴って様々な微量D-アミノ酸がヒトを含む哺乳類体内に存在し、生理的意義を有することが明らかになってきた。応募者はこれまでの研究において、D体とL体を区別することで従来のアミノ酸分析値よりも数倍から数十倍の変動を示す鋭敏な指標が存在することを見出し、これをアミノ酸代謝障害の早期診断に利用することで罹患者の生涯QOLを大きく改善できると考え、本研究の申請を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、D体とL体を区別するキラルアミノ酸メタボロミクスにより、アミノ酸代謝障害の網羅的かつ鋭敏な診断法を構築すること、並びに診断法構築に資する高感度かつ高選択的な分析法を開発することである。応募者はこれまでの研究で微量D-アミノ酸の精密分析装置を多数開発するとともに、哺乳類体内におけるD-アミノ酸の分布や動態、生理的意義の解析を行ってきた。特に平成20年にはタンパク質構成全アミノ酸光学異性体の一斉分析装置を世界で初めて完成させ、これらの装置を用いてキラルアミノ酸に着目した新規生理活性分子やバイオマーカーの探索を行ってきた。

キラルアミノ酸のD体は、正常時には生体内に殆ど存在しない微量な光学異性体であり、疾病時に大きな含量変化を示す場合がある。また、応募者は様々な微量アミノ酸光学異性体がヒトの血液や尿にも存在すること、出生前診断に用いる羊水中にも存在することを明らかにしてきた。これらの予備試験結果はD体とL体を切り分けた「キラルアミノ

酸メタボロミクス」によりアミノ酸代謝障害の網羅的かつ鋭敏な診断法が構築できる可能性を示している。そこで本研究では代謝関連アミノ酸をターゲットとし、光学異性体を識別する高感度選択的多次元分析法を構築すると共に、アミノ酸代謝障害を対象とした診断法の構築を検討する。

3. 研究の方法

アミノ酸代謝障害を網羅的に診断するため、タンパク質構成全アミノ酸20種に加えて代謝マップに存在する様々な関連アミノ酸を分析対象に加え、「代謝障害関連キラルアミノ酸メタボローム一斉分析装置」を開発する。対象疾患は代表的な代謝障害から「芳香族アミノ酸代謝障害」、「分岐鎖アミノ酸代謝障害」、「含硫アミノ酸代謝障害」、「尿素サイクル障害」を選択し、分析法を構築すると共にモデルマウス等を用いて新規診断指標の探索を行う。

各種アミノ酸代謝障害の関連アミノ酸として、芳香族アミノ酸代謝障害ではDOPA、分岐鎖アミノ酸ではアロイソロイシンなどを選択する。含硫アミノ酸ではホモシスチン、ホモシスチン、尿素サイクル障害ではオルニチン、シトルリンなどを選択し、分析条件を検討・確立する。分析には微量アミノ酸光学異性体の選択的分析が可能な二次元HPLCを用いる。分析の鍵はマトリクス由来の夾雑成分との分離であり、分離条件の精査は実際の対象マトリクスとなる血漿、尿等を用いて検討する。なお、分析装置は微量成分の選択的定量を可能とする二次元HPLCとし、長時間の全自動分析を実施するため、長寿命、省エネルギー型青色LED蛍光検出器のデザインと搭載を行う。

4. 研究成果

タンパク質構成アミノ酸と比較し、アミノ酸代謝マップに存在する「非タンパク質構成アミノ酸」の含量は極めて微量である。従って高い感度と高い選択性を有する分析装置の開発が必須である。そこで各アミノ酸代謝障害をターゲットとし、代謝関連アミノ酸の光学異性体を識別する二次元HPLC分析法の開発を行った。二次元HPLC法の開発に当たっては、長寿命型のLED蛍光検出器を新たにデザインし、キラルアミノ酸分析に特化した長寿命、ワイドレンジ検出器の試作・評価を行った。その結果、従来型の検出器と比較して90%以上の消費電力を削減しつつ、50倍の寿命を有する新たな検出器の開発が達成された。

これらの技術を導入した二次元分析装置により、各疾患におけるキラルアミノ酸分析システムを開発すると共に、モデル動物による評価を行った。芳香族アミノ酸ではフェニルアラニン、チロシンに加えて3,4-ジヒドロキシフェニルアラニンを分析対象とし、分離条件を精査すると共に二次元HPLCの構築を

行った。その結果、一次元目は1 m長のキャピラリーモノリス型 ODS カラムを使用し、高アセトニトリル含量での分離を行うことで100分以内で良好な相互分離が得られた。二次元目の光学分割についてはオリジナルデザインのカラムを含めた様々なパークル型固定相を検討した結果、L-ロイシンをキラルセクターに有するオリジナルカラムである KSAACSP-001S により、いずれのアミノ酸鏡像異性体も30分以内に完全分離が達成された。本法を用いてアミノ酸代謝異常の1種である D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 欠損マウスの尿分析を行った結果、正常マウスと比較して明確に D-フェニルアラニンおよび D-チロシンの割合が高いことが示された。これは DL を識別しないアミノ酸分析では測定できない変化であり、キラルアミノ酸分析により新たなバイオマーカーが発見出来ることを示した知見である。

分岐鎖アミノ酸代謝障害では、バリン、ロイシン、イソロイシンに加えてアロイソロイシンを分析対象とし、光学異性体を識別する二次元 HPLC 分析法を構築した。その結果、一次元目の逆相分離にはテトラヒドロフランを含有する移動相を用いて良好な相互分離が得られた。二次元目の光学分割にはキニンアルカロイドをキラルセクターに使用する陰イオン交換型固定相を使用し、いずれのアミノ酸も15分程度で鏡像異性体の完全分離が達成された。本システムを用いてメープルシロップ尿症モデルマウスの血液、尿を分析した結果、血中の D-イソロイシンおよび尿中の D-イソロイシン、L-アロイソロイシンが極めて鋭敏な含量変化を示すことを見出した。特に尿中の D-イソロイシンは軽症期の診断が可能であることが示され、高感度な早期診断指標として期待できる。

含硫アミノ酸代謝障害では、メチオニン、システイン、シスチンに加えてホモシステイン、ホモシスチンを分析対象とし、二次元分析法の構築を行った。分析条件を精査した結果、一次元目にキャピラリーモノリス ODS カラム、二次元目に KSAACSP-001S を用いることでいずれも良好に分離され、鏡像異性体は分離度 3.0 以上で完全分離が達成された。本システムを用いてマウス尿試料中の含硫アミノ酸光学異性体含量を評価した。その結果、尿中シスチンには多量の L-シスチンが存在することに加えて微量な D-シスチンと DL-シスチンの存在が明らかになった。シスチンはシステインのダイマーであり、光学異性体としては LL 体、DD 体および DL 体が科学的には存在する。今回の検討においてこれら3種がいずれも尿中に存在することが示され、新たなバイオマーカー候補としての利用が期待される。

尿素サイクル障害では、オルニチンおよびシトルリンを分析対象とし、二次元 HPLC 分析法の構築を行った。オルニチン、シトルリンはいずれもタンパク質構成アミノ酸では

ないため、二次元分析は極めて困難なアミノ酸である。一次元目の逆相分離にはキャピラリーモノリス型 ODS カラムを利用し、150分以内で夾雑成分との分離が可能であった。また、二次元目には様々なパークル型キラル固定相を精査し、強い相互作用を有するオリジナル固定相として、KSAACSP-105S を選択した。その結果、シトルリン鏡像異性体は40分、オルニチン鏡像異性体は20分で完全分離が達成された。本システムを用いてアミノ酸代謝障害の1種である DAO 欠損マウスにおける尿分析を行った結果、シトルリン、オルニチン共に D 体の割合が増加しており、特にシトルリンでは4倍程度の大幅な増加が認められた。以上の結果は二次元 HPLC に質量分析を連結した三次元システムである二次元 HPLC-MS 分析によっても確認された。

これらの結果は血中および尿中のキラルアミノ酸プロファイリングにより、様々なアミノ酸代謝異常が評価出来ることを示しており、今後これらの D-アミノ酸の由来や生理的意義、新たなバイオマーカーとしての利用が期待される。

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9件)

Sachise KARAKAWA, Yurika MIYOSHI, Ryuichi KONNO, Satoru KOYANAGI, Masashi MITA, Shigehiro OHDO, Kenji HAMASE, Two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of day-night variation of D-alanine in mammals and factors controlling the circadian changes, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 8083-8091 (2013). DOI:10.1007/s00216-013-7071-2

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*, 966, 187-192 (2014). DOI:10.1016/j.jchromb.2014.01.034

Yurika MIYOSHI, Tsubasa OYAMA, Yusuke ITOH, Kenji HAMASE, Enantioselective two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of amino acids; analysis and physiological significance of D-amino acids in mammals, *Chromatography*, 35, 49-57 (2014). DOI:10.15583/jpchrom.2014.005

Jumpei SASABE, Masataka SUZUKI, Yurika MIYOSHI, Yosuke TOJO, Chieko OKAMURA, Sonomi ITO, Ryuichi KONNO, Masashi MITA, Kenji HAMASE, Sadakazu AISO, Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal dysfunction using the ratio of serine enantiomers, *PLoS ONE*, 9, e86504 (2014). DOI:10.1371/journal.pone.0086504

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*, 36, 45-50 (2015). DOI:10.15583/jpchrom.2015.017

浜瀬健司: キラルアミノ酸のメタボロミクス, *ファルマシア*, 50, 315-320 (2014).

Hai HAN, Yurika MIYOSHI, Reiko KOGA, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Kenji HAMASE, Changes in D-aspartic acid and D-glutamic acid levels in the tissues and physiological fluids of mice with various D-aspartate oxidase activities, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 116, 47-52 (2015). DOI:10.1016/j.jpba.2015.05.013

Tsubasa OYAMA, Eiichi NEGISHI, Hirohisa ONIGAHARA, Nao KUSANO, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Manabu NAKAZONO, Sumio OHTSUKI, Akio OJIDA, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Design and synthesis of a novel pre-column derivatization reagent with a 6-methoxy-4-quinolone moiety for fluorescence and tandem mass spectrometric detection and its application to chiral amino acid analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 116, 71-79 (2015). DOI:10.1016/j.jpba.2015.05.039

Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Yu SATO, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Enantioselective determination of phenylalanine, tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine in the urine of D-amino acid oxidase deficient mice using two-dimensional high-performance liquid chromatography, *Chromatography*, 37, 1, 15-22 (2016), DOI:10.15583/jpchrom.2015.040

[学会発表](計23件)

Kenji HAMASE, Yurika MIYOSHI, Nao KUSANO, Jumpei SASABE, Yosuke TOJO, Masashi MITA, Sadakazu AISO, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid metabolome analysis for biomarker assay in clinical diagnosis using enantioselective 2D-HPLC, 39th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Amsterdam, The Netherlands, 2013 June), P63.

浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスを利用する創薬・診断の展開, 日本分析化学会第62年会(東大阪, 2013年9月), 講演要旨集, P37.

浜瀬健司, 二次元HPLCによるキラルアミノ酸メタボロミクス: 分析法の開発と医療展開, 第61回質量分析総合討論会(つくば, 2013年9月), 講演要旨集, P164.

浜瀬健司, 三次百合香, 笹部潤平, 木村友則, 山本陵平, 三田真史, 猪阪善隆, 相磯貞和, キラルアミノ酸メタボロミクスによる疾患バイオマーカー探索への新しいアプローチ, 第38回日本医用マススペクトル学会年会(神戸, 2013年9月), 講演要旨集, P35.

浜瀬健司, 三次百合香, 三田真史, 笹部潤平, 相磯貞和, 定量的キラルアミノ酸メタボロミクスの推進を可能とする二次元HPLC法の開発, 第8回メタボロームシンポジウム(福岡, 2013年10月), 講演要旨集, P31.

Kenji HAMASE, Yusuke ITO, Hirohisa ONIGAHARA, Nao KUSANO, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid metabolomics for the sensitive diagnosis of metabolic disorders, 40th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (Hobart, Australia, 2013 November), P49-50.

浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスによる新規疾患バイオマーカーの探索, ビタミンB研究委員会平成25年度シンポジウム(大阪, 2014年1月), 講演要旨集, p7.

浜瀬健司, 三次百合香, 三田真史, 金野柳一, 哺乳類におけるキラルアミノ酸メタボロミクス-D-アミノ酸の分布と含量制御-, 第87回日本薬理学会年会(仙台, 2014年3月), 講演要旨集, p35.

浜瀬健司, D/L-アミノ酸プロファイルが生み出す新たな美容・機能性食品の可能性, 第 19 回国際食品素材/添加物展・会議, 第 12 回ヘルスフードエキスポ (東京, 2014 年 5 月), 講演要旨集, P10.

浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスを基盤とする創薬・診断と新たな機能性食品の探索, 日本食品科学工学会第 61 回大会 (福岡, 2014 年 8 月), 講演集, P29.

浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスの展開を可能とする高感度選択的二次元 HPLC 法, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research 併設キラルサイエンスセミナー (宇都宮, 2014 年 9 月), 講演要旨集, P35.

Kenji HAMASE, Yurika MIYOSHI, Jumpei SASABE, Tomonori KIMURA, Masashi MITA, Ryohei YAMAMOTO, Yoshitaka ISAKA, Sadakazu AISO, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid metabolomics using two-dimensional HPLC for novel biomarker screening, 30th International Symposium on Chromatography (Salzburg, Austria, 2014 September), OR44.

Kenji HAMASE, Chiral amino acid metabolomics for clinical diagnosis, Molecular Chirality Asia 2014 (Beijing, China, 2014 October), P48.

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を可能とする二次元 HPLC 法の開発と利用, 第 56 回日本放線菌学会学術講演会 (東京, 2014 年 11 月), 講演 1.

浜瀬健司, タンパク質・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を可能とする二次元 HPLC 法の開発と創薬・診断への展開, 第 24 回 WS フォーラム (福岡, 2014 年 11 月), 講演要旨集, 講演 1

浜瀬健司, 三次百合香, 中根舞子, 三田真史, 長野正信, 黒酢および各種発酵食品・飲料におけるキラルアミノ酸メタボローム解析, 日本黒酢研究会第 2 回学術研究会 (東京, 2015 年 3 月), 日本黒酢研究会会報, P42.

Kenji HAMASE, Yurika MIYOSHI, Yayoi YONENAGA, Hirohisa ONIGAHARA, Yusuke ITO, Masashi MITA, Jumpei SASABE, Sadakazu AISO, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid targeted metabolomics for clinical diagnosis using enantioselective two-dimensional HPLC tandem-mass

spectrometry, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, (Geneva, Switzerland, 2015 June), P42.

Kenji HAMASE, Yurika MIYOSHI, Masashi MITA, Wolfgang LINDNER, Chiral amino acid metabolomics for drug discovery, clinical diagnosis and designing functional foods/beverages, 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, (Tbilisi, Georgia, 2015 July6), P25.

浜瀬健司, キラルアミノ酸網羅的定量分析システムの開発と応用, 日本プロテオーム学会 2015 年会 (熊本, 2015 年 7 月 23 日), 講演要旨集, P83.

浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクス技術の開発, 第 38 回日本神経科学大会 (神戸, 2015 年 7 月 28 日), 1LS05.

⑳ 浜瀬健司, キラルアミノ酸メタボロミクスによるバイオマーカー探索の新戦略, 第 28 回バイオメディカル分析科学シンポジウム, (長崎, 2015 年 8 月 22 日), 講演要旨集, P58-59.

㉑ 浜瀬健司, キラルアミノ酸分析技術の開発と応用, 第 45 回機能性食品用ペプチド研究会, (大阪, 2015 年 9 月 30 日), 講演要旨集, P1.

㉒ 浜瀬健司, キラルアミノ酸分析が生み出す新たな世界 - 医療・食品・宇宙への展開 -, 日本薬学会近畿支部平成 28 年新春特別講演会, (京都, 2016 年 1 月 8 日).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

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

新聞記事
脚光浴びる D-アミノ酸 食品開発着々と進展
健康食品新聞
2013 年 9 月 4 日

美肌アミノ酸 これだ 隠れた成分測れる装置
朝日新聞
2015 年 5 月 24 日

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：1 0 2 8 4 5 2 2

(2) 研究分担者

植田 正 (UEDA Tadashi)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：9 0 1 8 4 9 2 8

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：6 0 3 3 0 9 3 2

相磯 貞和 (AISO Sadakazu)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：6 0 1 3 8 0 1 3

(3) 連携研究者

遠藤 文夫 (ENDO Fumio)
熊本大学・医学部・教授
研究者番号：0 0 1 7 6 8 0 1