

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860023

研究課題名(和文)尿中キラルアミノ酸メタボローム解析を利用する鋭敏な非侵襲診断法の開発

研究課題名(英文)Development of sensitive and noninvasive diagnostic methods using chiral amino acid metabolomics in urine

研究代表者

三次 百合香(MIYOSHI, YURIKA)

九州大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：80707175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、尿試料におけるタンパク質構成アミノ酸のD体及びL体含量を網羅的に個別解析可能な専用装置の開発を達成した。また、質量分析計を検出器として導入し、尿由来の夾雑成分の影響をほとんど受けずに尿中キラルアミノ酸含量解析が可能な高性能分析装置を構築した。開発した装置を用いて、ヒトおよびマウス尿試料において様々なD-アミノ酸の存在を明らかにした。虚血再灌流腎障害モデルマウスにおける尿中キラルアミノ酸メタボロミクスを行い、D-アスパラギン、D-セリン、D-アラニン、D-プロリン等8種のキラルアミノ酸が腎障害マーカーとなり得る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Highly sensitive and selective analytical systems for the simultaneous determination of D- and L-enantiomers of proteinogenic amino acids in urine were designed and developed. By using mass spectrometers as detectors of the system, target chiral amino acids could be detected without severe interference in the urine, and various D-amino acids were found in the urine of healthy volunteers and mice. Using the analytical systems developed in this research, chiral amino acid metabolomics in the urine of model mice of ischemic acute kidney injury could be performed, and it was suggested that 8 chiral amino acids such as D-asparagine, D-serine, D-alanine and D-proline in urine were the candidate biomarkers of renal dysfunction.

研究分野：分析化学

キーワード：アミノ酸 メタボロミクス 光学分割

1. 研究開始当初の背景

種々の疾患においてアミノ酸の含量変化が報告されており、臨床診断においてアミノ酸メタボロミクスが注目されている。多くのアミノ酸メタボロミクスは D-アミノ酸と L-アミノ酸を区別せず、光学異性体を混合物として解析しているが、生体は D-アミノ酸を L-アミノ酸とは異なる機能性分子として認識しており、新規診断マーカー探索や創薬において D 体および L 体を区別するキラルアミノ酸メタボロミクスの推進が切望されている。

筋萎縮性側索硬化症モデルマウスにおける解析において、D-アミノ酸および L-アミノ酸を区別しない従来のアミノ酸メタボロミクスでは発見できないが、D/L 体を区別して解析することにより、発症や病態変化に伴って D-セリン含量が増加することが示されており、新規診断マーカー・創薬シーズ探索において D 体および L 体の個別定量は、未知のバイオマーカー発見につながる。

また、尿は非侵襲で採取可能なため被験者への負担が少ないことから、尿試料を用いる非侵襲診断法の開発は臨床的意義が高い。尿中キラルアミノ酸メタボローム解析装置を開発し、様々な疾患における尿中キラルアミノ酸メタボロミクスを展開することで、非侵襲かつ鋭敏な新規診断指標を発見できる可能性があり、ヒトの疾病予防、早期診断・治療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、D-アミノ酸および L-アミノ酸を区別する尿中キラルアミノ酸メタボローム解析装置の開発を達成し、循環器系疾患や精神疾患などをはじめとする各種疾患の非侵襲かつ鋭敏な新規診断法を開発することである。

D-アミノ酸は腎臓においてほとんど再吸収されず濃縮されて尿中に排泄されるため、血液と比較して尿試料中の方が D-アミノ酸含量変化が顕著になると考えられ、尿中キラルアミノ酸メタボロミクスにより鋭敏な新規診断指標を発見できる可能性が高い。

そこで本研究では、尿中キラルアミノ酸メタボローム解析の専用装置を世界で初めて開発し、疾患に伴うタンパク質構成全 D-及び L-アミノ酸の含量変化を解析することで、現在臨床で汎用されている血液マーカーと比較してより鋭敏かつ非侵襲な新規臨床診断マーカーを発見し、早期診断法や非侵襲診断法の開発を通して人々の健康維持に貢献する。

3. 研究の方法

これまでに開発してきた分析対象特化型の二次元 HPLC 分析装置を基盤として、タンパク質構成全アミノ酸について D-アミノ酸と L-アミノ酸を区別する尿中キラルアミノ酸メタボローム解析の専用装置を開発する。

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、二次元 HPLC 分析装置で光学分割・定量を行う。本装置は「逆相分離」と「各アミノ酸光学異性体を分離・定量する光学分割」からなるが、尿では血液や組織と比較して夾雑成分が極めて多く、分析条件の精査・最適化が不可欠である。そこで、タンパク質構成全アミノ酸を分析対象として逆相分離条件の精査および最適な光学分割カラムのスクリーニングを行い、これらを統合して二次元 HPLC 装置を構築する。

尿中には代謝物や老廃物など夾雑成分が多く存在するため、尿由来の夾雑成分によりピークの同定・定量が困難となる場合が想定される。そこで、ヒト尿試料を用いて、尿由来の夾雑成分と分離するための逆相分離および光学分割における移動相条件の検証・最適化を行う。また、質量分析計を検出器として使用し、尿由来の夾雑成分の影響をほとんど受けずキラルアミノ酸のピーク同定・含量解析が可能な高選択的多次元 HPLC システムを構築する。

また、疾患として腎不全に着目し、虚血再灌流腎障害マウスにおける尿中キラルアミノ酸メタボロミクスを行い、非侵襲かつ鋭敏な新規診断指標の探索・確立を行う。

4. 研究成果

これまでに開発した二次元 HPLC 分析装置を基盤として、D-アミノ酸と L-アミノ酸を区別する尿中キラルアミノ酸メタボローム解析の専用装置開発を行った。一次元目の逆相分離においては、九州大学薬学部(浜瀬健司)および研究協力企業の(株)資生堂と共同開発したモノリス型キャピラリーカラムを用い、タンパク質構成全アミノ酸 20 種にイソロイシンとスレオニンのアロ体を加えたアミノ酸 22 種の相互分離並びに尿中夾雑成分との分離条件を検討した。その結果、移動相としてトリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル、テトラヒドロフランおよび水の混合液を用いることで、10 時間以内で相互分離を達成した。

二次元目の光学分割については、分析対象のキラルアミノ酸 21 種について微量成分である D-アミノ酸が L-アミノ酸よりも先に溶出し良好な光学分割が得られ、かつ尿試料分析において大きな夾雑成分が認められないキラルカラムが不可欠である。そこで、市販のパークル型およびキナ皮アルカロイド誘導体型キラル固定相、九州大学薬学部および(株)資生堂と共同開発した新規キラル固定相を用いて、キラルカラムのスクリーニングを行った。その結果、共同開発した新規キラル固定相、Sumichiral OA-2500S、OA-3200S、OA-4700SR カラムにおいて、多くのキラルアミノ酸が良好に光学分割され、D-アミノ酸が L-アミノ酸よりも先に溶出した。そこで、こ

れら 4 種のキラル固定相を用いて良好な光学分割が得られる移動相条件を検討した結果、共同開発した新規キラル固定相と Sumichiral OA-3200S カラムの 2 種を組み合わせることにより、分析対象のキラルアミノ酸 21 種について良好な光学分割が達成された。そこで、D-アミノ酸と L-アミノ酸を区別する尿中キラルアミノ酸メタボローム解析装置を完成させるため、光学分割における移動相中酸濃度およびメタノールとアセトニトリルの組成比を精査し、哺乳類尿試料を用いて尿由来の大きな夾雑成分と分析対象キラルアミノ酸を分離可能な移動相条件を確立した。

尿試料の連続分析を行ったところカラムの劣化による分離能の低下が認められ、再現的分析が困難であった。そこで、種々の疾患における診断指標探索を行うに当たり、カラムの高性能化を達成し、D 体と L 体を区別する尿中キラルアミノ酸二次元 HPLC 分析装置の連続安定稼働の実現が不可欠であると考え、研究協力者の九州大学薬学部および協力企業の (株) 資生堂と高い分離能を有する逆相カラムおよび光学分割カラムの開発を行った。一次元目の逆相カラムにはカラム長 1メートル以上のモノリス型オクタデシルシリカカラムを使用し、分離条件の最適化により再現性および分離能の向上を達成した。二次元目には共同開発した高分解能光学分割カラムを搭載し、移動相条件やカラム洗浄条件の最適化を行った。その結果、タンパク質構成アミノ酸とアロイソロイシン、アロスレオニンを加えた 21 種のアミノ酸について 1本のキラルカラムによる光学分割を達成し、連続安定稼働可能な実用機の開発に成功した。

また、尿試料では血液や組織試料とは異なる夾雑成分が多数存在するため、キラルアミノ酸のピーク同定および定量値確認には、より選択性の高い分析システムが不可欠である。そこで、質量分析計における NBD-アミノ酸の検出条件を最適化し、研究協力企業の (株) 資生堂と質量分析計を検出器として使用する高選択的多次元 HPLC システムを構築した。その結果、ヒト尿中では D-アラニン、D-アルギニン、D-アスパラギン、D-アスパラギン酸、D-グルタミン酸および D-セリンが高濃度に存在することを多次元 HPLC-MS システムにおいても確認した。また、上記以外にも多くのタンパク質構成アミノ酸の D 体がヒト尿中に存在することを明らかにした。マウス尿試料においても D-セリン、D-アラニン、D-プロリン、D-アルギニン、D-リジン、D-フェニルアラニン、D-バリンが存在することを示し、開発した HPLC システムにより哺乳類尿試料中キラルアミノ酸の網羅的含量解析が可能であることを実証した。

尿中に多く認められる D-アスパラギン、D-セリン、D-アラニンおよび D-プロリンの由来解析を行うため、無菌マウス尿中含量解析を実施した。その結果、D-アラニンは尿中含

量が激減し主に腸内細菌由来であることが示され、D-アスパラギンおよび D-セリンは一部が腸内細菌に由来していることが明らかとなった。D-プロリン含量は無菌マウスにおいてほとんど変化が認められず、腸内細菌に由来しないことが示された。

また、疾患モデルとして虚血再灌流腎障害マウスにおけるキラルアミノ酸メタボロミクスを進めた。その結果、コントロール群と比較して虚血再灌流 4 時間、8 時間、20 時間、40 時間後における尿中アスパラギン、セリン、アラニンおよびプロリンの D 体の割合 ($\%D=D/(D+L)*100$) が有意に減少することが明らかとなった。また尿中アルギニン、バリン、フェニルアラニンおよびリジンの %D の減少も認められた。虚血再灌流 4 時間後の早期において有意な減少が認められたことから、現在臨床で汎用されている血液マーカーと比較してより鋭敏かつ非侵襲の新規腎障害マーカーとなり得る可能性が示された。今後、腎障害患者における尿試料キラルアミノ酸メタボロミクスを展開し、早期診断法や非侵襲診断法の開発が期待される。

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 2 件)

Reiko KOGA, Yurika MIYOSHI, Yu SATO, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Wolfgang LINDNER, Kenji HAMASE, Enantioselective determination of citrulline and ornithine in the urine of D-amino acid oxidase deficient mice using a two-dimensional high-performance liquid chromatographic system, *Journal of Chromatography A*, 査読有, Vol. 1467, pp. 312-317 (2016). DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.053

三枝百合香, 金野柳一, 三田真史, 浜瀬健司, D-アミノ酸関連酵素欠損に伴うほ乳類体内の D-アミノ酸含量変化, *Vitamins (Japan)*, 査読有, 88 巻, 515-523 (2014). URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009891163/>

[学会発表](計 7 件)

Yurika MIYOSHI, Maiko NAKANE, Yoshikazu SUGITO, Yosuke TOJO, Reiko KOGA, Masanobu NAGANO, Masashi MITA, Kenji HAMASE, Two-dimensional HPLC-FL determination of chiral amino acids in foodstuffs, XVII International Symposium on Luminescence Spectrometry, 2016 年 11 月 23 日 (Taipei, Taiwan).

Yurika MIYOSHI, Jumpei SASABE, Masataka SUZUKI, Yayoi YONENAGA, Yu

SATO, Maiko NAKANE, Masashi MITA, Sadakazu AISO, Kenji HAMASE, Two-dimensional HPLC-FL/MS/MS determination of chiral amino acids in physiological fluids of model mice of ischemic acute kidney injury, 26th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015年7月5-8日 (Tbilisi, Georgia).

三次百合香, 笹部潤平, 米永弥生, 中根舞子, 三田真史, 金野柳一, 相磯貞和, 濱瀬健司, 神経興奮性キラルアミノ酸を利用する創薬シーズ・診断マーカー探索のための高感度二次元HPLC一斉分析, 第15回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月24-26日 (徳島).

三次百合香, 笹部潤平, 鈴木将貴, 米永弥生, 中根舞子, 三田真史, 相磯貞和, 濱瀬健司, 二次元HPLC-FL/MS/MSを用いる腎障害モデルのキラルアミノ酸メタボロミクス, Symposium on Molecular Chirality 2015, 2015年6月12-13日 (東京).

Yurika MIYOSHI, Nao KUSANO, Yayoi YONENAGA, Hirohisa ONIGAHARA, Jumpei SASABE, Eiichi NEGISHI, Maiko NAKANE, Masashi MITA, Tomonori KIMURA, Ryohei YAMAMOTO, Yoshitaka ISAKA, Sadakazu AISO, Kenji HAMASE, Enantioselective determination of all proteinogenic amino acids in the serum and urine of patients/mice with renal dysfunction using a two-dimensional HPLC-FL/MS/MS system, 30th International Symposium on Chromatography (ISC2014), 2014年9月14-18日 (Salzburg, Austria).

Yurika MIYOSHI, Eiichi NEGISHI, Masanobu NAGANO, Jumpei SASABE, Maiko NAKANE, Masashi MITA, Ryuichi KONNO, Sadakazu AISO, Kenji HAMASE, Chiral amino acid metabolomics using two-dimensional HPLC focusing on neuro-active amino acids, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research, 2014年9月2-5日 (宇都宮).

三次百合香, 草野 尚, 鬼ヶ原弘久, 根岸栄一, 笹部潤平, 中根舞子, 三田真史, 木村友則, 山本陵平, 猪阪善隆, 相磯貞和, 濱瀬健司, 慢性腎不全におけるキラルアミノ酸メタボロームの二次元HPLC-FL/MS/MS解析, 第21回クロマトグラフィーシンポジウム, 2014年6月4-6日 (名古屋).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://soyaku.phar.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
三次 百合香 (MIYOSHI Yurika)
九州大学・大学院薬学研究院・特任助教
研究者番号: 80707175

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
濱瀬 健司 (HAMASE Kenji)
九州大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 10284522

三田 真史 (MITA Masashi)
株式会社資生堂