

Award Accounts

第 10 回 D-アミノ酸学会奨励賞

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

古賀 鈴依子¹⁾, 吉田 秀幸¹⁾, 能田 均¹⁾, 浜瀬 健司²⁾

福岡大学薬学部¹⁾

九州大学大学院薬学研究院²⁾

Multi-dimensional HPLC analysis of metabolic-related D-amino acids and the study on their distribution and regulation mechanisms

Reiko KOGA¹⁾, Hideyuki YOSHIDA¹⁾, Hitoshi NOHTA¹⁾,
Kenji HAMASE²⁾

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University¹⁾

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University²⁾

1. はじめに

生体内にはタンパク質構成アミノ酸に加え、多彩な生理機能を有する代謝関連アミノ酸が存在する。その多くは光学中心を有するキラルアミノ酸であるが、タンパク質構成キラルアミノ酸と比較して内在性含量は D 体 L 体ともに極めて微量であり、生体試料における正確な検出・定量は一層困難である。近年、比較的体内含量の高いタンパク質構成アミノ酸の D 体については、L 体とは異なる分布や代謝を示し、独自の生理機能を有することが明らかにされてきた¹⁻³⁾。また、疾患により含量変化を生じる D-アミノ酸の存在も報告されており^{4,5)}、診断マーカーの候補として注目を集めている。一方、代謝関連 D-アミノ酸については、分析法の欠如により詳細な解析はほとんど進んでおらず、高選択的な分析法の開発と生理的意義の解明が求められ

ている。筆者らはこれまでに、アミノ酸の蛍光誘導体化と、複数の異なる分離モードを組み合わせた多次元の高速度液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることにより、代謝関連キラルアミノ酸の高感度・高選択的分析法の開発に取り組んできた。本稿では、これらの分析法について生体試料分析への適用と併せて紹介する。

2. 代謝関連キラルアミノ酸を対象とする二次元 HPLC 一斉分析法の開発

代謝関連アミノ酸は生体内において様々な生命活動に関与するほか、生理活性物質や医薬品合成の素材としても注目されており、これまでも様々な分析法が報告されている^{6,7)}。しかし、その多くは逆相分配をはじめとする単一の分離モードのみを利用する方法であり、選択性の不足により生体試料分析への適用例は少ない。選

【責任著者・Corresponding Author】
古賀 鈴依子・Reiko KOGA

択性の向上には、複数の異なる分離モードを用いる多次元 HPLC 法の利用が効果的であり、我々は高感度蛍光試薬である 4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) によるアミノ酸の誘導体化と、逆相分配および光学分割を組み合わせた二次元 HPLC 法を用いて、代謝関連キラルアミノ酸の高感度・高選択的分析法を構築してきた⁸⁻¹¹⁾。

グルタミン酸受容体のアゴニストである *N*-Methyl-D-aspartic acid (NMDA) は長い間、非天然の D-アミノ酸であると考えられていたが、構造類似体である *N*-Methyl-glutamic acid (NMG) 鏡像異性体と共に、様々な海洋生物や哺乳類に内在することが次第に明らかとされてきた¹²⁻¹⁵⁾。しかし、いずれも極微量にしか存在せず正確な定量が困難であることから、生体試料分析を可能とする高感度かつ高選択的な分析法が求められていた。筆者らは、一次元目の逆相分配にキャピラリーモノリス型 ODS カラム (0.53 mm I.D. × 1000 mm) を、二次元目の光学分割に Sumichiral OA-2500S カラム (1.5 mm I.D. × 250 mm) を用いる二次元 HPLC 法を報告している⁸⁾。図 1 にアカガイ試料を分析した結果を示す。一次元目の逆相分配により *N*-Methyl-aspartic acid (NMA)、NMG を多量の夾雑成分から分離し、各アミノ酸画分をそれぞれ二次元目へと導入した。分析の結果、アカガイ外套膜には高濃度の NMDA (170 nmol/g) に加えて NMG 鏡像異性体が存在することが示された。また、他の二枚貝についても解析を行った結果、ハマグリ外套膜においても比較的高濃度の NMDA (29 nmol/g) の存在が認められた。二枚貝におけるこれらの結果は、我々が食事を通して神経活性アミノ酸を摂取していることを示しており、今後、NMDA 類縁化合物の代謝吸収や体内分布などの解明が期待される。

Ornithine (Orn) および Citrulline (Cit) は、尿素回路を構成するアミノ酸である。これらの血中濃度は、アミノ酸代謝障害の指標¹⁶⁾として用いられるほか、L 体は抗疲労作用や血管拡張作用を有するサプリメントとしても広く利用されている^{17,18)}。しかし、他の多くの代謝関連ア

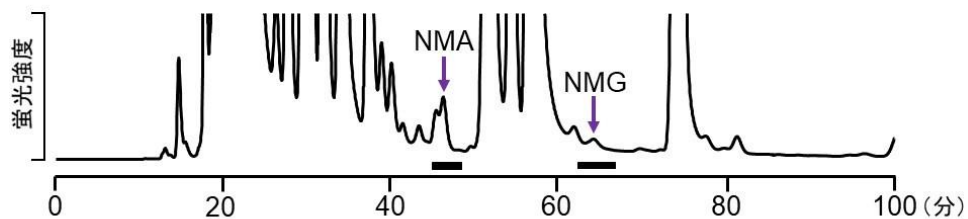
ミノ酸と同様、分析法の欠如により Orn および Cit の鏡像異性体を区別した生体内含量解析はこれまでほとんど行われてこなかった。我々は、一次元目の逆相分配にキャピラリーモノリス型 ODS カラム (0.53 mm I.D. × 1000 mm) を、二次元目の光学分割にオリジナルカラムである Singularity CSP-105S カラム (1.5 mm I.D. × 250 mm) を用いた二次元 HPLC 法並びに検出に質量分析装置を用いる二次元 HPLC-MS 法を開発した¹⁰⁾。マウス尿試料を分析した結果、Orn および Cit 鏡像異性体の存在が明らかとなった (図 2)。また、二次元 HPLC-MS 分析においては分析対象の鏡像異性体のピークのみが検出され、極めて高選択的な分析を達成した。

3. 高選択的三次元キラル HPLC を用いる生体内含量解析

生体試料中の微量代謝関連 D-アミノ酸の検出および定量は、二次元 HPLC を用いてもなお、選択性の不足により困難な場合が存在した。より高選択的な分析を可能とするため、筆者らは Orn および Cit、また Lys とその代謝物である 2-Aminoadipic acid (2-AAA) および Pipecolic acid (PA) を対象として選定し、逆相分配、イオン交換分離および光学分割の異なる 3 種の分離系を組み合わせた三次元キラル HPLC システムを新たに開発した。

三次元 HPLC 法においては、誘導体化したアミノ酸を一次元目の逆相分配により他の内在性化合物から分離し、オンラインで分取する。分取した各アミノ酸画分を二次元目の陰イオン交換カラムへ導入し、再び夾雑物から分離・分取した後、三次元目において鏡像異性体の分割を行う。逆相分配に微粒子充填型カラムである Singularity RP18 カラム (1.0 mm I.D. × 250 mm) を、陰イオン交換カラムとして Singularity AX カラム (1.5 mm I.D. × 150 mm) を、光学分割カラムには Singularity CSP-105S カラム (1.5 mm I.D. × 250 mm) を選択し、Orn および Cit を対象とした分析法を開発した。多量の夾雑成分が存在する尿試料中において、上述

一次元目:逆相分配



二次元目:光学分割

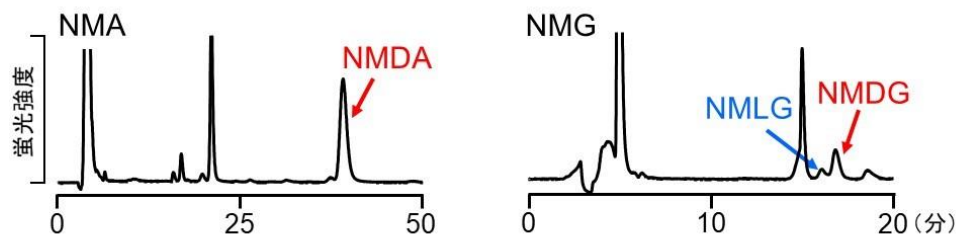
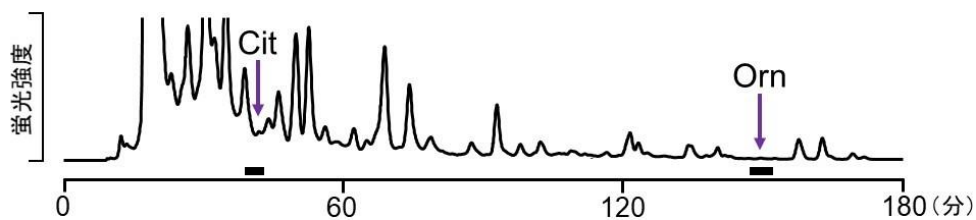


図1. アカガイ外套膜におけるNMDA類縁化合物の二次元HPLC分析結果

一次元目:逆相分配



二次元目:光学分割

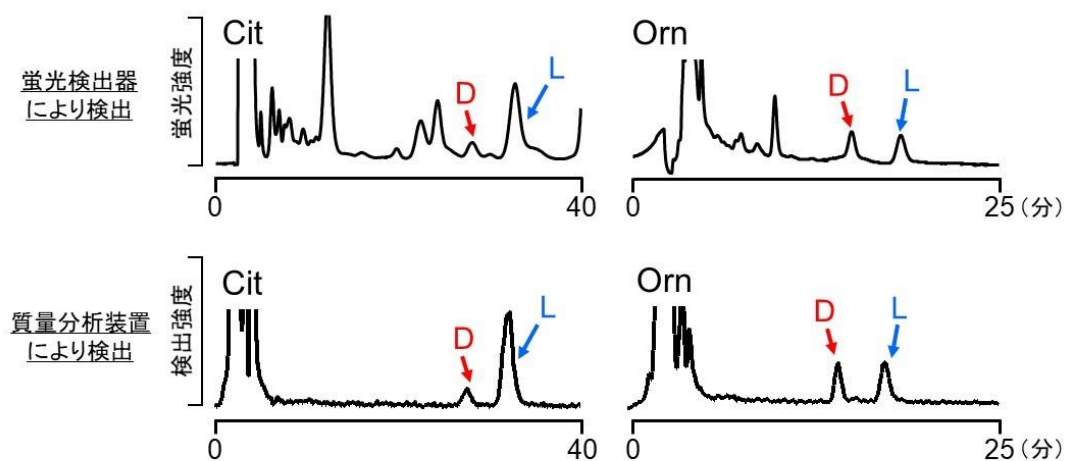


図2. マウス尿試料中OrnおよびCit鏡像異性体の二次元HPLC分析結果

した二次元 HPLC 蛍光法による分析結果と比較して、より高選択的な分析が可能であることが示された。また、生体内における含量制御機構を解析するため、D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) 欠損マウスおよびコントロールマウスの尿試料分析を行った。その結果、コントロールマウス尿中 Cit および Orn の %D 値 $((D/D + L) \times 100)$ がそれぞれ 7.5%, 31.9%であったのに対し、DAO 欠損マウス尿中においては 55.0%, 83.3%であった。いずれのアミノ酸についても DAO 欠損に伴う %D 値の有意な増加が認められ ($p < 0.01$)、これらの D-アミノ酸が DAO による含量制御を受けていることが明らかとなった。

必須アミノ酸である Lys は、肝臓においてサッカロピン経路により 2-AAA へ、脳においてはピペコリン酸経路により PA へと代謝される¹⁹⁾。これらのアミノ酸は糖尿病や神経疾患との関連^{20,21)}が報告されている一方、キラルを識別した体内分布や疾患による含量変化については未だほとんど明らかにされていない。そこで筆者らは、逆相分配に Singularity RP18 カラム (1.0 mm I.D. × 250 mm)、陰イオン交換カラムとして Singularity AX カラム (1.5 mm I.D. × 150 mm)、光学分割カラムに Singularity CSP-001S カラム (1.5 mm I.D. × 250 mm) を選択して Lys, 2-AAA, PA を対象とする分析法を構築し、ヒト尿試料における含量解析を行った。その結果、尿中には対象とした全てのアミノ酸鏡像異性体が存在することが明らかになり、2-AAA, PA および Lys の %D 値はそれぞれ 1.5%, 68.0%, 6.5%であった。

4. エキシマー蛍光誘導体化法を用いる Orn, Lys の高選択的キラル HPLC 分析法の開発

分子内エキシマー蛍光誘導体化法とは、同一の官能基を複数有する化合物の高選択的検出に有用な誘導体化法である^{22,23)}。ピレンのような平面多環系の蛍光分子が近接して存在するとき、励起光の照射により一方が励起状態となると、他の基底状態の分子と会合して励起二量体を形

成し、その波長は単一分子の蛍光波長 (モノマー蛍光) と比較して長波長 (エキシマー蛍光) 側にシフトする。従って、多官能性の分析対象化合物にピレン試薬を複数導入しエキシマー蛍光領域で検出することにより、モノマー蛍光を呈する夾雑成分の妨害を受けることなく分析対象化合物を選択的に検出することが可能となる。本誘導体化法を用い、 α 炭素に加えて側鎖にアミノ基を有する Orn および Lys を対象とした分析法を開発した。Orn および Lys をピレン試薬である 4-(1-Pyrene)butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (PSE) により誘導体化し、逆相分配と光学分割を組み合わせた二次元 HPLC を用いて分析した。一次元目の逆相分配には、Singularity RP18 カラム (1.0 mm I.D. × 250 mm) を、二次元目の光学分割には Singularity CSP-105S カラム (1.5 mm I.D. × 250 mm) を選択した。エキシマー蛍光波長 (励起波長 345 nm における 475 nm の蛍光発光) で検出することにより、ヒト尿試料において他の内在性化合物の影響を受けることなく高選択的な分析が達成された。本法を用いた含量解析により、D-Orn のヒト尿中含量は 2.93 μ M、D-Lys は 7.80 μ M であり、%D 値はそれぞれ 11.5%, 6.2%であることが示された。

5. おわりに

生体内における代謝関連 D-アミノ酸は、その含量が極めて微量であること、ペプチドやタンパク質構成アミノ酸をはじめとする多種多様なアミノ化合物や生体成分による妨害を受けることなどから、正確な検出・定量が困難な場合が多い。一方、これまでの研究から明らかになってきたように生体内には様々な代謝関連 D-アミノ酸が内在し、その生理的意義の解明が求められている。著者らは現在、更なる分析対象の拡充および選択性の向上について検討を進めており、今後、代謝関連キラルアミノ酸の疾患による含量変化や合成・代謝経路の解明などを通じて、人々の健康に貢献できるようになることを期待する。

参考文献

- 1) Miyoshi Y, Koga R, Oyama T, *et al.*: HPLC analysis of naturally occurring free D-amino acids in mammals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69**: 42-49, 2012
- 2) Miyoshi Y, Oyama T, Itoh Y, *et al.*: 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
- 3) Ishii C, Furusho A, Hsieh CL, *et al.*: Multi-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of chiral amino acids and related compounds in real world samples. *Chromatography*, **41**: 1-17, 2020
- 4) Nishikawa T: Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J. Chromatogr. B*, **879**: 3169-3183, 2011
- 5) Furusho A, Koga R, Akita T, *et al.*: Three-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of Asn, Ser, Ala, and Pro enantiomers in the plasma of patients with chronic kidney disease. *Anal. Chem.*, **91**: 11569-11575, 2019
- 6) Ilisz I, Péter A, Lindner W: State-of-the-art enantioseparations of natural and unnatural amino acids by high-performance liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.*, **81**: 11-22, 2016
- 7) Careni G, Sacchi S, Abbondi M, *et al.*: Direct chromatographic methods for enantioresolution of amino acids: recent developments. *Amino Acids*, **52**: 849-862, 2020
- 8) Koga R, Miyoshi Y, Negishi E, *et al.*: Enantioselective two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of *N*-methyl-D-aspartic acid and its analogues in mammals and bivalves. *J. Chromatogr. A*, **1269**: 255-261, 2012
- 9) Koga R, Miyoshi Y; Sato Y, *et al.*: 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**: 15-22, 2016
- 10) Koga R, Miyoshi Y, Sato Y, *et al.*: 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. *J. Chromatogr. A*, **1467**: 312-317, 2016
- 11) Koga R, Yoshida H, Nohta H, *et al.*: Multi-dimensional HPLC analysis of metabolic related chiral amino acids -Method development and biological/clinical applications-. *Chromatography*, **40**: 1-8, 2019
- 12) Sekine M, Fukuda H, Nimura N, *et al.*: Automated column-switching high-performance liquid chromatography system for quantifying *N*-methyl-D- and -L-aspartate. *Anal. Biochem.*, **310**: 114-121, 2002
- 13) Tarui A, Shibata K, Takahashi S, *et al.*: *N*-Methyl-D-glutamate and *N*-methyl-L-glutamate in *Scapharca broughtonii* (Mollusca) and other invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **134**: 79-87, 2003
- 14) D'Aniello A, Di Fiore MM, Fisher GH, *et al.*: Occurrence of D-aspartic acid and *N*-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release. *FASEB J.*, **14**: 699-714, 2000
- 15) Fontanarosa C, Pane F, Sepe N, *et al.*: Quantitative determination of free D-Asp, L-Asp and *N*-methyl-D-aspartate in mouse brain tissues by chiral separation and multiple reaction monitoring tandem mass spectrometry. *PLoS ONE*, **12**: e0179748, 2017
- 16) Häberle J, Boddaert N, Burlina A, *et al.*: Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orph. J. Rar. Dis.*, **7**: 32, 2012
- 17) Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, *et al.*: L-Ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr. Res.*, **28**: 738-743, 2008
- 18) Kaore SN, Amame HS, Kaore NM: Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. *Fund. Clin. Pharmacol.*, **27**: 35-50, 2013
- 19) Leandro J, Houten SM: The lysine degradation pathway: subcellular compartmentalization and enzyme deficiencies. *Mol. Genet. Metab.*, **131**: 14-22, 2020
- 20) Wang TJ, Ngo D, Psychogios N, *et al.*: 2-Amino adipic acid is a biomarker for diabetes risk. *J. Clin. Invest.*, **123**: 4309-4317, 2013
- 21) Xue J, Wang J, Gong P, *et al.*: Simultaneous quantification of alpha-amino adipic semialdehyde, piperidine-6-carboxylate, pipercolic acid and alpha-amino adipic acid in pyridoxine-dependent epilepsy. *Sci. Rep.*, **9**: 11371, 2019

- 22) 吉田 秀幸, 能田 均, 山口 政俊: 分子内エキシマー蛍光の発現に基づく誘導体化分析法の開発. *分析化学*, **55**: 213-221, 2006
- 23) Yoshida H, Nakano Y, Koiso K, *et al.*: Liquid chromatographic determination of ornithine and lysine based on intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization. *Anal. Sci.*, **17**: 107-112, 2001



古賀 鈴依子 (こが れいこ) 氏

略歴

2006-2010 九州大学薬学部創薬科学科
2010-2012 九州大学大学院薬学研究院 修士課程
2012-2016 九州大学大学院薬学研究院 博士後期課程
2016-2017 九州大学大学院薬学研究院 特任助教
2017-現在 福岡大学薬学部 助教