

## 実試料における微量 D-アミノ酸の二次元 HPLC 精密分析法

浜瀬 健司

(九州大学大学院薬学研究生院生体分析化学分野)

### 1. はじめに

アミノ酸は地球上で最も古くから存在する有機化合物群の一種であると考えられており、生体に必須の分子である。殆どのアミノ酸は $\alpha$ 位に不斉炭素を有し、互いに光学異性体となるL体とD体が存在する。L-アミノ酸についてはタンパク質の構成要素となる他、情報伝達、神経伝達など多彩な機能が古くから知られている一方で、D-アミノ酸は高等動物では生理機能を持たないと長い間考えられてきた。しかし、1980年代から1990年代にかけてヒトを含む哺乳類体内で比較的高濃度のD-セリン(D-Ser)とD-アスパラギン酸(D-Asp)の存在が報告され、現在ではD-Serが神経伝達を調節すること<sup>1)</sup>、D-Aspがホルモン分泌を制御すること<sup>2)</sup>などが明らかにされている。最近、D-Ser、D-Asp以外にも様々なD-アミノ酸が哺乳類体内に存在することが報告され、新規機能分子やバイオマーカー候補として注目されている。一方でD-Ser、D-Asp以外のD-アミノ酸は生体内含量が極めて低い場合が多く、正確な分析が困難であることから生理的意義の解析は停滞している。本稿では、生体試料や食品試料など、実試料における微量D-アミノ酸の正確な定量を可能とする二次元HPLC法(2D-HPLC)について紹介する。

### 2. 実試料における微量 D-アミノ酸分析の問題点

D-Ser、D-Asp以外のD-アミノ酸として、これまでに哺乳類体内でD-アラニン(D-Ala)、D-ロイシン(D-Leu)、D-プロリン(D-Pro)などの存在が報告されている。D-Serの脳皮質における含量がL-Serの約30%、各種内分泌組織中のD-Asp濃度がL-Aspの10-50%であるのに対し、他のD-アミノ酸はL体の0.1-1%程度という微量成分である。従って、その分析には高感度な方法が必要とされる。次に

この感度領域においては、L-アミノ酸を分析する感度では想像できない多数の夾雑成分が存在するため、高選択的な方法が必須である。L-アミノ酸は生体にとって生命維持に不可欠な成分であり、その血中濃度や組織中濃度はmMレベルという高濃度である。そのような高濃度の夾雑成分は生体内にほとんど存在しないため、多くの場合L-アミノ酸は定量妨害を受けない。一方で大部分のD-アミノ酸は $\mu\text{M}$ -nMレベルであり、この濃度では様々なアミノ化合物やペプチドが存在する。例えばジペプチドとトリペプチドのみについても、それぞれ400種類、8,000種類の異なる配列が考えられ、これらの存在下で微量なD-アミノ酸を分析することが如何に困難か想像できよう。

図1はアミノ酸光学分割に汎用される逆相HPLC/ジアステレオマー法を用いて微量D-アミノ酸を分析した例である。この方法では光学的に純粋な試薬によりD-及びL-アミノ酸を誘導体化し、生成したジアステレオマーを逆相カラムにより分離する。本法は汎用性の高い逆相カラムを用いた多数のDL-アミノ酸一斉光学分割が可能な優れた方法であるが、微量D-アミノ酸分析においては誘導体化試薬に極めて高い光学純度(少なくとも99.9%以上)が求められることに加え、選択性や感度が不足することが多い。実際に図1の例においても分析法の感度が不足し、D-アミノ酸のピークをほとんど確認できない。

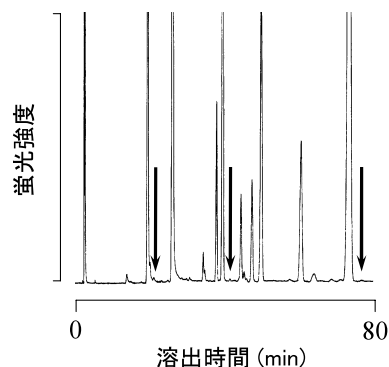


図1 ジアステレオマー法による生体試料中微量D-アミノ酸の分析例  
矢印はD-アミノ酸の溶出時間を示す。

Sensitive and precise 2D-HPLC determination of D-amino acids in real biological samples

Kenji Hamase (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan)

一方で光学活性化合物を固定相や移動相に利用するキラル固定相法・キラル移動相法では光学中心を持たない通常の蛍光誘導体化などが行えるため、試薬の光学純度の問題は原理的に存在せず様々な高感度検出試薬が利用できる。しかし、キラル固定相法やキラル移動相法のみでは分離能(選択性)が不足し、光学分割は達成されるものの、夾雑成分との分離が困難となる。図2はキラル固定相法により生体中の微量アミノ酸を分析した例であるが、多数のピークがD-アミノ酸の溶出時間近傍に存在しており、目的とするD-アミノ酸ピークに関する共溶出成分の有無や定量値の真値確認が極めて困難である。

本稿で紹介するプレカラム蛍光誘導体化2D-HPLC分析

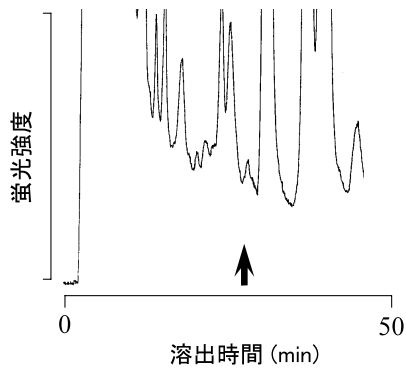


図2 キラル固定相法による生体試料中微量D-アミノ酸の分析例

矢印はD-アミノ酸の溶出時間を示す。

法はこれらの問題点を解決したものであり、分離法としてはキラル固定相法をベースとしながら高い選択性を有する2D-HPLCを利用する。これを高感度なプレカラム蛍光誘導体化と組み合わせることにより実試料中の微量D-アミノ酸について正確な定量が可能となっている。

### 3. プレカラム蛍光誘導体化2D-HPLCによる微量D-アミノ酸の分析

高感度検出・定量を可能とするため、アミノ酸は4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)<sup>3)</sup>により誘導体化を行う。生成するNBD-アミノ酸は励起波長470nm、蛍光波長530nmという長波長域に強い蛍光を有しており、内在性蛍光化合物の影響をほとんど受けることなく微量分析が可能である。組織試料や血漿など多量にタンパク質を含有する試料については、誘導体化に先立ちメタノールで除タンパクを行う。尿や飲料試料については直接誘導体化することも可能である。定量には図3に示した2D-HPLCを用いて高選択的分析を行う。一次元目には逆相マイクロカラムを使用しており、ここで目的アミノ酸を生体内の夾雑成分から分離する(この段階では光学分割は行っていないので、アミノ酸はD体とL体の混合物として溶出する)。一次元目に設置した蛍光検出器によって目的アミノ酸の溶出を確認し、カラムスイッチングバルブを切り替えて目的アミノ酸画分のみを分取ループへと導入する。分取が終了した後、再びカラムスイッチングバルブを切り替えると目

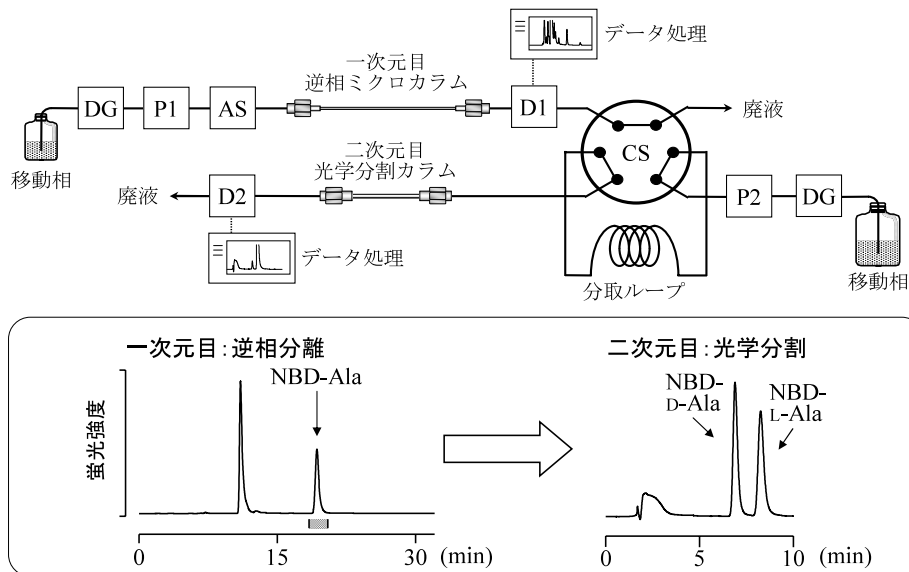


図3 2D-HPLCの流路図

一次元目の逆相マイクロカラムで分離した目的アミノ酸画分のみを、二次元目のキラルカラムに導入して光学分割する。DG: 脱気装置, P: ポンプ, AS: オートサンプラー, D: 検出器, CS: カラムスイッチングバルブ。

## テクニカルノート

的アミノ酸画分は二次元目の光学分割カラムへと導入され、ここでD体L体の分離と定量が行われる。

本システムの特徴として、一次元目の逆相カラムをマイクロ化することで一次元目と二次元目のカラムに十分な内径差を持たせている点が挙げられる。これにより一次元目の移動相流速は二次元目流速の10分の1程度となるため、目的アミノ酸画分全量を二次元目に導入可能としている。従って、本システムを利用することで分取による感度低下(サンプルロス)を引き起こすことなく高感度かつ選択的D-アミノ酸分析が可能となる。図4は実際にマウス血漿中の微量D-SerとD-Alaを定量した結果であり、(a)及び(d)が一次元目のクロマトグラム、(b)及び(e)が二次元目のクロマトグラムである。このように二次元分析を行うことで生体試料中の夾雑成分の影響をほとんど受けることなくD-アミノ酸の選択的微量分析が行われている。また、本システムでは二次元目に逆の立体配置を有するキラル固定相を利用することで生体試料中のD-アミノ酸確認を簡便に行うことができる。図4(c)及び(f)に表されるように、キラル固定相の光学中心を反転させることでD体とL体の溶出順序が逆転するため、溶出時間の反転及び両固定相での定量値の同等性からD-アミノ酸ピークを確認する。

上記の方法を用いてこれまでにマウス及びラット体内におけるD-Leu<sup>4,5)</sup>、D-Pro<sup>5,6)</sup>、D-Ala<sup>7,8)</sup>の分析を報告している。いずれも一次元目には内径1 mmまたは0.5 mmの逆相(ODS)カラムを利用し、移動相にはアセトニトリル及びトリフルオロ酢酸(TFA)を含む水溶液を用いる。二次元目にはナフチルグリシンをキラルセクターとするSumichiral OA-2500S<sup>9,10)</sup>カラム(住化分析センター、大阪)

を利用し、内径は4.6 mmまたは1.5 mmである。移動相にはクエン酸を含有するメタノール溶液(適宜アセトニトリルを混合)を利用する。

D-Leuに関してはマウス脳内で下垂体や松果体に局在することを明らかにしている。また、その組織内含量や血中含量がD-アミノ酸化酵素の活性に依存して変化し、本酵素を欠損するミュータントマウスでは10倍以上の濃度となることを示した<sup>5)</sup>。D-Proではマウス全身における分布を検討し、膵臓や精巣、下垂体前葉で高濃度となることを明らかにしている他、尿中に多量の排泄を認めた。この尿中D-Pro含量は腸内細菌の有無で変化しなかったことに加え、絶食時にも認められたことから、マウス体内で生成している可能性が示された<sup>6)</sup>。D-Alaについてはラット全身22組織における含量を比較した結果、下垂体前葉中の含量が最も高く、次いで膵臓への局在が認められた<sup>7)</sup>。D-Ala含量には週齢変化が認められ、6週から9週の若齢期に含量が高いことが示された。また、ラットの活動周期と同調する日内変化も認められ、休眠期には高値、活動期には低値となること、このリズムが血中インスリンリズムと逆位相となることを示している<sup>11)</sup>。D-Alaを特異的に認識するモノクローナル抗体を作製して下垂体前葉と膵臓における細胞局在を検討した結果、下垂体前葉では副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)分泌細胞<sup>12)</sup>、膵臓ではインスリン分泌細胞<sup>13)</sup>への局在が示された。

### 4. マルチループ2D-HPLCによる多成分同時分析

多数のD-アミノ酸について2D-HPLC一斉分析を行うため、マルチループ2D-HPLC装置を構築している。本装置

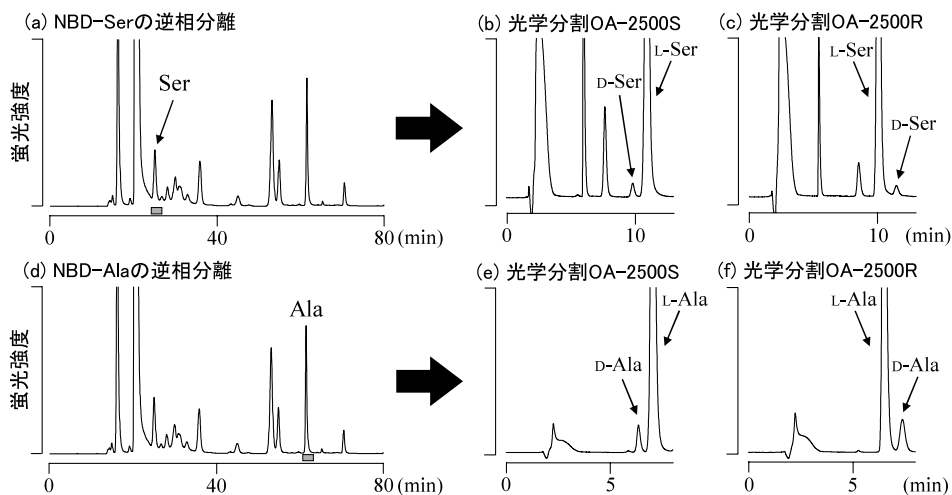


図4 マウス血漿中のD-Ser及びD-Ala二次元分析  
逆相分離したNBD-Ser, NBD-Ala画分(クロマトグラム中にバーで表示、一次元目カラム内径0.53 mm)を二次元目(カラム内径1.5 mm)に導入して光学分割する。

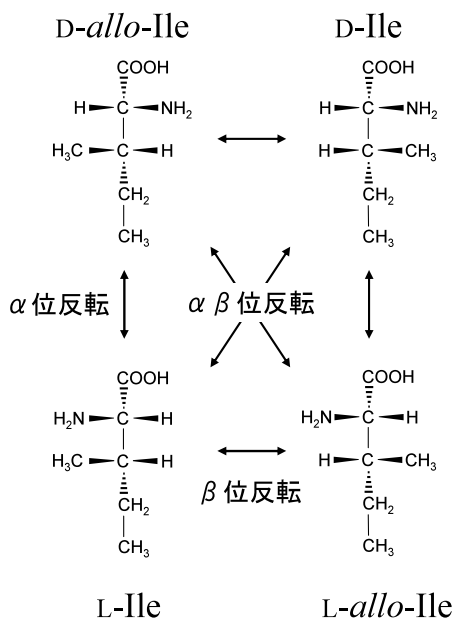


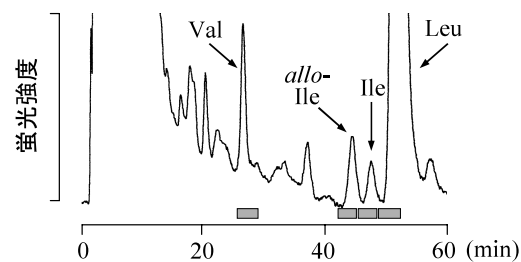
図5 Ile異性体の構造

は複数の対象アミノ酸をトラップするために分取ループを複数装備しており、分取したアミノ酸画分は適宜全自動で二次元目に導入されて光学分割・定量が行われる。なお、一次元目の溶出時間に適切な間隔が設定できる場合には単独の分取ループでも多成分分析が可能であるが、二次元分析の条件を自由に制御するためにはマルチループの利用が有用である。これまでに分岐鎖アミノ酸光学異性体一斉分析装置<sup>14)</sup>、Pro類縁アミノ酸光学異性体一斉分析装置<sup>15)</sup>、親水性アミノ酸光学異性体一斉分析装置<sup>16)</sup>を報告しており、いずれも一次元目にはマイクロODSカラムを利用する。二次元目のキラル固定相としては、分岐鎖アミノ酸とPro類縁体に対してはキニンをキラルセクターに有するChiralpak QN-AX<sup>17)</sup> (ダイセル化学, 大阪) を利用し、親水性アミノ酸にはSumichiral OA-2500Sを利用する。

分岐鎖アミノ酸としてはバリン (Val), Leu, イソロイシン (Ile) に加えてアロイソロイシン (*allo*-Ile) を分析対象としている。*allo*-IleはIleの $\beta$ 位が反転した化合物であり、タンパク質構成アミノ酸ではない。図5に示した通りIleは $\alpha$ 炭素,  $\beta$ 炭素の双方が不斉炭素であるが、生体内では $\alpha$ 位が優先的に反転するためL-Ileに対する「生体内で生じるD体」はD-*allo*-Ileとなる。実際にラット尿中の分岐鎖アミノ酸光学異性体を分析した結果、D-Ileよりも多量のD-*allo*-Ileが存在しており、L-*allo*-Ileは認められなかった。また、ラット尿中にはD-Val, D-Leuも認められた (図6)。

親水性アミノ酸としてはヒスチジン (His), アルギニン (Arg), Asp, グルタミン酸 (Glu), アスパラギン (Asn),

## (a) 一次元目 逆相分離



## (b) 二次元目 光学分割

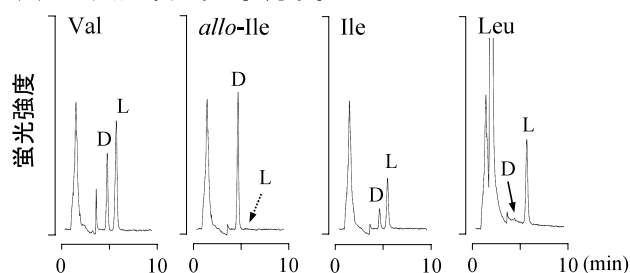


図6 ラット尿中における分岐鎖アミノ酸光学異性体の分析結果

一次元目で逆相分離した各アミノ酸画分 (バーで表示, カラム内径1.0mm) を二次元目 (カラム内径4.0mm) に導入して光学分割する。

グルタミン (Gln), Ser, スレオニン (Thr), アロスレオニン (*allo*-Thr) 及びグリシン (Gly) を分析対象とし, 10成分の二次元一斉分析を行っている (図7)。ラット大脳, 血漿及び尿中含量を分析した結果, 大脳においてはD-Ser, D-AspとD-*allo*-Thrの存在が認められ, 血漿中ではD-SerとD-Aspの存在が認められた。一方, 尿中では光学中心を持たないGlyを除く9種すべての親水性アミノ酸についてD体の存在が認められた。

## 5. 将来展望

上述してきたように, 哺乳類体内には以前の「常識」に反し様々なD-アミノ酸が存在することが明らかになってきた。これらのD-アミノ酸は局在組織, 局在細胞が異なっており, それぞれ特有の生理的意義を有していると推測される。筆者らは最近, タンパク質構成全アミノ酸に*allo*-Thrと*allo*-Ileを加えた22種について, 光学異性体を識別する二次元一斉分析装置の開発に成功した。本装置はいわゆる「アミノ酸分析」についてD体とL体を区別した定量を可能としており, 本装置により哺乳類体内や食品・飲料等における様々なD-アミノ酸の存在が明らかになると思われる。今後は既に機能解明が進んでいるD-SerやD-Aspに加えて多くのD-アミノ酸の生理的意義が解明され, 新しい創薬研究の展開や新規診断法, 機能性食品等の開発

## テクニカルノート

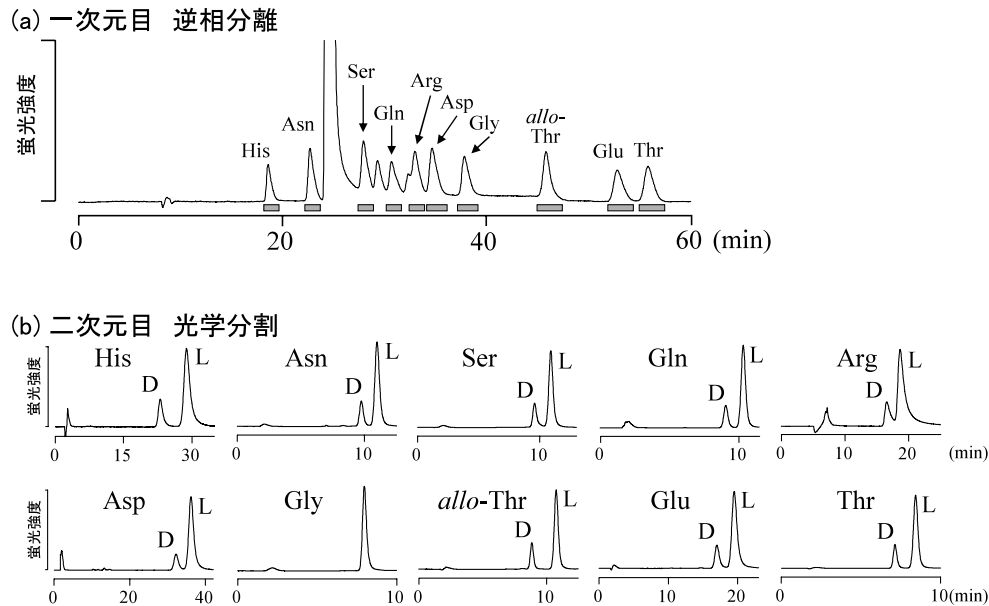


図7 親水性アミノ酸光学異性体の二次元一斉分析  
一次元目で逆相分離した各アミノ酸画分（バーで表示，カラム内径 0.53 mm）を二次元目（カラム内径 1.5 mm）に導入して光学分割する。

につながると期待される。

- 1) 西川 徹 (2008) 生化学, 80, 267-276.
- 2) 本間 浩 (2008) 生化学, 80, 277-286.
- 3) Imai, K. & Watanabe, Y. (1981) *Anal. Chim. Acta*, 130, 377-383.
- 4) Inoue, T., Hamase, K., Morikawa, A., & Zaitzu, K. (2000) *J. Chromatogr. B*, 744, 213-219.
- 5) Hamase, K., Inoue, T., Morikawa, A., Konno, R., & Zaitzu, K. (2001) *Anal. Biochem.*, 298, 253-258.
- 6) Hamase, K., Takagi, S., Morikawa, A., Konno, R., Niwa, A., & Zaitzu, K. (2006) *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 705-711.
- 7) Morikawa, A., Hamase, K., & Zaitzu, K. (2003) *Anal. Biochem.*, 312, 66-72.
- 8) Miyoshi, Y., Hamase, K., Tojo, Y., Mita, M., Konno, R., & Zaitzu, K. (2009) *J. Chromatogr. B*, 877, 2506-2512.
- 9) Pirkle, W.H., House, D.W., & Finn, J.M. (1980) *J. Chromatogr.*, 192, 143-158.
- 10) Ôi, N., Kitahara, H., Matsumoto, Y., Nakajima, H., &

- Horikawa, Y. (1989) *J. Chromatogr.*, 462, 382-386.
- 11) Morikawa, A., Hamase, K., Miyoshi, Y., Koyanagi, S., Ohdo, S., & Zaitzu, K. (2008) *J. Chromatogr. B*, 875, 168-173.
- 12) Etoh, S., Hamase, K., Morikawa, A., Ohgusu, T., & Zaitzu, K. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 217-223.
- 13) Morikawa, A., Hamase, K., Ohgusu, T., Etoh, S., Tanaka, H., Koshiishi, I., Shoyama, Y., & Zaitzu, K. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 872-876.
- 14) Hamase, K., Morikawa, A., Ohgusu, T., Lindner, W., & Zaitzu, K. (2007) *J. Chromatogr. A*, 1143, 105-111.
- 15) Tojo, Y., Hamase, K., Nakata, M., Morikawa, A., Mita, M., Ashida, Y., Lindner, W., & Zaitzu, K. (2008) *J. Chromatogr. B*, 875, 174-179.
- 16) Hamase, K., Miyoshi, Y., Ueno, K., Han, H., Hirano, J., Morikawa, A., Mita, M., Kaneko, T., Lindner, W., & Zaitzu, K. (2010) *J. Chromatogr. A*, 1217, 1056-1062.
- 17) Maier, N.M., Nicoletti, L., Lämmerhofer, M., & Lindner, W. (1999) *Chirality*, 11, 522-528.