

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

LC-MS/MS によるトリアゾール型固定相を用いた 光学活性アミノ酸の一斉分離定量法の開発と応用

分子病態解析学講座 坂本 達弥

【背景・目的】

生物を構成する主たるアミノ酸は L 体であるが、生体内に幾つかの D-アミノ酸が存在し、その生理作用が報告されているものもある。中でも D-Ser は、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型 Glu 受容体を介する神経伝達に関与しており、統合失調症の関連物質の一つとして考えられている。生体内には D-Ser の他に、複数の D-アミノ酸が存在することが報告されているが、その機能等は十分に解明されていない。D-アミノ酸の機能解析には、生理活性の評価と共にアミノ酸の定量分析が不可欠であり、生体試料中の D-アミノ酸を正確に定量することは、NMDA 受容体に関与する神経生理の研究、あるいは統合失調症を含む精神疾患などの客観的診断基準の創出に役立つと考えられることから、以下の研究を行った。

【方法】

Ser は比較的高極性のアミノ酸であり、低極性化合物との相互作用の強い逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法を用いた場合、固定相との相互作用が弱いため光学分割が困難であることが知られている。そこで、本研究では、アミノ酸の極性部位と相互作用が大きいと考えられる親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) 型固定相を用いた D, L-アミノ酸の一斉光学分割法、次いで LC-MS/MS による生体試料中 D, L-アミノ酸の定量を検討した。以下の検討 I~III では、生体試料中 D, L-アミノ酸を各種キラル誘導体化試薬によりジアステレオマー誘導体化後、トリアゾール型固定相 (COSMOSIL® 2.5HILIC、**図 1**) を用いて分離し、LC-ESI-MS/MS (Shimadzu LCMS-8040) により各アミノ酸誘導体を分離・定量した。本研究におけるヒト血清および実験動物を使用した実験は、東邦大学薬学部生命倫理委員会、ならびに動物実験委員会による承認後に行った。

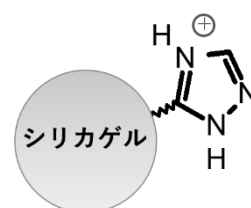


図 1 トリアゾール型固定相の模式図

【結果・考察】

I. トリアゾール型固定相を用いた D, L-アミノ酸の分離検出法の検討

はじめに、市販のジアステレオマー誘導体化試薬の一つである (S)-DBD-PyNCS により誘導体化した D, L-Ser (**図 2**) のトリアゾール型固定相への保持、光学分割の挙動を調べた。トリアゾール型固定相の保持には親水性相互作用と陰イオン交換作用が働くとされ、前者は移動相 CH₃CN 濃度、後者は移動相イオン強度 (塩濃度) により相互作用の強さの調節が可能であると考えられる。最適な D, L-Ser 誘導体の光学分割条件の探索のため、移動相中の CH₃CN 濃度および塩濃度を検討した。D, L-Ser 誘導体の保持係数 (k)、分離度 (R_s) は、移動相中の CH₃CN 濃度の増加に伴って増加した (**図 3a**)。 k 値の増大に関しては CH₃CN 濃度が増加すると保持時間が延長する HILIC 型固定相の一般的な性質と合致していた。続いて、移動相に塩 (HCO₂NH₄) を添加したことに伴う k , R_s の変化を調べた。その結果、HCO₂NH₄ 濃度増加に従って、陰イオン交換相互作用が

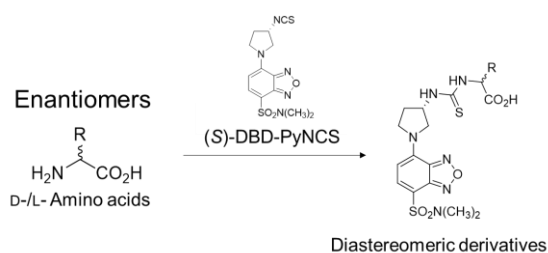


図 2 (S)-DBD-PyNCS による光学活性アミノ酸のジアステレオマー誘導体化

阻害されたことによると考えられる k 値の減少（保持時間の短縮）が見られた（図 3b）。しかし、保持時間の短縮による R_s 値の大きな減少は見られなかった。この結果より、(S)-DBD-PyNCS-D, L-Ser ジアステレオマー間の分離には、陰イオン交換より親水性相互作用の寄与が大きいと考えられた。ヒト血清中の D, L-Ser の定量は、95.5% CH₃CN/100 mM HCO₂NH₄ aq. を移動相として用いて、L-Ser に比べて僅かに存在するヒト血清中 D-Ser の定量に十分な光学分割 ($R_s = 1.85$) 定量が達成された（図 4）。

小括 1: トリアゾール型固定相を用いた (S)-DBD-PyNCS-D, L-Ser 誘導体の光学分割は、高 CH₃CN、高 HCO₂NH₄ 組成の移動相を用いることにより達成された。

II. アミノ酸一斉分離法の確立と生体試料分析への応用

前項 I の結果を受け、D-Ser 以外の NMDA 受容体の調節因子、すなわち Gly、L-Glu 等を含めたアミノ酸の一斉定量法を検討した。本項では、D, L-Ser の光学分割を達成した上で、その条件下で溶出しないアミノ酸（L-Glu 等）を同一クロマトグラム上で定量するため、前項 I で採用したアイソクラティック溶出からグラジエント溶出へと変更した。本条件において、複数の (S)-DBD-PyNCS-D, L-アミノ酸誘導体を分離することが可能であったが、一部のアミノ酸（Glu、Arg）の光学分割には適していなかった（図 5）。代表的なアミノ酸誘導体の R_s は DL-Ala: 2.7、DL-Ser: 2.1 であった。本法は、内標準物質 (IS) として生体内に存在しない 4 種のアミノ酸類縁体 (D-ホモセリン、1-メチル-D-Trp、GlyGly、カルボキシエチル-L-Cys) を用いた。本法の応用例として、ラット脳マイクロダイアリス実験により得た試料の測定を行った。D-Ser の細胞内取り込みを阻害する S-メチル-L-システインを投与 (*i.p.*) したラット脳線条体細胞間隙で D-Ser 濃度が増加する（約 130%、投与前比）ことを明らかにした。

しかし、定量値の再現性（精度）は、どの IS を分母としてピーク面積比を算出するか、により大きく変動し、精度の良い分析を行うことのできるアミノ酸/IS の組み合わせには、特異性が見られた。この結果から測定対象物質が多くなるほど、最適な IS の探索が困難となることが推察された。

小括 2: トリアゾール型固定相を用いる DBD-PyNCS 誘導体化されたアミノ酸の光学分割法は Ser、Ala など複数種のアミノ酸に適応可能であった²⁾が、D, L-Glu など一部のアミノ酸の光学分割には適さなかった。

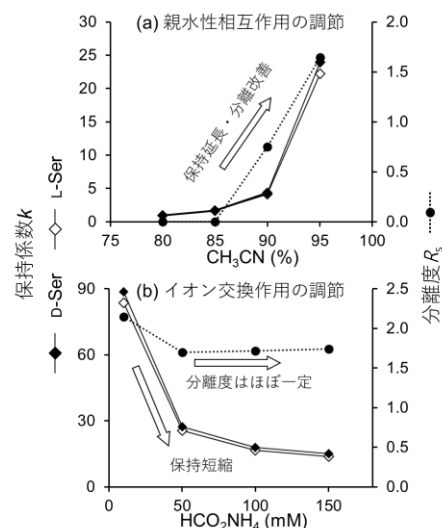


図 3 移動相組成と (S)-DBD-PyNCS-D, L-アミノ酸誘導体の保持 (k)、分離度 (R_s)

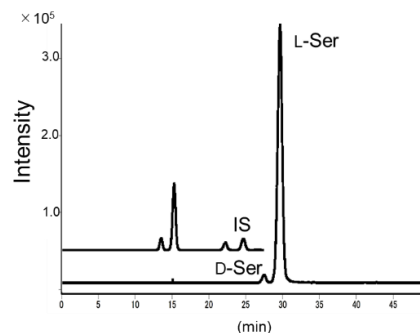


図 4 ヒト血清中 DL-Ser 誘導体の MRM クロマトグラム

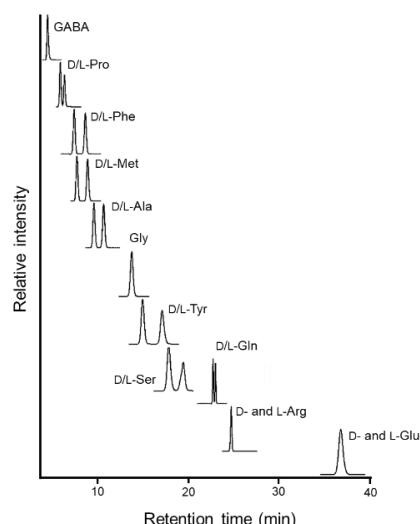


図 5 トリアゾール型固定相を用いた光学活性アミノ酸誘導体の一斉分離クロマトグラム

III. 新規ジアステレオマー誘導体化試薬の開発

前項 II の方法は、「一部のアミノ酸の光学分割が達成できない」、「目的物質毎に最適 IS 探索が必要」など欠点があった。そこで、これらの欠点を克服する新たなジアステレオマー誘導体化試薬の開発を試みることにした。新規試薬は i) 光学活性部位の識別に有利と考えられる環構造を有する、ii) IS として用いるための安定同位体標識体の合成が容易、iii) 光学活性原料から合成可能、の条件を満たす化合物をデザインし、Succinimidyl (4*R*)/(4*S*)-3-[(benzyloxy)carbonyl]-5-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl)acetate [(*R*)/(*S*)-COXA-OSu, 図 6a] および IS 用の (*S*)-COXA-OSu の重水素標識体 (*S*)-COXA-*d*₅-OSu (図 6b) を合成した。

COXA-OSu は、入手が容易な光学活性物質 *N*-Cbz-L- (または-D-) Asp を出発物質として、2 工程で合成可能であった。前項 II で光学分割ができなかった Glu や Arg を含め、多種の COXA-アミノ酸誘導体はトリアゾール型固定相を用いて完全な光学分割 ($R_s > 1.5$) が可能であった (図 7)。また、COXA-(*d*₅-)-アミノ酸誘導体は、衝突誘起解離 (CID) により CH₂O (あるいは CD₂O) が脱離する特徴的かつ効率的な開裂パターン ($\Delta m/z$; -30 or -32) を示した。この特徴は、MS/MS 測定時の高感度化および選択性の向上に寄与できると考えられる。検出限界値は、およそ 0.01 - 0.5 pmol (S/N=3) であった。種々の COXA-アミノ酸誘導体の開裂パターンを調べると、二級アミンである Pro の COXA 誘導体においては、CH₂O 脱離体は検出されなかった (図 8a)。COXA-OSu が二か所に導入されるアミノ酸の開裂パターンでは、Orn、Lys は CH₂O が一、および二分子脱離したとみられるプロダクトイオンが観測された (図 8b)。一方、Cys および Tyr は一分子脱離体のみが観測された (図 8c)。これらの結果より、COXA-CONH-アミノ酸結合が脱 CH₂O 化を促進していると考えられ、この特徴は、定量分析のみならずアミノ酸残基の特定など定性分析を行う上でも非常に有用であると考えられる。本法は、ラット、マウス血漿やアメフラシ中枢組織中のアミノ酸分析に応用可能であり、ラット血漿に適應した場合、多種の L-アミノ酸および、試料中に数 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で含まれる D-Ala、D-Ser の同時定量が、10 μL の血漿で可能であった (図 9)。

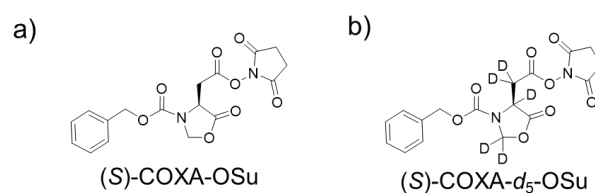


図 6 (*S*)-COXA-OSu (a) および重水素標識体 (*S*)-COXA-*d*₅-OSu (b) の構造

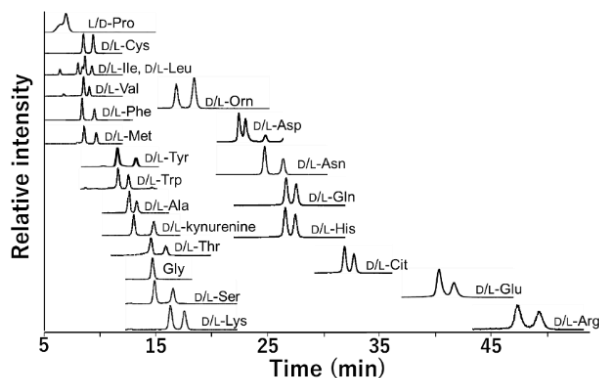


図 7 (*S*)-COXA-アミノ酸誘導体の一斉光学分割クロマトグラム (各 100 μM , standard amino acids)

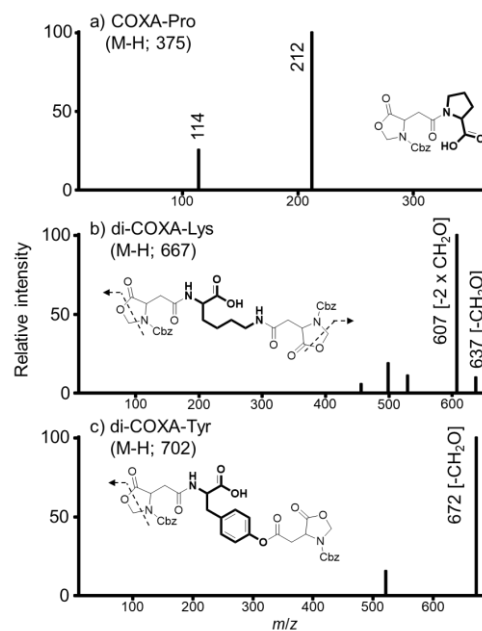


図 8 各種アミノ酸誘導体の CID-MS スペクトル

小括 3: トリアゾール型固定相による COXA-アミノ酸誘導体の光学分割法は、幅広いアミノ酸に適応可能であり、COXA-アミノ酸誘導体の特徴的な開裂による高感度、高選択的な分析が可能であった。さらに COXA-*d*₅-OSu を IS として利用することで、COXA で標識可能な物質の同位体標識体による内標準定量法が可能となり、本 LC-MS/MS 法を用いて、実際に生体試料中の D-アミノ酸定量例を示した³⁾。

【総括】

本研究では、LC-MS/MS によるトリアゾール型固定相を用いた *N*-誘導体化アミノ酸ジアステレオマー誘導体の分離法について検討し、D, L-Ser 誘導体を分離する LC 条件や非同位体標識化合物を用いた内標準定量法を開発した。次に、それらの検討で生じた問題点 (D, L-Glu 等の分離、非同位体標識 IS) を克服すべく新規誘導体化試薬の開発を行った。新規開発した誘導体化試薬 COXA-OSu を用いて、従来法 I, II より多様なアミノ酸を光学分割可能な分析法を確立した。この成果は D-Ser 等の生理活性アミノ酸の研究に活かすことができる。また、COXA-アミノ酸誘導体のアミノ酸残基の特定に応用可能な開裂様式や、多種の被験物質に対する内標準法を容易にする COXA-*d*₅-体は、対象物質の多様さのために研究が十分に進んでいないペプチド研究に応用可能と考えられる。本 LC-MS/MS 法が、それらの研究に応用され、研究の発展に寄与できることを期待する。

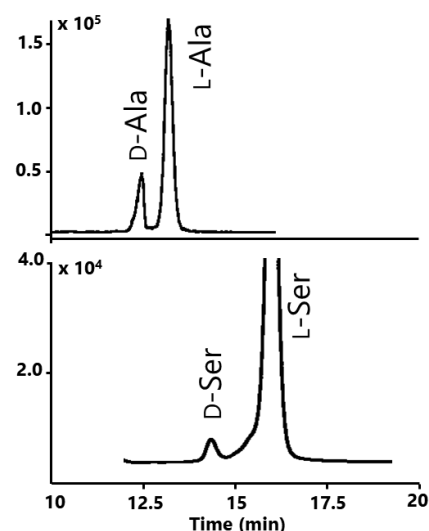


図 9 ラット血漿中 D, L-Ser、D, L-Ala-[(S)-COXA 誘導体] の MRM クロマトグラム

【対象文献】

- 1) **T. Sakamoto, et al.**, Determination of D-serine in human serum by LC-MS/MS using a triazole-bonded column after pre-column derivatization with (S)-4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N, N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, *Anal Bioanal Chem*, **408** (2016) 517-526. doi: 10.1007/s00216-015-9119-y
- 2) **T. Sakamoto, et al.**, Liquid chromatography-mass spectrometry with triazole-bonded stationary phase for *N*-methyl-D-aspartate receptor-related amino acids: development and application in microdialysis studies, *Anal Bioanal Chem*, **409** (2017) 7201-7210. doi: 10.1007/s00216-017-0682-2
- 3) **T. Sakamoto, et al.**, Succinimidyl (3-[(Benzyloxy)carbonyl]-5-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl)acetate on a triazole-bonded phase for the separation of DL-amino-acid enantiomers and the mass-spectrometric determination of chiral amino acids in rat plasma, *J Chromatogr A*, in press. doi: 10.1016/j.chroma.2018.11.061

博士論文審査結果

分子病態解析学（薬品分析学） 福島 健

坂本 達弥氏より提出された博士論文「LC-MS/MS によるトリアゾール型固定相を用いた光学活性アミノ酸の一斉分離定量法の開発と応用」の、審査結果について記す。

生体内には幾つかの D-アミノ酸が存在し、中でも D-Ser は、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 型 Glu 受容体を介する神経伝達に関与しており、統合失調症の関連物質の一つとして考えられている。生体内には D-Ser の他に、複数の D-アミノ酸が存在する。D-アミノ酸の機能解析には、生理活性の評価と共にアミノ酸の定量分析が不可欠であることから、同君は以下の研究を行った。

はじめに、同君は HILIC 型固定相の一種であるトリアゾール型固定相に着目した。市販のジアステレオマー誘導体化試薬(S)-DBD-PyNCS により誘導体化した D, L-Ser のトリアゾール型固定相への保持、光学分割の挙動を調べた結果、D, L-Ser 誘導体の保持係数 (k)、分離度 (R_s) は、移動相中の CH_3CN 濃度の増加に伴って増加した。続いて、移動相に塩 (HCO_2NH_4) を添加したことに伴う k 、 R_s の変化を調べた結果、 HCO_2NH_4 濃度増加に従って、 k 値の減少（保持時間の短縮）が見られたが、保持時間の短縮による R_s 値の大きな減少は見られなかった。これらの現象は、ODS カラムに代表される逆相型固定相とは異なる結果である。ヒト血清中の D, L-Ser の定量は、95.5% $\text{CH}_3\text{CN}/100 \text{ mM HCO}_2\text{NH}_4 \text{ aq.}$ を移動相として用いて、L-Ser に比べて僅かに存在するヒト血清中 D-Ser の定量に十分な光学分割 ($R_s = 1.85$) 定量が達成された。

次に、D-Ser 以外の NMDA 受容体の調節因子、すなわち Gly、L-Glu 等を含めたアミノ酸の一斉定量法を検討した。本条件では、複数の(S)-DBD-PyNCS -D, L-アミノ酸誘導体を分離することが可能であったが、一部のアミノ酸 (Glu、Arg) の光学分割には適していなかった。内標準物質 (IS) として生体内に存在しない 4 種のアミノ酸類縁体 (D-ホモセリン、1-メチル-D-Trp、GlyGly、カルボキシエチル-L-Cys) を用いた本法の応用例として、ラット脳マイクロダイアリシス実験により得た試料の測定を行い、D-Ser の細胞内取り込みを阻害する S-メチル-L-システインを投与 (*i.p.*) したラット脳線条体細胞間隙で D-Ser 濃度が増加する (約 130%、投与前比) ことを明らかにした。

次に、同君は新たなジアステレオマー誘導体化試薬の開発を試みた。新規試薬は i) 光学活性部位の識別に有利と考えられる環構造を有する、ii) IS として用いるための安定同位体標識体の合成が容易、iii) 光学活性原料から合成可能、の条件を満たす化合物をデザインし、Succinimidyl (4R)/(4S)-(3-[(benzyloxy)carbonyl]-5-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl)acetate [(R)/(S)-COXA-OSu, および IS 用の(S)-COXA-OSu の重水素標識体 (S)-COXA- d_5 -OSu を合成した。

この誘導体化試薬(S)-COXA-OSu を用いることで、多種の COXA-アミノ酸誘導体はトリアゾール型固定相を用いて完全な光学分割 ($R_s > 1.5$) が可能であった。また、同君は COXA-誘導体では、衝突誘起解離 (CID) により CH_2O (あるいは CD_2O) が脱離する特徴的かつ効率的な開裂パターン (Dm/z ; -30 or -32) を示すことを見出し、この特徴は、MS/MS 測定時の高感度化および選択性の向上に寄与できると考えられた。COXA-CONH-アミノ酸結合が脱 CH_2O 化を促進していると考えられ、この特徴は、定量分析のみならずアミノ酸残基の特定など定性分析を行う上でも非常に有用である。本法は、ラット、マウス血漿やアメフラシ中枢組織中のアミノ酸分析に応用可能であり、

ラット血漿に適応した場合、多種のL-アミノ酸および、試料中に数 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で含まれる D-Ala、D-Ser の同時定量が 10 μL の血漿で可能であった。

坂本氏が本研究で見出したトリアゾール型固定相による COXA-アミノ酸誘導体の光学分割法は、幅広いアミノ酸に適応可能であり、COXA-アミノ酸誘導体の特徴的な開裂による高感度、高選択的な分析が可能であった。さらに COXA- d_5 -OSu を IS として利用することで、COXA-OSu で標識可能な物質の同位体標識体による内標準定量が可能となり、本 LC-MS/MS 法を用いて、実際に生体試料中の D-アミノ酸定量例を示した。

以上をまとめると、本論文の著者である坂本達弥氏のクロマトグラフィー分離機構の理解、化合物の合成アイデア、LC-MS/MS についての技能、知識は十分であり、博士（薬学）の学位授与に相応しいと判断する。

以上