

論文の内容の要旨

論文題目 高速・高感度アミノ酸分析用新規試薬の開発と
その生命科学研究への応用

氏名 新保 和 高

生命科学の研究において、ゲノム解析、トランスクリプトミクス解析、プロテオミクス解析と並び、メタボロミクス解析として注目を集めている。特に、代謝物は遺伝的要因だけではなく、環境的な要因も含む表現型であり、代謝物の挙動の変化を的確に捉えることの意義はたいへん大きい。全代謝物の情報である“メタボローム”と称することは、1998年に Tweeddale らが大腸菌の抽出物を用いた解析において、初めて提唱しているが(1)、その概念は、古くからあり、1960年代初めには、既に、Pauling が“分子矯正医学”を提唱し、1971年に尿中の代謝物分析において、代謝物の定量分析による疾病診断が可能性についての予測を公言している(2)。

そのような代謝物の中で、アミノ酸は、生体中でもっとも多く存在する代謝物の一群であり、代謝経路においても、重要なハブの役割を果たしていることが多い。アミノ酸は、一般式で $\text{NH}_2\text{-RH-COOH}$ で表され、アミノ基とカルボキシル基、及び、R で表される種々の置換基を含む側鎖を有する化合物であり、ペプチドやたんぱく質の構成要素となるだけでなく、側鎖官能基の特徴から様々な生理機能を有している。

そのためアミノ酸分析に関する研究についても、非常に古くから行なわれ、現在、もっとも広く使用されている、アミノ酸の検出試薬であるニンヒドリン試薬は、1910年に Ruhemann らにより発見されている。1958年には、Spackman、Stein、Moore らが、たんぱく質を加水分解したアミノ酸を陽イオン交換樹脂で分離した後に、ニンヒドリン試薬と混合し、反応カラム内で過熱し呈色し検出する方法(ポストカラム誘導体化法)を自動化に成功し(3)、その功績により、ノーベル化学賞を受賞している。しかし、Spackman らの報告以来、近年の液体クロマトグラフィーの装置や充填材である

樹脂、コンピュータの発展により、分析時間、精度は格段に進歩し、当時、たんぱく質加水分解アミノ酸を約1日かけて分析していたが、現在では1時間程度での分析が可能となった。しかしながら、同様の原理によるものであり、今後の生命科学研究の更なる発展においては、より高感度・高速な全く新たなアプローチによるアミノ酸分析法の出現が欠かせなかった。

また、アミノ酸分析においては、いわゆる濃度を測定するための定量分析だけではなく、アミノ酸中の安定同位体標識率を捉えることが出来れば、¹³C 標識グルコース安定同位体基質を用いた、生体内の代謝物流れ(フラックス)を捉える代謝工学的な研究への応用も可能となるなど、生命科学研究に、今までにない、広がりを持たせることができる。

このようにアミノ酸を測定はたいへん重要と認識されが、従来の蛍光検出用試薬を用いる方法では、フェムトモル(femtomole)レベルの感度が限界であった。そこで、検出感度をさらに向上し、アットモル(attomole)レベルまで向上させることにより、サンプル調製に費やす手間を大幅に軽減され、その結果、多くの異なる条件でのデータの取得が可能となり、生命科学における研究を飛躍的に向上させることが出来ると考えた。さらに、分析時間を10倍に高速化することが出来れば、データ取得量として、トータルでおよそ1000倍程度増大することが可能となる。このような大量データはバイオインフォマティクス技術の発展と相俟って、データマイニング手法を用いることで、これまでに見えていなかった知見を生み出すことが期待できる。

そこで、アミノ酸分析の高感度化及び高速化を実現するため、全く新しいアプローチでのアミノ酸分析試薬の開発が必要であると考えた。これらの実現に向け、タンデム型の質量分析計(MS/MS)に注目した。特に、三連四重極型(Triple quadrupole)の質量分析計は、2つの質量フィルタと衝突室(コリジョンセル)を有する構造を取っており、非常に高い選択性を有する装置であり、高感度の定量が可能である。そこで、三連四重極型の質量分析計の原理を活用できる試薬を開発することで、これまでには無いアットモルレベルの分析が実現できると考えた。

本研究において、新しいアプローチによる試薬は、①～④の特徴を有するものとしてデザインし、鋭意検討を行なった。

- ①. 質量分析計において高感度に検出するための構造を有する。
- ②. 高速分析を行うために逆相の HPLC で保持されるために構造を有する。
- ③. アミノ基と穏和な条件で迅速に反応するための構造を有する。
- ④. 誘導体化物が CID で試薬骨格由来の部分とアミノ酸との間で規則的に開裂する。

結果、全て成功し、ここに全く新しいコンセプトの分析試薬を用いた画期的な高速・高感度アミノ酸分析法の完成を見ることが出来た。

特に、④の特徴については、試薬及びアミノ酸と試薬の反応物の電子の局在、超共役や共鳴によるフラグメントイオンの安定性など考慮することで、CID における開裂位置を制御できることを見出したことから、タンデム型質量分析計の CID において試薬骨格とアミノ酸との結合部位で特異的な開裂を誘起する試薬を開発することに成功した。

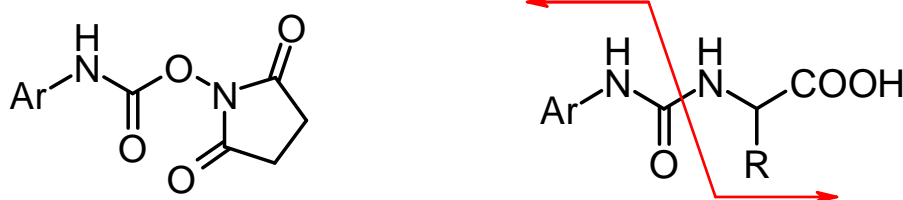


Fig 1. 開発した試薬の基本構造(左)とアミノ酸との反応物の CID による開裂(右)

開発した分析試薬のひとつである TAHS (*p*-*N,N,N*-Trimethylammonioanilyl *N'*-Hydroxysuccinimidyl Carbamate Iodide) (Fig.2) はアミノ酸測定の検出感度を従来のフェムトモル (femtomole) レベルからアットモル (attomole) レベルへと飛躍的な改善に成功した。このことは、これまで見えていなかった生体中の微量アミノ酸の測定が可能とし、また、細胞内であれば 10^3 個程度、血液であれば数 μ L という微量サンプルでの分析を可能とし、実験者のサンプル調製に関わる時間を大幅に低減することにつながった。

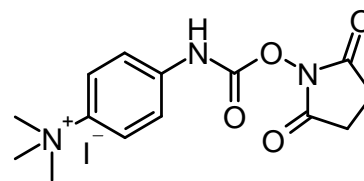


Fig.2 TAHS

また、CID での開裂位置を試薬とアミノ酸との結合位置に制御した試薬を開発できたことにより、アミノ酸の安定同位体標識率を GC-MS を用いた方法で行なわれるような複雑な補正計算なしに、簡便に算出することを可能とした。さらに、本手法は、高感度な分析方法でもあることから、従来の微生物の細胞内のたんぱく質加水分解アミノ酸の安定同位体標識率のみを算出しフラックスの解析を行う手法から、細胞内の遊離アミノ酸の安定同位体標識率の測定も可能とし、より細胞内の短時間の变化におけるフラックスの解析が可能となり、微生物によるアミノ酸生産技術の発展に貢献することができた(4)。

一方、本研究で開発した APDS (3-Aminopyridyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate) (Fig.3) は、所要時間 7.5 分での高速アミノ酸分析を可能とした。さらに、本分析方法は、高感度な方法でもあ

ることから、従来よりも分析に必要な血漿量を数 μ Lと大幅に低減できた。

さらに、本方法は、プレカラム誘導体化試薬を用いたアミノ酸分析方法であったことから、作業者による分析前に誘導体化反応が必要であったが、臨床現場での利用においては、操作方法の煩雑さ課題となっていた。そこで、誘導体化工程を自動化した装置の開発を

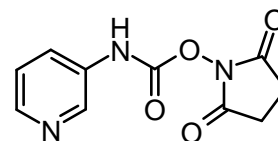


Fig.3 APDS

株式会社日立ハイテクノロジーズと共同で行った。開発した装置は、ヒト血漿を用いた分析法バリデーション試験において良好な結果を得ることができ、既存の分析方法との定量値の比較においても良い一致を示した。このことにより、従来の1日10検体しか分析できなかったアミノ酸の分析が、10倍の100検体程度処理できるようになり、年間35,000以上もの検体を分析することが可能とした。その結果、アミノ酸に関する研究の著しい発展に貢献することができた。味の素株式会社において、開発している『アミノインデックス®』は、血漿中のアミノ酸濃度を統計的に解析し、複数のアミノ酸の組み合わせを疾病や健康状態の指標として用いる方法である(6、7)。このような方法においては、開発段階の症例対照研究の段階においては、大量のアミノ酸分析データが、実際の実用段階においては迅速なアミノ酸の分析による判別が必要となる。今回、アミノ酸分析の処理能力を10倍に向上させた方法の開発に成功したことで、今後の臨床現場での適用が期待される。

<参考文献>

- (1) H. Tweeddale, L. Notley-McRobb and T. Ferenci, *J. Biotechnol.* 180, 5109-5116 (1998).
- (2) L. Pauling, A. Robinson, R. Teranishi and P. Cary, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2374-2376 (1971).
- (3) J. D. Rabinowitz and E. Kimball, *Anal. Chem.*, 79, 6167-6173 (2007).
- (4) D. H. Spackman, W. H. Stein and S. Moore: *Anal. Chem.*, 30, 1190-1206 (1958).
- (5) S. Iwatani, S. Van Dien, K. Shimbo, K. Kubota, N. Kageyama, D. Iwahata, H. Miyano, K. Hirayama, Y. Usuda, K. Shimizu and K. Matsui, *J Biotechnol.* 128, 93-111 (2007).
- (6) T. Ando, *Chem. Chem. Ind.*, 60, 40-41 (2007).
- (7) Y. Noguchi, Q. W. Zang, T. Sugimoto, Y. Furuhashi, R. Sakai, M. Mori, M. Takahashi and T. Kimura, *Am. J. Clin. Nutr.*, 83, 513S-519S (2006).