

# 尿中の遊離 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸定量のための HPLC による改良法

栞原 晶子, 木戸 詔子

## An Improved Method for the Determination of Free $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid in Urine by High Performance Liquid Chromatography

Akiko Kuwabara and Shoko Kido

A rapid and sensitive high performance liquid chromatographic (HPLC) method for the determination of free  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) in urine using precolumn fluorescent derivatization with OPA/ET reagent was previously developed. In the present study, we improved the method for quantitative analysis of urinary free Gla.

- 1) Fluorescent strength of OPA/ET reagent reached a maximum level after 3 days from the preparation of the reagent. Then the fluorescent strength was maintained at least after 3 weeks by the addition of ethanthiol every 3 days.
- 2) An urine sample was diluted by 20 to 60-folds and a 2.5  $\mu$ l aliquot of the diluted urine sample containing about 1 to 2 pmol of Gla was injected into the ChemcoPak Liquid Chromatography Columns packed with Nucleosil 5SB. The mobile phase consisted of 0.12M sodium citrate buffer (pH5.28) and acetonitrile in the ratio 60:40. Under these conditions, Gla peak appeared in a retention time of about 7 to 10 minutes and was completely resolved from the other amino acids. Since the peak disappeared after the sample was subjected to decarboxylation treatment, the peak was confirmed to contain only Gla.
- 3) This method gave a linear standard curve in a range of 0.10-150 pmol and allowed quantitative analysis of Gla in an amount as low as 0.1 pmol. We used the standard curve in a range of 0.10-4.0 pmol for urinary Gla analysis. This is a sensitive and simple assay of free Gla in urine which was subjected to only dilution without further treatment.

(Received September 8, 2005)

### 1. はじめに

$\gamma$ -カルボキシグルタミン酸 (3-アミノ-1, 1, 3-プロパントリカルボン酸, 略称 Gla) は下記に示すような生体の特定タンパク質の構成成分として存在し, タンパク質前駆体分子のグルタミン酸残基の $\gamma$ 位が, ビタミン K 依存性カルボキシラーゼにより選択的修飾を受けてカルボキシル化される。1974 年 Stenflo ら<sup>1)</sup>によって, Gla は血液凝固因子の第 II 因子であるプロトロンビンの正常分子中に発見され, このこ

とからビタミン K が各臓器のミクロソーム分画に存在するカルボキシラーゼを活性化し,  $\gamma$ -カルボキシル化反応の補助因子として機能することが明らかにされた。さらに典型的な血液凝固因子である VII, X および IX 因子にも Gla が含まれていることが報告された<sup>2-4)</sup>。その後, 血漿タンパク質のプロテイン M やプロテイン Z, 抗凝固作用を有しているプロテイン C やプロテイン C の補助因子であるプロテイン S などにも Gla が含まれていることが認められた<sup>2-4)</sup>。また, Gla は血液凝固系とは全く関係のない骨基質タンパク質や腎臓結石, 腎臓組織のタンパク質などにも含まれていることが確認された<sup>3,4)</sup>。体内で最も豊富に

Gla が存在するのは骨組織であり、骨の Gla タンパク質のオステオカルシン（別名 Bone Gla Protein: BGP）は骨の非コラーゲン性タンパク質の約 20% を占めている。また、骨基質には BGP 以外にも Gla を含むマトリックス Gla タンパク質が発見されているが、その機能については不明である<sup>5,6)</sup>。BGP は骨芽細胞で特異的に生成され、破骨細胞の基質シグナルとしての役割をもつと考えられている<sup>7)</sup>。ヒト BGP 分子 (MW, 5,900) 中には 3 個の Gla が存在し、カルシウムイオン結合能をもっている。BGP のカルシウムイオン結合様式は Gla を含有しない細胞内カルシウムイオン結合タンパク質と異なり、Gla とカルシウムイオンが弱く結合するケージ構造を形成している<sup>8)</sup>。BGP は細胞外骨基質に存在し骨のミネラル層でヒドロキシアパタイトと強く結合しており、骨の中でも長管骨に Gla 含有量は最も多い。また、BGP の生合成がビタミン D によっても調節されるとの報告<sup>9)</sup>もあるが、BGP の骨代謝については不明な部分が多い。骨芽細胞で生成された BGP は、一旦血流中に分泌された後に、血中のカルシウムイオンを動員してヒドロキシアパタイトに吸着され骨に蓄積される。そして大部分の BGP は腎臓に取り込まれて代謝され、ほとんどが遊離アミノ酸にまで分解され、BGP 中の Gla は体内で脱炭酸されることなく尿中に排泄される<sup>10)</sup>。従って、尿中の Gla 排泄量は Gla を含む骨組織の代謝の指標となる可能性があるが、ほとんど研究されていない。

Gla の測定方法としては、アミノ酸分析計による方法<sup>11)</sup>を始めとし、比色定量<sup>12)</sup>、陰イオン交換カラムクロマトグラフィー<sup>13)</sup>、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)<sup>14-16)</sup>、ガスクロマトグラフィー<sup>17)</sup>などを利用した多くの方法が報告されているものの、生体レベルの尿中 Gla の微量定量法についてのデータは少ない。今回 Kuwada らの方法<sup>15)</sup>に準じ、Gla の蛍光プレラベル法での HPLC による定量を試みた結果、種々の問題点があることが明らかとなった。そこで、Kuwada らの方法を改善し、より安定した高感度の定量条件を検討し、臨床検査の指標として用いることができるように改良したので報告する。

## II. 実験材料および方法

### 1. 試料の調製

Gla 標準液は DL- $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸モノアンモニウム塩 (Biosciences, Inc., La Jolla, Ca, USA) に蒸留水を加えて希釈し、16 pmol~40 nmol/100  $\mu$ l の Gla 標準液を調製し冷凍保存した。また採取した尿

試料は凍結保存し、使用時に蒸留水で 20~60 倍に希釈して用いた。

### 2. 蛍光化試薬・OPA/ETの調製

Hill らの方法<sup>18)</sup>に準じ、*o*-フタルアルデヒド (ナカライテスク) 100 mg をメタノール (和光純薬工業) 5 ml に溶かし、エタンチオール (ナカライテスク) 50  $\mu$ l と 0.15 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 10.5, 0.2% Brij-35 を含む) 10 ml を加えて混合し、蛍光化試薬 (OPA/ET 試薬) を調製した。さらに窒素置換後、使用するまでに最低 72 時間遮光して室温で保管し、3~4 日毎にエタンチオール 10  $\mu$ l を加えて使用した。これらの試薬はすべて特級を用いた。また Gla の HPLC 分析の当日に、試料 100  $\mu$ l に OPA/ET 試薬 100  $\mu$ l を加え、ミキサーで混和し、室温で 2 分間静置し、0.1 M リン酸二水素カリウム 200  $\mu$ l (アセトニトリルと蒸留水 2:1 の混合液を溶媒としてリン酸二水素カリウムを溶解) を加えて蛍光化した。

### 3. Glaの脱カルボキシル化

Hauschka らの方法<sup>19)</sup>に準じ、Gla 標準液または希釈した尿を加水分解ビンにそれぞれ 200  $\mu$ l (320 pmol 相当量) とし、同量の 2 N 塩酸 (ナカライテスク, アミノ酸自動分析計用特製試薬) を加え、真空下で 100°C, 16 時間の酸分解を行った。その後、固体の水酸化ナトリウムを入れたデシケーター中で、試料管に移した酸分解試料を減圧乾固して塩酸を除去し、さらに蒸留水で試料管壁を洗い込み、同様に減圧乾固した。これを 400  $\mu$ l の蒸留水に溶かして凍結保存した。

### 4. HPLCの条件

Kuwada らの方法<sup>15)</sup>に準じ、日立製作所 L-6300 形インテリジェントポンプ、日立製作所 F-1050 形分光蛍光光度計、日立製作所 D-2500 形クロマトデータ処理装置、日立製作所 AS-4000 形インテリジェントオートサンブラ、充填剤 Nucleosil 5SB (5  $\mu$ m 粒子) を詰めた ChemcoPak Liquid Chromatography Columns (4.6 $\times$ 50 mm, ケムコ), Type IH にプレカラムフィルター (2  $\mu$ m pore) を入れて使用した。カラムオーブンは 47°C に設定した。移動相には 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (和光純薬工業, アミノ酸自動分析用 3.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液, pH 5.28 を蒸留水で希釈) と HPLC 用アセトニトリル (和光純薬工業) を 60:40 で使用した。流速は 1.0 ml/min とし、Gla の蛍光検出は励起波長 240 nm, 蛍光波長 418 nm で測定し、ATT 6 で溶出パターンを示した。HPLC に注入する試料と移動相に用いた溶媒はすべて 0.45  $\mu$ m ミリポア, Type W または 47 mm プレイン

フィルター (日本ミリポア工業) を通してから用いた。Gla 標準液と尿希釈試料の注入量はすべて 2.5  $\mu$ l とした。

### III. 結果と考察

遊離の Gla の定量法で HPLC 以外の方法は、いずれもイオン交換体を通して Gla を精製したり、濃縮するなどの煩雑な操作を伴う上に、内部標準品による補正が必要である。HPLC での Gla の検出法にはポストラベル法とプレラベル法があるが、後者の方は感度が高い上に装置上簡便な方法である。そこで Kuwada らによる尿中の遊離 Gla の定量法<sup>15)</sup> に準じて HPLC を使用し、蛍光プレラベル法で測定してみたところ、蛍光試薬の安定性などに問題があることが判明したのでこの問題を解決し、より精度が高くしかも簡易な蛍光プレラベル化 Gla の HPLC による定量法を検討することにした。

#### 1. OPA/ET 試薬の安定性

プレテストとして Kuwada らの方法<sup>15)</sup> に準じ、蛍光化した Gla 標準液 (Gla 0.80~500 pmol/5  $\mu$ l 試料) を HPLC に注入し、Gla 量に対し蛍光強度をプロットして標準曲線を作成した。Kuwada らの報告では両対数プロットによる標準曲線であったが、図 1-A に示すように、対数を用いずに 0.80~200 pmol の範囲で Gla 量に比例して標準曲線を作成することができた。しかし、この標準曲線は図 1-A に示すように OPA/ET 試薬の調製後の日数によって蛍光強度 (ピーク面積/Gla, pmol) に 2 倍以上の差が見られた。Kuwada らは、OPA/ET 試薬は調製から 16 時間後に蛍光強度が調製時の 21~32% に減少し、その後安定した活性が得られると報告している<sup>15,16)</sup>。また、アルカリ処理をして尿中の Gla タンパク質や Gla ペプチドを分解して、全て遊離の Gla として定量した方法では、13 時間後に約 20% の減少を伴っている<sup>16)</sup>。そこでまず、蛍光試薬の安定性を検討するために、Gla 標準液を 3~4 日毎に OPA/ET 試薬で蛍光化し HPLC による標準曲線を作成した。OPA/ET 試薬調製から 16 時間までは蛍光強度が不安定とされているので、調製日と 1 日後から 21 日後まで Gla の蛍光強度を調べた。図 1-B は図 1-A に示す各標準曲線から求めた蛍光強度を相対的に示した結果であり、2 日後までは蛍光強度は急に上昇し 3 日後に最大値を示し、その後はほぼ一定の蛍光強度を示した。試薬調製後 3 日毎にエタンチオールを加えることで蛍光強度が回復し、1ヶ月後でも同じ蛍光強度を示した。この実験は 3 回繰り返す、OPA/ET 試薬の安定

性を確認した。従って OPA/ET 試薬 15 ml 調製後、3 日毎にエタンチオール 10  $\mu$ l を加えて以後の測定に使用した。

#### 2. 尿中の遊離 Gla 検出のための HPLC 条件

Kuwada らの方法<sup>15)</sup> の HPLC による Gla の分析は、尿試料を 5.0  $\mu$ l 注入し、移動相は 0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 50 : 50、流速 2 ml/min で行っている。しかし、この条件では Gla が 3~4 分で溶出し、またベースラインが下がりきらず分離が悪かったため以下に示すように、Gla 定量のための条件を検討した。

Kuwada らの方法では<sup>14-16)</sup> 尿試料は 5~10 倍希釈して使用していたが、この希釈倍率で HPLC を行うと尿中の Gla 以外のアミノ酸が過剰で Gla ピークの分離が悪かった。プレテストとして約 10 検体の尿試料を分析した結果、尿中のアミノ酸量は検体によって約 3 倍濃度が異なることが分かった。そこで検体により 20~60 倍希釈し、注入量を 2.5  $\mu$ l にして流速を 1 ml/min にしたところ、Gla ピークが拡散せずシャープなピークになり、ベースラインもやや下がった。つまり、Kuwada らの方法の約 1/10 の尿試料で、尿中の微量 Gla の分析が幾分改善できた。この条件下で得られた溶出パターンを図 2-A に示した。Gla は 5.96 分に溶出し、Gla の前後に溶出するピークとの分離が悪く、またベースラインが完全に下がりきらなかったため、次に移動相の条件を検討した。

移動相のクエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリル、50 : 50 の割合では Gla の分離が悪いため、45 : 55 にしたところ、Gla の溶出時間はあまり変化せず、Gla 以降に溶出するピーク (このピークはアルカリ分解で消失することから、尿中に溶出したタンパク質やペプチドが蛍光化されたものである<sup>16)</sup>) の時間が早くなり Gla との分離が悪くなったので 60 : 40 にしたところ、Gla 以降に溶出するピークが遅くなり、Gla との分離が改善された。しかし、Gla の前のピークとの分離は変わらず、ベースラインも下がりきらなかった。そこで、クエン酸ナトリウム緩衝液の濃度を 0.2 M から 0.12 M にした結果、図 2-B に示すように Gla は 7 分台に溶出して他のピークと完全に分離し、ベースラインも下がった。従って、HPLC の溶出条件は 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 60 : 40 で、流速 1 ml/min とした。本実験の結果から Gla の溶出は 7 分より早くなると分離が悪く、また 10 分より遅くなると拡散するため、7~10 分までに溶出する条件下で分析することが望

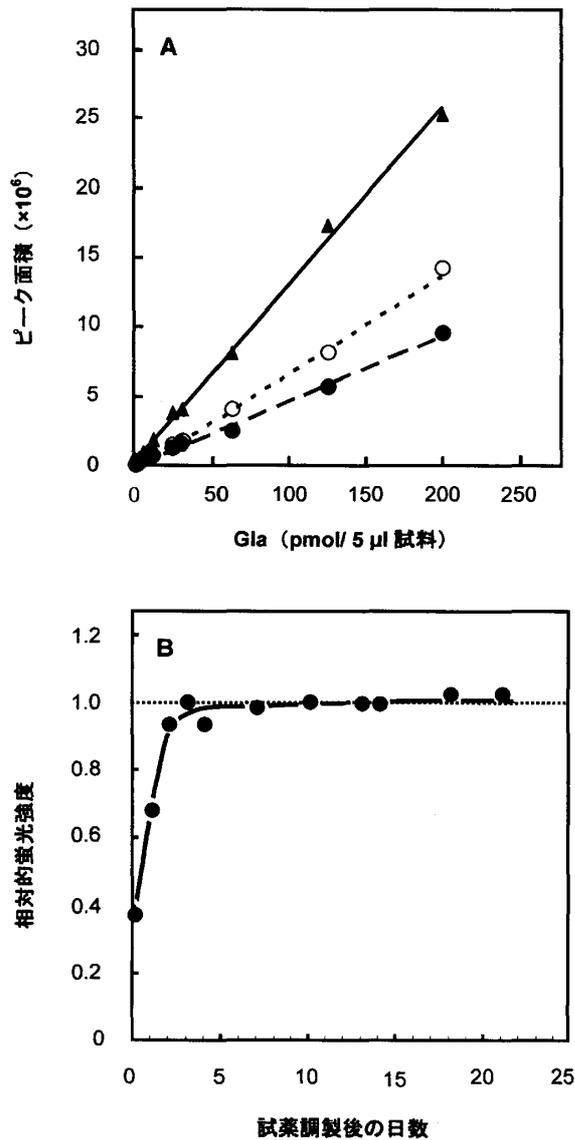


図1 蛍光試薬の経時的安定性  
測定日毎に Gla 標準液 100 $\mu$ l (Gla 64pmol $\sim$ 16 nmol を含有) に OPA/ET 試薬 100 $\mu$ l と緩衝液 200 $\mu$ l を加えて蛍光化した。この溶液 5 $\mu$ l を HPLC に注入し、A のグラフに示すように 0.80 $\sim$ 200 pmol の Gla に対する蛍光強度をピーク面積で示し、9 点プロットの標準曲線を作成した。●は試薬調製当日、○は1日後、▲は3日後に測定した結果を示した。この結果に示すように、測定日によって蛍光強度 (ピーク面積 / Gla pmole) が大きく変化した。B は蛍光試薬の安定性を調べるために、OPA/ET 試薬調製日から1 $\sim$ 4日毎に21日までの Gla の蛍光強度を測定したグラフである。縦軸はAのグラフに示すような各測定日の標準曲線から求めた蛍光強度の値を、蛍光強度の最大値を示す3日目の値を1として相対的に示した。OPA/ET 試薬は調製後4日目以降、3 $\sim$ 4日毎の測定日に検体を分取した後にエタンチオール 10 $\mu$ l を加えて用いた。この実験は3回の平均値を示した。

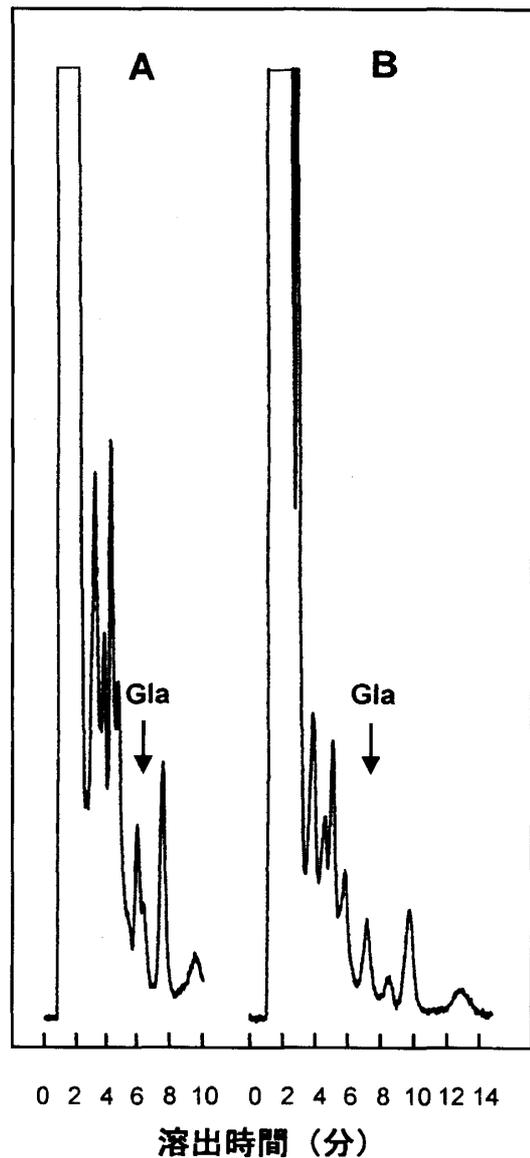


図2 尿試料中の遊離 Gla の HPLC 溶出パターン  
A は蛍光化した 20 倍希釈の尿試料を 2.5 $\mu$ l 注入し、0.2 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 50 : 50、流速 1 ml/min で溶出したパターンを示した。10 分以降に溶出していたペプチドやタンパク質のピークは拡散していたためカットしている。B は A と同じ尿試料を 0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液とアセトニトリルを 60 : 40、流速 1 ml/min、で溶出したパターンを示した。矢印は Gla の溶出ピークを示した。

ましいことが分かった。

以後、この条件で実験を行ったが、カラムが非常に小さく試料や溶媒に影響されやすいため溶出時間が変化した。従って、尿中の Gla を定量する場合には毎回 Gla 標準液を用いて Gla の溶出時間を確認する必要がある。また、尿試料を連続して流すと、Gla

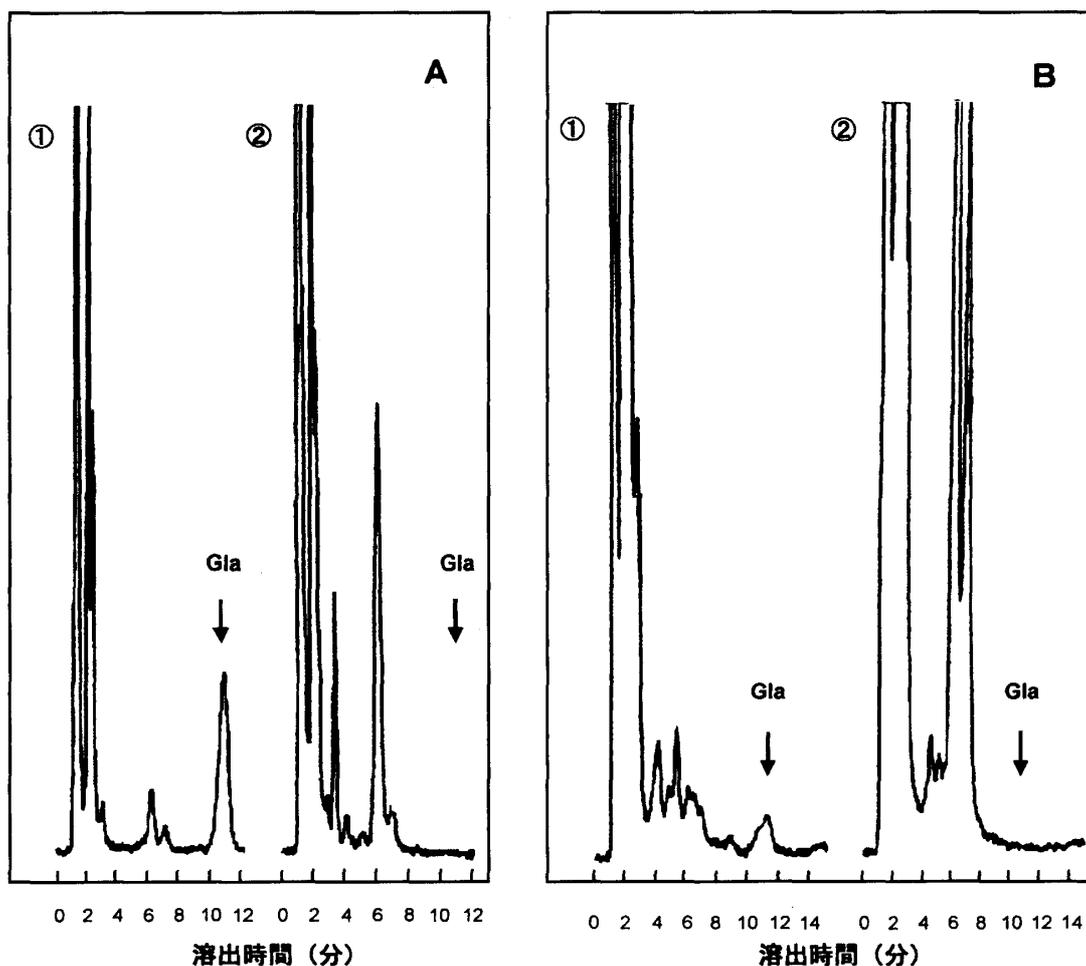


図 3 脱カルボキシル化による Gla の HPLC 溶出パターン  
 A は 2 pmol の Gla 標準液, B は 20 倍希釈の尿試料をそれぞれ蛍光化し, 各試料を 2.5  $\mu$ l ずつ注入し, 図 2-B の条件で溶出した。A と B 共に①が塩酸未処理の溶出パターン, ②が塩酸処理による脱カルボキシル化の溶出パターンを示した。矢印は Gla の溶出ピークを示した。

の溶出時間が徐々に早くなり, 分離が悪くなるのでカラムの再生操作として, 尿試料 15 検体毎に 40~80%アセトニトリルを 15 分のグラシエントシステムで溶出後, 80%アセトニトリルで 15 分パージを行った。この操作でも再生されない場合は, 多量の蒸留水→0.1M エチレンジアミン四酢酸・ナトリウム塩 (二ナトリウムと四ナトリウムを 1:1 で使用)→蒸留水→メタノール→蒸留水→0.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液で各々 30 分パージを行った。

### 3. 脱カルボキシル化による Gla の溶出パターン

尿試料中の Gla のピークに Gla 以外の蛍光物質が含まれていないことを確かめる必要がある。Gla 標準液と 60 倍希釈尿を塩酸処理によってそれぞれ脱カルボキシル化し, 未処理の試料と Gla 溶出パターンを比較した。Gla 標準液と尿試料 (図 3-A と図 3-B) について, 未処理の溶出パターン①と脱カルボ

キシル化の溶出パターン②をそれぞれ示した。溶出パターン①の矢印の位置に Gla のピークが検出された。しかし, 溶出パターン②の脱カルボキシル化した試料では Gla 標準液と尿試料ともに, 矢印の位置の Gla のピークが完全に消失し, 6 分台に脱カルボキシル化したと思われるピークが溶出した。この結果から尿試料中の Gla に相当するピーク中には Gla 以外の物質が存在していないことを確認した。

### 4. Gla 標準溶液による標準曲線の作成

上記 2 で決定した HPLC による Gla の定量条件で, 図 4-A のように標準曲線を作成したところ 0.10 pmol より濃度が低いと定量性に乏しく, また 150 pmol を超えると標準曲線から徐々に乖離し低値を示した。この条件で 30 検体の尿中 Gla を測定したところ, 0.10 pmol より低くなると検出が難しく, 4.0 pmol 以上になると分離が悪くなることから尿試料中の Gla

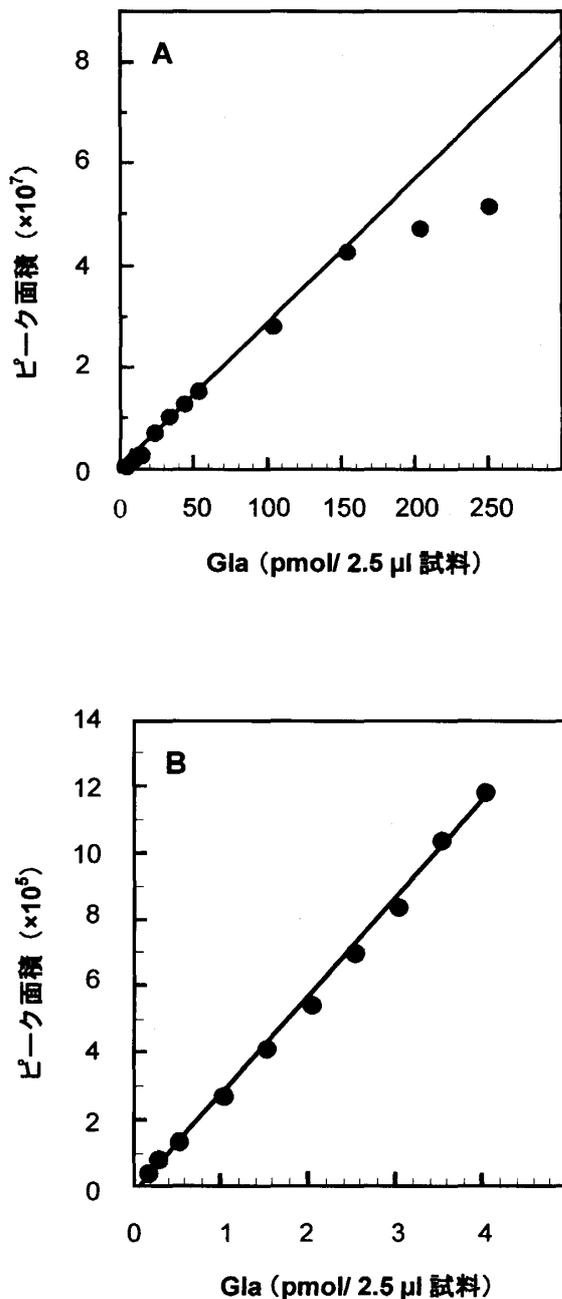


図 4 蛍光プレラベル Gla の HPLC による標準曲線の作成  
 決定した HPLC の測定条件下で、Gla 量 0.25～250 pmol (A) および 0.12～4.0 pmol (B) の範囲の標準曲線を得るように測定した。

は 1～2 pmol 前後で定量することが好ましいことが分かった。そこで、尿中の Gla 定量のための標準曲線は図 4-B に示すように、0.10～4.0 pmol を使用することにした。Kuwada らによる方法<sup>15)</sup>では Gla の検出限界が 0.3 pmol～1 nmol とされており、標準曲線は 0.3 pmol～100 pmol の両対数目盛で作成されていたが、低濃度でのプロット数が少なく、なおかつ

Gla 濃度とピーク面積共に対数でプロットしたグラフによる標準曲線であった。本研究ではこの濃度の範囲であれば Kuwada らのようにピーク面積と Gla 濃度を対数処理せずに直線で示すことができ、図 4-B の標準曲線を用いて尿中の Gla を低濃度で精度よく定量できることになった。

#### IV. ま と め

尿試料の調製が希釈操作のみで、装置上簡便で分析時間が短く、精度が高いとされている尿中の遊離 Gla の定量法として開発された HPLC での蛍光プレラベル法<sup>15)</sup>に従って定量してみたところ、蛍光試薬の安定性が悪く、一定した値が得られなかった。そこで、尿中の遊離 Gla 定量のための HPLC 法を下記に示すように改良した。

- Gla を OPA/ET 試薬でラベル化し、その蛍光強度の安定性を検討したところ、試薬調製後 1～3 日後までは蛍光強度は上がり続け、調製時の約 2 倍に達したが、その後はエタノールを 3 日毎に加えることで蛍光強度は少なくとも 3 週間後まで安定していた。
- HPLC の条件は、20～60 倍希釈尿試料の 2.5 µl 中に 1～2 pmol の Gla 量が含まれるように調製し、Nucleosil 5SB を充填剤とした ChemcoPak Liquid Chromatography Columns (4.6×50 mm) Type IH を用い、0.12 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.28) とアセトニトリルが 60 : 40、流速 1 ml/min とし、蛍光検出による定量を行った。その結果 Gla は 7～10 分までに溶出すると完全に単離された。この Gla ピークは脱カルボキシル化すると完全に消失したことから、Gla 以外の成分が含まれていないことを確認した。
- 今回決定した条件で標準曲線を作成した結果、0.10～150 pmol の範囲で、Gla 量に対するピーク面積を対数処理することなく、Gla 量に比例した検量線を得ることができた。0.10～4.0 pmol の標準曲線を用いて、尿は希釈操作のみで、蛍光プレラベル化した遊離 Gla を 15 分サイクルの HPLC により精度よく定量できた。

(平成 17. 9. 8. 受付)

#### V. 文 献

- J. Stenflo, P. Fernlund, W. Egan and P. Roepstorff: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 71, 2730 (1974)
- 木村修一: 栄養学レビュー, 27, 24 (1999)
- 岩永貞昭, 斎藤英彦, 松田道生監修: ビタミン

- K—医学・生物学領域における新展開—, メディカルジャーナル社, 82 (1994)
- 4) 細谷憲政監修: ヒューマン・ニュートリション—基礎・食事・臨床—, 医歯薬出版, 245 (2004)
  - 5) P.A. Price, M.R. Urist and Y. Otawara: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117, 765 (1983)
  - 6) P.A. Price and M.K. Williamson: *J. Biol. Chem.*, 260, 14971 (1985)
  - 7) J. Glowacki, C. Rey and M.J. Glimcher: *J. Cell. Biochem.*, 45, 292 (1991)
  - 8) Y. Otawara, N. Hosoya, S. Moriuchi, H. Kasai and T. Okuyama: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 26, 209 (1980)
  - 9) P.A. Price and S.A. Baukol: *J. Biol. Chem.*, 255, 11660 (1980)
  - 10) D.V. Shah, J.K. Tews, A.E. Harper and J.W. Suttie: *Biochim. Biophys. Acta.*, 539, 209 (1978)
  - 11) 白根由美子, 中村章一郎, 平石攻治, 黒川一男: 臨床科学, 12, 297 (1983)
  - 12) L. Pecci and D. Cavallini: *Anal. Biochem.*, 118, 70 (1981)
  - 13) C.M. Gundberg, J.B. Lian and P.M. Gallop: *Anal. Biochem.*, 92, 219 (1979)
  - 14) M. Kuwada and K. Katayama: *Anal. Biochem.*, 117, 259 (1981)
  - 15) M. Kuwada and K. Katayama: *Anal. Biochem.*, 131, 173 (1983)
  - 16) M. Kuwada and K. Katayama: *J. Chromatogr.*, 308, 398 (1984)
  - 17) S. Matsuura, S. Yamamoto and M. Makita: *Anal. Biochem.*, 114, 371 (1981)
  - 18) D.W. Hill, F.H. Walters, T.D. Wilson and J.D. Stuart: *Anal. Chem.*, 51, 1338 (1978)
  - 19) P.V. Hauschka, J.B. Lian and P.M. Gallop: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 72, 3925 (1975)