

Application News

No. C192A

LC/MS

LC/MS/MS による腸内細菌が産生するキラルアミノ酸の一斉分析

腸内細菌によって産生される代謝物の一部は、腸管内腔から絶えず吸収されて体中に運ばれます。近年では、腸内細菌叢が宿主の健康維持や増進に寄与していることが明らかになり、腸内細菌叢、代謝産物、健康と病気の関係に注目が集まっています。そのため、腸内細菌叢が産生する代謝物を分析することは極めて重要です。

D-アミノ酸は低分子量代謝物の一つで、L-アミノ酸とは生理機能が異なります。アミノ酸には光学異性体 (D 体・L 体) が存在し、長く生物界においては L 体のみが関与すると考えられてきましたが、近年では、D-アミノ酸が哺乳類の体内に存在することがわかり、それらの機能が注目されつつあります。例えば、D-セリンについては、統合失調症や筋萎縮性側索硬化症との関係が示唆されています。

ここでは、LC/MS/MS を使用して、マウス結腸内容物および血漿中のキラルアミノ酸を網羅的に分析し、腸内細菌叢が産生する D-アミノ酸を調査した事例をご紹介します。

A. Kunisawa, T. Hattori

試料の前処理

分析には、無菌マウス (GF)、通常菌叢定着マウス (Ex-GF) からそれぞれ採取した結腸内容物および血漿を用いました。前処理プロトコルを図 1 に示しました。

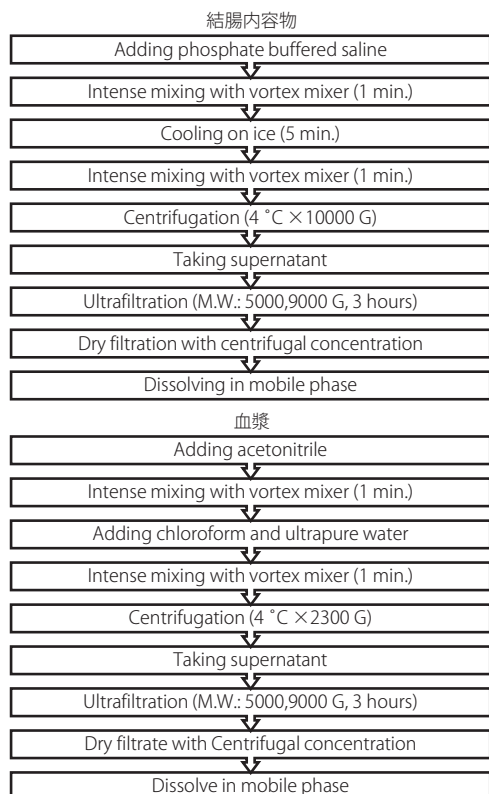


図 1 マウス結腸内容物および血漿の前処理プロトコル

分析条件

表 1 に分析条件を示します。本分析には、図 2 に示す「LC/MS/MS メソッドパッケージ DL アミノ酸」および LCMS™-8060 を用いました。従来のキラルアミノ酸分析では、アミノ酸の誘導体化や長時間分析が必要とされていました。本メソッドパッケージを用いることで、各キラルアミノ酸の誘導体化を必要とせず、短時間で分析できるため、分析業務を効率よく進めることが可能です。詳細はアプリケーションニュース No.C149、156 をご参照下さい。

表 1 分析条件

UHPLC (Nexera™ X2 system)	
Column	: CROWNPAK® CR-I (+) / CR-I (-) (3 mm × 150 mm, 5 μm, DAICEL corp.)
Mobile phase	: acetonitrile/ethanol/water/trifluoroacetic acid = 80/15/5/0.5
Flow rate	: 0.6 mL/min
Column temp.	: 25 °C
Injection volume	: 1 μL

MS (LCMS™-8060)	
Ionization	: ESI positive
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 15.0 L/min
Heating gas flow	: 5.0 L/min
Interface temp.	: 250 °C
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 300 °C



図 2 LC/MS/MS メソッドパッケージ DL アミノ酸 および Nexera™ X2+LCMS™-8060 システム

■ 結果

分析により得られた MRM クロマトグラムのうち、代表的な結果を図3に示しました。図3より、本分析条件により D,L-アミノ酸が充分に分離していること、また菌を有する Ex-GF マウスの結腸内容物では検出されている D-セリンおよび D-アラニンが、菌を有さない GF マウスでは検出されていないことがわかります。

次に、GF マウスおよび Ex-GF マウスの結腸内容物、血漿の分析結果を図4に示しました。ここでは、各試料中に含まれる D,L-アミノ酸の分析結果を比較するために、島津マルチオミックス解析パッケージを用いて各アミノ酸の定量値をグラフ化しました。結腸内容物の分析結果から、GF マウスおよび Ex-GF マウスからそれぞれ7種類、14種類の D-アミノ酸が検出されました。その中でも、12種類の D-アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、アロイソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トリプトファン）の濃度は、Ex-GF マウスにおいて有意に高いことから、これらの D-アミノ酸は腸内細菌叢によって産生されていることがわかりました。また、血漿中では、GF マウスでは3種類、Ex-GF マウスでは6種類の D-アミノ酸が検出されました。さらに、Ex-GF マウスにおける結腸内容物中および血漿中の D-アラニン濃度はどちらも GF マウス中の濃度よりも有意に高かったことから、腸内細菌叢によって産生された D-アラニンが血中に移行したことが示唆されました。

■ まとめ

このように、誘導体化不要かつ網羅的分析が可能な LC/MS/MS および「LC/MS/MS メソッドパッケージ DL アミノ酸」を用いることで、生体サンプル中の D,L-アミノ酸を迅速かつ高感度に定量できることが示唆されました。したがって本手法は今後、D-アミノ酸の生理機能解明や疾患予防に関する研究への展開が期待されます。

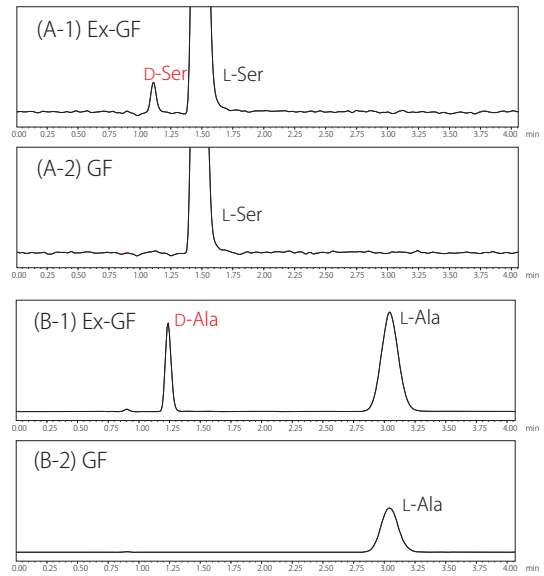


図3 結腸内容物の分析から得られた MRM クロマトグラム
(A-1) : Ex-GF 結腸内容物中 D,L-セリン
(A-2) : GF 結腸内容物中 D,L-セリン
(B-1) : Ex-GF 結腸内容物中 D,L-アラニン
(B-2) : GF 結腸内容物中 D,L-アラニン

<参考文献>

M. Matsumoto, A. Kunisawa, T. Hattori, S. Kawana, Y. Kitada, H. Tamada, S. Kawano, Y. Hayakawa, J. Iida, E. Fukusaki, Scientific Reports 8, 17915 (2018).
Y. Nakano, Y. Konya, M. Taniguchi, E. Fukusaki, J. Biosci. Bioeng. 123, 134-138 (2017).

本アプリケーションにおける作成には、大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎教授および協同乳業株式会社 松本光晴主幹研究員より多大なご協力を賜りました。



図4 結腸内容物および血漿中の D,L-アミノ酸濃度 (赤 : GF 黄 : Ex-GF)

LabSolutions、Nexera、および LCMS は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
CROWNPAK は、株式会社ダイセルの登録商標です。
なお、本文中には TM、®マークを明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行 : 2019年3月
A 改訂版発行 : 2019年6月

島津コールセンター ☎ 0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。