

微量D-アミノ酸定量のための高感度分析法の開発

中野 洋介、福崎 英一郎
大阪大学大学院工学研究科生物工学専攻



Food

■ 要旨

アミノ酸の立体構造を考えたとき、それらには鏡像異性体が存在し、それぞれL-アミノ酸（L-体）とD-アミノ酸（D-体）に区別されます。天然に存在するアミノ酸のほとんどがL-体であり、これまでD-体の機能についてはあまり注目されてきませんでした。しかしながら、近年、一部の食品、特に微生物が関与する醗酵食品において、D-アミノ酸が含まれていることが示唆され始め、その食品機能について注目が集まっています。そのような背景の中、筆者らはメタボロミクスで培った分析技術を応用して、高感度三連四重極質量分析計を用いて新規D-アミノ酸分析法を開発しました。本稿では、その手法を解説するとともに、醗酵食品分析への応用例についてご紹介します。

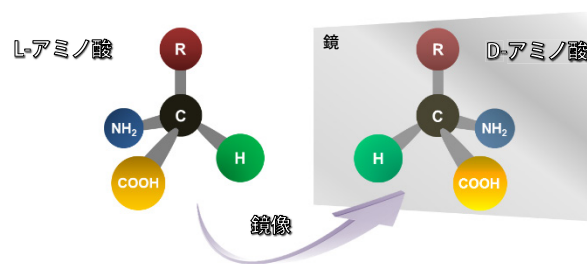


図1 アミノ酸の鏡像異性体
Rは側鎖を表します

1. D-アミノ酸研究の現状

20種類のタンパク質構成アミノ酸のうち、glycineを除く全てのアミノ酸は、4つの異なる官能基または原子が同一の炭素に結合するキラル中心を1つあるいは2つ有しており、その各々に立体異性体が存在します。それら立体配置を区別する際、アミノ酸に関しては、慣例的にD/L表記法が頻用されます。そしてそれぞれのアミノ酸のD-体とL-体は、原子の配置が互いに重ね合わせられない鏡像のエナンチオマー（鏡像異性体、対掌体）の関係にあります（図1）。

自然界においてはL-体が圧倒的に多く存在しており、地球上のすべての生命体がL-体をベースとして構成されていると長年考えられてきましたが、20世紀中頃に細菌の細胞壁のペプチドグリカン層にD-alanineとD-glutamic acidが含

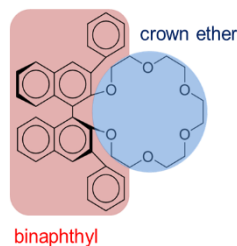
まれていることが報告される¹⁾と、自然界にはL-体だけではなくD-体も同様に存在するのではないかという認識が広まりました。近年では複数の疾患との関連性が議論されており、D-serineはアルツハイマー病や統合失調症、ALS（amyotrophic lateral sclerosis、筋萎縮性側索硬化症）といった神経疾患の病態生理に影響を及ぼすと考えられています^{2),3)}。また、D-serineと腎機能障害との密接な関連も報告されており、腎疾患の予後予測や新規バイオマーカーとしての使用も期待されています^{4),5)}。

上で示したように、D-アミノ酸に関する研究は、生理学的な観点で医学分野において大いに発展した経緯がありますが、近年では食品研究分野でも幅広く研究が展開されています。野菜や果物といった農作物^{6),7)}や海産物⁸⁾、そして醗酵食品中にD-アミノ酸が存在することが過去に報告されています。特に醗酵食品に関する報告においては、ワイン、ビール、日本酒、ヨーグルト、チーズ、酢、醤油、および味醂など対象は多岐に亘り、醗酵に関わる微生物のはたらきや熟成過程における生化学的変化が種々のD-アミノ酸生成の一因であると理解されています^{9)~11)}。食品の担う機能は、第一次機能としての栄養機能、第二次機能としての嗜好性機能、そして第三次機能としての健康性機能に大別されますが、食品含有成分としてのD-アミノ酸の機能は、そのうちの第二次機能、とりわけ個々が示す味質、すなわち呈味性に関連した性質がしばしば取り上げられます。L-glutamic acid monosodiumの旨味調味料としての使用に代表されるように、アミノ酸は食品の製造や調理過程における呈味改良剤として非常に大きな役割を果たす一方で、その呈味および閾値はL-体とD-体で異なります¹²⁾。これまで、アミノ酸溶液の官能評価や味覚受容体の解析を通じて、タンパク質構成アミノ酸の殆どのL-体は苦味を呈しますが、D-体は甘味を有するものが多く存在することが明らかになっています^{13),14)}。食品添加物として使用されるのは専らL-体であるため、D-体を新規性のある呈味性物質として一部利用しようとする動きもありますが、我が国では、厚生労働省の規制によって alanine、threonine、methionine、tryptophanのみD-体の使用が許可されており、さらに各々はラセミ体としてのみ使用可能、すなわちD-体とL-体を等量で使用するのみでしか食品添加物として使用出来ないという制限も相まって、D-アミノ酸の特殊な呈味を応用した独創的な食品開発を活発には行えない現状があります。これまで述べてきた通り、アミノ酸のD-体は生命現象の様々な局面においてL-体に無いユニークな生物学的機能を示すため、基礎・応用両面で総合的な研究が展開されてきました。医療や食品科学を初めとする諸分野における新たな知見の獲得は、近年の分析技術の目覚ましい進歩に依るものが大きいですが、未だ発展の途にあります。定量的または定性的な性能面において様々な改善の余地があり、より一層の技術開発の進展が望まれています。

2. アミノ酸の光学分割技術

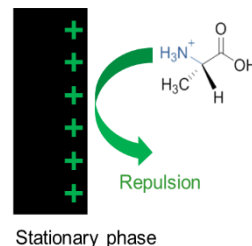
近年、当該研究室で新規D-アミノ酸分析法を開発しました¹⁵⁾。この手法におけるキラルアミノ酸の分離と検出にはHPLCと飛行時間型質量分析計 (TOFMS) をそれぞれ使用します。この手法の分離部においては、キラル固定相としてバイナフチル骨格をもつクラウンエーテルを有するカラムCROWNPAK® CR-1(+)¹⁶⁾を採用しています。当該手法のD, L-アミノ酸のキラル分離の原理に関しては、未だ詳細な説明が待たれる段階ですが、以下のような分離メカニズムが推測されます (図2)。ターゲットアミノ酸が有するアミノ基は、LCに使用される極低pHを示す移動相によって、プロトン化されます。このプロトン化アミノ基と固定相中のクラウンエーテルとの間に静電引力がはたらき、アミノ酸の保持が発生します。また、同時にこのクラウンエーテルには非常に高い構造のバイナフチルが結合しており、疎水保持が達成されると共に、D, L-アミノ酸で異なる立体障害が生じます。さらに、プロトン化したアミノ酸のアミノ基と固定相の充填剤粒子の細孔部における静電反発も分離に影響を及ぼしていると考えられます。これらキラルセクターと固定相の寄与によって、非誘導体化D, L-アミノ酸の分離が可能になり、その選択性は逆相分配、親水性相互作用、静電排除の混合モードにより得られていると予想されます¹⁶⁾。

• Chiral selector の寄与



binaphthylによる疎水保持や立体障害
crown etherによる静電引力

• Stationary phase の寄与



充填剤粒子の細孔の有意部分による静電反発

図2 Konya et al.¹⁶⁾が開発したD-アミノ酸分析法の推定分離メカニズム

このHPLCとTOFMSを使用したキラルアミノ酸分析法 (LC-TOFMS法) の特徴は3つ挙げられます。まず1つ目は、当該手法はアミノ酸の誘導体化を必要としない点です。誘導体化処理で懸念される望ましくない副反応をはじめとする諸問題を回避出来ます。2つ目は、分析のハイスループット性です。当該手法は第二級アミンであるprolineを除く全てのタンパク質構成アミノ酸を10分以内に完全分離することが出来ます。キラルアミノ酸の分析に数時間以上要求する手法の報告が多々ある中で、当該手法のスループット性は分離面でのエポックメイキングとも言うべき成果であると言えます。そして3つ目は、高質量分解能の質量分析計を使用する点です。TOFMSを用いることで、精密質量分析が可能になり、非常に近い分子量をもつターゲットアミノ酸の高い定性能力をもって区別することが出来ます。LC-TOFMS法のこれらの特徴は、いずれも特筆すべきであり、従来のD-アミノ酸分析法と一線を画すものと位置づけられますが、分析の検出面、特に感度やダイナミックレンジの向上に着目するとTOFMSには原理上の障壁があります。

このような背景の中、筆者らは島津製作所の高感度四重極質量分析計LCMS™-8060を用いた新規D-アミノ酸分析法の開発を行いました。四重極質量分析計におけるイオン分離部では、4本の金属ロッドに高周波電圧と直流電圧の両方を重ね合わせ印加することで、特定の質量範囲のイオンを通過させます。四重極質量分析計の測定モードは、ScanモードとSIMモードに大別され、ターゲット化合物を分析する場合には、特定の質量のみを検出する後者のモードが用いられます。使用するMS/MSは質量分離部において四重極を2つ、また四重極間に衝突室を配する構造を有しています。MS/MS分析において頻用されるMRMモードは、2つの四重極のどちらにおいてもSIMモードを用いることで、検出するイオンに対して高い選択性を得ると同時に、夾雑イオンに由来するバックグラウンドノイズの影響を軽減出来るため、相対的に感度良くシグナルを検出することが可能です。また先述の通り、MS/MSは広いダイナミックレンジを備えているため、濃度差、存在比率が大きく異なる対象化合物の網羅的な測定に好適です。

本研究では、分析技術を構築するにあたり、まず、MS/MSのパラメーターをファインチューニングすることにより、微量のD-アミノ酸を高感度に分析する手法の開発を行いました。その後、開発した手法と既存の手法の性能を比較し、評価しました。以下にその検討結果について述べます。

3. 微量D-アミノ酸の定量分析に資する高感度分析法の開発

LC-MS/MSを用いて微量D-アミノ酸を高感度に定量可能な分析法の開発にあたり、1.「分析法の開発」、2.「開発した分析法の評価」、3.「実サンプル分析への応用」の三つの項目に分割し、段階的に検討を行いました。以下に各項目の概要を述べます。

1. 「分析法の開発」

キラルアミノ酸の分離に関しては、既にKonya et al.が報告したLC-TOFMSを用いたD-アミノ酸分析法¹⁵⁾の応用を試みました。検出に関しては、最大感度の分析を達成するために、感度に影響するパラメーターを1つずつ詳細に検討しました。本研究で使用したMS/MSの装置構成の概略図は以下です(図3)。LCで分離された化合物は、まず初めにイオン源でイオン化(プロトン付加反応)されその後、レンズ系で収束され、質量分離部に入り、最終的に検出器に到達します。まず初めの検討として、2つの四重極を通過するイオンの m/z と電圧パラメーターの決定、すなわちMRMトランジションの最適化を行いました。次に、イオン源のプロープの位置の調整を行った後、ガス流量のパラメーターの最適化を行いました。イオン源のインターフェース部分では数種類のガスがイオン化の促進のために用いられています。加えて同インターフェース部分の電圧および熱パラメーターの最適化を行いました。

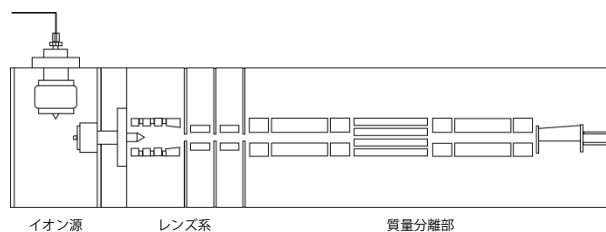


図3 三連四重極型質量分析計の装置構成概略図

2. 「開発した分析法の評価」

アミノ酸標準品の希釈系列を用いて測定範囲、直線性、併行精度、検出限界および定量下限を評価しました。直線性の範囲は、0.005から100 nmol/mLの濃度範囲の標準品溶液の各濃度の面積値を元に直線回帰したときの相関係数、再現性はN = 3の繰り返し数での検出ピーク面積値の相対標準偏差でそれぞれ評価しました。また、検出限界は、質量分析計のシグナルノイズ比から求めました。

3. 「実サンプル分析への応用」

本過程では、開発した分析法が標準品溶液に対してのみではなく、夾雑物質が含まれている実サンプル分析に実際に応用出来るかどうかを検証しました。実サンプルとしてはD-アミノ酸検出の報告が過去にある黒酢を対象としました。

また、以上の1から3の段階を経て確立した手法と、既存の手法であるLC-TOFMSを用いたD-アミノ酸分析法で同じサンプルを分析して得られた結果を比較し、新規分析手法の性能を評価しました。

3-1 分析法の開発

LC-MS/MSの高感度D-アミノ酸分析法の開発にあたり、まずターゲットアミノ酸のMRMトランジションの最適化を行った後、キラルアミノ酸分離条件の確認を行いました。LCの分離条件は既報のLC-TOFMS法¹⁵⁾を基に検討しました。先に詳しく述べたように、本手法はバイナフチル骨格にクラウンエーテルが結合したキラルセクターを有するカラム(CROWNPAK CR-I(+))を使用しており、固定相のクラウンエーテルとターゲットアミノ酸のアミノ基との相互作用

とバイナフチル骨格がもたらす立体障害がD, L-アミノ酸の光学分割に大きな影響を及ぼしているものと考えられます(図4)。本手法においても、非常に高い分離能でほぼ全てのターゲットD, L-アミノ酸の光学分割を達成しました(図4)。しかしながら、LC-TOFMS法とは異なり、本手法ではMS/MSがL-glutamineとD-lysineを同一化合物として認識しました。これは、両者が近い保持時間で溶出し、また同一のMRMトランジションを有することに起因します。TOFMSは、化合物の精密質量でデータを取得出来るため、LCでの分離が困難でもMSで分離が可能な場合があります。使用したMS/MSの質量分解能では、それぞれの質量の差(モノアイソトピック質量でglutamineが146.069、lysineが146.106)を識別することが出来ません。この問題を解決するため、CROWNPAK CR-I(+)と相補的な構造をもつカラム、CROWNPAK CR-I(-)を検討しました。CROWNPAK CR-I(+)とCROWNPAK CR-I(-)内のバイナフチルは軸不斉の関係(CR-I(+): (S)-18-crown-6-ether、CR-I(-): (R)-18-crown-6-ether)にあります(図5)。詳細な知見は待たれる状況ですが、2つのカラムによるD, L-アミノ酸の分離ではそれらの溶出の順序が逆転します。すなわち、本手法では、CR-I(+)を用いた場合に、各々のD-アミノ酸が先に溶出、その後L-アミノ酸が溶出しますが、CR-I(-)を用いるとL-アミノ酸が先に溶出します。以上のことを踏まえ、CR-I(+)に加え、CR-I(-)を利用することで、共溶出していたL-glutamineとD-lysineの単独ピークとしてのそれぞれの検出が可能になりました(図6)。また、同様に共溶出していたD-isoleucineとD-allo-isoleucineもそれぞれ単一でピーク認識可能になりました。加えて、データ取得の際に、想定される保持時間の前後0.75分だけをモニターすることで、1分析に要するMRMトランジション取得の回数を減らし、より高い再現性で得られるように設定しました。

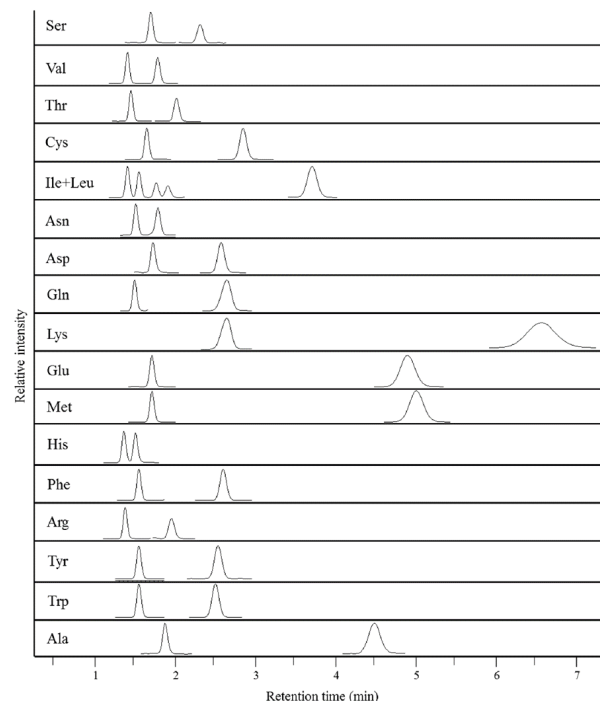


図4 18種類のタンパク質構成アミノ酸のクロマトグラム

用いたDL-アミノ酸標準溶液は1 nmol/mLで全ての化合物は8分以内に溶出しました。CROWNPAK CR-I(+)を用いた分析では、全てのアミノ酸においてD-体、L-体の溶出順を示した。isoleucineとleucineに関しては、D-isoleucine + D-allo-isoleucine (共溶出)、D-leucine、L-allo-isoleucine、L-isoleucine、L-leucineの順に溶出しました。

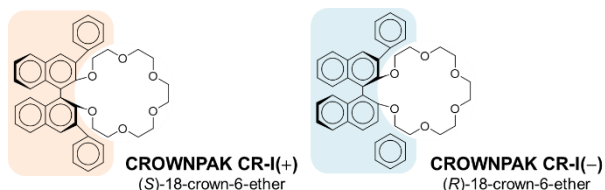


図5 CROWNPAK CR-I(+)およびCR-I(-)におけるキラルセクターの構造

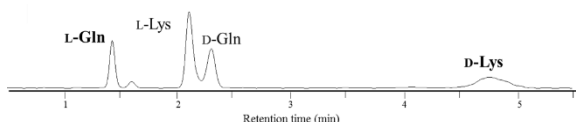


図6 CROWNPAK CR-I(-)を用いて得られたglutamineとlysineの抽出イオンクロマトグラム

続いて、イオン源のエレクトロスプレープローブの位置の調整を行いました。プローブの位置は、ターゲット化合物のイオン化の際の移動相の脱溶媒、イオン化効率に大きく依存するため、感度の向上に影響すると考えられ、近年ではイオンソースの位置パラメーターと感度を子細に調査した報告もされています¹⁷⁾。当該手法では、プローブをMSの導入部に対してデフォルトの位置より離すことによって、飛躍的に感度が上昇しました。特にglycineやalanineといった比較的低分子のアミノ酸においてその傾向が見られました。その後、MSの最適化の最後の検討として、インターフェースのガスパラメーター（nebulizer gas, heating gas, およびdrying gas）、熱パラメーター（desolvation line temperature, heat block temperature）、そしてinterface voltageのファインチューニングを行いました。島津製作所のLCMS-8060はこのようなMSパラメーターの子細な検討を行うことが可能で、ユーザーインターフェースも扱いやすいところは大きな特徴であると言えます。

3-2 開発した分析法の評価

最適化されたLC-MS/MSを用いたキラルアミノ酸分析法（LC-MS/MS法）の性能を測定範囲、直線性、併行精度、検出限界、および定量下限を調べることで評価しました（表1）。評価に際しては、アミノ酸標準溶液の希釈系列（0.005、0.01、0.05、0.5、1、5、50、および100 nmol/mL）を用い、分析で得られた各アミノ酸の面積値のデータはIS（内部標準物質）のピーク面積値で割ることにより、分析時に生じ得るインジェクション誤差などを補正しました。本研究では、各バリデーション項目において日米EU医薬品規制調和国際会議（ICH）が定める分析法開発におけるバリデーションガイドラインを初めとする諸基準に基づいた評価を行いました。測定範囲は両端の分析値の真度と精度を考慮した上で決定し、D-methionine、D-aspartic acid、D-glutamine、D-glutamic acid に対して最大の直線範囲（0.005–100 nmol/mL）を取り、全てのターゲットアミノ酸は各々の測定範囲において相関係数0.99以上と高い値を示しました。これらの結果は、LC-MS/MS法が広いダイナミックレンジでD-アミノ酸を定量出来ることを示しました。

併行精度はアミノ酸標準溶液を連続で3回分析して得られた各ピーク的面積値の相対標準偏差（RSD）で評価しました。D-alanineを除く全てのターゲットアミノ酸は0.05 nmol/mLにおいて平均8.1%のRSDを示し、D-alanineに関しては、0.5 nmol/mLで15.9%のRSDを示しました。全てのピーク面積値のRSDが20%以下の値を示し、LC-MS/MS法が高い再現性を保つことが示されました。検出限界および定量下限は、検出されるターゲット化合物のピーク（シグナル）がノイズに対して3倍以上および10倍以上の強度を示す濃度の値でそれぞれ決定しました。ノイズは、ターゲット化合物の検出前後区間の測定点の信号の標準偏差から算出しました。検出限界の値は0.005 – 0.5 nmol/mLの範囲でアミノ酸によって異なる値を示しましたが、数pmolオーダーでD-アミノ酸の検出が可能であり、本手法が実サンプルを対象とした微量分析に資し得る良好な結果を示しました。

表1 構築したLC-MS/MS法の性能評価

	Range (nmol/mL)	r	RSD (%)	LOD (nmol/mL)	LOQ (nmol/mL)
D-alanine	0.5-100	0.9979	15.9	0.01	0.05
D-arginine	0.005-50	0.9997	4.7	0.005	0.005
D-asparagine	0.01-50	0.9983	0.7	0.005	0.01
D-aspartic acid	0.01-100	0.9934	18.2	0.005	0.01
D-cysteine	0.01-100	0.9982	7.1	0.005	0.005
D-glutamine	0.005-50	0.9998	10.3	0.005	0.005
D-glutamic acid	0.005-50	1.0000	7.3	0.005	0.005
D-histidine	0.005-50	0.9997	9.0	0.005	0.005
D-isoleucine	0.01-50	0.9998	5.8	0.005	0.005
D-leucine	0.01-50	0.9996	11.5	0.005	0.01
D-lysine	0.01-100	0.9994	5.8	0.005	0.01
D-methionine	0.005-100	0.9975	6.6	0.005	0.005
D-phenylalanine	0.05-50	0.9996	18.7	0.005	0.05
D-serine	0.05-100	0.9952	12.5	0.005	0.5
D-threonine	0.05-100	0.9970	11.7	0.005	0.01
D-tryptophan	0.005-50	0.9993	2.9	0.005	0.005
D-tyrosine	0.005-50	0.9987	4.3	0.005	0.05
D-valine	0.01-50	0.9999	2.1	0.005	0.01

r : 相関係数、RSD: 相対標準偏差、LOD: 検出限界、LOQ: 定量下限

3-3 実サンプル分析への応用

LC-MS/MS法のキラルアミノ酸分析に対する実用性を評価するために、本手法を食品中に含まれるD-アミノ酸の定量分析に供しました。サンプルとしては商用で入手可能な黒酢を3種類用意しました。酢中には数種類のD-アミノ酸が含まれていることが明らかになっており^{18), 19)}、乳酸菌をはじめとするいくつかの細菌が酢中のD-アミノ酸生成に大きな役割を果たしていることが報告されています¹⁰⁾。まず初めに、3種類の黒酢に対して前処理を行いました。前処理方法は、酢中のD-アミノ酸に対して、回収率やLC-MS分析への影響が十分に吟味された既報の手法を採用しました²⁰⁾。D-アミノ酸の定量に関しては、アミノ酸標準溶液の希釈系列を分析して得られた各ピークの面積値から作成した検量線を用いて行いました。なお、定量に用いた希釈系列も酢と同様に前処理を行い、抽出誤差を補正しました。また、全ての分析対象バイアルには、ISとして同濃度のDL-alanine-2,3,3-d4が含まれており、インジェクションやイオン化における誤差を考慮するために各データをD-alanine-2,3,3-d4の分析値で補正しました。CROWNPAK CR-I(+)を用いて、ターゲットD-アミノ酸の一斉分析を行い、D-lysineの検出およびD-isoleucineとD-*allo*-isoleucineのピーク同定に関してはCROWNPAK CR-I(-)を用いて行いました。

LC-MS/MS分析の結果、14種類のD-アミノ酸 (D-alanine、D-serine、D-valine、D-threonine、D-*allo*-isoleucine、D-leucine、D-asparagine、D-glutamic acid、D-methionine、D-histidine、D-phenylalanine、D-arginine、D-tyrosine、およびD-lysine) が酢中から検出、定量されました。3つの酢で検出されたD-アミノ酸の種類は傾向こそ似ていましたが、濃度は酢間で異なっていました。次に同じサンプルを24時間以内にLC-TOFMS分析に供しました。両者の分析方法の結果を比較するために、LCの分離条件をはじめとする分析条件は全て統一しました。結果として、LC-TOFMS法では13種類のD-アミノ酸 (D-alanine、D-serine、D-valine、D-threonine、D-*allo*-isoleucine、D-leucine、D-asparagine、D-glutamic acid、D-methionine、D-histidine、D-phenylalanine、D-arginine、およびD-tyrosine) が全ての酢から検出、定量されました。D-アミノ酸の定量値は、LC-MS/MS法とLC-TOFMS法で非常に近い値を示しました(図7)。この結果は、LC-MS/MS法が従来のLC-TOFMS法の代替法として、使用することが可能であることを示唆しました。更に、全ての酢におけるD-lysine、酢CにおけるD-valineはLC-TOFMS法では検出されず、LC-MS/MS法でのみ検出、定量されました。以上の結果は、LC-MS/MS法の定量面での優位性を示し、実サンプル中に含まれる微量なD-アミノ酸の定量分析法として強力な手法になり得ることを示しました。

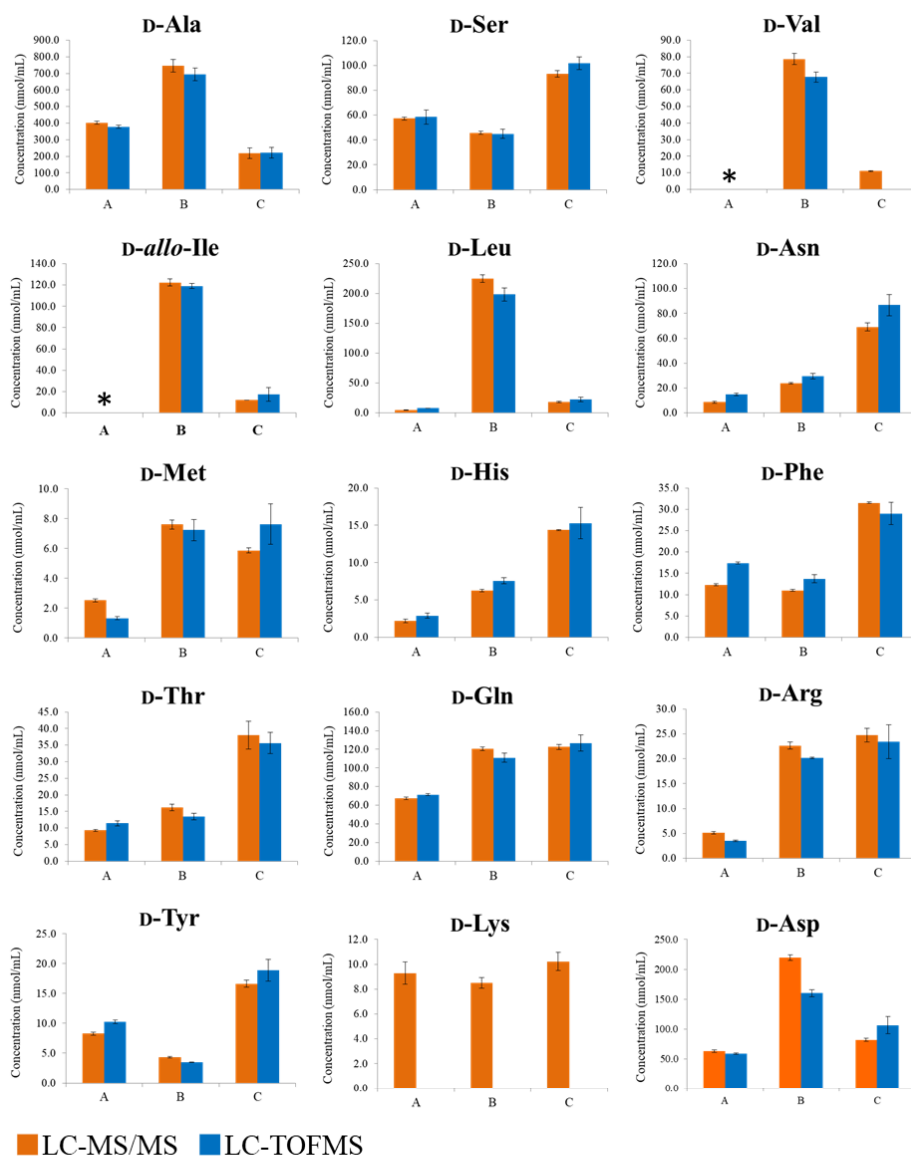


図7 LC-MS/MSおよびLC-TOFMS分析による黒酢中のD-アミノ酸の定量値

橙色の棒グラフがLC-MS/MS法で、水色の棒グラフがLC-TOFMS法で得られた黒酢A、B、Cに含まれる各々のD-アミノ酸の濃度を示します (N = 3)。図中のアスタリスク (*) は、ピーク自体は検出されたものの、定量下限以下の濃度を示したことを表します。

4. おわりに

本研究では、微量D-アミノ酸の高感度定量分析に資するLC-MS/MS分析法の開発を行いました。まず、MS/MSのMRMトランジションの最適化を行い、インターフェースのプロープ位置・温度・ガス流量・電圧などの種々のパラメーターを詳細に検討し、ターゲットアミノ酸検出の高感度化を行いました。分離に関しては、一部のアミノ酸が共溶出してしまい、単一ピークとして認識されない問題が生じましたが、従来使用していたカラムと相補的な構造を持つものを併用することで、全てのターゲットアミノ酸の分析が可能になりました。次に開発した手法を測定範囲、直線性、併行精度、検出限界、および定量下限を項目立て検証し、微量D-アミノ酸の定量分析の手法としての性能を評価しました。更に、開発した手法を実サンプル（黒酢）中に含まれるD-アミノ酸の定量分析に応用しました。従来の手法であるLC-TOFMS法と結果を比較すると、ほぼ類似したD-アミノ酸プロファイルが得られる一方で、LC-MS/MS法でのみ一部定量出来たD-アミノ酸があり、検出感度の点で大きな強みを発揮することを示しました。

LC-MS/MSを用いた微量D-アミノ酸分析に関する報告はいくつかありますが、ここに示した新規LC-MS/MS法は、誘導体化を必要とせずともキラルアミノ酸をハイスループトかつ高感度に一斉分析出来るところに大きな特色があり、短時間で多サンプルを処理できる当該分析手法は大きな強みを発揮すると言えます。

<参考文献>

- 1) Stevens, C.M., Halpern, P.E., Gigger, R.P.: Occurrence of D-amino acids in some natural materials. *J. Biol. Chem.*, 190, 705–10 (1951).
- 2) Nishikawa, T.: Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 879, 3169–3183 (2011).
- 3) Sasabe, J., Chiba, T., Yamada, M., Okamoto, K., Nishimoto, I., Matsuoka, M., Aiso, S.: D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.*, 26, 4149–59 (2007).
- 4) Sasabe, J., Suzuki, M., Miyoshi, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Ito, S., Konno, R., Mita, M., Hamase, K., Aiso, S.: Ischemic Acute Kidney Injury Perturbs Homeostasis of Serine Enantiomers in the Body Fluid in Mice: Early Detection of Renal Dysfunction Using the Ratio of Serine Enantiomers. *L. R. James, ed. PLoS One*, 9, e86504 (2014).
- 5) Kimura, T., Hamase, K., Miyoshi, Y., Yamamoto, R., Yasuda, K., Mita, M., Rakugi, H., Hayashi, T., Isaka, Y.: Chiral amino acid metabolomics for novel biomarker screening in the prognosis of chronic kidney disease. *Sci. Rep.*, 6, 26137 (2016).
- 6) Brückner, H., Westhauser, T.: Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. *Chromatographia*, 39, 419–426 (1994).
- 7) Gandolfi, I., Palla, G., Marchelli, R., Dossena, A., Puelli, S., Salvadori, C.: D-alanine in Fruit Juices: A Molecular Marker of Bacterial Activity, Heat Treatments and Shelf-life. *J. Food Sci.*, 59, 152–154 (1994).
- 8) Abe, H., Yoshikawa, N., Sarower, M.G., Okada, S.: Physiological Function and Metabolism of Free D-Alanine in Aquatic Animals. *Biol. Pharm. Bull.*, 28, 1571–1577 (2005).
- 9) Friedman, M.: Chemistry, Nutrition, and Microbiology of d-Amino Acids. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 3457–3479 (1999).
- 10) Mutaguchi, Y., Ohmori, T., Akano, H., Doi, K., Ohshima, T.: Distribution of D-amino acids in vinegars and involvement of lactic acid bacteria in the production of D-amino acids. *Springerplus*, 2, 691 (2013).
- 11) Inoue, Y., Katsumata, T., Watanabe, H., Hayase, F.: Mechanisms of d-amino acid formation during maturation of sweet rice wine (mirin). *Food Sci. Technol. Res.*, 22, 679–686 (2016).
- 12) Schiffman, S.S., Sennewald, K., Gagnon, J.: Comparison of taste qualities and thresholds of D- and L-amino acids. *Physiol. Behav.*, 27, 51–59 (1981).
- 13) Kawai, M., Sekine-Hayakawa, Y., Okiyama, A., Ninomiya, Y.: Gustatory sensation of l- and d-amino acids in humans. *Amino Acids*, 43, 2349–2358 (2012).
- 14) Bassoli, A., Borgonovo, G., Caremoli, F., Mancuso, G.: The taste of D- and L-amino acids: In vitro binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3) receptors. *Food Chem.*, 150, 27–33 (2014).
- 15) Konya, Y., Bamba, T., Fukusaki, E.: Extra-facile chiral separation of amino acid enantiomers by LC-TOFMS analysis. *J. Biosci. Bioeng.*, 121, 349–353 (2016).
- 16) Konya, Y., Taniguchi, M., Furuno, M., Nakano, Y., Tanaka, N., Fukusaki, E.: Mechanistic study on the high-selectivity enantioseparation of amino acids using a chiral crown ether-bonded stationary phase and acidic, highly organic mobile phase by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1578, 35–44 (2018).
- 17) Janusson, E., Hesketh, A. V., Bamford, K.L., Hatlelid, K., Higgins, R., McIndoe, J.S.: Spatial effects on electrospray ionization response. *Int. J. Mass Spectrom.*, 388, 1–8 (2015).
- 18) Tani, Y., Itoyama, Y., Nishi, K., Wada, C., Shoda, Y., Satomura, T., Sakuraba, H., Ohshima, T., Hayashi, Y., Yabutani, T., Motonaka, J.: An amperometric D-amino acid biosensor prepared with a thermostable D-proline dehydrogenase and a carbon nanotube-ionic liquid gel. *Anal. Sci.*, 25, 919–923 (2009).
- 19) Miyoshi, Y., Nagano, M., Ishigo, S., Ito, Y., Hashiguchi, K., Hishida, N., Mita, M., Lindner, W., Hamase, K.: Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 966, 187–92 (2014).
- 20) Konya, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E.: Novel high-throughput and widely-targeted liquid chromatography–time of flight mass spectrometry method for d-amino acids in foods. *J. Biosci. Bioeng.*, 123, 126–133 (2017).

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日本およびその他の国における商標または登録商標です。

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

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していません。
本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。
掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。

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。
改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、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/>