

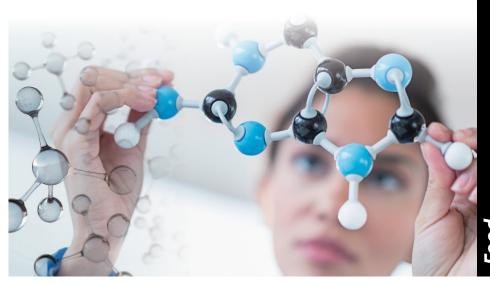
Application Note

No. 67

食品

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



ood

■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。

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

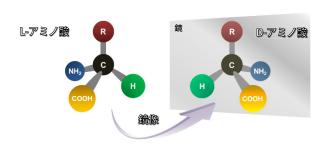


図1 アミノ酸の鏡像異性体 Rは側鎖を表します

まれていることが報告される 11 と、自然界には 11 と、住然界には 11 とではなく 11 との日本も同様に存在するのではないかという認識が広がりました。近年では複数の疾患との関連性が議論されており、 11 0、D-serine は 11 1、 11 1、 11 2 は、 11 3 は、 11 3 は、 11 4 は、 11 4 は、 11 5 は、 11 6 は、 11 7 は、 11 7 は、 11 8 は、 11 9 は、自然のでは、 11 9 は、 11

.

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-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 量で使用する場合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

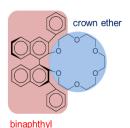
たは定性的な性能面において様々な改善の余地があり、よ

2.アミノ酸の光学分割技術

り一層の技術開発の進展が望まれています。

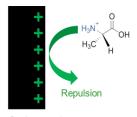
近年、当該研究室で新規D-アミノ酸分析法を開発しまし た15)。この手法におけるキラルアミノ酸の分離と検出には HPLCと飛行時間型質量分析計(TOFMS)をそれぞれ使用し ます。この手法の分離部においては、キラル固定相として バイナフチル骨格をもつクラウンエーテルを有するカラム CROWNPAK® CR-I(+)を採用しています。当該手法のD, L-ア ミノ酸のキラル分離の原理に関しては、未だ詳細な解明が 待たれる段階ですが、以下のような分離メカニズムが推測 されます(図2)。ターゲットアミノ酸が有するアミノ基は、 LCに使用される極低pHを示す移動相によって、プロトン化 されます。このプロ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 に嵩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。これらキラルセレクターと 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 etherlによる静電引力

Stationary phase の寄与



Stationary phase

充填剤粒子の細孔の有意の 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、非常に近しい分子量をもつターゲットアミノ 酸を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 ブ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。

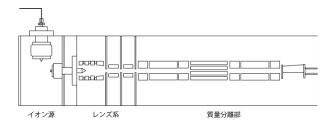


図3 三連四重極型質量分析計の装置構成概略図

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レ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、両者が近し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-6ether) 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Dallo-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。

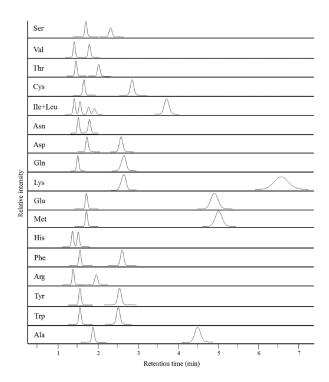


図4 18種類のタンパク質構成アミノ酸のクロマトグラム

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(-)におけるキラルセレクターの構造

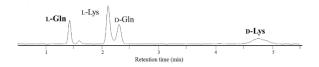


図 6 CROWNPAK CR-I(-)を用いて得られたglutamineとlysineの 抽出イオンクロマトグラム

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手法 (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 た各ピークの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-aspargine	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-tyropsine	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-2,3,3,3-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-2,3,3,3d4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 Dleucine, 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、Dthreonine、D-allo-isoleucine、D-leucine、D-asparagine、 D-glutamic acid , D-methionine , D-histidine , Dphenylalanine、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法で非常に近しい値を示しました (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Dvaline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。

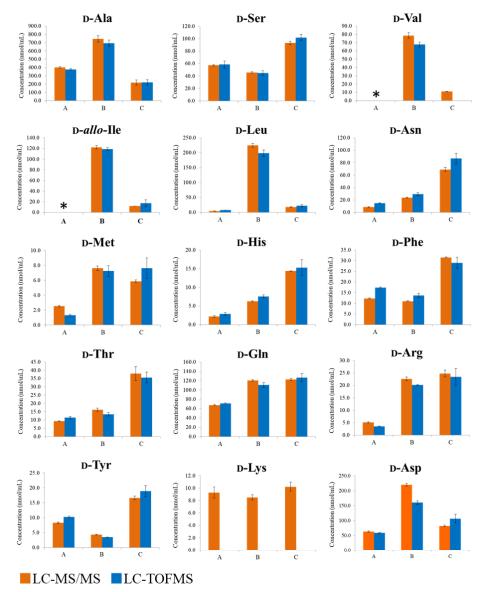


図7 LC-MS/MSおよびLC-TOFMS分析による黒酢中のD-アミノ酸の定量値

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 プローブ位置・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ット 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>

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Brückner, H., Westhauser, T.: Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. Chromatographia, 39, 419-426 (1994).
- 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).
- 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).
- 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 I- 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,
- 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/timeof-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 nanotubeionic 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がが計測事業部がプローバルアプリケーション開発センター