



Title	LC-MS/MSを用いたキラルアミノ酸およびその関連代謝物の高感度分析プラットフォームの構築
Author(s)	中野, 洋介
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72352
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

LC-MS/MS を用いたキラルアミノ酸および
その関連代謝物の高感度分析プラットフォームの構築

中野 洋介

2019年1月

大阪大学大学院工学研究科
生命先端工学専攻 生物工学コース

目次

略号.....	1
第一章 緒論.....	2
1.1 緒言	2
1.2. アミノ酸の存在, 機能, 分類, 構造	3
1.3. D-アミノ酸研究の歴史と現状.....	6
1.4. アミノ酸分析の歴史と光学分割技術	9
1.5. 本研究の背景と目的	13
第二章 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.....	19
2.1. 緒言	19
2.2. 実験材料および実験方法	21
2.2.1. 試薬	21
2.2.2. アミノ酸標準溶液の調製	21
2.2.3. 実サンプルの前処理	22
2.2.4. LC-MS 分析	22
2.3. 結果と考察	24
2.3.1. LC-MS/MS を用いたキラルアミノ酸分析法の開発	24
2.3.2. 開発した分析法の評価	29
2.3.3 実サンプルへの応用と既存法との比較	32
2.4. 小括	35
第三章 キラルアミンおよびその関連代謝物の網羅的分析系の構築	36
3.1. 緒言	36
3.2. 実験材料および実験方法	38
3.2.1. 試薬	38
3.2.2. 標準溶液の調製	39

3.2.3. サンプルの前処理	39
3.2.4. LC-MS 分析	39
3.2.5. 統計解析	40
3.3. 結果と考察	41
3.3.1. LC-MS/MS を用いた網羅的分析システムの構築	41
3.3.2. 構築した分析法の評価	56
3.3.3. 実サンプルへの応用	62
3.4. 小括	71
第四章 総括と展望.....	72
4.1. 本研究の総括	72
4.2. 今後の展望	73
引用文献.....	74
発表論文.....	84
書籍.....	85
学会発表.....	86
謝辞.....	92
付録.....	94

略号

GC : gas chromatography, ガスクロマトグラフィー

(HP) LC : (high performance) liquid chromatography, (高速) 液体クロマトグラフィー

MS : mass spectrometry あるいは mass spectrometer : 質量分析法あるいは質量分析計

TOFMS : time of flight mass spectrometer : 飛行時間型質量分析計

QqQMS : triple quadrupole mass spectrometer : 三連四重極型質量分析計

※本研究においては MS/MS は QqQMS の慣用的な表現として同義に扱う.

SIM : selected ion monitoring

MRM : multiple reaction monitoring, 多重反応モニタリング

IS : internal standard, 内部標準

RSD : relative standard deviation, 相対標準偏差

LOD : limit of detection, 検出限界

LOQ : limit of quantification, 定量下限

PCA : principal component analysis, 主成分分析

PC : principal component, 主成分

SFC : supercritical fluid chromatography, 超臨界流体クロマトグラフィー

第一章 緒論

1.1 緒言

“L'univers est un ensemble dissymétrique et je suis persuadé que la vie, telle qu'elle se manifeste à nous, est fonction de la dissymétrie de l'univers ou des conséquences qu'elle entraîne. L'univers est dissymétrique. (英訳 : The universe is an asymmetrical entity. I am inclined to believe that life as it is manifested to us must be a function of the asymmetry of the universe or of the consequence of this fact.) ”

これはフランスの科学者パスツールの言葉である。1849 年、パスツールは tartaric acid salt の結晶には非対称な 2 種類の形があり、照射する偏光に対してそれらが異なる性質を示すことを報告した。分子における「キラリティー」に関する発見は、後の立体化学の発展に大きく寄与し、その重要性は現在、自然科学の多分野で認識されている。しかし、分子のキラリティーを各々区別した上で個々の分子の性質を議論することは難しく、本研究の対象であるアミノ酸は自然界において多量に存在する「ホモキラル」分子の 1 つとして長年扱われてきた。近年ようやく、キラリティーを区別したアミノ酸の研究が展開され、それらが担う機能の違いに注目が集まり始めたが、その報告は未だ少数である。研究発展の律速要因になっているのは、分析科学における「光学分割」の難しさである。

「工」という字には、「道具を使って物を上手に作り出す」という意味がある。その点、著者は「工学」は最終目標を本質的な社会のニーズに応えることと設定した上で、理論的に体系化された方法論や技術開発を行うために成される学問であると考えている。本研究はその信条のもとで、アミノ酸の光学分割という主題に対して工学的な貢献を担い、アミノ酸のキラリティー研究をより加速、発展させ得る新規分析技術を開発することを目的に行われたものである。

1.2. アミノ酸の存在, 機能, 分類, 構造

アミノ酸は生命活動の根源に関わる基幹代謝物であり, その存在無くして生命活動は維持出来ない. アミノ酸は言わば「生命の基本物質」であり, DNA や RNA, そしてタンパク質といったセントラルドグマに関わる極めて重要な分子の前駆体であると共に, 組織や臓器の成長, 発達, 再生, およびホメオスタシスといった現象にも深く関わっている (Wu 2009). アミノ酸が担う個々の機能は, 枚挙に暇が無いが, 遺伝子発現制御, 細胞シグナリング, ホルモン分泌, 免疫応答などに関連する現象が特によく研究されている (Ravindran *et al.* 2016; Brasse-Lagnel *et al.* 2003; Pasiakos *et al.* 2012; Marc Rhoads and Wu 2009; Newsholme *et al.* 2005; Li *et al.* 2007).

アミノ酸には様々な定義や解釈があり, 一意には定まらない. 広義では, 「分子内に酸性を呈するカルボキシ基と塩基性を呈するアミノ基をもつ化合物群の総称を指す」ことが多い. また, 上記の条件にはあてはまらないが, アミノ基の代わりにイミノ基を有する *proline* や, カルボキシ基の代わりにスルホ基を有する *taurine* のような化合物もアミノ酸の一種として扱われる. 分類に関しては, 自然界に存在するアミノ酸と化学合成によって得られる非天然型アミノ酸がある. 自然界には存在するアミノ酸は, 500 種類を超える (Genchi 2017) が, タンパク質を構成するアミノ酸はその内の 20 種類である (図 1). コラーゲンやゼラチンといった特定のタンパク質にのみ見られる (4*R*)-4-hydroxy-L-proline や (5*R*)-5-hydroxy-L-lysine といった例外的なアミノ酸も一部存在するが, タンパク質生合成の際に用いられるのは前述の 20 種類のアミノ酸であり, しばしばタンパク質構成アミノ酸と呼ばれる. 一般的に, カルボキシ基に隣接した 1 番目の炭素を α 炭素と呼び, 全てのタンパク質構成アミノ酸は, カルボキシ基とアミノ基がその炭素に結合していることから, α -アミノ酸と称される側面もある.

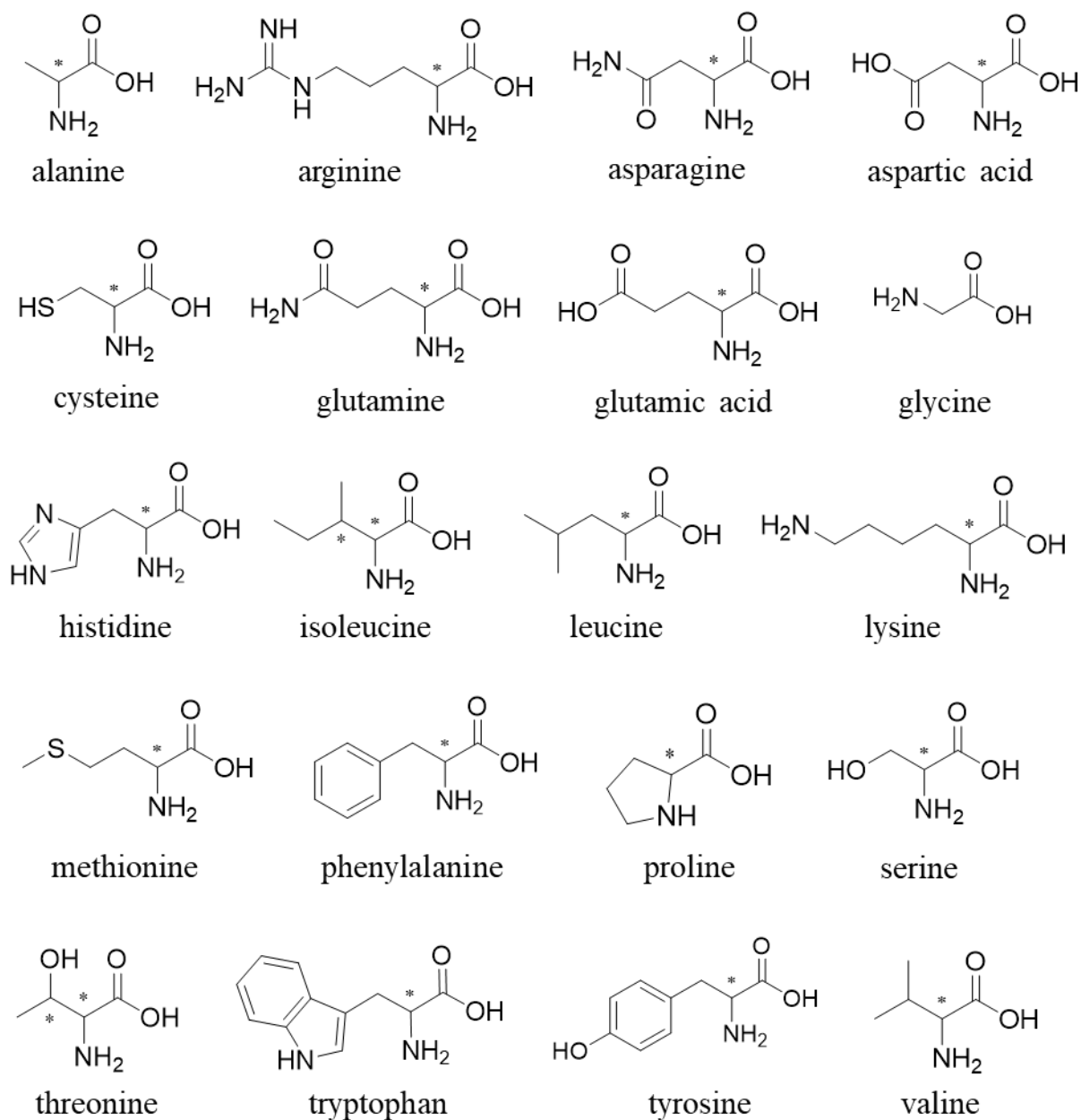
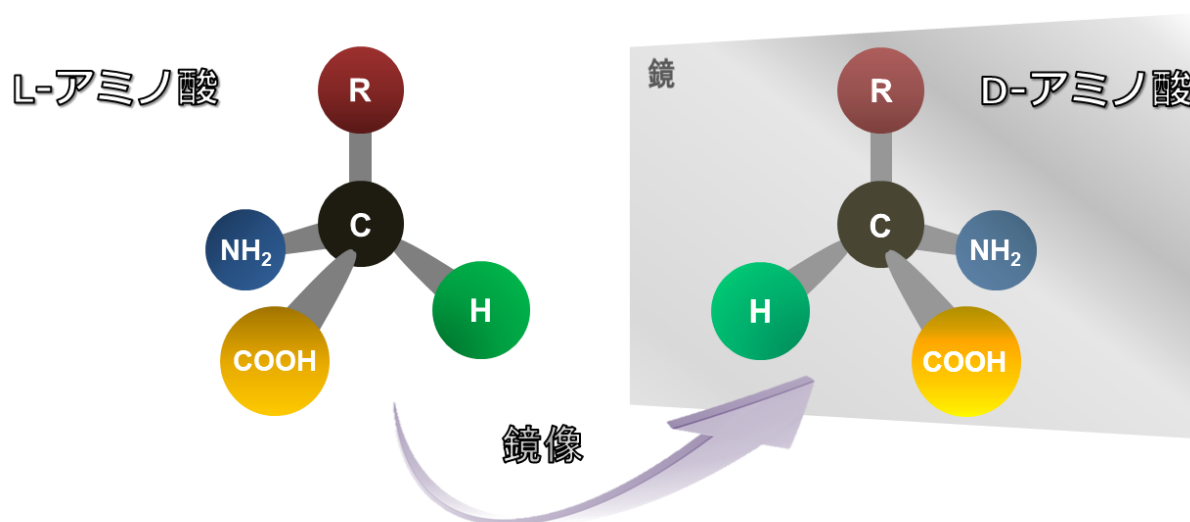


図 1. タンパク質構成アミノ酸

分子中のアスタリスクを付した炭素はキラル中心を示す。

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する. 化合物の立体配置を区別する際, *d/l* 表記法や (+)/(-) 表記法, あるいは *R/S* 表記法が用いられるが, アミノ酸に関しては, 慣例的に *D/L* 表記法が頻用される. 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) の関係にある (図 2) が, タンパク質構成アミノ酸にはキラル中心を 2 つ有する isoleucine や threonine には *allo*-体があり, ジアステレオマーが存在する. すなわち, *L*-isoleucine と *D*-isoleucine はエナンチオマーだが, *L*-isoleucine と *L*-*allo*-isoleucine および *D*-*allo*-isoleucine はジアステレオマーである.



1.3. D-アミノ酸研究の歴史と現状

前節で述べた通り、タンパク質構成アミノ酸には D-体と L-体のエナンチオマーが存在するが、自然界においては L-体が圧倒的に多く存在している。L-体がホモキラルに存在する原因については、様々な研究者が偶発的あるいは必然的事象であるという見地に立ち、実験的または理論的に実証してきた (Frank 1953; Quack 2002; Blackmond 2010) が、どれも未だ推論の域を出ておらず、決定的な根拠に基づいた確証が得られていない。「化学進化の過程において何らかの理由で L-体が選択された」と一般的に理解されるのが現状であり、今後の更なる研究の発展による解明が期待されている。

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おり、D-体はあくまで “unnatural isomers” であり “laboratory artifacts” であるという考えは、長い間遍く浸透していたが、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 (Stevens *et al.* 1951) 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がった。その後、いくつかの無脊椎動物においても数種の D-体の存在が確認される (Corrigan 1969; D’Aniello and Guiditta 1977) など、D-アミノ酸研究はその対象に広がりを見せる中で、それらが担う機能についてはいくつかの示唆は挙げられるものの、実際には不明な点が多く、十分な解明には至らなかった。20 世紀末頃になると、新しい分析技術の発展により、様々な生体サンプルから D-体を単離、同定出来るようになり、ヒトの生体内に存在する D-アミノ酸に大きな注目が集まった。ヒトの血液中の遊離 D-aspartic acid の存在が報告された (Dunlop *et al.* 1986) ことに端を発し、脳、尿、血漿、脳脊髄液、羊水といった生体サンプル中にも遊離 D-アミノ酸の存在が認められた (Fisher *et al.* 1991; Armstrong *et al.* 1993)。一方で、D-アミノ酸がもつ機能的役割の解明にも焦点が当てられ始め、複数の疾患との関連性やそれらの生理学的挙動が議論されるようになった。哺乳動物において D-serine は脳内にとりわけ多く分布し、L-glutamic acid と共に NMDA (N-methyl-D-aspartic acid) 受容体のコアゴニストとして機能する (Danysz

and Parsons 1998). この受容体の活性は大脳皮質や海馬において興奮性の神経伝達に深く関わり、記憶や学習などの脳の高次機能を制御している (Mothet *et al.* 2000; Yang *et al.* 2003) ため、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る (Nishikawa 2011; Sasabe *et al.* 2007). 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る (Sasabe *et al.* 2014; Kimura *et al.* 2016). この D-serine 同様、D-aspartic acid もその局在と機能については他のアミノ酸と比べて比較的よく調べられており、内在性の神経伝達物質あるいは数種類のホルモン産出および分泌の調節因子として重要な役割を担うこと (D'Aniello *et al.* 2011; Ota *et al.* 2012) や、水晶体のタンパク質に含まれる aspartic acid 残基が加齢に伴って異性化することでタンパク質の異常凝集を惹起し、白内障を発症させること (Garner and Spector 1978; Fujii *et al.* 2016) などが知見として得られている.

これまでいくつか例を示したように、D-アミノ酸に関する研究は、生理学的な観点でその機能の解明を目的としながら、医学分野で大いに発展した経緯があるが、近年では食品研究分野でも幅広く研究が展開されている. 野菜や果物といった農作物 (Brückner and Westhauser 1994; Gandolfi *et al.* 1994) や海産物 (Abe *et al.* 2005), 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る. 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る (Friedman 1999; Mutaguchi *et al.* 2013; Inoue *et al.* 2016). 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るが、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る.

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-体で異なる (Schiffman *et al.* 1981). 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-体は苦味を呈するが、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る (Kawai *et al.* 2012; Bassoli *et al.* 2014). 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るが、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 (指定添加物リスト番号 DL-alanine : 32, DL-tryptophan : 270, DL-threonine : 274, DL-methionine : 392) (資料 S1) 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る.

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、未だ発展の途である. 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る.

1.4. アミノ酸分析の歴史と光学分割技術

アミノ酸はその種類によって物理学的性質や分光学的性質が大きく異なる。そのため、アミノ酸の分析手法はその性質の違いを如何に利用するのか、また目的達成のためにどのような性能（簡便性、選択性、コスト、感度など）を分析に求めるのかに着目し、用途に合わせて開発されてきた経緯がある。その中でも微生物法や酵素法は、容易かつ安価であるため、実用性の高い手法として頻用されてきた。前者は、測定対象のアミノ酸に対して特異的に栄養要求性のある乳酸菌の増殖を測定するバイオアッセイ (Henderson and Snell 1948) が、後者はアミノ酸酸化酵素を中心とした高い基質選択性の酵素をアミノ酸と反応させ、その際生じた副生成物を測定する手法 (Scannone *et al.* 1964) が代表的である。

一方、簡便性やコストの面では上記の手法より劣るが、定性および定量の両方に優れ、かつ網羅的な測定を可能にするものとして現在主流のアミノ酸分析手法は、クロマトグラフィーを利用した技術である。その歴史は古く、1941 年に Martin と Synge が、分配クロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析手法 (Martin and Synge 1941) を報告したことに端を発する。シリカゲルを用いたこの手法では、羊毛由来のタンパク質加水分解物中のアミノ酸 6 種類の分析に成功したが、分析可能なアミノ酸の種類が限定されているという短所もあった。次に Martin らはペーパークロマトグラフィーを用いたアミノ酸分析手法 (Consden *et al.* 1944) を新たに報告した。この手法は数種の有機溶媒と濾紙を用いた 2 次元クロマトグラフィーであり、各次元につき最大 72 時間展開することにより、羊毛中の 22 種類のアミノ酸分析を可能にした。彼らはその後もクロマトグラフィーを用いたアミノ酸分離技術の原理実証に精力的に努め、その功績は 1952 年のノーベル化学賞の受賞をもって評価された。時同じくして、Moore と Stein はスルホン化ポリスチレン樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーを用いた分離と ninhydrin による比色定量を組み合わせたアミノ酸分析手法 (Moore and Stein 1948) を開発し、現在アミノ酸分析で頻用される「ポストカラムラベル法」の礎を築

いた。その後 Moore は Spackman らと共にアミノ酸自動分析装置の開発と実用化 (Moore *et al.* 1958; Spackman *et al.* 1958) を行った。装置の主要部はカラム，送液ポンプ，試薬槽，比色計などから構成されており，それらの連携を自動化させ従来の人為操作を排することで，アミノ酸の定性および定量操作は飛躍的に容易化した。Moore と Stein もまた Martin ら同様 1972 年にノーベル化学賞を受賞しており，アミノ酸分析の発展が科学の進歩に大きく貢献したことに疑う余地はない。1970 年代に入ると，クロマトグラフィーを用いた分析技術の高度化が急速に進んだ。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の登場による分析時間の短縮化や *o*-phthalaldehyde に代表される誘導体化蛍光試薬を用いた手法による高感度化，またプレカラムラベル法や質量分析計の導入など分析手法の選択肢が大幅に拡大した。

クロマトグラフィーを用いた分析技術の成熟は，アミノ酸の光学分割技術の開発に多大な影響を与えた。初めてキラル固定相をガスクロマトグラフィー (GC) に応用し，アミノ酸をターゲットとしたキラル分離を行った例 (Gil-Av *et al.* 1966) が当該分野の研究の嚆矢と言われている。その後，HPLC を用いたキラルリガンド交換ベースのキラル分離が報告される (Davankov and Rogozhin 1971) など，クロマトグラフィーを用いた光学分割手法は次第に発展した。現在，アミノ酸のクロマトグラフィック光学分割手法は 2 つのアプローチ，“indirect method”と“direct method”に大別される。indirect method は「アミノ酸をキラル試薬で誘導体化し，ジアステレオマー化したものを非キラルな固定相で分離する」手法である。ジアステレオマー化することで，本来殆ど等しい光学異性体間の物理学的性質を大きく変化させ，非キラルな環境下での分離を可能にする。薄層クロマトグラフィーや GC などを用いた手法のほか，HPLC を中心に数多くの応用例が報告されている (Toyo'oka *et al.* 1993; Bhushan and Brückner 2004; Bhushan and Kumar 2008; Cui *et al.* 2014)。誘導体化はターゲット化合物の分子内の官能基と試薬との化学反応を通じて行われ，その部位はアミノ基，カルボキシ基，カルボニル基，ヒドロキシ基などが挙げられる。誘導体化試薬の種類は多岐に亘るが，そ

の化学構造によってカルボン酸ベース、クロロ炭酸塩ベース、イソチオシアネートベースなどの反応試薬が存在する。この indirect method は、豊富な種類のキラル試薬が入手可能である、分析法の確立が容易である、また高い選択性を示すなどの長所がある反面、誘導体化処理の煩雑性や誘導体化物の安定性（ラセミ化の進行）あるいは夾雑物の副反応の発生など考慮すべき問題も多い手法であると言える (Ilisz *et al.* 2008). 一方, direct method は「アミノ酸をキラル試薬で誘導体化せずに、そのままのエナンチオマーをキラル固定相もしくはキラル移動相添加剤を用いて分離する」手法である。キラル固定相やキラル移動相添加剤とターゲット化合物の間にジアステレオメリックな結合が可逆的かつ一時的に形成され、その相互作用を利用して分離が達成される。キラル固定相には光学異性体を識別するキラルセクターが据え付けられており、シクロデキストリンベース、マクロ環状糖タンパク質ベース、ポリサッカライドベース、そしてクラウンエーテルベースのセクターがその一例として挙げられる (Xiao *et al.* 2012; Armstrong *et al.* 1994; Shen *et al.* 2014; Hyun 2016). direct method に関しては簡便な前処理で分析可能である、また分析手法を応用させやすいといった長所があるが、固定相の理論段数が小さい、分離条件がセンシティブである（些細な条件変更が分離挙動に大きく影響する）、そして分離カラムが高コストであるといった短所もある (Ilisz *et al.* 2008).

以上、現在のアミノ酸分析の歴史と光学分割に関する研究の現状について示したが、どの報告においても、「如何にターゲット化合物を効率よく分離するか」、そして「如何にターゲット化合物を高感度に検出するか」という命題は常に提示され、それらを解決すべく様々なアプローチが試されている。現在主流の indirect method と direct method の両方に一長一短あり、その性能面では未だ改善の余地がある。また、クロマトグラフィーを用いない光学分割手法も多数報告があり、例えばキャピラリー電気泳動法 (CE) やキラルシフト試薬を用いた核磁気共鳴分光分析法 (NMR) などが挙げられる (Chankvetadze and Blaschke 2001; Kabuto and Sasaki 1987). また、D-アミノ酸酸

化酵素を主に用いた酵素法はその簡便性やコストの面から、臨床検査などの現場での使用が期待されているが、各々の D-アミノ酸の検出には一対一の反応が必要となることから、予めアミノ酸を分離しない限り混合試料中の個々の D-アミノ酸を定量することは困難である。その点、クロマトグラフィーを用いた手法は、種々の D-アミノ酸を網羅的に分離分析することが出来る点で少なからず優位性があると言える。

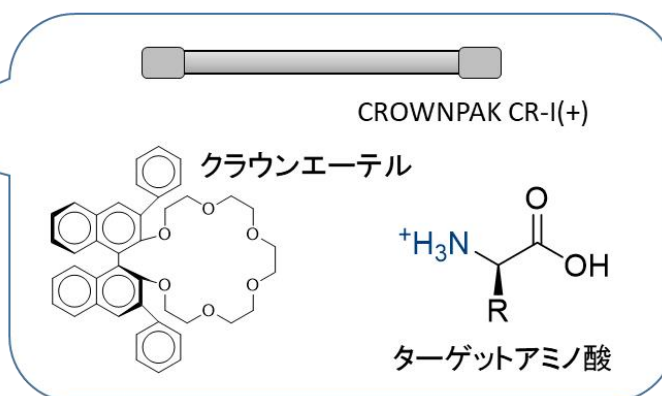
1.5. 本研究の背景と目的

近年、当該研究室で新規 D-アミノ酸分析法が開発された (図 3) (Konya *et al.* 2016). 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) をそれぞれ使用する.

分離 高速液体クロマトグラフ (HPLC)



**Nexera HPLC System
(SHIMADZU)**

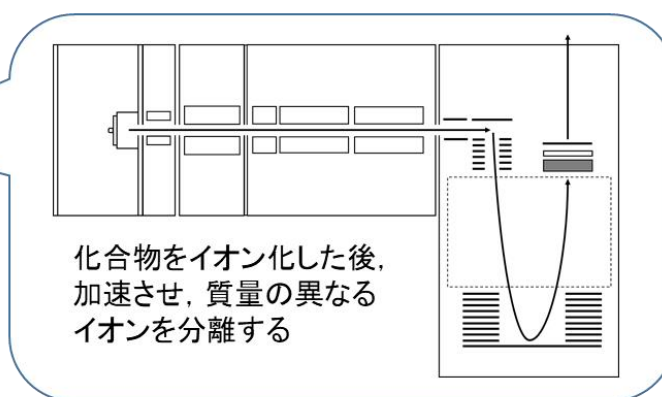


画像引用元: <https://www.shimadzu.com/an/hplc/x2-1.html>

検出 飛行時間型質量分析計 (TOFMS)



**TripleTOF 5600 System
(SCIEX)**

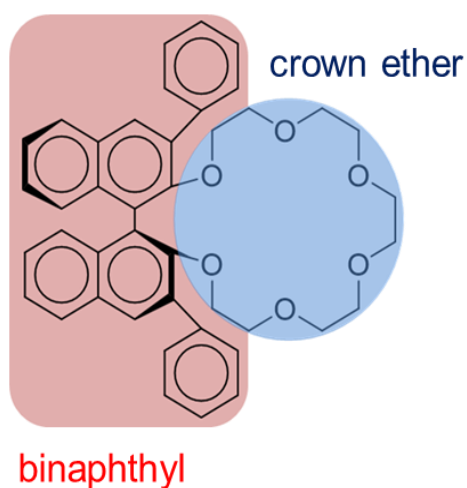


画像引用元: <http://www.directindustry.com/ja/prod/ab-sciex/product-61550-593855.html>

図 3. Konya *et al.*が開発した D-アミノ酸分析法の概略

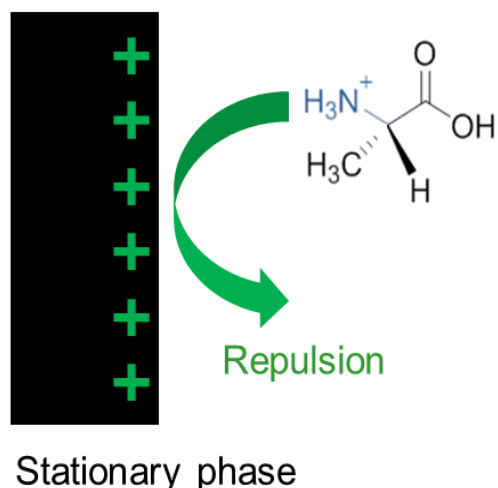
この手法の分離部においては、キラル固定相としてバイナフチル骨格をもつクラウンエーテルを有するカラム CROWNPAK CR-I (+) を採用している。当該手法の D, L-アミノ酸のキラル分離の原理に関しては、未だ詳細な解明が待たれる段階であるが、以下のような分離メカニズムが推測される (図 4)。ターゲットアミノ酸が有するアミノ基は、LC に使用される極低 pH を示す移動相によって、プロトン化される。このプロトン化アミノ基と固定相中のクラウンエーテルとの間に静電引力がはたらき、アミノ酸の保持が発生する。また、同時にこのクラウンエーテルには非常に嵩高い構造のバイナフチルが結合しており、疎水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る。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る。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る (Konya *et al.* 2018)。

• 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



Stationary phase
充填剤粒子の細孔の有意の部分による静電反発

図 4. Konya *et al.*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 つ挙げられる。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ある。いわゆる **direct method** の一種であり、**indirect method** で懸念されるような誘導体化処理に関わる諸問題を回避出来る。2 つ目は、分析のハイスループット性である。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る。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る。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ある。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を高い定性能力をもって区別することが出来る。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るが、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る。以下にその理由を述べる。

質量分析計が有する検出器には用途や目的に応じて異なる検出原理が用いられている。一般的に、質量分析計では数 10 keV の運動エネルギーをイオンに付与させ、検出器表面にソフトに衝突させることによって生じる 2 次電子を増倍させることで検出応答を得ている (Tanaka *et al.* 2010)。現在、質量分析計に搭載されている検出器は、二次電子増倍器とマイクロチャネルプレートに大別され、三連四重極質量分析計 (QqQMS, MS/MS) では前者が、TOFMS では後者が多く用いられている。二次電子増倍器の概略図は以下である (図 5)。ある閾値以上の運動エネルギーをもった粒子が質量分離部を通過した後、二次電子増倍器を構成するダイノードと呼ばれる特殊な金属表面を有した電極に衝突すると、1 個以上の電子が放出され、電位差を保った 2 つ目のダイノードに加速しながら衝突する。この電子の入射と放出の過程を周期的に繰り返しながら、電子増幅が進行し、二次電子増倍器ではアノードと呼ばれる電極に捕集されるまでに 1 個の粒子の入射に対して電子が 10^6 から 10^8 個ほどにまで増幅される。

二次電子増倍器の一つ一つのダイノードは比較的容量が大きく、電子が飽和しにくい構造を有しているため、検出のダイナミックレンジが広く、MS/MS のような定量性に優れた装置に使用される。

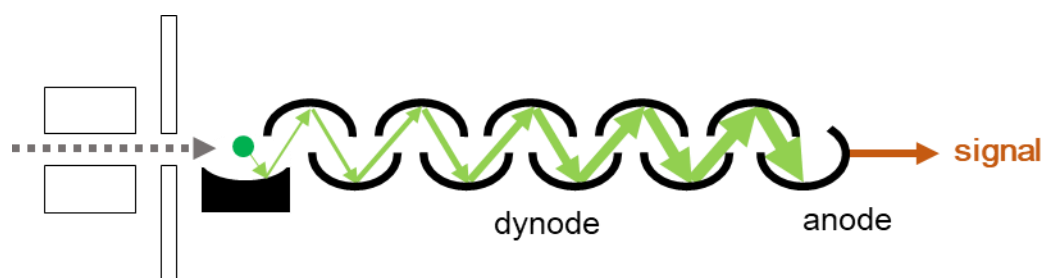


図 5. 二次電子増倍器の構造概略図

一方、TOFMS で頻用されるマイクロチャネルプレートは以下のような構造をしている (図 6). マイクロチャネルプレートは内径が極めて細い導電性ガラス管がハニカム構造のように密に束ねられ固着されたもので、各々の細管がチャネル型の電子増倍器として作用する。ある閾値以上の運動エネルギーをもった粒子は、チャネル内壁面に衝突すると、複数の電子を放出させる。電場勾配が生じたチャネル内で、それらの電子は内壁間で衝突を繰り返しながら増幅して行き、アノードに到達するまでに 10^4 個程度にまで増加する。通常の質量分析計では増倍率をさらに大きくするために、プレートを 2 つ重ねることによって 10^6 から 10^8 倍の電子増幅を行っている。マイクロチャネルプレートは、イオンを検出するプレート表面が平面であり、またチャネル内の移動距離の短さから、質量分離されたイオンの速度分解能を維持、時間的な拡がりを抑えたまま検出応答を得ることが出来るため、質量分解能が高い飛行時間型質量分析計に用いられる。しかし、マイクロチャネルプレートから大量の電子が放出される際、チャネル出口の内壁が帯電し後続の電子増倍が抑制され、また細管の容量的制限も相まって、電子が飽和しやすい性質を有している。従って、マイクロチャネルプレ

ートを搭載する質量分析計ではダイナミックレンジが狭く、3桁程度が限界であるとされている (Tanaka *et al.* 2010). 以上の理由から、分析系に高い定量性を求める場合、TOFMS よりも MS/MS を使用の方がより好ましいと考えられる.

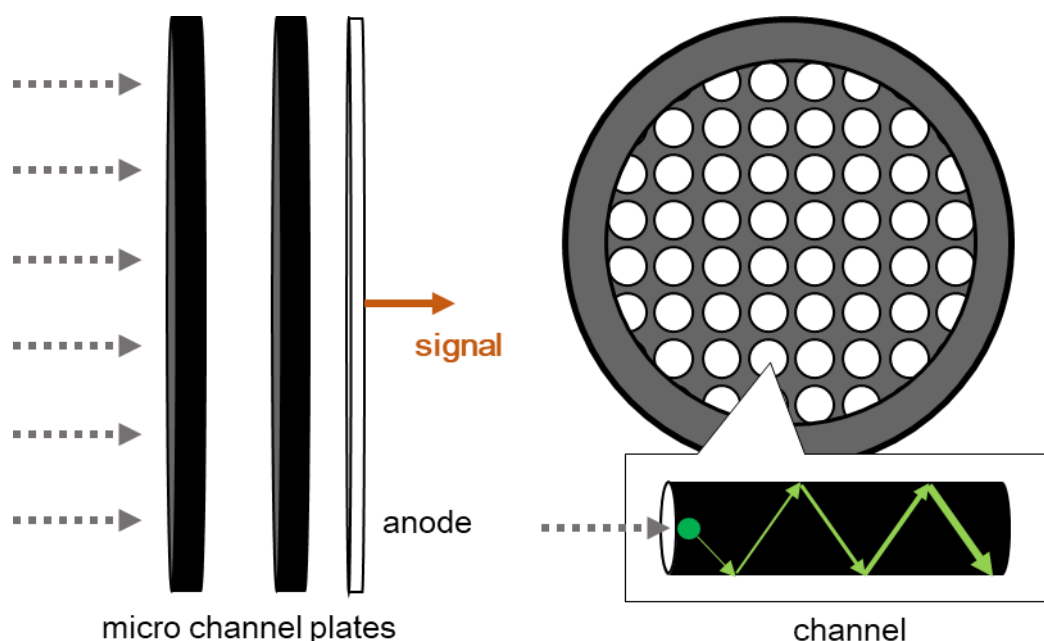


図 6. マイクロチャネルプレートの構造概略図

先述してきた通り、D-アミノ酸分析手法には、分離と検出の両面において高度な技術や工夫が求められる。すなわち、「物理化学的性質が殆ど等しい L-アミノ酸と D-アミノ酸を効率よくかつ高い分離能で分離すること」、そして「自然界に極微量しか存在しない D-アミノ酸を高感度に検出すること」を同時に満たさなければならない。既存の LC-TOFMS 法は分離面においては一定のブレークスルーをもたらしたが、検出面には課題が残る。

このような背景の中、本博士研究では LC-MS/MS を用いた新規 D-アミノ酸分析法の開発を目的とした。四重極型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る。四重極型の分析は、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る。本研究で使用する 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る。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ある。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ある。

本研究が目指すところは、MS/MS の最適化を通して高感度の D-アミノ酸分析法を確立すること、そして当該手法がより広範な化合物分析に適用可能な網羅性の高い手法であることを実証することである。本研究では、分析技術を構築するにあたり、高感度を pmol オーダー付近の化合物を検出可能な性能であると定義した (図 S1)。まず、第二章では 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った。その後、開発した手法と既存の手法の性能を比較し、評価した。続く第三章では、第二章で開発した手法をベースに、タンパク質構成アミノ酸のほか、対象化合物を大幅に追加し、より網羅的な代謝物プロファイリングシステムの構築を行った。その後、構築した手法を食品分析に応用し、得られたデータの多変量解析を通して、検出されたキラル代謝物の挙動を議論した。第四章では第二章と第三章で得られた結果を総括すると共に、今後の当該研究分野の展望について述べた。

第二章 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

2.1. 緒言

半世紀前まで生物学的プロセスの中で何ら有意な機能をもたないと考えられていた D-アミノ酸は、今や様々な分野でその研究発展の重要性が謳われている。生体内では L-アミノ酸には無い特殊な生理学的機能を示すことが多くのエビデンスで明らかになり、新たな機能性物質のシーズとしての期待も高い (Genchi 2017)。そのような背景において、キラルアミノ酸の光学分割は極めて重要であり、高速で堅牢性が高くかつ高感度に分離・検出する手法の開発が望まれている。一定の進展があるものの、現状の光学分割および定量手法においては、分離が不十分である、また微量の D-アミノ酸を検出するには感度が不十分であるといった問題を依然抱えており、更なる分析技術の向上が求められている (Tanwar and Bhushan 2015)。

そこで本章では、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を目的とした。その開発過程に関しては、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、段階的に検討を行った。以下に各項目の概要を述べる。

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 (Konya *et al.* 2016) の応用を試みた。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た。本研究で使用した MS/MS の装置構成の概略図は以下である (図 7)。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する。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った。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った。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る．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った．

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-アミノ酸分析法を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た．

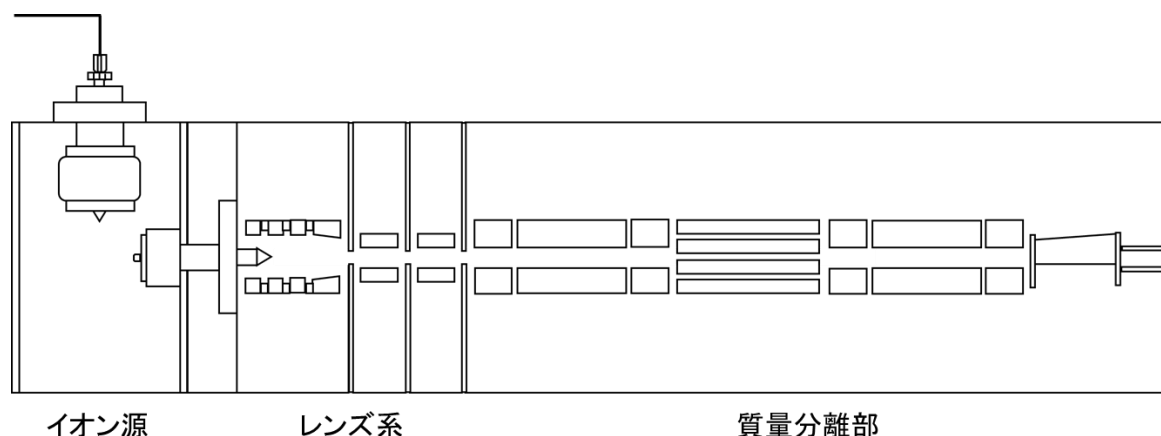


図 7. 三連四重極型質量分析計の装置構成概略図

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. 試薬

DL-alanine, DL-arginine hydrochloride, DL-asparagine monohydrate, DL-aspartic acid, DL-glutamic acid, DL-glutamine, DL-histidine, DL-isoleucine (DL-*allo*-isoleucine を含む 4 種類の異性体の混合物), DL-leucine, DL-lysine monohydrochloride, DL-methionine, DL-phenylalanine, DL-serine, DL-threonine, DL-tryptophan, DL-tyrosine, および DL-valine は東京化成工業 (東京, 日本) (TCI) から購入した. DL-cysteine hydrochloride monohydrate, LC/MS 用超純水 (以下, 簡略に水と示す), および容量分析用 0.1 mol/L 塩酸は富士フイルム和光試薬株式会社 (Wako) から購入した. LC/MS 用メタノール, LC/MS 用アセトニトリル, および HPLC 用トリフルオロ酢酸は関東化学株式会社 (東京, 日本) から購入した. HPLC 用クロロホルムはキシダ化学株式会社 (大阪, 日本) から購入した. DL-alanine-2,3,3,3-d₄ は Santa Cruz Biotechnology, Inc. (ダラス, テキサス, アメリカ) から購入した.

2.2.2. アミノ酸標準溶液の調製

20 μmol/mL のアミノ酸標準溶液を調製するために, それぞれのアミノ酸標準品を 50%メタノール (メタノール/水 = 1/1, 体積比) に溶解した. その際, 溶解度を上げるために 0.1 mol/L 塩酸を 0.02 mol/L になるように DL-glutamic acid, DL-histidine, および DL-tryptophan 溶液に, また 0.05 mol/L になるように DL-aspartic acid および DL-tyrosine 溶液にそれぞれ添加した. 得られた 20 μmol/mL の 18 種類の DL-アミノ酸標準混合溶液を段階希釈して 0.005, 0.01, 0.05, 0.5, 1, 5, 50, および 100 nmol/mL の希釈系列を調製した. 内部標準 (IS) として使用する DL-alanine-2,3,3,3-d₄ も 1000 nmol/mL になるように上記の方法で溶液を調製した.

2.2.3. 実サンプルの前処理

実サンプルの前処理は、D-アミノ酸検出が報告されている過去の手法 (Konya *et al.* 2017) に基づいて行った。実サンプルとしては、商用で入手可能な 3 つの酢 (A, B, C) を準備した。100 μ L のサンプル, 350 μ L のメタノール, 50 μ L の水, 20 μ L の IS 溶液を 1.5 mL チューブに加えてボルテックスし攪拌した後, 10000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した。遠心分離後, 360 μ L の上清を新しい 1.5 mL チューブに移し, 360 μ L の水と 180 μ L のクロロホルムを加えた後, 上記と同じ条件で攪拌および遠心分離を行った。50 μ L の上清を 1.5 mL チューブに移し, 160 μ L のアセトニトリルと 40 μ L の水を加え, 希釈した。その後, 100 μ L のサンプル溶液を LC/MS 用のバイアルに移した。尚, 定量に使用する検量線を作成するために使用するアミノ酸標準溶液も同様に上記の方法で前処理を行った。

2.2.4. LC-MS 分析

LC-MS 分析は Nexera HPLC System (株式会社島津製作所, 京都, 日本) を LCMS-8060 (島津製作所) に接続したシステムを使用した。イオン源はエレクトロスプレーイオン化法と大気圧化学イオン化法の両方を利用したデュアルイオンソースが搭載されたものを使用し, 各パラメーターを以下のように設定した。nebulizer gas : 3 L/min, heating gas : 5 L/min, drying gas : 15 L/min, interface temperature : 230°C, desolvation line temperature: 250°C, heat block temperature : 310°C, および interface voltage : 4 kV。MRM トランジションの最適化は 100 nmol/mL のアミノ酸標準溶液をインジェクションして行った。LC-TOFMS 分析は Nexera HPLC System を TripleTOF 5600 System (SCIEX, コンコード, オンタリオ, カナダ) に接続したシステムを使用し, 各パラメーターを次のように設定した。ion source gas 1 : 50 psi, ion source gas 2 : 50 psi, curtain gas 1 : 30 psi, temperature : 600°C, ion spray voltage floating : 5500 V, declustering potential : 60 V, collision energy : 5 V, および mass range : 60–600 m/z 。LC における分離には, 内径 3.0

mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5 μm の CROWNPAK CR-I(+)および CROWNPAK CR-I(-) (株式会社ダイセル, 大阪, 日本) を分析カラムとして用いた. インジェクション量は 1 μL とし, オーブン温度を 30 $^{\circ}\text{C}$ に保った. 移動相にはアセトニトリル, エタノール, 水, トリフルオロ酢酸を 80/15/5/0.5 (体積比) で混合した溶液を使用し, アイソクラティック条件のもと流速 0.4 mL/min で溶離を行った. データ取得および解析は, LC-MS/MS に関しては Labsolutions (島津製作所) を, LC-TOFMS に関しては MultiQuant (SCIEX) をそれぞれ使用して行った.

2.3. 結果と考察

2.3.1. LC-MS/MS を用いたキラルアミノ酸分析法の開発

LC-MS/MS の高感度 D-アミノ酸分析法の開発にあたり、まず初めに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。このプロセスで検討する項目は、それぞれ precursor ion の m/z , product ion の m/z , collision energy, Q1 Pre Bias, および Q3 Pre Bias の 5 つである。MS/MS における MRM 検出では、イオンソースでイオン化された化合物は MS/MS の 1 段目の四重極 (Q1) で precursor ion として選択された後、コリジョンセル内で不活性ガスによる衝突誘起解離を通じてフラグメント化され、2 段目の四重極 (Q3) では特定のイオンが product ion として検出される。collision energy はコリジョンセル内でのイオンの解離を促し、Q1 Pre Bias, および Q3 Pre Bias はそれぞれの四重極 (Q1 および Q3) にイオンを引き込むためにはたらくパラメーターである。MS/MS は precursor ion として、プロトンが付加した分子イオン ($[M + H]^+$) を D, L-アミノ酸の両方で選択した。collision energy はアミノ酸によって大きく異なり、product ion もその大きさに依存したが、Q1 Pre Bias および Q3 Pre Bias も含め、最大の感度を得られるように最適化を行った (表 1)。

表 1. 18 種類のタンパク質構成アミノ酸および IS の最適化 MRM トランジション

	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	Q3 Pre Bias (V)
alanine	90.10	44.10	-10	-14	-17
arginine	175.10	70.10	-17	-24	-12
asparagine	133.10	74.05	-10	-17	-14
aspartic acid	134.20	74.10	-16	-15	-14
cysteine	122.05	59.00	-10	-24	-22
glutamine	147.10	84.10	-18	-18	-16
glutamic acid	148.10	84.10	-10	-17	-18
histidine	156.10	110.10	-12	-15	-11
isoleucine	132.10	86.15	-13	-12	-18
leucine	132.10	86.15	-11	-12	-18
lysine	147.10	84.10	-17	-18	-21
methionine	150.10	56.10	-10	-17	-18
phenylalanine	166.10	120.10	-10	-14	-12
serine	106.10	42.10	-11	-20	-16
threonine	120.10	74.00	-11	-12	-13
tryptophan	205.10	185.15	-11	-10	-12
tyrosine	182.10	136.00	-10	-14	-23
valine	118.10	72.05	-11	-12	-13
IS	94.15	48.20	-13	-19	-15

CE : collision energy, IS : DL-alanine-2,3,3,3-d₄

次に、キラルアミノ酸分離条件の確認を行った。LC の分離条件は既報の LC-TOFMS 法 (Konya *et al.* 2016) を基に検討した。緒論で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る (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た (図 8)。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する。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る。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ない。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) にある (図 9)。詳細な知見は待たれる状況にあるが、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する。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-アミノ酸が溶出するが、CR-I(-))を用いると L-アミノ酸が先に溶出する。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った (図 10)。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った。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た。

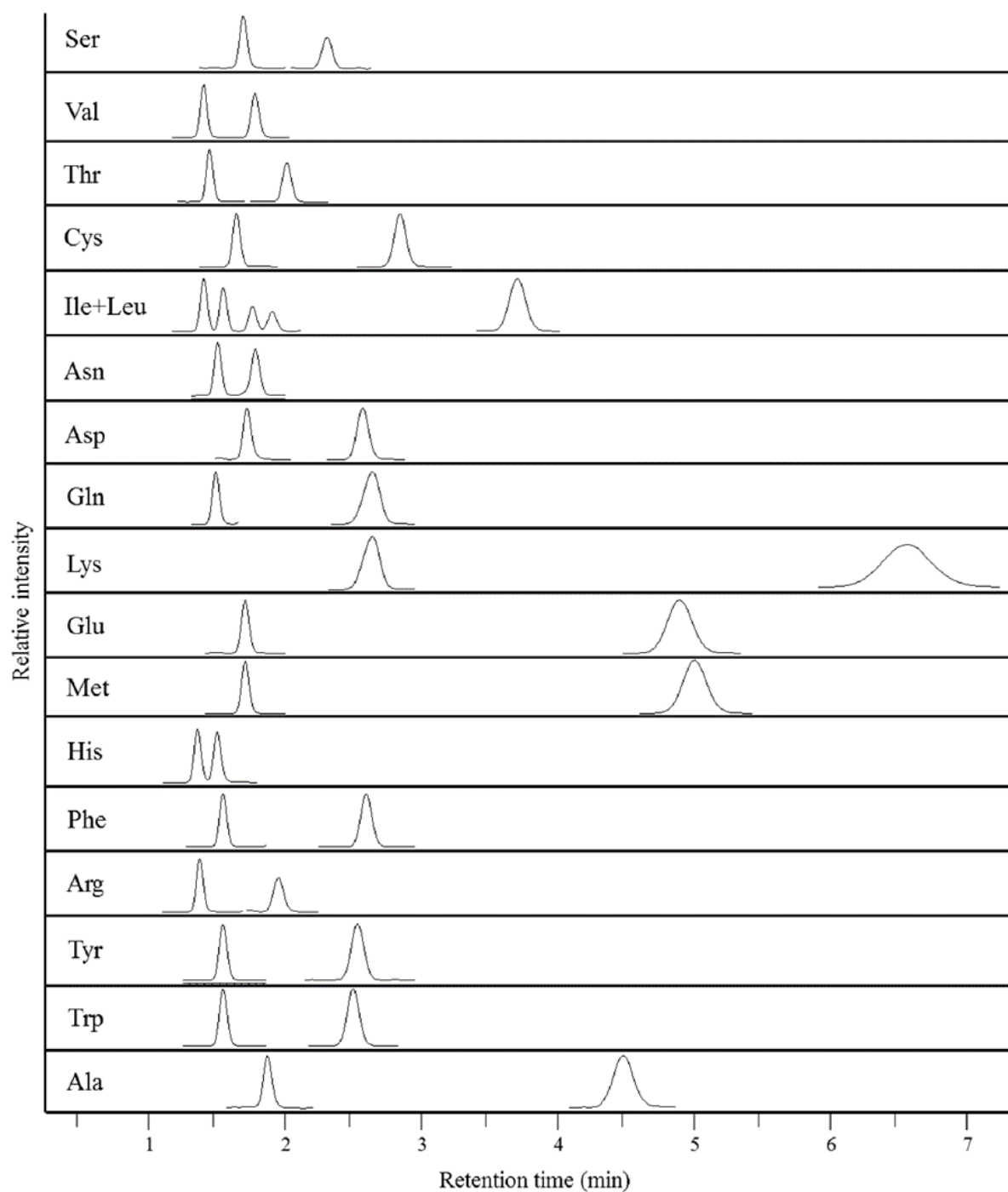


図 8. 18 種類のタンパク質構成アミノ酸のクロマトグラム

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 の順に溶出した。

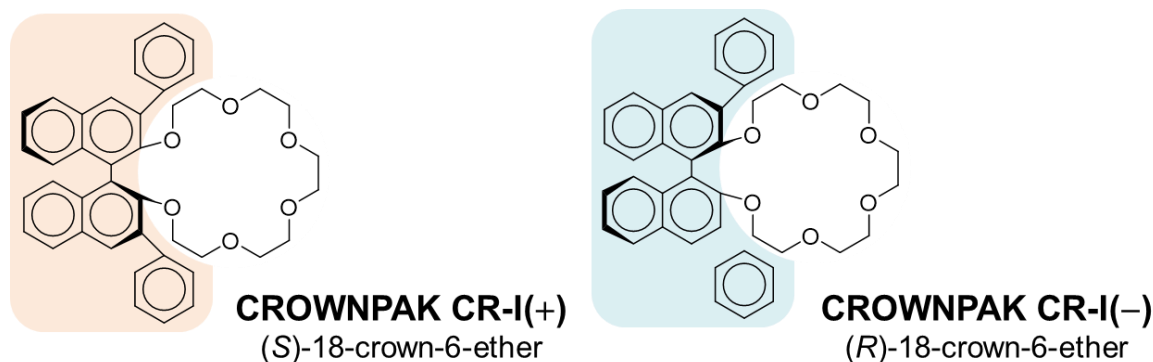


図 10. CROWNPAK CR-I(+)および CR-I(-)におけるキラルセクターの構造

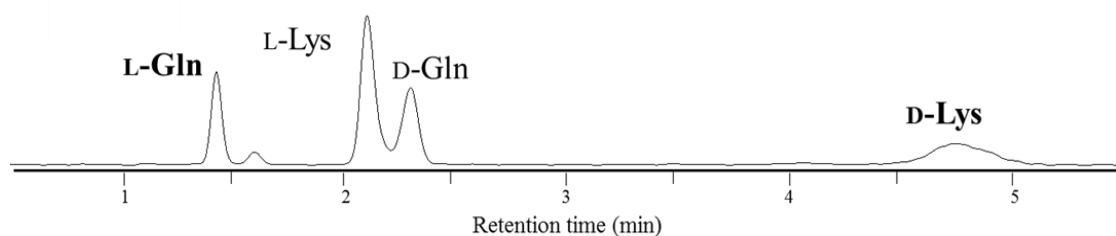


図 9. CROWNPAK CR-I(-)を用いて得られた glutamine と lysine の抽出イオンクロマトグラム

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った。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る (Janusson *et al.* 2015). 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った。

2.3.2. 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た (表 2). 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 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た. JIS K 0211:2013「分析化学用語 (基礎部門)」における定義では, 測定範囲は「分析計によって得られた値の誤差が指定された限界内に収まる測定量の範囲」, 直線性は「入力信号と出力信号との間の直線関係からのずれの小さい程度」, 併行精度は「同一の測定手順, 測定者, 分析条件, 測定装置, および場所において, 同一の測定量の連続する測定における結果間の一致の程度」, 検出限界は「検出できる最小量 (値)」, 定量下限は「ある分析方法によって分析種の定量が可能な最小量又は最小濃度」とされている. 本研究では, これらの項目において日米 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った. 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たが，数 pmol オーダーで D-アミノ酸の検出可能であり，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た．

表 2. 構築した LC-MS/MS 法の性能評価

	Range (nmol/mL)	<i>r</i>	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

2.3.3 実サンプルへの応用と既存法との比較

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た (図 11). 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 (Tani *et al.* 2009; Miyoshi *et al.* 2014), 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る (Mutaguchi *et al.* 2013). まず初めに, 3 種類の黒酢に対して前処理を行った. 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た (Konya *et al.* 2017). 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った. 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-2,3,3,3-d₄ の分析値で補正した. 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(-)を用いて行った.

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たが, 濃度は酢間で異なっていた. 次に同じサンプルを 24 時間以内に LC-TOFMS 分析に供した. 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た (図 12)．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た．

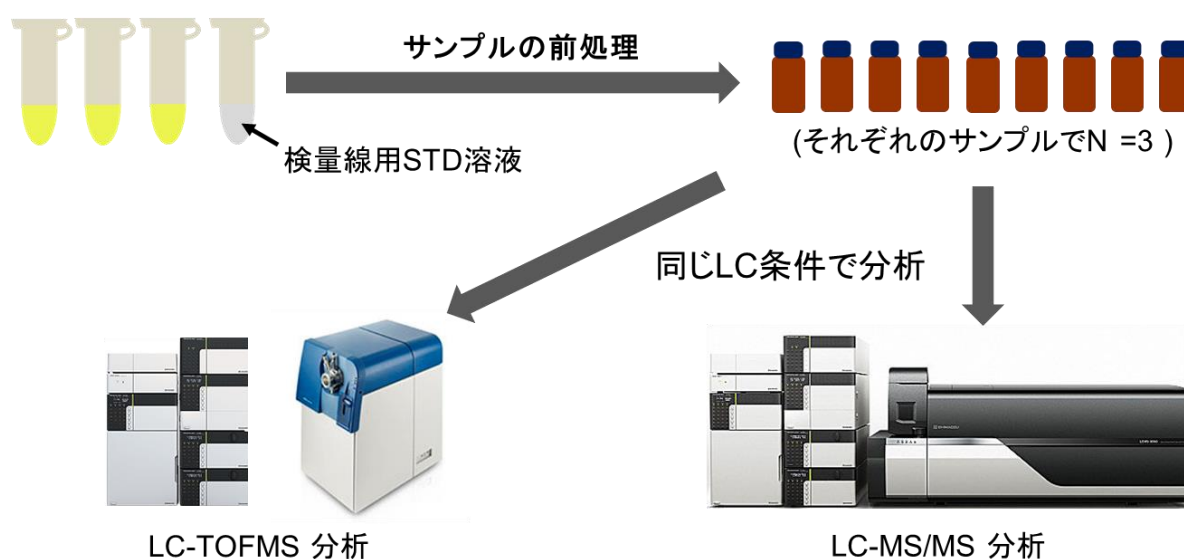


図 11. 実サンプル分析の流れ

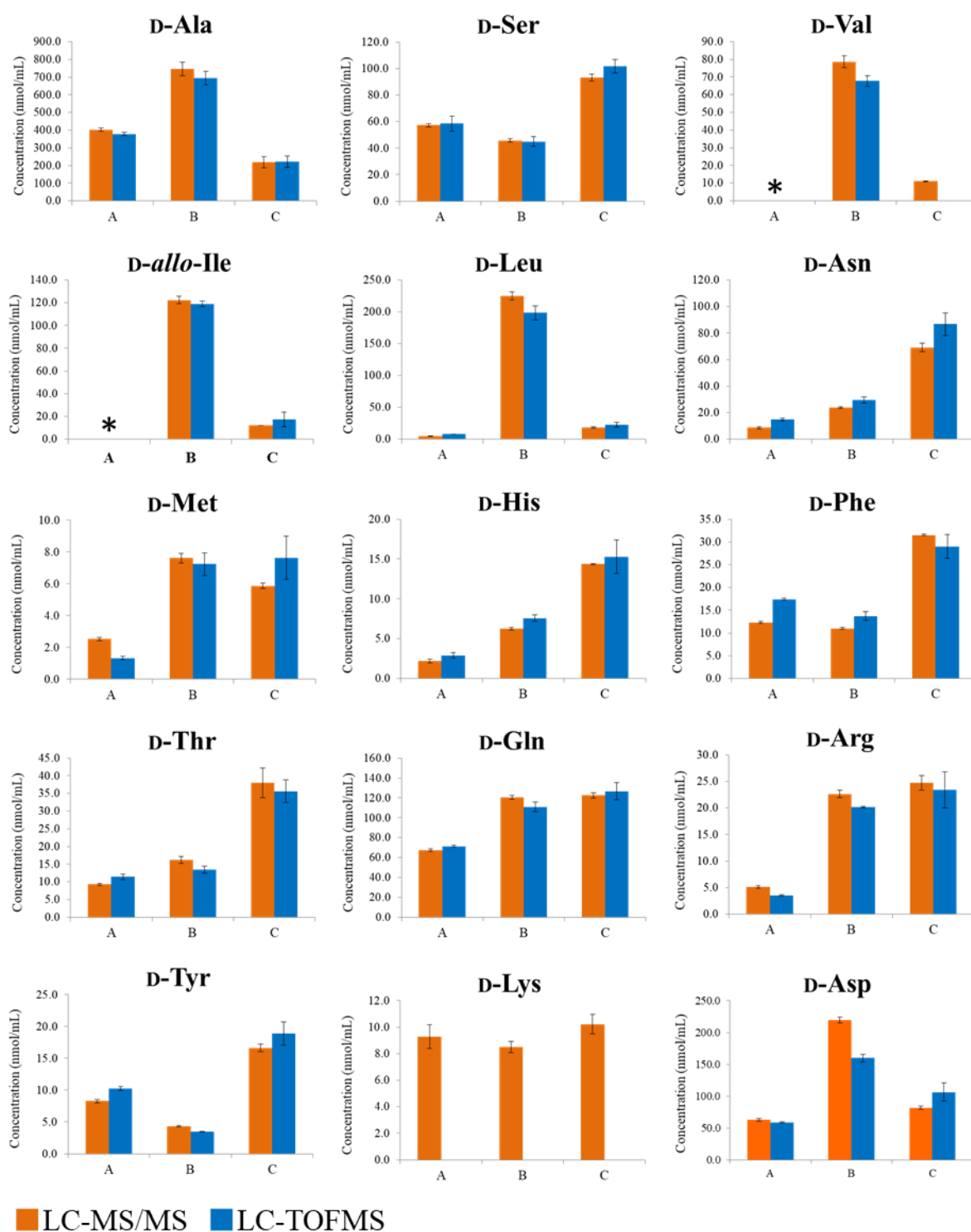


図 12. LC-TOFMS および LC-MS/MS 分析による黒酢中の D-アミノ酸の定量値

橙色の棒グラフが LC-TOFMS 法で、水色の棒グラフが LC-MS/MS 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す。

2.4. 小括

本章では、微量 D-アミノ酸の高感度定量分析に資する LC-MS/MS 分析法の開発を行った。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った。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った。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る (Visser *et al.* 2011; Reischl and Lindner 2012; Karakawa *et al.* 2015)。これら既報の手法は、望ましい感度や分離挙動を得るために誘導体化を必要とする。また、誘導体化を行わずにキラル分離を示した例 (Taujenis *et al.* 2014; Barbaro *et al.* 2014) もあるが、ターゲットアミノ酸のピーク分離能および形状に難がある。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る。

第三章 キラルアミンおよびその関連代謝物の網羅的分析系の構築

3.1. 緒言

前章では、LC-MS/MS を用いて、タンパク質構成アミノ酸をターゲットとした D-アミノ酸分析法の開発を行い、実サンプル中に含まれる微量の D-アミノ酸をハイスループットかつ高感度に検出することに成功した。proline を除く全てのタンパク質構成アミノ酸を 10 分以内に光学分割可能であり、微量にしか存在しない D-アミノ酸を誘導体化処理不要で分析出来る点で一定の成果を示した (Nakano *et al.* 2017)。

第一章の 1.5 で詳しく述べた通り、当該手法における分離の「鍵」となっているのは、ターゲットアミノ酸が有するアミノ基と分離カラムの固定相に結合したバイナフチル骨格のクラウンエーテルとの間で生じる立体選択的な相互作用であると推定される (図 4)。従って、タンパク質構成アミノ酸に限らず、分子内に同様にアミノ基を保有する化合物であれば、当該手法の分離メカニズムを適用し、分析することが可能であると考えた。勿論言うまでもなく、タンパク質構成アミノ酸以外にもキラリティーを有するアミノ基保有化合物は多数存在する。更に、キラリティーを有していないアミノ基保有化合物に対しても、キラルセクターのクラウンエーテルとアミノ基の間に静電引力が生じることによって固定相による保持が達成されるため、他のアミン類と同様に分離分析することが出来ると推測された。

そこで、本章では分析ターゲット化合物を大幅に加え、前章で確立した LC-MS/MS 法の適用範囲を拡大し、キラルアミンおよびその関連代謝物の網羅的分析系の構築を目指した。新たなターゲット化合物として、ornithine や γ -aminobutyric acid (GABA) を初めとする非タンパク質構成アミノ酸を対象とした。ornithine は他の多くのタンパク質構成アミノ酸と同じくキラル炭素を有し、その L-体は然ることながら、D-体もいくつかの微生物において生化学的に重要な分子であることが過去に報告されている (Matsui and Oikawa 2010)。更に、adenine などの核酸塩基、adenosine などのヌクレオシドといった核酸代謝物の他、dopamine や serotonin といった生体内で特異的な機能を

もつ生理活性アミンも新たに含めた。MS/MS の有する広いダイナミックレンジを活かした上で、化合物のキラリティーを考慮した多数の化合物を一斉に分析するキラルメタボロームプラットフォームの報告は今までに無く、新たな試みであると言える。

当該分析系の構築にあたり、前章における分析法開発の過程と同じく段階的にスキームを進めた。まず初めに、各ターゲット化合物の高感度検出に向けた MS/MS パラメーターの最適化を行った。具体的には MRM トランジションの最適化、イオンプロブの位置の調整、イオン源ガス流量および熱パラメーターの最適化を行った。前章におけるタンパク質構成アミノ酸をターゲットとした最適化においては、すべてのアミノ酸を対象に検討を進めたが、本章においては特に低感度を示した化合物を選択した上で検討した。続いてターゲット化合物の分離条件の検討を行った。従来の LC 条件を当該系にも適用し、新たに追加したターゲット化合物の分離挙動を確認した。更に、従来の手法では分離カラムの固定相との相互作用が不十分なためキラル分離が達成されなかった *proline* を初めとする第二級アミンに関しても、分離カラムのスクリーニングを再度行うことで、その分離あるいは分析の可否を検討した。その後、ターゲット化合物標準品の希釈系列を用いて、構築した系の直線性とその範囲、検出限界、および再現性を調べ、分析法の性能を評価した。最後に、実サンプルへの応用として、熟成期間の異なるチーズを 3 種類用意し、構築した分析系を用いてメタボローム分析を行った。検量線を用いてチーズ中に含まれる代謝物の定量を行うと共に、得られたデータに対して多変量解析の 1 つである主成分分析 (PCA) を行った。PCA で得られた score plot および loading plot から、検出された代謝物の特徴とその挙動を議論した。

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. 試薬

前章と同様に使用した分析ターゲットアミノ酸の標準品 (DL-alanine, DL-arginine, DL-asparagine, DL-aspartic acid, DL-glutamic acid, DL-glutamine, DL-histidine, DL-isoleucine (*allo*-体含む), DL-leucine, DL-lysine, DL-methionine, DL-phenylalanine, DL-serine, DL-threonine (*allo*-体含む), DL-tryptophan, DL-tyrosine, DL-valine, DL-cysteine) および溶媒 (水, メタノール, エタノール, アセトニトリル, クロロホルム, 塩酸, トリフルオロ酢酸) は引き続き同じ製造元から購入した. 1 mol/L ギ酸アンモニウム溶液およびギ酸は Wako から購入した.

本章で新たに使用した標準品とその製造元は以下である (分子量順). ethanolamine (Wako), sarcosine (Wako), β -alanine (Wako), DL- α -aminobutyric acid (Wako), *N,N*-dimethylglycine (Wako), γ -aminobutyric acid (Wako), hypotaurine (Wako), cytosine (Wako), histamine (Wako), uracil (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本), creatine (Sigma-Aldrich, セントルイス, ミズーリ, アメリカ), DL-proline (TCI), betaine (Wako), DL-norvaline (TCI), DL-2,4-diaminobutyric acid (TCI), DL-homoserine (TCI), DL-*allo*-threonine (Wako), nicotinamide (Wako), nicotinic acid (Wako), thymine (Wako), DL-pipecolic acid (Sigma-Aldrich), DL-*N*-acetylalanine (TCI), creatine (Wako), DL-ornithine (TCI), glycylglycine (Wako), adenine (キシダ化学), anthranilic acid (Wako), tyramine (Sigma-Aldrich), guanine (Wako), dopamine (Wako), tryptamine (Sigma-Aldrich), DL-2-aminoadipic acid (Sigma-Aldrich), DL-ethionine (Thermo Fisher Scientific, Inc., ウォルサム, マサチューセッツ, アメリカ), DL-2-aminopimelic acid (TCI), DL-citrulline (TCI), DL-carbamoyl aspartic acid (TCI), serotonin (Wako), DL-homophenylalanine (TCI), DL-2-aminosuberic acid (TCI), DL-dopa (TCI), DL-kynurenine (Sigma-Aldrich), *N*-acetylserotonin (TCI), DL-5-hydroxytryptophan (TCI), cystathionine (4 つの光学異性体を含む) (Sigma-Aldrich), melatonin (Wako), cystine (DD-体, *meso*-体, LL-体) (TCI), thymidine (Wako), cytidine (TCI),

uridine (Wako), adenosine (Sigma-Aldrich), inosine (Wako), guanosine (Wako).

3.2.2. 標準溶液の調製

前章の手順と同じくターゲット化合物の標準品は 50%メタノールに溶解した。それぞれの化合物の濃度が 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, および 50 nmol/mL になるように希釈系列を調製した。

3.2.3. サンプルの前処理

測定するサンプルとして熟成期間がそれぞれ 6 カ月, 18 カ月, および 26 カ月のナチュラルチーズ (Beemester, ノーズホラント, オランダ) を用意した。−30°C で凍結した 50 mg のそれぞれのチーズを Multi-beads shocker (安井器械株式会社, 大阪, 日本) で 1000 rpm で 10 秒間粉碎処理した。粉末を 500 μ L のメタノールに溶解させた後, 2 倍, 5 倍, 50 倍水希釈溶液を適宜調製し, その内の 50 μ L と 350 μ L のメタノール, 100 μ L の水, および 20 μ L の IS 溶液を 1.5 mL のチューブに加えた。チューブをボルテックス攪拌した後, 10000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した。遠心分離後, 360 μ L の上清を新しい 1.5 mL チューブに移し, 360 μ L の水と 180 μ L のクロロホルムを加えた後, 上記と同じ条件で攪拌および遠心分離を行った。50 μ L の上清を 1.5 mL チューブに移し, 160 μ L のアセトニトリルと 40 μ L の水を加え, 希釈した。その後, 100 μ L のサンプル溶液を LC/MS 用のバイアルに移した。それぞれのサンプルは 3 つずつ用意した。尚前章の手順と同様に, 定量に使用する検量線を作成するために使用するアミノ酸標準溶液も同様に上記の方法で前処理を行った。

3.2.4. LC-MS 分析

分析に使用した LC-MS/MS システムは前章で用いたものに準ずる。MS インターフェースの各パラメーターは最適化した後に以下のように設定した。nebulizer gas : 3

L/min, heating gas : 15 L/min, drying gas : 5 L/min, interface temperature : 200°C, desolvation line temperature : 250°C, heat block temperature : 300°C, および interface voltage : 4 kV. MRM トランジションの最適化は 100 nmol/mL の標準溶液を用いて, フローインジェクション分析で行った. LC における分離には, 前章で用いた CROWNPAK CR-I(+)および CROWNPAK CR-I(-)に加え, 内径 4.0 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μ m の CHIRALPAK ZWIX(-)(株式会社ダイセル) を分析カラムとして用いた. インジェクション量は 1 μ L とし, オープン温度を 30 °C に保った. CROWNPAK CR-I(+)および CR-I(-)を用いた分析に使用する移動相にはアセトニトリル, エタノール, 水, トリフルオロ酢酸を 80/15/5/0.5 (体積比) で混合した溶液を使用し, CHIRALPAK ZWIX(-)を用いた分析に使用する移動相にはメタノール, 水を 98/2 (体積比) で混合し, ギ酸およびギ酸アンモニウムが 25 mM になるように調製した溶液を使用した. どのカラムにおいてもアイソクラティック条件のもと流速 0.4 mL/min で分離を行った. データ取得および解析は, Labsolutions を使用した.

3.2.5. 統計解析

Labsolutions で解析したデータを Excel シートに集約し, 得られたピーク面積値に対して IS 補正を行った後, PCA に供した. PCA は SIMCA-P+ version 12 (Umetrics, ウメオ, スウェーデン) を用いて行い, 標準化のためにデータマトリックスの平均が 0, 分散が 1 になるようにオートスケールを施した.

3.3. 結果と考察

3.3.1. LC-MS/MS を用いた網羅的分析システムの構築

LC-MS/MS を用いたワイドターゲットキラルメタボローム高感度分析系の構築に向け、種々の MS パラメーターの最適化を行った。まず初めの工程として、ターゲット化合物の precursor ion の m/z , product ion の m/z , collision energy, Q1 Pre Bias, および Q3 Pre Bias を含む MRM トランジションの最適化を行った (表 3)。全てのターゲット化合物において、プロトン付加した $[M + H]^+$ を precursor ion として選択した。product ion は collision energy の大きさに依存しながら、化合物によって特徴的なフラグメントが観測された。例えば, valine と betaine は化学式が共に $C_5H_{11}NO_2$ であり分子量も等しいため, product ion の m/z こそ両者とも 118.10 を示すが, それぞれの product ion は前者が 58.10 で後者が 72.05 の m/z を示した。そのようなケースは複数観測され, MS/MS における衝突誘起解離の特徴を活かした結果が得られた。

表 3. ターゲット化合物の最適化 MRM トランジション

	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Q1 Pre Bias (V)	CE (eV)	Q3 Pre Bias (V)
ethanolamine	62.20	44.15	-27	-12	-17
glycine	76.20	29.90	-10	-11	-28
alanine	90.10	44.10	-10	-14	-17
sarcosine	90.20	44.20	-30	-13	-17
β -alanine	90.20	72.15	-30	-11	-30
IS	94.15	48.20	-13	-19	-15
α -aminobutyric acid	104.05	58.00	-28	-12	-23
<i>N,N</i> -dimethylglycine	104.05	58.10	-30	-15	-26
γ -aminobutyric acid	104.05	87.10	-29	-11	-16
serine	106.10	42.10	-11	-20	-16
hypotaurine	110.15	92.10	-10	-12	-16
cytosine	112.05	95.10	-10	-22	-21
histamine	112.10	95.10	-29	-16	-18
uracil	113.20	70.00	-11	-18	-29
creatinine	114.05	70.00	-28	-18	-19
proline	116.10	70.10	-11	-16	-12
betaine	118.10	58.10	-28	-28	-24
valine	118.10	72.05	-11	-12	-13
norvaline	118.10	72.15	-11	-11	-29
2,4-diaminobutyric acid	119.10	56.10	-11	-22	-23
threonine	120.10	74.00	-11	-12	-13
homoserine	120.10	74.00	-10	-13	-30
cysteine	122.05	59.00	-10	-24	-22
nicotinamide	123.05	80.15	-30	-22	-30
nicotinic acid	124.05	80.15	-11	-22	-14

thymine	127.20	110.10	-11	-17	-26
pipecolic acid	130.10	84.10	-12	-18	-17
<i>N</i> -acetylalanine	132.05	90.10	-30	-10	-16
leucine	132.10	86.15	-11	-12	-18
isoleucine	132.10	86.15	-13	-12	-18
creatine	132.25	90.10	-14	-13	-16
ornithine	133.10	70.10	-12	-16	-28
asparagine	133.10	74.05	-10	-17	-14
glycylglycine	133.20	76.15	-13	-11	-30
aspartic acid	134.20	74.10	-16	-15	-14
adenine	136.05	119.10	-30	-23	-16
anthranilic acid	138.05	120.10	-30	-14	-24
tyramine	138.20	121.20	-14	-15	-25
glutamine	147.10	84.10	-18	-18	-16
lysine	147.10	84.10	-17	-18	-21
glutamic acid	148.10	84.10	-10	-17	-18
methionine	150.10	56.10	-10	-17	-18
guanine	152.05	135.15	-14	-21	-23
dopamine	154.10	91.15	-14	-24	-19
histidine	156.10	110.10	-12	-15	-11
tryptamine	161.25	144.10	-16	-12	-29
2-aminoadipic acid	162.10	98.15	-15	-17	-10
ethionine	164.10	75.05	-13	-22	-30
phenylalanine	166.10	120.10	-10	-14	-12
arginine	175.10	70.10	-17	-24	-12
2-aminopimelic acid	176.10	112.20	-13	-15	-11
citrulline	176.10	70.20	-17	-23	-27
carbamoyl aspartic acid	177.15	74.10	-16	-22	-29
serotonin	177.25	160.10	-18	-10	-29

homophenylalanine	180.20	91.10	-19	-26	-17
tyrosine	182.10	136.00	-10	-14	-23
2-aminosuberic acid	190.20	126.15	-19	-15	-24
dopa	198.20	107.05	-10	-26	-17
tryptophan	205.10	188.15	-11	-10	-12
kynurenine	209.20	192.10	-10	-8	-20
<i>N</i> -acetylserotonin	219.05	160.05	-20	-15	-30
5-hydroxytryptophan	221.15	204.15	-22	-11	-21
cystathionine	223.15	88.05	-22	-27	-16
melatonin	233.20	174.10	-24	-18	-19
cystine	240.95	74.15	-21	-29	-28
thymidine	243.20	127.10	-12	-11	-23
cytidine	244.20	112.10	-12	-12	-11
uridine	245.00	113.00	-23	-11	-21
adenosine	267.95	136.10	-22	-16	-23
inosine	268.95	137.00	-20	-20	-20
guanosine	283.95	151.95	-27	-18	-26

CE : collision energy, IS : DL-alanine-2,3,3,3-d₄

次に、ターゲット化合物の分離挙動の確認および分離条件の検討を行った。LC 移動相条件に関しては、既報のキラルアミン分離手法 (Konya *et al.* 2017; Nakano *et al.* 2017) で使用されているものをベースに行った。先述の通り、分離に使用するカラム (CROWNPAK CR-I) の固定相にはバイナフチル骨格にクラウンエーテルが結合したセレクターが据えられており、アミノ基を有する化合物であれば、静電的な相互作用により保持し、分析可能であると推測された。タンパク質構成アミノ酸に加え、非タンパク質構成アミノ酸、核酸代謝物、生理活性アミンなど多数の化合物の分離を試みたところ、100 種類以上の化合物の分離に成功した。その中で、同じ分子量を有する化合物のクロマトグラムの一例を以下に示す (図 13)。殆どの化合物は、高い分離能かつシンメトリーで優れたピーク形状のピークが得られた一方で、D-*allo*-threonine, D-threonine, および D-homoserine といった化合物は共溶出し、それぞれが同じピークとして検出された。すなわち、これらの化合物は LC における分離が達成されず、MS においても同じ MRM トランジションを有することを意味する。

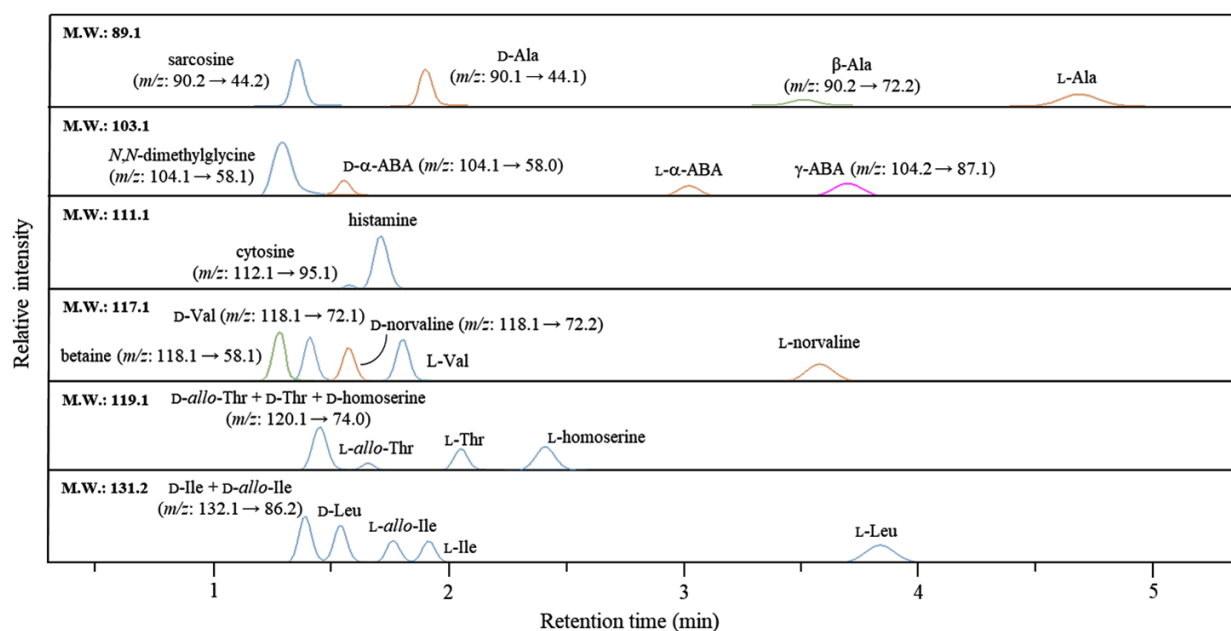


図 13. CROWNPAK CR-I(+)を用いて得られた同分子量化合物のクロマトグラムの一例
分析には 1 nmol/mL の標準溶液を用いた。同一 MRM トランジションで検出された化合物は同じ色のピークで表した。ABA : aminobutyric acid

そこで、これらの化合物の完全分離を図るため、使用した CROWNPAK CR-I(+)と相補的な構造をもつカラム CROWNPAK CR-I(-)の使用を試みた。前章でも述べたように、CROWNPAK CR-I(+)と CROWNPAK CR-I(-)内のバイナフチルは軸不斉の関係にあり(図 10)、タンパク質構成アミノ酸のキラル分析で L-glutamine と D-lysine が共溶出して検出された際は、CR-I(-)を CR-I(+)に替えて使用することで、それらの分離に成功した。この例を鑑み、本ケースにおいてもターゲット化合物の溶出順が入れ替わることで、共溶出を回避し得ると考えた。結果として、共溶出していた化合物はそれぞれが単一ピークとして検出され、分離が達成された(図 14)。CR-I(+)における分離では、図 13 が示すように L-*allo*-threonine, L-threonine, および L-homoserine はそれぞれが完全に分離して検出されおり、CR-I(-)での分離においては、非常に優れたピーク形状で挙動を保ったまま、D-*allo*-threonine, D-threonine, D-homoserine の順に検出された(図 14)。

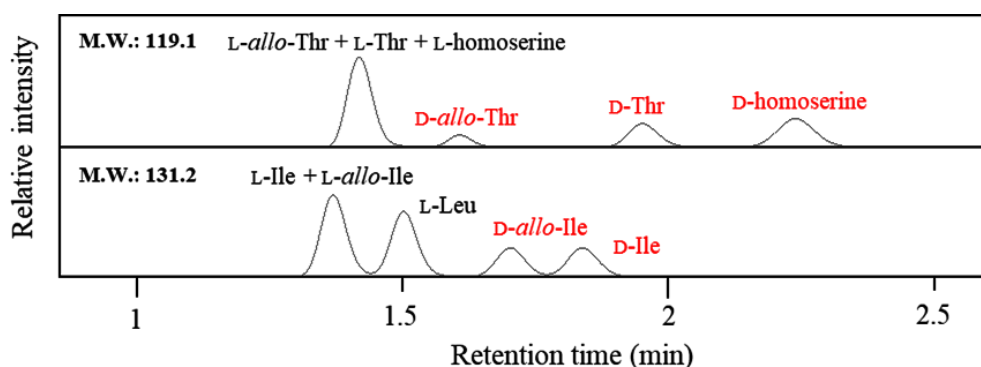


図 14. CROWNPAK CR-I(-)を用いて得られた同分子量化合物のクロマトグラムの一例
CROWNPAK CR-I(+)で検出されるピークの溶出順が L-体と D-体で逆転した。CR-I(+)の分析では共溶出していた化合物を赤色で表した。

更に、本研究では CROWNPAK CR-I(+)および CR-I(-)では原理上達成できなかった第二級アミンのキラル分離手法の開発を試みた。第一級アミンの有するアミノ基はプロトン存在下でアンモニウムイオンを形成するが、第二級アミンの場合はアンモニアの水素原子が2つ他の原子団に置換されていることから、クラウンエーテルとの静電的な相互作用が不十分となり、保持および分離が達成されない (Steensma *et al.* 2006). そこで、本研究では CROWNPAK CR-I とは異なる分離機構を有するカラムを用いて、proline を初めとする第二級アミンのキラル分離を試みた。カラムスクリーニングの結果、CHIRALPAK ZWIX(-)を使用することで、数種類の第二級アミンの光学分割に成功した (図 15). このカラムは、固定相のシリカゲルにキラルセクターとして *trans*-2-aminocyclohexane sulfonic acid で誘導体化した chinchona alkaloid を化学結合した構造を有する (図 16). ZWIX(-)の特性は、キラルセクターに弱アニオン性と強カチオン性部位をもち、それらのクーロン引力の違いに起因するイオン交換作用に基づいてキラル分離を行う点である (Tanwar and Bhushan 2015). 従って、分析化合物も両性イオンの状態を保つ必要があり、CROWNPAK CR-I を用いた分析で使用する極低 pH の移動相を用いることが出来ない。そこで、新たに ZWIX(-)の分析に資する条件の検討を行った。キラルセクターに対して分子内の対イオン効果を付与するため、移動相に酸性添加剤および塩基性添加剤を加える必要があり、前者にはギ酸や酢酸あるいはトリフルオロ酢酸、後者にはジエチルアミンやトリエチルアミンなどが用いられる (Pell *et al.* 2012; Ilisz *et al.* 2014). しかしながら、ジエチルアミンやトリエチルアミンを高濃度で使用する場合、MS を汚染する場合があります装置の保守の観点で好ましくない。そこで、それら塩基性添加剤の代替として LC 移動相の添加剤に頻用されるギ酸アンモニウムを使用した。ギ酸とギ酸アンモニウムの組合せをそれぞれ酸性および塩基性添加剤として使用して、キラル分離を行った例は過去に報告されている (Gerhardt *et al.* 2016). 本手法においては、メタノールと水の混合溶媒 (体積比 : 98/2) にギ酸およびギ酸アンモニウムを添加したものを移動相に用いた。

結果として，CROWNPAK CR-I と ZWIX (-)のカラムを併用することで，第一級，第二級アミンの両方を含めた合計 115 種類のキラル，非キラル化合物を網羅的に分析可能になった (表 4，図 S1-S4).

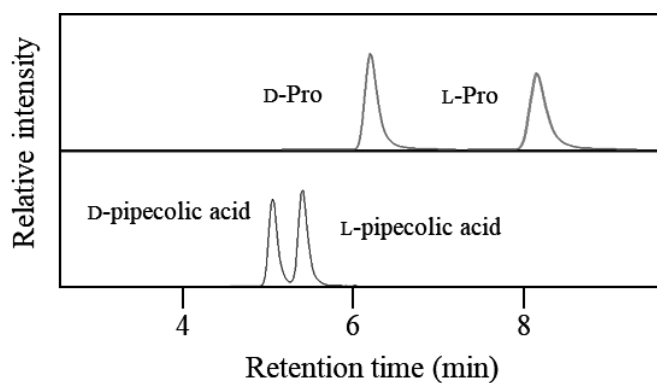


図 15. CHIRALPAK ZWIX(-)を用いて得られた第二級アミンのクロマトグラムの一例

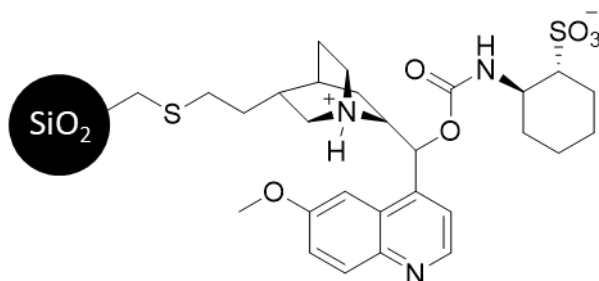


図 16. CHIRALPAK ZWIX(-)の有するキラルセクターの構造

セクター内にアニオン交換基とカチオン交換基の両方をもつ双生イオン分子から構成される．芳香族ヘテロ環の quinoline は π - π 相互作用あるいは立体効果をもたらす．

表 4. ターゲット化合物リスト

ethanolamine	D- <i>N</i> -acetylalanine	L-arginine
glycine	L- <i>N</i> -acetylalanine	D-2-aminopimelicacid
D-alanine	D-isoleucine	L-2-aminopimelicacid
L-alanine	D- <i>allo</i> -isoleucine	D-citrulline
sarcosine	L- <i>allo</i> -isoleucine	L-citrulline
β -alanine	L-isoleucine	D-carbamoyl aspartic acid
D- α -aminobutyric acid	D-leucine	L-carbamoyl aspartic acid
L- α -aminobutyric acid	L-leucine	serotonin
<i>N,N</i> -dimethylglycine	creatine	D-homophenylalanine
γ -aminobutyric acid	D-ornithine	L-homophenylalanine
D-serine	L-ornithine	D-tyrosine
L-serine	D-asparagine	L-tyrosine
hypotaurine	L-asparagine	D-2-aminosuberic acid
cytosine	glycylglycine	L-2-aminosuberic acid
histamine	D-aspartic acid	D-dopa
uracil	L-aspartic acid	L-dopa
creatinine	adenine	D-tryptophan
D-proline	anthranilic acid	L-tryptophan
L-proline	tyramine	D-kynurenine
betaine	D-glutamine	L-kynurenine
D-valine	L-glutamine	<i>N</i> -acetylserotonin
L-valine	D-lysine	D-5-hydroxytryptophan
D-norvaline	L-lysine	L-5-hydroxytryptophan
L-norvaline	D-glutamic acid	cystathionine-1
D-2,4-diaminobutyric acid	L-glutamic acid	cystathionine-2
L-2,4-diaminobutyric acid	D-methionine	cystathionine-3
D-homoserine	L-methionine	cystathionine-4
L-homoserine	guanine	melatonin

D- <i>allo</i> -threonine	dopamine	DD-cystine
L- <i>allo</i> -threonine	D-histidine	<i>meso</i> -cystine
D-threonine	L-histidine	LL-cystine
L-threonine	tryptamine	thymidine
D-cysteine	D-2-aminoadipic acid	cytidine
L-cysteine	L-2-aminoadipic acid	uridine
nicotinamide	D-ethionine	adenosine
nicotinic acid	L-ethionine	inosine
thymine	D-phenylalanine	guanosine
D-pipecolic acid	L-phenylalanine	
L-pipecolic acid	D-arginine	

本章で新たに分析の対象とした化合物を水色でハイライトした. *cystathionine* は 2 つのキラル炭素を有するため構造上, 4 つの光学異性体が存在するが, 各々の標準品が入手不可なため特定出来ない. クロマトグラム上で溶出した順に *cystathionine*-1, 2, 3, 4 とそれぞれラベルした.

次に、ターゲット化合物の高感度検出を達成するため、MS パラメーターの最適化を行った。以降の検討に関しては、特に低感度を示した 36 種類の化合物を対象にした上で工程を進めた (表 5)。

表 5. MS パラメーター最適化に使用したターゲット化合物

01. uridine	19. D-glutamine
02. uracil	20. D-glutamic acid
03. thymine	21. D-ethionine
04. glycine	22. D-dopa
05. D-valine	23. DD-cystine
06. D-tyrosine	24. D-cysteine
07. D-tryptophan	25. D-citrulline
08. D-threonine	26. D-aspartic acid
09. D-serine	27. D-asparagine
10. D-phenylalanine	28. D-arginine
11. D-ornithine	29. D-alanine
12. D-norvaline	30. D-5-hydroxytryptophan
13. D-methionine	31. D-2-aminosuberic acid
14. D-leucine	32. D-2-aminopimelic acid
15. D-kynurenine	33. D-2-aminoadipic acid
16. D-isoleucine	34. D-2,4-diaminobutyric acid
17. D-homophenylalanine	35. cytosine
18. D-histidine	36. β -alanine

まず初めに、イオン源のエレクトロスプレープローブ位置の調整を行った。前章で得られた結果から、プローブをイオンの取り込み口から遠ざけると、イオン源の高温環境下で移動相の脱溶媒が促進し、相対的に感度が上昇することが予想された。そこで、プローブを所定の位置から 1 mm ずつ最大 6 mm までイオン取り込み口から離れたそれぞれの位置において、感度がどのように変化するかを調べた (図 17)。

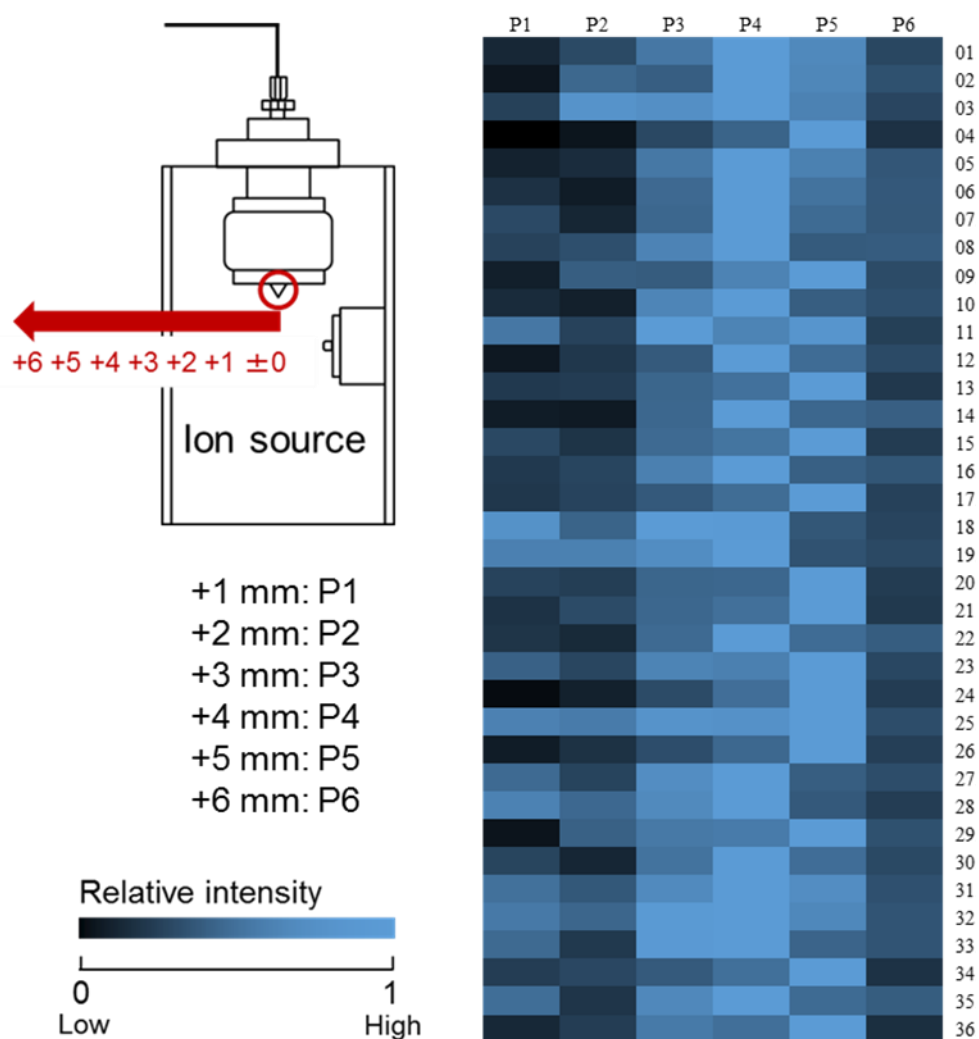


図 17.イオン源のエレクトロスプレープローブ位置による検出感度変動

初期位置を ± 0 mm とし、イオン取り込み口から遠ざける方向にプローブを 1 mm ごと動かし (P1–P6), 最大の感度が得られる位置を調べた. ヒートマップは得られた最大感度に対する相対感度 (面積値) を用いて作成し、カラースケールは明るい色ほど大きな値を示す. 36 種類の化合物の番号は表 5 に準拠する。

イオン取り込み口からの距離が大きくなると、殆どの化合物において感度の上昇が観測された一方で、+4 mm の位置を境にしてプローブを離していくと漸次的な感度の低下が見られた。これは、イオンの取り込み口からプローブの位置を大きく離すことによって、イオンの取り込みの絶対量が減少することが原因であると考えられる。すなわち、プローブの位置による検出感度の影響は「移動相の脱溶媒効率」と「イオン化化合物の取り込み」の間のトレードオフの上で成り立っており、本検討ではそれらのバランスを考慮した最適な位置を調査したと言える。

続いて、nebulizer gas, heating gas, および drying gas などのイオン源のガス流量を調節した。nebulizer gas は 1, 2, および 3 L/min の条件で、heating gas と drying gas は各々セットで、heating gas : 5 L/min かつ drying gas : 15 L/min, heating gas : 10 L/min かつ drying gas : 10 L/min, heating gas : 15 L/min かつ drying gas : 5 L/min の条件でそれぞれ検討した (図 18)。

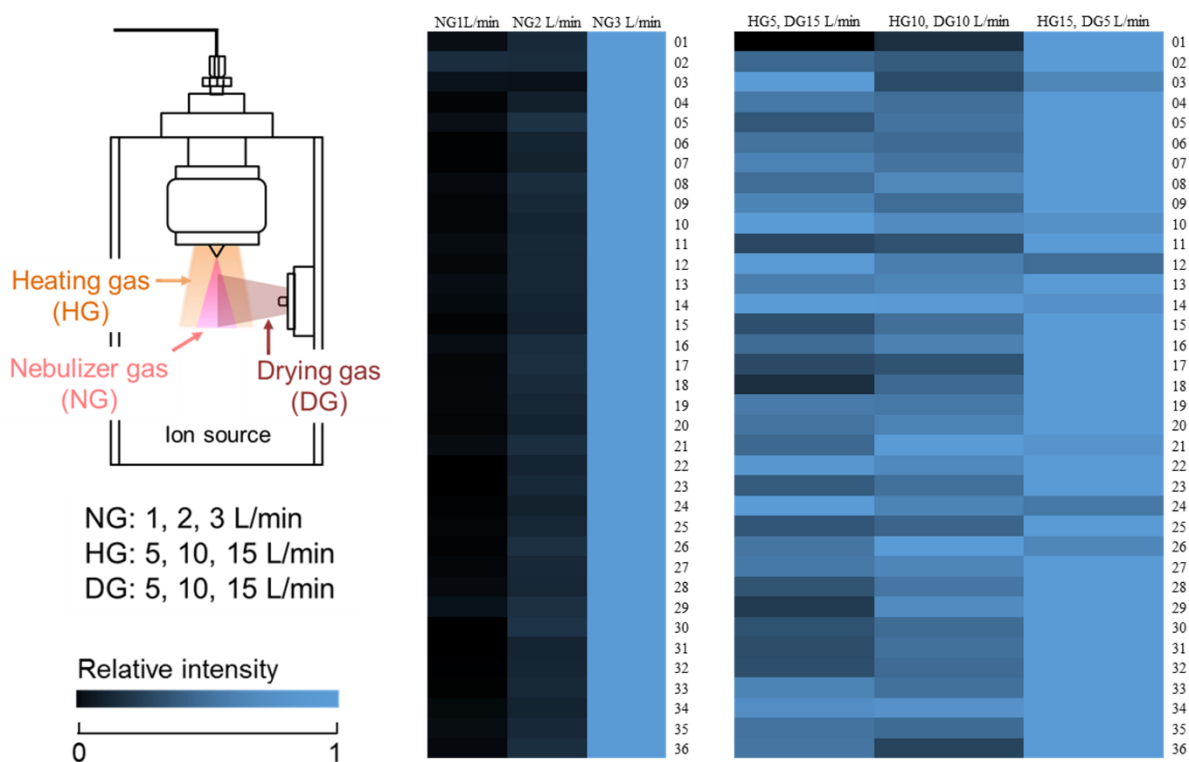


図 18.ガス流量パラメーターの違いによる検出感度変動

NG : nebulizer gas, HG : heating gas, DG : drying gas

最後に、MS インターフェースの熱パラメーターである interface temperature, heat block temperature, desolvation line temperature を検討した。interface temperature は 150, 200, および 250°C の条件で、heat block temperature は 250, 300, および 350°C の条件で、desolvation line temperature は 200, 250, および 300°C の条件で各々検討した (図 19)。イオン源における熱負荷は移動相の脱溶媒を促進し、ターゲット化合物のイオン化を補助するが、比較的高温の interface temperature は相対的に感度が低かった。これらの詳細な吟味の結果、最終的な MS パラメーターを次のように設定した。プローブ位置：+4 mm, nebulizer gas : 3 L/min, heating gas : 15 L/min, drying gas : 5 L/min, interface temperature : 200°C, desolvation line temperature : 250°C, heat block temperature : 300°C。これらのパラメーター最適化により、初期条件より 5 倍から 10 倍の感度改善が得られた。

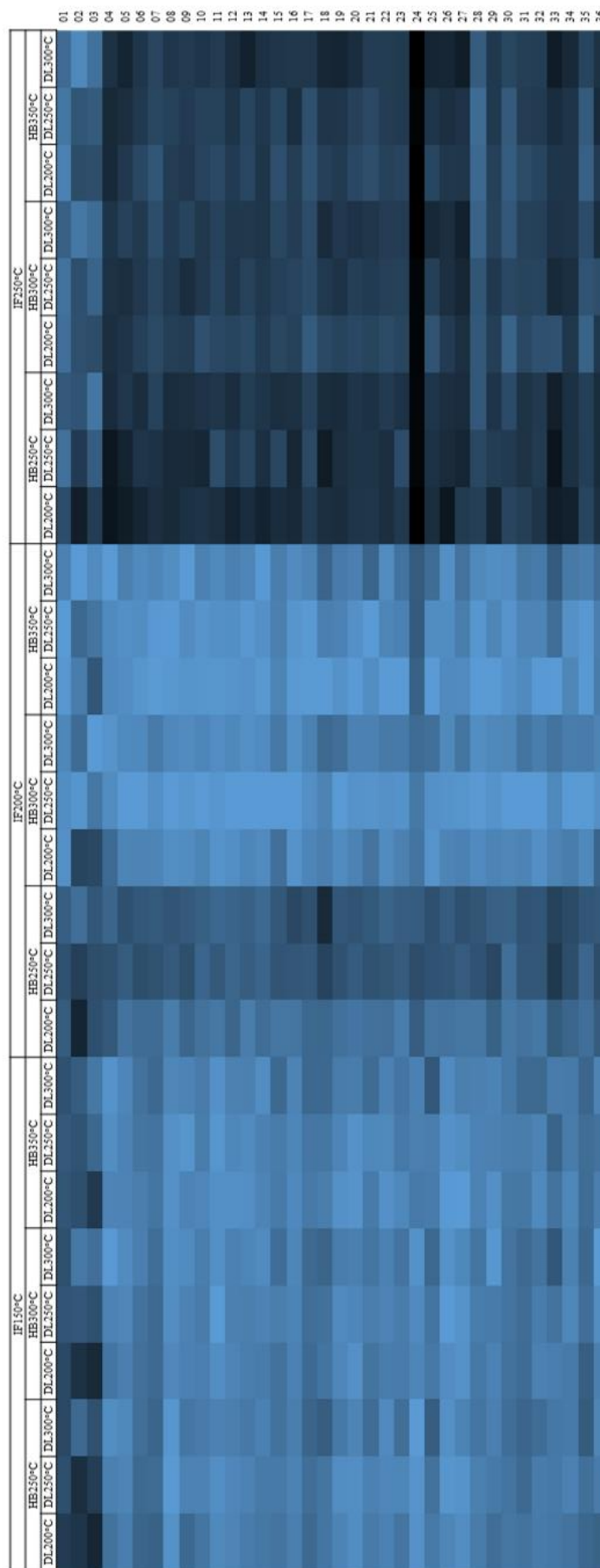
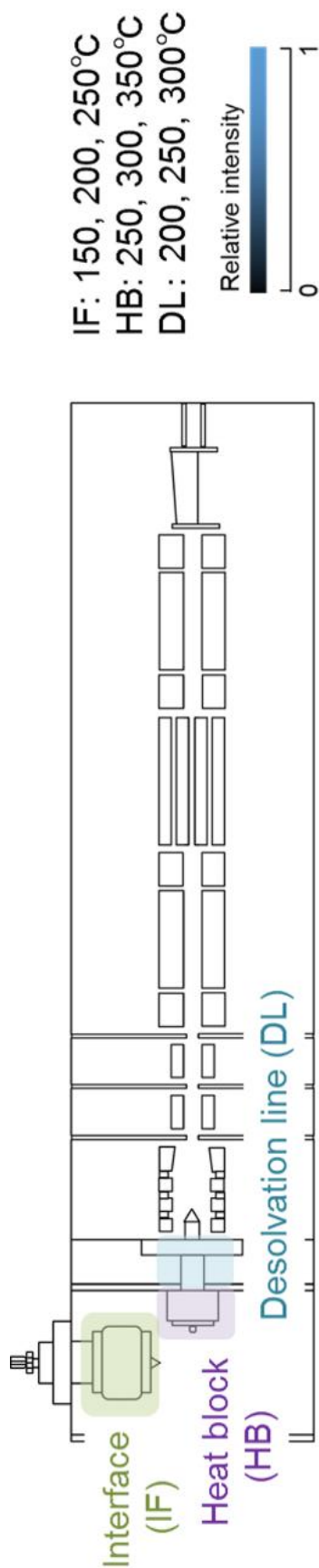


図 19. 熱パラメーターの違いによる検出感度変動

IF : interface, HB : heatblock, DL : desolvation line

3.3.2. 構築した分析法の評価

新たに構築したワイドターゲットキラルメタボローム分析手法の性能を前章同様測定範囲，直線性，併行精度，検出限界，および定量下限の観点で評価した (表 6). 各評価においては，標準溶液の希釈系列 (0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, および 50 nmol/mL) を用いた. cystathionine-1, guanine, D-methionine, L-valine, L-arginine, thymidine, L-5-hydroxytryptophan, L-dopa, serotonin, tryptamine, および L-homophenylalanine が最大の範囲 (0.001–50 nmol/mL) で，また L-serine は最小の範囲 (0.1–10 nmol/mL) で直線性が見られ，その範囲で全てのターゲットアミノ酸は相関係数 0.99 以上 (平均 $r = 0.9980$) と高い値を示した. 併行精度は 0.5 nmol/mL の標準溶液を連続で 3 回分析して得られた各ピークの面積値の RSD で評価した. 全ての化合物において RSD は 20%を下回り，平均 3.9%の RSD を示した. 検出限界および定量下限の値は化合物によって異なったが，数 pmol オーダーのターゲット化合物を検出し得る優れた定量性を示した. 以上の結果から，当該手法は広いダイナミックレンジを保ちながら，高い再現性で幅広い化合物を分析可能であることが実証された.

表 6. 構築した新規 LC-MS/MS 法の性能評価

	RT (min)	Range (nmol/mL)	<i>r</i>	RSD (%)	LOD (nmol/mL)	LOQ (nmol/mL)
<i>N,N</i> -dimethylglycine	1.305	0.001-1	0.9940	1.5	0.001	0.001
betaine	1.308	0.001-10	0.9933	3.0	0.001	0.001
sarcosine	1.360	0.05-10	0.9983	3.6	0.005	0.05
creatine	1.367	0.01-10	0.9985	1.8	0.01	0.05
D-arginine	1.369	0.001-10	0.9981	0.8	0.001	0.05
D-histidine	1.375	0.01-10	0.9980	4.0	0.001	0.01
D-valine	1.414	0.001-10	0.9987	4.6	0.001	0.005
creatinine	1.460	0.005-10	0.9981	2.8	0.001	0.005
D-glutamine	1.503	0.005-10	0.9978	5.6	0.001	0.005
D-asparagine	1.528	0.05-10	0.9978	9.3	0.05	0.05
L-histidine	1.529	0.01-50	0.9971	0.4	0.01	0.05
nicotinamide	1.537	0.005-10	0.9964	10.4	0.001	0.005
D-phenylalanine	1.547	0.05-10	0.9989	2.9	0.005	0.05
D-leucine	1.550	0.005-10	0.9987	7.3	0.005	0.005
D-tyrosine	1.553	0.005-10	0.9947	10.3	0.001	0.05
D-tryptophan	1.553	0.001-10	0.9975	5.2	0.001	0.001
nicotinic acid	1.554	0.001-10	0.9981	7.0	0.001	0.005
D-5-hydroxytryptophan	1.554	0.001-10	0.9978	6.2	0.001	0.001
cytidine	1.568	0.001-10	0.9989	2.9	0.001	0.001
D-dopa	1.574	0.001-10	0.9970	5.2	0.001	0.005
cytosine	1.574	0.005-50	0.9986	5.6	0.001	0.005
D- α -aminobutyric acid	1.576	0.01-10	0.9982	2.6	0.001	0.01
D-norvaline	1.578	0.005-10	0.9965	5.6	0.001	0.05
D-2-aminoadipic acid	1.614	0.001-10	0.9977	2.1	0.001	0.001
adenosine	1.617	0.001-10	0.9960	2.6	0.001	0.001
D-2-aminopimelic acid	1.619	0.005-10	0.9983	2.0	0.001	0.005

adenine	1.626	0.001-10	0.9972	3.2	0.001	0.001
D-2-aminosuberic acid	1.631	0.001-10	0.9981	1.5	0.001	0.005
D-citrulline	1.631	0.01-50	0.9957	2.2	0.001	0.005
D-cysteine	1.662	0.005-50	0.9984	3.3	0.01	0.01
cystathionine-1	1.666	0.001-50	0.9938	0.4	0.001	0.005
D-serine	1.699	0.05-10	0.9977	4.1	0.005	0.05
L- <i>allo</i> -threonine	1.670	0.05-50	0.9947	6.2	0.05	0.1
D-glutamic acid	1.722	0.005-50	0.9944	4.4	0.001	0.001
histamine	1.722	0.005-50	0.9984	0.8	0.001	0.005
guanosine	1.724	0.001-10	0.9986	2.5	0.001	0.001
guanine	1.728	0.001-50	0.9987	2.4	0.001	0.001
D-methionine	1.736	0.001-50	0.9957	5.7	0.001	0.005
D-aspartic acid	1.740	0.01-10	0.9973	3.7	0.001	0.05
D-ethionine	1.744	0.001-10	0.9978	3.2	0.001	0.001
D-2,4-diaminobutyric acid	1.777	0.005-50	0.9973	4.7	0.001	0.05
L- <i>allo</i> -isoleucine	1.777	0.01-50	0.9953	1.9	0.001	0.01
D-homophenylalanine	1.811	0.001-10	0.9980	0.8	0.001	0.001
L-valine	1.817	0.001-50	0.9956	4.2	0.001	0.005
L-asparagine	1.821	0.05-50	0.9940	3.3	0.005	0.05
D-kynurenine	1.860	0.005-50	0.9951	2.4	0.001	0.005
DD-cystine	1.865	0.005-50	0.9964	2.4	0.001	0.005
D-alanine	1.917	0.05-50	0.9969	7.2	0.001	0.05
L-isoleucine	1.934	0.005-50	0.9981	6.7	0.001	0.05
L-arginine	1.985	0.001-50	0.9962	2.9	0.001	0.001
L-threonine	2.050	0.01-50	0.9982	5.3	0.001	0.05
L-2,4-diaminobutyric acid	2.120	0.05-50	0.9830	2.3	0.001	0.05
anthranilic acid	2.137	0.05-50	0.9970	14.6	0.001	0.05
D-ornithine	2.157	0.05-10	0.9942	2.2	0.001	0.05
thymine	2.172	0.05-50	0.9993	13.0	0.005	0.05
thymidine	2.177	0.001-50	0.9985	5.6	0.001	0.001

melatonin	2.200	0.001-5	0.9968	1.6	0.001	0.001
uracil	2.223	0.1-50	0.9963	17.7	0.005	0.1
uridine	2.227	0.005-50	0.9961	5.4	0.001	0.005
<i>N</i> -acetylserotonin	2.285	0.005-10	0.9988	1.8	0.001	0.005
L-serine	2.336	0.1-10	0.9962	6.4	0.001	0.5
inosine	2.377	0.001-10	0.9986	1.7	0.001	0.001
L-homoserine	2.408	0.05-50	0.9993	2.3	0.01	0.05
L-5-hydroxytryptophan	2.535	0.001-50	0.9993	0.7	0.001	0.001
L-tryptophan	2.561	0.005-50	0.9998	1.5	0.001	0.005
cystathionine-2	2.579	0.005-50	0.9976	1.7	0.001	0.005
L-tyrosine	2.602	0.01-50	0.9994	1.6	0.001	0.05
L-aspartic acid	2.647	0.05-50	0.9995	7.0	0.001	0.05
L-phenylalanine	2.680	0.05-50	0.9999	1.3	0.001	0.05
L-dopa	2.717	0.001-50	0.9992	2.7	0.001	0.001
L-cysteine	2.940	0.005-50	0.9996	2.9	0.001	0.001
L- α -aminobutyric acid	2.990	0.01-50	0.9998	0.8	0.001	0.05
tyramine	3.201	0.005-50	0.9994	1.4	0.001	0.005
ethanolamine	3.244	0.05-50	0.9997	11.1	0.001	0.05
dopamine	3.331	0.005-50	0.9997	2.3	0.001	0.005
serotonin	3.347	0.001-50	0.9999	1.0	0.001	0.001
glycylglycine	3.380	0.005-50	0.9988	0.8	0.001	0.005
L-citrulline	3.411	0.005-50	0.9998	2.2	0.001	0.05
tryptamine	3.431	0.001-50	0.9983	1.1	0.001	0.001
β -alanine	3.519	0.1-50	0.9999	11.3	0.1	0.5
L-norvaline	3.592	0.01-50	0.9998	2.4	0.005	0.01
L-kynurenine	3.691	0.005-50	0.9999	1.8	0.001	0.005
γ -aminobutyric acid	3.709	0.005-50	0.9998	2.1	0.001	0.05
glycine	3.717	0.05-50	0.9994	3.8	0.001	0.05
L-2-aminopimelic acid	3.739	0.005-50	0.9995	2.4	0.001	0.005
hypotaurine	3.795	0.05-50	0.9995	1.9	0.005	0.05

L-leucine	3.850	0.005-50	0.9999	1.5	0.001	0.05
L-2-aminosuberic acid	3.858	0.005-50	0.9998	2.5	0.001	0.005
meso-cystine	3.960	0.005-50	0.9987	2.0	0.005	0.005
L-2-aminoadipic acid	4.017	0.005-50	0.9999	2.8	0.001	0.005
L-ornithine	4.086	0.05-50	0.9986	3.2	0.001	0.05
cystathionine-3	4.477	0.005-50	0.9999	0.9	0.005	0.005
L-alanine	4.684	0.05-50	0.9997	4.4	0.001	0.05
L-glutamic acid	5.123	0.005-50	0.9997	1.5	0.001	0.005
L-ethionine	5.196	0.005-50	0.9998	0.8	0.001	0.005
L-methionine	5.257	0.005-50	0.9996	1.0	0.005	0.005
L-homophenylalanine	5.970	0.001-50	0.9998	1.0	0.001	0.001
L-lysine	7.478	0.005-50	0.9999	0.5	0.001	0.01
cystathionine-4	10.606	0.005-50	0.9997	1.9	0.005	0.005
LL-cystine	15.762	0.005-50	0.9999	1.8	0.001	0.001
L-glutamine	1.448	0.001-10	0.9977	7.5	0.001	0.001
D-allo-threonine	1.613	0.001-10	0.9998	7.8	0.001	0.005
D-allo-isoleucine	1.702	0.001-10	1.0000	4.5	0.005	0.01
D-isoleucine	1.839	0.001-10	1.0000	4.9	0.001	0.005
D-threonine	1.959	0.001-10	0.9999	5.0	0.001	0.005
D-homoserine	2.244	0.001-10	1.0000	6.7	0.001	0.005
D-lysine	6.423	0.001-10	0.9997	14.0	0.001	0.001
L-N-acetylalanine	3.992	0.005-10	0.9999	0.3	0.001	0.005
D-pipecolic acid	5.249	0.005-50	0.9987	1.2	0.001	0.05
D/L-carbamoyl aspartic acid	5.339	0.01-50	0.9986	0.2	0.001	0.05
D/L-carbamoyl aspartic acid	5.674	0.05-50	0.9963	0.1	0.001	0.05
L-pipecolic acid	5.726	0.005-50	0.9999	16.8	0.001	0.01
D-N-acetylalanine	5.977	0.005-50	0.9968	4.4	0.001	0.01
D-proline	6.171	0.005-10	0.9997	3.0	0.005	0.01
L-proline	8.194	0.005-10	0.9990	10.2	0.005	0.01

RT : 保持時間, r : 相関係数, RSD : 相対標準偏差, LOD : 検出限界, LOQ ; 定量下限

評価は CROWNPAK CR-I(+)を用いて行ったが, 共溶出する化合物については CROWNPAK CR-I(-) および CHIRALPAK ZWIX(-)を使用した. 表中では CR-I(-)を用いて評価した化合物を赤色で, ZWIX(-)を用いて評価した化合物を青色で表した. 尚, carbamoyl aspartic acid に関しては D-体あるいは L-体単体の標準品が入手不可であり, 検出したピークのエナンチオメリックな同定が出来ないため, 表では D/L-carbamoyl aspartic acid と表記した (参考: 図 S6).

3.3.3. 実サンプルへの応用

構築した手法の実用性を検証することを目的に、食品中のキラルメタボローム分析に当該分析系を応用した。そのサンプルの例として、熟成期間が 6 カ月、18 カ月、および 26 カ月のナチュラルチーズを用意した。チーズの呈味などの品質は製造および熟成過程に大きく依存し、特に熟成過程はチーズ中の代謝物の生成量や種類に多大な影響を及ぼすことが知られている (Molimard and Spinnler 1996; Ochi *et al.* 2012)。加えて、ナチュラルチーズには微生物に由来すると考えられる数種類の D-アミノ酸が含まれていることが過去に報告されている (Brückner *et al.* 1992; Csapó *et al.* 2007)。食品に含まれる D-アミノ酸の測定に関する研究は、D-アミノ酸分析の特殊性および技術的障壁からその報告数が少ない上に、分析の対象をアミノ酸のみに限定しており、アミノ酸以外の他の代謝物を同時に測定している例は未だ無い。チーズはアミノ酸に加え、他の代謝物も豊富に含まれており (Ochi *et al.* 2012)、広いダイナミックレンジで広範なキラル、非キラル代謝物を測定可能な当該分析系の実用性を評価するためには好適な実サンプルであると考えた。

まず初めに、LC-MS/MS 分析に向けた実サンプルの前処理を行った。標準溶液の分析とは異なり、実サンプルを分析する場合は夾雑物質が MS におけるイオン化の際にマトリックス効果を引き起こす可能性があるため、それらを可能な限り除去する必要がある。チーズに対して行った前処理過程の詳細については、本章 3.2.3 で述べた通りである。実際に前処理した実サンプルのマトリックス効果の影響の有無を検証するために、matrix factor を計算した。計算式は以下である。

$$\text{matrix factor} = \frac{\text{SampleSTD} - \text{Sample}}{\text{BlankSTD}} \times 100 (\%) \quad (1)$$

SampleSTD：前処理済みのサンプルに濃度既知の標準品を添加した溶液の分析値

BlankSTD：前処理済みのブランクに濃度既知の標準品を添加した溶液の分析値

Sample：前処理したサンプルの分析値

(1)式の意味するところは、内因性に含まれている代謝物の影響を考慮した上で、前処理済みサンプル溶液と前処理済みブランク溶液の分析値の比を算出することにある。上式において、分析値は全て IS 補正されたピーク面積値を使用し、添加した標準品の濃度は 2.5 nmol/mL を使用している。6 カ月、18 カ月、および 26 カ月のチーズにおいて、後述する検出された代謝物のそれぞれの matrix factor の平均値は 90%, 95%, 100%を示した (表 S1)。

チーズ中の代謝物の定量に関しては、標準溶液の希釈系列を分析して得られた面積値を基に作成した検量線を用いて行った。分析に関しては、主に CROWNPAK CR-I(+) を使用し、ピークの共溶出が懸念される D-lysine と L-glutamine, D-threonine と D-allo-threonine と D-homoserine, および D-isoleucine と D-allo-isoleucine に関しては CROWNPAK CR-I(-)を使用した。また、D,L-proline を初めとする第二級アミンの分析に関しては、CHIRALPAK ZWIX(-)を用いた。結果として、タンパク質構成アミノ酸、非タンパク質構成アミノ酸、核酸塩基、ヌクレオシドといった 59 種類の代謝物が検出された (N = 3) (図 S5, 表 7, S2)。

表 7. 検出されたチーズ中の代謝物濃度 (mg/1g cheese, mean $\pm$ standard deviation)

	6 months	18 months	26 months
betaine	0.012 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001	0.018 $\pm$ 0.002
creatine	0.049 $\pm$ 0.007	0.049 $\pm$ 0.008	0.043 $\pm$ 0.004
D-arginine	0.12 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.00
D-histidine	0.0016 $\pm$ 0.0002	0.0028 $\pm$ 0.0001	0.0047 $\pm$ 0.0001
creatinine	0.0052 $\pm$ 0.0010	0.0047 $\pm$ 0.0006	0.0034 $\pm$ 0.0004
L-histidine	0.8 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.5
D-asparagine	0.0005 $\pm$ 0.0009	0.0034 $\pm$ 0.0008	0.0059 $\pm$ 0.0014
D-leucine	0.0039 $\pm$ 0.0006	0.0068 $\pm$ 0.0001	0.0055 $\pm$ 0.0001
cytidine	0.0044 $\pm$ 0.0012	0.0078 $\pm$ 0.0004	0.0092 $\pm$ 0.0009
cytosine	0.008 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.002	0.017 $\pm$ 0.003
adenosine	trace	trace	trace
adenine	trace	trace	trace
D-citrulline	trace	trace	trace
L- <i>allo</i> -threonine	0.0004 $\pm$ 0.0015	0.033 $\pm$ 0.003	0.037 $\pm$ 0.002
D-serine	0.011 $\pm$ 0.005	0.023 $\pm$ 0.004	0.028 $\pm$ 0.005
guanosine	0.013 $\pm$ 0.002	0.004 $\pm$ 0.000	0.001 $\pm$ 0.000
guanine	0.057 $\pm$ 0.009	0.095 $\pm$ 0.009	0.046 $\pm$ 0.003
D-glutamic acid	0.10 $\pm$ 0.02	0.18 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.03
histamine	N.D.	0.0074 $\pm$ 0.0002	0.0015 $\pm$ 0.0001
D-methionine	N.D.	0.0013 $\pm$ 0.0002	0.0012 $\pm$ 0.0001
D-aspartic acid	0.08 $\pm$ 0.03	0.37 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.04
L- <i>allo</i> -isoleucine	0.003 $\pm$ 0.001	0.016 $\pm$ 0.001	0.029 $\pm$ 0.003
L-valine	4.3 $\pm$ 0.9	4.3 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.3
L-asparagine	4.5 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.3
DD-cystine	N.D.	N.D.	0.0017 $\pm$ 0.0001
D-alanine	0.32 $\pm$ 0.04	0.73 $\pm$ 0.04	0.84 $\pm$ 0.04
L-isoleucine	4.8 $\pm$ 1.0	9.8 $\pm$ 0.4	8.1 $\pm$ 0.7

L-arginine	0.13 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.00
L-threonine	1.2 ± 0.0	1.8 ± 0.4	2.0 ± 0.3
thymidine	0.0022 ± 0.0004	trace	N.D.
uridine	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.008 ± 0.001
L-serine	1.9 ± 0.4	2.9 ± 0.3	2.8 ± 0.5
inosine	0.0025 ± 0.0003	trace	trace
L-tryptophan	0.24 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.36 ± 0.03
L-tyrosine	1.5 ± 0.1	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.7
L-aspartic acid	0.56 ± 0.16	0.45 ± 0.03	0.53 ± 0.06
L-phenylalanine	3.8 ± 0.9	5.0 ± 0.5	5.0 ± 0.3
L-cysteine	0.0032 ± 0.0007	0.0041 ± 0.0003	N.D.
L- α -aminobutyric acid	0.0012 ± 0.0002	0.0021 ± 0.0001	0.0028 ± 0.0000
tyramine	N.D.	0.0026 ± 0.0000	N.D.
ethanolamine	0.013 ± 0.001	0.020 ± 0.002	0.027 ± 0.004
glycylglycine	N.D.	trace	0.0019 ± 0.0002
L-citrulline	0.48 ± 0.07	0.95 ± 0.08	0.99 ± 0.08
γ -aminobutyric acid	0.0049 ± 0.0007	0.0065 ± 0.0003	0.0186 ± 0.0018
glycine	0.4 ± 0.0	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.3
L-leucine	6.7 ± 0.9	8.9 ± 0.1	5.2 ± 0.3
<i>meso</i> -cystine	N.D.	0.0008 ± 0.0000	0.0014 ± 0.0000
L-ornithine	0.8 ± 0.1	1.0 ± 0.0	0.9 ± 0.1
L-alanine	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2
L-glutamic acid	10 ± 2	16 ± 1	15 ± 1
L-methionine	1.1 ± 0.1	2.2 ± 0.4	2.0 ± 0.3
L-lysine	4.4 ± 0.7	7.6 ± 2.9	9.4 ± 0.7
LL-cystine	0.0009 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0001	0.0056 ± 0.0003
L-glutamine	2.8 ± 0.3	2.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1
D-lysine	0.041 ± 0.000	0.044 ± 0.000	0.046 ± 0.001
L-pipecolic acid	0.006 ± 0.000	0.010 ± 0.001	0.008 ± 0.000
D- <i>N</i> -acetylalanine	0.038 ± 0.004	0.037 ± 0.003	0.029 ± 0.001

D-proline	0.008 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.006 ± 0.001
L-proline	4.1 ± 0.9	8.0 ± 0.5	9.5 ± 0.6

N.D. : 非検出, trace : 定量下限以下

熟成期間の長さの違いによって、検出される代謝物のプロファイルは大きく異なり、過去の報告を裏付ける結果が得られた (Izco *et al.* 2000; McSweeney 2004). 熟成中に増加する代謝物がある一方で、減少する代謝物も多くあることは興味深く、6 カ月、18 カ月熟成のチーズにおいては全ての D-アミノ酸が増加していたが、いくつかの L-アミノ酸は減少していた。熟成がより進むと、殆どの L-アミノ酸が一層減少していた。熟成中の経時に伴う D-アミノ酸の生成量変化を議論するために、次式を用いて enantiomeric excess (e.e.) を算出した (表 8).

$$\text{e.e.} = \frac{\text{L} - \text{D}}{\text{L} + \text{D}} \times 100 (\%) \quad (2)$$

L : タンパク質構成アミノ酸の L-体の定量値

D : タンパク質構成アミノ酸の D-体の定量値

チーズ中には L-体が D-体よりも圧倒的に多く存在するため、(2)式で算出された e.e.の多くが 100%を示したが、alanine, aspartic acid, および arginine は例外的な値を示した。alanine は比較的多量の D-体が含まれており、e.e.は 20–30%の間で推移した。aspartic acid に関しては、熟成が進むにつれてドラスティックな増加があり、酵素を介した異性化などの代謝が関与していることが示唆される。arginine は 6 カ月熟成においては 4%だったが、26 カ月熟成においては–55%であり、検出された代謝物の中で最大の変化幅を示した。これは、チーズ熟成における酸ストレス応答あるいは代替エネルギー源に関わる異化代謝による L-arginine の特異的な消費 (D’Incecco *et al.* 2016) に依るところが大きいと考えられる。このような熟成中に引き起こされる種々の現象がチーズ中の生化学的変化に伴う呈味形成の複雑さに大きく貢献しているものと考えられる。

表 8. D-体および L-体の両方が検出されたタンパク質構成アミノ酸の e.e. (%)

	6 months	18 months	26 months
arginine	4	-37	-55
alanine	22	28	28
asparagine	100	100	100
aspartic acid	75	10	7
glutamic acid	98	98	97
histidine	100	100	100
leucine	100	100	100
lysine	98	99	99
methionine	100	100	100
proline	100	100	100
serine	99	98	98

チーズ中の代謝物プロファイルの挙動をより詳細に議論するために、検出された代謝物のピーク面積値を用いて多変量解析の1つ主成分分析 (PCA) を行った。PCAにより、それぞれのチーズの代謝物の多次元マトリックスを低次元化処理することで、得られたデータの構造を視覚的に捉えることが可能になった。解析の結果、第一主成分 (PC1) は 64.0%、第二主成分 (PC2) は 20.4%の寄与率をそれぞれ示した。score plot (図 20)において、PC1 軸の負から正の方向に沿って、熟成期間の増加に伴った位置配置が観測された。loading plot (図 21) においては、D,L-体合わせて 26 種類のタンパク質構成アミノ酸が観測され、PC1 軸においてその多くに対して正の相関が見られた。チーズの熟成中にはタンパク質分解などの種々の生化学的変化が活発になることが知られており (Puchades *et al.* 1989; Poveda *et al.* 2004)、熟成期間の長さでアミノ酸の生成量に相関が生じていることは合理的であると考えられる。一方で、ヌクレオシドを初めとする核酸代謝物は PC1 軸において負に寄与していた。これは微生物が熟成中にヌクレオシド由来のリボースをエネルギー源として活用すること (Smeianov *et al.* 2007) がその理由の1つとして考えられる。更に、興味深いのはいくつかのタンパク質構成アミノ酸の D-体および L-体は、それら鏡像異性体間で相関が無く、loading plot 上で異なる挙動を示した。例えば、D-leucine や L-proline は PC1 軸の正側に位置しているが、L-leucine や D-proline は PC2 軸の正側に位置していた。

代謝物のキラリティーを考慮した精密な成分プロファイリングによって、食品の官能特性に関する新たな知見を得られる可能性がある。アミノ酸の L-体と D-体が異なる呈味をもつことは古くから知られていたが、現状ではそれら鏡像異性体の区別はなされずに、多くの食品研究が展開されている。当該研究で示した結果は、ここに構築した新規分析系が食品のより高分解能の代謝物プロファイリングに資する強力な手法として貢献し得ることを示した。

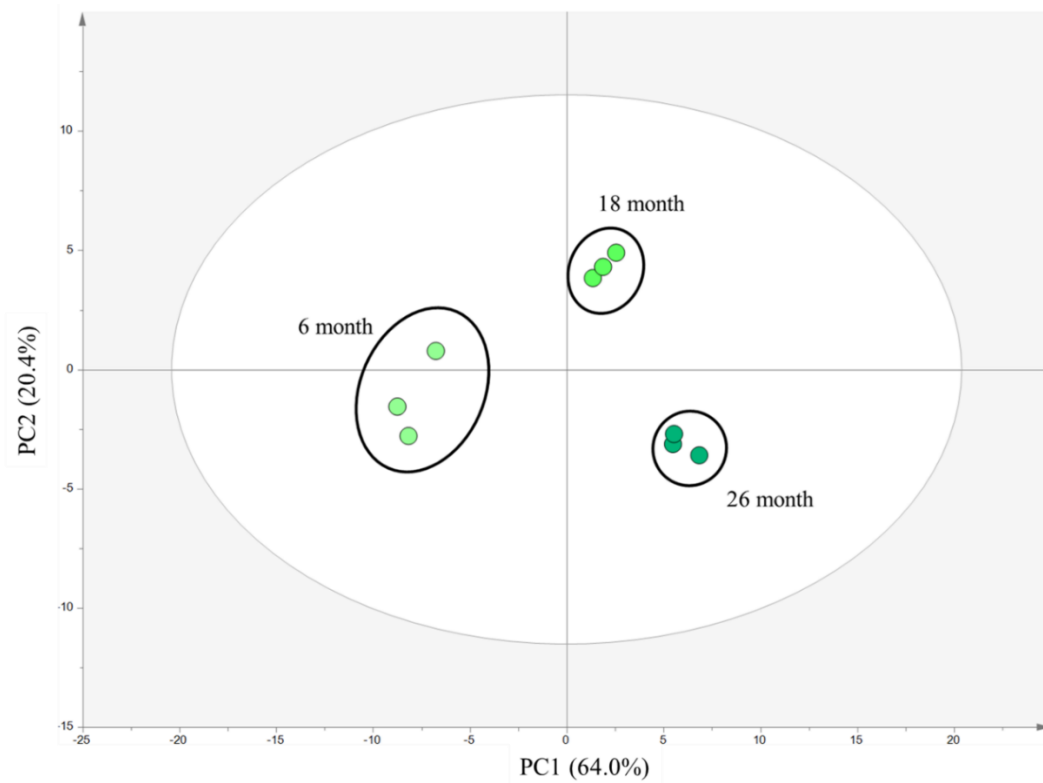


図 21. score plot

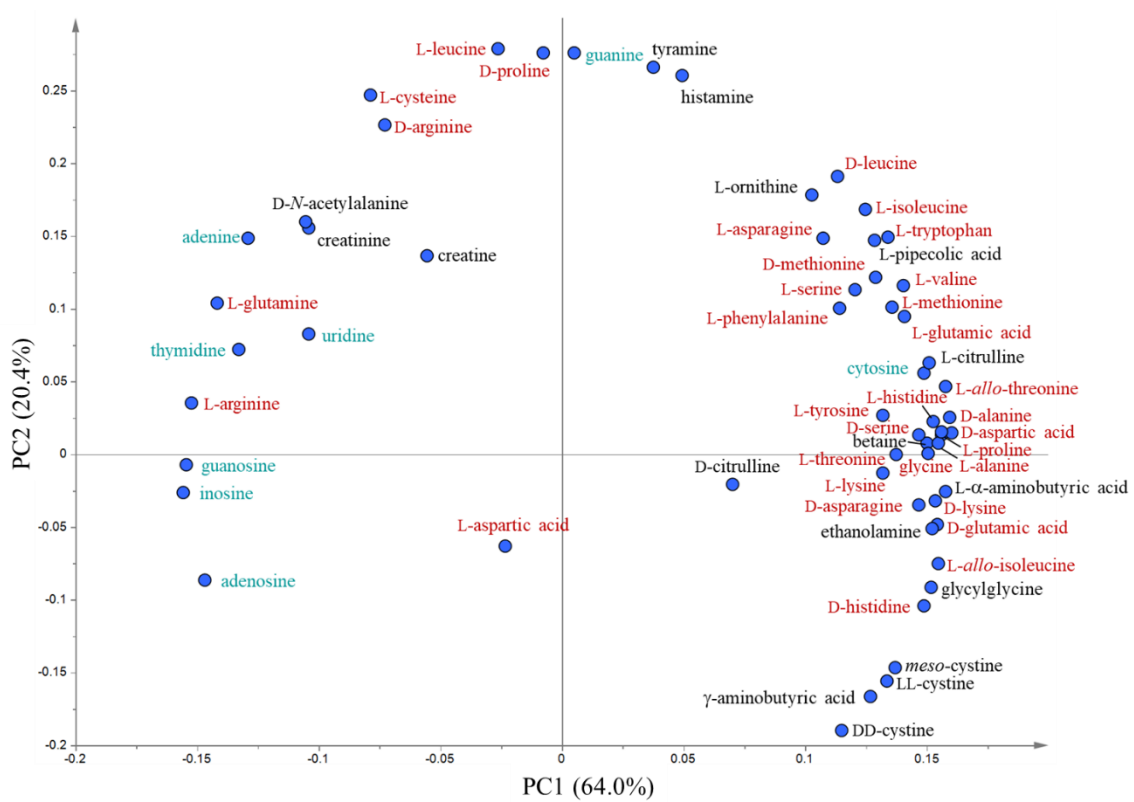


図 20. loading plot

タンパク質構成アミノ酸を赤色で、核酸代謝物を水色でハイライトした

3.4. 小括

本章では、LC-MS/MS を用いて 115 種類のキラル、非キラル化合物を対象としたワイドターゲットキラルメタボローム分析に資する新規分析系を構築し、またその分析系が食品中のアミノ酸や核酸代謝物を初めとする広範な成分のプロファイリングに応用出来ることを示した。種々のパラメーターを最適化した LC-MS/MS の高感度かつ広いダイナミックレンジを活かして、核酸塩基やヌクレオシド、D-アミノ酸といった極低濃度の代謝物と L-アミノ酸などの多量に含まれる代謝物の包括的な一斉分析に成功し、結果としてキラリティーを考慮した興味深い代謝物情報が得られた。PCA の結果から、熟成期間の異なるチーズ中ではいくつかの D-アミノ酸と L-アミノ酸は各々が異なる挙動を示しており、これは従来の鏡像異性体の区別を考慮しない分析手法では得られなかった新規性の高い知見であると言える。

現状のメタボローム分析の殆どが代謝物のキラリティーを議論せずに結果を解釈する中で、本手法を活用したキラルメタボローム分析の意義は非常に大きく、食品分野だけではなく様々な分野で応用し得る新規分析手法をして大きな可能性を有する。

第四章 総括と展望

4.1. 本研究の総括

繰り返し述べてきたように、D-アミノ酸研究の発展には、分析技術の高度化が不可欠であり、「如何に効率的にターゲット化合物を分離し、かつ高感度に検出するか」という技術的課題は常に提示される。本博士研究で開発した新規 LC-MS/MS 分析技術は、その課題解決に貢献し得る新たな手法として大きな役割を果たすと考えられる。

第二章では、LC-MS/MS を用いた D-アミノ酸の高感度分析手法を構築すると共に、従来の分析手法と比較することで、本手法の検出面における優位性を示した。高分離能の光学分割の達成、そして検出感度の向上のためにはアミノ酸の誘導体化処理が必須と従来考えられてきた中で、本手法は誘導体化を行わずとも高感度検出が出来る新規 D-アミノ酸分析手法として新たな可能性を提示した。

第三章では、核酸代謝物などアミノ酸以外の化合物を分析の対象に加え、第二章で構築した手法の適用範囲の拡張を行った。その過程で新たな分離系を検討し、proline などの第二級アミンのキラル分離を実現するなど、キラルアミンプロファイリングとして本手法が広範に利用出来る可能性を示した。実サンプル中に含まれるメタボローム解析への適用においては、通常のカラリティー非考慮の分析手法では取得し得ないユニークなメタボローム情報が得られ、当該手法を用いることでより精密な代謝物の表現型解析を実現出来る可能性を示した。

4.2. 今後の展望

本研究の主な成果は、微量にしか存在しない D-アミノ酸を高感度に分析出来、更に他の化合物も同時に測定出来る手法を構築したことである。当該手法は、報告されている D-アミノ酸分析手法の中でも、シンプルでかつ高感度で分析可能な実用性の高い手法である。本研究においては、全体を通して MS の製造メーカーを限定した分析法開発を行ったが、MS/MS 自体の構造はメーカーによって大差は無く、その MS の装置構成に適応したファインチューニングを行うことで、同様の結果が得られると考えられる。本研究では、分析ターゲット化合物と MS/MS の「相性」を考えた上で、詳細に最適化するプロセスとその重要性に着目したことを強調しておきたい。

また、キラリティーの情報を含んだ多成分を網羅的に解析する手法は未だ報告されていない。当該分析技術は「キラルメタボロミクス」という概念を提起させた上で、その解析に資する新たな手法として幅広い分野で応用され得ることが期待出来る。一方で、検出可能なメタボロームの数は数千にもものぼると言われる中で、本手法で対象としたのは百種類あまりである。本研究では、標準品の有無の都合上対象外としたが、分離メカニズムの原理を考えると、アミノ酸が複数結合したペプチドの分析にも適用可能であると考えられ、それらのキラル分離分析にも興味をもたれる。また、本手法で得られる代謝物情報と GC や SFC といった他のクロマトグラフィー手法で得られるデータを統合した包括的なメタボローム解析を行うことは非常に有意義であると考えられる。GC 分析では糖や有機酸といった低分子親水性代謝物が分析可能であり、超臨界二酸化炭素を移動相とする SFC 分析では高疎水性を示す脂質のプロファイリングが可能である。各技術で得られる代謝物情報と本手法のキラルアミンプロファイルを用いたメタボローム総体解析プラットフォームは、今まで説明、理解し得なかった生理現象を解明する手段として大きな貢献を果たすことが期待される。

引用文献

- 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).
- Armstrong, D.W., Gasper, M., Lee, S.H., Zukowski, J., Ercal, N.:** D-amino acid levels in human physiological fluids. *Chirality*, **5**, 375–378 (1993).
- Armstrong, D.W., Tang, Y., Chen, S., Zhou, Y., Bagwill, C., Chen, J.-R.:** Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **66**, 1473–1484 (1994).
- Barbaro, E., Zangrando, R., Vecchiato, M., Turetta, C., Barbante, C., Gambaro, A.:** D- and L-amino acids in Antarctic lakes: assessment of a very sensitive HPLC-MS method. *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 5259–5270 (2014).
- 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).
- Bhushan, R., Brückner, H.:** Marfey's reagent for chiral amino acid analysis: A review. *Amino Acids*, **27**, 231–247 (2004).
- Bhushan, R., Kumar, V.:** Indirect enantioseparation of α -amino acids by reversed-phase liquid chromatography using new chiral derivatizing reagents synthesized from s-triazine chloride. *J. Chromatogr. A*, **1201**, 35–42 (2008).
- Blackmond, D.G.:** The origin of biological homochirality. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**, a002147 (2010).
- Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Lavoinnie, A., Husson, A.:** Glutamine stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through cytosolic O-glycosylation of Sp1 in Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52504–52510 (2003).
- Brückner, H., Jaek, P., Langer, M., Godel, H.:** Liquid chromatographic determination of D-

- amino acids in cheese and cow milk. Implication of starter cultures, amino acid racemases, and rumen microorganisms on formation, and nutritional considerations. *Amino Acids*, **2**, 271–284 (1992).
- Brückner, H., Westhauser, T.:** Chromatographic determination of D-amino acids as native constituents of vegetables and fruits. *Chromatographia*, **39**, 419–426 (1994).
- Chankvetadze, B., Blaschke, G.:** Enantioseparations in capillary electromigration techniques: recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A*, **906**, 309–363 (2001).
- Consden, R., Gordon, A.H., Martin, A.J.:** Qualitative analysis of proteins: a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.*, **38**, 224–32 (1944).
- Corrigan, J.J.:** D-amino acids in animals. *Science*, **164**, 142–149 (1969).
- Csapó, J., Varga-Visi, É., Lóki, K., Albert, C.:** The influence of manufacture on the free D-amino acid content of Cheddar cheese. *Amino Acids*, **32**, 39–43 (2007).
- Cui, Y., Jiang, Z., Sun, J., Yu, J., Li, M., Li, M., Liu, M., Guo, X.:** Enantiomeric purity determination of (L)-amino acids with pre-column derivatization and chiral stationary phase: Development and validation of the method. *Food Chem.*, **158**, 401–407 (2014).
- D’Aniello, A., Guiditta, A.:** Identification of D-aspartic acid in the brain of *Octopus vulgaris* Lam. *J. Neurochem.*, **29**, 1053–1057 (1977).
- D’Aniello, S., Somorjai, I., Garcia-Fernández, J., Topo, E., D’Aniello, A.:** D-Aspartic acid is a novel endogenous neurotransmitter. *FASEB J.*, **25**, 1014–1027 (2011).
- D’Incecco, P., Gatti, M., Hogenboom, J.A., Bottari, B., Rosi, V., Neviani, E., Pellegrino, L.:** Lysozyme affects the microbial catabolism of free arginine in raw-milk hard cheeses. *Food Microbiol.*, **57**, 16–22 (2016).
- Danysz, W., Parsons, C.G.:** Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 597–664 (1998).

- Davankov, V.A., Rogozhin, S.V.:** Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper(II) complexes. *J. Chromatogr. A*, **60**, 280–283 (1971).
- Dunlop, D.S., Neidle, A., McHale, D., Dunlop, D.M., Lajtha, A.:** The presence of free D-aspartic acid in rodents and man. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 27–32 (1986).
- Fisher, G.H., D'Aniello, A., Vetere, A., Padula, L., Cusano, G.P., Man, E.H.:** Free D-aspartate and D-alanine in normal and Alzheimer brain. *Brain Res. Bull.*, **26**, 983–985 (1991).
- Frank, F.C.:** On spontaneous asymmetric synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**, 459–463 (1953).
- Friedman, M.:** Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids.(1999).
- Fujii, N., Takata, T., Fujii, N., Aki, K.:** Isomerization of aspartyl residues in crystallins and its influence upon cataract. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1860**, 183–191 (2016).
- 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).
- Garner, W.H., Spector, A.:** Racemization in human lens: evidence of rapid insolubilization of specific polypeptides in cataract formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3618–3620 (1978).
- Genchi, G.:** An overview on D-amino acids. *Amino Acids*, **49**, 1521–1533 (2017).
- Gerhardt, H., Sievers-Engler, A., Jahanshah, G., Pataj, Z., Ianni, F., Gross, H., Lindner, W., Lämmerhofer, M.:** Methods for the comprehensive structural elucidation of constitution and stereochemistry of lipopeptides. *J. Chromatogr. A*, **1428**, 280–291 (2016).
- Gil-Av, E., Feibush, B., Charles-Sigler, R.:** Separation of enantiomers by gas liquid

- chromatography with an optically active stationary phase. *Tetrahedron Lett.*, **7**, 1009–1015 (1966).
- Henderson, L.M., Snell, E.E.:** A uniform medium for determination of amino acids with various microorganisms. *J. Biol. Chem.*, **172**, 15–29 (1948).
- Hyun, M.H.:** Liquid chromatographic enantioseparations on crown ether-based chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **1467**, 19–32 (2016).
- Ilisz, I., Berkecz, R., Péter, A.:** Application of chiral derivatizing agents in the high-performance liquid chromatographic separation of amino acid enantiomers: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **47**, 1–15 (2008).
- Ilisz, I., Gecse, Z., Pataj, Z., Fülöp, F., Tóth, G., Lindner, W., Péter, A.:** Direct high-performance liquid chromatographic enantioseparation of secondary amino acids on Cinchona alkaloid-based chiral zwitterionic stationary phases. Unusual temperature behavior. *J. Chromatogr. A*, **1363**, 169–177 (2014).
- 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).
- Izco, J., Torre, P., Barcina, Y.:** Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS method. *Food Control*, **11**, 7–11 (2000).
- 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).
- Kabuto, K., Sasaki, Y.:** Highly consistent correlation between absolute configuration of α -amino acids and their shift induced by the n.m.r. chiral shift reagent propylenediaminetetra-acetatoeuropium(III) in aqueous solution. *J. Chem. Soc., Chem.*

Commun., **0**, 670–671 (1987).

Karakawa, S., Shimbo, K., Yamada, N., Mizukoshi, T., Miyano, H., Mita, M., Lindner, W., Hamase, K.: Simultaneous analysis of D-alanine, D-aspartic acid, and D-serine using chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to the rat plasma and tissues. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **115**, 123–129 (2015).

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).

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).

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).

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).

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).

Li, P., Yin, Y.-L., Li, D., Woo Kim, S., Wu, G.: Amino acids and immune function. *Br. J. Nutr.*, **98**, 237 (2007).

Marc Rhoads, J., Wu, G.: Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*, **37**, 111–122 (2009).

Martin, A.J., Synge, R.L.: A new form of chromatogram employing two liquid phases.

- Biochem. J.*, **35**, 1358–68 (1941).
- Matsui, D., Oikawa, T.:** Detection of D-ornithine extracellularly produced by *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032:: *argF*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 2507–2510 (2010).
- McSweeney, P.L.H.:** Biochemistry of cheese ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, **57**, 127–144 (2004).
- 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**, 187–192 (2014).
- Molimard, P., Spinnler, H.E.:** Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *J. Dairy Sci.*, **79**, 169–184 (1996).
- Moore, S., Spackman, D.H., Stein, W.H.:** Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. An improved system. *Anal. Chem.*, **30**, 1185–1190 (1958).
- Moore, S., Stein, W.H.:** Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **176**, 367–388 (1948).
- Mothet, J.P., Parent, A.T., Wolosker, H., Brady, R.O., Linden, D.J., Ferris, C.D., Rogawski, M.A., Snyder, S.H.:** D-Serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 4926–4931 (2000).
- 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).
- Nakano, Y., Konya, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E.:** Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of trace D-

- amino acids. *J. Biosci. Bioeng.*, **123**, 134–138 (2017).
- Newsholme, P., Brennan, L., Rubi, B., Maechler, P.:** New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. *Clin. Sci.*, **108**, 185–94 (2005).
- 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).
- Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., Fukusaki, E.:** Metabolomics-based component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 751–758 (2012).
- Ota, N., Shi, T., Sweedler, J. V:** D-Aspartate acts as a signaling molecule in nervous and neuroendocrine systems. *Amino Acids*, **43**, 1873–1886 (2012).
- Pasiakos, S.M., Pasiakos, M., S.:** Exercise and amino acid anabolic cell signaling and the regulation of skeletal muscle mass. *Nutrients*, **4**, 740–758 (2012).
- Pell, R., Sić, S., Lindner, W.:** Mechanistic investigations of cinchona alkaloid-based zwitterionic chiral stationary phases. *J. Chromatogr. A*, **1269**, 287–296 (2012).
- Poveda, J.M., Cabezas, L., McSweeney, P.L.H.:** Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chem.*, **84**, 213–218 (2004).
- Puchades, R., Lemieux, L., Simard, R.E.:** Evolution of free amino acids during the ripening of cheddar cheese containing added Lactobacilli Strains. *J. Food Sci.*, **54**, 885–888 (1989).
- Quack, M.:** How important is parity violation for molecular and biomolecular chirality? *Angew. Chemie Int. Ed.*, **41**, 4618–4630 (2002).
- Ravindran, R., Loebbermann, J., Nakaya, H.I., Khan, N., Ma, H., Gama, L., Machiah, D.K., Lawson, B., Hakimpour, P., Wang, Y., Li, S., Sharma, P., Kaufman, R.J.,**

- Martinez, J., Pulendran, B.:** The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature*, **531**, 523–527 (2016).
- Reischl, R.J., Lindner, W.:** Methoxyquinoline labeling—A new strategy for the enantioseparation of all chiral proteinogenic amino acids in 1-dimensional liquid chromatography using fluorescence and tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, **1269**, 262–269 (2012).
- 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**, 4149–4159 (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. *PLoS One*, **9**, e86504 (2014).
- Scannone, H., Wellner, D., Novogrodsky, A.:** A study of amino acid oxidase specificity, using a new sensitive assay. *Biochemistry*, **3**, 1742–1745 (1964).
- 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).
- Shen, J., Ikai, T., Okamoto, Y.:** Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1363**, 51–61 (2014).
- Smeianov, V. V., Wechter, P., Broadbent, J.R., Hughes, J.E., Rodríguez, B.T., Christensen, T.K., Ardö, Y., Steele, J.L.:** Comparative high-density microarray analysis of gene expression during growth of *Lactobacillus helveticus* in milk versus rich culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 2661–2672 (2007).
- Spackman, D.H., Stein, W.H., Moore, S.:** Automatic recording apparatus for use in

- chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190–1206 (1958).
- Steensma, M., Kuipers, N.J., de Haan, A.B., Kwant, G.:** Influence of process parameters on extraction equilibria for the chiral separation of amines and amino-alcohols with a chiral crown ether. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 588–597 (2006).
- Stevens, C.M., Halpern, P.E., Gigger, R.P.:** Occurrence of D-amino acids in some natural materials. *J. Biol. Chem.*, **190**, 705–710 (1951).
- Tanaka, K., Yoshino, K., Hayashi, M., Naito, Y., Ohkubo, M.:** Detectors for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **58**, 111–116 (2010).
- 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).
- Tanwar, S., Bhushan, R.:** Enantioresolution of amino acids: a decade's perspective, prospects and challenges. *Chromatographia*, **78**, 1113–1134 (2015).
- Taujenis, L., Olšauskaitė, V., Padarauskas, A.:** Enantioselective determination of protein amino acids in fertilizers by liquid chromatography–tandem mass spectrometry on chiral teicoplanin stationary phase. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 11099–11108 (2014).
- Toyo'oka, T., Ishibashi, M., Terao, T.:** Further studies on the resolution of carboxylic acid enantiomers by liquid chromatography with fluorescence and laser-induced fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*, **278**, 71–81 (1993).
- Visser, W.F., Verhoeven-Duif, N.M., Ophoff, R., Bakker, S., Klomp, L.W., Berger, R., de Koning, T.J.:** A sensitive and simple ultra-high-performance-liquid chromatography–tandem mass spectrometry based method for the quantification of D-amino acids in body fluids. *J. Chromatogr. A*, **1218**, 7130–7136 (2011).

Wu, G.: Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, **37**, 1–17 (2009).

Xiao, Y., Ng, S.-C., Tan, T.T.Y., Wang, Y.: Recent development of cyclodextrin chiral stationary phases and their applications in chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1269**, 52–68 (2012).

Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., Duan, S.: Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 15194–15199 (2003).

発表論文

1. **Yosuke Nakano**, Toshiyuki Yamashita, Masashi Okuno, Eiichiro Fukusaki, Takeshi Bamba, *In vitro* steroid profiling system for the evaluation of endocrine disruptors, *J. Biosci. Bioeng.*, **122**, 370–377 (2016).

2. **Yosuke Nakano**, Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki, Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of trace D-amino acids, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **123**, 134–138 (2017).

※本学位論文に関与する論文

3. Moyu Taniguchi, Yutaka Konya, **Yosuke Nakano**, Eiichiro Fukusaki, Investigation of storage time-dependent alterations of enantioselective amino acid profiles in kimchi using liquid chromatography-time of flight mass spectrometry, *J. Biosci. Bioeng.*, **124**, 414–418 (2017).

4. Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Masahiro Furuno, **Yosuke Nakano**, Nobuo Tanaka, Eiichiro Fukusaki, 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).

5. **Yosuke Nakano**, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki, High-sensitive LC-MS/MS-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites, *J. Biosci. Bioeng.*, *in press* (2019 年 1 月現在).

※本学位論文に関与する論文

書籍

1. 中野洋介，谷口百優，福崎英一郎：機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集，第2章 作用機序解析，3 メタボローム解析，3.1 メタボロミクスの概要，シーエムシー出版，324-328 (2017).
2. 入船智哉，谷口百優，中野洋介，原田里紗，福崎英一郎：解説II-3 メタボロミクスの食品機能解析への応用，工業材料，**65**，43-47 (2017).

学会発表

国際学会・シンポジウムにおける発表

1. ○**Yosuke Nakano**, Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki

“Development of high-sensitive and high-throughput methods for chiral amino acid analysis”

KAIST-OSAKA U symposium 2016, Korea, October, 2016

2. ○**Yosuke Nakano**, Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki

“Development of high-sensitive and rapid methods for chiral amino acid analysis”

Biotechnology and Chemistry for Green Growth, Japan, March, 2017

※本発表は Best poster presentation 賞を受賞した.

3. ○Yuki Uno, Toshikazu Minohata, Jun Watanabe, Hidetoshi Terada, Junko Iida, **Yosuke Nakano**, Eiichiro Fukusaki

“High-throughput comprehensive analysis of trace D and L-amino acids using extra-facile chiral separation and column switching”

65th ASMS Conference, USA, June, 2017

4. ○**Yosuke Nakano**, Moyu Taniguchi, Yutaka Konya, Eiichiro Fukusaki

“Development of high-sensitive and high-throughput methods for chiral amino acid analysis”

Metabolomics2017, Australia, June, 2017

5. ○**Yosuke Nakano**, Moyu Taniguchi, Yutaka Konya, Eiichiro Fukusaki

“Development of LC-MS/MS method for quantitative analysis of trace D-amino acids”

The 3rd International Conference of D-Amino Acid Research, Italy, July, 2017

※本発表は IDAR2017 Travel grant を受賞した.

6. ○**Yosuke Nakano**, Yutaka Konya, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki

“Development of LC-MS/MS method for quantitative analysis of trace D-amino acids”

“Selectivity in Chemoand Biocatalysis” Joint Symposium Aachen–Osaka, Germany,
September, 2017

7. ○Akihiro Kunisawa, Yuki Uno, Shinichi Kawano, Junko Iida, **Yosuke Nakano**, Eiichiro
Fukusaki

“High-throughput comprehensive LC-MS/MS analysis of trace D and L-amino acids using extra-
facile chiral separation and column switching system”

PITTCON2018, USA, November, 2018

8. ○**Yosuke Nakano**, Daisuke Watai, Eiichiro Fukusaki

“Chiral separation of Glycine-based dipeptide using LC-MS/MS”

Biotechnology and Chemistry for Green Growth, Japan, March, 2018

9. ○Moyu Taniguchi, Yutaka Konya, **Yosuke Nakano**, Eiichiro Fukusaki

“Investigation of storage time-dependent alterations of enantioselective amino acid profiles in
kimchi using LC-TOFMS”

Biotechnology and Chemistry for Green Growth, Japan, March, 2018

10. ○**Yosuke Nakano**, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki

“Wide-targeted LC-MS/MS-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and
related metabolites”

Metabolomics2018, USA, June, 2018

※本発表は 2018 Metabolomics Society Student Travel Award を受賞した

11. ○ Moyu Taniguchi, Asako Shimotori, **Yosuke Nakano**, Shuichi Shimma, Eiichiro Fukusaki

“Metabolomics-based profiling of taste components specially focusing on D-amino acids in Kijoshu (a Japanese sake)”

Metabolomics2018, USA, June, 2018

12. ○ **Yosuke Nakano**, Moyu Taniguchi, Eiichiro Fukusaki

“High-throughput LC-MS/MS-based chiral metabolic profiling focusing on amino acids and related metabolites”

XXII International Mass Spectrometry Conference, Italy, August, 2018

13. ○ Yutaka Umakoshi, **Yosuke Nakano**, Eiichiro Fukusaki

“Development of automatic switching valve system based on LC-MS/MS method for chiral amino acids profiling in rat urine”

Japan-Indonesia International Scientific Conference 2018 Scholar Summit, Japan, October, 2018

国内学会・シンポジウムにおける発表

1. ○中野洋介，紺屋豊，谷口百優，福崎英一郎

「D-アミノ酸の微量定量のための LC-MS/MS 分析法の開発」

第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会，高知，2016 年 9 月

2. ○中野洋介，紺屋豊，谷口百優，福崎英一郎

「D-アミノ酸の微量定量のための LC-MS/MS 分析法の開発」

第 68 回日本生物工学会大会，富山，2016 年 9 月

3. ○箕畑俊和，宇野由紀，渡辺淳，寺田英敏，飯田順子，中野洋介，福崎英一郎

「カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システムの検討」

日本薬学会第 137 年会，2017 年 3 月

4. ○中野洋介，紺屋豊，谷口百優，福崎英一郎

「食品中の D-アミノ酸分析に資する LC-MS/MS 法の開発」

日本農芸化学会 2017 年度大会，京都，2017 年 3 月

5. ○渡辺淳，宇野由紀，箕畑俊和，寺田英敏，飯田順子，中野洋介，福崎英一郎

「カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システムの検討」

日本農芸化学会 2017 年度大会，2017 年 3 月

6. ○箕畑俊和，宇野由紀，渡辺淳，寺田英敏，飯田順子，中野洋介，福崎英一郎

「カラムスイッチングを用いたキラルアミノ酸分析システムの検討」

第 65 回質量分析総合討論会，茨城，2017 年 5 月

7. ○中野洋介, 紺屋豊, 谷口百優, 福崎英一郎

「ターゲットキラルメタボロミクスに資する高感度 LC-MS/MS 分析法の開発」

第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月

8. ○谷口百優, 紺屋豊, 中野洋介, 福崎英一郎

「キムチ中 D-アミノ酸の保存期間における経時的プロファイル変動の調査」

第 69 回日本生物工学会大会, 東京, 2017 年 9 月

9. ○中野洋介, 紺屋豊, 谷口百優, 福崎英一郎

「ターゲットキラルメタボロミクスに資する高感度 LC-MS/MS 分析法の開発」

第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月

10. ○谷口百優, 紺屋豊, 中野洋介, 福崎英一郎

「キムチ中 D-アミノ酸の保存期間における経時的プロファイル変動の調査」

第 11 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2017 年 11 月

11. ○中野洋介, 紺屋豊, 谷口百優, 福崎英一郎

「LC-MS/MS を用いた高感度 D-アミノ酸分析法の開発」

新アミノ酸分析研究会第 7 回学術講演会, 東京, 2017 年 12 月

12. ○谷口百優, 紺屋豊, 中野洋介, 福崎英一郎

「LC-TOFMS を用いたアミノ酸鏡像体を含むアミン類の高速一斉分析法の開発と発酵食品への応用」

新アミノ酸分析研究会第 7 回学術講演会, 東京, 2017 年 12 月

13. ○中野洋介，谷口百優，福崎英一郎

「LC-MS/MS を用いたキラルメタボローム分析法の開発と食品分析への応用」

日本農芸化学会 2018 年度大会，愛知，2018 年 3 月

14. ○中野洋介，馬越 泰，福崎英一郎

「バルブスイッチング LC-MS/MS に基づくキラルアミノ酸の多検体分析」

第 70 回日本生物工学会大会，大阪，2018 年 9 月

15. ○馬越 泰，中野洋介，福崎英一郎

「キラルアミノ酸分析に資するバルブスイッチング LC-MS/MS 法の確立」

第 12 回メタボロームシンポジウム，山形，2018 年 10 月

謝辞

本博士論文は、著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻博士課程に在籍し行った研究成果をまとめたものです。

本研究を遂行するに当たり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎 教授に深甚の謝意を表します。

本論文作成に当たり有益なご指導、ご助言、およびご校閲を賜りました大阪大学産業科学研究所 永井健治 教授、大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 内山進教授に厚く感謝申し上げます。

また、日頃から貴重なご助言と励ましの言葉を頂きました新聞秀一 准教授ならびに Sastia Prama PUTRI 助教に心から感謝申し上げます。

著者が研究室に配属された学部四年生の時から、研究活動に関するご指導、ご助言のみならず研究室生活全般において大変お世話になりました九州大学生体防御医学研究所兼大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 馬場健史 教授、和泉自泰 准教授、並びに大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 小野比佐好 元助教に厚く御礼申し上げます。

本研究に使用した装置に関して、深いご理解とご支援を頂きました株式会社島津製作所、その他本論文に直接関与しない研究も含め共同研究などでお世話になりました大学、民間企業、その他研究機関の方々に感謝致します。

また、本研究を進めるにあたり、細部に渡り懇切なるご指導を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻 古野正浩 研究員、ならびに九州大学生体防御医学研究所 紺屋豊 学術研究員に深謝致します。

本研究を行うに際し、多大なご協力とご支援を賜りました大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生物資源工学領域メソッド開発チームの寺田英敏 修士，谷口百優 修士，林佑志 学士，新川翔也 学士，馬越泰 学士，綿井大輔 学士，山本華菜 氏，吉川航平 氏および諸先輩方，学生諸氏，研究員，事務補佐の方々に心から感謝の意を

表します.

尚, 本研究は日本学術振興会特別研究員奨励費 (課題番号:17J013230) および日本医療研究開発機構 (AMED) の革新的先端研究開発支援事業 (疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出, 課題番号:JP18gm0710005) の助成を受け, 遂行されました.

最後に, いつも温かく見守ってくれた父, 美味しいご飯を用意してくれた母, 親身に応援してくれた姉, いろいろな形で全面的に支え続けてくれた家族そして親族, サポートし続けてくれた多くの友人に深い感謝の意を表して謝辞と致します.

付録

第一章に関わる付録（掲載順）

資料 S1. 指定添加物リスト（規則別表第 1）の抜粋

図 S1. 分析技術の検出感度比較および本研究における感度レベルの定義

第三章に関わる付録（掲載順）

図 S2. 新しく追加したターゲット化合物の構造

図 S3. CROWNPAK CR-I(+)を用いて得られたターゲット化合物のクロマトグラム
(保持時間 1.3–2.7 min)

図 S4. CROWNPAK CR-I(+)を用いて得られたターゲット化合物のクロマトグラム
(保持時間 2.7–15.8 min)

図 S5. 共溶出する化合物のクロマトグラムとそれらの分離ピーク

表 S1. 各々のチーズにおける matrix factor (%)

図 S6. チーズ中で検出された代謝物のクロマトグラムの一例

表 S2. 検出されたチーズ中の代謝物濃度 (nmol/mL//1g cheese)

資料 S1. 指定添加物リスト (規則別表第 1) の抜粋

公益財団法人 日本食品化学研究振興財団

指定添加物リスト (規則別表第 1)

平成30年7月3日改正

1	亜鉛塩類 (グルコン酸亜鉛及び硫酸亜鉛に限る。)	Zinc salts (limited to Zinc Gluconate and Zinc Sulfate)
2	亜塩素酸水	Chlorous Acid Water
3	亜塩素酸ナトリウム	Sodium Chlorite
4	亜酸化窒素	Nitrous Oxide
5	アジピン酸	Adipic Acid
6	亜硝酸ナトリウム	Sodium Nitrite
7	L-アスコルビン酸 (別名ビタミンC)	L-Ascorbic Acid (Vitamin C)
8	L-アスコルビン酸カルシウム	Calcium L-Ascorbate
9	L-アスコルビン酸2-グルコシド	L-Ascorbic Acid 2-glucoside
10	L-アスコルビン酸ステアリン酸エステル (別名ビタミンCステアレート)	L-Ascorbic Stearate (Vitamin C Stearate)
11	L-アスコルビン酸ナトリウム (別名ビタミンCナトリウム)	Sodium L-Ascorbate (Vitamin C Sodium)
12	L-アスコルビン酸パルミチン酸エステル (別名ビタミンCパルミテート)	L-Ascorbic Palmitate (Vitamin C Palmitate)
13	アスパラギナーゼ	Asparaginase
14	L-アスパラギン酸ナトリウム	Monosodium L-Aspartate
15	アスパルテーム (別名L- α -アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル)	Aspartame (L- α -Aspartyl-L-Phenylalanine Methyl Ester)
16	アセスルファムカリウム (別名アセスルファムK)	Acesulfame Potassium (Acesulfame K)
17	アセチル化アジピン酸架橋デンプン	Acetylated Distarch Adipate
18	アセチル化酸化デンプン	Acetylated Oxidized Starch
19	アセチル化リン酸架橋デンプン	Acetylated Distarch Phosphate
20	アセトアルデヒド	Acetaldehyde
21	アセト酢酸エチル	Ethyl Acetoacetate
22	アセトフェノン	Acetophenone
23	アセトン	Acetone
24	亜セレン酸ナトリウム	Sodium selenite
25	アゾキシストロビン	Azoxystrobin
26	アドバンテーム	Advantame
27	アニスアルデヒド (別名パラメトキシベンズアルデヒド)	Anisaldehyde (<i>p</i> -Methoxybenzaldehyde)
28	β -アポ-8'-カロテナール	b-apo-8'-carotenal
29	(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ジメチルスルホニウム塩化物	(3-Amino-3-carboxypropyl)dimethylsulfonium chloride
30	アミルアルコール	Amyl alcohol
31	α -アミルシンナムアルデヒド (別名 α -アミルシンナミックアルデヒド)	α -Amylcinnamaldehyde (α -Amylcinnamic Aldehyde)
32	DL-アラニン	DL-Alanine
33	亜硫酸ナトリウム (別名亜硫酸ソーダ)	Sodium Sulfite
34	L-アルギニンL-グルタミン酸塩	L-Arginine L-Glutamate

指定添加物リスト（規則別表第1）

平成30年7月3日改正

250	チアミンラウリル硫酸塩（別名ビタミンB1ラウリル硫酸塩）	Thiamine Dilaurylsulfate (Vitamin B1 Dilaurylsulfate)
251	チオエーテル類（毒性が激しいと一般に認められるものを除く。）	Thioethers (except those generally recognized as highly toxic)
252	チオール類（別名チオアルコール類）（毒性が激しいと一般に認められるものを除く。）	Thiols (Thioalcohols) (except those generally recognized as highly toxic)
253	L-テアニン	L-Theanine
254	デカナル（別名デシルアルデヒド）	Decanal (Decyl Aldehyde)
255	デカノール（別名デシルアルコール）	Decanol (Decyl Alcohol)
256	デカン酸エチル（別名カプリン酸エチル）	Ethyl Decanoate (Ethyl Caprate)
257	鉄クロロフィリンナトリウム	Sodium Iron Chlorophyllin
258	5,6,7,8-テトラヒドロキノキサリン	5,6,7,8-Tetrahydroquinoxaline
259	2,3,5,6-テトラメチルピラジン	2,3,5,6-Tetramethylpyrazine
260	デヒドロ酢酸ナトリウム	Sodium Dehydroacetate
261	テルピネオール	Terpineol
262	テルペン系炭化水素類	Terpene Hydrocarbons
263	デンプングリコール酸ナトリウム	Sodium Carboxymethylstarch
264	銅塩類（グルコン酸銅及び硫酸銅に限る。）	Copper Salts (limited to Copper Gluconate and Cupric Sulfate)
265	銅クロロフィリンナトリウム	Sodium Copper Chlorophyllin
266	銅クロロフィル	Copper Chlorophyll
267	<i>d</i> / <i>l</i> - α -トコフェロール	<i>d</i> / <i>l</i> - α -Tocopherol
268	トコフェロール酢酸エステル	<i>all-rac</i> - α -Tocopheryl Acetate
269	<i>d</i> - α -トコフェロール酢酸エステル	<i>R,R,R</i> - α -Tocopheryl Acetate
270	DL-トリプトファン	DL-Tryptophan
271	L-トリプトファン	L-Tryptophan
272	トリメチルアミン	Trimethylamine
273	2,3,5-トリメチルピラジン	2,3,5-Trimethylpyrazine
274	DL-トレオニン（別名DL-スレオニン）	DL-Threonine
275	L-トレオニン（別名L-スレオニン）	L-Threonine
276	ナイシン	Nisin
277	ナタマイシン（別名ピマリシン）	Natamycin
278	ナトリウムメトキシド（別名ナトリウムメチラート）	Sodium Methoxide (Sodium Methylate)
279	ニコチン酸（別名ナイアシン）	Nicotinic Acid (Niacin)
280	ニコチン酸アミド（別名ナイアシンアミド）	Nicotinamide (Niacinamide)
281	二酸化硫黄（別名無水亜硫酸）	Sulfur Dioxide (Sulfurous Acid, Anhydride)
282	二酸化塩素	Chlorine Dioxide
283	二酸化ケイ素（別名シリカゲル）	Silicon Dioxide (Silica Gel)
284	二酸化炭素（別名炭酸ガス）	Carbon Dioxide (Carbonic Acid, Gas)
285	二酸化チタン	Titanium Dioxide
286	乳酸	Lactic Acid
287	乳酸カリウム	Potassium Lactate

指定添加物リスト（規則別表第1）

平成30年7月3日改正

352	プロパノール	Propanol
353	プロピオンアルデヒド	Propionaldehyde
354	プロピオン酸	Propionic Acid
355	プロピオン酸イソアミル	Isoamyl Propionate
356	プロピオン酸エチル	Ethyl Propionate
357	プロピオン酸カルシウム	Calcium Propionate
358	プロピオン酸ナトリウム	Sodium Propionate
359	プロピオン酸ベンジル	Benzyl Propionate
360	プロピコナゾール	Propiconazole
361	プロピレングリコール	Propylene Glycol
362	プロピレングリコール脂肪酸エステル	Propylene Glycol Esters of Fatty Acids
363	ヘキサン酸（別名カプロン酸）	Hexanoic Acid (Caproic Acid)
364	ヘキサン酸アリル（別名カプロン酸アリル）	Allyl Hexanoate (Allyl Caproate)
365	ヘキサン酸エチル（別名カプロン酸エチル）	Ethyl Hexanoate (Ethyl Caproate)
366	ヘプタン酸エチル（別名エナント酸エチル）	Ethyl Heptanoate (Ethyl Enanthate)
367	l-ペリラルデヒド（別名l-ペリラルデヒド）	l-Perillaldehyde
368	ベンジルアルコール	Benzyl Alcohol
369	ベンズアルデヒド	Benzaldehyde
370	2-ペンタノール（別名sec-アミルアルコール）	2-Pentanol (sec-Amyl alcohol)
371	trans-2-ペンテナール	trans-2-Pentenal
372	1-ペンテン-3-オール	1-Penten-3-ol
373	芳香族アルコール類	Aromatic Alcohols
374	芳香族アルデヒド類（毒性が激しいと一般に認められるものを除く。）	Aromatic Aldehydes (except those generally recognized as highly toxic)
375	没食子酸プロピル	Propyl Gallate
376	ポリアクリル酸ナトリウム	Sodium Polyacrylate
377	ポリイソブチレン（別名ブチルゴム）	Polyisobutylene (Butyl Rubber)
378	ポリソルベート20	Polysorbate 20
379	ポリソルベート60	Polysorbate 60
380	ポリソルベート65	Polysorbate 65
381	ポリソルベート80	Polysorbate 80
382	ポリビニルピロリドン	Polyvinylpyrrolidone
383	ポリビニルポリピロリドン	Polyvinylpolypyrrolidone
384	ポリブテン（別名ポリブチレン）	Polybutene (Polybutylene)
385	ポリリン酸カリウム	Potassium Polyphosphate
386	ポリリン酸ナトリウム	Sodium Polyphosphate
387	d-ボルネオール	d-Borneol
388	マルトール	Maltol
389	D-マンニトール（別名D-マンニット）	D-Mannitol (D-Mannite)
390	メタリン酸カリウム	Potassium Metaphosphate
391	メタリン酸ナトリウム	Sodium Metaphosphate
392	DL-メチオニン	DL-Methionine

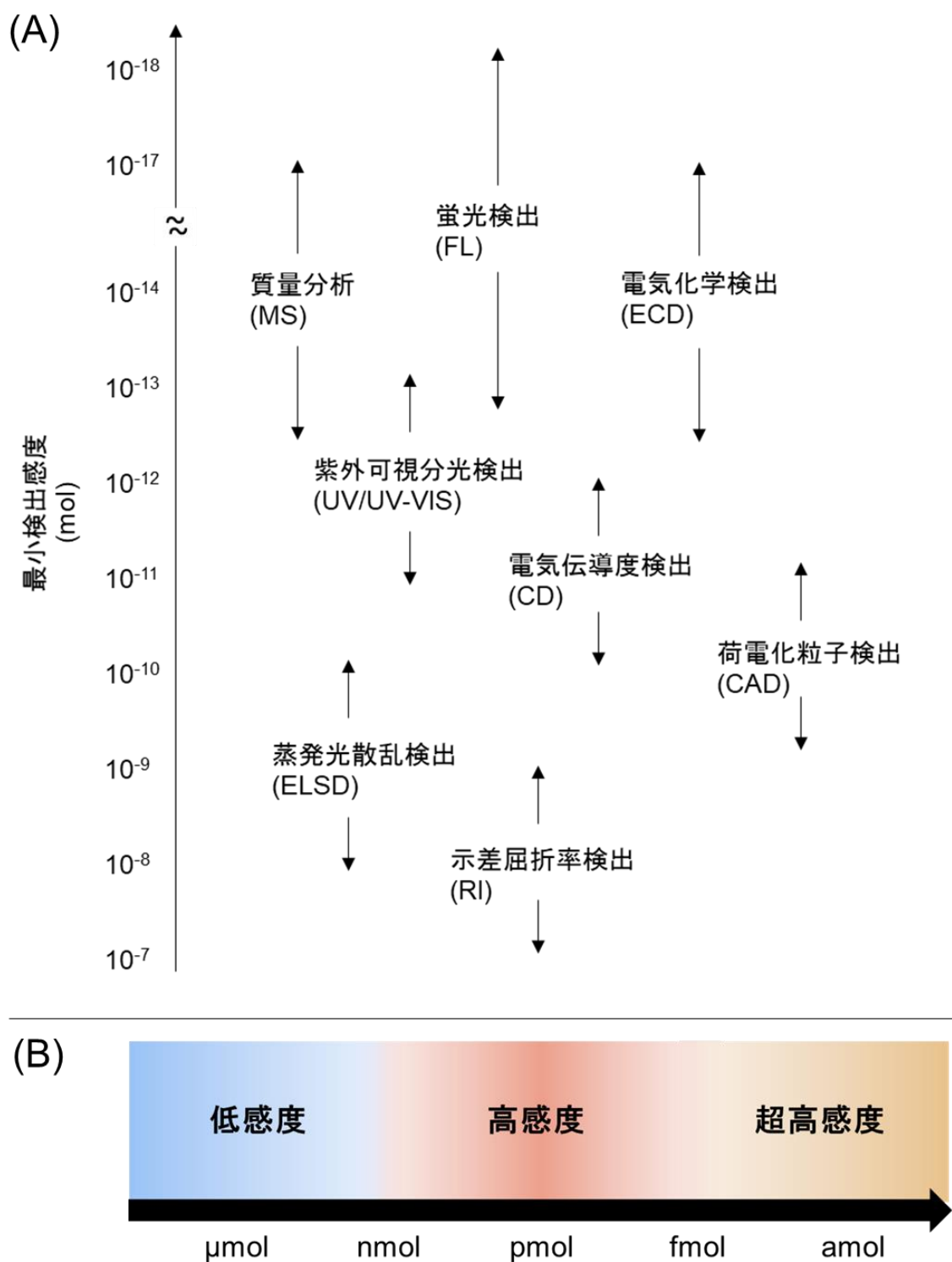


図 S1. 分子検出手法の感度比較および本研究における感度レベルの定義

(A) 分離分析手法に頻用される検出技術の最小検出感度の比較を示した (参考：JIS K 0124:2011「高速液体クロマトグラフィー通則」)。

(B) 本研究では，LC-MS 分析によって検出可能な物質質量レベルごとに低感度，高感度，超高感度とカテゴリー化した。

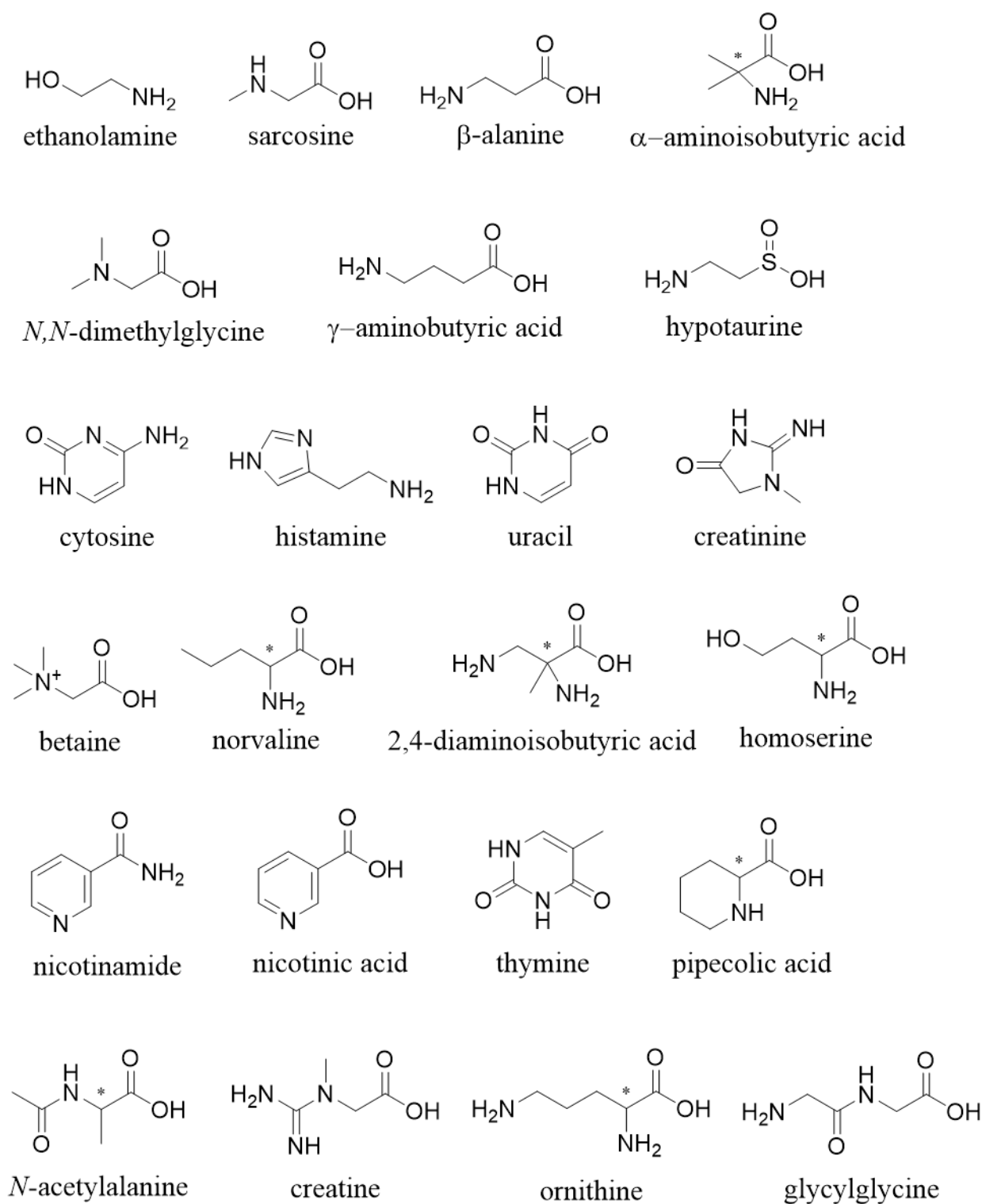


図 S2. 新しく追加したターゲット化合物の構造

タンパク質構成アミノ酸に加えて、新たに対象とした化合物を分子量順に表した。分子中のアスタリスクを付した炭素はキラル中心を示す（但し、ヌクレオシドのリボース、デオキシリボース部に存在する不斉炭素については、区別・考慮しない）。

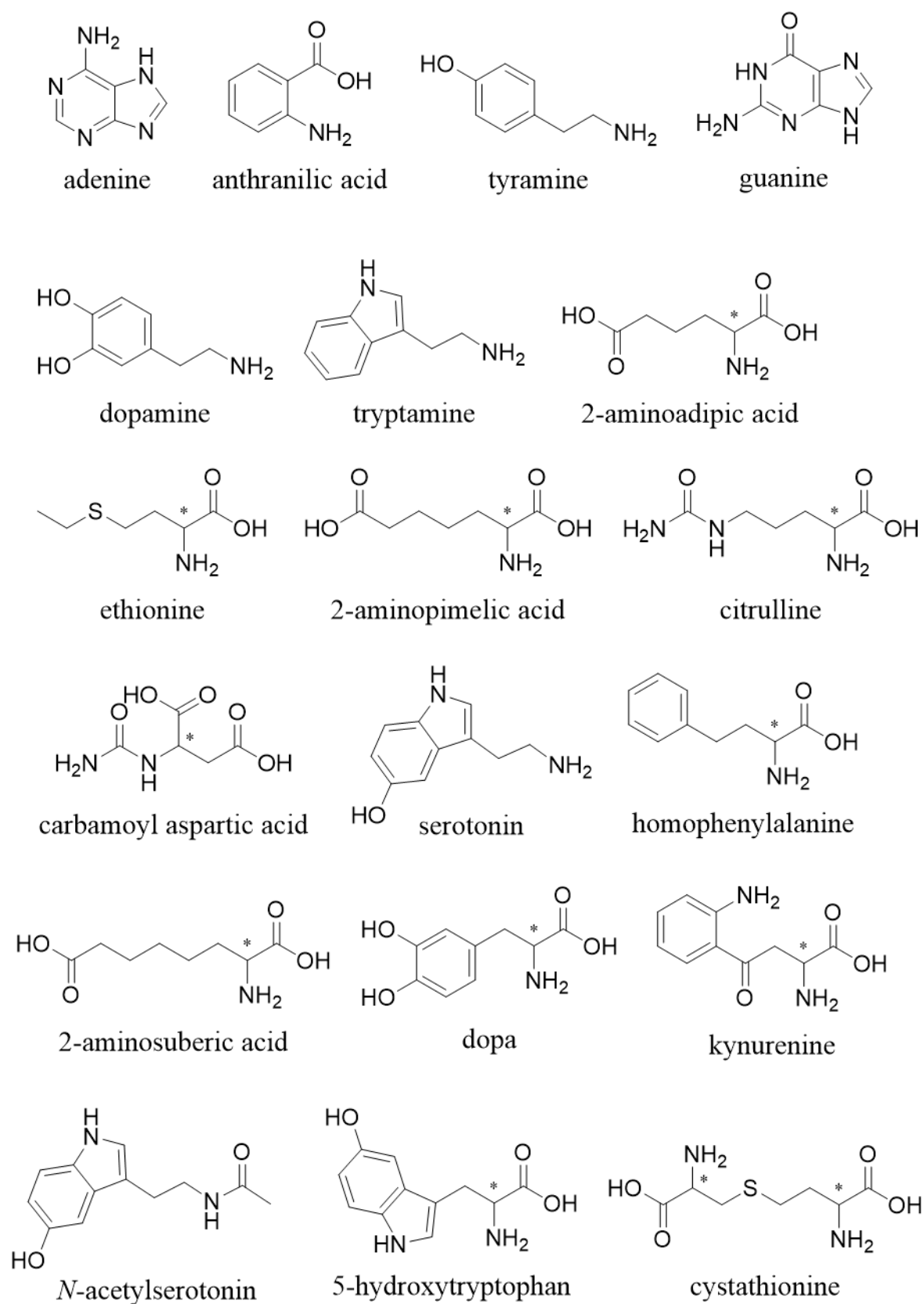


図 S2. 新しく追加したターゲット化合物の構造 (続き)

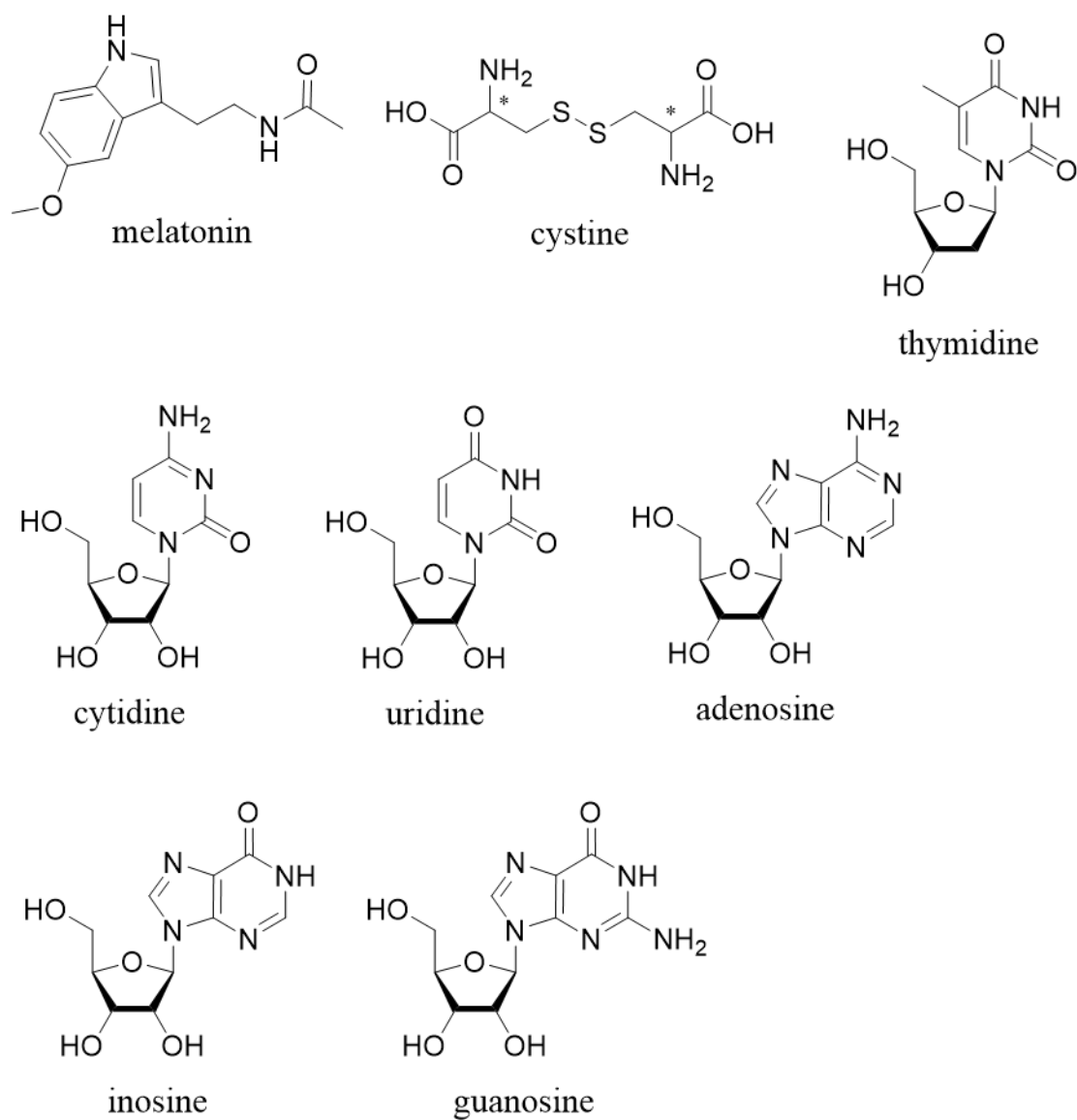


図 S2. 新しく追加したターゲット化合物の構造 (続き)

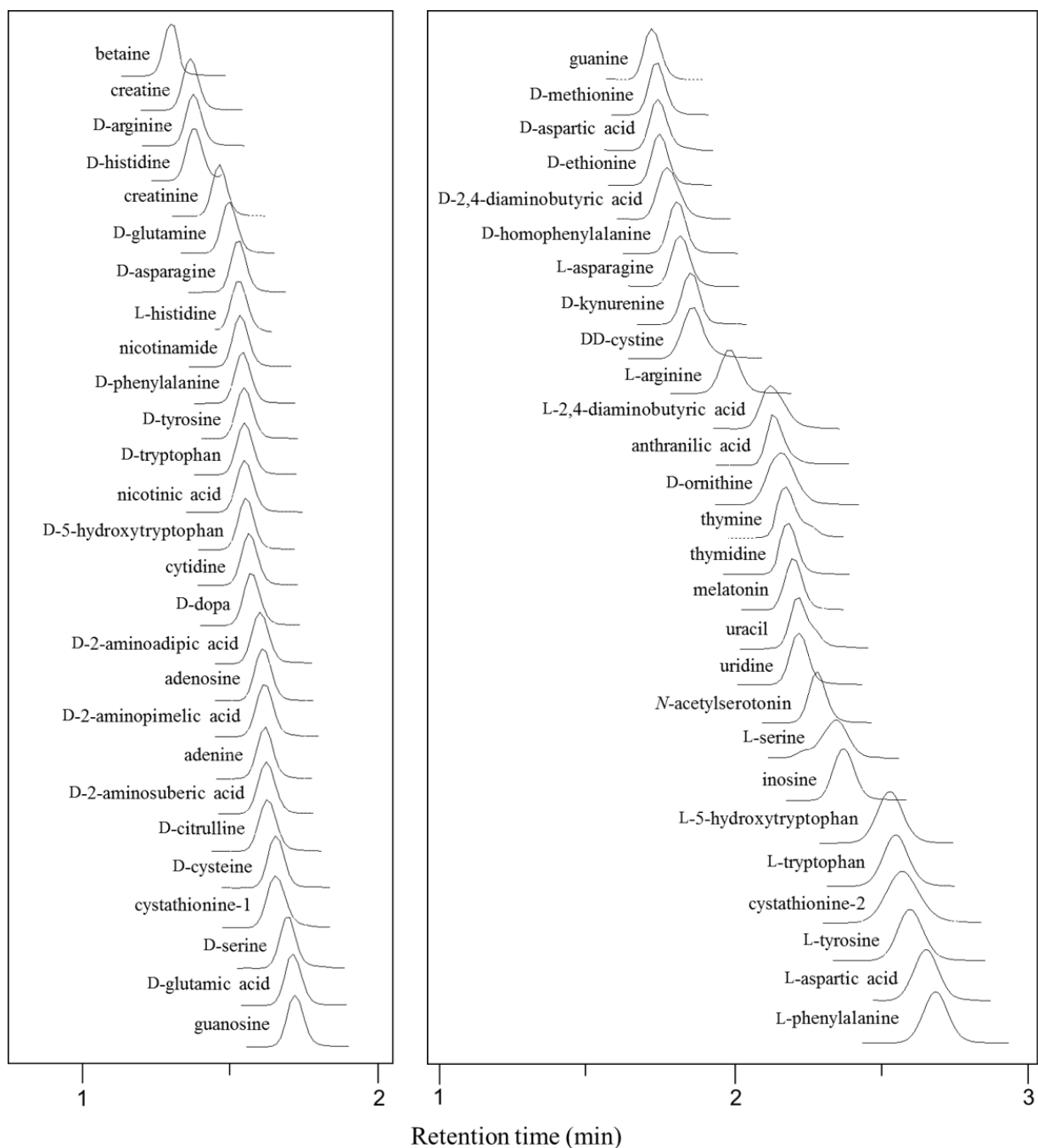


図 S3. CROWNPAK CR-I(+)を用いて得られたターゲット化合物のクロマトグラム (保持時間 1.3–2.7 min)

図 13 で示した化合物のクロマトグラムは除外した.

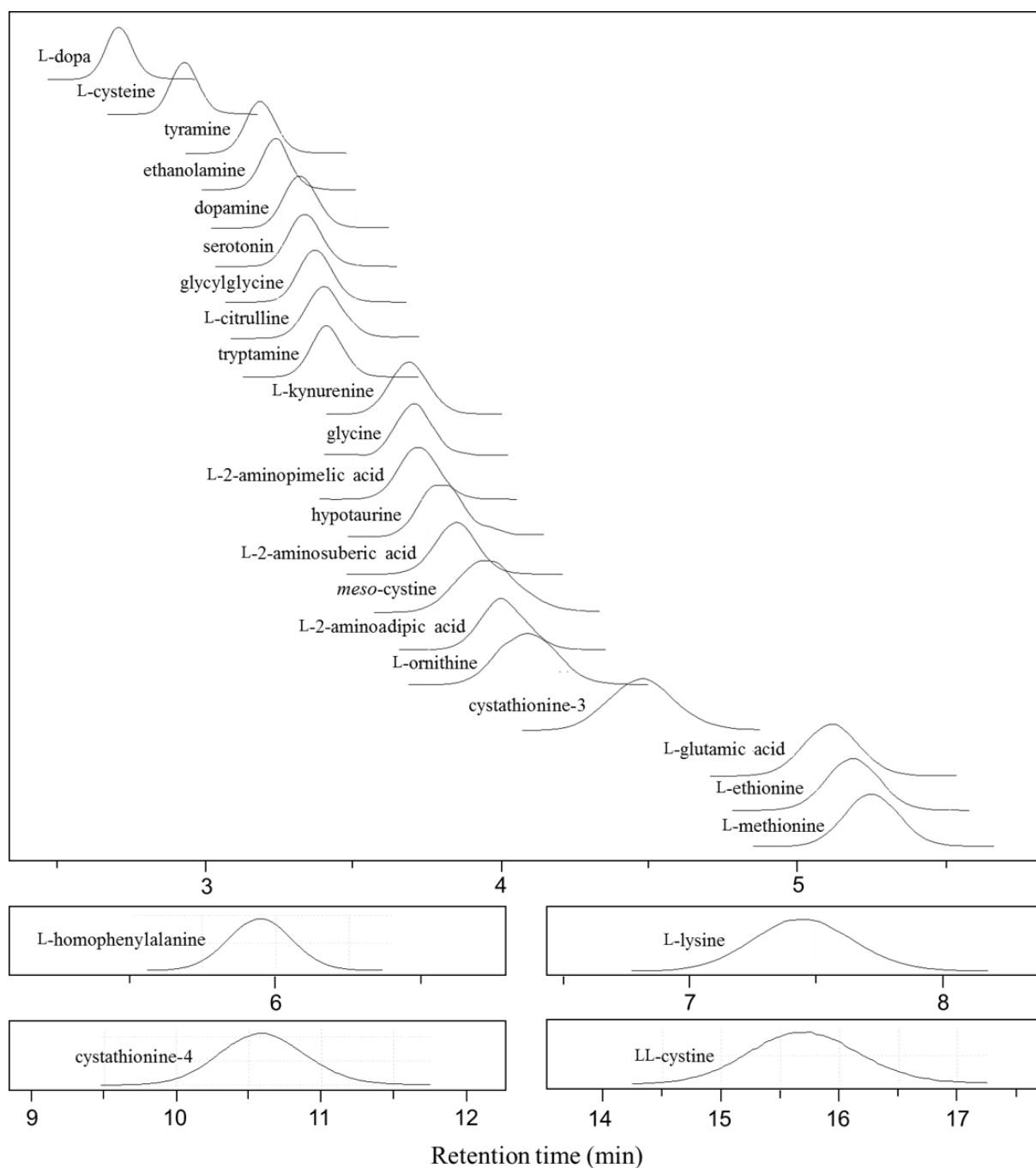


図 S4. CROWNPAK CR-I(+)を用いて得られたターゲット化合物のクロマトグラム (保持時間 2.7–15.8 min)

図 13 で示した化合物のクロマトグラムは除外した。

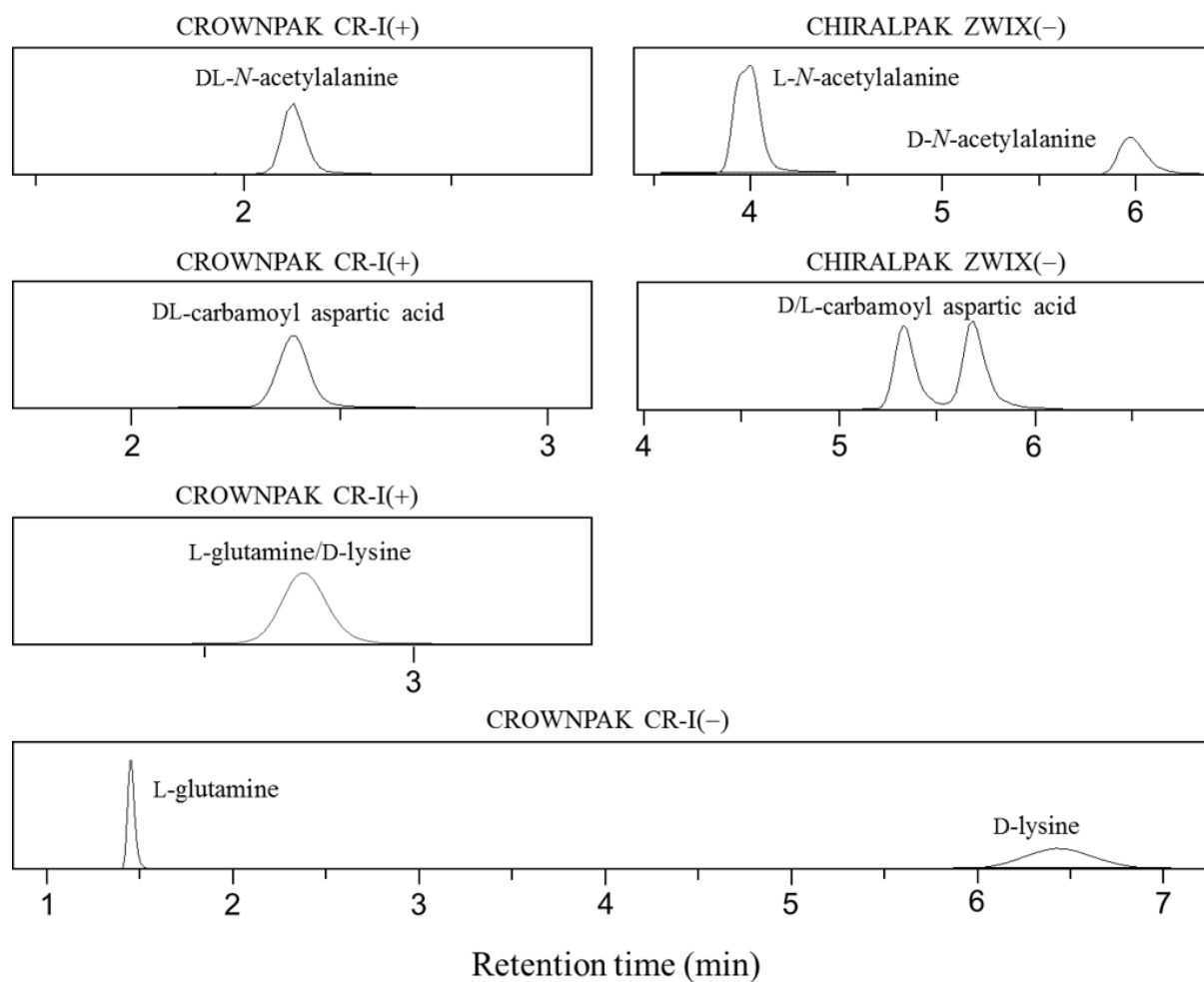


図 S5. 共溶出する化合物のクロマトグラムとそれらの分離ピーク

CROWNPAK CR-I(+)で共溶出した化合物は CROWNPAK CR-I(-)あるいは CHIRALPAK ZWIX(-)を用いて分離が達成された．ここには，図 14 で示したクロマトグラムとは異なる例を示した．L-glutamine と D-lysine の分離には，CR-I(-)を，DL-N-acetylalanine および carbamoyl aspartic acid には ZWIX(-)をそれぞれ使用した．carbamoyl aspartic acid に関しては D-体あるいは L-体単体の標準品が入手不可なため，上図では D/L-carbamoyl aspartic acid と表記した．

表 S1. 各々のチーズにおける **matrix factor (%)**

	6 months	18 months	26 months
betaine	96	99	104
creatine	98	110	103
D-arginine	91	106	114
D-histidine	90	103	99
creatinine	90	97	99
L-histidine	118	127	117
D-asparagine	95	109	101
D-leucine	90	89	96
cytidine	86	87	89
cytosine	85	100	99
adenosine	85	87	89
adenine	78	88	88
D-citrulline	86	91	92
<i>L-allo</i> -threonine	83	88	90
D-serine	86	89	89
guanosine	78	84	85
guanine	84	88	90
D-glutamic acid	87	93	99
histamine	74	80	79
D-methionine	92	92	98
D-aspartic acid	95	73	82
<i>L-allo</i> -isoleucine	72	73	74
L-valine	83	93	101
L-asparagine	90	101	116
DD-cystine	86	89	92
D-alanine	92	100	120
L-isoleucine	96	106	100

L-arginine	87	94	96
L-threonine	114	137	142
thymidine	86	101	100
uridine	72	81	88
L-serine	88	89	114
inosine	90	96	100
L-tryptophan	82	86	87
L-tyrosine	105	91	123
L-aspartic acid	73	85	89
L-phenylalanine	82	89	111
L-cysteine	94	99	100
L- α -aminobutyric acid	88	94	94
tyramine	81	85	83
ethanolamine	83	90	89
glycylglycine	81	91	89
L-citrulline	84	94	113
γ -aminobutyric acid	84	91	91
glycine	105	104	91
L-leucine	85	95	117
<i>meso</i> -cystine	79	86	87
L-ornithine	87	96	113
L-alanine	113	101	111
L-glutamic acid	92	106	131
L-methionine	103	102	109
L-lysine	100	109	141
LL-cystine	78	80	73
L-glutamine	123	108	101
D-lysine	112	104	102
L-pipecolic acid	92	83	91
D- <i>N</i> -acetylalanine	93	97	97

D-proline	87	77	85
L-proline	98	92	113

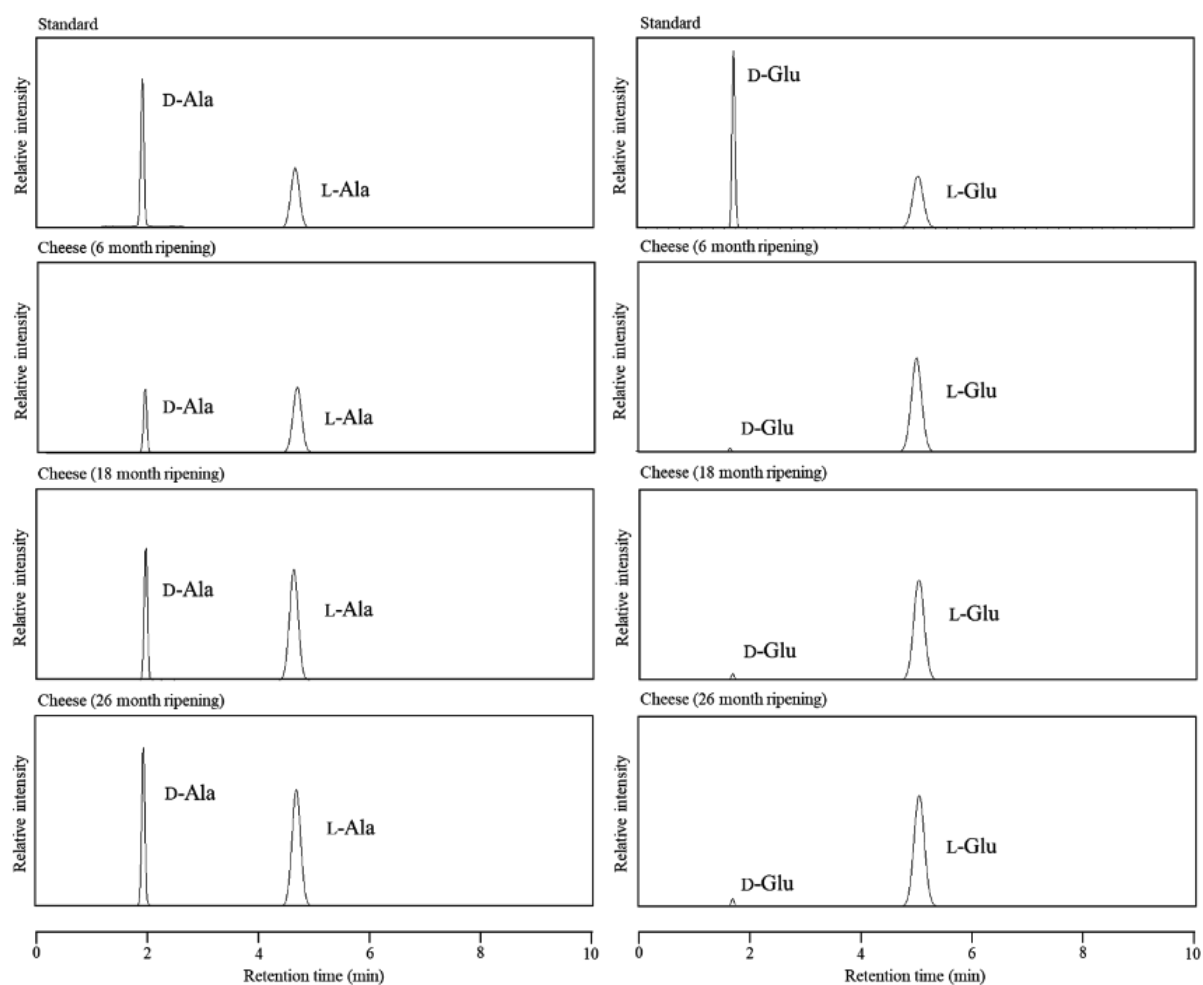


図 S5. チーズ中で検出された代謝物のクロマトグラムの一例

図中では alanine (左), glutamic acid (右)の例を示した. 上から順に, 標準品, 6 カ月, 18 カ月, 26 カ月熟成チーズ分析で得られたクロマトグラムを並べた.

表 S2. 検出されたチーズ中の代謝物濃度 (nmol/mL)

	6 months	18 months	26 months
betaine	198	279	312
creatine	750	753	649
D-arginine	1389	1476	987
D-histidine	21	36	61
creatinine	91	84	60
L-histidine	10622	27619	31848
D-asparagine	8	52	90
D-leucine	64	111	89
cytidine	36	64	76
cytosine	144	282	299
adenosine	trace	trace	trace
adenine	trace	trace	trace
D-citrulline	trace	trace	trace
L- <i>allo</i> -threonine	6	549	616
D-serine	207	438	534
guanosine	89	26	10
guanine	751	1254	603
D-glutamic acid	1360	2495	3503
histamine	N.D.	132	27
D-methionine	N.D.	18	16
D-aspartic acid	1257	5501	6849
L- <i>allo</i> -isoleucine	55	255	470
L-valine	73079	73973	71069
L-asparagine	67625	88839	82991
DD-cystine	N.D.	N.D.	14
D-alanine	7192	16475	18974
L-isoleucine	79216	160849	132240

L-arginine	1466	689	303
L-threonine	19723	29623	33683
thymidine	19	trace	N.D.
uridine	93	83	69
L-serine	36443	55436	53406
inosine	19	trace	trace
L-tryptophan	2347	3988	3548
L-tyrosine	17033	28731	31023
L-aspartic acid	8354	6751	7993
L-phenylalanine	46641	60714	60146
L-cysteine	52	68	N.D.
L- α -aminobutyric acid	22	42	54
tyramine	N.D.	38	N.D.
ethanolamine	414	661	869
glycylglycine	N.D.	trace	29
L-citrulline	5503	10810	11256
γ -aminobutyric acid	96	126	361
glycine	10471	29305	36254
L-leucine	110255	145030	85405
<i>meso</i> -cystine	N.D.	13	24
L-ornithine	11433	15522	13776
L-alanine	12248	28546	34285
L-glutamic acid	136685	213550	210321
L-methionine	14172	29402	27086
L-lysine	59779	103510	128471
LL-cystine	14	28	92
L-glutamine	38164	29573	17858
D-lysine	561	601	626
L-pipecolic acid	91	148	130
D- <i>N</i> -acetylalanine	579	563	444

D-proline	147	235	111
L-proline	71308	139528	164438

N.D. : 非検出, trace : 定量下限以下