



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                                   |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 多次元高速液体クロマトグラフィーを用いた 地球外試料中のキラルアミノ酸分析                                                             |
| Author(s)        | 古庄, 仰; 浜瀬, 健司                                                                                     |
| Citation         | 低温科学, 78, 287-294                                                                                 |
| Issue Date       | 2020-03-24                                                                                        |
| DOI              | <a href="https://doi.org/10.14943/lowtemsci.78.287">https://doi.org/10.14943/lowtemsci.78.287</a> |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/77795">https://hdl.handle.net/2115/77795</a>                 |
| Type             | departmental bulletin paper                                                                       |
| File Information | 32_p287-294.LT78.pdf                                                                              |



# 多次元高速液体クロマトグラフィーを用いた 地球外試料中のキラルアミノ酸分析

古庄 仰<sup>1)</sup>, 浜瀬 健司<sup>1)\*</sup>

2019 年 10 月 31 日受付, 2019 年 11 月 22 日受理

高等生物体内では L-アミノ酸が過剰に存在して主に利用されており, 鏡像異性体の関係にある D-アミノ酸は殆ど存在しない. この L 型過剰はホモキラリティと呼ばれ, その偏りの起源解明として地球外試料中のキラルアミノ酸分析が注目されている. 多様な構造異性体を有する様々な有機化合物が含まれる地球外試料中で微量キラルアミノ酸を分析するためには, 高い感度と選択性を兼ね備えた分析法が必須である. アミノ酸の蛍光誘導体化と複数の分離機構を組み合わせた多次元 HPLC は, 最も有用な分析法の一つである. 本項では多次元 HPLC の開発と様々な試料への適用例, ならびに多次元 HPLC を用いた炭素質隕石中のキラルアミノ酸分析について報告する.

## Chiral amino acid analysis of extraterrestrial samples using multi-dimensional HPLC

Aogu Furusho<sup>1</sup> and Kenji Hamase<sup>1</sup>

The excess of L-amino acids in higher organisms is called "homochirality," and its origin is still unclear. Various amino acids have been found in carbonaceous chondrites, and their chiral properties are gathering attention for their use in elucidating chemical evolution, including the origin of homochirality. Highly sensitive and selective multi-dimensional HPLC systems combining multiple columns of various separation modes are some of the most suitable tools for determining trace amounts of chiral amino acids in extraterrestrial samples, which include various organic compounds with uncountable structural isomers. In this article, the development of a multi-dimensional HPLC system and its application to various real-world samples are described, including an application in chiral amino acid analysis in carbonaceous chondrites.

キーワード: アミノ酸, ホモキラリティ, 光学分割, 多次元 HPLC  
amino acid, homochirality, enantiomer separation, multi-dimensional HPLC

### 1. はじめに

アミノ酸は分子内にカルボキシ基とアミノ基を有する化合物の総称であり, 中でも  $\alpha$  位の炭素に両官能基が結合した  $\alpha$ -アミノ酸はタンパク質の構成要素や生理活性物質として生体内で生命活動に必須な役割を担っている. タンパク質を構成する  $\alpha$ -アミノ酸のうちグリシンを除く 19 種は  $\alpha$  位の炭素を不斉中心として D 型と L 型

の鏡像異性体が存在する. これらのアミノ酸は原始地球や宇宙空間において化学合成により生じたと考えられている. 一般に化学合成されたアミノ酸は D 型と L 型が等量のラセミ体として生じる一方で, ヒトを含む高等動物体内では L 型がタンパク質合成をはじめとする様々な生体活動に多く利用され, D 型アミノ酸は殆ど存在しない. このキラルアミノ酸の偏りは「アミノ酸のホモキラリティ」と呼ばれ古くから知られているが, その起源は

\*連絡先

浜瀬 健司

九州大学大学院 薬学研究院

〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1

e-mail : hamase@phar.kyushu-u.ac.jp

1) 九州大学大学院 薬学研究院

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

未だ解明されていない。

ホモキラリティの起源解明の手がかりとして、宇宙に存在するアミノ酸の解析が挙げられる。1969年にオーストラリアのマーチソン村付近に落下した隕石からはアミノ酸を含む様々な有機化合物が発見され (Kvenvolden et al., 1970)、地球上には殆ど存在しないアミノ酸も豊富に含まれていた。その後も南極隕石や Murray 隕石などの炭素質コンドライトに分類される隕石からアラニン、バリン等のアミノ酸が発見され (Lawless et al., 1971; Cronin et al., 1979)、宇宙におけるアミノ酸の存在が確認された。さらにイソバリン (iVal) 等の一部のアミノ酸についてはL体がD体よりも多く存在するキラルの偏りが報告され (Cronin and Pizzarello, 1997)、地球外より飛来したアミノ酸が地球上の生命の起源、ホモキラリティの起源となった可能性も指摘されている。これらのことから、地球外試料におけるキラルアミノ酸分析に注目が集まっている。地球外試料としては隕石試料が比較的入手しやすく、様々な種類の隕石が研究されている。しかし、地球上に落下した隕石はL型アミノ酸が豊富に存在する地球環境での汚染が懸念されるため、宇宙空間で試料を採取し地球に持ち帰るというサンプルリターン計画に力が注がれている。現在も小惑星「リュウグウ」での試料採取を行う「はやぶさ2計画」(橘ほか, 2014) や小惑星「Bennu」での試料採取を行う「OSIRIS-REx計画」(Lauretta et al., 2017) が進行中である。

宇宙試料、臨床試料、食品など実試料中のキラルアミノ酸の分析法としてはガスクロマトグラフィー (GC) や高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる方法が広く用いられている。GCでは、アミノ酸を光学活性な誘導体化試薬でジアステレオマーに変換したのち逆相カラムで分離する方法や (Kvenvolden et al., 1970)、光学不活性な試薬で誘導体化されたアミノ酸を光学分割カラムで分離する方法 (Schurig, 2011) が開発されている。HPLC法でも、ジアステレオマー法や光学分割カラムを使用する方法が汎用されている (Miyoshi et al., 2012)。またGC、HPLC共に検出器として質量分析器 (MS) を用いることで選択性を向上させた分析法も多数報告されている。これらの分析法を利用して様々な生体試料が分析され、これまで専らL体が利用されていると考えられていた哺乳類体内においても大脳にD-セリン (Ser) (Hashimoto et al., 1992) が、内分泌組織にD-アスパラギン酸 (Asp) (Fisher et al., 1986) が局在していることなどが明らかになった。またD-SerやD-Aspの局在が発見されたことからD-アミノ酸の機能に関する研究が進み、現在ではD-Serが神経伝達の調節 (Oliet and Mothet,

2009)、D-Aspがホルモン分泌の制御 (Katane and Homma, 2011) に関わっていることが確認されている。しかしいずれの方法もクロマトグラフィーによる分離が一次元であるため、ジペプチドやアミン類など様々な夾雑成分を含む生体試料中で目的のD-アミノ酸を完全に分離することは困難な場合が多い。また生体内のD-アミノ酸はL型に対して数%から1%以下しか存在しないことがほとんどであるため、分析法の感度不足も課題となる。地球外試料についても多種多様な構造異性体を有する有機化合物が含有されており、生体試料と同様に目的キラルアミノ酸の正確な分析には高い選択性が必須である。また宇宙空間で採取可能な試料はごく微量であるため、感度不足も懸念される。そのため地球外試料中のキラルアミノ酸を正確に分析可能な、高い感度と選択性を備えた分析法が切望されている。

我々はこれまでにアミノ酸の蛍光誘導体化と多次元HPLCを組み合わせた分析法を開発し、食品試料や生体試料中に含まれる様々なキラルアミノ酸の分析を行ってきた (Miyoshi et al., 2014a, b)。この方法ではアミノ酸を蛍光標識することで高い感度が得られ、複数の分離機構を組み合わせてHPLCを多次元化することで選択性を格段に向上させることが可能である。高い感度と選択性を兼ね備えた本分析法は多種多様な有機化合物が含まれ、かつ微小な試料しか入手できない地球外試料中のキラルアミノ酸分析に極めて有用であると考えられる。本稿では多次元HPLC法の開発と生体試料などへの適用例、および多次元HPLC法を用いた地球外試料の分析結果について報告する。

## 2. キラルアミノ酸の多次元 HPLC 分析法開発と各種生体試料への適用

### 2.1. 二次元 HPLC 分析法の開発と利用

二次元HPLC法は異なる二つの分離機構を組み合わせた分析法であり、分析対象に対する高い化学選択性を有している。キラルアミノ酸の分析には逆相分離と光学分割の組み合わせが汎用されており、アミノ酸は高感度検出のために4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) などによってプレカラム蛍光誘導体化が行われている。NBD-Fは第一級、第二級アミンと反応する化合物であり、 $\alpha$ -アミノ酸のみならず幅広いアミノ酸及びアミンを蛍光標識できる。誘導体化反応はホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) の存在下で試料とNBD-Fアセトニトリル溶液を混和し、60℃で2分間加熱する簡便な操作で行われ、トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液を加えて反応を

停止して HPLC に導入する。

図 1 に二次元 HPLC の流路図を示す (Hamase et al., 2010). 誘導体化された NBD-アミノ酸は第一段階として一次元目の逆相カラムへと導入され、疎水性の違いにより他のアミノ酸及び共存成分と分離される。逆相カラムとしては粒子充填型やモノリス型の C18 カラムが一般に用いられ、移動相にはメタノール、アセトニトリル、テトラヒドロフランといった有機溶媒を含有する水溶液が使用される。また NBD 化アミノ酸はカルボキシ基を有するため、保持と分離の改善を目的として TFA などの酸が移動相に添加される。NBD-アミノ酸の検出は蛍光検出器により行われ、励起波長 470 nm における 530 nm の蛍光発光が使用される。NBD-F は光学不活性な試薬であるため、誘導体化された D 型及び L 型のアミノ酸は鏡像関係を保持しており、逆相カラムでは分離されない。そのため相互分離されたアミノ酸は D 型と L 型の混合物としてそれぞれ対応するループに分取され、バルブの切り替えにより二次元目の光学分割カラムへと導入される。分取及び導入はタイムプログラムにより全自動で行われ、分取用ループを複数装備することで、一分析で数種から数十種のアミノ酸の二次元一斉分析が可能である。二次元目では光学分割カラムによりアミノ酸の鏡像異性体が分離される。光学分割カラムは不斉中心を有する化合物が固定相に使用され、立体認識により生じる相互作用の差を利用して鏡像異性体を分離することが可能である。市販されている光学分割カラムにはアミロースやセルロースの誘導体を用いた多糖誘導体型カラムやキニン・キニジン誘導体を用いたイオン交換型カラム、光学認識部位にアミノ酸誘導体を使用した Pirkle 型カラムなどがある。NBD-アミノ酸のキラル分析には Pirkle 型光学分割カラムが汎用される。Pirkle 型光学分

割カラムでは、ギ酸やクエン酸を含有するアルコールとアセトニトリルの混液が移動相として使用できる。検出は一次元目と同様に蛍光検出器により行い、必要に応じて質量分析器 (MS, MS/MS) を使用することも可能である。

二次元 HPLC の生体試料への適用例として図 2 にラット尿中の親水性アミノ酸を分析した結果を示す (Hamase et al., 2010). 標品アミノ酸の溶出時間を元に一次元目の逆相分離で各アミノ酸を分取し、それぞれの画分をループにトラップした後、二次元目の光学分割カラムに導入して鏡像異性体を分離・定量している。一次元目ではアミノ酸以外のピークが多数認められ、鏡像異性体を区別しない状態でもアミノ酸の定量は困難であるが、二次元の分離を行うことで D 型・L 型共に正確な定量が可能となる。測定した親水性キラルアミノ酸 9 種全てについて D 体のピークが認められ、ラット尿中での D-アミノ酸の存在が明らかになった。このように二次元 HPLC を用いることで様々な夾雑成分を含む実試料中の微量 D-アミノ酸を分析することが可能であり、我々はこれまでに種々の試料を用いた D-アミノ酸分析を行ってきた。その結果、マウス、ラット、ヒト等の哺乳類体内での D-アミノ酸の分布や起源、酵素による含量制御などを明らかにしてきた (Miyoshi et al., 2014b). また伝統的な製法で作られた黒酢中には多量の D-アミノ酸が含まれていることも明らかにし (Miyoshi et al., 2014a), 機能性食品としての有用性を示唆した。

一方、図 2 の結果を注視すると、二次元目においても夾雑成分が存在し目的アミノ酸以外のピークが認められる。試料または対象アミノ酸の種類によっては、一次元目の逆相分離でアミノ酸と分離されない夾雑成分が、二次元目光学分割においてもアミノ酸の近傍に溶出し定量

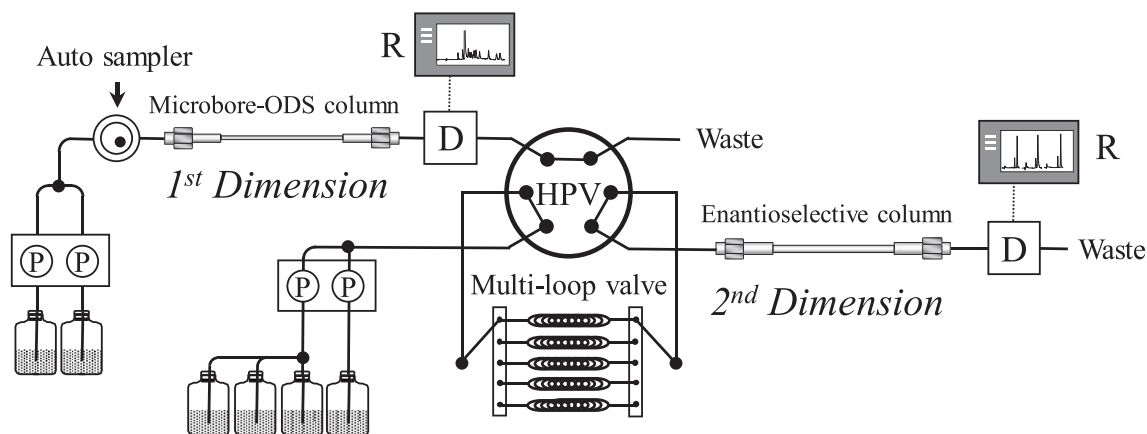
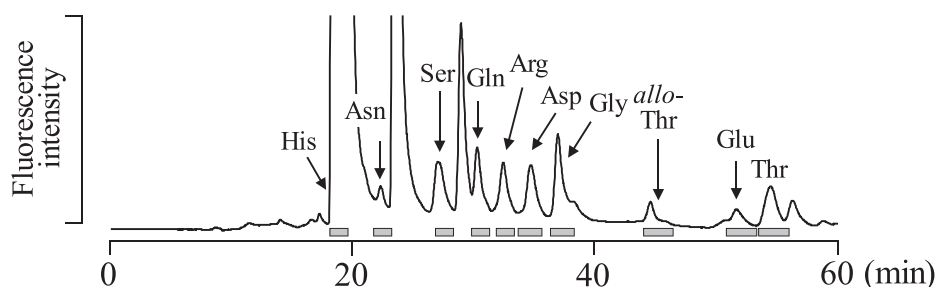


図 1: 二次元 HPLC の流路図. (*J. Chromatogr. A*, **1217**, 1056-1062 (2010) より改変して掲載.)

P, ポンプ; D, 検出器; R, 記録計; HPV, 高圧六方バルブ.

## (A) 1D: Microbore-ODS column



## (B) 2D: Enantioselective column

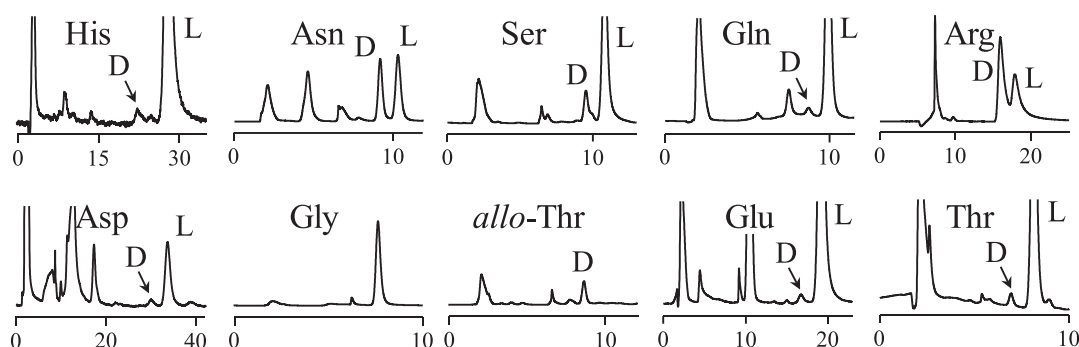


図2：ラット尿中における親水性アミノ酸の二次元 HPLC 分析. (*J. Chromatogr. A*, **1217**, 1056-1062 (2010) より改変して掲載.)

1D において各アミノ酸画分 (下線) をマルチループに分取し, 2D の光学分割カラムに導入する.

を妨害する場合がある. 個々の試料に対して分析条件を精査することで正確な定量が可能となる場合もあるが, 多検体の解析が求められる臨床試料や試料量が少なく測定回数が限られる宇宙試料では条件の最適化が容易ではない. そのため, 幅広い試料に適用可能な更に高い選択性を有する分析法が要求され, 逆相分離, 光学分割に加えて第三の分離機構を有する三次元 HPLC の開発が切望された.

## 2.2. 三次元 HPLC 分析法の開発と利用

三次元 HPLC は, 選択性の向上を目的として二次元 HPLC に新たな分離次元を追加した分析法である. 逆相分離, 光学分割でアミノ酸と共溶出する夾雑成分を分離するため, 新規に追加するカラムとしては異なる分離機構を有する陰イオン交換カラムやミックスモードカラムが適している. 陰イオン交換カラムではイオン強度の違いにより化合物が分離され, ミックスモードカラムでは水素結合や  $\pi$ - $\pi$  相互作用など複数の相互作用により化合物が分離される. 図3に三次元 HPLC の流路図を示した (Furusho et al., 2019). 一次元目逆相分離ではアミノ酸の相互分離を行い, 分析対象アミノ酸を D 体と L 体の混合物としてそれぞれループに分取する. 各アミノ酸画

分は二次元目のカラム (陰イオン交換カラム及びミックスモードカラム) に導入され, 一次元目では分析対象アミノ酸と共溶出する夾雑成分を更に分離する. 陰イオン交換カラム及びミックスモードカラムの移動相としては, ギ酸やクエン酸等の酸を含むメタノールとアセトニトリルの混液が用いられる. いずれのカラムも光学認識能を持たないため鏡像異性体は分離されず, アミノ酸は再度 D 体と L 体の混合物としてループに分取される. 最終次元の三次元目では光学分割カラムにより鏡像異性体が分離され, D 体と L 体がそれぞれ定量される. 二次元 HPLC と同様に各次元での分取・導入はタイムプログラムにより全自動で行われる. またピークの全量に分取して次の次元に導入することで多次元化による感度低下を抑え, 三次元目のクロマトグラムを用いた高感度直接定量が可能である.

二次元および三次元 HPLC を用いてヒト血漿試料を分析した結果を図4, 5に示す (Furusho et al., 2019). 分析対象アミノ酸としてアスパラギン (Asn), セリン (Ser), アラニン (Ala) およびプロリン (Pro) の4種を選択しており, 三次元 HPLC では二次元目に陰イオン交換カラムが用いられている. 比較のために逆相分離及び光学分割の移動相条件は二次元, 三次元 HPLC で同一と

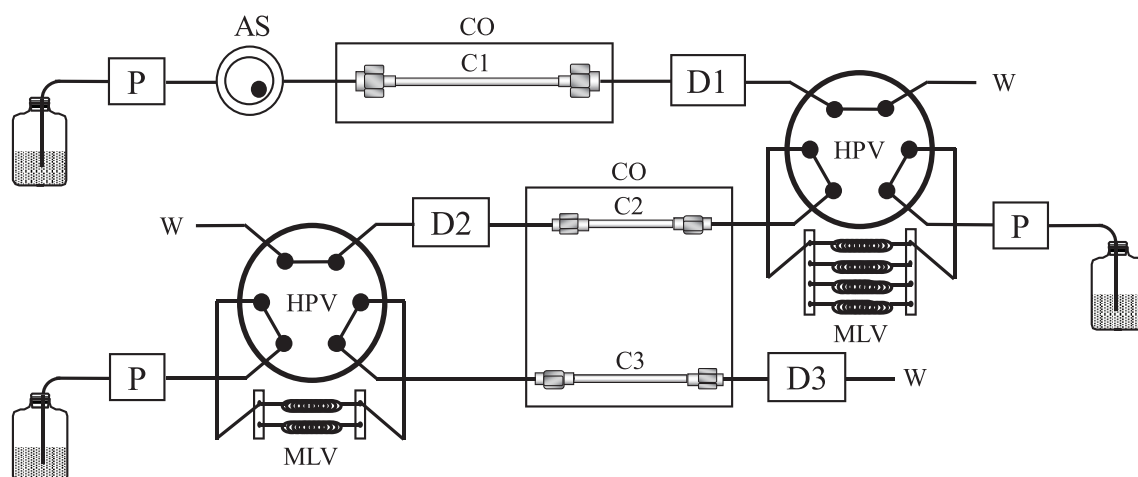


図3: 三次元 HPLC の流路図. (*Anal. Chem.*, **91**, 11569-11575 (2019) より改変して掲載.)

C1, 逆相カラム; C2, 陰イオン交換カラム; C3, 光学分割カラム; AS, オートサンプラー; CO, カラム恒温槽; D, 検出器; HPV, 高圧六方バルブ; MLV, マルチループバルブ; P, ポンプ; W, 廃液.

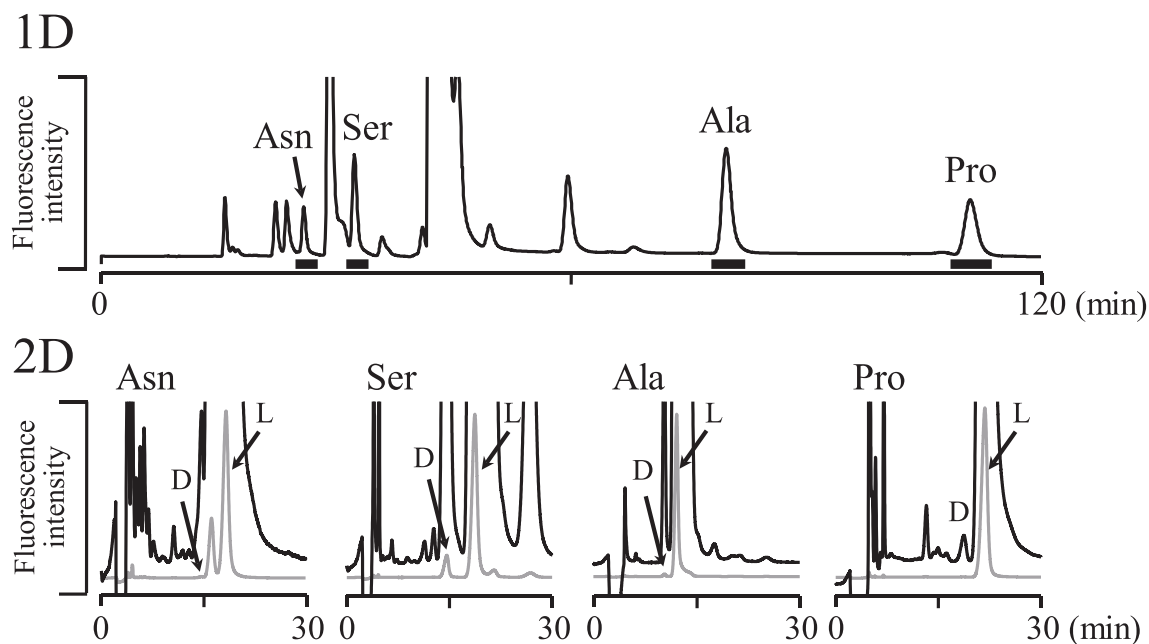


図4: ヒト血漿中キラルアミノ酸の二次元 HPLC 分析. (*Anal. Chem.*, **91**, 11569-11575 (2019) より改変して掲載.)  
二次元目における黒のクロマトグラムは灰色のクロマトグラムを100倍に拡大したものである。

している。二次元 HPLC (図4) では、一次元目でアミノ酸と分離されない夾雑成分が二次元目においてもアミノ酸の近傍に多数溶出し、L型に対して微量にしか存在しない血中D-アミノ酸の正確な定量は困難である。一方、三次元 HPLC (図5) では二次元目の陰イオン交換分離によって多数の共存成分がアミノ酸と良好に分離されている。一次元目、二次元目での分離により殆どの内因性化合物が除去されたため、三次元目では微量D-アミノ酸のピークが明瞭に認められている。本分析法は慢性腎臓病 (CKD) 患者25検体の血漿試料に適用されており、全

ての試料について夾雑成分の影響を受けることなくアミノ酸の定量が可能であった。臨床検体は多種の夾雑成分を多様な個体差で含有しており、アミノ酸の内因性含量、共存成分の種類・量ともに大きな個体差がある。しかし、三次元 HPLC を用いた分析では個々の試料に対する移動相の最適化を行うことなく定量が可能であり、本分析法が高い感度と選択性を有し、幅広い試料に適用可能であることが示されている。CKD 患者の血漿試料分析の結果から、分析対象D-アミノ酸の血中濃度が疾患の進行に従って増加する傾向が認められ、新規腎機能マーカー

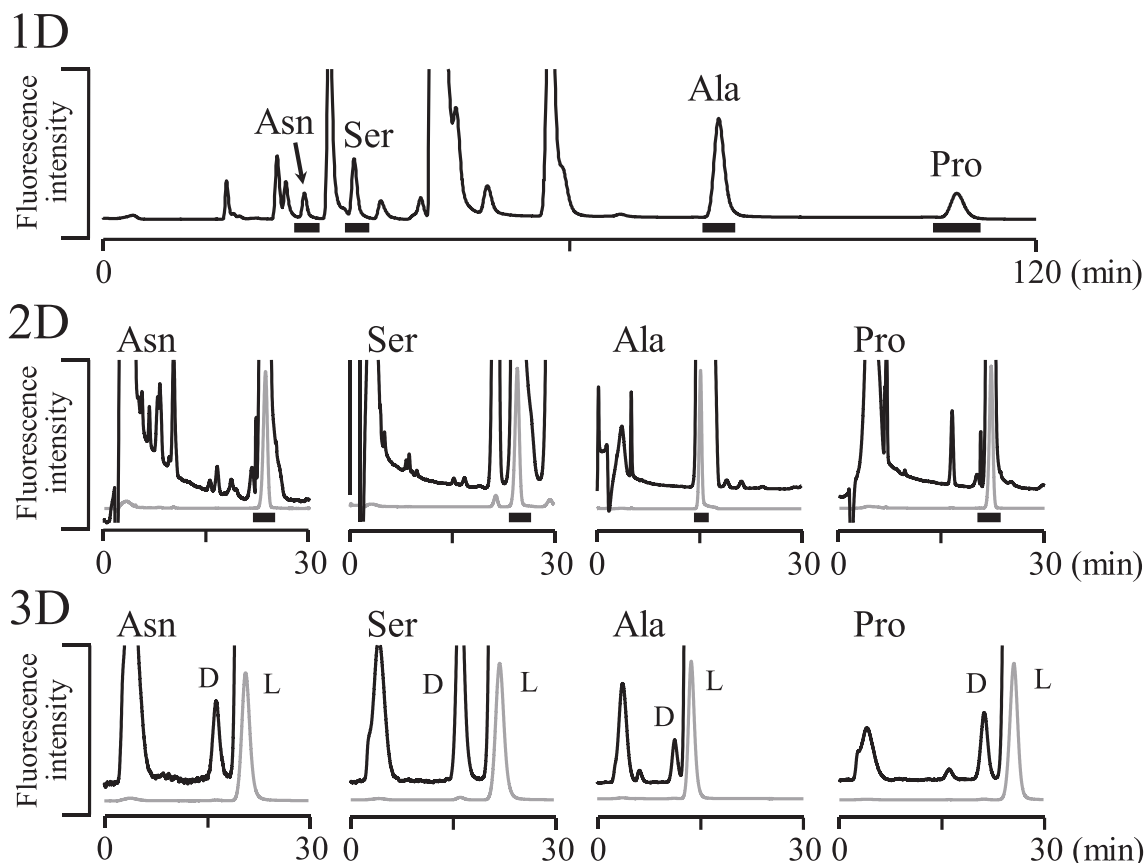


図5: ヒト血漿中キラルアミノ酸の三次元 HPLC 分析. (*Anal. Chem.*, **91**, 11569–11575 (2019) より改変して掲載.)  
二, 三次元目における黒のクロマトグラムは灰色のクロマトグラムを 100 倍に拡大したものである.

としての利用が今後期待される.

このように多次元 HPLC 分析法は高い感度と選択性を兼ね備えており, 夾雑物を多く含む試料中での微量キラルアミノ酸の分析に極めて有用である. 地球外試料の分析では, 多種多様な構造異性体が存在する中で有機化合物の定量を行うため, 多次元 HPLC は微量キラルアミノ酸の分析に適した方法であると考えられる.

### 3. 多次元 HPLC を用いた地球外試料中のキラルアミノ酸分析

炭素質隕石は有機化合物を比較的多く含む隕石であり, 中でも CM や CR に分類される Murchison 隕石や南極隕石からは様々なアミノ酸が発見されている (Kvenvolden et al., 1970; Cronin et al., 1979). これまでに, 二次元 HPLC を用いた炭素質隕石中キラルアミノ酸の分析結果が報告されている (Hamase et al., 2014). 本報告での分析対象は 8 種のキラルアミノ酸 (アラニン (Ala), バリン (Val), 2-アミノ酪酸 (2AB), ノルバリン (nVal), *N*-メチルアラニン (*N*-MeAla), イソバリン (iVal), 3-アミノ酪酸 (3AB), 3-アミノイソ酪酸 (3AIB))

と不斉炭素を持たない 5 種のアキラルなアミノ酸 (グリシン (Gly),  $\beta$ -アラニン ( $\beta$ -Ala),  $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA), サルコシン (Sar), 2-アミノイソ酪酸 (2AIB)) である. 一次元目の逆相分離ではモノリス型 C18 カラムを使用し, TFA を含むアセトニトリル水溶液のグラジエント分離により対象アミノ酸が 180 分以内に相互分離している. 二次元目では 14 種の Pirkle 型光学分割カラムを検討し, 2 種のカラムを並列に装備してアミノ酸に応じて使い分けることで, 全てのキラルアミノ酸が光学分割されている. 本二次元 HPLC は定量性, 再現性ともに良好な結果を示し, 定量限界は約 2 fmol である.

二次元 HPLC を用いて Yamato 791191 隕石を分析したクロマトグラムを図 6 に示す (Hamase et al., 2014). Yamato 791191 隕石は 1979 年に南極大陸のやまと山脈裸水域で採取された炭素質隕石 (CM2) である. 隕石表面は地球上のアミノ酸により汚染されている可能性があるため, 破碎して得られた内部の破片が分析に用いられた. 試料は塩酸を用いる加水分解, NBD-F によるアミノ酸の蛍光誘導体化を行った後, 二次元 HPLC で分析された. 一次元目においては標品アミノ酸の溶出時間で対象アミノ酸をそれぞれループに分取し, 各画分を二次元

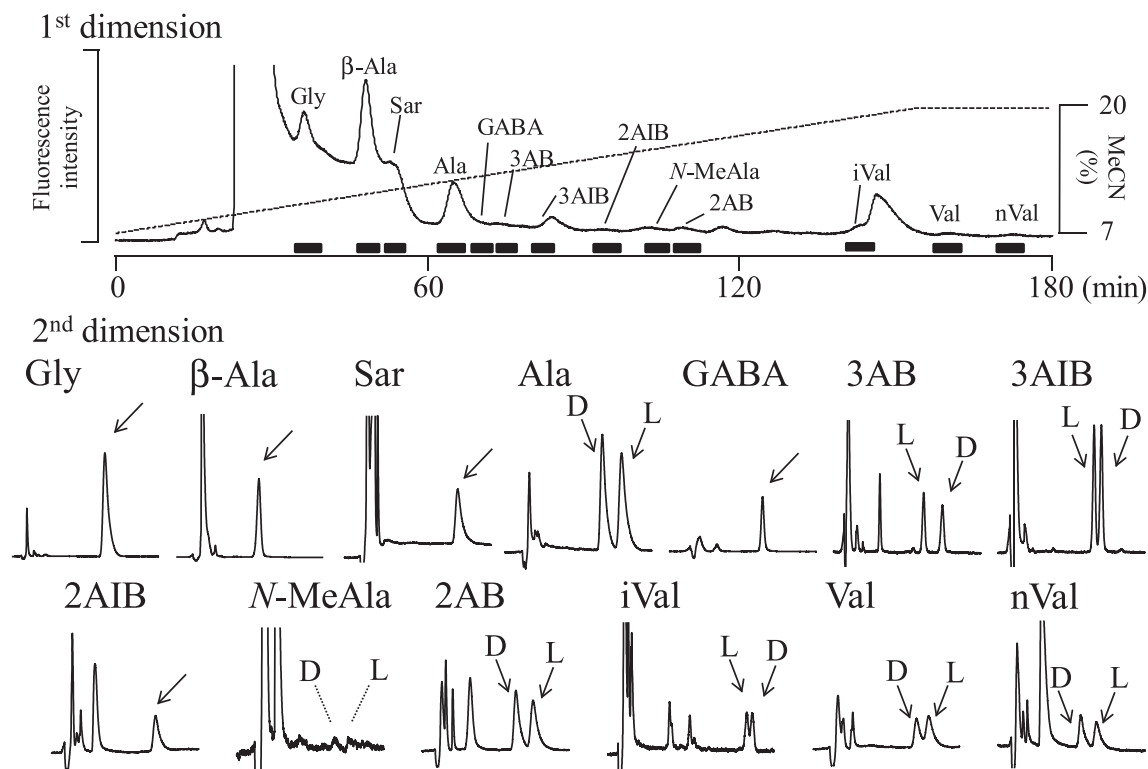


図 6: Yamato 791191 隕石中キラルアミノ酸の二次元 HPLC 分析. (*Chromatography*, **35**, 103-110 (2014) より改変して掲載.)

目に導入して鏡像異性体の分離・定量を行っている。二次元目では全ての分析対象アミノ酸のピークが認められ、数種のアミノ酸は比較的多量 (10 nmol/g 以上) に存在することが明らかにされた (表 1)。またキラルなアミノ酸は D 体と L 体がほぼ等量であった。隕石試料を用いた再現性、回収率についても良好な値が得られ、構築された二次元 HPLC は地球外試料に適用可能であることが示された。

一方で、二次元目のクロマトグラムにおいては対象アミノ酸以外のピークも多数認められる。Yamato 791191 隕石の分析ではアミノ酸が極めて豊富に含まれるため、相対的に定量を妨害するような夾雑物は殆ど認められない。しかし、隕石試料はアミノ酸の種類、量ともに多様であり、未知の夾雑成分がアミノ酸の近傍に溶出して定量を妨害する可能性も指摘されている。そのため更に高い選択性を有する分析法の開発が望まれており、地球外試料中のキラルアミノ酸を対象とした三次元 HPLC 分析法の構築が現在進められている。

#### 4. おわりに

本項では、逆相分離と光学分割を組み合わせた二次元 HPLC、さらに陰イオン交換分離を加えた三次元 HPLC

表 1: Yamato 791191 隕石中のアミノ酸含量

| アミノ酸    |   | (nmol/g) | % L  |
|---------|---|----------|------|
| Gly     |   | 46.30    | —    |
| β-Ala   |   | 13.95    | —    |
| Sar     |   | 8.26     | —    |
| Ala     | D | 10.35    | 51.3 |
|         | L | 10.89    |      |
| GABA    |   | 5.85     | —    |
| 3AB     | D | 4.87     | 50.7 |
|         | L | 5.00     |      |
| 3AIB    | D | 2.62     | 49.2 |
|         | L | 2.54     |      |
| 2AIB    |   | 39.94    | —    |
| N-MeAla | D | trace    | —    |
|         | L | trace    |      |
| 2AB     | D | 5.17     | 49.8 |
|         | L | 5.14     |      |
| iVal    | D | 19.13    | 49.2 |
|         | L | 18.51    |      |
| Val     | D | 2.14     | 52.5 |
|         | L | 2.36     |      |
| nVal    | D | 1.43     | 51.3 |
|         | L | 1.50     |      |

*Chromatography*, **35**, 103-110 (2014) より改変して掲載.

について分析法開発と種々の実試料への適用例を示した。アミノ酸の蛍光誘導体化と多次元 HPLC 分析法を用いることで、多種多様な夾雑成分を含む生体・食品試料中で微量キラルアミノ酸を正確に分析することが可能である。また高い感度と選択性を兼備した本法は、様々な有機化合物を含む地球外試料におけるキラルアミノ酸分析にも極めて有用であり、炭素質隕石中で8種のキラルアミノ酸および5種のアキラルなアミノ酸が定量可能であった。より精密かつ幅広い試料に適用可能な三次元 HPLC 法の開発が現在進行中である。2020年には小惑星「リュウグウ」の試料を載せた「はやぶさ2」が帰還予定であり、多次元 HPLC 法を用いたキラルアミノ酸分析が期待される。

## 参考文献

- Cronin, J. R., S. Pizzarello and C. B. Moore (1979) Amino acids in an Antarctic carbonaceous chondrite. *Science*, **206**, 335–337.
- Cronin, J. R. and S. Pizzarello (1997) Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids. *Science*, **275**, 951–955.
- Fisher, G. H., N. M. Garcia, I. L. Payan, R. Cadilla-Perezrios, W. A. Sheremata and E. H. Man (1986) D-Aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 683–687.
- Furusho, A., R. Koga, T. Akita, M. Mita, T. Kimura and K. Hamase (2019) Three-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of Asn, Ser, Ala, and Pro enantiomers in the plasma of patients with chronic kidney disease. *Anal. Chem.*, **91**, 11569–11575.
- Hamase, K., Y. Miyoshi, K. Ueno, H. Han, J. Hirano, A. Morikawa, M. Mita, T. Kaneko, W. Lindner and K. Zaitzu (2010) Simultaneous determination of hydrophilic amino acid enantiomers in mammalian tissues and physiological fluids applying a fully automated micro-two-dimensional high-performance liquid chromatographic concept. *J. Chromatogr. A*, **1217**, 1056–1062.
- Hamase, K., Y. Nakauchi, Y. Miyoshi, R. Koga, N. Kusano, H. Onigahara, H. Naraoka, H. Mita, Y. Kadota, Y. Nishio, M. Mita and W. Lindner (2014) Enantioselective determination of extraterrestrial amino acids using a two-dimensional chiral high-performance liquid chromatographic system. *Chromatography*, **35**, 103–110.
- Hashimoto, A., T. Nishikawa, T. Hayashi, N. Fujii, K. Harada, T. Oka and K. Takahashi (1992) The presence of free D-serine in rat brain. *FEBS Lett.*, **296**, 33–36.
- Katane, M. and H. Homma (2011) D-Aspartate - An important bioactive substance in mammals: A review from an analytical and biological point of view. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3108–3121.
- Kvenvolden, K., J. Lawless, K. Pering, E. Peterson, J. Flores, C. Ponnampuruma, I. R. Kaplan and C. Moore (1970) Evidence for extraterrestrial amino-acids and hydrocarbons in the Murchison meteorite. *Nature*, **228**, 923–926.
- Lauretta, D. S., S. S. Balram-Knutson, E. Beshore, W. V. Boynton, C. Drouet d'Aubigny, D. N. DellaGiustina, H. L. Enos, D. R. Golish, C. W. Hergenrother, E. S. Howell, C. A. Bennett, E. T. Morton, M. C. Nolan, B. Rizk, H. L. Roper, A. E. Bartels, B. J. Bos, J. P. Dworkin, D. E. Highsmith, D. A. Lorenz, L. F. Lim, R. Mink, M. C. Moreau, J. A. Nuth, D. C. Reuter, A. A. Simon, E. B. Bierhaus, B. H. Bryan, R. Ballouz, O. S. Barnouin, R. P. Binzel, W. F. Bottke, V. E. Hamilton, K. J. Walsh, S. R. Chesley, P. R. Christensen, B. E. Clark, H. C. Connolly, M. K. Crombie, M. G. Daly, J. P. Emery, T. J. McCoy, J. W. McMahon, D. J. Scheeres, S. Messenger, K. Nakamura-Messenger, K. Richter and S. A. Sandford (2017) OSIRIS-REx: Sample return from asteroid (101955) Bennu. *Space Sci. Rev.*, **212**, 925–984.
- Lawless, J. G., K. A. Kvenvolden, E. Peterson, C. Ponnampuruma and C. Moore (1971) Amino acids indigenous to the Murray meteorite. *Science*, **173**, 626–627.
- Miyoshi, Y., R. Koga, T. Oyama, H. Han, K. Ueno, K. Masuyama, Y. Itoh and K. Hamase (2012) HPLC analysis of naturally occurring free D-amino acids in mammals. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **69**, 42–49.
- Miyoshi, Y., T. Oyama, Y. Itoh and K. Hamase (2014a) Enantioselective two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of amino acids; Analysis and physiological significance of D-amino acids in mammals. *Chromatography*, **35**, 49–57.
- Miyoshi, Y., M. Nagano, S. Ishigo, Y. Ito, K. Hashiguchi, N. Hishida, M. Mita, W. Lindner and K. Hamase (2014b) Chiral amino acid analysis of Japanese traditional Kurozu and the developmental changes during earthenware jar fermentation processes. *J. Chromatogr. B*, **966**, 187–192.
- Oliet, S. H. R. and J. -P. Mothet (2009) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience*, **158**, 275–283.
- Schurig, V. (2011) Gas chromatographic enantioseparation of derivatized  $\alpha$ -amino acids on chiral stationary phases - Past and present. *J. Chromatogr. B*, **879**, 3122–3140.
- 橘省吾, 澤田弘崇, 岡崎隆司, 高野淑識, はやぶさ2 サンプラーチーム (2014) 「はやぶさ2」サンプルリターン探査——太陽系起源天体探査における位置づけ——. 地球化学, **48**, 265–278.