

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580154

研究課題名（和文）食品に含まれるピロロキノリンキノン誘導体の検索と定量に関する研究

研究課題名（英文）Study on determination of pyrroloquinoline quinone derivatives in various foods

## 研究代表者

熊澤 武志 (KUMAZAWA TAKESHI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：00186470

## 研究成果の概要（和文）：

食品におけるピロロキノリンキノン誘導体の検索と定量を、高感度分析法である高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法を使用した新しい分析方法によって実施した。その結果、効率の良い抽出法、正確な同定法、定量性ある分離検出法の開発によって、食品中のアミノ酸結合型 PQQ 誘導体の存在が確認された。特に、imidazopyrroloquinoline は多くの食品に含まれ、数 ng～数百 ng/g（あるいは ml）、それ以外は概ね数 ng/g（あるいは ml）程度であることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we examined the determination of pyrroloquinoline quinone (PQQ) derivatives in various foods that are commonly consumed daily. The samples were analyzed using efficient extraction, accurate identification and quantification followed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The PQQ amino acid derivatives were identified with low concentration in various foods. The imidazopyrroloquinoline concentrations ranged from several ng/g-several hundred ng/g (or ml); other PQQ derivatives were in the range of several ng/g or ml.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品化学・栄養生化学・ピロロキノリンキノン・HPLC 法・MS/MS 法

## 1. 研究開始当初の背景

PQQ はメタノール資化性微生物におけるメ

タノール脱水素酵素の補酵素として 1979 年に発見され、その構造が決定された

(Salisbury *et al.*, 1979)。これは生物のエネルギー獲得系にとって必須の酸化還元酵素の補酵素として NAD(P)、FAD に次ぐものである。この PQQ はほ乳類においても多彩な作用を示すことが報告されている。1989 年に Killgore らは、PQQ 欠乏マウスを作成して成長過程を調べたところ、PQQ をほとんど含まない食餌で飼育したマウスでは体重の減少が見られ、脱毛、骨軟化症や結合組織合成障害等の成長障害が現れることを明らかにした (Killgore *et al.*, 1989)。この発見を機に PQQ はほ乳類の成長に必須の栄養素として考えられるようになり、その後、PQQ の働きがほ乳類においても種々報告されるようになった。その中で研究代表者はヒト線維芽細胞における DNA 合成促進作用 (Naito *et al.*, 1993) を見出し、PQQ の細胞増殖への関与を明らかにした。一方、PQQ はほ乳類の必須アミノ酸であるリジンの代謝酵素アミノアジピン酸セミアルデヒド脱水素酵素の補酵素として働き、ほ乳類の新しいビタミンであるとする報告 (Kasahara and Kato, 2003) がなされ脚光を浴びたが、現在もその議論が続いている。最近では、パーキンソン病や認知障害の発症抑制効果等、PQQ と精神・神経機能との関連も注目されている (Kobayashi *et al.*, 2006; Nunome *et al.*, 2008; Ohwada *et al.*, 2008)。また、研究代表者は線維芽細胞における PQQ の DNA 合成促進と細胞内シグナル伝達系分子群の関連に注目したところ、細胞増殖に中心的役割を果たす MAP キナーゼカスケードの活性化に PQQ が深く関与していることを明らかにした (Kumazawa *et al.*, 2007)。このようにヒトを含むほ乳類における PQQ の働きについて、最近議論が再燃している。

## 2. 研究の目的

研究代表者はヒトの各種組織 (肝臓、腎臓、脳、脾臓、膵臓、血液等) において遊離型 PQQ が概ね数 ng/g (あるいは ml) 程度存在することを明らかにし (Kumazawa *et al.*, 1992)、

PQQ の生理作用を考察する上で重要なエビデンスを提示している。また、研究代表者は日常生活で摂取する 29 種類の食品中には遊離型 PQQ が 3.4~61ng/g (あるいは ml) の範囲で存在することを報告した (Kumazawa *et al.*, 1993; Kumazawa *et al.*, 1995)。一方、Noji らは 8 種類の食品において 0.2~7.0 ng/g (あるいは ml) 程度の遊離型 PQQ 量の存在を報告している (Noji *et al.*, 2007)。これら一連の PQQ 量に関する研究結果から、体内に PQQ の合成経路を持たないほ乳類では、PQQ は食べ物から摂取されるものと考えられている (Kumazawa *et al.*, 1995)。しかし、その摂取される PQQ が食品中に遊離型のみで存在するのか、あるいは遊離型以外に PQQ 付加物も存在するのか、その詳細は未だ明らかになっていない。*in vitro* での実験では、PQQ は反応性の高い物質として観察され、特にアミノ酸との結合性が高いことが確認されている (Urakami *et al.*, 1996)。従って、食品中に存在する PQQ は遊離型以外にもアミノ酸結合物をはじめとする種々の誘導体を形成しているものと考えられる。しかも、アミノ酸の一種であるグリシンと PQQ の結合物である imidazolopyrroquinoline (IPQ) 誘導体には神経成長因子の合成促進作用 (Yamaguchi *et al.*, 1993) や線維芽細胞の DNA 合成促進作用等も報告されている (Naito *et al.*, 1993)。しかし、食品中に存在する IPQ の詳細な含有量は未だ報告されていない。

そこで、本研究では食品における PQQ 誘導体の検索とその定量を、特に遊離型 PQQ とアミノ酸結合物 PQQ に焦点を絞って、最新の高感度分析法である高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (HPLC/MS/MS) 法を使用して実施する。食品中の遊離型 PQQ に関しては、既に研究代表者がガスクロマトグラフィー/質量分析法によって検出した結果を報告しているが、本研究で用いる HPLC/MS/MS 装置のような超高感度検出が可能な分析機

器が開発されている現在、その PQQ 量の再評価を行うことは微量成分分析の観点から意義が大きい。また、本研究によって食品中の PQQ 誘導体の種類と含有量が明らかになることは、PQQ の生理・薬理作用を日常の食生活との関連性から論じる上で重要な基礎的知見になり、食品科学領域における本研究の価値は非常に高いものといえる。

### 3. 研究の方法

(1) 分析試料：本研究では、食品に含まれる PQQ 誘導体について、以下の食品から検索及び定量を行った。すなわち生鮮食品は農産物の米穀、豆類、野菜及び果実、畜産物の肉類及び卵類、水産物の魚類、貝類及び海藻類、加工食品は農産物の粉類、野菜・果実類、茶・コーヒー・ココア類、香辛料、麺・パン類、菓子類及び豆類、畜産物の食肉製品、酪農製品及び卵製品、調味料、食用油脂、調理食品、ジュース・飲料水及び酒類等、水産物の魚介類及び海藻類等、これら生鮮食品並びに加工食品の各々 50 品目程度について検討した。

(2) PQQ 誘導体標準品の作製：アミノ酸結合型 PQQ 誘導体は PQQ とアミノ酸（グリシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-トレオニン、L-セリン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン、L-リジン、L-アルギニン、L-システイン、L-メチオニン、L-チロシン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-ヒスチジン、L-プロリン）を 1:10（モル比）に混和後、室温で攪拌条件下、24 時間の反応を行った。また、混液の pH は塩酸及びアンモニア水を用いて、pH4~9 の間で各々の合成に最適な条件を選択した。また、合成した標準品は HPLC 分取法を用いて精製を行い、HPLC-UV 法及び MS-ESI 法による各標準品のスペクトル解析等を用いて純度検定を行った。

(3) 内部標準物質の作製：内部標準物質として使用する安定同位体 [<sup>13</sup>C]PQQ 誘導体標準品は既報 (Methods Enzymol., 280, 150-158,

1997) に準じて、安定同位体 [<sup>13</sup>C]メタノールから [<sup>13</sup>C]PQQ を合成した。さらに、方法 (2) と同様の方法を用いて、アミノ酸結合型 [<sup>13</sup>C]PQQ を合成した。

(4) スペクトルライブラリーの作製：合成したアミノ酸結合型 PQQ 誘導体及びアミノ酸結合型 [<sup>13</sup>C]PQQ について、HPLC-ESI-MS/MS 法によるプロダクトイオンスキャンによるフラグメンテーション解析を行った。

(5) 抽出法の開発：各種食品中 PQQ 誘導体の抽出法は遊離型 PQQ を対象とした Kumazawa らの方法 (Biochem. J., 1995) に準じて行い、抽出液は蒸発乾固後、初期移動相を用いて溶解した。また、陰イオン交換樹脂-固相抽出カートリッジ（充填剤量 30mg、リザーバー量 1ml）あるいは微量固相抽出装置である MonoTip C<sub>18</sub> チップを用いた新しい簡易抽出法では、試料液を pH3~6 の間で固相に通液し、蒸留水による洗浄後、酸性メタノール若しくはメタノールによって溶出を行った。溶出液は蒸発乾固後、初期移動相を用いて溶解した。

(6) HPLC/MS/MS 法による食品中 PQQ 誘導体の検出及び同定・定量法：HPLC による分離法では C8 及び C18 カラム（長さ 15cm x 内径 2.1mm、粒径 5 $\mu$ m 及び 3 $\mu$ m）を用いて、移動相は 10mM 酢酸アンモニウムとアセトニトリルのグラジエント法を適用した。なお、HPLC は資生堂ナノスペース SI-2、島津 20AD プロミネンス、ESI-MS/MS 装置はサーモエレクトロン TSQ Quantum Discovery MAX 及び ABsciex 4000 Q Trap をそれぞれ使用した。PQQ 誘導体の同定は食品由来の抽出物を HPLC/MS/MS 装置に導入し、得られたプロダクトイオンスキャンからスペクトルライブラリーとの同一性を参考にして判断した。また、複数のプロダクトイオンを利用した選択反応モニタリング (SRM) 法により、プロダクトイオンマススペクトルにおけるイオン強度パターン的一致性から同定を行った。一方、定量は SRM 法を用いて行った。

#### 4. 研究成果

(1) PQQ 誘導体合成の検討：各種アミノ酸とPQQのインキュベーション条件(特にpH)等を変えてPQQ誘導体の合成の最適条件を検討した。すなわち、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-グルタミン酸、L-フェニルアラニン、L-グルタミン、L-アスパラギン酸、L-ヒスチジン、L-アルギニン、L-アスパラギン及びL-リジンを結合させる場合はpH3~4、グリシン及びL-システインの場合はpH7~8、L-トリプトファン、L-プロリン、L-トレオニン、L-セリン、L-チロシンの場合はpH9~9.5であった。合成した標準品はHPLC分取法を用いて精製を行い、純度は概ね85~98%以上が得られた。しかし、チロシン結合型PQQに関しては合成の再現性が悪く、反応条件の再検討が必要と思われた。

(2) 内部標準物質の合成の検討：既報の方法(Methods Enzymol., 1997)に準じて $[^{13}\text{C}]$ PQQの合成を行い、約1.1mgを得た。次に、この $[^{13}\text{C}]$ PQQと各種アミノ酸との反応によるアミノ酸結合型 $[^{13}\text{C}]$ PQQ誘導体の合成を行った。精製はSep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジ法を用い、溶出にはメタノール溶液を用いた。

(3) 分析条件の検討：合成したPQQ誘導体の標準品を用いてHPLC条件を検討した。カラムはC<sub>18</sub>あるいはC<sub>8</sub>(長さ15cm x 内径2.1mm、粒径5 $\mu\text{m}$ 及び3 $\mu\text{m}$ )を用い、移動相は10mM酢酸アンモニウムとアセトニトリルを用いることで、PQQとPQQ誘導体の分離を行うことができた。

(4) マススペクトル解析の検討：PQQ誘導体の標準品及び内部標準物質について、HPLC/MS/MS-ESI法によるマススペクトル解析を行ったところ、負イオンモードにおいてSingle MSでは偽分子イオン $[\text{M}-\text{H}]^-$ をベースピークとし、MS/MSではカルボキシ基が1~

3個の開裂に伴うプロダクトイオンが出現する共通性が見られた。しかし、L-グルタミン酸、L-トリプトファン、L-トレオニン、L-アスパラギン酸を結合したPQQ誘導体は全てがグリシン-PQQと同一のマススペクトル、すなわちIPQ型であった。

(5) PQQ誘導体の抽出：Kumazawaらの方法(Biochem. J., 1995)に準じてPQQ誘導体の抽出を行い、約60%の回収率を得た。また、陰イオン交換樹脂-固相抽出カートリッジを用いた抽出法では回収率は70%以上で、茶類、酒類、野菜ジュース類、乳製品において簡便な抽出が可能であった。さらに、微量固相抽出装置であるMonoTip C<sub>18</sub>チップを用いた抽出法では抽出物を酸性条件下で溶解して遠心分離後、上清をチップに通液し、蒸留水による洗浄、メタノール溶液による溶出を行った。これはグリシン-PQQ誘導体を中心とするIPQ抽出に適用することができ、回収率は約80%であった。なお、本研究で開発したこれらの新しい抽出法はPQQ誘導体以外の多くの化学物質にも応用可能な抽出法であることが明らかとなった。

(6) PQQ誘導体の同定及び定量：① HPLCを用いた測定法では分析対象物の分離は十分ではなかったが、プロダクトイオンを選択することによるフィルター作用によって、分離能の問題は解消された。また、L-アラニン、L-アルギニン、L-システイン、L-グリシン、L-セリン等のアミノ酸結合型PQQの誘導体に関しては、超高速HPLC(C<sub>18</sub>カラム使用)分析において分離能の向上がみられた。② 食品中アミノ酸結合型PQQ誘導体のMS検出では、IPQ以外の成分は微量であったことからSRM法を採用して、ピーク強度パターンから同定を行った。③ 定量ではSRM法を用いて遊離型PQQとアミノ酸結合型PQQ誘導体の測定を実施した。その結果、遊離型PQQは多く

の食品に含まれ、数 ng~数十 ng/g (あるいは ml) の濃度範囲であった。また、アミノ酸結合型 PQQ の存在は、野菜類、豆類、海藻類において IPQ が最も割合が高く (70%以上)、アラニン-PQQ 誘導体が約 10~20%、アルギニン-PQQ 誘導体が約 5~15%であった。また、果物類、野菜ジュース類、麺類、パン類ではほとんど (80%以上) が IPQ 型であった。食肉類では IPQ とアルギニン-PQQ 誘導体、アラニン-PQQ 誘導体が約 50~80%含まれたが、豚肉に関しては IPQ (約 40%) よりもアラニン-PQQ 誘導体 (約 60%) が多かった。卵類では IPQ が約 60~70%、アルギニン-PQQ 誘導体が約 10%であった。茶類では日本茶において IPQ が最も多く (70%)、ウーロン茶では IPQ (60%) とアルギニン-PQQ 誘導体 (約 20%) の順で多かった。一方、ほとんどの食品中でアルギニン及びアラニンの各 PQQ 誘導体は数 ng/g (あるいは ml) 程度であったが、食肉類及び茶類に関しては数十 ng/g (あるいは ml) であった。また、IPQ に関しては一様に多くの食品に含まれ、数 ng~数百 ng/g (あるいは ml) であった。しかし、その他のアミノ酸結合型 PQQ 誘導体に関しては定量限界以下のものが多かった。なお、香辛料、調味料、食用油脂では PQQ 誘導体は検出されなかった。

④本研究で開発・実施した分析法の定量性及び再現性に関しては、米国食品医薬品局の分析基準にほぼ合致することが明かとなった。

以上のように、本研究は PQQ の生理・薬理作用を日常の食生活との関連性から論じる上で重要な基礎的知見となった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Kumazawa T., Hasegawa C., Hara K., Uchigasaki S., Lee X.-P., Seno H., Suzuki O., Sato K.: Molecularly

imprinted solid-phase extraction for selective determination of methamphetamine, amphetamine, and methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci.*, 印刷中 査読有

- ② Hasegawa C., Kumazawa T., Uchigasaki S., Lee X.-P., Sato K., Terada M., Kurosaki K.: Determination of dextromethorphan in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 2215-2223 (2011) 査読有
- ③ Kumazawa T., Hara K., Hasegawa C., Uchigasaki S., Lee X.-P., Seno H., Suzuki O., Sato K.: Fragmentation pathways of trifluoroacetyl derivatives of methamphetamine, amphetamine, and methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs by gas chromatography/mass spectrometry. *Int. J. Spectrosc.* 2011, 1-12 (2011) 査読有
- ④ Kumazawa T., Hasegawa C., Uchigasaki S., Lee X.-P., Suzuki O., Sato K.: Quantitative determination of phenothiazine derivatives in human plasma using monolithic silica solid-phase extraction tips and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 2521-2527 (2011) 査読有
- ⑤ 熊澤武志, 長谷川智華, 李 曉鵬, 佐藤啓造, 鈴木 修: シリカモノリス固相抽出技術と薬毒物分析への応用. *JSBMS Lett.* 35, 32-37 (2010) 査読無
- ⑥ Kumazawa T., Hasegawa C., Lee X.-P., Sato K.: New and unique methods of solid-phase extraction for use before instrumental analysis of xenobiotics in human specimens. *Forensic Toxicol.* 28, 61-68 (2010) 査読有
- ⑦ Anzai T., Ullmann L.G., Hayashi D., Satoh T., Kumazawa T., Sato K.: Effects of strain differences and vehicles on results of local lymph node assays. *Exp. Anim.* 59, 245-249 (2010) 査読有
- ⑧ Lee X.-P., Kumazawa T., Hasegawa C., Arinobu T., Kato A., Seno H., Sato K.: Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by LC-MS-MS with a hydrophilic polymer column. *Forensic Toxicol.* 28, 96-104 (2010) 査読有
- ⑨ Arima Y., Sato K., Fujishiro M., Nittono S., Uji A., Marumo A., Lee X.-P.,

Kumazawa T., Katsumata Y.: Long-term storage of blood samples as freezing hemolysates with Good's buffer for methemoglobin determination. Med. Biol. 154, 114-120 (2010) 査読有

⑩ Shinmen N., Koshida T., Kumazawa T., Sato K., Shimada H., Matsutani T., Iwadate Y., Takiguchi M., Hiwasa T.: Activation of NFAT signal by p53-K120R mutant. FEBS Lett. 583, 1916-1922 (2009) 査読有

⑪ Kumazawa T., Saeki K., Yanagisawa I., Uchigasaki S., Hasegawa C., Seno H., Suzuki O., Sato O.: Automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/MS/MS for the determination of butyrophenone derivatives in human plasma. Anal. Bioanal. Chem. 394, 1161-1170 (2009) 査読有

[学会発表] (計3件)

① 熊澤武志, 長谷川智華, 李 曉鵬, 有信哲哉, 妹尾 洋, 鈴木 修, 佐藤啓造: シリカモノリス SPE と GC/MS を利用した血漿中フェノチアジン系向精神薬の分析. 第35回日本医用マススペクトル学会年会, 2010/9/9, 名古屋.

② 李 曉鵬, 熊澤武志, 川瀬靖聡, 長谷川智華, 林 大吾, 有信哲哉, 佐藤啓造: オンライン自動カラムスイッチング UFLC-MS/MS 及び MS<sup>3</sup> によるヒト血漿中ベンゾジアゼピン系薬物の迅速高感度分析法. 第35回日本医用マススペクトル学会年会, 2010/9/9, 名古屋.

③ 有信哲哉, 服部秀樹, 熊澤武志, 李 曉鵬, 水谷洋子, 大森貴之, 西本 寛, 小島貞男, 石井 晃, 妹尾 洋: モノリスカラムを用いたバックフラッシュカラムスイッチング LC/MS による血中テオフィリンの超迅速分析. 第34回日本医用マススペクトル学会年会, 2009/9/10, 大阪.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊澤 武志 (KUMAZAWA TAKESHI)  
昭和大学・医学部・教授  
研究者番号: 00186470

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: