

プラスマローゲンの分析法

Analytical Methods for Plasmalogen

西向 めぐみ

岩手大学農学部動物科学科
〒020-8550
岩手県盛岡市上田3丁目18-8

Megumi NISHIMUKAI
Department of Animal Science,
Faculty of Agriculture, Iwate University
3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate
020-8550, Japan



前場 良太

NPO 法人 国際生活習慣病フォーラム
〒173-0037
東京都板橋区小茂根4丁目28-14

Ryouta MAEBA
Specified non-profit organization
International Lifestyle-related Disease
Forum
4-28-14 Komone, Itabashi-Ku, Tokyo
173-0037, Japan

原 博

藤女子大学人間生活学部食物栄養学科
〒061-3204
石狩市花川南4条5丁目

Hiroshi HARA
Department of Food Science and
Human Nutrition, Faculty of Human
Life Sciences, Fuji Women's University
Hanakawa Minami 4jo-5, Ishikari-shi,
Hokkaido 061-3204, Japan



論文要旨：プラスマローゲンはリン脂質のサブクラスの一つで、嫌気性微生物から哺乳類まで生物界に広く分布している。プラスマローゲンの病態生理学的役割はよくわかっていないが、以前から、アルツハイマー病をはじめとする多くの神経変性疾患との関係が示されてきた。近年、体内のプラスマローゲンの変動が、酸化ストレスや慢性炎症を伴う代謝性疾患に関与するという多くの報告があり、血漿・血清中のプラスマローゲンは、これらの疾患のバイオマーカーとして期待される。そこで本稿ではプラスマローゲンの疾病との関係、およびプラスマローゲン分析の従来法から新しい方法まで様々な分析法を紹介する。

Abstract: Plasmalogen is a subclass of phospholipids widely distributed in the biological world, from anaerobic bacteria to mammals. Although the pathophysiologic roles of Plasmalogen are poorly understood, it has long been implicated in a number of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease. Recently, there have been various reports that changes of plasmalogen in the body are involved in metabolic diseases associated with oxidative stress and chronic inflammation. Thus, plasma/serum Plasmalogen is a potential biomarker for these diseases. Here we describe the relationship between plasmalogen and diseases, and the various reports from conventional to new methods of plasmalogen measurement.

Key words: plasmalogen, biomarker, LC-MS/MS, enzymatic assay

1 はじめに

グリセロリン脂質は、グリセロール骨格の *sn*-1 位への脂肪族炭化水素鎖の結合形態によって、ジアシル型、アルキル型、アルケニル型の3つのサブクラスに分類される。ジアシル型はグリセロリン脂質の主要なサブクラ

スであり、一般的にリン脂質というと、ジアシル型を指すことが多い。また、アルキル型とアルケニル型を総称してエーテル型グリセロリン脂質と呼び、特にビニルエーテル基を有するアルケニル型はプラスマローゲンと呼ばれる (Fig. 1)。さらに、*sn*-3 位に結合する極性基に基づき、主にエタノールアミン型とコリン型に分類される。

プラスマローゲンは、嫌気性微生物から哺乳類まで生

連絡者：西向 めぐみ
E-mail : nmegumi@iwate-u.ac.jp

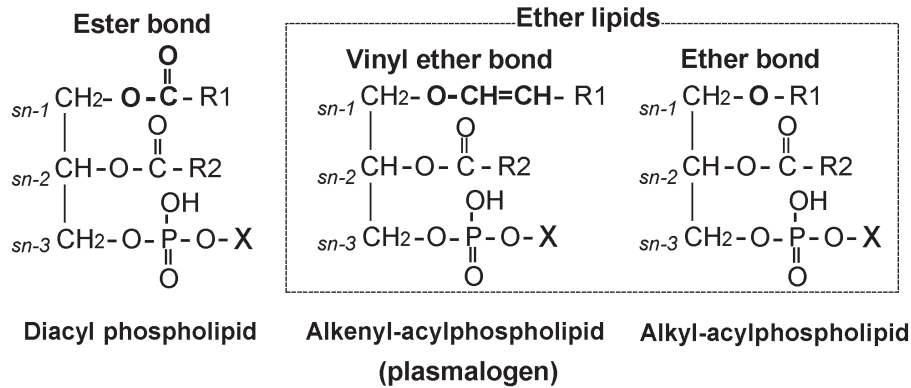


Fig. 1 Chemical structures of diacyl and ether-linked phospholipids.
X, head group (choline, ethanolamine, inositol, serine) ; R1 & R2, hydrocarbon chain.

物界に広く、比較的多く分布しているが、微生物と動物とでは生合成系が異なっていることが報告されている¹⁾。本稿では動物における知見を以下に示す。

動物におけるプラスマローゲン生合成の最初の2段階はペルオキシソームで行われる^{2, 3)}。また、その律速酵素である Fatty acyl CoA reductase 1 (Far 1) はペルオキシソームに局在している⁴⁾ ことから、ペルオキシソームはプラスマローゲンの生合成に欠かせない細胞内小器官であると考えられている。生合成系の途中で生成されるアルキル型グリセロリン脂質はプラスマローゲンの前駆体であり、エタノールアミン型プラスマローゲンはエタノールアミン型のアルキル型グリセロリン脂質から合成されるのに対し、コリン型プラスマローゲンはコリン型のアルキル型グリセロリン脂質ではなくエタノールアミン型プラスマローゲンの変換により合成されると考えられているが、その正確な生合成経路はいまだ不明である^{5, 6)}。

生体内において、プラスマローゲンは多種多様な組織・臓器に分布しているが、ほとんどの臓器でエタノールアミン型の方がコリン型よりも多く、特に脳や神経系ではエタノールアミン型の比率が高くなっている。一方、血漿や心筋など一部の組織においてはコリン型が比較的多く存在している。しかし、その病態生理学的役割はいまだ不明な点が多い。

前述のようにプラスマローゲンの生合成はペルオキシソームで始まる。ペルオキシソームの障害を持つ患者の中には、プラスマローゲンが全身的に減少し、重度の精神遅滞、副腎機能障害、白内障、軟骨異形成や不育症などの様々な病態を示すことがある⁷⁾。プラスマローゲン生合成ノックアウトマウスも同様の表現型を示し、特に中枢神経系の機能障害が顕著である⁸⁾。また、プラスマローゲンは脳に多く存在し、神経細胞の機能やミエリンの形成に不可欠な役割を果たしていることから^{9, 10)}、プ

ラスマローゲンの減少は、アルツハイマー病 (AD) をはじめとする多くの神経変性疾患の要因となっている¹¹⁻¹³⁾。さらに、プラスマローゲンは、膜融合の促進に関わる膜の特性を調節する¹⁴⁾ など、生体膜の調節にも関与することから、神経系に限らず、様々な病態の発現に関与している可能性が示唆されている。

脳や心筋などプラスマローゲンが多く含まれている臓器は、酸素消費量が多く、酸化ストレスを受けやすいこと、また、プラスマローゲンを欠損させた培養細胞や動物は、野生型に比べて酸化ダメージを受けやすいことから、プラスマローゲンは内因性の抗酸化物質として機能していると考えられている。この機能には、sn-1位のビニルエーテル結合が関与し、ビニルエーテル部分を介した活性酸素種消去により、細胞を酸化障害から保護すると考えられている¹⁵⁻¹⁸⁾。さらに、プラスマローゲンはsn-2位にアラキドン酸やドコサヘキサエン酸などの多価不飽和脂肪酸を結合し、炎症に関連する生理活性脂質メディエーターの前駆体の貯蔵庫としても機能している。

以上のような観点より、酸化ストレスや慢性炎症を伴う代謝性疾患へのプラスマローゲンの関与が注目され、認知症や動脈硬化症、心血管疾患などの加齢性の疾患では、症状の進行とともに血中のプラスマローゲンの減少が報告されている¹⁹⁻²²⁾。また、プラスマローゲンと癌との関係も報告されており、胃癌や結腸癌のような消化器癌の患者における血漿中プラスマローゲンは、健常者と比較して有意に増加している^{23, 24)}。このように、老化と関連する疾病とプラスマローゲンの関係は、その増減だけでは判断できないほど非常に複雑である。しかし、複雑であるがゆえに、血漿・血清中のプラスマローゲンは、加齢性疾患の診断や治療効果の予測に役立つマーカーとなる可能性があり、ますます、プラスマローゲン分析の必要性が高まると考えられる。そこで本稿では、我々が採用している血漿・血清プラスマローゲンの分析

法を含め、プラスマローゲンの新旧様々な分析法について以下に紹介する。

2 血漿・血清中のプラスマローゲンの分析法

プラスマローゲンの分析法はいろいろあるが、その構造的特徴であるビニルエーテル結合を利用したものが多い。

プラスマローゲンのビニルエーテル結合はメタノール溶液中でヨウ素と特異的かつ定量的に反応することが知られており、ヨウ素の持つ 355 nm の波長光の吸収の減少を測定することで、プラスマローゲンの定量が可能である^{25, 26)}。このヨウ素を用いた古典的な方法は、比較的簡単な手順ではあるが、検出感が低いという問題がある。同じくビニルエーテル結合を利用した分析法として、アルデヒドを測定する方法がある。プラスマローゲンのビニルエーテル結合は酸に不安定で、酸により脂肪族アルデヒドとリゾリン脂質に分解される。結果として得られる脂肪族アルデヒドは、通常、ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC または GC/MS) を用いてジメチルアセタール誘導体として測定され²⁷⁾、一方、リゾリン脂質は二次元薄層クロマトグラフィーなどによって測定される²⁸⁾。また、ホスホリパーゼ C により sn-3 位のリン酸基以降を切断し、残った部分を高速液体クロマトグラフィー (HPLC, LC) にてプラスマローゲンとジアシル型、アルキル型を分離する方法もある²⁹⁻³¹⁾。

しかし、これらの分析法は、手間がかかること、また感度の問題があり、プラスマローゲンを正確に分析・定量するには不十分である。近年、これらの問題を解決するために以下のような様々な方法が報告されている。

2・1 放射性ヨウ素 (¹²⁵I) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析

我々はプラスマローゲンの簡便で迅速な高感度定量法

を検討する中で、triiodide ion (以下、I₃⁻と略す) がプラスマローゲンのビニルエーテル結合と特異的に反応し、プラスマローゲンにヨウ素 (I) を付加することを見出した³²⁾。反応機序やヨウ素付加体の構造の詳細は不明であるが、質量分析によりヨウ素付加体では 158 の質量増加を認めることから、Fig. 2 のような構造が推測

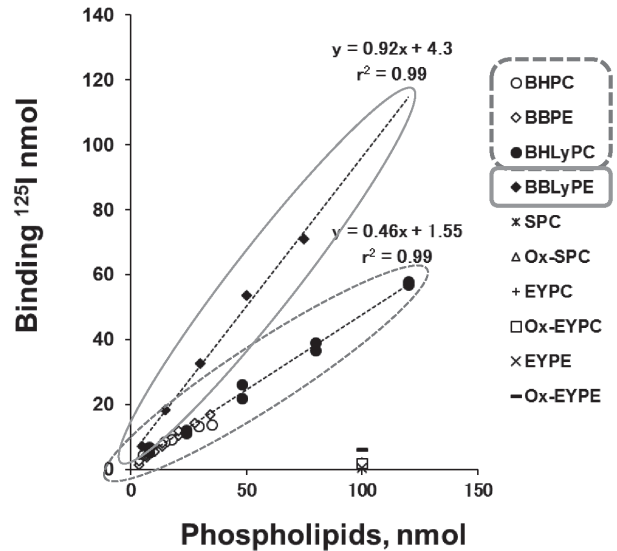


Fig. 3 Radioactive iodine (I-125) binding capacity of various glycerophospholipids^{35, 36)}.

BHPC, bovine heart choline glycerophospholipids (70% PlsCho); BBPE, bovine brain ethanolamine glycerophospholipids (90% PlsEtn); BHLyPC, bovine heart choline lysoglycerophospholipids (80% LyPlsCho); BBLyPE, bovine brain ethanolamine lysoglycerophospholipids (90% LyPlsEtn); SPC, soybean phosphatidylcholine; Ox-SPC, oxidized soybean phosphatidylcholine; EYPC, egg yolk phosphatidylcholine; Ox-EYPC, oxidized egg yolk phosphatidylcholine; EYPE, egg yolk phosphatidylethanolamine; Ox-EYPE, oxidized egg yolk phosphatidylethanolamine.

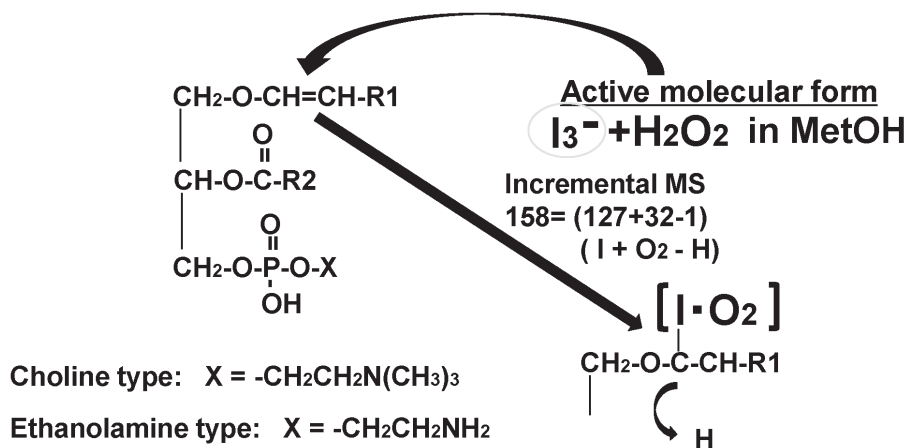


Fig. 2 Estimated mechanism of action of iodine with Plasmalogen.

された。ちなみに、ヨウ素以外のハロゲン元素である塩素 (Cl) や臭素 (Br) もプラスマローゲンと特異的に反応するが、これらの元素の場合にはプラスマローゲンは開裂してしまい、塩化あるいは臭化アルデヒドを生成する^{33, 34)}。ヨウ素付加プラスマローゲンを高感度で検出するために、放射性ヨウ素 (^{125}I) を過酸化水素で処理し $^{125}\text{I}_3^-$ を含むヨウ素試薬を作製した³²⁾。このヨウ素試薬を用いてヨウ素とプラスマローゲンとの結合比を調べたものを Fig. 3 に示す。コリン型プラスマローゲン (BHPC, 70%コリン型プラスマローゲン) とそのリゾ体 (BHLyPC, 80%コリン型リゾプラスマローゲン)、およびエタノールアミン型プラスマローゲン (BBPE, 90%エタノールアミン型プラスマローゲン) とは 1:1 の割合 (見かけの結合比は 1:0.5) で、エタノールアミン型プラスマローゲンのリゾ体 (BBLyPE, 90%エタノールアミン型リゾプラスマローゲン) とは 1:2 の割合 (見

かけの結合比は 1:1) で結合することがわかった。ちなみに、プラスマローゲン以外のグリセロリン脂質にはヨウ素は結合しないことも確認している (Fig. 3)。これらのヨウ素付加プラスマローゲンは、フローガンマカウンターを検出器として、内部標準物質を用いた HPLC により分別定量が可能となった³²⁾。HPLC 上のピーク面積と計測された放射活性の間には直線性が認められ、ピークの形状や溶出時間に影響されず定量ができること、さらに直線の傾きはプラスマローゲンの分子種によらずコリン型プラスマローゲン、エタノールアミン型プラスマローゲン、および内部標準物質でほぼ等しく、定量値は比較可能であることが示された³⁵⁾ (Fig. 4)。さらに、本定量法の precision (精度:再現性) と accuracy (正確度:真値にどのくらい近い) を日内および日間変動により評価したところ、いずれも満足できる結果が得られ、本法がルーチン使用に耐えられることを確認し

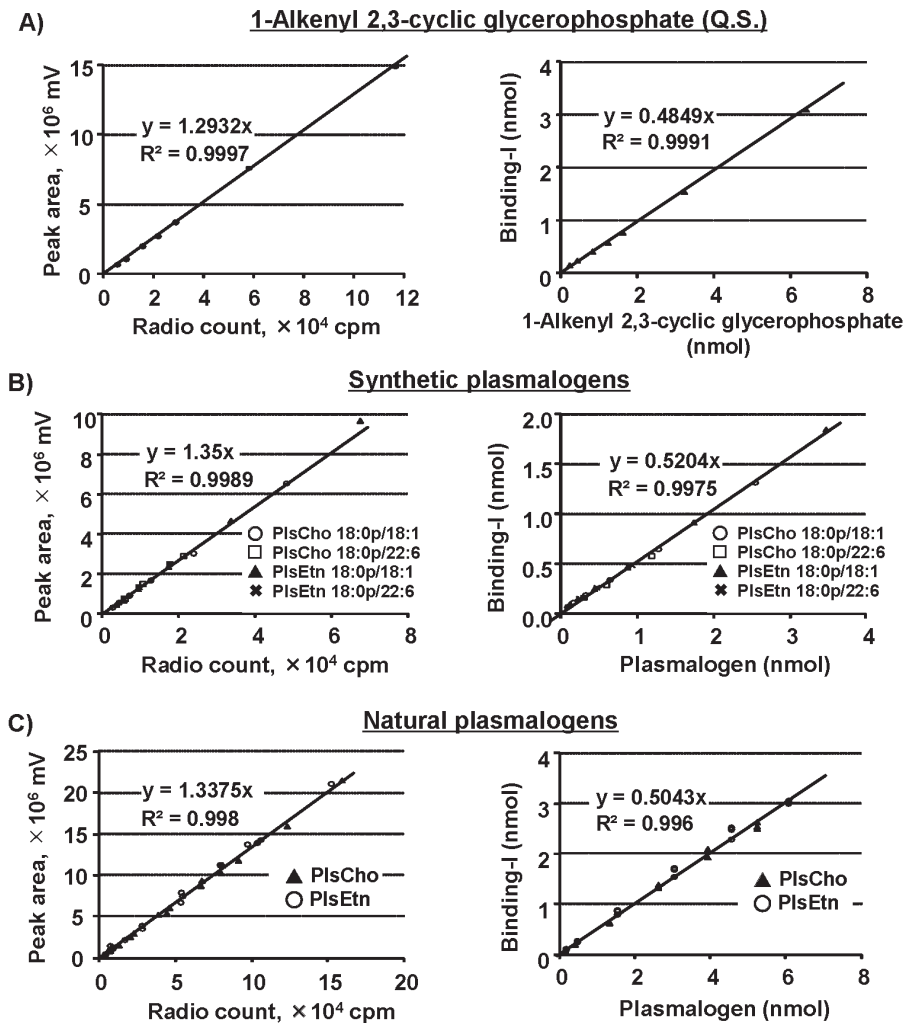


Fig. 4 Linear regression analyses between the peak areas on LC and the radio counts, and the between the amounts of binding-iodine and plasmalogen or Q.S.^{35, 36)}.

PlsCho, choline plasmalogen; PlsEtn, ethanolamine plasmalogen; Q.S., quantitative standard (1-Alkenyl 2,3-cyclic glycerophosphate).

た^{35, 36)}。

2・2 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による分析

病態との関連性を論じる上で、プラスマローゲンの総量だけではなく、プラスマローゲンに結合している脂肪酸の種類や官能基などの詳細な構造解析、つまり分子種の情報が必要である。溶離液等を工夫してLCによるリン脂質の分離も可能であるが、分子種等の詳細な情報を得ることは難しい。そこでLCとMS/MSを組み合わせた分析法がリン脂質の分析には有効である。LCの条件に関しては、使用する機器の仕様などにより使用可能な溶媒が異なるので、他の論文を参考にして欲しい^{37, 38)}。ここではMS/MSについて紹介する。

前述のように、グリセロリン脂質は、グリセロールを骨格とし、sn-1位に脂肪族炭化水素鎖である脂肪族アシル基または1-O-アルキル基、sn-2位にアシル基、sn-3位に極性基を持つリン酸エステル基(極性頭部基)を含む。MSにおいて、グリセロリン脂質の[M+H]⁺または[M-H]⁻にアルゴンや窒素などの不活性ガスを衝突ガス(コリジョンガス)として衝突させると解離(衝突誘起解離, Collision-induced dissociation: CID)し、フラグメントを生じる。ポジティブイオンモードのCIDの場合、主要なフラグメンテーション経路の1つは、リン酸-グリセロール結合の切断であり、その結果、リン脂質の極性頭部基の特徴的な断片化によるプロダクトイオンの生成によって、リン脂質のクラスを特異的に検出することができる^{39, 40)}。

エタノールアミン型グリセロリン脂質はポジティブイオンモードのCIDで、ホスホエタノールアミンの頭部基である141 Daのニュートラルロスを示す。しかし、同じエタノールアミン型であってもプラスマローゲンはジアシル型やアルキル型と同程度のホスホエタノールアミンのニュートラルロスは受けない⁴¹⁾。代わりにビニルエーテル基によってもたらされる特徴的な分子内転移により、ビニルエーテル基を含むsn-1位とsn-2位の炭化水素側鎖を反映するフラグメントを生成することが明らかになっている⁴²⁾。そのフラグメントをFig. 5(左)に示した。CIDにより、sn-1位が16:0, 18:0, 18:1であるエタノールアミン型プラスマローゲンは、それぞれsn-1由来の炭化水素鎖を有し、かつ、リン酸-エタノールアミンを含むm/z 364, 392, 390のフラグメントを生成する。その結果、sn-1位が16:0であるエタノールアミン型プラスマローゲンの場合、sn-2位に結合する炭化水素鎖によって、Fig. 5(右)に示すような分子種の検出が可能となる。示したチャートはヒトの血清の分析例である。

一方、コリン型グリセロリン脂質はポジティブイオンモードのCIDで、ホスホコリンの頭部基であるm/z 184のプロダクトイオンを生成する。コリン型の場合、アルケニル型であるプラスマローゲンもジアシル型やアルキル型と同じようにm/z 184のプロダクトイオンを主に生成する。しかし、コリン型プラスマローゲンは、エタノールアミン型プラスマローゲンのようなプラスマローゲン特異的なフラグメントを生成しない。そこで、

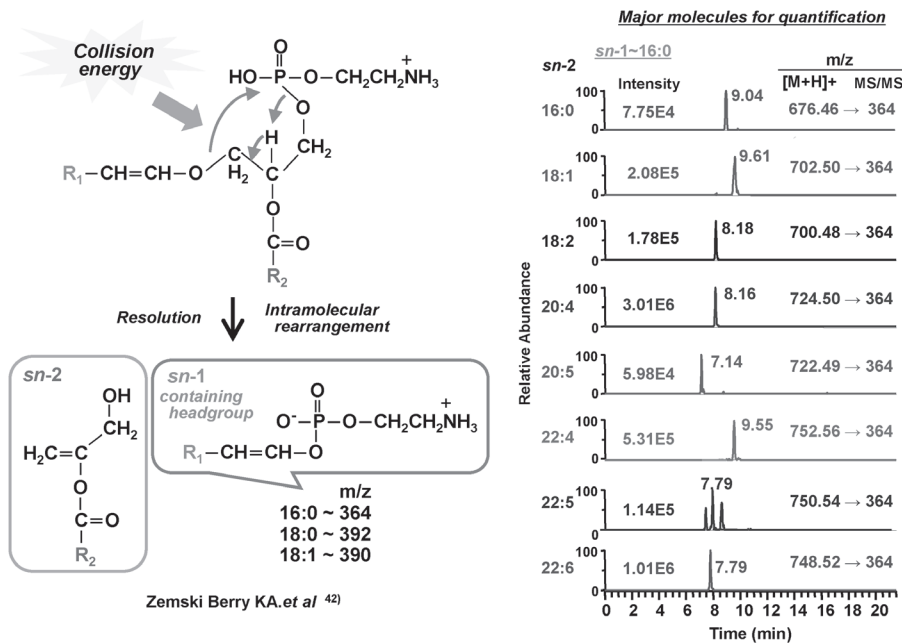


Fig. 5 UPLC-MS/MS analysis of ethanolamine plasmalogen molecular species.

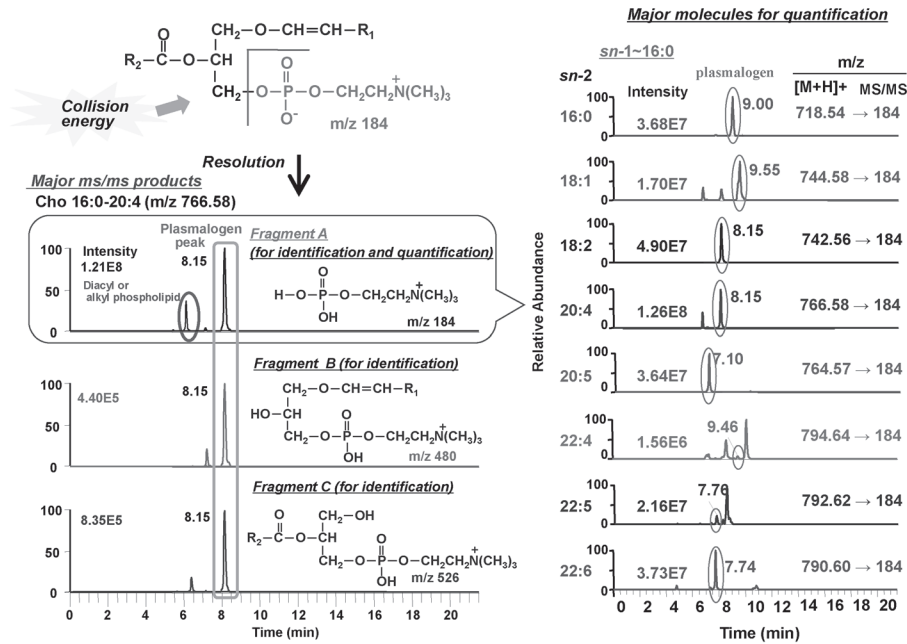


Fig. 6 UPLC-MS/MS analysis of choline plasmalogen molecular species³⁶⁾.

我々は、コリン型プラスマローゲンから生成する3種のフラグメントによる同定、および、プラスマローゲンは酸に弱いという性質を利用したピーク同定により分析している^{21, 43)}。例として16:0/20:4のコリン型プラスマローゲンのMS/MSをFig. 6に示す。CIDにより、ホスホコリン由来の m/z 184と sn -2位または sn -1位の炭化水素鎖が外れたフラグメントが生じ、同じリテンションタイムのピークを検出することにより同定を行う。さらに、酸処理(塩酸蒸気に暴露)をしたサンプルを同じように分析すると、酸に弱いプラスマローゲンのピークは消失する。これらの方法を合わせて同定を行っている。定量には、イオン強度の強い m/z 184のフラグメントを使用している。なお、コリン型プラスマローゲンのMS/MS分析に関しては、東北大学のグループで酢酸ナトリウムを含む溶離液を用いたアルカリ金属(ナトリウムイオン)存在下での特異的なフラグメント解析を確立しているのでこちらも参考にされたい^{44, 45)}。このようにLC-MS/MSを利用して、プラスマローゲンの分子種解析が可能である。

2・3 酵素アッセイ法による分析

LC-MS/MSを用いた血清中のプラスマローゲンの測定は、分子種などの詳細な情報を得ることができるが、測定機器が高価であることや、サンプルの処理に手間と時間がかかりすぎる問題がある。プラスマローゲン特異的な酵素を用いた測定キットのようなツールがあれば、医療現場での血漿・血清中プラスマローゲンの迅速測定やプラスマローゲン研究の促進につながる。酵素法によ

る分析には、ホスホリパーゼ(PL) A1, PLA2, PLB, PLC, PLDによる分解が考えられるが、プラスマローゲン特異的な加水分解酵素に関しては、福島大学のグループが多く報告をしている。

PLA1とPLA2は、それぞれ sn -1位と sn -2位の位置選択性を持つが、杉森らは、市販のPLA2よりもプラスマローゲンの sn -2位のエステル結合の加水分解に適している新規ホスホリパーゼA1(PLA1)を*Streptomyces albidoflavus* NA297⁴⁶⁻⁴⁸⁾から単離している。さらにリゾプラスマローゲンに特異性を示すホスホリパーゼDも報告している^{49, 50)}。これらの酵素を組み合わせることにより、プラスマローゲンからリゾプラスマローゲン、さらにコリンやエタノールアミンが生成する。この反応系に、コリンオキシダーゼやアミンオキシダーゼを組み合わせることによってプラスマローゲンを測定する方法を提案している³⁶⁾。また、馬渡ら⁵¹⁾は*Aspergillus oryzae*由来のPLA1により共存するジアシル型リン脂質を除去後、残りのエーテル型リン脂質をグリセロリン脂質特異的PLDで分解し、遊離のコリンやエタノールアミンを測定する方法を提案している。

3 おわりに

本総説では、著者らの分析方法を含む、プラスマローゲン分析の従来法から新しい方法まで様々な測定法を紹介した。プラスマローゲンと疾病との関係が今後も明らかにされていくことは予想され、それに伴い、疾病マーカーとしてだけでなく、疾病予防へのプラスマローゲ

ンの活用が考えられる。そうになると、血漿・血清だけではなく、食品素材も分析対象となる。その際、主に何を検討したいのか(存在の確認なのか、総量なのか、分子種組成なのか)、また、研究設備や状況によって採用する分析法を選ぶ必要がある。

文 献

- 1) Zhou, Y.; Yu, N.; Zhao, J.; Xie, Z.; Yang, Z.; Tian, B. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, 765 (2020).
- 2) Wanders, R.J.; Waterham, H.R. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 1707-1720 (2006).
- 3) Brites, P.; Waterham, H.R.; Wanders, R.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1636**, 219-231 (2004).
- 4) Honsho, M.; Asaoku, S.; Fujiki, Y. *J. Biol. Chem.* **285**, 8537-8542 (2010).
- 5) Lee, T.C. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 129-145 (1998).
- 6) Watschinger, K.; Werner, E.R. *Biochimie* **95**, 59-65 (2013).
- 7) Farooqui, A.A.; Horrocks, L.A. *Neuroscientist* **7**, 232-245 (2001).
- 8) da Silva, T.F.; Sousa, V.F.; Malheiro, A.R.; Brites, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1501-1508 (2012).
- 9) Luoma, A.M.; Kuo, F.; Cakici, O.; Crowther, M.N.; Denninger, A.R.; Avila, R.L.; Brites, P.; Kirschner, D.A. *Free Radic. Biol. Med.* **84**, 296-310 (2015).
- 10) Nagan, N.; Zoeller, R.A. *Prog. Lipid Res.* **40**, 199-229 (2001).
- 11) Igarashi, M.; Ma, K.; Gao, F.; Kim, H.W.; Rapoport, S.I.; Rao, J.S. *J. Alzheimers Dis.* **24**, 507-517 (2011).
- 12) Ginsberg, L.; Rafique, S.; Xuereb, J.H.; Rapoport, S.I.; Gershfeld, N.L. *Brain Res.* **698**, 223-226 (1995).
- 13) Han, X.; Holtzman, D.M.; McKeel, D.W.Jr. *J. Neurochem.* **77**, 1168-1180 (2001).
- 14) Glaser, P.E.; Gross, R.W. *Biochemistry* **33**, 5805-5812 (1994).
- 15) Morand, O.H.; Zoeller, R.A.; Raetz, C.R. *J. Biol. Chem.* **263**, 11597-11606 (1988).
- 16) Khaselev, N.; Murphy, R.C. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 275-284 (1999).
- 17) Maeba, R.; Sawada, Y.; Shimasaki, H.; Takahashi, I.; Ueta, N. *Chem. Phys. Lipids* **120**, 145-151 (2002).
- 18) Dean, J.M.; Lodhi, I.J. *Protein Cell* **9**, 196-206 (2018).
- 19) Goodenowe, D.B.; Cook, L.L.; Liu, J.; Lu, Y.; Jayasinghe, D.A.; Ahiahonu, P.W.; Heath, D.; Yamazaki, Y.; Flax, J.; Krenitsky, K.F.; Sparks, D.L.; Lerner, A.; Friedland, R.P.; Kudo, T.; Kamino, K.; Morihara, T.; Takeda, M.; Wood, P.L. *J. Lipid Res.* **48**, 2485-2498 (2007).
- 20) Wallner, S.; Schmitz, G. *Chem. Phys. Lipids* **164**, 573-589 (2011).
- 21) Nishimukai, M.; Maeba, R.; Yamazaki, Y.; Nezu, T.; Sakurai, T.; Takahashi, Y.; Hui, S.P.; Chiba, H.; Okazaki, T.; Hara, H. *J. Lipid Res.* **55**, 956-965 (2014).
- 22) Nishimukai, M.; Maeba, R.; Ikuta, A.; Asakawa, N.; Kamiya, K.; Yamada, S.; Yokota, T.; Sakakibara, M.; Tsutsui, H.; Sakurai, T.; Takahashi, Y.; Hui, S.P.; Chiba, H.; Okazaki, T.; Hara, H. *Clin. Chim. Acta* **437**, 147-54 (2014).
- 23) Lv, J.; Lv, C.Q.; Xu, L.; Yang, H. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **21**, 157-160 (2015).
- 24) Merchant, T.E.; Kasimos, J.N.; de Graaf, P.W.; Minsky, B.D.; Gierke, L.W.; Glonek, T. *Int. J. Colorectal Dis.* **6**, 121-126 (1991).
- 25) Williams, J.N.; Anderson, C.E.; Jasik, A.D. *J. Lipid Res.* **3**, 378-381 (1962).
- 26) Gottfried, E.L.; Rapport, M.M. *J. Biol. Chem.* **237**, 329-333 (1962).
- 27) Ingrand, S.S.; Wahl, A.; Favreliere, S.; Barbot, F.; Tallineau, C. *Anal. Biochem.* **280**, 65-72 (2000).
- 28) Horrocks, L.A. *J. Lipid Res.* **9**, 469-472 (1968).
- 29) Ramesha, C.S.; Pickett, W.C.; Murthy, D.V. *J. Chromatogr.* **491**, 37-48 (1989).
- 30) Nishihira, J.; Ishibashi, T.; Sawamura, Y.; Hosokawa, M. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33**, 137-146 (1994).
- 31) Nishimukai, M.; Wakisaka, T.; Hara, H. *Lipids* **38**, 1227-1235 (2003).
- 32) Maeba, R.; Ueta, N. *Anal. Biochem.* **331**, 169-176 (2004).
- 33) Albert, C.J.; Crowley, J.R.; Hsu, F.F.; Thukkani, A.K.; Ford, D.A. *J. Biol. Chem.* **276**, 23733-23741 (2001).
- 34) Albert, C.J.; Thukkani, A.K.; Heuertz, R.M.; Slungaard, A.; Hazen, S.L.; Ford, D.A. *J. Biol. Chem.* **278**, 8942-8950 (2003).
- 35) Maeba, R.; Yamazaki, Y.; Nezu, T.; Okazaki, T. *Ann. Clin. Biochem.* **49**, 86-93 (2012).
- 36) Maeba, R.; Nishimukai, M.; Sakasegawa, S.; Sugimori, D.; Hara, H. *Adv. Clin. Chem.* **70**, 31-94 (2015).
- 37) Shoji, N.; Nakagawa, K.; Asai, A.; Fujita, I.; Hashiura, A.; Nakajima, Y.; Oikawa, S.; Miyazawa, T. *J. Lipid Res.* **51**, 2445-2453 (2010).
- 38) Zhao, Y.Y.; Xiong, Y.; Curtis, J.M. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5470-5479 (2011).
- 39) Pulfer, M.; Murphy, R.C. *Mass Spectrom. Rev.* **22**, (2003).
- 40) Cole, M.J.; Enke, C.G. *Anal. Chem.* **63**, 1032-1038 (1991).
- 41) Kayganich, K.A.; Murphy, R.C. *Anal. Chem.* **64**, 2965-2971 (1992).
- 42) Zemski, Berry, K.A.; Murphy, R.C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **15**, 1499-1508 (2004).
- 43) Nishimukai, M.; Yamashita, M.; Watanabe, Y.; Yamazaki, Y.; Nezu, T.; Maeba, R.; Hara, H. *Eur. J. Nutr.* **50**, 427-436 (2011).
- 44) Otoki, Y.; Nakagawa, K.; Kato, S.; Miyazawa, T. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1004**, 85-92 (2015).
- 45) Otoki, Y.; Kato, S.; Kimura, F.; Furukawa, K.; Yamashita, S.; Arai, H.; Miyazawa, T.; Nakagawa, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **134**, 77-85 (2017).
- 46) Sugimori, D.; Kano, K.; Matsumoto, Y. *FEBS Open Bio.* **2**, 318-327 (2012).
- 47) Murayama, K.; Kano, K.; Matsumoto, Y.; Sugimori, D. *J. Struct. Biol.* **182**, 192-196 (2013).

- 48) Sakasegawa, S.I.; Maeba, R.; Murayama, K.; Matsumoto, H.; Sugimori, D. *Biotechnol. Lett.* **38**, 109-116 (2016).
- 49) Matsumoto, Y.; Kashiwabara, N.; Oyama, T.; Murayama, K.; Matsumoto, H.; Sakasegawa, S.I.; Sugimori, D. *FEBS Open Bio.* **6**, 1113-1130 (2016).
- 50) Oyama, T.; Murayama, K.; Sugimori, D. *FEBS Open Bio.* **11**, 1132-1143 (2021).
- 51) Mawatari, S.; Hazeyama, S.; Morisaki, T.; Fujino, T. *Pract. Lab. Med.* **10**, 44-51 (2018).