



Title	Pseudomonas fluorescensの産生するホスファチジルグリセロール分子種の高速度液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析
Author(s)	田岡, 裕佳子; 板橋, 豊
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 56(1), 1-6
Issue Date	2005-03
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/22005">http://hdl.handle.net/2115/22005</a>
Type	bulletin (article)
File Information	56(1)_P1-6.pdf



[Instructions for use](#)

## *Pseudomonas fluorescens* の産生するホスファチジルグリセロール分子種の 高速液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析

田岡裕佳子<sup>1)</sup>・板橋 豊<sup>1)</sup>

(2004年11月17日受付, 2004年12月20日受理)

### Reversed-Phase HPLC/Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Phosphatidylglycerol Molecular Species in *Pseudomonas fluorescens*

Yukako TAOKA and Yutaka ITABASHI

#### Abstract

Regio-specific analysis of molecular species of bacterial phosphatidylglycerols (PG; a mixture of 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol and 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol) was carried out using reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) in conjunction with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). For this purpose, the Gram negative bacterium *Pseudomonas fluorescens* IAM12001 strain was used. The PG fraction was isolated from total lipids of *P. fluorescens* in the stationary phase and resolved into molecular species on an ODS column (25 cm × 4.6 mm i.d., 5 μm particle size) using methanol/water/aqueous ammonium hydroxide (94:6:0.1, v/v/v) as the mobile phase. On-line ESI-MS gave weak product ions [M-RCO]<sup>-</sup>, [M-H-RCOOH]<sup>-</sup> and [RCOO]<sup>-</sup>, in addition to a prominent deprotonated [M-H]<sup>-</sup> molecule. The three product ions derived from a fatty acid at the *sn*-2 position showed greater intensities than those from the *sn*-1 position, by which individual molecular species could be identified. The major molecular species (*sn*-1/*sn*-2) were 16:0/*cis*-11, 12-methylenehexadecanoic acid (cy17:0), 18:1/cy17:0 and 16:0/18:1, of which the sum occupied about 73% of total PG.

**Key words:** Phosphatidylglycerol, Molecular species, Acyl position, *Pseudomonas fluorescens*, Reversed-phase HPLC, Electrospray ionization mass spectrometry

#### はじめに

ホスファチジルグリセロール (PG) はホスファチジルエタノールアミン (PE) やカルジオリピン (CL) と共に菌体膜を構成する主要脂質成分であり, 細菌の生育に不可欠な役割を果たしている (Shibuya, 1992; 畝本, 1993)。その構造は 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R, S* 配置) であることが知られているが (Hostetler, 1982), 最近, *Pseudomonas* 属や大腸菌など種々の細菌の PG 中にジアステレオマーの一つである 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R, R* 配置) が少量存在することが明らかにされている (Itabashi and Kuksis, 1997; 藤島ら, 2004; 蒲野ら 2004)。両異性体の構造式を Fig. 1 に示す。これら異性体の機能の差異についてはまだ明らかにされていないが, *R, R* 異性体も *R, S* 異性体と同様に, アシル基の異なる多数の分子種から構成されており, 菌体内で生合成されると考えられている (藤島ら, 2004; 蒲野ら 2004)。細菌は温度や圧力など環境の変化に適応するために膜脂質の脂肪酸組成, すなわち分子種組成を

変えて膜の流動性を維持することはよく知られている (畝本, 1993)。したがって, PG 分子種を構成脂肪酸の結合位置を含めて明らかにすることは細菌の環境適応を研究する上で重要である。

最近, エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) を用いて PG 分子種を高感度で迅速に分析する方法が検討されている。その多くは, 細菌の総リン脂質を順相または逆相 HPLC を用いて分析し, 数種のリン脂質クラス (PG, PE, CL など) を分離して, 各脂質クラスの分子種を ESI-MS で同定するものであり (Fang and Barcelona, 1998; Fang ら, 2000; Hsu and Turk, 2001; Mazzella ら, 2004), 膜リン脂質分子の網羅的分析法として注目されている。しかしながら, 脂質クラスと各脂質クラスを構成する分子種を一度の HPLC で良好に分離するのは難しく, ピーク間の重なりがしばしば観察される (Fang and Barcelona, 1998; Fang ら, 2000; Mazzella ら, 2004)。このことは, HPLC に MS を併用しても, 少量成分や構成脂肪酸の結合位置を含めて分子種を正確に同定することは困難であることを示唆する。したがって, 精密な分子種分析を目的とす

<sup>1)</sup> 北海道大学大学院水産科学研究科生物資源化学講座  
(Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

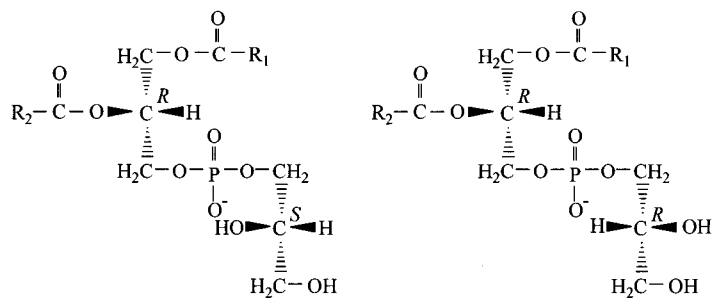


Fig. 1 Structures of bacterial phosphatidylglycerols.  
 Left panel, 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R, S* configuration);  
 Right panel, 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R, R* configuration).

る場合、あらかじめ PG を薄層クロマトグラフィー (TLC) 等の手法を用いて総脂質から単離した後、逆相 HPLC で個々の分子種を明りょうに分離することが必要であると考えられる。

著者らは先に、PG 分子中の 2 つのヒドロキシル基を 3,5-ジニトロフェニルウレタン (bis-DNPU) に変換した後、逆相 HPLC/ESI-MS を用いて分子種組成の詳細を明らかにする方法を報告した (石岡ら, 2003)。この誘導体化法は UV 検出 (254 nm) が可能であるため定量性に優れており、また、PG の立体異性体をキラル HPLC で分離する上で必要不可欠であった (Itabashi and Kuksis, 1997)。しかしながら、立体異性体を区別しないで分子種組成を求める場合、誘導体の調製は必ずしも必要でないと考えられることから、著者らは PG を直接逆相 HPLC/ESI-MS で分析して分子種組成を明らかにすることを試みた。その結果、前報では大腸菌 PG から分子種 23 成分を検出し、そのうち主要な 14 分子種については、構成脂肪酸の結合位置 (*sn*-1 位と *sn*-2 位) を含めて同定することができた (田岡ら, 2004)。本報では、この直接法を大腸菌 PG とは分子種組成の異なる *Pseudomonas fluorescens* PG に適用した結果について報告する。

### 実験方法

#### 試料と PG の単離

*Pseudomonas fluorescens* IAM12001 を B-1 培地中で、25°C で 72 時間培養した後、遠心分離 (8000 rpm, 20 min) によって集菌した。生理食塩水で数回洗浄した菌体から Bligh-Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) を用いて総脂質を抽出し、その約 10 mg (少量のクロロホルムに溶解) を薄層クロマトグラフィー {シリカゲル 60 F<sub>254</sub> (Merck 製), 移動相: クロロホルム-メタノール-水, 65:25:4 (v/v/v)} に付した。展開後、2',7'-ジクロロフルオレセイン-エタノール溶液 (0.2%) を噴霧して紫外線下で PG を検出し (*R<sub>f</sub>* 0.24), クロロホルム-メタノール-酢酸 (20:10:1, by vol) を用いてシリカゲルから抽出した (石岡ら, 2003)。

#### 逆相 HPLC/ESI-MS

ODS カラム (Mightysil RP-18, 250×4.6 mm i.d., 5 μm, 関東化学製) を P4000 ポンプ (Finnigan 製) に接続し、分析温度を CTO-10AS 恒温槽 (島津製) を用いて 20°C 設定した。移動相にはメタノール-水-29% アンモニア水 (94:6:0.1, v/v/v) の混液を使用した。流量は 0.5 ml/min とし、イソクラティック溶離法で分析した。移動相のメタノールと水は HPLC 用 (和光純薬工業製) を用い、29% アンモニア水は特級試薬 (関東化学製) を使用した。移動相混液は、使用前に 0.45 μm の PTFE フィルター (Millipore 製) を用いて濾過した。

PG を 100 μg/ml の濃度になるようにメタノールに溶解し、オートインジェクター (AS3000, Finnigan 製) を用いて、その 3~5 μl をカラムに注入した。MS には、イオントラップ型質量分析計 LCQ (Finnigan 製) を使用し、加熱キャピラリー温度 260°C, スプレー電圧 4.2 kV, シースガス (窒素) 流量 80 arb (arbitrary units), 補助ガス (ヘリウム) 流量 30 arb, キャピラリー電圧 -38 V, チューブレンズオフセット -100 V 及び衝突誘起解離エネルギー (source CID energy) を 40% に設定し、負イオンスペクトルを測定した (質量範囲 150~1,000 amu) (田岡ら, 2004)。

#### UV 検出 HPLC (HPLC/UV)

UV 検出逆相 HPLC (HPLC/UV) により、PG 誘導体 (bis-DNPU) の分子種分析を行った。誘導体は Itabashi and Kuksis (1997) の方法に従って調製した。HPLC ポンプには L-6000 ポンプ (日立製) を使用した。移動相には HPLC/ESI-MS 分析と同様に、メタノール-水-29% アンモニア水 (94:6:0.1, v/v/v) を使用し、流量は 0.5 ml/min のイソクラティック溶離法で分析した。試料を 1 mg/ml の濃度になるようにメタノールに溶解し、その 5 μl を 7125 型インジェクター (Rheodyne 製) を用いてカラムに注入した。検出器には L-4000 (日立製) を使用し、溶出成分を 254 nm でモニターした。クロマトグラムの記録にはクロマトパック C-R6A (島津製) を使用した。

Table 1 Fatty acid composition of phosphatidylglycerols from *Pseudomonas fluorescens* IAM12001 (wt%)<sup>a)</sup>

Fatty acid <sup>b)</sup>	<i>P. fluorescens</i>
14:0	0.5
15:0	0.5
16:0	26.8
16:1n-9	0.1
16:1n-7	9.8
17:0	0.7
17:1	0.2
cy17:0	33.0
18:0	1.2
18:1n-9	0.3
18:1n-7	23.3
cy19:0	2.9

- a) GLC conditions: column, Omegawax 320 (30 m×0.32 mm i.d.); carrier gas (He), 1.2 ml/min; column temperature, 170°C.”  
 b) cy, cyclopropane.

## 結果と考察

## 脂肪酸組成

本研究で分析した *P. fluorescens* IAM12001 株の PG の脂肪酸組成を Table 1 に示す。分子中にシクロプロパン環を持つシス-9,10-メチレンヘキサデカン (cy17:0) が全脂肪酸中 33.0% と最も多く、次いで 16:0 が 26.8%, 18:1n-7 が 23.3%, そして 16:1n-7 が 9.8% を占めた。*P. fluorescens* PDD3513 株の総脂質も、これら 4 種の脂肪酸から主に構成されていることが知られている (Gill ら, 1975)。以下に述べるように、HPLC/ESI-MS を用いて PG の個々の分子種を構成する脂肪酸を特定できるが、予め PG の脂肪酸組成を明らかにしておくことは、分子種の同定を確認する上で有効であった。

## 分子種分析

*P. fluorescens* IAM12001 株 PG の HPLC/ESI-MS によって得られた総イオンカレントクロマトグラム (TIC) を Fig. 2A に示す。移動相にメタノール-水-29% アンモニア水 (94:6:0.1, v/v/v) を用いることで 10 分子種が分離された。各分子種は PG の bis-DNPU 誘導体 (石岡ら, 2003) と同様に、ECN (equivalent carbon number) 値に従って ODS カラムから溶出した (Table 2)。分子種間の相

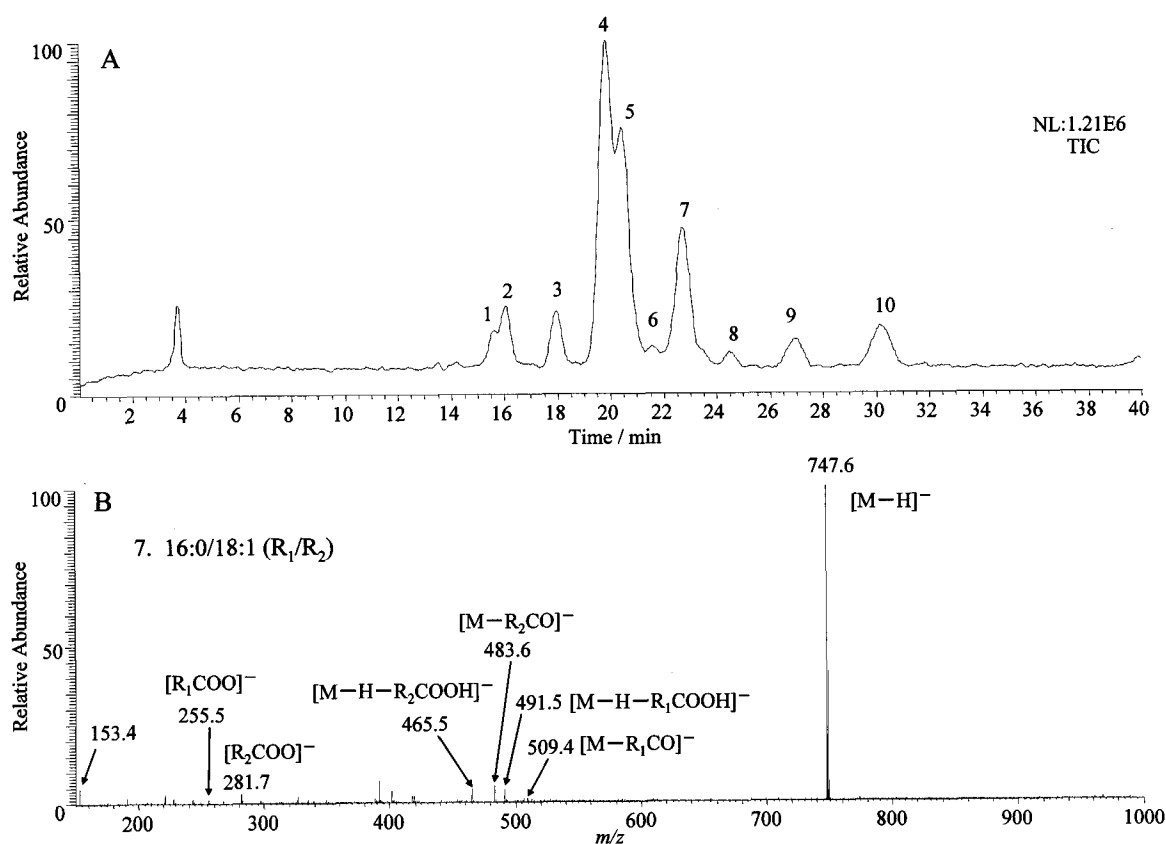


Fig. 2. Reversed-phase HPLC/ESI-MS profiles of the phosphatidylglycerols in *Pseudomonas fluorescens* IAM12001. A, total ion chromatogram (TIC); B, mass spectra averaged over the peak 7 between 22.3 and 23.1 min on the TIC. Source CID energy, 40%. Other MS conditions as given in text.

Table 2 Molecular species composition of phosphatidylglycerols from *Pseudomonas fluorescens* IAM12001 obtained by HPLC/ESI-MS and HPLC/UV.

Peak no. <sup>a)</sup>	ECN <sup>b)</sup>	RRT <sup>c)</sup>	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	Molecular species <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	Peak area%	
					HPLC/ESI-MS <sup>d)</sup>	HPLC/UV <sup>e)</sup>
1	30	0.79	719.5	16:0/16:1	3.1	3.3
2	30	0.81	745.5	18:1/16:1	4.9	4.2
3	32	0.91	745.5	cy17:0/cy17:0 <sup>f)</sup>	4.8	4.6
4	31	1.00	733.5	16:0/cy17:0	27.0	43.7
5	31	1.04	759.5	18:1/cy17:0	26.5	19.7
6	31	1.09	759.5	— <sup>g)</sup>	0.5	1.2
7	32	1.15	747.5	16:0/18:1	19.1	14.5
8	32	1.24	747.5	17:0/cy17:0	1.9	1.8
9	32	1.37	773.5	cy19:0/cy17:0	4.2	2.4
10	33	1.53	761.5	16:0/cy19:0	7.9	4.6

- a) Peak numbers correspond to those in Fig. 3A.  
 b) Equivalent carbon number = total acyl carbon number - 2 x number of double bonds. ECN values of cy 17:0 and cy19:0 are taken as equivalent to those of 17:1 and 19:1, respectively.  
 c) Retention times relative to 16:0/cy17:0. d) [M-H]<sup>-</sup> ions of phosphatidylglycerols.  
 e) UV detection of the bis (3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols. For HPLC conditions, see Ishioka et al. (2003).  
 f) cy, cyclopropane.  
 g) —, not determined.

Table 3 Product ion intensities of phosphatidylglycerols in *Pseudomonas fluorescens* IAM 12001 obtained by HPLC/ESI-MS.

Peak no. <sup>a)</sup>	Molecular species <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	[M-H] <sup>-</sup> ( <i>m/z</i> )	Product ion intensity (%) <sup>b)</sup>					
			[M-R <sub>1</sub> CO] <sup>-</sup>	[M-R <sub>2</sub> CO] <sup>-</sup>	[M-H-R <sub>1</sub> COOH] <sup>-</sup>	[M-H-R <sub>2</sub> COOH] <sup>-</sup>	[R <sub>1</sub> COO] <sup>-</sup>	[R <sub>2</sub> COO] <sup>-</sup>
1	16:0/16:1	719.5	— <sup>c)</sup>	5.7	2.8	4.2	—	3.4
2	18:1/16:1	745.5	—	8.0	3.4	4.4	1.3	4.3
3	cy17:0/cy17:0 <sup>d)</sup>	745.5	—	8.7	—	12.4	—	7.5
4	16:0/cy17:0	733.5	—	6.3	2.8	5.0	—	10.9
5	18:1/cy17:0	759.5	—	5.7	2.7	3.8	1.4	8.0
6	ND <sup>e)</sup>	759.5	—	—	—	—	—	—
7	16:0/18:1	747.5	—	5.0	3.9	4.2	1.3	3.6
8	17:0/cy17:0	747.5	—	3.4	—	3.0	—	3.1
9	cy19:0/cy17:0	773.5	1.2	4.7	1.6	2.9	—	2.0
10	16:0/cy19:0	761.5	—	3.0	2.2	1.5	—	1.2

- a) Peak numbers correspond to those in Fig. 2A.  
 b) Product ion intensities relative to base peak [M-H]<sup>-</sup> (100%). R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> refer to fatty acids on the *sn*-1 and *sn*-2 positions, respectively.  
 c) —, not observed.  
 d) cy, cyclopropane.  
 e) ND, not determined.

互分離は bis-DNPU 誘導体と比べて幾分低下したが、溶出時間は約 50 分短縮された。ESI-MS 分析によって各分子種の構成脂肪酸に関する情報を得るために、イオン源に高電圧 (source CID energy, 40%) を印加してフラグメンテーションを行った。その結果、各ピークの負イオンスペクトルからは、[M-H]<sup>-</sup> の脱プロトン化分子 (ベースピーク) の他に、[M-RCO]<sup>-</sup>、[M-H-RCOOH]<sup>-</sup> 及び [RCOO]<sup>-</sup> のプロダクトイオンが検出された。これらプロダクトイオンの強度はアシル基の結合位置 (*sn*-1 位または *sn*-2 位) によって異なり、*sn*-2 位のアシル基が *sn*-1 位のそれより

も脱離しやすい傾向が認められた (Table 3)。すなわち、*sn*-2 位のアシル基由来の [M-R<sub>2</sub>CO]<sup>-</sup> はピーク 6 を除くすべてのピークから検出されたが、*sn*-1 位由来の [M-R<sub>1</sub>CO]<sup>-</sup> はピーク 9 のみで検出された (この場合も強度は [M-R<sub>2</sub>CO]<sup>-</sup> > [M-R<sub>1</sub>CO]<sup>-</sup> であった)。同様に、[M-H-RCOOH]<sup>-</sup> と [RCOO]<sup>-</sup> についても *sn*-1 位よりも *sn*-2 位由来のイオンが強く検出された。これらの結果から、各プロダクトイオンの強度は脂肪酸の結合位置を反映しており、*sn*-2 位の脂肪酸が *sn*-1 位のそれよりも脱離しやすいことが明らかとなった。従って、これらのイオンを利用し

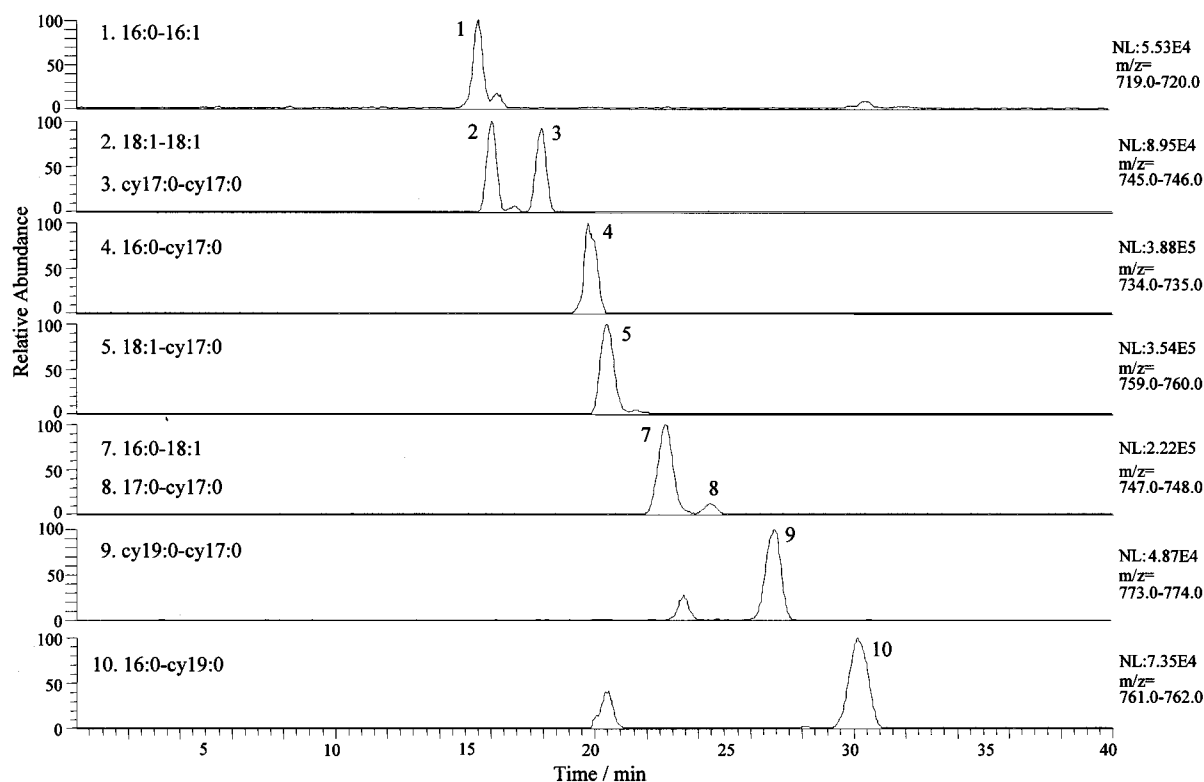


Fig. 3 Mass chromatograms representing  $[M-H]^-$  ions of the major molecular species of phosphatidylglycerols in *Pseudomonas fluorescens* IAM12001  $m/z = [M-H]^- \pm 0.5$

て、HPLC で分離したほとんどすべての分子種をアシル基の結合位置を含めて同定することが可能であった。例えば、TIC 上で 22.3~23.1 分に溶出したピーク 7 の分子種は、 $m/z$  747.6  $[M-H]^-$  と 18:1 由来の  $m/z$  483.6 ( $[M-R_2CO]^-$ ),  $m/z$  465.5 ( $[M-H-R_2COOH]^-$ ),  $m/z$  281.7 ( $[R_2COO]^-$ ) 及び 16:0 由来の  $m/z$  509.4 ( $[M-R_1CO]^-$ ),  $m/z$  491.5 ( $[M-H-R_1COOH]^-$ ),  $m/z$  255.5 ( $[R_1COO]^-$ ) から  $sn-1-16:0/sn-2-18:1$  と同定された (Fig. 2B)。他のピークについても同様の方法で解析した。総分子種中に約 1% しか含まれないピーク 6 については  $[M-H]^-$  は観察されたものの、有効なプロダクトイオンは検出されず、分子種の同定には至らなかった。*E. coli* 脂質に含まれるシクロプロパン酸 (cy17:0 及び cy19:0) は、PG 分子中の  $sn-2$  位に局在することが酵素 (ホスホリパーゼ A2) の立体特異性を利用する方法によって明らかにされている (Kito *et al.*, 1974)。本研究では、*P. fluorescens* PG 中のシクロプロパン酸が  $sn-2$  位に存在することを HPLC/ESI-MS を用いて明らかにした。他のピークについても同様の方法で解析した後、マスクロマトグラフィーによって同定に誤りのないことを確認した (Fig. 3)。例えば、 $m/z$  747.5 $\pm$ 0.5 ( $[M-H]^-$ ) の質量数を検索することにより、分子量の等しい 2 成分 (ピーク 7 とピーク 8) が得られたが (Fig. 3)、これらは上述した方法によって、それぞれ  $sn-1-16:0/sn-2-18:1$ ,  $sn-1-17:0/sn-2-cy17:0$  として同定されたものである。

### 分子種組成

マスクロマトグラフィーから求めた *P. fluorescens* IAM12001 PG の分子種組成 (ピーク面積%) を Table 2 に示す。主な分子種 ( $sn-1/sn-2$ ) は 16:0/cy17:0 (27.0%), 18:1/cy17:0 (26.5%) 及び 16:0/18:1 (19.1%) であった。Fang ら (2000) は、*Pseudomonas* 3 株 (*P. putida* mt-2, *P. putida* F1, *P. mendocina* KRI) のリン脂質 (PG と PE の混合物) を逆相 HPLC/ESI-MS で分析し、TIC 上で 4~6 個のピークを得ているが、これら試料の脂肪酸成分は本研究で分析した *P. fluorescens* と大きく異なり、シクロプロパン酸 (cy17:0 及び cy19:0) と *cis*-バクセン酸 (18:1n-7) の存在は記載されていない。従って、分子種組成も本研究結果と異なる。

マスクロマトグラフィーによって得られた分子種組成は UV 検出 HPLC (HPLC/UV) で得られた値と比較的良く一致したことから (Table 2)、本研究で適用した HPLC/ESI-MS 法は分子種の同定ばかりでなく、組成を求める方法としても有効であると考えられる。しかし、含有率の高い 16:0/cy17:0 では、MS 検出 (26.8%) の方が UV 検出 (43.7%) よりもかなり低い値を示したので、HPLC/ESI-MS で組成を求める場合、成分濃度とピーク面積の相関について、今後詳細に検討する必要があると考えられる。

Table 4 Positional distribution of fatty acids in phosphatidylglycerol molecules of *Pseudomonas fluorescens* (mol%).

Fatty acid	sn-1 + sn-2			
	sn-1 <sup>a)</sup>	sn-2 <sup>a)</sup>	A <sup>b)</sup>	B <sup>c)</sup>
16:0	66.9	—	33.5	26.8
16:1	—	7.6	3.8	9.9
17:0	1.8	—	0.9	0.7
cy17:0	4.7	73.1	38.9	33.0
18:1	24.1	14.7	19.4	23.6
cy19:0	2.4	4.7	3.6	2.9

a) Calculated from the data of HPLC/UV in Table 2.

b) (sn-1 + sn-2)/2.

c) Data from Table 1.

### 脂肪酸の位置分布

*P. fluorescens* PG 分子中の sn-1 位 と sn-2 位における各脂肪酸の位置分布を Table 2 の組成% から計算により容易に求めることが可能である。定量性は ESI-MS 検出よりも UV 検出の方が優れていると考えられるので、本研究では、bis-DNPU 誘導体 (石岡ら, 2003) の組成% を計算に使用した。Table 4 に計算結果を示す。総 PG の脂肪酸組成% は計算値 A と実測値 B が比較的良く一致したことから、本法の分析精度は良好である。主要脂肪酸である 16:0 と cy17:0 は、それぞれ sn-1 位 と sn-2 位に局在し、18:1 は両位置に比較的均等に分布することが認められた。従来、リン脂質を構成する脂肪酸の位置分布は sn-2 位のアシル基を特異的に加水分解する酵素 (ホスホリパーゼ A2) を用いて求められてきた (Christie, 1982)。本研究では、煩雑な操作を要する酵素を使用せずに、HPLC と MS を用いて位置分布を求めることが可能であることを示した。ESI-MS の定量精度が改善されれば、PG を誘導体に変換せずに、直接 HPLC/ESI-MS で分析して位置分布を明らかにすることも可能になると考えられる。

### おわりに

本研究で検討した方法は、PG を直接逆相 HPLC/ESI-MS で分析して分子種組成を求めるもので、従来の PG を加水分解した後、誘導体に変換して組成を求める方法や誘導体化した PG を分析する方法よりも簡便である。本法は、少量 (0.5 μmol 程度) の試料で少量成分 (総分子種中 1% 程度) を含めて分子種の同定が可能であることから、細菌由来 PG の分子種分析に広く適用できると考えられる。

### 文 献

Batley, M., Parcker, N.H., Redmond, J.W. (1982). Molecu-

lar analysis of the phospholipids of *Escherichia coli* K12. *Biochim. Biophys. Acta.* **710**, 400-405.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.

Christie, W.W. (1982). Structural analysis of lipids by means of enzymatic hydrolysis (Chapter 9). pp. 155-166, *Lipid Analysis 2nd Edition*, Pergamon Press, Oxford.

Fang, J., and Barcelona, M.J. (1998). Structural determination and quantitative analysis of bacterial phospholipids using liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, **33**, 23-35.

Fang, J., Barcelona, M.J., and Alvarez, P.J.J. (2000). A direct comparison between fatty acid analysis and intact phospholipids profiling for microbial identification. *Org. Geochem.*, **31**, 881-887.

藤島裕典・蒲野淑子・田岡裕佳子・澤辺智雄・板橋 豊 (2004). 海洋細菌に存在するホスファチジルグリセロールの立体異性体. 日本水産学会誌, **70**, 200-202.

蒲野淑子・藤島裕典・澤辺智雄・板橋 豊 (2004). 海洋細菌に存在する非天然型リン脂質. 北大水産彙報, **55**, 17-21.

Gill, G.O. (1975). Effect of growth temperature on the lipids of *Pseudomonas fluorescens*. *J. General Microbiol.*, **89**, 293-298.

Hostetler, K.Y. (1982) Polyglycerophospholipids: phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and bis (monoacylglycerol) phosphate. pp. 215-261, Hawthorne, J.N., and Ansell, G.B. (Eds.), *Phospholipids*, Elsevier Biochemical Press, Amsterdam.

Hsu, F.F. and Turk J. (2001). Studies on phosphatidylglycerol with triple quadrupole tandem mass spectrometry with electrospray ionization: Fragmentation processes and structural characterization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12**, 1036-1043.

石岡沙織・田岡裕佳子・板橋 豊 (2003). 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法によるホスファチジルグリセロールの分子種分析. 分析化学, **52**, 795-803.

Itabashi, Y. and Kuksis, A. (1997) Reassessment of stereochemical configuration of natural phosphatidylglycerols by chiral-phase high-performance liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, **254**, 49-56.

Kito, M., Ishinaga, M., Nishihara, M., Kato, M., Sawada S., and Hata, T. (1974). Metabolism of the Phosphatidylglycerol Molecular Species in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **54**, 55-63.

Mazzella, N., Molinet, J., Syakti, A.D., Dodi, A., Doumenq, P., Artaud, J., and Bertrand, J.C. (2004). Bacterial phospholipid molecular species analysis by ion-pair reversed-phase HPLC/ESI/MS. *J. Lipid Res.*, **45**, 1355-1363.

Shibuya, I. (1992). Metabolic regulation and biological functions of phospholipids in *Escherichia coli*. *Prog. Lipid Res.*, **31**, 245-299.

田岡裕佳子・石岡沙織・板橋 豊 (2005). 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による大腸菌ホスファチジルグリセロールの分子種分析. 分析化学, **54**, 155-160.

畝本 力 (1993). “特殊環境に生きる細菌の巧みなライフスタイル”, p. 45, (共立出版).