

| 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液体クロマトグラフィー/エレ<br>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          | http://hdl.handle.net/2115/22005   |
| Туре             | bulletin (article)   |
| File Information | 56(1)_P1-6.pdf   |



# 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-diacylsn-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 ( $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$  i.d.,  $5 \mu \text{m}$  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  $[M-RCO]^-$ ,  $[M-H-RCOOH]^-$  and  $[RCOO]^-$ , in addition to a prominent deprotonated  $[M-H]^$ 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-snglycero-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

(Laboratory of Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

<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



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  $F_{254}$  (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 ( $R_f$ 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 $\mu$ m, 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 $\mu$ m の PTFE フィルター (Millipore 製) を用 いて濾過した。

PGを 100  $\mu$ g/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 $\mu$ l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  $\mu$ l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   | comp | osition            | ot   | phos- |
|---------|---------|--------|------|--------------------|------|-------|
| phat    | idylgly | cerols | fror | n <i>Pse</i>       | udor | monas |
| fluo    | rescens | IAM    | 2001 | (wt%) <sup>a</sup> | 1)   |       |

| Fatty acid <sup>b)</sup> | P. fluorescence |
|--------------------------|-----------------|
| 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.

|                        |                   |                   | [M-H]- | Molecular species           | Peak area%                |                       |  |
|------------------------|-------------------|-------------------|--------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|--|
| Peak no. <sup>a)</sup> | ECN <sup>b)</sup> | RRT <sup>c)</sup> | (m/z)  | <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2  | 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  | g)                          | 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                   |  |

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

a) Peak numbers correspond to those in Fig. 3A.

b) Equivalent carbon number = total acyl carbon number -2x 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)  $[M-H]^-$  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 obtaind by HPLC/ESI-MS.

|                        | Molecular species           | [M-H]- | Product ion intensity (%) <sup>b)</sup> |               |                   |  |              |                                   |  |
|------------------------|-----------------------------|--------|---|---------------|-------------------|--|--------------|-----------------------------------|--|
| Peak no. <sup>a)</sup> | sn-1/sn-2                   | (m/z)  | $[M-R_1CO]^-$                           | $[M-R_2CO]^-$ | $[M-H-R_1COOH]^-$ | [M-H-R <sub>2</sub> COOH] <sup>-</sup> | $[R_1COO]^-$ | [R <sub>2</sub> COO] <sup>-</sup> |  |
| 1                      | 16:0/16:1                   | 719.5  | c)                                      | 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  $[M-H]^-$  (100%).  $R_1$  and  $R_2$  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,  $[M-H]^-$ の脱プロトン化分子 (ベースピーク) の他に,  $[M-RCO]^-$ ,  $[M-H-RCOOH]^-$ 及び  $[RCOO]^-$ 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  $[M-R_2CO]^-$ 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  $[M-R_1CO]^-$ はピーク9のみで検出された (この場合も強度は  $[M-R_2CO]^->[M-R_1CO]^-$ であった)。同様に,  $[M-H-RCOOH]^-$ と  $[RCOO]^-$ 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

- 4 -



Fig. 3 Mass chromatograms representing [M-H]<sup>-</sup> ions of the major molecular species of phosphatidylglycerols in *Pseudomonas fluorescens* IAM12001 m/z=[M-H]<sup>-</sup>±0.5

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、  $R_2CO]^{-}$ , m/z 465.5 ([M-H- $R_2COOH]^{-}$ ), m/z 281.7 ([R<sub>2</sub>COO]<sup>-</sup>) 及び 16:0 由来の *m/z* 509.4 ([M-R<sub>1</sub>CO]<sup>-</sup>), m/z 491.5 ([M-H-R<sub>1</sub>COOH]<sup>-</sup>), m/z 255.5 ([R<sub>1</sub>COO]<sup>-</sup>) 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. fuorescens 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 KR1) 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 Posiitional distribution of fatty acids in posphatidylglycerol molecules of *Pseudomonas fluorescens* (mol%).

|            |                            |                    | sn-1+sn-2       |                 |  |
|------------|----------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|--|
| Fatty acid | <i>sn</i> -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. fuorescens 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 *Peudomonas fluorescens. J. General Microbiol.*, 89, 293-298.
- Hostetler, K.Y. (1982) Polyglycerophospholipids: phosphatidylglycerol, diphosphatidylglycerol and bis (monoacylglycero) 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 reversedphase 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.
- 献本 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).

- 6 -