



Title	プラストキノン
Author(s)	柴田, 勝
Citation	低温科学, 67, 233-243 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/39151
Type	bulletin (article)
Note	3章 単離・精製・活性測定 3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量 e
File Information	67-036.pdf



[Instructions for use](#)

3. 酵素・電子伝達成分の精製・活性測定・定量

e. プラストキノン

柴田 勝¹⁾

プラストキノンは、光合成電子伝達系の光化学系IIとシトクロム b_6/f 複合体を仲介する電子伝達体として機能しており、その酸化還元状態により反応中心などのタンパク質の転写が調節されている^{1,2,3)}。本章では、緑葉、葉緑体からの酸化型・還元型プラストキノン類の一般的な抽出・分析方法に加え、微量試料での定量法について紹介する。

Analysis of Plastoquinones in Green Leaves

Masaru Shibata

Plastoquinone is a major plant quinone in chloroplasts, and its function in photosynthesis is to act as electron redox-mediator between PSII and cytochromb₆/f complexes and hydrogen pump across the thylakoid membranes. Many cellular responses to variable environments are carried out *via* the redox state of the plastoquinone-pool as function of a redox sensor in chloroplasts. In this chapter, I introduce plant quinone analytical methods with high performance liquid chromatography which has high sensitive and selective methods. Biosynthesis, principle of analysis and quinone determination of plastoquinones have been described.

3.e.1 プラストキノンの種類

プラストキノン (2,3-dimethyl-6-multiprenyl-1,4-benzoquinone) は、酸化還元反応を行うベンゾキノン環の6位に側鎖としてイソプレニル誘導体が結合した構造を持つ。イソプレニル基 (C₅) を単位として、その数が9, 4, 3のプラストキノンが知られており、それぞれPQA-9, PQA-4, PQA-3として記されている(図1)。従来、論文等では側鎖の炭素数を明示するために側鎖炭素数が45個のPQA-9をPQA-45やPQA₄₅として表記されてきたが^{4,5)}、近年はイソプレニル単位を基本として示すのが一般的である⁶⁾。

全ての緑色植物の葉にはプラストキノンが存在しており、葉令や生育条件によりその含量は大きく変動するが、その中でPQA-9が量的に最も多く、重量比でクロロフィルの10~50%程度相当する量が含まれている^{4,5,6,7,8)}。葉内のプラストキノンは、葉緑体のチラコイド膜、包膜およびプラストグロビュール顆粒に蓄積していることが知られている^{9,10)}。主な機能として光合成電子伝達系の光化学系IIとシトクロム b_6/f 複合体の電子伝達の仲介を行い、その酸化還元レベルは転写制御のシグナル³⁾として働いている。また、光化学系IIのQ_A成分や直接的な活性酸素のクエンチングなど、その機能は多岐に

渡っている。電子伝達に關与するキノン蓄積(プール)は、電子プールとして知られており、主成分はチラコイド膜のPQAである¹¹⁾。これらのことから特に言及されていない限り、論文等のプラストキノン類はPQA-9を示している。本章では以後、PQA-9を主な分析対象として紹介する。

プラストキノンは、側鎖の構造の違いにより3種類に大別することができ、最も一般的なA型のプラストキノン(PQA)に加えてB型(PQB)、C型(PQC)がある(図1)^{4,12)}。イソプレニル側鎖の1つにOHが付加したものがPQCであり、OHの結合位置により6つの異性体(PQC₁~PQC₆)に分類されている。また、PQCのOH基に脂肪酸(C₆~C₁₈)がエステル結合したものがPQBであり、それぞれがPQB₁~PQB₆に対応している⁴⁾。PQA以外のマイナーPQ成分として、側鎖長の短いPQA-4がセイヨウトチノキの緑葉¹³⁾に見出されており、また、ホウレンソウにもPQC₁₋₄、PQC_{5,6}、PQBが全キノン類の1%程度、存在している¹²⁾。これらのプラストキノン類のうちで、比較的機能が明確になっているのがPQAであり、その他のものについてはあまり研究が行われていない。

3.e.2 プラストキノンの生合成

プラストキノンは葉緑体において、ベンゾキノン環に

1) 長岡工業高等専門学校物質工学科

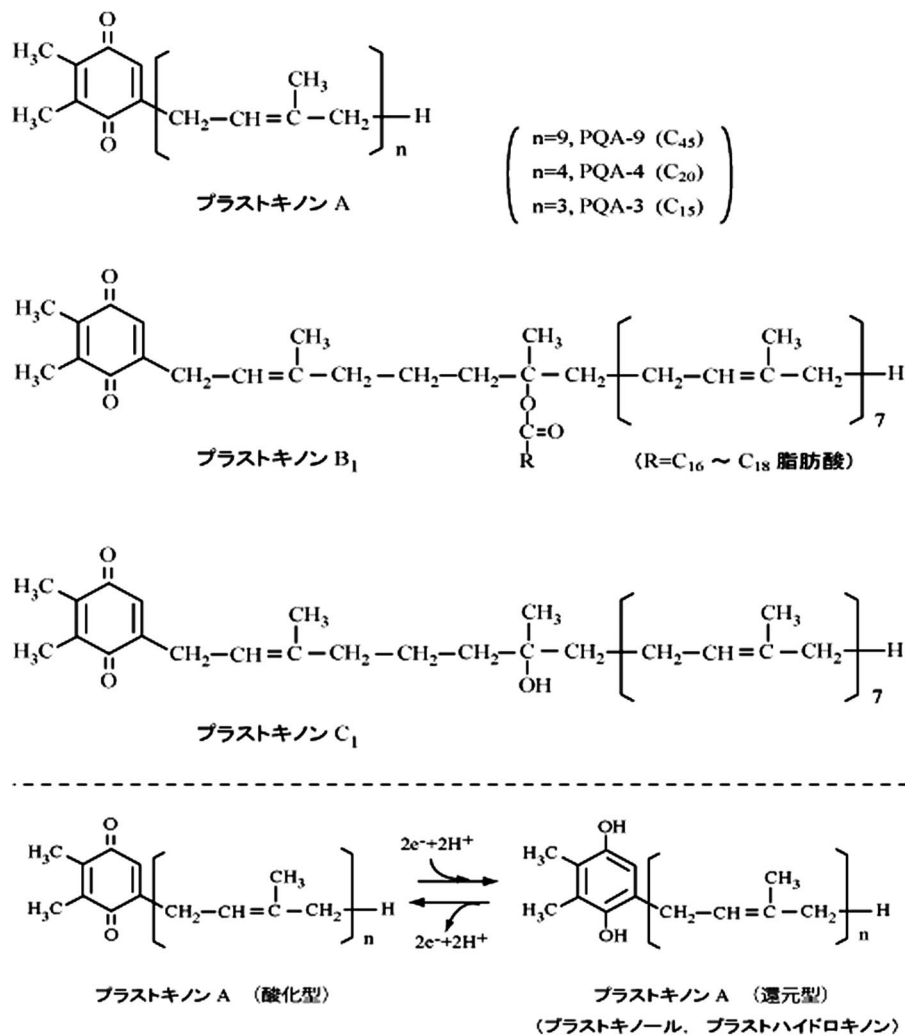


図1：プラストキノン A, B, C の構造と酸化還元反応

側鎖のイソプレニル基が転移し、合成される(図2)^{14,15,16}。葉緑体の植物キノン類は、光化学系 I の A₁ のフィロキノン、抗酸化物質のトコフェロール、電子伝達体のプラストキノンがあり、その合成経路の多くが共通している。ベンゾキノン環は、シキミ酸からコリスミ酸を経てホモゲンチジン酸から合成される。包膜でホモゲンチジン酸にイソペン(C₅)が9個縮合した C₄₅ のソラネシルピロリン酸(solanesyl pyrophosphate)が脱炭酸と共に転移し、2-メチル-6-ソラネシルキノール(2-methyl-6-solanesylquinol)となる。次いでベンゾキノン環のメチル化¹⁷が行われ、プラストキノンの還元型であるプラストキノールが合成される。生合成は、酸化型ではなく全て還元型を基質として行われており、酸化型では各反応は起こらない¹⁵。

プラストキノン側鎖のイソプレノイドは、細胞質・ミトコンドリアでのアセチル-CoA を出発物質とするメバ

ロン酸経路とは異なり、葉緑体・色素体でのピルビン酸・グリセルアルデヒド-3-リン酸を出発物質とする非メバロン酸経路により合成されている(図2)^{18,19}。

3.e.3 プラストキノン分析

プラストキノン^{#1}は、酸化型、還元型でその吸収スペクトルが異なることから、キノン同定は主に紫外域の酸化還元差スペクトル、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)により行われている。小型の葉や変異体などでは、得られる試料量

^{#1} PQA-9は市販されているが、マイナープラストキノンの標準物質の入手は困難であることから、TLCなどにより精製する必要がある。PQA-9を含め、主なプラストキノン類ならば、キノンを研究している研究室から分譲してもらうのが純度や濃度の信頼性の点から確実である。

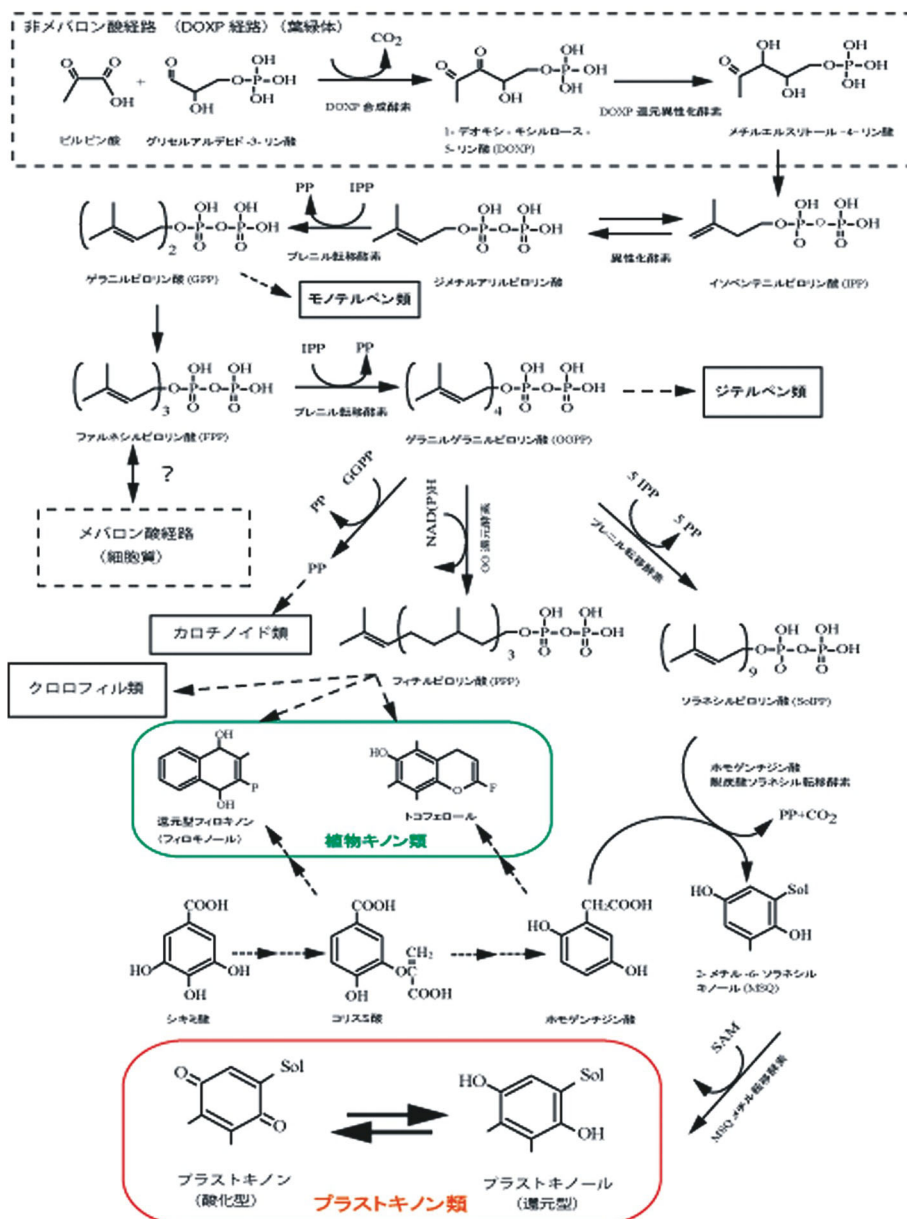


図2：葉緑体のプラストキノンの合成経路

が限られていることから、極微量試料 (10 mg 以下) によるプラストキノンの測定についても紹介する。

3.e.3.1 酸化還元差スペクトルの測定操作

プラストキノンは、酸化型が 255 nm、還元型が 290 nm に吸収極大を示す。微量の不純物を含むプラストキノンの分画フラクションのキノンの定性定量を行うには吸収法ではなく、酸化還元差スペクトルにより行う (表 1, 図 3)。酸化型プラストキノンは 255~260 nm に吸収帯があり、還元型ではその吸収が消失する (図 3)。緑葉には、キノン類としてトコフェロール、フィロキノン、ユビキノンがあり、トコフェロール、ユビキノンの還元型の吸収スペクトル (極大 290 nm) はプラストキノンの還元型

表 1：プラストキノンの吸収とモル吸光係数 (エタノール中)

プラストキノンの種類	吸収極大波長 (nm)	モル吸光係数 ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	文献
酸化型	255	17.9	3), 30)
還元型	290	3.4	3), 30)
酸化還元差	255	15.0	3), 22)

と類似しているが、その酸化型の吸収帯が大きく異なることから、酸化還元差吸収スペクトルにより定性を行う。プラストキノンの吸収スペクトルは側鎖の種類や長さにより影響を受けないことから⁴⁾、全てのプラストキノンの種に対して同様な手順により定量を行うことができる。

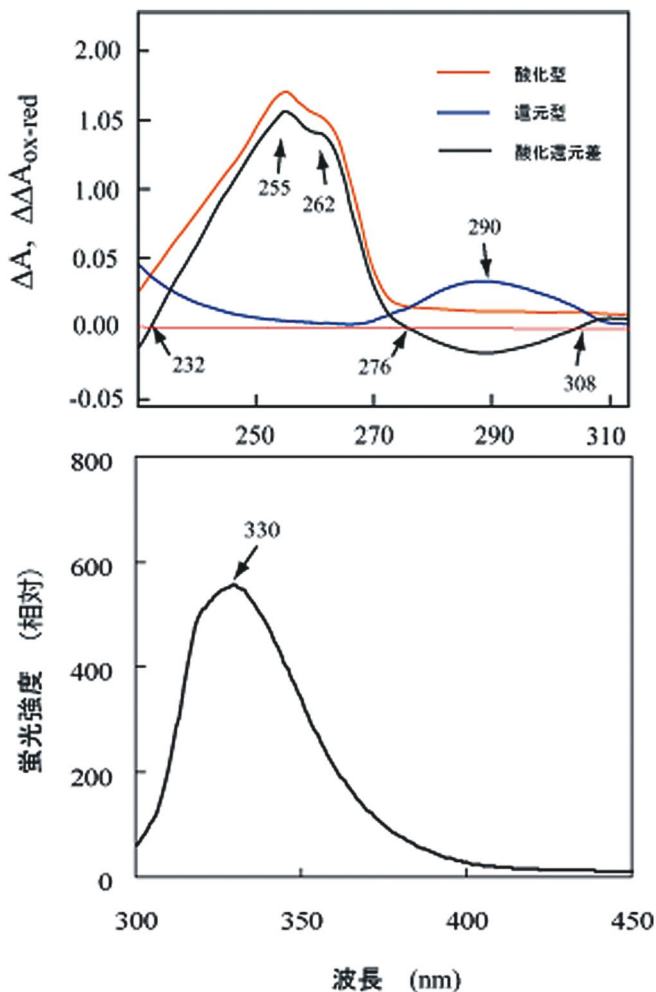


図3：プラストキノンのスペクトル
(a)酸化型、還元型および酸化還元差スペクトル(エタノール中)
(b)還元型プラストキノンの蛍光スペクトル (290 nm 励起)

溶液中の酸化型プラストキノンの定量を以下の1～3操作により行い、還元型を含む全プラストキノンの量に対しては4、5操作により測定する。

[実験操作]

1. プラストキノンを含むエタノール溶液の吸収スペクトルを220～340 nmの範囲で測定する^{※2}。
2. 次にエタノール溶液1.0 mlに対して水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) を数粒 (極微量, 数 μg 程度) 添加し^{※3}, プラストキノンをプラストキノールに還

^{※2} 試料・標準物質が微量である場合、全ての操作を分光光度計のセル内で行う。

^{※3} プラストキノンは比較的安定であるが、過剰な水素化ホウ素ナトリウムの添加により分解する。また、分光光度計のセル内で水素が発生し、気泡の付着によりスペクトルが乱れることがあるので注意すること。

元する。ゆっくり攪拌し、20秒後に再度、吸収スペクトルを測定する。キノン還元は比較的速度で行われるが、条件により時間がかかる場合があるので、数回、スペクトル測定を行い、変化がなくなるまで繰り返し測定する。スペクトル変化がなくなれば、全てのキノンが還元されたとみなす (図3)。

3. 255 nmの還元前の吸光度 (ΔA_{ox}) と還元後の吸光度 (ΔA_{red}) の差を酸化還元差モル吸光係数 15.0 (mM⁻¹cm⁻¹)^{※4} を用いてプラストキノンの濃度を求める (表1)^{4,12,20}。

$$\text{プラストキノンの濃度 (mM)} = \frac{\Delta A_{\text{ox}} - \Delta A_{\text{red}}}{15}$$

4. 試料中に還元型プラストキノール (プラストキノール、プラストヒドロキノール) が混在する場合は、試料のエタノール溶液に最終濃度が1 mMとなるようにFeCl₃を加えて、攪拌し、1分間放置してキノールの酸化を行う。
5. 次に、等量の石油エーテル (またはヘキサン) と適量の蒸留水を加えて混合し、キノンを含む石油エーテル層を分離する。エーテル層を他のチューブに移し、エタノール水層を等量の石油エーテルで再抽出する。2つの石油エーテル抽出液を合わせて、数回、蒸留水でFeを取り除いた後、減圧乾固する (水分が多ければ抽出エーテル層を無水硫酸ナトリウムにより脱水する)。これをエタノールに再溶解させることで、ほとんど全てのプラストキノンは酸化型となる。本操作後にプラストキノンの酸化還元差スペクトルから溶液中の酸化型プラストキノンの定量を行い、全プラストキノンの量 (酸化型+還元型) を求める。

3.e.3.2 緑葉・葉緑体からのプラストキノンの抽出

プラストキノンは、疎水的であることから緩衝溶液ではなく有機溶媒による効率的な抽出を行う。一般的な抽出溶媒として、エタノール、エーテル、ヘキサン、アセトン、クロロホルム/メタノールなどがある。葉片の抽出溶液をプラストキノンのみではなく、他の色素類の測定にも使用する場合は、極性有機溶媒のアセトンや複数の混合有機溶媒で抽出されることが多い。また、抽出操作中の酸化分解など防ぐために、抽出溶媒の冷却や脱気、窒素パージによる溶存酸素の除去、そして*t*-butyl-p-hydroxytoluene (BHT)、グルタチオン、アス

^{※4} 酸化還元差スペクトルはエタノール中で233, 276, 308 nmの3箇所ΔΔAが0 (isobestic point) になるため、これらの波長は差スペクトルの確認に用いる。

コルビン酸などの抗酸化物質の添加により抽出時の酸化抑制を行う場合もある。一方、高濃度の抗酸化物質（還元剤）によるキノンの還元も知られており^{※5}、キノンの酸化還元状態を調べたい場合は、抽出時の酸化還元反応、試料の保存性が問題となる。これらのことから、抽出溶媒と安定化剤の種類・濃度を選択しなければならない。

抽出効率や溶媒の扱いやすさから、葉片のプラストキノンの定性・定量分析を行うには、緑葉からアセトンまたは酢酸エチルにより抽出を行う。抽出溶媒としてのアセトンはプラストキノン抽出の効率が良く、材料中のプラストキノンをほとんど完全に抽出できるが、クロロフィルやその他の極性脂質も同時に多量に抽出されるために、その後の操作として適切な分離・分析条件の設定が必要であり、得られるキノンの純度や定量性が問題となる場合がある。石油エーテルやヘキサンによる抽出は、クロロフィルなどの雑物質の共抽出を抑制することができることから、その後の精製操作が簡便になり、また、水溶性抗酸化物質による酸化型キノンの還元を抑えることができる。しかし、条件によりキノン抽出が不安定となるために幾分、定量性に欠ける。

葉緑体からキノン抽出を行う場合、葉緑体を脱イオン水に懸濁してアセトンやメタノールで抽出するか、凍結乾燥後石油エーテルやヘキサンなどで抽出を行う。

【抽出法1】少量の葉片からの抽出^{※6,※7}

本節では、抗酸化物質を加えない冷却したアセトンによる抽出を基本として説明する。必要な場合、アセトンにグルタチオン^{※8}またはBHTを加える。

1. 乳鉢を用いて植物組織（50～100 mg）を液体窒素内で破碎し、アセトンを加え、抽出する。

^{※5} 酸化型プラストキノンは30 mM アスコルビン酸を含む90%アセトン水溶液中で、常温、5分間の攪拌により、一部ではあるが還元型になることが知られている²¹⁾。グルタチオンでは還元されない。酢酸エチル中でのプラストキノンの安定性は高く、高濃度のアスコルビン酸を含む場合でも酸化型を還元させず、また、無添加の状態においても常温で還元型の酸化があまりみられない。また、抽出効率も非常に高く、アセトンと同程度である。

^{※6} 葉片からのアセトン抽出では、ワックス状物質が抽出液中に混在して精製の操作が困難になる時があるために、葉緑体から抽出したほうがその後の操作しやすくなる。葉緑体はホウレンソウの葉から常法に従って調整すればよいが、粗標品で十分である。

^{※7} シロイヌナズナなどの薄い葉の場合、ビーズ破碎で定量的な抽出が可能である。

^{※8} 90%アセトン水溶液に高濃度アスコルビン酸を添加すると酸化型の一部が還元されてしまうが、グルタチオンではその心配はない。

2. マイクロチューブに移し、5,000 xg で5分間遠心後、上清を他のマイクロチューブに移し、残渣に250 μ l アセトンを加えてボルテックス後、再遠心により上清と残渣に分離する。上清を先程の上清に加え、再度、残渣に250 μ l アセトンを加え、キノン抽出を行う。全てのアセトン抽出液を混合し、抽出溶液の重量測定（空のマイクロチューブ重量を差し引く）後、アセトンの比重0.79 g/ml から抽出溶液量を計算する。全量で約1.0 ml 程度になる。本抽出により葉内の98%以上のプラストキノンの抽出が可能である。
3. キノンの酸化、分解を抑えるために、マイクロチューブをアルミホイルで遮光する。すぐに、測定を行わない場合は -20°C 以下で冷凍保存する。

【抽出法2】葉緑体・チラコイド膜からの抽出・濃縮 I （色素類を含む全抽出）

1. 200 g のホウレンソウの葉から調整した葉緑体を15 ml の脱イオン水に懸濁する。
2. 攪拌しながら200 ml のアセトンに加える。5分間攪拌後、濾過して緑色のアセトン抽出液を分離する。さらに100 ml のアセトンで2回、200 ml の石油エーテルで1回抽出を行う。本操作で残渣にはほとんど緑色がない状態となる。
3. 全ての抽出液を合わせ、200 ml の脱イオン水を徐々に加えて石油エーテル層を分離させる。石油エーテルを除き、アセトン—水相に再度、石油エーテルを100 ml 加え攪拌後、石油エーテル層を分離する。
4. エーテル層を先程の抽出エーテルに合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターなどで減圧乾燥（ 40°C 以下に設定）する。

【抽出法3】葉緑体・チラコイド膜からの抽出・濃縮 II （共雑物質を抑えた抽出）

1. 葉緑体を凍結乾燥し、クロロフィル1 mg 当たり10 ml の石油エーテルを加える。
2. 大型のガラスホモゲナイザーか乳鉢中で固まりがないように分散させた後、ビーカーに移し10分間攪拌する。遠心または濾過して黄色の石油エーテル抽出液を分離する。
3. この抽出操作を2回くり返し、得られた抽出液をいっしょにして、ロータリーエバポレーターなどで減圧乾燥（ 40°C 以下に設定）する。

[抽出法4] チラコイド膜からの簡易抽出

1. 0.1 μmol 程度のクロロフィルを含む葉緑体溶液 100 μl に等量の蒸留水を加え攪拌後、冷えた 300 μl のアセトンを加え、攪拌後遠心する。
2. 上清を別のマイクロチューブに移し、残渣に 300 μl アセトンを加え、攪拌後遠心し、再度、残渣に 300 μl アセトンを加えて、再抽出する。残渣に緑色が残っていたら、再度、アセトン抽出を行う。
3. 全てのアセトン抽出溶液を合わせ 80%アセトン比重 (0.82 g/ml) から抽出溶液量を計算する。全量で 1.0 ml 程度になる。本抽出により葉内の 98%以上のプラストキノンの抽出が可能である。

3.e.3.3 TLC によるプラストキノンの分画

プラストキノン分画は、粗抽出液を酸性アルミナ (8%不活性化) のカラムクロマトグラフィーとシリカゲルの薄層クロマトグラフィー (TLC) により行う。ただし、アルミナカラムによる分画操作では、還元型キノン (キノール) が全て酸化型になるために、精製を通じての酸化還元比を求めることはできない。PQB, PQC 異性体の分離に関しては Barr & Crane (1971) に詳しく記述されているので、参照されたい。本項では、TLC による PQA, PQB, PQC までを紹介する。

1. アルミナ (アルミニウムオキシド活性型、酸性、カラムクロマトグラフィー用、Merk) 100 g に脱イオン水 8 ml を加えて攪拌する。この際、発熱するが常温にもどってから石油エーテルに懸濁して湿式でクロマト管に充填する (3×15 cm)。 (石油エーテルは揮発しやすいのでドラフトチャンバー内で操作)
2. 乾燥抽出物を石油エーテル (5~10 ml) に溶解させる。クロロフィルを含む場合は、少量のジエチルエチルエーテル (1~2 ml) に溶解してから 10 倍量の石油エーテルで薄める。
3. これをカラムに添加吸着後、それぞれ 50 ml ずつの石油エーテルとエチルエーテルの混液²⁴⁾ で展開する。両者の割合は (1) 100 : 0, (2) 100 : 2, (3) 100 : 5, (4) 100 : 10, (5) 100 : 20 で、この順に添加する。(2)と(3)で溶出される画分に PQA と PQB が、(5)で PQC が溶出される。各画分の PQ の有無は紫外部の酸化還元差スペクトルにより行う。
4. PQA と PQB を含む画分と PQC を含む画分はそれぞれ別々に濃縮して、別々のシリカゲルプレート

(20×20 cm) に線状に塗布する。次いで、クロロホルム-イソオクタン (80 : 20) で展開する。プラストキノンの R_f 値はそれぞれ PQA=0.9, PQB=0.8, PQC₁₋₄=0.4, PQC_{5,6}=0.3 である。各キノンの位置はロイコメチレンブルーで検出する。検出はプレートの片端で行ない、その他の部分は濾紙かガラス板で覆うことでメチレンブルーが噴霧されないようにする。

5. 還元型のメチレンブルー (ロイコメチレンブルー) により発色させる。ロイコメチレンブルーの調整として、50 ml 0.1%メチレンブルーアルコール溶液、1.0 g 亜鉛末、1.0 ml 濃硫酸を加えて軽く攪拌してから 10 分以上静置する。亜鉛粉末が沈殿しているために、ガラスウールなどを用いて亜鉛粉末を除いてから用いる。
6. TLC で分離後、ロイコメチレンブルーをスプレーし発色させる。本発色剤は、キノンの反応性により還元型メチレンブルーを酸化し青色変化することを利用している。ロイコメチレンブルーは空気中の酸素によっても酸化されるために、スプレー後、バックグラウンドの青色が徐々に強くなるために手際良く、スポットを可視化する。
7. 発色溶液がかかっていない TLC 部分を掻き出し、エタノールにより溶出させる。PQC と PQB はそれぞれ異性体の混合物である。異性体を分離するには、さらに別の展開溶媒で TLC を行う必要がある。PQA は 5~10 ml の熱エチルアルコールに溶かし、冷凍庫中に放置すると結晶になる。

3.e.3.4 HPLC によるプラストキノンの測定

抽出溶液のキノン定量には、紫外 (UV) 検出器による高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられてきた。しかし、プラストキノンなどの植物キノン類の測定には、紫外部に大きな吸収を示すクロロフィルやカロチノイドなどの色素類が抽出溶液に混入することから、キノン種やその濃度によっては定量的な分析ができない^{12,23)}。このために植物葉片のキノン分析では前処理や分析法の工夫が行われてきた。前処理として①アルミナカラムによる色素除去、② FeCl₃ などの酸化剤を用いてキノン還元体を色素類と分離しやすい酸化体へ変換させてから全量測定すること、などがある。また、分析法の改良として③ HPLC によりキノンを分離後、NaBH₄ などの還元剤により蛍光性を有する還元型キノン (キノール) に反応させ、蛍光検出器²⁴⁾ により検出する分析法がある。これらの方法は前処理の煩雑さや反応試薬によるキノン分解、急激な分離カラムの劣化などが起こりやす

²⁴⁾ 夏季、空調のない実験室では石油エーテルがカラム内で気化し、内部のアルミナ層が乱れるので注意すること。

い。これらの問題点を解決する方法として④キノン類の酸化還元電位を選択的に検出可能な電気化学検出器(ECD)を用いた分析が行われてきた^{12,25)}。しかし、ECDは、特殊な検出器であることからPQ類定量を迅速・簡単に行うための障壁となっている。これらのことから、一般的な紫外-可視吸光度検出器による検出に加えて、キノンに対して特異性が高く、高感度なon-line法の一種であるポストカラム還元法について紹介する。

ポストカラムキノン還元法は、フィロキノンの分析を中心に進歩してきたが、基本的な操作はプラストキノンの分析に適用することができる。まず、ポストカラム還元法はその還元方法により3つに大別される。(A)白金黒カラムを用いたカラム還元法²⁶⁾、(B)電気化学的還元法²⁷⁾、(C)NaBH₄などの還元剤を用いた化学的還元法^{24,28,29)}。その中で白金黒カラムを用いたカラム還元法とNaBH₄を用いた化学的還元法について具体的な条件を記す。

また、より簡単な系によるHPLC分析として検出器に吸光検出器と蛍光検出器を組み合わせた方法についても記述する。

【キノン類の分離条件】

プラストキノンはその側鎖の性質から、キノン分離に対して逆相カラムを用いたHPLCにより行う(表2)。分離カラムとして逆相カラムODS、溶離液にメタノールやエタノールを用いてキノン類を分離¹⁰⁾する。エタノールの比率を高くすると、プラストキノンの溶出が早くなり、分析時間が短縮されるが、比較的早くに溶出する還元型が他の物質のピークと重なり、キノンの定量の妨げとなる場合がある。

植物葉片のキノン類の側鎖の炭素数はトコフェロールがC₁₅、フィロキノンはC₂₀と短く、還元型プラストキノンはより早くに溶出する。しかし、ユビキノンの側鎖はC₄₀、C₄₅であることからPQと溶出位置が近く、特にC₄₀側鎖の還元型ユビキノンはプラストキノンの還元型との分離は、一般的なODSカラムでは分離が十分に行えない。しかし、適切な検出器・検出条件を設定することで還元型ユビキノンを検出せずに定量誤差を抑えることができる。プラストキノンの定量は、標品の酸化型、還元型のピークエリアとの比較により行う。

(例) キノン分離の条件

カラム：Luna 5 μ C18 (2)

(ϕ 4.6 x 150 mm, Phenomenex, Inc.)¹¹⁾

溶離液：メタノール/エタノール=1/1(v/v)

カラム温度：40°C

流速：1.0 ml/min

リテンションタイム：

還元型 7.4 min, 酸化型 10.9 min

【検出】¹²⁾

検出法により、プラストキノンの定量限界、検出限界が異なるので、実験に適した検出器を選択する(表2)。

【吸光度検出】

ホットダイオードアレイ型(PDA)のような多波長で同時に検出可能なマルチ波長検出器を用いた場合、プラストキノンの酸化型255 nm、還元型290 nmの各吸収極大での検出波長により、同時に測定が可能である。しかし、還元型は酸化型に比べて吸光係数が小さい(酸化型の20%程度⁴⁾)のために、還元型が低濃度のときは、UV吸収では定量性のある測定ができない。また、還元型は、比較的、早くに溶出することから色素類のピークの端に掛かりやすく、酸化型に比べて定量限界が比較的高くなる。一方、酸化型は比較的遅くに溶出され、他の物質と分離しやすく、明確なピークとして検出できることから、低濃度の還元型測定のために還元型を酸化型に変換後、HPLC測定を行う。まず、255 nmのUV検出によるHPLC分析により酸化型を定量し、その後、抽出溶液に最終濃度が0.5 mMになるようにFeCl₃を添加し、全ての還元型プラストキノンを酸化型に反応させた後に再度、HPLCにより全PQ(PQ+PQH)量の測定を行い、全PQから先程のPQ量を差し引くことでPQHを求める。しかし、HPLCカラムに高濃度のFeを含む溶液を直接インジェクションしても分析可能であるが、分析カラムの寿命を低下させてしまう可能性が高い。液-液分配操作などによりFeを取り除いた後(3e.3.1)に分析を行うことでこれらの問題を解決できるが、多数の試料を同時に前処理には時間がかかり煩雑となる。このために、検出器の種類を適切なものを選択する。

【蛍光検出】¹³⁾

還元型は励起波長290 nmにおいて330 nmの蛍光を

¹¹⁾ ODSであれば、メーカーにはこだわらない。また、本章では150 mm長のカラムを用いているが250 mm長でも、全く問題はない。

¹²⁾ 定性限界とは目的物質が含まれていることを示すピークを認識できる限界値でS/N=3程度である。定量限界とは目的物質の定量性が得られる下限値でありおよそS/N=10である。

¹³⁾ 本条件では還元型ユビキノンの9と還元型PQA-9の分離が不

¹⁰⁾ 逆相カラム(ODSなど)に溶離液としてメタノールを中心にエタノールまたはヘキサンを混合することで酸化型、還元型を分離可能である。

表 2: プラストキノンの分離・検出条件

カラム	溶離液*	流速 (ml/分)	検出条件 【種類】 (波長, 電圧)	キノン**	リテンション タイム (分)	文献
Teknokroma C18 (4.0 x 250 mm)	MeOH/Hex=17/1(v/v)	1.5	【蛍光, 吸収】 ex.290 nm, em.330 nm abs 255 nm	PQA (red)	8.8	22)
				PQA (ox)	26.2	
Radial-PAK Cartridge C-18	MeOH/EtOH=3/1(v/v) containing 50 mM NaClO ₄ , 2 mM HClO ₄	2.0	【ECD(ref. Ag/AgCl)】 -250 mV (ox)	PQC ₁₋₄ (ox)	6.9	12)
				PQC _{5,6} (ox)	8.0	
				PQB (ox)	10.9	
				PQA (ox)	15.2	
Radial-PAK Cartridge C-18	MeOH/EtOH=1/4(v/v) containing 50 mM NaClO ₄	2.0	【ECD(ref. Ag/AgCl)】 -500 mV (ox) -800 mV (red)	PQA (red)	3.4	25)
				PQA (ox)	8.2	
Shimpack ODS (4.6 x 250 mm)	MeOH/EtOH=1/1(v/v)	1.5	【蛍光(NaBH ₄ 還元)】 ex.290 nm, em.330 nm	PQA (red) PQA (ox)	7.8 21.5	
Luna C18 (2) (4.6 x 150 mm)	MeOH/EtOH=1/1(v/v)	1.0	【蛍光(白金黒還元)】 ex.290 nm, em.330 nm	PQA (red) PQA (ox)	7.4 10.9	

* : MeOH; メタノール, EtOH; エタノール, Hex; ヘキサン
** : 酸化型プラストキノンの PQ(ox), 還元プラストキノンの PQ(red)

示すことから, カラムによるキノンの分離後に蛍光検出器により還元型プラストキノンの高感度測定が可能となる。しかし, 酸化型プラストキノンは蛍光性を示さないことから, そのままでは還元型のみしか検出できない(図 5 A, B)。このことから, HPLC によりキノンを分離した後, 酸化型を還元型に反応させる post-reduction の操作を行うことで, 蛍光検出器によるプラストキノンの高感度検出が可能となる。定量限界は 2.0 pmol 以下であり, 抽出溶液量に依存するが葉片として 1~5 mg あれば十分測定可能である。キノンの測定に関する post-reduction 法は, 化学的還元, 電気的還元, 触媒還元の種類があるが, 電気化学的還元には特殊な装置が必要となることから, 化学的還元, 触媒還元の種類を紹介する(図 4 A, B)。

【蛍光検出 (NaBH₄による化学的還元法)】

ODS カラムによりキノンを分離した後に無蛍光性の酸化型キノンを反応コイル中で NaBH₄ と反応させることにより, 蛍光性の還元型キノンの (キノール) に還元し, 蛍光検出器を用いて測定を行う(図 4 A)。分離カ

ラムとして上記条件でキノンを分離後, カラム出口に接続した 40°C に保った反応コイル (φ 0.5 mm x 150 cm) の一端から還元試薬として 0.045% (w/v) NaBH₄ を含むエタノール溶液を流速 0.5 ml/min で流し, 分離したキノンの還元¹⁴を行う。検出には蛍光検出器を用い, 還元型プラストキノンを励起波長 290 nm, 蛍光波長 330 nm の条件により検出する。全てのキノンの定量を濃度既知のプラストキノンのピークエリアとの比較により行う。

【蛍光検出 (白金黒カラムによる触媒還元法)】¹⁵

ODS カラムによりキノンを分離した後に無蛍光性の酸化型キノンを白金黒カラムで還元し, 蛍光検出器を用いて測定を行う(図 3 B)。分離カラムの後ろに白金黒

完全であるが, エタノール溶液中では還元型プラストキノンの蛍光量子収率 (0.117) は, 還元型ユビキノンの (0.004) に比べて大きく²⁰⁾, また, 蛍光波長はそれぞれ 327 nm, 371 nm と大きく異なっていることから, 蛍光検出において還元型ユビキノンの還元型プラストキノンの定量性に与える影響はほとんどない。

¹⁴ 反応コイル (φ 0.5 mm x 150 cm) を用いたキノンからキノールへの反応時間は同条件下で約 10 sec. であり, 還元溶液 0.01% NaBH₄ で 1.0 nmol PQ が全還元される。高濃度の NaBH₄ はキノンの分解を促進することが知られていることから, 0.06% NaBH₄ でキノンの分解を調べたが, 各キノンの分解は確認されず, 各測定間の誤差は 0.44% であった。還元試薬の 0.045% (w/v) NaBH₄ で 5.0~2000 pmol/injection の広い濃度範囲においてピークエリアとキノン量とに相関関係が得られている。

¹⁵ 還元カラムは資生堂より 4.0x15mm, 4.0x30mm の 2 種類が販売されている。しかし, 乾燥状態でステンレスの空カラムに詰めて十分に使用できる品質のカラムを簡単に自作することができる。1.0 g の白金黒(platinum black)で 4.0 x 15 mm のカラムを詰めることができる。

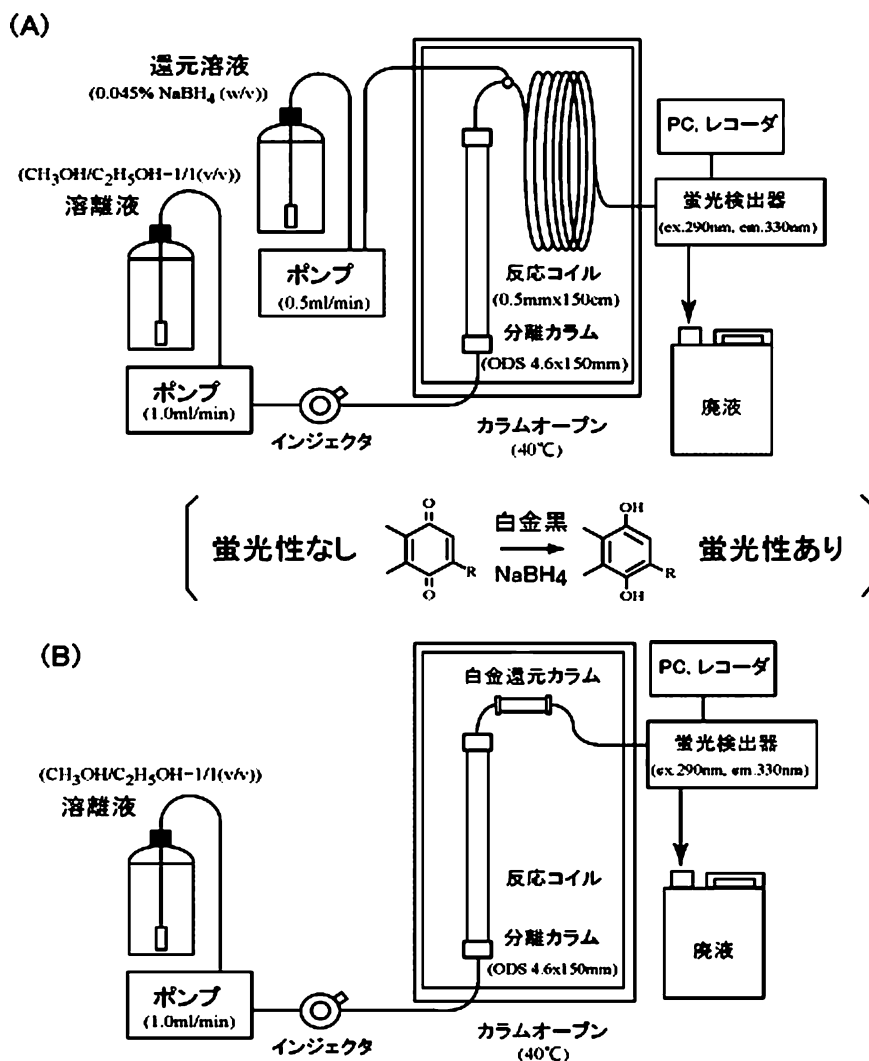


図4：ポストカラム還元法によるプラストキノンの高感度 HPLC 測定装置

カラムを接続するのみであることから、化学的還元法に比べて装置的にも簡略することができ、還元溶液の調整などの必要もない。

先程と同様な条件において分離・還元反応を行い、290 nm により励起した 330 nm のキノン類の蛍光を測定することにより検出する (図 5 A, B)。全てのキノン類の定量を標準サンプルのピークエリアとの比較から行う。白金黒カラムの還元力は徐々に低下していくことから、カラムの長期保存、多数の検体を扱う場合は標品の PQ などを用いてチェックを行うべきである。

【酸化還元・電気化学検出】¹⁶⁾

ECD(電気化学検出器, electrochemical detector)は、電気化学的な反応を用いた検出器であり、アミン類の検

出に良く用いられている。キノン類などの酸化還元反応を行う物質に対して検出の特異性が高い。原理として、カラムから分離したキノン類が検出器のセル内で電氣的に還元 ($Q + 2e^- + 2H^+ \rightarrow QH_2$) または酸化 ($QH_2 \rightarrow Q + 2e^- + 2H^+$) し、その時の電流の大きさとキノン濃度が比例する。このことから、キノンの検出に用いることができる。

ECD 検出器を用いた HPLC は他の測定と異なり、溶離液に NaClO₄, HClO₄ など分子の大きな酸(過塩素酸)を添加する。実際の測定では、酸化型プラストキノンの検出にポテンシャル-800 mV²⁵⁾ または -250 mV¹²⁾ にセットする(表 2)。酸化還元物質に対して高感度で特異的に応答することや各物質の酸化還元ポテンシャルが異なることから、ECD により高感度キノン分析を行うことができる。

¹⁶⁾ ポテンシャル 0.25 V の条件では、トコフェロールキノン、ユビキノンフィロキノンも同時に検出される。

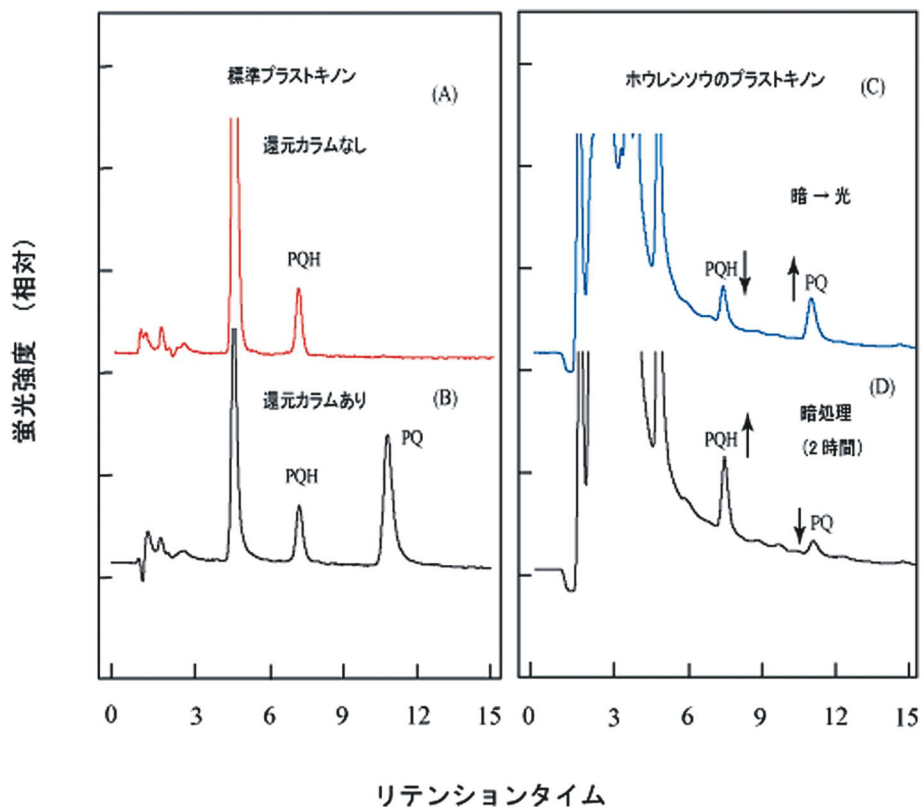


図5：酸化型、還元型プラストキノンのHPLCチャート

【より簡単な良感度な検出】¹⁷⁾

比較的低濃度の還元型を正確に定量するには、感度的に吸光度検出器では難しい。このことから、分離カラム以降に吸光度検出器(255 nm 設定)を接続することで酸化型を検出し、その後ろに蛍光検出器(ex 290 nm, em 330 nm に設定)を接続して還元型を検出することで酸化型・還元型を同時に比較的高感度で測定を行うことができる²²⁾。

3.e.4 おわりに

HPLC 測定に慣れていない場合や初めてプラストキノン測定を行う場合は、PDA 検出器のみ、または、PDA と蛍光検出器を備えた HPLC による測定を行うことで、比較的定量性のある結果が得られる(3.e.3.4の【より簡単な良感度な検出】を参照)。また、試料数が多い場合やシロイヌナズナなどの薄い葉の場合、ビーズ破砕により抽出を行っても良い。さらに、HPLC 分析に HTP 型(high-through put) のカラムを用いることで分析時間を

大幅に短縮でき、1 試料の HPLC 分析は 1～5 分以内に行うことも可能である。

参考のために表 2 にプラストキノンの具体的な分析条件を示す。また、微量試料や高感度測定では、検出器の選択が重要となることから酸化型、還元型に対する感度の一覧を表 3 に記す。

測定以外に注意する点。プラストキノンはチラコイド膜以外に、包膜やプラストグロビュールに光合成電子伝達に関与しないプラストキノンが大量に存在している。このために、葉片のプラストキノンには電子伝達に関与するキノンと関与しないキノンが混在しており、葉片のキノン量(酸化還元状態)²²⁾、分析定量値のままでは光合成(電子伝達鎖)のプラストキノンプール(またはその酸化還元比)とはならないので注意が必要である³¹⁾。実際、暗処理した葉のプラストキノンの 30% が還元型で、飽和光下でも全プラストキノンの 65% までしか還元されておらず、光強度に依存しないプラストキノンが存在していることが知られている(図 5 C, D)。

文献

- 1) J. F. Allen & T. Pfannschmidt, *Philos. Trans. R. Soc.*,

¹⁷⁾ カラム出口以降の検出器の接続は、セルの耐圧性等の問題からの吸光度検出器の後ろに蛍光検出器を接続する。

表3：プラストキノンの検出感度の比較

検出の種類	検出器 (条件)	検出感度	
		酸化型	還元型
吸収	紫外吸収検出器		
	255 nm 290 nm	中 低	— 低
蛍光	蛍光検出器 (ex.290 nm, em.330 nm)		
	ノーマル	—	高
	白金黒カラム還元 NaBH ₄ 還元	高 中高	高 中高
酸化還元電位	電気化学検出器		
	−800 mV 500 mV	高 —	— 高

- B355 (2000) P.1351.
- 2) H. Zer & I. Ohad, Trends Biochem. Sci., **28** (2003) P. 467.
 - 3) C. H. Foyer & G. D. Noctor, Antioxid Redox Signal, (2008)
 - 4) R. Barr & F. L. Crane F. L.; Methods in Enzymology (ed. San Pietro, A.) volXXIII, Academic Press, 1971, p. 372.
 - 5) 岡山茂樹, 「光合成研究法」, 共立出版, 1981, p.321.
 - 6) H. K. Lichtenthaler, Photosynth. Res., **192** (2007) P.163.
 - 7) H. H. Grumbach, Z. Naturforsch., **38c** (1983) P.996.
 - 8) R. Kana, E. Kotabová & O. Prásil, Physiol. Plant, **133** (2008) P.794.
 - 9) H. K. Lichtenthaler, Photosynth. Res., **92** (2007) P.163.
 - 10) H. K. Lichtenthaler, U. Prenzel, D. Douce & J. Joyard, Biochim. Biophys. Acta, **641** (1981) P.99.
 - 11) P. Joliot & A. Joliot, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **99** (2002) P.23.
 - 12) S. Okayama, Plant Cell Physiol., **25** (1984) P.1445.
 - 13) H. Eck & A. Trebst, Z. Naturforsch., **18B** (1963) P.446.
 - 14) J. Soll, M. Kemmerling & G. Schults, Arch. Biochem. Biophys., **204** (1980) P.544.
 - 15) J. Soll, G. Schultz, J. Joyard, R. Douce & M. A. Block, **238** (1985) P.290.
 - 16) K. G. Hutson & D. R. Threlfall, Biochim. Biophys. Acta, **632** (1980) P.630.
 - 17) Z. Cheng, S. Sattler, H. Maeda, Y. Sakuragi, D. A. Bryant & D. D. Penna, Plant Cell, **15** (2003) P.2343.
 - 18) M. Wanke, K. Skorupinska-Tudek & E. Siezewas, Acta Biochemi. Poloica, **45** (2001) P.663.
 - 19) H. K. Lichtenthaler, Fett. Lipid, **100** (1998) P.128.
 - 20) C. DeVitry, C. Carles & B. A. Diner, FEBS Lett., **196** (1986) P.203.
 - 21) J. Kruk & K. Strzalka, J. Photochem. Phtobiolo., B.: Bio, **33** (1993) P.33.
 - 22) J. Kruk & S. Karpinski, Biochem. Biophys. Acta, **1757** (2006) P.1669.
 - 23) K. Kusube, K. Abe, O. Hiroshima, Y. Ishiguro, S. Ishikawa & H. Hoshida, Chem. Pharm. Bull., **32** (1984) P.179.
 - 24) H. Shimada, R. Ohno, M. Shibata, I. Ikegami, K. Onai, M. A. Ohto & K. Takamiya, Plant J., **41** (2005) P.627.
 - 25) M. Isogai, M. Nishimura & S. Okayama, Plant Cell Physiol., **28** (1987) P.1301.
 - 26) H. Hiraike, M. Kimura & Y. Itokawa, Y., J. Chromatog., **430** (1988) P.143.
 - 27) H. Hiraike, M. Kimura & Y. Itokawa, Y., Am. J. Obstet. Gynecol., **158** (1988) P.564.
 - 28) H. Hiraike, M. Kimura & Y. Itokawa, Y., Jpn. J. Hyg., **41** (1986) P.764.
 - 29) M. Shibata, M. Tsuyama, T. Takami, H. Shimizu & Y. Kobayashi., J Exp Bot., **55** (2004) P.1989.
 - 30) J. Kruk, K. Strzalka, R. M. Leblanc, Biochem. Biophys. Acta, **1112** (1992) P.19.
 - 31) J. Kruk & Karpinski; Photosynthesis: Fundamental Aspectsto Global Perspectives (eds A. van der Est, D. Bruce), Int. Soc. Photostnth., 2005, P.568.