



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高速液体クロマトグラフィーによる藻類由来ホスファチジルグリセロールの立体異性体の分析
Author(s)	佐藤, 理奈; SATO, Rina; 藤島, 裕典 他
Citation	北海道大学水産科学研究彙報, 54(1-2), 7-12
Issue Date	2003-07
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/21977
Type	departmental bulletin paper
File Information	54(1_2)_P7-12.pdf



高速液体クロマトグラフィーによる藻類由来ホスファチジル グリセロールの立体異性体の分析

佐藤 理奈¹⁾・藤島 裕典¹⁾・板橋 豊¹⁾

Analysis of Algal Phosphatidylglycerols by Chiral Phase High-Performance Liquid Chromatography

Rina SATO, Hironori FUJISHIMA and Yutaka ITABASHI

Abstract

An application of chiral phase high-performance liquid chromatography (HPLC) for determination of the stereochemical configuration of algal phosphatidylglycerols (PG) is described. For this purpose PG were isolated from the total lipid extracts from the green algae, *Enteromorpha* sp. and *Chlorella vulgaris*, and the raphidophyte alga, *Heterosigma akashiwo*, by preparative thin-layer chromatography, and then converted to their bis(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives. The derivatives were separated on two chiral phases of opposite configuration, (*R*)- and (*S*)-1-(1-naphthyl) ethylamine polymers, which caused a reversal in the elution order of enantiomeric and diastereomeric PG. PG from leaves of spinach, radish, parsley, and green tea were also examined to compare with the algal ones. The results clearly showed that all of the PG examined consisted of single 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R*, *S* configuration). The present study demonstrates that chiral phase HPLC provides an accurate, sensitive, and unambiguous information about the configuration of algal PG.

Key words: Phosphatidylglycerol, Diastereomer, *Enteromorpha* sp., *Chlorella vulgaris*, *Heterosigma akashiwo*, Spinach, Parsley, Green tea, Chiral phase HPLC, 3,5-Dinitrophenylurethane

はじめに

ホスファチジルグリセロール (PG) は細胞膜を構成するリン脂質の一つであり、種々の生物組織中に少量または主要成分として広く分布する (Hostetler, 1982)。植物では、葉緑体包膜とチラコイド膜に含まれる総脂質の 10~15% を占めており、その分子構造 (分子種) は低温適応に影響すると考えられている (Murata, 1983; 大西, 1992)。

PG は分子中にキラル中心を 2 つ有するので、4 種の立体異性体が考えられる。Benson and Miyano (1961) は、C¹⁴ で標識した *Chlorella* 由来の PG からグリセリン酸を調製し、これを非標識 D-, L- 及び DL-グリセリン酸と混合して再結晶化し、それぞれの放射能活性を調べた結果、*Chlorella* PG から調製したグリセリン酸に D- または L-グリセリン酸を混合して生成した再結晶はともに 50% の放射活性を示したのに対して、DL-グリセリン酸を混合してできた再結晶はこれをほぼ 100% 保持していることを認めた。このことから、*Chlorella* PG から得られた 2 つのグリセリン酸は互いに鏡像関係にあることが明らかになった。その後、Harverkate and van Deenen (1965) はハウレンソウの葉由来 PG にホスホリパーゼ C 及び D を作用させて得ら

れた加水分解物を分析することによって、元の PG の構造を 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-1'-*sn*-グリセロール (*R*, *S* 配置, Fig. 1A) と決定した。同様の酵素法により、微生物由来 PG の構造も *R*, *S* 配置であることが明らかにされた (Op den Kamp et al., 1968; Ruettinger and Brewer, 1978; Hostetler, 1982)。しかしながら、これらの研究に使用された方法は PG 分解物から元の PG の構造を推定する間接的なものであり、またホスホリパーゼ C 及び D は基質に対して完全な立体特異性を示さないことから、試料 PG に *R*, *S* 以外の少量の立体異性体が混在する場合、それを検出して立体構造を正確に決定することは難しいと考えられる。

Itabashi and Kuksis (1997) 及び板橋ら (1998, 1999) は、ビス (3,5-ジニトロフェニルウレタン) 誘導体に変換した PG の 4 つの立体異性体を (*R*)- 及び (*S*)-1-(1-ナフチル) エチルアミンを固定相とする HPLC を用いて良好に分離する簡便な方法を確立し、これを数種の生物由来 PG の立体構造の分析に適用した。その結果、大腸菌 PG 中に従来知られていない 1,2-ジアシル-*sn*-グリセロ-3-ホスホ-3'-*sn*-グリセロール (*R*, *R* 配置, Fig. 1B) が約 11% 存在することが明らかになった。このことは、キラル HPLC 法が従来

¹⁾ 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 Marine Bioresources Chemistry, Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University)

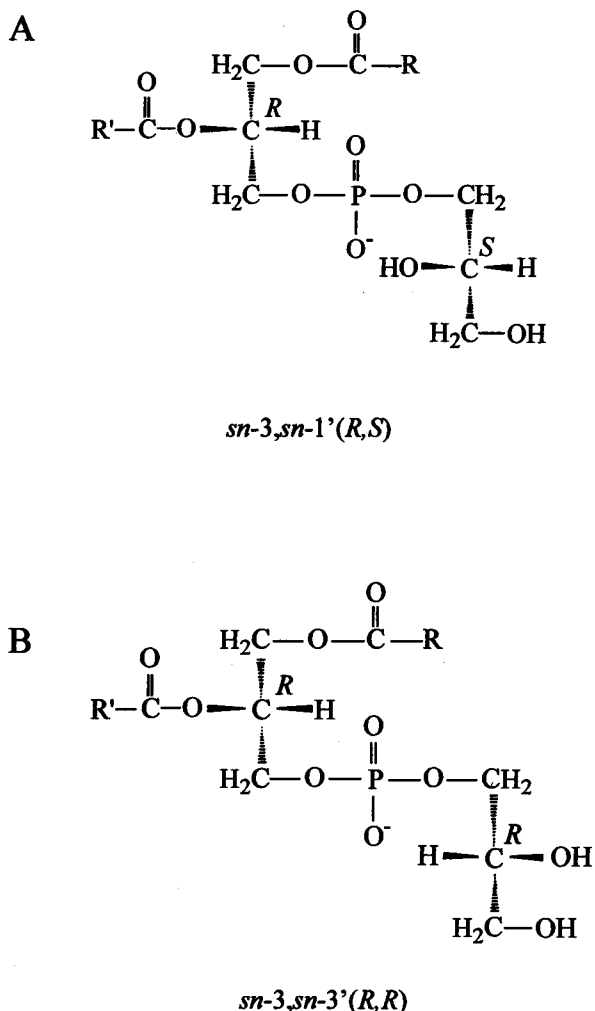


Fig. 1. Structures of diastereomeric phosphatidylglycerols.

- A, 1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R*, *S* configuration);
 B, 1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R*, *R* configuration).

の間接的な方法よりも詳細に PG の立体構造を決定できることを示している。

本研究では、水圏生物由来 PG の分析例が少なく、立体構造については上述した間接的な方法で求めた初期の報告があるにすぎないことから、キラル HPLC 法を用いて海藻及び微細藻由来 PG の立体構造を明らかにすることを試みた。

実験方法

試料

Chlorella vulgaris (NIES-227) と *Heterosigma akashiwo* (NIES-4) を 2L の C 培地及び f/2 培地を用いて照度 4,000 lux, 明暗サイクル 12L-12D, 温度 20°C で無菌培養し、定常

期前期または中期の藻体を遠心分離 (1,500×g) して回収した (Terasaki and Itabashi, 2002)。緑藻アオノリ (*Enteromorpha* sp. 乾燥品) と高等植物 (ホウレンソウ, パセリ, 大根及び緑茶) の葉は函館市内の食料品店で購入した。大腸菌由来リン脂質 (Sigma 製, Type IX) に含まれる PG をキラル HPLC 分析の標品として使用した (Itabashi and Kuksis, 1997)。

PG の単離

試料から Bligh-Dyer 法 (Bligh and Dyer, 1959) を用いて脂質を抽出した。得られた総脂質から薄層クロマトグラフィ (TLC) により PG を単離した。TLC 板 (Merck 製シリカゲル HF₂₅₄, 20×20 cm, 厚さ 0.5 mm) は使用前に 110~120°C で 1 時間活性化して使用した。少量のクロロホルムに溶解した総脂質 (約 30 mg) を TLC 板にバンド状にスポットした後、クロロホルム/メタノール/酢酸 (70:30:8, by vol) を用いて展開した。風乾後, 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 0.75), クロロホルム/メタノール/酢酸 (20:10:1, by vol) を用いて回収した。得られた PG を再度 TLC で分析して, 単一スポットであることを確認した。

ウレタン誘導体の調製とキラル HPLC 分析

PG のビス (3,5-ジニトロフェニルウレタン) 誘導体の調製とキラル HPLC 分析は, Itabashi and Kuksis (1997) の方法に準じて行った。PG (約 1 mg) を乾燥トルエン 1 ml に溶解した後, 3,5-ジニトロフェニルイソシアネート (住化分析センター製) を約 5 mg 加えて溶解した。これに乾燥ピリジンを約 30 μl 加えて 30°C で 3 時間攪拌 (800 rpm) しながら反応させた。生成した PG のビス (3,5-ジニトロフェニルウレタン) 誘導体は, TLC (10% 硫酸アンモニウム含浸シリカゲル HF₂₅₄; 展開溶剤: クロロホルム/メタノール/水, 40:10:1 by vol) を用いて精製した。

ウレタン誘導体の分析には, 島津製の LC-6A ポンプと (*R*)-及び (*S*)-1-(1-ナフチル) エチルアミンをキラルセクターとする 2 種のカラム (YMC 製 A-K03 及び A-L03, 250×4.6 mm i.d.) を使用した。移動相 (和光純薬工業製 HPLC 用溶媒) には, *n*-ヘキサン/ジクロロメタン/メタノール/トリフルオロ酢酸 (60:20:20:0.2, by vol; 流量 1 ml/min) を使用し, 10°C のカラム温度で分析した。試料をジクロロメタンに溶解し (1 mg/ml), その 5 μl を Rheodyne 製 Model 7125 インジェクターを用いてカラムに注入し, 溶出した成分を 254 nm (島津製 SPD-6A 検出器) でモニターした。

結果と考察

キラル HPLC

Fig. 2 に、A-K03 カラムを用いて得られたアオノリ、*C. vulgaris* 及び *H. akashiwo* 由来 PG の HPLC クロマトグラムを大腸菌 PG のそれと比較して示す。標品の大腸菌 PG では、*R,R* 体と *R,S* 体は明りょうに分離されたが (Fig. 2D), アオノリ、*C. vulgaris* 及び *H. akashiwo* では *R,R* 体の溶出時間 (15 分付近) にピークは検出されず、*R,S* 体のピーク (20 分付近) のみが現われた。Fig. 3 に、A-K03 と逆の立体配置を有する A-L03 カラムを使用して得られた同一試料のクロマトグラムを示す。この A-L03 カラムを使用すると、PG のジアステレオマー (*R,S* 体と *R,R* 体) は A-K03 カラムで得られる順序と逆に溶出することが知られている (Itabashi and Kuksis, 1997; 板橋ら 1999)。本研究でも、両ジアステレオマーの溶出順番は逆転した (Fig. 2D 及び Fig. 3D)。いずれのクロマトグラムからも、*R,S* 体の溶出時間 (15 分付近) に単一の明りょうなピークが検出されたが、*R,R* 体の溶出時間 (20 分付近) にピークは認められなかった (Fig. 3A-3C)。したがって、立体配置の異なる両カラムを用いて得られた分析の結果は、アオノリ、*C. vulgaris* 及び *H. akashiwo* の PG の立体構造は *R,S* 配置であり、*R,R* 体は存在しないことを明確に示している。

標準品として使用した大腸菌 PG よりもアオノリ、*C. vulgaris* 及び *H. akashiwo* PG のピーク幅が広いのは、これら PG が不飽和度の大きく異なる多数の脂肪酸から構成されているためと考えられる。緑藻 *C. vulgaris* の PG はエイコサペンタエン酸 (20:5n-3) やドコサヘキサエン酸 (22:6n-3) などの高度不飽和脂肪酸を含有しないが、C16 と C18 の種々の飽和及び不飽和脂肪酸を多く含んでいる (Arisz ら, 2000; Thompson, 1996; Xu and Siegenthaler, 1996)。また、*H. akashiwo* の PG (ジガラクトシルジアシルグリセロールを含む) には 20:5n-3 が全脂肪酸中約 21%、22:6n-3 が約 3% 含まれている (Bell ら, 1997)。これら炭素数と二重結合数の異なる 2 種の脂肪酸の組み合わせによって保持時間が異なるために、ピーク幅が広がったり、部分的に分離されるものと考えられる。

Fig. 4 及び Fig. 5 に、A-K03 カラムを用いて得られた高等植物 (ホウレンソウ、パセリ、緑茶、大根) の葉から分離した PG の HPLC クロマトグラムを示す。標準品の大腸菌 PG と溶出時間を比較した結果、藻類 PG と同様にホウレンソウ、パセリ、緑茶からは *R,R* 体のピークは見出されず、*R,S* 体のみが検出された。大根葉は *R,S* 体のピークの他に 12 分から 13 分付近に小さなピークが観察されたが (Fig. 5B), A-L03 カラムを用いて分析した結果、*R,S* 体のピークは溶出順序が逆転して 15 分付近に検出されたのに対して、*R,R* 体の溶出時間 (20 分付近) にピークは現われなかったことから (クロマトグラムは省略)、大根葉 PG も

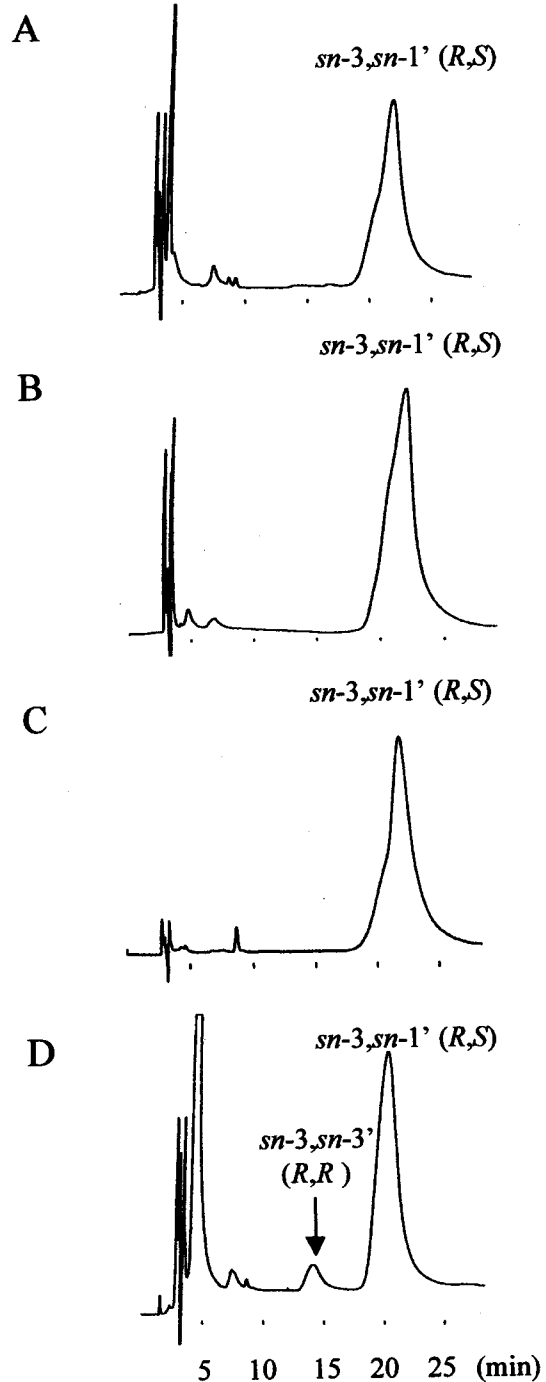


Fig. 2. Chiral phase HPLC profiles of the bis(3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from *Enteromorpha* sp. (A), *Chlorella vulgaris* (B), *Heterosigma akashiwo* (C), and of standard phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* (D) on a column containing (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymer (A-K03, 25 cm × 4.6 mm i.d.; YMC, Kyoto, Japan). *sn*-3, *sn*-1'=1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol (*R,S* configuration); *sn*-3, *sn*-3'=1, 2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-3'-*sn*-glycerol (*R,R* configuration). Column temp., 10°C; Mobile phase, *n*-hexane/dichloromethane/methanol/trifluoroacetic acid (60:20:20:0.2, by vol). Detection: 254 nm.

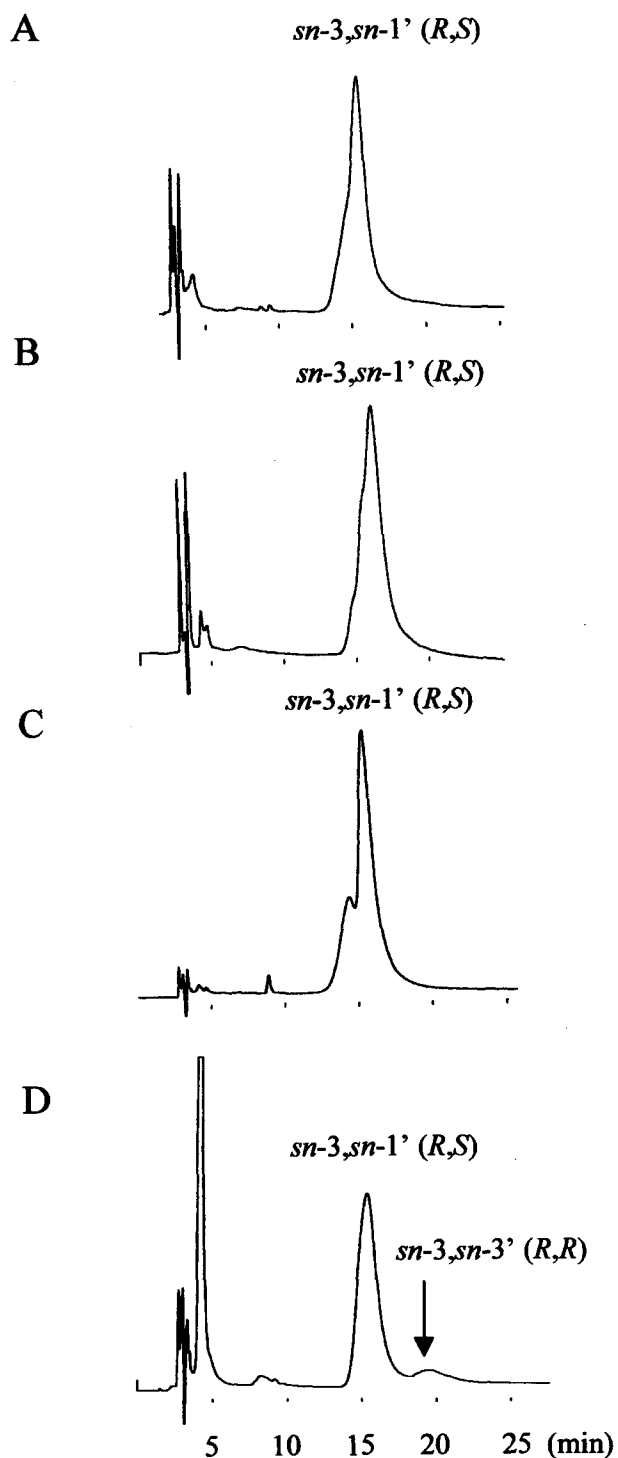


Fig. 3. Chiral phase HPLC profiles of the *bis* (3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from *Enteromorpha* sp. (A), *Chlorella vulgaris* (B), *Heterosigma akashiwo* (C), and of standard phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* (D) on a column containing (*S*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymer (A-L03, 25 cm×4.6 mm i.d.; YMC). Other HPLC conditions and abbreviations as given in Fig. 2.

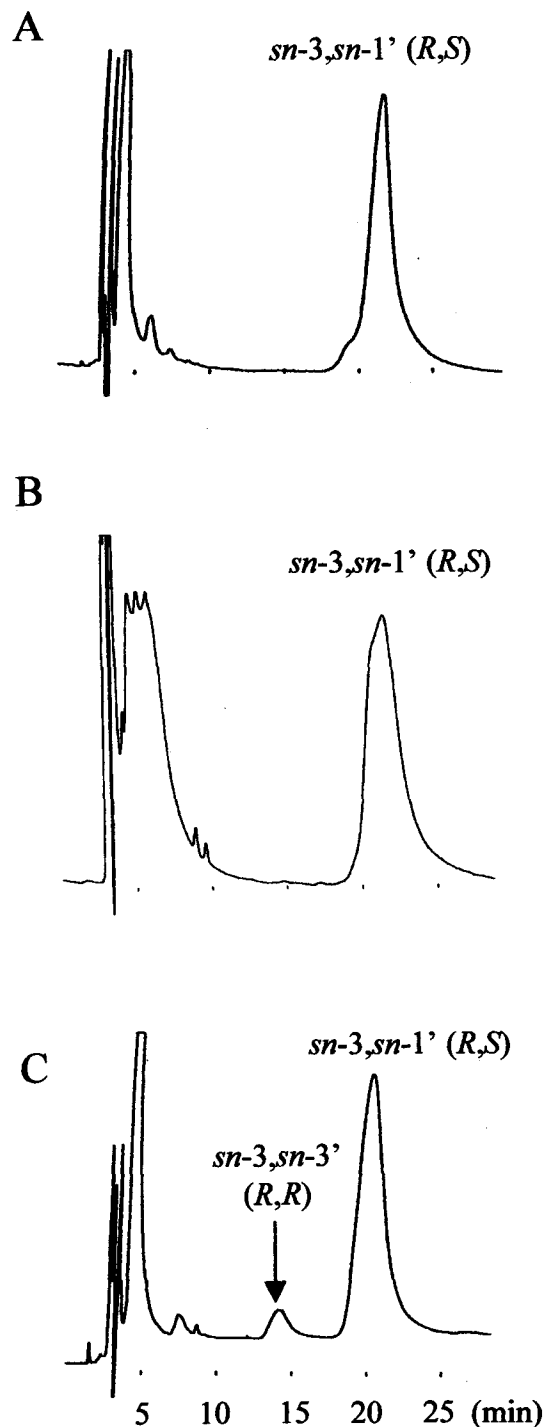


Fig. 4. Chiral phase HPLC profiles of the *bis* (3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from spinach leaves (A) and parsley leaves (B), and of standard phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* (C) on a column containing (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymer. HPLC conditions and abbreviations as given in Fig. 2.

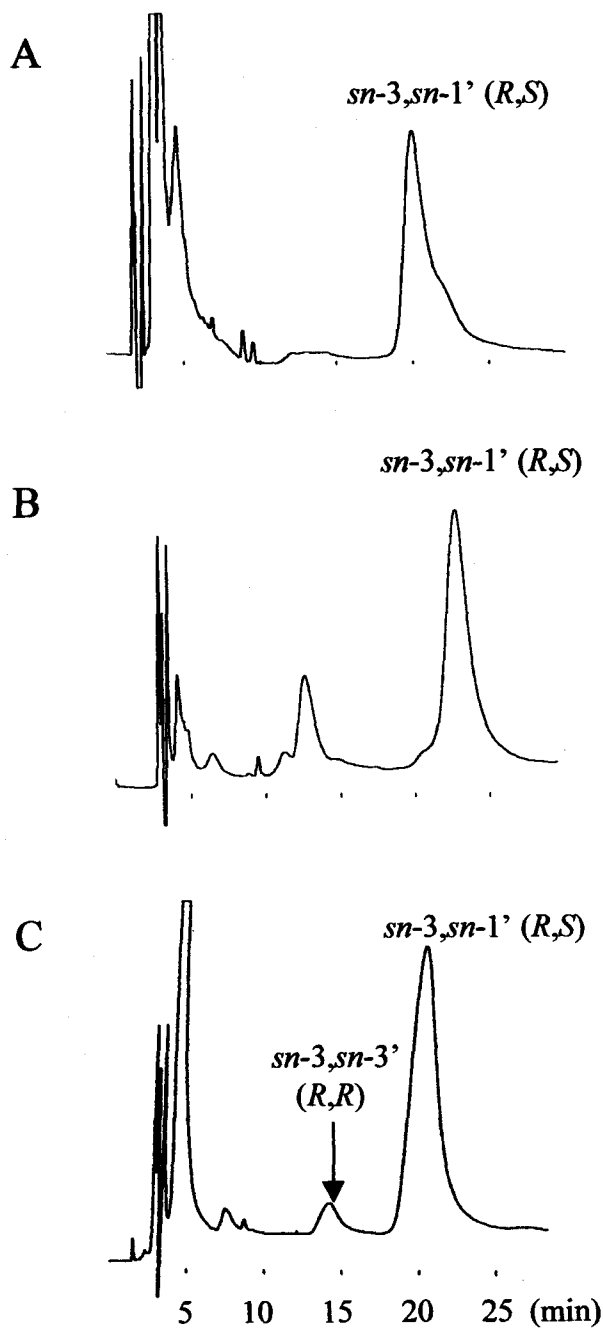


Fig. 5. Chiral phase HPLC profiles of the bis (3,5-dinitrophenylurethane) derivatives of phosphatidylglycerols from green tea leaves (A) and radish leaves (B), and of standard phosphatidylglycerols from *Escherichia coli* (D) on a column containing (*R*)-1-(1-naphthyl)ethylamine polymer. HPLC conditions and abbreviations as given in Fig. 2.

他の試料と同様に *R, S* 体のみであることが確認された。12~13分に溶出した成分は試葉由来の不純物であり、TLCでの精製が不十分であったと考えられる。ホウレンソウ葉のPGは、本研究で得られた結果と同様に、*R, S* 配置であることが酵素法により既に明らかにされているが (Haverkate and Van Deenen, 1965), その他の葉由来PGの立体構

造は本研究において初めて確認されたものである。

生合成

PGの生合成については、シチジン5'-二リン酸(CDP)-ジアシルグリセロールと *sn*-グリセロール3-リン酸から生成する経路とカルジオリピン(ジホスファチジルグリセロール)からホスホリパーゼD(PLD)の作用によって生成する経路が知られている(Hostetler, 1982)。これらの反応によって生成するPGは *R, S* 体であり、従来報告されてきた生物由来PGの立体構造と一致する。また、PLDの触媒するホスファチジル基転移反応によって細胞膜の主要構成リン脂質であるホスファチジルコリン(またはホスファチジルエタノールアミン)とグリセロールからPGが生成する経路も推測されるが、この転移反応によって生成するPGは *R, S* と *R, R* の等量混合物であるといわれている(Yangら, 1967; Joutti and Renkonen, 1976)。一方、大腸菌から *R, R* 配置のPGが見出されたことから、同菌体には *R, R* 体を生合成する未知の経路の存在することが示唆されている(Itabashi and Kuksis, 1997)。本法を用いてアオノリ、*C. vulgaris* 及び *H. akashiwo* のPGの立体構造を分析した結果、いずれも *R, S* 体であり、*R, R* 体は検出されなかったことから、海藻及び微細藻のPGはキャベツなどの高等植物のPGと同様にCDP-ジアシルグリセロールと *sn*-グリセロール3-リン酸から合成されるものと考えられる。

おわりに

本研究ではキラルHPLCを用いて、海藻、微細藻及び高等植物葉由来PGの立体構造を分析した。その結果、いずれの試料のPGにも大腸菌から見出されている *R, R* 体は存在せず、*R, S* 体のみから構成されていることが明らかとなった。キラルHPLCを用いるPGの構造分析法は、従来の酵素の立体特異性を利用する間接的な方法よりも正確で感度も高く、操作も簡単であることから、水圏生物由来PGの立体構造の解析や生合成の研究に広く適用できると考えられる。

本研究の一部は科学研究費補助金(基盤研究B 13460088)によって行われた。

文 献

- Arisz, S.A., van Himbergen, J.A.J., Musgrave, A., van den Ende, H., and Munnik, T. (2000). Polar glycerolipids of *Chlamydomonas moewusii*. *Phytochemistry*, **53**, 265-270.
- Benson, A.A. and Miyano, M. (1961). The phosphatidylglycerol and sulpholipid of plants: asymmetry of the glycerol moiety. *Biochem. J.*, **81**, 31 p.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.

- Bell, M.V., Dick, J.R., and Pond, D.W. (1997). Octadecapentaenoic acid in a raphidophyte alga, *Heterosigma Akashiwo*. *Phytochemistry*, **45**, 303-306.
- Haverkate, F. and Van Deenen, L.L.M. (1965). Isolation and chemical characterization of phosphatidyl glycerol from spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 78-92.
- 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.
- 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.
- 板橋 豊・A. Kuksis (1998). キラル HPLC/ESI/MS によるホスファチジルグリセロールの立体配置の決定. 脂質生化学研究, **40**, 175-177.
- 板橋 豊・佐藤理奈・藤島裕典・Arnis Kuksis (1999). キラル HPLC/ESI/MS による酸性リン脂質の構造解析. *Chromatography*, **20**, 368-371.
- Joutti, A., and Renkonen, O. (1976). The structure of phosphatidyl glycerol prepared by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation from egg lecithin and glycerol. *Chem. Phys. Lipids*, **17**, 264-266.
- Murata, N. (1983). Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling-resistant plants. *Plant & Cell Physiol.* **24**, 81-86.
- Op den Kamp, J.A.F., Bonsen, P.P.M. and Van Deenen, L.L.M. (1968). Structural investigations on glucosaminyl phosphatidylglycerol from *Bacillus megaterium*. *Biochem. Biophys. Acta*, **176**, 298-305.
- 大西正男 (1992). 葉緑体ホスファチジルグリセロールのシスおよびトランス不飽和化. 化学と生物, **30**, 211-213.
- Ruettinger, R.T. and Brewer, G.J. (1978). Stereo-configuration of phosphatidylglycerol in the membrane of bacteriophage PM2 and in its host, *Pseudomonas* BAL-31. *Biochem. Biophys. Acta*, **529**, 181-185.
- Terasaki, M. and Itabashi, Y. (2002). Free fatty acid level and galactolipase activity in a red tide flagellate *Chattonella marina* (Raphidohyceae). *J. Oleo Sci.*, **51**, 1-6.
- Thompson Jr, G.A. (1996). Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, **1302**, 17-45.
- Xu Y., and Siegenthaler P.-A. (1996). Phosphatidylglycerol molecular species of photosynthetic membranes analyzed by high-performance liquid chromatography: theoretical considerations. *Lipids*, **31**, 223-229.
- Yang, S.F., Freer, S., and Benson, A.A. (1967). Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, **242**, 477-484.
- Yu, C-H, Liu, S-Y, and Panagia, V. (1996). The transphosphatidylation activity of phospholipase D. *Mol. Cell. Biochem.*, **157**, 101-105.