

Application News

No. C188A

LC/MS

LC/MS/MS による真核藻類の ガラクト脂質分析

ガラクト脂質は、高等植物の葉緑体膜脂質の約 8 割（モル比）を占める自然界に豊富な糖脂質の一種です。植物および他の光合成独立栄養生物は、リン脂質の代わりにリンを含まないガラクト脂質を葉緑体のチラコイド膜の主要成分として利用します。

これまでの数十年に亘る研究により明らかになったガラクト脂質の重要な生物活性を以下に示します。

1. チラコイド生合成過程への直接的関与
2. 光合成電子輸送反応に不可欠
3. リン飢餓時、リン脂質を部分置換
4. 花の発生における役割
5. 薬草の抗炎症および抗腫瘍活性への貢献

ガラクト脂質は、グリセロール骨格の sn-3 位にエーテル結合したガラクトース部分と sn-1 および sn-2 位にエステル結合した二本の脂肪酸によって構成されます（図 1）。ガラクトースのヒドロキシル基により、ガラクト脂質は両親媒性を示します。

ガラクト脂質は糖の種類により分類され、モノガラクトシルジアシルグリセロール（MGDG）、ジガラクトシルジアシルグリセロール（DGDG）とスルホキノボシルジアシルグリセロール（SQDG）などが含まれます。図 1 に主要なガラクト脂質である MGDG と DGDG の化学構造を示します。MGDG と DGDG の含有量の比率及びそれぞれの脂肪酸組成分布は葉緑体形成の研究等において重要な指標となります。

ミドリムシとして知られる単細胞真核藻類ユーグレナの一種ユーグレナグラシリス（*Euglena gracilis*）は、葉緑体を有し、光独立栄養的にも従属栄養的にも増殖することができます。近年、低酸素条件下で生産するワックスエステルがバイオ燃料の原料として優れていることから注目を集めています。

ここではユーグレナグラシリスの含有脂質を解析する一環として、高速液体クロマトグラフとトリプル四重極型質量分析計システム（Shimadzu LCMS™-8060）を用いたユーグレナグラシリス粉末中のガラクト脂質分析例をご紹介します。

H. Lin

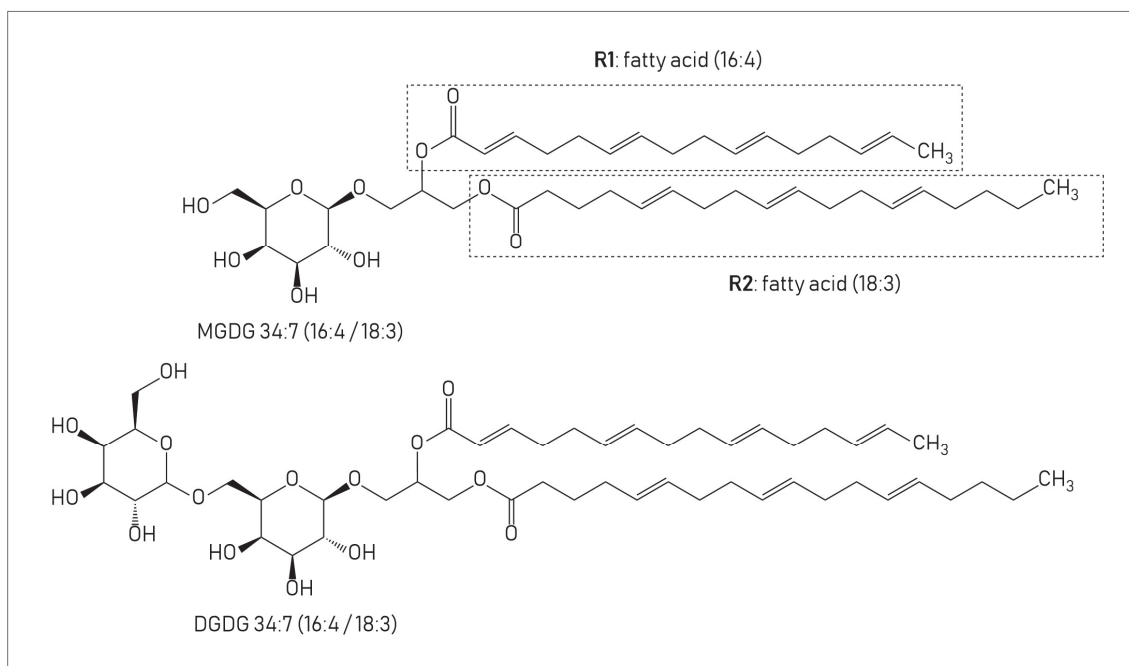


図 1 MGDG 34:7 (16:4/18:3) と DGDG 34:7 (16:4/18:3) の化学構造（脂肪酸の二重結合の位置および幾何異性は未特定）

■ サンプル前処理

大規模培養されたユーグレナグラシリスの乾燥粉末は株式会社ユーグレナから提供されました。

3~5 mg の試料粉末に 600 μ L の混合メタノール/クロロホルム (1:1) を加え、5 分間攪拌し懸濁しました。次いで、300 μ L の超純水を混合物に添加し、10 分間攪拌をかけた。室温で 10 分間放置した後に 4 $^{\circ}$ C で 10 分間、20,000 g で遠心分離し、有機相 (下層) を回収しました。100 倍希釈を行い、そのうち 5 μ L を LC-MS/MS 分析に供しました。

表 1 分析条件

[LC] Nexera™ X2 システム	
Column	: Phenomenex Kinetex® C8 (2.1 mm I.D.×150 mm, 2.6 μ m)
Solvent A	: 20 mM ammonium formate
Solvent B	: 2-propanol / acetonitrile (1 : 1)
Flow rate	: 0.3 mL/min
Column temp.	: 45 $^{\circ}$ C
Injection vol.	: 5 μ L
Gradient (B conc.)	: 20% (1 min) – 92.5% (25 min), curved gradient (-3)
[MS] LCMS-8060	
Ionization	: ESI negative
DL temp.	: 250 $^{\circ}$ C
Heat Block temp.	: 400 $^{\circ}$ C
Interface temp.	: 150 $^{\circ}$ C
Nebulizer gas	: 2.0 L/min.
Drying gas	: 10.0 L/min.
Heating gas	: 10.0 L/min.

■ MRM トランジション

MGDG と DGDG の標準品 (カタログ番号 840523/840524 Avanti Polar Lipids 社製) の分析により、MGDG と DGDG が主にネガティブモードにおいてギ酸アダクトで検出されることがわかりました。ギ酸アダクトをプリカーサイオンとして、プロダクトイオンスクリーンを行った結果、脱プロトン体は強度が強くと安定に検出されるプロダクトイオンでした。ガラクト脂質の脂肪酸総炭素数 32~44 と脂肪酸総二重結合数 0~12 を考慮した結果、プリカーサイオンはギ酸アダクト、プロダクトイオンは脱プロトン体で、91 種の MGDG と 91 種 DGDG (合計 182 種) の MRM トランジションライブラリーを構築しました。

■ 分析結果

図 2 はユーグレナグラシリス脂質抽出物中に検出されたガラクト脂質の分離状況およびシグナル強度を示した図です。脂肪酸総炭素数 34 および二重結合数 2-7 の MGDG および DGDG のマスクロマトグラム (最も豊富な成分) を以下のように色で示しました。

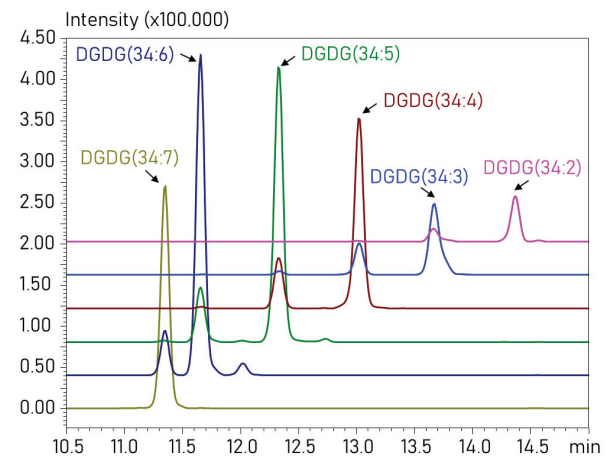
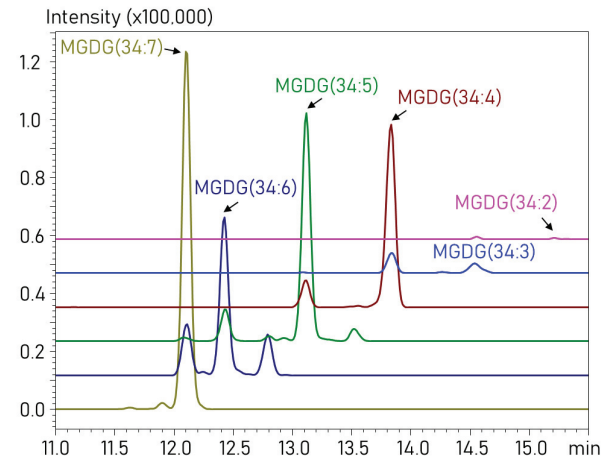


図 2 LCMS-8060 を用いたユーグレナ脂質抽出物中の MGDG および DGDG の分離と検出

<謝辞>

ユーグレナサンプルのご提供と有益な議論を頂きましたユーグレナ社中央研究所の松本拓也博士に感謝いたします。

LCMS および Nexera は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

Kinetex は、Phenomenex, Inc. の登録商標です。

その他、本書に掲載されている会社名、製品名、サービスマーク、およびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中には TM、® マークを明記していない場合があります。