液体クロマトグラフィー質量分析計を使用した 果実の植物ホルモンの同時分析

Simultaneous Analysis of Phytohormones in Fruits Using High-Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry

太田祐樹¹・坂井 優¹・知野秀次¹・福田陽子²・児島清秀^{2*}

Yuuki OHTA,¹ Yu SAKAI,¹ Shuji CHINO,¹ Yoko FUKUDA,² and Kiyohide KOJIMA^{2*}

¹ 新潟大学大学院自然科学研究科 *Graduate School of Science and Technology, Niigata University, Niigata, JAPAN*

² 新潟大学農学部 *Faculty of Agriculture, Niigata University, Niigata, JAPAN*

A method for the highly sensitive detection of some phytohormones is described. We evaluated some simple methods for the extraction and purification of phytohormones using organic solvents and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) using atmospheric pressure chemical ionization (APCI). The methodology developed was used for the simultaneous detection and quantitative determination of a series of 5 phytohormones, including indole-3-acetic acid (IAA), abscisic acid (ABA), cytokinins (CKs), gibberellins (GAs) and jasmonic acids (JAs). The detection limits ranged from 0.07 pmol for JA to 4.0 pmol for ABA. Compared with previous negative electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) methods, the sensitivity was found to be sufficient for the detection and analysis of the above phytohormones. This method was sufficiently sensitive to permit the measurement of the endogenous concentrations of IAA, ABA, CKs, GAs, and JAs in extracts of the "Le lectier" fruit.

(Received January 5, 2011; Accepted February 23, 2011)

1. 序 論

果実は、花芽形成から老化の段階でさまざまな現象が起こっており¹⁾、オーキシシン (IAA)、サイトカイニン類 (CKs)、アブジジン酸 (ABA)、ジベレリン酸類 (GAs)、ジャスモン酸類 (JAs) などの複数の植物ホルモンが発達段階ごとに複雑な相互作用をしながら関与している^{2)~6)}。果実の生長過程の詳細を解明するには、ごく微量で存在する活性型の植物ホルモンを定量する高感度な分析方法が必要である。エンザイムイムノアッセイ (ELISA) やラジオイムノアッセイ (RIA) などの免疫法や、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC-MS) がある^{7), 8)}。近年では、植物ホルモンの相互作用の解明のため、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて、同一のサンプルから複数の植物ホルモンを一斉に分析する方法が開発されている^{9), 10)}。そこで、本研究ではより広く普及している

LC-シングル四重極型 (MS) の装置でも適応可能な植物ホルモンの一斉分析法の検討を行った。

果実には糖やポリフェノールなどの夾雑物が多く含まれる¹⁾。したがって植物ホルモンの分析には、これらの夾雑物の除去、および多くのサンプル数を分析するための簡易な精製・濃縮方法の確立が必要である^{11), 12)}。また、複数の植物ホルモンの一斉分析に対応した高感度な分析条件の確立が必要である^{13)~16)}。

本報告では、有機溶媒分配による簡易精製と濃縮法の確立、LC による高分離条件、MS の高感度な分析条件を最適化し、果実における 5 種類の植物ホルモン (IAA, ABA, CKs, GAs, JAs) の LC-MS を用いた一斉分析法を確立した。

2. 実 験

2.1 試薬

標準試料は和光純薬工業 (大阪, 日本) から、安定同位体は Olchemlm 社 (Czech Republic) から購入した (Table 1 に使用した試料の分子量を示す)。それぞれの試料はメタノールに溶解し使用した。

2.2 分析条件

LC-MS (LCMS-2010EV, 島津) を使用し、大気圧イオ

* Correspondence to: Kiyohide KOJIMA, *Faculty of Agriculture, Niigata University, 8050 Ikarashi 2-no-cho, Nishiku, Niigata 950-2181, JAPAN*, e-mail: Kojimaki@agr.niigata-u.ac.jp
児島清秀, 新潟大学農学部, 〒950-2181 新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

Table 1. m/z Value of Precursor and Product Ions of Each Phytohormones in the Positive and Negative Mode

Compounds	Molecular weight	Positive mode			Negative mode		
		Precursor ion	Product ion		Precursor ion	Product ion	
Indole-3-acetic acid (IAA)	175.18	176.05	146.00	130.00	174.00	144.00	
Absciscic acid (ABA)	264.32	265.05	247.20		263.15	219.10	153.05
Trance-zeatin (Z)	219.24	220.10	200.10	136.00	218.15	198.00	134.00
Trance-zeatin-9-ribiside (ZR)	351.36	352.10	220.10	136.00	350.00	218.00	198.00
Isopenteniladenine (iP)	203.25	204.05	136.00		202.05	134.00	
Isopenteniladenosine (iPR)	335.36	336.55	204.05	136.00	391.15*	202.05	134.00
Jasmone acid (JA)	210.27	211.10	165.10	151.10	209.05	n.d.	
Jasmone acid methyl ester (MJA)	224.30	225.20	211.10	165.10	151.10	223.10	209.05
Gibberellin A1 (GA ₁)	348.39	n.d.	n.d.		347.10	393.15*	
Gibberellin A4 (GA ₄)	332.39	n.d.	n.d.		331.10	377.10*	
¹³ C-IAA	181.14	182.05	152.00	136.00	180.00	149.95	
² H ₆ -ABA	270.36	271.10	253.10	285.35*	269.15	225.15	159.10
² H ₅ -Z	224.28	225.10	205.05	136.00	223.05	n.d.	
² H ₅ -ZR	356.40	357.15	225.10		n.d.	222.95	
² H ₆ -iP	209.29	210.15	136.00		208.10	134.00	
² H ₆ -iPR	341.41	342.15	210.15	136.00	397.25*	n.d.	207.80
² H ₂ -GA ₁	350.41	n.d.	n.d.		349.00	395.15*	
² H ₂ -GA ₄	334.40	n.d.	n.d.		333.10	379.10*	

*Adduct-ion

n.d.: not detected

Table 2. LC-MS Condition for the Quantification of Phytohormones

Start time (min)	Finish time (min)	Detective mode	Detector voltage (V)	Standard			Internal standard		
				Compounds	m/z	RT (min)	Compounds	m/z	RT (min)
12.5	42	P*	1.8	Z	220.10	18.75±0.20**	² H ₅ -Z	225.10	18.28±0.17
				ZR	352.10, 220.10	36.43±0.09	² H ₅ -ZR	357.15, 225.10	35.39±0.19
42	63	P	2.0	GA ₁	347.10	48.67±0.17	² H ₂ -GA ₁	349.00	48.65±0.18
		N	2.0	IAA	176.05, 146.00, 130.00	59.17±0.13	¹³ C-IAA	182.05, 152.00, 136.00	59.16±0.12
63	95	P	1.5	iP	204.05	68.68±0.34	² H ₆ -iP	210.15	68.45±0.12
				iPR	336.55, 204.05	84.72±0.24	² H ₆ -iPR	342.15, 210.15	83.85±0.16
				ABA	265.05, 247.10	91.43±0.10	² H ₆ -ABA	271.10, 253.10	90.99±0.15
				ABA	263.15	91.43±0.10	² H ₆ -ABA	269.15	91.43±0.10
95	130	N	1.5	GA ₄	331.10	99.43±0.14	² H ₂ -GA ₄	333.10	98.47±0.15
		N	1.8	JA	211.10	106.41±0.27	—		
		P	1.8	MJA	225.20, 211.10	118.73±0.44	—		

* P: Positive mode, N: Negative mode

** Values are the means±SE. ($n=4$)

ン化 (APCI) 法で測定した。各測定部の設定は下記の条件で固定した; ネブライザーガス流量 2.5 mL/min, APCI インターフェイス温度 400°C, CDL 温度 250°C (SIM)・200°C (SCAN), ヒートブロック温度 200°C, インターフェイス電圧 4.5 kV, CDL 電圧チューニングファイル, カラムオープン温度 40°C。カラム CD-C18 (3.0×250 mm, インタクト製) を使用した。

2.3 LC-MS の分析条件の最適化

Q-array の DC および RF の電圧, 移動相, 分析モード, m/z 値および定量限界値に関して試験を行い, これらの結果より DC が 0 V, RF が 140 V を最大の検出感度とし, 流速 0.3 mL/min, LC の分離のために用いた移動相は Fig. 1, 選択した分子量および検出器電圧は Table 2 に示す条件で一斉分析を行った。

Fig. 1. Chromatographic gradient conditions for LC-MS analysis.

2.4 分配法による果実における植物ホルモンの精製・濃縮

植物材料は, セイヨウナシ ‘ル・レクチエ’ 果実を用いた。果実をホモジナイズした後 0.5~3.0 g 相当を, 100% メタノールおよび内部標準 (各 500 pmol) をを加え -18°C で 24 時間保管した。以降の精製方法は以前の方法に従って, すべての植物ホルモンにも対応した方法で行った^{8), 17)}。保管したサンプルを遠心分離後, 上澄み液をろ過しながら回収し, メタノールを除去後 pH 3.0 の 0.03 M リ

Fig. 2. Flow diagram showing the purification of phytohormones.

ン酸バッファーを添加した。溶液をヘキサンで1~2回分配した後、水層を酢酸エチルで3回分配した。分配後に残った水層に、pH 9.0 の 0.03 M リン酸バッファーを同量添加後、ブタノールで2回分配した。酢酸エチルおよびブタノール層の有機溶媒を除去後、100%メタノールで回収しメンブレンフィルター (0.20 μ m, Whatman) でろ過し、混合液を分析サンプルとした (Fig. 2)。なお、この方法での JAs 以外の回収率は標準物質および安定同位体ともに 89.4%以上であった。JAs は分配後ヘキサンおよび水層に残り、また揮発性が高いこともあり正確な回収率は得られなかった。

3. 結果および考察

3.1 LC-MS の分析条件の最適化

5 種類の植物ホルモン (IAA, ABA, CKs, GAs, JAs) の最適な分析条件を確立するために、DC および RF 電圧、移動相、分析モード、 m/z 値および定量限界値に関して試験を行った。

Fig. 3 に IAA の Q-array 電圧の変化による検出感度の変化を示す。50 pmol のメタノール溶液を 1 mL/min の流量で直接導入した。Q-array 電圧の DC の変化による検出感度は 0 V が最大で、50 V まで増加させるに従ってすべてのイオンの検出感度は低下し、50 V ではピークが検出されなかった (Fig. 3A)。RF 電圧の変更による検出感度は 60 V から上昇するに従って検出感度も上昇し、140 V で感度が最大であった (Fig. 2B)。Kojima らの報告 (日立 M-1200H) では負イオンモードのほうが高感度であり¹³⁾、これは装置による差であると考えられる。Auto mode で測定した場合、電圧を固定して得られた最大感度の 0.6~1.2 倍 (Fig. 3 Auto mode での測定範囲) の値を示し、測定ごとに大きなばらつきが示された。これらの結果から、Q-array 電圧を DC 0 V, RF 140 V に固定することで検出感度が最大となり、他の植物ホルモンでも同様の傾向が示されたため (データ略) この電圧を最適電圧とした。

移動相は、IAA, ABA, CKs および JAs でメタノールを

Fig. 3. Effect of Q-array voltage on sensitivity of precursor and product ions of indole-3-acetic acid. A; The effect of DC voltage with the RF voltage fixed at 150 volts. B; The effect of RF voltage with the DC voltage fixed at 0 volts. Auto mode; Tuning file. P: Positive mode, N: Negative mode.

用いた場合、GAs はアセトニトリルを用いた場合検出感度が高い傾向が示され、添加物質の影響は IAA でギ酸添加した場合 2 倍程度の感度を示した (データ略)。

イオンの検出モードは、IAA, CKs および JAs は正イオンモードで検出感度が高く、GAs は負イオンモードが高い傾向を示し、ABA は検出感度に差は示されなかった (データ略)。

予備的試験として、ESI プローブを用い、その他の条件を同条件で行った場合、APCI を用いたときの 20% 程度の検出感度しか得られなかった (データ略)。

本条件で観察された各植物ホルモン由来のイオンの m/z 値を Table 1 に、前駆イオンの検出限界値を Fig. 4 に示す。検出限界値は S/N 比 10 倍 (ピークエリアの面積値 1×10^5) となり、JA の 0.07 pmol から ABA の 4 pmol が検出限界範囲として示された。

3.2 植物ホルモンの一斉分析

Fig. 5 に標準物質の植物ホルモン (前駆イオン) を用いたときの保持時間と相対強度を示す。IAA および GAs は他の植物ホルモンに比べ、検出されたイオンの相対強度は低い値を示したが、ピークエリアは測定には十分な値を示した。また、同条件での主な標準物質と安定同位体の MS スペクトルを Fig. 6 に示す。GAs 以外の標準物質および安定同位体ともに生成イオンが得られたが、GAs は付加イオンが得られたが生成イオンは示されなかった。したがって、GAs は前駆イオンのみで測定を行うこととした。この結果より、各植物ホルモンの測定時間を設定しセグメントを分けた条件でサンプルの分析を行った (Table 2)。

実際のサンプルのマスキロマトグラムを Fig. 7 に示す。簡易精製と LC による分離を行うことでそれぞれの植物ホルモンのピークが得られた。内部標準法を用いた定量的結果 'ル・レクチェ' 果実内の植物ホルモン濃度は、それぞれ Z 20, ZR 16.3, IAA 142.6, iP 21.0, iPR 32.8, ABA 3070, GA₄ 84.5 pmol/gFW であった (Table 3)。Z はピークが検出されたが夾雑物ピークと近接しているため推定の最大濃度を示す。また、保持時間が標準物質で示された時間との差が生じていた。これは直後のピークが原因であると示唆

Fig. 4. Relationship between amount added and peak area. Ms conditions: eluent: (a)–(h), 50% MeOH containing 0.1% formic acid; (i), (j), 50% acetonitrile, detection voltage 1.5 kV. Detection mode (a), (c)–(h), positive mode; (b), (i), (j), negative mode. R^2 , correlation coefficients; the slope of each graph gives the accuracy of the analysis.

されるが、安定同位体のピークとの時間差によりそのもののピークと判断した。逆相系のカラムを用いた場合 CKs が検出されるフラクション付近は夾雑物が多く検出され、その中から実際のピークを判別することが難しい場合がある。本報告の方法では内生量がごく微量の場合、正確な定量にはさらなる精製を行う必要があるかもしれない。JAs は内部標準がないため、内生量の計算はできなかったがピークは示されたため果実内に存在すると確認できた。実際のサンプルの GAs などの前駆イオンのみ用いて測定している植物ホルモンは、測定結果の信頼度を向上させるために、付加イオンもしくは正および負イオンを同時に分析することが必要かもしれない。

4. ま と め

本報告は、LC-MS を用いて 5 種類の生理活性を示す植物ホルモンを同時に分析することを可能にした報告であ

Fig. 5. LC-MS chromatogram of a standard mixture of phytohormones (50 pmol). LC conditions were described in Fig. 4. Arrow heads are as precursor ion peak of each phytohormone. P: Positive mode, N: Negative mode.

Fig. 6. MS spectral patterns for standards (a), (c), (e), (g) and internal standards (b), (d), (f), (h). Precursor ion (m/z) of the compounds: (a), 352.10; (b), 357.1; (c), 347.10; (d), 349.00; (e), 336.55; (f), 342.15; (g), 176.05; (h), 182.05. MS conditions: scan, detection voltage 1.5 kV, m/z 50–400.

Fig. 7. Chromatogram of an LC-MS phytohormone analysis of extracts of the "Le Lectier" fruits.

Table 3. Endogenous Concentrations of Phytohormones in 'Le Lectier' Fruits

Phytohormones	Concentration (pmol/gFW)
Z	<20
ZR	16.3±3.9
IAA	142.6±17.6
GA ₁	40.7±1.7
iP	21.0±6.4
iPR	32.8±5.3
ABA	3070±248
GA ₄	84.5±4.4
JA	Detected
MJA	Detected

* Values are the means±SE. (n=5)

る。液-液分配による精製・濃縮は簡易な方法であり、多くのサンプル数を処理でき、回収率は標準物質および安定同位体ともに 89.4% 以上であるため有効な手段であることが示された。しかしながら JAs に関しては十分な回収率を得るために、ほかの方法の検討が必要であると示唆された。

電圧、移動相、分析モードおよび m/z 値の測定により MS の最適条件を確立でき、JA の 0.07 pmol から ABA の 4.0 pmol の検出限界範囲が示された。これは Chiwocha らの報告⁹⁾と比較しても、定量に必要な十分な値が得られたと考える。この結果により JAs は他の植物ホルモンに比べて回収率が悪いにもかかわらず、検出限界値が低いために実際のサンプル中の内生量を検出できたと示唆された。

感度および精度の高い分析が可能であることが示され、'ル・レクチエ' 果実における内生植物ホルモンの定量が可能であり十分な結果を得られた。しかしながら、植物体に含まれる物質は、植物の種や器官によって大きく異なるため、本報告で行った方法が他の植物への適応検証が必要であろう。

LC による分離で植物ホルモンのピークと夾雑物ピークを分離することができたが、分析後カラムの洗浄含め平衡状態に戻るまで 1 時間必要とし、1 サンプルあたりの分析時間は 3 時間 20 分である。この方法であると 1 日あたり 7 サンプル (約 50 サンプル/1 週間) 程度が分析数になる。したがって分析数の増加のため分離能の高いカラムを用いるなどさらなる検討が必要である。

本研究が植物ホルモンの研究の発展の取り組みによって、有効な情報となりえることを期待する。

謝 辞 本研究は新潟大学の超域研究機構の創生科学研究部門のプロジェクトとして行われた。

文 献

- 1) 山田邦夫ら, "園芸生理学", 山本昭平編, 文永堂 (2007), p. 83.
- 2) P. Georgina, P. W. Barlow, L. J. Feldman, and G. I. Cassab, *Plant, Cell and Environment*, **28**, 719 (2005).
- 3) L. Mouvayidin, R. D. Mambro, and S. Sabatini, *Trends in Plant Science*, **14**(10), 557 (2009).
- 4) M. Kieffer, J. Neve, and S. Kepinski, *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **13**, 12 (2010).
- 5) K. Kojima, Y. Tamura, M. Nakano, D.-S. Han, and Y. Niimi, *Plant Growth Regulation*, **41**, 99 (2003).
- 6) G. Gillaspay, B. Ben-David, and W. Gruissem, *Plant Cell*, **5**, 1439 (1993).
- 7) 横田孝雄, "植物ホルモンの精製と機器分析", 勝美弁行・増田芳雄編, 丸善 (1983), p. 3.
- 8) 増田芳雄編, "植物ホルモン研究法", 学会出版センター, (1991), p. 7.
- 9) S. D. Chiwocha, S. R. Abrams, S. J. Ambrose, A. J. Cutler, M. Loewen, A. R. Ross, and A. R. Kermode, *Plant J.*, **35**, 405 (2003).
- 10) X. Pan, R. Welti, and X. Wang, *Phytochemistry*, **69**, 1773 (2008).
- 11) A. Müller, P. Dückting, and E. W. Weiler, *Planta*, **216**, 44 (2002).
- 12) 軸丸雄介, 花田篤志, 佐藤深雪, 笠原博幸, 南原英司, 山口信次郎, 神谷勇治, *JSCR*, **42**(2), 167 (2007).
- 13) K. Kojima, *JARQ*, **31**, 271 (1997).
- 14) 児島清秀, 田村裕一, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **49**, 237 (2001).
- 15) 児島清秀, 農業および園芸, **73**(8, 9), 871, 967 (1998).
- 16) 丹羽利充, "最新のマススペクトロメトリー", 化学同人 (1995), p. 2, 43.
- 17) K. Kojima, *JARQ*, **29**, 179 (1995).

Keywords: Absciscic acid, Cytokinins, Gibberellins, Indole-3-acetic acid, Jasmonic acids, LC-MS