

LC/MS システムによる試料中アブシジン酸の同定と、 高速液体クロマトグラフィーによるダイズ種子中の アブシジン酸含有量の迅速測定

大竹憲邦*・山田真也*・大山卓爾*

キーワード ダイズ種子, アブシジン酸, LC/MS システム

1. はじめに

植物ホルモンの一つアブシジン酸 (ABA) は、休眠やストレスに関連し、また植物の代謝や生育制御にきわめて重要な役割を果たしていると考えられている。特にダイズなどの種子中に多く含まれ、登熟過程や貯蔵養分の蓄積とも関連があると考えられている。ABA は他のホルモンより高濃度に含まれているため、測定が比較的容易であり、現在までに多くの植物体内 ABA 濃度の測定法が報告されてきている。しかし、ABA 抽出前処理操作には煩雑な部分が多く、ABA を定量的に回収できない段階を含む場合には、測定値から直接試料中の濃度を求めることはできない。そのため重水素 (^2H) 標識 ABA を抽出操作時に試料に加え、ガスクロマトグラフ質量分析 (GC-MS) による質量分析値から試料中の ABA 濃度を推定するか、トリチウム (^3H) 標識 ABA を試料に加え、精製した後、シンチレーションカウンターで測定し、回収率を求め補正する方法が、正確な定量法とされている⁹⁾。しかしこれらの化合物は、入手が困難であったり、放射線取り扱い施設を必要とする。

近年、高速液体クロマトグラフ (HPLC) と質量分析器 (MS) とを組み合わせた LC/MS システムが開発され、液体クロマトグラフのカラムで分離した試料を直接質量分析することができるようになった。そのため液体クロマトグラフで分離した物質のフラグメンテーションから同定が可能となり、さらに特異的なイオンピークだけを経時的に追跡することができるため、特定の質量ピーク (m/z) のマスプロトグラムを作成でき、そこから定量を行うことも可能となった。このシステムを用いた ABA の定量結果は既に報告されているが³⁾、分析方法の詳細は述べられていない。今回著者らは LC/

MS (M-1200 H 型 LC/MS, HITACHI) を用いた ABA の分析条件について詳細に検討した。その結果、シリカ系のカラムを用いた HPLC により分離された OD₂₆₀ のピークからダイズ種子中の ABA 濃度を直接測定することができることを確認した。

2. 試料と分析方法

1) ABA の抽出

ダイズ [*Glycine max*] 種子からの ABA の抽出は以下のように行った⁴⁾。ダイズ新鮮種子または凍結種子 (生体重約 5 g) を酸化防止剤として BHT (2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol) 10 mg L⁻¹ を含むメタノール 30 mL を用いて乳鉢で磨砕する。一晚、-20°C で放置し、15000×*g*、10 分間遠心分離する。上清を 50 mL のメスフラスコにとり、沈殿をさらに 10 mL のメタノールで 2 回洗い、先の上清と合わせて、50 mL に定容し、これをメタノール抽出液とする。20 mL のメタノール抽出液を、ロータリーエバポレーターを用いて 40°C の湯浴中で減圧乾燥する。10 mL の水に再溶解し、0.45 μm のニトロセルロースフィルターでろ過する。

2) ABA の粗精製

水再溶解液をそのまま HPLC で分析すると、ABA と他成分のピークが重なるため、妨害成分を取り除く必要がある。ABA の粗精製に逆相クロマトグラフィー用オクタドデシルシラン化 (ODS) した低極性の充填剤ミニカラム (C18) が有効であることは既に報告されている⁴⁾。一般に C18 ミニカラムからの ABA の溶出には、塩緩衝液とメタノールの混合液が用いられるが⁵⁾、LC/MS の分析では、分離カラムからの溶出液を直接気化して MS の試料とするため、C18 溶出液には塩類緩衝液を使わずに、0.1 M 塩酸で pH を調節した。塩を含む溶液は LC 出口のマクロパイプをつまらせる。試料抽出後の粗精製は以下のように行った。上述の水再溶解液 5 mL を、Sep-Pac C18 (Waters) に通した。C18 カラムを 10 mL の 0.2 L L⁻¹ メタノール (0.1 M 塩酸で

* 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2-8050)
1995 年 12 月 13 日 受付・1996 年 3 月 14 日 受理
日本土壤肥料学雑誌 第 68 巻 第 1 号 p.52~58 (1997)

pHを2.0に合わせた水とメタノールの混合液, v/v) で洗浄する。次に0.32 L L⁻¹メタノール (0.1 M塩酸でpHを2.0に合わせた水とメタノールの混合液) と0.4 L L⁻¹メタノール (蒸留水とメタノールの混合液) をそれぞれ10 mLずつ用いて溶出させ、0.32 L L⁻¹と0.4 L L⁻¹メタノール画分を合わせて粗ABA抽出液とした。各溶液による溶出にはすべてペリスタポンプを用い、流速は1 mL min⁻¹とした。粗精製画分を100 mLのトールビーカーに取り、40°Cの湯浴に入れた真空デシケーター内で減圧乾燥する。乾燥した後各1 mLのメタノールでトールビーカー内を3回洗い、10 mLバイアルに移し40°C、減圧乾燥後、上述の32%メタノール1 mLに溶解させた。

3) 高速液体クロマトグラフィーによる分離条件

LC/MSによる分析には、Shodex SIL-5 B (昭和電工) カラムを用い、HITACHI L-6200形インテリジェントポンプを使用した。溶媒として塩化メチレン、メタノール (90:10, v/v) 混合液を使い、流速1.4 mL min⁻¹で分析した⁴⁾。

cis-ABAと*trans*-ABAの分別にはShodex NH pak J-411 (昭和電工) カラムを使い、溶媒として0.2 M酢酸を含む5%メタノール溶液を流速0.6 mL min⁻¹で分析した⁴⁾。

HITACHI L-4000 H形 UV-VIS検出器により、OD₂₆₀の吸光度を測定し、インテグレーターで積分した値を得た。

4) LC/MSによる検出条件

LC/MS (M-1200 H型 LC/MS, HITACHI) により大気圧イオン化 (API: Atmospheric Pressure Ionization) 法を使い Negative modeで分析した。API法とは、LCから流出した移動相溶媒と試料を大気圧条件下で高温によりガス化した後、イオン化し、質量分析部に導入する方法である。液体クロマトグラフィーのカラムから流出した試料と移動相溶媒は、霧化器によって霧状となり、高温の脱溶媒室を通過する間に溶媒分子は蒸発し、試料分子が単独で空気中に浮いた状態になる。この試料分子は次に針電極へ進み、イオン化され、細孔を通過して質量分析部へ送られ、分析される。細孔間に加えられる電圧 (ドリフト電圧) を変えることにより、フラグメンテーションの条件を変えることができる。著者らの分析条件を以下に示す。霧化部温度、170°C; 脱溶媒室温度、400°C; 第一細孔温度、140°C; ニードル電圧、2700 V; マルチプライアの電圧、1500 V; 測定モードの極性、負イオン。ABAをMSで分析する場合は、ドリフト電圧を40 Vとして263 *m/z* ピークを測定した。

5) ダイズ種子登熟中の ABA 濃度測定

ダイズ種子として、1993年新潟県農業試験場の水田転換畑で栽培した同質遺伝系統ダイズの根粒着生系統 (T 202) と非着生系統 (T 201) を用いた。元肥に16 kg N ha⁻¹の硫酸を与え、常法に従い栽培した。平均的な大きさの未熟種子を9月1日より10月6日まで7日ごとに各3植物体から収穫し、すぐに-80°Cで保存した。種皮を取り除いた、新鮮重0.5~1.0 gの種子からABAを上記と同様に抽出し、SIL-5 Bカラムを用いて測定した。

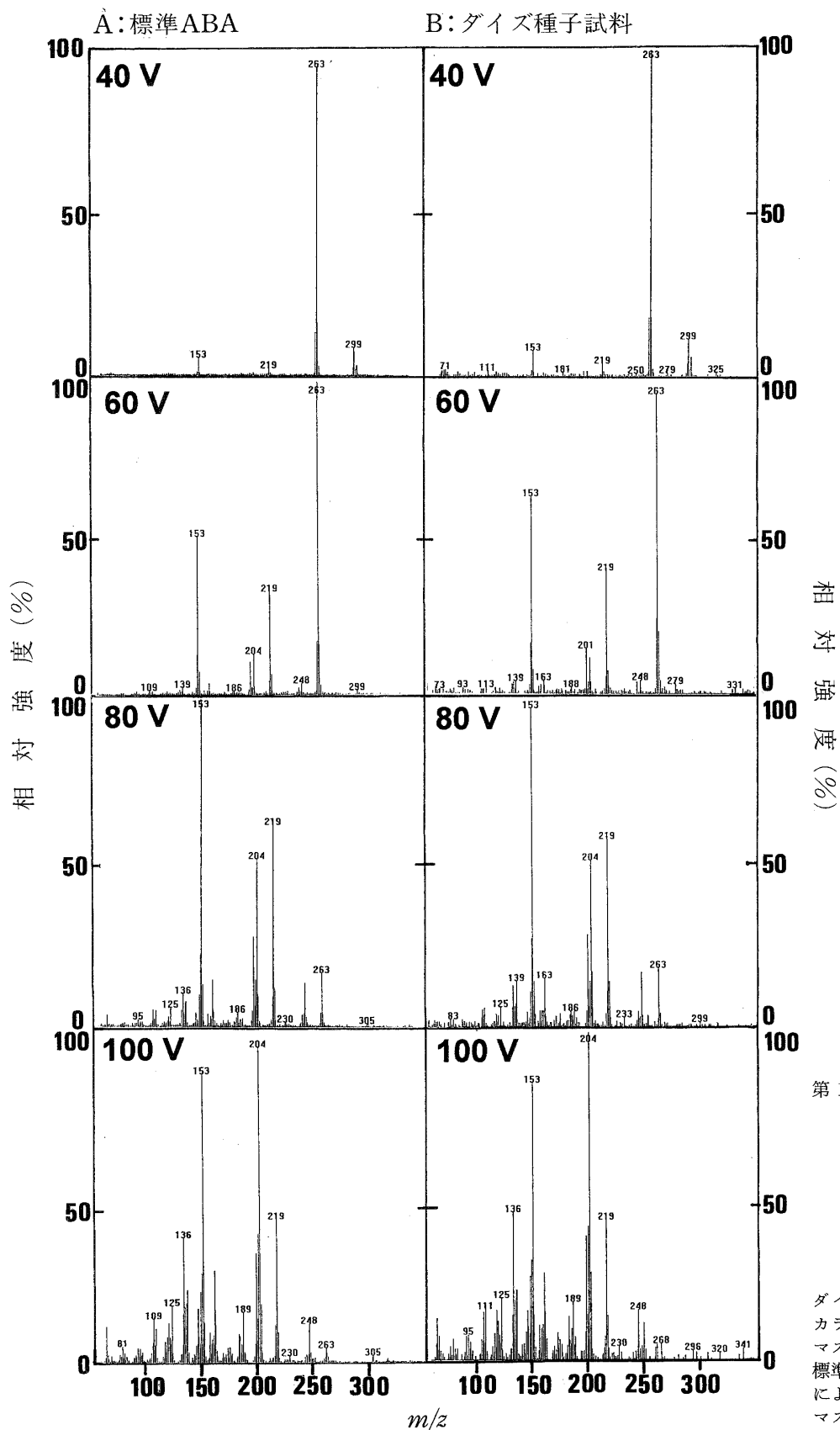
3. 結果と考察

1) LC/MSの設定

質量分析では、イオン化のドリフト電圧の正負およびその大きさにより、分析感度やフラグメンテーションが変化する。ABA測定の最適条件を求めめるため、ドリフト電圧を変えて標準ABA (東京化成) のマススペクトルを調べた。LC/MSの装置にはカラムを装着せず、インジェクターとMS部を直接接続し、溶離液を流しながら、メタノールに溶解したABA標準液を注入した。ドリフト電圧は40, 60, 80, 100 Vとし、60~500 *m/z* の範囲で、サンプリングポイント当たり80回掃引し、全イオン強度を測定した (第1図A)。ただし、350 *m/z* 以上の領域にはスペクトルがほとんど認められなかったため、60~350 *m/z* の範囲を示した。ドリフト電圧40 Vでは、263 *m/z* に最大ピークが得られた。これはABA (分子量264) から水素を除いた質量数である。263 *m/z* ピークは電圧を上げるにつれ減少し、219, 204, 153 *m/z* のピークが高くなってきた。これらはABAからカルボキシル基、カルボキシル基とメチル基、および1'の結合が切断されたものと推定される (第2図)。

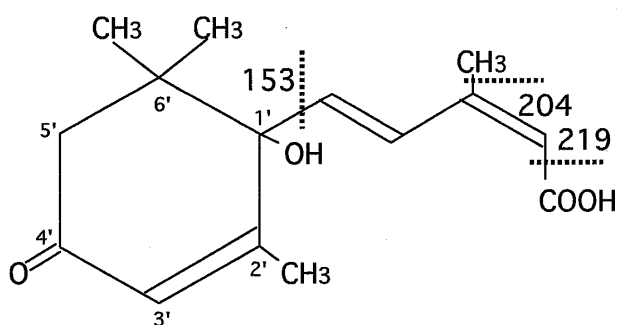
2) Sep-Pak C18カラムによるABAの回収率の検討

標準ABA (10 mgを蒸留水1 Lに溶解させた試料、東京化成) 1 mLをC18カラムにかけ、溶出させた。ABAをSIL-5Bカラムで分離し、OD₂₆₀における紫外部吸収スペクトルおよび、263 *m/z* をサンプリングポイント当たり2000回掃引したマスキンググラムを得た。水および0.2 L L⁻¹メタノール画分にはABAは検出されなかった (第3図)。ABAは全て0.32 L L⁻¹+0.4 L L⁻¹メタノール溶出画分に回収された。C18を洗浄したメタノール画分には酸化防止剤 (BHT) のピークが確認されたが、ABAは検出されなかった。263 *m/z* のマスキンググラムがUVピークと比べ、若干遅れ

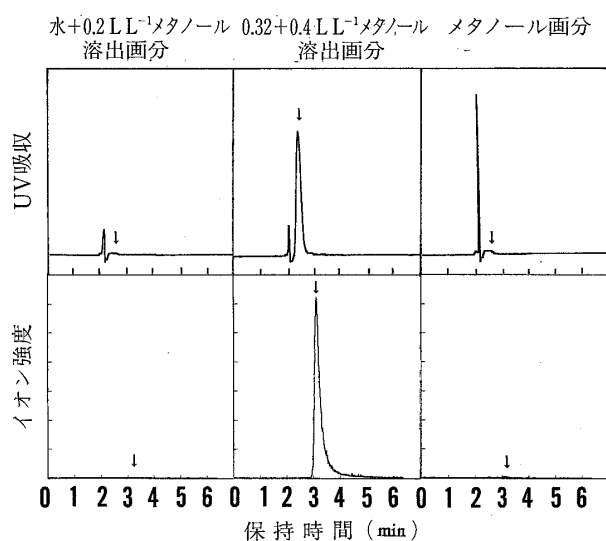


第 1 図 ドリフト電圧を 40, 60, 80, 100 V と変えた標準アブシジン酸 (左パネル) とダイズ種子試料から調整したアブシジン酸のマススペクトル (右パネル)

ダイズ種子試料は SIL-5B カラムにより分離した後、マススペクトルを測定した。標準アブシジン酸はカラムによる分離をせずに、直接マススペクトルを測定した。



第2図 アブジン酸の化学構造
点線は、ドリフト電圧を変化させたときに、解裂の起こったと考えられる主な部位を示す。

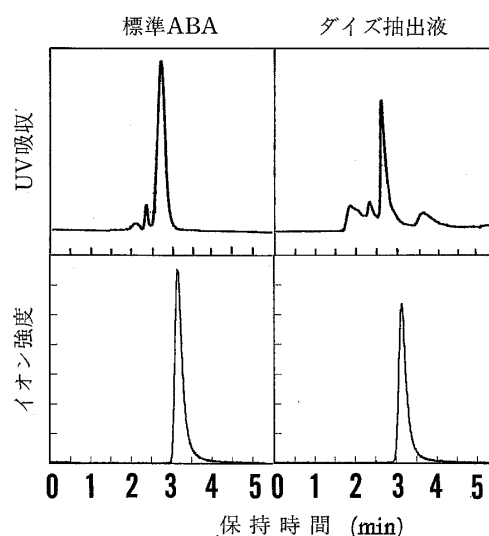


第3図 C18 ミニカラムを用いた標準アブジン酸の粗精製
標準アブジン酸 (10 mg L⁻¹) はC18 ミニカラムから溶出後、減圧乾燥させた後0.1 mLの0.32 LL⁻¹メタノールに溶解させShodex SIL-5B カラムにより分離した。矢印は標準アブジン酸の保持時間を示す。上部パネルは紫外外部吸収 (OD₂₆₀)、下部パネルはLC/MSにより検出した263 m/zのマスプロトグラムを示す。

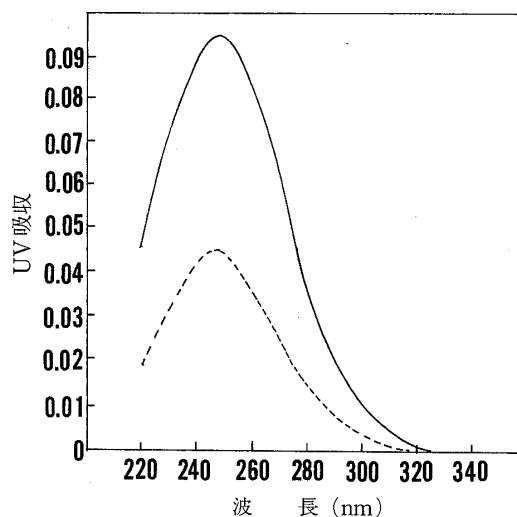
ているのは、UV 検出器から質量分析計まで試料が移動するためである。標準溶液に対し試料と同様の処理を行ったところ、100%の回収率が得られ、C18 カラムによる吸着や乾燥中の損失はないものと考えられた。

3) HPLC によるダイズ試料溶液の ABA の同定

Shodex SIL-5 B カラムにより ABA の標準液を分離すると、UV 検出器では保持時間 2.8 min、質量分析計では 3.0 min に単一ピークとして検出された。ダイズ種子より調整した試料溶液を Shodex SIL-5B で分離すると ABA 標準液と同じ検出時間にピークが確認された (第4図)。このピークが ABA であることを確認するために、ドリフト電圧を 40, 60, 80, 100 V と変化させ、質量分析計で検出される 3.0 min のピーク部分のマス



第4図 SIL-5B で分離したときの、標準アブジン酸 (左パネル) とダイズ試料溶液 (右パネル) との紫外外部吸収 (OD₂₆₀) (上部パネル) と質量分析による 263 m/z のマスプロトグラム (下部パネル)



第5図 メタノールに溶解させた標準アブジン酸 (実線) と、SIL-5B によりダイズ試料溶液から分離した ABA (点線) 部分の紫外部 (220~340 nm) 吸収スペクトル

プロトグラム (60~500 m/z) を調べた。ドリフト電圧 40, 60, 80, 100 V のいずれの場合も、ダイズ抽出液のマスプロトグラムは ABA 標準液とほぼ同様であった (第1図 B)。さらに HPLC より試料溶液の ABA ピークを分取し、減圧乾燥後、メタノールに溶解させ、その UV 吸収スペクトルを調べた。ダイズ種子試料溶液 ABA 画分のスペクトルは ABA 標準液と等しく、紫外外部吸収の最大値は 250 nm 付近であった (第5図)。

UV 吸収 (OD₂₆₀) のピーク面積と、ドリフト電圧 40 V により生成する 263 m/z のマスプロトグラムの面

積値から推定した ABA 濃度との比較を行った。ダイズ試料溶液を 2, 3, 4, 5 倍に希釈した試料溶液を測定したところ、マススペクトルから推定した ABA 濃度と UV 吸収 (OD_{260}) の積分値から推定した ABA 濃度とは一致した (第 6 図)。

以上の結果から、ダイズ種子粗精製抽出液の ABA ピークには ABA 以外の妨害成分はほとんど含まれないため、LC/MS を用いなくても HPLC の UV ピーク面積のみから ABA の定量が可能であると結論できる。

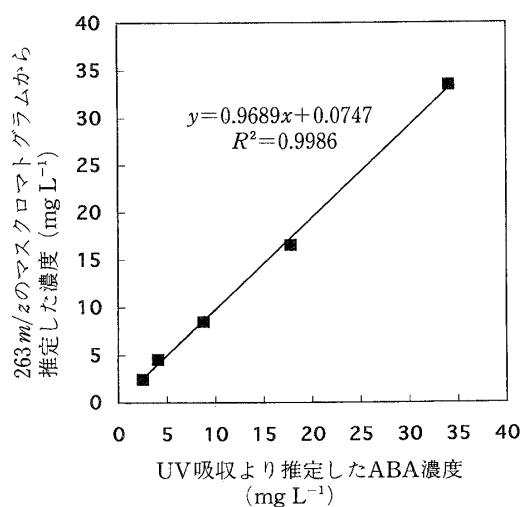
4) *cis*-ABA および *trans*-ABA の分別定量

Shodex SIL-5 B を用いた場合、*cis*-ABA および *trans*-ABA は同一の保持時間を持つために各々を分別測定することはできない。一方、Shodex NH pak J-411 カラムを用いると *cis*-および *trans*-ABA を分別定量できる (第 7 図)⁴⁾。SIL-5 B のクロマトグラムから推定したダイズ試料溶液中の ABA 濃度 (24.46 mg L^{-1}) は Shodex NH pak J-411 カラムを用いて推定した *cis*-ABA および *trans*-ABA の合計 (24.96 mg L^{-1}) と一致した。したがって、NH カラムを用いて *cis*-ABA と *trans*-ABA の分別定量が可能である。しかし、*cis*-ABA の標準液を室温におくと、時間の経過に伴い、一部 *trans*-ABA に変換することが認められた。そのため実際の試料の抽出の際に *cis* と *trans* の変換が起こる可能性があるので注意を要する。

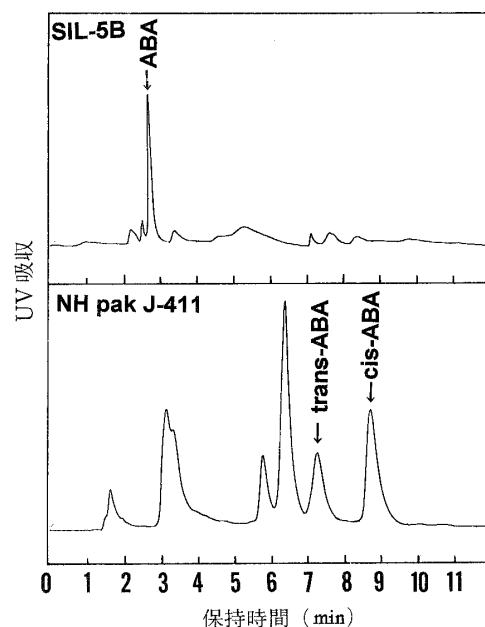
以上の結果から、C 18 ミニカラムを用いる簡単な精製により HPLC (Shodex SIL-5 B カラム) で UV の吸光度を測定することにより、ダイズ種子中の ABA の定

量が可能であることが確認された。C 18 を用いた精製法では、ABA のピークに他成分は含まれず、試料中の ABA をほぼ完全に回収できるため、ABA を直接定量することができる。ダイズ登熟中の種子には新鮮重 1 g 当たり約 $6 \mu\text{g}$ の ABA (最大約 $15 \mu\text{g}$) が含まれているので¹⁾、最低 0.1 g の試料でも測定可能であった。さらに NH カラムを用いても、ABA を定量することはできるが、*cis*- および *trans*-ABA の分別定量には試料調整中に相互変換が起こらないような工夫が必要である。また、試料の精製において、C 18 ミニカラムに通す前、ダイズ試料溶液をカチオン交換樹脂の Dowex 50 (H^+ 型) ミニカラムを通過させると ABA ピークは吸着されることなく通過するが、保持時間が ABA よりも後半に出現する成分をかなり除去できた。不純物を大量に含む試料や ABA 濃度が低い場合には Dowex 50 (H^+ 型) カラムを併用することにより、HPLC による分離を改善したり、カラムの洗浄時間を短くできることがわかった。

今回著者らはダイズ未熟種子について ABA の同定と定量を行ったが、LC/MS を利用して同様な確認を行えば、他の植物器官における ABA の同定並びに濃度の測

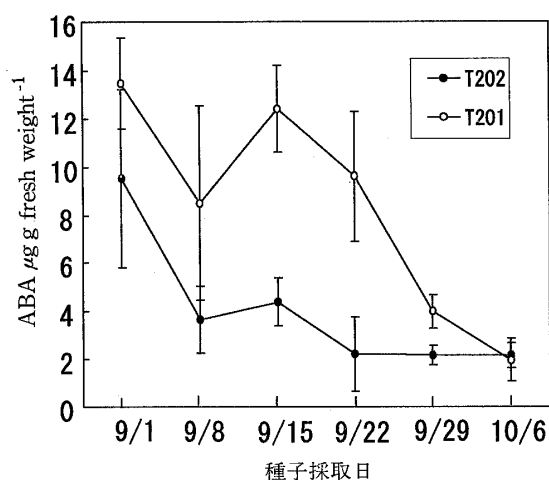


第 6 図 263 m/z のマスクロマトグラムから推定したダイズ試料のアブシジン酸濃度と、紫外部 (OD_{260}) 吸収から推定したアブシジン酸濃度との比較



第 7 図 Shodex SIL-5B と NH pak J-411 を用いたアブシジン酸の紫外部 (OD_{260}) 吸収クロマトグラム

SIL-5B (上部パネル) は溶媒としてジクロロメタン:メタノール=90:10 (v:v) を用い、流速 1.4 mL min^{-1} で分離した。NH pak J-411 (下部パネル) は溶媒として 0.2 M 酢酸 0.05 L L^{-1} を含むメタノール溶液を用い、流速 0.6 mL min^{-1} で分離した。



第8図 根粒着生系統 (T 202) と非着生系統 (T 201) ダイズ種子 ABA 濃度の変化

種子は9月1日 (平均種子生体重: T 202 0.111 g, T 201 0.035 mg), 9月8日 (T 202 0.213 g, T 201 0.099 g), 9月15日 (T 202 0.237 g, T 201 0.101 g), 9月22日 (T 202 0.280 g, T 201 0.127 g), 9月29日 (T 202 0.290 g, T 201 0.174 g), 10月6日 (T 202 0.261 g, T 201 0.157 g) に採取した。

定も可能である。

5) ダイズ種子中 ABA 濃度の時期別変化

第8図に圃場で栽培した根粒着生系統ダイズ T 202 と根粒非着生系統ダイズ T 201 の種子中の ABA 濃度の変化を示す。根粒着生系統の T 202 では、種子内 ABA 濃度は9月1日に最も高い値を示し、その後登熟に伴い減少した。この結果は、これまで報告されているダイズ種子 ABA 濃度の登熟期間中の変化と一致している^{1,8)}。一方、根粒非着生系統の T 201 では9月8日から9月29日まで T 202 よりも高い値を示し、9月15日に最大となり、その後減少して、10月6日には T 202 と同様のレベルとなった。

これまで著者らは新潟県農業試験場の水田転換畑で生育した根粒非着生系統ダイズは着生系統と比較して種子窒素濃度が低く、種子貯蔵タンパクの一つβ-コングリシニンのβ-サブユニット集積が抑制されることを報告した⁶⁾。その後の研究により、β-サブユニットの集積は根粒着生の有無よりも、窒素の供給量により調節されていることが分かった⁷⁾。T 201 で ABA 濃度が高く維持

されているのに対し、T 202 では低くなるという本実験結果は、種子の内生 ABA 濃度によりβ-サブユニットの集積が調節されている可能性を示唆しており、興味深い。BRAY and BEACHY²⁾ は本実験結果とは反対に、ダイズ未熟種子を *in vitro* 培養する際に ABA を与えるとβ-サブユニット集積が上昇したことを報告している。内生 ABA と外部から添加した ABA とは生理的役割に違いがあるのかもしれない。ダイズ種子における ABA レベルと、窒素栄養や、β-サブユニット集積との関連は今後の研究課題である。

謝辞 LC/MS システムによる分析に御助言を頂いた新潟大学農学部内山武夫教授ならびに試料採取に御協力頂いた新潟県農業試験場高橋能彦博士に謝意を表します。

文 献

- 1) ACKERSON, R. C.: Regulation of soybean embryogenesis by abscisic acid. *J. Exp. Bot.*, **34**, 414~421 (1984)
- 2) BRAY, E. A. and BEACHY, R. N.: Regulation by ABA of β-conglycinin expression in cultured developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.*, **79**, 746~750 (1985)
- 3) DJILIANOV, D., GERRITS, M. M., IVANOVA, A., van ONCKELEN, H. A. and de KLERK, G. J. M.: ABA content and sensitivity during the development of dormancy in lily bulblets regenerated *in vitro*. *Physiol. Plant.*, **91**, 639~644 (1994)
- 4) 北條良夫・石塚潤爾 編：最新作物生理実験法, p. 265~269, 農業技術協会, 東京 (1985)
- 5) LEWIS, R. W. and VISSCHER, S. N.: A simplified purification method for analysis of abscisic acid. *Plant Growth Reg.*, **1**, 25~30 (1982)
- 6) OHTAKE, N., NISHIWAKI, T., MIZUKOSHI, K., CHINUSHI, T., TAKAHASHI, Y. and OHYAMA, T.: Lack of β-conglycinin in non-nodulating isolines of soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **40**, 345~349 (1994)
- 7) OHTAKE, N., SUZUKI, M., TAKAHASHI, Y., FUJIWARA, T., CHINO, M., IKARASHI, T. and OHYAMA, T.: Differential expression of β-conglycinin genes in nodulated and non-nodulated isolines of soybean. *Physiol. Plant.*, **96**, 101~110 (1996)
- 8) SCHUSSLER, J. R., BRENNER, M. L. and BRUN, W. A.: Abscisic acid and its relationship to seed filling in soybeans. *Plant Physiol.*, **76**, 301~306 (1984)
- 9) 高橋信孝・増田芳雄 共編：植物ホルモンハンドブック [下], p. 1~160, 培風館, 東京 (1994)

Identification of Abscisic Acid by LC/MS System and Rapid Determination of the Abscisic Acid Concentration in Soybean Seeds Using High Performance Liquid Chromatography

Norikuni OHTAKE, Shinya YAMADA and Takuji OHYAMA
(*Fac. Agric., Niigata Univ.*)

Abscisic acid (ABA) is one of the photohormones related to plant metabolism, development and senescence. For determination of ABA, tritium- or deuterium-labeled ABA has been used as an internal standard, because incomplete recovery was expected in the extraction and purification procedures. The simple purification method was applied for the determination of ABA concentration in soybean seeds without any internal standard.

The soybean seeds were extracted with methanol including 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-crezol as an anti-oxidant. After methanol was evaporated to dryness, the residue was redissolved in water, and the impurities in the solution were removed by mini column of octadecylsilane (C18). The ABA was quantitatively recovered from the column and ABA gave a single UV peak by high performance liquid chromatography with a SIL 5-B column. The identification of ABA was done by a liquid chromatography/mass spectrometer (LC/MS) system. The mass spectrum of standard ABA and the peak with the same retention time from soybean seeds gave the similar fragmentation patterns with various voltages of ionization. Also, the values obtained by mass spectrum with 263 *m/z*, a major peak of ABA and those by UV absorbancy, showed the same concentrations. UV spectrum of standard ABA and isolated ABA fraction from LC showed the same curve.

From these results, the ABA concentration in soybean seeds can be analyzed simply by partial purification with a C18 mini-column and analyzed by HPLC with UV detector without an internal standard. The LC/MS system is very useful to identify the LC peak and to detect impurities in the ABA fraction.

ABA concentration change in seeds was compared in two isogenic lines, nodulated T202 and non-nodulated T201, grown in a rotated paddy field of Niigata Agricultural Station during seed development. In the early stage of seeds development (September 1, 1993), the ABA concentration of T202 seeds was initially higher and then decreased, while that of T201 seeds remained high in the middle stage of seeds development (September 22, 1993). The differential changes in the ABA concentration of seeds may influence nitrogen nutrition of plants or seed storage protein accumulation.

Key words abscisic acid, LC/MS system, soybean seed

(*Jpn. J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 68, 52-58, 1997)