

解 説

ミジンコ 1 匹中に含まれる脂質成分の高感度精密分析法の開発

石田康行

中部大学応用生物学部

要 旨

生態学の分野では、同種のプランクトン類の個体間での多様性や、その生活史を詳細に調べるために、動物プランクトン中に含まれる脂質成分の含有量や脂肪酸組成を、個体ごとに解析する手法の開発が渴望されてきた。こうした中で、筆者らの研究グループは、有機アルカリ共存下での反応熱分解ガスクロマトグラフィー（反応熱分解 GC）や、固体試料調製法を採り入れたマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）などの手法により、代表的な動物プランクトンであるミジンコ 1 個体中に含まれる脂質成分を分析する実用分析法を開発した。これらの方法により、乾燥重量が数十 μg とごく微量であるミジンコ中に含有される脂質成分の分子構造や脂肪酸組成を、煩雑な試料前処理を用いずに、1 匹ごとに高感度解析することを可能にした。ここでは、それらの研究例として、1) 反応熱分解 GC によるミジンコ個体中の脂肪酸成分の高感度検出、2) ミジンコ中の多価不飽和脂肪酸を含む全脂肪酸成分の迅速定量、3) ミジンコの脂質代謝の個体レベルでの解析、および 4) MALDI-MS によるミジンコ 1 個体中の脂質分析を行った内容について概説する。

1. はじめに

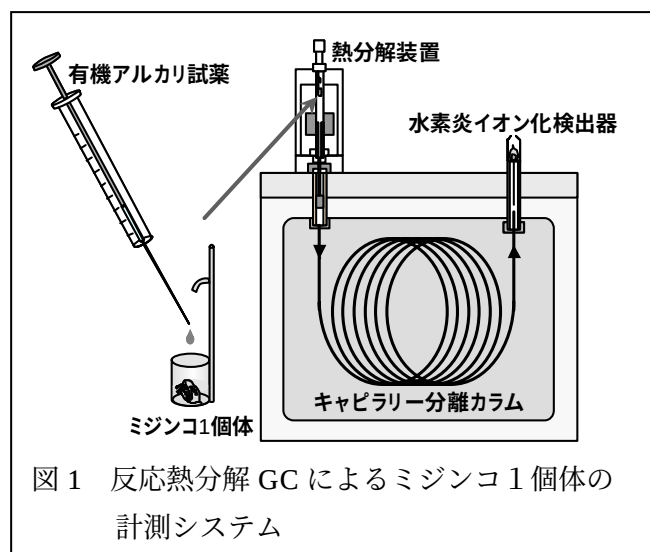
近年、環境水中に棲息する同種のプランクトンの個体間での多様性や、その生活史を詳細に調べるために、プランクトン中に含まれる脂質成分の含有量や組成を個別に解析する手法の開発が生態学などの分野において渴望されている。一般に、プランクトン類に含まれる脂質成分の分析には、1) 含有される脂質成分の溶媒抽出操作、および 2) 抽出した脂質の加水分解や誘導体化などの試料前処理操作を行った後に、諸クロマトグラフィー計測を利用する方法が汎用されている。しかしながら、これらの分析法では、比較的、煩雑な試料前処理操作を要することに加えて、溶媒抽出操作の際に、少なくとも mg 単位の試料量が必要となることが問題点として指摘されている。従って、個体ごとの乾燥重量が数～数十 μg 程度しかない、極めて微小なプランクトン類については、それらに含有される脂質成分の分析を 1 匹ごとに行うことはほとんど不可能であった。

こうした中で、筆者らの研究グループは、有機アルカリ共存下での化学反応場とガスクロマトグラフィー（GC）を結合した反応熱分解 GC により、試料分子中にエステル

結合を有する、様々な縮合系高分子の詳細な分子構造解析を行ってきた。また、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）のための新規試料調製法の開発を通じて、様々な高分子材料中に含まれる添加剤の直接 MALDI-MS 測定を可能にしてきた。これらの計測法を発展的に応用することにより、動物プランクトンの一種であるミジンコ 1 個体中に含まれる脂質成分の分子構造や、それらを構成する脂肪酸成分の化学組成を詳細に解析することに成功した。さらに、得られた知見を基にして、脂質成分の組成や存在状態と、ミジンコの棲息環境や生育条件との相関を解析することを可能にした。本稿では、その大要を解説する。

2. 反応熱分解 GC によるミジンコ個体中の脂肪酸成分の高感度分析

近年、有機アルカリの一種である水酸化テトラメチルアンモニウム $[(\text{CH}_3)_4\text{NOH}]$ （TMAH）を化学試薬に用いた反応熱分解 GC が、縮合系高分子材料などの実用性の高い解析手法として注目されている（Challinor, 2001; 石田ら, 1998）。この方法では、反応熱分解に際して、



TMAH 試薬の作用により、試料分子中に含まれるエステル結合が、瞬時に加水分解されると同時に、分解生成物のメチル誘導体化が高效率に達成される。こうして生じた分解物はオンラインで GC 測定され、その結果得られるクロマトグラムから、もとのポリマー試料の共重合組成や末端基濃度などの解析を行うことが可能となる。そこで筆者らは、まずこの手法により、ミジンコ個体中の脂質成分を構成する、脂肪酸成分の化学組成を高感度に分析することを試みた。図1に、実験で用いた反応熱分解 GC の測定システムを示す。ここでは、微量天秤を用いて1匹のカブトミジンコ (*Daphnia galeata*) 試料 (20~40 µg) を白金製の試料ホルダーに秤取し、そこへ反応試薬である TMAH 溶液を添加した後、400℃に保持した加熱炉型熱分解装置の炉心へと落下導入した。その

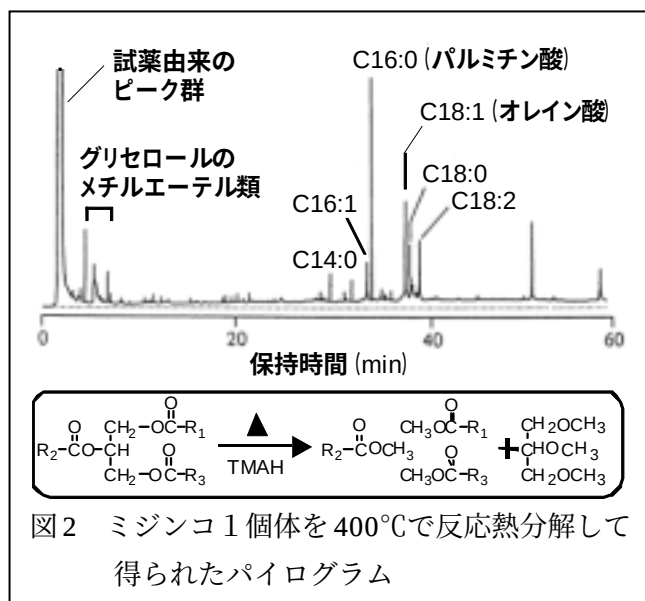
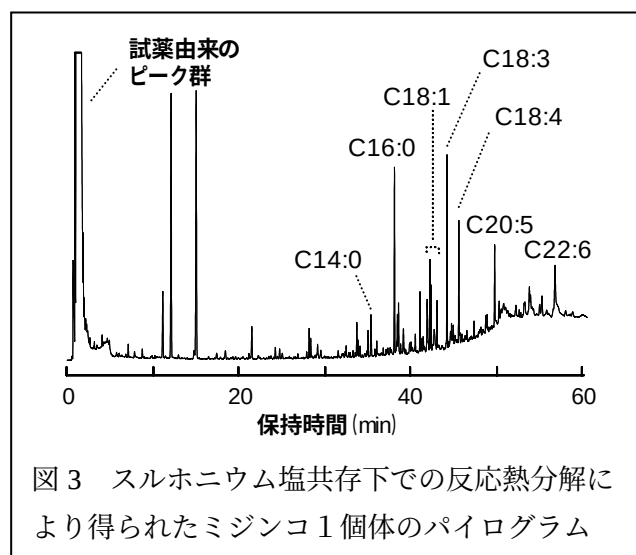


図2 ミジンコ 1 個体を 400℃で反応熱分解して得られたパイログラム

結果、得られたミジンコ試料の典型的なクロマトグラムを図2に示す。この図に見られるように、クロマトグラム上には、ミジンコ中の脂質を構成する炭素数 14~18 の一連の脂肪酸成分が、それらのメチルエステルとして明瞭に観測された。さらに、これらのピーク面積を基にして、µg オーダーの乾燥重量しかもたないミジンコ1匹中に含まれる脂肪酸成分の化学組成を、迅速かつ高精度に解析することもできた (Ishida et al., 1996)。

3. ミジンコ中の多不飽和脂肪酸を含む全脂肪酸成分の迅速定量

上述した反応熱分解 GC による脂質分析の方法では、反応分解の際に TMAH により誘起される不飽和成分の異性化が関与するために、多不飽和脂肪酸成分の正確な定量が困難であるという問題が残されていた。これに対して筆者らは、脂肪酸メチルエステルへの反応分解が TMAH よりも低温で進行する、水酸化トリメチルスルホニウム[(CH₃)₃SOH; TMSH]を反応試薬として用いることにより、天然油などの脂質試料中に含まれる多不飽和脂肪酸類についても、それらの異性化を抑制してほぼ定量的に観測できることを見出した (Ishida et al., 1999; Okuyama et al., 2002)。



そこで、TMSH 共存下での反応熱分解 GC をミジンコの1個体分析に応用した。その結果得られた、ミジンコ試料の典型的なクロマトグラムを図3に示す。このクロマトグラム上には、熱的に不安定なエイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5) やドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6) な

どの、不飽和結合数が 5~6 に及ぶ多価不飽和脂肪酸を含む、一連の脂肪酸成分がそれらのメチルエステルとしてはっきりと観測された。これらのピーク強度から求めた、各種脂肪酸成分の定量値は、溶媒抽出やオフラインでの化学反応を併用する従来法によって得られた値と極めて良い一致を示した。さらに、反応熱分解 GC による定量結果の再現性は、相対標準偏差で 5% 以下とかなり良好であり、本法により、ミジンコ中の多不飽和成分を含む全脂肪酸を、正確かつ高精度に定量することができた (Nakanishi et al, 2003)。

4. ミジンコの脂質代謝の個体レベルでの解析

筆者らは、こうして開発した反応熱分解 GC の手法を用いて、京都大学生態学研究センターとの共同研究により、琵琶湖の異なる水深において採取した天然のミジンコ類 (Sekino et al., 1997) や、飼料濃度が極端に異なる状態で飼育され、貯蔵脂質量の異なることが予想されるミジンコ類 (石田, 2003) などの脂質成分を個体ごとに解析してきた。ここでは、一例として、ミジンコ個体の脂肪酸分布と、そのミジンコが摂取した植物プランクトンの脂肪酸分布との相関を解析した結果を紹介する。

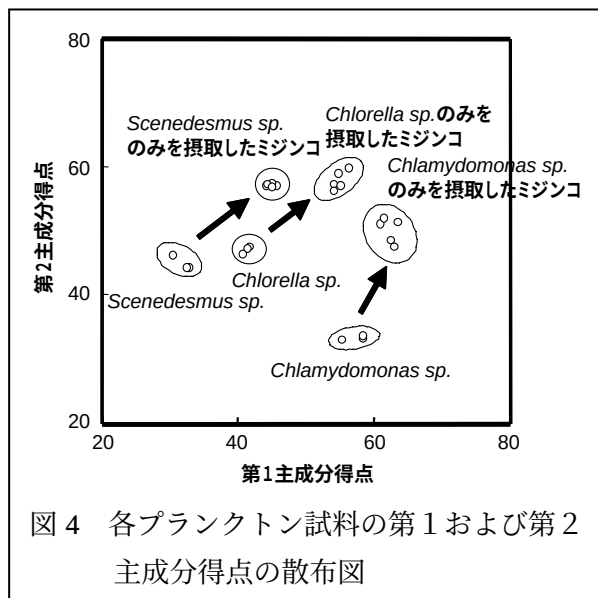


図 4 各プランクトン試料の第 1 および第 2 主成分得点の散布図

ここでは、相関関係を視覚化するため、反応熱分解 GC から得られた各試料の脂肪酸組成のデータを、多変量解析法の一手法である主成分分析法により、2 次元の情報 (第 1 および第 2 主成分得点) に要約する方策を採った。図 4 に、代表的な 3 種類の植物プランクトンと、その

いずれかを飼料に用いて飼育したミジンコについてそれぞれ得られた、第 1 および第 2 主成分得点の散布図を示す。この図において、ミジンコ試料の各プロットは、餌の種類ごとに明瞭に 3 グループに分類されている。このことは、当該研究で用いたミジンコ試料の脂肪酸組成は、餌として与えた植物プランクトンの脂肪酸組成をかなりよく反映していることを示しており、ミジンコの脂質代謝に関する知見を個体レベルで得ることができた (Ishida et al., 1998)。

5. MALDI-MS によるミジンコ 1 個体中の脂質分析

反応熱分解 GC により、ミジンコ 1 個体中に含まれる脂質の脂肪酸組成を解析することが可能となったが、この方法ではもとの脂質成分の分解が不可避であるため、脂質分子そのものの直接的な情報を得ることはできない。

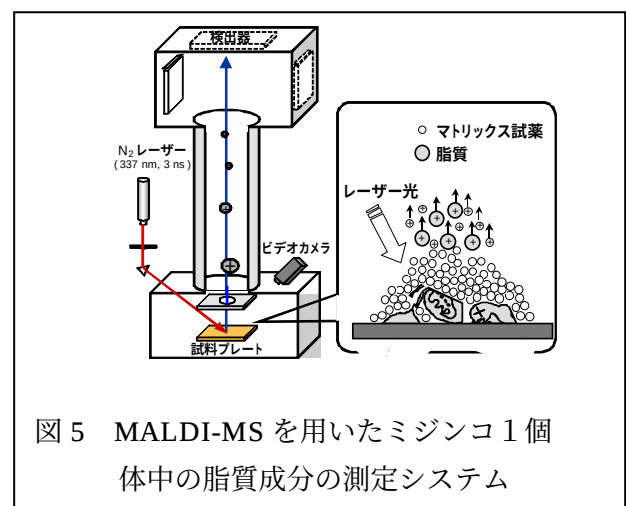
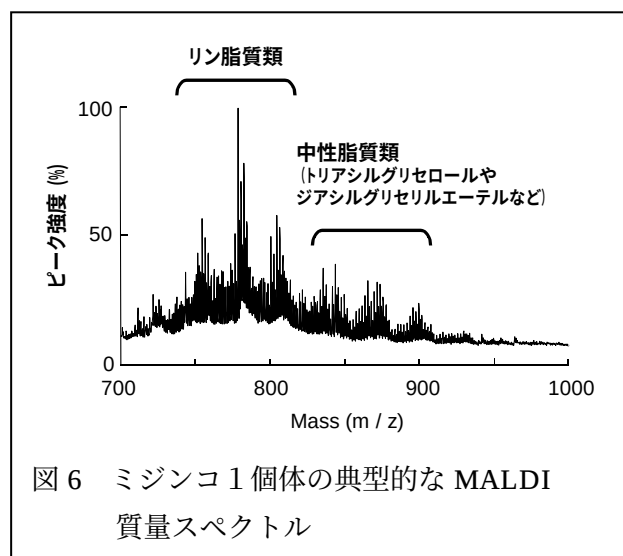


図 5 MALDI-MS を用いたミジンコ 1 個体中の脂質成分の測定システム

そこで筆者らは、固体試料調製法を取り入れたマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (MALDI-MS) により、ミジンコ 1 匹中の脂質成分をそのまま直接測定することを試みた。ここでは、ミジンコ 1 匹をステンレス製の試料プレート上に直接設置し、ピンセットを用いて試料を数片に解体してから、イオン化に作用するマトリックス試薬やイオン化助剤などの各種の試薬溶液を順次加える手法を用いた。こうした試料調製を施した後、溶媒を乾燥除去し、図 5 に示す N₂ レーザーを備えた飛行時間型質量分析計を用いて MALDI-MS 測定を行った。

図 6 に、上記の固体試料調製法を採り入れた

MALDI-MS により得られた、ミジンコ試料の質量スペクトルを示す。このスペクトル上には、ミジンコ1個体中に細胞膜の構成脂質として含まれるリン脂質類と、貯蔵脂質として含有される中性脂質類を区別して、質量スペクトル上に同時に観測された (Ishida et al., 2003)。本法は、ミジンコ1個体中の脂質成分の存在状態をそのまま解析できることから、今後、生態学の分野で重要な役割を果たし得るものと期待される。



6. おわりに

以上のように、反応熱分解 GC および MALDI-MS の手法により、ミジンコのように1匹の乾燥重量が μg オーダーと極微量である、動物プランクトン個体中の脂質類を高感度かつ迅速に解析することのできる新しい分析法を開発した。これらの手法は、動物プランクトン個体の脂質代謝や生活史などを解析する、主に生態学の領域で実用分析法として実際に活用され始めている。

今後、本法により得られるプランクトン個体中の脂質の存在量や存在状態と、そのプランクトンのサイズや成長速度とを関連付けることにより、プランクトンの生命活動において各種の脂質成分が果たす役割が明らかになることが期待される。

また、地球化学の分野では、水圏における物質循環の解明を目的として、プランクトン類や藻類を始めとする微生物類や、沈降粒子などに含まれる有機物の分析がよく行われている。しかし、それらの分析に一般に利用されている諸クロマトグラフィーの方法では、少なくとも mg 単

位の試料を必要とする溶媒抽出操作が不可欠であり、当該量の試料を得るために場合によっては1ヶ月に及ぶ採取期間を要することも珍しくない。そのため、プランクトンを含めた水圏の物質循環を、豪雨や赤潮の発生といった比較的短期間での環境変化と関連付けて解析することは現状では必ずしも容易ではない。これに対して本稿で紹介した方法では、短期間で採取可能な極微量の試料を用いた高感度迅速測定が可能である。従って、これらの手法を各種の水圏有機物の分析に発展的に応用することにより、水圏における物質循環の解析における時間分解能が飛躍的に向上することも期待される。

引用文献

- 石田康行, 大谷 肇, 柘植 新. 1998. 反応熱分解ガスクロマトグラフィーによる合成高分子及び天然有機物のキャラクタリゼーション. 分析化学. 47: 673-688.
- 石田康行. 2003. ミジンコの履歴書を作る (動物プランクトン1個体中に含まれる脂質の迅速分析法の開発とその応用). 化学と工業「化学のフロンティア」. 56: 97-100.
- Challinor, J. M. 2001. Review: the development and applications of thermally assisted hydrolysis and methylation reactions. J. Anal. Appl. Pyrolysis 61: 3-34.
- Ishida, Y., Isomura, S., Tsuge, S., Ohtani, H., Sekino, T., Nakanishi, M., Kimoto, T. 1996. Discriminative Analysis of Zooplankton Individual by Reactive Pyrolysis-Gas Chromatography in the Presence of Organic Alkali. Analyst. 121: 853-856.
- Ishida, Y., Yokoi, H., Isomura, S., Ohtani, H., Tsuge, S., Sekino, T., Nakanishi, M., Kimoto, T. 1998. Correlation Analysis between Fatty Acid Compositions of Zooplankter Individuals, Fed on Different Phytoplankton Species by Mean of

Pyrolysis-Gas Chromatography Combined with On-line Methylation. J. Chromatogr. B. 716: 39-45.

in a single zooplankter

Author(s) : Yasuyuki Ishida

Address(es) : 1) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

Keywords : Fatty acid component, Lipid, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, Thermally-assisted hydrolysis and methylation-GC, Zooplankton

Ishida, Y., Wakamatsu, S., Ohtani, H., Tsuge, S. 1999. Compositional Analysis of Polyunsaturated Fatty Acid Oil by One-Step Pyrolysis in the Presence of Trimethylsulfonium Hydroxide. J. Anal. Appl. Pyrolysis. 49: 267-276.

Ishida, Y., Nakanishi, O., Hirao, S., Ohtani, H., Tsuge, S., Urabe, J., Sekino, T., Nakanishi, M., Kimoto, T. 2003. Direct Analysis of Lipids in Single Zooplankter Individuals by Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry. Anal. Chem. 75: 4515-4518.

Nakanishi, O., Hirao, S., Ishida, Y., Ohtani, H., Tsuge, S., Urabe, J., Sekino, T., Nakanishi, M., Kimoto, T. 2003. Highly Sensitive Determination of Lipid Components Including Polyunsaturated Fatty Acids in Individual Zooplankters by One-Step Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography in the Presence of Trimethylsulfonium Hydroxide. J. Anal. Appl. Pyrolysis. 68-69: 187-195.

Okuyama, S., Mitsui, T., Ishida, Ohtani, H., Tsuge, S. 2002. Discriminative Analysis of Denatured Vegetable Oils by Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation-Gas Chromatography Combined with Multivariate Analysis. J. Anal. Appl. Pyrolysis. 64: 187-196.

Sekino, T., Nakanishi, M., Ishida, Y., Isomura, S., Tsuge, S., Ohtani, H., Kimoto, T. 1997. Inter- and Intraspecific Differences in Fatty Acid Composition of Freshwater Crustacean Zooplankton. Freshwater Biol. 38: 611-618.

Title : Highly sensitive analysis of lipid components

Summary

Highly sensitive analysis of lipid components in a single zooplankter

Yasuyuki Ishida

1) College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University.

In recent years, it is of interest to determine fatty acid compositions of each single zooplankter in order to consider its metabolism and life history in terms of inter-individual differences. The authors have developed the practical method to analyze the lipid components contained in a single zooplankter by means of thermally-assisted hydrolysis and methylation-gas chromatography (THM-GC) and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) combined with a solid sample preparation. In this paper, typical applications of these methods to highly-sensitive determination of fatty acid components in a single zooplankter are overviewed. These applications include; 1) highly sensitive detection of fatty acid components in a single zooplankter by THM-GC in the presence of an organic alkali; 2) determination of fatty acid components including polyunsaturated fatty acids in a single zooplankter; 3) correlation analysis between fatty acid compositions of zooplankter individuals, fed on different phytoplankton species; and 4) lipid analysis of a single zooplankter by MALDI-MS combined with the solid sample preparation.