

令和元年6月10日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05355

研究課題名(和文) 必須脂肪酸と必須アミノ酸の安定同位体比を利用した動物プランクトンの餌資源の解析

研究課題名(英文) Analysis of zooplankton food resources using stable isotope ratios of essential fatty acids and amino acids

研究代表者

山本 修一 (Yamamoto, Shuichi)

創価大学・理工学部・教授

研究者番号：20182628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：動物プランクトンの餌資源を推定するために、簡便かつ少量の試料で必須脂肪酸(多不飽和脂肪酸)の分子レベルでの炭素安定同位体比分析を可能にする方法を確立することを目的とした。その結果、第一に期待されたTMAH-GCMS法では多不飽和脂肪酸の分析はできないことが明らかになった。そこで次にTMSH-GCMS法をOnline法およびInjector法で検討した結果、従来から行われてきた溶媒抽出法による多不飽和脂肪酸と同程度の分析が遜色なく行えることが分かった。特に、可動式のInjector-TMSH法は多不飽和脂肪酸の炭素安定同位体比の測定に最も適した方法と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サンゴ礁の動物プランクトンを中心とした食物網を明らかにすることは、サンゴ礁を破壊するオニヒトデの成長を阻害する方法を考えるうえでも重要である。本研究では、動物プランクトンの餌資源を推定する第一歩として、必須脂肪酸の分子レベルでの炭素安定同位体比測定を簡便かつ少量の試料で分析できる方法の基礎的な検討を行い、Injector-TMSH法として確立した。

研究成果の概要(英文)：In order to estimate zooplankton food resources, we aimed to establish a simply method which enables analyses for compound specific stable carbon isotope ratios of essential fatty acids (polyunsaturated fatty acids) using small amounts of samples. However, unfortunately, it became clear that analysis of polyunsaturated fatty acids cannot be performed by the expected TMAH-GCMS method. As the next examination, TMSH-GCMS method was examined with Online and Injector methods. Consequently, it has been found that the TMSH method can sufficiently perform an analysis of polyunsaturated fatty acids with the same degree as the conventional method by the solvent extraction. In particular, the mobile Injector-TMSH method is considered to be the most suitable method for measuring the carbon stable isotope ratio of polyunsaturated fatty acids.

研究分野：有機地球化学、生物地球化学

キーワード：炭素・窒素安定同位体比 必須脂肪酸 多不飽和脂肪酸 動物プランクトンの餌資源

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

栄養塩に乏しい熱帯・亜熱帯域に分布するサンゴ礁では、食物連鎖の起点である植物プランクトンの一次生産量が少ないにも関わらず、動物プランクトンを含む高次栄養段階の生産量が非常に高いという、栄養構造上の未解決の課題（Darwin's Paradox）がある。その課題を解決するためにはまず動物プランクトンの食物網を解析する必要がある。

動物の体内で合成できない典型的な化合物として必須アミノ酸や必須脂肪酸（多不飽和脂肪酸：PUFA）が知られている。フェニルアラニンなどの必須アミノ酸やエイコサペンタエン酸などのPUFAは、動物プランクトンの体内で合成できない化合物で、いずれも餌資源から直接引き継がれるものである。しかし動物プランクトン中に含まれるこれらのアミノ酸や脂肪酸を分析するだけでは、その起源を特定することはできない。これらの化合物の窒素同位体比や炭素同位体比は、餌資源から引き継がれている、いわばこれらの化合物のラベルであり、これらの同位体比を求めることで、餌資源をある程度特定できると考えられる。これまでアミノ酸の窒素同位体比を分析する技術はすでに可能になっているが、PUFAの炭素同位体比を測定する簡便な方法はこれまで確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、動物プランクトンの食物網を明らかにするために、まず①動物プランクトン中のPUFAの炭素同位体比を分析する方法を確立し、②特定の植物プランクトンで培養した動物プランクトン中のPUFAの炭素安定同位体比と必須アミノ酸の窒素安定同位体比から、餌資源を特定する指標を確立することである。基本的にはできるだけ簡便な方法で、かつ少量の試料量で分析できる方法を確立することが重要になる。

3. 研究の方法

本研究では、簡便なPUFAを含む脂肪酸分析法の確立が第一の目標である。

(1) PUFAの分析方法の検討—1：溶媒抽出法とTMAH法（水酸化テトラメチルアンモニウムを試料に添加して、加熱することで、加水分解と同時にメチル誘導体化をする方法）

従来から行われている溶媒抽出による脂肪酸分析法を2種—ケン化抽出法および溶媒抽出法、簡便な分析法として従来から本研究で長年検討を重ねてきたTMAH法を検討する。

しかしながら、TMAH法ではPUFAの分析できないことが明らかになったことから、次の段階として、TMSH法の検討を行うことにした。

(2) PUFAの分析方法の検討—2：溶媒抽出法とTMSH法（水酸化トリメチルスルホニウムを試料に添加して、加熱することで、TMAH法と同様に加水分解と同時にメチル誘導体化をする方法）

(3) 簡便な方法としてPUFAを含む脂肪酸分析法を確立した後に、分子レベルでの脂肪酸分析法を検討し、動物プランクトンや他の試料に対する分析方法を確立する。

(4) アミノ酸の分子レベルでの窒素同位体比測定の組み合わせにより、本研究の最終的な目標を達成する予定であったが、ガスクロマトグラフ・安定同位体比質量分析計(GC/IRMS)のトラブルおよびキャリアーガスのヘリウムが入手困難になり研究方法(3)の段階で研究遂行が困難になった。

4. 研究成果

(1) PUFAの分析方法の検討—1：溶媒抽出法とTMAH法

従来から行われている溶媒抽出による脂肪酸分析法を2種—ケン化抽出法および溶媒抽出

法、簡便な分析法として従来から本研究で長年検討を重ねてきた TMAH 法を検討した。

①溶媒抽出法 1—ケン化抽出法

試料を 0.5N 水酸化カリウム-メタノール/5%水、80°C、3 時間環流によりケン化後、ヘキサン/ジエチルエーテル(9:1)による中性成分および酸性成分の溶媒抽出、トリメチルシリル化剤による TMS 化、あるいは BF₃/MeOH によるメチル化を行った。

②溶媒抽出法 2—有機溶媒による超音波抽出法

有機溶媒としてクロロホルム/メタノール/水 (1:1:1) を用い、超音波抽出 (50Hz、5 分、3 回) した後、内部標準を加え、BF₃/MeOH 法によりトランスメチレーションを行った。

③TMAH 法 1 -Online-TMAH 法

TMAH 法は内部標準とともに水酸化テトラメチルアンモニウム (TMAH) を試料に添加し加熱することで、エステル結合やエーテル結合を加水分解し、同時に生成物のメチル化を行う方法 (熱化学反応) である。この方法には GC-MS 装置に直結した熱分解装置 (日本分析工業製 キュリーポイントパイロライザー JHP-3 型) 内で熱化学反応を行い、生成物を直接 GC-MS 装置に導入、分析する Online-TMAH 法とガラスサンプル管を用いて熱化学反応を行い、有機溶媒による抽出後、GC-MS 分析を行う Offline-TMAH 法がある。Online 法では反応生成物を全量 GC-MS に導入することから、GC-MS 分析に要する 1 回分の試料を用いることから、極めて少量の試料で分析できること、また試料の加熱はキュリーポイント法によるため加熱温度を Fe, Ni などの強磁性体の混合比を変えることでさまざまな温度のパイロヒールを使用できることが大きな特徴である。実際には、販売しているパイロヒールを利用するため、280, 315, 358, 445, 500, 590, 670°C のものを用いた。本研究では簡便な脂肪酸分析法を求めていることから、Online-TMAH 法を用いて検討した。

④TMAH 法 2 -Injector-TMAH 法

Injector-TMAH 法では、今回新たに導入した Injector 方式の熱分解装置 (日本分析工業製 キュリーポイントインジェクター JCI-55) を用いる方法である。Injector 方式の熱分解装置は持ち運びが可能であり、GC-MS 装置への試料の導入は Injector のシリンジを通して行われる。原理的には Online 方式の TMAH 法と同様である。

植物プランクトン (*Thalassiosira* sp.、*Isochrysis* sp. など)、や様々な堆積物試料を用いて、脂肪酸分析の方法の検討をおこなった。Fig. 1 に代表的な結果を示したように、明確になったことは TMAH 法では PUFA の分析はできないことであった。

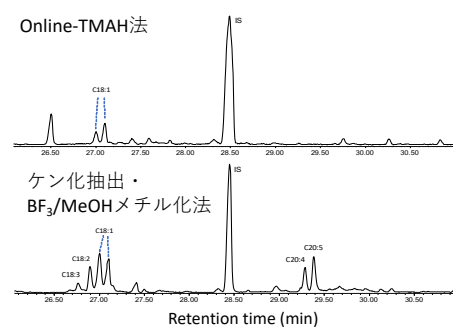


Fig. 1 堆積物試料 (谷津干潟) を用いたケン化抽出法と Online-TMAH 法の脂肪酸分析の比較

(2) PUFA の分析方法の検討—2 : 溶媒抽出法と TMSH 法

簡便な方法で PUFA を分析できる方法を種々検討した結果、TMSH 法を検討することにした。TMSH 法は、TMAH 法と同様に、試料に水酸化トリメチルスルホニウム (TMSH) を添加し、加熱することで、加水分解と同時に生成物のメチル化を行う方法である。この方法は、これまで PUFA 分析法としては詳細な検討は行われていないことから、基礎的な条件から検討することにした。

①TMSH 法による生成物と加熱温度の検討

②加熱方式の検討—Online 方式および Injector 方式の検討

③溶媒抽出法との比較

① Fig. 2 に Online-TMSH 法の条件を変えた PUFA の分析結果を示す。用いた試料は *Isochrysis* sp.、加熱温度は 280~670°C、加熱時間を 5, 10, 15 秒と変化させた。Fig. 2 に示したように、TMSH 法では TMAH 法と異なり PUFA の分析が可能であること、また PUFAs の総量は、加熱温度が 280~358°C で高く、445°C 以上では生成量は少ないことを示している。また 358°C、15 秒において PUFA の総量が最も高くなった。これらの結果は、TMSH 法では TMAH 法と異なり PUFA の分析が可能であること、また最適な加熱温度は 358°C、15 秒であることがわかった。

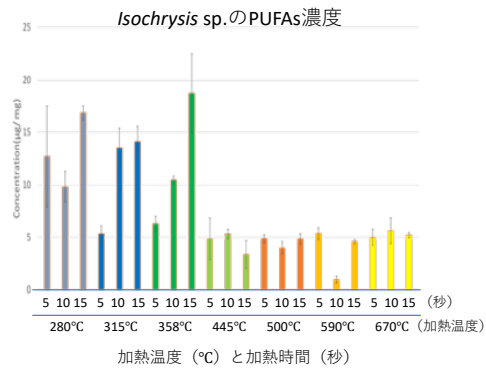


Fig. 2 植物プランクトン (*Isochrysis* sp.) を用いた Online-TMSH 法の条件検討結果

② Online-TMSH 法と Injector-TMSH 法の比較検討、また③溶媒抽出法 1 や溶媒抽出法 2 と TMSH 法との比較検討を行った。Fig. 3 に *Thalassiosira* sp. を用いて、有機溶媒抽出法 2、Online-TMAH 法、Online-TMSH 法および Injector-TMSH 法 (358°C、15 秒) における比較の結果を、また Fig. 4 に *Thalassiosira* sp. を用いた溶媒抽出法 1、溶媒抽出法 2 と Online-TMSH 法における比較の結果を示した。

上記および Fig. 3 に明らかなように TMAH 法では C_{18:1} および C_{18:2} FA の分析はできるが、C_{18:3} FA などの典型的な PUFA は分析できないことを示している。また Online-TMSH 法、Injector-TMSH 法では、溶媒抽出法 2 の結果と概ね一致した結果が得られることを示している。一方、Fig. 4 には、溶媒抽出法 1 および溶媒抽出法 2 と Online-TMSH 法 (358°C、15 秒) の分析結果を TIC クロマトグラムとして表している。いずれの方法においても C_{18:1}、C_{18:2}、C_{18:3}、C_{20:4}、C_{20:5} および C_{22:6} の PUFA が同程度分析できることを示している。

以上のことから、Online-TMSH 法と Injector-TMSH 法では分析結果にほとんど違いはないこと、また本研究に最適な PUFA の分析法は、Injector-TMSH 法で、加熱温度 358°C、加熱時間 15 秒であることを示している。

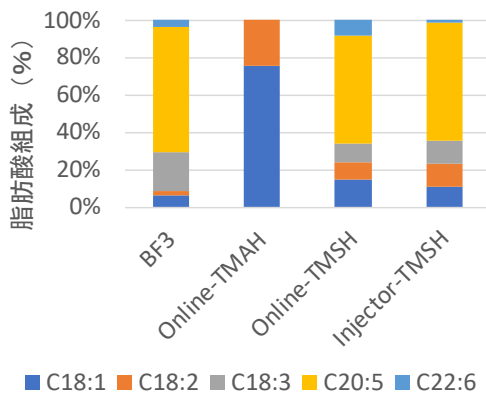


Fig. 3 溶媒抽出法 (クロロフォルム/メタノールによる超音波抽出-BF₃/MeOHによるメチル化)、Online-TMAH法、Online-TMSH法およびInjector-TMSH法による植物プランクトン (*Thalassiosira* sp.) の多不飽和脂肪酸分析の比較

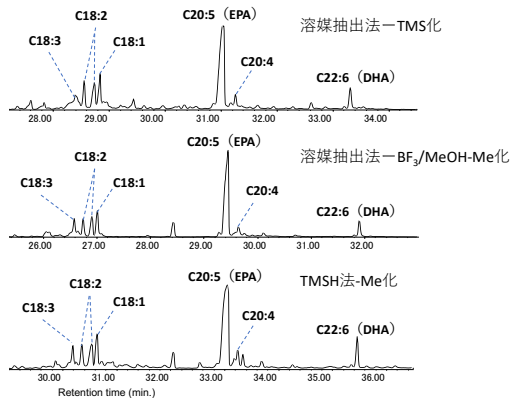


Fig. 4 植物プランクトン (*Thalassiosira* sp.) を用いた溶媒抽出法と Online-TMSH法の比較。溶媒抽出法は、ケン化抽出-TMS化法およびクロロフォルム/メタノールによる超音波抽出-BF₃/MeOHによるメチル化である。

(3) PUFAs 分析法としての Injector-TMSH 法の応用—海水中懸濁態有機物 (POM) とオニヒトデ幼生の分析

Injector-TMSH 法の応用として、海水中植物プランクトンを含む POM および動物プラン

クトンとして人工的に飼育したオニヒトデ幼生 (*Acanthaster planci*) やオニヒトデ雌成体の卵巣の PUFAs を含む脂肪酸の分析を行った。POM は粒径 $<20\ \mu\text{m}$ と $<5\ \mu\text{m}$ 、またこれらに栄養塩を添加して植物プランクトンを増殖したもの、さらにこれら 4 種の POM を餌として培養したオニヒトデ幼生を試料として分析した。

分析結果を Fig. 5 に示したように、主に植物プランクトンからなる POM および動物プランクトンとしてのオニヒトデ幼生の期待された脂肪酸組成を示しており、PUFAs を含む脂肪酸分析が十分に可能なことを示している。

(4) Injector-TMSH 法による PUFAs の炭素同位体比測定の検討

①分子レベルでの炭素安定同位体測定では、GC におけるベースライン分離が要求される。Injector-TMSH 法による PUFAs を含む脂肪酸分析では、Fig. 4 に幾つかの例を示したように、基本的に脂肪酸が優先的に分析され、ほとんど他の化合物が含まれないため概ねベースライン分離が達成できている。

②誘導体化におけるメチル基の導入による同位体効果を、 C_{14} , C_{16} , C_{18} の飽和脂肪酸、 $C_{18:1}$, $C_{18:2}$, $C_{18:3}$, $C_{20:4}$, $C_{20:5}$ の不飽和脂肪酸を用いて検討した。その結果、 C_{16} , $C_{18:3}$ 脂肪酸の同位体効果が他の脂肪酸の同位体効果と異なる値を示したため、今後更なる検討が必要になった。そこで誘導体化に伴う同位体効果の詳細な検討を行っている最中 (2018 年暮れ)、ガスクロマトグラフ燃焼同位体比測定装置 (GC/IRMS) がトラブルに見舞われ、さらにはキャリアーガスとしてのヘリウムガスの入手が困難になったため、残念ながら更なる検討が不可能になった。

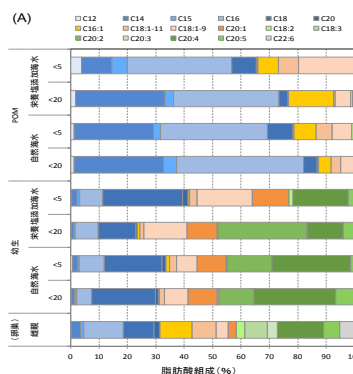


Fig. 5 オニヒトデ雌成体の卵巣、飼育実験におけるオニヒトデ幼生、飼育海水中の POM の脂肪酸組成 (%)

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 17 件)

- ①田所良幸・中富伸幸・中嶋亮太・栗原晴子・岡地賢・山本 修一, 安定同位体比を用いたオニヒトデ幼生の食性解析, 第 35 回有機地球化学シンポジウム, 2017 年 8 月
- ②田所良幸・中富伸幸・樋口純平・岡地賢・山本修一, 安定同位体比を用いたオニヒトデ浮遊幼生期の食性解析, 日本サンゴ礁学会第 20 回大会, 2017 年 11 月
- ③城聖人・樋口純平・田所良幸・中富伸幸・岡地賢・山本修一, オニヒトデの幼生期における飢餓耐性: ブラキオラリア期の場合, 日本サンゴ礁学会第 20 回大会, 2017 年 11 月
- ④樋口純平・城聖人・田所良幸・中富伸幸・岡地賢・山本修一, オニヒトデの幼生期における飢餓耐性: ビピンナリア期の場合, 日本サンゴ礁学会第 20 回大会, 2017 年 11 月
- ⑤角石由美・平原南萌・今野文枝・下出信次・山本修一・戸田龍樹, 相模湾沿岸域における粒状有機物の脂肪酸量の周年変動, 第 1 回海洋生物学シンポジウム, 2017 年 3 月
- ⑥平原南萌・角石由美・今野文枝・下出信次・山本修一・戸田龍樹, 相模湾沿岸域における粒状有機物の脂肪酸組成の周年変動, 第 1 回海洋生物学シンポジウム, 2017 年 3 月
- ⑦ S. Kasai, N. Nakatomi, S. Yamamoto, Characterizing chemical composition of size-fractionated particulate organic matter in a fringing coral reef of Malaysia, 13th International Coral Reef Symposium, June 2016
- ⑧Y. Tadokoro, N. Nakatomi, R. Nakajima, H. Kurihara, K. Okaji, S. Yamamoto, Evaluation of size-fractionated particulate organic matter as a food source for crown-of-thorns starfish larvae,

13th International Coral Reef Symposium, June 2016

⑨N. Nakatomi, Y. Tadokoro, R. Nakajima, H. Kurihara, K. Okaji, S. Yamamoto, Elucidating food sources for larval stage of crown-of-thorns starfish by stable isotope analysis, 13th International Coral Reef Symposium, June 2016

⑩K. Sowa, N. Nakatomi, K. Tanaka, S. Kasai, K.E. Yamaguchi, S. Yamamoto, Pretreatments and analytical protocol for a compound-specific stable isotope analysis of fatty acids in the Porites coral skeleton, Goldschmidt YOKOHAMA 2016, June 2016

⑪ S. Kasai, N. Nakatomi, S. Yamamoto, Characterizing chemical composition of size-fractionated particulate organic matter in the coastal area of distinct climate regions, Biomarkers and Molecular Isotopes, International Workshop of Organic Geochemistry in Osaka, July 2016

⑫田所良幸, 中富伸幸, 中嶋亮太, 栗原晴子, 岡地賢, 山本修一、炭素・窒素安定同位体比分析によるオニヒトデ浮遊幼生期の餌資源の検討, 日本サンゴ礁学会第19回大会, 2016年12月

⑬中富伸幸, 葛西里美, 鴨志田智子, 山本修一, サンゴ礁域における懸濁態有機物(POM)の有機化合物組成の空間的な特徴、第33回日本有機地球化学会シンポジウム, 2015年8月

⑭葛西里美, 鴨志田智子, 中富伸幸, 山本修一、サンゴ礁域におけるPOMの有機物組の特徴づけ、第33回日本有機地球化学会シンポジウム, 2015年8月

⑮中富伸幸, 岨康輝, 田中健太郎, 葛西里美, 山本修一、造礁性サンゴ骨格中脂肪酸の分子レベル炭素安定同位体分析に向けた適切な前処理方法の検討、第62回度日本地球化学会年会, 2015年9月

⑯葛西里美, 中富伸幸, 山本修一、サンゴ礁域におけるPOMの有機物組成の特徴づけ、日本サンゴ礁学会第18回大会, 2015年11月

⑰中富伸幸, 田所良幸, 中嶋亮太, 栗原晴子, 岡地賢, 山本修一、安定同位体比分析による浮遊幼生期の餌資源の解明、日本サンゴ礁学会第18回大会, 2015年11月

〔図書〕(計3件)

①中富伸幸・山本修一(2018)第3章 幼生餌料制限、所収『平成29年度オニヒトデ総合対策事業報告書』p142-190, 沖縄県環境部自然保護課・緑化推進課発刊

②中富伸幸・山本修一(2017)炭素・窒素安定同位体比分析によるオニヒトデ幼生の餌起源の解明、『平成28年度オニヒトデ総合対策事業報告書』p142-190, 沖縄県環境部自然保護・緑化推進課発刊

③中富伸幸・山本修一(2016)炭素・窒素安定同位体比分析によるオニヒトデ幼生の餌起源の解明、『平成27年度オニヒトデ総合対策事業報告書』p150-164, 沖縄県環境部自然保護・緑化推進課発刊