

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20710017

研究課題名（和文） 質量分析を用いた海水中の難分解性多環式化合物定量法開発

研究課題名（英文） Development of Analytical Procedures for Trace-level Determination of Marine DOC by Mass Spectrometry

研究代表者

本郷 やよい (HONGO YAYOI)

独立行政法人理化学研究所・物質構造解析チーム・技師

研究者番号：40435681

研究成果の概要（和文）：

本研究は、LC-ESI-MS法による海水中の葉酸定量法を開発し、濃度減衰要因と葉酸から生じる化合物を探索した。結果、葉酸添加後48時間以降に生じた化合物はNMR、MSによる構造解析を経て主としてパラアミノグルタミン酸 (PAG)であると確認した。従来、葉酸は光により分解消失すると考えられてきたが、本実験では暗条件下で67%の葉酸がPAGに変化しており、海水中の溶存有機化合物消失速度が化合物の化学性に強く依存することを実験的に示した。

研究成果の概要（英文）：

Chemical alteration of a compound should be one of the significant factors on the formation of long-lived marine dissolved organic acid. I investigated the three reaction pathways of marine folic acid that is one of the known natural compounds in seawater. To reveal the degradation rate and detect the newly appeared compounds, a seawater incubation experiment with high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) analysis was applied.

The degradation rate of folic acid in the seawater resembled that in the control buffer, suggesting that the marine bacterial contribution was smaller than that of chemical degradation. Photo-irradiation enhanced the degradation rate in both seawater and control medium. However, after 168 h, 67% of folic acid had decomposed without light and marine bacteria, proving that thermal degradation aside from photolysis is important for folic acid degradation. The chemical instability of folic acid was the most probable factor to control the lifetime in seawater. Accurate mass measurement, MS/MS technique and NMR analysis indicated the newly appeared compound in the incubation media as *p*-aminobenzoylglutamic acid (PAG).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境動態解析

キーワード：LC-ESI-MS、海洋溶存態有機化合物、葉酸

1. 研究開始当初の背景

海水のろ過により懸濁態から分離された有機物全体は溶存有機化合物と呼ばれ全炭素量としての海洋分布が明らかにされてきた。炭素量にして全溶存有機物の約9割に相当する化合物が微生物分解を長期間受けず海洋全体に残存する難分解性画分とされ、その画分の数%が分解すると大気中の二酸化炭素濃度変動に十分寄与しうるとも見積もられている。溶存有機化合物の実態と化学挙動を解明することは海洋地球化学領域の課題解明に留まらず、気候変動予測にとっても不可欠である。

近年は機器分析の技術普及と合わせて複数のグループで溶存有機化合物の分子レベルの構造解明研究が開始されている。しかし、海洋分布が明らかになった溶存有機化合物は未だ数種に過ぎず依然構造未知の化合物が大半を占める。その最大の理由は個々の化合物は強電解質溶液中に低濃度かつ不均一多分散の複雑な混合物として存在し、単離検出が極めて難しい点にある。2007年に海水の325nmの吸収が大西洋では水塊によらずほぼ一定であると報告された。海水中に存在する溶存有機化合物の大部分は1)海洋の光吸収特性を支配し2)生分解され難く長期間海水中に残存する特徴から分子レベルの実体としてペプチドグリカンなどと考えられているものの、全様解明には程遠い。

本研究では生物由来既知化合物を分析対象とし、その海水中での化学変化をLC-ESI-MSを用いて解明することを目的とした。従来、海水中の溶存有機化合物は一定の試料処理後アミノ酸、炭水化物、脂質など混合物として分析され分布や海洋循環過程などの研究が行われていた。一方、有機化合物に対する分析機器の検出感度、分析精度向上に伴い分子構造を推定することによる溶存有機化合物の実態解明研究が今後主流になると想定される。なかでも質量分析法は高い感度と分子選択性があり微量化合物検出定量法として核磁気共鳴法と併せ有力な分子構造推定手段である。本研究では海水中の溶存有機化合物の中から上記1)、2)の性質を有する化合物として葉酸を標品とし、質量分析法による海水中の葉酸定量法、葉酸から生じる化合物を検出、定量する手法を開発する。

2. 研究の目的

本研究の目的は海水中の多環式化合物のうち紫外-可視領域に光吸収特性のある化合物を特定し、質量分析法による化合物検出定量法を開発することである。そ

のためにはまず、すでに海水中の存在が知られている葉酸が海水中でどのような化学変遷を受けるのかを明らかにし、難分解性有機化合物の成因や分解要因を検討した。葉酸は海水中で強い光吸収性を示す化合物であり、過去、吸光分析でおおよその濃度がnMレベルと報告されている。まず、葉酸の海水からの高感度定量法をLC-ESI-MSを用いて開発し、培養海水中の濃度を系時観測できるようにする。同時に、光、溶存酸素、微生物などの条件の異なる培養系での濃度変化を調べ、さらに系内に新たに生じた化合物を追跡し、葉酸の化学変化を追った。

これにより、海水中の有機化合物がどのような過程を経て難分解性有機物となりうるか検討した。

3. 研究の方法

本研究では海水中の溶存有機化合物のモデルとして葉酸を対象とした研究を行った。また、海水中に生じた葉酸分解物を検出し、その構造特定を行った。

低エネルギー衝突誘起解離と同位体ラベル化標準添加を利用した質量分析法で極微量の葉酸由来化合物を検出可能にし、また、完全構造決定のために培養系の拡大と化合物抽出、NMR測定を行った。また、未知化合物の構造解析においては標品のスペクトルとの比較によって化合物特異性の高い検出・定量法を目指した。

海水中の溶存有機化合物は分子の起源が海洋系外(陸空)に及び、さらに溶存態-懸濁態間の交換を経るため生体化合物と比べ格段に複雑である。単離不十分な海洋の混合物試料に生化学領域の一斉分析を安易に導入すると、高感度スペクトルスコピーをもってしても得られる情報も従来の元素比などと大差ない上、解析情報量が増えかつ複雑になることで化合物の誤った解釈がなされる危険が増加する。本研究は分析する化合物を絞ることで単離精製法を確立し、その上で分子構造解析を行った。

4. 研究成果

(1)本課題で開発したHILICカラムを用いたLC-ESI-MSによる海水マトリックス中の葉酸定量法の検出下限は13nMであった。これはUVや蛍光分析法と同等程度であるが、質量分析法による化合物特異性の高さを利用し、海水中で誘導体化などを経た関連化合物との分離分析も可能であり、主たる海水中の微量葉酸定量法として用いる事が可能である。前処理としてイオン交換樹脂

と逆相ODS前処理カラムによる脱塩濃縮法が最適であった。

(2) 葉酸の定量とあわせ、葉酸添加後48時間以降海水培養系内に新たに発生した化合物の探索を行った。その結果、LC-MS上のピークとして観測された分子量264の化合物は ^1H , ^{13}C -NMR、MS/MS法による構造解析、標準化合物とのスペクトル比較を経て *p*-aminobenzoyl-L-glutamic acid(PAG)であることを確認した。

(3) 従来、海水中の葉酸は主として光分解および生物分解により速やかに消失すると考えられてきた。本研究においても葉酸消失速度定数 k は暗条件下(0.007-0.008)に対し、明条件下(0.017-0.0018)と、照射による葉酸の消失促進が確認された。しかし、7日間の培養実験では、質量分析法を用いた半定量実験により暗条件下のコントロールバッファにおいても67%の葉酸がPAGに変化したことを明らかにした。この結果は、海水中の葉酸の消失速度は水溶液中での化合物安定性自体に依存し、生物環境、光環境を必ずしも反映しない可能性を強く示唆し、難分解性有機化合物総体として光分解・生分解が重要とされる従来の議論に加え、海洋溶存有機化合物の分布に化合物ごとの化学性の要素を考慮する必要があること証明した。既知化合物を添加した培養海水を用いて、化合物の変化と消失プロセスを明らかにできた事で、本手法が実際の海水中の難分解性化合物生成プロセスを研究する手段として有効であることを示した。

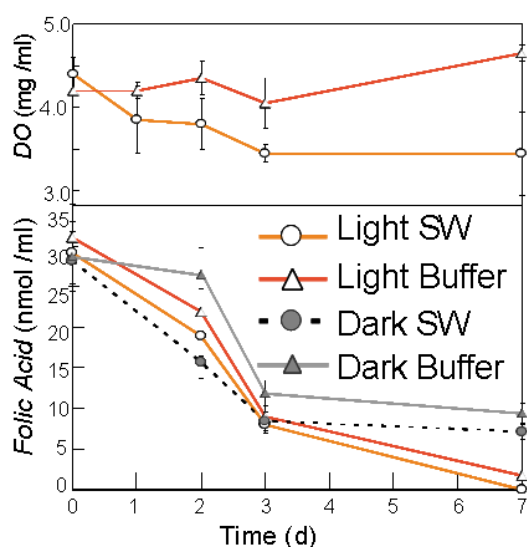


図 葉酸濃度(下)と溶存酸素濃度(上)の系時変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Hongo, Yayoi; Li, Baolin; Suzuki, Katsunori; Nakamura, Takemichi, An unexpected $[M+I]^+$ ion formation in phosphasilene compounds detection by electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 46, 956-959, 2011 (査読あり)

② Akagi, Tasuku; Fu, Feng-Fu; Hongo, Yayoi; Takahashi, Kozo, Composition of rare earth elements in settling particles collected in the highly productive North Pacific Ocean and Bering Sea: Implications for siliceous-matter dissolution kinetics and formation of two REE-enriched phases, *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75, 4857-4876, 2011 (査読あり)

③ Izuchi, Yuko; Koshino, Hiroyuki; Hongo, Yayoi; Kanomata, Nobuhiro; Takahashi, Shunya, Synthesis and Structural Revision of Phomopsin B, a Novel Polyketide Carrying a 10-Membered Cyclic-Ether Ring, *Organic Letters*, 13, 3360-3363, 2011. (査読あり)

④ Takahashi, Shunya; Hongo, Yayoi; Ye, Yue Qi; Koshino, Hiroyuki, Simple and efficient synthesis of highly functionalized cyclohexanes; formal total synthesis of ovalicin and fumagillin, *Asymmetry*, 22, 703-707, 2011 (査読あり)

⑤ Hara, Yasuko; Obata, Hajime; Doi, Takashi; Hongo, Yayoi; Gamo, Toshitaka; Takeda, Shigenobu; Tsuda, Atsushi., Rare earth elements in seawater during an iron-induced phytoplankton bloom of the western subarctic Pacific (SEEDS-II)., *Deep-Sea Research, Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56, 2839-2851, 2009(査読あり)

⑥ Takahashi, Shunya; Takahashi, Ryotaro; Hongo, Yayoi; Koshino, Hiroyuki; Yamaguchi, Kazunori; Miyagi, Taeko.,

Synthesis of All Possible Isomers Corresponding to the Proposed Structure of Montanacin E, and Their Antitumor Activity., Journal of Organic Chemistry, 74, 6382-6385, 2009 (査読あり)

⑦Structural Determination of Montanacin D by Total Synthesis Takahashi, S.; Hongo, Y.; Tsukagoshi, Y.; Koshino H., Org. Lett. 2008, 10, 19, 4223-4226. (査読あり)

⑧The biosynthesis of sorbicillinoids in Trichoderma sp. USF-2690: Prospect for the existence of a common precursor to sorbicillinol and 5-epihydroxyvertinolide, a new sorbicillinoid member Sugaya, K.; Koshino, H.; Hongo, Y.; Yasunaga, K.; Onose, J.; Yoshikawa, K.; Abe, N., Tetrahedron Lett. 2008, 49, 654-657. (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

①本郷やよい, 井土由宇子, 高橋俊哉, 中村健道, エネルギー分解イオンモビリティ質量分析法による環状分子の構造解析, 第59回質量分析総合討論会, 2011年9月17日, ホテル阪急エキスポパーク (大阪)

②Yayoi Hongo, LC-ESI-MS analysis of folic acid degradation in seawater, Goldshmidt2010. June, 17, 2010, Knoxville, USA.

③本郷やよい・小畑元, 海水中の葉酸の消失と変化, 2009年日本海洋学会秋季大会, 2009年9月26日, 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
本郷 やよい (HONGO YAYOI)
独立行政法人理化学研究所・物質構造解析チ
ーム・技師
研究者番号：4 0 4 3 5 6 8 1