

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550003

研究課題名(和文) 海洋微生物に由来する大気微粒子ゲル状有機物に含まれるペプチド検出の試み

研究課題名(英文) Detection of peptides in atmospheric organic aerosols of marine microbial origin

研究代表者

宮崎 雄三 (Miyazaki, Yuzo)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：60376655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アミノ酸のシリル化(誘導体化)及びガスクロマトグラフ/質量分析法を用い、海洋大気有機エアロゾルに含まれる遊離態アミノ酸およびペプチドを含む結合態アミノ酸など、アミノ酸含有有機物を高感度で検出する新たな分析手法を確立した。この分析手法を海洋大気エアロゾル試料に適用し、遊離態及び結合態として存在する各々16種のアミノ酸の濃度定量に成功した。海洋表層水起源を示すエアロゾル試料において、グリシンが支配的なアミノ酸であり、結合態アミノ酸の質量濃度は遊離態アミノ酸の質量濃度より約4-5倍高いことなどが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：An analytical method was established for the determination of both free and combined amino acids including peptide in marine atmospheric aerosols. The method derivatized amino acids followed by a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. The application of the adopted method in marine aerosols of the western North Pacific and the equatorial Pacific enabled the identification and quantification of 16 amino acids. Glycine was the predominant amino acids for both free and combined form in the aerosols originated from sea surface. On average, the total concentration of combined amino acids was found to be four to five times higher than that of free amino acids in the aerosol samples.

研究分野：大気化学

キーワード：アミノ酸 大気エアロゾル 海洋微生物 ペプチド アミノ酸含有有機物 誘導体化 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋大気中に浮遊する微粒子(エアロゾル)は雲粒の生成などを通して、大気の放射場に強い影響を及ぼす。海洋表層から大気へ放出される硫化ジメチル(DMS)及びDMSの酸化生成物である硫酸エアロゾルなど、無機物については多くの研究が行われてきた。硫酸エアロゾルと同程度存在し、植物プランクトンなど海洋微生物を起源とする有機エアロゾルが雲粒生成を介して気候に与える影響が、近年、国際的に注目されている。

(2) これまで研究実施者らは、海洋大気のある有機エアロゾルが海洋表層から放出された微生物由来の含窒素有機物に富むことを発見してきた(Miyazaki et al., ACP, 2011)。この有機物組成として、海水に多く含まれ海洋表面の砕波を通して大気への放出が予想されるアミノ酸含有有機物が挙げられる。エアロゾル中のアミノ酸含有有機物は主にバクテリア、藻類、ウイルス、微生物の残物、細胞分解による細胞外タンパク質など、海水中の微生物活動に由来すると考えられている。

(3) 海洋大気エアロゾルの化合物組成に関する理解が遅れているが、特にペプチドはその酸化・還元基を含む分子構造から、大気エアロゾルの酸性度や親水性、平均分子量の支配要因となり、雲凝結核として機能しうるため極めて重要である。またアミノ酸の中でもL-ロイシンなどは氷晶核能を保有することが近年の研究で明らかになっている。実際に最近、北極海域の雲・霧水中で海洋微生物由来のゲル状有機物が発見されており(Orellana et al., PNAS, 2011)、これらのアミノ酸に由来する化学組成と雲凝結核能の関係性が世界的にも注目されている。

(4) 上記の研究背景のもと、海洋微生物の大気エアロゾルへの寄与を元素レベルで明らかにする過程で、ゲル状粒子に含まれるアミノ酸含有有機物の重要性を認識した。これらのなかでも、遊離態アミノ酸と併せて質量が大きいと予想される結合態アミノ酸を高い精度で検出・定量し、海洋大気有機エアロゾルに含まれるアミノ酸の組成と存在量を明らかにする本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、海洋表層微生物に由来する大気有機エアロゾルの生成機構解明に向けて、エアロゾルに含まれる遊離態アミノ酸やペプチドなどの結合態アミノ酸など、アミノ酸含有有機物を誘導体化法およびガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)を用いることで高感度で検出・定量し、以下の分子レベルの研究を行うことを目的とした。

(1) 海洋大気エアロゾル中において、雲凝結核としての重要性が示唆されているゲル状有機物に着目し、GC/MSを用いることで、ペプチド(結合態アミノ酸)を主とするアミノ酸含有有機物を高感度で検出・定量する新たな分析手法を確立する。本研究では、誘導体化試薬にN-(t-ブチルジメチルシリル)-N-メチルトリフルオロアセトアミド(MTBSTFA)を用いてアミノ酸含有有機化合物中のアミノ基とカルボキシル基をシリル化(誘導体化)し、GC/MSにより海洋大気エアロゾル試料中の遊離態アミノ酸、およびペプチドを主とする結合態アミノ酸を検出する手法の確立を試みる。

(2) 亜寒帯北太平洋および熱帯東部太平洋上で研究実施者らが取得した大気エアロゾル試料について、(1)で確立した新規の遊離態・結合態アミノ酸分析手法を用い、ゲル状粒子に含まれるアミノ酸含有有機物の化合物組成を明らかにする。さらに、これらエアロゾルの酸性度・親水性及び生成支配要因を考察する。

3. 研究の方法

(1) 誘導体化から検出に至るまでの分析過程におけるアミノ酸の回収率を調べるための実験を行った。ここで用いる誘導体化試薬MTBSTFAは、ペプチドを構成するアミノ酸の誘導体化において、アミノ基とカルボキシル基のシリル化を単一ステップで行い、比較的安定な誘導体を得ることができる。この手法はクロマトグラフィの分解能が極めて高く、海洋大気エアロゾル中の超微量なアミノ酸を容易に同定できることが期待できる。さらにこの手法を用いた理由として、アミノ酸含有有機物以外の誘導体は生成されにくいいため、ブランク値を低減することが可能であり、海洋大気エアロゾルという一般的に低濃度の条件下(1m³当たりナノグラムオーダー)でも、高い精度で検出することが期待できるためである。

濃度既知の遊離態アミノ酸標準物質としてL-アミノ酪酸を用いた。標準物質を超純水とイソプロパノールの混合液に入れ濃縮後、ノルバリンを内部標準物質としてガラスバイアル内で混合させた。これを純窒素で乾燥後、MTBSTFAとジメチルホルムアミドを混合させ、ガラスバイアルを密封した。60-70°Cの温度条件下で約30分間加熱後、試料をGCに導入し、誘導体化の作業過程での不純物・干渉成分の寄与を調べた。

その後、誘導体化した試料を質量分析計に導入し、ピークの構造解析を行うことで内部標準物質であることを確認した。遊離態アミノ酸アミノ酸標準物質について上記の誘導体化を行い、GC/MSを用いて各化合物の構造解析を行うことで検出感度・精度を確認した。

(2) 結合態アミノ酸については、上記と同様に石英繊維フィルターから純水抽出した試料を濃縮した後、加水分解用のバキュームリアクションチューブにて、乾燥処理を行った。この中に塩酸(6M, 250 μ l)を加え、110 $^{\circ}$ Cで約6時間、加水分解処理を行った。室温に冷却した後、遊離態アミノ酸への処理と同様に抽出試料を誘導体化した。GC/MSにて、アミノ酸の定量を行った。ここで定量した全アミノ酸量と上記で定量した遊離態アミノ酸量の差を結合態アミノ酸とした。アミノ酸成分の検出感度とクロマトグラムでの分離度、回収率・検出の再現性から最適な分析条件を決定した。

(3) 亜寒帯北太平洋上および熱帯東部太平洋上で過去に取得した大気エアロゾル試料について、上記で確立した新規の分析手法を用い、遊離態・結合態のアミノ酸の分析・定量を行った。各々、平成20年度に亜寒帯西部北太平洋(学術研究船白鳳丸航海: KH-08-1)と平成23年度に熱帯東部太平洋(米国海洋大気庁研究船 Ka'imimoana 航海)において実施された航海観測で得られた大気エアロゾル試料を用いた。

(4) 大気エアロゾル中のアミノ酸への海洋微生物の寄与を調べるために、上述の海洋大気試料を用いてエアロゾルの起源情報を含む安定炭素同位体比(^{13}C)を測定した。ここではフィルター試料を塩酸処理し、エアロゾルに含まれている炭酸塩を除去した後、純窒素気流にて乾燥させた。有機炭素を純水抽出・濃縮後、元素分析/安定炭素同位体質量分析計に導入し、水溶性有機炭素(WSOC)の ^{13}C を測定した。

4. 研究成果

(1) 石英繊維フィルターを用いて、アミノ酸標準物質の濃縮と誘導体化の作業過程における不純物・干渉成分の寄与(ブランク値のレベル)を調べた結果、試料の溶媒として通常用いる超純水製造装置で精製される超純水では、ブランク値が高くなる(数十~数百ng/ml)ことがわかった。そこで、溶媒としてより純度の高いChromasolvグレードの超純水を複数回蒸留して用い、同様の検証を行った。その結果、ブランク値が1桁低減することが分かった。また、実大気サンプル中の無機成分の干渉影響を取り除くため、文献を参考に、上記高純度の超純水とイソプロパノールを1:1の割合で混合させると、アミノ酸の検出効率が2倍以上改善することが明らかになった。アミノ酸の標準物質に対する検出感度は極めて良い線形性を示すことを確認した($r^2 > 0.90$)。検出下限値(質量)は、各種アミノ酸化合物に対して、数十pgまで下げることができた。

(2) 結合態アミノ酸についてはアスコルビン酸を加えることで、加水分解過程での硝酸塩による分解を防ぐことができることが分かった。エアロゾル試料には普遍的に硝酸塩が含まれるため、このアスコルビン酸の付加は極めて重要である。付加するアスコルビン酸の量は、本研究の分析条件下では500 μ gが最も適当であった。分析過程において使用する溶媒や化学物質の検討、濃縮法の改善による干渉成分の低減により、測定精度を高めることができた。回収率は遊離態・結合態アミノ酸で $65 \pm 10\%$ 以上を達成した。アミノ酸成分の検出感度とクロマトグラムでの分離度、回収率・検出の再現性、ブランク値の検討から最適な分析条件を決定した。

(3) 上記で確立した分析手法を海洋大気エアロゾル試料(亜寒帯西部北太平洋、東部熱帯太平洋で取得)に適用した。大気エアロゾル試料はエアロゾル全量(TSP)および粒径1 μ m以下のエアロゾルを半日~1日間採取したものである。分析の結果、遊離態及び結合態として存在する各々16種のアミノ酸の検出および濃度定量に成功した。濃度レベルは遊離態・結合態アミノ酸ともに数ng m^{-3} から数十ng m^{-3} のオーダーであった。海洋大気エアロゾルにおけるWSOCの ^{13}C が -22‰ から -18‰ の範囲を示すエアロゾル試料を海洋表層水起源とした。これらの試料において、グリシンが支配的なアミノ酸であることが明らかになった。さらに、ペプチドを含む結合態アミノ酸の質量濃度は遊離態アミノ酸の質量濃度より約4-5倍高いことなどが明らかになった。

本研究で行ったエアロゾル中のアミノ酸の検出・化学特性の理解を通し、今後は海洋微生物が駆動する海洋大気有機エアロゾルの動態解明に繋がることが期待される。

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1件)

Miyazaki, Y., M. Sawano, and K. Kawamura, Low-molecular-weight hydroxyacids in marine atmospheric aerosol: Evidence of a marine microbial origin, *Biogeosciences*, 査読有, 11, 4407-4414, doi:10.5194/bg-11-4407-2014, 2014.

[学会発表](計4件)

宮崎 雄三, フィールド観測から見る陸上植生・海洋微生物起源の有機エアロゾル, 有機エアロゾルに関するワークショップ: 大気におけるその動態・性状・役割, 2015年1月23日, 名古屋大学東京オフィス(東京都千代田区)

Miyazaki, Y., S. Coburn, R. Volkamer, R. B. Pierce, K. Ono, and K. Kawamura, Submicrometer Water-Soluble Organic Aerosols in Marine Boundary Layer Over the Eastern Pacific, NCAR/NOAA/TORERO Symposium, 2014年6月24日, Boulder, USA.

Miyazaki, Y., S. Coburn, R. Volkamer, R. B. Pierce, K. Ono, T. Takeuchi, and K. Kawamura, Isotopic compositions and biogenic organic marker compounds of water-soluble organic carbon in submicrometer marine aerosol, AGU Fall Meeting, 2013年12月10日, San Francisco, USA.

Miyazaki, Y., R. Volkamer, R. B. Pierce, K. Ono, and K. Kawamura, Ocean-derived atmospheric organic aerosols over the eastern Pacific, Surface Ocean - Lower Atmosphere Study (SOLAS) Symposium, 2013年5月31日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 雄三 (MIYAZAKI, Yuzo)

北海道大学・低温科学研究所・助教

研究者番号：60376655