

**技術論文**メタン湧出点周辺堆積物中の C<sub>40</sub> ビフィタンの GC/MS による解析\*

萩原成騎\*\*

(2009 年 7 月 3 日受付, 2009 年 9 月 14 日受理)

**1. はじめに**

近年, GDGT (グリセロール ジアルキル グリセロール テトラエーテル) の分解生成物である ビフィタンは, 古細菌のバイオマーカーとしての重要性が指摘されており, これらを用いた古細菌の対比が行われた (De Rosa *et al.*, 1986)。Koga *et al.* (1998) は, 嫌氣的メタン酸化古細菌 (ANME) における定性的脂質組成, すなわち, コア脂質, 単糖, ホスホジエステル結合性の極性基が化学分類学的指標になりうることを指摘した。ここで Koga *et al.* (1998) は, ビフィタンをコア脂質分析の補助として用いた。その後, 還元環境でメタン酸化を行っている古細菌の大部分は, 16S rDNA 解析に基づいた分類によって, ANME-1 と ANME-2 に分類された (たとえば Mills *et al.*, 2003)。Blumenberg *et al.* (2004) は, ANME-1 と ANME-2 がそれぞれ卓越する海洋堆積物の有機地球化学分析を行った。その結果, ANME-1 の炭化水素画分からはクロセタンと飽和および不飽和 PMI, エーテル結合性脂質からはフィタンのみで ビフィタンは検出されなかった。ANME-2 については, 炭化水素画分から飽和および不飽和 PME のみでクロセタンを含まず, エーテル結合性脂質からはフィタンと 3 種の ビフィタンが検出された。

このように, ビフィタンはバイオマーカーを用いた古細菌の研究において重要性が増している。本論では, 日本海東縁海鷹海脚のメタン湧出地点近傍の堆積物から検出された ビフィタンについての GC/MS 解析結果を報告する。

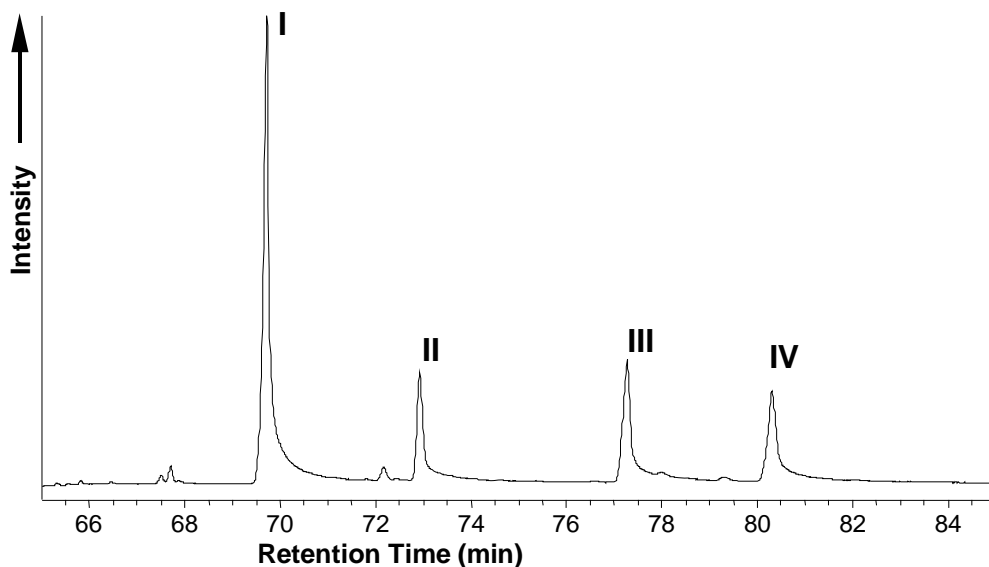
**2. 試料**

“なつしま” NT-06-19 航海 (日本海直江津沖海鷹海脚および上越海丘のメタン湧出海域) において, ハイパードルフィンを用いた潜航調査を行った。本調査潜航では深海底におけるガス放出の観察, 堆積物柱状コア試料 (push core) の採取およびニスキン採水器による海水の採取を行った。研究に用いた試料は, 第 600 潜航 (海鷹海脚北部) PC3, 海底がバクテリアマットに被覆された地点の試料である。試料採取地点の水深は 912 m, 水温は 0.2 ~ 0.3°C であった (萩原ら, 2009)。

**3. 分析方法**

正確に計り取った試料約 3 g を 50 ml テフロン製遠沈管に投入し, 40 ml の溶媒 (DCM/メタノール:93/7) を加えた。超音波洗浄器中で 60 分抽出, 遠心分離機にて溶媒と堆積物を分離し, 抽出溶媒はナスフラスコに移した。この操作を 3 回繰り返した。抽出溶媒はロータリーエバポレーターによって濃縮し, シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって炭化水素画分, 多環芳香族炭化水素画分, ケトン/エステル画分, 極性画分に分離した。さらに, 極性画分については, HI/LiAlH<sub>4</sub> 処理によりエーテル結合を切断し, 放出される ビフィタンについて分析を行った。この操作は, 極性画分を乾固した後に 1 ml の 55% ヨウ化水素酸を加え, 100°C にて 2 時間還流してエーテル結合を切り, 炭化水素鎖をヨウ化アルキル化した。これを 50 ml のヘキサン/蒸留水中に投入し, ヘキサ

\* GC/MS analysis of C<sub>40</sub> biphytane isolated from the sediment near the methane seep site\*\* 東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻 〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学理学部 1 号館  
Tel: 03-5841-4524 Fax: 03-5841-4555 e-mail: ogi@eps.s.u-tokyo.ac.jp  
Shigenori Ogiwara: Department of Earth and Planetary Science, Graduate School of Science, The University of Tokyo



**Fig.1.** The total ion chromatogram of biphytanes released from intact polar lipids by ether cleavage and subsequent reduction. Mass spectrum of numbered peaks is given in Fig.2.

ン相を取り乾固した。これに 20 mg 水素化リチウムアルミニウムを 1 ml テトラヒドロフラン (脱水) に溶解した溶液を加え 2 時間還流して炭化水素とし、再びシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって炭化水素を精製し、分析に用いた。この分析操作は Thiel *et al.* (2001) を改良したものである。分析に用いた GC/MS は ThermoQuest 社製 Voyager であり、注入口はオンカラム、使用カラムは HP-5ms (内径 0.25 mm, 長さ 30 m, 膜厚 0.25  $\mu$ m) である。分析条件は 40 $^{\circ}$ C で 1 分保持し、3 $^{\circ}$ C/分 で 300 $^{\circ}$ C まで昇温した後、30 分保持した。カラムブリードの影響が大きい為、各化合物ピークの直前をバックグラウンドとして補正を行った。

また、試料に C<sub>35</sub> から C<sub>37</sub> までの *n*-アルカンを添加して、分析を行った。添加した *n*-アルカンの保持時間を用いてピフィタンの GC 保持指数 (Retention Index) を計算した。本研究では GC 保持指数は、Kissin *et al.* (1986) に従い、以下のように計算した。KF (X) = ((n-1) + (RTX-RTC<sub>n-1</sub>)) / (RTC<sub>n</sub>-RTC<sub>n-1</sub>) x 100 ここで、KF (X) は化合物 X の GC 保持指数、RTX は化合物 X の保持時間 (min)、RTC<sub>n</sub> は化合物 X の直後に湧出する *n*-アルカンの保持時間 (min)、RTC<sub>n-1</sub> は化合物 X の直前

に湧出する *n*-アルカンの保持時間 (min) である。本研究では化合物 X はピフィタンである。

#### 4. 結 果

Fig.1 に HI 処理後の極性画分のトータルイオンクロマトグラム (TIC) を示す。検出されたピフィタンは、I (0-ring), II (1-ring), III (2-ring) および IV (3-ring) である。GC 保持指数は、I (0-ring) および II (1-ring) について、それぞれ、3512 および 3642 であった。III (2-ring) と IV (3-ring) の GC 保持指数は、求めることができなかった。

Fig.2 に 4 種のピフィタンのマススペクトルを示す。開裂の解釈は、Ventura *et al.* (2008) 及び Schouten *et al.* (1998) を参考にした。I (0-ring) は、分子イオンは検出されない。フラグメントイオンの分布は *n*-アルカンのように分子量の増加に伴って滑らかに減少するが、分枝点における開裂である *m/z* 126/127, 196/197, 266/267, 322/323, 392/393 がやや高いピークとなって検出される。偶数が出現するのは、開裂時の水素離脱に起因する。

II (1-ring) は、分子イオン *m/z* 560 が存在する。特徴的なフラグメントイオンは、*m/z* 166/167 及び 194/195 であり、それぞれ直鎖イソプレノイドのシ

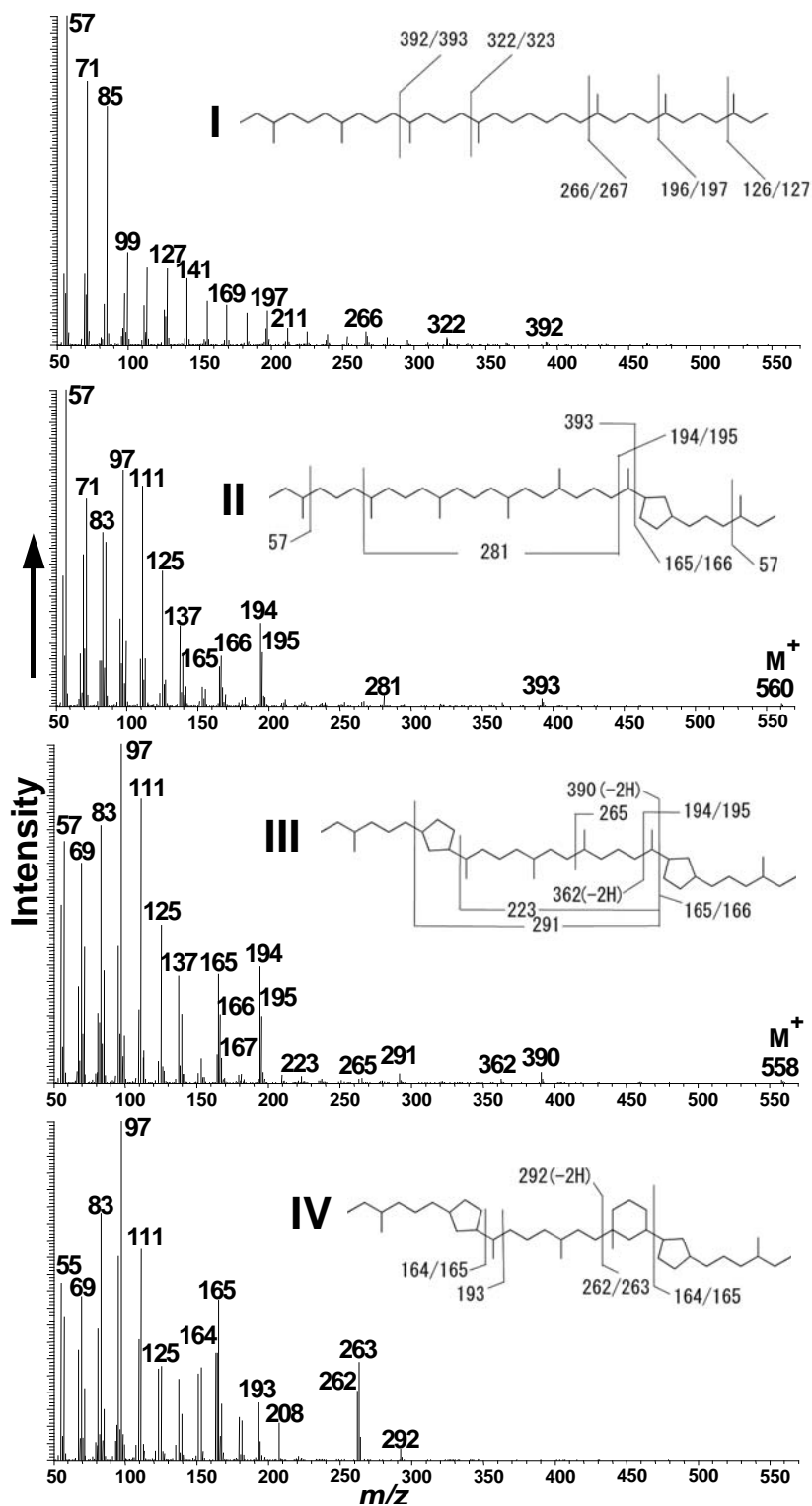


Fig.2. Electron impact mass spectra of biphytanes.

Table Identification level of C<sub>40</sub> biphytanes.

Peak No.	Compound	Formula	Molecular Weight	Base peak	Diagnostic fragment	Identification level	Reference Papers
I	C <sub>40</sub> biphytane (0-ring)	C <sub>40</sub> H <sub>82</sub>	562	57	127 197 266 322 392	1	DeLong <i>et al.</i> (1998) and Ventura <i>et al.</i> (2008)
II	C <sub>40</sub> biphytane (1-ring)	C <sub>40</sub> H <sub>80</sub>	560	57	57 166 194 281 393	1	DeLong <i>et al.</i> (1998), Schouten <i>et al.</i> (1998) and Ventura <i>et al.</i> (2008)
III	C <sub>40</sub> biphytane (2-ring)	C <sub>40</sub> H <sub>78</sub>	558	97	97 165 194 291 390	1	DeLong <i>et al.</i> (1998), Schouten <i>et al.</i> (1998) and Ventura <i>et al.</i> (2008)
IV	C <sub>40</sub> biphytane (3-ring)	C <sub>40</sub> H <sub>76</sub>	556	97	97 165 193 263 292	1	DeLong <i>et al.</i> (1998) and Schouten <i>et al.</i> (1998)

1. Coincidence in mass spectral data in references.

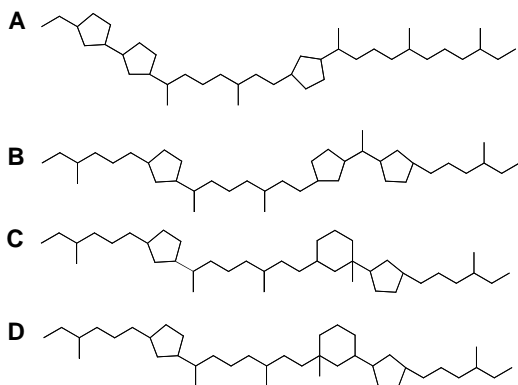


Fig.3. The historical transition of the identified structure of C<sub>40</sub> biphytane with 3-rings.

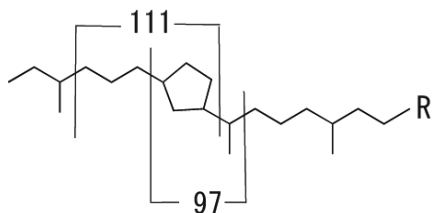


Fig.4. Fragmentation of *m/z* 97 and 111 ions from C<sub>40</sub> biphytane with cyclopentane ring(s).

クロペンタン環側での最初の分枝において、シクロペンタン側と直鎖イソプレノイド側での開裂に起因する。*m/z* 393 は *m/z* 166/167 を生じた開裂の片側である。なお、*m/z* 281 は、*m/z* 194/195 を生じた開裂の片側がもう一度分枝にて開裂して生じる。また、ベースイオン *m/z* 57 は、両端の最初の分枝内側における開裂によって生じる。

III (2-ring) においては、分子イオン *m/z* 558 が検出される。特徴的なフラグメントイオンは、*m/z* 165/166 及び 194/195 であり、それぞれシクロペン

タン環から伸びたイソプレノイド鎖の最初の分枝において、シクロペンタン環側と直鎖イソプレノイド側での開裂に起因する。*m/z* 390 及び 362 は、それぞれ *m/z* 165/166 及び 194/195 を生じた開裂の片側である。*m/z* 223 及び 291 は、*m/z* 390 のフラグメントが、再度シクロペンタン環の左右で開裂することによって形成される。III (2-ring) のマススペクトルは、II (1-ring) と非常に良く似ている。

3-ring マススペクトルの解釈は、2000 年を境界として変化した。3-ring を 3-シクロペンタン環との解釈した 20 世紀の報告 (たとえば DeLong *et al.*,1998) に対して、Schouten *et al.* (2000) 以降は、2-シクロペンタン環、1-シクロヘキサン環と解釈している。Fig.3 に示した A 及び B が 3-ring を 3-シクロペンタン環との解釈した構造である。C は 2-シクロペンタン環、1-シクロヘキサン環の初期の解釈、D は現在用いられている解釈である。DeLong *et al.* (1998) では A と解釈し、Schouten *et al.* (1998) では B と解釈した構造が、Schouten *et al.* (2000) では C となり、Schouten *et al.* (2008) では D に変更されている。同様に Kuypers *et al.* (2001) では C と示された構造が、Kuypers *et al.* (2002) では D へ変更されている。これは Sinninghe Damsté *et al.* (2002) による NMR を用いた研究において C と D の比較を行い、NMR のデータと D がよく一致することを示した報告による。Sinninghe Damsté *et al.* (2002) では、将来マススペクトルの解釈を行うと述べたが、未だに報告されていない。本論では、D で示された構造を元に IV (3-ring) のマススペクトルを以下のように解釈した。特徴的イオンである *m/z* 164/165 は二つのシクロペンタン環が、それぞれ分子の内側の枝と開裂したシクロペンタン側のフラグメントである。シクロペンタン環が単独

で存在する側では、さらに内側の分枝における開裂によって  $m/z$  193 のフラグメントが生じる。また、シクロヘキサン環と長鎖側枝の開裂によって、 $m/z$  262/263 と 292 のフラグメントが形成される。ここで、 $m/z$  262/263 のフラグメントが分子の端の分枝でさらに開裂して、特徴的な偶数イオンである  $m/z$  208 を形成すると解釈した。

II (1-ring), III (2-ring) および IV (3-ring) に共通して見られるフラグメントは  $m/z$  97 及び 111 である。これを3つの化合物に共通する構造から推定した。Fig.4 に共通の構造と推定した開裂を示す。シクロペンタンの左右に伸びるイソプレノイド鎖の分枝において、それぞれ2箇所の開裂によって、 $m/z$  97 及び 111 イオンを形成することができる。なお、III (2-ring) および IV (3-ring) においては、 $m/z$  97 はベースイオンである。

## 文 献

- Blumenberg M., Seifert R., Reinter J., Pape T. and Michaelis W. (2004) Membrane liquid patterns typify distinct anaerobic methanotrophic consortia. *Proceedings of National Academy of Science* **101**, 11111-11116.
- DeLong E. F., King L. L., Massana R., Cittone H., Murray A., Schleper C. and Wakeham S. G. (1998) Dibiphytanyl Ether Lipids in Nonthermophilic Crenarchaeotes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 1133-1138.
- DeRosa M., Gambacorta A., Lanzotti V., Trincone A., Harris J. E. and Grant W. D. (1986) A range of ether core lipids from the methanogenic archaeobacterium *Methanosarcina barkeri*. *Biochimica et Biophysica Acta* **875**, 487-492.
- Kissin Y. V., Feulmer G. P. and Payne W. B. (1986) Gas chromatographic analysis of polymethyl-substituted alkanes. *Journal of Chromatographic Science*, **24**, 164-169.
- Koga Y., Morii H., Akagawa-Matsushita M. and Ohga M. (1998) Correlation of polar lipid composition with 16S rRNA phylogeny in methanogens. Further analysis of lipid component parts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**, 230-236.
- Kuypers M. M. M., Blokker P., Erbacher J., Kinkel H., Pancost R. D., Schouten S. and Sinninghe Damsté J.S. (2001) Massive expansion of marine archaea during a mid-Cretaceous oceanic anoxic event. *Science* **293**, 92-94.
- Kuypers M. M. M., Blokker P., Hopmans E. C., Kinkel H., Pancost R. D., Schouten S. and Sinninghe Damsté J. S. (2002) Archaeal remains dominate marine organic matter from the early Albian oceanic anoxic event 1b. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **185**, 211-234.
- 萩原成騎・石崎 理・松本 良 (2009) なつしま NT-06-19 航海 (直江津沖海鷹海脚および上越海丘) によって採取された堆積物柱状試料の有機地球化学分析, 地学雑誌, 118,128-135.
- Schouten S., Hoefs M. J. L., Koopmans M. P., Bosch H. -J. and Sinninghe Damsté J. S. (1998) Structural characterization, occurrence and fate of archaeal ether-bound acyclic and cyclic biphytanes and corresponding diols in sediments. *Organic Geochemistry* **29**, 1305-1319.
- Schouten S., Hopmans E. C., Pancost R. D. and Sinninghe Damsté J. S. (2000) Widespread occurrence of structurally diverse tetraether membrane lipids: evidence for the ubiquitous presence of low-temperature relatives of hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 14421-6.
- Schouten S., Baas M., Hopmans E. C. and Sinninghe Damsté J. S. (2008) An unusual isoprenoid tetraether lipid in marine and lacustrine sediments. *Organic Geochemistry* **39**, 1033-1038
- Sinninghe Damsté J. S., Schouten S., Hopmans E. C., van Duin A. C. T. and Genevasen J. A. J. (2002) Crenarchaeol: the characteristic core glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether membrane lipid of cosmopolitan pelagic crenarchaeota. *Journal of Lipid Research* **43**, 1641-1651.
- Thiel V., Peckman J., Richnow H. H., Luth U., Reitner J. and Michaelis W. (2001) Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonate and microbial mat. *Marine Chemistry* **73**, 97-112.
- Ventura G. T., Kenig F., Reddy C. M., Fryfinger G.

S., Nelson R. K., Van Mooy B. and Gaines R. B.  
(2008) Analysis of unresolved complex mixtures  
of hydrocarbons extracted from late Archean

sediments using comprehensive two dimensional gas  
chromatography (GC×GC). *Organic Geochemistry*  
**39**, 846–867.