

技術論文**現生ハプト藻 *Emiliana huxleyi* 培養試料中の
長鎖アルケンの GC/MS 解析***

天羽美紀****・萩野恭子**・鈴木徳行**・堀口健雄**・山本正伸****

(2009 年 7 月 13 日受付, 2009 年 9 月 25 日受理)

1. はじめに

ハプト藻の *Emiliana huxleyi* は、長鎖アルケノンを作る最も主要な種としてよく知られている。長鎖アルケノンの不飽和指標は古水温計として、また、その濃度はハプト藻の生産量の指標として利用されている (e.g., Sikes and Volkman, 1993; Amo and Minagawa, 2003; Yamamoto et al., 2005)。これまでに、*E. huxleyi* の一部の株では、アルケノンと同じ炭素数 37 や 38 の長鎖アルケンを生合成することが報告されている (Conte et al., 1995)。これらの長鎖アルケンは、南大洋のように水温の低い海域の堆積物中で検出されている (Sikes and Volkman, 1993; Sikes et al., 1997)。

E. huxleyi には炭酸塩の殻である円石の形態にいくつもの表現型があり、その分布は海流系に規制されていることが報告されている。温暖な黒潮海流では、表現型 A が多産し、寒冷な親潮域では表現型 B や B/C, C が多産する (Hagino et al, 2005)。本報では、寒冷な親潮域で採取された *E. huxleyi* の培養株について表現型の同定を行い、その中の長鎖アルケンの分析を行った。以下に *E. huxleyi* 培養試料の長鎖アルケンの分析方法とマススペクトルの解釈について報告する。

2. 試料

実験には、ベーリング海から単離された NIES-1312 株 (国立環境研究所) を用いた。電子顕微鏡による円石の形態観察の結果、NIES-1312 株の表現型は Hagino et al. (2005) による B/C と同定された。同株を MNK 培地を用いて 18 °C、明期 18 時間・暗期 6 時間の光周期で培養した。細胞の増殖速度をフックスローゼンタル血球計算器 (エルマ販売株式会社) を用いてモニターし、対数増殖期 (時間に対して指数関数的に細胞数が増加する時期) に脂質分析用の試料を採取した。

3. 分析方法**3.1. 長鎖アルケンの抽出・分離**

冷凍凍結された培養試料 (27 ml) を解凍後、GF/F フィルター (Whatman) で濾過をした。その後、フィルター試料をメタノール (HPLC 用) / ジクロロメタン (HPLC 用) (3:1) 20 ml, メタノール / ジクロロメタン (1:1) 20 ml, ジクロロメタン 20 ml でそれぞれ一回ずつ超音波抽出を行った。抽出物はロータリーエヴァポレーターを用いて、ウォーターバスを 27°C に設定し乾固した。得られた抽出物をバスツールピペットに硫酸ナトリウムを詰め

* GC/MS analysis of unsaturated long-chain alkenes in culture samples of recent Haptophyte *Emiliana huxleyi*.** 北海道大学大学院理学研究院自然史科学部門, 〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目
Miki Amo, Kyoko Hagino, Noriyuki Suzuki, Takeo Horiguchi: Department of Natural History Sciences, Faculty of Science, Hokkaido University, N10 W8, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan.*** 独立行政法人 石油天然ガス・金属鉱物資源機構 R&D 推進部, 〒261-0025 千葉市美浜区浜田 1-2-2
Technology Research & Development Department, Japan Oil, Gas and Metals National Corporation, 1-2-2, Hamada, Mihama-ku, Chiba 261-0025, Japan.

mail: amo-miki@jogmec.go.jp, Tel: 043-276-4308

**** 北海道大学大学院地球環境科学研究院地球圏科学専攻, 〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 5 丁目
Masanobu Yamamoto: Division of Earth System Science, Faculty of Earth Environmental Science, Hokkaido University, N10 W5, Kita-ku, Sapporo 060-0810, Japan.

たカラムに通し、水を除去した。抽出物を乾固した後に、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (45 mm 長, 6 mm 内径, 5% H₂O; 70-230 mesh, Merck) によって以下の4つのフラクションに分画した。溶出液の順序はヘキサン (HPLC 用) 3 ml (F1 フラクション), ヘキサン/トルエン (HPLC 用) (3:1) 3 ml (F2 フラクション), トルエン 4 ml (F3 フラクション), トルエン/メタノール (3:1) 3 ml (F4 フラクション) である。F1 フラクションをその後の分析に供した。

3.2. ガスクロマトグラフィー・質量分析 (GC/MS)

F1 フラクションを, Agilent 6890 ガスクロマトグラフ・5975 質量検出器計 (スプリットレス注入法, CP-Sil5CB (60 m 長, 0.25 mm 内径, 0.25 μm 膜厚) キャピラリーカラム; VARIAN) に導入し

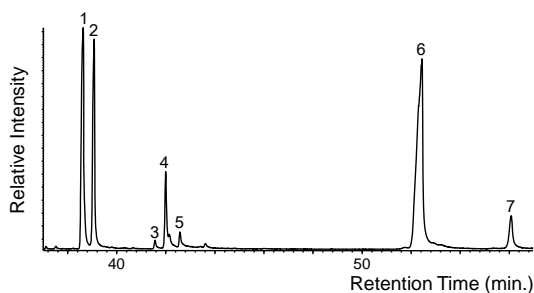


Fig. 1. Total ion chromatogram of long-chain unsaturated alkenes in *Emiliania huxleyi* NIES-1312. Compound names are given in Table 1.

て分析した。オープン温度は 40°C で 2 分保持し, 300°C まで 4°C / 分で昇温した後, 300°C で 20 分間保持した。キャリアガスは高純度ヘリウムを用いた。質量分析計によるイオン化は電子衝撃イオン (EI) 法であり, 全イオンスキャンモード (m/z 50-550), イオン化電圧は 70eV で行った。

4. 結 果

長鎖アルケン, GC/MS で分析を行った。GC/MS のガスクロマトグラム (イオンクロマトグラム) を Fig. 1 に示す。同定された化合物の名称を Table 1 に, 質量スペクトルと構造式を Fig. 2 に示す。

長鎖アルケン, C₃₁, C₃₃, C₃₇, C₃₈ のアルケンが検出された (Fig. 1 および Table 1 のピーク番号 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)。長鎖不飽和アルケンの同定は GC/MS による質量スペクトルを Rieley et al. (1998) と Grossi et al. (2000) と比較して行った。アルケンの分子イオンピークは通常はつきりしているため, すべてのアルケンから分子イオン (M) が得られた。また, 飽和炭化水素の場合と同じく, 直鎖アルケンは 14 単位の間隔でのピーク群で特徴づけられる。直鎖アルケンの二重結合の位置は, フラグメント中で容易に移動するので決めにくいが, シス型の二重結合については, フラグメントイオンから二重結合の位置を推定できる。ピーク 1 は, 分子イオン M=432 から C_{31:2} アルケンであることを示し, フラグメントイオン M-126 は Δ²² 位に二重結合があることを, さらにフラグメントイオン M-154 は,

Table 1. Identification of long-chain alkenes.

Peak no.*	Compound name	Formula	Molecular weight	Diagnostic fragmentation (m/z)	Identification level**		Reference
					This study	Reference	
1	2,22-Hentriacontadiene	C ₃₁ H ₆₀	432	432, 306, 278	2	1	Rieley et al., 1998
2	3,22-Hentriacontadiene	C ₃₁ H ₆₀	432	432, 306, 264	2	1	Rieley et al., 1998
3	Tritriacontatetraene	C ₃₃ H ₆₀	456	456, 332	1		
4	Tritriacontatriene	C ₃₃ H ₆₂	458	458, 334	1		
5	Tritriacontatriene	C ₃₃ H ₆₂	458	458, 334	1		
6	1,15,22-Heptatriacontatriene	C ₃₇ H ₇₀	514	514	2	1	Rieley et al., 1998; Grossi et al., 2000
7	1,16,23-Octatriacontatriene	C ₃₈ H ₇₂	528	528	2	1	Rieley et al., 1998; Grossi et al., 2000

* Peak numbers refer to the chromatogram in Fig. 1.

** Identification level;

1: Interpretation of mass spectrum data.

2: The mass spectrum and GC retention time are identical to those in references.

3: The mass spectrum is identical to that of authentic standard.

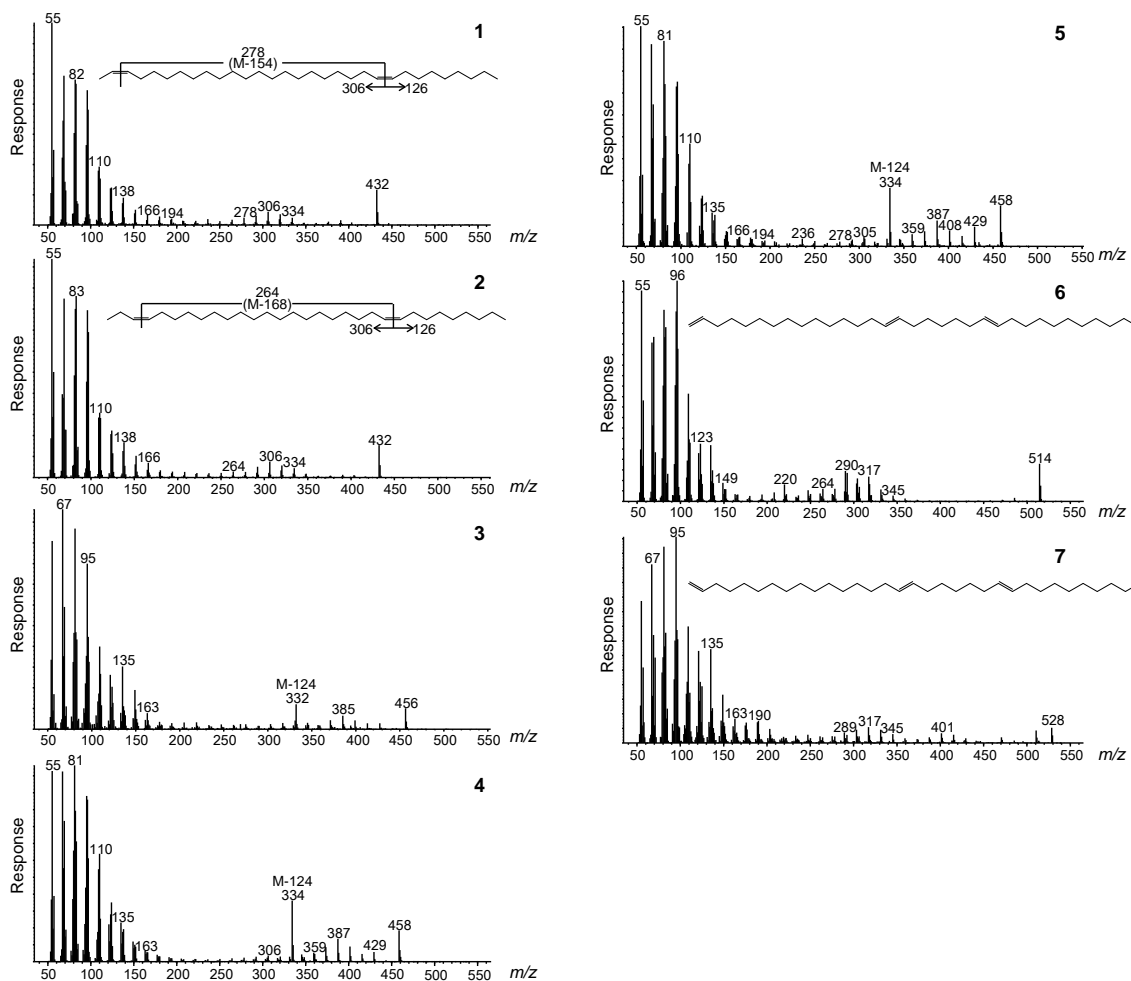


Fig. 2. Mass spectra of long-chain unsaturated alkenes in peaks #1-#7 in Fig. 1. Compound names are given in Table 1.

Δ^2 位に二重結合があることを示している (図 2-1)。ピーク 2 は、分子イオン $M=432$ から $C_{31:2}$ アルケンであることを示し、フラグメントイオン $M-126$ は Δ^{22} 位に二重結合があることを、さらにフラグメントイオン $M-168$ は、 Δ^3 位に二重結合があることを示している (図 2-2)。 C_{31} 、 C_{33} アルケンは、シス型の二重結合を持つと考えられており (Rieley et al., 1998)、シス型の二重結合位で開裂が起こっていると考えられる。

ピーク 3 は、分子イオンから $C_{33:4}$ アルケンであると考えられ、フラグメントイオン $M-124$ は、シス型の二重結合が Δ^{24} 位にあることを示している (図 2-3)。また、残り 3 つの二重結合は Δ^1 位から Δ^{23} 位までの間にあることを示している。残りの

二重結合は、顕著なフラグメントイオンが観察されないことからトランス型であると考えられる。ピーク 4 は、分子イオン $M=458$ から $C_{33:3}$ アルケンであると考えられ、フラグメントイオン $M-124$ は、シス型の二重結合が Δ^{24} 位にあることを示している (図 2-4)。ピーク 3 と同様に、残り 2 つの二重結合は顕著なフラグメントイオンが観察されないことから、 Δ^1 位から Δ^{23} 位までの間にトランス型の二重結合があると考えられる。ピーク 5 は、分子イオン $M=458$ から $C_{33:3}$ アルケンであると考えられ、フラグメントイオン $M-124$ は、シス型の二重結合が Δ^{24} 位にあることを示している (図 2-5)。ピーク 3、4 と同様に、残り 2 つの二重結合は顕著なフラグメントイオンが観察されないこと

から、 A^1 位から A^{23} 位までの間にトランス型の二重結合があると考えられる。Rieley et al. (1998) による *E. huxleyi* (VAN 556 株) のアルケン分析の結果、 $33:2A^{1,24}$ と $33:2A^{2,24}$ の2つの C_{33} アルケンが検出されている。これらは、 A^{24} 位の他には、 A^1 位や A^2 位に二重結合を持っている。このことから、本研究で検出された C_{33} アルケンも A^1 位や A^2 位に二重結合を持っている可能性がある。

ピーク6は、分子イオン $M=514$ から $C_{37.3}$ アルケンであり、ピーク7も同様に分子イオン $M=528$ から $C_{38.3}$ アルケンであることが示唆された。 C_{37} triene と C_{38} triene の二重結合の位置については、Rieley et al., 1998 による *E. huxleyi* (VAN 556 株) の C_{37} triene と C_{38} triene の二硫化ジメチル付加物の NMR とマススペクトル分析から明らかになっている。これによると C_{37} triene は $37:3A^{1,15,22}$ で、 C_{38} triene は $38:3A^{1,16,23}$ であり、二重結合はすべてトランス型であった。また、 C_{37} triene の二重結合の位置については、Grossi et al., 2000 による *E. huxleyi* (CS-57 株) 中の C_{37} triene の二硫化ジメチル付加物の NMR とマススペクトル分析からも同様の結果が得られている。このことから、本研究で得られた C_{37} triene と C_{38} triene の二重結合はいずれもトランス型で、二重結合の位置も同じであると考えられる。 C_{37} triene と C_{38} triene の二重結合の位置は、 C_{37} alkadienone と C_{38} alkadienone と同じであることから、 C_{37} , C_{38} アルケンはアルケノンと同じ生合成経路で作られたことが指摘されている (Rieley et al., 1998)。

5. 謝 辞

本研究の遂行に当たり北海道大学大学院沢田健講師には貴重なご助言を頂きました。二名の匿名査読者には本稿の査読を通じて貴重なご意見を頂きました。本研究は文部科学省 21 世紀 COE プログラム新・自然史科学創成 (プログラムリーダー岡田尚武) と科学研究費補助金 (若手研究 (B)) : 課題番号 17740354) の助成によって行われました。記して感謝致します。

引用文献

- Amo M. and Minagawa M. (2003) Sedimentary record of marine and terrigenous organic matter delivery to the Shatsky Rise, western North Pacific, over the last 130 kyr. *Organic Geochemistry* **34**, 1299-1312.
- Conte M. H., Thompson A. and Eglinton, G. (1995) Lipid biomarker diversity in the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the related species *Gephyrocapsa oceanica*. *J. Phycol.* **31**, 272-282.
- Grossi V., Raphel D., Aubert C. and Rontani, J. -F. (2000) The effect of growth temperature on the long-chain alkenes composition in the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi*. *Phytochemistry* **54**, 393-399.
- Hagino K., Okada H. and Matsuoka, H. (2005) Coccolithophore assemblages and morphotypes of *Emiliana huxleyi* in the boundary zone between the cold Oyashio and warm Kuroshio currents off the coast of Japan, *Marine Micropaleontology* **55**, 19-47.
- Rieley G., Teece M. A., Peakman T. M., Raven A. M., Greene K. J., Clarke T. P., Murray M., Leftley J. W., Campbell C. N., Harris R. P., Parkes R. J., Maxwell J. R., 1998. Long-chain alkenes of the haptophytes *Isochrysis galbana* and *Emiliana huxleyi*. *Lipids* **33**, 617-625.
- Sikes E. L. and Volkman, J. K. (1993) Calibration of alkenone unsaturation ratios (UK) for paleotemperature estimation in cold polar waters, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**, 1883-1889.
- Sikes E. L., Volkman J. K., Robertson L. G. and Pichon J. J. (1997) Alkenones and alkenes in surface waters and sediments of the Southern Ocean: Implications for paleotemperature estimation in polar regions, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **61**, 1495-1505.
- Yamamoto M., Suemune R. and Oba, T. (2005) Equatorward shift of the subarctic boundary in the northwestern Pacific during the last deglaciation. *Geophysical Research Letters* **32**, L05609.