論文

微量湿式分析による分子レベル同位体比の品質管理と確度向上: 特に天然存在比の正確な評価と Stable Isotope Probing (SIP) 法の応用に向けて*

> 高野淑識**·力石嘉人**·大河内直彦********* (2010年5月28日受付,2010年9月29日受理)

Abstract

Recent advances in the application of molecular approaches have emphasized our potentially underestimate of microbial diversity in natural environments and have revealed comprehensive biogeochemical processes. One of the biggest challenges for organic geochemists and/or microbial ecologists is to identify which organisms are carrying out a specific set of metabolic processes. To answer this fundamental question, stable isotope probing (SIP) together with compound-specific isotope analysis (CSIA) is a useful technique to understand the microbial ecology and its biogeochemical cycles. The method relies on the incorporation of a substrate that is highly enriched in a stable isotope such as ¹³C and ¹⁵N, and the identification of specific molecular targets through active microorganisms in any environment. However, we have to pay attention about highly SI-enriched contamination problems and co-elution problems during pretreatment of chemical analysis and also in chromatographic procedures, which potentially prevent us from performing precise CSIA. Here, we point out quality control by wet chemical pre-treatment for precise compound-specific isotope analysis by isotope-ratio mass spectrometry coupled to gas chromatography and liquid chromatography. Not only in biogeochemical background but also from a scope of common welfare, CSIA technique is also widely useful tools for validation approaches in food material, anti-doping test, and environmental assessment. For further precise CSIA, we also discuss representative optimized analytical conditions of some model compounds including intact polar lipids (IPLs) with its derivatives, *n*-alkane, and amino acids.

^{*}Quality control by wet chemical pre-treatment for precise compound-specific isotope analysis

^{**}独立行政法人海洋研究開発機構,海洋・極限環境生物圏領域 〒 237-0037 横須賀市夏島町 2-15 Yoshinori Takano, Yoshito Chikaraishi and Naohiko Ohkouchi: Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC)

²⁻¹⁵ Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan

^{***}東京工業大学大学院総合理工学研究科化学環境学専攻 〒 226-8502 横浜市緑区長津田 4259 Department of Environmental Science and Technology, Tokyo Institute of Technology 4259 Nagatsuda, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 226-8502, Japan

⁺²⁵⁾ Nagatsuda, White Fu, Tokonama, Kanagawa 220-0502, Japan

^{****}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

Department of Earth and Planetary Sciences, University of Tokyo

⁷⁻³⁻¹ Hongo, Tokyo 113-0033, Japan

Corresponding author. Yoshinori Takano

e-mail: takano@jamstec.go.jp, Fax: +81-46-867-9775

1. はじめに

微生物群集の構造解析や分子レベルでの生物 地球化学的プロセスの解明に向けて, 生元素の 安定同位体のラベル化による Stable Isotope Probing (SIP) 法が広く用いられるようになった (e.g., Boschker et al., 1998: Radajewski et al., 2000: Boschker and Middelburg, 2002: Radajewski et al., 2003: Dumont and Murrell, 2005: McDonald et al., 2005: Veuger et al., 2006: Evershed et al., 2006: Nomaki et al., 2008: Buhring et al., 2009: Webster et al., 2010)。標識され た分子の情報を得ることは、クロマトグラフ法を 用いて有機化合物を分離・検出し、その化合物を 同定・定量することが基本となる。低沸点化合物 では、主にガスクロマトグラフ法 (GC) およびガ スクロマトグラフ / 質量分析法 (GC/MS) が必要 になる。高沸点化合物では、主に液体クロマトグ ラフ法 (LC) および液体クロマトグラフ質量分析 法 (LC/MS) が用いられる。さらに、クロマトグラ フで分離された化合物は、オフラインまたはオン ラインの同位体質量分析 (IRMS) を行なうことで、 分子レベルの同位体比を評価することができる。 安定同位体の天然存在比の評価とともに,¹³Cや ¹⁵Nなどの同位体標識によるトレース化合物や標識 実験の評価には、分子レベル同位体比の品質管理 と確度を向上させる必要がある。では、具体的に は、どのような点に留意すれば良いのだろうか。

まず、分子レベル同位体比の評価には、目的とす る化合物の「正確なベースライン分離あるいは単 離」が基本となる。生体試料や堆積物のような多 成分系の複雑な組成を持つ試料や夾雑物の多い試 料を分析する際には、前処理法および分離・単離 の最適化は、常に引き合いに出されている。次に、 クロマトグラフ上での「共溶出 (co-elute)」の検証 が必要になることもある。共溶出とは、目的物と同 じ保持時間に目的外の化合物が同時溶出すること を指す。仮に、クロマトグラフによる共溶出がある と、「分子レベルの同位体比」という根拠が成立し ないことを意味する。有機化合物の分析では,分 子量や組成式が異なるにも関わらず,同溶出条件 下で極性が非常に近い化合物同士がオーバーラッ プするような場合に遭遇することがある。この共 溶出は、化合物の安定同位体比の評価や分子指標 の信頼性に大きな影響を与える。例えば、アミノ 酸のガスクロマトグラフ法での共溶出に関する事 例では、Nature 誌上で Engel and Macko (1997) と Pizzarello and Cronin (1998) のような議論・反論が 行われている。本稿では、分子レベル同位体比の 品質管理と確度向上を図るために、湿式分析によ る基礎的な留意点についてまとめた。主に、極性脂 質・コア脂質および位置異性体の解析、クロマトグ ラフ法と共溶出化合物の評価, クロマトグラフ法 および分光法による不純物のスクリーニング、化 学修飾による共溶出化合物の分離、溶出中の同位 体分別について、いくつかのモデル化合物と分析 の具体例を挙げ、その改善方法を考察した。本稿 で扱う内容以外でも炭素(¹³C/¹²C)・窒素(¹⁵N/¹⁴N) の分子レベル同位体比の品質管理と正確な評価 を目的とした総説 (Metges and Petzke, 1999: Hoefs, 2007: Michener and Laitha, 2007: 力石·大場, 2008: Ohkouchi et al., 2010) があるので参照されたい。

2. 試料

高分子化合物の試料は、Matreya Biochemicals LLC およびブレーメン大学海洋環境研究セン ターから入手した培養アーキア株 (*Thermoplasma acidophilum*)の脂質画分を用いた。低分子化合物 は、和光純薬から入手した*n*-アルカンおよびアミ ノ酸標準試料を用いた。陽イオン交換カラムに用 いた樹脂は、Bio-Rad 社製 AG50 W-X-8 (200-400 mesh)を用いた。海洋堆積物試料は、下北半島沖 で海洋掘削船「ちきゅう」の調査航海 (CK06-06) で採取された表層堆積物 (sec 1-1, 深度 0.5 m)を 用いた (Kobayashi et al., 2008)。

3. 分析方法

3.1. HPLC/ESI-MS および HPLC/APCI-MS

培養した Thermoplasma acidophilum の Intact polar lipids (IPLs) 画分は,液体クロマトグラフ/質量分 析計 (HPLC/MS, Agilent 1100)を用い,電子スプ レーイオン化法 (ESI, positive mode, m/z 200-2000) で分析した (Sturt et al., 2004)。化合物の分離は, LiChrospher Diol (2 × 125 mm, 5 μ m; Alltech, Deerfield, IL, USA) および同ガードカラム (4 ×7.5 mm) で行った。カラムおよびガードカラムは、カラ ムオーブン (Poralathermo) でプレヒーター 35℃、 オーブン内 30℃ に保持した。溶離液は、A: n-ヘ キサン / 2-プロパノール / ギ酸 / 14.8 mol/L アンモ ニア水 (79:20:0.12:0.04, v/v) の混合溶液、B: 2-プ ロパノール / 蒸留水 / ギ酸 / 14.8 mol/L アンモニア 水 (88:10:0.12:0.04, v/v) の混合溶液を用い、流速 0.2 mL/min で、0 分 (B液:0%) から 45 分 (B液: 65%) のグラジエントで行った。この IPLs は、ホ スファチジルグリセロール基 (Phosphatidyl glycerol-) およびグリコシル基 (Glycosyl-) を極性頭部 に持ち、GDGT (glycerol dialkyl glycerol tetraethers) をコア脂質にしていることから、IPL-GDGTs と呼 ばれる。

次に、ここで用いた IPL-GDGTs に 2 mol/L HCl/ MeOH (1:1, v/v) を用いて、塩酸メタノール分解 (acid methanolysis: 110℃, 3時間)を行い, 乾燥後, 蒸留水と n-ヘキサン / n-プロパノール (99:1, v/v) の各1mLで液 / 液抽出を3回行い. 有機相のT. acidophilum 由来のコア脂質 (Core Lipids) を精製 した。この画分をCL-GDGTsと呼ぶ。液体クロ マトグラフ / 質量分析計 (HPLC/MS, Agilent 1100) を用い、検出は大気圧化学イオン化法 (APCI, positive mode, m/z 200-2000) で行なった。分離は, Prevail Cyano (2.1 ×150 mm, 3 µm; Alltech, Deerfield, IL, USA) および同ガードカラム (4×7.5 mm) で 行った (Huguet et al., 2006)。カラムおよびガード カラムは、カラムオーブン (Poralathermo) でプレ ヒーター45℃、オーブン内40℃に保持した。溶 離液は、A: n-ヘキサン、B: n-プロパノールを用 い, 流速 0.2 mL/min で, 0 分 (B 液: 1%) から 45 分 (B液:1.8%) のグラジエント後に,55 分まで B 液10%のバックフラッシュを行った (Takano et al., 2010b)。極性溶媒によるバックフラッシュは、目 的化合物の溶出後の洗浄を意味しており、カラム 平衡化の前に行われる (e.g., Hopmans et al., 2000)。

3.2. GC/FID および GC/MS

n-アルカンおよびアミノ酸の分析は, ガスクロ マトグラフ (GC/FID; Agilent Technologies 6890) お よびガスクロマトグラフ / 質量分析計 (GC/MS; Agilent 6890N/Agilent 5973) を用いた。化合物の分 離は, キャピラリーカラム (HP-5, 30m×0.25 mm i.d.; 膜厚 0.25µm; Agilent)を用いた。*n*-アルカン 分析時のオーブン昇温プログラムは,40℃から 120℃まで10℃ min⁻¹で昇温後,6℃ min⁻¹で320℃ まで昇温し,320℃で20分間保持した。キャリ アーガスはヘリウムを用い,流速1.3 mL/min と した。電子イオン化電圧は70 eV とし,スキャン 範囲は*m/z* 40-800 とした。アミノ酸の分析条件 は,Chikaraishi et al. (2009, 2010),力石ら (2009), Takano et al. (2009) を参照されたい。

4. 結果と考察

4.1. 極性脂質と位置異性体 (レジオアイソマー) の解析

Figure 1 の培養試料 T. acidophilum 由来の IPL-GDGTs のクロマトグラムが示すように, T. acidophilum の膜脂質を構成する IPLs は, 多様な構 造を保有している。ホスファチジルグリセロール 基およびグリコシル基の極性頭部とコア脂質部分 は複数の組み合わせが可能であり, それらに対応 した異性体群 (Appendix) のシグナルが出現して いることが分かる。また, ホスファチジルグリセ ロール基とコア脂質の結合は, グリコシル基との それに比べて化学的に強く, ESI 法で開裂してい ないことが分かる。ここで見られる, 一連の減少 パターン (m/z = 2) は, コア脂質部位のシクロペ ンタン環の数に由来する (Appendix)。

極性頭部を化学的に切断して得られるコア脂 質 (CL-GDGTs) のクロマトグラムを Figure 2 に示 す。GDGTs のうち、五員環を保有しないイソプ レノイドと2,3-sn-グリセロールから構成されるカ ルドアーキオール (caldarchaeol) の他, GDGT1, GDGT2, GDGT3, GDGT4 およびその位置異性体 (regio-isomer: e.g., m/z 1307, 1309) が含まれるこ とがわかる。三次元クロマトグラムで見ると, GDGT3と保持時間がほぼ同一で、質量数が異な る未同定の GDGTs (m/z 1307, 1309)の共溶出が認 められる。各化合物の同位体組成は、preparative HPLC により各化合物をベースライン分離で分取 し、同位体質量分析計を用いて評価が可能とな る (e.g., Shah et al., 2008: Takano et al., 2010b)。例 えば, Figure 2 に示すように, 化合物 A (caldarchaeol) や化合物 B (GDGT1) の分子レベル同位体



Fig. 1. Representative total ion chromatogram of intact polar lipids (glyco- and phosphoglyco-GDGTs) from *Thermoplasma acidphilus* by HPLC/ESI-MS on positive mode. Three axis stands for retention time (min), *m/z*, intensity. See also analytical condition in Sturt et al., 2004: Rossel et al., 2008: Schubotz et al., 2009.



Fig. 2. Representative total ion chromatogram of *Thermoplasma acidphilus* after sugarcleavage treatment by HPLC/APCI-MS on positive mode. Three axis stands for retention time (min), *m/z*, intensity. Here, compound (A) and (B) indicate caldarchaeol and GDGT 1 (glycerol dialkyl glycerol tetraethers). See also analytical condition (Huguet et al., 2006) and the discussion of elution blank (Takano et al., 2010b: Ogawa et al., 2010). 比は、この分離条件で評価できる。しかし、この *T. acidophilum* 試料の場合、GDGT3 や GDGT4 の 保持時間には、高質量側に共溶出する異性体化合 物 (*m*/*z* 1307, 1309) があるため、両者を別の方法 で再分離しなければ、それぞれの分子レベル同 位体比を評価することができない。HT-GC (High-Temperature GC) による分離で、CL-GDGTsを直接 オンラインで同位体質量分析計に導入する方法も 検討されている (Pancost et al., 2008)。

実際の環境中には、多種多様な微生物が存在 するため、共溶出する IPLs の定性・定量評価は、 SIM (Selected ion monitoring) や後述する MS density map の併用が望ましい (e.g., Rossel et al., 2008: Schubotz et al., 2009: Lipp and Hinrichs, 2009)。ま た、堆積物中では、IPL-GDGTs と CL-GDGTs が 共存している。それらを正確に識別する一つの方 法として、ここで示した HPLC/ESI-MS と HPLC/ APCI-MS の分析方法を組み合わせることにより、 各々 IPL-GDGTs と CL-GDGTs の定量評価、Ring Index 評価等が可能になる。

4.2 クロマトグラフ法と共溶出化合物の評価

4.2.1 同位体ラベルした化合物の共溶出と確度保証 今回用いた T. acidophilum は、天然存在比の

¹²C-, ¹⁴N-栄養基質で培養したものである。¹³C-基 質や¹⁵N-基質を用いて培養した場合は, ラベル基 質から二次的に生成した多くの未知¹³C-化合物や ¹⁵N-化合物が混入しているため,「クロマトグラ ム上には現れない化合物」の存在に留意する必要 がある。クロマトグラム上には現れない化合物と は, DAD (Diode Array Detector)の場合,吸収を持 たない化合物が相当する。MS の場合,検出可能 なレンジ以外の質量範囲の化合物(微少分子量お よび高分子量)が相当する。このようなDAD およ びMS の弱点を補填できる検出法の一つは, ELSD (Evaporative Light Scattering Detector) である。

また,HPLCのカラムと高親和性で未知の¹³C-化合物が,カラムにトラップされて,連続的ある いは不連続的に溶出するような場合もある。未知 の¹³C-化合物が前処理で100%除去できる保証, ガードカラムに100%トラップ可能である保証は 無いと考えた方が良い。したがって,preparative HPLCのように分画後に濃縮が必要な場合は,溶 出条件のバックグラウンド値の評価, 試薬溶媒に 元来含まれている微量残留添加物のクロスチェッ クを必要とする。目的以外の化合物が, 混入して いないことを示すには, elution blank として目的 化合物を挟み打ちするように (Figure 2), その保 持時間のバックグラウンドを評価すれば反証がで きる。また, 目的化合物を単離した後に, 核磁気 共鳴スペクトル法 (¹H-, ¹³C-NMR)を用いれば, 純 度決定がより確実になる。有機化合物の NMR 測 定の場合, 重溶媒の使用が一般的であり, 重水素 と極性官能基との間の置換反応は, 非常に速やか に進行してしまう。このため, 交換可能なプロト ンが, 重水素と置換され, その部位のプロトンの シグナルが¹H-NMR上で消失することに留意する 必要がある (竹内・西川, 2004)。

ここで、研究対象の目的化合物カルドアーキ オール (caldarchaeol: Cs6H172O6) が 1.0 nmol あると 仮定する。真の値 δ^{13} C⁽¹⁾caldarcheaol = -20‰ (vs. PDB) の時、ラベル化された ¹³C-DIC (dissolved inorganic carbon: δ^{13} Cbic = 1000, 2000, 4000, 8000‰) が、 0.001-10 nmol (共溶出量: Zbic nmol) 混入すると、 前後のマスバランスから混入後の見かけ上の値 δ^{13} C⁽²⁾caldarcheaol は、

 $(86 + Z_{\text{DIC}}) \ x \ \delta^{13} \text{C}^{(2)}_{\text{caldarcheaol}}$ $= 86 \ x \ \delta^{13} \text{C}^{(1)}_{\text{caldarcheaol}} + Z_{\text{DIC}} \ x \ \delta^{13} \text{C}_{\text{DIC}}$

と示される。

 $\Delta^{13}C_{caldarcheaol} = \delta^{13}C^{(2)}_{caldarcheaol} - \delta^{13}C^{(1)}_{caldarcheaol}$

であるから,真の δ^{13} C⁽¹⁾caldarcheaol との差 (Δ^{13} Ccaldarcheaol) の理論曲線は,Figure 3 のようになる。同位体質量 分析計での δ^{13} Ccaldarcheaolの測定誤差を±0.5‰とする と,混入した¹³C-DIC が 8000‰ の場合,0.1% オー ダーの共溶出量でも真の値とのずれは、しだいに 顕著になることが分かる。

4.2.2 エナンチオ過剰率と共溶出の検証

4.2.1 で述べた共溶出の検証は、エナンチオ過剰 率 (Enantiomeric Excesses: *ee*)のように相対比を 評価する分析でも重要である。Figure 4 にエナン チオ過剰率のモデル化合物として D-アミノ酸 (存 在量比 50.0%), L-アミノ酸 (存在量比 50.0%)の 例を示す。各存在量比は 50.0% の場合、



Fig. 3. Theoretical diagram between $\Delta^{13}C_{caldarcheaol}$ (difference between original isotopic composition and co-eluted ¹³C-DIC) and additional mixing rate of ¹³C-DIC. Here, original $\delta^{13}C_{caldarcheaol}$ is defined as -20% with the amount of 1 nmol.

Enantiomeric Excesses (*ee*) = $(|L - D|) / (|L + D|) \times 100$ = |L% - %D|= 0.0 %

である。ここで, Figure 4 に示すように L-アミノ 酸の検出強度に対して,同じ保持時間に共溶出す る化合物の割合を Z % とすると,真の ee と見か け上の ee の差 (Δee) は,

 $\Delta \text{ Enantiomeric Excesses } (\Delta ee)$ = | (L% + Z) - (%D - Z) | = 2 Z %

となる。したがって、分析の測定誤差を $\pm 0.2\%$ と すると、共溶出量 0.2% でも真の値とのずれ (Δee) は有意になり、誤った評価が行われてしまう可 能性がある (e.g., Engel and Macko, 1997: Pizzarello and Cronin, 1998)。

4.3. クロマトグラフ法および分光法による不純物 のスクリーニング

n-アルカン (*n*-C₁₅ - C₃₀) の GC/MS による分離を Figures 5&6 に示す。ガスクロマトグラフに接続さ れているキャピラリーカラムの劣化や不純物の混 入などがあった場合,クロマトグラフを三次元で 可視化すると目的外化合物の判別が容易になる。 Figure 5 では,おそらくカラムブリードに起因する







Fig. 4. An example of co-eluted unknown compound overwrapping signal on L-amino acid. (a) separation model of pristine original D-, L-amino acids in base-line resolution (without co-elution), (b) co-elution with L-amino acid on same retention time, (c) theoretical diagram between Δ*ee* (difference of enantiomeric excess) caused by co-elution compound.

m/z 207, *m/z* 281 の未知化合物が高温側でブリー ディングしていることが分かる。Figure 5を二次元 の MS density map にすると, Figure 6-(b) になる。

Figure 6 には, (a) 不純物の無いガスクロマトグ ラムの分離例, (b) 不純物 (▼) のあるガスクロマ トグラムの分離例を示す。ここで目的とする化合 物 (•: *n*-アルカン) の絶対量に対して,目的外化 合物 (▼ およびブリード化合物)の混入の相対量 が多い場合,目的化合物の同位体比の評価は難し くなる。このため,試料に夾雑化合物がある場合, その前処理・後処理の最適化とともに,その後の ガスクロマトグラフ法によるブリーディングの少 ない分離条件を最適化する必要がある。



Fig. 5. GC/EI-MS chromatogram of *n*-alkane (*n*-C₁₅ to *n*-C₃₀). Three axis stands for retention time (min), *m/z*, intensity. Two column breed signals were observed.



Fig. 6. Density map of GC/EI-MS chromatogram of *n*-alkane (*n*-C₁₅ to *n*-C₃₀). Two axis stands for retention time (min) and *m/z* with color contour showing intensity. (a) pristine *n*-alkane separation without any impurities, (b) *n*-alkane separation with impurities and bleeding compounds showing also in Figure 5.

4.4. 化学修飾による共溶出化合物の分離

極性が非常に良く類似した共溶出化合物の場 合.いずれかの化合物を化学修飾することによ り、分離することができる。例えば、前述のアー キア株 Thermoplasma acidophilum は、ユーリアー キオータ門 (Eurvarchaeota) であるが. クレン アーキオータ門 (Crenarchaeota) の一部には、Appendix に示すような五員環と六員環を分子内に もつ crenarchaeol (Sinninghe Damsté et al., 2002) や crenarchaeol regio-isomer を保有するものがいる。 特に有光層以深を好む海洋性クレンアーキオー タ (e.g., Karner et al., 2001) からよく見出され、陸 水環境から検出されることもある (Pearson et al., 2004)。この crenarchaeol は、海洋の水柱だけで なく堆積物中にも幅広く存在することが知られる ようになった (e.g., Ingalls et al., 2006; Turich et al., 2007; Lipp and Hinrichs, 2009)。この化合物は.光 合成色素に由来する Pyropheophytin a (P Phe a) と 極性が類似しており、順相クロマトグラフ法によ る分離の場合、保持時間がオーバーラップする ことがある。このような場合, P Phe a に銅をキ レート配位することによって (Figure 7), 化合物 の極性を意図的に変え、その結果として保持時間

差が生じ,各々の化合物の同位体比を評価できる (Takano et al., 2010b)。

天然界には、このような脂質成分のレジオアイ ソマー (regio-isomer) の他, D-体と L-体のアミノ 酸のようにエナンチオマー (enantiomer) が存在す る。D-体とL-体アミノ酸は、極性が同一である ため、通常の分析方法では、シグナルは一つにな る。このようなエナンチオマーの場合、双方のア ミノ酸をジアステレオマー化することにより、分 離することができる。あるいは、立体的配向性の ある固定相のあるキラルカラムで分離することが できる。前者の場合. Figure 8 のように (S)-また は (R)-の光学活性試薬を用いれば (例えば,光学 活性アルコールなど), 溶出順序を D-体 →L-体ま たはL-体→D-体と意図的にコントロールできる (Takano et al., 2009)。後者の場合,昇温条件とカ ラムの選定によって溶出順序が D-体→L-体また は L-体→D-体と変わる場合がある (Levkin et al., 2007)。これらの光学分割法と同位体質量分析法 を組み合わせることで、各々の立体異性体分子レ ベルでの同位体的均質性・不均質性の評価という 新しい分子診断法が確立できる。



Fig. 7. Intercalation reaction between pyropheophytin *a* (PPhe *a*) and its copper derivatives obtained following treatment with saturated copper acetate dissolved in acetone. The UV/VIS absorbance is shown before and after the intercalation reaction.

4.5. クロマトグラフ法における溶出中の同位体分別

クロマトグラフ法でベースライン分離ができな い場合,軽元素の同位体組成が真の値と異なる 場合がある (e.g., Hare et al., 1991: Filer, 1999: Smittenberg and Sachs, 2007)。主な理由は,(i)目的化 合物の回収率が低い場合や不十分な分離などによ り,溶出時間により同位体比が変動するためであ る。その一例として,アミノ酸の一種グリシンを 使った検証例を Figure 9 に示す。グリシンには, アミノ基に窒素が一つ含まれる。その窒素同位体 比は,イオン交換クロマトグラフ法のある溶出条 件下では,最大で 31.1‰ (vs. Air)の同位体分別が ある (Hare et al., 1991)。同様に,分子内に2つ含 まれる炭素は,最大で 1.5‰ (vs. PDB)の同位体分 別がある。このため,目的化合物であるグリシン の真の同位体比は,溶出したピークをベースライ

(a) D-, L-amino acids with S-(+)-2-butanol



Retention time	(min)

Fig. 8. Derivatization of amino acid diastereomers by optically active (S)-(+)-2-butanol or (R)-(-)-2-butanol with pivaloyl chloride to produce N-pivaloyl-(R, S)-2-butyl esters (NP/2Bu). Representative schemes: (a) D-alanine is first elution when we use (S)-(+)-2-butanol, and (b) L-alanine is first elution when we use (R)-(-)-2-butanol (Takano et al., 2009). Here, the molar fraction was D-alanine : L-alanine = 5 : 95.

ン上で確実に、完全な回収を行なう必要がある。

次に,(ii)カラム樹脂と溶質との間で,吸着・ 脱着の相互作用の際に同位体分別が起きることが ある。例えば,イオン交換クロマトグラフ法は, 誘導体化の反応阻害になるような夾雑物が多い試 料(化石試料,岩石試料,堆積物試料)の前処理 として有効な手法であるが,分子レベルでの同位 体分別(Evershed et al., 2007 and the references cited therein)を生じる。これと類似した現象は,ガス クロマトグラフ法の一部のキャピラリーカラムで も知られている(Chikaraishi et al., 2010)。

(i), (ii) の理由から,最も信頼性の高い分子レ ベル同位体比を得るためには、ベースライン分離 かつ高回収率であることが第一の必須条件と言え る。ただし、高回収率であれば同位体比が真の 値と整合的である保証はなく、各分析ラインでの 確度検証 (e.g., Chikaraishi et al., 2010) が必要であ る。Figure 10 に、タンパク性および非タンパク 性アミノ酸を陽イオン交換クロマトグラフ法(樹 脂:Bio-rad AG50 W-X-8, 200-400 mesh)で処理し た際の各分子レベル安定同位体比を示す。GC/ FID で求めたこの前処理法によるアミノ酸の回収 率は、94.3±11.4% (mean, n=3)であり、カラムを 通す前後の δ^{15} Namino acids を比較する理想直線(1:1) との誤差(Δ^{15} N)は、最大で 0.3‰ (mean = 0.02‰) である(Takano et al., 2010a)。この方法により、化



Fig. 9. Carbon and nitrogen isotopic fractionation during the separation of glycine from an ion exchange column. A 50mg quantity of glycine was loaded onto the ion exchange column chromatograph. Fractions were collected across the peak. Modified from Hare et al., 1991.

石, 堆積物, 岩石などの硬組織に保存されてい る生物起源アミノ酸を分画・精製が可能になり, 様々な生物地球化学試料へ応用できる。

謝 辞

培養アーキア株 (Thermoplasma acidophilum) 試 料の一部は, ブレーメン大学 Yu-Shih Lin 博士から 提供された。ブレーメン大学の Kai-Uwe Hinrichs 博士,海洋研究開発機構の小川奈々子博士, 筑波 大学の野本信也博士には,分析上のアドバイスを 頂いた。著者らは,ゲスト編集委員の大場康弘 博士(北海道大学)から執筆の機会を与えて頂い た。本稿は,山本正伸博士(北海道大学)および一 人の匿名者から査読を受けた。本研究の一部は, 科学研究費補助金(Y.T., Y.C., N.O., 19GS0211) に よって行われた。





Fig. 10. Verification of data consistency prior to (without) and following cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}N$, ∞ vs. air). The resin we used was Bio-rad AG50 W-X8 (200-400 mesh). Standard AA mixtures including protein (lower plot line) and non-protein (upper plot line) were used. Gly, glycine; Leu, leucine; Ile, isoleucine; Met, methionine; Sar; sarcosine; β -Ala, beta-alanine; Ala, alanine; Asp, aspartic acid; Thr, threonine; Pro, proline; 2-AAA, 2-aminoadipic acid; Ser; serine; Glu, glutamic acid; Val, valine; Phe, phenylalanine; 3-AiBA, 3-aminoisobutyric acid; Ile, isoleucine; Hyp, hydroxyproline; 2-ABA, 2-aminobutyric acid. Modified from Takano et al., 2010a.

引用文献

- Boschker H., Nold S., Wellsbury P., Bos D., De Graaf W., Pel R., Parkes R., Cappenberg T. (1998) Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labelling of biomarkers. *Nature*, **392**, 801-805.
- Boschker H., Middelburg J. (2002) Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *FEMS Microbiol*ogy Ecology, **40**, 85-95.
- Buhring S.I., Smittenberg R.H., Saches D., Lipp J.S., Golubic S., Sachs J.P., Hinrichs K.-U., Summons R.E. (2009) A hypersaline microbial mat from the Pacific Atoll Kiritimati: insights into composition and carbon fixation using biomarker analyses and a ¹³C-labeling approach. *Geobiology*, 7, 308-323.
- カ石嘉人,大場康弘 (2008) ガスクロマトグラフ /
 同位体比質量分析計による分子レベル安定同位
 体比分析法. Researches in Organic Geochemistry,
 23/24, 99-122.
- Chikaraishi Y., Ogawa O.N., Kashiyama Y., Takano Y., Suga H., Tomitani A., Miyashita H., Kitazato H., Ohkouchi N. (2009) Amino acid trophic level (ATL): elucidation of aquatic food web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 740-750.
- 力石嘉人,高野淑識,大河内直彦 (2009) アミノ酸 (ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体)の GC/MS による解析. Researches in Organic Geochemistry, 25, 61-70.
- Chikaraishi Y., Takano Y., Ogawa N.O., Ohkouchi N. (2010) Instrumental optimization for compoundspecific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Earth, Life and Isotopes* (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, K. Koba), Kyoto Univ Press. pp. 365-386.
- Dumont M., Murrell J. (2005) Stable isotope probinglinking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 499-504.
- Engel M.H., Macko S.A. (1997) Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Mur-

chison meteorite. Nature, 389, 265-268.

- Evershed R., Crossman Z., Bull I., Mottram H., Dungait J., Maxfield P., Brennand E. (2006) ¹³C-labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Current opinion in biotechnology*, **17**, 72-82.
- Evershed R. P., Bull I. D., Corr L. T., Crossman M. Z., Van Dongen B. E., Evans C. J., Jim S., Mottram H. R., Mukherjee A. J., Pancost R. D. (2007) Stable isotopes in ecology and environmental science (edited by R. Michener & K. Lajtha), Blackwell Publishing, p. 508.
- Filer, C. (1999) Isotopic fractionation of organic compounds in chromatography. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals*, **42**, 169-197.
- Hare P, Fogel M, Stafford T, Mitchell A., Hoering T. (1991) The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. Journal of Archaeological Science, 18, 277-292.
- Hopmans E.C., Schouten S., Pancost R.D., van der Meer M.T.J., Sinninghe Damsté J.S. (2000) Analysis of intact tetraether lipids in archaeal cell material and sediments by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14, 585-589.
- Huguet C., Hopmans E.C., Febo-Ayala W., Thompson D.H., Sinninghe Damsté J.S., Schouten S. (2006) An improved method to determine the absolute abundance of glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids. Organic Geochemistry, 37, 1036-1041.
- Hoefs J. (2007) Stable Isotope Geochemistry, Springer. 翻訳本は, J. ヘフス著 (和田秀樹・服部陽子 訳) 同位体地球化学の基礎. Springer Japan.
- Ingalls A., Shah S., Hansman R., Aluwihare L., Santos G., Druffel E., Pearson A. (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 6442-6447.
- Karner M.B., DeLong E.F., Karl D.M. (2001) Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature*, **409**, 507-510.
- Kobayashi T., Koide O., Mori K., Shimamura S., Mat-

suura T., Miura T., Takaki Y., Morono Y., Nunoura T., Imachi H. (2008) Phylogenetic and enzymatic diversity of deep subseafloor aerobic microorganisms in organics-and methane-rich sediments off Shimokita Peninsula. *Extremophiles*, **12**, 519-527.

- Levkin P.A., Levkina A., Czesla H., Schurig V. (2007) Temperature-induced inversion of the elution order of enantiomers in gas chromatography: *N*-ethoxycarbonyl propylamides and *N*-trifluoroacetyl ethyl esters of alpha-amino acids on Chirasil-Val-C-11 and Chirasil-Dex stationary phases. *Analytical Chemistry*, **79**, 4401-4409.
- Lipp J.S., Hinrichs K-U. (2009) Structural diversity and fate of intact polar lipids in marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **73**, 6816-6833.
- McDonald I.R., Radajewski S., Murrell J.C. (2005) Stable isotope probing of nucleic acids in methanotrophs and methylotrophs: A review. Stable isotope applications in methane cycle studies. *Organic Geochemistry*, **36**, 779-787.
- Metges C.C., Petzke J.K. (1999) The use of GC-C-IRMS for the analysis of stable isotope enrichment in nitrogenous compounds. In *Methods for investigation of amino acid and protein metabolism*. CRC press LCC, Florida, USA., 121-132.
- Michener R., Lajtha K. (2007) Stable isotopes in ecology and environmental science. Blackwell Publishing.
- Nomaki H., Ogawa N.O., Ohkouchi N., Suga H., Toyofuku T., Shimanaga M., Nakatsuka T., Kitazato H. (2008) Benthic foraminifera as trophic links between phytodetritus and benthic metazoans: carbon and nitrogen isotopic evidence. *Marine Ecology-Progress Series*, **357**, 153-164.
- Ogawa O.N., Nagata T., Kitazato H. & Ohkouchi N. (2010) Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses. *Earth, Life, and Isotopes* (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba), Kyoto University Press. 339-353.
- Ohkouchi N., Tayasu I., Koba K. (2010) *Earth, Life, and Isotopes.* Kyoto University Press.
- Pancost R.D., Coleman J.M., Love G.D., Chatzi A., Bouloubassi I., Snape C.E. (2008) Kerogen-

bound glycerol dialkyl tetraether lipids released by hydropyrolysis of marine sediments: A bias against incorporation of sedimentary organisms? *Organic Geochemistry*, **39**, 1359-1371.

- Pearson A., Huang Z., Ingalls A.E., Romanek C.S., Wiegel J., Freeman K.H., Smittenberg R.H., Zhang C.L. (2004) Nonmarine crenarchaeol in Nevada hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5229-5237.
- Pizzarello S., Cronin J.R. (1998) Alanine enantiomers in the Murchison meteorite. *Nature*, **394**, 236-236.
- Radajewski S., Ineson P., Parekh N., Murrell J. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, **403**, 646-649.
- Radajewski S., McDonald I., Murrell J. (2003) Stableisotope probing of nucleic acids: a window to the function of uncultured microorganisms. *Current opinion in biotechnology*, 14, 296-302.
- Rossel P.E., Lipp J.S., Fredricks H.F., Arnds J., Boetius A., Elvert M., Hinrichs K-U. (2008) Intact polar lipids of anaerobic methanotrophic archaea and associated bacteria. *Organic Geochemistry*, **39**, 992-999.
- Schubotz F., Wakeham G. S., Lipp J.S., Fredricks H.F., Hinrichs K-U. (2009) Detection of microbial biomass by intact polar membrane lipid analysis in the water column and surface sediments of the Black Sea. *Environmental Microbiology*, **11**, 2720-2734.
- Shah S.R., Mollenhauer G., Ohkouchi N., Eglinton T.I., Pearson A. (2008) Origins of archaeal tetraether lipids in sediments: Insights from radiocarbon analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**, 4577-4594.
- Sinninghe Damsté J.S., Schouten S., Hopmans E.C., van Duin A.C.T., Geenevasen 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.
- Smittenberg R., Sachs J. (2007) Purification of dinosterol for hydrogen isotopic analysis using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1169**, 70-76.
- Sturt H.F., Summons R.E., Smith K., Elvert M., Hin-

richs K-U. (2004) Intact polar membrane lipids in prokaryotes and sediments deciphered by highperformance liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometry - new biomarkers for biogeochemistry and microbial ecology. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 617-628.

- Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa O.N., Kitazato H., Ohkouchi N. (2009) Compound-specific nitrogen isotope analysis of D-, L-alanine and valine: application of diastereomer separation to δ^{15} N and microbial peptidoglycan studies. *Analytical Chemistry*, **81**, 394-399.
- Takano Y., Kashiyama Y., Ogawa O.N., Chikaraishi Y., Ohkouchi N. (2010a) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compoundspecific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2317-2323.
- Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa O.N., Nomaki H., Morono Y., Inagaki F., Kitazato H., Hinrichs K-U., Ohkouchi N. (2010b) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea. *Nature Geo-science*, **3**, 858-861.
- 竹内敬人,西川実希 (2004) 有機化学のための高 分解能NMR テクニック. 講談社サイエンティフィック.
- Turich C., Freeman K.H., Bruns M.A., Conte M., Jones A.D., Wakeham S.G. (2007) Lipids of marine Archaea: Patterns and provenance in the water-column and sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 3272-3291.
- Veuger B., van Oevelen D., Boschker H.T.S., Middelburg J.J. (2006) Fate of peptidoglycan in an intertidal sediment: An in situ ¹³C-labeling study. *Limnology* and Oceanography, **51**, 1572-1580.
- Webster G., Rinna J., Roussel E., Fry J., Weightman A., Parkes R. (2010) Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK revealed by stableisotope probing. *FEMS microbiology ecology*, **72**, 179-197.













GDGT (3)



GDGT (4)



GDGT (5): crenarchaeol, where X, X'=H

GDGT (5)': crenarchaeol regio-isomer, where X, X'=H

X, X': -H (CL-GDGTs) or -polar head group (IPL-GDGTs)



Appendix. Representative structures of archaeal tetraethers detected in marine environment. Their regioisomers are not shown (e.g., crenarchaeol regio-isomer). X, X' denote polar head group.