

HPLC による海水中の超微量溶存アミノ酸分析

所属 大気海洋研究所 共同利用共同研究推進センター 陸上研究推進室

発表者 早乙女 伸枝

saotome@aori.u-tokyo.ac.jp

1. はじめに

海水中に生息する細菌等からなる微生物群集は溶存有機物を主な栄養源としています。その代表的な物質のひとつにアミノ酸があります。微生物群集は、利用可能な有機物の乏しさから溶存している有機物のみならず、アンモニアやリン酸などの無機物も取り込むことで増殖に必要な構成成分を獲得していますが、タンパク質の合成系に直接利用可能な溶存態のアミノ酸は、エネルギー効率の点から、主要な栄養源になっていると考えられます。そのため海水中のアミノ酸濃度や組成を調べることは、海洋における微生物群集の生態を理解する上で重要です。

しかし、アミノ酸は栄養価値が高く、海水中では微生物等に迅速に取込まれてしまうため、濃度が著しく低く、測定が極めて難しい物質でもあります。これまで配属されていた研究室では、海洋における炭素や窒素といった生物由来の元素やその循環メカニズムに関わる研究が進められており、その中で私は海水中の溶存アミノ酸の分析を担当していました。所属が変わった現在も同様の業務を続けており、その技術の一端を御紹介します。

2. HPLCとは？

アミノ酸の分析には HPLC という装置を使った分析が一般的です。HPLC とは、**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography の略で、高速液体クロマトグラフィーと呼ばれます。混合物を成分ごとに分離し、各成分の濃度を定量するシステムです。装置は送液部（ポンプ）、試料導入部（マニュアルインジェクター／オートサンプラー）、分離部（カラム）、検出部（検出器）から成ります（図1）。

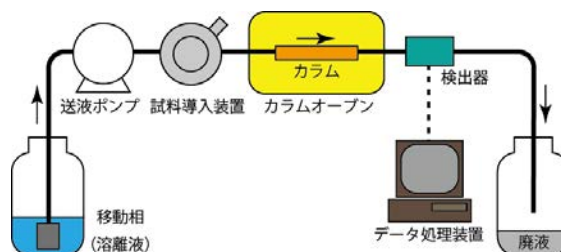


図1. HPLCの主要構成単位

試料中に含まれる測定対象成分の分離原理は比較的単純です（図2）。溶液状の試料を装置に導入すると、試料は送液部から送られた溶離液によって分離部に送られます。分離部にあるカラムで、溶離液中の測定対象成分はカラム充填物の固相と相互作用し、溶離液（移動相）とカラム固相との間の親和性の違いによって成分ごとに溶出の速度が変わります。検出部で溶出成分をリアルタイムにモニターし、分離された対象成分の溶出時間から成分を同定し、検出強度からその濃度を知ることができます。この分析方法は一般的に広く普及しており、様々な物質の分離定量に利用されています。アミノ酸分析専用の HPLC システムも市販されています。

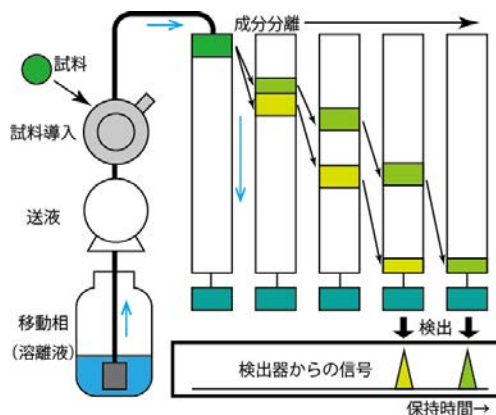


図2. HPLCによる分画の概念

HPLC 分析で最も重要になるのはカラムの選別です。カラムによる分離には様々な種類があります。今回は、私がアミノ酸分析で

利用している逆相カラムクロマトグラフィーと呼ばれる方法を紹介します。代表的なカラムは ODS カラムです。オクタデシルシリル(Octa Decyl Silyl) 基を表面に修飾した化学結合型多孔性球状シリカゲルを固定相として試料中の対象成分との疎水性相互作用を利用します。水等を溶媒とした極性の高い溶離液に試料を導入し ODS カラムに到着すると、試料中の極性の低い（水に溶けにくい）成分は選択的にカラムに吸着します。そこに有機溶媒の混合比を上げ、極性を徐々に下げた溶離液を流していくと、カラムに吸着した成分が極性の差に従って順番に溶離していきます。このように2種類の溶離液の混合比を変化させて溶離させる方法をグラジエント溶出法といいます。アミノ酸の分析にはこの方法を利用します。

3. アミノ酸とは？

アミノ酸とは、同一分子内にアミノ基とカルボキシル基の両方の官能基を持つ有機化合物の総称です。基本構造を図3に示します。側鎖 R には複数種あり、これがアミノ酸の種類を決めています。例えば、カルボキシル基を含んだ側鎖を持つアミノ酸の代表としてグルタミン酸があり、調味料の“味の素”の主成分として有名なように、旨味成分としてよく知られています。アミノ酸はタンパク質の構成成分でもあり、約20種類のアミノ酸がそれに含まれています。生物には体内で合成できるアミノ酸と、栄養分として外部から摂取

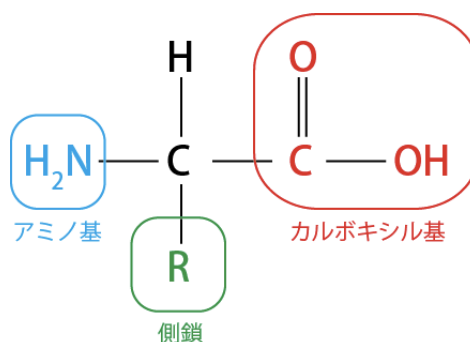


図3. アミノ酸の基本構造

しなければならぬアミノ酸（必須アミノ酸）があり、ヒトの必須アミノ酸としてメチオニンやロイシンなど9種類が知られています。このようにアミノ酸には多くの種類が存在しますが、それらの側鎖の極性の差を利用することにより、HPLC システムを用いて分離定量することができます。

4. HPLCによる海水中の溶存アミノ酸分析

海水中の溶存アミノ酸分析には多くの困難を伴います。それは二つの大きな問題があるためです。まず、現場海水中の濃度が非常に希薄であること、そしてアミノ酸が非常にコンタミネーション（外部からの汚染）を受け易い物質であることです。信頼できるデータを得るためには、少なくとも両者の問題を克服する必要があります。

濃度の問題改善には、①サンプルの濃縮、②検出感度の向上が対処法として考えられます。しかし、海水試料の場合、蒸発等により濃縮すると海水中の塩が析出し、その後の分析操作が著しく阻害されます。そこで、現在では検出感度を向上させる方法が一般的ですが、その場合、後者の問題であるコンタミネーションの影響を排除することが重要となります。私たち自身の身体の大部分がタンパク質（アミノ酸）から出来ているように、通常の実験環境下には、海水中に含まれる超微量のアミノ酸濃度に対し極めて多量のアミノ酸が存在しており潜在的な汚染源となります。私たちのグループでは、検出感度の問題を、プレラベル蛍光法という手法を導入することにより解決し、コンタミネーションの問題をクリーン技術を徹底することで最低限に抑えることに成功し、海水中の超微量アミノ酸の測定方法を確立させました。

高感度の分析手法は1979年に Mopper と Lindroth により考案された方法¹⁾に改良を加えて研究室独自のメソッドを作製しました。Mopper らの方法とは、「アミノ酸をアルカリ性下でオルトフタルアルデヒドと反応させて蛍光誘導体化し、蛍光検出器で検出する」というものです。この方法では数~10 nmol/L という低濃度でも検出が可能です。ただ、この方法では第一級アミノ酸しか検出できず、また、反応開始後、時間とともに蛍光強度が変化するため、試薬を加えてから検出するまでの時間が一定であることが必要となります。反応試薬を加えるところから試料の導入ま

をオートサンプラーで自動的に行うことで、この時間を一定にすることが容易に出来ます。このようにして多種類のアミノ酸を検出しています。私たちはこのような方法で【1】溶存遊離態アミノ酸と【2】溶存結合態アミノ酸を分析可能にしました。

【1】溶存遊離態アミノ酸の場合：海水サンプル1～2ml に水酸化ナトリウムで pH を 12 に調整したホウ酸・クエン酸（それぞれ 1 mol/l）緩衝液を 10 ～ 20 μ l 加えます。これに OPA 試薬（オルトフタルアルデヒド：0.1 g、2-メルカプトエタノール：100 μ l、メタノール：2 ml、ホウ酸・クエン酸緩衝液：0.5 ml、超純水：1.5 ml）を 20 μ l 加えて蛍光誘導体化し、HPLC で分離後、蛍光検出器で検出します。OPA 試薬をサンプルに加えて混合し HPLC に導入する操作は、オートサンプラーで行います。

【2】溶存結合態アミノ酸の場合：試料を加水分解して遊離アミノ酸の状態にする必要があります。一般的な 6N HCl を加えて 110°C で 12 ～ 24 時間加熱する方法では、塩酸からのコンタミネーションが無視できない程度であるため、気相加水分解²⁾を採用しています。具体的な方法は下記の通りです。まずサンプルを容量が 1～2ml 程度の小さい容器（容器 A）に 100 ～ 600 μ l 入れ、50°C のバキュームオーブンで乾固させます。次に、容量が 15 ～ 20 ml 程度の容器（容器 B）に 0.1% フェノール 7N HCl とトリフルオロ酢酸を 9：1 で混ぜたものを 175 μ l 加えます。この試薬を入れた容器 B にサンプルを乾固させた容器 A を入れます。容器 A を入れた容器 B を真空ラインにつないで減圧と窒素導入を 3 回程度繰り返して出来るだけ酸素を除去し、減圧した状態で容器 B を密閉させます。この容器を 158°C で 30 分程度加熱します。このようにすることで、容器 B に入っている試薬の蒸気だけが乾固したサンプルに接触して、加水分解させることができます（図 4）。この時、試薬中に微量のアミノ酸が混入していても、ほとんど蒸気にならないためコンタミネーションが起りにくくなります。加熱後、放冷してから容器 A を取り出し、デシケーターに入れ、

水流アスピレーターで減圧してサンプルの容器に付着した酸を除去します。酸を除去したサンプル容器に超純水 1 ～ 2 ml を 3 回に分けて添加して抽出します。この抽出液を遊離態アミノ酸の分析と同様に HPLC で測定します。

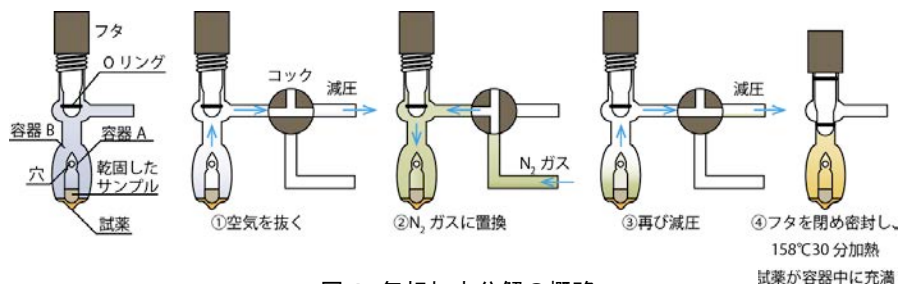


図 4. 気相加水分解の概略

5. 結果の一例

海水中のアミノ酸分析の一例として、1997 年の白鳳丸航海（航海番号 KH-97-2）（図 5）で採水されたサンプルでの測定結果を紹介します。遊離態及び結合態のアラニンについて深度分布を示します（図 6）。

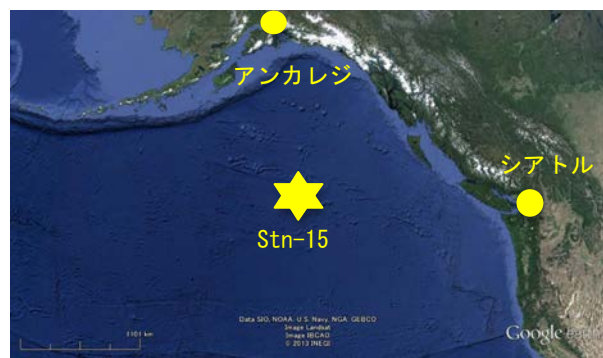


図 5. 採水地点 (KH 97-2, Stn-15)
(採水日：1997 年 8 月 8 日)

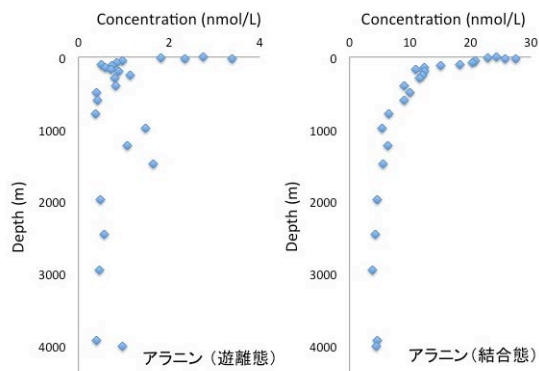


図 6. 遊離態及び結合態アラニンの深度分布
(KH 97-2, Stn-15)

アミノ酸の種類によって蛍光強度に違いがあり、検出限界等も異なりますが、だいたい数~10 nmol/L の変動を捉えることが出来ます。アラニンの場合、深度分布から分かりますように、1 nmol/L 未満の差を検出することが可能です。

6. 今後の課題と展望

今年度から UHPLC と呼ばれる装置（図7）が導入され、今までよりも分析時間を短縮することが可能になりました。UHPLC の「U」は Ultra の略で、UHPLC が HPLC よりも更に高圧に耐えられる装置であるため、このように呼ばれています。これまで1測定に45分程度の時間を要していましたが、15分程度まで短縮できる見込みとなりました。また、今まで使用していた装置に比べて、感度や分離も向上できそうです。

それから、溶存結合態アミノ酸測定の前処理には非常に手間がかかりますが、ひとつの容器で10サンプルまで同時に加水分解できる器具が装置メーカーによって開発されたので、それを改良して加水分解の作業効率を上げたいと考えています。

今後とも、より信頼性や効率などが良くなるよう工夫を重ね、分析技術の向上を目指していきたいと思えます。



図7 UHPLC の写真

7. 謝辞

今回の発表にあたり、大気海洋研究所・陸上研究推進室の皆さん、生元素動態分野及び沿岸保全分野の先生方に大変お世話になりました。技術職員になって以来、このような場での発表は全く初めてでしたが、様々なご教示や励ましをいただきました。ここに深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Lindroth, P. and Mopper, K. 1979. Anal. Chem., 51: 1667-1674
- 2) Tsugita, A., Uchida, T., Mewes, H. W. and Ataka, T. 1987. J. Biochem., 102: 1593-1597