

総説

安定同位体利用技術

イオントラップ型質量分析を導入した 海洋微細藻類の脂質メタボローム解析

大井信明，白岩善博

Reprinted from
RADIOISOTOPES, Vol.64, No.4
April 2015



Japan Radioisotope Association
<http://www.jrias.or.jp/>

総 説



安定同位体利用技術

イオントラップ型質量分析を導入した 海洋微細藻類の脂質メタボローム解析

大井信明*, 白岩善博†

筑波大学生命環境系; JST/CREST**

305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

†emilhux@biol.tsukuba.ac.jp

微細藻類を用いたバイオ燃料創出のための技術開発が精力的に行われている。その実現のためには、オイル含有量の高い新規微細藻類株の自然界からの単離、培養条件の最適化によるオイル生成速度と蓄積量の増大、遺伝子工学や代謝工学による有用燃料脂質の合成能の向上や代謝改変技術の確立等を実現する必要がある。そのためには、微細藻類の有用脂質代謝経路に関する基礎情報が不可欠となるが、その詳細な解析技術は不十分である。そこで、イオントラップ型質量分析計を導入して、微細藻類のための脂質メタボロミクス手法の開発を試みた。その結果、海洋優占種の1種であるハプト藻 *Emiliana huxleyi* を用いて、油性画分から10脂質種600以上の脂質分子種を同定する解析系の確立に成功した。

Key Words : algal lipidomics, mass spectrometer, lipid biosynthesis, marine microalgae, biofuel, metabolomics

1. はじめに

石油代替エネルギー資源など、再生可能エネルギーへの転換技術の創出が社会的課題となり、太陽電池や風力発電などの自然エネルギーの活用による電力供給が普及しつつある。加えて、トウモロコシなど穀物類の糖発酵によるバイオエタノール生産が、太陽エネルギーを活用するバイオ燃料生産の筆頭として既に実用化されて

いる。しかし、穀物類の利用は食糧供給と競合し食糧の市場価格の高騰をもたらした大きな社会問題を引き起こした。そのため、食糧と競合しないバイオ燃料生産の技術開発が強く求められている。この状況において、独立栄養的（光合成による光エネルギー変換に基づく生命活動）にオイルを生産し、他の植物バイオマスと比較して単位面積・単位植物体重量あたりの生産能が高い微細藻類によるバイオ燃料生産が注目されてきた。

2007年にNature誌に掲載されたビジネスレポート記事¹⁾では、藻類を原料とする再生可能エネルギーの研究・技術開発、すなわち藻類バイオ燃料生産の研究が世界中で加速している動きが“Algae Bloom Again”という表現で紹介された。同年、「アメリカが輸入する原油の50%相当分を、トウモロコシを原料とするバイオ燃料で代替するためには、アメリカの現耕地面積

* (現所属)一般財団法人 日本気象協会 環境・エネルギー事業部 エネルギー事業課
170-6055 東京都豊島区東池袋 3-1-1 サンシャイン
60 55 階
oi.nobuaki@jwa.or.jp

** JST 戦略的創造研究推進事業「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の解明と基盤技術の開発(代表:白岩善博, 2010-2015)の助成を得て実施した。

の約 20 倍の面積が必要となる。一方、生産能力が高い微細藻類によるバイオ燃料生産で賄えば、現耕作地のわずか 1～3% で済む²⁾との試算が出された。これらの微細藻類研究と実用化の動きにおいて、我が国では、筑波大学を中心とするオイル産生能を有する独立栄養藻類 *Botryococcus* と従属栄養生物 *Aurantiochytrium* による炭化水素燃料生産を基盤とする drop-in-fuel として活用できる藻類バイオ燃料生産のための技術開発が契機となり産業化への関心を呼ぶこととなった³⁾。

地球温暖化の進行に伴い、世界的な飲料水や農業用水の不足傾向が国際紛争を誘起することが問題視され始めた。その社会情勢の中で、河川や湖沼が起源の淡水を大量に必要とする微細藻類の大規模培養が水不足を助長する懸念が生じてきた。その結果、海水利用が可能な海産微細藻類を活用するバイオ燃料生産にも注目が集まってきた。しかしながら、バイオ燃料生産に最適な藻類株の選定や海水利用の大型培養施設の開発はその途上にあり、未だ実用化されていない。

以上の世界情勢の中で、日本科学技術振興機構 (JST)・戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「藻類・水圏微生物の機能解明と制御によるバイオエネルギー創成のための基盤技術の創出」(松永是研究統括) が開始され、多くの藻類バイオマスエネルギー研究が現在進行中である。この中で基礎研究も進み、燃料生産微細藻類として特に有望視されているシアノバクテリア (ラン藻類)⁴⁾ やコロニー性緑藻 *Botryococcus*⁵⁾ の炭化水素合成経路が相次いで解明されている。

筆者らも JST/CREST の研究課題「海洋ハプト藻類のアルケノン合成経路の解明と基盤技術の開発」(代表：白岩善博) の下で海洋微細藻類と海水利用を基盤とするバイオ燃料生産に関する研究を開始し、藻類脂質のメタボローム解析 (algal lipidomics) とその基盤技術の開発を行っている。本稿ではその一部を紹介する。

2. 微細藻類の脂質メタボロミクスの現状

バイオ燃料生産に限らず、微細藻類を利用して効率的に物質生産を行うためには、その代謝能力を目的に合わせて制御することが重要な課題である。現在、淡水産藻類や海洋性珪藻などを用いて、その有用物質の生産能力を向上させるため、代謝産物生合成遺伝子の発現解析 (トランスクリプトミクス) や蛋白質 (プロテオミクス) 及び代謝産物 (メタボロミクス) などの網羅的解析が行われている。

メタボロミクスにおける代謝物の検出には質量分析 (Mass Spectrometry, MS) が頻用され、これにより分子量及び構造情報を得ることができるとともに、高感度の定量が可能である。これまでに、ガスクロマトグラフィー (GC)/MS やキャピラリー電気泳動 (CE)/MS により、解糖系、トリカルボン酸 (TCA) サイクルなど、生体内の中心代謝経路にかかわる親水性の低分子代謝物を対象としたメタボロミクスが盛んに行われてきた⁶⁾ (図 1)。

最近の研究から脂質は、エネルギー源や生体膜の構成成分であるだけでなく、生理活性シグナル分子として生理現象にかかわっていることが明らかになった。このためメタボロミクスのターゲット分子として注目されるようになり、脂質に特化したメタボロミクス (脂質メタボロミクス、リピドミクス) が、医学系の分野を中心に積極的に進められている^{7)–10)}。

脂質は水に不溶で、有機溶媒に溶ける生体成分の総称である。基本的には疎水性が高いとされるが、リン酸基や糖など、極性の高い分子種の結合により、幅広い極性を持つことが知られている (図 2)。これに加えて、脂肪酸の鎖長や不飽和度だけが異なる多数の構造類縁体や構造異性体が存在することから、脂質の分析には高度な分離分析技術が必要となっている。さらに、データ解析においても、脂肪酸の組み合わせや結合位置が異なるにもかかわらず、同じ m/z (質量分析で用いられる質量 m と電荷 z

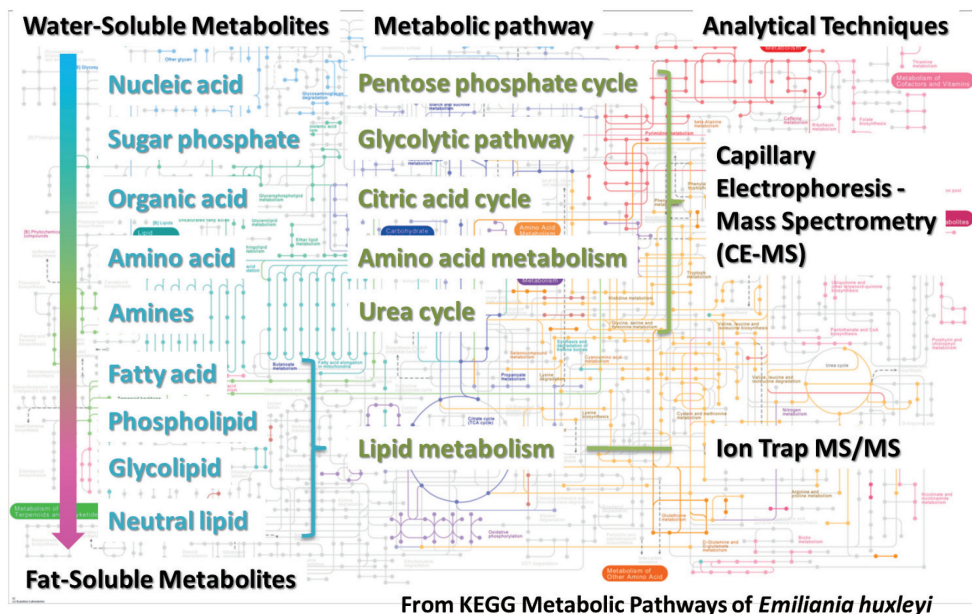


図1 代謝物及びメタボロミクス解析法

の比で、質量分析スペクトルは m/z を横軸として表示する) を示す異性体、いわゆる同重体が多数存在するため、成分の同定には巧妙な手法が必要である。このような状況が脂質メタボロミクスの大きなハードルであり、脂質メタボロミクス研究が遅れた理由の一つとなっている。メタボロミクスは網羅的な代謝産物の解析を目的としているが、実際には一回の分析で必要とする全ての代謝物の情報が得られるわけではない。解析対象は多数の分子種であり、それぞれの含有量も大きく異なることから、分析方法の使い分けが重要である。

藻類脂質メタボロミクスを構築するにあたり、筆者らはダイレクトインフュージョン(ショットガン)MS法により、特定の脂質に絞ってその中で網羅的分析を目指した(図3)。リン脂質は、コリン基やセリン基など特有の極性基を有する。それらの部分構造を持つ分子を特異的に検出することが可能なプリカーサーイオンスキャンやニュートラルロススキャンによって、特定の脂質クラスの分子群を選択的かつ包括的

に分析することができる。また、プリカーサーイオンスキャンは、脂肪酸鎖の解析にも有用である。本法では目的とする脂質のプロファイルの取得が可能なることから、液体クロマトグラフィー(LC)による分離をしなくてもよい簡便さやハイスループットの利点があることで頻用されている⁸⁾⁻¹²⁾。

脂質メタボロミクスによる多成分の一斉分析から得られたデータには、類似構造の成分が多数混在するため、成分の同定にはかなりのスキルと膨大な時間を要する。脂質は、脂肪酸鎖の組み合わせが異なることにより多様化しているが、その種類(クラス)は20種程に限られている。入手可能な脂質標準品を用いて同定に必要な基礎的なフラグメント情報を取得し、データベースを構築することが可能である(図3)。実際に生体試料を分析する場合、そのデータを脂肪酸鎖長や不飽和結合の数などの分子種を形成する種々の要素から生じる多様性を理論的に構築したデータと照合し、データベースを拡張するなどによって、標準品の入手できない脂質

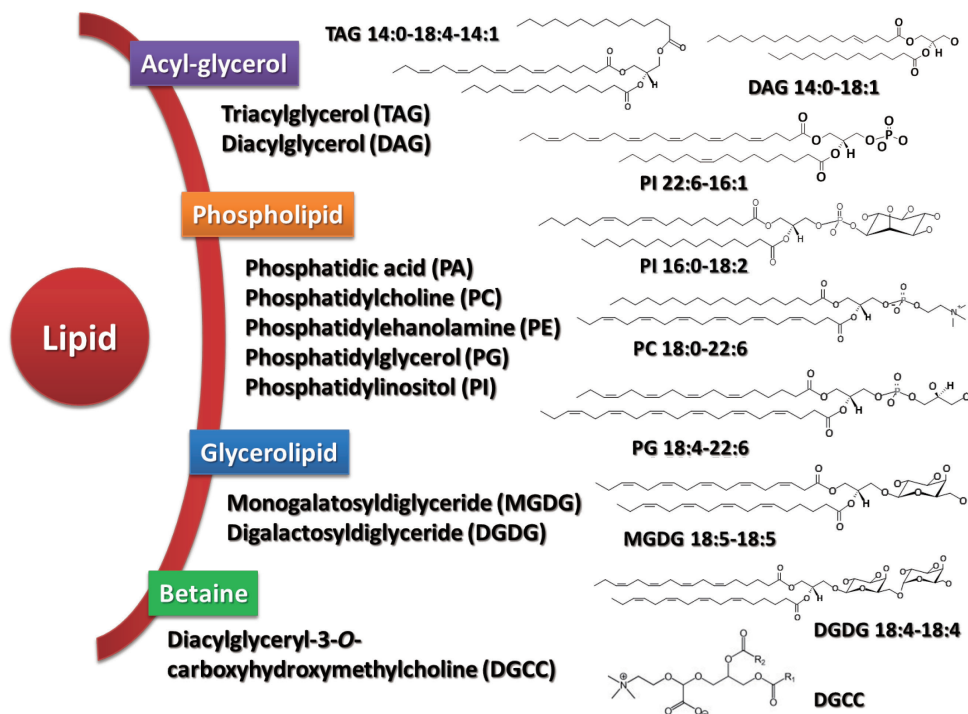


図2 脂質種及びその化学構造例

の同定も可能となる。

現在、MSデータからの自動ピッキング技術とこれまで蓄積・開発されてきたデータベースや検索アルゴリズムを合体させることにより、脂質代謝物を自動同定するためのLipidView (ABSciex) という検索ツールが開発されている¹³⁾。LipidViewでは、1) 脂質の質量分析の生データを読み込み、適切な脂質ピークを選択する波形解析モジュール、2) 脂質の仮想構造から、そのプリカーサーイオンとそこから生じるプロダクトイオンデータ群を保持する脂質データベース、3) 抽出した脂質ピークと脂質データベースを使用し、サンプル内に存在する脂質を同定するモジュールで構成されている。そのため、ニュートラルスキャン、プリカーサースキャンの各スペクトルの同定結果を集計し、最も確からしい脂質を検索することが可能である。現在、脂肪酸、アシルグリセロール、リン

脂質、糖脂質など約25000以上の分子が格納された理論データベースが構築され利用可能となっている¹³⁾。しかし、本研究で見出した微細藻類特有のベタイン脂質 (DGTS, DGTA, DGCC) については、従来のデータベースに独自の情報を追加することによって同定した。

3. 海洋微細藻類の脂質メタボローム研究の現状

ごく最近、淡水性のモデル微細藻類である単細胞緑藻 *Chlamydomonas* を用いたGC/MSによる炭化水素種の網羅的分析¹⁴⁾や、LC/MSによるリン脂質及び糖脂質種の網羅的分析¹⁵⁾が報告された。また、オイル産生藻類として注目されているコロニー形成緑藻 *Botryococcus*¹⁴⁾や新規に単離された単細胞緑藻 *Pseudochochicystis*¹⁶⁾においても同様の報告がなされている。一方、海洋性微細藻においては珪藻 *Stephanodiscus* で

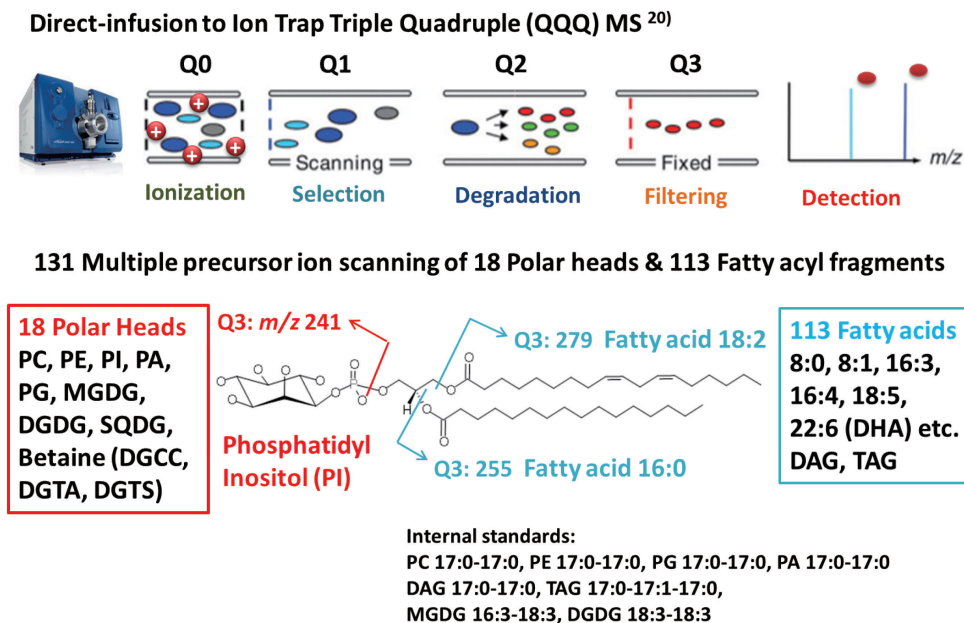


図3 脂質メタボロミクスのための質量分析手法

のみ報告¹⁷⁾されている。

筆者らの研究室では海洋性微細藻に特化した脂質メタボロミクスを目指している。地球環境の側面から、海洋性微細藻類（植物プランクトン）は全球の光合成量の約半分を担う海洋一次生産者であり、その炭素固定と代謝の詳細な理解は、今日の地球温暖化や気候変動の予測、動物プランクトン・魚類のバイオマス生産量の推定等のために必須である。

筆者らは海洋性微細藻の中でもハプト藻類を研究対象としている。中生代白亜紀を中心に形成された原油の一部、特に中近東の原油がハプト藻類を起源とするとの知見がある。すなわち、太古に長い時間をかけて行われた原油生成を、現代において短時間で実現することを目指すものである。

ハプト藻起源の原油の元となったと考えられる主な脂質分子は、 C_{27} - C_{32} アルケン及び C_{37} - C_{39} 超長鎖ケトン分子（アルケノン）である¹⁸⁾。筆者らは、それらの合成能を有し、増殖能に優れ、

既に遺伝子情報が公開されているハプト藻 *Emiliania huxleyi* CCMP 2090 株を用いて、リピドーム解析により、超長鎖アルケノンを高蓄積させる代謝改変戦略の構築を目指している（図4）。さらに、一次生産を担う植物プランクトン種の光合成炭素代謝を詳細に理解することにより、基礎生産のみならず海洋環境に対する生理応答や種特異的な代謝物（バイオマーカー）の探索等にも、応用可能な基盤技術の開発をも試みている。なお、本メタボローム解析技術は、植物プランクトンの他、バクテリア・動物プランクトン・魚類等、生物一般に共通する一次代謝・脂質代謝経路において幅広く応用可能な解析技術である。

ハプト藻 *E. huxleyi* CCMP 2090 株（赤道下の南太平洋産で無菌株として取得）を用いて実施した脂質メタボロミクスの事例を以下に紹介する。至適条件下でハプト藻を無菌培養し、 10^7 ~ 10^8 個の細胞群を、微量代謝物の消失を防ぐために極低温下（ -80°C ）でメタノール：クロ

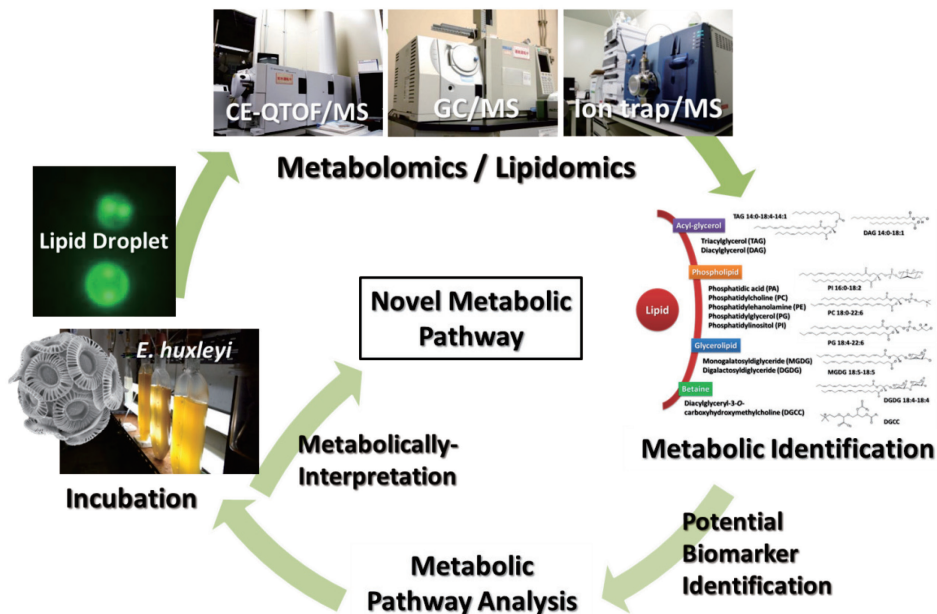


図4 脂質メタボロミクスによる研究手法

ロホルム：水（1：2：0.8）混合液で抽出する。細胞抽出液中の水溶性画分において、キャピラリー電気泳動・飛行時間型質量分析計（CE-TOF/MS）を用いて、カルビン回路・解糖系・TCA回路・アミノ酸生合成経路の中間代謝産物を網羅した34種類の代謝物を同定した（図5）。さらに、細胞抽出液中の油性画分について、イオントラップ型質量分析計（Ion Trap MS/MS[®]）によるショットガンリポミクス解析から、ベタイン脂質[1,2-diacylglyceryl-3-(O-carboxyhydroxymethylcholin) (DGCC)], リン脂質 [phosphatidylcholine (PC)・phosphatidylethanolamine (PE)・phosphatidic acid (PA)・phosphatidylglycerol (PG)・phosphatidylinositols (PI)], 糖脂質 [monogalatosyldiglyceride (MGDG)・digalactosyldiglyceride (DGDG)], ジアシルグリセロール (DAG), トリアシルグリセリロール (TAG) の10脂質種に分類される618種類の脂質分子種が脂質データベース解析により検出された（表1；図2）。本法の開発

により、これまでの薄層クロマトグラフィー（TLC）及びGC/MS法を用いた*E. huxleyi*脂質種に関する報告¹⁹⁾に比べ、10倍を超える多くの脂質分子種が検出され、本研究で導入したダイレクトインフュージョンMS法²⁰⁾（図3）の有効性が藻類リポミクスにおいても証明された。

さらに、本*E. huxleyi* CCMP 2090株の脂質メタボロミクスより得られた脂質種と脂肪酸種の関係について3Dネットワークを用いて解析したところ、Docosahexanoic acid (DHA; FA 22:6)が最も関係性が多様である脂肪酸分子種であることがわかった（図6；脂肪酸長と脂質種間のつながりの数に比例して球の体積が大きくなり、FA 22:6の球の体積が最大であったため）。そこでDHA代謝経路に着目し、経路上に本データを載せたところ、これまで知られていなかったオメガ-6脂肪酸合成経路及び動物型“ Sprecher” DHA合成経路が存在する可能性が示唆された。これに関しては、現在詳細な解析を実

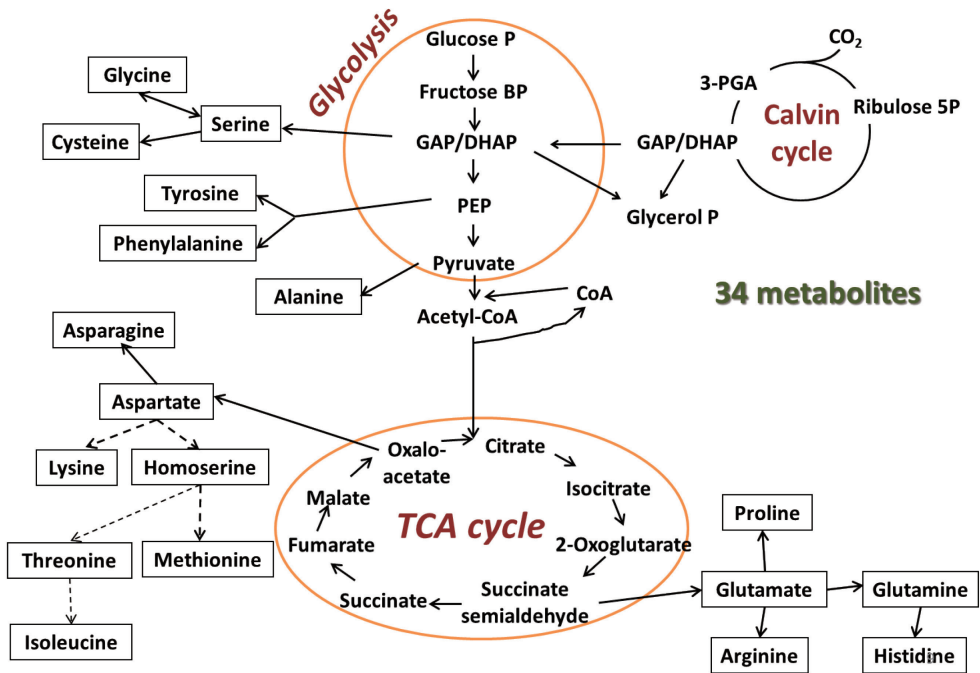


図5 CE-TOF/MSによる検出された *E. huxleyi* CCMP 2090 の34代謝物

表1 脂質メタボロミクスにより検出された *E. huxleyi* CCMP 2090 の10脂質種618脂質分子種

脂質種	検出数
PA	35
PC	32
PE	19
PG	26
PI	31
DAG	46
TAG	309
MGDG	47
DGDG	42
DGCC	31

施中である。

4. おわりに

本研究で実施した海洋性微細藻類の脂質メタボローム解析技術 (Marine Algal Lipidomics) は、陸上植物や淡水性微細藻類では生産できな

い有用脂質を高度に生産させ、それを高濃度に蓄積させるための代謝改変戦略を立案するために不可欠な知見である。筆者ら藻類バイオ燃料研究の最終目的は、電気では代替不能なジェット燃料等の液体燃料や化学工業原料を生産するための基盤技術の開発である。その目標達成には、大量培養系構築のエンジニアリングやオンサイト型のバイオリクターによる幅広い多様な環境下における微細藻類の培養の技術開発等に加え、解決すべき課題も多い。

一方、地球環境研究においてもハプト藻・円石藻類とその特異的な代謝産物であるアルケノンやその他の代謝産物解析の重要性が増している。海水温上昇や表面海水の塩濃度低下等の影響は、北極海や北極周辺の高緯度海域のエコシステムの大変動をもたらし、一次生産者である植物プランクトンの増殖変動により、漁業資源生産の大変動をもたらす懸念が生じている。漁業資源生産の将来予測のためには、それらの海

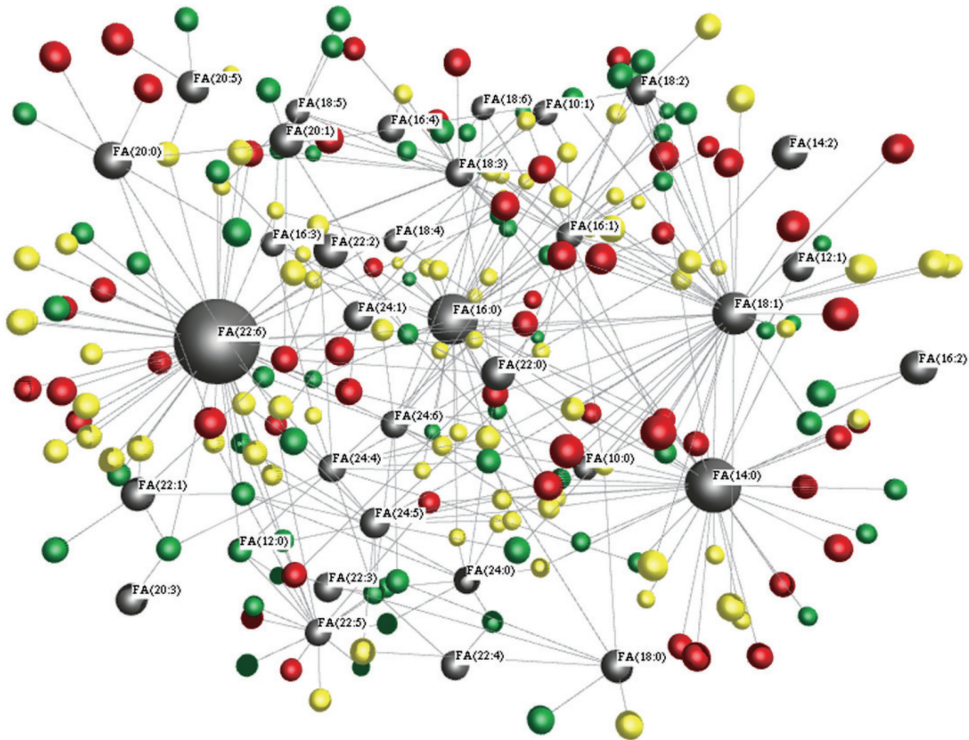


図6 *E. huxleyi* 脂質種及び脂肪酸種の3Dネットワーク
脂質種間のつながりの数に比例して球の体積が大きくなる
黒：FA(脂肪酸)；黄：PC, PE, PA, PG, PI；緑：MGDG,
DGDG, DAG；赤：TAG

域でブルームを形成する珪藻やハプト藻類・円石藻等の一次生産者の増殖や代謝変動の解析が不可欠である。すなわち、1) 植物プランクトンの光合成による炭素代謝経路の細胞レベルでのフラックス解析、2) 海洋植物プランクトン優占種が生産する代謝産物の網羅的解析による一次生産化合物種の同定、3) 環境中に放出された有機化合物種の網羅的解析（メタボローム解析）、4) 種特異的バイオマーカー探索等が必要である。すなわち、それら海洋微細藻類の物質生産・代謝産物生産のポテンシャルの生理生化学的解析データによる高精度の未来環境予測や未来漁業資源予測のモデル構築に不可欠であり、海洋微細藻類のメタボローム解析の重要性が多面で益々増大する状況となっている。

文 献

- 1) Haag, A. L., Algae bloom again, *Nature*, **447**, 520-521 (2007)
- 2) Chisti, Y., Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, **25**, 294-306 (2007)
- 3) "Nature Spotlight on Tsukuba", *Nature Jobs Advertisement feature*, *Nature*, **11**, 8 (2010)
- 4) Schirmer, A., Rude, M. A., Li, X., Popova, E. and Del Cardayre, S. B., Microbial biosynthesis of alkanes, *Science*, **329**, 559-562 (2010)
- 5) Niehaus, T. D., Kinison, S., Okada, S., Yeo, Y., Bell, S. A., Cui, P., Devarenne, T. P. and Chappell, J., Functional identification of triterpene methyltransferases from *Botryococcus braunii* race B, *The Journal of Biological Chemistry*, **287**, 8163-8173

- (2012)
- 6) 田口良編, メタボロミクス, 遺伝子医学MOOK 16, メディカルドゥ, 大阪(2010)
 - 7) 馬場健史, 微細藻類によるエネルギー生産と事業展望, pp.18-30, シーエムシー出版, 東京(2012)
 - 8) Ejsing, C. S., Duchoslav, E., Sampaio, J., Simons, K., Bonner, R., Thiele, C., Ekroos, K. and Shevchenko, A., Automated identification and quantification of glycerophospholipid molecular species by multiple precursor ion scanning, *Analytical Chemistry*, **78**, 6202-6214(2006)
 - 9) Taguchi, R., Houjou, T., Nakanishi, H., Yamazaki, T., Ishida, M., Imagawa, M. and Shimizu, T., Focused lipidomics by tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **823**, 26-36(2005)
 - 10) Ståhlman, M., Ejsing, C. S., Tarasov, K., Perman, J., Borén, J. and Ekroos, K., High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **877**, 2664-2672(2009)
 - 11) Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesiada, H., Zhou, H., Rajashekar, C. B., Williams, T. D. and Wang, X., Profiling membrane lipids in plant stress responses, *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 31994-32002(2002)
 - 12) Brügger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F. T. and Lehmann, W. D., Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 2339-2344(1997)
 - 13) Zhou, Z., Marepally, S. R., Nune, D. S., Pallakollu, P., Ragan, G., Roth, M. R., Wang, L., Lushington, G. H., Visvanathan, M. and Welit, R., LipidomeDB data calculation environment : Online processing of direct-infusion mass spectral data for lipid profiles, *Lipids*, **46**, 879-884(2011)
 - 14) Barupal, D. K., Kind, T., Kothari, S. L., Lee, D. Y. and Fiehn O., Hydrocarbon phenotyping of algal species using pyrolysis-gas chromatography mass spectrometry, *BMC Biotechnology*, **10**, 40(2010)
 - 15) Lu, N., Wei, D., Chen, F. and Yang, S., Lipidomic profiling and discovery of lipid biomarkers in snow alga *Chlamydomonas nivalis* under salt stress, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **114**, 253-265(2011)
 - 16) Ito, T., Tanaka, M., Shinkawa, H., Nakada, T., Ano, Y., Kurano, N., Soga, T. and Tomita, M., Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxiphycean alga in nitrogen-deficient conditions, *Metabolomics*, **9**, 178-187(2013)
 - 17) Xu, J., Chen, D., Yan, X., Chen, J. and Zhou, C., Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, **663**, 60-68(2010)
 - 18) Yamane, L., Matsuyama, S., Igarashi, K., Utsumi, M., Shiraiwa, Y. and Kuwabara, T., Anaerobic coculture of microalgae with *Thermosiphon globiformans* and *Methanocaldococcus jannaschii* at 68 °C enhances generation of n-alkane-rich biofuels after pyrolysis, *Applied and Environmental Microbiology*, **79**, 924-930(2013)
 - 19) Bell, M. V. and Pond, D., Lipid composition during growth of motile and cocolith forms of *Emiliana huxleyi*, *Phytochemistry*, **41**, 465-471(1996)
 - 20) Domonm, B. and Aebersold, R., Mass spectrometry and protein analysis, *Science*, **312**, 212-217(2006)

Abstract

Applications of Stable Isotopes

Lipidomics in Marine Microalgae Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

Nobuaki OHI* and Yoshihiro SHIRAIWA : Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba ; JST/CREST, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref. 305-8572, Japan, *Japan Weather Association, Sunshine 60 Bldg. 55, 3-1-1 Higashi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170-6055, Japan

The coccolithophorid Emiliana huxleyi (Haptophyta)

is one of the most abundant bloom-forming algae in worldwide oceans. We successfully developed and optimized a very sensitive and high-throughput algal lipidomics system using an electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) in order to profile the lipids. In axenic strain *E. huxleyi* CCMP 2090, we identified molecular species of betaine lipids (1,2-diacylglycerol-3-(O-carboxyhydroxymethylcholine), glycerol lipids (monogalactosyldiacylglycerol, digalactosyldiacylglycerol, sulfquinovosyldiacylglycerol and triacylglycerol) and phospholipids (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol and phosphat-

idic acid) based on the simultaneous automated acquisition and processing of ion spectra of acyl-anions of common fatty acid moieties and several lipid class-specific fragment ions for 132 precursors. More than 600 apparent molecular mass species of polar glycerolipids were identified in *E. huxleyi* CCMP 2090. According to 3-D network analysis, *E. huxleyi* CCMP 2090 is notable for its high production of docosahexaenoic acid (DHA) and, in particular, a unique DHA biosynthetic pathway which is composed of both the omega-6 fatty acid pathway and the mammalian-type "Sprecher" pathway.