

Notice on Plankton Seminar
#15016
14:45-16:00, 2 December (Wed.) 2015 at Room W303

S, Samek., A. Jonas, Z. Pilat, P. Zemanek, L. Nedbal, J. Triska, P. Kotas and M. Titilek (2010)
Raman Microspectroscopy of Individual Algal Cells: Sensing Unsaturation of Storage Lipids *in vivo*
Sensors **10**: 8635-8651

レーザーラマン顕微鏡を用いた、藻類細胞内の貯蔵脂質の不飽和度の計測

光合成生物は太陽光エネルギーを用いて二酸化炭素を固定し有機物を生産している。海洋における同化作用の殆どは植物プランクトンが担っているが、この同化量は陸上植物の同化量にも引けを取らないと考えられている。近年、植物プランクトンの生成する同化産物、中でも脂質が燃料などで産業利用できる可能性がある。藻類が生産する主な脂質は3分子の脂肪酸を含むトリアシルグリセロール (TAG) であるが、この TAG の性質を判断する上で分子内の脂肪酸の不飽和度 (ヨウ素価) に関する情報は大変重要である。しかしながら、藻類の脂質の分析に関する知見は少ないのが現状である。レーザーラマン顕微鏡は細胞を傷つけることなく生物の中の物質を分析できる等の特徴を兼ね備えている。本研究では、レーザーラマン顕微鏡を用いて藻類が細胞内に貯蔵する脂質の分析を行い、脂質の不飽和度 (C=C 結合の数を C-C 結合の数で割った値)、ひいてはヨウ素価 (油脂 100g に付加するヨウ素の質量) の推定を試みた。また、ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GCMS) を用いた細胞内の脂質の分析を行い、レーザーラマン顕微鏡による分析結果と比較を行い、レーザーラマン顕微鏡で得られる分析結果の妥当性についての確認を行った。

実験には緑藻の *Botryococcus sudeticus*, *Chlamydomonas* sp., 黄緑色藻の *Trachydiscus minutus* の3種類の植物プランクトン培養株を使用した。*B.sudeticus* と *Chlamydomonas* sp. の培養は BBM 培地にて行い、定常期末期に実験に供した。黄緑色藻の *T. minutus* は 50% 強度の Setlik-Simmer 培地にて培養を行った。培養条件は光強度 $400 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度は 28°C とし、定常期初期に実験に使用した。

レーザーラマン顕微鏡の励起光としては 785 nm の波長を使用した。過去の知見より脂肪酸は 1656 cm^{-1} (V_U) と 1445 cm^{-1} (V_S) にスペクトルのピークを示し、前者の強度は脂肪酸内の炭素の不飽和結合 (C=C) の数、後者の強度は炭素の飽和結合 (C-C) の数と比例していることが知られている。そこで、まず不飽和度が既知の純粋な脂肪酸のラマンスペクトルを測定し、脂肪酸の不飽和度と V_U/V_S (分析した試料のラマンスペクトルの内、 1656 cm^{-1} と 1445 cm^{-1} の強度の比) の比例関係を明らかにした。その後、 V_U/V_S の値をヨウ素価に変換するための式を作成した。最終的には細胞内の脂質体のスペクトルの V_U/V_S の値をヨウ素価に変換し、藻類細胞内の脂質の検討を行った。

GCMS による分析では、まず植物プランクトン培養株をガラス繊維濾紙にて濾過し、フィルターを凍結乾燥させた。凍結乾燥後、内部標準脂肪酸としてノナデカン酸をヘキサンに溶解させてフィルターにスポットし、このフィルターを grinding jar を用いて粉碎した。破砕したフィルターをクロロホルム-メタノール混合溶液に浸して脂肪酸を抽出した後、メタノールに溶解させた塩酸を用いて脂肪酸をメチル化させた。生成された脂肪酸メチルエステルは 1 mL のヘキサンに溶解させ、この内 $1 \mu\text{L}$ を GC に供した。GC の分析条件は注入口温度を 250°C 、スプリットレスモードとした。オーブンの昇温条件は初期温度を 60°C とし、最終的には 255°C まで上昇させた。キャリアガスとしてヘリウムガスを用い、質量のスキャンレンジは $50-450$ とした。

過去の知見通り、脂肪酸のラマンスペクトルの V_U/V_S の値と不飽和度には比例関係があることが確かめられた。一方、 V_U/V_S の値とヨウ素価は、ヨウ素価が 150 以上となると線形関係を取らなくなったため、キャリブレーションカーブを作成した。ラマンスペクトルより推定された藻類の脂肪酸のヨウ素価は種によって大きく異なり、*T. minutus* のヨウ素価の 216 ± 7 が分析した3種の藻類の中で最大の値であった。GCMS による分析でも *T. minutus* の脂肪酸のヨウ素価は 194 となり、2つの手法から導き出されたヨウ素価は近い値を示した。また、この2つの手法で算出されたヨウ素価の差は藻類の培養条件の僅かな差に起因したと考えられた。

藻類の脂質体から得られたラマンスペクトルには、脂質だけでなく β -カロテンに起因するものも含まれていると考えられたため校正を行った。具体的には、 β -カロテンが示すピークの内、 1442 cm^{-1} に表れる小さなピークが脂質の 1445 cm^{-1} (V_S) のピークと重なっていると考えられたため、 β -カロテンに起因するラマンスペクトルの減算を行った。この校正は、脂質由来の 1445 cm^{-1} (V_S) の強度が小さかった *Chlamydomonas* sp. で特に重要な作業であった。

本実験では藻類細胞の脂質体のラマンスペクトルを測定することにより、脂質のヨウ素価を推定することに成功した。実験に供した3種類の藻類のヨウ素価は 88 から 216 まで広い範囲の値を示したが、この結果より、藻類の脂質の利用できる分野に向き不向きがある可能性が示唆された。例えば、高いヨウ素価の 216 を示した *T. minutus* の脂質は燃料としては不適だが (120 より下が望ましい)、食品利用には向いている可能性がある。藻類の脂質は培養条件等の生理状態の影響を受けて若干変動すると考えられるが、これはあるいは個体群の相違に起因する可能性がある。レーザーラマン顕微鏡による分析は細胞の生理状態への影響が少ないというメリットがある。今後、藻類の脂質を産業利用する際、レーザーラマン顕微鏡は迅速かつ多目的に活用できる強力なツールとなるであろう。

横溝 岳志