

MALDI-TOF/MS を用いた溶存無機態窒素の安定同位体比測定手法の開発

長岡技術科学大学 学生会員 ○永井孔明, 正会員 山口隆司, 斎藤信雄, 鈴木義之,
一関高専 荒木信夫, ミネソタ大学 石井聡, 北海道大学 押木守

1. はじめに

活性汚泥を含む環境試料には様々な微生物が共存しており、複雑な代謝系が構築されている。処理メカニズムを理解し、より高効率なシステムを構築するためには微生物代謝の理解が不可欠である。特に窒素循環において、窒素化合物は化学的および生物学的に様々な形の化合物に変換されて循環している^{1,2)}。また、環境中では複数の窒素変換反応が同時に進行するため、窒素化合物の濃度は総窒素変換率を反映しているに過ぎない。したがって、窒素化合物の濃度を測定するだけでは試料中で発生した特定の窒素変換反応を調べることはできない^{2,3)}。この理由から、安定同位体を用いたトレーサー試験は複合微生物系内での微生物代謝を理解するために非常に有用である⁴⁾が、安定同位体比の測定、特に、溶存無機窒素 (NH_3 , NO_2^- , NO_3^- , NH_2OH , N_2H_4) の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比測定は一般的に (GC, EA) IRMS が必要であり、装置が非常に高価であるばかりでなく、前処理操作も極めて煩雑であった^{5,6)}。さらに、IRMS は自然界中の安定同位体比を‰レベルで測定する目的で運用されており、トレーサー試験において‰レベルで標識された試料を持ちこむことがそもそも嫌厭され、測定できる施設は世界的にみても限られているのが現状である。そこで、我々は溶存無機態窒素を発色試薬で呈色させ、その色素を MALDI-TOF/MS で質量分析することで安定同位体比を‰レベルで簡便かつ安価に測定する新たな安定同位体比測定手法を提案する。

2. 実験方法

各態窒素化合物 (NH_3 , NO_2^- , NO_3^- , NH_2OH , N_2H_4) について、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比を 0~100% に調整した水溶液を用意し発色操作へ供した。 NO_3^- と NH_2OH は化合物を NO_2^- に還元しナフチルエチレンジアミン法で発色させた。 NH_3 および N_2H_4 はそれぞれインドフェノール法、4-(ジエチルアミノ)ベンズアルデヒド法で発色させた。発色反応で生成した色素を含むサンプル溶液と MALDI マトリックス (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid,

10 mg/mL) をそれぞれ 0.5 μL ずつ MALDI プレート上にスポットし、よく混合し、MALDI-TOF/MS (autoflex III, Bruker) で質量分析を行い、標的 m/z に出現するピーク面積を取得した。

トレーサー試験では、好気性アンモニア酸化細菌 *Nitrosomonas europaea* (NBRC14298) のアンモニア酸化能を調査する目的で培養を行なった。50 mL の培養液を 250 mL のフラスコを用いて 150 rpm で振盪培養を行なった。33 mM の $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加し、28 °C, pH 7.8 の条件で 14 日間培養を行なった。培養液を系時的に採取し、 NO_2^- 濃度および NH_4^+ 濃度をそれぞれナフチルエチレンジアミン法およびインドフェノール法で定量し、 $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比を測定した。

Nitrobacter winogradskyi (NBRC14297) の亜硝酸酸化能を調査する目的で培養を行なった。20 mL の培養液を 50 mL のバイアル瓶を用いて暗所で 40 rpm で振盪培養を行なった。2.5 mM の $^{15}\text{NaNO}_2$ と 2.5 mM の $^{14}\text{NaNO}_3$ 、5 mM のギ酸を添加し、28 °C, pH 7.5 の条件で 80 時間培養を行なった。培養液を系時的に採取し、 NO_2^- 濃度および NO_3^- 濃度をナフチルエチレンジアミン法および銅還元法で定量した。さらに $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比および $^{15}/^{14}\text{NO}_3^-$ 比を測定した。

3. 結果および考察

$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比 0, 50, 100% で作製した NO_2^- 溶液中の NO_2^- をナフチルエチレンジアミン法で発色させ、生成するアゾ色素を MALDI-TOF/MS で測定した結果を図 1A に示す。 m/z 371 および 372 に $^{14}\text{NO}_2^-$ と $^{15}\text{NO}_2^-$ 由来のピークが出現し、予想通り m/z 1 のシフトを確認した。各窒素化合物で同様の測定を行い、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比とピーク面積比の相関を調査したところ、全窒素化合物で高い直線性を確認できた (図 1B)。

続いて、本手法を適用して硝化菌の窒素代謝を調査した結果を図 2 に示す。*N. europaea* については、 $^{15}\text{NH}_4^+$ 酸化に伴って生成した NO_2^- の $^{15}/^{14}\text{N}$ 比はほぼ 100% であり、 $^{15}\text{NO}_2^-$ の生成を確認した。*N. winogradskyi* について、pH 7.5 で本細菌は NO_2^- を消費

し、消費に伴って NO_3^- 濃度が増大した。この結果から *N. winogradskyi* の亜硝酸酸化能を確認した。 $^{15}/^{14}\text{NO}_3^-$ 比および $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比を測定したところ、 $^{15}/^{14}\text{NO}_3^-$ 比が 9% から 45% まで上昇した。これは $^{15}\text{NO}_2^-$ が酸化されて $^{15}\text{NO}_3^-$ が生成したことを示しており、*N. winogradskyi* による亜硝酸酸化が起きていることに由来する。しかし、 $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比は 87% から 71% に減少した。 $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ はいくら消費されても $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比は変わらないはずであるにも関わらず今回の実験では $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比が減少する結果になった。これは $^{14}\text{NO}_3^-$ が $^{14}\text{NO}_2^-$ に変化したことで $^{15}\text{NO}_2^-$ の存在割合が減少したことを意味している。この結果から、*N. winogradskyi* が亜硝酸酸化と硝酸還元を同時に進行していることがわかった。

培養サンプルの濃度を測定するだけでは見た目上亜硝酸酸化反応しか確認できなかったのに対し、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比を測定することで硝酸還元反応も同時に進行していることを突き止めた。濃度定量と安定同位体比測定を組み合わせることで複数の反応が同時に起きている環境でもそれぞれの反応を確実に理解することが可能であることが実証された。

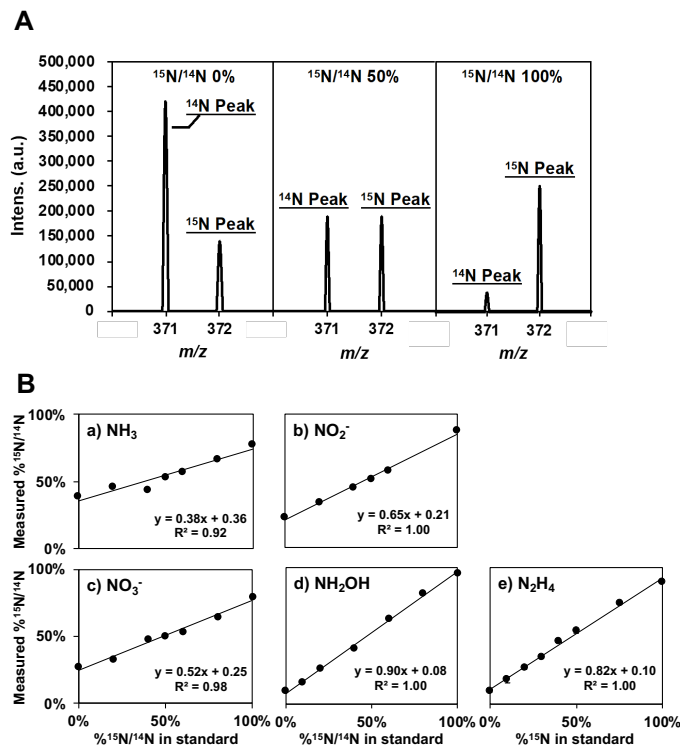


図 1. スタンダードの分析結果: A) $^{15}/^{14}\text{NO}_2^-$ 比 0, 50, 100% スタンダードの測定. B) 各窒素化合物の $^{15}/^{14}\text{N}$ 比とピーク面積比の関係

4. まとめ

各態窒素の由来する発色色素を MALDI-TOF/MS で測定することにより $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比が測定でき、微生物の窒素代謝を詳細かつ簡便に調査することが可能になった。本測定法は水質分析で汎用される比色分析法で色素を生成させ、MALDI-TOF/MS で分析する捜査のみであり、例えば、 NO_2^- であれば 5 分以内に $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比を測定できる。測定には比色分析試薬とマトリックスのみが必要であり、これらの費用は概して小さい (数円/検体)。(メタ)DNA/RNA シーケンスにより、機能未知な遺伝子・代謝系が多く報告されており、本手法はきわめてパワフルな解析ツールになると期待される。

5. 参考文献

- 1) T. Kalvelage et al., *Nat. Geosci.* **2013**, 6, 223-234.
- 2) M. M. M. Kuypers et al., *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, 16, 263-276.
- 3) A. J. Burgin et al., *Front. Ecol. Environ.* **2007**, 5, 89-96.
- 4) M. Holtappels et al., *Methods Enzymol.* **2011**, 486, 223-251.
- 5) K. Isobe et al., *Microbes Environ.* **2011**, 26, 46-53.
- 6) K. Kobayashi et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2021**, 35, e8979.

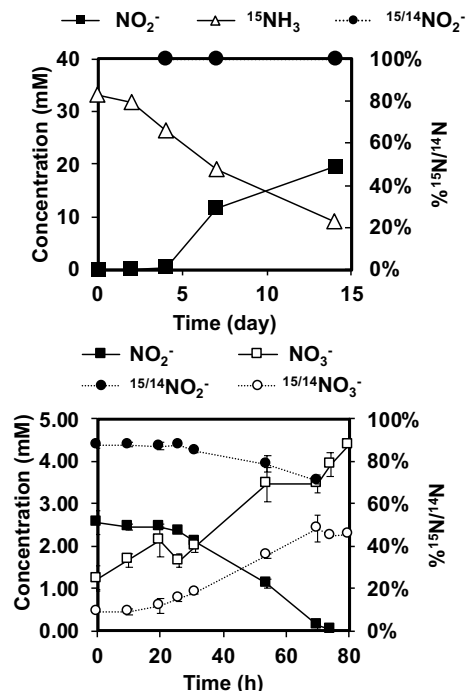


図 2. 上) *N. europaea* の $^{15}\text{NH}_3$ 酸化活性,

下) *N. winogradskyi* の $^{15}\text{NO}_3^-$ 還元活性 (pH 7.5)