

# Application News

## No. C201

LC-MS

### LC/MS/MSによるニホンライチョウ糞便のメタボローム解析 ～絶滅危惧種の飼育技術確立への応用～

国際自然保護連合が発表した2017年版の最新のレッドリストによると、絶滅の恐れが高いとされる3つのランク(CR、EN、VU)に2万5,821種の野生生物が記載されています。絶滅危惧種の多くは飼育が難しく、各分野の専門家が連携して飼育技術の開発に取り組んでいます。

ニホンライチョウは、近年その個体数が減少し、絶滅が危惧されています。絶滅から守るため、動物園等の域外での増殖・野生復帰を目指す取り組みがなされていますが、解決すべき課題がいくつかあります。その一つとして、野生のニホンライチョウが食べる高山植物を人工飼育のニホンライチョウが食べると下痢やシュウ酸塩沈着を伴った糸球体腎症を起こす問題があります。これは、人工飼育ではシュウ酸を多く含む高山植物を与えず飼育するため、人工飼育のニホンライチョウにはシュウ酸を分解する腸内細菌叢が存在しないためと考えられています。このように、人工飼育したライチョウの野生復帰には、野生型腸内細菌叢の再構築も含めた飼育技術の開発が必要です。腸内細菌叢による宿主への影響を解明する手段として、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析や、質量分析計を用いたメタボローム解析等が行われています。

本アプリケーションニュースでは、野生および人工飼育ニホンライチョウの腸内細菌叢が生産する代謝物を含む糞便をLC/MS/MSでメタボローム解析しました。メタボローム解析が野生復帰のための飼育技術の確立に応用できると示唆されたため、その事例をご紹介します。

T. Hattori

#### ■ サンプルおよび前処理

ニホンライチョウ糞便は、排泄後直ちに現場で凍結し、前処理・分析を行う前まで-80℃で冷凍保管しました。図1にニホンライチョウ糞便から代謝物を抽出するための前処理手順を示します。糞便100mgにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)500μLを添加後、攪拌し、その上清を遠心分離、限外濾過しました。その後、濾液を超純水で10倍に希釈し、LC/MS/MS用の分析サンプルとしました。

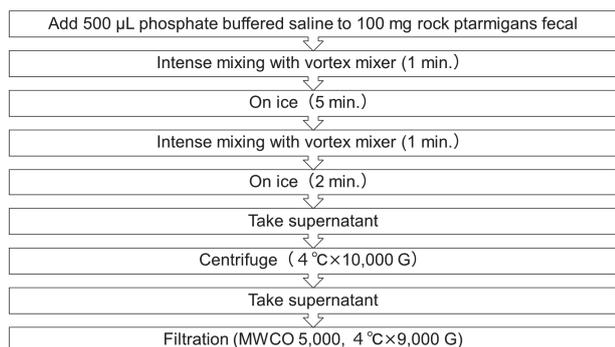


図1 ニホンライチョウ糞便の前処理

#### ■ 分析条件

LC/MS/MS分析は、一次代謝物LC/MS/MSメソッドパッケージ Ver. 2に含まれるイオンペアフリーLC/MS/MS法を用い、LCMS™-8060で分析しました。本分析法では、ライフサイエンス分野のメタボローム解析において重要となるアミノ酸、有機酸、ヌクレオシド、ヌクレオチド等の親水性代謝物97成分の一斉分析が可能です。詳細はApplication Data Sheet No. 49をご参照下さい。表1にHPLCおよびMSの分析条件を示します。

表1 測定条件

[HPLC conditions] (Nexera™ X2)	
Column	: Reversed-phase column
Mobile phases	: A) 0.1 % Formic acid in water B) 0.1 % Formic acid in acetonitrile
Mode	: Gradient elution
Flow rate	: 0.25 mL/min
Injection volume	: 3 μL
[MS conditions] (LCMS-8060)	
Ionization	: ESI (Positive and negative mode)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
Block heater temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

#### ■ メタボローム解析

野生および人工飼育ニホンライチョウの糞便をLC/MS/MSで測定した結果、アミノ酸、ヌクレオチド、ヌクレオシドやTCAサイクルに関わる有機酸等が検出されました。野生では平均56成分(n=4)、人工飼育では平均60成分(n=6)検出され、成分数、含有量ともに人工飼育ニホンライチョウの方が多い傾向が見られました。

次に各成分の内部標準物質に対する面積比を用いて、主成分分析およびt検定をTraverse MS™ソフトウェアによって行いました。図2にScore plotおよびLoading plotの結果を示します。t検定の結果、有意差が確認された(p<0.05)成分の内部標準物質に対する面積比の比較を図3に示します。Score plotの結果から、野生・人工飼育ニホンライチョウ糞便間で明確なクラスターが形成されました。また、Loading Plot、t検定の結果から、人工飼育ニホンライチョウの糞便ではフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン等のアミノ酸が、野生ニホンライチョウの糞便では、ウリジン、アデニン、シチジン等の核酸が特徴的な成分であることがわかりました。人工飼育ニホンライチョウにおいて遊離アミノ酸が多かったことから、飼料から摂取したタンパク質が多過ぎて余っていることが示唆されました。高タンパク状態が続くと、感染症、脚部異常、翼形成異常等になりやすいことが知られています。

一方、野生ニホンライチョウにおいては核酸代謝の中間産物が多いということから、この中間産物をアミノ酸合成に利用する代謝系がライチョウに存在すると推測できました。草食動物の消化管にはこのような代謝系が存在し、飼料由来の核酸や細菌死菌体由来の核酸の代謝が活発に起こっていることが知られています。野生ニホンライチョウには草食動物

と同じような代謝系が存在することで、高山のような栄養に乏しい環境下でも上手くアミノ酸を合成し生き延びていると考えられます。

以上のようにメタボローム解析の結果、現状の人工飼育で使用している飼料はタンパク質が過剰であるため、その飼料を改良する必要があることが明らかになりました。

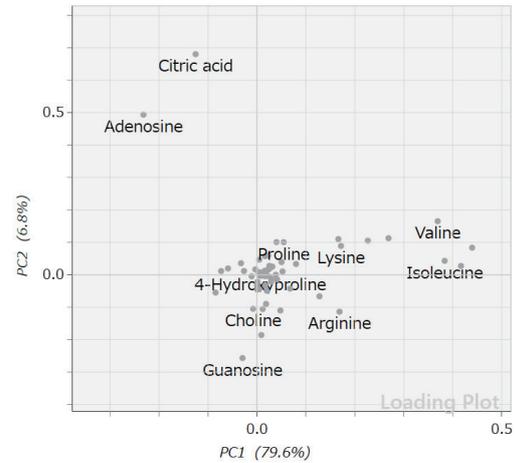
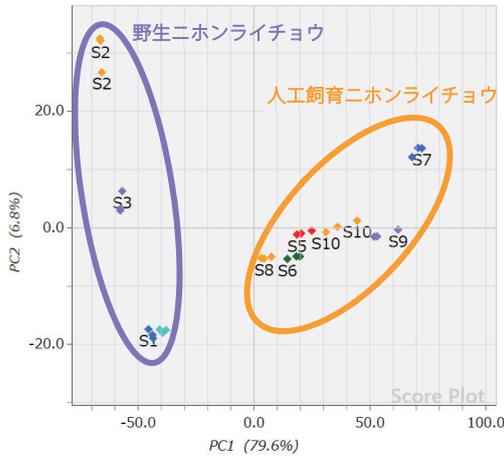


図2 ニホンライチョウ糞便抽出液の主成分分析

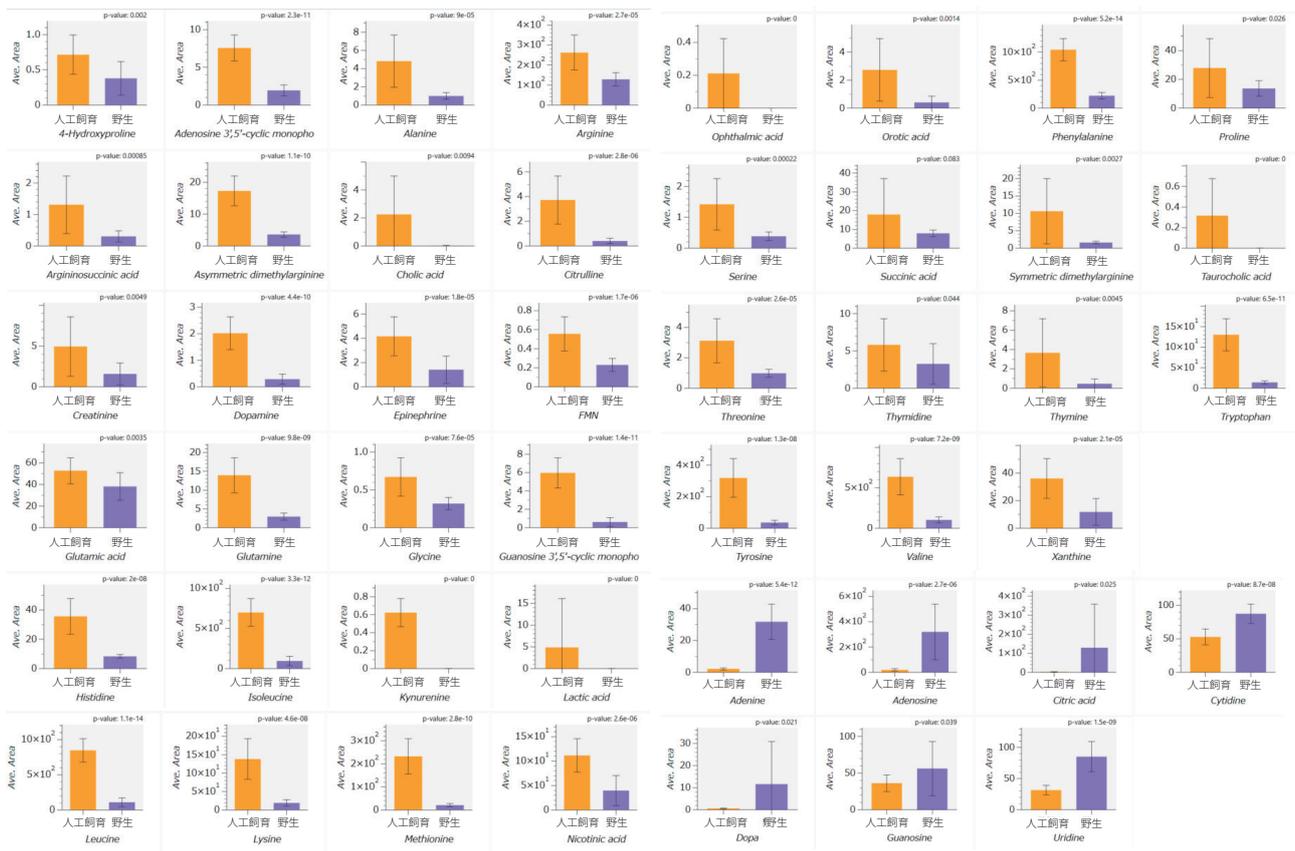


図3 t検定で有意差が確認された成分の内部標準物質に対する面積比比較

本アプリケーションニュース作成にあたり、ニホンライチョウ糞便のご提供並びにご指導を中部大学 創発学術院の牛田一成教授にご協力頂きました。

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証を受けておりません。治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

LCMS および Nexera は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。Traverse MS は、ライフィクス株式会社の商標です。

**株式会社 島津製作所**

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2019年7月

島津コールセンター ☎0120-131691  
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。