

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02988

研究課題名(和文) アミノ酸の安定同位体測定法の超高感度化技術の開発

研究課題名(英文) Development of a highly sensitive method for stable isotope analysis of amino acids

研究代表者

力石 嘉人 (Chikaraishi, Yoshito)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：50455490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS)を用いたアミノ酸の安定炭素・窒素同位体比分析の大幅な感度向上を目標に、(1)反応炉やトラップなどの各接続部のユニオンの再設計、(2)金属触媒を用いた酸化・還元炉の高性能化、(3)マルチパーパスサンプラー(MPS)システムの導入、(4)カラムカップリング法の導入した。その結果、市販のGC-IRMSの約100倍の感度の向上が達成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアミノ酸の安定同位体比を用いた研究は、測定に必要な試料量が多いことが、重大な欠点であった。しかし、本研究により、上記(1)～(4)の技術を導入し、実際に、約100倍の感度の向上が行えたことで、本手法の応用範囲は劇的に広がったと考えている。試料サイズの制約の改善は、生物・生態系とその生合成・代謝系の機能や進化、地球生物圏における有機物・エネルギー循環、宇宙空間や初期地球における有機物生成や生命の起源に関連した研究など、幅広い分野への波及効果が、期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed a highly sensitive method for stable isotope analysis of amino acids, based on the incorporation of the following 4 techniques: (1) redesign of unions for connecting capillary column with reactors and traps; (2) increase of reactivity for reactors with metal catalyst; (3) installation of a multiple purpose sampler (MPS); and utilization of column coupling method. The results indicate that GC-IRMS modified in this study has a high sensitivity by approximately 100 times compared to the commercial GC-IRMS.

研究分野：有機地球化学，同位体生理学，同位体生態学

キーワード：アミノ酸 安定同位体比 GC-IRMS 高感度

1. 研究開始当初の背景

水素・炭素・窒素などの生元素には安定同位体が存在し、その比率(安定同位体比: D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ など)は、(1)地球上の物理化学・生化学反応の基質・経路・フラックスに対して定量的に変化するため、そして(2)この基本原理が個々の反応スケールの研究から地球化学・地質学スケールの研究まで共通の一般則として広く適用できるため、古くから多くの研究で、反応素過程の5W2H(Who, What, When, Where, Why, How, How many)を読み解くツールとして用いられてきた(酒井・松久, 1996, 安定同位体地球化学)。1990年代に、試料全体の同位体比分析から、試料に含まれる個々の有機化合物の同位体比が分析ができる測定装置「ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS)」が開発され、さらに、2009年に「アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階推定法(Chikaraishi et al., 2009, Limnol. Oceanogr. Meth. 7, 740-750)」が開発され、生態学分野で広く用いられるようになると、有機化合物の安定同位体比分析は、生物・生態系とその生成・代謝系の機能や進化、地球生物圏における有機物・エネルギー循環、宇宙空間や初期地球における有機物生成や生命の起源に関連した研究で注目され、また大きく期待されるようになった。

しかし現行の「アミノ酸の窒素同位体比測定法」の成果は、肉眼で認識できる生物の軟組織や、易培養性微生物を用いた生物学・生態学的研究に限定されている。それは現行の測定法には、数ナノ(10^{-9})モルのアミノ酸が必要であり、生物から単離したタンパク質やオルガネラ、難培養性微生物、地質時代の生物化石、隕石やサンプルリターン計画によりもたらされる地球外物質などの研究に求められる「数ピコ(10^{-12})モルレベルでのアミノ酸の安定同位体比測定」に、全く対応できていないためである。

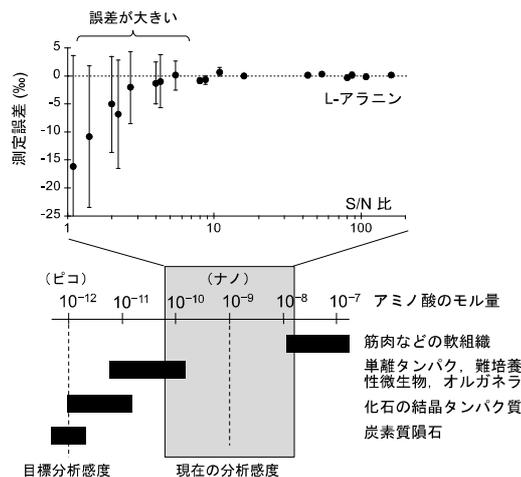


図1 現行法の分析感度(上)と、試料1mg中(難培養性微生物等は、1 μ g)のアロニンのモル量(=安定同位体比測定に求められる分析感度)

2. 研究の目的

アミノ酸の解析手法としての潜在性を最大に引き出し、様々な研究分野への貢献を実現するために、ピコ(10^{-12})モルレベルでの安定同位体比測定法の開発を行う。具体的には、

- (1) 測定機器(ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計:GC-IRMS)の「シグナル/ノイズ(S/N)比の向上」
- (2) マルチパーパスオートサンプラーとカラムカップリング法を用いた「定量導入・高分解能クロマトグラフ法(=測定に必要なアミノ酸量の削減)の開発」
- (3) 開発した測定法の実試料への応用
を行い、その達成により、アミノ酸の安定同位体比分析の適用範囲を劇的に広げ、生理学、生態学、宇宙地球化学の様々な研究に新たな展開をもたらすことを期す。

3. 研究の方法

上記の(1)~(3)の達成目標に対して、以下の実験を実施する

(1) GC-IRMS の S/N 比の向上:

GC-IRMS は、GC と IRMS 間に酸化炉・還元炉・各種トラップ系が配置され、それらがキャピラリーカラムで接続されている機器で、有機化合物の安定同位体比測定に広く用いられており、(i) 各接続部から大気測定機器内へ流入し、ノイズ(N)の増加をもたらす、また、(ii) 既存の酸化炉・還元炉の反応率の低さから、クロマトグラム上での検出ピークの形状が悪く、シグナル(S)の低下をもたらすために S/N 比が悪い。そこで、本研究では、反応炉やトラップなどの各接続部のユニオンの再設計により、測定機器内へ流入する大気の徹底的に排除し、また、反応炉に用いる酸化・還元触媒を検討し、酸化・還元力の大幅な向上を図ることで、S/N 比の向上を図る。

(2-1) マルチパーパスオートサンプラー(MPS)の導入:

MPS は、Gerstel 社が開発した「温度プログラム気化法(PTV)」導入法と、それを効率的に運用するためのオートサンプラーの複合システムであり、一般的な GC 分析に用いられているスプリット/スプリットレス導入法に比べ、低分子化合物で約 5~10 倍、高分子化合物で約 10~20 倍の効率で試料を導入できる。また、下記(2-2)で記す「カラムカップリング法」での使用が予定される長さ 90m, 120m の GC カラムを用いた高圧力下(10PSI 以上)の He キャリアーでも、リークすることがない。本研究では、この MPS を導入することで、GC-IRMS の感度向上を図る

(2-2)カラムカップリング法の導入：

カラムカップリング法は、異なる性質の複数の GC カラムを直接連結して1つのカラムとして運用し、クロマトグラフィの分解能と S/N 比の双方を大幅に向上させる可能性が示唆されている全く新しい分析方法 (Ishikawa et al., 2018. Limnol. Oceanogr. Meth. 16, 607-620) である。Ishikawa et al., 2018 では、高圧耐性の無い GC を使用したが、上記(2-2)の MPS システムを導入すれば、分離能の高い 90m もしくは 120m の GC カラムの使用が可能になる。一般的にカラムの長さが X 倍になれば X 倍の分離能が得られるため、理論的には、90mのカラムで約 4 倍、120m で約 5 倍の分離能が得られると期待できる。

(3)実証研究：

生物から単離したタンパク質、葉緑体やミトコンドリアなどの細胞内オルガネラ、海洋や海底下から採取された難培養性微生物、地質時代の生物化石、隕石や宇宙空間を模したモデル実験で得られたアミノ酸、海洋堆積物(メタンハイドレート生成層前後)などを対象に、開発した高感度測定法の実用研究への応用(実試料の分析)を行う。

4. 研究成果

(1) GC-IRMS の S/N 比の向上：

GC-IRMS の経路を出来るだけシンプルなものに変更し、各接続部のユニオンを、フェラルの斜側面がすり鉢状のユニオンに接するように再設計し、接地面積の最大化を図ることで、10-50mV 程度存在するノイズ (S/N の N) を、0.5-1.0mV まで減少させることに成功した。さらに、パラジウム触媒を用いることで、酸化炉の能力を約 1.5 倍に、ロジウム触媒を用いることで、還元炉の能力を約 7-8 倍向上させることに成功した。

(2) マルチパーパスオートサンプラー (MPS)、及び、カラムカップリング法の導入：

上記(1)の「ユニオンや経路の再設計」および「反応炉に用いる触媒の最適化」に加え、マルチパーパスオートサンプラー (MPS)、及び、カラムカップリング法を導入した結果、合計で、市販の GC-IRMS の感度の約 20 倍に達した。これに、「導入量による測定値変化の補正」を実施し、その結果、市販の GC-IRMS の約 80 倍の感度の向上を達成した(例えば、市販：8nmol、本システム：0.1nmol)。その後、GC の分離キャピラリーカラムの内径の最適化を行い、現在は、概ね、市販の GCIRMS の約 100 倍の感度の向上を達成している。

(重大な問題点の発覚)

本研究により、市販の GC-IRMS の約 100 倍の感度の向上が達成された。これは当初の計画の第 1 到達目標である「100 倍」に届き、最終目標である「1000 倍」にの 1/10 である。しかし、この高感度化により、試料に少量含まれているアミノ酸(例えば、メチオニンや、D 体アミノ酸など)へのアクセスが可能となった一方で、既存のクロマトグラフィでは、これらの微量の有機化合物を、同じ試料に含まれるメジャーな有機化合物から十分に分離できない(そのため、同位体比が測定できない)という課題に頻繁に悩まされるようになった。

そこで、この「クロマトグラフィでのピーク分離の向上」を目的に、基盤研究 A (20H00185、2次元ガスクロマトグラフ-安定同位体比質量分析計 (GC-GC-IRMS) の開発) を、研究計画最終年度前年度応募し、採択されたため、本研究は、当該基盤研究 A に引き継ぐ形で終了した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Pauli j.N., Manlick P.J., Dharampal P.S., Takizawa Y., Chikaraishi Y., Niccolai L.J., Grauer J.A., Black K.L., Restrepo G.M., Perring P.L., Wilson E.C., Martin M.E., Curras M.R., Bougie T.A., Thomson K.L., Smith M.M., Steffan S.A | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Quantifying niche partitioning and multichannel feeding among tree squirrels | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Food Webs | 6. 最初と最後の頁 e00124 ~ e00124 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fooweb.2019.e00124 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Steffan S.A., Dharampal P.S., Danforth B.N., Gaines-Day H.R., Takizawa Y., Chikaraishi Y. | 4. 巻 194 |
| 2. 論文標題 Omnivory in Bees: Elevated Trophic Positions among All Major Bee Families | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The American Naturalist | 6. 最初と最後の頁 414 ~ 421 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1086/704281 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Sugahara Haruna, Takano Yoshinori, Tachibana Shogo, Sugawara Iyo, Chikaraishi Yoshito, Ogawa Nanako O., Ohkouchi Naohiko, Kouchi Akira, Yurimoto Hisayoshi | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Molecular and isotopic compositions of nitrogen-containing organic molecules formed during UV-irradiation of simulated interstellar ice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 GEOCHEMICAL JOURNAL | 6. 最初と最後の頁 5 ~ 20 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2343/geochemj.2.0553 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takano Yoshinori, Chikaraishi Yoshito, Imachi Hiroyuki, Miyairi Yosuke, Ogawa Nanako O., Kaneko Masanori, Yokoyama Yusuke, Kruger Martin, Ohkouchi Naohiko | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Insight into anaerobic methanotrophy from 13C/12C- amino acids and 14C/12C-ANME cells in seafloor microbial ecology | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 14070 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31004-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Tsuchiya Masashi, Chikaraishi Yoshito, Nomaki Hidetaka, Sasaki Yoko, Tame Akihiro, Uematsu Katsuyuki, Ohkouchi Naohiko | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Compound-specific isotope analysis of benthic foraminifer amino acids suggests microhabitat variability in rocky-shore environments | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Ecology and Evolution | 6. 最初と最後の頁 8380 ~ 8395 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ece3.4358 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Xing Daochao, Chikaraishi Yoshito |
| 2. 発表標題 Trophic position estimate in a marine ecosystem with a wide 15N baseline |
| 3. 学会等名 International Symposium on Isotope Physiology, Ecology, and Geochemistry 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Chikaraishi Yoshito |
| 2. 発表標題 Trophic isotopic discrimination |
| 3. 学会等名 International Symposium on Isotope Physiology, Ecology, and Geochemistry 2019 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takizawa Yuko, Chikaraishi Yoshito |
| 2. 発表標題 Remarkable fractionation of nitrogen isotopes in anaerobic amino acid metabolisms. |
| 3. 学会等名 The 29th International Meetings on Organic Geochemistry (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 力石嘉人 |
| 2. 発表標題 生態系のエネルギー循環からみた共生系 |
| 3. 学会等名 共生起源研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshito Chikaraishi |
| 2. 発表標題 Habitat use of organisms viewed with an Isoscape map, based on nitrogen isotopic composition of amino acids |
| 3. 学会等名 International workshop on new application of stable isotope approaches (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshito Chikaraishi |
| 2. 発表標題 Compound-specific isotope analysis (CSIA) of 15N/14N in amino acids: as a potential powerful tool for studying physiology, ecology, and geochemistry |
| 3. 学会等名 42nd International Symposium on Capillary Chromatograph and 15th GCxGC Symposium (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 力石嘉人, 滝沢侑子, Steffan, A.S. |
| 2. 発表標題 食物連鎖の中に存在する嫌氣的代謝プロセスの可視化: 蜜蜂が姿を消した原因を探る |
| 3. 学会等名 有機地球化学会品川シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Chikaraishi Y., Takizawa Y. |
| 2. 発表標題 Is Isotopic Fractionation in Carbon Isotopes Coupling with That in Nitrogen Isotopes in Food Webs? |
| 3. 学会等名 AOGS2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Chikaraishi Y., Takizawa Y. |
| 2. 発表標題 Stable isotope analysis of amino acids: as a new tool for illustrating central biosynthetic and metabolic flux. |
| 3. 学会等名 The 28th International Meeting of Organic Geochemistry (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 力石嘉人 |
| 2. 発表標題 アミノ酸の窒素同位体比を用いた「生物の栄養段階」推定法 |
| 3. 学会等名 日本生態学学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

| | |
|--|--------------------|
| 国際研究集会 International Symposium on Isotope Physiology, Ecology, and geochemistry | 開催年 2019年～2019年 |
|--|--------------------|

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|