

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K14590

研究課題名（和文）脂質の分解量を評価する：分子内安定炭素同位体比からの新たなアプローチ

研究課題名（英文）Evaluation of lipid degradation by position-specific carbon isotope analysis

研究代表者

滝沢 侑子（Takizawa, Yuko）

北海道大学・低温科学研究所・准教授

研究者番号：90822536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体内または環境中に存在する「脂質」が、どのように生産され、その後どの程度分解されたかを、評価する新規手法：脂肪酸分子内（カルボニル基）安定炭素同位体比解析法の実用化を達成することを目的に(i)申請者がこれまでに開発した測定機器の測定条件の最適化および(ii)その測定法で得られた同位体比から、実際に脂質が分解された量を評価する方法論の構築に必須である「同位体分別係数」を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、生物が持つ、生体内でのエネルギー収支や恒常性を維持する機構の理解を助けるのみならず、環境変化に対する生物の応答（生存戦略、環境変化への適応や進化）、ひいては、生物圏における物質の移動・エネルギー循環の、定量的な理解に貢献する。例えば、寒冷環境や季節変化に対抗する手段として脂質を保持する生物が「実際に利用した脂質の種類や量」を定量的に評価することが可能になる。また、生体内での反応のみならず、堆積物や水柱に残存するバイオマーカー（炭素数16, 18などの飽和・不飽和脂肪酸）から、生物が「脂質を生産した当時の環境情報」にアクセスできるようになると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a method for quantitative analysis of 'lipid degradation based on the following two approaches: 1) Optimization of analytical conditions in the position-specific isotope analysis of carbonyl carbon on fatty acids; and 2) identification of an isotope effect (isotopic fractionation factor) for lipid hydrolysis on plant metabolism.

研究分野：有機地球化学

キーワード：安定同位体 脂質 エネルギー収支

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生物にとって脂質は、エネルギー源や基質(炭素源)としての役割を持つ重要な有機化合物である。自然界に生息する多くの生物は、独立栄養生物または自らが生産・同化した有機化合物を、分解・異化することによってエネルギーを獲得し、生命活動の恒常性を維持している。有機化合物が生体内、あるいは環境中で果たす機能や動態(すなわち、脂質のような有機化合物が、いつ・どのような環境で生産され、そしてその後、何のために・どのくらい分解され、利用されていくのか)を体系的に理解することは、環境変化に対する生物の応答や、それを取り巻く生態系、生物圏における物質循環を理解するために必要不可欠である。

有機化合物の動態を理解する手段のひとつに安定同位体比解析法がある。この安定同位体比解析法は、天然に存在する有機化合物が、誰(何)によって、どのような環境で作られたのか?を知るために、この約30年間に様々な分野で盛んに研究されてきた。この解析法は、有機化合物の組成が起源生物に特異的であること、そして $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ などの安定同位体比自然存在度が、物理化学・生化学的な反応に伴い規則的に変化すること、そしてその変化率が、生物種に関わらず一定の普遍性を有するという経験則に基づいている。有機化合物の安定同位体比は、理論上、生産するプロセス(合成経路)と、そこから分解された量(分解量)のバランスによって決定される。にもかかわらず、これまでの安定同位体比を用いた研究は「生産」について扱ったものが多く、「分解」については、検出する測定法も、定量的に評価する方法論も存在しなかった。有機化合物の動態を正しく理解するためにも、生産と分解のそれぞれのシグナルを優れた精度で読み取る測定法・方法論を確立することは、安定同位体比解析法の積年の課題であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内または環境中に存在する「脂質」が、どのように生産され、その後どの程度分解されたか?を、評価する新規手法:脂肪酸分子内(カルボニル基)安定炭素同位体比解析法の実用化を達成することである。具体的には、(i)申請者がこれまでに開発した測定機器(ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計の改良型)の「測定条件の最適化」および(ii)その測定法で得られた同位体比から、天然試料に含まれる脂質の生産プロセスと分解量を評価するための「方法論(プロキシ)の確立」をおこなう。本研究の達成は、脂質分子中に残されている「生産と分解の双方の記録」を「単一の分子」から読み解く具体的な方法論を世界で初めて提唱し、将来、生物が「有機物を、いつ・どこで・何のために利用しているか」に関して、個体レベルでの生存戦略から、生物圏における物質(エネルギーとしての有機物)循環までを定量的に評価するための主要ツールとなる新規解析手法を提案できる。

### 3. 研究の方法

本研究は大きく2つのパートで構成される。初年度は、測定条件の最適化を優先して研究する。最適化が達成され次第、方法論(プロキシ)の確立へとステップアップする。(i)測定条件の最適化:開発したプロトタイプの測定機器をもとに、生体試料から環境試料まで様々な対象を測定するうえで、十分な安定性と精度(通常有機化合物分子レベル同位体比分析の測定精度である0.3-0.5%と同等の精度)を確保するための最適条件(具体的には、GCカラムの種類、キャリアガスの流速、導入量、熱分解炉の温度等)を検討する。(ii)方法論(プロキシ)の確立:カルボニル炭素を持つ脂質(トリアシルグリセロール)をエネルギー源かつ炭素源として利用することが知られる「植物種子」をモデル試料として用いる。分解前後におけるカルボニル炭素の同位体比変化を、測定値(熱分解によって得た値)と、真値(分子レベル測定からマスバランス計算によって得た値)とで比較し、校正法を作製する。さらに得られた校正法を用いて、実試料の同位体比測定に必要な標準物質を作製する。

### 4. 研究成果

本研究は、2020年度から2022年度に実施および達成する予定の研究課題であったが、新型コロナウイルス感染拡大防止の措置等の影響を受け、特に初年度における研究の進捗が著しく悪く、その影響は最後まで残ることとなった。そのような中で達成できた成果を以下に記す:

#### ① 脂肪酸分子内(カルボニル基)安定炭素同位体比測定のための分析装置:ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計の設置(図1)

例えばトリアシルグリセロールなどの「カルボニル基を持つ脂質」を対象に、生産と分解の両方の情報を取り出すための分析装置をデザイン、及び設置した。その特徴はガスクロマトグラフ(GC)と同位体比質量分析計(IRMS)の間に併設した「燃焼炉」と「熱分解炉」

にある。分析系に導入された脂質由来の脂肪酸は、GCで分離された後、燃焼炉では「分子全体」が、熱分解炉では「カルボニル基」のみが二酸化炭素ガスに変換される。その後IRMSがそれぞれの二酸化炭素ガスの安定同位体比を測定する。これらの結果と、マスバランスから算出した「アルキル鎖」の同位体比を組み合わせることで、アルキル鎖の同位体比からは生産のプロセスを、カルボニル基の同位体比からは分解量をそれぞれ評価することが可能である。

条件検討の結果、例えば、熱分解炉の温度と熱分解によって得られる二酸化炭素の安定同位体比との関係性は図3のようになる。温度が低い条件（1100℃以下）と高い条件（1200℃以上）では、同位体比が安定しない。これは不完全な熱分解と他の炭素（カルボニル基以外に由来する）の酸化分解による影響を受けていると考えられた。

② 脂質の分解における炭素同位体分別係数を算出 (Takizawa and Chikaraishi, 2021)

生物が利用する脂質には様々な種類があるが、脂質の分解、特に、脂質分子中のカルボニル炭素に酵素が反応し加水分解されるプロセスは、多くの生物が持つ分解反応であり、おおよそ共通の反応機構によって進行する。また、分解における反応部位での同位体比変化（<sup>13</sup>Cの濃縮）は、理論上、反応量の増加に伴い増大すると考えられる。本研究ではこの「反応量と、反応部位での<sup>13</sup>C濃縮」の関係に着目し、脂質分解の反応部位である「脂肪酸成分のカルボニル炭素」に、反応量の程度に応じた同位体比情報（<sup>13</sup>C濃縮）が記録されるという仮説に基づき、植物試料を用いて実験をおこない、実際に分析をおこなった。

その結果、植物生体内で新規合成が極めて少ない状況下で脂質が顕著に分解されると、脂質中の脂肪酸分子のカルボニル炭素に<sup>13</sup>Cが確かに濃縮することを明らかにした。また、レイリーモデルに基づく検証の結果、試料中の脂質の残存量が少ない（言い換えると「分解量が多い」）ほど、多くの<sup>13</sup>Cが濃縮すること、そしてこの現象は、脂質が酵素によって加水分解される時に<sup>12</sup>Cから優先して反応することで得られるとものであると解釈できた（その際の同位体分別係数 $\alpha$ は0.9086であり、これは光合成による二酸化炭素固定の際におこる同位体分別の大きさに匹敵する）。脂質は植物のみならず動物にとっても主要な炭素源かつエネルギー源であることから、今後分析法の開発と方法論の確立を進めれば、脂質分解・利用の理解の進展に貢献できると期待している。

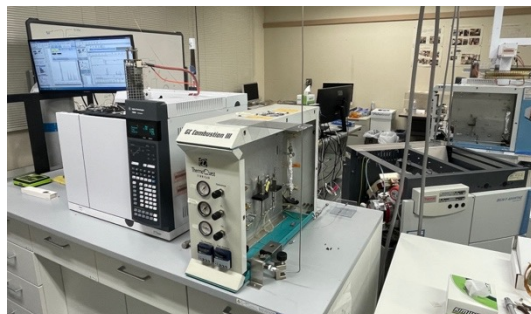


図1 実際に設置されたガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS)

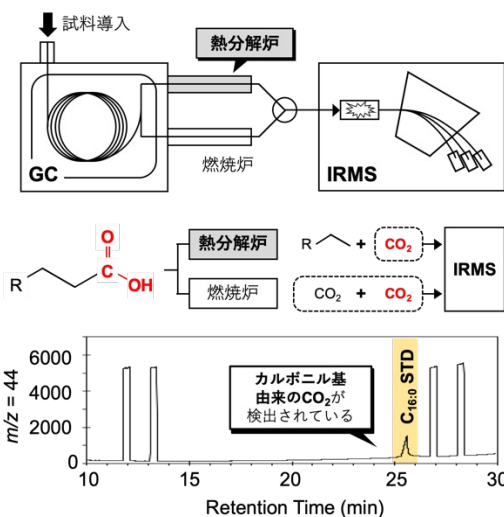


図2 GC-IRMSの概念図 (上)、導入された脂肪酸分子が熱分解炉、燃焼炉でそれぞれ起こす反応 (中)、実際に検出される標準試料 (パルミチン酸) カルボニル基由来の炭素の $m/z=44$ のピーク (下)

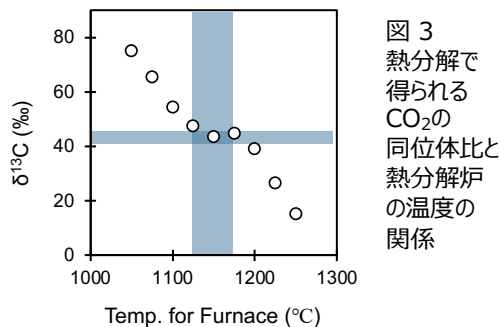


図3 熱分解で得られるCO<sub>2</sub>の同位体比と熱分解炉の温度の関係

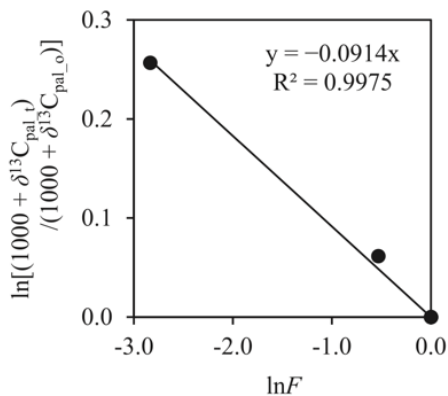


図4 植物が貯蔵する脂質分解における同位体分別係数の見積り。レイリーモデルに従い、図の傾きから同位体分別係数 $\alpha=0.9086$ であることがわかった (Takizawa and Chikaraishi, 2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takizawa Y. and Chikaraishi Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 A large fractionation of 13C/12C ratios for palmitate metabolism in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Researches in Organic Geochemistry	6. 最初と最後の頁 67-72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 力石嘉人, 滝沢侑子
2. 発表標題 バイオマーカーの安定同位体比分析の新展開：テルペンの同位体分析の可能性
3. 学会等名 札幌古環境勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Takizawa
2. 発表標題 Storage lipid consumption during plant metabolism: potential advance for the position-specific isotope analysis
3. 学会等名 International Symposium on Isotope Physiology, Ecology, and Geochemistry 2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022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0件

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
---------	---------