

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H06297・20K20316

研究課題名(和文)核酸安定同位体生態学の創成：遺伝情報と環境情報の統合へむけて

研究課題名(英文)Stable isotope analysis of the nucleic acids

研究代表者

木庭 啓介(Koba, Keisuke)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：90311745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：生物体中の核酸については、その窒素炭素安定同位体比についてほとんど理解されていない。そこで核酸の安定同位体比測定を実現するため、生物体からの核酸抽出と、その微量試料を用いた同位体測定のための手法開発を行った。元素分析計連結型質量分析計(EA-IRMS)を改良し、微量試料での測定手法を確立した。次にバクテリアを用いて核酸精製能が高い抽出キットを探索し、抽出された核酸の窒素同位体比をEA-IRMSで測定すると、菌体の同位体比よりも約8%低い値で安定していた。よって、この手法で核酸窒素同位体比測定が可能となり、核酸窒素同位体比からバクテリア菌体の窒素同位体比を復元することができる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この核酸窒素同位体比から生物体の窒素同位体比が復元できるという発見は、たとえば古環境研究において過去の生物の食性を解析したり、環境DNA研究において、採捕することのできない生物の食性を解析したり、というような全く新たな展開をもたらすことができる可能性を持つものである。今後、基礎的な知見として重要な、様々な生物におけるバイオマスと核酸の窒素同位体比の関係、炭素同位体比の関係を明らかにするところから展開してゆくことにより、本格的な発展が期待できると考えている。

研究成果の概要(英文)：The nitrogen isotopic ratio of the nucleic acids is unknown due to the difficulties in the measurement. We modified EA-IRMS for the tiny samples (i.e. extracted nucleic acids) and tested the extraction kits for DNA.

We found that the nitrogen isotopic ratio of the purified nucleic acids was lower by ca. 8 ‰ than that of bacterial biomass, indicating that the nitrogen isotopic ratio of nucleic acids can be used to reconstruction of the nitrogen isotopic ratio of the bacterial biomass.

研究分野：生態系生態学

キーワード：核酸 窒素同位体比 DNA RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ^{13}C や ^{15}N といった安定同位体は、メタボローム解析のようにトレーサーとして生物などの物質代謝・循環系へ添加しその運命を追跡するトレーサー法、そして自然界における存在比の微小な変動を精密分析することで、非侵襲的に物質の挙動を判定する自然存在比法、の2通りで医学、薬学、生理学、生物学、地球化学、考古学など様々な分野で用いられてきた。例えば ^{15}N と ^{13}C の自然存在比 (^{15}N 、 ^{13}C) を用いる同位体生態学では、生物または生物由来の物質がもつ ^{15}N から生物の栄養段階や生態系への人為起源窒素の影響の大きさ、富栄養状況、 ^{13}C から生物の光合成過程、生息環境、生態系でのメタン生成過程とその食物網への影響の大きさ、といった生態系の維持管理に極めて重要な情報を提供できる学問基盤が確立している。

(2) しかし、「捕集可能な生物についてしか同位体比は測定できない」という、当然の呪縛からは逃れることはできていない。捕獲が難しい大型動物、捕獲できない希少種、そして生態系の基礎基盤として重要でありながら、その実態を測ることの困難な微生物など、多くの重要な生態系構成要素については、その生物を捕獲できないために同位体比が測定できない、つまり生態を理解できないのである。同位体生態学が始まって半世紀、成熟を迎えた今、この根源的な問題がボトルネックになっている。

(3) DNA が生物相や生物種といった遺伝情報を有しているのと同様に、物質の安定同位体比はその物質の生成・消費・輸送過程という環境情報を有している。ここで、環境中の1物質としてDNAをとらえ、その同位体比測定が可能となれば、DNAから生物情報とその生物の生息、生態環境についての情報を得ることができる。例えば、捕獲できないオオサンショウウオの生息場所、その餌資源がDNAの同位体比測定により明らかになる。しかし、環境中のDNA(eDNA)は自然環境中では微量しか存在せず、その同位体比測定はきわめて困難である。それどころか、これまで生物体の核酸分子についてその ^{15}N と ^{13}C を測定した例は極めて少なく、そもそもどのような値を取るかすら、未知の状態である。その大きな理由が測定に供することができる核酸分子量が少ないために、通常の測定では精度良く ^{15}N と ^{13}C を測定することが不可能であることが挙げられる。

2. 研究の目的

(1) そこで、本研究はこれまで応募者が培ってきた超微量安定同位体比測定技術を駆使することで、まずは生物体が保持する核酸について、 ^{15}N 測定を実現することを目標とした。このことで、将来的にeDNAについての ^{15}N 、 ^{13}C 測定、そしてeDNA同位体による生態系解析学、核酸同位体生態学への発展に資する基礎的な研究を実現できると考えた。

3. 研究の方法

(1) 本研究は2つの軸で進めることとした。1つ目は抽出された核酸、広義には微量溶存有機化合物の ^{15}N 測定手法の検討、2つ目は核酸の抽出自体の検討、である。

(2) 溶存有機化合物の安定同位体比測定については多くの研究がなされてきているが、その多くはかなり大量の試料を用いるものであり、本研究が目指す測定は、かなりの微量化・高感度化が必要となる。そのため、今回は1つ目の検討において、以下の4つのシステムを利用を試みた。A 液体クロマトグラフィーによる溶存有機物分離のあと湿式酸化、そして質量分析計を組み合わせたシステム(LC-PO-IRMSシステム)による測定(これは ^{13}C のみで、 ^{15}N については湿式酸化の生成物を次のBシステムで測定する)、B 溶存有機物を湿式酸化後、特殊バクテリアを用いて N_2O に返還後、IRMSにて測定するシステム(PO-GC-IRMSシステム)、C 溶存有機炭素測定計に溶存有機物を供給し、生成されるNOガスをNOガストラップを組み合わせることでトラップし、そのNOガスを N_2O に変換してIRMSにて測定するシステム(TOC-GC-IRMSシステム)、D 元素分析計にIRMSを接続して測定するシステム(EA-IRMSシステム)である。

(3) また、2つ目の検討においては、一般的な核酸抽出キットを用いて生物体からできるだけ純粋な核酸分子を取り出すということで、複数の異なる抽出キットを用い、その精製度を検討した。具体的には一般に核酸抽出で用いられている吸光度やタンパク質などのコンタミネーションの把握に加え、それらでは見ることが難しいと考えられる炭素化合物のコンタミネーションを査定するために、抽出産物のC/N比に着目し、理想状態の核酸C/N比と比較して抽出核酸試料のC/N比が合致するかどうかという検討を行った。

4. 研究成果

(1) 検討の結果、LC-PO-IRMS は水分そして酸素ガスが IRMS に供給されてしまう構造になっており、カタログスペックでは良好な測定ができるとうたわれているものの、実際には IRMS 自体の状態が不安定になることが大変多いことが明らかとなった。そのため、安定した測定が難しいこと、また、湿式酸化での核酸分子の硝酸イオンへの酸化が不十分であることから、利用が困難であると結論づけた。次に PO-GC-IRMS でも同様に、湿式酸化での核酸分子の完全酸化が難しく、不十分な酸化結果となってしまったためにこれも断念した。さらに続けて、TOC-GC-IRMS では、NO ガストラップによる NO ガスのトラップ、そしてそのトラップ産物の N₂O への変換は十分な精度で実現することがわかり、大変期待の持てる仕様であることが判明した。なお、この部分での検討において、GC-IRMS を用いた詳細なシステムの改良や測定法の制度確認などを行い、その内容については論文として公表している (Kobayashi et al. 2020)。さらに TOC 計での測定では N 濃度だけでなく C 濃度も測定できるため、核酸分子の生成状況を C/N 比として検討することができるというメリットもある。しかし TOC 計での高温触媒溶存有機物分解の際のブランクを低減することが大変困難であり、流路の改造などの検討を行ったが、残念であるが利用できるレベルとは至らなかった。最後に EA-IRMS については、世界中で普及しているシステムであることもあり、安定に測定を行うことができるものの、他のシステムと比較して数十倍から数百倍の試料量を必要とするというネックがあった。しかし、本研究において、このシステムの微量化を進めることで、これまでよりも高感度で同位体比測定が可能となる EA-IRMS システムを構築することができ、それを利用して検討を進めることができた。なお、この EA-IRMS の改造については軽微なものであり、多くの EA-IRMS ユーザーが対応可能なものと思われることもあり、論文化し発表している (木庭ら 印刷中)。実際、所属する機関が全国共同利用・共同研究拠点と言うこともあり、この拠点事業の中でこの改良型 EA-IRMS、そして GC-IRMS についてはすでに多くのユーザーが利用し、微量での同位体比測定を実施している。

(2) 改造型 EA-IRMS を用いて、モデルサンプルとしてバクテリアを対象として、異なる核酸抽出キットでの検討を行った。通常の核酸抽出では吸光度を用いて核酸の生成状態をみているが、抽出キットによらず吸光度では核酸精製は良好な状態であった。しかし、実際に抽出物の成分を測定してみると、あるキットではタンパク質の除去効率が高く、さらに核酸の回収率が高かったものの、炭素化合物のブランクレベルが大変高く、¹⁵N 測定には利用できるが、¹³C 測定には利用できないということが判明した。一方別のキットでは、タンパクの除去が不十分であり、前者のキットと比較して核酸の回収率が低かったことから、このキットはそもそも利用に値しないものであると判断せざるを得なかった。核酸抽出キットに含まれている試薬それぞれについて、炭素窒素ブランクを引き起こす可能性があるものを選び出し、代替品の利用が可能かなどの確認も行ったが、劇的にブランクを下げつつ、核酸回収率を低減しないプロトコルの開発にまでは至らなかった。

(3) ¹⁵N 測定に利用できるキットを用いて、実際にバクテリアの核酸についてその ¹⁵N を測定してみた (図)。同時にバクテリアのバイオマスの ¹⁵N も測定し、比較してみると、いろいろな培養条件 (嫌気または好気) でバクテリアバイオマスの ¹⁵N は変動するが、その核酸の ¹⁵N は約 8%低い値で推移していた。

つまり、利用する栄養塩やバクテリアの生理状態によってバイオマスの ¹⁵N は変動しても、核酸の ¹⁵N はそこから 8%低い値と見なしてよいと思われる。この結果は唯一の先行研究である Strable et al. (2011) の 8% (モルモットでの研究) と相補的であった。このことは、核酸の ¹⁵N から生物体バイオマスの ¹⁵N が、そしてその食性が解析できる可能性を示すものである。この結果についてはすでに数回の学会発表を経て、現在国際学術雑誌への投稿を目指して整理している状況である。また、この測定技術をベースとして、より生物の生理特製 (特に生態学的化学量論) と安定同位体比のシグナルの関係を明らかにすることを目指した研究が、本研究に従事していた若手博士研究者によって提案され、別の科研費でのプロジェクトとして走り始めている。

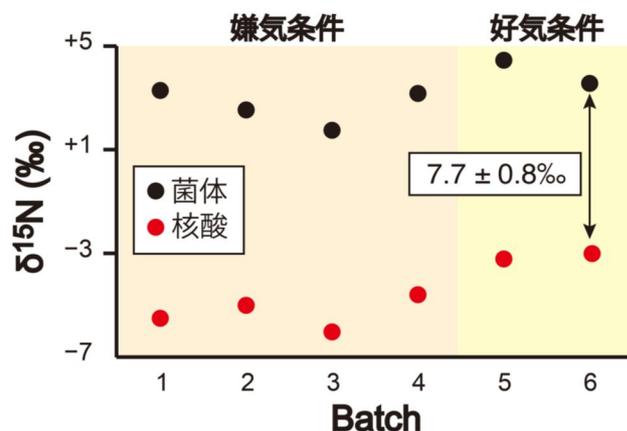


図. 脱窒菌の菌体と核酸の窒素同位体比

(4) ¹⁵N の測定についてはある程度のもどが立ったものの、残念ながら確実なプロトコルの作成、そして様々な生物の核酸同位体比パターンの収集、とまでは至らなかった。しかし、改良型 EA-IRMS の利用と、さらなる改良による微量測定を実現することで、プロトコルの制約条件である核酸回収量についてはより緩和することができる予定である。そうすると、かなり強い

条件で核酸を含んだ溶存有機物を分離しても、その分離において核酸の同位体比に変動がなければ、量が減っても測定が可能となる。この回収量と精製強度のバランスを撮ることがこれまででは難しかったが、あと数年かけて、なんとかこの核酸同位体測定を軌道に乗せ、次のステップへと展開したい。

< 引用文献 >

Kobayashi K., Fukushima K., Onishi Y., Nishina K., Makebe A., Yano M., Wankel S.D., Koba K., Okabe S. Influence of $\delta^{18}\text{O}$ of water on measurements of $\delta^{18}\text{O}$ of nitrite and nitrate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2021, 35:e8979.

木庭啓介、木下桂、大西雄二、福島慶太郎、尾坂兼一、松尾奈緒子、舟川一穂、瀬古祐吾、目戸綾乃、平澤理世、小川奈々子、兵藤不二夫、由水千景、元素分析計連結型安定同位体比質量分析計の簡易改造による微量試料炭素窒素安定同位体比測定、*Radioisotopes*、印刷中

Maggie S. Strable, Carolyn L. Tschanz, Behzad Varamini, Yoshito Chikaraishi, Naohiko Ohkouchi and J. Thomas Brenna, Mammalian DNA $\delta^{15}\text{N}$ exhibits 40% intramolecular variation and is unresponsive to dietary protein level, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2011, 25, 3555–3562

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kazuki Shinoda, Midori Yano, Muneoki Yoh, Makoto Yoshida, Akiko Makabe, Yohei Yamagata, Benjamin Z. Houlton, Keisuke Koba	4. 巻 34
2. 論文標題 Control of the Nitrogen Isotope Composition of the Fungal Biomass: Evidence of Microbial Nitrogen Use Efficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 5-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1264/jsme2.ME18082	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 Liu Xue-Yan, Koba Keisuke, Koyama Lina A., Hobbie Sarah E., Weiss Marissa S., Inagaki Yoshiyuki, Shaver Gaius R., Giblin Anne E., Hobara Satoru, Nadelhoffer Knute J., Sommerkorn Martin, Rastetter Edward B., Kling George W., Laundre James A., Yano Yuriko, Makabe Akiko, Yano Midori, Liu Cong-Qiang	4. 巻 115
2. 論文標題 Nitrate is an important nitrogen source for Arctic tundra plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 3398 ~ 3403
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1715382115	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 木庭啓介、木下桂、大西雄二、福島慶太郎、尾坂兼一、松尾奈緒子、舟川一穂、瀬古祐吾、目戸綾乃、平澤理世、小川奈々子、兵藤不二夫、由水千景	4. 巻 -
2. 論文標題 元素分析計連結型安定同位体比質量分析計の簡易改造による微量試料炭素窒素安定同位体比測定	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radioisotopes	6. 最初と最後の頁 -
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 -
1. 著者名 Kobayashi Kanae, Fukushima Keitaro, Onishi Yuji, Nishina Kazuya, Makabe Akiko, Yano Midori, Wankel Scott D., Koba Keisuke, Okabe Satoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Influence of $\delta^{18}O$ of water on measurements of $\delta^{18}O$ of nitrite and nitrate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 e8979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rcm.8979	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大西雄二・木庭啓介
2. 発表標題 バクテリアにおける核酸の安定同位体測定手法の開発
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大西 雄二・福島慶太郎・木庭 啓介
2. 発表標題 安定同位体比測定のための微生物からの核酸抽出
3. 学会等名 2019年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木庭啓介
2. 発表標題 土壌微生物と植物の窒素獲得競争：実際の現場では？
3. 学会等名 2019年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木庭啓介
2. 発表標題 土壌微生物と植物の窒素獲得競争：安定同位体比からの再検討
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木下 桂・大西 雄二・福島 慶太郎・木庭 啓介
2. 発表標題 琵琶湖集水域の寄生虫類相と安定同位体を用いた栄養段階の解明
3. 学会等名 2019年度生物地球化学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木下桂・浦部美佐子・大西雄二・福島慶太郎・木庭啓介
2. 発表標題 琵琶湖集水域におけるコイ科魚類寄生虫類相と栄養段階：安定同位体測定を用いた解明
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keisuke Koba
2. 発表標題 Nitrogen and oxygen isotope techniques to elucidate the uncovered functions in the ecosystems
3. 学会等名 Ecosystem N cycling under climate change (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西 雄二・後藤晶子・福島慶太郎・木庭 啓介
2. 発表標題 バクテリアからの核酸抽出と安定同位体比測定
3. 学会等名 日本生態学会第68回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ツンドラの生態系でも硝酸イオンは大切な窒素源だった
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/180313_1.html
森林に忍び寄る静かな異変 激増する窒素は地球に何をもたらすのか
http://shochou-kaigi.org/interview/interview_49/

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
研究分担者	木村 浩之 (Kimura Hiroyuki) (30377717)	静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授 (13801)	

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