

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 30 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21684033

研究課題名（和文）アミノ酸の分子レベル多次元安定同位体比測定法の開発

研究課題名（英文）Development of multi-stable isotope analytical method of amino acids

研究代表者

力石 嘉人（CHIKARAI SHI YOSHITO）

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員

研究者番号：50455490

研究成果の概要（和文）：本研究では、アミノ酸の窒素・炭素・水素安定同位体比分析法の開発を行った。その結果、(1)窒素に関しては、ピバロイルイソプロパノール誘導体化法により、実試料において、0.5nmol の試料で $\pm 0.5\%$ の測定が、(2)炭素に関しては、1段階誘導体化法により、標準試料であれば、0.1nmol の試料で $\pm 0.5\%$ の測定が、(3)水素に関しては、ピバロイルイソプロパノール誘導体化法により、0.5nmol の実試料において、 $\pm 50\sim 100\%$ の測定が可能になった。

研究成果の概要（英文）：I developed a compound-specific isotope method for measuring the stable nitrogen, carbon, and hydrogen isotopic compositions of amino acids. The results show (1) nitrogen isotopic composition can be determined by pivaloyl/isopropyl ester derivatization, with better than $\pm 0.5\%$ and the minimum sample amount of 0.5 nmol N, (2) carbon isotopic composition can be determined by ethyl ester derivatization, with better than $\pm 0.5\%$ and the minimum sample amount of 0.1 nmol N, and hydrogen isotopic composition can be determined by pivaloyl/isopropyl ester derivatization, with better than $\pm 50\sim 100\%$ and the minimum sample amount of 0.5 nmol N. However, the carbon isotope analysis is only available for standard solution of amino acids but not for natural samples, at this moment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	20,500,000	6,150,000	26,650,000

研究分野：数物系化学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：アミノ酸，安定同位体，生態系，光学異性体

1. 研究開始当初の背景

水素・炭素・窒素・酸素などの生元素は、地球の大気水圏・地殻圏・生物圏を構成する主要元素であり、各圏間を化学種・安定同位体比を変えながら比較的短い時間で移動し

ている。これらの元素の安定同位体比（D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ など）とその変化率は、起源や生化学反応の過程を解明する上で重要なツールとして古くから多くの研究に用いられてきた。アミノ酸は、生物の生合成・代謝

に深く関わる有機化合物である。D-体・L-体の光学異性体が存在し、地球の生物はタンパク質の基本構造として L-体アミノ酸を用いる一方、極少量の D-体アミノ酸も生命活動の維持に欠かせない。さらに炭素質隕石などの地球外物質中にも存在し、その存在量や異性体の偏りに関する研究は *Nature* や *Science* などの超一流紙にいくつも掲載されてきた。すなわち、アミノ酸の安定同位体比は、地球生物圏の生合成・代謝・生理機能だけでなく、宇宙における有機物の生成過程を解き明かす潜在的可能性を有している (図1)。

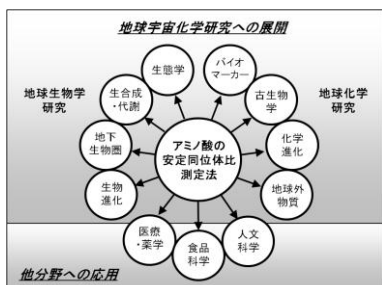


図1 アミノ酸の分子レベル安定同位体比測定法の展開領域

ところが研究開始時において、アミノ酸の安定同位体比研究は、ほとんど行われてなかった。それは、微量試料に含まれる個々のアミノ酸の同位体比を精度良く測定する確かな技術が無かったからである。

一方で、報告者は本研究の前年までに、ガスクロマトグラフィ/同位体比質量分析計 (GC/IRMS) を用いて、アミノ酸の分子レベル安定窒素同位体比測定法 (プロトタイプ法) を開発し、従来に比べて 1000 分の 1 以下の数ナノモル程度 (10⁻⁹ モル) の試料量での窒素同位体比測定を可能にしている。そしてその成果は、とくに生物の栄養段階の推定研究で著しいものがあった。アミノ酸には、捕食により同位体比が大きく変化するグルタミン酸と同位体比が変化しないフェニルアラニンが存在する (図2)。

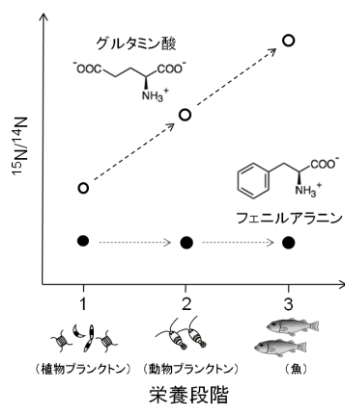


図2 食物連鎖とアミノ酸の安定窒素同位体比の関係

すなわち、生物に含まれるこの2種のアミノ

酸の安定窒素同位体比を単純に比較するだけで、生物の栄養段階を正確に求めることができる。これは、安定同位体比の変動が生化学反応のプロセスを反映するという同位体の本質的・普遍的現象を利用したものであり、またホルマリン固定試料や化石の殻や骨にも広く適応可能なため、絶滅生物の生態系も復元できる唯一の研究手法として大きな注目と期待を集めた。

しかしこのプロトタイプ法では、測定器 (GC/IRMS) を超繊細にチューニングしても、実試料において十分な精度で測定できるアミノ酸がアラニン・グルタミン酸・フェニルアラニンなどの 10 種類に限られていた。それは、生食連鎖と腐食連鎖の相互関係などの複雑系をはじめ、地球生物圏の生合成・代謝・生理機能、宇宙における有機物の生成過程の解明などの本質的な課題について、プロトタイプ法では部分的にしかアプローチすることができないことを意味していた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、プロトタイプ法を基にして、光学異性体も含めて測定可能なアミノ酸の種類を増やし、窒素だけでなく水素や炭素などの多元素の安定同位体比の測定も行える汎用性の高い測定法 (アミノ酸の分子レベル多次元安定同位体比測定法) の開発を目的に研究を行った。研究期間 (3 年) 内に 5 つの具体的な到達点を設定した。

- (1) 汎用的な分子レベル安定窒素同位体比測定法の開発
- (2) プロトタイプ法では測定ができないグルタミン・アスパラギン・トリプトファンへの対応
- (3) 光学異性体レベル安定窒素同位体比測定法 (個々の D-体・L-体に対応した測定法) の開発
- (4) 分子レベル安定炭素同位体比測定法の開発
- (5) 分子レベル安定水素同位体比測定法の開発

3. 研究の方法

本研究は、アミノ酸の分子レベル安定窒素同位体比測定法の汎用化と拡充 (前半) と分子レベル安定水素・炭素・酸素同位体比測定法の開発 (後半) で構成される。これらは、抽出・誘導体化法・ガスクロマトグラフの分離カラムの改良と最適化、二次元ガスクロマトグラフ法の導入により達成した。

4. 研究成果

- (1) 汎用的な分子レベル安定窒素同位体比測定法の開発

まず、アミノ酸の前処理 (抽出・誘導体化・精製) 法において、

- ① プロトタイプ法のスケールダウン
- ② 遠心フィルター及び遠心脱水フィルター
の導入
- ③ 反応試薬の変更

等により、前処理に費やす時間を約 1/3 にするとともに、失敗するリスク（確率）をほぼ 0 にした（プロトタイプ法では 5 試料に 1 つは失敗していた。また、高度なガラス管加工技術が必要であった）。

さらに、GC/IRMS の様々な条件として、

- ④ 反応炉の温度の最適化
- ⑤ カラムの種類最適化
- ⑥ キャリアーガスの流速の最適化
- ⑦ 様々な接続部の簡易化且つ低リーク化
- ⑧ 同位体比の測定におけるキャリブレーションの標準化
- ⑨ 標準物質の製作

を順次検証・検討し、その結果、安定した測定を実現するとともに、プロトタイプ法の約 1/3 の試料量でも十分な精度でできるようになった。

後者の概要は、論文として発表し、また、前者・後者合わせて、実際にどのように前処理を行い、測定・キャリブレーションを行えば良いかをまとめたスライド（pdf 形式）を日本語・英語の 2 言語で、所属機関の web サイトにて公表した。

(2) プロトタイプ法では測定ができないグルタミン・アスパラギン・トリプトファンへの対応

プロトタイプ法では、グルタミン・アスパラギン・トリプトファンは、試料の酸加水分解の過程でほとんどが分解され、分解を免れても誘導体化ができないという問題があった。そこで、本研究では、試料から水抽出で得られる遊離体のアミノ酸を対象に、エトキシカルボニル/エチルエステル誘導体化（図 3）を用いることで、これを克服した。

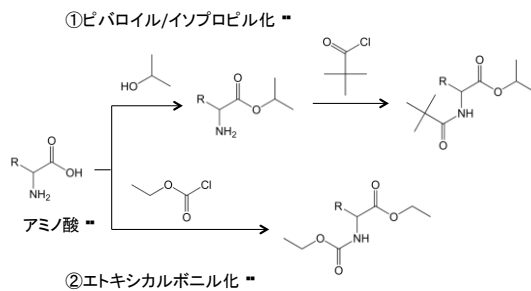


図3 アミノ酸の誘導体化

現在、タンパク質性のアミノ酸のうち、ピバロイル/イソプロピル誘導体化法では、アラニン、グリシン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、アスパラギン酸、トレオニン、セリン、メチオニン、グルタミン酸、フェニルアラニンの 12 種、エトキシカルボニル

誘導体化法では、アスパラギン、グルタミン、システイン、リシン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン の 7 種、の計 19 種について、窒素同位体比の測定が可能である。これらの成果は、論文として発表した。

(3) 光学異性体レベル安定窒素同位体比測定法（個々の D-体・L-体に対応した測定法）の開発

ピバロイル/イソプロピル誘導体化法では、光学異性体は、GC/IRMS のクロマトグラム上では単一のピークとしてしか現れず、D-体、L-体の区別は不可能である（図 4a）。そこで本研究では、イソプロパノールの代わりに、光学活性ブタノールを用いて誘導体化を行い、且つ、GC/IRMS の分離カラムに極性カラムを用いることで、D-体、L-体の個別の同位体比測定を達成した（図 4b）。

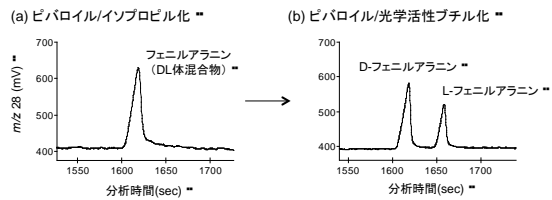


図4 光学異性体(D体、L体)の分離

これらの成果は、論文として発表した。

しかしこの方法を用いて、天然の試料に含まれる D-体/L-体のアミノ酸の同位体比を個別に測定することは、現在のところ、残念ながら困難な場合がほとんどである。それは天然試料には種類の異なるアミノ酸が多数存在し、それらが、微量しか存在しない D-体アミノ酸の同位体比測定に、干渉するためである。本研究ではこれを克服するため、PFC キャピラリー分取装置による各アミノ酸の分子レベルでの単離・精製を行った。一般的な試料における回収率が 20%前後であり、この低い回収率の改善は、今後の研究課題の一つとして残るが、現在、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、グルタミン酸、フェニルアラニンについて、D-体/L-体の安定窒素同位体比が測定可能であることを検証済みである。また、二次元ガスクロマトグラフ法における同位体分別も詳細に検証し、無極性または微極性の分離カラムの使用に関しては、PFC 分取作業中に同位体分別が生じないことを確認している。

(4) 分子レベル安定炭素同位体比測定法の開発

これまでアミノ酸の安定炭素同位体比を精度良く測定することができなかった最大の理由は、カルボニル基・アミノ基の誘導体化に伴う同位体分別（同位体比が変化してしまうこと）にある。本研究ではこれを克服す

るために、

- ① スルホン化
- ② 一段階エステル化
- ③ ジアゾ化
- ④ ヒドロキシル化
- ⑤ アミノ基のハロゲン置換

及び、上記2種の組み合わせを検討し、また、同時にガスクロマトグラフでの分離カラムの変更等を行い、安定炭素同位体比の測定法の開発を進めた。

標準試薬レベルにおいては、エタノールを用いた②一段階エステル化(図5)を採用することで、0.2~0.7‰の精度での安定炭素同位体比測定を達成した。

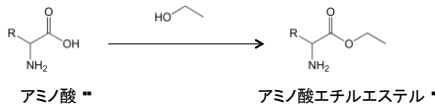


図5 アミノ酸の一段階エステル化

これらの成果は、論文として発表した。しかし、この方法では、残念ながら実試料の測定ができるレベルには到達できなかった。それは、実試料にはアミノ酸以外の有機化合物(夾雑物)が含まれており、それらを除去することが困難なためである。

また一方で、同様に標準試薬レベルにおいては、ジアゾ化とアルコール置換の組み合わせ(イソプロピルエステルをジアゾ化した後、 $-N_2^+$ 基をイソプロパノール($-O_iPr$)で置換し、アミノ酸をカルボン酸イソプロピルエステル/イソプロピルエーテルに変換する、図6)を用いることで、0.4~0.7‰の精度での安定炭素同位体比測定を達成した。

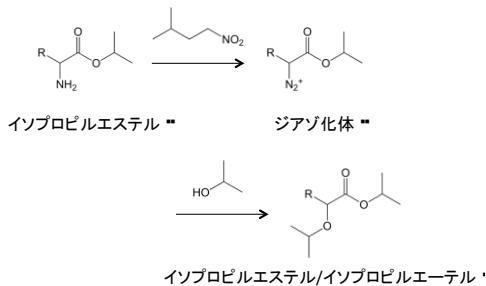


図6 アミノ酸のジアゾ化及びそのエーテル化

この方法では、誘導体化の後に、シリカゲルカラムで夾雑物を除去することが可能であるため、前者(一段階エステル化)よりも実用的な測定法と言える。今後、誘導体化条件や、GC分離カラムの最適化(得られた誘導体化物の分離)を詳細に検討する必要があるが、この手法は、世界で始めて、実試料分析に耐えうる汎用的な分析法のプロトタイプ型と言えるものである。様々な検証が終わり次第、論文として発表する予定であ

る。

(5) 分子レベル安定水素同位体比測定法の開発

これまでアミノ酸の安定水素同位体比は、米国ワシントン大学の研究グループを除いて、世界中で誰も測定できていない(但し、ワシントン大学の報告する値の検証はなされていない)。そこで、本研究では、窒素同位体比の測定に用いているピバロイルイソプロピル誘導体化を応用した測定法の開発を試みた。

現時点では、

- ① 抽出~測定の間にかかる水素交換の評価が不十分であること
- ② 同位体比の決まった国際標準物質が全く存在しないこと

の2点から、実試料の同位体比を詳細に議論できるレベルの測定法とは到底言えないものの、0.5nmolの実試料において、±50~100‰での測定が可能である(表1)。

表1 植物プランクトン、動物プランクトン、魚のアミノ酸水素同位体比

	植物プランクトン	動物プランクトン	魚
アラニン	42	114	-92
グリシン	109	276	108
バリン	-39	25	
ロイシン	4	38	13
イソロイシン	-51	-17	34
プロリン		199	219
セリン	301	275	371
メチオニン	21		42
グルタミン酸	149	157	129
フェニルアラニン	41	76	44

今後の研究課題の一つとして、水素交換の正しい評価と標準物質の製作・整備が必要である。

研究初年度の目標である窒素同位体比測定法の確立は、非常に順調にすすみ、この手法は既に様々な応用研究に用いられている。光学異性体の分析や炭素同位体比についても、汎用分析にはまだまだ使えないが、プロトタイプ型としては完成形といえるような測定法を開発することができた。後者は、3年の研究期間内に、実試料への積極的な応用研究はできなかったが、それでも、プロトタイプ型が開発できたことは、今後の研究の発展につながる大きな成果だと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

- ① 力石嘉人、高野淑識、小川奈々子、佐々木瑠子、土屋正史、大河内直彦 (2011)

- アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階の解析：陸上環境を含めた生物生態系の解明に向けて. *Researches in Organic Geochemistry*, 27, 3-11. <http://www.ogeochem.jp/publication_s p.html>, 査読有
- ② Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Doi, H., and Ohkouchi, N. (2011) 15N/14N ratios of amino acids as a tool for studying terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and hornets). *Ecological Research*, 26, 835-844. <<http://www.springerlink.com/content/96n12x53248pnx34>>, 査読有
- ③ Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) An improved method for precise determination of carbon isotopic composition of amino acids. *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, p.355-366. , 査読有
- ④ Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., and Ohkouchi, N. (2010) Further evaluation of the trophic level estimation based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, p.37-51. , 査読有
- ⑤ Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N.O., and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, p.367-386. , 査読有
- ⑥ Takano, Y., Chikaraishi, Y., and Ohkouchi, N. (2010) Enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of D- and L-alanine: nitrogen isotopic hetero- and homogeneity by microbial and chemical processes. *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, p.387-402. , 査読有
- ⑦ Takano, Y., Kashiya, Y., Ogawa, O.N., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. (2010) Isolation and desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24, 2317-2323. <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.4651/abstract>>, 査読有
- ⑧ 力石嘉人, 小川奈々子, 高野淑識, 土屋正史, 大河内直彦 (2010) アミノ酸の窒素同位体比を用いた水棲生物の栄養段階の解析. *地球化学*, 44, 233-241. , 査読有
- ⑨ 力石嘉人, 高野淑識, 大河内直彦 (2009) アミノ酸 (ピバロイル/イソプロピルエステル誘導体) の GC/MS による解析. *Researches in Organic Geochemistry* 25, 61-70. <http://www.ogeochem.jp/publication_s p.html>, 査読有
- ⑩ 山口保彦, 力石嘉人, 横山祐典, 大河内直彦 (2009) アミノ酸 (エトキシカルボニル/エチルエステル誘導体) の GC/MS による解析. *Researches in Organic Geochemistry* 25, 71-82. <http://www.ogeochem.jp/publication_s p.html>, 査読有
- [学会発表] (計 2 件)
- ① Chikaraishi, Y. Compound-specific stable isotope analysis of amino acids as a novel tool for ecological food web study. Goldschmidt Conference 2011, 2011.8.17 Prague, Czech Republic (招待講演)
- ② 力石嘉人 他 3 名 アミノ酸の炭素同位体比は測定できるのか? 有機地球化学会 長岡シンポジウム, 2010.8.15, 石油資源開発 長岡鉱業所
- [図書] (計 1 件)
- ① 力石嘉人 (2010) 安定同位体比を用いた生態系研究の発展—バルクから化合物レベルの安定同位体比分析へ—. 「食品表示を裏付ける分析技術? 化学の目で偽装を見破る?」日本分析化学会表示・起源分析技術研究懇談会 (編集委員: 安井明美・有山薫・保倉明子・等々力節子・鈴木忠直・力石嘉人) 編, 東京電機大学出版局, pp. 166-167.
- [その他]
ホームページ等
- ① <http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/elhr p/biogeochem/takarabako.html>
- ② <http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/elhr p/isotope/download.html>
- ③ http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/elhr p/biogeochem/download_e.html
6. 研究組織
(1) 研究代表者
力石 嘉人 (CHIKARAISHI YOSHITO)
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・主任研究員
研究者番号: 50455490