

機関番号：82706

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ~ 2010

課題番号：21770031

研究課題名 (和文) アミノ酸窒素同位体比で解く近過去生態系の変動：標本生物に記録された情報の解読

研究課題名 (英文) Aquatic foodweb structure from compound specific nitrogen isotope ratios of amino acids: Reconstruction of the past ecosystems

研究代表者

小川 奈々子 (OGAWA NANAKO O.)

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・技術研究主任

研究者番号：80359174

研究成果の概要 (和文)：本研究は、生体アミノ酸の化合物レベル窒素安定同位体比を用いた、生態系生物の栄養段階推定手法の開発研究の一部である。本課題では、過去に採取・保管されてきた生物試料を想定した化学固定や殻内有機物に対する手法の検証と、琵琶湖・バイカル湖の生物標本試料での応用研究を行った。この結果アミノ酸窒素同位体比手法は化学固定や殻内有機物においても有効であり、過去の生態系構造の研究でも威力を発揮することが示された。

研究成果の概要 (英文)：To verify reliability of the method as a tool for studying ecosystems in the past, compound-specific nitrogen isotopic ratios of amino acids ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ ) were measured for various types of samples. We have determined  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  values for chemical-fixed specimens, shell and soft tissue organics of snails and bivalves, and long-stored biological specimens from Lake Biwa and Lake Baikal. These results strongly suggested that the  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  method was an effective and a useful tool for reconstructing the past ecosystems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生物地球化学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：生態系・近過去生態系変動・アミノ酸・窒素安定同位体比・食物連鎖・栄養段階

## 1. 研究開始当初の背景

**全窒素安定同位体食物網解析法とその課題**

生物の全窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ ) を利用した食物網解析法 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ 法) は「生態系生物の  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$  が一つの捕食プロセスごとに約3.3%ずつ上昇する」という経験則 (図1) に基づき、消費者の捕食プロセス数 (栄養段階TL) を、一次生産者 (以下、生産者) と消費者の全窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN生産者}}$ 、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN消費者}}$ ) と捕食に伴う  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$  濃縮率 (3.3%) の関係式

$$\text{TL}_{\text{消費者}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{TN消費者}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{TN生産者}}) / 3.3$$

から求める。基本的に生態系生物の種類を問わず成立し、異なる生態系構造野の比較解析を可能とすることから、生態学食物網研究のみならず、生態系生物を介するさまざまな物質循環の解析ツールとしても重用されてきた。

一方、実際の生態系では、この解析に不可欠な一次生産者値 ( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN生産者}}$ ) の確定が困難な事例も多く、「一次生産者問題」の克服は長年に

わたり $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ 法の課題とみなされてきた。この問題は、消費者生物だけしか保存/発見されていない「過去の生態系」研究ではより深刻で、研究分野の発展における障壁でもあった。

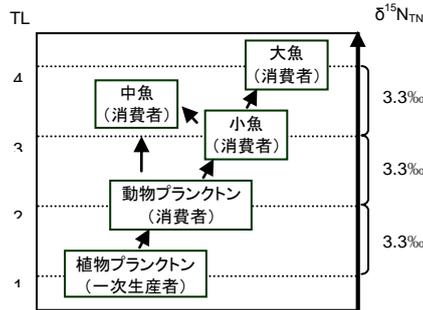


図1 生態系生物の栄養段階(TL)と全窒素安定同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ )の関係(水域生態系での例)。捕食により $^{15}\text{N}$ が濃縮されて $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ が3.3‰ずつ上昇する (DeNiro & Epstein 1981, Minagawa & Wada 1984)

### 新手法:アミノ酸窒素安定同位体食物網解析法

アミノ酸化合物の窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )を用いる解析方法は、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ 法のこうした問題点を克服した新手法として2002年に提案され、2006-2008年に研究代表者を含む研究グループにて検証・確立された。

表1) 二つの窒素同位体比生態系構造解析手法の比較

	全窒素法(従来手法)	アミノ酸法(本研究手法)
共通点	<ul style="list-style-type: none"> <li>生態系生物の種類を問わず利用可能</li> <li>異なる生態系間の食物網を数値として比較可能</li> <li>図式化しての構造解析が可能</li> </ul>	
相違点	消費者・一次生産者双方の分析が必要	消費者のみの分析で、一次生産者情報も得られる

その最大の特徴は一次生産者の直接測定を必要としないことである(表1)。 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 法では、消費者生物の捕食段階(=アミノ酸栄養段階,ATL)は、消費者のもつ複数のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値だけを用い、以下の関係式であらわすことが出来る。

$$\text{ATL}_{\text{消費者}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}_{\text{消費者}}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}_{\text{消費者}}} - 3.4) / \alpha$$

( $\alpha$ は $\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$ 濃縮率。PheはMetにも置き換え可能。)これは、消費者が生合成するアミノ酸(Gluなど)では $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 値は捕食に伴い上昇するが、消費者が生合成しないアミノ酸(不可欠アミノ酸、Phe、Metなど)では、消費者体内でも一次生産者 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 値が保持されることによる(図2)。

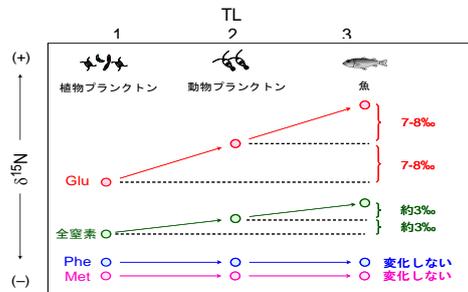


図2 生態系生物の栄養段階(TL)と全窒素、各種アミノ酸(Glu, Phe, Met)の窒素同位体比( $\delta^{15}\text{N}$ )の関係 (McClelland and Montoya 2002, Chikaraishi et al., 2006, 2009)

$\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 法は、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ 法が抱えてきた「一次生産者値」課題を克服した「新時代の生態系解析手法」として、ここ数年で国内外の研究者による研究利用も増加してきている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、近年研究代表者らの研究グループで確立されたアミノ酸化合物レベル安定同位体比( $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ )による生態系構造解析手法を発展させ、過去の生態系構造の復元解析を行うことである。特に化学固定の影響、殻内有機物の利用可能性、など過去の標本試料や化石等の古生物試料への応用に必要な知見について実験的に明らかにした上で、実際の標本試料を用いた応用研究を行い、手法の有効性について確認することに主眼を置いた。

## 3. 研究の方法

水界生態系における $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 法によるアミノ酸栄養段階(ATL)推定手法の有効性は、これまでの研究代表者を含む研究グループでの研究成果より既に確認されている。本研究では

- (1) 「過去の生態系の解析」に対し考慮されるべきいくつかの項目に対する試験
- (2) 実際の水界生態系生物の標本試料を用いての応用研究

に大別される。(1)では、生物標本試料は保存の際に腐敗等を防ぐため行われる化学固定の影響の評価、および、保存性がよく遺跡標本や化石試料としての試料も多い硬組織の利用に関する現生貝類での本手法の有効性の検証を行った。(2)では $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$ 法での研究成果の豊富な琵琶湖・バイカル湖を対象に、それぞれハゼ科魚類、サケ科魚類、動物プランクトン標本試料および代表的生物種について $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 法を適用し生態系構造の解析を行った。

## 4. 研究成果

### 化学的固定が与える影響の評価

生物標本試料では腐敗等を防ぐため化学固定が行われることが多い。本研究ではグルタル・ローズベンガル・エタノールの3種の化学固定処理について固定実験を行い、その $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ への影響を評価した。(ホルマリンに関しては既に研究代表者らによって、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ への影響がないことを確認報告済みである。)魚類のほか各種の含アミノ酸・含タンパク物質・土壌生物・水棲生物について上述の各化学固定は $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ 測定結果に有意な影響を与えないことが確認された。

### 貝類殻内有機物のアミノ酸安定同位体分布の有用性評価

貝類の殻などの硬組織は、保存性がよいこ

とから遺跡標本や化石試料として古い時代の試料が多く存在する。この硬組織に一種の芯材として取込まれた有機物から栄養段階の推定が可能となれば、考古学や古生物学の分野への利用も可能となる。ここでは硬組織内有機物への  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  法の評価を行うため、天然で捕獲した巻貝、二枚貝、実験室で飼育された巻貝数種とその餌生物について、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  を測定し解析した。この結果、試験に用いた貝類では筋肉組織と殻内有機物とはアミノ酸分布がよく一致することが明らかとなった。また餌生物との関係についても、明確な捕食のある組み合わせでは、研究代表者らのグループで各種の水界生態系生物について見出した結果と整合性があることが明らかとなった。

#### 標本試料への応用研究

琵琶湖産魚類の標本試料を用いて、琵琶湖の富栄養化と魚類の食性変化、栄養段階の変化について研究を行った。1916年から1982年に琵琶湖で採取されホルマリン固定にて保存されていたハゼ科魚類イサザについて  $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  法によりもとめられた栄養段階は3.2~3.3とほとんど変化が見られなかった。イサザについては琵琶湖の富栄養化後、胃内容物に明らかな生物相変化が観測されているが、本研究の結果は、食性の見かけ上の変化が必ずしも栄養段階の変化にはつながらないことを示唆した。これは全窒素安定同位体比測定による従来手法を用いた研究結果 (Ogawa *et al.*, 1999) とも一致している。

ロシアバイカル湖では、バイカルアザラシ、浮遊性カジカ4種、コレゴヌス、その他浮遊性の動物プランクトン等について、アミノ酸安定同位体比測定を行い、生態系構造の再解析を行った。この結果バイカル湖において栄養段階最上位に位置するバイカルアザラシは栄養段階5を示し、カジカ類より上位に位置することが確かめられた。バイカルアザラシでは  $\delta^{15}\text{N}_{\text{TN}}$  法により推察された栄養段階が、行動観測から予測されるよりも低いことが報告されている (Yoshii *et al.*, 1999)。本研究の結果、採餌範囲の広い高い高次消費者では、餌生物における全窒素同位体値の幅の広さが、栄養段階算出の際の過小評価につながっていることが推察された。同様の事項は、本研究の中で相模湾周辺におけるイワシ類における研究結果においても観測されており、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$  法によるATL推定が、生態系の高次消費者において殊に優れた威力を示すことが示唆された。

#### 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6件)

- ① 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
- ② Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7, 740-750. 査読有
- ③ Nishikawa J., Kohzu A., Boontanon N., Iwata T., Tanaka T., Ogawa N.O., Ishii R. Wada E. (2009) Isotopic composition of nitrogenous compounds with emphasis on anthropogenic loading in river ecosystems. *Isotopes in Environmental Health Studies*. 45: 27-40. 査読有
- ④ 小川奈々子, 力石嘉人, 大河内直彦(2009) アミノ酸の天然レベル窒素安定同位体組成を用いた食物解析. 臨床化学 38, 266-271. 査読なし

[学会発表] (計8件)

- ① 小川奈々子 アミノ酸の化合物レベル窒素同位体比: バイカル湖沖帯生態系構造の再構築. 日本地球惑星科学連合 2011年大会. 2011年5月22日幕張メッセ
- ② 小川奈々子 Ecosystem in Lake Baikal: Results from nitrogen isotopic analyses of amino acids. International Symposium on Isotope Ecology 2010 in Kyoto: Relationship between biodiversity and ecosystem function 2010年11月2日 COOP Inn Kyoto
- ③ 小川奈々子 琵琶湖産イサザのアミノ酸化合物レベル窒素安定同位体比: 新手法による湖沼環境動態解析. 日本地球惑星科学連合 2010年大会. 2010年5月20日幕張メッセ
- ④ 小川奈々子 微量分析技術を用いた化合物レベル安定同位体比測定とその応用. シンポジウム: 安定同位体を用いて生態系と気候変動の関わりを科学するー陸と海と空, 過去・現在・未来をつなぐ安定同位体. 2010年3月10日 三重大学 (招待講演)

[図書] (計6件)

- ① Ogawa, N.O., Nagata, .T, Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2010) Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotopic analyses. *in Earth, Life, and Isotopes* (Eds. N. Ohkouchi, I.

Tayasu, and K. Koba), Kyoto University Press, p. 339-353. 査読有

- ② Ogawa, N.O., Wada, E., Smirnova-Zalumi, N.S., Melnik, N.G., Bondarenko, N.A., Shimaraev, M.N., Smirnov, V.V., and Yoshioka, T. (2010) Fish scales as a record of atmospheric change. *in* Earth, Life, and Isotopes (Eds. N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba), Kyoto University Press, p. 263-269. 査読有

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：元素分析用前処理装置及び元素分析装置

発明者：大河内直彦・小川奈々子

権利者：独立行政法人海洋研究開発機構

種類：特許

番号：特願 2 0 0 9 - 2 6 0 0 9 5

出願年月日：平成 2 1 年 1 1 月 1 3 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/biogeos/j/elhrp/biogeochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小川 奈々子 (OGAWA NANAKO O.)

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・技術研究主任

研究者番号：80359174