

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24684041

研究課題名(和文) アミノ酸の異性体レベル安定同位体比が明らかにする有機化合物と生命の大連鎖

研究課題名(英文) Development of chiral-isomer specific isotope analysis of amino acids, for advances in studies for the interaction between life and organic compounds

研究代表者

力石 嘉人 (Chikaraishi, Yoshito)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物地球化学研究分野・主任研究員

研究者番号：50455490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アミノ酸の光学異性体レベルの窒素・炭素・水素同位体比分析法の開発に挑戦し、以下の結果を得た。(1) 窒素・炭素同位体比に関しては、ピバロイル/イソブチルエステル誘導体化法と極性のGCカラムの組み合わせにより、約0.5nmolの試料で±0.5‰の測定が可能になった。またいくつかの代表試料を使って、この分析法が、生物、堆積物、そして隕石試料に至るまで、様々な試料へ利用できることを確認した。(2) 一方で、水素同位体比に関しては、アミノ基上の交換性水素のコントロールが困難であり、測定法の開発ができなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I challenged the development of chiral-isomer specific isotope analysis of nitrogen, carbon, and hydrogen within amino acids. The results show that the isotope analysis of nitrogen and carbon is successfully achieved by using a combination of pivaloyl/isobutyl ester derivatization with a polar GC column, resulting in a 1 sigma standard deviation being better than ± 0.5‰ based on the S/N ratio of >20 with baseline separation on the chromatogram. I also briefly confirmed that this method is widely applicable to biological (e.g., animal tissues), geological (e.g., sediments), and extraterrestrial samples (meteorites). In contrast, the isotope analysis of hydrogen is still in the early-development stage, because I cannot control the considerable isotopic fractionation of hydrogen/deuterium on the amino group of amino acids during extraction and GC elution processes.

研究分野：有機地球化学

キーワード：アミノ酸 安定同位体 光学活性 窒素 炭素 水素 生命

1. 研究開始当初の背景

水素・炭素・窒素などの生元素は、地球の大気圏・生物圏・地殻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, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 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(酒井・松久, 1996, 安定同位体地球化学)。

アミノ酸は、生物の生合成・代謝・生理機能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、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。また動物には必須・非必須アミノ酸が存在し、前者は動物自身が生合成することができないため、藻類や植物(一次生産者)により作られたものを出発点として、捕食-被食を経て食物連鎖の頂点まで受け継がれる。さらにアミノ酸は、炭素質隕石などの地球外物質にも存在し、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、光合成で作られた有機化合物が、地球表層・地下生物圏の多種多様な生物とどのように関わり、それを支えているのか(有機化合物と生命の大連鎖)を明らかにするうえで、また、生物の生合成・代謝・生理機能や、さらには宇宙における有機物の生成過程を解き明かす「鍵」として潜在的可能性を有している。

ところが現在までアミノ酸の安定同位体比研究は、広く行われることはなかった。それは、微量試料から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(分子レベル、および光学異性体レベル安定同位体比測定法)がなかったからである。

そこで報告者(研究代表者:力石)はこれまで、アミノ酸に代表される含窒素有機物の分子レベル安定同位体比測定法の開発、およびその地球化学・地球生物学研究への応用を行ってきた。そして、ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析法(GC/IRMS法)による分子レベル安定同位体比測定法を確立し、従来に比べて1万分の1以下の数ナノモル程度(10^{-9} モル)の試料量での同位体比測定を可能にした。これは例えば、海洋堆積物に含まれるアミノ酸の安定同位体比を得るために、これまでは数十キログラムの堆積物を分析しなければならなかったものが、数グラムの堆積物から同じデータが得られることを意味する。これにより生物や堆積物試料のみならず、化石の殻や骨に含まれる極微量のアミノ酸の安定同位体比が、世界で初めて実用レベルで正確に測定できるようになり、それを使った研究が世界中で始まった。

その成果は、とくに生物の栄養段階の推定研究で著しい(Chikaraishi et al., 2009; Limnol/Oceanogr.:Methods 7, 740-750)。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。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、その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用可能なため、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ている。

しかし、この手法では、ガスクロマトグラム上で光学異性体(D-体、L-体アミノ酸)を分離できないため、光学異性体を区別して同位体比を測ることは不可能であった。そしてそのため、生食連鎖と腐食連鎖の相互関係などの複雑系をはじめ、地下生物圏での生命活動、宇宙における有機物の生成過程の解明など、D-体アミノ酸の同位体比そのものやD-体、L-体の同位体比の差分が鍵情報になる研究課題について、全くアプローチすることができなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究期間内に以下の3つ到達点を設定した。

- (1) 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)を開発する
- (2) 光学異性体レベル安定水素・炭素同位体比測定法を開発する
- (3) 開発した測定法を、科学的に価値のある代表的な実試料へ応用する

3. 研究の方法

本研究は、上記の研究目的(1)~(3)に対して、光学異性体レベル安定窒素同位体比測定法の開発(平成24年度)、光学異性体レベル安定水素・炭素同位体比測定法の開発(平成25年度)、開発した手法の実試料への応用研究(平成26, 27年度)を計画、実施した。

測定法開発における最大の懸案事項は、如何に同位体分別を起こすことなく、もしくはそれを人為的にコントロールできる条件下で、(1)アミノ酸の単離・精製法を確立し、(2)誘導体化法と分離カラムの選定・最適化ができるか、である。前者は、PFCキャピラリー分取装置やHPLCでのアミノ酸の精製・単離などを検討し、後者は、光学活性アルコールを用いた誘導体化と極性のGC分離カラムの組み合わせにより検討した。

4. 研究成果

(1) アミノ酸の精製と同位体分別

光学異性体レベルの安定同位体比を得るためには、まずは、天然試料に含まれる個々のアミノ酸を分子レベルで(DL体混合物として)単離する必要がある。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。これを実現するため、高速液体クロマトグラフィ(HPLC)及び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・精製法を検討した。

その結果、窒素同位体比を対象にした場合には、求核性の固定相を持つ分離カラム(GCでは、フェニル基を持つHP-5, HP-35, HP-17, シアノ基を持つDB-23, ポリエチレングリコール系のHP-INNOWAXなど、HPLCでは、グラファイト系のHypercarbなど)が、GC, HPLCともに有用であり、一方で、炭素同位体比を対象にした場合には、求電子性の固定相を持つ分離カラム(GCでは、電気的にプラスの官能基を持つHP-FFAP, Chirasil-Valなど、HPLCでは、ODS系のCAPCELL PAK C₁₈ MG, Primesep Aなど)が有用であることがわかった。これは、求核性の固定相は、アミノ酸のアミノ基(同じく求核性の窒素)と反発し、一方でカルボキシル基(求電子性の炭素)と相互作用を持つため、炭素の同位体分別が起こり、一方で求電子性の固定相は、アミノ酸のアミノ基(同じく求核性の窒素)と相互作用を持ち、カルボキシル基(求電子性の炭素)と反発するため、窒素の同位体分別が起こるためであると解釈できる。

実際に、これにより、適切な分離カラムを用いた場合には、試料に含まれるアミノ酸とマトリックスを、同位体比の変動率で、炭素、または窒素で、 $\pm 0.3\%$ 以内(=測定誤差以内)で、かつ、試料・目的・コスト・時間等に応じた様々なレベル(粗精製から純物質まで)で、分離・精製ができるようになった。

(2) 窒素同位体比の測定

従来の分析法では、光学異性体は、GC/IRMSのクロマトグラム上で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。そこで本研究では、光学活性アルコールを用いて誘導体化を行い、ジアステレオマー化することと、GC/IRMSの分離カラムの検討を行い、クロマトグラム上でD-体、L-体の区別・分離とその安定窒素同位体比の測定に挑戦した。

その結果、光学活性アルコールとして、光学活性ブタノールを用い、GC/IRMSの分離カラムとして、DB-23ms、または、HP-INNOWAXを用いることで、D-体、L-体がクロマトグラム上で完全に分離し、両者を区別して安定窒素同位体比の測定ができること(測定精度= $\pm 0.5\%$ 以内)を見出した。

また、微量試料に対応するための機器の改造(様々のコネクタ類の新規設計)と、地球上の天然試料の持つ同位体比をほぼ(おそらく、95%程度)カバーできるように、 $-26\sim+45\%$ の標準物質の製作を行った。

(3) 炭素同位体比の測定

アミノ酸の炭素同位体比測定は、この20年間、アミノ基の誘導体化(ピバロイル化、もしくはトリフルオロアセチル化)における炭素同位体の分別(同位体組成の変化)が人為的にコントロールできず、非常に精度の悪い値しか得られなかった(得られる同位体比に最大10‰の誤差が含まれていた)。そこで本研究では、この同位体分別を回避する方法として、エステル化のみでの分析、ジジアゾ化とメタノール置換によるアミノ基の除去、ジアゾ化の後に光学活性アルコールで置換し、ジアステレオマー化による分離能の向上、の3つを検討し、さらに、界面活性剤の存在下でのアミノ酸の誘導体化などを検討した。

その結果、HPLCを用いたアミノ酸の粗精製の徹底、界面活性剤の存在下でのアミノ酸の誘導体化、炭酸水素ナトリウム飽和溶液を用いた洗浄とさらなる精製、の3つのプロセスを導入することで、1級アミノ酸については、誘導体化時に生じる同位体分別を人為的に最小化および完全にコントロールすることに成功した(同位体分別をゼロにすることは出来ないが、得られた測定値に対して、マスバランス計算による補正を行うことができるようになった)。なお、プロリンやヒドロキシプロリンなどの2級アミノ酸は、付加する誘導体基の同位体比が1級アミノ酸のものとは異なるため、未だ測定が困難である。

この開発した手法により、アミノ酸の炭素同位体は、分子レベル、および光学異性体レベルで、世界で初めて優れた精度、かつ汎用的に測定できるようになった。標準試料を用いた検証では、アミノ酸の炭素同位体比を $\pm 0.5\sim 0.7\%$ 以内で測定することに成功(従来は、 $\pm 4\sim 8\%$ の誤差があった)した。

(4) 水素同位体比の測定

水素同位体比の測定においては、アミノ酸のアミノ基の持つ交換性水素の扱いが大きな懸案事項である。そこで、本研究では、交換能の評価、ジアゾ化とメタノール置換によるアミノ基の除去を検討した。

その結果、アミノ基のイオン化-非イオン化を伴う水相-有機層の分配(液-液抽出)において、最大1000‰もの同位体分別が観測されることがわかった(抽出率が90%の際には、 -200% であった水素同位体比が、抽出率が数%の場合には、 $+700\sim+800\%$ にもなる)。これは、予想している自然界におけるアミノ酸の水素同位体比の変動($-200\sim+100\%$)を遥かに超える大きな同位体分別であり、すなわち、アミノ基の持つ交換性水素の扱いには、細心の注意が必須であることがわかった。

ジアゾ化とメタノール置換によるアミノ基の除去は、交換性の水素を除去し、かつ同位体分別も無いために、理論的にも、実験的にも優れた解決法にはなると考えられた。しかし、ジアゾ化反応は絶対嫌水の条件が必要

であり、90%にもなる横須賀の夏の湿度では、安定性・再現性が確保できなかった。様々な脱水条件を検討したが、これまでに優れた結果（安定的な結果）は得られず、現時点で、水素同位体比の測定法は完成しなかった。

(5) 代表的な実試料への応用

本研究で開発した、窒素・炭素同位体比の測定法を用いて、

生物試料として、光学異性体が多く含まれているバクテリア（*Bacillus subtilis* 等）の培養株およびキチン質を持つ天然生物（カニ・エビなどの甲殻類等）

環境試料として、海洋表層堆積物（相模湾と日本海）

ハヤブサ 2 計画における宇宙に存在する有機物の生成や生命の起源の研究を念頭に、マーチソン隕石等の炭素質隕石対象試料として、実験室で化学合成したアミノ酸

の分析を行い、その結果以下の 4 つの大きな成果が得られた。

バクテリアやカニ・エビなど生物由来のアミノ酸は、D 体よりも L 体の ^{15}N が僅かに濃縮しており（1~2%程度）、これはラセマーゼの同位体分別と考えられる。

堆積物中のアミノ酸には、D 体と L 体の間に同位体比の差がほとんど無い（時間が経つと非生物的なラセミ化が進行し、均一化されてしまうためと説明される）。隕石に含まれるアミノ酸にも、D 体と L 体の間に同位体比の差がほとんど無い（非生物的に合成もしくは分解されたアミノ酸には、D 体と L 体の間で同位体比の差を生じるようなプロセスがないと説明される）。

実験室で化学合成したアミノ酸では、合成場の光学活性の偏りに依存して、D 体と L 体の間に同位体比の差が生じる（反応系内にどちらかの光学活性物質が存在する場合に、それが、次の光学活性を生む原因・触媒となると考えられる）。

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 7 件）

Schimmelmann A., Qi T., Coplen T.B., Brand W.A., Fong J., Meier-Augenstein W., Kemp H.F., Toman B., Ackermann A., Assonov S., Aerts-Bijma A.T., Brejcha R., Chikaraishi Y., Darwish T., Elsner M., Gehre M., Geilmann H., Gröning M., Hélie J.-F., Herrero-Martín S., Meijer H.A.J., Sauer P.E., Sessions, A.L., Werner R.A. (2016) Organic Reference Materials for Hydrogen, Carbon, and Nitrogen

Stable Isotope-Ratio Measurements: Caffeines, n-Alkanes, Fatty Acid Methyl Esters, Glycines, L-Valines, Polyethylenes, and Oils. *Analytical Chemistry*, in press. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04392, 査読有

Chan Q.H.S., Chikaraishi Y., Takano Y., Ogawa N.O., Ohkouchi N. (2016) Amino acid compositions in heated carbonaceous chondrites and their compound-specific nitrogen isotopic ratios. *Earth, Planets and Space* 68, 7. doi: 10.1186/s40623-016-0382-8, 査読有

Chikaraishi Y., Steffan S.A., Takano Y., Ohkouchi N. (2015) Diet quality influences isotopic discrimination among amino acids in an aquatic vertebrate. *Ecology and Evolution* 5, 2048-2059. doi: 10.1002/ece3.1491, 査読有

Takano Y., Chikaraishi Y., Ohkouchi N. (2015) Isolation of underivatized amino acids by ion-pair high performance liquid chromatography for precise measurement of nitrogen isotopic composition of amino acids: development of comprehensive LC x GC/C/IRMS method. *International Journal of Mass Spectrometry* 379, 16-25. doi:10.1016/j.ijms.2014.11.012, 査読有

高野淑識, 力石嘉人, 大河内直彦 (2015) イオンペアクロマトグラフィー/電子スプレーイオン化質量分析法 (LC/ESI-MS) によるアミノ酸のマススペクトル解析. *Researches in Organic Geochemistry* 31, 33-49. 査読有

佐藤里恵, 川西英彦, Arndt Schimmelmann, 鈴木彌生子, 力石嘉人 (2014) 窒素安定同位体比測定のためのアミノ酸標準物質の開発. *分析化学* 63, 399-403. doi:10.2116/bunsekikagaku.63.399, 査読有

鎌田暁子, 力石嘉人 (2014) 高温型酸化炉を用いるガスクロマトグラフィー/同位体比質量分析法によるアミノ酸の安定同位体比測定. *分析化学* 63, 279-282. doi: 10.2116/bunsekikagaku.63.279, 査読有

〔学会発表〕（計 4 件）

Chikaraishi Y. (2015) Compound-Specific Isotope Analysis of Amino Acids: For deep discussion on current issues/problems. Mini-Workshop on Compound Specific Isotope Analysis of Amino Acids. アメリカ・ランシング・ミシガン州立大学 (10 月 5 日), 口頭発表

Chikaraishi Y. (2014) High resolution food webs viewed via CSIA (Compound-specific Stable isotope Analysis) of amino acids. UW Dept. of Entomology Colloquium 2014. アメリカ・マディソン・ウイスコンシン大学マディソン校 (12 月 6 日), 招待講演

Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Tsuchiya M., Ohkouchi N (2013) ^{15}N -Enrichment of amino acids for studying trophic structure and energy flow in food webs. Goldschmidt Conference 2013, イタリア・フィレンツェ (8月26日), 口頭発表
力石嘉人・土屋正史 (2012) アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階解析: 共生系へアプローチ, 日本地球化学会年会, 福岡県福岡市, 九州大学 (9月12日), 口頭発表

〔その他〕

ホームページ等

[Preparation and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ analysis of amino acids]

<http://www.jamstec.go.jp/biogeochem/download.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力石 嘉人 (Chikaraishi, Yoshito)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・生物

地球化学研究分野・主任研究員

研究者番号: 50455490