

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02989

研究課題名(和文) 有機分子の起源・生成機構解明のための同位体解剖学的手法の深化

研究課題名(英文) Isotopic anatomies for elucidation of the origin and history of organic molecules

研究代表者

山田 桂太 (Yamada, keita)

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：70323780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、地球宇宙化学試料に存在する微量有機分子の位置別炭素・水素安定同位体分析法(炭素PSIAおよび水素PSIA)を確立し、実際試料に適用することで、地球宇宙化学的研究における有機分子の起源・生成機構の議論を進展させることを目指した。具体的には、大気中揮発性有機化合物アセトンについて、炭素PSIAからその起源が工業由来か生物由来かを見分ける手法を確立した。また、エタノールについて、これまでにない迅速かつ簡便な水素PSIAを確立した。隕石中有機化合物については、イソバリンに着目し、数ミリグラムの試料を用いる炭素PSIAを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで困難であった環境中微量有機分子の炭素・水素の部位別同位体分析を確立・適用し、これまで不可能であった発生源が非常に似通った有機分子の詳細な起源推定および環境有機分子の生成機構の解明を実現した。特に人体に悪影響のある、あるいは気候変動に影響を与える大気微量有機成分の詳細な起源特定を可能にした。また隕石中のアミノ酸の生成経路解明に役立つ手法を開発した。

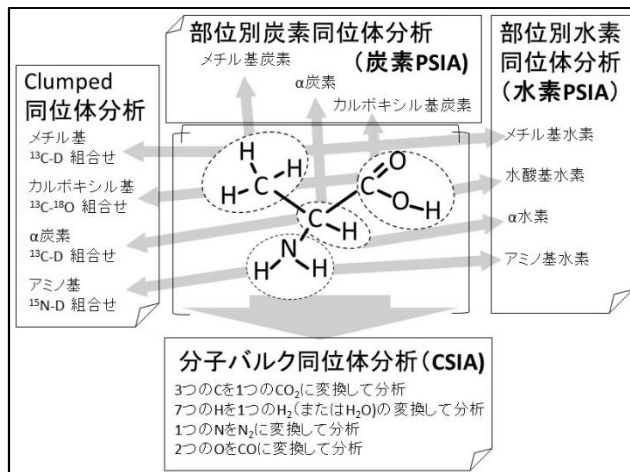
研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to advance the discussion on the origin and generation mechanism of organic molecules by position-specific stable carbon-hydrogen isotope analysis (C-PSIA and H-PSIA) for trace organic molecules present in geochemical samples. Specifically, we established a method for distinguishing the origin of atmospheric acetone if it derives from industrial or biological by C-PSIA. We have also established a new H-PSIA for ethanol. Regarding organic compounds in meteorites, we focused on isovaline and developed carbon PSIA using a few milligrams of sample.

研究分野：有機地球化学

キーワード：安定同位体分析 揮発性有機分子 アミノ酸 アセトン エタノール

## 1. 研究開始当初の背景

地球宇宙化学分野において、有機分子の軽元素安定同位体組成分析は、その有機分子の起源や生成機構を解明するために必要不可欠な手法である。現在、有機分子を構成する元素ごとに分子全体値(バルク値)を計測する、化合物別同位体分析(Compound-specific isotope analysis; CSIA)が行われている。しかし、CSIAによって得られる同位体組成値は、その分子が生成する過程の情報を持った各官能基の同位体組成を平均化した値であり、従って生成機構の情報が平均化あるいは相殺されてしまっている。有機分子がもつ起源・生成機構の情報を正確かつ鋭敏に読み取るためには、現行のCSIAに加え、分子内の位置毎の安定同位体分析(Position-specific isotope analysis; PSIA)、多重置換の安定同位体分析(Clumped isotope analysis)を行う必要がある。地球宇宙化学分野においては、この様な、1つの分子が持つ同位体組成の多様性を徹底的に追究する“同位体解剖学的手法”の深化が強く望まれている(下図)[Eiler, Annu. Rev. Earth Planet. Sci. 2013]。



従来、有機分子のPSIAには、主に核磁気共鳴(NMR)と同位体比質量分析法(Isotope ratio Mass Spectrometry; IRMS)が用いられるが、試料前処理の煩雑さや必要試料量の多さ( $\mu\text{g}$ から $\text{mg}$ 量)から、地球宇宙化学試料への適用が難しい状況にあった。このような状況の中、オンライン熱分解とIRMSを組み合わせることで、前処理の煩雑さや必要試料量を低減する手法が考案され[Corso & Brenna, PNAS, 1997]、環境試料中の極微量( $\text{ng}$ 量)の有機分子の炭素PSIAの可能性が示された。申請者らは、このオンライン熱分解-IRMS法を基に、酢酸の炭素PSIAを開発し、環境試料への適用

に成功した[Yamada et al., 2002; 2014]。同時期に米国のグループによっても酢酸の炭素PSIAの開発と環境適用が報告されている[Dias et al., 2002]。しかし、環境有機分子の生成過程の解明には、このPSIAが唯一の方法であるが、現在、環境試料中の炭素PSIAが実現しているのは世界的にも申請者らと米国グループの酢酸のみである。

我々のグループでは、さらに開発を継続し、現在では地球宇宙化学的に重要な数種の有機分子(例えば、エタノール、プロパン、アラニン等)の炭素PSIAの開発に世界に先駆け成功している[例えば、Hattori et al., 2011; Gilbert et al., 2013; Nimmanwudipong et al., 2015]。これまでは、標準試薬および生体試料を中心に適用を進めてきたが、装置への試料導入法を改良することで、酢酸同様、濃度の低い地球宇宙化学試料に展開が可能であると考えられる。また、同様の手法を用いて計測可能な分子種を増やすことや、新たに水素PSIAへ拡張することについても検討可能な状況にある。以上の経緯から、計測可能な分子種の拡大、水素同位体への拡張、試料導入方法の改良の観点から本手法を進展させ、地球宇宙化学試料に展開する本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

地球宇宙化学試料に含まれる有機分子の起源・生成機構を、安定同位体組成分析によって解明するためには、現行の分子バルク同位体分析のみではなく、究極的には分子内の位置別の同位体分析まで深化させる必要がある。しかし、地球宇宙化学試料中に極微量にしか存在しない有機分子の分子内位置別同位体分析は実現していない。本研究では、これまで我々グループが世界に先駆け開発に成功した位置別炭素安定同位体分析法を、地球宇宙化学試料に展開し、地球宇宙化学的研究における有機分子の起源・生成機構の議論を進展させることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、地球宇宙化学的に重要な数種の揮発性有機化合物(VOCs)およびアミノ酸について、はじめに、オンライン熱分解-同位体比質量分析システムによる分子内位置別炭素・水素安定同位体分析(炭素・水素PSIA)を確立する。続いて、目的分子を極微量にしか含まない実試料を分析システムに導入するための方法を構築する。最後にこれらシステムを、実試料に適用し、起源・生成機構解析に対する炭素・水素PSIAの有効性を例証することで目的を達成させる。

具体的には、地球宇宙化学分野において重要な以下の2つの研究課題に、確立した方法を適用し、各研究課題が現状抱える問題点を解決することで議論の進展をはかり、有機分子の起源・生成機構解明のためのPSIAの有効性を示す。

#### < 課題 1：大気中揮発性有機化合物の発生源解明 >

大気中の揮発性有機化合物 (volatile organic compounds: VOCs) は、大気質、人体、気候に多大な影響を及ぼす対流圏オゾンや二次有機エアロゾルの形成に深く関与している重要な大気微量成分である。それにもかかわらず、現行の濃度分析や CSIA では VOCs の発生源や各発生源からの放出量が十分に解明できず、議論に停滞が見られる。本研究では、VOCs の中でも存在量および反応性の高さから重要視されている、エタノール、アセトアルデヒド、アセトンに着目し、VOCs の各発生源を明らかにする。

#### < 課題 2：地球外アミノ酸の生成経路解明 >

地球外アミノ酸がどのような前駆体からどのような生成経路を経て合成されるのかを明らかにすることは、分子進化や生命の起源を考える上で非常に重要であるが、現在提案されているいくつかの生成経路のうち、どの経路がもっとも正しいのかを、現行の水素・炭素・窒素 CSIA では評価することが出来ない。本研究では、確立したアミノ酸の炭素・水素 PSIA を、様々な合成経路をもつアミノ酸に適用し、生成経路と分子内位置別同位体的特徴を関連付けることで、アミノ酸の前駆体・合成経路を特定する指標創出を目指す。アミノ酸としては、グリシン、アラニン、イソバリンに着目する。

### 4. 研究成果

#### < 課題 1：大気中揮発性有機化合物の発生源解明について >

大気中のエタノール、アセトアルデヒド、アセトンについて、炭素 PSIA に必要な試料量 (各 50nmol 程度) を大気から濃縮し、オンラインで熱分解-同位体比質量分析システムへ導入するための前処理濃縮装置を作製した。

エタノール、アセトアルデヒド、アセトンを含む模擬大気試料を用いて、前処理濃縮装置の装置を行ったところ、アセトンに関しては、過不足なく濃縮・導入が可能であることが分かった。一方、エタノールとアセトアルデヒドに関しては、濃縮過程でアセトアルデヒドの一部がエタノールに変換されてしまうことが明らかになった。これは、濃縮に用いる吸着剤 (カルボキセン) が、化合物の脱着のために高温 (200 ) になった時に、アセトアルデヒドが酸化されてしまうためだと推測された。吸脱着の温度・時間を変化させ、アセトアルデヒドが酸化されない条件を検討したが、見つけることは出来なかった。さらに、実験を重ねるごとに同条件においてもアセトアルデヒドが酸化される割合が増加することが分かった。今後、同位体分析を行うためには各化合物が反応・変化しない吸着剤を選定することが必要である。

実験室内の大気を前処理濃縮装置で濃縮し、オンラインで熱分解-同位体比質量分析システムへ導入して分析を行ったところ、アセトンの炭素 PSIA が可能であることが分かった。人間の呼気についても同様に分析可能であることが分かった。室内大気および呼気に含まれるアセトンは、炭素 CSIA の数値が似通っているが、炭素 PSIA が明確に異なることが明らかになった。このことから、工業的に合成されたアセトン (実験室大気中アセトン) と生物的に合成されたアセトン (呼気中アセトン) が PSIA によって明確に区別できる可能性が示唆された (下図)。今後、都市大気等に適用することで、従来よりも精緻に発生源特定が可能になるとと思われる。

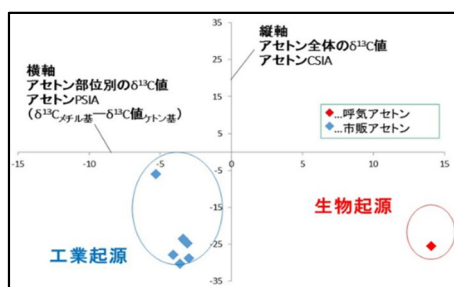


図 1. アセトンの PSIA の分布

エタノールに関しては、水素 PSIA の開発を行った。はじめに、メチル基、メチレン基および水酸基の水素が重水素で標識されたエタノールを、通常の標識されていないエタノール試薬に混合することで、重水素含有量の異なるエタノール試薬を作製した。それら試薬を、これまでに確立した炭素 PSIA で用いられる、マイクロ固相抽出法を用いて熱分解-同位体比質量分析システムへ導入し、水素同位体分析をおこなった。結果、メチル基とメチレン基の水素が熱分解時に交換することが明らかになった。標識度合いの異なる試料の分析から、交換率を導き出すことができた。この交換率を使って、基のエタノールの分子内同位体分布を決定できることがわかった。

熱分解-同位体比質量分析システムを用いた水素 PSIA は、世界で初めての例である。今後試料量を減らすことができれば、環境試料への適用が可能である。試料量を減らすためには、上述の前処理濃縮装置を完成させる必要があり、濃縮過程におけるアセトアルデヒドの酸化を防ぐことが今後の課題である。

#### < 課題 2：地球外アミノ酸の生成経路解明について >

はじめに、アミノ酸 PSIA として従来利用されてきた、ニンヒドリン反応により得られるカルボキシ炭素の同位体測定の見直しを行い、この方法の精度・確度、および低減可能な必要試料量を見積もった。結果、従来ニンヒドリン反応による同位体分別はない、もしくは小さいと考えられていたが、グリシン、アラニン、イソバリンにおいて非常に大きな同位体分別があることが分

かった(分別係数 40%以上)。このことは、 $\pm 0.5\%$ の精度・確度で測定結果を得るためには、ニンヒドリン反応の反応進行度を 99.5%以上にする必要があることを意味している。しかしながら、実際には反応進行度はグリシンで 95%、アラニン、イソバリンで 98%にとどまることが分かった。そのため反応進行度を 100%に近づける条件検討を行った。しかしながら、反応進行度を 100%にすることは出来なかった。そこで、試料量を変化させニンヒドリン反応およびカルボキシ炭素同位体測定を行うことで、レイリー蒸留モデルを作成し、反応進行度と同位体組成の関係を表す回帰式からカルボキシ炭素の同位体を決定する方法を確立した。しかし、本法をもしいる場合、必要試料量は最低でも 0.5 mg量必要であることが分かった。隕石などの地球宇宙化学試料に適用するためには、さらなる試料量の低減が必要である。

確立した方法を様々な試薬に適用することで、同位体分析に必要不可欠な同位体標準物質の整備をすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fry Brian, Carter James F., Yamada Keita, Yoshida Naohiro, Juchelka Dieter	4. 巻 32
2. 論文標題 Position-specific <sup>13</sup> C/ <sup>12</sup> C analysis of amino acid carboxyl groups - automated flow-injection analysis based on reaction with ninhydrin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Rapid Communications in Mass Spectrometry	6. 最初と最後の頁 992 ~ 1000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcm.8126	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 -

1. 著者名 Julien Maxime, Gilbert Alexis, Yamada Keita, Robins Richard J., H?hener Patrick, Yoshida Naohiro, Remaud G?rald S.	4. 巻 176
2. 論文標題 Expanded uncertainty associated with determination of isotope enrichment factors: Comparison of two point calculation and Rayleigh-plot	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Talanta	6. 最初と最後の頁 367 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.talanta.2017.08.038	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神藤拓実、中川麻悠子、山田桂太、吉田尚弘
2. 発表標題 大気中の含酸素揮発性有機化合物の濃縮と分子内部位別炭素同位体比分析手法の開発
3. 学会等名 日本地球化学会年会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 白瀧滉司、宮澤謙太、山田桂太、吉田尚弘
2. 発表標題 グリシンの部位別炭素安定同位体比測定法の確立
3. 学会等名 日本地球化学会年会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三沢亮太、山田桂太、吉田尚弘
2. 発表標題 イソバリンの部位別炭素安定同位体比測定法の確立
3. 学会等名 日本地球化学会年会2018
4. 発表年 2018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
研究 分担者	中川 麻悠子  (nakagawa mayuko)  (20647664)	東京工業大学・地球生命研究所・研究員   (12608)	
研究 分担者	ジルベルト アレキシー  (gilbert alexis)  (20726955)	東京工業大学・理学院・助教   (12608)	