

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18796

研究課題名(和文)水陸境界環境の物質循環を解読するアミノ酸安定窒素同位体比解析法の創出

研究課題名(英文)Development of a methodology for measuring the energy transfer along food webs on aquatic-terrestrial mixed resources

研究代表者

力石 嘉人(Chikaraishi, Yoshito)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：50455490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体試料中に微量で含まれているメチオニン(必須アミノ酸の1つ)の安定窒素同位体比の測定に関して、異なる2つの性質のGCカラムを連結する「カラムカップリング法」と定義できるような新しい分析法を開発した。またそれを用い、メチオニン・フェニルアラニン・グルタミン酸の窒素同位体比から、河川等の水陸境界環境で生息する生物における「有機物資源の水陸混合率：藻類X%-陸上植物Y%」および「栄養段階」を推定する方法論を確立した。これらの成果を、水陸境界環境における生物の栄養段階、および餌資源の同定・水陸混合比を見積もる新たな方法論としてまとめ、国内学会、および、国際誌で発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、水陸境界環境において、有機物資源の水陸混合率、生物の栄養段階、そして、アミノ酸の代謝量(エネルギー消費量)等を定量的に見積もる方法論が提案されたことで、地球化学や生態学の分野で、今後、水陸境界環境の研究が進むと期待される。

また本研究で開発した「カラムカップリング法」は、夾雑物の多い試料に、少量含まれている有機化合物の安定同位体比測定(例えば、スポーツ競技におけるドーピング、危険薬物の起源・使用量の推定や、隕石中有機物の起源・生成プロセスの研究)にも直接応用できるため、本研究の結果は、これらの研究に新たな展開をもたらすと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, I developed 'column-coupling method' for measuring stable isotopic composition of methionine, a very minor but indispensable amino acid, in natural organisms. Moreover, applying this method developed, we established a compound-specific isotope methodology for estimating 'resource proportion (aquatic X% vs. terrestrial Y%)' and 'trophic position' of organisms in food webs where both phytoplankton and terrestrial-plants are potentially utilized as primary resources for consumer species along food chains. The results including the method and methodology were published as a paper in Limnology and oceanography: Methods, in 2018.

研究分野：有機地球化学，同位体生態学

キーワード：アミノ酸 メチオニン 水陸境界環境 安定同位体比 食物連鎖 エネルギー

1. 研究開始当初の背景

海洋生物圏における窒素循環の解析は、海洋の生物生産性や、海洋生物の栄養段階と食物連鎖網の規模、そして人間活動が海洋生態系へ与える影響(水産資源量の変遷や生態系の破壊・回復など)を評価するために重要である。また海洋の生物生産性は、二酸化炭素吸収量と密接に関係しているため、その正確な評価は、地球温暖化問題を考える上でも非常に重要な意義をもつ。

海洋生物圏の窒素循環の解析法の1つに、生物および堆積物などの試料に含まれるアミノ酸の安定窒素同位体比($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$)の分析があり、Gaebler et al., 1963 (Cand. J. Biochem. Physiol. 41, 1089-1097)以降、半世紀にわたり研究されてきた。それは、その安定同位体比の変化率に、地球上で起こる様々な物理化学・生化学反応の5W2H(Who, What, When, Where, Why, How, How many)が記録されているという基本原理が、個々の生物の研究から地球化学・地質学スケールの研究まで、共通の一般則として広く適用できるためである。これらの研究において、申請者が2009年に発表した「アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階推定法」の成果は著しい(Limnol. Oceanogr.: Methods 7, 740-750)。これは、食物連鎖の捕食-被食関係における窒素同位体比の変化率が、非必須アミノ酸であるグルタミン酸と必須アミノ酸のフェニルアラニンとの間で異なることを利用して、生物の栄養段階を正確に求める方法論であり(図1、誤差は0.1-0.2栄養段階)、現在の地球化学・生態学とその周辺分野(考古学・生物学など)の研究で積極的に用いられている。

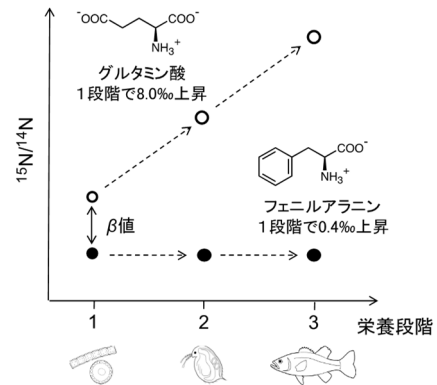


図1 食物連鎖とアミノ酸の安定窒素同位体比の関係
 β 値 = -3.4‰ (藻類), +8.4‰ (陸上植物)
 ‰: 国際標準物質の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ に対する千分率

しかしこの方法論は、河川や河川の流入する沿岸域などの水陸境界環境には適用できないという極めて重大な欠点を持つ。それは、藻類と陸上植物でフェニルアラニンの窒素同位体比を決める代謝システムが異なる(それにより、図1の値が藻類で3.4‰、陸上植物で-8.4‰と、大きな差を示す)ことが、水陸境界環境場におけるフェニルアラニンの同位体比を、有機物供給源の水-陸の寄与度に応じて大きく変化させてしまうためである(栄養段階に換算して、最大1.6段階分の誤差を生じる)。沿岸域などの水陸境界環境は、最も生物生産性が高い場所の1つであり、海洋の窒素循環の研究では、「水陸境界環境を取り巻く窒素循環の正確な評価こそが最重要課題である」と頻りに指摘されているにもかかわらず、である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、この現行法の欠点を克服し、藻類と陸上植物で共通の値を示す(共通の代謝系を持つ)メチオニンに注目し、その安定窒素同位体比測定法の開発と、開発した測定法の実証研究を行い、「水陸境界環境の物質循環を解読するアミノ酸安定窒素同位体比解析法の創出」に挑戦する。具体的には、以下の2つの達成目標を設定する。

- (1) 測定法の開発研究(平成29年度): メチオニンは、生体を構成する20種類のアミノ酸の中で、とりわけ含有量が少なく、これまで、安定同位体比の測定が極めて困難であった。本研究では、「カラムカップリング法」の導入によりこの難題の解決に挑戦する。
- (2) 開発した測定法の実試料での実証研究(平成30年度): 開発した手法を、代表的なモデルケースとして河川の生物群に適用し、生態系への「藻類・陸上植物由来の有機物の混合比」や、その混合比が求まることで見積もられる「生物の栄養段階」を評価し、本研究が提案する方法論の有効性を実証する。

3. 研究の方法

アミノ酸の安定窒素同位体比は、一般的に、生体試料(乾燥重量で数mg)を酸加水分解後、イオン交換クロマトグラフィ、誘導體化、マイクロ固相抽出などを駆使して、ガスクロマトグラム上で独立した1つのピークが得られるまで精製し(図2)、ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS)で測定する。従ってこれまでは、煩雑な前処理に伴う不安定な回収率や再現性、夾雑物との存在比を考慮して、グルタミン酸やフェニルアラニンなどの主要なアミノ酸のみが研究対象とされてきた。一方で、本研究が着目するメチオニンは、生体中の含有量が極めて少なく、また、現行の測定条件(単一のカラム)ではクロマトグラム上で夾雑物と十分に分離することができない(図3左)。これが、メチオニンの安定同位体比測定を極めて困難にしている主因である。

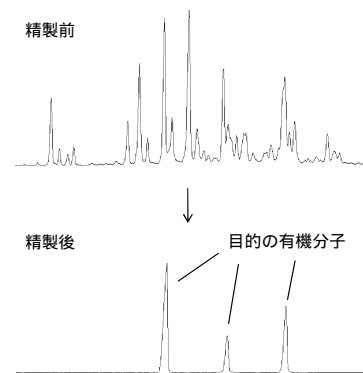


図2 安定同位体比を測定するには、様々な前処理法を駆使して、目的の有機化合物をクロマトグラム上で単一のピークにする必要がある

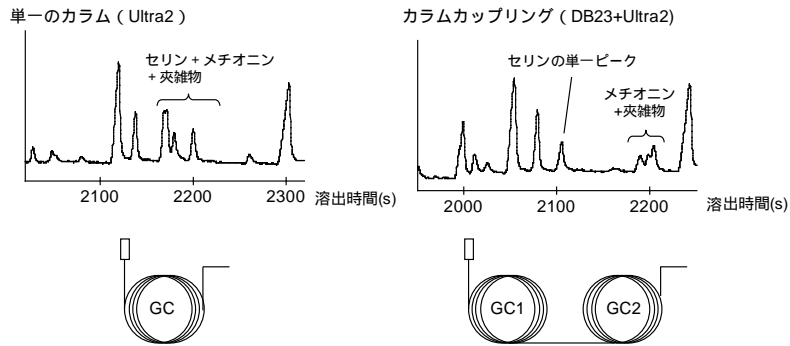


図3 カラムカップリング法によるセリン（非必須アミノ酸の1つ）のクロマトグラム上での分離

そこで本研究では、まず、以下の2つのアイデアでこれを克服する。1つ目は、異なる2つの性質のGCカラムを連結してピーク分離を達成する「カラムカップリング法(図3右)」と定義できるような分析法を用いて、クロマトグラム上でメチオニンを夾雑物から分離することである。申請者は平成27-28年度に行った予備実験で、一般的に使われている微極性のGCカラム(Ultra2)では分離困難なセリン(非必須アミノ酸の1つ)が、極性カラム(DB23)と微極性カラム(Ultra2)を連結したカラムカップリング分析により、独立したピークとして得られることを発見した(図3右)。本研究では、この原理を応用し、安定窒素同位体比分析の信頼性が確認済みであるAgilent社製の微極性カラム:HP-Ultra2、中極性カラム:DB35ms、2つの高極性カラム:DB23、HP-INNOWAX(Chikaraishi et al., 2010, *Earth, Life and Isotopes*, pp.367-386)を用い、これらの組み合わせの計12通りにより、メチオニン分析の最適条件を得る。2つ目は、前処理で用いる誘導体基の化学構造の変更である。一般的には、ピバロイル化が用いられるが、この構造(炭素数や分岐鎖の有無)を変更することで、メチオニンのGCカラムでの溶出時間をコントロールして、より完璧な分離を得る。

次に、開発した測定法を、代表的なモデルケースとして、既知の餌を与えて育てた飼育個体、及び、天然から採取した陸上(有機物資源:植物100%)、海洋(同:藻類100%)、河川生態系(同:様々な割合の混合、研究協力者である石川尚人博士がIshikawa et al. (2014, *Oecologia* 175, 911-922)で、グルタミン酸やフェニルアラニンの安定窒素同位体比を報告済)について、(1)メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸の同位体比の差から、生態系への「藻類・陸上植物由来の有機物の混合比」を見積る。(2)その混合比を用いて、図1のを再定義することで、各々の生物の栄養段階が見積もり、生態系構造を描く。

$$\begin{aligned} \text{再定義} &= (-3.4\text{‰}) \times (\text{藻類}\%) + (+8.4\text{‰}) \times (\text{植物}\%) \\ \text{栄養段階} &= ({}^{15}\text{N}_{\text{グルタミン酸}} - {}^{15}\text{N}_{\text{フェニルアラニン}} + \text{再定義}) / 7.6 + 1 \end{aligned}$$

4. 研究成果

まず、メチオニンのクロマトグラム上での分離能の大幅な向上を目指し、以下の項目を検討した。

- GCカラム: HP-5MS(微極性)、DB35ms(中極性)、DB23及びHP-INNOWAX(高極性)
- 組み合わせ: 15m+30m, 30m+30m, 30m+15m
- GCの昇温プログラム
- アシル化: *n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、ピバロイル、*n*-ペンチル

その結果、メチオニンは、

- GCカラム: HP-INNOWAX(15m) + HP-5MS(30m)
- 組み合わせ: 15m+30m
- GCの昇温プログラム: 40 -4分保持-250 まで8 /分昇温-20分保持
- アシル化: ピバロイル

の組み合わせにより、夾雑物や他のアミノ酸から、十分に分離できることが明らかになった(図4)。また、メチオニンの標準試薬を用いた検証を行い、 $\pm 0.5\text{‰}$ の精度で安定同位体比の測定ができることがわかった。

次に、この分析条件を用いて、

- 既知の餌を与えて育てた飼育個体
- 天然から採取した陸上(有機物資源:植物100%)、海洋(同:藻類100%)
- 河川生態系(同:様々な割合の混合)

で、メチオニン、フェニルアラニン、グルタミン酸の同位体比を測定し、生物毎に「図1の再定義」を行い、また「有機物資源の水陸混合率:藻類X%-陸上植物Y%」と「栄養段

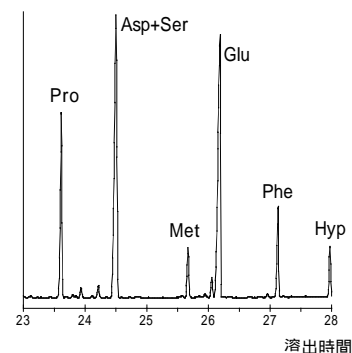


図4 カラムカップリング法(HP-INNOWAX 15m + HP-5MS 30m)によるメチオニン(Met)の分離

階」を計算した。その結果、飼育実験、天然試料ともに、

- ・ 有機物資源の水陸混合率（藻類 X%-陸上植物 Y%）は、メチオニンとフェニルアラニンの同位体比の差から計算できること
- ・ 栄養段階は、グルタミン酸とフェニルアラニンの同位体比、及び、上記の水陸混合率より求めた値より、計算できること

がわかった（図5）。なお、得られた「栄養段階」は、全ての生物種において、生物学的知見と一致する結果であった。

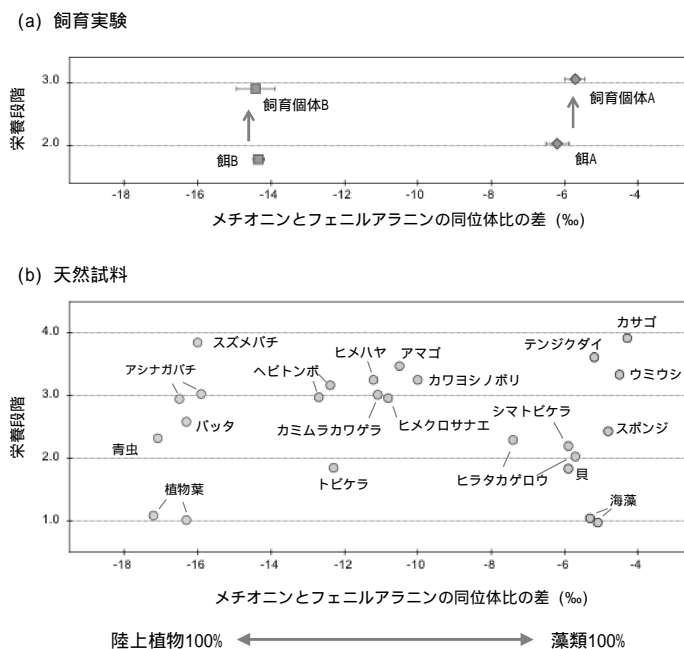


図5 様々な生物における、「藻類-陸所植物の寄与率（メチオニンとフェニルアラニンの同位体比の差）」と、「栄養段階（グルタミン酸とフェニルアラニンの同位体比の差より計算）」

本研究により、現行の「アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階推定法」が抱えていた「河川や河川の流入する沿岸域などの水陸境界環境には適用できない」という極めて重大な欠点を、解決する1つの方法論を提案することができた。これらの成果は、水陸境界環境における生物の栄養段階、および餌資源の同定・水陸混合比を見積もる新たな方法論としてまとめ、国内学会、および、国際誌で発表済みである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Ishikawa F.N., [Chikaraishi Y.](#), Takano Y., Sasaki Y., Takizawa Y., Tsuchiya M., Tayasu I., Nagata T., Ohkouchi N. (2018) A new analytical method for determination of the nitrogen isotopic composition of methionine: its application to aquatic ecosystems with mixed resources. *Limnology and Oceanography: Methods* 16, 607-620, 査読有り, doi: 10.1002/lom3.10272

〔学会発表〕(計1件)

力石嘉人, 菅谷智司. アミノ酸の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 分析で見た共生系のエネルギーフロー, 日本共生生物学会, 11月24日, 2018年, 神戸大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：石川 尚人

ローマ字氏名：(ISHIKAWA, Naoto)

研究協力者氏名：菅谷 智司

ローマ字氏名：(SUGAYA, Satoshi)

研究協力者氏名：滝沢 侑子

ローマ字氏名：(TAKIZAWA, Yuko)

研究協力者氏名：佐々木 瑠子

ローマ字氏名：(SASAKI, Yoko)

研究協力者氏名：高野 淑識

ローマ字氏名：(TAKAN0, Yoshinori)

研究協力者氏名：小川 奈々子

ローマ字氏名：(OGAWA, Nanako)

研究協力者氏名：大河内 直彦

ローマ字氏名：(OHKOUCHI, Naohiko)

研究協力者氏名：土屋 正史

ローマ字氏名：(TSUCHIYA, Masashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。