

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K21888

研究課題名（和文）有機化合物の安定同位体比分析法：誘導体化に伴う同位体比変化を無力化する技術の開発

研究課題名（英文）A new method for minimizing isotopic fractionation associated with derivatization of organic compounds

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、誘導体化における同位体比の変化の仕組みの把握を目的に、糖やアミノ酸の代表的な誘導体化である「アシル化」に注目し、基質と誘導体化の濃度バランスと同位体比の関係を実験的に明らかにした。

また、同位体分別の軽減の変化を軽減、および、希釈する手法の導入を目的に、(1) 界面活性剤を用いた同位体比変化の軽減、(2) 官能基の交換による同位体比変化の希釈に挑戦し、実際に、ナノフルオロ吉草酸を添加して行ったアミノ酸のアシル化で、同位体比の変化が軽減されること、および、アミノ酸のアシル基と酢酸イソプロピルのアセチル基の交換反応により、同位体比の変化が希釈されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルボキシル基やヒドロキシル基等の極性官能基をもつ有機化合物に関して、安定同位体比の測定を行うためには、測定を行う前に、極性官能基を化学修飾し、対象の有機化合物の極性を低下させる必要がある。しかし、多くの化学修飾（誘導体化反応）には、安定同位体比の人為的変化のリスクがあり、これが、極性有機化合物の安定同位体比研究を妨げている主因であった。本研究により、この「誘導体化（化学修飾）に伴う同位体比の人為的変化」を克服する2つの新たな手法が開発されたことは、今後、これらの極性有機化合物の安定同位体比を用いた研究が、様々な分野の研究で実用化されていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I developed a new method for minimizing isotopic fractionation associated with derivatization (particularly for acylation) of organic compounds. During acylation of amino acids, there is a significantly-large fractionation in  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , which is caused by preferential reaction of  $^{12}\text{C}$  on the acetyl reagents to amino acids. However, the isotopic fractionation can be reduced when amino acids are acylated with a surfactant and be diluted when the acyl group on the amino acids are replaced with that on the solvent.

研究分野：有機地球化学，同位体生態学，同位体生理学

キーワード：誘導体化 安定同位体比 同位体分別

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球生物圏の物質循環の研究は、大気・陸・海洋と生物の間でおこる物質（もしくはエネルギー）収支を定量し、また、それらへの人間活動（化石燃料の消費・森林破壊など）の影響を評価する。とくに、植物や藻類による二酸化炭素の吸収と、その結果としての土壌・海洋への炭素の貯蔵に関する研究は、大気二酸化炭素の増減とも密接に関係しているため、将来の地球の姿、人間社会の持続可能性を考えるうえでも非常に重要な意義を持つ。

これらの物質循環の解析法の1つに、有機化合物の安定同位体比（D/H,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ）分析がある。この解析法は、有機化合物の同位体比に、物理化学・生化学反応の5W2H（Who, What, When, Where, Why, How, How many）が記録されるという基本原理が、個々の生物から地球化学・地質学のスケールまで共通の一般則として適用できるため、様々な研究で広く用いられている。実際に、飽和炭化水素のD/Hは、陸上の乾湿状態を（例えば、Sachse et al., 2012, *Annu Rev Earth Planet Sci* 40, 221-49）、また、アミノ酸の $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ は、生態系の窒素フローを（例えば、Chikaraishi et al., 2014, *Ecol Evol* 4, 2423-2449）正確に定量することができるツールとして、現在の地球化学・生態学とその周辺分野の標準的な研究手段になっている。しかし、有機化合物の安定同位体比は、測定法（飽和炭化水素の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 分析、Hayes et al., 1990, *Org Geochem* 16, 1115-1128）が初めて発表されてから約30年経った現在においても、糖や核酸塩基などの生物にとって重要な分子を含む多くの有機化合物で「分析を行うために必要な誘導体化（不揮発性化合物に揮発性を持たせるための化学修飾）に伴い、人為的な同位体比の改変が起こる（Rieley 1994, *Analyst* 119, 915-919）ために」測定できない、という本質的な課題を抱えている。前述の炭化水素やアミノ酸の分析は「誘導体化を必要としない」もしくは「例外的に、同位体比の改変がない」ことにより、広く使われているのである。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、この「誘導体化に伴う同位体比の人為的改変」を抜本的に克服する新たな手法の開発にチャレンジする。具体的には、(1) 誘導体化における同位体比の改変の仕組みの把握、(2) 同位体比の改変を軽減、希釈する手法の導入、(3) 実証研究、の3つの達成目標を設定する。これらの達成により、有機化合物の安定同位体比分析の適用範囲を劇的に広げ、生物圏の物質循環の様々な研究に新たな展開をもたらすことを期待する。

### 3. 研究の方法

上記の(1)~(3)の達成目標に対して、以下の実験を実施する

#### (1) 誘導体化における同位体比の改変の仕組みの把握：

化学反応に伴う同位体比の改変は、生成物が気体または沈殿（固体）として系から除去される非可逆反応では、レイリー蒸留（Rayleigh 1896 *Philos Mag* 42, 493-593）で説明できるが、生成物が溶液中に溶解している多くのケース（とくに可逆反応）では、ほとんど理解できていない。そこで本研究では、「同位体比の改変が生じる代表的な反応」かつ「糖やアミノ酸、核酸塩基の-OH基、-NH<sub>2</sub>基の代表的な誘導体化反応」である「アシル化」に着目し、基質、誘導体化剤、生成物の間の濃度バランスと同位体比の関係を、実験的に明らかにする。

#### (2) 同位体比の改変を軽減、希釈する手法の導入：

試料（基質）と誘導体化剤の量比を、コントロールすることは、高純度の標品を用いた際には、ある程度可能である（Corr et al. 2007 *Anal Chem* 79, 9082-9090）。しかし、自然界から得られた天然試料の場合には、試料が、様々な有機化合物やマトリックスの混合物であるため、上記(1)の研究で得られた「同位体分別のメカニズム」から、同位体比の改変の効果を計算等により取り除くことは、非常に難しい。

そこで、本研究では、(i)界面活性剤を用いた同位体比改変の軽減と、(ii)誘導体化の交換反応を用いた同位体比改変の希釈、により「誘導体化に伴う同位体比の人為的改変」という難題の克服に挑戦する。界面活性剤は、極性の有機化合物（糖やアミノ酸）を溶液中で均一に混合するため、同位体比改変の原因である「競争反応」を緩和することが期待でき、また交換反応は、誘導体化により改変してしまった同位体比を多量の交換剤で希釈し、改変の影響を最小化することが期待できる

#### (3) 実証研究：

開発した手法を、生物や環境試料に含まれる糖、アミノ酸、アルコールの同位体分析に適用し、本研究で提案する新手法の有効性を実証する。

糖やアミノ酸の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、核酸塩基の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ に、科学的に価値の高い情報があることが古くから知られており、この30年間、日本（Chikaraishi & Ohkouchi, 2010, *Ear Life Iso*, pp355-366）、イギリス（Corr et al., 2007, *Anal Chem* 79, 9082-9090）、ドイツ（Smith et al., 2009, *Anal Biochem* 390, 165-172）を中心に世界中で活発に研究されてきた。本研究は、それらの研究で共通の課題となってきた「誘導体化に伴う同位体比の人為的改変」を、一見すると誘導体化反応とは関係の無い「界面活性剤の添加」や「誘導体化の交換反応」という、全く新しいアイデアを導入することで、

抜本的に解決するを目指す。

#### 4. 研究成果

(1) 誘導体化における同位体比の改変の仕組みの把握：

炭素数 3~6 の糖，アラニン，グリシン，グルタミン酸などのアミノ酸の標品に対し，モル比で 10~10,000 倍のアシル化剤を用いて誘導体化（糖の場合にはアセチル化，アミノ酸の場合にはピバロイル化）を行い，誘導体基の炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$  値）を測定した。

その結果，

- ・ 誘導体基の炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$  値）は，基質の反応官能基（ヒドロキシル基やアミノ基）のモル濃度の対数に対して，直線で近似されるような値を持つ
  - ・ その傾きや切片は，糖については炭素数，アミノ酸については，個々のアミノ酸で特異的である
  - ・ 複数の糖の混合物に対して誘導体化を実施しても，それらの直線の傾き・切片はほとんど変化しない
  - ・ 一方で，複数のアミノ酸の混合物に対して誘導体化を実施すると，混合率に応じて，直線の傾き・切片が変化する
  - ・ その変化は，光学異性体（例えば，L-アラニンと D-アラニン）の混合率でも変化する
- ことが明らかになった。

これは，糖をアセチル化する際には，内部標準法（試料に，天然には存在しない糖分子を添加する）により，誘導体基の炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$  値）を求めることが可能であることを意味し，一方で，アミノ酸のアシル化では，天然試料の場合には，誘導体基の炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$  値）を求めることが，極めて難しいことを意味する。

(2) 同位体比の改変を軽減，希釈する手法の導入：

アミノ酸の混合試薬をピバロイル化した際に，炭素同位体比（ $\delta^{13}\text{C}$  値）は，誘導体化時に界面活性剤を添加しない場合には， $\pm 5\%$ 以上の改変が生じる。さらにこの改変は，上記(1)で述べたように，複数のアミノ酸の混合物や光学異性体の組成比によっても，大きく変化してしまう。一方で，ナノフルオロ吉草酸（Nonafluoropentanoic Acid）などの界面活性剤の添加により，この  $\delta^{13}\text{C}$  値の改変は，プロリン（Pro）とヒドロキシプロリン（Hyp）を除くほとんどのアミノ酸で劇的に改善され，ほとんど見えなくなる（有意で無くなる）ことがわかった。さらに，誘導体化されたアミノ酸を，酸性条件下，酢酸イソプロピル溶液中で加熱することで，アミノ酸誘導体化体のエステル基，アシル基を，有機溶媒（酢酸イソプロピル）のそれらと交換させることにより，誘導体化における同位体比の改変の影響を，検出限界以下に希釈できることを明らかにした。これらの成果は，すでに，アミノ酸の安定同位体比測定における標準試料の作成に応用されている。

(3) 実証研究：

上記(1)，(2)で確立した「界面活性剤の利用」と「交換反応を用いた同位体比改変の希釈」を，代表的なモデルケースとして，実験室で飼育した生物（実験区と対象区の比較試料など）に適用し，本研究が提案する方法論の有効性を実証する予定であった。しかし，この実証研究に関しては，新型コロナの感染防止措置により，(i) 研究室の利用制限が実施されたこと，(ii) 実験用の生物の入手が著しく困難になったことにより，実施することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furukawa Yoshihiro, Chikaraishi Yoshito, Ohkouchi Naohiko, Ogawa Nanako O., Glavin Daniel P., Dworkin Jason P., Abe Chiaki, Nakamura Tomoki	4. 巻 116
2. 論文標題 Extraterrestrial ribose and other sugars in primitive meteorites	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 24440 ~ 24445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1907169116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Chikaraishi Yoshito
2. 発表標題 Hydrogen Isotopic Composition of Fatty acids, Sterols, and Phytol: Autotrophic vs. Heterotrophic Production
3. 学会等名 The 29th International Meeting on Organic Geochemistry（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Xing Daochao, Chikaraishi Yoshito
2. 発表標題 Illustrating food web structure in a marine ecosystem via compound-specific isotope analysis of amino acids
3. 学会等名 The 29th International Meeting on Organic Geochemistry（国際学会）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------