

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 23 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20740316  
研究課題名 (和文) アミノ酸の立体異性体分子レベル安定窒素同位体比解析法の研究  
研究課題名 (英文) Development of enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of amino acids

## 研究代表者

高野 淑識 (TAKANO YOSHINORI)  
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・研究員  
研究者番号：80399815

研究成果の概要 (和文)：生体を構成する分子には、光学異性体や構造異性体が存在する。身近な光学異性体の例でいうと、タンパク質を構成するアミノ酸は、基本的にL-体アミノ酸から構成され、核酸の糖は、D-体リボースから構成されることが挙げられる。また、D-アラニンなどのようにタンパク質は構成しないが、細胞内のペプチドグリカンとして局所的に高濃度に存在する場合がある。これらの他にも生体内で生理活性を持つ種々の分子は、いずれかの異性体に偏っていることが多い。本研究では、従来のキラルなキャピラリーカラムを用いた光学異性体の分離ではなく、光学活性アルコール付加によるジアステレオマー誘導体化法を導入し、自然界に存在する光学異性体および構造異性体の個々の分子レベル窒素同位体比の評価を行った。

研究成果の概要 (英文)：The one-handedness of terrestrial L-amino acids in proteins and in D-sugars of DNA and RNA are primary formation, structure and function of biopolymers for life on the Earth. We have developed an analytical method to determine the ESIA of individual amino acid enantiomers and revealed nitrogen isotopic hetero- and homogeneity for D-alanine and L-alanine in terms of microbial processes in domain Bacteria and chemical processes in organic symmetric synthesis. Novel derivatization of amino acid diastereomers by optically active (*R*)-(-)-2-butanol or (*S*)-(+)-2-butanol with pivaloyl chloride produces N-pivaloyl-(*R,S*)-2-butyl esters (NP/2Bu) of the amino acid diastereomers. The novel method of enantiomer-specific isotopic analysis (ESIA) is useful for distinguishing the origin of biogenic and abiogenic processes and is applicable to enantiomer studies.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：宇宙地球化学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：アミノ酸、エナンチオマー、安定同位体比、生物プロセス、非生物プロセス

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 生体を構成する分子には、立体異性体が

存在する。右手と左手のように鏡像関係であり、光学的な性質も反対であることから、光

学異性体とも呼ばれる。このように原子間の結合順序が同一で、空間的な原子配列が異なる化合物の性質は、「キラリティー(Chirality)」と呼ばれる。身近な立体異性体の例でいうと、タンパク質を構成するアミノ酸は、基本的にL-体アミノ酸から構成され(=ホモキラル、不斉である)、核酸の糖は、D-体リボースから構成されることが挙げられる。さらに化学、生物学、物理学の境界領域的観点から、キラリティー研究における代表的事例を挙げると、生物圏で非常に重要な役割を担っていることが見えてくる。

有機物のキラリティーの発見は、1849年のルイ・パスツールの発見に端を発する。このため、キラリティー研究に関する国際的な研究動向は、古くから知られる。なぜ地球の生物は、タンパク質の基本構造としてL-体アミノ酸を使うのか。いわゆる不斉の起源(ホモキラリティー)の謎は、国内外の研究機関からいくつかの有力な仮説があるものの150年以上経った今も決定的な解明に至っていない。特に、炭素質隕石のD, L-アミノ酸に関する研究は、アリゾナ州立大学、パリ大学、NASAらのグループが牽引し、1970年代から今日までNatureやScienceなどの超一流誌に幾つも掲載されている。生命の起源研究とも密接に関わることから科学的な関心の高さが伺える。

近年の国内的な研究動向でいうと、野依良治は、有機合成的手法を取り入れ、右手あるいは左手の分子を選択的に合成する触媒と反応経路(=不斉合成)の開発に成功し、2001年にノーベル化学賞を受賞した。一連のキラリティー研究が契機となり、化学・医薬・食品業界に飛躍的成長をもたらしたことは、周知のことである。

このキラリティー研究は、地球宇宙化学的な観点からも常に開拓されてきた。炭素質隕石や岩石を含む地球化学試料、生体試料、合成実験試料などを対象とした光学分割法(D-体とL-体をクロマトグラフで分ける方法)、あるいは分光学的手法による地球化学的研究が挙げられる。研究代表者は、ホモキラリティーの起源を解明するために学生時代から様々な地球極限環境でのフィールド調査研究、室内模擬実験による有機合成研究の成果を国際誌へ報告してきた。

## 2. 研究の目的

地球生物圏の構造、代謝、生理機能に本質的に関わるアミノ酸の立体異性体について、個々の異性体分子レベル安定同位体比を解析する方法を確立し、自然界の代表的試料の

保有する情報を引き出すことを研究目的とする。本研究では、立体異性体分子レベル安定窒素同位体比(つまり、個々のD-体とL-体に対応した安定同位体比)の解析法を確立し、自然界の試料への応用的展開を図る。

その方法論を確立することにより、従来のように試料をバルクで分析(全量分析)するよりも、得られる情報量は遥かに多く、より本質的な議論が可能になること、そして地球生命科学のような境界領域への科学的な波及効果が期待される。

## 3. 研究の方法

(1)アミノ酸の立体異性体分子レベル安定窒素同位体比の分析ライン確立を行なった。

確立のために必要な段取りは、

(i)単成分の標準試料を用いて、元素分析/同位体質量分析法(EA/IRMS法)で安定同位体比の値を決定した。

(ii)新たに開発したガスクロマトグラフ/燃焼/同位体質量分析法(GC/C/IRMS法)に必要な試料の前処理として、誘導體化、抽出、濃縮の最適化を行なった。

(iii)GC/C/IRMS法により、多成分系での同時評価ができるように、昇温プログラムの最適化、最適なキャピラリーカラムの選定を行ない、EA/IRMS法とのデータ整合性を検証した。

(2)次に、データの精度と確度の検証を行なった。研究代表者らが、行なった予察的検証では、ガスクロマトグラフに用いられるキャピラリーカラムの一部(例えば、Chirasil-Valなど)には、カラム固定層に窒素化合物を含むものがあり、カラムの窒素化合物と分析試料のアミノ酸分子内の窒素との間で同位体交換がおきることを見出した。慎重なクロスチェックが必要である。そこで本提案では、従来のキラルなキャピラリーカラムを用いた光学異性体の分離ではなく、同位体質量分析に導入される「窒素」を試料由来のシグナルに限定する目的で、光学活性アルコール付加によるジアステレオマー誘導體化法の開発を進めた。

## 4. 研究成果

本研究で確立された分析ラインにより、自然界の代表的試料かつ素性の明らかな試料の評価を行なった。通常用いるキャピラリーカラムによるGC/IRMS法で光学異性体分子レベルでの正確な安定窒素同位体比が得られるようになった。次に、タンパク性のD, L- $\alpha$ -アラニンと非タンパク性の $\beta$ -アラニンのようにアミノ基の位置により、構造異性体の

関係にある分子についても検証を行なった。ここで確立した分析方法の応用的展開として、下記の試料について解析を行った。

- (1) 独立栄養および従属栄養の微生物試料(核を持たない原核生物)、堆積物から得られた微生物を評価した。
- (2) 栄養段階などが明らかになっている水界生態学試料を評価した。
- (3) 有孔虫化石などの海底堆積物に埋没した古生物試料を評価した。
- (4) 地球極限環境、地球内部試料に含まれる固体試料と有機物の起源を評価した。

真正細菌のペプチドグリカンに含まれるD,L-アラニンの $\Delta^{15}\delta_{NDL}$  ( $\delta^{15}N_{D-Ala} - \delta^{15}N_{L-Ala}$ )をみると、 $\delta^{15}N_{D-Ala}$ の方が同位体的に軽い傾向があった。また、一部の *Firmicutes* 株を除き、 $\Delta^{15}\delta_{NDL}$ は、D-アラニン含有量(%D-Ala)と正の相関を示した。ペプチドグリカン代謝に至るまでのいくつかの酵素反応経路での同位体分別が示唆された。

真正細菌の細胞壁には、主としてその強度と形態を支えるために堅い層が存在し、特にグラム陽性の細胞壁は、その約90%がペプチドグリカン(数層~約25層)から構成され、準難分解性の性質を持つ。細胞内のタンパク質を構成するアミノ酸は、基本的にL-体であるが、細胞壁のペプチドグリカンには、2つの糖誘導体であるN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸にD-アラニンやD-グルタミン酸などのD-アミノ酸を含むペプチドが架橋している。IODP Leg201(ペルー沖海底下微生物圏航海)で海底堆積物中から培養・単離に成功した真正細菌は、プロテオバクテリアとともにグラム陽性の *Firmicutes* や *Actinobacteria* が主要な構成菌種であった(eg. D'Hondt *et al.*, 2004; Teske, 2006)。本分析法と同位体ラベル法を組み合わせることで様々な極限環境下に棲息する真正細菌の代謝活性の評価が可能になった。

## 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11件)

- ① Kato, S., Takano, Y., Kakegawa, T., Oba, H., Inoue, K., Kobayashi, C., Utsumi, M., Marumo, K., Kobayashi, K., Ito, Y., Ishibashi, J., and Yamagishi, A. (2010) Biogeography and biodiversity in sulfide structures of active and inactive vents at deep-sea hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 2968-2979. DOI:10.1128/AEM.00478-10. (査読有)
- ② Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2009) Amino acid trophic level (ATL): elucidation of aquatic food web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Method*, 7, 740-750. (査読有)
- ③ Kato, S., Yanagawa, K., Sunamura, M., Takano, Y., Ishibashi, J.-I., Kakegawa, T., Utsumi, M., Yamanaka, T., Toki, T., Noguchi, T., Kobayashi, K., Moroi, A., Kimura, H., Kawarabayasi, Y., Marumo, K., Urabe, T., and Yamagishi, A. (2009) Abundance of Zetaproteobacteria within crustal fluids in back-arc hydrothermal fields of the Southern Mariana Trough. *Environmental Microbiology*, 11, 3210-3222. (査読有)
- ④ Fujii, M., Takano, Y., Kojima, H., Hoshino, T., Tanaka, R., and Fukui, M. (2009) Microbial community structure, pigment composition, and nitrogen source of red snow in Antarctica. *Microbial Ecology*, DOI 10.1007/s00248-009-9594-9. (査読有)
- ⑤ 力石 嘉人, 高野 淑識, 大河内 直彦 (2009) アミノ酸 (N-ピバロイル-イソプロピルエステル誘導体) の GC/MS による解析. *Researches in Organic Geochemistry*, 25, 61-70. (査読有)
- ⑥ Bassez, M.-P., Takano, Y., and Ohkouchi, N. (2009) Organic analysis of peridotite rocks from Ashadze and Logatchev hydrothermal sites. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2986-2998. (査読有)
- ⑦ Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, O. N., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2009) Compound-specific nitrogen isotope analysis of D-alanine, L-alanine, and valine: application of diastereomer separation to  $\delta^{15}N$  and microbial peptidoglycan studies. *Analytical Chemistry*, 81, 394-399. (査読有)
- ⑧ Kashiyama, Y., Miyashita, H., Ohkubo, S., Ogawa, O. N., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Suga, H., Toyohuku, T., Nomaki,

H., Kitazato, H., Nagata, T., and Ohkouchi, N. (2008) Evidence for the global distribution of Chlorophyll-d. *Science*, 321, 658-658. (査読有)

- ⑨ Flemings, P.B., Long H., Dugan B., Germaine J., John C.M., Behrmann J.H., Sawyer D. & IODP Expedition 308 Scientists (2008) Pore pressure penetrometers document high overpressure near the seafloor where multiple submarine landslides have occurred on the continental slope, offshore Louisiana, Gulf of Mexico. *Earth and Planetary Science Letters*, 269, 309-325. (査読有)
- ⑩ 高野 淑識 (2008) 物質進化と極限環境の地下生物圏に関する有機地球化学的研究, *地球化学(Geochemistry)*, 42, 23-40. (in Japanese with English abstract) (査読有)
- ⑪ Marumo, K., Urabe, T., Goto, A., Takano, Y., and Nakasheema, M. (2008) Mineralogy and isotope geochemistry of active submarine hydrothermal field at Suiyo Seamount, Izu-Bonin Arc, West Pacific Ocean. *Resource Geology*, 58, 220-248. (査読有)

[学会発表] (計 2 1 件)

- ① 高野 淑識, 力石 嘉人, 小川 奈々子, 野牧 秀隆, 大河内 直彦: 海底堆積物中の古細菌が生きている直接の証拠, *日本地球化学会*, 2009年9月15日、広島
- ② 加藤 真吾, 柳川 勝紀, 砂村 倫成, 高野 淑識, 石橋 純一郎, 浦辺 徹郎他: 海洋地殻流体中の Zetaproteobacteria とその重要性, *日本地球化学会*, 2009年9月15日、広島
- ③ Yamaguchi, Y. T., Y. Takano, Y. Chikaraishi, Y. Yokoyama and N. Ohkouchi: Nitrogen isotopic compositions of amino acids from microorganisms as a tool for studying microbial processes. 19th International Symposium on Environmental Biogeochemistry, Humburg, 14-Sept-2009.
- ④ M. Takeda, K. Sawada, and Y. Takano: Alkenones in sediments from freshwater and saline lakes on the Skarvsnes area, Antarctica. 24th International Meeting on Organic Geochemistry Bremen, 8-Sept-2009.
- ⑤ Yoshito Chikaraishi, Nanako O. Ogawa, Yuichiro Kashiya, Yoshinori Takano, Yasuhiko Yamaguchi, Hiroshi Kitazato, Naohiko Ohkouchi: Elucidation of food web structures based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. 24th International Meeting on Organic Geochemistry Bremen, 8-Sept. 2009.
- ⑥ Y. Takano, Y. Chikaraishi, N. O. Ogawa, and N. Ohkouchi: Enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of D- and L-alanine for nitrogen isotopic composition ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) in bacterial and chemical processes. 24th International Meeting on Organic Geochemistry Bremen, 7-Sept-2009.
- ⑦ Y. Takano, N. O. Ogawa, H. Nomaki, Y. Chikaraishi, H. Kitazato, and N. Ohkouchi: In-situ  $^{13}\text{C}$ -tracer experiments for deep-sea benthic Archaea: evidence of active metabolism by membrane lipid biomarkers. 24th International Meeting on Organic Geochemistry, Bremen, 7-Sept-2009.
- ⑧ 高野 淑識, Julius Lipp, 山口 保彦, Kai-Uwe Hinrichs, 大河内 直彦: 生きている指標とされる Intact Polar Lipids とその地球化学的意味、*日本有機地球化学会*, 2009年8月5日、松江
- ⑨ 高野 淑識, 小川 奈々子, 力石 嘉人, 大河内 直彦: 地下生物圏の生細胞識別法および代謝活性評価法の開発: シグナルを分子レベルで分ける、*地球惑星科学連合大会*, 2009年5月23日、幕張
- ⑩ 山口 保彦, 高野 淑識, 力石 嘉人, 大河内 直彦: 微生物のアミノ酸窒素同位体組成: 微生物食物連鎖の解明へ向けて、*地球惑星科学連合大会*, 2009年5月23日、幕張
- ⑪ 柏山 祐一郎, 力石 嘉人, 高野 淑識, 小川 奈々子, 北里 洋, 大河内 直彦: 「アミノ酸栄養段階」古食性解析に向けた殻体内アミノ酸同位体分析法の開発、*日本古生物学会*, 2009年2月1日、沖縄
- ⑫ Yoshinori Takano, Hidetaka Nomaki, Nanako O. Ogawa, Yoshito Chikaraishi, Hiroshi Kitazato, and Naohiko Ohkouchi. In-situ tracer experiment for benthic archaea: carbon isotopic evidence of active metabolism from caldarchaeol and crenarchaeol of archaeal membrane lipids. 7th International Symposium for Subsurface

Microbiology (ISSM), Shizuoka, 16-Nov-2008.

- ⑬ Y.C. Saigusa, Y. Chikaraishi, Y. Takano, H. Kitazato, N. Ohkouchi. Site-specific  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  analysis of alanine by NMR. 4th International Symposium on Isotopomers (ISI). Tokyo, 5-Oct-2008.
- ⑭ 高野 淑識, 力石 嘉人, 小川 奈々子, 北里 洋, 大河内 直彦: 分子レベルから立体異性体分子レベル窒素同位体比への展開, 2008 年度 日本地球化学会, 駒場, 2008 年 9 月 18 日.
- ⑮ 高野 淑識, 野牧 秀隆, 小川 奈々子, 力石 嘉人, 稲垣 史生, 北里 洋, 大河内 直彦: 海底での同位体トレーサー培養実験からみた古細菌の代謝活性, 2008 年度 日本地球化学会, 駒場, 2008 年 9 月 18 日.
- ⑯ 内藤 裕一, Noah V. Honch, 大河内 直彦, 小川 奈々子, 力石 嘉人, 高野 淑識, 柏山 祐一郎, 米田 穰: アミノ酸の窒素同位体比分析を用いた北海道縄文時代人の食性解析, 2008 年度 日本地球化学会, 駒場, 2008 年 9 月 18 日.
- ⑰ 力石 嘉人, 小川 奈々子, 柏山 祐一郎, 高野 淑識, 北里 洋, 大河内 直彦: アミノ酸の窒素同位体比を用いた食物連鎖解析, 2008 年度 日本地球化学会, 駒場, 2008 年 9 月 18 日.
- ⑱ 高野 淑識, 力石 嘉人, 小川 奈々子, 北里 洋, 大河内 直彦: 原核生物のペプチドグリカンに含まれる D-, L-アラニンの立体異性体分子レベル窒素同位体比, 2008 年度 日本有機地球化学会, 名古屋, 2008 年 7 月 24 日.
- ⑲ Yoshinori Takano, Fumio Inagaki, Yuki Morono, Nanako O. Ogawa, Hiroshi Kitazato, and Naohiko Ohkouchi. Application of NMR to characterize intact polar lipids in deep biosphere. Goldschmidt conference, Vancouver, Canada, 15-July-2008.
- ⑳ 柏山 祐一郎, 力石 嘉人, 高野 淑識, 小川 奈々子, 北里 洋, 大河内 直彦, 富田 武照, 棚部 一成: アミノ酸の窒素同位体比を用いた新しい古食性解析法: 応用と展望, 2008 年古生物学会年会, 仙台, 2008 年 7 月 5 日.
- 大河内 直彦, 力石 嘉人, 小川 奈々子, 柏山 祐一郎, 高野 淑識, 北里 洋: アミノ酸の窒素同位体比を用いた新しい古食性解析法: 原理, 2008 年古生物学会年会, 仙台, 2008 年 7 月 5

日.

[図書] (計 4 件)

- ① Takano, Y., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) Enantiomer-specific isotope analysis (ESIA) of D- and L-alanine: nitrogen isotopic hetero- and homogeneity by microbial process and chemical process. Earth, Life, and Isotopes (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba). Kyoto University Press., in press.
- ② Chikaraishi Y., Takano Y., Ogawa O. N., and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. Earth, Life, and Isotopes (edited by N. Ohkouchi, I. Tayasu, and K. Koba). Kyoto University Press., in press.
- ③ Kobayashi, K., Kaneko, T., Takahashi, J.-I., Takano, Y., and Yoshida, S. (2010) High molecular weight complex organics in interstellar space and their relevance to origins of life. Astrobiology: Emergence, Search and Detection of Life (edited by V. Basiuk). American Scientific Publishers, pp. 175-186.
- ④ Kobayashi K., Kaneko T., Takano Y., and Takahashi J. (2008) Formation of amino acid precursors with large molecular weight in dense clouds and their relevance to origins of bio-homochirality. Organic Matter in Space (edited by S. A. Sandford & S. Kwok), pp. 465-472. doi:10.1017/S1743921308022199, Cambridge Univ. Press.

[その他]

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野 淑識 (TAKANO YOSHINORI)  
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・研究員  
研究者番号: 80399815

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

大河内 直彦 (OHKOUCHI NAOHIKO)  
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・プログラムディレクター

研究者番号：00281832

力石 嘉人 (CHIKARAISHI YOSHITO)  
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・研究員  
研究者番号：50455490