



安定同位体利用技術 生態学指標としての安定同位体:

アミノ酸の窒素同位体分析による新展開

力石嘉人,柏山祐一郎,小川奈々子,大河内直彦

Reprinted from RADIOISOTOPES, Vol.56, No.8 August 2007



総説

安定同位体利用技術

生態学指標としての安定同位体:アミノ酸の窒素同位体分析による新展開

力石嘉人, 柏山祐一郎, 小川奈々子, 大河内直彦

独立行政法人 海洋研究開発機構 地球内部変動研究センター 237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15

Key Words : stable isotope, ecology, food web, trophic level, nitrogen, amino acid

1. はじめに

生物や生物が作り出した有機物に含まれる安 定同位体の天然存在比(D/H,¹³C/¹²C,¹⁵N/¹⁴N, ¹⁸O/¹⁶Oなど)は、生態系の構造やその変遷を 解析する上で非常に優れた指標になる^{1),2)}。例 えば動物の炭素・窒素同位体比は、主に餌の同 位体比を反映し、また食物連鎖に伴って重い同 位体(¹³C・¹⁵N)が濃縮するため、生態系の食 物連鎖網の解析や栄養段階の推定などの食性解 析に用いられる³⁾⁻¹⁵⁾。また植物やそれを餌とす る陸上動物の水素・酸素同位体比は、環境水(雨 水)の同位体比をよく反映するため、乾湿など の気候変動に関連した生態系変遷の解析などに 用いられる¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。また、かつて有機物の安定 同位体比分析はごく一部の科学者だけが扱える 特殊な技術であった。

しかし近年の技術発展,とくに元素分析計/ 安定同位体比質量分析計(EA/IRMS)の発展・ 普及により現在では誰にでも扱える一般的な手 法になった。そのため近年の生態学研究におい て安定同位体比分析は最も主要なアプローチの 一つとして広く認識されるようになり,とくに 生態系の食物連鎖網の解析や栄養段階の推定な どの研究では,ほとんど必須のツールとして用 いられている^{8)-10),19)-27)}。

本稿では,安定窒素同位体比を用いた食物連 鎖網の解析と栄養段階の推定について,これま での全窒素同位体比分析法とその問題点をまと め,また今後これらの研究の中心的手法になる であろう新手法:アミノ酸の窒素同位体比分析 法を紹介する。

安定窒素同位体比の表示(δ¹⁵N値の定義)

安定窒素同位体比は標準試料に対する千分偏 差 (δ¹⁵N 値,単位パーミル:‰)で表される (式(1))。

 δ^{15} N $\acute{\mathbf{m}} = [(R_{ii} / R_{ii}) - 1] \times 1000(\%) (1)$

R は同位体存在比率($^{15}N/^{14}N$)を示し,標準 試料には大気中の窒素ガス($^{15}N/^{14}N$ = 0.0036765) 11 が用いられる。この δ 値表記は, 天然試料中のごくわずかな同位体比の変動を定 性的に理解しやすいコンパクトな値として示す。 例えば、 $^{15}N/^{14}N$ =0.0036802の試料の場合,標 準試料との $^{15}N/^{14}N$ の差は+0.0000037となる が、 δ 値表記では $\delta^{15}N$ =+1.0‰となる。試料

^{* &}quot;Appliciations of Stable Isotopes in Life Sciences". Stable Isotopes as Ecological Proxies : Compound-Specific Nitrogen Isotope Analysis of Amino Acids. Yoshito CHIKARAISHI, Yuichiro KASHIYAMA, Nanako O. OGAWA and Naohiko OHKOUCHI : Institute for Research on Earth Evolution, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, 2-15, Natsushima-cho, Yokosuka-shi, Kanagawa Pref. 237-0061, Japan.

のδ¹⁵N 値が正であれば,大気窒素に比べ¹⁵N に富む(同位体的に重い)ことを示し,負であ れば¹⁴N に富む(同位体的に軽い)ことを示す。

3. 全窒素同位体分析による生態系の構造解析

3・1 全窒素同位体比の測定法

生体試料の全窒素同位体比分析は, 試料中に 含まれるすべての窒素を N₂ ガスに変換し,そ の15N/14Nを同位体比質量分析計で測定するこ とで行われる。1990年代中頃までは、乾燥試 料を石英管に封管・燃焼し、生成した N₂ ガス を真空ラインを用いて手作業で精製し,同位体 比を測定するという手法(封管燃焼法)²⁸⁾が用 いられていたが、現在では元素分析計/同位体 比質量分析計 (EA/IRMS) を用いて、N₂ガス への変換・精製・同位体比測定をオンラインで 行う方法²⁹⁾⁻³²⁾が一般的である。EA/IRMS は 操作も簡単であり、一試料あたり約10~20分 と処理速度も速い。一回の分析に必要な試料量 は、一般に窒素量で約30~50µg(窒素含有 量が 5%の試料であれば, 試料全体で 0.6~ 1.0 mg)であり,測定精度は±0.2%程度である。

3・2 生物の全窒素同位体比と生態系

生態系を構成するすべての生物の全窒素同位 体比は、その生態系の生産者の同位体比に支配 される。例えば、海水中の硝酸イオンを窒素源 として生育した植物プランクトンの全窒素同位 体比は、 $\delta^{15}N$ 値 = +3 ~ +10‰^{33),34)}であるの に対し, 窒素ガスの固定により生育したシアノ バクテリアの全窒素同位体比は、 $\delta^{15}N$ 値=約 0‰³⁵⁾⁻³⁹⁾である。そのため、それらを餌とする 動物プランクトンや魚の全窒素同位体比は、こ の生産者の同位体比の違いを反映する40)。動物 の全窒素同位体比は、その動物が属する生態系 の生産者のものに比べいくらか高い値になる41)。 これは、動物は捕食によって餌から窒素を得る 一方,不要な窒素を尿やアンモニアとして体外 に排出し、その際に体組織に残る窒素は¹⁵Nに 富み,排出される窒素は¹⁴N に富むという同位

体分別が起こるためである。生体反応における 同位体分別の基本概念・仕組みなどは, Hayes (2001)⁴²⁾などを参照していただきたい。この動 物による同位体分別は, 1980年代前半に積極 的に研究され⁴³⁾⁻⁴⁵⁾,

- (1) 餌に対して捕食者の全窒素同位体比は約3.3‰高くなる
- (2) この¹⁵N 濃縮は,植食動物(一次消費者) から高次消費者までのほとんどの生物に共 通する

ということが経験的に求められている。したが って、図1に示すような"植物プランクトン-動物プランクトン-小魚-中魚-大魚"で構成さ れる生態系では、生物の全窒素同位体比は食物 連鎖における栄養段階(Trophic Level: TL) の上昇に伴い、 δ^{15} N 値が段階的に約3.3‰ず つ高くなる。

3・3 栄養段階 (TL) の推定

自然界の生態系における食物網は密に入り組 んでおり,生物間の相互作用は非常に複雑であ る。例えば海洋では,シアノバクテリア・植物 プランクトン・付着藻類・大型の藻類(海藻) などの複数の生産者が混在し,また海藻と動物 プランクトンの両方を捕食するような雑食者も 多い。しかし,食物連鎖に伴い生物の全窒素同 位体比が段階的に約3.3‰ずつ高くなるという 関係を利用することで,生物の全窒素同位体比 から生態系に属する各生物の栄養段階(TL: 式(2))を推定することができ,生態系の食物連 鎖構造を単純化して捉えることができる。

$$TL = (\delta^{15}N_{\pm m} - \delta^{15}N_{\pm \tilde{e} \tilde{e} \tilde{e}})/3.3 + 1$$
(2)

 $\delta^{15}N_{\pm\%}$ は研究対象の生物の全窒素同位体比を, $\delta^{15}N_{\pm \omega \tilde{a}}$ は研究対象の生態系の生産者の全窒素 同位体比を表す。図1を例に挙げれば,植物プ ランクトンの栄養段階は1になり,動物プラン クトンは2,小魚は3,大魚は4になる。また, 動物プランクトンと小魚の両方を捕食する中魚 は、3~4の中間的な値になる。



全窒素同位体比 (δ¹⁵N, ‰)

6

図2 バイカル湖沖帯生物の栄養段階と全窒素同位体比

Δ

実際の研究例として,バイカル湖沖帯の生物 群の全窒素同位体比を図2に示す。Yoshii et al. (1999)⁷によると,バイカル湖沖帯生態系では, 栄養段階と全窒素同位体比の間に式(3)の関係 が成り立つ。

$$TL = (\delta^{15} N_{\pm \%} - 3.8) / 3.3 + 1$$
 (3)

すなわち全窒素同位体比分析からこの生態系は, 栄養段階がおよそ1の植物プランクトン,2の 動物プランクトン,3のオームル(サケ科の 魚),3~4のカジカ類,4のアザラシという食 物連鎖構造であると推定される。 と栄養段階の推定などの生態学研究に非常に有 用な情報をもたらす。これまでに多くの研究が 行われ,多くの論文³⁾⁻¹⁵⁾が発表されていること からも,本手法の有用性は疑いようがない。し かし一方で,以下に示す問題点があることもよ く知られている。

12

14

10

8

 (1) 食物連鎖に伴う 3.3‰の δ¹⁵N 値の上昇は, 経験的な平均値である。

栄養段階の上昇に伴う δ^{15N} 値の上昇を本稿 では3.3‰と記したが、この値はいくつかの生 物をもとに得られた経験的な平均値であり、3.3 ‰という値がどの程度一般的であるか、また正 確にはいくつであるか、誤差はどの程度である のかなどが常に議論の争点になる。実際、 DeNiro & Epstein (1981)⁴³はこの値を、-0.5

^{3・4} 全窒素同位体分析の問題点 生物の全窒素同位体比は,食物連鎖網の解析

~ +9.2‰の幅を持ち平均で+3.0±2.6‰と報 告している。また, Minagawa & Wada (1984)⁴⁵⁾ は、+1.3~+5.3‰の幅を持ち平均で+3.4± 1.1‰と報告している。更に、単一の個体にお いても分析部位・組織が異なると同位体比が異 なるという報告46)-48)や、窒素の利用効率が異 なると¹⁵Nの濃縮率が異なるという報告⁴⁹⁾もあ る。このように食物連鎖に伴う δ¹⁵N 値の上昇 は全ての生物で必ずしも同一であるとは理解さ れておらず^{25),50),51)},また捕食に伴う¹⁵Nの濃縮 のメカニズムも未解明である。

(2) 生産者の妥当な δ¹⁵N 値を得ることが難し 6.1

全窒素同位体比分析法による栄養段階の推定 では,研究の対象となる生物の他に,研究対象 の生態系における生産者の全窒素同位体比を得 なければならない。しかし生産者の窒素同位体 比は、地域や季節の変化などの生育環境の影響 を受け易く、すぐに変動してしまう。とくに海 洋・湖沼における代表的な生産者である植物プ ランクトンの窒素同位体比は,異なる窒素源(硝 酸体窒素・アンモニア・窒素ガス)の利用率の 変化や、ライフサイクルが早い(寿命が短い) ことなどにより、時間的・空間的に非常に大き な変動幅を示す52)-55)。例えば、バルト海の植 物プランクトンのδ¹⁵N 値の季節変動は0~ +7‰にもなり54)、同様の変動は日本の木崎湖 などでも観察されている52)(図3)。一方で消費 者は寿命が長く,餌の変動を体内で平均化する ため,結果として体組織の同位体比は,長寿命 の消費者・高次の消費者ほど利用した餌の積分 値を反映する。そのため、研究対象の生態系に おいて、時間的・空間的にある一点で、生産者 ・植食動物・高次消費者を採集しても、その窒 素同位体比は食物連鎖関係を示さないことが多 い⁵⁶⁾。この問題を解決するために、動物プラン クトンや貝類などの植食動物を TL=2として 用いる研究^{20), 21), 23), 57) - 60)}や、表層堆積物のδ¹⁵N れているが、動物プランクトンのδ¹⁵N 値変動 (a) バルト海



図3 植物プランクトン・動物プランクトンの全窒 素同位体比の季節変動, (a)バルト海, (b)木 崎湖

月

85年

5678910

86年

も無視できる程小さくはなく $5^{2}-5^{4},6^{2},6^{3}$ (図 3), また表層堆積物のδ¹⁵N値を一次生産者の代表 値と見なすことには、沈降・埋没過程での同位 体比変動の支配要因^{64),65)}がほとんど未解明であ るという大きな問題がある。このように天然の 生態系において、一次生産者の妥当な δ¹⁵N 値 を得ることは非常に難しく、この問題を解決す るには時間的・空間的にできるだけ多数の試料 を採取・分析し、できるだけ妥当な代表値(平 均値)を得ることを心がけるしかない。

4. アミノ酸の窒素同位体比分析による生態 系の構造解析

4·1 概要

生体アミノ酸の窒素同位体比分析は,1960 年代後半から 1990 年代前半にかけていくつか の研究66)-70)で行われ、生態系解析ツールとし

ての有用性が古くから注目されてきた⁷¹⁾。しか し当時の分析法は,個々のアミノ酸を高速液体 クロマトグラフィやイオン交換クロマトグラフィ などを用いて手作業で分取・単離・精製し, その同位体比を一つずつ封管燃焼法で測定する という手法であり,わずかな試料の分析にも非 常に多くの時間と労力を費やさねばならなかっ た。しかし近年、ガスクロマトグラフ/燃焼/質 量分析計 (GC/C/IRMS) が開発され⁷²⁾, 生体 に含まれる個々のアミノ酸の窒素同位体比分析 が上記の煩雑な操作なしに簡単に行えるように なった^{73),74)}。そのため、様々な研究でアミノ酸 の窒素同位体比が積極的に測定されるようにな り⁷⁵⁾⁻⁸⁴⁾,研究の進展と共に,アミノ酸の窒素 同位体比分析の生態系解析ツールとしての重要 性・有用性が再認識されるようになっ た^{79),80),84)}。例えば、一つの生体に含まれるア ミノ酸には、食物連鎖に伴い7~8‰の非常に 強い¹⁵N 濃縮を示すアミノ酸(グルタミン酸な ど) とほとんど¹⁵N 濃縮を示さないアミノ酸 (フ エニルアラニンなど)が存在する。すなわち、 これらの2種類のアミノ酸の窒素同位体比を比 較することで、動物試料のみからその動物の生 態系における栄養段階を知ることができる^{79),84)} (4・4 章を参照)。これは、生産者の妥当な δ¹⁵N 値を得ることが難しいという全窒素同位体比分 析の問題点を根本的に解決する。このようにア ミノ酸の窒素同位体比分析法は、全窒素同位体 比分析法に替わる新しい手法として, 今後の幅 広い利用が期待されている。

生体アミノ酸の窒素同位体比研究は始まった

ばかりであり、そのデータはまだ限定的である。 本稿ではいくつかの先駆的研究^{70),80),84)}を基に、 生産者の同位体比分布(4·3·1章)・捕食に伴 う同位体比の変化(4·3·2章)・アミノ酸の窒 素同位体比分析の有用性(4·4章)を紹介する が、本稿で取り扱うデータはまだ完全でないこ とを予め了承いただきたい。

4・2 アミノ酸の窒素同位体比の測定法

アミノ酸の窒素同位体比分析は,生体試料からの抽出,揮発性物質への誘導体化,GC/C/ IRMSによる同位体比測定という手順で行われる。抽出には塩酸加水分解が用いられ,生体蛋 白質のアミノ酸への分解と抽出が同時に行われる。アミノ酸に揮発性を持たせるための誘導体 化には,トリフルオロアシル/イソプロピルエ ステル化(TFA/iPr)^{77),85)},ペンタフルオロア シル/イソプロピルエステル化(PFA/iPr)⁸³⁾, *N*-ピバロイル/イソプロピルエステル化(NP/ iPr)⁷⁴⁾などが用いられる。しかし,フッ素含有 化合物は,燃焼で生じる副生成物がキャピラリ ーカラムなどを浸食するという問題があるため, NP/iPrを用いる研究が多い^{75),76),78)-82),84)。}

GC/C/IRMSの装置の概略を図4に,得られ る代表的なクロマトグラムを図5に示す。装置 についての詳細は数編の論文・総説がすでに発 表されているのでそちらを参照していただきた い^{72),86)-88)}。アミノ酸の誘導体化物(各種アミ ノ酸の混合物)は,ジクロロメタンや酢酸エチ ルなどの溶液としてGCに導入される。個々の アミノ酸はキャリヤガスとしてヘリウムを用い



図4 ガスクロマトグラフ/燃焼/同位体比質量分析計(GC/C/IRMS)の概略図

RADIOISOTOPES



図5 代表的な m/z 28 クロマトグラム:褐藻(シダモク)のアミノ酸(NP/iPr 誘導体)

た GC のキャピラリーカラムによって分離され、 GC オーブン内でカラムと直結したセラミック 製マイクロボリューム燃焼炉(内径:0.5mm, 長さ:32 cm,酸化剤:酸化銅・酸化ニッケル 線, 触媒:プラチナ線, 温度:950~1050℃) 及び還元炉(内径:0.5mm,長さ:32cm, 還元剤:還元銅線,温度:550~650°)に連 続的に導入される。導入されたアミノ酸はそれ ぞれ. 燃焼炉で二酸化炭素 (CO₂)・窒素酸化 物 (NO_x)・水 (H₂O) に酸化分解され, 更に 窒素酸化物が還元炉で窒素ガス(N₂)に還元 される。水と二酸化炭素を透水フィルタと液体 窒素トラップで除去した後、窒素ガスはキャリ ヤガスと共に IRMS に導入され、イオン化の 後,m/z 28 (¹⁴N₂⁺) と 29 (¹⁴N¹⁵N⁺) の強度が 測定される。実際の測定⁸⁴⁾では、図5に示すよ うなクロマトグラムが得られ、個々のアミノ酸 の窒素同位体比が測定される。1 試料あたりの 測定時間は約40~60分であり、必要な試料量 は一般的にアミノ酸一分子あたり窒素量で約 30 ng (窒素含有量が 5%の試料であれば、試 料全体で 200~500 µg 程度), 測定精度は±0.5 ‰程度である。

同位体比を測定するためには,個々のアミノ 酸を必ずベースライン上で分離しなければなら ない(図5では,アスパラギン酸とトレオニン のピークが重なっており、このような場合は、 アスパラギン酸とトレオニンの同位体比を得る ことはできない)。GCのカラムは、一般に無 極性もしくは微極性の無窒素キャピラリーカラ ムが用いられ^{74),75),78)-81),84)}、アミノ酸の光学異 性体 (D/L-体) は一つのピークとして検出さ れる (図5)。光学異性体を分離するキラル分 離カラムや優れた分離能が期待できる極性カラ ムを用いた研究例もあるが^{83),85)}、これらのカラ ムには固定層に窒素が含まれているものが多く、 カラム内での同位体交換の可能性が否定できな い。含窒素カラムをアミノ酸の窒素同位体比分 析に用いる場合は、測定対象のすべてのアミノ 酸に対して、同位体比既知の標準試薬を用いて 測定で得られる同位体比を較正する必要がある。

4・3 生体アミノ酸の窒素同位体比

4・3・1 生産者の同位体比分布

シアノバクテリア・植物プランクトン・陸上 植物などの生産者は,硝酸イオンや窒素ガスな どの無機窒素を窒素源として,生体に必要な全 てのアミノ酸を自ら合成している。そのため生 産者のアミノ酸は,生体の全窒素同位体比(生 産者が取り込んだ全窒素の積分値),及び個々 のアミノ酸の合成反応^{89,90}における同位体分別 (どちらか一方の同位体の優先的利用)を反映



図6 生産者のアミノ酸の窒素同位体比分布(a)水生植物⁸⁴,(b)陸上植物(力石ら未発表)

し、アミノ酸の種類ごとに特異的な同位体比を 持つ。実際、シアノバクテリア・植物プランク トン・海藻などの水生植物のアミノ酸は、全窒 素の同位体比に対して-3~+8‰の変化を示 し、その大きさはアミノ酸の種類により様々で ある^{79),84)} (図 6 a)。例えば、バリン・イソロイ シン・プロリン・グルタミン酸の窒素同位体比 は、全窒素同位体比に比べ0~3‰程度高く、 一方でセリン・メチオニン・フェニルアラニン の窒素同位体比は、全窒素同位体比に比べ、そ れぞれ6~8‰・2~5‰・1~3‰程度低い。 また、このアミノ酸の窒素同位体比と全窒素同 位体比の関係は、生物の種類が異なっていても 水生植物であれば海水・淡水を問わずほぼ普遍 的であり⁸⁴⁾, 硝酸イオンを窒素源として用いた 場合でも窒素ガスを用いた場合でも明確な差は 観察されない⁸⁰⁾。

しかし、この関係は陸上植物では成り立たな いようである(図6b)。陸上植物のアミノ酸 の窒素同位体比は、種内・種間を問わず非常に 多様な分布を示す。例えば、C3植物(被子) のイソロイシンや、C4植物のセリン・メチオ ニンの窒素同位体比は、同じ光合成グループ内 であっても、全窒素同位体比に比べて高い値を 持つものから低い値を持つものまで、全体とし て10%以上の大きなバリエーションを示す。 またフェニルアラニンの窒素同位体比は、同じ C3植物の被子植物と裸子植物の間でさえ、5 %以上の明らかな差を示す。この陸上植物の多 様な窒素同位体比分布は、水生植物と陸上植物 の間の窒素利用効率の相違などによると考えら れるが、詳しい原因はわかっていない。

4・3・2 捕食に伴う同位体比の変化

動物には動物自身で合成することができる可 欠アミノ酸(非必須アミノ酸)と,餌から摂取 しなければならない不可欠アミノ酸(必須アミ ノ酸)がある。しかし一般的な自然環境で生育 する動物は,ほぼ全てのアミノ酸を餌の摂取に より獲得することができ,摂取したアミノ酸の 大部分を代謝(分解)してエネルギーを得ると 共に,残りの一部を用いて体組織を構成する蛋 白質を合成している⁹¹⁾。そのため,動物体組織 のアミノ酸の窒素同位体比は,主に餌のアミノ 酸の窒素同位体比,及びアミノ酸代謝における 同位体分別の有無を反映する⁸⁴⁾。アミノ酸の代 謝における同位体分別のしくみは以下の通りで RADIOISOTOPES

ある。

- (1) メチオニン・フェニルアラ ニン以外のほとんどのアミ ノ酸は,代謝の初期反応が アミノ基の脱離反応である ため(図7a),代謝される アミノ酸と代謝されずに残 るアミノ酸(体組織になる アミノ酸)の間で同位体分 別が起こる。一般的には, 代謝により脱離するアミノ 基は¹⁴Nに富み,その結果, 残ったアミノ酸は¹⁵Nに富 む。またこの同位体分別の 大きさは,アミノ酸の種類 により特異的である⁹²。
- (2) メチオニン・フェニルアラ 図7 アミニンなどのアミノ酸は,代
 (b) 謝反応の初期反応にアミノ基(窒素)が関わらないため(図7b,c),代謝されるアミノ酸と代謝されずに残るアミノ酸の間で同位体分別は起こらない。そのためメチオニン・フェニルアラニンなどの窒素同位体比は,代謝の影響を受けず,餌の窒素同位体比を保存する。

実際,藻類とそれを捕食した植食動物のアミノ 酸の同位体比の差(Δ¹⁵N_{植食動物-※類})は、図8の 関係を持つ⁸⁴⁾。例えば、動物のバリン・イソロ イシン・プロリン・グルタミン酸は、餌のアミ ノ酸の窒素同位体比よりもそれぞれ、3~6‰ ・4~5‰・3~6‰・6~8‰程度高い値を示 し、一方で動物のメチオニン・フェニルアラニ ンの窒素同位体比は、餌の窒素同位体比とほと んど変わらない。

4・4 アミノ酸の窒素同位体比分析の有用性
 4・4・1 新指標:アミノ酸栄養段階(アミノ酸TL)の提供

アミノ酸の窒素同位体比分析は、全窒素同位



図7 アミノ酸代謝の初期反応, (a) グルタミン酸などのアミノ酸, (b) メチオニン, (c) フェニルアラニン



体比分析では決して得ることができない新しい 情報を提供する。例えば、アミノ酸代謝に伴う ¹⁵Nの濃縮は、全窒素同位体比のδ¹⁵N上昇(~ 3.3‰)の主要因と考えられ、そのメカニズム の解明に重要な情報を提供する⁷⁹⁾。また、動物

(42)

のメチオニン・フェニルアラニンなどの窒素同 位体比は、代謝の影響を受けず生産者の窒素同 位体比をそのまま保存しているため、その動物 が属する生態系の生産者の全窒素同位体比を復 元することができる⁸⁰⁾。しかし、生態系研究に おけるアミノ酸の窒素同位体比分析の最も重要 な有用性は、生物の栄養段階を推定する新指 標:アミノ酸栄養段階(アミノ酸TL:式(4)) を提供することであろう^{70),80),84)}。

$$\mathcal{T} \stackrel{\scriptstyle{\xi}}{\scriptstyle{\int}} \stackrel{\scriptstyle{\text{R}}}{\scriptstyle{\text{R}}} \text{TL} = \begin{bmatrix} \delta^{15} N_{\mathfrak{M}\mathfrak{M}^{AA1}} - (\delta^{15} N_{\mathfrak{M}\mathfrak{M}^{AA2}} + a) \end{bmatrix} / b + 1 \qquad (4)$$

$$a = \delta^{15} N_{\pm \hat{a} \hat{a}^{AA1}} - \delta^{15} N_{\pm \hat{a} \hat{a}^{AA2}}$$

$$b = \delta^{15} N_{\hat{m} \hat{a} \hat{a}^{AA1}} - \delta^{15} N_{\mathfrak{M}^{AA1}}$$

 $\delta^{15}N_{вирисс}$ は代謝により ^{15}N の濃縮が起こるアミノ酸(グルタミン酸など)の窒素同位体比を、 $\delta^{15}N_{вирис}$ は代謝の影響を受けず ^{15}N の濃縮が 起こらないアミノ酸(フェニルアラニンなど) の窒素同位体比を表し、aは生産者における両 者の差を、bは一段階の捕食に伴う ^{15}N の濃縮 を示す。

3章で述べたように、全窒素同位体比分析に よる栄養段階の推定(式(2))では、捕食に伴う 全窒素同位体比の上昇を+3.3%としている。 しかしこの値は経験的な平均値であり、¹⁵N 濃 縮メカニズムの科学的根拠も乏しい。一方、ア ミノ酸 TL は、動物のアミノ酸代謝の生化学反 応における同位体分別を利用した指標であり, 科学的根拠が明らかである。また,動物のメチ オニン・フェニルアラニンなどの窒素同位体比 は,その動物が実際に利用した生産者の積分値 (高次消費者では,彼らの餌である低次消費者 が利用した全ての生産者の積分値)と等しい。 したがって,アミノ酸の窒素同位体比を用いる ことで,生態系における生物の栄養段階を正確 に推定することができ,生態系における食物連 鎖網の構造を正確に捉えることができる。

4・4・2 海洋・湖沼生態系の解析

アミノ酸の窒素同位体比分析は、海洋・湖沼 の生態系解析において、とくに有用である。海 洋・湖沼生態系の生産者である水生植物のアミ ノ酸の窒素同位体比分布は、生物の種類を問わ ずほぼ普遍的であり(図 6 a)、式(4)の a はア ミノ酸ごとに特定の値になる(表 1)。また、 研究例が少なくまだ十分なデータであるとは言 い難いが、一段階の捕食に伴う¹⁵N 濃縮(式(4) の b)もいくつかの先行研究^{79),84)}から見積もる ことができる(表 2)。したがって、例えば $\delta^{15}N_{вммАAI}$ にグルタミン酸を、 $\delta^{15}N_{вммAA2}$ にフェ ニルアラニンを用いた場合、式(4)は式(5)で表 される。

表1 水生植物 (N=7) におけるアミノ酸の窒素同位体比の差 (式4のa)

	$δ^{15}$ N _{アミノ酸} - $δ^{15}$ N _{メチオニン} (‰)	$ δ15N_{\mathcal{T} \in \mathcal{J}} \otimes - δ15N_{\mathcal{T} \perp \perp \mathcal{I}} = δ^{(m)}) $
アラニン	+3.7 ± 2.4	+2.6 ± 1.9
グリシン	-0.2 ± 2.5	-1.3 ± 2.9
バリン	+5.0 ± 1.4	+4.0 ± 1.5
ロイシン	+3.2 ± 1.2	+2.2 ± 1.8
イソロイシン	$+4.0 \pm 0.7$	$+2.7 \pm 0.9$
プロリン	$+3.9 \pm 1.4$	+2.9 ± 1.3
セリン	-4.3 ± 1.3	-5.2 ± 1.6
メチオニン	-	-1.5 ± 0.8
グルタミン酸	+4.6 ± 1.8	+3.4 ± 1.3
フェニルアラニン	+1.5 ± 0.8	-

(43)

表2 植食動物 (N=5) におけるアミノ酸の ¹⁵N 濃縮(式4のb)

	δ15 N捕食者 - δ15 N餌 (‰)
アラニン	+6.2 ± 1.9
グリシン	+3.2 ± 2.3
バリン	+4.7 ± 1.8
ロイシン	$+4.5 \pm 2.6$
イソロイシン	+4.7 ± 2.2
プロリン	+5.5 ± 1.7
セリン	$+3.2 \pm 3.5$
グルタミン酸	+7.6 ± 1.4

P	ミノ酸 TLグルタミン酸-フェニルアラニン
=	$\left[\boldsymbol{\delta}^{\scriptscriptstyle 15} N_{\mathfrak{M} \mathfrak{M} \mathcal{I} \mathcal{V} \mathcal{I} \mathcal{I} \mathfrak{I} \mathfrak{I}} - \left(\boldsymbol{\delta}^{\scriptscriptstyle 15} N_{\mathfrak{M} \mathfrak{M} \mathcal{I} \mathcal{I} \mathfrak{I} \mathcal{I} \mathcal{I}} + 3.4\right)\right]$

(5)/7.6+1

これは、動物の栄養段階が動物の二つのアミノ 酸の窒素同位体比から計算できることを意味し, 言い換えれば、栄養段階の推定に生産者の試料 を必要としないことを意味する。すなわち、海 洋・湖沼生態系の解析では、アミノ酸の窒素同 位体比を分析することで, 生物の栄養段階を正 確に推定できるだけでなく、生産者の妥当な窒 素同位体比を得なければならないという全窒素 同位体比分析法の問題点(4・3章)を根本的に 解決できる。

実際の研究例として,バイカル湖沖帯の動物 プランクトンについて,式(5)(アミノ酸の窒素 同位体比)を用いて計算されたアミノ酸 TL, 及び式(3)(全窒素同位体比)を用いて計算され た従来の TL を図9に示す。これらの動物プラ ンクトンは、植物プランクトン食のため理論的 な栄養段階は2.0のはずである。しかし全窒素 同位体比分析からはTL=1.6~2.4と推定さ れ, ±0.4の誤差を持つ。一方で, グルタミン 酸とフェニルアラニンの窒素同位体比から計算 されたアミノ酸 TL は, 1.9~2.1を示し, 全 窒素同位体比分析よりも妥当な値を示す。

このように、海洋・湖沼の生態系解析では、 アミノ酸の窒素同位体比を用いることで、生態 系の生産者を採取・分析する必要なしに、生物 の栄養段階を正確に推定することができる。

4・5 今後の課題と展望

4・5・1 データの拡充による研究の発展

生体アミノ酸の窒素同位体比研究は始まった ばかりであり、そのデータはまだ限定的である。 今後多くの試料を分析し, 生産者の窒素同位体 比分布や捕食に伴う同位体比変化のデータを増 やすことができれば、表 1,2の値の正確さを 高めることができ、より精度の高い栄養段階推 定が可能になるであろう。



図9 バイカル湖沖帯の動物プランクトンの栄養段階,(a)アミノ酸TL,(b)全窒素 同位体比より計算された TL(小川ら,未発表)

(a) アミノ酸

水生植物とは異なり,陸上植物のアミノ酸の 窒素同位体比分布は,種内・種間を問わず多様 である(図6b)。これは,水生植物の表1に 対応する値が,陸上植物では普遍的な値として 得られないことを意味する。そのため,被食者 と捕食者が明確に特定できる場合を除き,陸上 生態系におけるアミノ酸TLの計算は簡単では ない。今後,アミノ酸TLを陸上生態系で用い るためには,陸上植物のアミノ酸の窒素同位体 比分布に多様性をもたらす支配要因を解明する 必要がある。

また植物同様,多くのバクテリアがアミノ酸 を自ら合成することができる。彼らの持つアミ ノ酸の窒素同位体比分布を知ることができれば, 生態系へのバクテリアの寄与率を見積もること ができるであろう。

4・5・2 TLの計算に用いるアミノ酸の検討・アミノ酸間の比較

式(5)では、グルタミン酸とフェニルアラニ ンの窒素同位体比を用いたアミノ酸 TL の計算 式を示したが、今後どのアミノ酸の組み合わせ が最も適切であるのかの検討が必要であろう。 現在までに得られている捕食に伴う¹⁵N 濃縮の データ(表 2)では、グルタミン酸が最も強い¹⁵N 濃縮(+7.6‰)を示し、その変動幅も1σで ±1.4‰と小さい。この強い¹⁵N 濃縮と小さい 変動幅は、アミノ酸 TL を計算する上で得られ る結果の誤差を少なくする効果を持つ。しかし, グルタミン酸はほとんどの動物が自ら合成する ことのできる可欠アミノ酸であり,動物体組織 から得られるグルタミン酸には、動物自身が合 成したグルタミン酸が含まれている可能性があ る。そのため、不可欠アミノ酸であるバリン(15N 濃縮:+4.7±1.8‰)やイソロイシン(¹⁵N濃 縮:+4.7±2.2‰)を用いたほうがより正確な アミノ酸 TL を得られるのかもしれない。

また,複数のアミノ酸の窒素同位体比を比較 することで,追加的な生態系情報が得られる可 能性もある。例えば,メチオニンとフェニルア ラニンの窒素同位体比は代謝の影響を受けない (4・3・2 章)。そのため、水生植物のみを生産者 とする生態系では、その生態系に属する全ての 生物で、両者の窒素同位体比の差は水生植物の それと等しくなるはずである(表1:メチオニ ンの窒素同位体比はフェニルアラニンに比べ 0.7~2.3‰程度小さい)。すなわち、研究対象 の生物でこの関係が変化する場合には、その生 態系への陸上生物やバクテリアの寄与が考えら れ、変化の程度はその寄与率を反映する可能性 がある。

4・5・3 ホルマリン試料の分析

図10に示すように、長期間のホルマリン固 定を受けた試料でも、アミノ酸の窒素同位体比 はほとんど変化しない。これは、過去の研究で 採取された試料や、博物館に保管されている試 料からでもアミノ酸TLが得られることを意味 する。無論、陸上生態系の生物については、植 物の窒素同位体比分布に多様性をもたらす支配 要因をまず解明する必要があるが、少なくとも 海洋生態系の生物については、数百 µg 程度の 試料があれば、アミノ酸TLを分析することが できる。すなわち過去に採取された生物などに ついても、ホルマリン固定試料が保管されてい れば生態系解析が十分に行えるであろう。

4・5・4 殻体蛋白質の分析

軟体動物の殻体(炭酸カルシウム)や脊椎動 物の骨・歯(リン酸カルシウム)などの動物が



図 10 アミノ酸の窒素同位体比へのホルマリン固定 の影響(試料:琵琶湖オイカワ,1995 年採 取)(小川ら,未発表)

(45)





作り出す無機質硬組織には,鋳型や基質として 多くの蛋白質が含まれており,それらは形成時 の生体情報を記録している。例えば,オウムガ イの殻体中に含まれる有機物の全窒素同位体比 は,孵化前,孵化後の栄養移行期,成長期,水 槽での飼育という生活史に対応した変化を示す (図 11)。したがって,これらのアミノ酸の窒 素同位体比を分析すれば,殻体や骨からその生 物の生活史における栄養段階の推移や生産者の 窒素同位体比の変化を観察することができるで あろう。また,これらの蛋白質は無機質の結晶 中に取り込まれているため分解や変質を受けに くく,動物の軟体組織に比べはるかに長期間保 存される。実際に,白亜紀などの化石試料から も断片化した殻体蛋白質が検出されている^{93),94)}。 そのため,アミノ酸の窒素同位体比分析を用い れば,考古学試料や化石試料からも栄養段階や 食物連鎖に関わる古生態系情報を抽出できる可 能性がある。

4・6 アミノ酸の窒素同位体比分析法の産業 応用-本マグロの天然・養殖判別

アミノ酸の窒素同位体比分析法は,前処理法 (アミノ酸の抽出・誘導体化・精製)が簡易で あり,GC/C/IRMSでの窒素同位体比測定も, これまでEA/IRMSを用いて全窒素同位体比 を測定してきた研究者・研究機関にとっては難 しい技術ではない。そのため,本法は学術分野 だけでなく産業分野での利用も比較的容易であ



図12 人然・霍油やマクロのアマク酸 TL (ガイロラ、木光衣)、クレクーンは TL-3.0 ~ 3.、 GP:アミノ酸 TL_{グルタミン酸フェニルアラニン}、 PP:アミノ酸 TL_{ブロリン・フェニルアラニン}、 GM:アミノ酸 TL_{ブロリン・フェニルアラニン}、 PM:アミノ酸 TL_{ブロリン・チャニン}、 ろう。本稿の最後に、アミノ酸の窒素同位体比 分析法の産業分野への応用例として、本マグロ (クロマグロ)の天然・養殖判定の可能性を紹 介する。

この数年,世界におけるマグロ需要の増加と 資源保護のための漁獲規制の強化により、マグ ロの値段は上昇し、とくに天然の本マグロは一 層高値になっている。天然の本マグロは、主に オキアミ(動物プランクトン)やイカなどを餌 としているのに対し、養殖の本マグロでは、サ バ・イワシなどの栄養段階のより高い生物が餌 に使われることが多い(餌の成分が全て公開さ れていないため,詳細はわからない)。そのた め、両者の栄養段階は異なることが予想され、 それを測定することができれば天然・養殖の判 別が行えそうである。実際、大西洋・地中海産 の天然本マグロのアミノ酸 TL は、養殖のもの に比べ有意に低い値を示す(図12)。このよう に、アミノ酸 TL は、本マグロの天然と養殖を 判別する簡易な科学的分析法として利用できる 可能性が非常に高い。

謝 辞

本稿執筆の契機を与えられた昭光通商株式会 社村岡研一氏に深く感謝いたします。本稿の内 容は,日本学術振興会特別研究員奨励費及び CRESTにより実施した研究成果の一部を取り 纏めたものである。

文 献

- Fry, B., Stable Isotope Ecology, Springer, New York (2006)
- West, J. B., Browen, G. J., Cerling, T. E. and Ehleringer, J. R., *TRENDS Ecol. Evol.*, 21, 408-414 (2006)
- Wada, E., Terazaki, M., Kabaya, Y. and Nemoto, T., Deep-Sea Res., 34, 829-841 (1987)
- Hobson, K. A. and Welch, H. E., Mar. Ecol. Prog. Ser., 84, 9-18 (1992)
- Wada, E. and Yoshioka, T., Geochem. Int., 32, 121-140 (1995)

- Keough, J. R., Sierszen, M. E. and Hagley, C. A., Limnol. Oceanogra., 41, 136-146 (1996)
- Yoshii, K., Melnik, N. G., Timoskin, O. A., Bondarenko, N. A., Pavel, N. A., Yoshioka, T. and Wada, E., *Limnol. Oceanogr.*, 44, 502-511 (1999)
- Halaj, J., Peck, R. W. and Niwa, C. G., *Pedobiologia*, 49, 109-118 (2005)
- Grall, J., Le Loc'h, F., Guyonnet, B. and Riera, P., J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 38, 1-15 (2006)
- Søreide, J. E., Hop, H., Carroll, M. L., Falk-Petersen, S. and Hegseth, E. N., *Prog. Oceanogra.*, 71, 59-87 (2006)
- 11) 小川奈々子,木庭啓介,高津文人,和田英太郎, RADIOISOTOPES,46,632-644(1997)
- 12) 和田英太郎, 地球化学, 31, 17-25(1997)
- 13)和田英太郎,西川絢子,高津文人, *RADIOISO-TOPES*, **50**, 158-168 (2001)
- 14)和田英太郎,小川奈々子,宮坂 仁,地球環境, 7,77-85(2002)
- 15)和田英太郎,宮坂 仁,小川奈々子,月刊海洋, 38,441-452 (2006)
- Miller, R. F., Fritz, P. and Morgan, A. V., Palaeoceanogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol., 66, 277-288 (1998)
- 17) Cormie, A. B., Luz, B. and Schwarcz, H. P., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **58**, 3439-3449 (1994)
- 18) Gröcke, D. R., Schimmelman, A., Elisa, S., Miller,
 R. F., *Qua. Sci. Rev.*, 25, 1850-1864 (2006)
- 19) Iken, K., Brey, T., Wand, U., Voigt, J. and Junghans, P., Prog. Oceanogr., 50, 383-405 (2001)
- 20) Hobson, K. A., Fisk, A., Karnovsky, N., Holst, M., Gagnon, J.-M. and Fortier, M., *Deep-Sea Res.*, 49, 5131-5150 (2002)
- 21) Post, D. M., Ecology, 83, 703-718 (2002)
- 22) Perisc, A., Roshe, H. and Ramade, F., *Estuar. Cost. Shelf Eci.*, **60**, 261-272 (2004)
- 23) Doi, H., Matsumasa, M., Toya, T., Satoh, N., Mizota, C., Maki, Y. and Kikuchi, E., *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, **64**, 316-322 (2005)
- 24) Scherwood, G. D. and Rose, G. A., *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, **63**, 537-549 (2005)
- 25) Schweizer, M. K., Wooller, M. J., Toporski, J., Fogel, M. L. and Steele, A., *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, 230, 335-351 (2006)
- 26) Yi, X., Yang, Y. and Zhang, X., Ecol. Model., 193,

801-808 (2006)

- 27) Vizzini, S. and Mazzola, A., Estuar. Coast. Mar. Sci., 66, 459-467 (2006)
- 28) Minagawa, M., Winter, D. A. and Kaplan, I. R., Anal. Chem., 56, 1859-1861 (1984)
- 29) Fry, B., Brans, W., Mersch, F. J., Tholke, K. and Garritt, R., Anal. Chem., 64, 288-291 (1992)
- 30) Wong, W. W., Clarke, L. L., Johnson, G. A., Llaurador, M. and Klein, P. D., *Anal. Chem.*, 64, 354-358 (1992)
- Brand, W. A., Adv. Mass. Spectrum., 14, 655-679 (1998)
- 32) 濱 健夫,濱 順子, *RADIOISOTOPES*, 45, 40-48 (1996)
- 33) Altabet, M. A. and Francois, R., *Glob. Biogeochem.* Cyc., 8, 20-116 (1994)
- 34) Voss, M., Dippner, J. W. and Montoya, J. P., Deep-Sea Res., 48,1905-1921 (2001)
- 35) Minagawa, M. and Wada, E., Mar. Chem., 19, 245-259 (1986)
- 36) Liu, K.-K., Su, M.-J., Hsueh, C.-R. and Gong, G.-C., Mar. Chem., 54, 273-292 (1996)
- 37) Karl, D., Letelier, R., Tupas, L., Dore, J., Chistian, J. and Hebel, D., *Nature*, 388, 533-538 (1997)
- 38) Karl, D., Michaels, A., Bergman, B., Capone, D., Carpenter, E., Letelier, R., Lipschultz, F., Paerl, H., Sigman, D. and Stal, L., *Biochemistry*, 57/58, 47-98 (2002)
- 39) Mino, Y., Saino, T., Suzuki, K. and Marañón, E., Glob. Biogeochem. Cyc., 16, 1059, doi:10.1029/ 2001GB001635 (2002)
- Wada, E. and Hattori, A., Geochim. Cosmochim. Acta, 40, 249-251 (1976)
- 41) Miyake, Y. and Wada, E., Rec. Oceanogr. Works Japan, 9, 37-53 (1967)
- 42) Hayes, J. M., Rev. Mineral. Geochem., 43, 225-277 (2001)
- DeNiro, M. J. and Epstein, S., *Geochim. Cosmochim.* Acta, 45, 341-351 (1981)
- 44) Macko, S. A., Lee, W. Y. and Parker, P., J. Exp. Mar. Bio. Eco., 63, 145-149 (1982)
- 45) Minagawa, M. and Wada, E., *Geochim. Cosmochim.* Acta, 48, 115-1140 (1984)
- 46) Hobson, K. A. and Clark, R. G., Condor, 94, 189-197 (1992)

- 47) Gannes, L. Z., O'Brien, D. M. and Martínez del Rio, C., *Ecology*, 78, 1271-1276 (1997)
- 48) Hobson, K. A., Alisauskas, R. T. and Clark, R. G., Condor, 95, 388-394 (1993)
- Adams, T. S. and Strner, R. W., *Limnol. Oceanogr.*, 45, 601-607 (2000)
- 50) Vander Zanden, M. J. and Rasmussen, J. B., *Lim*nol. Oceanogr., 46, 2061-2066 (2001)
- Vanderklift, M. A. and Ponsard, S., *Oecologia*, 136, 169-182 (2003)
- 52) Yoshioka, T., Hayashi, H. and Wada, E., Jpn. J. Limnol., 50, 313-320 (1989)
- Yoshioka, T., Wada, E. and Hayashi, H., *Ecology*, 75, 835-846 (1994)
- 54) Roff, C., Mar. Ecol. Prog. Ser., 203, 47-65 (2000)
- 55) Dore, J. E., Brum, J. R., Tupas, L. M. and Karl, D. M., *Limnol. Oceanogr.*, 47, 1595-1607 (2002)
- O'Reilly, C. M. and Hecky, R. E., *Limnol. Oceanogr.*, 47, 306-309 (2002)
- 57) Fry, B., Limnol. Oceanogr., 35, 1182-1190 (1988)
- 58) Cabana, G. and Rasmussen, J. B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10844-10847 (1996)
- 59) Sydeman, W. J., Hobson, K. A., Pyle, P., Elizabeth and McLaren, E. B., *Condor*, 99, 327-336 (1997)
- 60) Vander Zanden, M. J., Cabana, G. and Rasmussen, J. B., *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **54**, 1142-1158 (1997)
- 61) Ogawa, N. O., Koitabashi, T., Oda, H., Nakamura, T., Ohkouchi, N. and Wada, E., *Limnol. Oceanogr.*, 46, 1128-1136 (2001)
- 62) Schmit, K., Atkinson, A., Stubing, D., McClelland, J. W., Montoya, J. P. and Voss, M., *Limnol. Ocean*ogr., 48, 227-289 (2003)
- 63) Matthews, B. and Mazumder, A., *Limnol. Ocean*ogr., 50, 1404-1414 (2005)
- 64) Freudenthal, T., Wagner, T., Wenzhöfer, F., Zabel, M. and Wefer, G., *Geochim. Cosmochim Acta*, 65, 1795-1808 (2001)
- 65) Lehmann, M. F., Bernasconi, S. M., Barbieri, A. and McKenzie, J. A., *Geochim. Cosmochim. Acta*, 66, 3575-3584 (2002)
- 66) Gaebler, O. H., Vitti, T. G. and Vukmirovich, R., Can. J. Biochem., 44, 1249-1257 (1966)
- 67) Macko, S. A., Fogel (Estep), M. L., Hare, P. E. and Hoering, T. C., *Chem. Geol.*, 65, 79-92 (1987)
- 68) Serban, A., Engel, M. H. and Macko, S. A., Org.

Geochem., 13, 1123-1129 (1988)

- 69) Hare, P. E., Fogel, M. L., Stafford Jr, T., Michell, A. D. and Hoering, T., J. Archaeol. Sci., 18, 277-292 (1991)
- 70) Minagawa, M., Egawa, S. and Kabaya, Y., Mass Spectros., 40, 47-56 (1992)
- 71) Macko, S. A. and Engel, M. H., Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 333, 367-374 (1991)
- 72) Hayes, J. M., Freeman, K. H., Popp, B. N. and Hoham, C. H., Org. Geochem., 16, 1115-1128 (1990)
- 73) Merritt, D. A. and Hayes, J. M., J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5, 387-397 (1994)
- 74) Metges, C. C., Petzke, K.-J. and Hennig, U., J. Mass Spectrom., 31, 367-376 (1996)
- 75) Metges, C. C. and Petzke, K. J., Anal. Biochem., 247, 158-164 (1997)
- 76) Metges, C. C., Petzke, K. J., El-Khoury, A. E., Henneman, L., Grant, I., Bedri, S., Regan, M. M., Fuller, M. F. and Young, V. R., *Am. J. Clin. Nutr.*, **70**, 1046-1058 (1999)
- 77) Fogel, M. L. and Tuross, N., Oecologia, 120, 336-346 (1999)
- 78) Metges, C. C. and Daenzer, M., Anal. Biochem., 278, 156-164 (2000)
- 79) McClelland, J. W. and Montoya, J. P., Ecology, 2173-2180 (2002)
- McCellland, J. M., Holl, C. M. and Montoya, J. P., Deep-sea Res. 1, 50, 849-861 (2003)
- 81) Schmidt, K., McClelland, J. W., Mente, E., Montoya, J. P., Alkinson, A. and Voss, M., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **266**, 43-58 (2004)

- 82) Petzke, K. J., Boeing, H. and Metges, C. C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 1392-1400 (2005)
- Veuger, B., Middelburg, J. J., Boschker, H. T. S. and Houtekamer, M., *Limnol. Oceanogr. : Methods*, 3, 230-240 (2005)
- 84) Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H. and Ohkouchi, N., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, (in press)
- 85) Macko, S. A., Uhle, M. E., Engel, M. H. and Andrusevich, V., Anal. Chem., 69, 926-929 (1997)
- 86) Brand, W. A., Tegtimeyer, A. R. and Hilkert, A., Org. Geochem., 21, 585-594 (1994)
- 87) Sessions, A. L., J. Sep. Sci., 29, 1946-1961 (2006)
- 88) 力石嘉人,奈良岡浩,ぶんせき,8,456-462(2004)
- 89) Lengeler, J. W., Drew, G. and Schlegel, H. G., Biology of the Prokaryotes, Blackwell Science, New York (1999)
- 90) Buchanan, B. B., Gruissem, W. and Jones, R. L., Biochemistry and Molecular Biology of Plant, American Society of Plant Physiology, Rockville (2000)
- 91) Bender, D. A., Introduction to Nutrition and Metabolism, CRC Press, London (2002)
- 92) Macko, S. A., Fogel Estep, M. L., Engel, M. H. and Hare, P. E., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **50**, 2143-2146 (1986)
- 93) Matter III, P. and Miller, H. W., Comp. Biochem. Physiol., 43B, 55-56 (1972)
- 94) Ostrom, P. H., Macko, S. A., Engel, M. H. and Silfer, J. A., Org. Geochem., 16, 1139-1144 (1990)