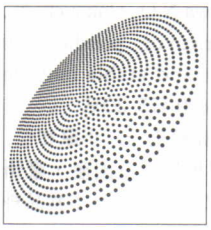
臨床化学　38：266－271，2009



特集●Vol.38 No.3　安定同位体と臨床化学

アミノ酸の天然レベル窒素安定同位体組成を用いた食物解析

小川奈々子*　力石嘉人*　大河内直彦*

1. はじめに

天然中に存在する窒素の約99.635％は，7個の陽子，7個の中性子，そして7個の電子から成る^{14}Nである。それに対し，残りの約0.365％は，中性子が一つ多い安定同位体^{15}Nである。原子量が異なることに起因して，様々な物理的・化学的・生物学的プロセスにおいて両者の反応速度が微妙に異なり，それを反映して^{15}Nの天然中における存在比がわずかに偏った分布をもっている。逆に言うと，この微妙な変動を捉えれば，そこで何が起きているのかについて知ることができる。こういった手法は，元来地球科学の分野で発達した研究手法であるが，最近になりその応用は徐々に生物学的な問題にまで広がりを見せている。

天然の生態系において，生物体の窒素安定同位体組成が「食物連鎖」にともなって少しずつ上昇していくことが見出されたのは1980年代初頭のことである[1)]。このルールを用いて，さまざまな生態系における食物連鎖の仕組みや生態系が明らかにされてきた[2,3)]。最近になり筆者らのグループは，この研究手法の精度を飛躍的に上昇させる「アミノ酸の窒素同位体比を用いた食物解析法」を開発した。本稿で紹介するのは，この新しい食物解析法である。この手法は，もちろん人間にも応用できるものであり，医学的な応用も視野に入るものである。

2. 天然レベルの窒素同位体比の分析法と表示法について

天然レベルの安定同位体比を用いた研究の方法論は，歴史的に独特の分析法と表示法が用いられてきた。まず，試料中に含まれる^{15}N存在度のわずかな変動を捉えるために，安定同位体質量分析計と呼ばれる特殊な質量分析計が用いられている。これは磁場型の質量分析計であるが，複数の検出器をもっており，同時に複数の質量イオンをモニターすることができる。窒素同位体比を測定する場合，窒素ガス(N_2)としてイオン源に導入し，m/z 28イオン($^{14}N_2^+$)とm/z 29イオン($^{15}N\ ^{14}N^+$)を比較することにより^{15}Nの^{14}Nに対する存在比を測定する。ただし，天然中における^{15}N存在度の違いが非常に小さいため，試料と標準物質を交互に測定し，両者の間に見られる僅かなずれを以下の式に示すデルタ(δ)値として示す表記法が研究者たちの間で長らく用いられてきた。

*海洋研究開発機構 海洋極限環境生物圏研究領域

$$\delta^{15}N=\left\{\frac{(^{15}N/^{14}N)_{試料}}{(^{15}N/^{14}N)_{標準物質}}-1\right\}\times 1000\,(‰)$$

標準物質には大気窒素ガス（$^{15}N/^{14}N=0.0036765$）が用いられ，すなわちこの$\delta^{15}N$値は，大気窒素ガスの$^{15}N/^{14}N$に対して，試料の$^{15}N/^{14}N$が千分率でどの程度違うかを表す。例えば，$^{15}N/^{14}N=0.0036802$の試料では，標準試料との$^{15}N/^{14}N$の差が+0.0000037となるが，δ値表記では$\delta^{15}N=+1.0‰$となる。一般に，測定にともなう誤差は0.2‰程度で，これは^{15}N存在度が0.003650％と0.003651％の非常にわずかな違いを十分に捉えることができる。

本稿で主に解説するアミノ酸の窒素同位体比を測定する場合，この同位体質量分析計の手前にガスクロマトグラフィーをカップリングさせた，ガスクロマトグラフィー／燃焼／同位体質量分析計（GC/C/IRMS）と呼ばれる分析機器を使用する。この機器では複数のアミノ酸が混在する試料をガスクロマトグラフィーによってあらかじめ分離し，分離された各アミノ酸を順次燃焼／還元して窒素ガス（N_2）にしてからオンラインで同位体質量分析計に導入し，それぞれの窒素同位体比を測定していく。こうした分析法の詳細については，力石他（2007）を参照していただきたい[4]。

3. 生態系と安定同位体比

自然界に生息する生き物は，光合成などによりアミノ酸を無機物から合成できる「独立栄養生物」と，他の生物に栄養依存する「従属栄養生物」がいる。捕食による生物間の結びつきは「食物連鎖」と呼ばれ，独立栄養生物を一次生産者，これを餌とする生物を消費者と呼ばれる。生態系には，一次生産者を食べる一次消費者，それを食べる二次消費者といったように，生き物がピラミッド上に積み重なっており，一次生産者からの距離を「栄養段階」として表すことができる。たとえば，牧草は一次生産者なので栄養段階が1，その牧草を食べるウシの栄養段階は2，その牛肉（だけ）を食べる人間は栄養段階が3というわけである。このような食物連鎖に沿って（栄養段階の上昇とともに），筋肉組織など生体中に含まれる窒素の安定同位体比が上昇し，それを用いることによって生態系の食物連鎖網が解析できることが1980年代に知られるようになった（**図1**）。これは生体内の酵素反応系において，^{14}Nを含むアミノ酸が^{15}Nを含むそれよりもわずかに速く代謝され，結果として生体内に^{15}Nが

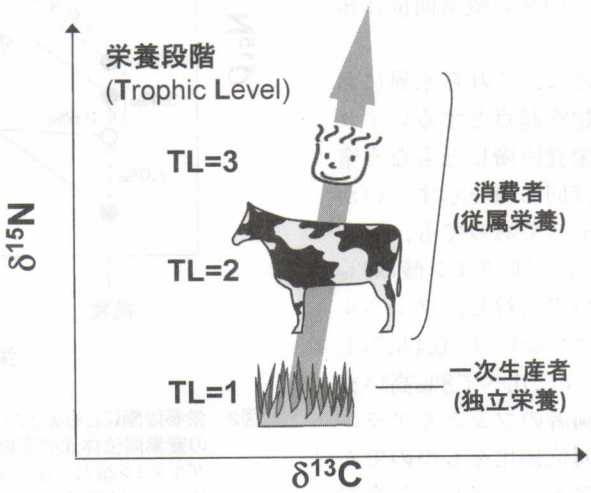


図1　天然レベルの窒素および炭素安定同位体比と食物連鎖上の生物との関係
捕食者生物の安定同位体比は窒素と炭素の両方とも，エサ生物よりも大きな値になることが経験則として明らかになっている。窒素は特にその変化が大きいため，栄養段階の推定手段として広く用いられている。

「蓄積」することに起因している[3]。

最近になり，生体を構成する個々のアミノ酸レベルで窒素安定同位体比を測定することにより，より正確な栄養段階が推定できることが明らかになってきた[5,6]。生体内におけるアミノ酸はタンパク質だけでなく，コラーゲン，ケラチンなど多様な機能をもつ物質の構成成分で，その機能も多岐にわたる。しかし，それを構成するアミノ酸はわずか20種類でしかない。しかもその代謝プロセスは，各種生物間でほとんど等しい。

誌面の都合上詳細は他に譲るが[4,6,7]，これまでの研究によると，一次生産者が合成するアミノ酸は，特定の生物グループ内で非常に似た窒素同位体分布をもつことが経験的に知られている。まず，水界中に生息する藻類やシアノバクテリアといった光合成生物（栄養段階1の生物）がもつグルタミン酸は，種や属といった進化系統の位置にかかわらず，フェニルアラニンより平均3.4‰高い値をもつことが知られている。それに対し，イネ科などの陸上C3植物では，グルタミン酸がフェニルアラニンより約8.4‰低い窒素同位体比をもち，トウモロコシやサトウキビといった陸上C4植物は，約0.4‰高い値をもっている。このように光合成生物の3つのグループ内のアミノ酸は，それぞれが非常に均質性の高い窒素同位体組成をもっているのである。

さらにおもしろいことに，これら水界における植物や陸上高等植物を起点とするいずれの生態系においても，栄養段階にともなう窒素同位体比の上昇はほぼ同じ値を示す。いかなる生物間の捕食プロセスであっても，餌とその消費者を比較すると，グルタミン酸は8‰も消費者が高い値をもつのに対し，フェニルアラニンはほとんど変化しない（～0.4‰の上昇）。ライオンはシマウマに比べて8‰高いグルタミン酸をもつが，両者のフェニルアラニンはほとんど同じ窒素同位体比をもつのである。従属栄養生物は，フェニルアラニンを常に餌に含まれる植物由来のそれに依存するしかないため，どれほど高次の捕食者といえども，利用している必須アミノ酸の究極的な起源は一次生産者ということになる。最初に植物が合成したフェニルアラニンが，食物連鎖を通して高次捕食者へと移動していくだけとも言える。ここで重要なことは，フェニルアラニンが代謝される際，アミノ基の窒素とα位炭素間のN結合が開裂しないので（水酸基が付加されてチロシンになる），同位体分別が起きないことである[6]。このためフェニルアラニンは，「捕食」というプロセスを通してその窒素同位体比を変動させることがない。バリンは，フェニルアラニンと同じように必須アミノ酸であるが，その代謝で窒素－炭素結合が開裂するため，その窒素同位体比は変動する。

これらのことをまとめると，**図2**のようになる。3つの光合成生物グループ（水界，陸上C3，陸上C4）間で組成バランスの違いはあるが，個々の系でみるとどのグループにおいて

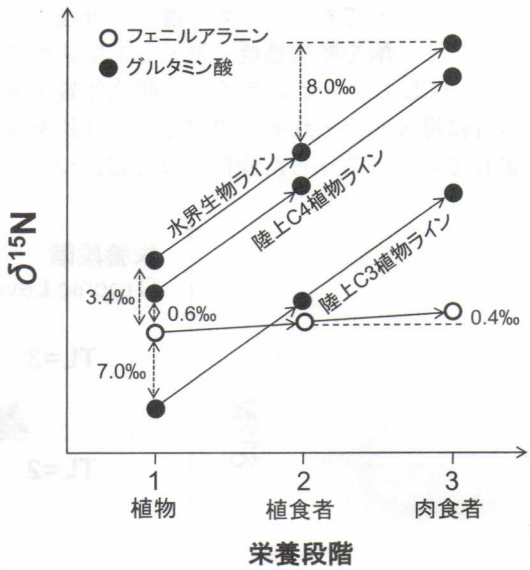


図2　栄養段階にともなうグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の変動
グルタミン酸は，独立栄養生物（栄養段階1）の値と比べて，従属栄養生物では1捕食関係毎に8‰ずつ大きくなる。これに対してフェニルアラニンは0.4‰と小さな変化しか示さないので，栄養段階の高い生物ほどグルタミン酸とファニルアラニンとの窒素安定同位体比の差が大きくなっていく。

も，生き物のグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の差が栄養段階の一次関数になるのである。逆に言うと，動物試料のアミノ酸の窒素同位体比を測定すれば，その栄養段階が推定できるというわけである。**図3**は，水界に生息するさまざまな生物の栄養段階を示したものである。この図からは，サザエの栄養段階が2.0で，彼らが植物プランクトン（海藻）のみを食べていることがわかるし，栄養段階3.3のクロダイは動物プランクトン（栄養段階2）だけでなく，栄養段階3の生物（小さな魚など）もいくらか食べていることがわかる。さらに，海の「トッププレデター」と呼ばれるサメは，4.5～4.8という非常に高い値をもち，その呼称にふさわしい栄養段階を示している。ここまでくると，そのサメの肉さえ口にする人間のアミノ分布と栄養段階について興味が湧いてこないだろうか。もっとも，水界だけでなく，陸上生態系からの生き物をさまざまな割合で食べる人間については，3つの式の混合になるので，事情はそれほど単純ではない。以下に，その研究例について紹介しよう。

4. 人間の食性への応用

現代のある日本人の家族4人（夫婦および子供二人）の手の爪を測定した結果を例にとって見てみよう。この家庭では，朝食と夕食はほとんどの場合全員が同じものを食べ，昼食のみ学校や職場でそれぞれ異なるものを食べている。このため，摂取する食物のおよそ7割が同一と考えられる。こうした食生活の類似性を反映した結果，**図4**に示したように家族4人の間で，5種類のアミノ酸窒素同位体比の組成バランスは類似している。現代の日本人の代表的な食物は，穀類（コメ・小麦）・野菜・果実などの作物（栄養段階1），牛・豚・鶏肉（栄養段階2），魚介類（水界生態系，栄養段階＝3，**図3**）だが，この家族は動物タンパク質として魚介類と肉類をほぼ等分に食べ，大豆製品などの植物性タンパク質も比較的多く摂取している。彼らのアミノ酸同位体比分布と，上の各食物が食事の100％を占めた場合

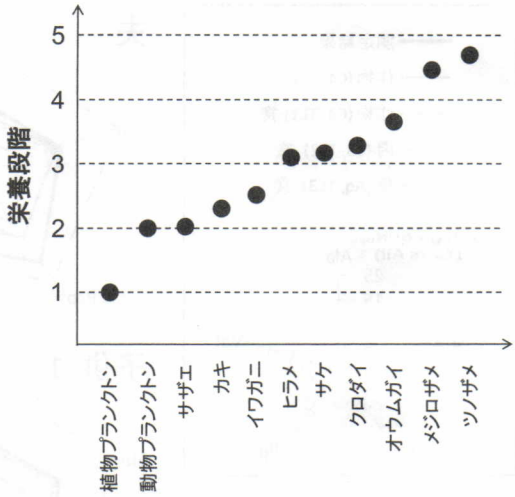


図3　アミノ酸窒素同位体比法で求められた様々な水生生物の栄養段階

の予測分布（**図4**）は，この食性を反映し魚類100％と肉類100％との中間やや植物よりの値をとり，全体の分布パターンもこれらの中間形となっている。トウモロコシや砂糖などのC4植物をあまり摂っていないことは，バリンの挙動パターンで確認できる。まだ研究は半ばだが，より多数のアミノ酸の窒素同位体比を総合的に解釈すれば，さらに明瞭な食性情報をパターン化できるかもしれない。

とはいえ現時点では，人間のように海産物と農産物とを同時に摂取する生物については，栄養段階の一義的な解釈は不可能である。現在この弱点を克服するために，アミノ酸の炭素安定同位体比などの分析法を確立し，新しいパラメーターを導入することを目指している。また，こういったアミノ酸の同位体分析には，爪だけでなく髪の毛や皮膚組織などにも応用することができるため，古人類の食性を知ることに応用され始めている。

5. おわりに

本稿ではアミノ酸の安定同位体比を用いた食性解析の研究例を紹介した。安定同位体比とは，化学反応において同位体という質量のわずかに異なる同じ元素同士がみせる「反応

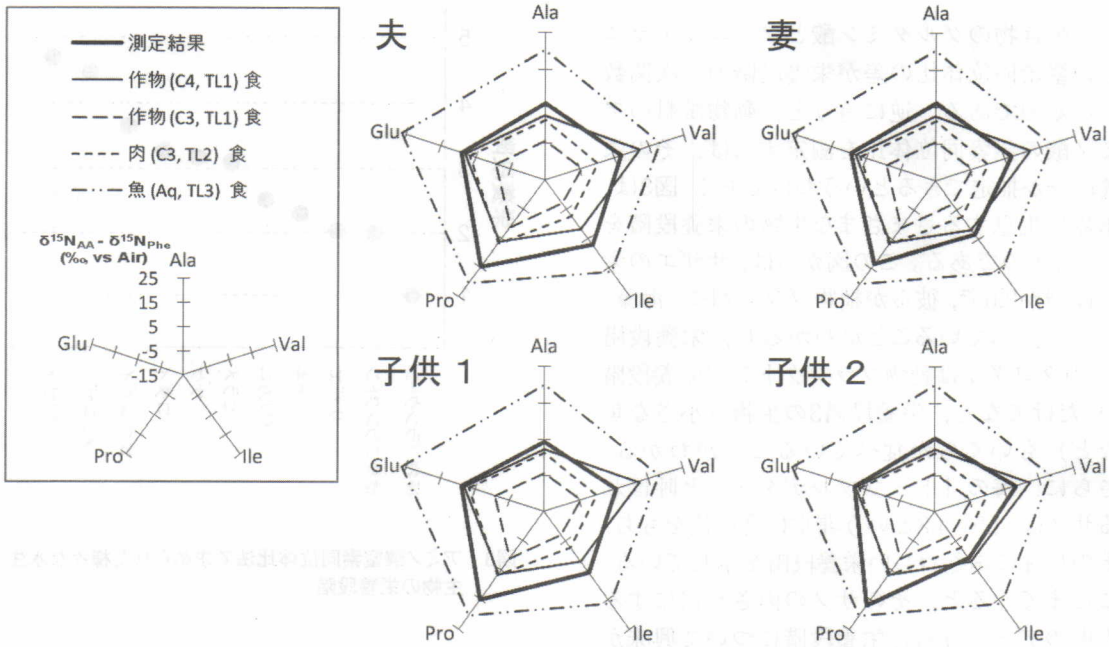


図4　ある家族（夫，妻，子供1，子供2）の手の爪から測定されたアミノ酸窒素同位体比と，食物として作物（C3,C4），肉，魚だけをそれぞれ食べていた場合の推定アミノ酸窒素同位体比との比較
各アミノ酸の窒素同位体比を，フェニルアラニンの窒素同位体比との差で示してある。

速度のずれ」を写した指紋のようなものである。生物的あるいは非生物的なあらゆる「動き」はその要所要所に安定同位体比という指紋を残し，我々はそれを詳細に測定し解析することでその「プロセス」の真相の謎解きを行うのである。天然レベルの安定同位体比による手法の重要な特徴は，現実に機能しているシステムの「あるがままの姿」を測定し解析する手法であるという点にある。すなわち，高濃度のトレーサー物質を添加した実験のように，生体に「負荷」を与える必要がない。その点においても，従来とは少々異なる次元の情報を与えてくれる。たとえば，患者の食物摂取習慣の解析といったことに応用するのは簡単なことである。

また今後の可能性として，ある部位に蓄積する病原性タンパク質の起源を知るのに役立つかもしれない。たとえば，トウモロコシなどの飼料を与えられて育ったウシのアミノ酸の同位体比は，**図4**における作物（C4, TL1）食のラインに乗ってくるはずである。これまで天然レベルの安定同位体比がほとんど応用されることのなかった医学的な可能性を指摘して，本稿の結びとしたい。

■文　献

1) Minagawa M, Wada E: Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidences and the relation between $d^{15}N$ and animal age. Geochim Cosmochim Acta, **48**: 1135-1140, 1984.
2) Ogawa NO, Koitabashi T, Oda H, Nakamura T, Ohkouchi N, Wada E: Fluctuations of nitrogen isotope ratio of gobiid fish (Isaza) specimens and sediments in Lake Biwa, Japan, during the 20th century. Limnol Oceanogr, **46**: 1228-1236, 2001.
3) Fry B: Stable Isotope Ecology, 308p., Springer, New York, 2006.
4) 力石嘉人, 柏山祐一郎, 小川奈々子, 大河内直彦: 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. RADIOISOTOPES, **56**:

463-477, 2007.
5) McClelland JW, Montoya JP: Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. Ecology, **83**: 2173-2180, 2002.
6) Chikaraishi Y, Kashiyama Y, Ogawa NO, Kitazato H, Ohkouchi N: Biosynthetic and metabolic controls of nitrogen isotopic composition of amino acids in marine macroalgae and gastropods: implications for aquatic food web studies. Mar Ecol Prog Ser, **342**: 85-90, 2007.
7) Chikaraishi Y, Ogawa NO, Ohkouchi N: Further evaluation of trophic level estimation based on nitrogen isotopic composition of amino acids (in Earth, Life, and Isotopes, eds Ohkouchi N, Tayasu I, Koba K), in press, Kyoto University Press, Kyoto, 2009.

Diet analysis based on the nitrogen isotopic composition of amino acids

Nanako O Ogawa*, Yoshito Chikaraishi*, Naohiko Ohkouchi*
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology, Institute of Biogeosciences