### Low Temperature Science

# 低温科学

## 2021 Vol.79

ISSN 1880-7593

## 安定同位体を用いた 有機物・生物・生態系解析



## はじめに

地球惑星科学,とくに地球生命科学は、大気・陸・海洋と生物の間でおこる物質・エネ ルギー収支を定量し、その変遷と生命の進化・多様化や、人間活動(化石燃料の消費・森 林破壊など)が自然界へ与える影響を評価する学問分野である。例えば、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、将来の地球の姿や、人間社会の持続可 能性を考えるうえで重要な意義を持つ。また、宇宙空間や初期地球における有機物生成に 関する研究は、地球における生命の起源や、地球外生命の可能性など、生命誕生の根幹(生 命分子の起源や生命のホモキラリティの謎)に関わる制約条件を与える。

これらの研究に共通する有効な解析手段の1つに、安定同位体がある.安定同位体とは、 陽子の数が等しく中性子の数が異なる原子のことであり、生物を構成する水素・炭素・窒 素・酸素などには、必ず安定同位体が存在する(例えば、炭素では98.9%の<sup>12</sup>Cと1.1% の<sup>13</sup>Cなど).そして、その比率(安定同位体比:例えば<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>Cなど)は、(1)地球上の物 理化学・生化学反応の基質・経路・フラックスに対して定量的に変化するため、(2)この基 本原理が個々の反応スケール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、古くから多くの研究で、反応素過程の5W2H(Who,What, When, Where, Why, How, How many)を読み解くツールとして用いられてきた.

また、同位体比の自然界での変化率を用いる研究に加え、安定同位体を標識として用い るトレーサー研究も盛んに行われている.実際に、基質(例えば、ブドウ糖など)の特定 の部位を人工的に同位体標識し、その移動を単一の生物体内、生物群集内、あるいは海底 の堆積場などにおいて、分子レベルもしくは分子内の個々の元素レベルで追う手法(Stable Isotope Probing, SIP 法)は、生物の代謝合成経路の可視化、生物群集の機能・構造解析、 生物地球化学的プロセスの解明といった研究で利用が期待されている.

本特集は、生物学、生態学、宇宙地球化学などの分野で、最新の同位体技術を研究され ている、もしくは、それらの技術を用いて研究を展開されている方々に、論文を執筆して いただき、解説集として取りまとめたものである.これらの論文が、今後の研究の発展に 資することになれば幸いである.

最後に、本巻の刊行にあたり、論文を執筆して下さった全ての著者と論文の査読を引き 受けて頂いた全ての査読者に、この場をお借りして御礼申し上げる.

> 「低温科学」第79巻編集委員 カ石嘉人(北海道大学・低温科学研究所) 布浦拓郎(海洋研究開発機構) 古川善博(東北大学・理学研究科)



#### はじめに

安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法―1:ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計		
·····································	嘉人	1
アミノ酸の安定同位体比を用いた生態系解析	嘉人	13
安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法―2:ガスクロマトグラフ-質量分析計と MassWorks	拓郎	23
マルチオミクス解析による好熱性水素酸化細菌からの可逆的 TCA 回路の発見 	晴幸	31
オービトラップ質量分析計を用いたアミノ酸解析の可能性島村 繁, 澄田 智美, 布浦	拓郎	37
Orbitrap Fusion を用いた CE-MS と四重極 GC-MS でのアミノ酸分析の比較 澄田 智美,島村 繁,布浦	拓郎	43
宇宙における安定窒素同位体比の多様性とその起源解明に向けた実験的アプローチーーーーーーーー 菅原	春菜	51
炭素安定同位体組成で探る隕石有機物の生成反応と地球への運搬・古川	善博	59

## 安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の 検出法—1:ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計

#### **滝沢 侑子<sup>1)</sup>, 力石 嘉人<sup>1)</sup>**

2020年11月25日受付, 2021年2月10日受理

有機化合物に含まれる水素・炭素・窒素などの安定同位体の存在比を,分子レベル(化合物レベル), もしくは分子内の個々の元素レベルで測定するための主要な分析装置として,ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS)がある.本稿では,GC-IRMSの原理と,生理・生態学分野への利 用方法を解説する.

#### Stable isotope analysis-1: gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer

Yuko Takizawa and Yoshito Chikaraishi

One of the most general instruments for determining the inter- and intra-molecular isotopic heterogeneity in natural environments is gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer (GC-IRMS), which allows a rapid and precise determination of stable hydrogen, carbon, and nitrogen isotope ratios of individual compounds even in complex mixture of components. We review a brief outline of GC-IRMS and its application to physiological and ecological studies.

キーワード:安定同位体, GC-IRMS, 同位体生理学, 同位体生態学, 有機地球化学 Stable isotope, GC-IRMS, Isotope Physiology, Isotope Ecology, Isotope Geochemistry

#### 1. はじめに

有機化合物を構成する水素・炭素・窒素・酸素などに は安定同位体が存在し、その比率(安定同位体比: D/H, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N, <sup>18</sup>O/<sup>16</sup>Oなど)は、自然界の様々 な反応プロセス(過程)において僅かに変化する(Fry, 2006 など).例えば、大気二酸化炭素の<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C は約 0.01109 であるのに対して、その二酸化炭素を原料に植 物が光合成で作り出したブドウ糖の<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C は約 0.01080 であり、原料の二酸化炭素に比べてわずかに <sup>12</sup>C に富む.このように、原料の中の軽い同位体(<sup>12</sup>C な

連絡先 滝沢 侑子 北海道大学低温科学研究所 〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目 Tel. 011-706-5486 e-mail: takizaway@lowtem.hokudai.ac.jp 1) 北海道大学低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan ど)が優先的に反応し、その反応が非定量的\*1である(原 料の一部が反応せずに残存する)場合には、生成物に軽 い同位体が濃縮(例えば、ブドウ糖に<sup>12</sup>Cが濃縮)し、 残った原料に重い同位体が濃縮(例えば、二酸化炭素 に<sup>13</sup>Cが濃縮)する.この原理は、数秒スケールで起こ る生物化学的な反応から、数十・数百万年スケールで起 こる地質学的な反応まで、地球上で起こるあらゆる反応 に共通する一般則として広く知られている.これらの法 則に基づいて、安定同位体比は、反応素過程の5W2H (Who, What, When, Where, Why, How, How many)を読 み解くツールとして、古くから多くの研究で用いられて きた(詳しくは安定同位体地球化学などの書籍を参照し ていただきたい).

本稿では、有機化合物の安定同位体比を、分子レベル (化合物レベル)、もしくは分子内の個々の元素レベルで 測定するための主要な分析装置である「ガスクロマトグ ラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS: gas chromato-

<sup>\*1</sup> http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/ pg171.html



graph - isotope ratio mass spectrometer)」の,装置の概要と,その技術を利用した研究例(GC-IRMS を使った研究で明らかになったこと)の一部を紹介したい.なお本稿で説明するGC-IRMSは,著者らの研究室で運用している Thermo Fisher Scientific 社製の拡張型安定同位体比質量分析計 Delta V advantage と,Agilent 社製のガスクロマトグラフ 7890Bをガスクロ型前処理装置GC-C/TC III を介して接続した装置\*2 であり,説明の多くは著者らのこれまでの使用経験に基づいたものであることを予めご了承いただきたい.またGC-IRMSの機器そのものや使用条件,GC-IRMSの測定技術を利用した研究例については,既にいくつかの論文や総説が発表されているため,それらも併せて参照されたい(例えば,Sessions 2006; Evershed et al. 2007;力石・大場 2008).

#### 2. GC-IRMS の概要

#### 2.1. 安定同位体比の定義

安定同位体の組成比の表記は,平均存在度(例え ば,<sup>12</sup>C:99.89%,<sup>13</sup>C:1.1%)や存在比(例えば,<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C = 0.0111)などが一般的である.しかし,自然界の様々な 反応プロセス(過程)における同位体比の僅かな変化を 捉える際には,国際標準物質の安定同位体存在比に対す る「千分偏差(δ値,単位‰,式1)」が,伝統的に用いら れている.

$$\delta \text{ in } = [(R_{\text{tx}} / R_{\text{tx}} / R_{\text{tx}} / R_{\text{tx}}) - 1] \times 1000 \qquad (\vec{x} 1)$$

R は水素・炭素・窒素いずれかの存在比(それぞれ, D/H, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N)を示す. 国際標準物質は, 測定した い元素にあわせて, 標準平均海水(V-SMOW: ViennaStandard Mean Ocean Water, D/H=0.000155576), Peedee 層ベレムナイト炭酸塩(V-PDB: Vienna-Peedee Belemnite, <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C=0.011180), または大気窒素(Air: Atmospheric Nitrogen, <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N=0.0036765)のいずれか が用いられる.これらの標準物質は、国際原子力機関 (IAEA) によって管理されている.試料のる値が、国際 標準物質に対して「正」であればその試料は重い同位体 (D, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) を多く含むことを示し、「負」であれば軽 い同位体 (H, <sup>12</sup>C, <sup>14</sup>N) を多く含むことを示す.なおる 値は国際単位系 (SI) ではないため、る値に代わる新しい 定義が提案されているものの、現時点ではどれも定着し ておらず、る値の使用が続いている.安定同位体比の 「‰」という単位(表記)は、将来的に変わる可能性があ ることに留意されたい.

#### 2.2. 装置の概要

GC-IRMS には主に5つの構成要素がある(図1):

- (1) 試料に含まれる複数の有機化合物を分離する「GC」
- (2) それぞれの有機化合物を H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>ガスに変換する「反応炉」
- (3) 測定に不要なガス成分や水分を除去する「トラップ」
- (4) 加圧系の装置 (GC) と真空系の装置 (IRMS) を接続 する「スプリットシステム」

(5) H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>ガスの安定同位体比を測定する「IRMS」 測定の対象とする有機化合物は,揮発性を持たせるため に前処理の段階で化学修飾され,ヘキサンやジクロロメ タンなどの有機溶媒に溶かされた状態でGCへ導入され る.溶液中に混在する有機化合物は,ガラス製のGC キャピラリーカラム(長さ30または60m,内径0.25ま たは0.32mm, 膜圧0.1から0.5µmが用いられること が多い)によってそれぞれ分離され,その後は連続的に セラミック製の反応炉(長さ32-34 cm,内径0.5 mm) に導入される.(2)~(4)の構成の子細は,測定対象とす

<sup>\*2</sup> http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/ pg233.html





1935-47 平衡論 (Urey) 理論 の構築 1947 速度論 (Bigelisen & Mayer)

1960's~ 真空技術, PC技術 技術 1970's~ IRMS(封管燃焼法) の発展 1980~ online技術の開発 (Preston, Owens, Fry) 1985-90 GC-IRMSの開発 (Hayes)

図3:GC-IRMSの開発史

0.75 0.74

29/28 0.73 0.72 0.71 1.5

m/z 28 (V) 1.0

西暦

0.5

20

1950

る分子や元素, また GC-IRMS の仕様 (メーカーや, バー ジョン)によって異なるが、いずれの手段においても、 最終的には、反応炉内で生成された試料由来のH2, CO2, もしくは N<sub>2</sub> ガスがキャリアーガス(He)と共に IRMS に導入され、同位体比が測定される仕組みとなっている. 実際に測定をおこなうと、図2に示すようなクロマトグ ラムが得られ、試料に含まれる複数の有機化合物が、GC によって分離され、1つ1つのピークが示す有機化合物 の同位体比が測定されていることがわかる.

#### 2.3. 開発の歴史

同位体の研究(理論および測定技術)は、この80年間 の社会情勢に強く影響を受けながら発展してきた歴史が ある(図3).自然界における同位体存在比の変化(同位 体分別) に関する理論は、原子爆弾の開発に伴って 1930-40年代に集中的に研究され、Urey によって「平衡 論的同位体分別」が, Bigelisen, Mayer によって「速度 論的同位体分別」の理論が完成した(同位体分別に関す る詳細は,著者らのウェブサイト\*3や,安定同位体地球 化学などの書籍を参照されたい). その後 1960 年代に は、米国等による宇宙開発(アポロ計画など)に伴って、 真空技術や計算機 (PC 技術) が発展し、同位体比質量分 析計(IRMS)が開発された経緯がある.開発当初の同 位体比測定は、対象とする試料を石英管内で燃焼・還元 し、生成したガスを手作業で真空ラインを用いて分離・ 精製し、IRMS に導入するというもので、封管燃焼法、 Bulk 法, または Dual Inlet 法と呼ばれている. この方法 は、試料全体に含まれる水素・炭素・窒素の同位体比を 精密に測定することが可能な現在も用いられている重要 な技術であり,特に標準試料の同位体比を決定するため に欠かせないものである.ただし、封管燃焼法による測 定の特徴として、元素あたり数ミリモル (mmol) 程度の

<sup>\*3</sup> http://www.lowtem.hokudai.ac.jp/isophysiol/products/cn6/ pg171.html

試料量が要求される上に、<br />
試料の燃焼・<br />
還元、および真 空ラインを用いたガスの分離・精製にかなり時間がかか る(著者らの経験では「一週間で十数試料の測定」が限 界である).また、有機化合物の酸素同位体比の測定に 関しては、試料から「有機化合物由来の酸素」を確実に 抽出する技術が未だに開発されておらず、優れた封管燃 焼法が存在しないという点にも注意されたい(例えば、 Saurer et al. 1998). 1970-80 年代になると、オイル ショックの影響を受けて、世界的に「石油資源の成因や 起源」を理解するための研究が進むようになり、その手 段のひとつとして「化石燃料(石油・石炭)に含まれる 炭化水素の分子レベルでの同位体比分析 | の需要が高 まった(「有機地球化学」研究の黎明期である). その後 は人間活動に伴う環境の変化を評価したり、生態系の構 造を理解したりするために,多量の生物試料の同位体比 分析をより簡便に実施できる測定手法の需要が高まっ た、そこの背景を受けて、前述したような手間のかかる 「手作業でのガスの精製」を行わずに同位体比分析を可 能とするための「自動分析(オンライン)技術」の研究 が進んだ.その結果,既存のGCや元素分析計(EA: Elemental analyzer) などを改良して作られた「試料の ガス化・生成したガスの分離・精製を行う前処理装置」 と、「同位体比を測定する IRMS」とを、「スプリットシ ステム (詳細は後述)」で接続した GC-IRMS, EA-IRMS が開発された.このように,現在用いられている GC-IRMS の基本的な原理は, 1990 年代には既に完成し ていたといえる (Hayes et al., 1990).

なお、GC-IRMS を示す表記として、論文等では様々 な略記が使われている.isotope ratio monitoring-GC-MS (irm-GC-MS) と表記されることや、炭素・窒素同位 体比を測定する条件の装置を GC-combustion-IRMS (GC-C-IRMS)、水素同位体比を測定する条件の装置を GC-pyrolysis-IRMS (GC-P-IRMS)、GC-thermal conversion-IRMS (GC-TC-IRMS) と表記することもある. また、近年、測定装置を示す時には「GC-IRMS:gas chromatograph - isotope ratio mass spectrometer」のよ うに「-」を、測定法を示す時には「GC/IRMS:gas chromatography/isotope ratio mass spectrometry」のよ うに「/」を用いることが多くなっている.

#### 2.4. GC-IRMS を用いた安定同位体比の測定における 重要事項

#### 2.4.1. 反応炉

水素同位体比の測定には,熱分解炉(触媒:グラファ イト,温度:1400-1500℃)が用いられる.導入された有 機化合物は,熱分解によって H<sub>2</sub>, C (グラファイト) に加 えて,有機化合物に酸素原子が含まれる場合は CO が生 成される.炭素・窒素同位体比の測定には,燃焼炉(酸 化剤:NiO, CuO,触媒:Pt,温度:800-1150℃)と還元 炉(還元剤:Cu,温度:550-650℃)が用いられる.導入 された有機化合物は,燃焼炉で,CO<sub>2</sub>,H<sub>2</sub>O,N<sub>2</sub>,種々の 窒素酸化物(NxOy)に酸化分解され,その後還元炉にて, 窒素酸化物が N<sub>2</sub> に還元される.

反応炉では、試料が炉に与える負荷の大きさに伴って (例えば、分析数の多さや、測定試料の質など)、触媒の 劣化や、酸化・還元剤の消耗が起こることが一般的であ る。炉の内部での反応効率の低下は、人為的な同位体分 別をもたらす要因になり、クロマトグラム上でのピーク 形状の悪化(テーリングなど)や、試料が持つ同位体比 を正しく測定できないなどといった、測定結果の不確か さを増大させる要因にもなる. また分析数が増えていく と、水素同位体比測定においては試料由来のグラファイ トが,炭素・窒素同位体比測定においては酸化不足によっ て CO2 ではなくグラファイトが生成され、炉内に蓄積し てしまう. グラファイトの存在は, 炉内の流路を塞ぐ(狭 くする) 方向に働くため, 流速の増大と, 反応効率の低 下をもたらす.加えてグラファイトそのものが「有機化 合物のグラファイト化の触媒」にもなるため、一度作ら れてしまうとグラファイト化反応が連鎖的に進行し、 さ らにグラファイト化そのものが同位体分別を伴うため, 炭素同位体比の測定が極めて困難になる. また, フッ素 (F) などのハロゲンが含まれる有機化合物の測定にも注 意が必要である.水素同位体比測定では、熱分解炉内で フッ化水素 (HF) が生成され, GC-IRMS のキャピラリー カラムなどの様々な部品を腐蝕する.炭素・窒素同位体 比測定では、炉内の酸化剤・還元剤と不可逆的に反応し (CuF<sub>2</sub>やNiF<sub>2</sub>を生じる),酸化・還元力を低下させる. 上に挙げてきたこれらの問題は「炉の交換」によってのみ 改善されるため, 試料の質や測定数にあわせて, メンテ ナンスの必要性やその頻度について、よく注意されたい.

#### 2.4.2. バックフラッシュシステム

バックフラッシュシステムとは、試料あるいは GC 導入時に用いる溶媒に含まれている「反応炉に負荷をかけ うる有機化合物」を、反応炉に入れることなく外部に排 出する仕組みである。図4に示すように、「開」時には、 GC からのフローと、反応炉を逆流したフローが同時に GC 外部へと排出されるため、溶媒等の反応炉への侵入 を防ぐことができる。一方「閉」時は、GC からのフロー がそのまま反応炉に送られ、試料の有機化合物を熱分解、



図4:バックフラッシュシステム

あるいは酸化分解することができる.このように,バッ クフラッシュシステムを活用して,酸化剤・還元剤の消 耗と,触媒の劣化を防ぐことは,安定的な(再現性の高 い)測定をするうえで重要である.

#### 2.4.3. 透水膜

炭素・窒素同位体比測定では、有機化合物の燃焼により、水(H<sub>2</sub>O)が生成する.このH<sub>2</sub>Oが試料由来のCO<sub>2</sub> 等とともに IRMS でイオン化されると、式2の反応が起 こり、

$$^{12}C^{16}O_2^+ + H_2O \rightarrow H^{12}C^{16}O_2^+ + OH \bullet$$
 (式 2)

m/z 45 の H<sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sub>2</sub> が生成する. m/z 45 は <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> と同じ であるため,分析計内の水の存在自体が,測定によって 得られる同位体比を大きく見積もってしまう要因となる (Leckrone and Hayes, 1997, 1998). これを防ぐために, 還元炉とオープンスプリットの間などに,水を除去する 透水膜(Nafion<sup>™</sup> フィルター)を配置する必要がある (図 5). この透水膜は,経年劣化,とくに光により著し く劣化する性質があるため,暗所に設置するか,あるい はアルミ箔等で覆い遮光することが求められ,定期的な 交換も必須である(著者らの研究室では約2年毎に交換 している).

#### 2.4.4. スプリットシステム

GC は加圧系の分析機器であり、0.4 bar (=約10 psi, 40 kPa) 以上のガス圧で、試料を分離する。一方で IRMS は減圧系の分析機器であり、10<sup>-6</sup> mbar の真空下 で、質量数の異なるイオンを分離する。これらの異なる 圧力系の分析機器同士を繋ぎ、加圧系から減圧系への試 料の導入をおこなうのが「オープンスプリットシステム」



である(図6).オープンスプリットシステムでは、GC 側(加圧系)から来たキャピラリーカラムの先端が開放 系になっており、そこに、IRMS(減圧系)へとつながる キャピラリーカラムが挿入されている.この仕組みによ り、反応炉で生成した試料由来のガスは、一部がIRMS 側のキャピラリーカラムに引きこまれそのまま IRMS に導入され、一方残りの大部分は測定機の系外に排出さ れる.

この基本原理に従って、様々なタイプのオープンスプ リットシステムが運用されている。例えば、内径 0.32 mm のキャピラリーカラム (GC 側) に、0.1 mm のキャ ピラリーカラム (IRMS 側) を挿入したシンプルなもの (図 6a) から、ヘリウムガスで満たされた円筒上のガラ ス管に、GC 側のキャピラリーカラムと IRMS 側のキャ ピラリーカラムとの双方を挿入し、IRMS 側のカラムを 上下に出し入れすることによって、IRMS へ導入するタ イミングを制御したり、導入する濃度を調整したりする もの (図 6b) がある.

IRMSへの導入量は、IRMS 側のキャピラリーカラム の長さと内径、IRMS の真空度により決定される。例え ば、短いキャピラリーカラムを用いると、GC から来た 試料ガスの導入量が増加するが、IRMS の真空度が悪く なり、結果として IRMS のメンテナンス頻度を高くする 必要がある。そのため、研究対象の試料量や、研究室で 実施可能なメンテナンス頻度を考えたうえで、IRMS 側 のキャピラリーカラムの長さと内径を調整することが推 奨される。

#### 2.4.5. 分子ピークのベースライン分離

GC-IRMSでの同位体比分析では、図2に示すように、 クロマトグラム上で、同位体比を測定したい有機化合物 のピークが、ターゲットではない他の化合物や夾雑物等



図 5:透水膜

図6:オープンスプリットシステム

に由来するピークから,確実に分離されている必要があ る.例えば,異なる同位体を持つガス(例えば、<sup>12</sup>CO<sub>2</sub> と<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>)が,キャピラリーカラム内を流れる時には,同 位体効果により溶出時間に僅かな差があることが報告さ れており(Ricci et al., 1994),著者らの経験的には,二酸 化炭素の場合,*m/z*45の<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>が*m/z*44の<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>より も僅かに先に溶出することがわかっている.このような 場合には、クロマトグラム上のピークの、前半部が同位 体的に重く、後半部が同位体的に軽くなると考えられる (図2の45/44を参照).実際に、キャピラリーカラム内 での溶出時間に差が生まれる詳細なメカニズムは十分に 解明されていないものの、同位体比を正確に測定するた めには、ピークの一部ではなく「ピーク全体」をより正 確に積分する必要があるため、ベースラインの分離は慎 重におこなわれるべきである.

#### 2.4.6. 誘導体化における同位体分別

同位体比を測定したい有機化合物が,極性官能基(ヒ ドロキシ基:-OH,カルボキシル基:-COOH,アミノ基: -NH₂など)を持つ場合には揮発性を持たせるために, また,クロマトグラム上でのピーク分離能やS/N(シグ ナル/ノイズ)比を向上させるために,官能基を化学的 に修飾し極性を下げる処理がおこなわれる.これを「誘 導体化」という.しかし誘導体化においては,誘導体化 剤と測定対象の有機化合物や元素の組み合わせによっ て,人為的な同位体分別が生じ,それが測定値に不確か さをもたらすため,十分に注意を払う必要がある(Rieley, 1994).

例えば,カルボン酸(R<sub>1</sub>-COOH)とアルコール(R<sub>2</sub>-OH) を反応させ,エステル(R<sub>1</sub>-CO-OR<sub>2</sub>)を生成(カルボン 酸をエステル化、もしくは、アルコールをアシル化)す るときには、「カルボキシル基の炭素」と「アルコールの 酸素」の結合生成によって、同位体分別(軽い同位体で ある<sup>12</sup>C.<sup>16</sup>Oの優先的な反応)が生じる(図7).カルボ ン酸(試料)に対して、アルコール(誘導体化剤)が過 剰量存在する「エステル化」をおこなう時には、反応が 100%進行した場合にヒドロキシル基の酸素に同位体分 別が生じる(図7a,ただし、カルボキシル基の炭素は 100%反応するので、同位体分別は無い)、一方で、アル コール(試料)に対して、カルボン酸(誘導体化剤)が 過剰量存在する「アシル化」をおこなう時には、反応が 100%進行した場合にカルボキシル基の炭素に同位体分 別が生じる(図7b. ただし、アルコールの酸素は100% 反応するので、同位体分別は無い). これらの誘導体化 に伴う人為的な同位体分別は、理論上は、有機化合物と 誘導体化剤のモル比を調節することによって最小化でき る\*4が、例えば試料に含まれるマトリックス(誘導体化 剤と反応しうる、巨大な有機化合物:セルロースやリグ ニンなど)の存在や、目的の有機化合物以外に混合して いる化合物 (夾雑物)の影響も受けるので注意されたい.

また, アミノ酸を対象とした場合は, アミノ基 (-NH<sub>2</sub>) 周辺の立体構造は生体を構成するアミノ酸 20 種類のあ いだでそれぞれ異なっているため, 誘導体化剤との反応 性もそれぞれに差があると考えられる. アミノ酸の誘導 体化 (アシル化) における同位体効果の大きさもまた, 20 種それぞれで異なる (Corr et al., 2007) ことにも留意 したい. 加えて, アミノ酸同士での競争反応も起こるた

<sup>\*\*</sup> 誘導体化における同位体分別は、有機化合物と誘導体化剤のモル比が1:∞のとき最大になり、1:1のときゼロになる.



め(Chikaraishi and Ohkouchi, 2010),複数のアミノ酸を 対象とした測定においては、前述したような、誘導体化 剤のモル比を調節する\*4といった方法は現実的ではない. 一方で、炭素数の異なる直鎖アルコール(R-OH, Rの炭 素数が16-30など)の誘導体化(アシル化)反応における 同位体効果の大きさは、たとえ炭素数が異なっても、ヒド ロキシ基周辺の立体構造はほとんど等しいため、試料中 の全アルコールと誘導体化剤のモル比で決定される.

誘導体化反応において,誘導体基に含まれる元素の同 位体的な影響は,一般的に式3を用いて補正される.

$$n_{ss}$$
  $n_{ss}$   $n$ 

nは、誘導体化前後の試料および誘導体基の「元素数」 を示す.  $\delta_{ist#ik+tik}$ は測定によって得られるため、 $\delta_{ist#ik+tik}$ を求めるにあたっては、予め $\delta_{ist#ik+tik}$ を知る必要がある. 一般的な手順として、同位体比( $\delta_{ist#ik+tik}$ )既知の標品を 用いて試料と同じ条件で誘導体化をおこない、式3より  $\delta_{ist#ik+tik}$ を得る.次に、対象とする試料を同じ誘導体化剤 を用いて誘導体化し、実際に得られた測定値( $\delta_{ist#ik+tik}$ ) から $\delta_{ist#ik+tik}$ を求めることが多い.この際、 $\delta_{ist#ik+tik}$ が一 定であると計算しやすいが、誘導体化反応において同位 体分別がある場合には(アミノ酸のアシル化における炭 素、アルコールのアセチル化における炭素など)、 $\delta_{ist#ik+tik}$ が一定にならないので、 $\delta_{ist#ik+tik}$ の計算が困難になる. この困難を克服するため、これまでに様々な取り組みが なされてきたが,残念ながら,優れた解決法は未だに開 発されていない.

#### 2.4.7. GC カラムの選択

GC カラムは、測定対象の有機化合物の分子量や極性 などに応じて、様々なものが販売されている。それらの うち、カラムの固定相にハロゲン(F など)が含まれて いるものを除いたほとんどのカラムが、GC-IRMS で使 用することができる。一般的に、無極性や微極性の内径 0.32 mm×長さ 30 m もしくは 60 m の低ブリードカラ ム(例えば、Agilent 社製の HP-1 MS や HP-5 など)で、 固定相の膜厚が薄いタイプ(0.1 から 0.32 µm)が用い られる。膜厚の厚いカラムは、GC オーブン温度の上昇 に伴い、カラムから固定相が溶出し、クロマトグラムの バックグラウンドを上昇させるだけでなく、燃焼炉や還 元炉内の反応剤の著しい劣化の原因になるため、その点 に留意されたい。

キャリアーガスの流速は、GC-MS などに比べると遅 い1.0 から1.4 ml/分の範囲の定流量(constant flow) に設定されることが多く、これは熱分解炉や燃焼炉にお いて十分な反応時間を確保するためである。例えば、早 い流速(例えば、2.0 ml/分)では反応効率の著しい低下 に伴う同位体分別が生じることによって、正確な同位体 比を得ることが困難になり(Chikaraishi et al., 2010)、ま た極端に遅い流速(例えば、0.5 ml/分)ではGC のピー ク分離能の著しい低下によって、クロマトグラム上での ベースライン分離(2.4.6 章を参照)が難しくなるため である.

測定対象の有機化合物によってどの GC カラムを選択 するべきかはケースバイケースであるが,以上の要素を 参考に決定して頂きたい.

#### 2.4.8. 同位体比のキャリブレーション

試料に含まれる有機化合物の同位体比を得るために は,一般的に,同位体比既知の標準有機化合物(Reference materials, Schimmelmann et al., 2016)を用意し,

- (1)標準ガスの同位体比を0%として,標準有機化合物の測定を行い,測定値と標準有機化合物も持つ既知の値の関係式(1次相関式)を作成する(図8)
- (2)標準有機化合物の測定時と同じ条件で試料を測定し、(1)の関係式を用いて試料の同位体比を計算する

という方法が一般的である.種々の標準有機化合物 (Reference materials)は、IAEA やインディアナ大学\*5, 昭光サイエンス\*6などから販売されている.(1)の関係 式(図8)の作成においては、測定対象の有機化合物の同 位体比の範囲を、できるだけ広くカバーできるように複 数の標準有機化合物を用いることが重要であり、この作 業こそが得られた結果(補正値)の確度の担保になる. また、(1)の関係式の傾きは、一般的に1.0にならないこ との方が多く、これは「IRMSの装置固有の特性」や 「GC-IRMS 系内での同位体分別」などに起因する.とく に後者は有機化合物の種類や測定条件にも依存するた め、標準有機化合物として採用する有機化合物は、測定 対象の有機化合物と同一のもの、またはできるだけ構造 が類似したものを採用する必要がある.

なお、同位体比既知の標準ガスを用いて、その標準ガ スの同位体比から試料の有機化合物の同位体比を計算す るキャリブレーション法を用いている論文等が多く存在 する.これは、「(1)の関係式の傾きを1.0」と仮定した 上で算出された方法であり、同位体的に正しい値が得ら れてない(=確度が十分に担保されていない)可能性に 留意したい.

#### 3. 生理・生態学研究への利用

ここまでは、安定同位体比の天然存在度を測定するための装置:GC-IRMSの基本原理を解説してきた.ここ



図8:GC-IRMS で得られた測定値(x軸)に対する同位体比 既知の標準有機化合物のδ値(y軸)の関係

からは、実際に測定して得られた安定同位体比の天然存 在度から、何をどのように評価できるかについて、その 利用方法の一部を紹介する。

安定同位体の天然存在度に差をもたらす要因のひとつ が「同位体分別」であり、その変化の法則性は、2.3で述 べたように「平衡論的同位体分別」または「速度論的同 位体分別」のいずれかで説明可能である.特に,生物を 介する反応における同位体分別は、後者によって決定さ れることが多い. 同位体分別は生物体内で起こるあらゆ る代謝(生合成や分解)の反応プロセスにおいて起こっ ているが、実際に私たちがその同位体比の変化を、観測 したり評価したりすることが可能な「有機化合物」と「元 素」の組み合わせは、ごく一部に限られている、その組 み合わせの中で、近年頻繁に用いられるようになったも ののひとつに「アミノ酸」の「安定窒素同位体比」で分 解量を評価するという手法がある. この方法論が成立す る理由は、生物体内におけるグルタミン酸(アミノ酸) の分解(異化)プロセスの最初の反応である「脱アミノ 酵素反応」における速度論的同位体分別が、式4に示す レイリーモデルに従うためである.

$$\Delta \,\delta^{15} \mathbf{N} \doteq 1000 \left[ F^{(\alpha - 1)} - 1 \right] \tag{$\mathbf{t}$4}$$

 $\Delta \delta^{15}$ N は、反応前後での同位体比の変化 ( $\delta^{15}$ Nt=x- $\delta^{15}$ Nt=0)を、Fは、反応のフラックス (反応前を1とし て、全て反応すると0)示す.また、 $\alpha$ は同位体効果を示 し、およそ0.9938 と見積もられている (図 9, Goto et al,

<sup>\*5</sup> https://hcnisotopes.earth.indiana.edu/reference-materials/inde x.html

<sup>\*6</sup> https://www.shoko-sc.co.jp/products/stable\_isotope/reagent/ standard/index.html

2018). この理論に基づくと, 例えば, 生物同士の捕食— 被食関係, すなわち「捕食者がエサを食べて消化し, そ の養分に含まれているグルタミン酸を分解してエネル ギーを獲得する」という過程においては, エサから摂取 したグルタミン酸のうち, 約 70%が分解された時, 分解 されずに残ったグルタミン酸の δ<sup>15</sup>N 値は約 8‰上昇す るという関係性が導き出される.

このような知見を応用することによって、生物の生理 学的な現象(代謝の状態,エネルギーの獲得・蓄積・消 費,それらの効率化や制限要因など)や、生態学的な現 象(生態系ピラミッドにおける生物の位置,エネルギー の流れなど)を、定量的に理解することができる.前者 の学問分野は「同位体生理学」、後者の学問分野は「同位 体生態学」と呼ばれている.また、両者を合わせて、「同 位体生理生態学」と呼ばれることもある.以下に、GC-IRMS(正確には、GC-IRMSを用いて得られた有機化合 物、特にアミノ酸の同位体比)が理解に貢献した生理・ 生態学研究について紹介する.

まず, 生物を構成するアミノ酸分子の「分解(異化) 過程における窒素同位体分別」に着目したことによって 発展した同位体生態学研究の原理を紹介する(具体的な 応用例は、本誌第2章「アミノ酸の安定同位体比を用い た生態系解析」を参照されたい). 生体を構成するアミ ノ酸は20種類あり、それぞれのアミノ酸がどのような 分解(異化)のプロセスを経るかによって、アミノ酸ご との同位体分別に差がもたらされる. 例えば、分解(異 化)の初期反応が「脱アミノ酵素反応」であるアラニン、 バリン、イソロイシン、グルタミン酸などは、同位体生 態学分野で「Trophic アミノ酸」と呼ばれ、これらのア 視点で見ると、被食者よりも捕食者の方が高くなる.こ れは,脱アミノ化がおこなわれる際に,<sup>14</sup>Nを持つアミ ノ酸のアミノ基から優先的に反応することで同位体分別 が起こること、その結果として捕食者の内部で<sup>15</sup>Nが濃 縮することによって説明できる。一方で、フェニルアラ ニンやメチオニンなどの、分解(異化)の初期反応が脱 アミノ化ではない(ヒドロキシル化やアデノシル化であ る)アミノ酸は「Source アミノ酸」と呼ばれ,窒素同位 体比に顕著な同位体分別は見られず、その結果として捕 食者と被食者とでアミノ酸の窒素同位体比がほとんど変 化しない.

これらの「分解(異化)に伴うエネルギーの確保」と、 一部のアミノ酸にみられる「分解(脱アミノ化)に伴う 窒素同位体分別」は、生産者から高次捕食者に至るまで の食物連鎖の中で連続的に起こっているため、生態系ピ



図9:グルタミン酸の脱アミノ化における同位体分別

ラミッドの上位の生物ほど Trophic アミノ酸の  $\delta^{15}$ N値 は高い値となり、一方で Source アミノ酸の  $\delta^{15}$ N値はピ ラミッドの中のいずれの栄養段階に位置する生物であっ ても、一次生産者(植物や植物プランクトン)とほとん ど変わらない(Chikaraishi et al., 2007). これら2種類 のアミノ酸の同位体分別の特徴に基づいて作られたの が、以下の一般式(式5)であり、この式を用いること で、生態系ピラミッドにおける生物の位置(栄養段階) を正確に推定することができるようになった (Chikaraishi et al, 2009).

栄養段階 = 
$$(\delta^{15}N_{Tr} - \delta^{15}N_{Src} + \beta) / (\Delta_{Tr} - \Delta_{Src}) + 1$$
  
(式 5)

られる普遍的なものである. βは, 植物プランクトンや シアノバクテリアを一次生産者とする生態系で-3.4‰, 陸上の維管束植物を一次生産者とする生態系で+8.4‰ と見積もられている(Chikaraishi et al., 2011). この方 法論を実際に応用研究へ用いる際は,これらの値を式(5) に代入して生物の栄養段階を算出する.

続いて、生物を構成するアミノ酸の炭素同位体比に着 目して、最近明らかになった同位体生理生態学に関連す る研究の原理を紹介する. 生物は多種多様な有機化合物 によって構成され、その活動は、 有機化合物が生体内で 様々な反応を伴った代謝(生合成や分解)をすることで 維持されている。生体内における代謝プロセスは非常に 多様かつ複雑であることから、その中から「同位体分別 が生じる反応を特定し、どの分子の何の元素に記録され るかを特定する」ことは、困難であると考える研究者も 少なくない. それに加えて, 従来「有機化合物の同位体 分別は、軽い同位体同士の結合(例えば<sup>12</sup>C-14N)の開裂 が、重い同位体を含む結合の開裂(例えば<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N)より も優先して起こることによって発生する」(例えば、 Chikaraishi 2014)と考えられてきたが、その理論では十 分に説明することができない同位体比の変化が多く報告 されていた\*7. この事実は、それまで同位体を用いて研 究してきた多くの研究者の頭を悩ませるのみならず,「有 機化合物の安定同位体」という評価手法そのものの信頼 性を揺るがす大きな要因のひとつとなっていた.

しかし近年になり、生物の代謝反応における同位体分 別は、主に、水素化、脱水素化、炭酸固定、脱炭酸、ア ミノ化、脱アミノ化などの「元素の付加」や「脱離」を 伴う反応や、巨大プール(貯蔵物質)が「分解(酵素分 解) される際の初期反応」により生じることがわかって きた. とくに動物(従属栄養生物)は、エサから得た有 機物を分解することによってエネルギーを獲得している ため、エネルギーを取り出すための主な代謝機構である 中央代謝に関わる生化学的・生理学的な反応が、有機化 合物の安定同位体比を決定すると考えることができる. 実際に Takizawa et al. (2020) では、これまでにも述べ てきた「アミノ酸分解における脱アミノ化」に加えて、 「中央代謝(解糖系とクエン酸回路)における脱炭酸」と の、双方の同位体分別が、アミノ酸の窒素同位体比・炭 素同位体比それぞれに色濃く反映されるという仮説を提 唱した.この仮説は、生体内で生じる様々な同位体比の

変化を矛盾無く説明できるとして,注目されている.

#### 4. おわりに

GC-IRMS が開発されてから約 30 年が経った. しか しながら、私たちが測定可能な有機化合物や元素は、依 然として,一部の脂質の水素・炭素やアミノ酸の窒素に 限られている、そこには乗り越えなくてはならない方法 論的な課題(例えば、良い誘導体化法が見つかっていな い. それを解決するためのアイデアがないなど)もある が、GC-IRMS を用いた測定では、GC-MS などに比べ、 要求される試料量が多く(GC-MS が pmol であるのに 対し、GC-IRMS は nmol)、そもそも存在量の少ない試 料の同位体比を測定することができないという課題も無 視できない. これは、GC-IRMS のオペレーション(確 度・精度を維持すること)が他の分析装置に比べて難し いこと、そして、使用する研究者や学生が、複雑な装置 の内部構造や機能を十分に理解することができないこと などに原因があると考えられる. これらの課題を一度に 全て解決することは容易ではないが、本稿によって、 GC-IRMS という装置のポテンシャルが少しでも伝えら れたら、これから先、様々な分野で重要な研究手段の一 つとして積極的に使われるようになること、そして、優 れた研究成果をもたらすことに少しでも貢献出来れば幸 いである.

#### 謝辞

本稿の内容は、日本学術振興会科学研究費、若手研究 20K14590(研究代表者 滝沢侑子)、基盤研究A(一般) 20H00185(研究代表者 力石嘉人)、挑戦的研究(萌芽) 19H21888(研究代表者 力石嘉人)及び、シリコーン工 業会(Silicon Industry Association of Japan)からの寄付 金で実施した研究成果の一部を取りまとめたものであ る.

#### 引用文献

- Evershed, R. P., Bull, I. D., Corr, L. T., Crossmann, Z. M., van Donhgen, B. E., Evams, C. J., Jim, S., Mottram, H. R., Mukherjee, A. J. and Pancost R. D. (2007) Compoundspecific stable isotope analysis in ecology and paleoecology. In *Stable isotopes in Ecology and Environmental Science* (Michener, R. and Lajtha, K. eds), pp 480–540. Blackwell Publishing.
- 力石嘉人・大場康弘(2008)ガスクロマトグラフ/同位体比 質量分析計による分子レベル安定同位体比分析法. Res.

<sup>\*7</sup> 呼吸により排出される二酸化炭素の同位体比が基質に比べて低 くならないことや、アミノ酸の脱アミノ化において炭素と窒素 の同位体分別が同調しないことなど、「結合の開裂」による同位 体分別では説明できない現象が多い。

- Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) An improved method for precise determination of carbon isotopic composition of amino acids. In *Earth, Life, and Isotopes* (Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., eds), Kyoto University Press, pp. 355–366.
- Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2007) 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.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr.: Meth.*, 7, 740–750.
- Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N. O. and Ohkouchi, N. (2010) Instrumental optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. In *Earth, Life, and Isotopes* (Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., eds), Kyoto University Press, pp. 367–386.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Doi, H. and Ohkouchi, N. (2011) <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N ratios of amino acids as a tool for studying terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and hornets). *Ecol. Res.* **26**, 835–844.
- Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, F. N., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. and Ohkouchi, N. (2014) Highresolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecol. Evol.*, 4, 2423–2449.
- Corr, L. T., Berstan, R. and Evershed, R. P. (2007) Development of *N*-acetyl methyl ester derivatives for the determination of  $\delta^{13}$ C values of amino acids using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **79**, 9082–9090.
- Goto, A. S., Miura, K., Korenaga, T., Hasegawa, T., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2018) Fractionation of stable nitrogen isotopes (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) during enzymatic deamination of glutamic acid: implications for mass and energy transfers in the biosphere. *Geochem. J.*, **52**, 273–280.

- Hayes, J. M., Freeman, K. H., Popp, B. N. and Hoham, C. H. (1990) Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Org. Geochem.*, 16, 1115–1128.
- Leckrone, K. J. and Hayes, J. M. (1997) Efficiency and temperature dependence of water removal by membrane dryers. *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 911–918.
- Leckrone, K. J. and Hayes, J. M. (1998) Water-Induced Errors in Continuous-Flow Carbon Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **70**, 2737–2744.
- Ricci, M. P., Merritt, D. A., Freeman, K. H. and Hayes, J. M. (1994) Acquisition and processing of data for isotope-ratiomonitoring mass spectrometry. *Org. Geochem.*, **21**, 561– 571.
- Rieley G. (1994) Derivatization of organic compounds prior to gas chromatographic-combustion-isotope ratio mass spectrometric analysis: Identification of isotope fractionation processes. *Analyst*, **119**, 915–919.
- 酒井均・松久幸敬(1996)安定同位体地球化学.東京大学出版会
- Saurer, M., Robertson, I., Siegwolf R. and Leuenberger, M., (1998) Oxygen isotope analysis of cellulose: An interlaboratory comparison. *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2074–2080.
- Schimmelmann, A., Qi, T., Coplen, T. B., Brand, W. A., Fong, J., Meier-Augenstein, W., Kemp, H. F., Toman, B., Ackermann, A., Assonov, S., Aerts-Bijma, A. T., Brejcha, R., Chikaraishi, Y., Darwish, T., Elsner, M., Gehre, M., Geilmann, H., Gröning, M., Hélie, J. -F., Herrero-Martín, S., Meijer, H. A. J., Sauer, P. E., Sessions, A. L., and Werner, R. A. (2016) Organic reference materials for hydrogen, carbon, and nitrogen stable isotope-ratio measurements: caffeines, *n*alkanes, fatty acid methyl esters, glycines, L-valines, polyethylenes, and oils. *Anal. Chem.*, **88**, 4294–302.
- Sessions, A. L. (2006) Isotope-ratio detection for gas chromatography. J. Sep. Sci., 29, 1946–1961.
- Takizawa, Y., Takano, Y., Choi, B., Dharampal, P. S., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2020) A new insight into isotopic fractionation associated with decarboxylation in organisms: implications for amino acid isotope approaches in biogeoscience. *Prog. Earth Planet. Sci.*, 7, 1–13.

## アミノ酸の安定同位体比を用いた生態系解析

#### 力石 嘉人<sup>1)</sup>

2020年12月5日受付, 2021年2月10日受理

アミノ酸の安定窒素同位体比の測定法の開発と方法論の確立を経て,生物の栄養段階(生態系ピラ ミッドにおける階層)が優れた精度で推定できるようになったことにより,生物・生態系の研究は飛 躍的に発展した.実際に,複雑な食物連鎖網における捕食一被食の関係や,生態系の中で何が起こっ ているのか,環境変化に対する影響や生物の適応などが正確に理解できるようになった.本稿ではそ の原理と応用研究を解説する.

#### Food webs viewed via stable nitrogen isotopic composition of amino acids

#### Yoshito Chikaraishi

Stable nitrogen isotope analysis of individual amino acids can be useful to illustrate the trophic position of organisms in food webs, and therefore has resulted in impressive advances in ecological studies. Indeed, this analysis has provided unprecedented accuracy in predicting the trophic tendencies of organisms, describing their interactions in complex food webs, elucidating the adaptation of organisms to environmental changes, etc. Here, we briefly review the principal of this tool and its application.

キーワード:安定同位体,窒素,アミノ酸,栄養段階,食物連鎖 Stable isotope, Nitrogen, Amino acid, Trophic position, Food web

#### 1. はじめに

自然界の生態系では、生物間の捕食一被食の関係が極 めて複雑に絡み合っており、その全容を観察等から正確 に理解することは難しい、そこで生態学では、一次生産 者(例:植物プランクトン)を「1」として、それを食べ る一次消費者(例:動物プランクトン)を「2」、それを 食べる二次消費者(例:小さい魚)を「3」、さらにそれ を食べる三次消費者(例:大きい魚)を「4」とする「栄

連絡先 力石 嘉人 北海道大学低温科学研究所 〒060-0819 札幌市北区北19条西8丁目 Tel.011-706-5472 e-mail:ychikaraishi@lowtem.hokudai.ac.jp 1)北海道大学低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan 養段階」という概念を導入し、生態系ピラミッドにおける生物の位置(または、階層)を定量的な数字で捉えることで、複雑な生態系を単純化して理解してきた(図1)、実際に、この栄養段階(値)もしくはその変化を知ることで、我々は、生物が何を食べているのかといった食性解析のみならず、生態系におけるそれぞれの生物の機能・役割や、人類活動が自然界の生物・生態系に与えている影響を評価してきた(例えば、VanderZanden et al., 1999).

栄養段階を求める(数値化する)ために,これまで生 態学では様々な手法が用いられてきた.しかし,自然界 では,植物と草食動物を除く生物の多くが雑食者(omnivore:植物と動物の両方を食べる動物,multiple carnivore:様々な栄養段階の動物を食べる動物)であるた めに,研究対象の生物の「エサ生物」の特定は容易では ない.また,たとえ数値化できたとしても,得られた値 には大きな誤差(例えば,栄養段階で±1~2)が潜在的 に含まれており,導き出した値の正確さを担保できな



図1:生態系ピラミッドの概念図と栄養段階

かった. 例えば、体や口の大きさ、歯の形などを観察す ることで、生物間の相互関係を推定することも可能では あるものの、栄養段階の「数値化」に至るのは困難であ る. また, 胃内容物の解析は, 研究対象の生物が実際に 摂食したものがわかる一方で、自然界における捕食活動 の一瞬のスナップショットでしかない. その上, 胃の中 に残存するものと捕食者が吸収したものは必ずしも一致 しないというという問題があった. そこで、これまでの 手法のデメリットを克服しうる手法として、2007~2009 年にかけて、アミノ酸の窒素同位体比に基づく生物の栄 養段階解析法が提案された (Chikaraishi et al, 2009, McCarthy et al., 2009, Popp et al., 2009). これは, 生物に 含まれている2種類のアミノ酸の安定同位体比(<sup>15</sup>N/ <sup>14</sup>N)の差を計測することによって生物の栄養段階を正 確に推定する手法であり、提案されてから約10年の間 に様々な研究に応用されるようになった.本稿では、そ の原理と代表的な研究例を紹介したい.

#### 2. 原理

#### 2.1. 安定同位体比の表記

アミノ酸は,水素・炭素・窒素・酸素・硫黄などの元 素で構成され,これらの元素には質量が僅かに異なる安 定同位体が存在する。例えば,窒素の場合,99.6337%が 質量数14の窒素14(<sup>14</sup>N)で,残りの0.3663%が質量数 15の窒素15(<sup>15</sup>N)であり,安定同位体比の比率(<sup>15</sup>N/ <sup>14</sup>N)は0.0036765となる。しかしこの値は,地球上の 様々な生化学的反応において,質量が異なることに起因 する「軽い同位体(例えば,窒素の場合には<sup>14</sup>N)の優先 的な反応」が起こるために,元素の起源,反応過程,反 応量などで変化する(<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>Nの小数点4,5桁目が変化 する).

試料に含まれる安定同位体の比率の表記には,一般的 に,国際的に定められた標準物質に対する千分率(δH 値, 単位‰,式1)が用いられている.

$$\delta H$$
値 = [( $R_{itt}/R_{標準物質}$ ) - 1] × 1000 (式 1)  
ただし、 $R = H/L$ 

HとLは, それぞれ重い (例えば, <sup>15</sup>N) と軽い (例えば, <sup>14</sup>N) 同位体の存在量を表す. 従って, δH 値は, 窒素の 場合には δ<sup>15</sup>N 値と表記する. 試料の δH 値が正であれ ば, 標準物質に対して重い同位体 (H) が富むことを意 味し,反対に負であれば,軽い同位体 (L) が富むことを 意味する.

#### 2.2. 食物連鎖におけるアミノ酸の <sup>δ15</sup>N 値の変化

生物を構成する 20 種類のアミノ酸には、食物連鎖の 捕食者と被食者の間で、δ<sup>15</sup>N 値がほとんど変化しない Source アミノ酸 (Src-AA, 例えば, フェニルアラニン, メチオニンなど)と、 ô<sup>15</sup>N 値が 3-8‰上昇する Trophic アミノ酸(Tr-AA, 例えば、グルタミン酸、アラニン、 バリンなど)の2種類がある(図2,図3)<sup>\*1</sup>.Src-AA は、分解(エネルギーを取り出すための異化)の初期反 応にアミノ酸のアミノ基(窒素)が関与しないため、捕 食者が Src-AA を分解しても ∂<sup>15</sup>N 値がほとんど変化し ない. 一方で Tr-AA は, 分解の初期反応がアミノ基の 脱離反応であるために、<sup>14</sup>N が優先的に反応し、その結 果、分解されずに残されたアミノ酸(このアミノ酸は後 に捕食者の体を構築する)に<sup>15</sup>Nが濃縮する(例えば, Chikaraishi et al., 2007, Takizawa et al., 2020). そしてこ のプロセスが、魚、甲殻類、昆虫、哺乳類、バクテリア などの多くの生物の間で共通して成立するため(例えば、 Steffan et al., 2015, Yamaguchi et al., 2017, McMahon and McCarthy, 2016), 植物プランクトンから高次捕食者ま で、生態系を構成する様々な生物の栄養段階が、以下の - 般式 (式 2) により推定できる (Chikaraishi et al., 2009).

栄養段階 = 
$$(\delta^{15}N_{Tr} - \delta^{15}N_{Src} + \beta) / (\Delta_{Tr} - \Delta_{Src}) + 1$$
  
(式 2)

<sup>\*&</sup>lt;sup>1</sup>「Source アミノ酸, Trophic アミノ酸」の分類は、生体内でのア ミノ酸の「分解反応」により決定される. 一方で, 一般的に使 われている「必須アミノ酸, 非必須アミノ酸」の分類は、生体 内でのアミノ酸の「合成反応」により決まっている. また, Source アミノ酸なのか Trophic アミノ酸なのか, もしくは、さ らに別の分類になるのかがわかっていないアミノ酸も多い.



図2:アミノ酸の分類

栄養段階 = 
$$(\delta^{15}N_{\mathcal{P}^{N}\mathcal{P}^{z} > \mathfrak{F}} - \delta^{15}N_{\mathcal{P}^{z} = \mathcal{P}} + \beta)/$$
  
(8.0-0.4)+1 (式 3)

フェニルアラニン, グルタミン酸のΔ値はそれぞれ 0.4‰, 8.0‰である.フェニルアラニン, グルタミン酸 を用いた場合には, βは陸上植物(正確には,水草も含む 維管束植物)を基点とする生態系では8.4‰であり,海 水・淡水における植物プランクトンやシアノバクテリア を基点とする生態系では-3.4‰となる(Chikaraishi et al., 2010).

なおこの原理が,全ての生物において成立する(同じ,  $\Delta_{Src}$ ,  $\Delta_{Tr}$  値を持つ)かどうかは,残念ながら十分にわ かっていない(例えば, McMahon and McCarthy, 2016). 測定法の信頼性を担保するうえで,様々な生物が持つ  $\Delta_{Src}$ ,  $\Delta_{Tr}$  値やそのバラツキ(そしてその要因)を知る 必要があるが,同位体比が一定の工サを用いて,アミノ 酸のターンオーバーを考慮したうえでの十分な期間の飼 育を実施(これを controlled feeding experiment という)



栄養段階

図3:食物連鎖におけるアミノ酸の安定窒素同位体比の変化

することは容易ではない. そのため, とくに, 単一のエ サでの飼育が難しいとされる生物(爬虫類, 鳥類, 大型 の動物など)や, 寒冷域や無酸素環境などといった特殊 な条件下で生育する生物に関するデータが著しく不足し ている.

#### 2.3. アミノ酸の ð<sup>15</sup>N 値の測定

アミノ酸の δ<sup>15</sup>N 値の測定は一般的に,(1) 試料の酸加 水分解,(2) 誘導体化と精製,(3) ガスクロマトグラフ— 同位体比質量分析計(gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer: GC-IRMS)による δ<sup>15</sup>N 値の測定に より実施される. 「(1) 試料の酸加水分解」では,試料に



図4:アミノ酸のδ<sup>15</sup>N 値より求められた相模湾沿岸の岩礁域の生態系構造(Chikaraishi et al., 2014 を改変)

濃塩酸(HCl)を加え加熱することで、試料中のタンパク 質をアミノ酸に加水分解する. 「(2)粗精製と誘導体化」 では,まず試料中の脂質成分を液一液抽出により除去し, アミノ酸が持つ「高い親水性、極性」という性質を、誘 導体化(本誌,第1章,安定同位体の天然存在量および 安定同位体標識の検出法―1:ガスクロマトグラフ-同位 体比質量分析計を参照)により低下させ、また、GC-IRMS へ導入できるように精製する.これまでに、様々 な誘導体化法が検討され用いられてきているが、試薬の 毒性,誘導体化後のアミノ酸の安定性,GC-IRMS への 負荷、誘導体化反応における同位体分別など様々(一長 一短) である (Ohkouchi et al., 2017) ため, それぞれの研 究室の環境にあわせて誘導体化法を選択する必要があ る. またそれと並行して, 誘導体化剤の毒性が低く, 誘 導体化されたアミノ酸の安定性が高く,また GC-IRMS ヘ与える負荷と人為的な同位体分別の影響が最小限にと どめられるような理想的な誘導体化法を開発する必要が ある、なお著者の研究室では、アミノ酸のカルボキシル 基 (-COOH) をイソプロピルエステル化し、アミノ基を ピバロイル化するピバロイル/イソプロピル (pivaloyl/ isopropylesters, Pv/iPr) エステル化を用いている. 「(3) GC-IRMS による ∂<sup>15</sup>N 値の測定」では、GC-IRMS によ る δ<sup>15</sup>N 値の測定では、1 度の試料導入に対して、そこに 含まれる個々のアミノ酸の δ<sup>15</sup>N 値が測定される.δ<sup>15</sup>N 値の測定に必要な時間は一般的に1測定あたり約1~ 1.5時間, 試料量はアミノ酸一分子あたり窒素量で数ナ ノモル, 測定精度は0.4~0.8‰ (1 σ) 程度である. この 測定手法は、冷凍試料や乾燥試料だけでなく、ホルマリ

ンなどで固定されたもの, 貝殻や骨, 歯などの硬組織中 に含まれているタンパク質にも問題なく用いることがで きる (例えば, Ogawa et al., 2013, Chikaraishi et al. 2014). 実際に, 少なくとも数万年前の人骨や動物骨などの考古 学的試料への応用も実施されている (例えば, Naito et al., 2010, 2013, 2016, Itahashi et al., 2018, 2019).

#### 3. 実試料への応用

#### 3.1. 岩礁域生態系の構造解析

岩礁域では、多種多様な生物が生息し、また、捕食― 被食関係が絡み合っているため、複雑な生態系構造を持 つ. Chikaraishi et al. (2014) は、相模湾沿岸の岩礁域に 生息する海藻, 貝, カニ, エビ, 魚などの様々な生物を 採取し、アミノ酸の δ<sup>15</sup>N 値から栄養段階を求め、岩礁域 の生態系構造を視覚化した(図4).アミノ酸のδ<sup>15</sup>N値 から見積もられた栄養段階は、ワカメなどの海藻が 0.9~1.1. アワビやサザエなどの海藻食の貝やウニなど が1.7~2.0であり,前者が一次生産者,後者が一次消費 者であることがわかる。また、カニ・ヤドカリ・牡蠣な どの栄養段階は、2.2~2.6であり、これらの値から彼ら が omnivore (植物と動物の両方を食べる雑食動物) であ ることがわかる、さらに様々な魚、伊勢エビ、マダコな どの栄養段階は、それぞれ、2.9~4.6、3.9、3.8 に分布 し、彼らはこの海域における multiple carnivore (様々な 栄養段階の動物を食べる雑食動物)であることがわかる. このように、アミノ酸の d<sup>5</sup>N 値から求めた栄養段階(誤 差が±0.1~0.2)から、雑食性のカニの中でも藻食性が



図5:アミノ酸のδ<sup>15</sup>N 値より求められた,植物葉,キノコ,ハキリアリ,ハ キリアリの体に付いているバクテリアの栄養段階(Steffan et al., 2015).写 真:(A)植物葉を切り取っているハキリアリ,(B)切り取った葉を巣に運ん でいるハキリアリ,(C)栽培されているキノコ(菌類),(D)アリの体に付い ている白いバクテリア

強いものから肉食性の強いものがいることや, 魚でも種 類によって食性が多様であることを明らかとなった.

#### 3.2. ハキリアリが構築する生態系

ハキリアリは、北アメリカの東南部や中南米の熱帯雨 林に生息するアリである.キノコ(菌類)をエサとしてい るが、そのキノコはハキリアリ自らが、様々な木の葉を切 り取り、巣に運び、巣の中で栽培したものである. Steffan et al., (2015) は、ハキリアリの生態系を実験室で飼育・ 再現し、基礎生産者である植物の葉(Quercus macrocarpa), それを基に育てられたキノコ (Leucoagaricus gongylophorus), ハキリアリ (Acromyrmex echinatior), そしてハキリアリの体に付いているバクテリア (Actinobacteria: Pseudonocardia) をそれぞれ採取し、 アミノ酸の ∂<sup>15</sup>N 値から栄養段階を算出し, 生態系構造 を視覚化した(図5). アミノ酸の d<sup>15</sup>N 値から見積もら れた栄養段階は,植物葉が1.0±0.1,キノコが2.0±0.1, アリが3.0±0.2であり、当初の予想通りに、「植物葉は キノコのエサ」であり、また、「キノコはアリのエサ」で あることが証明された. さらに興味深いことに、ハキリ アリの体に付いているバクテリアの栄養段階は4.0± 0.2であり、ハキリアリはバクテリアに食べられており、 バクテリアはこの生態系において栄養段階の頂点にいる ことが明らかとなった.

#### 3.3. 海鳥の栄養段階の推移

ハワイ諸島には, Hawaiian Petrel (*Pterodroma sand-wichensis*) という海鳥が生息しており,彼らはイカや魚などを捕食する multiple omnivore であると考えられている. Hawaiian Petrel の体サイズは,この数百年間で著しく減少したことが骨格標本などの記録からわかって



図 6:2000-2500 年前, 300-400 年前, 現在の Hawaiian Petrel の骨コラーゲンに含まれるアミノ酸(グルタミン酸とフェニ ルアラニン)の ∂<sup>15</sup>N 値, および求められた栄養段階(Ostrom et al., 2017)

いる. 一般的に, 生態系の上位にいる生物は, 環境変化 に対して最も影響を受けやすいと考えられいるため, Ostrom et al. (2017) は, 2000-2500 年前, 300-400 年前, 現在の Hawaiian Petrel の骨から, 骨コラーゲンに含ま れるアミノ酸の  $\delta^{15}$ N 値を測定し, それぞれの年代の Hawaiian Petrel の栄養段階を算出した(図 6). 骨コ ラーゲンに含まれるフェニルアラニンとグルタミン酸の  $\delta^{15}$ N 値および栄養段階は, 2000-2500 年前と 300-400 年 前の試料の間ではほとんど変化しなかったのに対し, 300-400 年前と現在の試料の間では, フェニルアラニン の  $\delta^{15}$ N 値が 1.0‰の上昇を, グルタミン酸の  $\delta^{15}$ N 値が 1.6‰の減少を示し, それに伴い栄養段階が 0.3 減少し た. この年代(300-400 年前~現代)は, ハワイ諸島周辺 において産業漁業が発展した時期であり, このことから, Hawaiian Petrel と人間との間で, 魚などのエサ資源の



図7:アミノ酸の∂<sup>5</sup>N 値より求められた,アメリカ・五大湖 (Superior 湖と Michigan 湖)の Coregonus 種の栄養段階: 灰色が絶滅前で赤色が現存種 (Blanke et al., 2018)

競争が激化したこと,それに伴いハワイ近海の生態系ピ ラミッドのサイズが小さくなった(食物連鎖が短くなっ た)ことが考えられた.

#### 3.4. 五大湖の Coregonus 種の栄養段階の推移

アメリカ合衆国の五大湖には、かつて多くの種類の Coregonus 種(サケ科の淡水魚)が生息していたが、現 在ではその多くが姿を消し、数種が確認できる程度であ る. Blanke et al. (2018) は、絶滅前に捕獲され、ホルマ リン漬けで保管されていた7種,そして現在の湖から採 取した2種の Coregonus 種を対象に、アミノ酸の δ<sup>15</sup>N 値を測定し、絶滅前後における栄養段階の変化を比較し た(図7).アミノ酸のδ<sup>15</sup>N値から見積もられた栄養段 階は、絶滅前の Coregonus 種では 3.4~4.2 と多様であ り, C. hoyi と C. kiyi の 2 種では 4.0 以上という高い値 となった.一方で,現存する C. hoyi と C. kiyi の2種の 栄養段階は、それぞれ、3.8、3.4 であり、絶滅前に比べ て栄養段階は著しく低下していることがわかった.この 結果は, Ostrom et al. (2017) で述べたように, 生態系に 対する人間の介入(過剰な漁業による大きな環境変化) によって、C. hovi と C. kivi の2種は、短い食物連鎖の 中で生きることを強いられている(短い食物連鎖に適応 できたために生き残れた)ことを示唆している.一方で, 他の多くの Coregonus 種は、このような外圧や大きな環 境変化に耐えられなかったために絶滅してしまったと考 えることができた.

#### 3.5. 環境変化に伴う生物の栄養段階の変化

植物と草食動物を除く多くの生物の食性は、3.3. や 3.4. 章で述べてきたように、環境の変遷に伴って変化 するポテンシャルを持っている. 多様な種類の生物を摂 食して生きていくことが可能な生物は、「ジェネラリス ト (generalist)」とよばれ、彼らの栄養段階は、環境の変 化(とくにエサ生物の多様性の変化)に対応して変化す ると考えられている.一方で、限定的な、あるいは単一 の種類の生物をエサとして食べる生物は、「スペシャリ スト (specialist)」とよばれ、彼らの栄養段階は、環境の 変化が起こったとしても変化せず、一定の値をもつと考 えられている.この概念に基づくと,先述の3.3,3.4. 章で示した Hawaiian Petrel や C. hoyi と C. kiyi は, generalist であるがゆえに、人間活動(漁業)によって生 息環境が著しく変化しても、食性(エサ生物のバランス) を変化させることで生き残り、一方で絶滅してしまった 多くの種類の Coregonus 種は, specialist であったため に、生息環境の変化に対応できなかったと解釈すること ができる. この仮説を証明するために, Choi et al. (2020) は、韓国の河川に生息するカマツカ(Pseudogobio esocinus, specialist の代表種) とブラックバス (Micropterus salmoides, generalist の代表種)を,河川の複数地点か ら採取し、アミノ酸の ∂<sup>15</sup>N 値から栄養段階とその標準 偏差(1o)を求め、生息数と生息環境のエサ資源の多様 性との関係を調べた(図8).その結果、カマツカの栄養 段階は、どのような生息環境であってもほとんど同じ値 を持つが(標準偏差は1σ=0.2と非常に小さい),その 個体数は、生息環境のエサ資源の多様性が小さくなると ともに、減少していることがわかった. 一方でブラック バスについては、生息環境のエサ資源の多様性が小さく なると栄養段階は上昇し, その際に標準偏差も小さくな ることがわかった.また、ブラックバスの個体数は、生 息環境が変化してもほとんど変化しなかった. この結果 は、generalist は、食性の多様性が大きいために、環境の 変化(エサ資源の変化)に順応して個体数を維持するこ

カマツカ(specialist)



図8:アミノ酸のδ<sup>45</sup>N値より求められた,カマツカとブラック バスの栄養段階とそのバリエーションの変化,生息数(標準分 布のサイズ)と生息環境のエサ資源の多様性との関係(Choi et al., 2020).

とができるのに対して, specialist は食性の多様性が小 さいために,環境の変化(エサ資源の変化)に対応でき ずに個体数を維持できなくなっていることを,明確に示 した.

#### 4. 今後の課題

研究対象の生物に含まれるアミノ酸のδ<sup>15</sup>N値に基づ いて、その生物の栄養段階を優れた精度(1σ=0.1~0.2) で推定できる解析手法を確立したことは、生態学分野に 大きなブレイクスルーをもたらし、この手法は、生態学 のみならず、考古学・海洋生物学・昆虫学・地球化学な どの周辺分野の研究においても積極的に用いられるよう になった、しかし、この手法を広く、多様な生物・生態 系に適用するためには、克服せねばならない以下の3つ の大きな課題がある。

- controlled feeding experiment により、様々な生物 種について、エサと飼育生物の間のΔsrc、Δtr 値を 決定すること(2.2参照)
- (2)用いる試薬の毒性が低く、化学的に安定な誘導体化物を生じ、かつGC-IRMSへの負荷が少なく、さらに人為的な同位体分別を生じない誘導体化法を、開発すること(2.3参照)

 (3) Δ<sub>Tr</sub> 値が,様々な生物種で一定になる原理・科学的 根拠(または,一定にならない時の特異的な条件) を明らかにすること

本誌第1章(安定同位体の天然存在量および安定同位 体標識の検出法—1:ガスクロマトグラフ-同位体比質量 分析計)で説明されているように、食物連鎖の捕食者と 被食者の間での Trophic アミノ酸の $\delta^{15}$ N値の上昇は、 捕食者が、エサ(被食者)由来のアミノ酸を、脱アミノ 化する際に生じる速度論的同位体分別のためであり、そ の程度(同位体分別の大きさ、 $\Delta_{Tr}$ )はレイリーモデル (式4)に従う.

$$\Delta_{\mathrm{Tr}} \approx 1000 \left[ F^{(\alpha-1)} - 1 \right] \qquad ( \vec{\mathfrak{X}} 4 )$$

 $\Delta_{\text{Tr}}$ が反応前後での同位体比の変化( $\partial^{15}N_{t=x} - \partial^{15}N_{t=0}$ ) を、Fが反応のフラックス(脱アミノ化されずに残った アミノ酸の割合)を、 $\alpha$ が反応固有の同位体効果(例え ばグルタミン酸の場合、 $\alpha=0.9938$ , Goto et al., 2018)を 示す.この式4に基づくと、 $\Delta_{\text{Tr}}$ 値は、脱アミノ化する 反応のフラックス(F)、すなわち「捕食者がエサ(被食 者)由来のアミノ酸をどのくらい分解したか」の関数に なる、シンプルに考えれば、Fは、生物の成育環境や条 件や、エネルギー消費量などにより多様になると考えら れるが、実際には、魚、甲殻類、昆虫、哺乳類、バクテ リアなどの多くの生物で、 $\Delta_{Tr}$ 値(とくにグルタミン酸) は、ほとんど一定の値を持ち(例えば、Steffan et al., 2015, Yamaguchi et al., 2017, McMahon and McCarthy, 2016), それ故、前述の 3.1~3.5 で述べたように、アミノ酸の  $\partial^{15}N$  値は、一次生産者から高次捕食者までの様々な生物 の栄養段階の推定に適用することができる。それでは一 体なぜ、多くの生物で $\Delta_{Tr}$ 値が類似した値になる(例え ば、グルタミン酸で 8.0‰という値が普遍的に見つかる) のか、一方で、一体どのような条件、環境で、この $\Delta_{Tr}$ 値 が変化するのかは、今後明らかにすべき課題である。

#### 謝辞

本稿の内容は、日本学術振興会科学研究費、基盤研究 A(一般)20H00185(研究代表者 力石嘉人)、挑戦的研 究(萌芽)19H21888(研究代表者 力石嘉人)及び、シ リコーン工業会(Silicon Industry Association of Japan) からの寄付金で実施した研究成果の一部を取りまとめた ものである。

#### 引用文献

- Blanke, C., Chikaraishi, Y. and Vander Zanden, M. J. (2018) Historical niche partitioning and long-term trophic shifts in Laurentian Great Lakes deepwater Coregonids. *Ecosphere*, 9, e02080.
- Chikaraishi, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kitazato, H., and Ohkouchi, N. (2007) 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.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2009) Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr.: Meth.*, 7, 740–750.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O. and Ohkouchi, N. (2010) Further evaluation of the trophic level estimation based on nitrogen isotopic composition of amino acids. In *Earth, Life, and Isotopes* (Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., eds), Kyoto University Press, pp. 37–51.
- Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, F. N., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. and Ohkouchi, N. (2014) Highresolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecol. Evol.*, 4, 2423–2449.
- Choi, B., Lee, C., Takizawa, Y., Chikaraishi, Y., Oh, H.-J. Chang,

K.-H., Jang, M.-H., Kim, H.-W., Lee, K.-L. and Shin, K.-H. (2020) Trophic response to ecological conditions of habitats: Evidence from trophic variability of freshwater fish. *Ecol Evol.*, **10**, 7250–7260.

- Goto, A. S., Miura, K., Korenaga, T., Hasegawa, T., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2018) Fractionation of stable nitrogen isotopes (<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N) during enzymatic deamination of glutamic acid: implications for mass and energy transfers in the biosphere. *Geochem. J.*, **52**, 273–280.
- Itahashi, Y., Tsuneki, A., Dougherty, S. P., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. and Yoneda, M. (2018) Reconstruction of Neolithic food consumption based on the ∂15N values for individual amino acids at Tell el-Kerkh, northern Levant. J. Archaeol. Sci.: Rep., 17, 775–784.
- Itahashi, Y., Erdal, Y. S., Tekin, H., Omar, L., Miyake, Y., Chikaraichi, Y., Ohkouchi, N. and Yoneda, M. (2019) Amino acid <sup>15</sup>N analysis reveals change in the importance of freshwater resources between the hunter-gatherer and farmer in the Neolithic upper Tigris. *Ame. J. Phys. Anthropol.*, **168**, 676–686.
- McCarthy, M. D., Benner, R., Lee, C. and Fogel, M. L. (2007) amino acid nitrogen isotopic fractionation patterns as indicators of heterotrophy in plankton, particulate, and dissolved organic matter. *Geochim Cosmochim Acta*, **71**, 4727–2744.
- McMahon, K. W. and McCarthy, M. D. (2016) Embracing variability in amino acid  $\delta 15$ N fractionation: mechanisms, implications, and applications for trophic ecology. *Ecosphere*, **7**, e01511.
- Naito, I. Y., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., Mukai, H., Shibata, Y., Honch, N. V., Dodo, Y., Ishida, H., Amano, T., Ono, H. and Yoneda, M. (2010) Dietary reconstruction of the Okhotsk Culture of Hokkaido, Japan, based on nitrogen isotopic composition of amino acids: implication for the correction of radiocarbon marine reservoir effects on human bones. *Radiocarbon*, 52, 671–681.
- Naito I. Y., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. and Yoneda, M. (2013) Evaluation of carnivory in inland Jomon hunter-gatherers based on nitrogen isotopic compositions of individual amino acids in bone collagen. J. Archaeol. Sci., 40, 2913–2923.
- Naito, Y. I., Drucker, D. G., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., Wißing, C., Semal, P. and Bocherens H. (2016) Ecological niche of Neanderthals from Spy cave revealed by nitrogen isotopes of individual amino acids in collagen. *J. Hum. Evol.*, 93, 82–90.
- Ohkouchi, N., Chikaraishi, Y., Close, H. G., Fry, B., Larsen, T., Madigan, D. J., McCarthy, M. D., McMahon, K. W., Nagata, T., Naito, Y. I., Ogawa, N. O., Popp, B. N., Steffan, S. A., Takano, Y., Tayasu, I., Wyatt, A. S. J., Yamaguchi, Y. T. and Yokoyama, Y. (2017) Advances in the application of amino acid nitrogen isotopic analysis in ecological and biogeochemical studies. Org. Geochem., 113, 150–174.

Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2013) Trophic

position estimates of formalin-fixed samples with nitrogen isotopic compositions of amino acids: an application to gobiid fish (Isaza) in Lake Biwa, Japan. *Ecol Res.*, **28**, 697–702.

- Ostrom, P. H., Wiley, A. E., James, H. F., Rossman, S., Walker, W. A., Zipkin, E. and Chikaraishi, Y. (2017) Broad-Scale Trophic Shift in the Pelagic North Pacific Revealed by an Oceanic Seabird. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.*, 284, 20162436.
- Popp, B. N., Graham, B. S., Olson, R. J., Hannides, C. C. S., Lott, M., López-Ibarra, G. and Galván-Magaña, F. (2007) Insight into the trophic ecology of yellowfin tuna, Thunnus albacares, from compound-specific nitrogen isotope analysis of proteinaceous amino acids. In *Stable isotopes as indicators of ecological change* (Dawson, T. E. and Siegwolf R. T. W., eds) Academic Press. pp 173-190.
- Steffan, A. S., Chikaraishi, Y., Currie, C. R., Horn, H., Gaines-Day, H. R., Pauli, J. N., Zalapa, J. and Ohkouchi, N. (2015) Microbes are trophic analogs of animals: Unification of the

macro- and microbiome in food web ecology. *Proc. Natl.* Acad. Sci. U.S.A., **112**, 15119–15124.

- Takizawa, Y., Takano, Y., Choi, B., Dharampal, P. S., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2020) A new insight into isotopic fractionation associated with decarboxylation in organisms: implications for amino acid isotope approaches in biogeoscience. *Prog. Earth Planet. Sci.*, 7, 1–13.
- Vander Zanden, M. J., Casselman, J. M. and Rasmussen, J. B. (1999) Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature*, **401**, 464–467.
- Yamaguchi, Y. T., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N. O., Imachi, H., Yokoyama, Y. and Ohkouchi, N. (2017) Fractionation of nitrogen isotopes during amino acid metabolism in heterotrophic and chemoautotrophic microbes across Eukarya, Bacteria, and Archaea: Effects of nitrogen sources and metabolic pathways. *Org Geochem.*, **111**, 101–112.

## 安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の 検出法—2:ガスクロマトグラフ-質量分析計と MassWorks

#### 力石 嘉人<sup>1)</sup>\*, 滝沢 侑子<sup>1)</sup>, 布浦 拓郎<sup>2)</sup>

2020年11月25日受付, 2021年1月11日受理

分子内 Stable Isotope Probing 法とは,特定の部位を人工的に同位体標識した基質(ブドウ糖など) を用いて,その同位体標識の移動を,単一の生物体内,生物群集内,または海底の堆積場で追跡する ことで,試料中で起きている代謝合成経路の可視化や,生化学反応の特定を行う手法である.この手 法は,近年,ガスクロクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)と質量のキャリブレーション用のソフト ウェア MassWorks の組み合わせにより,大きく発展した.本稿では,この手法の原理について解説 する.

#### Stable isotope analysis -1: MassWorks on conventional gas chromatograph -mass spectrometer

Yoshito Chikaraishi, Yuko Takiawa and Takuro Nunoura

MassWorks is an acquisition software that works on the mass spectra of conventional gas chromatograph-mass spectrometer, to determine stable isotope labels in organic compounds. The analysis of the isotope labels at the level of individual positions in organic compounds is potentially highly useful as a novel 'Position-Specific Stable Isotope Probing' to trace metabolic flow and associated function in diverse samples including single organisms and biotic community as well as sedimentary site. We review a brief outline of MassWorks and its application.

キーワード: SIP 法, 安定同位体, アミノ酸, 代謝 SIP, Stable isotope, Amino acid, Metabolism

#### 1. はじめに

水素・炭素・窒素などの有機化合物を構成する元素に は、安定同位体が存在するが、重い同位体の平均存在量 は、それぞれ、約0.0115%(D)、1.07%(<sup>13</sup>C)、0.364% (<sup>15</sup>N)と、非常に僅かである、そこで、基質(ブドウ糖、 ピルビン酸、酢酸など)の特定の部位を人工的に重い安 定同位体(D,<sup>13</sup>C,<sup>15</sup>N など)で標識し、培養や飼育後の 代謝物に含まれる重い同位体を追跡することで、単一の

\*連絡先 力石 嘉人 北海道大学 低温科学研究所 〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目 Tel. 011-706-5472 e-mail: ychikaraishi@lowtem.hokudai.ac.jp 生物体内,生物群集内,または海底の堆積場などにおいて,試料中で起きている代謝合成経路の可視化や,生化 学反応の特定を行うことができる.これを Stable Isotope Probing法 (SIP法)といい,とくに,代謝物(有 機化合物)の個々の部位(例えば,1位の炭素,2位の炭 素)ごとの同位体標識を追跡する手法を,分子内 Stable Isotope Probing法(分子内 SIP法,図1)という.

従来の SIP 法は, (1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC: High Performance Liquid Chromatograph) 等

北海道大学 低温科学研究所
 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido
 University, Sapporo, Japan
 2) 国立研究開発法人海洋研究開発機構
 Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology
 (JAMSTEC), Yokosuka, Japan



念図.赤丸が安定同位体(<sup>13</sup>C)で標識した部位を示す.

代謝産物 図 1:分子内 Stable isotope Probing 法(分子内 SIP 法)の概

を用いて目的の化合物を単離・精製した後に、核磁気共 鳴スペクトル (NMR: Nuclear Magnetic Resonance) 装 置で標識された部位を特定する、もしくは(2)抽出・精 製等の前処理を施した後に,元素分析-同位体比質量分 析 計 (EA-IRMS: Elemental Analyzer-Isotope Ratio Mass Spectrometer)やガスクロマトグラフ-同位体比質 量分析計 (GC-IRMS: Gas Chromatograph-Isotope Ratio Mass Spectrometer)を用いて化合物ごとの標識率を調 べる,のどちらかが一般的であった(図2).しかしこれ らの手法には一長一短があり、(1) NMRは、部位ごとの 標識を簡単に評価できるが、一般的に感度が悪く、測定 には, 高標識率の(例えば, 測定したい部位の炭素の 50% 以上が<sup>13</sup>Cに置換されている)数mgの有機化合物を必 要とする.一方で、(2) IRMS は、同位体の天然存在度 を測定するために設計されている機器であるために, 極々低濃度の同位体標識(0.数%)は正確に測定できる が、数%を超える濃度の標識の分析はできない.また、 有機化合物全体の同位体標識率は測定できるが、部位ご との標識を測定することは非常に難しい. さらに、これ らの(1),(2)の双方において,研究対象(目的)の代 謝物(有機化合物)を単離・精製すること自体が困難な 場合が多く,これらの理由から,SIP法の活用・利用は なかなか広がっていないのが現状である.

このような背景を受けて,近年では,従来の方法 (HPLC, NMR, EA-IRMS, GC-IRMS) を用いるのでは なく、一般的なガスクロクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS: Gas Chromatograph-Mass Spectrometer) で 得られたデータに対して、 質量キャリブレーション用の ソフトウェア「MassWorks (Cerno Bioscience 社製,国 内では Gerstel 社が販売)」を用いて、有機化合物の部位 ごとの同位体含有量を正確に(同位体の濃度で、1~2% の誤差で)解析する「分子内 SIP 法」の研究が積極的に 行われるようになった.この手法の利点は、 煩雑な単 離・精製プロセスを経ずに、研究対象の試料中に含まれ ている数 ng の有機化合物について、その「分子内の同 位体標識位置」を正確に特定し、またその濃度を、2~99% の同位体存在量の範囲であれば、1~2%の誤差で定量す ることができる. すなわち MassWorks を使うことで. 高濃度標識が必要な NMR 法と極低濃度標識しか分析で きない IRMS 法のちょうど中間(低~高濃度標識の)領 域で,分子内 SIP 法が利用できることになり,様々な研究 への応用が期待されている. そして実際に, 始原的系統群 に属する水素酸化好熱細菌における可逆的な TCA 回路 の発見などに貢献している (Nunoura et al., 2018). 本稿で は、この MassWorks を使った解析法の原理を紹介する.

#### 2. SIP 法に使用されてきた分析装置の例

#### 2.1. ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)

一般的なガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS) では、試料(様々な有機化合物の混合物)はまず、ガス クロマトグラフ(GC)で、1つ1つの有機化合物に分離



図2: SIP 法に用いる3つの手法と、それらが対応している分析対象の有機化合物の<sup>13</sup>Cの濃度



される. そして, その後, 質量分析計 (MS) のイオン化 室に導入されてイオン化され, 磁場 (電極) によって異 なる質量のイオンが分離される (図3). 質量分離の基本 式 (式1) は,

$$m/z = B^2 r^2 e/(2V) \qquad (\not \exists 1)$$

質量(m),電荷数(z),磁場強度(B),軌道の半径(r), 電子の電荷(e),加速電圧(V)を用いて示され,m/z値 の異なるイオンの軌道の半径(r)は,磁場強度(B)また は加速電圧(V)の関数になる.m/z値は,電荷数(z) が1の場合には,そのまま質量(m)ということになる. すなわち,磁場強度(B)または加速電圧(V)をコント ロールし,軌道の半径(r)を連続的に変化させることで, 1つの検出器で一定の範囲のm/z値(例えば50~500) のイオンを検出する(スキャン)ことができる(詳細は, 質量分析に関する様々な書籍があるので参照して頂きた い,例えば,質量分析学—基礎編—など).実際のMSで は,様々なタイプの磁場(電極)が用いられており,例 えば一般的なGC-MSで使用されている四重極型の質量 分析計では,4本の電極を用いることで特定の質量(m/z 値)のイオンが,連続的に検出器へ送られる.質量分析 において、有機化合物は、相対分子質量ではなく、モノ アイソトピック質量に基づいて分離されるので、同じ化 学組成式で示される有機化合物であっても、同位体組成 の異なる分子イオン(例えば、<sup>12</sup>C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>、<sup>12</sup>C<sub>12</sub>[<sup>13</sup>C]H<sub>22</sub> NO<sub>4</sub>と<sup>12</sup>C<sub>11</sub>[<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>)は分離され、それぞれの分子 イオンピークがマススペクトル上に観測される(図4). また、イオン化された有機化合物は化学的に非常に不安 定であるため、壊れた際に化合物構造に特異的なフラグ メントイオンを生じる、その際に生じたフラグメントイ オンも、分子イオンと同様に、同位体組成の異なるイオ ンピークが観測される(図4).

このように、原理的には、同位体組成の異なる「分子 イオン」と「フラグメントイオン」のピーク強度を比較 することで、有機化合物の、どの元素に、どれくらい同 位体標識が入っているのかを推定することが可能であ る.一般的に、測定に必要な試料量は化合物あたり ng オーダーである.しかし GC-MS を用いた SIP 法は、 GC の条件 (GC カラムのブリードや、汚れなど)により、 観測されるフラグメントイオンの強度が変化しやすいこ とに加えて、異なる元素の同位体 (<sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) を区別 することが困難である(例えば、<sup>12</sup>C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>[<sup>2</sup>H] NO<sub>4</sub> と<sup>12</sup>C<sub>12</sub>[<sup>13</sup>C]H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>は、少数点1桁の質量分解能では区 別できない)ために、低濃度(20~30%以下)の同位体 標識の検出は難しい.

#### 2.2. 核磁気共鳴 (NMR) 装置

核磁気共鳴 (NMR: nuclear magnetic resonance) 装置 では,有機化合物中の1つ1つ部位の炭素,あるいは窒



#### 図4:グルタミン酸誘導体化物をGC-MSで分析した際の質量スペクトル

グルタミン酸誘導体化物の質量スペクトル



素の原子核の歳差運動の回転周期に共鳴するラジオ波を 外部から加えることによって共鳴させ、その時に生じる エネルギーの吸収量を「NMR スペクトル」として測定 する.この時、与えられた周波数に対して検出された ピークが出現する領域を化学シフト(単位は ppm)と呼 ぶ. 共鳴周波数は、対象とする原子周辺の物理・化学的 な構造,例えば,有機化合物の構造がどのような形か, みている元素が化合物の中でどこに位置するか、周囲に どのような官能基があるか、などで決定されるため、有 機化合物の1つ1つの部位の炭素あるいは窒素は,異な る化学シフトを示し、また各々のスペクトルの強度か ら<sup>13</sup>Cや<sup>15</sup>Nの含有量を推定することができる(詳細は, NMR 装置に関する様々な書籍があるので参照して頂き たい、例えば、NMR 入門:必須ツール 基礎の基礎な ど). 例えば、アラニンの<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを測定す ると、カルボキシル炭素、α炭素、β炭素は、それぞれ 175~180 ppm, 50~55 ppm, 15~20 ppm の化学シフト で検出される(図 5a). また, このアラニンのβ炭素を 2%の<sup>13</sup>Cで標識化すると, β炭素のシグナル強度が<sup>13</sup>C の含有量に比例して高くなる(図5b).

このように NMR 装置を用いることで,同位体標識が 有機化合物のどの元素にどれくらい入っているのかを推 定することが可能である.ただし,SIP 法として利用す るには,<sup>13</sup>C-NMR および<sup>15</sup>N-NMR は感度が十分でない ため,特定の部位に,高濃度(50%以上)の同位体標識 が導入された有機化合物が mg オーダーで必要になる. 例えば、一般的な共鳴周波数(磁場強度)が400 MHzの NMR 装置では、1 mgのアラニンの<sup>13</sup>C-NMR スペクト ルを測定するために約1時間必要である。NMR 装置の 感度は、共鳴周波数(磁場強度)の3/2乗に比例し、ま た測定時間の1/2乗に比例するため、磁場強度 900 MHz の NMR 装置を約1ヶ月間用いることができれば、10 µg のアラニンでも同位体標識の測定が可能であるが、膨大 な時間と費用がかかる上、それでもGC-MSに比べると 検出感度が3~4桁も低い。

#### 2.3. ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS)

ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS) は、試料(混合物)をガスクロマトグラフ(GC)で分離 した後, GC に直結している反応炉で有機化合物を H2, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> 等のガスに変換し, 同位体比質量分析計 (IRMS) でガス中の同位体組成を測定する(詳細は、本誌の第一 章「安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検 出法-1:ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計」を 参照して頂きたい). 上記 2.1.1 で示したように,一般 的な GC-MS では. 磁場強度 (B) または加速電圧 (V) を連続的に変化させ、1の検出器を用いて、広い範囲の m/zをスクリーニング的に検出する.一方でGC-IRMS では、磁場強度(B)または加速電圧(V)を一定に設定 し、複数の検出器を用いて、イオン化されたガスに含ま れる主要な同位体分子種(例えば二酸化炭素では, m/z  $44 = {}^{12}C^{16}O_2$ ,  $m/z 45 = {}^{13}C^{16}O_2$ ,  ${}^{12}C^{17}O^{16}O_1$ ,  $m/z 46 = {}^{12}C^{18}$ O<sup>16</sup>O)を定量的に検出する. さらに. 同位体分子種の存 在量に合わせて、検出されるシグナルを電気的に増幅さ せており(例えば, m/z 45 で約 100 倍, m/z 46 で約 10,000倍),存在量の少ない重い同位体を持つ分子種の 測定感度が高い.そして、この複数の m/z の同時検出 により、GC-IRMS は、安定同位体組成の自然界での僅 かな変動でも正確に測定することができる.

このように、GC-IRMS を用いることで「有機化合物 全体」として同位体標識がどれくらい入っているのかを 測定することができる.測定に必要な試料量は、一般的 に、化合物あたり ng から µg オーダーである.ただし、 GC-IRMS を使った SIP 法は、GC-IRMS が安定同位体 組成の自然界での変動の測定用に作られていることもあ り、極めて低い濃度(<sup>13</sup>C で約2%以下)に標識化された 試料を用いる必要がある.また、同位体標識された位置 が有機化合物のどの元素に入っているかを推定するも困 難である.





図 6: アラニン誘導体化物の質量スペクトル: (a) 全体, (b) *m/z* 128 付近, (c) MassWork による 質量キャリブレーション後の *m/z* 128 付近

#### 3. MassWorks を用いた SIP 法

#### 3.1. MassWorks の原理

MassWorks (Cerno Bioscience 社 製, 国内では Gerstel 社が販売)は、一般的なGC-MSで得られたデー タ (質量スペクトル)を、(1)独自の補正関数でガウス分 布に変換し、また(2)安定同位体の天然存在度の補正を 行うことで、精密質量を得ることができる「質量キャリ ブレーション」用のソフトウェアである(図6)、一般的 には、未知の有機化合物の精密質量の測定に用いられて いるため、質量スペクトル、安定同位体の天然存在度と の関係性は、以下のように示される:

[質量スペクトル]+[安定同位体の天然存在度] ⇒[未知化合物の精密質量]

一方で SIP 法では,知りたい情報が「代謝産物(有機 化合物)の,どの部位に,どの程度の同位体標識が含ま れているか」であるため,研究対象の有機化合物の化学 構造は既知であることが多い.そこで,

[質量スペクトル] – [化合物の既知の精密質量] ⇒[同位体標識の存在量]

に示すように、MassWorksの解析において、ガウス分 布に変換した質量スペクトルに、既知の精密質量の情報 を与えることで、分子イオンおよびフラグメントイオン 中の同位体標識の存在量を求めることができる。例え ば、アミノ酸の1種であるアラニン(誘導体化物)のイ



27

(b) <sup>13</sup>C標識



図 7: アラニン誘導体化物の質量スペクトル (*m/z* 128 付近を 拡大)と、MassWorks で求めた同位体分子種の割合

オンフラグメント ( $C_7H_{14}NO$ ) について, 質量スペクト ルを MassWorks で解析すると,含まれている主な同位 体分子種: $C_7H_{14}NO$ : $C_6[^{13}C]H_{14}NO$ : $C_6[^{13}C_2]H_{14}NO$ の存 在割合が,それぞれ0.969:0.006:0.026と計算される (図 7a).これに対し,同じ化合物の1つの炭素を数% の<sup>13</sup>C で標識したものは,それぞれ,0.752:0.168: 0.080と計算され,<sup>13</sup>C の標識率に対応して  $C_6[^{13}C]H_{14}$ NO の存在量が増加する(図 7b).

このように、MassWorks を用いることで、上記(2.1 章)のGC-MSの欠点(観測されるフラグメントイオン の強度が変化しやすいことや、異なる元素の同位体を区 別することが困難なこと、など)を克服することができ、



理論的には、同位体組成の異なる分子及びフラグメント イオンのピーク強度を比較することで、有機化合物の部 位ごとの同位体標識率を2~99%の範囲であれば、正確 に特定することができる.また、GC-MSの分析感度で 測定が行えるため、研究対象の試料中に数ngオーダー で含まれている有機化合物について、同位体標識率を測 定することができる.

#### 3.2. キャリブレーション

上述のように、MassWorks では、例えば、アラニン (誘導体化物)のフラグメントイオン (C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO)の3つ の同位体分子種:C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NO:C<sub>6</sub>[<sup>13</sup>C]H<sub>14</sub>NO:C<sub>6</sub>[<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]H<sub>14</sub> NOの存在割合は、それぞれ0.752:0.168:0.080と計 算され、合計すると1.0になる.しかし、標識される元 素の数が多い場合や、質量スペクトル上で同じ(あるい は近い)*m/z*値を持つフラグメントが重なるなどの原因 によって、得られた同位体分子種の存在割合の合計値が 1.0にならなかったり、マイナス値(例えば、-0.03 な ど)になったりすることがある.従って、MassWorks を用いて解析をおこなうためには、あらかじめ標品(非 標識体)を用いて、得られた値(測定値)が適切なスケー ルになるようにキャリブレーションする必要がある.

実際に、アラニンの誘導体化物に関して、非標識のも のと、 $\beta$ 位に<sup>13</sup>Cを16%導入した標識のものとの分析結 果を MassWorks で解析すると、分子種 C<sub>6</sub>[<sup>13</sup>C]H<sub>14</sub>NO の存在割合は、非標識のもので-0.032、16%標識のもの で0.125と計算される(図 7a).このような場合には、 -0.032から1.0の計算値が、1.1%(天然存在度)から 100%の<sup>13</sup>C 濃度に対応するように補正を行うことで、 C<sub>6</sub>[<sup>13</sup>C]H<sub>14</sub>NOの正確な存在量を求めることができる(図 8).

#### 4. おわりに

NMR 装置を用いた SIP 法は,同位体標識が有機化合物の「どの部位にどれくらい入っているのか」を推定することができる強力な手法であるが,試料として,高濃度(50%以上)で同位体標識された有機化合物が mg オー ダーで必要である.GC-IRMS を用いた SIP 法は,測定 に必要な試料量が,化合物あたり ng から µg オーダーで ある.しかし,同位体標識が有機化合物に「化合物全体 としてどれくらい入っているのか」を推定することがで きるが,1つ1つの元素の標識率にはアクセスできない. また,極めて低い濃度(<sup>13</sup>C で約2%以下)で同位体標識 を使用する必要がある.従って,NMR や GC-IRMS を 用いた SIP 法は,残念ながら多くの研究にとって,実用 的ではなかった.

一方で, MassWorks を用いることは, 高濃度標識が 必要な NMR 法と極低濃度標識しか分析できない GC-IRMS 法のちょうど中間(低~高濃度標識の)領域で, SIP 法が利用できることを意味する.また,数 ng オー ダーの有機化合物について,その「分子内の標識位」を 特定することが可能である.従って, 試料量が限られて いる, 試料量は十分にあるが目的の有機化合物の含有量 が少ない,高濃度標識が入手できない,などの研究でも, SIP 法の利用が現実的になる.本誌4章(マルチオミク ス解析による好熱性水素酸化細菌からの可逆的 TCA 回 路の発見)に,この手法を用いて明らかにした最新の研 究成果を紹介する.

#### 謝辞

本稿の内容は、日本学術振興会科学研究費(基盤研究 A:研究代表者 布浦拓郎)(19H00988)及び、シリコー

29

ン工業会(Silicon Industry Association of Japan)からの 寄付金で実施した研究成果の一部を取りまとめたもので ある.

#### 引用文献

Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T.,

Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. and Takai, K. (2017) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile, *Science* 359, 559–563.

Hore, P.J. (著)., 岩下孝, 大井高, 楠見武徳 (翻訳) (2017) NMR 入門: 必須ツール 基礎の基礎. 化学同人

豊田岐聡(2016)質量分析学一基礎編一, 日本質量分析学会
## マルチオミクス解析による好熱性水素酸化細菌からの 可逆的 TCA 回路の発見

## 布浦 拓郎<sup>11</sup>, 力石 嘉人<sup>21</sup>, 跡見 晴幸<sup>31</sup>

2020年12月9日受付, 2021年1月22日受理

生物による炭素固定は地球上の生命そして生態系の維持において必須の機能であり、還元的 TCA 回路(reductive tricarboxylic acid cycle)は、ウッドリュンガル(Wood-Ljungdahl)経路(アセチル CoA 経路)と並び、最も始原的な炭酸固定経路ではないかと考えられてきた。我々は始原的系統群に 属す好熱性水素酸化細菌 *Thermosulfidibacter takaii*に対するマルチオミクス解析を実施し、二酸化 炭素や有機酸等、入手可能な炭素源により機能方向が変化する可逆的 TCA 回路を発見した。更に、この TCA 回路の性質を基に、初期生命が還元的 TCA 回路でなく、可逆的 TCA 回路を保持した可能 性を提唱した。

## A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile revealed by multi-omics

Takuro Nunoura, Yoshito Chikaraishi, Haruyuki Atomi

Inorganic carbon fixation is essential to sustain life and ecosystem on Earth. The reductive tricarboxylic acid (rTCA) cycle, also known as the citric acid cycle, and the Wood-Ljungdahl pathway, also known as the acetyl-CoA pathway, are the most ancient carbon fixation metabolisms. A combination of multi-omics analyses revealed a previously unknown reversible TCA cycle whose direction was regulated by available carbon sources such as inorganic carbon and organic acids. Moreover, we hypothesized that primordial life harbored the reversible TCA cycle but not rTCA cycle.

キーワード: 好熱菌, TCA 回路, 代謝解析, 安定同位体 Thermophile, TCA cycle, Metabolomics, Stable isotope

連絡先 布浦 拓郎 海洋研究開発機構 生命理工学センター 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町 2-15 Tel. 046-867-9707 e-mail: takuron@jamstec.go.jp 1)国立研究開発法人海洋研究開発機構 Japan Agency for Marine-Earth Science & Technology (JAMSTEC), Yokosuka, Japan 2)北海道大学 低温科学研究所 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan 3) 京都大学大学院工学研究科 Graduate School of Engineering, Kyoto University, Kyoto, Japan

## 1. はじめに

教科書にはミトコンドリアにおけるエネルギー生産の 主要経路として、クエン酸回路、つまり酸化的 TCA 回 路(oxidative tricarboxylic acid cycle)が記述されている. 勿論、酸化的 TCA 回路はミトコンドリアだけでなく、 好気性細菌にも広く分布する.その一方で、微生物にお ける TCA 回路を見渡せば、回転方向の異なるもの、部 分的に欠失した経路やバイパス経路も知られており、更 に、回路を担う個々の化学反応を担う酵素にも多様性が 存在する.このように TCA 回路は全生物に共通する基 本的な代謝系であるため、回路を構成する化合物のネッ トワークとしての保存性は非常に高いが、生命現象とし ては柔軟であり、教科書に書かれている「好気性生物に



おけるエネルギー獲得経路」とは、その1つの型、そして1つの役割に過ぎない. 多様な TCA 回路が有す機能の本質は、「アミノ酸や核酸等の前駆体となる中間代謝物の生産」である(Smith and Morowitz 2004; Wächtershäuser 1990). そして、その起源は生命の誕生以前の「化学進化の時代」にまで遡る可能性が指摘されており、TCA 回路の非生物学的な再現は、現在、化学進化の再現・実証研究における最も競争的な研究対象の一つとなっている.

## TCA 回路の多様性

完全型の TCA 回路として,酸化的 TCA 回路,酸化 的回路とは真逆に回転することで炭酸固定に機能する還 元的 TCA 回路の他, 分岐型経路が知られている (図 1). 酸化的 TCA 回路は好気性生物だけでなく嫌気性微生物 にも広く分布し、還元的 TCA 回路も後述の通り嫌気性 微生物だけでなく好気性微生物にも分布する. そして完 全型の分岐型 TCA 回路は嫌気性従属栄養微生物から見 出されている.一方,回路を担う酵素群の分布から TCA 回路の多様性を見ると、教科書にクエン酸回路と して記述される主に好気条件下で機能する酵素群がむし ろ例外的であり、嫌気性微生物に分布する酸化的 TCA 回路を担う酵素群は、還元的 TCA 回路や分岐型 TCA 回路を担う酵素群と共通性が高い. 還元的 TCA 回路と 他の TCA 回路を分けるのは、還元的 TCA 回路におけ るクエン酸開裂反応を担う ATP クエン酸リアーゼ (ATP citrate lyase) (クエン酸+CoA+ATP->アセチ ル CoA+オキサロ酢酸+ADP) やその機能を2段階で 担うシトリル CoA 合成酵素 (citryl-CoA synthetase) (ク エン酸+CoA+ATP->シトリルCoA+ADP)及びシト リル CoA リアーゼ (citryl-CoA lyase) (シトリル CoA->アセチル CoA+オキサロ酢酸)の存在のみであ る (Aoshima et al. 2004ab).

また、熱力学的に TCA 回路の多様性を比較すると、 最も安定な完全型 TCA 回路は分岐型経路である. 酸化 的、還元的回路のいずれも、他の酵素反応との共役等を 必要とする非自発的な反応(吸エルゴン反応)を含む. 特に、酸化的回路におけるリンゴ酸脱水素酵素(malate dehydrogenase)が触媒する反応は、極めて非自発的な 吸エルゴン反応である( $\Delta G^{\circ}$ +30 kJ).なお、還元的回 路においては、ピルビン酸:フェレドキシンオキシドレ ダクターゼ(ピルビン酸合成酵素)(pyruvate ferredoxin oxidoreductase)及び2-オキソグルタル酸:フェレド キシンオキシドレダクターゼ(2-オキソグルタル酸合成 酵素)oxoglutarate ferredoxin oxidoreductase(いずれも  $G^{\circ}$ +19 kJ)が吸エルゴン反応で機能する(Fuchs 2011) (図 1).

更に近年,生命進化,生態学的観点から,還元的 TCA 回路に注目が集まっている.生命進化において,還元的 TCA 回路はメタン菌等の炭酸固定経路として知られる ウッドリュンガル (Wood-Ljungdahl) 経路 (アセチル CoA 経路)と並び,最も始原的な炭酸固定経路であると 考えられている (Smith and Morowitz 2004; Braakman and Smith 2012).そして,現在の地球環境においても, 還元的 TCA 回路は水圈・陸圏に広範に生息する亜硝酸 酸化菌等へも分布することが近年の研究で明らかにさ れ,酸素が豊富に存在するグローバルな生態系において も改めてその重要性が再評価された (Lücker et al. 2010; Pachiadaki et al. 2017). 従来,還元的 TCA 回路は限ら れた嫌気環境や貧酸素環境における主要炭酸固定経路の 一つと考えられてきたが,もはや,特殊な炭酸固定経路 という認識は誤りとなった.

## Thermosulfidibacter における 可逆的 TCA 回路

上述のように、TCA 回路は古典的でありながら、な

おかつ新しい研究対象であり続けている.筆者らは好熱 性水素酸化菌の生理生態を研究する中で、始原的バクテ リア系統 Aquificae 門に属す嫌気性好熱菌 *Thermosulfidibacter takaii* より,新たな形の TCA 回路 を見出し報告した (Nunoura et al. 2018). T. takaii は高 温環境(至適増殖温度70℃)において、水素を酸化して 硫黄を還元することでエネルギーを獲得し、炭酸固定に 依存する独立栄養条件の他、水素をエネルギー源、酢酸 やコハク酸等の有機酸等を炭素源とする混合栄養条件で も増殖することが出来る(注:混合栄養増殖には複数の 意味が存在するが、本報における"混合栄養生物"は、無 機化合物を電子供与体. 有機化合物を少なくとも一部の 炭素源として利用し、増殖する生物を意味する).研究 開始当初,筆者らは他の Aquificae 門細菌と同様,T. takaii は独立栄養条件では還元的 TCA 回路により炭素 固定を行うと予想した.しかし、本菌のゲノムには、 TCA 回路に関する完全な遺伝子が揃う一方、還元的 TCA 回路に不可欠なクエン酸開裂反応を担う ATP ク エン酸リアーゼやその機能を2段階で担うシトリル CoA 合成酵素及びシトリル CoA リアーゼをコードする 遺伝子が存在せず,また,既知の他の炭素固定経路(ウッ ドリュンガル経路やカルビンベンソン回路等)を担う遺 伝子セットも見出されなかった. そこで, 筆者等は 「ATPクエン酸リアーゼを代替する何らかの仕組みで還 元的 TCA 回路が機能する」と仮説し、独立栄養条件及 び混合栄養条件で培養した細胞を用い、細胞粗抽出液の 酵素活性測定、トランスクリプトーム及びプロテオーム 解析を実施した、その結果、TCA 回路が試験した全て の培養条件で恒常的に発現し機能していること、そして、 非常に高いクエン酸合成酵素 (citrate synthase) 活性 (ア セチル CoA+オキサロ酢酸->クエン酸+CoA)が常に 存在することが明らかとなった.また,独立栄養細胞に おいても、ATP クエン酸リアーゼ活性が認められない 一方、独立栄養、混合栄養いずれの細胞においても、ク エン酸合成酵素の逆反応によるクエン酸開裂反応は検出 された. そして、このクエン酸合成酵素の逆反応活性は 還元的 TCA 回路を有す Aquificae 門細菌の ATP クエ ン酸リアーゼ活性とほぼ同等であった、つまり、吸エル ゴン反応 ( $\delta G^0 = +37.6 \text{ kJ}$ ) であり (Guynn et al. 1973) 生体内では生じ得ないとされてきたクエン酸合成酵素の 逆反応により, T. takaii 細胞内では還元的 TCA 回路が 機能していることが強く示唆されたのである.

ところが,ここで問題が生じた.一連の解析結果は, *T. takaii* が独立栄養増殖において,クエン酸合成酵素の 逆反応により,還元的 TCA 回路を機能させている可能

性は示している.しかし、TCA 回路の機能方向を直接 証明するものではないからである. T. takaii において TCA 回路を構成する酵素反応は、全て可逆的であり、 また、同様に TCA 回路が機能するであろう混合栄養条 件でも回路が還元方向に機能するのか等.疑問は尽きな い. 従来, このような場合, 安定同位体標識した基質を 投与し, 鍵となる中間代謝産物の標識を評価する解析が NMR や LC-MS 等を用いて行われてきた. しかし, 力 石ら(本誌3章)がまとめるように、NMR は多量の試料 を必要とし、T. takaiiのように細胞収量が低い菌株への 適用は極めて困難である.また、LC-MSを用いて細胞 内の遊離有機酸を測定する手法も大腸菌等よく増殖する 微生物を対象に利用されているが、この手法も細胞収量 の低い菌株への適用は現実的ではなかった。そこで現れ たのが、筆者(力石)らが有機地球化学の新しい研究手 段として検討してきた、GC-MSと解析ソフトウェア MassWorks を組み合わせた新たな手法である. 一見異 なる研究分野の融合により、低い細胞収量が故に代謝解 析が困難であった環境微生物を対象とし得る新しいオミ クス研究の手段が誕生したのである.

新手法では、力石ら及び澄田らに詳述されている通り (本誌3章及び6章),既存の手法と同様,培養基質に含 まれる特定の炭素原子を「炭素13」で標識し,*T. takaii* がピルビン酸,オキサロ酢酸,2-オキソグルタル酸を前 駆体として生産したアミノ酸,即ち,アラニン,アスパ ラギン酸,グルタミン酸の「どの炭素原子」に「炭素13」 が取り込まれているのかを、以下のように定量し、代謝 経路の流れを判断する.

- (1) 安定同位体標識した基質を用いた培養
- (2) 全菌体蛋白質の加水分解とアミノ酸の誘導体化
- (3) ガスクロマトグラフ一質量分析計 (GC-MS) による 分析
- (4) ソフトウェア (MassWorks) による炭素 13 の標識
   率を算出
- (5) TCA 回路の反応方向の確定

この結果, *T. takaii* において, 以下のように, TCA 回路は増殖条件により, 極めて柔軟な振る舞いをすることが明らかになった (図 2).

- (1) 独立栄養条件においては還元的 TCA 回路と同様に 機能する.
- (2) コハク酸あるいは酢酸を添加した混合栄養条件では、それぞれの基質で、酸化方向、還元方向に機能する部位が異なる分岐型の経路が機能する(注:いずれ分岐パターンも、従来知られている分岐型TCA回路とは異なる).その結果、炭酸固定と脱炭

図2: 代謝解析によって示された各種培養条件下での T. takaii TCA 回路の振る舞い. 点線は, 本研究における代 謝解析からの解釈では明示されなかった経路.

酸が生じる経路がそれぞれの分岐型経路で入れ替わる.

(3) コハク酸と酢酸の双方を添加した混合栄養条件では、アナプロレティック経路(典型的 TCA 回路においては、ピルビン酸あるいはホスホエノルピルビン酸をカルボキシル化してオキサロ酢酸を生成する 還元方向の反応経路)を含め、酸化的に TCA 回路が機能する.つまり、TCA 回路での炭酸固定能が 消失する.

さらに、T. takaiiのクエン酸合成酵素がクエン酸開裂 反応に適した酵素学的性状を有すか否か検証するため, 大腸菌で発現した酵素を用いて検討した. その結果, T. takaiiのクエン酸合成酵素は、単独でも、あるいはクエ ン酸開裂反応で生じたオキサロ酢酸を消費するリンゴ酸 脱水素酵素の存在下でも、還元的反応を触媒することを 確認した。また、クエン酸開裂反応においては、クエン 酸に対する Km 値(速度 v=1/2 Vmax(最大速度)とす るときの基質濃度, Km 値が低い程基質との親和性が高 いことを意味する)が既報の ATP クエン酸リアーゼと 比較すると明らかに低いこと、更に、kcat/Km 値(分子 活性 kcat が Km に対して高いほど触媒効率が高いこと を示す)もクエン酸に対し、比較的高いことが明らかに なった. これらはこの酵素が, T. takaiiの TCA 回路を 還元的な方向に回転させるために十分に高い触媒効率を 有すこと、更に言えば TCA 回路が柔軟に回転方向を変 化させることに適した性状を有すことを示す.

#### 4. 生命誕生と可逆的 TCA 回路

T. takaii より見出された可逆的 TCA 回路は, TCA 回路が本質的に持つ柔軟性を明らかにした. 一方,

TCA 回路は、アミノ酸や核酸生合成の起点となる中間 代謝産物の生合成に不可欠であり、少なくともその原型 のような経路が化学進化の時代より存在したであろうと 考えられている。この二つの視点は、従来、従属栄養か 独立栄養の何れかで誕生したと議論されてきた生命誕生 論争に新たな視点を与える.即ち.独立栄養と混合栄養 を使い分ける通性混合栄養として生命が誕生した可能性 である. 生命の起源論争において, 従属栄養で誕生した 生命は、自らによる有機物消費により絶滅してしまう可 能性が指摘され、一方で、生命誕生には有機物の濃集し た環境が必要であるにも関わらず、そのような条件下で 独立栄養生物が生じる不可思議さも指摘されてきた (Lazcano 2010). この永遠に続くかに思える議論に対 し, 通性混合栄養として生命が誕生したと仮説すると, 所与の環境条件において、無機物からエネルギーを獲得 する一方,炭素源については,有機物同化(脱炭酸)と 炭酸同化を柔軟に使い分ける,即ち混合栄養と独立栄養 を使い分ける通性混合栄養の形で生命が誕生し、継続し たと説明することが可能となる. この通性混合栄養生物 としての生命誕生仮説は、両説の利点を統合し、それぞ れへの批判を克服し得るものであると考える.

#### 5. その後

*T. takaii*の可逆的 TCA 回路は, Deltaproteobacteria に属す *Desulfurella acetivorans* から見出された同様の 可逆的 TCA 回路と並べて発表された (Mall et al. 2018). *D. acetivorans* は *T. takaii* と同様に,水素を電子供与体 として硫黄を還元する独立栄養条件下で増殖する他,酢 酸を電子供与体及び炭素源として用い増殖する.この両 増殖条件下にて,それぞれ還元的 TCA 回路と酸化的 TCA 回路を使い分けることが示されたのである.ま





た、D. acetivoransのゲノム情報からは、ATP クエン酸 リアーゼ遺伝子が偽遺伝子化し、クエン酸合成酵素がそ の機能を代替したことが示されている。その後、ゲノム 解析により、水素を電子供与体とする化学合成独立栄養 細菌 Deferribacter autotrophicus が同様にクエン酸合成 酵素を用いた炭素固定を行う可能性が示唆された (Slobodkinet al. 2019)他、鉄還元菌 Geobacter sulfurreducens に人為的なゲノム変異を誘起することで、新たに クエン酸合成酵素の逆反応を用いる炭素固定能を獲得し たことが報告されている(Zhang et al. 2020).これらの 報告は、クエン酸合成酵素を用いた可逆的 TCA 回路が 自然環境に広く分布している可能性を示している.

一方, クエン酸合成酵素と ATP クエン酸リアーゼの 関係について、重要な知見が ATP クエン酸リアーゼの 構造解析によりもたらされた (Verschueren et al., 2019). 筆者らは、クエン酸合成酵素と ATP クエン酸リ アーゼ、シトリル CoA リアーゼの系統関係をクエン酸 合成酵素ドメインの系統解析により議論し、クエン酸合 成酵素より citrvl-CoA リアーゼや ATP クエン酸リアー ゼが生じた可能性を指摘していた (Nunoura et al. 2018). これに対し、VerschuerenらはATP クエン酸リアーゼ の結晶構造解析を行うと共に、その構造に基づくアライ メント解析を行い、シトリル CoA リアーゼのドメイン 重複とその部分欠失により、クエン酸合成酵素が誕生し たことを示したのである (図3). さらに、このクエン酸 合成酵素の起源を根拠に、 還元的 TCA 回路が酸化的 TCA 回路より先に誕生したと考察した.これに加え、 ATP クエン酸リアーゼのドメイン構造の進化及びその 熱力学的性質を考えることで、TCA 回路の起源につい ては新たな側面が見えてくる.

#### (1) ATP クエン酸リアーゼのドメイン構造

Verschueren らは、シトリル CoA 合成酵素 + シトリ ル CoA リアーゼが機能する還元的 TCA 回路を最も始 原的な TCA 回路として定義した.一方, ATP クエン酸 リアーゼとシトリル CoA 合成酵素が共有する 2 つのド メイン構造は、スクシニル CoA 合成酵素と起源を共に し (Aoshima et al. 2004a), ATP クエン酸リアーゼ、シ トリル CoA リアーゼ、シトリル CoA 合成酵素、スクシ ニル CoA 合成酵素、クエン酸合成酵素のドメイン構造 を比較すると図 3 のようになる.つまり、シトリル CoA 合成酵素 + シトリル CoA リアーゼが機能する還元的 TCA 回路が誕生する前に、より始原的な TCA 回路の 存在が仮説できる.そして、そのもっとも始原的な回路 においては、スクシニル CoA 合成酵素とシトリル CoA



CS 型 TCA 回路	
succinyl-CoA synthetase	citrate synthase

**図 3**: スクシニル CoA 合成酵素,シトリル CoA 合成酵素 (CCS),シトリル CoA リアーゼ(CCL)と,クエン酸合成酵素(CS) におけるドメイン構造の分布と,TCA 回路の進化モ デル. 始原型 TCA 回路からの還元型 TCA 回路(CCS/CCL 型 TCA 回路及び ACL 型 TCA 回路)の進化過程と,クエン 酸合成酵素(CS)を含む TCA 回路を比較した.CS 型 TCA 回路の誕生段階や,始原型回路の機能方向を現時点において 決定することは困難である.

アーゼと共に機能していたと推測されるのである.

(2) ATP クエン酸リアーゼの熱力学

ATP クエン酸リアーゼ (あるいはシトリル CoA 合成 酵素 + シトリル CoA リアーゼ)の熱力学的性質(ΔG<sup>o</sup> +4 kJ) (Fuchs 2011) を考慮すると, 還元的 TCA 回路 の回転方向を決定するのは、ATP クエン酸リアーゼで はなく、回路全体の物質フラックスであり、また、フェ レドキシンを補酵素とする酸化還元酵素の機能方向を担 保する還元力供給のフローであることが分かる.実際, ATP クエン酸リアーゼが酸化方向に機能し,酸化的リ ン酸化による ATP 供給に貢献する報告もある(Möller et al. 1987). 更に、シトリル CoA リアーゼ自体もクエ ン酸合成酵素活性を有すことが知られる(Aoshima et al. 2004b). つまり, ATP 依存的なクエン酸開裂反応の熱 力学を考慮すると、少なくとも、T. takaii や D. acetivorans において TCA 回路の可逆性が担保された条件が 存在すれば、始原的な還元的 TCA 回路も可逆的に機能 した可能性は十分にあり得る.

蛋白質立体構造解析に基づき,クエン酸合成酵素の進 化過程が明らかにされたことにより,我々が提唱したク エン酸合成酵素を含む可逆的 TCA 回路が最も始原的 TCA 回路であるという仮説は否定された.一方,ATP クエン酸リアーゼ(ATP 依存のクエン酸開裂は反応)の 熱力学的性質を考慮すると,シトリル CoA リアーゼを 含む始原型 "還元的" TCA 回路が,初期生命において還 元方向に回転し,炭酸固定のみに機能していたと結論す るに十分ではない.筆者らは,生命の起源における TCA 回路の可逆性,そして,その生命が通性混合栄養 であった可能性は十分にあり得ると考えている.

この他,一般的なクエン酸合成酵素の他,立体特異性 が異なり,また進化的にも全く異なるクエン酸合成酵素 [(re)-citrate synthase] も一部の嫌気性細菌から見出さ れている (Gottschalk 1968) [一般的なクエン酸合成酵素 は,(re)-citrate synthase に対し,(si)-citrate synthase と記述される]. 生命誕生時の TCA 回路において,(re) -citrate synthase が機能していた可能性も現時点では排 除することが出来ない. 今後も多角的な研究の進展が期 待される.

### 謝辞

本研究の一部は、文部科学省科学研究費補助金・新学 術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコッホ機 能生態学」(課題番号:19H05684),日本学術振興会化学 研究費補助金・基盤研究(A)「TCA回路の多様性とそ の起源の解明」(課題番号:19H00988)で行われた.ま た、本稿の完成には亀谷将史氏、千葉洋子氏より、示唆 に富む指摘をいただいた、感謝申し上げる.

## 参考文献

- Aoshima, M., Ishiii, M. and Igarashi, Y. (2004a) A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol.*, **52**, 751–761.
- Aoshima, M., Ishiii, M. and Igarashi, Y. (2004b) A novel enzyme, citryl-CoA lyase, catalysing the second step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol.*, **52**, 763–770.
- Braakman, R. and Smith, E. (2012) The Emergence and Early Evolution of Biological Carbon-Fixation. *PLOS Comput. Biol.*, **8**, e1002455.
- Fuchs, G. (2011) Alternative pathways of carbon dioxide fixation: insights into the early evolution of life? *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 631–658.
- Gottschalk, G. (1969) Partial purification and some properties of the (R)-citrate synthase from *Clostridium acidi-urici*. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 301-306.
- Guynn, R. W., Gelberg, H. J. and Veech, R. L. (1973) Equilibrium Constants of the Malate Dehydrogenase, Citrate synthase, citrate lyase, and acetyl coenzyme A hydrolysis reactions under physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, 248, 6957–6965.

- Lazcano A. (2010) Historical development of origins research. Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 2, a002089.
- Lücker, S. et al. Lücker, S., Wagner, M., Maixner, F., Pelletier, E., Koch, H., Vacherie, B., Rattei, T., Sinninghe Damsté, J. S., Spieck, E., Le Paslier, D. and Daims, H. (2010) A *Nitrospira* metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 13479–13484.
- Mall, A., Sobotta, J., Huber, C., Tschirner, C., Kowarschik, S., Bačnik, K., Mergelsberg, M., Boll, M., Hügler, M., Eisenreich, W. and Berg, I. A. (2018) Reversibility of citrate synthase allows autotrophic growth of a thermophilic bacterium. *Science*, **359**, 563–567.
- Möller, D., Schauder, R., Fuchs, G. and Thauer, R. K. (1987) Acetate oxidation to CO2 via a citric acid cycle involving an ATP-citrate lyase: a mechanism for the synthesis of ATP via substrate level phosphorylation in Desulfobacter postgatei growing on acetate and sulfate. *Arch. Microbiol.*, 148, 202–207.
- Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yahagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H. and Takai, K. (2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, **359**, 559–563.
- Pachiadaki, M. G., Sintes, E., Bergauer, K., Brown, J. M., Record, N. R., Swan, B. K., Mathyer M. E., Hallam, S. J., Lopez-Garcia, P., V Takaki, Y., Nunoura, T., Woyke, T., Herndl, G. J. and Stepanauskas, R. (2017) Major role of nitrite-oxidizing bacteria in dark ocean carbon fixation. *Science*, **358**, 1046–1051.
- Smith, E. and Morowitz, H. J. (2004) Universality in intermediary metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101,13168–13173.
- Slobodkin, A., Slobodkina, Allioux, M., Alain, K., Jebbar, M., Shadrin, V., Kublanov, I., Toshchakov. S. and Bonch-Osmolovskaya, E. (2019) Genomic insights into the carbon and energy metabolism of a thermophilic deep-sea bacterium *Deferribacter autotrophicus* revealed new metabolic traits in the phylum *Deferribacteres. Genes*, **10**, 849.
- Verschueren, K. H. G., Blanchet, C., Felix, J., Dansercoer, A., De Vos, D., Bloch, Y., Van Beeumen, J., Svergun, D., Gutsche, I., Savvides, S. N. and Verstraete, K. (2019) Structure of ATP citrate lyase and the origin of citrate synthase in the Krebs cycle. *Nature*, 568, 571–575.
- Wächtershäuser, G. (1990) Evolution of the first metabolic cycles. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87, 200–204.
- Zhang, T., Shi, X.-C., Ding, R., Xu, K. and Tremblay, P.-L. (2020) The hidden chemolithoautotrophic metabolism of *Geobacter sulfurreducens* uncovered by adaptation to formate. *ISME J.*, 14, 2078–2089.

## オービトラップ質量分析計を用いた アミノ酸解析の可能性

## 島村 繁<sup>1)</sup>\*, 澄田 智美<sup>1)</sup>, 布浦 拓郎<sup>1)</sup>

2020年11月6日受付, 2021年1月23日受理

キャピラリー電気泳動インターフェイス(ZipChip<sup>™</sup>)を備えたオービトラップ搭載質量分析計 (Orbitrap Fusion)をアミノ酸分析へ適用すると、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)での分 析と同程度あるいはそれ以下の試料量でも測定が可能なだけでなく、非常に簡便かつ短時間で解析す ることができる。更に、菌体を超音波破砕し得られた溶液に含まれる遊離アミノ酸を、ほとんど未調 整のままで測定する事も可能である。これによりGC-MS法における技術的課題:試料調製における (1)加水分解過程でのアスパラギン、グルタミンからのアスパラギン酸、グルタミン酸への変換(2) 試料調製におけるプロリンの低い回収率、(3)GC-MS解析におけるアルギニン、システイン、ヒスチ ジン、トリプトファンの検出不可、などの改善が期待される。本報では一般的なバクテリア培養菌体 を用いて、遊離アミノ酸と総アミノ酸、それぞれの基本的な試料調整方法や測定条件等を紹介する。

## Analysis of amino acids by Orbitrap mass spectrometry.

Shigeru Shimamura, Tomomi Sumida and Takuro Nunoura

Combination of a capillary electrophoresis interface ZipChip<sup>™</sup> and Orbitrap Fusion mass spectrometer (Fusion MS) is applicable to amino acid analysis even from tiny amounts of biological samples, in the similar sensitivity to the conventional method using a gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). Moreover, Fusion MS analysis can achieve simple preparation of samples and rapid detection of amino acids, which allow us to access cellular free amino acids with almost no preparation. Fusion MS analysis indeed potentially resolve the technical issues associated with the conventional GC-MS analysis, such as (1) conversion of asparagine and glutamine to asparaginate and glutamate, respectively, in protein hydrolysis and (2) low recovery of proline in sample preparation and no detection of arginine, cysteine, histidine, and tryptophan in GC-MS analysis. Here, we introduce sample preparation procedure for the analysis of free and total amino acids in bacterial cells and analytical conditions for the amino acid measurement in the Fusion MS method.

**キーワード**:アミノ酸,同位体,キャピラリー電気泳動,質量分析 Amino acid, Stable isotope, Capillary electrophoresis, Mass spectrometry

## 1. はじめに

オービトラップ (Orbitrap) 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific 社製) は、イオントラップ質量分析計の 一種であり、イオンを中心電極の周りで回転、振動運動 させることでより長い距離を飛行させ、その際の荷電粒 子の回転運動を高速フーリエ変換によって解析する超高 分解能フーリエ変換型質量分析装置である. *m/z* 200 で 最大 500,000 FWHM という極めて高い質量分解能を持 つとともに、サブ1 ppm (内部標準による LockMass 機 能使用時)の質量精度で容易に分析対象物の精密質量を 得ることが可能である(窪田, 2007:MÄOHRING, 2018).

*連絡先				
島村 繁				
国立研究開発法人海洋研究開発機構(JAMSTEC)				
〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2番地15				
e-mail : shimas@jamstec.go.jp				

1)海洋研究開発機構(JAMSTEC) Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology



 分析機器全体像

 a OrbitrapFusion 本体, b ZipChip インターフェイス, c ZipChip オートサンプラー&送液ユニット
 2) ZipChip 電気泳動チップ

d BGE resevoir, e ESI pump, f Sample reservoir, g Sample waste

また,研究対象の試料に合わせた分離機器やイオンソースを組み合わせることが可能であることから,化合物同 定に留まらず,プロテオーム解析を含む様々な分野で, 分析対象物の質量分析に広く利用されている.

一方, 試料を塩酸加水分解し, 得られたアミノ酸を誘 導体化を経てガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS) により分析する手法は, 簡便で高感度な解析手法として 知られる(高野ら, 2016). この手法は、本誌3章(安定 同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法― 2: ガスクロマトグラフ-質量分析計と MassWorks) に 詳述されるように、GC-MS で得たデータを質量キャリ ブレーション用ソフトウェア MassWorks により解析す ることで、アミノ酸分子内の安定同位体標識を定量する ことが可能である.そして、この解析技術は、これまで 代謝解析が困難であった難培養微生物の代謝機構の研究 への適用が可能である (Nunoura et al., 2018). さらに, GC-MS の質量分析装置にオービトラップを採用した機 種では、精密質量による化合物同定は勿論、MassWorks を用いなくとも、分子内の安定同位体標識を同定するこ とが可能となる.しかし、これらGC-MSを用いた生物 試料の解析には, 試料を塩酸加水分解する過程で, アス パラギン、グルタミンがそれぞれアスパラギン酸、グル タミン酸に変換されてしまうこと、前処理過程における プロリンの回収率が10%以下になってしまうこと、そし て GC-MS 解析自体がアルギニン・システイン・ヒスチ ジン・トリプトファンなどのアミノ酸が検出できないな どの技術的課題も内包する. (力石ら, 2009)

一方で、今回紹介するキャピラリー電気泳動インター フェイス ZipChip<sup>™</sup> (908 devices 社製) と, オービトラッ プ搭載機種 Orbitrap Fusion (図1) を組み合わせた分析 手法では、精密質量による分子同定が可能なだけでなく、 アミノ酸を誘導体化することなく、簡便かつ短時間で測 定することが可能である.特に、菌体を超音波破砕して 得た細胞内の遊離アミノ酸を測定する場合、塩酸加水分 解や誘導体化に伴う技術的な課題の多くを改善できる. また、測定に必要な試料液量が最小10µLと非常に少な い為(実際に解析ラインへ導入される量は5nL 程度で あるため、測定後に試料を回収して別の分析の為に再利 用する事も可能), GC-MS を用いる手法と同様に微量試 料への適用が可能である.なお、本誌6章にある通り、 この手法で塩酸加水分解した試料を解析する場合は, GC-MSより少ない試料での解析が可能となる、本報で は、この新たな解析手法の概要と共に、従属栄養細菌を モデルとして用い、塩酸加水分解して得た総アミノ酸と、 細胞の超音波破砕により得た細胞内遊離アミノ酸につい ての解析結果を比較して紹介する.

## 2. 試料調整と測定

#### 2.1 塩酸加水分解による総アミノ酸分析試料の調整

リアクティバイアル1.0 mL (GL サイエンス) に塩酸 (アミノ酸自動分析用,富士フイルム和光純薬) 300 μL にて懸濁した菌体を入れて,クローズドトップスク リューキャップ (GL サイエンス) で蓋をし,ドラフト内 で110℃のヒートブロック上で一晩反応させる.

塩酸加水分解後のバイアルをヒートブロックから取り 出して室温に戻し、ジクロロメタン(ダイオキシン類分 析用, 富士フイルム和光純薬) 200 μL, ヘキサン (ダイオ キシン類分析用,富士フイルム和光純薬)400 µL(ジク ロロメタン:ヘキサン=1:2)を加え、フタを締めて良 く混ぜた後、バイアルから上層の溶媒層を除き脂質の除 去を行う. この操作を計3回繰り返した後、メタノール (ダイオキシン類分析用もしくは LC/MS 用, 富士フイ ルム和光純薬)400 µL を加え,窒素ガスの吹き付けを用 いて乾固する.得た総アミノ酸は超純水(QTofMS用, 富士フイルム和光純薬) 50 µL にて再懸濁し, ZipChip Metabolites Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社)の サンプルバッファーにて10倍に希釈して解析試料とし た(高野ら, 2016を改変).しかし,澄田らの解析結果 (本誌 6 章, Orbitrap Fusion を用いた CE-MS と四重極 GC-MSでのアミノ酸分析の比較)に示されるように、 メタノールを加えて乾固する過程において,非特異的な 反応が起こることが判明しており、改変後の試料調整方 法は澄田ら(本誌6章)を参照されたい.

#### 2.2 細胞内の遊離アミノ酸分析試料の調整

菌体を 70%メタノール 700  $\mu$ L に懸濁後, 超音波ホモ ジナイザー Q 700 (水冷チラー付きカップホーンタイプ, QSonica 社) にて 循環水 温度 2℃, Amplitude:40, Process Time:3分, Pulse-OFF Time:15 秒の条件で破 砕した.そして,菌体破砕液にクロロホルム 400  $\mu$ L を 加えて5分間しっかりと攪拌した後,20,000 g, -8℃で 10分間遠心し,上層 (水層)を2 mL チューブに移した. さらに,回収率向上のため,残った下層 (有機溶媒層) へ超純水 200  $\mu$ L を加えて,同条件で攪拌,遠心し,さら に上層を回収した.その後,回収液へ窒素ガスを吹き付 けて乾固し,ZipChip Metabolites Assay Kit のサンプル バッファー 30  $\mu$ L にて懸濁して測定試料とした.

#### 2.3 キャピラリー電気泳動

BGE (*background* electrolyte)及び、サンプルバッファーは ZipChip Metabolites Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社)を用いた.なお、自身で調製する場合は、LC/MS グレードの試薬を用い、それぞれ以下の組成の BGE、サンプルバッファーを準備する.BGE (超純水:イソプロパノール:アセトニトリル:ギ酸=68:20:10:2(%,v/v))、サンプルバッファー(超純水:メタノール:酢酸アンモニウム=80:19:1(%,v/v)). 電気泳動は ZipChip HS チップ (Thermo Fisher Scientific 社) を用い, Field Strength Start 1000 V/cm, Injection Volume 5 nL, Pressure Assist "Disabled"の条 件にて、3 分間の設定で行った.

### 2.4 質量分析

試料の測定は Orbitrap Fusion を用いて, MS 及び MS/MS それぞれ下記の条件にて測定した. Targeted Mass リストをフィルターとして登録し, Scan Priority を高く設定することで, <sup>13</sup>C を含む全パターンの各アミ ノ酸 *m/z* を優先的に MS/MS 測定を実施した. また, MS および MS/MS は Data Dependent Mode を Cycle Time 0.6 秒にて測定した.

[MS 測定条件] Detector:Orbitrap, Resolution:15,000, Quadrupole Isolation:ON, Scan Range (m/z):70-500, RF Lens (%):60, AGC Target:Standard, Maximum Injection Time Mode:Custom (50 ms), Polarity: Positive, EASY-IC<sup>TM</sup>:ON

[MS/MS 測定条件] Isolation Mode: Quadrupole, Isolation Window (m/z): 0.7, Activation Type: HCD, Collision Energy Mode: Stepped (25,35,50), Detector Type: Orbitrap, Resolution: 15,000, Scan Range Mode: Define First Mass (m/z 50), AGC Target: Standard, Maximum Injection Time Mode: Dynamic

## 従属栄養細菌より抽出したアミノ酸の 測定結果

一般的な従属栄養細菌の菌体を,塩酸加水分解して得た総アミノ酸と,超音波破砕で得た細胞内遊離アミノ酸の各試料それぞれのマスクロマトグラムを図2に示す.また,表1に各アミノ酸の検出の有無と保持時間(RT),MS/MS時に得られるプロダクトイオンピークなどの情報をまとめた.

総アミノ酸測定では、アスパラギン、グルタミンが検 出されていないが、これは、塩酸加水分解の過程で、ア スパラギン、グルタミンがそれぞれアスパラギン酸、グ ルタミン酸に変換されたことによる.一方、プロリン、 アルギニン、ヒスチジンはピーク強度も高く検出されて いる.システインは、検出はされるもののピーク強度は 低く、また、トリプトファンは検出されなかった.シス テイン及びトリプトファンにおける低い検出効率は、測 定系における検出感度だけでなく、今回解析した従属栄 養細菌における利用頻度が低いことも影響しているので はないかと推察される.



#### 表1:CE-MS 測定時の各アミノ酸保持時間とプロダクトイオン

					Retention time (min)				
AminoAcid	Abbreviation	Formula	Calculated Exact mass	Calculated Precursor ion [M + H] (m/z)	Total amino acid	Intracellular Free amino acid	Measured accurate Product ions (m/z) $$		
Lysine	Lys (K)	C6H14N2O2	146.1050	147.1128	0.89	1.02	56.0490, 67.0536, 84.0801, 130.0852, 147.1126		
Arginine	Arg (R)	C6H14N4O2	174.1111	175.1190	0.94	1.05	60.0553, 70.0648, 116.0701, 130.097, 158.0919, 175.1201		
Histidine	His (H)	C6H9N3O2	155.0689	156.0768	0.98	1.07	56.0491, 81.0442, 82.0520, 83.0598, 93.0441, 110.0705, 156.0767		
Glycine	Gly (G)	C2H5NO2	73.0315	76.0393	1.09	1.19	76.0392		
Alanine	Ala (A)	C3H7NO2	89.0471	90.0550	1.16	1.25	60.1084, 90.0547		
Valine	Val (V)	C5H11NO2	117.0784	118.0863	1.30	1.38	53.0382, 55.0539, 56.0491, 57.0569, 59.0488, 72.0802, 118.0862		
Isoleucine	Ile (I)	C6H13NO2	131.0941	132.1019	1.33	1.40	55.0540, 56.0495, 69.0695, 86.0960, 132.1017		
Leucine	Leu (L)	C6H13NO2	131.0941	132.1019	1.36	1.43	55.0538, 56.0493, 69.0694, 86.0957, 132.1017		
Serine	Ser (S)	C3H7NO3	105.0420	106.0499	1.41	1.48	60.0439, 70.0283, 88.0386, 106.0499		
Threonine	Thr (T)	C4H9NO3	119.0577	120.0655	1.49	1.50	56.0492, 57.0332, 74.0597, 84.0441, 102.0544, 120.0655		
Methionine	Met (M)	C5H11NO2S	149.0505	150.0583	1.49	1.56	56.0492, 61.0103, 74.0232, 84.0439, 85.0278, 87.0258, 102.0544, 104.0523, 133.0311, 150.0589		
Asparagine	Asn (N)	C4H8N2O3	132.0529	133.0608	ND	ND	-		
Phenylalanine	Phe (F)	C9H11NO2	165.0784	166.0863	1.57	1.63	79.0637, 93.0694, 103.0533, 120.0797, 166.0866		
Tryptophan	Trp (W)	C11H12N2O2	204.0893	205.0972	ND	1.66	91.0536, 115.0534, 118.0643, 146.0591, 159.0903, 170.0591, 188.0696, 205.0971		
Proline	Pro (P)	C5H9NO2	115.0628	116.0706	1.59	1.67	70.0647, 116.0704		
Glutamine	Gln (Q)	C5H10N2O3	146.0686	147.0764	ND	1.68	84.0438, 130.0490, 147.0763		
Glutamic Acid	Glu (E)	C5H9NO4	147.0526	148.0604	1.65	1.70	56.0491, 84.0438, 102.0543, 130.0490, 148.0602		
Cysteine	Cys (C)	C3H7NO2S	121.0192	122.0270	1.69	1.76	58.9945, 76.0209, 86.9893, 104.9997, 122.0270		
Tyrosine	Tyr (Y)	C9H11NO3	181.0733	182.0812	1.75	1.79	91.0536, 95.0485, 107.0485, 119.0483, 123.0433, 136.0748, 147.0431, 165.0538, 182.0822		
Aspartic Acid	Asp (D)	C4H7NO4	133.0370	134.0450	1.83	1.87	70.0283, 74.0231, 88.0387, 116.0334, 134.0446		



図 3: グルタミン酸の MS および MS/MS スペクトル a: グルタミン酸 MS スペクトル,b: グルタミン酸 MS/MS スペクトル,c: <sup>13</sup>C を 1 つ含むグルタ ミン酸 MS/MS スペクトル,NL (Normalized Level),hcd (Higher energy Collisional Dissociation)

一方で、遊離アミノ酸の測定では、アスパラギンを除 く全てのアミノ酸が検出された.但し、保持時間が総ア ミノ酸の測定に比べ、全体的に遅くなる現象がみられた. これは、遊離アミノ酸解析における試料調製が破砕処理 のみによる為、総アミノ酸試料に比べて、アミノ酸以外 の有機化合物が解析試料に混在し、それらが電気泳動時 に干渉した結果であると考えられる.

今回の解析結果は、Orbitrap Fusion を用いた遊離ア ミノ酸の分析は、従来のGC-MSを用いた解析における 技術的課題を克服しうることを示す.ただし、微生物試 料を取り扱う場合には、菌体内の化合物の多様性は培養 条件や使用する菌種により変化し、それらがMSにおけ るイオン化時に競合することにより検出感度の低下に繋 がる事がある.従って、新たな生物試料を測定する際に は、まず総アミノ酸と遊離アミノ酸を予察的に解析し、 それぞれの解析手法に由来する技術的課題を考慮の上 で、解析対象・手法を選択することが望ましい.

## 4. アイソトポマーの検出

図3に総アミノ酸の測定におけるのグルタミン酸 ([M+H]+m/z148.0602:有効数字は小数点以下3桁で あるが、本報では炭素の同位体ピークの質量差 m/z 1.003を扱う上で、敢えて実測の数値をそのまま表記す る事とする)の MS スペクトル (図 3-a) と, そこに検出 された自然存在度の同位体ピーク *m/z* 149.0634, それ ぞれの MS/MS スペクトル (図 3-b, c) を示した.

両ピークの差は<sup>12</sup>Cと<sup>13</sup>Cの質量差(m/z 1.0032)であ り,まさに同位体のピークを検出している.更にそれぞれ を MS/MS 測定した結果の構造情報から(Thermo Fisher Scientific 社提供の mzCloud スペクトルライブラ リーを参照, https://www.mzcloud.org/), m/z 149.0634 のグルタミン酸には1つの<sup>13</sup>Cが構造中のいずれかに導 入されており、さらに図 3-c のピーク情報から1位の炭 素が抜けた [M+H-H2O-HCOOH]+m/z 84.0440, [M+ H-HCOOH]+m/z102.0545 にそれぞれ m/z 85.0474. m/z103.0579の同位体ピークが見られていることから、 1 位の炭素が<sup>12</sup>C と<sup>13</sup>C になっているものが、どちらも 存在していることがわかる(高野ら, 2015). また, 5位 の炭素が抜けた [M+H-H2O-HCOOH-HCOOH]+m/z 56.0492 にも m/z 57.0526 がみられるため, 同様に5位 の炭素にも <sup>12</sup>C と <sup>13</sup>C どちらも存在していることがわか る、同時に2~4位の炭素に関しては個々が抜ける分子 構造に該当するピークは検出されていない為、いずれの 炭素が <sup>13</sup>C であるか判別できないが, m/z 57.0526 の数 値からいずれか1つが <sup>13</sup>C であることが示唆される.つ まり、この天然同位体を含むグルタミン酸では、特定の 炭素が<sup>13</sup>Cとなっている訳ではなく,各位の炭素にラン

ダムに <sup>13</sup>℃ が入っていることが明らかになった.

## 5. まとめ

本章にて紹介した結果は、CE-MSを用いた分析手法 が、安定同位体で標識した基質を用いたトレーサー代謝 解析を行う上で、非常に有用なデータをもたらす可能性 を示す. 試料調製の簡便さと短時間での測定が可能なこ とからも、CE-MSを用いた分析手法は、今後、GC-MS を用いた従来法と合わせて、トレーサー代謝解析法の重 要な手段の一つとなっていくことが期待される. なお、 本報の結果から概算すると、一般的な従属栄養細菌の細 胞内遊離アミノ酸を測定する場合、必要な菌体は 10<sup>6</sup>~ 10<sup>7</sup>細胞であると推定される. 更に、細菌細胞を構成す る総蛋白質の塩酸加水分解によって得た総アミノ酸を測 定する場合、10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>細胞程度でも良好な結果を得るこ とができると推定される. 実際に同位体を用い培養した 菌体での詳細な解析については本誌 6 章を参照された い.

更に、Thermo Fisher Scientific 社提供の低分子解析用 ソフトウェア Compound Discoverer がバージョン 3.1 からトレーサー代謝解析に対応したことにより、より広 範囲な代謝系を対象としたトレーサーメタボロミクス解 析の可能性が広がった.高感度・高分解能であり、かつ 精密質量が取得できるオービトラップ搭載の質量分析計 は、アミノ酸だけではなく解糖系や TCA 回路(クエン 酸回路)など有機酸を直接対象とするトレーサー代謝解 析においても、非常にパワフルなツールとなる可能性が 高い.なお、現在、我々は、CE や UPLC などの分離手 法を併用し、中央代謝系に関わる有機酸のトレーサー代 謝解析法のより高感度・高精度な手法を確立すべく条件 検討を進めている.今回紹介したアミノ酸トレーサー代 謝解析と共に、生物の代謝機構の研究における有力な選 択肢の一つとなることを期待している.

### 謝辞

本研究を進めるにあたり,福山宥斗ポストドクトラル 研究員(海洋研究開発機構)に一部のサンプル調整にご 協力頂いた.また,技術的な助言を頂くと共に,本稿執 筆の機会を頂いた,力石嘉人教授(北海道大学低温科学 研究所)に深くお礼を申しあげます.

本項で紹介した研究の一部は,文部科学省科学研究費 補助金・新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポ ストコッホ機能生態学」(課題番号:19H05684),日本学 術振興会化学研究費補助金・基盤研究(A)「TCA 回路の 多様性とその起源の解明」(課題番号:19H00988)で行 われた.

## 参考文献

- 窪田雅之 (2007) 電場型フーリエ変換質量分析計 Orbitrap の 仕組みと性能,そして LTQ Orbitrap について 生物物理 科学,51,53-58
- Thomas MÄOHRING, Tomoko Vincent (2018)「オービト ラップ型イオントラップを有する質量分析計の原理と応用 研究」. ぶんせき,**12**, 526-531
- Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H.and Takai, K.(2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, **359**, 559–563.
- 高野淑識,力石嘉人,大河内直彦 (2016) アミノ酸 (ピバロ イル/イソブチルエステル誘導体)の GC/MS による解析. *Res. Org. Geochem.*, **32**, 1-18.
- カ石嘉人・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. Res. Org. Goechem., 25, 61-70.
- 高野淑識,力石嘉人,大河内直彦 (2015) イオンペアクロマ トグラフィー/電子スプレーイオン化質量分析法 (LC/ ESI-MS) によるアミノ酸のマススペクトル解析. Res. Org. Geochem., **31**, 33-49.

## Orbitrap Fusion を用いた CE-MS と 四重極 GC-MS でのアミノ酸分析の比較

## **澄田 智美<sup>1)</sup>\*, 島村 繁<sup>1)</sup>, 布浦 拓郎<sup>1)</sup>**

2020年11月9日受付, 2021年1月23日受理

微量メタボローム解析技術(アミノ酸のピバロイル/イソプロピルエステル誘導体を用いたGC-MS での分析及び質量キャリブレーション用のソフトウェアである MassWorks を用いた解析)によ るアミノ酸のアイソトポマー解析は、アミノ酸生合成経路だけでなく、前駆体となる有機酸を生産す る TCA 回路等周辺の主要代謝経路の解明にも有効な手段である.しかし、この僅かなバイオマスで 解析可能な手法であっても、その適用に十分なバイオマスを得ることが困難な環境微生物も存在する. また、GC-MS での解像度では、他の化合物との十分な分離が困難な場合もある.そこで、より高精度 で高感度な解析手法の開発を目指し、キャピラリー電気泳動インターフェイス ZipChip<sup>TM</sup> とオービト ラップ搭載機種 Orbitrap Fusion を用いた CE-MS での分析及び解析ソフトウェア Xcalibur Qual Browser を用いた代謝解析技術の基盤構築を進めている.本報では微量メタボローム解析における、 従来の GC-MS と新技術の CE-MS の両者を比較しつつ紹介する.

## Detection of tracing of stable isotope labelled amino acids using Orbitrap-Fusion CE-MS and Quadrupole GC-MS

Tomomi Sumida<sup>1</sup>, Shigeru Shimamura<sup>1</sup> and Takuro Nunoura<sup>1</sup>

Isotopomer analysis for amino acids in tracer-based metabolomics is useful to identify major metabolic pathways producing amino acid precursors such as the TCA cycle in addition to amino acid biosynthetic pathways. A novel method of tracer-based metabolomics that consists of quadrupole GC-MS analysis for pivaloyl/isopropyl derivatives of amino acids and MassWorks software for identification of stable isotope probing required less amount of samples comparing with the methods available previously. However, even with the novel method, isotopomer analysis of amino acids for some of environmental microbes is not applicable because of the difficulty in obtaining sufficient biomass. Thus, we are developing an accurate and sensitive analysis by CE-MS analysis with an Orbitrap Fusion MS compound with a capillary electrophoresis interface ZipChip<sup>TM</sup>. Here, we report the comparison of current GC-MS and developing CE-MS methods to identify isotopomers of amino acids.

**キーワード**:メタボローム解析,安定同位体,質量分析 Metabolomics, <sup>13</sup>C tracer analysis, Stable isotope, Mass spectrometry

\*連絡先

澄田 智美
国立研究開発法人海洋研究開発機構(JAMSTEC)
〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2番地15
e-mail:sumidat@jamstec.go.jp
1)海洋研究開発機構(JAMSTEC)
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology

## 1. 解析手法

GC-MS での測定分析は Agilent Technologies 社製の ガスクロマトグラフィー質量分析計 6890 N GC-5973 A MSD (HP-5 ms カ ラ ム)を用いて行い, Cerno Bioscience 社製の質量キャリブレーションソフトウェア MassWorks により同位体標識率を算出した. CE-MS での分析は 908 devices 社製の ZipChip CE System と Thermo Fisher Scientific 社製のオービトラップ質量分



図1:アミノ酸試料の調製法の比較.

析計 Orbitrap Fusion を用いて測定を行い,同じく Thermo Fisher Scientific 社製の解析ソフトウェア Xcalibur Qual Browser により同位体標識率を算出した. 測定原理に関する詳細は,本特集号「3. 安定同位体の天 然存在量及び安定同位体標識の検出法-2:ガスクロマ トグラフ-質量分析計と MassWorks」と「5. オービト ラップ質量分析計を用いたアミノ酸解析の可能性」を併 せて参照されたい.

## 2. 全アミノ酸試料調製方法の改善

本研究では、試料検体として<sup>13</sup>CO<sub>2</sub>を添加して培養標 識した化学合成独立栄養細菌(Aquificae 門)の菌体を用 いた.GC-MS分析用のアミノ酸の抽出と誘導体化は、 Chikaraishi et al., 2009の方法を一部改変して行なった. GC-MS分析用の試料調製は、全菌体のタンパク質をア ミノ酸に加水分解するため、濃塩酸で処理後、脱脂、イ ソプロピルエステル誘導体化及びピバロイル誘導体化の 工程を経る(図1(A)).一方で、CE-MSでの分析用の 試料は、誘導体化が不要であり、加水分解および脱脂の みにより調製されるため(図1(B))、GC-MS 用の試料 調製に比べて非常に簡便である.

Chikaraishi *et al.*, 2009 の方法での試料調整では, 脱脂 後の窒素ガス気流下での乾固時に, 試料バイアルにメタ ノールを加えて共沸させていた. しかし, その方法で調 製した試料を CE-MS で分析したところ, アミノ酸の主 鎖および側鎖のカルボキシル基がエステル化されている と想定されるピークが検出された.そこで,濃塩酸処理 後の試料にメタノールを加えることで,実際にエステル 化が生じるのか否か,標品のアスパラギン酸を用いた検 証を以下のように実施した(図2).

濃塩酸に溶かした標品のアスパラギン酸を用い、メタ ノールの添加・非添加で N2 乾固を行った試料用いて CE-MSのポジティブイオンモードで測定した結果、メ タノールを加えた試料ではアスパラギン酸の [M+H]+ m/z134.045の他に, 主鎖もしくは側鎖の COOH 基の どちらかがエステル化された  $[M+H+CH_2]^+$ の m/z148.060と, 主鎖と側鎖の両方がエステル化された [M+ H+CH<sub>2</sub>+CH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>の m/z 162.076 が検出された (図 2 (A)). この検証の結果,一連の試料処理に伴うエステ ル化により生じる技術的な問題も明確になった. なかで も顕著な事象は、エステル化したアスパラギン酸とグル タミン酸の識別において生じる. 主鎖もしくは側鎖の COOH 基のどちらかがエステル化されたアスパラギン 酸  $[M+H+CH_2]^+$ は、グルタミン酸  $[M+H]^+$ の m/z値 (m/z148.060) と等しくなり、また、CE-MS 分析に よる保持時間もグルタミン酸の [M+H]+と非常に近い ため, 解析時のピークの同定を難しくする (図2(B)). このようなエステル化はメタノールの非添加試料では生 じないため、アミノ酸の試料調製では、脱脂後の乾固時 にメタノールを添加せずに乾固することを推奨する.



図2:全アミノ酸試料調製時の塩酸とメタノール処理によるエステル化の影響.

## 3. アイソトポマー分析手法の比較

TCA 回路の反応方向の確定を行う際には、それぞれ、 ピルビン酸、オキサロ酢酸、オキソグルタル酸を前駆体 とするアミノ酸であるアラニン,アスパラギン酸,グル タミン酸が鍵となる、そのため、これら3つのアミノ酸 のアイソトポマー解析が多くの研究で行われている (Nunoura et al., 2018). GC-MS での分析の場合、ピバロ イル / イソプロピルエステル誘導体化アミノ酸のイオン 化時にそれぞれの構造に特異的なフラグメンテーション が生じる (Chikaraishi et al., 2009). 従って、アミノ酸に 取り込まれている安定同位体標識率を算出するには、プ リカーサーイオン[M]<sup>+</sup>の代わりに [M]<sup>+</sup>からプロピル エステル基が脱離した [M-59]+ に対応したイオンフ ラグメントの安定同位体標識率が解析される.例えば、 アラニン,アスパラギン酸,グルタミン酸の場合,[M]+ がそれぞれ m/z 215, 301, 315 のため, [M-59]+ は m/z 156, 242, 256 となる. それに対し、CE-MS ではフラグ メンテーションが起きにくい ESI によるイオン化での ポジティブイオンモード測定のため、[M+H]+を解析 しており、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸の [M+H]+ はそれぞれ m/z 90.055, 134.045, 148.060 と なる. Orbitrap では精密質量での測定が可能なため、分 析された [M+H]<sup>+</sup>もサブ 1 ppm (内部標準による LockMass 機能使用時)の質量精度で精密質量を得るこ とができ、解析ピークの同定精度は非常に高い、図3の 同位体標識試料は<sup>13</sup>CO2が十分に取り込まれているた め、各アミノ酸に複数個の<sup>13</sup>Cの取り込みが確認できる. 非標識試料をコントロールとして用いた GC-MS 及び CE-MSの解析結果を比較すると(図3(A, E)), GC-MS では夾雑物由来のピークが確認された(図3(A)の青枠 内). <sup>13</sup>Cの天然存在比は約1.1%であり、<sup>13</sup>Cが分子内 に2個存在する [<sup>13</sup>C]<sub>2</sub>標識されたアミノ酸の天然存在 比は非常に少ないはずであり、非標識コンロトールの試 料では [<sup>13</sup>C]<sub>2</sub>の位置に同位体標識ピークは検出されな いはずである(図3(E)). このように、GC-MSを用い て試料を解析する際には夾雑物の影響を受けるアミノ酸 が存在することを留意する必要があり、同位体標識試料 (図3(B))を解析する際には、非標識コントロール(図3 (A))の[<sup>13</sup>C]<sub>1</sub>及び[<sup>13</sup>C]<sub>2</sub>の存在量を引くことにより実 際の存在量を計算する必要がある。一方で CE-MS の解 析では、Orbitrap の質量分解能が高いため、アミノ酸由 来のピークと夾雑物由来のピークを精密質量で分けるこ とが可能である.また、CE-MSでは安定同位体が複数 個アミノ酸に取り込まれた際、それぞれの安定同位体標 識されたアミノ酸のピークは、<sup>12</sup>Cと<sup>13</sup>Cの精密質量差



図3:アイソポマー解析の比較.

である 1.003 の質量で正確にピークがシフトするため (図 3(F)), より精度の高い解析が可能となる.実際, 図 3 (G)に示すように, [<sup>13</sup>C]<sub>1</sub>, [<sup>13</sup>C]<sub>2</sub> のピークを近傍に検出 される夾雑物のピークと区別して解析する事ができる.

## 4. 標品を用いた CE-MS での MS/MS 分析

GC-MSを用いてアミノ酸の1位の炭素の安定同位体 標識率を解析する場合,プリカーサーイオン [M]+から プロピルエステル基が脱離した [M-59]+のフラグメ ントイオンの量比(分子全体に含まれる安定同位体標識 率に対応)と,1位のカルボニル基が脱離した [M-87]+ のフラグメントイオンの量比(1位の炭素を除いた残り の構造に含まれる安定同位体標識率に対応)とを比較す ることでおこなわれる.一方で,同様の解析を CE-MS で行う場合には,プリカーサーイオン [M+H]+をさら に MS/MS分析して得られたフラグメントイオンの安定 同位体標識率を解析する必要がある.従って両者の比較 のため CE-MS での MS/MS 測定で得られるフラグメン トイオンの解析を行った.

Cambridge Isotope Laboratories, Inc より入手したア ラニン(L-ALANIN (1-<sup>13</sup>C, 99%)), アスパラギン酸 (L-ASPARTIC ACID (1,4-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, 99%))及びグルタミ ン酸(L-GLUTAMIC ACID (5-<sup>13</sup>C, 99%))を用いて MS/MS 測定を行った結果, アラニンでは MS/MS によ り生じるフラグメントイオンのうち, カルボキシル基の 脱離により生成するフラグメントイオンが CE-MS の検 出下限値 (m/z 50)を下回るため解析ができなかった. 一方で, アスパラギン酸及びグルタミン酸に関しては, MS/MS によるフラグメントイオンの解析が可能であっ た (それぞれ図4と図5).アミノ酸の主鎖のカルボキシ ル基 (-COOH)の脱離により生成したイオン ( $[M+H-HCOOH]^+ = [M+H-46]^+$ , アスパラギン酸ではm/z88.039, グルタミン酸では102.055)は、図4,5の星の 位置に<sup>13</sup>C の安定同位体標識が入っており,それぞれ  $[M+H-46]^+ + 1.003 \text{ m/}z$ で検出される.それに加 えて,アスパラギン酸では3位と4位の側鎖(-CH<sub>3</sub>-COOH)の脱離により生成したイオン( $[M+H-CH_3-COOH]^+ = [M+H-60]^+$ ,m/z74.024+1.003)が,グ ルタミン酸では1位と5位のカルボキシル基の脱離によ り生成したイオン( $[M+H-HCOOH-HCOOH]^+ = [M+H-92]^+$ ,m/z56.050)が検出された.

1 位のカルボキシル基の炭素の安定同位体標識率の解 析には、 $[M+H-HCOOH]^+ = [M+H-46]^+$ のマスス ペクトルが利用される.現行の CE-MS の分析方法で は、プリカーサーイオンのエリア値は算出できるが、残 念ながら MS/MS 分析のエリア値は算出することができ ないため、主鎖の標識率の解析はエリア値ではなくピー ク強度を用いる。例えば図 3(G)のアスパラギン酸の分 析では(図 6)、標識の数が1個 [<sup>13</sup>C]<sub>1</sub>の 135.048([M+ H]<sup>+</sup>+1.003)のプリカーサーイオンに対する MS/MS 分析の [M+H-46]<sup>+</sup> のピークは、m/z88.040([M+ H-46]<sup>+</sup>)と 89.043([M+H-46]<sup>+</sup>+1.003)の2つが 確認される(図 6(A)赤枠内).この2つのピーク強度を



図4:アスパラギン酸の(A)マスクロマトグラム及び(B)MS/MS スペクトルとフラグメンテー ションパターン.



図5:グルタミン酸の(A)マスクロマトグラム及び(B)MS/MSスペクトルとフラグメンテーションパターン.

比較することにより, カルボキシル基の同位体標識率を 見積もる事ができる.実際に, CE-MS のプリカーサー イオン  $[M]^+$ のエリア値からの算出された, 1つの炭素 が<sup>13</sup>C で標識されているアスパラギン酸(存在比 22.8%)のうち(表1),約28%に1位のカルボキシル基 が標識されており,残りの72%は主鎖以外の炭素が標識 されている事が分かる.複数の炭素が<sup>13</sup>C で標識されて いる場合にもm/z136.051(2個標識  $[^{13}C]_2$ ,  $[M]^+ +$ 2.007,図6(B)),m/z137.055(3個標識  $[^{13}C]_3$ ,  $[M]^+ +$ 3.010,図6(C))をMS/MS分析し, $[M+H-46]^+$ のフ ラグメントイオンを解析することで,同位体標識化率を 解析することができる,

アラニンとアスパラギン酸に関して,GC-MS

(+MassWorks)とCE-MS(+Xcalibur Qual Browser) との同位体標識率解析の結果を表1にまとめた.この結 果,GC-MSとCE-MSで解析方法の相違に起因すると 推測される差異はあるものの,検出された同位体標識率 は従来のGC-MSでの解析結果と新技術のCE-MSでの 解析結果はほぼ一致していることがわかる.このように CE-MSを用いた解析は、より微量な試料での解析が可 能で試料調製が容易であり、且つ、従来のGC-MSでの 分析と同程度、もしくはそれ以上の精度で同位体標識率 を解析することができる可能性が高い.今後、分析条件 をさらに検討し、簡便で優れた精度で代謝解析が可能な 技術基盤の構築を進めたい.



**表1**: GC-MS 及び CE-MS 解析によるアミノ酸の [<sup>13</sup>C]の標識の数と存在量(%)の比較.

				-			
		GC-MS [M-59]†から 算出	CE-MS [M+H]⁺から 算出	アミノ酸の主鎖と側鎖の標識の数		GC-MS [M-59]*と [M-87]*から 算出	CE-MS [M+H] <sup>+</sup> と MS/MS から 算出
アラニン	標識の数	存在量(%)		主鎖    側鎖		存在量(%)	
	[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	62.0	46.4	[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>		62.0	46.4
	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	18.8	28.1	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	4.8	MS/MS から 算出できない
				[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	14.0	
	[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub>	10.8	20.6	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	10.8	
				[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub>	0.0	
	[ <sup>13</sup> C] <sub>3</sub>	8.5	4.8	[ <sup>13</sup> C] <sub>3</sub>		8.5	4.8
アスパラギン酸	標識の数	存在量(%)		主鎖		存在量(%)	
	[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	49.8	38.4	[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>		49.8	38.4
	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	20.6	22.8	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	$[^{13}C]_0$	11.5	6.3
				[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	9.1	16.5
	[ <sup>13</sup> C] <sub>2</sub>	15.3	24.4	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>1</sub>	14.4	11.9
				[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	$[^{13}C]_2$	0.9	12.5
	[ <sup>13</sup> C] <sub>3</sub>	10.1	12.0	$[^{13}C]_1$	$[^{13}C]_2$	9.9	11.4
				[ <sup>13</sup> C] <sub>0</sub>	[ <sup>13</sup> C] <sub>3</sub>	0.2	0.6
	[ <sup>13</sup> C] <sub>4</sub>	4.2	2.5	$[^{13}C]_4$		4.2	2.5

謝辞

共に本稿の執筆の機会をいただいた,北海道大学低温科 学研究所の力石嘉人教授に深くお礼を申し上げます.ま た,理化学研究所の千葉洋子研究員には一部の解析にご

本研究を行うにあたり、ご助言とご指導をいただくと

協力いただきました.本項の研究の一部は,日本学術振 興会科学研究費(基盤研究A:研究代表者 布浦拓郎) (19H00988)及び,(新学術領域研究(研究領域提案型): 研究代表者 跡見晴幸,研究分担者 布浦拓郎 (19H05684),北海道大学低温科学研究所共同研究 (20G043)からの支援を受けて行われました.

## 参考文献

力石嘉人・高野淑識・大河内直彦(2009)アミノ酸(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. *Res. Org. Geochem.*, **25**, 61-70.

Nunoura, T., Chikaraishi, Y., Izaki, R., Suwa, T., Sato, T., Harada, T., Mori, K., Kato, Y., Miyazaki, M., Shimamura, S., Yanagawa, K., Shuto, A., Ohkouchi, N., Fujita, N., Takaki, Y., Atomi, H.and Takai K. (2018) A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, **359**, 559–563.

## 宇宙における安定窒素同位体比の多様性と その起源解明に向けた実験的アプローチ

## 菅原 春菜

2021年2月2日受付, 2021年2月12日受理

窒素は有機分子を形成する重要な元素の1つであるが、その安定同位体比(<sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N)は宇宙において、地球上での変動幅を遥かに超えるような非常に大きな変動幅を示す。本稿ではまず、銀河スケールから太陽系スケール、さらには始原的太陽系物質のミクロスケールに至るまで、窒素同位体比の多様性について議論する。さらに、彗星や隕石のような始原的太陽系物質において<sup>15</sup>Nの濃集がいかにして生じたのかを解明するための実験的研究について紹介し、特に始原的な窒素であるアンモニアが<sup>15</sup>N 濃集の重要な鍵となる可能性について議論する。

# Diversity of stable nitrogen isotopic ratio in the universe and the experimental approaches to understand the origins

### Haruna Sugahara

Nitrogen is one of the important constituent elements of organic molecuels. In the universe, the stable isotopic ratio of nitrogen  $({}^{15}N/{}^{14}N)$  shows a huge variation compered with the terrestrial one. In this paper, the variation of the nitrogen isotopic ratio from in the garactic scale to the solar system scale, and in the micro scale in the pristine solar system materials are reviewed. In addition, the experimental studies to understand the anomalous accumulation of  ${}^{15}N$  in the pristine solar system marials such as comets and chondrites are described. Especially, the possible role of ammonia in the accumulation of  ${}^{15}N$  is discussed.

キーワード:安定窒素同位体比,同位体異常,同位体分別,地球外有機物,始原的太陽系物質
 Stable nitorogen isotopic ratio, Isotopic anomaly, Isotopic fractionation, Extraterrestrial organic materials, Pristine solar system materials

## 1. はじめに

有機分子は炭素(C)を骨格として,主として宇宙にお いても存在量の多い水素(H),酸素(O),窒素(N)の 4元素から構成される.これらの元素にはそれぞれ質量 数の異なる安定同位体が存在するが,その比は様々な物 理化学的プロセスにより変動するため,有機分子が経て

\*連絡先

菅原 春菜

〒252-5210 神奈川県相模原市中央区由野台 3-1-1 e-mail:sugahara.haruna@jaxa.jp 国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究所 ISAS, JAXA, Sagamihara, Japan きた進化プロセスや生成環境を理解するための重要な指標となる.これらの元素において、安定同位体は質量数が最も小さいものの存在度が圧倒的に多く、また、地球上での安定同位体比の変動は極僅かであるため、以下のように地球の標準物質を基準とした千分率として表される.

$$\delta^{15}N(\%) = (R_{ik} / R_{ik} / R_{ik$$

この式は窒素を例にしたが,窒素には<sup>14</sup>Nと<sup>15</sup>Nの2 つの安定同位体があり,標準物質である地球大気の <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N比は0.0036765である.地球物質の安定同位体 比の変動幅は数十%程度であるが,地球外物質は地球物 質と比べ,変動幅が大きい.特に,水素と窒素は数千% を超える大きな変動幅を持つため、天文学分野では地球 物質を基準とした千分率ではなく、単に D/H や<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N のように表されることも多い。

本稿では、宇宙における安定窒素同位体比の多様性や その起源解明に向けた研究について紹介する.

## 2. 宇宙における安定窒素同位体比の多様性

### 2.1. 銀河系の安定窒素同位体比

窒素の2つの安定同位体(14N, 15N)の詳細な生成プロ セスについてはまだ議論も多いが、両者ともに質量の大 きな (M>1M<sub>☉</sub>) 恒星内部における CNO (carbonnitrogen-oxygen) サイクルの副生成物として生成される と考えられている。<sup>14</sup>N は主系列星や赤色巨星の水素燃 焼殻における cold-CNO サイクルや新星アウトバースト の hot-CNO サイクルおよび AGB 星(Asymptotic Giant Branch star:漸近巨星分枝星)における HBB (Hot Bottom Burning) により生成されると考えられ、特に HBB が主要な生成プロセスとされるのに対し、<sup>15</sup>Nの主 な生成プロセスは hot-CNO サイクルや超新星爆発 (Type Iaおよび Type Ⅱ)のみと考えられている (e.g., Wiescher et al., 2010; Adande and Ziurys, 2012; Romano and Matteucci, 2003). このように,<sup>14</sup>Nの起源には一次 的および二次的ソースの両方が存在するのに対し,<sup>15</sup>N は二次的ソースのみであり、この起源の相違が銀河内に おける<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N比の勾配を生み出す.銀河中心は金属元 素の多い星が多いため、新星や超新星爆発により生成す る <sup>15</sup>N の存在量が多く,銀河中心からの距離に応じて <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N 比は上昇する (Adande and Ziurys, 2012). 銀河 内に存在する様々な星間分子雲のニトリル (CN, HNC, HCN)の天文学的観測結果により、<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N 比と銀河中 心からの距離との関係式が得られ、そこから太陽系が形 成された位置の星間分子雲(Local ISM: Local interstellar medium) の <sup>14</sup> N/<sup>15</sup> N 比 は 290 ± 40 ( $\delta$  <sup>15</sup> N = -60 ±130‰)と算出される(Adande and Ziurys, 2012).

#### 2.2. 太陽系の安定窒素同位体比

太陽系において最も大きな窒素リザーバーは太陽であ るため、太陽系のバルクの窒素同位体比は太陽の値に等 しい.アメリカ航空宇宙局 (NASA)のジェネシス (Genesis) 探査機により持ち帰られた太陽風サンプルの 分析から、現在の太陽の $\delta^{15}$ N値は $-383\pm8\%$  (<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N =441±5)であることが明らかになった (Marty et al., 2011).しかし、この太陽系の値は前述の銀河系の <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N 比の勾配から想定される値 ( $\delta^{15}$ N = -60 ±130‰, <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N = 290±40)とは一致しない. この相違 の要因としては, 45.6 億年前に星間分子雲が収縮し, 原 始太陽系円盤が形成される過程で局所的に同位体分別が 生じた可能性が考えられる (e.g., Füri and Marty, 2015). また, 銀河系内の星間分子雲の窒素同位体比の測定分子 種は多くがニトリル (CN, HNC, HCN)であるが, 太陽 系に近い星間分子雲 Barnard 1 のアンモニアやそのアイ ソトポログの (NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>D)の窒素同位体比はそれぞれ  $\delta^{15}$ N =  $-186\pm125\%$  (<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N = 334±50),  $\delta^{15}$ N = -421±155‰ (<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N = 470<sup>±1</sup>%) とニトリルよりもより太陽 系に近い値を示す (Lis et al., 2010; Gerin et al., 2009). そ のため, 星間分子雲内において, ニトリル分子種とアミ ン分子種 (アンモニア)との間で同位体分別が生じ, そ のソースの相違が太陽系の値に反映されている可能性も 考えられている (e.g., Hily-Blant et al., 2013).

#### 2.3. 太陽系天体の安定窒素同位体比

前述の通り、太陽の窒素同位体比はδ<sup>15</sup>N=-383±8‰ (<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N=441±5) であるが,太陽系天体は多様な窒素 同位体比を示す(図1).太陽系で最も大きな惑星である 木星については欧州宇宙機関(ESA)の赤外線天文衛星 (Infrared Space Observatory Short Wavelength Spectrometer, ISO-SWS) や NASA/ESA のカッシーニ (Cassini) 探査機による天文観測, NASA のガリレオ (Galileo) 探 査機によるその場質量分析等により、大気中のアンモニ アの窒素同位体比が測定されている. 求められた窒素同 位体比はそれぞれ, ISO-SWS: δ<sup>15</sup>N = -483<sup>+245</sup>/<sub>-272</sub>% (<sup>14</sup>N/  $^{15}N = 526^{+585}_{-169}$  (Fouchet et al., 2000). Cassini :  $\delta^{15}N =$  $-393 \pm 86\%$  (<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N = 448 ± 62) (Abbas et al., 2004), Galileo :  $\delta^{15}N = -375 \pm 80\%$  (14N/15N = 435 ± 60) (Owen et al., 2001) である. このように木星の窒素同位体比は 太陽とほぼ同じ値を示し、原始太陽系円盤と同様の値を 保持していると考えられる.同じく巨大惑星である土星 は天文観測から<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N=~500 (δ<sup>15</sup>N=-460‰) 程度と 木星と同様の窒素同位体比を持つことから、土星と木星 は原始太陽系円盤内の同じ窒素リザーバーから形成され たと考えられている (Fletcher et al., 2014; Mousis et al., 2014). しかし, 興味深いことに土星の衛星であるタイ タンは土星とは異なる窒素同位体比を示す. タイタンは カッシーニ探査機から投下されたホイヘンス小型探査機 (Huygens) に搭載されたガスクロマトグラフ質量分析 計 (GC-MS) により, 窒素同位体比の測定が行われたが,  $N_2 O^{14}N/^{15}N$ 比は167.7±0.6 ( $\delta^{15}N = 621.9 \pm 6\%$ ) であ り、土星よりも遥かに<sup>15</sup>Nに富む同位体組成を持つ (Niemann et al., 2010). これはタイタンが原始太陽系円



図1:太陽系天体および星間分子雲の多様な窒素同位体比. Füri and Marty (2019)を改変.

盤内のアンモニア氷から形成された可能性を示唆する (Mandt et al., 2014).

一方、地球のような岩石惑星は太陽や巨大惑星と異な り,<sup>15</sup>Nに富む.前述の通り,地球大気はδ<sup>15</sup>N=0‰  $(^{14}N/^{15}N = 272)$ である. 月については、NASA のアポロ (Apollo) 計画や旧ソ連のルナ (Luna) 計画により持ち帰 られた月のレゴリス試料の詳細分析がなされている。月 には大気や磁気圏による遮蔽効果がほとんど働かないた め、月の表層は太陽風の影響を強く受け、月表層の窒素 同位体比は<sup>15</sup>N に乏しい太陽風起源の窒素(δ<sup>15</sup>N=< -200‰, <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N=>340) と<sup>15</sup>N に富む窒素 (8<sup>15</sup>N= +50~100‰,<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N=265±5)の混合により幅広い値 を示す (Hashizume et al., 2000; Füri and Marty, 2015). 後者の起源としては惑星間塵(IDPs: Interplanetary dust particles) や微隕石などが考えられている.次に, 火星は NASA のバイキング (Viking) 探査機1号と2号 に搭載された質量分析計により,現在の火星大気 (N2) の窒素同位体組成が直接測定され、その値はδ15N= +648±65‰ ( $^{14}N/^{15}N = 165 \pm 17$ )と、地球よりも  $^{15}N$  に 富む (Nier and McElroy, 1977; Owen et al., 1977). また, 火星隕石の衝突ガラスに閉じ込められた過去の火星大気 は、同様に<sup>15</sup>N に富む値を示すが(e.g., Zagami 隕石: δ<sup>15</sup>N = + 244.7±17.4‰, Marti et al., 1995), 火星隕石 の中にはδ<sup>15</sup>N=-30‰という低い窒素同位体比を持つ 成分が存在し、この値は火星内部の窒素の値を示すと考 えられている (e.g., Mathew and Marti, 2001). これらの 窒素同位体比の相違は、火星大気の進化や大気と岩石圏 との間の相互作用の存在を示唆する. それから金星につ いては、NASA のパイオニア・ヴィーナス (Pioneer Venus) 探査機に搭載の質量分析計による測定例があり, 窒素同位体比の測定精度は高くないが、地球とほぼ同様 の値であろうと報告している (Hoffman et al., 1979).

#### 2.4. 始原的太陽系物質(隕石,彗星)の安定窒素同位体比

隕石や彗星などの始原的太陽系物質は, 岩石惑星と同 様に太陽よりも<sup>15</sup>N に富むが、岩石惑星がほぼる<sup>15</sup>N= ~0‰ (<sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N=270) 付近の窒素同位体比を持つのに対 し、始原的太陽系物質の値は多様で、さらに+1,000‰を 超えるような非常に高い窒素同位体比を示すものが存在 する (図1). 始原的太陽系物質の窒素は主に有機物,特 に不溶性有機物(Insoluble Organic Matter: IOM)とい う形態で存在する. 有機物や揮発性成分を多く含む始原 的な隕石である炭素質コンドライトは、化学組成や酸素 同位体比によって CI, CM, CO, CV, CK, CR, CH, CB に分類されるが、IOM のバルクの窒素同位体比は特 殊な CM コンドライトである Bells 隕石と CR コンドラ イトを除き、全てのコンドライトはほぼ0±30‰という 岩石惑星と同様のδ<sup>15</sup>N 値を示す (e.g., Alexander et al., 2007). 一方, CR コンドライトは+150~310‰, Bells 隕石は+415‰という高いδ<sup>15</sup>N 値を持つ(Busemann et al., 2006; Alexander et al., 2007).

さらに、炭素質コンドライトの中には、ミクロスケー ルで<sup>15</sup>N が局所的に濃集したホットスポットが存在す る.例えば、バルクレベルでは Murchison 隕石 (CM2) の $\delta^{15}$ N 値は  $-1.0\pm0.4\%$  であるが (Alexander et al., 2007)、局所的には  $+2590\pm250\%$  という非常に高い  $\delta^{15}$ N 値を持つホットスポットが存在する (Hashiguchi et al., 2015)、前述の Bells 隕石も最大で +3,200 $\pm700\%$ 、複数の CR コンドライトにも+1,500~ +2,000%という $\delta^{15}$ N 値を持つホットスポットが存在 する (Busemann et al., 2006)、また、Tagish Lake 隕石 にはナノグロビュールの形態を持つ有機物に<sup>15</sup>N の濃集 が見られる (Nakamura-Messenger et al., 2006). これら の<sup>15</sup>N ホットスポットは冷たい星間分子雲や原始太陽系 円盤の外縁部に起源をもつと考えられているが、詳細に ついてまだわかっていない. また, 必ずしも重水素 (D) の濃集とは相関しないため、<sup>15</sup>NとDのキャリアが異な る可能性や原始太陽系円盤や隕石母天体上での水質変成 作用により同位体比が変化する可能性が示唆されている (Busemann et al., 2006; Hashiguchi et al., 2015). それか ら、金属(Fe-Ni)に富む炭素質コンドライトである Isheyevo 隕石は、主に CB と CH の 2 つの岩相が混合し た砕石岩とされるが、バルクでも+1,122‰という非常 に高いδ<sup>15</sup>N 値を持つ (Ivanova et al., 2008). また, Isheyevo 隕石には始原的なゼノリスが含まれ、このゼノ リスのδ<sup>15</sup>N 値は非常に不均質で、太陽のような低い δ<sup>15</sup>N 値(-310±20‰)から太陽系内で最高値となる +4,900±300‰というホットスポットまで、太陽系内全 体の変動幅を表すような非常に幅広いδ<sup>15</sup>N 値を示す (Briani et al., 2009). これは <sup>15</sup>N の少ない原始太陽系円 盤の物質(N<sub>2</sub>)と<sup>15</sup>N に富むカイパーベルト天体や彗星 のような非常に始原的な原始太陽系円盤外縁部の物質が 混合したことを示唆する (Briani et al., 2009).

次に、彗星については、地球上で手に入る彗星物質は NASA のスターダスト (Stardust) 計画により持ち帰ら れた 81P/Wild2 彗星(木星族)のリターンサンプルに限 られる. 81P/Wild2 彗星塵の分析から, バルクのδ<sup>15</sup>N 値は多くが0%であり、一部の粒子が<sup>15</sup>N に富む +100~500‰という値を持つが、ミクロスケールでは、 最大+1,300±400‰の<sup>15</sup>Nホットスポットが存在するこ とが明らかになった (McKeegan et al., 2006). また, 炭 素質コンドライトに見つかったような <sup>15</sup>N に富む (δ<sup>15</sup>N =+1,120±30‰) 有機ナノグロビュールも発見されて いる (De Gregorio et al., 2010). しかし, スターダスト サンプルはサンプル捕集時の高速衝突により, 氷成分は 消失している. 彗星の氷に含まれる窒素含有分子の窒素 同位体比の測定は、彗星の天文学的観測から行われてお り、複数の彗星(木星族およびオールトの雲起源)の  $^{14}N/^{15}N$  比はほぼ同じで CN と HCN が $\sim$ 150 ( $\delta$   $^{15}N = \sim$ +810‰), NH<sub>3</sub> (NH<sub>2</sub>)  $\hbar^{\varsigma} \sim 130 (\delta^{15}N = \sim + 1,100\%)$  °C ある (e.g., Manfroid et al. 2009; Bockelée-Morvan et al., 2008; Rousselot et al., 2014; Shinnaka et al., 2014). しか し, CN, HCN と NH<sub>3</sub> がほぼ同じ同位体比を持ち, かつ, それらが太陽(原始太陽系円盤)の値と異なることは、 2.1 章で述べた星間分子雲におけるニトリル分子種とア ミン分子種との間での同位体分別のモデルと矛盾する. そのため、原始太陽系円盤や星間分子雲からそこに至る

までの過程で、何らかの同位体分別が生じていると考え られる.

## 3. 始原的太陽系物質の<sup>15</sup>Nの濃集の要因解明に 向けた検証実験

## 3.1. 星間分子雲内や原始太陽系円盤での光化学反応に よる窒素同位体分別

2章で述べたように、太陽系天体は多様な窒素同位体 比を示し、特に彗星や隕石のような始原的太陽系物質は 太陽や他の太陽系惑星と比べ高いδ<sup>15</sup>N値を持ち, さら に局所的に <sup>15</sup>N が異常に濃集したホットスポットも存在 する. このような <sup>15</sup>N の濃集は太陽系形成以前の冷たい 星間分子雲に起源を持つと考えられているが、その生成 プロセスについてはあまり理解が進んでいない. 星間分 子雲内にて同位体分別を引き起こす要因の1つとされる のがイオン分子反応であるが、この反応は動的にではな く熱力学的に同位体分別が引き起こされる反応であり, 極低温で大きな同位体分別が生じる(e.g., Terzieva and Herbst, 2000). 特に,水素は窒素を超える 10,000%以 上の同位体異常を示すが、このDの濃集の要因は極低 温の星間分子雲におけるイオン分子反応であると考えら れている.しかし、窒素については、イオン分子反応に より生じさせることのできる同位体分別の程度は小さ く, 始原的太陽系物質の持つ非常に高いδ<sup>15</sup>N 値を説明 できない (Terzieva and Herbst, 2000). この異常な <sup>15</sup>N の濃集をイオン分子反応により生じさせるためには、例 えば 10K 以下の気相中に窒素原子(N)が大量に存在す るといったような特殊な生成環境を考える必要がある (e.g., Rodgers and Charnley, 2008). さらに, 2.3 章で述 べたように、<sup>15</sup>Nの濃集とDの濃集が必ずしも相関しな いことも窒素同位体分別プロセスを理解する上で重要な 問題の1つであるが (e.g., Busemann et al., 2006; Hashiguchi et al., 2015), イオン分子反応における水素の 原子核スピン状態(オルソ・パラ)により説明できると いう説もある (Wirström et al., 2012).

<sup>15</sup>N の濃集を引き起こすもう1つの主要因は紫外線に よる N<sub>2</sub>の自己遮蔽効果による同位体選択的光解離反応 である.星形成領域や原始太陽系円盤にて,恒星からの 紫外線が表面に照射されると,存在量の多い<sup>14</sup>N<sup>14</sup>N は自 己遮蔽効果によりごく表層に存在する分子のみが解離さ れるが,存在量の少ない<sup>14</sup>N<sup>15</sup>N や<sup>15</sup>N<sup>15</sup>N は自己遮蔽効 果が効きにくいため,より深部の領域の分子まで解離さ れる.この選択的光解離により生成された<sup>15</sup>N 原子がア ンモニアのような分子となって星間塵表面に凍結される



**図 2**: 星間氷模擬実験のセットアップおよび生成した試料の 例. Sugahara et al. (2019) を改変.

ことにより、<sup>15</sup>N に富む星間氷が形成されると考えられ ている (e.g., Heays et al., 2017; Furuya and Aikawa, 2018). これらの研究は理論的計算に基づくものであり、 実験的研究は極めて少ないが、Chakraborty et al. (2014) はシンクロトロンを用いた実験を行い、N2の選択的光 解離によって非常に大きな窒素同位体分別が生じること を実証している. 彼らは、H2 と N2 を入れたチャンバー に、シンクロトロンを用いて様々な波長の真空紫外線 (VUV)を照射することで N<sub>2</sub>を光分解し,極低温(195K) にて生成したアンモニアに+10,000%を超える非常に大 きな<sup>15</sup>Nの濃集が生じることを報告している.この VUV による選択的光分解は波長依存性が大きく、 +10,000‰を超える同位体分別が生じるのは 90.0nm で あるが、それ以外の波長では+1,000~+3,000%程度で ある. また. この 90 nm でのピークは自己遮蔽効果のみ では説明できないため、上位の電子状態での摂動が重要 な役割を担っていると考えられている (Muskatel et al., 2011).

また、私たちの研究グループでは、アンモニアを出発 分子として、高真空チャンバー内に模擬星間ガス(水、 メタノール、アンモニア)を導入して、~10Kの基板上 に凍結させ、重水素ランプを用いて紫外線を照射し、星 間氷模擬物質を生成する実験を行い(図2)、生成した有 機物のバルクレベルおよびアミノ酸の分子レベル窒素同 位体比測定を行った(Sugahara et al., 2019).その結果、 生成した有機物はバルクレベルおよび分子レベルでアン モニアと同じ窒素同位体比を示すことが明らかになった



図 3: 星間氷模擬試料の窒素同位体比測定結果. (a) ガスク ロマトグラフ/燃焼/同位体比質量分析計 (GC/C/IRMS) によるサンプル P1-C の m/z 28 クロマトグラム. (b) 試料の バルクおよびアミノ酸の窒素同位体比測定結果. Sugahara et al. (2019) を改変.

(図3).本結果は、星間氷にて光化学反応によりアンモニアから有機分子が生成する際には、窒素に同位体分別 は生じず、アンモニアが<sup>15</sup>Nの濃集プロセスの重要な鍵 であることを示す.

#### 3.2. アンモニアの吸着による窒素同位体分別

アンモニアが始原的太陽系物質の<sup>15</sup>N 濃集を理解する 上での重要な鍵となりうる可能性について前節で述べた が、私たちの研究グループではさらに、アンモニアが星 間塵表面に吸着する際に窒素同位体分別が生じるか否か 検証を行った(Sugahara et al., 2017).この検証実験で は、モンモリロナイトやサポナイトのようなケイ酸塩鉱 物を封入したガラスバイアルにアンモニアガスを導入 し、吸着したアンモニアの窒素同位体比の測定を行った. その結果、吸着したアンモニアは<sup>15</sup>N に富み、+50‰を 超える大きな同位体分別が生じることが明らかになった (図 4).本結果は吸着という非常に基礎的な素過程が窒 素に同位体分別を生じさせることを示している.

## 4. おわりに

本稿では窒素の同位体比に着目し,銀河スケールから,



図 4: (a) アンモニアガスのケイ酸塩鉱物への吸着実験結果. 図中のパーセンテージは水の 含有量を示す. (b), (c) 吸着実験後, 真空に引いた実験の結果. 真空引きする時間は 1-8h まで変化させた. Sugahara et al. (2017) を改変.

太陽系スケール、さらには始原的太陽系物質のミクロス ケールでの窒素同位体異常についてレビューし、宇宙に おける窒素同位体比の多様性とその起源について議論し た. 銀河スケールでは、銀河中心から縁辺部に向かっ て,<sup>15</sup>N が減少していく傾向があり、その中に太陽系が 位置付けられるが、この銀河の傾向から導き出される窒 素同位体比と太陽系の窒素同位体比は一致しないという 問題がある.また、太陽系スケールでは、太陽と木星、 土星はほぼ同様の窒素同位体比を持つが、岩石惑星は <sup>15</sup>N に富み, さらに彗星や隕石のような始原的太陽系物 質は数+1,000‰以上ものる<sup>15</sup>N 値を示す. このように 窒素同位体比は非常に多様であり、その同位体分別プロ セスもおそらく1つではなく複数のプロセスが関与して いると考えられるが、窒素は他の元素と比較してもあま り理解が進んでいない、本稿では、未だ謎の多い窒素同 位体分別プロセスを理解するための試みとして、著者の 研究も含め、いくつかの実験的研究についても紹介した が,1つ1つの素過程において分子レベルで窒素同位体 分別について検証を行っていくと共に, 昨年, C型小惑

星 Ryugu から帰還したはやぶさ2リターンサンプルの ような地球外物質の詳細な分析を重ねていくことで, 謎 の多い窒素の同位体分別プロセスの総合的な理解が進ん でいくと期待される.

#### 謝辞

本稿の執筆の機会をくださった北海道大学低温科学研 究所の力石嘉人教授に心からお礼申し上げます.また, 本稿で紹介した著者の研究の共同研究者である海洋研究 開発機構の高野淑識博士,小川奈々子博士,大河内直彦 博士,東京大学の橘省吾教授,北海道大学低温科学研究 所の香内晃教授,菅原いよさん,北海道大学低温科学研究 費補助金 新学術領域研究「宇宙における分子進化:星 間分子雲から原始惑星系へ」(課題番号:JP25108006), 挑戦的萌芽研究(課題番号:16K13916)および日本学術 振興会 海外特別研究員制度の助成を受けて行われまし たので,ここに感謝申し上げます.また,北海道大学低

57

温科学研究所の共同利用(一般共同研究)の援助を受け ました.

## 参考文献

- Abbas, M. M., LeClair, A., Owen, T., Conrath, B. J., Flasar, F. M., Kunde, V. G., Nixon, C. A., Achterberg, R. K., Bjoraker, G., Jennings, D. J., Orton, G. and Romani, P. N. (2004) The nitrogen isotopic ratio in Jupiter's atmosphere from observations by the Composite Infrared Spectrometer on the Cassini spacecraft. *Astrophys. J.*, **602**, 1063.
- Adande, G. R. and Ziurys, L. M. (2012) Millimeter-wave observations of CN and HNC and their <sup>15</sup>N isotopologues: a new evaluation of the <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N ratio across the galaxy. *Astrophys. J.*, **744**, 194.
- Alexander, C. M. O'D., Fogel, M., Yabuta, H. and Cody, G. D (2007) The origin and evolution of chondrites recorded in the elemental and isotopic compositions of their macromolecular organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **71**, 4380–4403.
- Bockelée-Morvan D., Biver, N., Jehin, E. and Cocharan, A. L. (2008) Large excess of heavy nitrogen in both hydrogen cyanide and cyanogen form comet 17P/Holmes. *Astrophys. J.*, **679**, L49–L52.
- Briani, G., Gounelle, M., Marrocchi, Y., Mostefaoui, S., Leroux, H., Quirico, E., and Meibom, A. (2009) Pristine extraterrestrial material with unprecedented nitrogen isotopic variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 10522–10527.
- Busemann, H., Young, A. F., Alexander, C. M. O'D., Hoppe, P., Mukhopadhyay S. and Nittler, L. R. (2006) Interstellar chemistry recorded in organic matter from primitive meteorites. *Science*, **312**, 727–730.
- Chakraborty, S., Muskatel, B. H., Jackson, T. L., Ahmed, M., Levine, R. D. and Thiemens, M. H. (2014) Massive isotopic effect in vacuum UV photodissociation of N<sub>2</sub> and implications for meteorite data. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111, 14704–14709.
- De Gregorio, B. T., Stroud, R. M., Nittler, L. R., Alexander, C. M. O'D., Kilcpyne, A. L. D. and Zega, T. J. (2010) Isotopic anomalies in organic nanoglobules from Comet 81P/Wild 2: Comparison to Murchison nanoglobules and isotopic anomalies induced in terrestrial organics by electron irradiation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **74**, 4454–4470.
- Fletcher, L. N., Greathouse, T. K., Orton, G. S., Irwin, P. G. J., Mousis, O., Sinclair, J. A. and Giles, R. S. (2014) The origin of nitrogen on Jupiter and Saturn from the <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N ratio. *Icarus*, 238, 170–190.
- Fouchet, T., Lellouch, E., Be'zard, B., Encrenaz, T. and Drossart, P. (2000) ISO-SWS observations of Jupiter: measurement of the ammonia tropospheric profile and of the <sup>15</sup>N/<sup>14</sup>N isotopic ratio. *Icarus*, **143**, 223–243.
- Füri, E. and Marty, B. (2015) Nitrogen isotope variations in

the Solar System. Nature Geosci., 8, 515-522.

- Furuya, K. and Aikawa, Y. (2018) Depletion of heavy nitrogen in the cold gas of star-forming regions. *Astrophys. J.*, 857, 105.
- Gerin, M., Marcelino, N., Biver, N., Roueff, E., Coudert, L. H., Elkeurti, M., Lis, D. C. and Bockelée-Morvan, D. (2009) Detection of <sup>15</sup>NH<sub>2</sub> D in dense cores: A new tool for measuring the <sup>14</sup>N/<sup>15</sup>N ratio in the cold ISM. Astron. Astrophys., **498**, L9–L12.
- Hashiguchi, M., Kobayashi, S. and Yurimoto, H. (2015) Deuterium- and <sup>15</sup>N-signatures of organic globules in Murchison and Northwest Africa 801 meteorites. *Geochem. J.*, **49**, 377–391.
- Hashizume, K., Marty, B. and Wieler, R. (2002) Analyses of nitrogen and argon in single lunar grains: towards a quantification of the asteroidal contribution to planetary surfaces. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **202**, 201–216.
- Heays, A. N., Bosman, A. D. and van Dishoeck, E. F. (2017) Photodissociation and photoionisation of atoms and molecules of astrophysical interest. *Astron. Astrophys.*, 602, A105.
- Hilly-Blant, P., Bonal, L., Faure, A. and Quirico, E. (2013) The <sup>15</sup>N-enrichment in dark clouds and Solar System objects. *Icarus*, **223**, 582–590.
- Hoffman, J. H., Hodge, Jr. R. R., McElroy, M. B., Donahue, T. M. and Kolpin, M. (1979) Composition and structure of the Venus atmosphere: Results from Pioneer Venus. *Science*, 205, 49–52.
- Ivanova, M. A., Kononkova, N. N., Krot, A. N., Greenwood, R. C., Franchi, I. A., Verchovsky, A. B., Trieloff, M., Korochantseva, E. V. and Brandstätter, F. (2008) The Isheyevo meteorite: Mineralogy, petrology, bulk chemistry, oxygen, nitrogen, carbon isotopic compositions, and 40Ar-39Ar ages. *Meteorit. Planet. Sci.*, 43, 915–940.
- Lis, D. C., Wootten, A., Gerin, M. and Roueff, E. (2010) Nitrogen isotopic fractionation in interstellar ammonia. *Astrophys. J.*, **710**, L49–L52.
- Mandt, K. E., Mousis, O., Lunine, J. and Gautier, D. (2014) Protosolar ammonia as the unique source of Titan's nitrogen. *Astrophys. J. L.*, **788**, L24.
- Manfroid, J., Jehin, E., Hutsemékers, D., Cochran, A., Zucconi, J.-M., Arpigny, C., Schulz, R., Stüwe, J. A. and Ilyin, I. (2009) The CN isotopic ratios in comets. *Astron. Astrophys.*, 503, 613–624.
- Mathew, K. J. and Marti, K. (2001) Early evolution of Martian volatiles' Nitrogen and noble gas components in ALH84001 and Chassigny. *J. Geophys Res.*, **106**, 1401–1422.
- Marti, K., Kim, J. S., Thakur, A. N., McCoy, T. J. and Keil, K. (1995) Signatures of the Martian atmosphere in glass of the Zagami meteorite. *Science*, **267**, 1981–1984.
- Marty, B., Chaussidon, M., Wiens, R. C., Jurewicz, A. J. Z. and Burnett, D. S. (2011) A <sup>15</sup>N-poor isotopic composition for the solar system as shown by Genesis solar wind samples.

Science, 332, 1533-1537.

- McKeegan, K. D., Aléon, J., Bradley, J., Brownlee, D., Busemann, H., Butterworth, A., Chaussidon, M., Fallon, S., Floss, C., Gilmour, J., Gounelle, M., Graham, G., Guan, Y., Heck, P. R., Hoppe, P., Hutcheon, I. D., Huth, J., Ishii, H., Ito, M., Jacobsen, S. B., Kearsley, A., Leshin, L. A., Liu, M.-C., Lyon, I., Marhas, K., Marty, B., Matrajt, G., Meibom, A., Messenger, S., Mostefaoui, S., Mukhopadhyay, S., Nakamura-Messenger, K., Nittler, L., Palma, R., Pepin, R. O., Papanastassiou, D. A., Robert, F., Schlutter, D., Snead, C. J., Stadermann, F. J., Stroud, R., Tsou, P., Westphal, A., Young, E. D., Ziegler, K., Zimmermann, L. and Zinner, E. (2006) Isotopic compositions of cometary matter returned by Stardust. *Science*, 314, 1724-8.
- Mousis, O., Lunine, J. I., Fletcher, L. N., Mandt, K. E., Ali-Dib, M., Gautier, D. and Atreya, S. (2014) New insights on Saturn's formation from its nitrogen isotopic composition. *Astrophys. J. L.*, **796**, L28.
- Muskatel, B. H., Remacle, F., Thiemens, M. H. and Levine, R. D. (2011) On the strong and selective isotope effect in the UV excitation of N2 with implications toward the nebula and Martian atmosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 6020–6025.
- Nakamura-Messenger, K., Messenger, S., Keller, L. P., Clemett, S. J. and Zolensky, M. E. (2006) Organic globules in the Tagish Lake meteorite: Remnants of the protosolar disk. *Science*, **314**, 1439–1442.
- Nier, A. O. and McElroy, M. B. (1977) Composition and structure of Mars' upper atmosphere: Results from the neutral mass spectrometers on Viking 1 and 2. J. Geophys. Res., 82, 4341–4349.
- Niemann, H. B., Atreya, S. K., Demick, J. E., Gautier, D., Haberman, J. A., Harpold, D. N., Kasprzak, W. T., Lunine, J. I., Owen, T. C. and Raulin, F. (2010) Composition of Titan's lower atmosphere and simple surface volatiles as measured by the Cassini-Huygens probe gas chromatograph mass spectrometer experiment. J. Geophys. Res., 115, E12006
- Owen, T., Mahaffy, P. R., Niemann, H. B., Atreya, S. and Wong, M. (2001) Protosolar nitrogen. Astrophys. J., 553, L77–L79.
- Owen, T., Biemann, K., Rushneck, D. R., Biller, J. E., Howarth,

D. W. and Lafleur, A. L. (1977) The composition of the atmosphere at the surface of Mars. J. Geophys. Res., 82, 4635–4639.

- Rodgers, S. D. and Charnley, S. B. (2008) Nitrogen superfractionation in dense cloud cores. *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, 385, L48–L52.
- Romano, D. and Matteucci, F. (2003) Nova nucleosynthesis and Galactic evolution of the CNO isotope. *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, **342**, 185–198.
- Rousselot, P., Pirali, O., Jehin, E., Vervloet, M., Hutsemékers, D., Manfroid J., Cordier, D., Martin-Drumel, M.-A., Gruet, S., Arpigny, C., Decock, A. and Mousis, O (2014) Toward a unique nitrogen iso- topic ratio in cometary ices. *Astrophys. I. L.*, **780**, L17.
- Shinnaka, Y., Kawakita, H., Kobayashi, H., Nagashima, M. and Boice, D. C. (2014) <sup>14</sup>NH<sub>2</sub>/<sup>15</sup>NH<sub>2</sub> ratio in comet C/2012 S1 (ISON) observed during its outburst in 2013 November. *Astrophys. J. L.*, **782**, L16.
- Sugahara, H., Takano, Y., Tachibana, S., Sugawara, I., Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N., Kouchi, A. and Yurimoto, H. (2019) Molecular and isotopic compositions of nitrogen-containing organic molecules formed during UVirradiation of simulated interstellar ice. *Geochem J.*, 53, 5–20.
- Sugahara, H., Takano, Y., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2017) Nitrogen isotopic fractionation in ammonia during adsorption on silicate surfaces. ACS Earth Space Chem., 1, 24–29.
- Terzieva, R. and Herbst, E. (2000) The possibility of nitrogen isotopic fractionation in interstellar clouds. *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, **317**, 563–568.
- Wiescher, M., Gorres, J., Uberseder, E., Imbriani, G. and Pignatari, M. (2010) The Cold and Hot CNO Cycles. *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.*, **60**, 381-404.
- Wirström, E. S., Charnley, S. B., Cordiner, M. A. and Milam, S. N. (2012) Isotopic anomalies in primitive solar system matter: Spin-state-dependent fractionation of nitrogen and deuterium in interstellar clouds. *Astrophys. J. Lett.*, **757**, L11.

## 炭素安定同位体組成で探る 隕石有機物の生成反応と地球への運搬

## 古川 善博

2020年11月25日受付, 2021年1月28日受理

近年,著者らのグループによって炭素質コンドライトからリボースなどの生命を構成する糖が見つ かった.このことは、宇宙に生命を構成する糖が存在し、それが地球にもたらされていたことを示す 事実で、地球生命の材料となる糖の起源を考える上で、隕石が考慮すべき供給源であることを示して いる.この糖の炭素同位体組成は地球生物によって作られる糖に比べて優位に<sup>33</sup>C に富んでいた.こ れは、アミノ酸やホルムアルデヒド、アミンなどの炭素質コンドライトに含まれる他の水溶性有機物 と同様の特徴であり、炭素質コンドライトに含まれる<sup>32</sup>C に富む不溶性有機物の炭素同位体組成とは 大きく異なる.地球外有機物の炭素安定同位体組成には、その生成反応や生成環境に応じた情報が記 録されている.糖が生成する反応であるホルモース型反応に関連した複数の反応の速度には大きな差 がある可能性があり、水溶性有機物と不溶性有機物の炭素同位体組成の特徴は、それら一連の反応の 中での動的同位体分別によって説明できる可能性がある.その場合、ホルモース型反応は隕石有機物 全体の生成に大きな影響を及ぼした可能性がある.隕石には地球有機物よりもはるかに多種多様な有 機物が含まれており、それらの有機物生成と地球への運搬を理解するには、網羅的な測定とともに、 特定の分子ごとに精密に同位体組成を測定することが不可欠であり、その精密化と隕石有機物のよう な多種多様な有機物を含む試料へのより良い応用が地球外有機物の全貌を理解するために大きく貢献 するであろう.

## Investigations on the formation and delivery of meteorite organic matter based on the carbon isotope compositions

## Yoshihiro Furukawa

The recent finding of ribose and other bio-important sugars in carbonaceous chondrites indicates that meteorites were a potential source of sugars on the prebiotic Earth. The detected sugars were enriched in <sup>13</sup>C. This enrichment is similar to other solvent-soluble organic matter such as amino acids but distinct from terrestrial biota and meteoritic solvent-insoluble organic matter. Carbon isotope compositions record the type of formation reaction and the formation environment of the organic matter. The large difference in the carbon isotope compositions between soluble organic matter and insoluble organic matter may be formed by kinetic isotope effects through many steps of the formose reaction because a large difference in the reaction rate can be expected related to the formose reaction. In such a case, the formose reaction might significantly affect the bulk organic syntheses of the meteorite organic matter. Since meteorites contain a huge variety of organic compounds, coordinated analysis with non-target analyses and high precision target analyses such as compound-specific isotope analysis would be more important to understand the bulk organic syntheses in the early solar system and their delivery to the prebiotic Earth.

\*連絡先 古川 善博 東北大学理学研究科 地学専攻 〒980-0833 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3 Tel. 022-795-3453 e-mail : furukawa@tohoku.ac.jp

東北大学理学研究院 地学専攻 Department of Earth Science, Tohoku University, Sendai, Japan キーワード:隕石, 糖, アミノ酸, 動的同位体効果, Meteorite, Sugar, Amino acid, Kinetic isotopic fractionation

## 1. はじめに

地球で回収された隕石の大部分は、その反射スペクト ル(可視から近赤外領域)の類似性から火星と木星の間 に軌道を持つ様々な小惑星に由来する岩石と考えられて いる (Zellner et al., 1985). このことは、小惑星探査機は やぶさがイトカワから持ち帰った試料の分析により決定 付けられた(Nakamura et al., 2011). 地球などの惑星は その成長過程で、より小さな天体が激しく合体成長し、 高温で生成した岩石によって構成されている.一方,小 惑星ではその程度が低く、地球のように金属の核とケイ 酸塩鉱物のマントルのような分化した構造を持たない小 惑星も多い、そのような小惑星から飛来した隕石は、コ ンドリュールと呼ばれる球粒状物質を含むことからコン ドライトと呼ばれ、地球上で回収された隕石のうち、3% 程度が有機物を含むコンドライト(炭素質コンドライト) である. このような隕石は熱による変質の程度が特に低 いため、太陽系最初期の情報を記録している貴重な試料 となっている. 隕石に残される太陽系の始原的な情報 は、主に鉱物に関する研究で明らかにされてきた。一方 で、炭素質コンドライトに含まれる有機物に関しても、 長年研究が行われてきた歴史がある. それは、炭素質コ ンドライトからアミノ酸や核酸塩基などの生命を構成す る有機化合物(極性有機化合物)が見つかるため、小惑 星からの隕石の飛来が、地球の生命の起源に繋がる可能 性があると考えられているためである.しかし、そのよ うな極性有機化合物の含有量は低く、それらを対象とし た研究だけでは初期太陽系でどの様な有機化学反応が起 こったのかを推定することはできない. また, 隕石には 5万種類以上の有機分子が含まれており未だに同定され ていない有機分子も多いことが、さらに問題を複雑にし ている (Schmitt-Kopplin et al., 2010). 初期太陽系での 化学反応の条件や環境を推定するには、隕石中に数wt% 含まれ主要な炭素質物質である溶媒不溶性有機物の含有 量や化学的特徴と整合的な成因を検討していく必要があ る.本総説では、著者らが近年行った隕石からの糖の検 出と隕石有機物生成の模擬実験、および近年明らかにな りつつある隕石有機物生成の主要な反応について紹介す る.

## 2. コンドライトに含まれる有機物の量と性質

大部分のコンドライトは有機炭素を含んでおり、その 含有量は、普通コンドライトでは典型的には0.1-0.3 wt%程度であるが、炭素質コンドライトではその割合が 高く、典型的には0.1-2 wt%である(Alexander et al., 2007). 普通コンドライトではこの有機炭素のうち全て が、酸にも有機溶媒にも溶けない不溶性有機物と呼ばれ る、複雑な分子構造を持つ有機物であると認識されてい る. 炭素質コンドライトでも、熱変質を受けた炭素質コ ンドライトでは有機炭素の大部分が不溶性有機物として 含まれる(Alexander et al., 2015). 一方で、水質変質を 受けた炭素質コンドライトではその量はやや低く、70 wt%程度が不溶性有機物として含まれ、残りの30 wt% 程度は水や有機溶媒に可溶な低分子有機物として含まれ る場合がある(Pizzarello et al., 2006).

# 炭素質コンドライトを構成する 不溶性有機物とその安定同位体組成

炭素質コンドライト中の不溶性有機物は、主に、C、 H, N, O から構成されており, 例えばマーチソン隕石の 不溶性有機物の組成は C100H70N3O12S2 程度であると報告 されている (Hayatsu et al., 1980). この炭素は芳香族炭 素が脂肪族炭素よりも多い化学状態となっており、実に 複雑な炭素骨格を持っていると推定されている(Cody and Alexander, 2005; Cody et al., 2002). 不溶性有機物 炭素の安定同位体組成は大部分の炭素質隕石で δ<sup>13</sup>C= -30‰から-10‰の値をとる (Alexander et al., 2007). 中でも、CI コンドライトでは  $\delta^{13}C = -17\%$  (Orgueil, Ivuna), CM コンドライトでは、二次加熱を受けた隕石 と Bells 隕石を除いて、ほとんどが  $\delta^{13}C = -19\%$  から -17% (n=8), CR 隕石では  $\delta^{13}$ C = -27% から -20%(n=7) と,狭い範囲に分布している (Alexander et al., 2015; Alexander et al., 2007). これらの値は地球生物が 作り出す有機物の値に近いが、小惑星ではそのような生 化学的な反応は考えられず、この値がどのような現象に 由来するものかは不明である.一方で炭素質コンドライ トの窒素同位体組成(d<sup>15</sup>N)と水素同位体組成(dD)に 関しては、CR コンドライトで δ<sup>15</sup>N=+153‰ から +309‰,  $\delta D$  = +2619‰から+3527‰と極めて高く, そ れ以外の炭素質コンドライトでは、CM コンドライトの

Bells 隕石を例外として, 概ね CR コンドライトよりも かなり低い値をとる(Alexander et al., 2007). 分子雲や 太陽系の外側の極低温領域で生成する分子に含まれる窒 素と水素は,<sup>15</sup>N に富むことが知られているため, CR コ ンドライトの<sup>15</sup>N と D に富む有機物の由来の一つはそ のような極低温環境とも考えられている(Aleon, 2010).

## 炭素質コンドライトから検出された 可溶性分子とその安定同位体組成

炭素質コンドライトに含まれる可溶性有機物について は、古くは1960年代から研究が行われ、当時はアミノ酸 や糖の存在が示唆されていた(Degens and Bajor, 1962; Kaplan et al., 1963). しかし、このような生命に関係の 深い有機分子の分析には、地球物質(地球上での生命活 動に由来する有機分子)の混入が非常に大きな問題で あった. 実際にその当時出版された論文では炭素質コン ドライト以上に普通コンドライトから多くのアミノ酸と 糖が検出されたと報告しており、著者自身が論文中で混 入物の可能性を指摘している(Degens and Bajor, 1962; Kaplan et al., 1963). 普通コンドライトにアミノ酸など の極性有機分子がほとんど含まれていないことは、現在 ではよく知られた事実である(Chan et al., 2012).

その後, NASA がアポロ計画で月から持ち帰った岩石 の分析などを通して, サンプルの注意深い取り扱いや, 分析過程での地球物質の混入を防ぐ工夫が行われ, 混入 物と思われる有機物の報告が激減し, 炭素質コンドライ トからは, アミノ酸, カルボン酸, アミン, 炭化水素な ど多様な有機分子が改めて検出されるようになった. そ の頃には, 初期地球でのアミノ酸の生成を模擬したミ ラーの実験の出発物質が, 初期地球の大気組成とは大き く異なることが指摘され (Abelson, 1966), 初期地球で アミノ酸は生成しないと考えられるようになっていたの で, 隕石から見つかる地球外有機物は, 生命の起源とい う意味でも存在感を増していたと思われる.

一方で、大部分の隕石は地上に落下して、年月が経っ てから回収されるため、隕石表面に関してはその間の地 球物質による汚染が避けられない.実験室でサンプルの 注意深い取り扱いや、分析過程での地球物質の混入を防 ぐ工夫が行われたとしても、個々の隕石岩片ごとに汚染 の頻度や程度は大きく異なり、検出した有機分子が地球 外由来の有機分子である決定的な証拠を得ることは困難 であった.しかし、1990年にアミノ酸の分子ごとの安定 炭素同位体組成が分析され、その問題は解決した(Engel et al., 1990).地球の生物が持つ炭素同位体組成に近い



図 1:隕石・彗星有機物の炭素同位体組成. Figure 1: ªElsila et al., 2012; <sup>b</sup>Furukawa et al., 2019; <sup>c</sup>Alexander et al, 2005; <sup>d</sup>De Gregorio et al., 2010; <sup>e</sup>Elsila et al., 2009; <sup>f</sup>Simkus et al., 2019.

組成をもつ不溶性有機分子とは異なり、幸いなことに地 球外由来のアミノ酸はそれよりもかなり高い炭素同位体 組成を持つことが明らかになった(Elsila et al., 2012; Engel et al., 1990; Pizzarello et al., 2004). このことは同 時に、炭素同位体組成が地球のアミノ酸と地球外のアミ ノ酸を区別するための有用な指標となることを意味して いる、その後、炭素質コンドライトに含まれる他の有機 化合物の分子ごとの炭素や窒素、水素の安定同位体組成 の測定が行われ、例えば、マーチソン隕石の炭化水素で は、不溶性有機物(-19‰)よりやや高い-10‰から0‰、 カルボン酸はそれよりもやや高い0から+10%,アミノ 酸はさらに高い+10から+40%であることが明らかに なった (Alexander et al., 2007; Aponte et al., 2019; Elsila et al., 2012; Pizzarello et al., 2004) (図 1). アルデヒド類 も+20‰から+66‰と高い値を示し、特にホルムアルデ ヒドは+66‰と極めて高い値を持つ (Simkus et al., 2019) (図 1). また, 核酸塩基についてはマーチソン隕 石中のウラシルのみが測定されており、∂<sup>13</sup>C=+44.5‰ という炭素同位体組成が報告されている (Martins et al., 2008) (図1).

一方で, アミノ酸の窒素同位体組成は CR コンドライトが CM コンドライトよりもやや高いが, 共に+80‰から+200‰程度に分布し, その差は小さい(Elsila et al., 2012). アミノ酸の水素同位体組成は CM コンドライト



図2: (A) RNA の構造. (B) ATP の構造.

のマーチソン隕石で分析が行われ,十分な精度で測定で きていないデータのようだが,+数百‰の高い値を持つ と報告されている (Pizzarello et al., 1991).

## 5. 隕石からの糖の検出

糖は生体内で非常に重要な役割を担っている.例え ば、リボースとデオキシリボースは生命の基本原理を支 える RNA と DNA の構成分子であり、グルコースは呼 吸のエネルギー源として使われる(図 2A).リボースは さらに、生命のエネルギー通貨とみなされる ATP や ADP の構成分子でもある(図 2B).植物の構造体であ るセルロースやヘミセルロースも糖が主成分である.こ のように、糖は現在の生命にとって不可欠な有機分子で ある.

糖を含む分子の中でも、RNA は最初期の生命に非常 に関連の深い分子として注目を集めている.現在の生命 では DNA が遺伝情報を記録し、その記録に基づいて、 RNA を介してタンパク質が合成される.そして、その タンパク質が生体内の多くの反応を駆動する、DNA-RNA-タンパク質システムが生命の基本となっている. しかし、初期の生命ではこれらの働きを全て RNA が行 なっていたとする RNA world 仮説が支持を集めている ことから、RNA を構成する糖であるリボースは生命の 起源にとって非常に重要な分子であると考えられている (Benner et al., 1989; Joyce, 1989; Joyce and Orgel, 1993).

そのため、地球外で糖の存在を探す研究はこれまでに

盛んに行われてきた. 電波望遠鏡観測では, 糖の前駆体 であるグリセルアルデヒドが検出されている (Jes et al., 2012). 炭素質コンドライトからは, 2000 年に Cooper らによって最小の糖であるジヒドロキシアセトンが検出 されている (Cooper et al., 2001). また, この研究では他 に, 糖のアルデヒド基がカルボキシル基になっている複 数の糖酸, 糖のアルデヒド基が水酸基になっている複数 の糖アルコールが検出された (Cooper et al., 2001). こ れらの糖アルコールは後に分子ごとの炭素同位体比が測 定され, 最高で 2-Methylglyceric acid の $\delta^{13}$ C = +82‰, Glyceric acid は $\delta^{13}$ C = +60‰と高い値を示すことが明ら かになった (Cooper and Rios, 2016).

糖には D 体と L 体の鏡像異性体が存在する. 糖酸, 糖アルコールにも不斉炭素があるので,同様に鏡像異性 体が存在する. 化学的に糖を合成すると,特殊な場合を 除いて D 体と L 体は 1:1の量比で生成するが,生命を 構成する糖は D 体であり(ただし,アラビノースは L 体),この性質はホモキラリティーと呼ばれ,生命を特徴 付ける重要な性質となっている. Cooper らは,炭素質 コンドライトに含まれる糖酸の光学異性体比を分析し, D 体が L 体の何倍も多いと報告している(Cooper and Rios, 2016). 隕石に含まれる糖酸が D 体を多く含んで いるという報告は,地球生命のホモキラリティーの起源 という観点からも注目されている.

糖の生成に関しては,室内模擬実験による研究も進ん でいる.分子雲中に存在するメタノールを含む氷に紫外 線が照射される反応を模擬した室内実験において,リ



図3:リボースと他の五炭糖の構造式.

ボースを含む複数の糖の生成が確認されている (Meinert et al., 2016). また,同様の条件でデオキシロ ボースの生成も確認されている (Nuevo et al., 2018). こ れらの実験結果は,宇宙に生命を構成する糖が存在して もおかしくないことを示している.

非生物的反応で生成される糖の研究は、有機化学的研 究として古くから行われており、ホルムアルデヒドをア ルカリ性溶液中で加熱すると、ホルモース反応と呼ばれ る逐次的なアルドール縮合を基本とする反応によって、 多様な糖が生成することが知られている (Breslow, 1959; Butlerow, 1860). そのような研究では、液体クロマトグ ラフィー質量分析計 (LC/MS) やガスクロマトグラ フィー質量分析計 (GC/MS) を用いた分析が行われてい る.一般的に、液体クロマトグラフィーよりもガスクロ マトグラフィーの方が化合物の分離は良いが、糖は不揮 発性の有機物なので、ガスクロマトグラフィーで分析す るには誘導体化(揮発性を付与する化学修飾)が必要に なる.しかし,糖の誘導体化で典型的に用いられている トリメチルシリル化などの方法では、一つの糖分子から 4種類程度の誘導体化物を生成してしまう. さらに、ホ ルモース反応生成物が異性体を含むあまりに多様な糖を 含むことから.誘導体化で検出される分子の種類が増え ることと相まって、GC/MS を用いた分析は困難であっ た (Meinert et al., 2016). 一方で著者らは, 1つの糖分 子から1つの誘導体化物を形成するアルドニトリルアセ テート誘導体化を用いて、典型的な隕石有機物分析より も多くの試料を用いて、隕石の糖分析を行った、測定し た隕石はCMコンドライトであるマーチソン隕石と、 CR コンドライトである NWA801 隕石および NWA7020 隕石である. その結果, マーチソン隕石と NWA801 隕 石からリボース,キシロース,アラビノース,リキソー スを検出した(図3). これらの糖のうち、リボース、ア ラビノース、キシロースの炭素同位体組成を測定するこ とができ、その値はマーチソン隕石のリボースで ∂<sup>13</sup>C= +38‰, アラビノースで ∂<sup>13</sup>C = +43‰ という非常に高い 値を持つことが明らかになった. 地球の生物が作る糖の 炭素同位体組成は、一般的に d<sup>13</sup>C < 0‰であり、また実

際にマーチソン隕石が落下した地域の土壌に含まれる五 炭糖の炭素同位体組成が  $\delta^{13}C = -60$ から -40‰であっ たことから、これらの隕石から検出した糖は、地球外由 来であることが明らかになった (Furukawa et al., 2019).

また、非生物的糖生成反応によって生成する糖の組成 を、隕石から検出された糖と比較するために、ホルムア ルデヒド、グリコールアルデヒド、アンモニア、水酸化 カルシウムを含む水溶液を加熱して、アンモニアが関与 するホルモース型反応実験を行った. その結果, 生成物 の五炭糖組成はマーチソン隕石と NWA801 隕石から検 出された五炭糖組成と類似する傾向が見られた (Furukawa et al., 2019). このことはアンモニアが関与 するホルモース型反応によって炭素質コンドライト中の 糖が生成したことを示唆している.しかし、ホルモース 型反応は熱エネルギーだけではなく、光化学エネルギー でも促進されることが知られている (Shigemasa et al., 1977). したかって、糖を生成したアンモニアが関与す るホルモース型反応が、小惑星内部の水熱反応によって 引き起こされたのか, それとも, 小惑星集積前の分子雲 や原始太陽系円盤内の低温環境での光化学反応によって 引き起こされたのかは、この結果だけでは明らかではな い.

測定した3つの隕石に含まれる珪酸塩鉱物の水質変質 の程度,および不溶性有機物の炭素の化学状態を比較す ると,糖が検出された CR コンドライトである NWA801 隕石は,糖が検出されなかった CR コンドライトである NWA7020 隕石よりも変質の程度が低かったが,糖が検 出された CM コンドライトであるマーチソン隕石は NWA7020 隕石よりも変質の程度が高かった.従って, 隕石母天体での鉱物や有機物の変質と糖の有無の関係に ついては,明らかでなく,更なる研究が必要である.こ れには,南極から回収された保存状態の良い炭素質隕石 やサンプルリターンで得られる試料など,地球の汚染が 少ない多くの試料の分析が必要になるであろう.

## 6. 隕石有機物の生成モデル

隕石に含まれる不溶性有機物と可溶性有機物の起源 は,長らく議論が行われてきた.両者の炭素同位体組成 が全く異なることから、それらは別々の起源であるとす る説がある (Derenne and Robert, 2010; Remusat et al., 2005). 不溶性有機物の生成については、高温で金属や 酸化物等を触媒とした一酸化炭素と水素からの生成であ るフィッシャー・トロプッシュ型反応 (FTT 反応) が議 論されてきた (Lancet and Anders, 1970). しかし, FTT 反応で生成する炭素質物質はほとんどが直鎖の炭 化水素であるのに対し、隕石から検出される不溶性有機 物は主に芳香族炭素から成るという違いがある(Cody and Alexander, 2005; Cody et al., 2002). さらにこの反 応では、反応残存物の CO は生成する炭化水素より高い 炭素同位体組成を持つが、実際の炭素質コンドライトで 検出される CO と炭化水素の同位体組成はこの逆になる (Lancet and Anders, 1970; Yuen et al., 1984). このよう なことは、不溶性有機物生成の主要な生成反応が FTT 反応であるとする考えとは整合的でない.

可溶性有機物,特にアミノ酸の生成反応は,ホルムア ルデヒド,シアン化水素,アンモニアが水溶液中で反応 し*α*-アミノ酸を生成するストレッカー反応が古くから 議論されてきた (Peltzer and Bada, 1978; Pizzarello et al., 2006).しかし,アミノ酸を生成するこの反応と,隕石中 の主要有機物である不溶性有機物を作った反応または, 多様な隕石有機物を作った様々な反応との関係はほとん ど議論されてこなかった.また,不溶性有機物の変質に よって水溶性の有機物が生成するという考えも報告さ れ,カルボン酸の生成が確認されている (Oba and Naraoka, 2006).

近年,小惑星内部でのアンモニアが関与するホルモー ス型反応によって、炭素質コンドライトの不溶性有機物 や彗星から見つかっている炭素質物質に近い化学構造の 炭素質物質が生成すると提案された(Cody and Alexander, 2005). この反応の原料となるホルムアルデ ヒドとアンモニアは、分子雲の低温環境で生成しやすい 分子であり、炭素質コンドライトからも検出されている (Pizzarello and Groy, 2011; Simkus et al., 2019; Watanabe and Kouchi, 2002). ホルムアルデヒドとアンモニアから アミノ酸が生成することは古くから知られていたが (Yanagawa et al., 1980),癸生川ら(2017)と古賀、奈良 岡(2017)ではさらに、アンモニアが関与するホルモー ス型反応で生成するアミノ酸の組成が、隕石アミノ酸の 組成に似ていることも明らかにした(Kebukawa et al., 2017; Koga and Naraoka, 2017). また, 奈良岡らは, こ の反応で生成する種々のイミダゾールや種々のピリミジ ンを隕石から検出した(Naraoka and Hashiguchi, 2019; Naraoka et al., 2017). さらに大場らは、ホルムアルデヒ ドとアンモニアの反応で生成するヘキサメチレンテトラ ミンの存在をマーチソン隕石などの炭素質コンドライト で明らかにした (Oba et al., 2020). また, 先述の通り著 者らは、アンモニアが関与するホルモース型反応で生成 する五炭糖の組成が、マーチソン隕石と NWA801 隕石 に含まれる五炭糖の組成と類似していることを明らかに した (Furukawa et al., 2019). これらの研究によって, アンモニアが関与するホルモース型反応によって、炭素 質コンドライトに含まれるアミノ酸と糖および不溶性有 機物が生成した可能性は示されたが、実際に起こった主 要な反応が、アンモニアが関与するホルモース型反応で あったのかどうかを判断するには、さらなる制約が必要 である.

## ホルモース型反応に伴う 炭素同位体分別の可能性

隕石有機物のうち可溶性有機分子が不溶性有機物より も<sup>13</sup>C に富むことは、それらの炭素源が異なるという可 能性と、それらの生成の際の同位体分別がその差を生み 出したという可能性が考えられる.ホルモース型反応の 基本的な反応はアルドール縮合で、この反応で単素数1 のホルムアルデヒドから巨大分子である不溶性有機物が 形成されるとすると、その反応速度は極めて高いことに なる.また、アルカリ溶液中でのホルモース型反応は、 正反応の反応速度が逆反応の反応速度に比べて極めて高 いため、ほとんど不可逆的に縮合反応が進む、もし、こ の反応で<sup>12</sup>Cと<sup>13</sup>Cの間に同位体分別が起こるに十分な 反応速度の差が生じれば、<sup>12</sup>Cからなるホルムアルデヒ ドが優先的に消費され,不可逆的に系から取り除かれる. 多段階反応の最終生成物である不溶性有機物は、反応初 期では原料アルデヒドの炭素同位体組成より<sup>12</sup>Cに富む が、反応が進むにつれ原料の炭素同位体組成に近づき、 反応残渣のホルムアルデヒドは反応が進むにつれ、急激 に<sup>13</sup>C に富むようになる可能性がある. この<sup>13</sup>C に富む ホルムアルデヒドとやはり<sup>13</sup>Cに富むグルコールアルデ ヒドからアミノ酸が生成されれば、その炭素同位体組成 は<sup>13</sup>C に富むものとなるであろう. そうだとすれば, こ のことは炭素質コンドライトに含まれるホルモース反応 の反応物であるホルムアルデヒドと,ホルモース反応の 最初期の生成物の一つである五炭糖が<sup>13</sup>Cに富むことの

理由となる可能性もある.

過去の研究では, 隕石中に見つかるアミノ酸が<sup>13</sup>C に 富む理由として, 10 K 以下の環境でのイオン分子反応 によって生成した有機物を材料にアミノ酸生成が起こっ たという解釈が行われてきた(Elsila et al., 2012; Epstein et al., 1987; Pizzarello et al., 2004). 極低温領域で生成す る有機物は<sup>15</sup>N と D に富むと考えられ, CR コンドライ トに含まれる有機物からはこの様な特徴が見つかってい る(Aleon, 2010; Watanabe and Kouchi, 2008). しかし, CR コンドライトに含まれるアミノ酸や IOM は<sup>13</sup>C に富 む特徴は持っていない(Alexander et al., 2015; Elsila et al., 2012). このことからも, 隕石有機物の<sup>13</sup>C 濃集は必 ずしも極低温環境と関連するとは限らないと推察でき る.

アンモニアが関与するホルモース型反応が隕石有機物 生成の主要生成反応だったとすると、それは小惑星内部 の数十℃の水熱反応でも起こり得ることは、多くのホル モース反応の条件が示している (Furukawa et al., 2019). 一方で、ホルモース型反応は光化学エネルギーでも進行 することから (Shigemasa et al., 1977), 小惑星集積以前 の極低温環境での光化学反応でもホルモース型反応が進 行した可能性がある. NASA の Stardust 計画で回収さ れた Comet 81P/Wild 2 のコマ物質からは、隕石の IOM にも含まれる様なグロビュール状の炭素質物質が見つ かっており、その炭素同位体組成は、δ<sup>13</sup>C=-35±3‰ と<sup>12</sup>C に富むものであった(De Gregorio et al., 2010). 一方で、不確定性は高いが同じ彗星のコマ物質に暴露さ れたサンプラーから抽出されたグリシンは &<sup>33</sup>C= +29±6‰と<sup>13</sup>C に富む値を示した(Elsila et al., 2009). これらの同位体組成の差は、小惑星集積前の分子雲や原 始太陽系円盤の極低温環境において、光化学反応でホル モース型反応が進行し、同位体組成の差を生み出したと 考えると、隕石有機物と統一的に解釈できるかもしれな い. 光化学反応でどの様なホルモース型反応が進行し, どの程度の炭素同位体組成の違いを生み出すのかは、極 低温環境を模擬した今後の研究が期待される.

近年の隕石有機物分析および有機物合成実験を通し て,初期太陽系での有機物生成反応に関する理解は着実 に進んでいる.今後はどのような環境でどのような反応 により有機物が生成しているのかの理解を追える段階に なるであろう.これに向けては,鉱物分布と有機物分布 を相補的に理解するための隕石分析や,彗星サンプルリ ターンによって初期太陽系の高温過程を経験していない 有機物の入手がその理解を大きく前進させるであろう.

#### 8. まとめ

始原的な隕石に含まれる極性の低分子有機物は,地球 生命が作り出す有機分子に比べて<sup>13</sup>Cに富んでいる.こ の炭素同位体組成の特徴は,地球外から地球への生命材 料分子供給の強力な証拠となり,これまでにアミノ酸, 核酸塩基,そして近年にはリボースを含む糖が地球外で 非生物学的に作られた有機物として見出されている.そ の様な隕石に含まれる多様な有機物の同位体組成は,有 機物生成反応での同位体分別を記録している可能性があ る.炭素や窒素,水素などの軽元素同位体組成は地球外 有機物の成因や生成環境を制約するために不可欠な特徴 となっている.

#### 謝辞

本稿の執筆機会を頂いた,北海道大学低温科学研究所 の力石嘉人教授に深くお礼申し上げます.また,本稿で 紹介した著者らの研究は,北海道大学低温科学研究所の 力石嘉人教授,東北大学理学研究科の中村智樹教授,岩 佐義也さん,阿部千晶さん,海洋研究開発機構の大河内 直彦博士,小川奈々子博士,NASA Goddard Space Flight Center の Daniel P. Glavin 博士, Jason P. Dworkin 博士と共に,科研費(18H03728, 19K21888 and 20H00185), NINS アストロバイオロジーセンター,北海 道大学低温科学研究所(18G046, 20G049)からの支援を 受けて実施しました.

## 参考文献

- Abelson, P. H. (1966) Chemical events on the primitive Earth. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 55, 1365–1372.
- Aleon, J. (2010) Multiple origins of nitrogen isotopic anomalies in meteorites and comets. *Astrophys. J.*, 722, 1342–1351.
- Alexander, C. M. O., Bowden, R., Fogel, M. L. and Howard, K. T. (2015) Carbonate abundances and isotopic compositions in chondrites. *Meteorit. Planet. Sci.*, **50**, 810–833.
- Alexander, C. M. O., Fogel, M., Yabuta, H. and Cody, G. D. (2007) The origin and evolution of chondrites recorded in the elemental and isotopic compositions of their macromolecular organic matter. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **71**, 4380–4403.
- Aponte, J. C., Woodward, H. K., Abreu, N. M., Elsila, J. E. and Dworkin, J. P. (2019) Molecular distribution, <sup>13</sup> C-isotope, and enantiomeric compositions of carbonaceous chondrite monocarboxylic acids. *Meteorit. Planet. Sci.*, 54, 415–430.
- Benner, S. A., Ellington, A. D. and Tauer, A. (1989) Modern

metabolism as a palimpsest of the RNA world. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 7054–7058.

- Breslow, R. (1959) On the mechanism of the formose reaction. *Tetrahedron Lett.*, **1**, 22–26.
- Butlerow, A. (1860) Ueber ein neues Methylenderivat. Justus Liebigs Ann. Chem., 115, 322–327.
- Chan, H.-S., Martins, Z. and Sephton, M. A. (2012) Amino acid analyses of type 3 chondrites Colony, Ornans, Chainpur, and Bishunpur. *Meteorit. Planet. Sci.*, 47, 1502–1516.
- Cody, G. D. and Alexander, C. M. O. D. (2005) NMR studies of chemical structural variation of insoluble organic matter from different carbonaceous chondrite groups. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 1085–1097.
- Cody, G. D., Alexander, C. M. O. D. and Tera, F. (2002) Solidstate (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) nuclear magnetic resonance spectroscopy of insoluble organic residue in the Murchison meteorite: a self-consistent quantitative analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 66, 1851–1865.
- Cooper, G., Kimmich, N., Belisle, W., Sarinana, J., Brabham, K. and Garrel, L. (2001) Carbonaceous meteorites as a source of sugar-related organic compounds for the early Earth. *Nature*, **414**, 879–883.
- Cooper, G. and Rios, A. C. (2016) Enantiomer excesses of rare and common sugar derivatives in carbonaceous meteorites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **113**, E3322–3331.
- De Gregorio, B. T., Stroud, R. M., Nittler, L. R., Alexander, C. M. O. D., Kilcoyne, A. L. D. and Zega, T. J. (2010) Isotopic anomalies in organic nanoglobules from Comet 81P/Wild 2: Comparison to Murchison nanoglobules and isotopic anomalies induced in terrestrial organics by electron irradiation. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **74**, 4454–4470.
- Degens, E. T. and Bajor, M. (1962) Amino acids and sugars in the bruderheim and Murray meteorite. *Naturwissenschaften*, 49, 605–606.
- Derenne, S. and Robert, F. (2010) Model of molecular structure of the insoluble organic matter isolated from Murchison meteorite. *Meteorit. Planet. Sci.*, 45, 1461–1475.
- Elsila, J. E., Charnley, S. B., Burton, A. S., Glavin, D. P. and Dworkin, J. P. (2012) Compound-specific carbon, nitrogen, and hydrogen isotopic ratios for amino acids in CM and CR chondrites and their use in evaluating potential formation pathways. *Meteorit Planet Sci.*, **47**, 1517–1536.
- Elsila, J. E., Glavin, D. P. and Dworkin, J. P. (2009) Cometary glycine detected in samples returned by Stardust. *Meteorit. Planet. Sci.*, **44**, 1323–1330.
- Engel, M. H., Macko, S. A. and Silfer, J. A. (1990) Carbon isotope composition of individual amino-acids in the Murchison meteorite. *Nature*, **348**, 47–49.
- Epstein, S., Krishnamurthy, R. V., Cronin, J. R., Pizzarello, S. and Yuen, G. U. (1987) Unusual stable isotope ratios in amino acid and carboxylic acid extracts from the Murchison meteorite. *Nature*, **326**, 477–479.
- Furukawa, Y., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., Ogawa, N. O.,

Glavin, D. P., Dworkin, J. P., Abe, C. and Nakamura, T. (2019) Extraterrestrial ribose and other sugars in primitive meteorites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 24440–24445.

- Hayatsu, R., Winans, R. E., Scott, R. G., McBeth, R. L., Moore, L. P. and STudier, M. H. (1980) Phenolic ethers in the organic polymer of the Murchison meteorite. *Science*, **207**, 1202– 1204.
- Jes, K. J., Cécile, F., Suzanne, E. B., Tyler, L. B., Ewine, F. v. D. and Markus, S. (2012) Detection of the simplest sugar, glycolaldehyde, in a solar-type protostar with ALMA. *Astrophys. J. lett.*, **757**, L4.
- Joyce, G. F. (1989) RNA evolution and the origins of life. *Nature*, 338, 217–224.
- Joyce, G. F. and Orgel, L. E. (1993) Prospects for understanding the origin of the RNA world. In The RNA world in: R.F., G., J. F., A. (Eds.), The RNA world. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1–25.
- Kaplan, I. R., Degens, E. T. and Reuter, J. H. (1963) Organic compounds in stony meteorites. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 27, 805–834.
- Kebukawa, Y., Chan, Q. H. S., Tachibana, S., Kobayashi, K. and Zolensky, M. E. (2017) One-pot synthesis of amino acid precursors with insoluble organic matter in planetesimals with aqueous activity. *Sci. Adv.*, 3, e1602093.
- Koga, T. and Naraoka, H. (2017) A new family of extraterrestrial amino acids in the Murchison meteorite. *Sci. Rep.*, 7, 636.
- Lancet, M. S. and Anders, E. (1970) Carbon isotope fractionation in the Fischer-Tropsch synthesis and in meteorites. *Science*, **170**, 980–982.
- Martins, Z., Botta, O., Fogel, M. L., Sephton, M. A., Glavin, D. P., Watson, J. S., Dworkin, J. P., Schwartz, A. W. and Ehrenfreund, P. (2008) Extraterrestrial nucleobases in the Murchison meteorite. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **270**, 130– 136.
- Meinert, C., Myrgorodska, I., de Marcellus, P., Buhse, T., Nahon, L., Hoffmann, S. V., d'Hendecourt, L. L. S. and Meierhenrich, U. J. (2016) Ribose and related sugars from ultraviolet irradiation of interstellar ice analogs. *Science*, 352, 208–212.
- Nakamura, T., Noguchi, T., Tanaka, M., Zolensky, M. E., Kimura, M., Tsuchiyama, A., Nakato, A., Ogami, T., Ishida, H., Uesugi, M., Yada, T., Shirai, K., Fujimura, A., Okazaki, R., Sandford, S. A., Ishibashi, Y., Abe, M., Okada, T., Ueno, M., Mukai, T., Yoshikawa, M. and Kawaguchi, J. (2011) Itokawa dust particles: a direct link between S-type asteroids and ordinary chondrites. *Science*, 333, 1113–1116.
- Naraoka, H. and Hashiguchi, M. (2019) Distinct distribution of soluble N-heterocyclic compounds between CM and CR chondrites. *Geochem. J.*, **53**, 33–40.
- Naraoka, H., Yamashita, Y., Yamaguchi, M. and Orthous-Daunay, F.-R. (2017) Molecular Evolution of N-Containing
Cyclic Compounds in the Parent Body of the Murchison Meteorite. *ACS Earth Space Chem.*, **1**, 540–550.

- Nuevo, M., Cooper, G. and Sandford, S. A. (2018) Deoxyribose and deoxysugar derivatives from photoprocessed astrophysical ice analogues and comparison to meteorites. *Nat. Commun.*, **9**, 10.
- Oba, Y. and Naraoka, H. (2006) Carbon isotopic composition of acetic acid generated by hydrous pyrolysis of macromolecular organic matter from the Murchison meteorite. *Meteorit. Planet. Sci.*, **41**, 1175–1181.
- Oba, Y., Takano, Y., Naraoka, H., Furukawa, Y., Glavin, D. P., Dworkin, J. P. and Tachibana, S. (2020) Extraterrestrial hexamethylenetetramine in meteorites—a precursor of prebiotic chemistry in the inner solar system. *Nat. Commun.*, 11, 6243.
- Peltzer, E. T. and Bada, J. L. (1978) α-Hydroxycarboxylic acids in the Murchison meteorite. *Nature*, **272**, 443–444.
- Pizzarello, S., Cooper, G. W. and Flynn, G. J. (2006) The nature and distribution of the organic material in carbonaceous chondrites and interplanetary dust particles, in: Lauretta, D.S., McSween Jr., H.Y. (Eds.), Meteorites and the early solar system 2. The University of Arizona Press, Tucson, pp. 625–651.
- Pizzarello, S. and Groy, T. L. (2011) Molecular asymmetry in extraterrestrial organic chemistry: An analytical perspective. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **75**, 645–656.
- Pizzarello, S., Huang, Y. S. and Fuller, M. (2004) The carbon isotopic distribution of Murchison amino acids. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 68, 4963–4969.
- Pizzarello, S., Krishnamurthy, R. V., Epstein, S. and Cronin, J. R. (1991) Isotopic analyses of amino acids from the Murchison meteorite. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 55, 905–910.

Remusat, L., Derenne, S., Robert, F. and Knicker, H. (2005)

New pyrolytic and spectroscopic data on Orgueil and Murchison insoluble organic matter: A different origin than soluble? *Geochim. Cosmochim. Acta*, **69**, 3919–3932.

- Schmitt-Kopplin, P., Gabelica, Z., Gougeon, R. D., Fekete, A., Kanawati, B., Harir, M., Gebefuegi, I., Eckel, G. and Hertkorn, N. (2010) High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall. *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, **107**, 2763– 2768.
- Shigemasa, Y., Matsuda, Y., Sakazawa, C. and Matsuura, T. (1977) Formose Reactions. II. The Photochemical Formose Reaction. Bull. Chem. Soc. Jpn., 50, 222–226.
- Simkus, D. N., Aponte, J. C., Hilts, R. W., Elsila, J. E. and Herd, C. D. K. (2019) Compound-specific carbon isotope compositions of aldehydes and ketones in the Murchison meteorite. *Meteorit. Planet. Sci.*, **54**, 142–156.
- Watanabe, N. and Kouchi, A. (2002) Efficient formation of formaldehyde and methanol by the addition of hydrogen atoms to co in H2O-CO Ice at 10 K. Astrophys. J. lett., 571, L173.
- Watanabe, N. and Kouchi, A. (2008) Ice surface reactions: A key to chemical evolution in space. *Prog. Surf. Sci.*, 83, 439–489.
- Yanagawa, H., Kobayashi, Y. and Egami, F. (1980) Genesis of amino acids in the primeval sea: formation of amino acids from sugars and ammonia in a modified sea medium. J. Biochem., 87, 359–362.
- Yuen, G., Blair, N., Des Marais, D. J. and Chang, S. (1984) Carbon isotope composition of low molecular weight hydrocarbons and monocarboxylic acids from Murchison meteorite. *Nature*, **307**, 252–254.
- Zellner, B., Tholen, D.J. and Tedesco, E. F. (1985) The eightcolor asteroid survey: Results for 589 minor planets. *Icar*, 61, 355–416.

## ■紀要「低温科学」の変遷 --

- ·低温科學, 第1輯 (1944年)-第10輯 (1953年)
- ·低温科學. 生物篇, 第11輯 (1954年) 第35輯 (1978年)
- ·低温科学.物理篇,第11輯(1953年)-第53輯(1995年)
- ·低温科学.物理篇.資料集,第27輯(1970年)-第63輯(2005年)
- (このうち, 第1輯(1944年12月)~第3輯(1950年12月)は岩波書店発行, 第4輯(1948年10

月)は北方出版社発行,第5輯(1950年12月)以降は低温科学研究所発行)

・低温科学. 第64巻(2005年)~

※第 68 巻(2009 年)Supplement Issue(英文增刊号発行)

## ■著作権-

- ・本紀要に掲載された論文の著作権は、北海道大学低温科学研究所に属する.
- ・ただし、原著者が出典を明示して再利用することは妨げない.
- ・また,掲載論文の一部または全部を電子的に蓄積し,北海道大学低温科学研究所が行う情報提供 サービスにより公開することがある。

	2021年3月20日
発 行 者	<b>北海道大学 低温科学研究所</b> 〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 8 丁目 URL:http://www.lowtem.hokudai.ac.jp
編集者	力石 嘉人
印刷・製本	(株)アイワード

© 2021 Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University





## 北海道大学 低温科学研究所

Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan http://www.lowtem.hokudai.ac.jp