【解説】

アミノ酸の窒素安定同位体比から 生き物の栄養段階を読み解く

大河内直彦，力石嘉人，小川奈々子

生体中に含まれるアミノ酸の窒素安定同位体比を精密に測定することによって，自然界に暮らす生き物の栄養段階を推定する方法が開発された。この手法を用いれば，各種生態系の解析に役立つだけでなく，環境変化が生物の食性に及ぼしてきた影響や，過去の人類の食性など，さまざまな応用研究が可能になる。

餌を採って食べることは，自然界で暮らすすべての生き物にとって，きわめて根本的な活動である。そのわりに，自然界に暮らす生き物のその実態についてはあまりよく知られていない。たとえば，深い海に生息している生き物は観察が難しく，試料もなかなか得にくい場合が多いから，その食性がきちんと調べられているケースはまれである。そんなに珍しい生き物ではなくても，食性がよく知られていない生物は実はきわめて多い。たとえば，私たちが蒲焼などにしてしばしば口にするウナギは，養殖が難しいことで知られている。直接的な原因は生簀でのウナギの稚魚（*Leptocepharus*）の育成が難し

いことであり，その主たる理由とは天然における稚魚の餌がきちんと知られていないからである⁽¹⁾。

最近筆者らが確立したアミノ酸の窒素同位体比を用いた栄養段階の推定法は，天然環境において生き物が何を食べて暮らしているかということを教えてくれるものである。捕食というマクロな生態学的事象が，ミクロな化学的シグナルとして捉えることができることも魅力である。それは，純粋に生態学的な問題から，上述のような水産学的な問題，さらに生理学的な問題に至る広い領域に適用できる新しい方法論である。本稿では，この栄養段階の推定法について概略を説明し，その応用例をいくつか紹介しよう。

天然レベル安定同位体

手法を解説する前に，天然レベルの安定同位体比について簡単に述べておきたい。安定同位体はトレーサーとして用いられる一方で，天然レベルの微小な安定同位体比の変動から，自然界で起きている事象を解析する方法論としても用いられてきた。化学反応において反応物と生成物の間で，安定同位体比が平衡論的あるいは速度論

Diet Analysis Based on Nitrogen Isotopic Composition of Amino Acids
Naohiko OHKOUCHI, Yoshito CHIKARAISHI, Nanako O. OGAWA, 海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域

的にごくわずかが差異が生じることを理論的な背景としている。

多くの場合、観測される同位体比の差はきわめて小さなものである。たとえば、自然界に存在する窒素には ^{15}N が平均0.366%ほど含まれている。そして、天然におけるその変動はほとんどの場合、0.360から0.372%の間に収まる。きわめて小さな差を十分な精度をもって測るために、同位体質量分析計と呼ばれる特殊な質量分析計が用いられる。また、同位体比は、交互に測定した標準試料に対する相対値であるデルタ (δ) 値という独特の形式で表わされる。

$$\delta^{15}\text{N} = \{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{試料}} / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{標準物質}} - 1\} \times 1000$$

窒素の場合、標準物質はきわめて均質な大気中の窒素ガス (AIR) が用いられる。通常、分析誤差は0.2%程度 (^{15}N のモル比にすると、0.00007%というきわめて小さな違いに相当する。‰は千分率, per milを表わす単位) である。

個々のアミノ酸の窒素安定同位体比を測定するためには、安定同位体比質量分析計の前にガスクロマトグラフィーを付設した、ガスクロマトグラフィー/燃焼/同位体質量分析計と呼ばれる機器を使う。ガスクロマトグラフィーによって個々のアミノ酸が分離された後、順次燃焼管中で燃焼され、窒素は窒素ガス (N_2) としてオンラインで安定同位体比質量分析計に導入される。安定同位体比質量分析計では、複数の検出器で m/z 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}^+$) と m/z 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$) を同時に測定し、両者の比をとることによって窒素同位体比を測定する。

栄養段階推定法の原理

生体中に存在するアミノ酸は、主としてタンパク質やコラーゲンの成分であり、そのほとんどが20種類のアミノ酸から構成されている。よく知られているように、20種類のアミノ酸は、動物が体内で合成できる非必須アミノ酸 (可欠アミノ酸) と、合成できず食物から得なければならない必須アミノ酸 (不可欠アミノ酸) の2種類に分けることができる。たとえば、必須アミノ酸の一つフェニルアラニンは、その構造の中にベンゼン環が含まれており、われわれ動物は、進化の過程でベンゼン環を合成する酵素を失っている。したがって、微生物を除く従属栄養生物は必須アミノ酸であるフェニルアラニンを常に餌に求めるしかない。つまり、どれほど高次の捕食者といえども、それがもつ必須アミノ酸の究極的な起源は藻類などの独立栄養生物にある。水界中に暮らす独立栄養生物についてみると、各アミノ酸には窒素同位体

(^{15}N) は驚くほどバランスよく分配されている。たとえばフェニルアラニンとグルタミン酸の差は、あらゆる藻類、シアノバクテリアなどを通して平均3.4%である⁽²⁾。

フェニルアラニンが生体内で代謝される際、窒素同位体比が変化しないことは経験的に知られてきた⁽³⁾。フェニルアラニンが代謝される際、アミノ基の脱離 (ケト酸の生成) はほとんど起こらず、水酸基が付加されてチロシンが生成する。窒素原子が関与しないこの代謝では、窒素同位体比の変化は原理的に起こりえないのである⁽²⁾。したがって、理論的にはフェニルアラニンの窒素同位体比は食物連鎖を通してほぼ一定に保たれることになる。筆者らがさまざまな培養実験における系について詳しく調べたところ、1栄養段階につき、その上昇幅は平均わずか0.4%であった⁽⁴⁾。

一方、グルタミン酸は、非必須アミノ酸とはいえ、その多くは動物の体内で合成されたものではなく、必須アミノ酸のように食物に含まれるグルタミン酸がそのまま用いられている。さらに重要なことに、グルタミン酸はフェニルアラニンとは決定的に異なる代謝プロセスをもっている。その代謝の最初のステップは、アミノ基が脱離してケト酸になることである。グルタミン酸の場合、代謝されるとクエン酸回路の中間生成物でもある α -ケトグルタル酸になる。グルタミン酸からアミノ基が脱離する際には、C-N結合を開裂させる必要があるが、C- ^{14}N とC- ^{15}N 結合力の差に起因する同位体分別が生じる。培養実験の結果によると、捕食者のグルタミン酸の窒素同位体比は、被食者のそれに比べて規則的に高くなり、あらゆる系においてその差は平均8.0%であった⁽⁴⁾。

上に述べたことを、栄養段階と関連づけた数式として表わすと以下ようになる。

$$[\text{栄養段階}] = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1$$

ちなみに、この式でいう栄養段階とは、植物プランクトンなどの独立栄養生物が1.0、それを食べる植食者が2.0、植食者だけを食べる動物が3.0という数値で、小数もありえる。上の式の重要なポイントは、水界中に生息する生き物の栄養段階が、グルタミン酸 (Glu) とフェニルアラニン (Phe) の窒素同位体比の差だけの一次関数になることである (図1)。言い換えると、目的生物の試料さえ手にすればその栄養段階を知ることができる。栄養段階の推定誤差は、筆者らが行った培養実験などをもとに計算すると0.1程度である⁽⁴⁾。

筆者らのグループでは、多くの捕食者-被食者系について測定を行ない、この手法がほとんどすべての系について成り立つことを明らかにしてきた⁽⁴⁾。それと同時に、様々な生態系に応用し、生態系の解析ツールとして

図1 ■ グルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比と栄養段階の関係を示す図

栄養段階は、グルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の差の一次関数になる。

用いてきた。ここからは、そういった応用例について紹介することにしよう。

バイカル湖の生態系への応用例

まず最初に紹介するのは、バイカル湖の生態系への応用例である。長年、観察を中心とした生態学的な研究が行われてきたフィールドであり、さまざまな生態学的な知見が蓄積している⁽⁵⁾。その意味で、本手法の妥当性を評価するには良いケース・スタディとなる。

アミノ酸の分析結果から推定された個々の生物の栄養段階を図2に示したので、これを見ながら解説することにしてしよう。植物プランクトンは純粋な1種だけの試料を得ることが難しいため、珪藻 (*Aulacoseira baicalensis*) の1試料についてしかデータがない。しかし、その試料の分析結果は、きっちり栄養段階1.0を示した。植物プランクトンを主食とする動物プランクトンについては、採取年代の異なるカイアシ類 (*Epischura baicalensis*) 7試料について分析を行なった結果、いずれも栄養段階に換算して1.9～2.1の値を示し、その平均値は2.0となった。この数字は、従来の生態学的な知見とももちろん整合的である。同じ動物プランクトンでも、バイカル湖の浮遊性ヨコエビ (*Macrohectopus branickii*) はカイアシ類より大きく成長することが知られている。栄養段階はサイズに比例して動物プランクトンより高く (2.2～2.5) なり、大きな個体ほど小さな動物プランクトンやその遺

図2 ■ バイカル湖に暮らすさまざまな生き物の、アミノ酸窒素同位体比から推定した栄養段階

骸を食べていることがわかる。さらにオムル (*Coregonus autumnalis migratorius*) と呼ばれるサケ科の魚は、その1段階高い栄養段階3.6 (平均値) を、オムルの稚魚を捕食する浮遊性カジカ類は、オムルより上の栄養段階4.3 (平均値) を示す。バイカル湖においてトッププレデターとして君臨しているバイカルアザラシの栄養段階は、平均値として5.0を示した。つまり、彼らの餌は平均すると栄養段階4.0の生き物ということになる。もし、カジカとオムルを主食とすると、前者を4割、後者を6割食べていることになる。重要なことは、こういった結果が、これまで行われてきた生態学的な研究ときわめて整合的という点にある。アミノ酸の窒素同位体比を用いた栄養段階推定法が、天然の系においても成り立つことを示したのである。

琵琶湖の富栄養化と魚類の食性変化

次に紹介するのは、琵琶湖の例である。琵琶湖では1960年代以降、富栄養化が進行してきた。研究の目的は、こういった環境変化が生き物の食性にどのような影響を及ぼすのかについて明らかにすることである。分析の対象は、ハゼ科魚類のイサザ (*Gymnogobius isaza*) である。イサザは研究用試料として20世紀初頭から琵琶湖の北湖で採取され、ホルマリン漬けにされて長期保存されてきた。したがって、過去1世紀近くにわたるイサザの食性の経時変化を復元することが可能である。ちなみに「ホルマリン固定」とは、ホルムアルデヒドがアミノ基に架橋する反応であるが、アミノ酸のアミノ基の安定同位体比は変質しない⁽⁶⁾。したがって、ホルマリン

図3 ■ 20世紀を通した(a)琵琶湖北湖の深層水(水深75 m以深)における硝酸濃度と、(b)イサザ筋肉中のアミノ酸の窒素同位体比から復元した栄養段階

詳細は文献(8, 9)を参照のこと

固定試料といえども、栄養段階の記録媒体として用いることができる。

試料が採取された琵琶湖の北湖では、1950年代から深層水中に硝酸が蓄積し始めている。琵琶湖では60年代後半から70年代半ばにかけて、夏になると各地でアオコが発生し水質の悪化は顕著になった。こういった水質汚染に伴ってプランクトン種がごっそり入れ替わるとともに、ほぼそれと同時期にブルーギルやブラックバスなどの移入種の増加も確認されている。さらにそれに伴って、琵琶湖におけるイサザの水揚げ量から推定されるそのバイオマスは、この環境変化に応じて大きく減じた⁽⁷⁾。こういった環境変化は、そこに生息する魚の食性にどのような影響を与えたのだろうか？

筆者らは、イサザコレクションのなかから体長 58 ± 7 mmの1歳魚だけを選び出し、そのアミノ酸窒素同位体比を分析した^(8, 9)。図3に示した分析結果からも明らかとなっており、20世紀を通してイサザの栄養段階は3.2～3.3で横ばい状態にあった。つまり、富栄養化は進んだものの、イサザは栄養段階が2.2～2.3にあたる生き物（主に動物プランクトンやヨコエビなどと考えられる）を主食とし続けたことを示唆している。大きな環境変化を受けたにもかかわらず、イサザの栄養段階は一定を保たれたのである。これは、食性が変化しなかったというよりは、生態系の変化に応じて代替種を食べることで環境変化を凌いでいたということができそうだ。

我が国の湖沼において富栄養化が顕著に進行したのは、多くの場合高度成長期のことである。だから、富栄養化が生態系に及ぼした影響を知るには、もはや過去の記録を辿るしかないケースが多い。その一方で、琵琶湖

のイサザのように継続的に採取され、ホルマリン固定試料として博物館や大学に長年保存されている魚類などは膨大な種類と数に上ると考えられる。そういった保存試料を用いて、様々な魚種について正確な栄養段階が調べられていけば、富栄養化が生態系に及ぼしてきた影響が、これまで以上にクリアに見えてくるだろう。栄養段階は数ある生態系パラメーターの一つに過ぎないが、定量性の向上は、今後環境と生態系の関係を定量的に論じる際に重要なアンカー・ポイントとして貢献するだろう。

化石への応用

有機物でできた生き物の軟体部は多くの場合、死後すぐに分解されてしまうものである。しかし、炭酸カルシウム、二酸化ケイ素、リン酸カルシウムといった生物がつくり出す硬組織中には、比較的長い期間にわたって有機物が保存されることが知られている。そこで筆者らは、骨（リン酸カルシウム）、歯（リン酸カルシウム）、卵の殻（炭酸カルシウム）、貝殻（炭酸カルシウム）といった硬組織に含まれるアミノ酸を抽出する方法を確立して⁽¹⁰⁾、その窒素同位体比を測定した。その結果、軟体部を構成するアミノ酸の窒素同位体比と等しいことを見いだした。つまり、上で紹介した方法論は化石試料にも潜在的に適応可能である。ここでは、骨化石の中に含まれるコラーゲンのアミノ酸を用いて、縄文人の人骨化石に応用した例について紹介しよう。

筆者らは東大の米田穰、内藤裕一らと共同で、北海道の北黄金貝塚（伊達市、縄文中期）から出土した縄文人骨から抽出したコラーゲン中に含まれるアミノ酸の窒素同位体比を測定して食性解析を行なった⁽¹¹⁾。その結果の一部を図4に示す。誌面の都合上詳しく述べないが、筆者らのグループでは最近、陸域生態系でも栄養段階とアミノ酸の窒素同位体比の間に同様の関係があることを見いだしており、陸の生態系解析についてもこの手法は応用可能である⁽¹²⁾。ただし、栄養段階と窒素同位体比の関係式の係数が少々異なっている。したがって、人間のような海陸両方のタンパク質源に依存するような生き物の場合、その栄養段階を一義的に決めることは理論上不可能である。

とはいえ、図4からは、当時の縄文人のタンパク質源が海洋生態系に大きく偏っていたことがわかる。さらに、海からくるタンパク質源が（北黄金貝塚から産する）ホタテの栄養段階（～2.4）よりもいくらか高かったことが予想され、当時そこに暮らしていた人々が漁に

図4 ■北海道北黄金貝塚（縄文中期）から採取された各種化石試料のアミノ酸の窒素同位体比

横軸にフェニルアラニンの窒素同位体比を、縦軸にグルタミン酸の窒素同位体比をとると、海域生態系に属する生き物は左側の灰色の領域にプロットされ、陸域生態系に属する生き物は右側のコバルト色の領域にプロットされる。点線はそれぞれの系における栄養段階を表わしている。北黄金貝塚に産する人骨のコラーゲンの窒素同位体比は、海域生態系に大きく偏っている。東大、米田穰・内藤裕一らとの共同研究。詳細は文献（11, 13）を参照のこと。

よって積極的に魚を採取していたことを示唆している⁽¹³⁾。こういった結果の詳細は原著論文に譲ることとして、このような試料に応用できることは、この方法論が歴史科学の研究ツールとなりえることを示している。もちろん、さらに時代を遡って、恐竜の食性解析にも原理的には応用可能である。

将来への展望

本稿で紹介した方法論は、微生物が関わる系でも成り立つことが最近明らかになりつつある。つまり、上で紹介した生食連鎖の裏側ともいえるべき腐食連鎖でも、この方法論は原理的に威力を発揮する。生き物の食性を高い

定量性をもって数値化する手法は今後、生態学をとりまく数多くの問題にヒントを与えてくれるだろう。病理解析や栄養学にまでも応用できるかもしれない⁽¹⁴⁾。

自然界に暮らす生き物の栄養段階のデータが蓄積してくると、さらなる展望が開けてくるだろう。たとえば、あらゆる生態系において、最も高い栄養段階はいったいいくつになるのだろうか？という問題は、長年にわたって生態学にとって中心的問題であり続けている⁽¹⁵⁾。一次生産者の量は、地球に降り注ぐ太陽エネルギーの量によって決まる。栄養段階が上がれば上がるほど、流れるエネルギー量は少なくなる。今回、筆者らが開発したアミノ酸の窒素同位体比を用いた栄養段階の定量法は、単一の種を維持していくのにどのくらいのエネルギーや個体数が必要なのかという本質的な問題に、潜在的に重要な情報を与えてくれるものである。こういった情報を系統樹に重ね合わせて、進化と食性の関係について議論することがその先にある。

文献

- 1) 塚本克己：私信
- 2) Y. Chikaraishi *et al.*: *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **342**, 85 (2007).
- 3) J. W. McClelland & J. P. Montoya: *Ecology*, **83**, 2173 (2002).
- 4) Y. Chikaraishi *et al.*: *Limnol. Oceanogr. Method*, **7**, 740 (2009).
- 5) O. A. Timoshkin: "Guide and Key to Pelagic Animals of Baikal", Russian Academy of Sciences, 1995, p. 693.
- 6) N. O. Ogawa *et al.*: *Limnol. Oceanogr.*, **46**, 1228 (2001).
- 7) M. Yuma, K. Hosoya & Y. Nagata: *Environ. Biol. Fish.*, **52**, 97 (1998).
- 8) N. O. Ogawa, Y. Chikaraishi & N. Ohkouchi: *Ecol. Res.*, in press.
- 9) 大河内直彦, 小川奈々子, 力石嘉人: *科学*, **81**, 621 (2011).
- 10) Y. Takano, Y. Kashiya, N. O. Ogawa, Y. Chikaraishi & N. Ohkouchi: *Rapid Commun. Mass. Spectrom.*, **24**, 2317 (2010).
- 11) Y. Naito *et al.*: *Am. J. Phys. Anthropol.*, **143**, 31 (2010).
- 12) Y. Chikaraishi, N. O. Ogawa, H. Doi & N. Ohkouchi: *Ecol. Res.*, **26**, 835 (2011).
- 13) 大河内直彦, 内藤裕一, 力石嘉人, 米田 穰: *科学*, **81**, 1116 (2011).
- 14) 小川奈々子, 力石嘉人, 大河内直彦: *臨床化学*, **38**, 266 (2009).
- 15) R. L. Lindeman: *Ecology*, **23**, 399 (1942).