安定同位元素のトレーサー利用 (Ⅵ)

質量分析法による ^{15}N の測定と利用 (Ⅱ) [†]—— 各種窒素化合物中の ^{15}N 測定と応用例を中心として ——

和田 英 太 郎

三菱化成生命科学研究 生物地球化学・社会地球化学教室
東京都町田市南大谷11号

現在広く普及している放射性核種のトレーサー法と同様、安定同位体も生化学、生物学、農学、地球化学、薬学、医学の分野で広くトレーサーとして利用されている。たとえば、(1)化学物質定量の内部標準、(2)反応速度定数の決定や反応機構の解明、(3)代謝活性の測定あるいは代謝経路の解明、(4)生体内物質のプールサイズあるいは回転速度の決定、(5)農学、地球化学等野外を対象とする分野は生物による物質移動、栄養要求性に関する研究など、きわめて幅広い分野で応用することができる。現在安定同位体の使用が急速に普及し、その利用に関する文献抄録集¹⁾、総説^{2),3)}など出され、この分野の研究者にとって便利になっている。本稿では、試料を N_2 ガスにして測定を行う研究に話題をしばって述べているが、研究目的は何であれ、 ^{15}N 含量を測定しようとする化合物あるいは生体をどのように分離精製し、 N_2 ガスに変換するかが ^{15}N トレーサー法を使えるか否かの鍵となる。とくに野外を研究対象とする農学、地球化学の分野ではこの点に苦心が払われ、試料調製法と質量分析計による ^{15}N 測定法の開発が一体化して進められてきた。この節ではおもに試料調製法に視点を定め、いくつかの研究を紹介したい。著者の専門である生物地球化学の分野では生物活動に関与する自然界の含窒素化合物中の ^{15}N 分布に関する多くの研究が行われている。天然における ^{15}N 分布とこれを規定している窒素同位体効果については、 ^{15}N トレーサー法の基礎的知見となるのでここに合わせて詳しく述べてみたい。

9. 自然界における微生物の栄養要求性

窒素は生物の主要な構成元素であることは改めていうまでもない。自然界では窒素がしばしば生物の生育速度あるいは生物量を制限する因子になっている。したがってある生物がどのような窒素化合物を最も多く利用しているかという問題は野外の生態系では重要である。一例として海洋における植物プランクトンの栄養要求性について述べる。

植物プランクトンは窒素源として NH_4^+ 、 NO_3^- を利用するので下図のようにあらわす¹⁶⁾。

ここで N は濃度、 V は反応速度定数 (時間⁻¹)、 ρ は単位時間あたりの同化量である。いま $V_{\text{NO}_3^-}$ を測定するため、 ^{15}N で標識した NO_3^- を試水に添加する。このとき、系の状態が大きく変化しないよう加える $^{15}\text{NO}_3^-$ の量は試料中に存在する NO_3^- の数%とする。 a を ^{15}N の atomic % とすると

$$\frac{dN_p}{dt} = V_{\text{NO}_3^-} N_p$$

$$\frac{da_p N_p}{dt} = a_{\text{NO}_3^-} V_{\text{NO}_3^-} N_p$$

$$\text{よって } V_{\text{NO}_3^-} = \frac{\rho_{\text{NO}_3^-}}{N_p} = \frac{da_p/dt}{a_{\text{NO}_3^-} - a_p \text{ } t=0}$$

となる。

インキュベーション終了後、微生物をフィルター上に集め、 ^{15}N 含量を測定する。上図に示したように、通常海水中には代謝活性に関与しない粒状有機態窒素が含まれるため、測定された ^{15}N 含量 (a_p) と $V_{\text{NO}_3^-}$ の

[†] On the Utilization of Stable Isotopes (Ⅶ).
Measurement of ^{15}N by Mass Spectrometry and
Its Application (Ⅱ).
Eitaro WADA: Mitsubishi-Kasei Institute of
Life Sciences, 11, Minami-Ooya, Machida-shi,
Tokyo.

値の間にはつぎの関係が成り立つ。

$$V_{\text{NO}_3^-} = \frac{da_p/dt}{a_{\text{NO}_3^-} - a_p \text{ } t=0} \cdot \frac{N_p + N_D}{N_p}$$

試水中のプランクトン態窒素 (N_p) と活性のない粒状有機態窒素 (N_D) を区別できないので、 ^{15}N 含量の測定から $V_{\text{NO}_3^-}$ を直接求めることはできないが、代謝活性に関与する生物が同一の場合は、各基質に対する速度定数の比 $V_{\text{NO}_3^-}/V_{\text{NH}_4^+}$ および $\rho_p = V \cdot (N_p + N_D)$ は求めることができる。このようにして Dugdale ら¹⁶⁾ は海洋のいくつかの海域で NH_4^+ 、 NO_3^- の利用率を求めた。高緯度域では、冬期には鉛直混合が激しく、下層から NO_3^- 、 PO_4^{3-} などの栄養塩が供給され、一次生産の窒素源として NO_3^- がおもに使われる。一方、下層から栄養塩の供給のない低緯度域では NH_4^+ が窒素源となっている (表3)¹⁷⁾。

表3 海洋表層における窒素利用の割合¹⁷⁾

海 域	$\frac{V_{\text{NO}_3^-}}{V_{\text{NO}_3^-} + V_{\text{NH}_4^+}} \times 100$	文 献
北西太平洋沿岸		
Juneau-Cape Spencer	27.6	16
Seattle-Juneau	20.3	16
Vancouver-Honolulu	8.7	16
中部北太平洋 (150°W)		
50°N	28 — 50	Hattori and Wada ら (1972)
40°N	0 — 44	
10°N	0	
ベーリング海峡	77 — 89	McRoy ら (1972)
アリユーション列島近海	13 — 40	

微生物の生育生理的な研究を行うには、試料を単一種までに分離することが必要である。しかし天然試料中の微生物を分離することはきわめて困難である。そのため試料中の優先種のみに着目し、代謝活性の測定を行ったり、対象とした微生物を単離培養し、連続培養系で自然状態に近い培養を行い、自然界での生理生育状態を推定する方法が採られているのが現状といえる。

辻¹⁸⁾は図12に示すような装置を使って、走光性をもつ鞭毛藻を共存するバクテリアから分離し、各種窒素化合物の同化速度を測定した。メッシュ40 μm のネットで動物プランクトンを除いたのち、試水を図の(B)にたす。つぎに(A)の部分に、ろ過海水に5%容の水を加え滅菌したものを満たし、上部から光を照射する。試水中の活発な鞭毛藻は数時間で上部(A)に集まる。生理

図12 鞭毛藻分離器¹⁸⁾

表4 赤潮鞭毛藻による窒素化合物同化速度¹⁸⁾
($\mu\text{g-at.N} \times 10^{-9}/\text{細胞/時間}$)

測点	日 付	アミノ酸混液*	尿素	NH_4^+	NO_2^-	NO_3^-
東京湾	1971年 8 月	0.11	—	46.6	2.9	0.0
	1972年 9 月	0.04	28.8	74.2	2.5	4.8
	10 月	0.01	24.3	101.4	2.9	1.1
相模湾	1972年 6 月	0.09	—	13.5	4.1	3.0

* ^{14}C 標識アミノ酸を使用した。

状態の良好な鞭毛藻は付着バクテリアが少なく、画分(A)の代謝活性のほとんどは鞭毛藻によるとみなしうる。東京湾の赤潮はこの種の走光性をもつ鞭毛藻であるが、かれは上記装置で赤潮の鞭毛藻を分離後、窒素栄養要求性を ^{15}N 法によりしらべた(表4)。東京湾の赤潮鞭毛藻の窒素化合物利用度は $\text{NH}_4^+ > \text{CO}(\text{NH}_2)_2 > \text{NO}_2^- > \text{NO}_3^- > \text{amino acid mixture}$ の順となる。東京湾に放出される排水中には NH_4^+ や $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ が多く、赤潮鞭毛藻は最も多く存在する窒素化合物を利用している。

10. NO_2^- 、 NO_3^- 中の ^{15}N 含量の測定

微生物による硝化作用、硝酸還元過程を ^{15}N トレーサー法によって研究する場合、 NO_2^- あるいは NO_3^- 中の ^{15}N 含量を測ることが必要となる。この場合、共存する NH_4^+ や溶存有機窒素からの ^{15}N 混入を防がねばならない。それには前号で述べた $\text{HNO}_2 + \text{HOS O}_2\text{NH}_2 \rightarrow \text{N}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{SO}_4$ の反応を使う。試料液量が少なければ NO_2^- は反応管内で直接この反応を行

図13 アゾ色素法と Al 還元法との相互校正

い N_2 を得ることができる。 NO_3^- は NO_2^- と分離することがむずかしい。したがって $NO_2^- + NO_3^-$ 中の ^{15}N 含量を測定する。この場合 Cd 還元法¹⁹⁾によって、定量的に NO_2^- に還元後 ($NO_3^- + Cd + EDTA^{-4} + H_2O \rightarrow NO_2^- + Cd(EDTA)^{-2} + 2OH^-$)、生成した NO_2^- をスルファミン酸と反応させる。図13にこの操作の検討結果を示す。あらかじめ ^{15}N 含量の異なる NO_3^- 標準液を調製し、これを Cd-還元法によって NO_2^- に還元したのち、スルファミン酸により N_2 にし $\delta^{15}N$ 値を求める。他方、同じ標準液をアルカリ中で Al によって NH_4^+ に還元し、KOBBr によって N_2 に酸化後 $\delta^{15}N$ を求め (図13・横軸) 両者の値を比較する。測定数が十分とはいえないが、両者の間には直線関係があり、勾配は $\frac{1}{2}$ となる。この事実はスルファミン酸の N 1 原子と NO_2^- の N 1 原子から N_2 が生成されることを意味する (3・5 参照)。 NO_2^- に対してスルファミン酸を大過剰に使い、しかも、まだ反応液が低温のうちに両液を混合するとスルファミン酸からくる N に同位体効果が生じるので、スルファミン酸の量は NO_2^- の10倍以内とし、両液を混合するときは一定温度 (室温付近) にし反応させる。

海水のように塩分量が高く、 NO_2^- 、 NO_3^- が希薄な試料の場合は NO_2^- を分離濃縮しなければならない。著者ら²⁰⁾はこの目的のため海水中の微量 ($10^{-7} \sim 10^{-9} M$) の NO_2^- をスルファニル酸と N-1・ナフチルエチレンジアミンで発色後、生成したアゾ色素を陰イオン交換樹脂によって濃縮する方法を開発した。図14にこのイオン交換カラムを示した。アゾ色素の樹脂への吸着能はきわめて高く、水流ポンプで流量を 50ml/分としても定量的に樹脂に捕集される。3~5 l の試水を処理するときは 20φ×100mm の大型のカラムを使うと30分程度で極微量のアゾ色素を捕集できる。溶離は60%の酢酸溶液で行うが色素であるため溶離状態が目で

図14 アゾ色素濃縮用カラム²⁰⁾

観察でき、きわめて便利である。濃縮した色素は $SnCl_2$ で還元後、キエルダール分解し、KOBBr によって N_2 ガスにする。この方法ではスルファニル酸、N-1・ナフチルエチレンジアミンがカラムに吸着し少量混入してくる。さらにアゾ色素には試薬分子の窒素が含まれるので NO_2^- の窒素がこれらで希釈されるが全窒素量を測定することによって次式から NO_2^- 画分中の ^{15}N を算出できる。たとえば $^{15}NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$ の硝化活性を測定する場合、硝化された NH_4^+ の量 ρ は

$$\rho = \frac{\Delta a / \Delta t}{a_{NH_4^+} - a_0} \times N \quad \text{となる。}$$

Δa : 反応時間 Δt のときの atomic excess %

$a_{NH_4^+}$: $^{15}NH_4^+$ を加えたときの NH_4^+ の ^{15}N atomic %

a_0 : $^{15}NH_4^+$ を加えないブランクテスト時のアゾ色素の atomic %

N : キエルダール分解された窒素量

表5²¹⁾はこの方法によって西部北太平洋で $NH_4^+ \rightarrow NO_2^-$, $NO_3^- \rightarrow NO_2^-$ 過程での NO_2^- 生成速度を求めた結果である。黒潮域では NO_2^- 生成に対して硝化の寄与が大きく親潮域 (Kuril 沖) では硝酸還元の寄与が大きいことが見出される。

11. 脱窒系で発生する N_2 中の ^{15}N の測定

脱窒素過程 ($NO_3^- \rightarrow N_2$) は微生物学的には硝酸呼吸ともよばれ、反応経路、中間生成物、エネルギー効率などの研究が古くから行われている。自然界においては生態系から窒素の消失を伴うので注目される反応

表5 海洋有光層における NO_2^- の生成速度²¹⁾

海 域	年 月	NO_2^- 生成速度 ng at.N/l/時間	
		$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$
東支那海 フィリッピン海 北西太平洋 クリル沖	1971年5月	0.007	0.011
	6月	0.007	0.006
	7月	0.026	2.6
相模湾	1970年6月	0.20	1.4
	10月	0.10	0.42

過程である。中間生成物は微生物の種、生理状態によって異なるが NO_2^- , NO , N_2O などが知られている。6節に示した無機ガスのパターン係数からわかるように、 N_2O は分子量が44であり CO_2 の m/e 44のピークが重なってしまう。 ^{15}N トレーサー法でたとえば50% ^{15}N を標識した NO_3^- を基質として用いれば、 N_2O の m/e 45のピークが簡単に識別でき、 CO_2 共存下で N_2O の定量が可能となる。 ^{15}N トレーサー法によって脱窒活性を測定する場合つぎの2点に注意しなければならない。

- 1) 脱窒活性がきわめて弱い場合は atomic %が50%以下の NO_3^- を使用し m/e 29/28比を測定する。たとえば100%の $^{15}\text{NO}_3^-$ を使用すると、発生したガスが微量の場合は m/e 30のピークの測定が困難になる。
- 2) 気相に空気が存在するような実験系（たとえば土壌の脱窒活性を自然条件に近い系で測定する場合など）では空気中の窒素ガスおよび ^{15}N で標識した NO_3^- から発生した N_2 ガスはおのおの独立に m/e 28, 29, 30の比が統計的、確率的に分布している。この両者が混合した場合はもはや通常の確率分布でなくなり、ふつうの測定や計算では正しい値を得ることができない。とくに試料が土壌のような場合は実験中に

NO_3^- が生成され、時間とともに、 NO_3^- 中の ^{15}N 含量も変化していく、この場合つぎのような測定と計算を行う²²⁾。

1) 測定

$$r = \frac{m/e\ 29}{m/e\ 28}, \quad r' = \frac{m/e\ 30}{m/e\ (28+30)} \text{ を測定する。}$$

$$= 2b/a \quad \quad \quad = c/(a+2b)$$

2) 計算

いま m/e 28, 29, 30の窒素ガスのモルフラクションを a , $2b$, c とする ($a+2b+c=1$)。

ここで、 $X^{14}\text{N}$: NO_3^- 中の ^{14}N の atom fraction

$$X^{14}\text{N} = (1 - X^{14}\text{N}) \quad \text{NO}_3^- \text{ 中の } ^{15}\text{N} \text{ の atom fraction}$$

$$X^{14}\text{A}, X^{15}\text{A}: \text{Aは空気を表す}$$

$$d: \text{反応時間 } t \text{ 後の気相中で脱窒過程に起因する } \text{N}_2 \text{ のフラクション}$$

とすると

$$a = (1-d)(X^{14}\text{A})^2 + d(X^{14}\text{N})^2$$

$$2b = 2(1-d)(X^{14}\text{A}X^{15}\text{A}) + 2d(X^{14}\text{N}X^{15}\text{N})$$

$$c = (1-d)(X^{15}\text{A})^2 + d(X^{15}\text{N})^2$$

上記式から $X^{14}\text{N}$ と d を求めると

$$X^{14}\text{N} = \frac{-B \pm \sqrt{B^2 - 4AP}}{2A}$$

ここで $A = P(r'+1) + R(r+2)$

$$B = -2[P(r'+1) + R]$$

$$P = 2(X^{14}\text{A})(1 - X^{14}\text{A}) - r(X^{14}\text{A})^2$$

$$R = (1 - X^{14}\text{A})^2 - r'[2(X^{14}\text{A})(1 - X^{14}\text{A}) + (X^{14}\text{A})^2]$$

$$d = \frac{P}{(r+2)(X^{14}\text{N})^2 - 2X^{14}\text{N} + P} \quad \text{となる。}$$

Hauck らは気相に空気が存在する条件下で土壌中の脱窒活性を測定し、表6のような結果を報告している。かれらは上記の計算で $X^{15}\text{N}$ を求めたが、 $X^{15}\text{N}$ は実

表6 $^{15}\text{NO}_3^-$ より発生した窒素ガスの空気中における $X^{15}\text{N}$ およびモル分率 (d) の計算値²²⁾

実験番号	$^{15}\text{NO}_3^-$ を添加後の日数	初期の $X^{15}\text{N}$	$X^{15}\text{N}$ 計算値	d_1	d_2
8 a	19	0.347	0.3398	0.0183	0.0190
	19	0.347	0.3397	0.0074	0.0076
12 a	4	0.347	0.347	—	—
	14	"	0.3439	0.0152	0.0154
	22	"	0.2735	0.0364	0.0579
13	22	0.347	0.2889	0.0114	0.0147
14	19	0.2395	0.2164	0.0514	0.0569

d_1 : $^{15}\text{NO}_3^-$ が希釈をうけないとして計算した。

d_2 : $^{15}\text{NO}_3^-$ が希釈をうけた場合

図15 浜名湖底層水 (10m) の脱窒活性²³⁾ 図16 溶存ガス抽出装置²³⁾

験開始時の値から変化する (例, 表 5, 12a-22日)。これは添加した $^{15}NO_3^-$ が実験中に生成した天然の同位体比をもつ NO_3^- によって希釈されたことを物語っている (d_1 と d_2 を比較)。

図15²³⁾には著者らが浜名湖で行った脱窒活性を測定した結果を示す。図16にはこのとき使用した脱ガス用の真空系を示した。 NO_3^- は2つの点で脱窒系を制御している。第1はこの反応過程の基質として使われる。第2は試水中の NO_3^- の量が酵素系のレベルを規定していることである。環境水中に NO_3^- が $10^{-7}M$ 以上存在する場合は、誘導期のない活性が測定される。この事実は酸素消失後、硝酸呼吸の誘導、呼吸能保持に NO_3^- が重要な因子となっていることを示唆する。

培養実験系でも多くの研究が ^{15}N を利用して行われている。たとえば, *Pseudomonas denitrificans* の N_2O 代謝に対する O_2 , NO_3^- の影響についての研究²⁴⁾, 代謝中間生成物を調べた研究²⁵⁾などがある。

12. 希釈法による極微量試料中の ^{15}N の定量

同位体希釈によって、試料中の微量成分を定量する方法は放射性核種を使う分野で広く普及している。 ^{15}N を使ってもまったく同様の方法が適用できる。Nommik²⁶⁾ は植物体中の NO_3^- の定量にこの方法を用いた。乾重量 0.1-1.0 g の植物体試料に 0.1-0.2 meq の ^{15}N 濃度既知の NO_3^- を加えたのち、 NO_3^- を抽出し、Rittenberg 管内で 15% $TiCl_3 \cdot 5N H_2SO_4$ 混合液と反応させ m/e 28, 29, 30, 31 を測定する。求めた ^{15}N 濃度変化から植物体中の NO_3^- 量を算出する。これに対して試料量が微量 ($\ll 1\mu g$) でもその中に検出可能な ^{15}N が含まれていれば、標準ガスで試料を希釈し $^{15}N/^{14}N$ を求め、試料中の ^{15}N 量を算出することができる。著者ら²⁷⁾はこの方法によって海洋中の藍藻 *Trichodesmium* コロニー (1コロニーの N 量は約 $1\mu g$) や大型の珪藻の *Esmodiscus* 細胞1個ごとの NH_4^+ 同化活性を測定した。試料はバケツあるいはプランクトンネットで採取後、滅菌海水で洗浄し、 $^{15}NH_4^+$ 取込み実験 (5.000lux で2時間) を行ったのち、顕鏡下で写真撮影を行い、グラスファイバーフィルター上に捕集される。試料を Duma 法 (7.3参照) でガス化後、図7-5中の標準試料を約 $2.5\mu g at.N$ 入れて希釈し、 ^{15}N 量を測定した。この場合希釈率は m/e 28 のピーク高により簡単に算出できる。測定試料全窒素量も m/e 28 のピーク高から求められるので、

表7 海洋性藍藻 *Trichodesmium* コロニーの
 NH_4^+ 同化能 (反応実験は1コロニーご
 とに行った) (和田・蓮本, 1973)

海 域	コロニー の 番 号	NH_4^+ 同化能 $\mu\text{g}\cdot\text{at.N}/\text{colony}/\text{時間}$
大島岡田沖	1	0.83×10^{-3}
	2	0.27
駿 河 湾	3	0.24
	4	0.17
	5	0.25
駿河湾口 ～下田	6	0.16
	7	0.31
	8	0.082
	9	0.13
	10	0.22
	11	0.088
	12	0.23
	13	0.61
	14	0.27
	15	0.18
	16	0.17

得られた excess atomic % から同化された窒素量を算出し、コロニーごとあるいはセルあたりの同化量を求めることができる。表7はその結果の一部をまとめたものである。自然界の試料は多くの場合、きわめて不均一であり、また藻類の生理状態も個々のセルごとに異なっている。このような微量試料を取り扱う方法の開発は自然界のような不均一系の細部を知るうえに役立つばかりでなく、実験室の ^{15}N トレーサー法の普及に伴い、ますます重要になってきている。

13. 生体内の窒素化合物中の ^{15}N 含量の測定

13.1 窒素固定系の研究例

この過程は生態系の窒素収支の面でとくに重要であり ^{15}N 法による最も多くの研究例がある。以前は Kjeldahl 法による全窒素の増減を測定する方法が採られていた。近年は ^{15}N 法に加えて、窒素固定能をもつ微生物が N_2 と化学形の類似している C_2H_2 を還元することを利用して、生じた C_2H_4 をガスクロマトグラフで測定する、いわゆるアセチレン還元法による窒素固定系の研究が著しく普及した。現在多くの研究者がアセチレンの還元能を指標として N_2 固定系の研究をしているが、窒素固定能を有する微生物の種類、

表8 *Serradella* nodule 中の窒素化合物の ^{15}N 分布³⁶⁾

化 合 物	Atomic excess % (^{15}N)				
	連続して系に $^{15}\text{N}_2$ 存在		最初の8分間のみ系に $^{15}\text{N}_2$ を入れる		
	$8\frac{1}{4}$	16	12	14	16 (分)
全 窒 素	0.058	0.118	0.053	0.053	0.051
ニンヒドリン-N	0.145	0.277	0.116	0.101	0.095
ア ン モ ニ ヤ	0.265	0.247	0.135	0.078	0.092
Aspartic acid	0.154	0.265	0.237	0.156	0.202
Glutamic acid	0.730	1.124	0.678	0.490	0.501
Serine	0.045	—	0.183	—	—
Threonine	0.041	—	—	0.053	0.022
Glycine	0.056	0.073	—	0.044	0.044
Asparagine	—	—	—	—	—
amino-N	0.023	0.052	0.026	—	0.042
amide-N	0.051	—	0.056	—	0.062
Alanine	0.139	0.298	0.181	0.187	0.155
Glutamine	—	—	—	—	—
amino-N	0.213	0.320	0.226	0.163	0.155
amide-N	0.280	—	0.163	0.171	—
Leucine	0.031	0.050	—	0.019	0.025
Phenylalanine	1.006	0.055	—	0.028	0.017
Arginine	—	0.012	—	0.047	0.026

生理状態によって必ずしも N_2 固定活性と C_2H_2 還元活性が一定の関係とならない難点があり、 ^{15}N 法による検討がさらに必要となってくると思われる。とくに固定された N_2 が生体内にはいったのちの経過に関する研究は ^{15}N をトレーサーとして使うことによって可能となる。

自然界における N_2 固定活性の測定は森林土壌²⁸⁾、湖²⁹⁾、熱帯水田³⁰⁾、砂漠³¹⁾、海洋³²⁾ などあらゆる場所で測定されている。いずれの測定でも気相の組成は空気とほぼ同じであるが、目的によっては酸素を Ar で置換する。これら測定法については Burris³³⁾ によって詳しくまとめられている。培養実験では、非共生窒素固定菌、藍藻、根粒菌による N_2 固定系の反応機構、中間代謝物の研究など多くの報告がある。そのなかでも Burris を中心とした一連の ^{15}N 法による研究が目をはく。かれらは *Azotobacter vinelandii* を材料とした、速度論的な仕事³⁴⁾、cell-free 系での研究³⁵⁾ など、この分野での先駆的な仕事をしている。Kennedy³⁶⁾ は *serradella* nodules についてパルスレーベル法により固定された ^{15}N の生体内での挙動に関する一連の研究を行った。 $^{30}N_2$ を短時間与えると最初に NH_4^+ 、つぎにグルタミン酸、グルタミンに ^{15}N が見出される。この事実から NH_4^+ が最初に形成される中間体であり、つぎにグルタミン酸とグルタミンが作られることを明らかにした (表 8)。

13.2 その他の例

トレーサー標識法の応用例に生体内物質の回転速度、プールサイズの決定がある。一例として反応

は定常状態と仮定する。いま反応系を乱さない程度少量の ^{15}B を加えると

$$\frac{dB}{dt} = k_1 A - k_2 B = 0$$

$$\frac{d\alpha B}{dt} = -k_2 \alpha B \quad (\alpha \text{ は } B \text{ 中の } ^{15}N \text{ atomic } \%)$$

%) が成立し、

$$\alpha = \alpha_0 e^{-(k_2/B)t} \quad \text{となる。}$$

したがって、 B を分離し、 ^{15}N 含量の時間変化を測定することにより、 B の回転時間 $B/k_1 A$ が求まる。このような手法により生体内のアミノ酸の動的状態、タンパクの半減期などの知見が得られる。Chayen ら³⁷⁾ は *Torulopsis utilis* を $^{15}NH_4^+$ を含む培地で生育し、タンパク合成の間、このイーストの酸可溶画分はターンオーバーされるが、核酸やタンパクはターンオ

ーバーされず、代謝の最終産物であることを明らかにした。

以上、 ^{15}N の利用については主として無機態窒素化合物の測定法とその応用例にしぼって述べた。放射性核種をトレーサーとして使う研究法は微生物学、生化学、医薬学の分野で著しく発展している。これらの分野で開発された手法は当然 ^{15}N トレーサー法にも応用できる場合が多い。

14. 自然界における窒素同位体の分布と同位体効果

^{15}N トレーサー法によって測定を行う場合結果は atomic excess % で表示される。この場合、基準として試料のもともとの ^{15}N 含量を同時に測定するが、種々の窒素化合物間で、この値がどの程度バラツいているかを知っておく必要がある。また非生物的、生物学的を問わずすべての化学反応では同位体ごとに若干反応速度が異なり、いわゆる同位体効果が生じる。したがってトレーサー法により精密測定する場合は、この影響を補正する必要がでてくる。この 2 点についての概略を知っておくことは ^{15}N 法を行う研究者にとって必要と思われるので以下に述べてみたい。

14.1 自然界における ^{15}N の分布

図17は現在まで報告された生物に関連する地球上の

図17 自然界における ^{15}N の分布³⁸⁾

窒素化合物の $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ * を著者がまとめたものである³⁸⁾。 $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ は空気中の窒素ガスを標準 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{N}_2, \text{air}} = 0.00\text{‰}$) にとった場合、 $-10 \sim +20\text{‰}$ ($-0.361 \sim 0.372$ atomic %) の範囲にある。 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 等々の試薬は空気中の N_2 を原料として製造されるため、これらの $\delta^{15}\text{N}$ は $-5 \sim 5\text{‰}$ と比較的空氣に近い値をもつ。ただし試薬びんによって値が異なるので使用のさいは注意する必要がある。図17はすべてのデータをまとめてしまったためその詳細がわかりにくい。以下に述べる3つの事実が見出され、これらの事実は自然界で生じる生物学的過程の窒素同位体効果と密接に関連している。

* 前号でも述べてあるが

$$\delta^{15}\text{N}\text{‰} = \left\{ \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{試料}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{空氣の窒素}}} - 1 \right\} \times 1000$$

$$2.74\text{‰} \div 0.00100 \text{ atomic \%}$$

1) 生物起源の窒素化合物は平均的にみて、空気中の窒素ガスの ^{15}N 含量より高くなっている。

2) 植物体中の全窒素の ^{15}N 含量は窒素源として使われる N_2 , NH_4^+ , NO_3^- などの種類によって異なる。この差はとくに海洋では明確である。

3) ^{15}N 含量は生態系のなかで、植物体 → 動物体 (たとえば植物プランクトン → 動物プランクトン → 魚) と食物連鎖に沿って高くなる傾向を示す。

表9には培養微生物による窒素同位体分別の測定結果を示す。表中の左行は各実験で基質として使われた

表9 培養微生物による窒素同位体分別³⁸⁾

基 質	生成物の $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ (基質 ao ‰)	使用した微生物
同 化		
NO_3^-	$-0.9 \sim -18.5$	} <i>Phaeodactylum</i> <i>tricornutum</i> <i>Chaetoceros</i> sp.
NO_2^-	$-1.4 \sim -4.0$	
NH_4^+	$-9.6 \sim +7.3$	
硝 化		
$\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$	$-5.4 \sim -21.1$	海洋性硝化細菌
有機物の分解	$0.0 \sim -2.3$	<i>Scenedesmus</i> sp.
硝酸還元 $\rightarrow \text{NO}_2^-$	$-5.0 \sim -29.0$	<i>Serratia marinorubra</i>
脱窒, $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	-30	Denitrifier
	$-14.4 \sim -20.7$	" (舞鶴湾)
	$-1.9 \sim -12.3$	" (浜名湖)
窒素固定	$-9.0 \sim +4.0$	<i>Azotobacter</i>
	$-1 \sim -3$	<i>Anabaena cylindrica</i>

窒素化合物を示し、生成物の $\delta^{15}\text{N}$ 値は基質の値を 0.0‰ としたときの $\delta^{15}\text{N}$ 値である。たとえば *Phaeodactylum* (沿岸性珪藻) による NO_3^- 同化のさいの $\delta^{15}\text{N}$ 値の最低は -18.5‰ であるが、これは NO_3^- 同化のさいの $^{14}\text{NO}_3^-$, $^{15}\text{NO}_3^-$ の見かけの速度比 $^{14}\text{k}/^{15}\text{k} \div 1.0185$ であることを意味する。同位体分別が生起する程度は微生物の生育生理条件によって異なるが、表8にあげた $\delta^{15}\text{N}$ 値の最低値は (最高の同位体分別係数を与える) 自然界において各代謝系で生起しうる同位体効果の範囲を意味すると考えてよい。

ここで生物起源の窒素化合物が空氣の窒素ガスより高い ^{15}N を示すに至った理由を考察してみる。生物圏と空氣中の N_2 との間の関係はつぎのように模式化できる。

上図のサイクルが繰り返されて定常状態に近づくとき $\delta^{15}\text{N}_{\text{生物圏}} > \delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ となる。

(数字は同位体分別係数)

表8から最大の窒素同位体分別は硝酸還元過程 (脱窒を含む) で起こることが示唆される。これに対して窒素固定での同位体分別はほとんど起こらないと考えてよい。閉鎖系で不可逆過程 ($A \rightarrow B$) の0次あるいは一次反応が起こる場合、反応物A、生成物Bの窒素同位体比 δ_A , δ_B と反応生成物のフラクション $f = (B_i/A_0)$ の間の関係は図18³⁹⁾ のようになる。図からも明ら

図18 閉鎖系 0 次あるいは一次反応における窒素同位体比の変化³⁹⁾

かなように見かけ上の分別係数 $\{(^{14}\text{N}/^{15}\text{N})_{B_t}/(^{14}\text{N}/^{15}\text{N})_{A_0}\}$ は $t=0$ で真の同位体分別係数 α ($\alpha=k_{14}/k_{15}$, k は反応速度定数) に一致し, A がすべて B になるまで反応が進んだとき ($f=1$) 見かけ上の同位体分別は起こらない。このことは自然界において窒素の同位体分別が起こるためにはその反応過程の α が大きくかつ基質が多量に存在することが必要となる。海洋の中深層には NO_3^- が $40 \mu\text{g at. N/l}$ あり, とくに東部熱帯海域の溶存窒素欠乏層では $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$ の過程が $\alpha=1.04$ の非常に大きな同位体分別を伴って進行している⁴¹⁾。つぎに N_2 が窒素源となっているような根粒をもつ陸上植物や熱帯・亜熱帯海域に赤潮をつくる海洋性藍藻の $\delta^{15}\text{N}$ 値は空気中の N_2 の $\delta^{15}\text{N}$ 値にほぼ等しく, 窒素固定系が駆動したときの α は 1,000 に近い。上記 2 つの代謝過程における同位体分別の差が地質年代を通して寄与し, 生物圏の ^{15}N 含量を空気中の窒素ガスより高くしたと説明される。

前述のうち第 2 の事実 ^{15}N トレーサー法による窒素要求性と同位体効果が密接に関連した結果である。海洋の高緯度域では冬期に海水の鉛直混合が盛んとなり, 下層から NO_3^- が供給される。夏期はこの NO_3^- は一次生産の窒素源として使われる。このとき, 有光層の NO_3^- は $20 \mu\text{g at. N/l} \rightarrow 10 \mu\text{g at. N/l}$ と約半

分が使われ, 植物プランクトンの $\delta^{15}\text{N}$ 値は約 4‰ となる。中低緯度域では冬期下層からの NO_3^- の供給がほとんどない。 ^{15}N トレーサー法によると低濃度 ($0.5 \mu\text{g at. N/l}$) の NH_4^+ が N 源として使われている。このような系では

を繰り返す, その結果, プランクトンの $\delta^{15}\text{N}$ は平均 8.6‰ と海洋の全窒素の平均値 (約 7‰) にほぼ等しい。

紅海, 南支那海, ベンガル湾, アマゾン河口域などの貧栄養海域では藍藻 *Trichodesmium* の赤潮が発生する。この赤潮は窒素固定活性が高く, 空気中の N_2 を固定することによって生物量がささえられている。このような海域ではプランクトンの $\delta^{15}\text{N}$ は $-1.7 \sim +0.5\text{‰}$ の範囲できわめて空気中の N_2 ガスの値に近づいている⁴⁰⁾。

食物連鎖と $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比の関係についての研究はまだまだ少ない。Gaebler ら⁴¹⁾によるとネズミに特定の餌を与えた場合, 必須でないアミノ酸 (可欠アミノ酸) に ^{15}N が濃縮される。

14.2 窒素同位体効果

化学反応における同位体の分別は 1) 同位体交換平衡, 2) 目的同位体元素の関与する化学結合が切れる化学反応で生じる。後者の場合一連の逐次反応ではこの切断過程が全反応系を律速するか, ほぼ同様な律速系が 2 つ以上あるときは, この過程の前に他の律速系がないという条件が必要となる。

NH_4^+ と NH_3 の同位体交換平衡が土壌中の NO_3^- の ^{15}N 含量を規定する例を以下に示す。Kreitler⁴²⁾ は米国テキサス州の土壌中の NO_3^- の $\delta^{15}\text{N}$ 値が図17に

図19 土壌中の NO_3^- の ^{15}N 含量⁴²⁾

示す2つのグループに分かれることを見出した。家畜を飼育している周辺では NO_3^- の $\delta^{15}\text{N}$ 値はつねに+11~15‰と高い値を示す。この原因としては家畜から排泄された尿素が次式のように分解し

生成した NH_4^+ が土壌の pH を上昇させ、反応

$$K=1.034$$

により、 NH_4^+ に比べて34‰軽い NH_3 が土壌から失

われることによると考えた。現場土壌を使ったモデル実験は上の事実を証明している。この NH_3 が逃げ、残りの ^{15}N 含量が高くなった NH_4^+ が NO_3^- に酸化され図19のようになると考えられる。

つぎに速度論的同位体効果の例として、硝酸還元をとりあげてみる。表10は Brown ら⁴³⁾が NaOH 溶液中で Fe(II) により NO_3^- , NO_2^- , NH_2OH を NH_4^+ に無機的に還元したときの窒素同位体分別係数を反応初期 ($f < 0.124$) に求めた結果である。いまこれらの化合物が還元されるとき最初の N-O 結合の切断が律速段階で、この段階のみが同位体効果に寄与すると

表10 NO_3^- , NO_2^- , NH_2OH 還元時の窒素同位体効果⁴³⁾

化 合 物	温 度 (°C)	測 定 数	f	$^{14}k/^{15}k$	
				実 験 値	計 算 値
NO_3^-	110	7	0.058~0.300	1.057	1.057
NO_2^-		18	0.048~0.500	1.029	1.029
NH_2OH		13	0.080~0.720	1.028	1.028
NO_3^-	25	11	0.032~0.232	1.075	1.075
NO_2^-		7	0.105~0.360	1.035	1.035
NH_2OH		3	0.075~0.124	1.032	1.032

考えると Bigeleisen-Wolfsberg⁴⁴⁾ の与えた式を使って同位体分別係数が算出できる。

$$^{14}k/^{15}k = \left[\frac{\left(\frac{1}{14} + \frac{1}{16} \right)}{\left(\frac{1}{15} + \frac{1}{16} \right)} \right]^{1/2} [1 + G(u_i) \Delta u_i]$$

ここで活性化状態では基質の N-O の振動が消失したと考えている。

$$u_i = hc\nu_i/kT, \quad u_{14i} = u_{15i} + \Delta u_i$$

$$G = \frac{1}{2} - \frac{1}{u} + \frac{1}{e^{u-1}}$$

よって

$$^{14}k/^{15}k = 1.0194 (1 + G(u_i) \Delta u_i)$$

この計算結果を表9に示してある。実験値と理論値は NO_3^- , NH_2OH の場合良く一致している。かれらは ^{15}N をトレーサーにを使って、 $\text{NO}_3^- \xrightarrow{k_{\text{NO}_3^-}} \text{NO}_2^- \xrightarrow{k_{\text{NO}_2^-}} \text{NH}_2\text{OH} \xrightarrow{k_{\text{NH}_2\text{OH}}} \text{NH}_4^+$ の速度定数を求め、 $k_{\text{NO}_2^-} > k_{\text{NH}_2\text{OH}} > k_{\text{NO}_3^-}$ の結果を得ている。 NO_2^- 還元における同位体効果が理論値と一致しない大きな理由は $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_4^+$ の反応で後者の段階が律速するためと結論される。

微生物による硝酸還元の場合には上記の無機化学的還元と異なり同位体効果は理論値よりも小さくなる(表9)。著者は珪藻 *Phaeodactylum tricornutum*

を基質の NO_3^- が大過剰の条件下で培養し、 NO_3^- 同化のさいの同位体分別係数は生育速度によって変わり、生育速度と $(\alpha-1)$ が反比例になることを見出している。この説明としてはつぎのようなことが考えられよう。増殖の対数期では、光強度を変えると生育速度が変化する。この時期には NO_3^- 還元系は定常状態となっているが、光による変化は硝酸還元酵素(NRase)のターンオーバーの速度、細胞内の NO_3^- 濃度 ($\text{NO}_3^-_{\text{cell}}$) が変わるためと考えられる。さらに同位体分別は NO_3^- の N-O 結合が切れるときにのみ起こると思われるので、 $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{cell-N}$ の反応は模式的に下記のように表される。見かけの窒素同位体分別係数 ($\alpha = (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{cell}} / (^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{NO}_3^-}$) は25°Cで、

$\alpha - 1 = \frac{75}{1000} \cdot X \cdot Y$ と表される。このことは同位体分別の大きさが逆反応の正反応に対する flux の比

(X, Y) によって規定されることを意味している。Y は微生物の生育状態によって大きく変動しないと考えられる。培地中の NO_3^- が $10^{-2}M$ と十分に高い場合 NO_3^- 培地 $\rightarrow \text{NO}_3^-_{\text{cell}}$ の量は各培養条件を通じて、ほぼ一定である。この場合、照射光が増大すると NO_3^- -NRase 量の増加 $\rightarrow \text{NO}_3^-_{\text{cell}}$ 減少 $\rightarrow X \approx 0$ となり、したがって α は 1 に近づく。つぎに照射光の強度を下げて生育速度が遅くなると、X は 1.00 に近づく。したがって同位体分別係数は Y の大きさで規定され、種々の微生物で 1.020~1.030 (表 9 参照) の値が得られている。

生体、全窒素の ^{15}N 含量はまず上記のような同化の初期過程で規定される。つぎにこれを素材として、アミノ酸、タンパクが作られ、これらの間に二次的な同位体分別が生じ、化合物ごとに ^{15}N 含量が若干変わってくる。

以上、この章では、著者の得意とする分野、経験に主点をおいて述べてみた。今後、 ^{15}N 法を行う方々に、本講座が役立つことを願っている。

文 献

- 16) Dugdale, R.C. and J.J. Goering: *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 196—206 (1967)
- 17) Hattori, A. and E. Wada: Assimilation and oxidation-reduction of inorganic nitrogen in the North Pacific Ocean. 'Oceanography of the Bering Sea, 149—62, Univ. of Alaska (1974)
- 18) 辻 堯: 海洋の鞭毛藻による窒素化合物同化活性, 微生物の生態, **3**, 57—71, 東京大学出版会 (1976)
- 19) Wood, E.D., F.A. Armstrong and F.A. Richards: *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **47**, 23—31 (1967)
- 20) Wada, E. and A. Hattori: *Anal. Chim. Acta*, **56**, 233—40 (1971)
- 21) Miyazaki, T., E. Wada and A. Hattori: Nitrite production from ammonia and nitrate in the euphotic layer of the Western North Pacific Ocean. *Mar. Sci. Comm.*, **1**(6)381—94 (1975)
- 22) Hauck, R.D. and D.R. Bouldin: *Nature*, **191**, 871—72 (1961)
- 23) Koike, I., E. Wada, T. Tsuji and A. Hattori: *Arch. Hydrobiol.*, **69**, 508—20 (1972)
- 24) Delwiche, C.C.: *J. Bacteriol.*, **77**, 55—59 (1959)
- 25) Marshall, R.O., H.J. Dishburger, R. MacVicar, G.D. Hallmark: *ibid.*, **66**, 254—58 (1963)
- 26) Nommik, H.: *Acta Agr. Scand.*, **7**, 389—94 (1957)
- 27) 和田英太郎, 蓮本造志: 藍藻 *Trichodesmium* のコロニーごとのアンモニア同化能, 1974年春季海洋学会
- 28) Hüser, R.: Microbial N fixation in forest soils. Communication from the Bavarian State Forest Association, No. **31**. 3—11 (1965)
- 29) Dugdale, V.A., R.C. Dugdale: *Limnol. Oceanogr.*, **7**, 170—77 (1962)
- 30) MacRae, I.C. and T.F. Castro: *Soil Sci.*, **103**, 277—80 (1967)
- 31) Mayland, H.F. and T.H. McIntosh: *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **30**, 606—09 (1966)
- 32) Stewart, W.D.P.: *J. Gen. Microbiol.*, **36**, 415—22 (1964)
- 33) Burris, R.H. and Wilson, R.W.: Method for measurement of nitrogen fixation. 'Method in Enzymology', V. **7**, New York, Academic Press, 355—66 (1957)
- 34) Allison, R.M. and Burris, R.H.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 351—64 (1957)
- 35) Burma, D.P. and Burris, R.H.: *ibid.*, **225**, 723—33 (1957)
- 36) Kennedy, I.R.: *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 295—303 (1966)
- 37) Chayen, R., J. Chayen and E.R. Roberts: *ibid.*, **31**, 186—94 (1959)
- 38) Wada, E., T. Kadonaga and S. Matsuo: *Geochem. J.*, **9**, 139—48 (1975)
- 39) Miyake, Y. and E. Wada: *Rec. Oceanogr. Works Japan*, **9**, 37—53 (1967)
- 40) Wada, E. and A. Hattori: *Geochim. Cosmochim. Acta*, **40**, 249—51 (1976)
- 41) Gaebler, O.H., T.G. Vitti and R. Vukmirovich: *Canad. J. Biochem.*, **44**, 1249—57 (1966)
- 42) Kreitler, C.W.: Determining the source of

- nitrate in ground water by nitrogen isotope studies. Bureau of Economic Geology, Univ. Texas Report of Investigations No. 83
- 43) Brown, L.L. and J.S. Drury: *J. Chem. Phys.*, **46**, 2883—37 (1967)
- 44) Bigeleisen, J. and M. Wolfsberg: Theoretical and experimental aspects of isotope effects in chemical kinetics. *Adv. Chem. Phys.*, **1**, 15-76, ed. I. Prigogine, Interscience Publ., N.Y. (1958)
-