

## アミノ酸の窒素同位体比が開く世界

大河内 直彦  
(海洋研究開発機構)

窒素同位体比は、多様な生き物が織りなす食物網の解析に広く用いられてきました。これは、「食う－食われる」の関係によって、窒素同位体比が3～4%上昇するというよく知られた知見が基礎となっています。生き物の窒素の多くは20種類のアミノ酸の窒素ですから、個々のアミノ酸の窒素同位体比を測れば、さらに詳細な知見を得ることができます。ここではそんな研究を紹介したいと思います。

20種類のアミノ酸の中でも、生き物の食物網を知るためには特にグルタミン酸とフェニルアラニンが役に立つことがわかっています。動物にとってグルタミン酸は非必須アミノ酸（体内で合成できるアミノ酸）ですが、多くの場合自ら合成することはなく、食物に含まれるグルタミン酸をそのまま利用しています。グルタミン酸は、動物の体内でアミノ基（ $-NH_2$ ）が脱離してケト酸（ $\alpha$ -ケトグルタル酸）に代謝され、その時に窒素同位体が分別します。これによって、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平均8.0%規則的に高くなります。

一方、フェニルアラニンの代謝ではアミノ基の脱離はほとんど起きず、水酸基（ $-OH$ ）が付加されてチロシンになります。アミノ基が関わらないこの代謝では、窒素同位体の分別は原理的に起こりません。したがって、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となります。実際、さまざまな生物について詳しく調べた結果、被食者から捕食者への同位体比の上昇は、平均するとわずか0.4%にすぎないことがわかっています。さらにほとんどの動物にとってフェニルアラニンは必須アミノ酸（体内で合成できないアミノ酸）ですから、それはすべ

て食物に由来しています。つまり高次の捕食者といえども、それがもつフェニルアラニンの窒素同位体比は、生態系の基盤をなす樹木や藻類などの植物（独立栄養生物）の同位体比に近い値をもちます。

さらに興味深いことに、そういった植物についてグルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比を比べると、非常に安定した関係性がみられます。つまり、前者が後者より、水域の植物では平均3.4%高く、陸域の植物では平均8.4%低いという生物種に依存しない関係です。上に述べたことを示したのが図1で、栄養段階とそれぞれのアミノ酸の窒素同位体比とを関連づける数式は以下ようになります（Chikaraishi et al., 2009, 2014）。

（水域生物）

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

（陸域生物）

$$\text{栄養段階} = (\delta^{15}N_{\text{Glu}} - \delta^{15}N_{\text{Phe}} + 8.4) / 7.6 + 1$$

ちなみに栄養段階とは、植物プランクトンなどの独立栄養生物が1、それを食べる植食者が2、植食者だけを食べる動物が3という数値です。多様な生き物を捕食することによって小数点以下の数値もありえます。重要なことは、生き物の栄養段階がグルタミン酸とフェニルアラニンの「窒素同位体比の差」の単純な一次関数として表せることです。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ことが、従来法と比べた長所の一つです。栄養段階の推定誤差は、理論上0.1程度であることがわかっています。

これまでの研究は、この手法がほとんどの生態系について成り立つことを示唆してきました

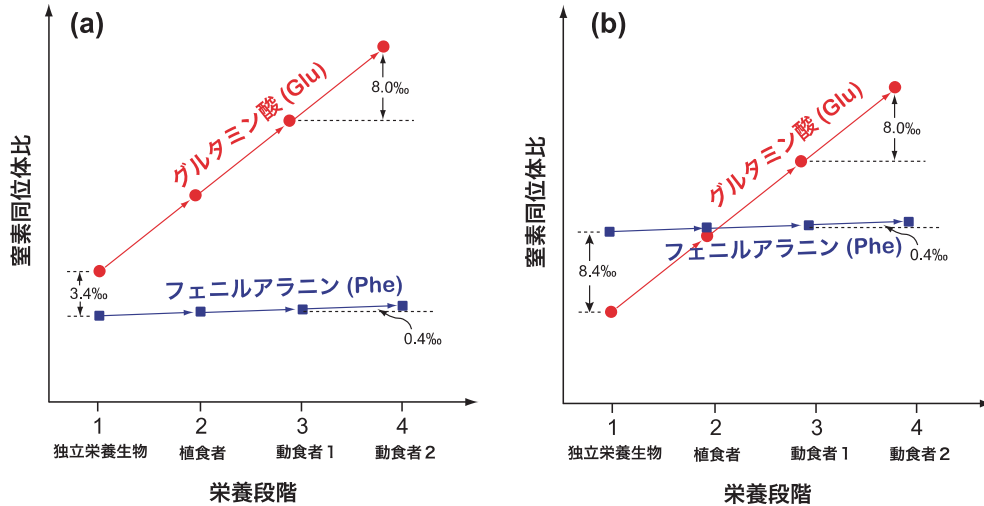


図1. グルタミン酸 (Glu) とフェニルアラニン (Phe) の窒素同位体比を用いて、(a) 水域に暮らす生き物と (b) 陸域に暮らす生き物の栄養段階を推定する方法の原理 (Chikaraishi et al., 2009, 2014 を改変)。

(Ohkouchi et al., 2017)。この新しい方法の応用例について以下に紹介します。

### 東北沖の底魚の例

世界有数の漁場の一つとして知られる東北沖で採取された底魚類、つまり海底および海底付近を主な生活場にする多様な生き物の栄養段階を推定した結果を図2に示します (Ohkouchi et al., 2016)。ここで示した25種の生物の栄養段階は2.6から4.5まで分布することがわかります。同じカレイ目

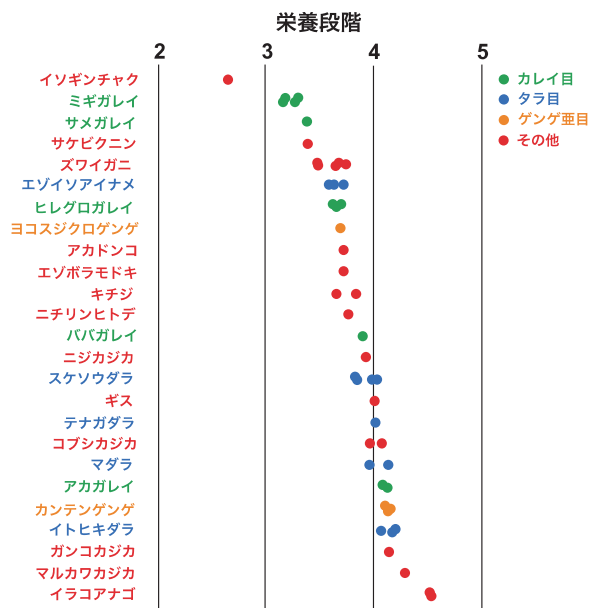


図2. 東北沖で採取された生き物の栄養段階 (Ohkouchi et al., 2016 を改変)。

もミギガレイは平均3.2であるのに対し、アカガレイは4.1程度でかなり異なるようです。また蒲鉾の材料になるスケソウダラの栄養段階は平均3.9、蒲焼きにして食されるイラコアナゴの栄養段階は最も高い4.5であることがわかります。

このように、直接観察することの難しい深海に暮らす魚の食性を垣間見ることができます。しかし生き物の栄養段階を明らかにすることの面白さは、他の現象と重ねて考えることによってさらに引き立てられます。次に、そういった例について見ていきましょう。

### 環境変化が生き物の食性に及ぼす影響：琵琶湖のイサザの例

よく知られているように、琵琶湖では高度成長期に富栄養化が進行しました。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ます。60年代から70年代にかけて、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りました。こういった水質汚染と、それにブルーギルやブラックバスなど移入種の増加によって、プランクトン種や魚種が大きく入れ替わりました。そんな環境変化が生態系や生き物の食性にどのような影響を及ぼしてきたのでしょうか？ そんな問いに答えるべく、ハゼ科魚類のイサザを用いた研

究を紹介します。

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、ホルマリン固定されて保存されてきました。このホルマリン固定ではアミノ酸の窒素同位体比は変質しないので、こういった試料を用いることにより過去の生態系情報を保持しているはずです。

京都大学がもつ膨大なアーカイブ試料の中から選び出されたほぼ同じ体長をもつ1歳魚のイサザのアミノ酸窒素同位体比を図3に示しました(Ogawa et al., 2013)。それによると、20世紀を通してイサザの栄養段階は3.2～3.3の横ばいでほとんど変化していません。つまり富栄養化は進んだものの、イサザの食糧の平均的な栄養段階は2.2～2.3で変わらず、主に動物プランクトンやヨコエビなどを食し続けてきたと推定されます。環境と生態系が大きく変化したのですが、それに伴って代替種を食べることで適応してきたのでしょう。食物連鎖の中における機能という意味ではあまり変わらなかったと言うこともできそうです。

わが国の湖沼において環境汚染が顕著に進行し

たのは、高度成長期のことが多いですから、環境変化が生態系に及ぼす影響を知るには、過去の記録を読むことが重要になります。その一方で全国各地の博物館や大学などには、琵琶湖のイサザのようにホルマリン固定試料として膨大な数の試料が保存されています。そういった保存試料の解析が進めば、環境変化が生態系に及ぼしてきた影響が、これまで以上に明らかになってくるでしょう。

### 縄文人の食性解析

有機物の塊である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います。しかし、生物が作り出す硬組織中には、長期にわたって有機物が保存されます。実際、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）といった硬組織中に含まれるアミノ酸を抽出して窒素同位体比を測定すると、その生物の食性を復元することができることが知られています。ここでは、私たちが東京大学と共同で行った、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ましょう。

図4は、内陸である長野県の栃原岩陰遺跡、北村遺跡（それぞれ縄文時代早期、後期）で見出された縄文人骨と、北海道の沿岸域の北黄金貝塚（縄文時代前期～中期）で見出された縄文人骨から抽出したコラーゲン中のアミノ酸の窒素同位体比を示したものです(Naito et al., 2010, 2013)。内陸部の縄文人は、同所で発見される動物と同一の生態系に属し、その栄養段階が平均すると2.7程度であることがわかります。つまり彼らのタンパク源の少なくとも7割程度が、化石として残されているシカなどの草食動物から来ていたことを示唆しています。それに対し、沿岸域に住む当時の縄文人のタンパク源は、海洋生態系に大きく偏っていたことがわかります（タンパク源の8割程度）。海陸両方のタンパク源に依存するこのようなケースでは、その栄養段階を一義的に決めることは理論上できませんが、図4からは海からくるタンパ

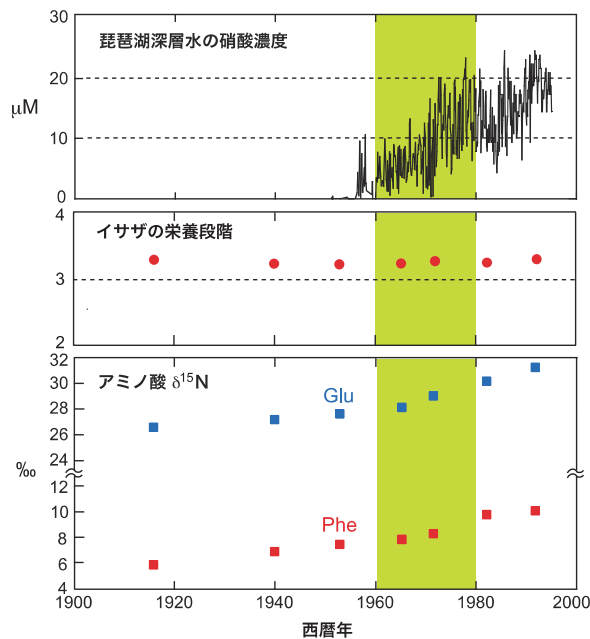


図3. 20世紀における琵琶湖(北湖)の深層における(上)硝酸濃度の変化、(中)イサザの栄養段階の変化、(下)グルタミン酸とフェニルアラニンの窒素同位体比の変化(Ogawa et al., 2013を改変)。

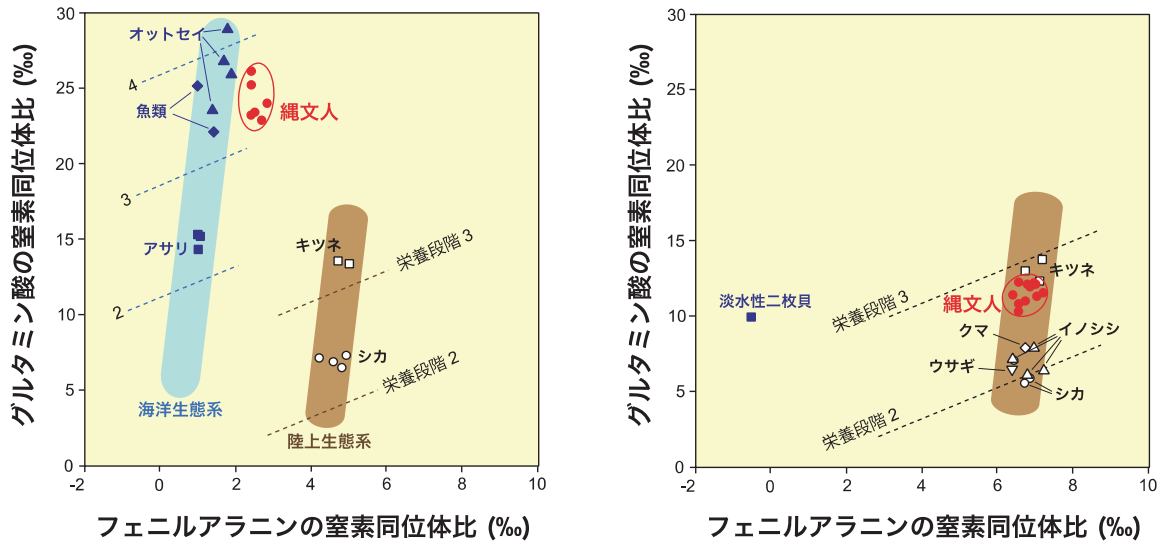


図4. 縄文人の食性解析へ応用した例。(左)北海道沿岸域にある北黄金貝塚から得られた骨や貝試料の分析結果(Naito et al., 2010 を改変)。(右)内陸の栃原岩陰遺跡と北村遺跡から得られた骨や貝試料の分析結果(Naito et al., 2013 を改変)

ク源がホタテの栄養段階 (~2.4) よりもいくらか高かったことが予想され、高次捕食者である魚類やオットセイなどをかなり口にしていただであろうことも窺えます。

#### おわりに

このようにアミノ酸の窒素同位体比は、生き物の食性に関する多様な研究のツールになり、さまざまな分野で少しずつ応用され始めています。ここでは述べませんでした、フェニルアラニンの窒素同位体比が植物、ひいてはその栄養源となる硝酸やアンモニアなどの窒素同位体比に大きく左右されることを用いて、生物が生息していた環境場の復元や移動経路の追跡にも応用できます。たとえば、サケの骨に記録された同位体記録を用いて回遊ルートの推定などが行われています(Matsubayashi et al., 2020)。

さらにここで紹介した方法論は、微生物が関わる系でも基本的に成り立つことがわかっています。つまり、生食連鎖の裏側ともいべき腐食連鎖でも、アミノ酸の窒素同位体比を用いた栄養段階推定法は原理的に威力を発揮します(Yamaguchi et al., 2017)。このようにアミノ酸の窒素同位体比は、自然界における生き物の暮らし

を知る貴重なツールになるのです。

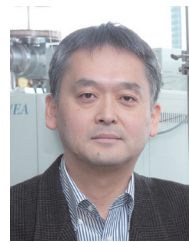
#### 文献

- Chikaraishi Y, Ogawa NO, Kashiyama Y, Takano Y, Suga H, Tomitani A, Miyashita H, Kitazato H, Ohkouchi N (2009) Elucidation of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography, Method 7*: 740-750. <https://doi.org/10.4319/lom.2009.7.740>
- Chikaraishi Y, Steffan SA, Ogawa NO, Ishikawa NF, Sasaki Y, Tsuchiya M, Ohkouchi N (2014) High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecology and Evolution 4*: 2423-2449. <https://doi.org/10.1002/ece3.1103>
- Matsubayashi J, Osada Y, Tadokoro K, Abe Y, Yamaguchi A, Shirai K, Honda K, Yoshikawa C, Ogawa NO, Ohkouchi N, Nagata T, Naito YI, Miyamoto H, Nishio S, Tayasu I (2020) Tracking long-distance ocean migration of marine fishes using compound-specific stable isotope analysis of



- amino acids. *Ecology Letters* 23: 881–890.  
<https://doi.org/10.1111/ele.13496>
- Naito Y, Honch N, Chikaraishi Y, Ohkouchi N, Yoneda M (2010) Quantitative evaluation of marine protein contribution in ancient diets based on nitrogen isotope ratios of individual amino acids in bone collagen: An investigation at the Kitakogane Jomon site. *American Journal of Physical Archaeology* 143: 31–40.  
<https://doi.org/10.1002/ajpa.21287>
- Naito Y, Chikaraishi Y, Ohkouchi N, Yoneda M (2013) Evaluation of carnivory in inland Jomon hunter-gatherers based on nitrogen isotope ratios of individual amino acids in bone collagen. *Journal of Archaeological Science* 40: 2913–2923.  
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2013.03.012>
- Ohkouchi N, Shibata H, Nomaki H, Ogawa NO, Chikaraishi Y, Goto T, Fujikura K, Kitazato H (2016) A monitoring result of polychlorinated biphenyls (PCBs) in deep-sea organisms and sediments off Tohoku during 2012–2014: temporal variation and the relationship with the trophic position. *Journal of Oceanography* 72: 629–639.  
<https://doi.org/10.1007/s10872-016-0359-z>
- Ohkouchi N, Chikaraishi Y, Close HG, Fry B, Larsen T, Madigan DJ, McCarthy MD, McMahon KW, Nagata T, Naito YI, Ogawa NO, Popp BN, Steffan S, Takano Y, Tayasu I, Wyatt ASJ, Yamaguchi YT, Yokoyama Y (2017) Progresses and challenges with the use of amino acid nitrogen isotopic compositions in ecological and biogeochemical studies. *Organic Geochemistry* 113: 150–174.  
<https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.07.009>
- Ogawa NO, Chikaraishi Y, 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. *Ecological Research* 28: 697–702.  
<https://doi.org/10.1007/s11284-012-0967-z>
- Yamaguchi Y, Chikaraishi Y, Takano Y, Ogawa NO, Imachi H, Yokoyama Y, Ohkouchi N (2017) Fractionation of nitrogen isotopes during amino acid metabolism in heterotrophic and chemolithoautotrophic microbes across Eukarya, Bacteria and Archaea: Effects of nitrogen sources and metabolic pathways. *Organic Geochemistry* 111: 101–112.  
<https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.04.004>

#### 著者情報



大河内直彦（海洋研究開発機構海洋機能利用部門部門長）1995年東京大学大学院理学系研究科修士、博士（理学）。京都大学生態学研究センター研修員、北海道大学助教、ウッズホール海洋研究所ポストドクトラルフェロー、固体地球統合フロンティア研究システム研究員などを経て、2019年より現職。

（2022年3月31日掲載）