

総説

アミノ酸の窒素同位体比を用いた生物の栄養段階の解析：
陸上環境を含めた生物生態系の解明に向けて*

力石 嘉人**・高野 淑識**・小川 奈々子**・佐々木 瑤子**・
土屋 正史**・大河内 直彦**

(2011年3月22日受付, 2011年4月15日受理)

Abstract

Recent evidences have suggested that compound-specific stable isotope analysis (CSIA) of amino acids has been employed as a new powerful method with that enables the estimation of trophic level of organisms in not only aquatic but also terrestrial food webs. This CSIA approach is based on contrasting the ^{15}N -enrichment with each trophic level between two common amino acids: glutamic acid shows significant enrichment of +8.0‰ with each trophic level, whereas phenylalanine shows little enrichment of +0.4‰. These ^{15}N -enrichments are well consistent in both aquatic and terrestrial organisms. The trophic level of organisms can be estimated within a small error as $1\sigma=0.12$ for aquatic and 0.17 for terrestrial food webs, employing the eq.: [Trophic level] = $(\delta^{15}\text{N}_{\text{glutamic acid}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{phenylalanine}} + \beta)/7.6 + 1$, where β represents the isotopic difference between these two amino acids in primary producers (-3.4‰ for aquatic cyanobacteria and algae, +8.4‰ for terrestrial C3 higher plants, and -0.4‰ for terrestrial C4 higher plants). Here, we briefly review this new method (i.e. CSIA of amino acids) and its application to natural organisms in terrestrial environments.

1. 全試料 (bulk) からアミノ酸へ

植物プランクトン (一次生産者) を「1」として、それを食べる動物プランクトン (一次消費者) を「2」、その動物プランクトンを食べる小さい魚 (二次消費者) を「3」、その小さい魚を食べる大きい魚 (三次消費者) を「4」とする「栄養段階 (Trophic level)」という概念を用いることで、被食-捕食の関係が極めて複雑に絡み合う自然界の食物網においても、生物の生態系ピラミッドの中での位置を、シンプルに理解しやすい定量的な数

字として捉えることができる。例えば、ある生物の栄養段階が「3.3」であれば、1つの可能性として、70%は栄養段階「2.0」の動物プランクトンを食べ、30%は栄養段階「3.0」の魚を食べたと理解できる。また反対に、30%は栄養段階「2.0」の動物プランクトンを食べ、70%は栄養段階「3.0」の魚を食べた生物であれば、その栄養段階は「3.7」となる。

従来、この栄養段階を見積もる中心的な手法として、生物の安定窒素同位体比が用いられてきた。これは、被食-捕食を通して、生物全体

*Food chain analysis by nitrogen isotopic composition of amino acids: Application to terrestrial environments

**独立行政法人海洋研究開発機構, 海洋・極限環境生物圏領域 〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15
Yoshito Chikaraishi, Yoshinori Takano, Nanako O. Ogawa, Yoko Sasaki, Masashi Tsuchiya, Naohiko Ohkouchi:
Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka,
237-0061, Japan
e-mail: ychikaraishi@jamstec.go.jp Tel: 046-867-9778; Fax: 046-867-9775

(bulk) の窒素同位体比が3.4‰上昇することを利用したものであり (Fig. 1), 栄養段階を知りたい生物とその生物が属する生態系の一次生産者の双方の窒素同位体比を求め、以下の式により栄養段階 (TL_{bulk}) を推定する (式 1, Minagawa and Wada, 1984)。

$$TL_{\text{bulk}} = [(\delta^{15}\text{N}_{\text{organism of interest}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{primary producer}}) / 3.4] + 1 \quad (\text{式 1})$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{organism of interest}}$ は研究対象の生物の窒素同位体比を、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{primary producer}}$ は研究対象の生態系の一次生産者の窒素同位体比を表す。2000年代に入ると、この原理をさらに発展させ、生物に含まれるアミノ酸の窒素同位体比から、栄養段階を非常に高精度に見積もる手法が提案された (McClelland and Montoya, 2002; Chikaraishi et al., 2007; Popp et al., 2007; 力石ら, 2007, 2010)。これは、被食-捕食を通して、捕食者のアミノ酸の窒素同位体比が餌に対して、フェニルアラニンで約0.4‰、グルタミン酸で約8.0‰上昇することを利用したものである (Fig. 2)。実際に、例えば、海水・淡水を問わず水棲の生物においては、グルタミン酸 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}}$) とフェニルアラニン ($\delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}}$) の同位体比と栄養段階 (TL_{Glu/Phe}) の関係は式 2 で与えられ、

$$TL_{\text{Glu/Phe}} = [(\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6] + 1 \quad (\text{式 2})$$

生物の栄養段階を $1\sigma=0.12$ という非常に良い精度で見積もることができる (Chikaraishi et al., 2009)。このアミノ酸を用いた手法 (以下、アミノ酸法と呼ぶ) は、単に精度が良いというだけではなく、

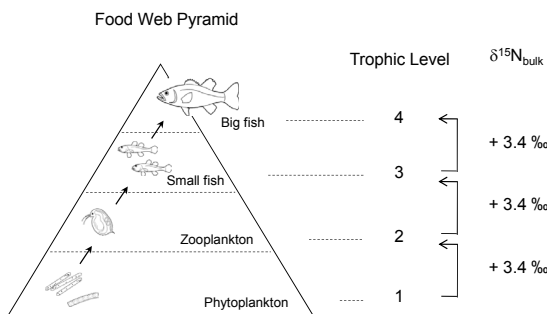


Fig. 1. Relationship between the trophic level (TL) and $\delta^{15}\text{N}$ values of bulk organisms (after Minagawa and Wada, 1984).

生物の栄養段階を推定するうえで一次生産者の同位体比の情報を必要しない、言い換えれば、これまでの生物全体の同位体比分析法 (以下、bulk法と呼ぶ) で悩みの種であった一次生産者の窒素同位体比のバリエーションに全く左右されずに、研究対象の生物に含まれる2つのアミノ酸の同位体比を見るだけで栄養段階を推定することができるという点で本質的に優れている。また、bulk法とは異なり、試料に含まれるマトリックスの影響を受けないため、ホルマリン固定試料や軟体動物の殻体 (炭酸カルシウム)・脊椎動物の骨・歯 (リン酸カルシウム) などの生物硬組織、さらには土壤や堆積物といった環境試料にも適用できる (小川ら, 未発表)。これは従来、一次生産者の窒素同位体比の復元が難しかったために研究が進まなかった過去の生態系解析や、それに基づく環境変動の復元などの研究に、また、土壤や堆積物における腐食連鎖の研究などにも本手法が利用できることを示唆する。

この手法の登場により、生物の栄養段階の見積り精度は格段に向上した (Fig. 3a)。天然の生物は、多様な窒素同位体比を持つ一次生産者を起点とする生態系に属している。それが、従来のbulk法において栄養段階の推定を難しくする、または精度を著しく低下させる一因であった。しかし、アミノ酸の窒素同位体比 (式 2) により導かれた栄養段階 (TL_{Glu/Phe}) は、研究対象の生物に含まれるグルタミン酸とフェニルアラニンの同位体比の

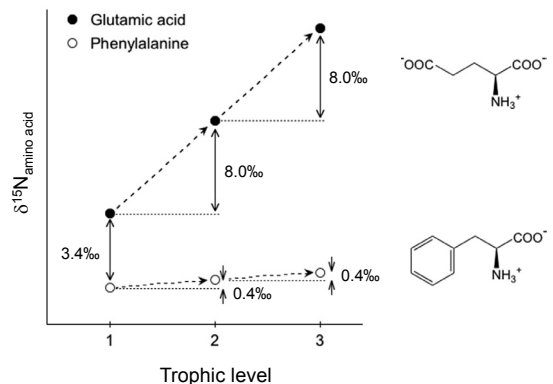


Fig. 2. Relationship between the trophic level (TL) and $\delta^{15}\text{N}$ values of amino acids for aquatic ecosystems (Chikaraishi et al., 2009, 2010).

差を測るので、そのような一次生産者の同位体比のバラツキには左右されず、シアノバクテリア、植物プランクトン、海藻などの一次生産者が「1」、動物プランクトンや貝などの一次消費者が「2」と、生物学的な知見にぴったり一致する。また、カニが「2.5」前後、魚が「3~4」、サメが「4後半」というように、雑食者や高次消費者の栄養段階も生物学的な知見と一致する。

2. アミノ酸法の基本原理

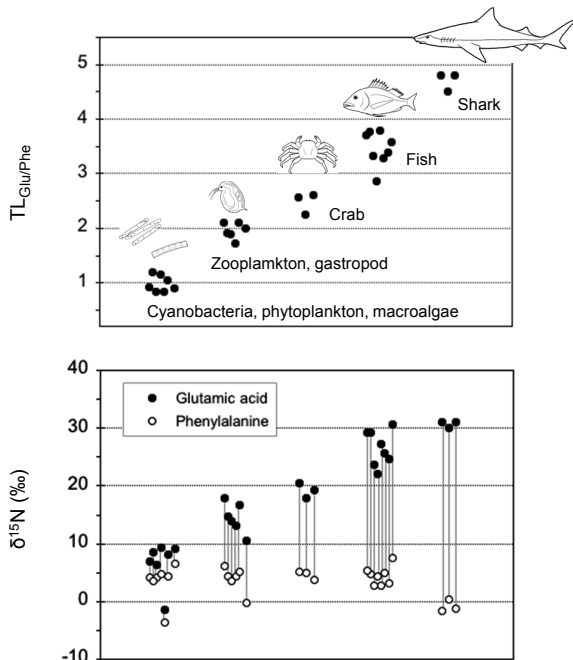
生体に含まれるアミノ酸には、食物連鎖に伴い窒素同位体比がほとんど変化しないメチオニン、フェニルアラニンなどの「Source アミノ酸」と、窒素同位体比が上昇するアラニン、バリン、イソロイシン、プロリン、グルタミン酸などの「Trophic アミノ酸」の2グループがある (McClelland and

Montoya, 2002)。前者は代謝の最初の反応にアミノ基 (窒素) が関わらないため同位体分別を示さず、一方で、後者は代謝の最初の反応がアミノ基の脱離反応であるために同位体分別が起こると考えられている (Chikaraishi et al., 2007)。従って、一次生産者も含めてどの栄養段階の生物であっても、その生物に含まれる両者のアミノ酸の窒素同位体比を比較することで、以下の一般式より (式3) 栄養段階 ($TL_{\text{trophic/source}}$) を推定することができる (Chikaraishi et al., 2009)。

$$TL_{\text{trophic/source}} = [(\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{source}} + \beta) / (\Delta_{\text{trophic}} - \Delta_{\text{source}})] + 1 \quad (\text{式 } 3)$$

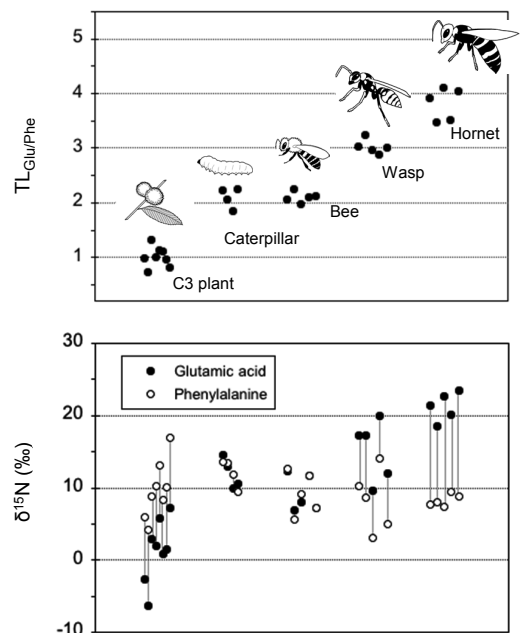
「 $\delta^{15}\text{N}_{\text{source}}$ 」、 「 $\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}}$ 」は、それぞれ Source アミノ酸と、 Trophic アミノ酸の同位体比を、 「 β 」は一次生産者における両者のアミノ酸の同位体比の差

(a) Aquatic food web



$$TL_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1$$

(b) Terrestrial C3 food web



$$TL_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} + 8.4) / 7.6 + 1$$

Fig. 3. $\delta^{15}\text{N}$ values of glutamic acid (Glu) and phenylalanine (Phe), and the $TL_{\text{Glu/Phe}}$ values in natural organisms: (a) aquatic food web, (b) terrestrial C3 food web (after Chikaraishi et al., 2007; McCarthy et al., 2007; Popp et al., 2007; Chikaraishi et al., 2009, 2010, 2011)

を、「 Δ_{source} 」, 「 Δ_{trophic} 」は、両者のアミノ酸の食物連鎖に伴う同位体比の上昇値を示す。原理的には、「 $\delta^{15}\text{N}_{\text{source}}$ 」, 「 $\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}}$ 」には様々なアミノ酸を用いることができるが、式3の各項の生物間でのバラツキを考慮すると、Source アミノ酸にフェニルアラニン、Trophic アミノ酸にグルタミン酸を用いた場合(式2)に、最も優れた精度($1\sigma=0.12$)で栄養段階を求めることができる(Chikaraishi et al., 2009; 力石ら, 2010)。

3. 海から陸へ

アミノ酸を用いた手法が、海洋や湖沼の水棲生物の研究室で作られたものであったことと、初期に試分析された陸上植物の結果がシアノバクテリアや植物プランクトンなどの水棲の一次生産者のそれとは異なっていたこと(力石ら, 2007)などが重なり、陸上生物への本手法の利用は、水棲生物へのそれに比べて遅れた。しかし、最近の積極的な研究(Lorrain et al., 2009; Chikaraishi et al., 2010; Naito et al., 2010; Chikaraishi et al., 2011)により、以下のことがわかってきた。

1. 式3の「 β 」は、C3植物で+8.4%、C4植物で-0.4%である(シアノバクテリアや植物プランクトンなどの水棲の一次生産者は-3.4%)。
2. 被食-捕食を通じたアミノ酸の窒素同位体比の変動(^{15}N の濃縮)は、水棲生物のものと全く同じである(グルタミン酸で+8.0%、フェニルアラニンで+0.4%)。
3. 見積られる栄養段階の誤差は、 $1\sigma=0.17$ である(水棲生物では、 $1\sigma=0.12$)。

これらの知見は、アミノ酸を用いた栄養段階推定法が水陸を問わず全く同じ原理で利用できることを示している。

実際に、C3植物を起点とした生態系に属するとわかっている生物について、「 $\beta=+8.4$ 」として本手法を適用すると、一次生産者であるC3植物(葉)が「1」、青虫やミツバチなどの一次消費者が「2」と、それらを食べるアシナガバチが「3」、さらにスズメバチが「3~4」と、植物からや高次消費者に至るまでの全ての生物で、生物学的な知見とぴったり一致する(Fig. 3b)。また同様に、主にトウモロコシ(C4植物)を餌として育ったニワトリ

の卵の栄養段階は、「 $\beta=-0.4$ 」で計算すると、ちょうど「2.0」になる(力石ら, 未発表)。

陸上の生態学研究において、安定同位体比を用いた栄養段階解析がなかなか進まない1つの理由に、生態系の基点となる植物の窒素同位体比のバリエーションが非常に大きい(ときには、20%にもなる)、すなわち、bulk法ではそれを無視して3.4%の同位体比の変化を捉えることが非常に難しい、ことがあげられる。例えば、Fig. 4に示すように、アシナガバチの1つの巣から得られた卵、幼虫、サナギ、成虫のbulkの窒素同位体比は、卵から成虫へと、低くなっている(卵と比べれば、成虫は約5%低い)。これはサナギ化~変態における栄養段階の低下を示すのであろうか? しかし実際は、周辺で採取された植物の同位体比のバリエーションが10%以上あることを考慮すると、この卵から成虫への5%の変化がサナギ化~変態に由来するものなのかを議論することは非常に難しくなってしまう。このような事例について、アミノ酸を用いた栄養段階推定法は大いに力を発揮する。Fig. 4では、グルタミン酸やフェニ

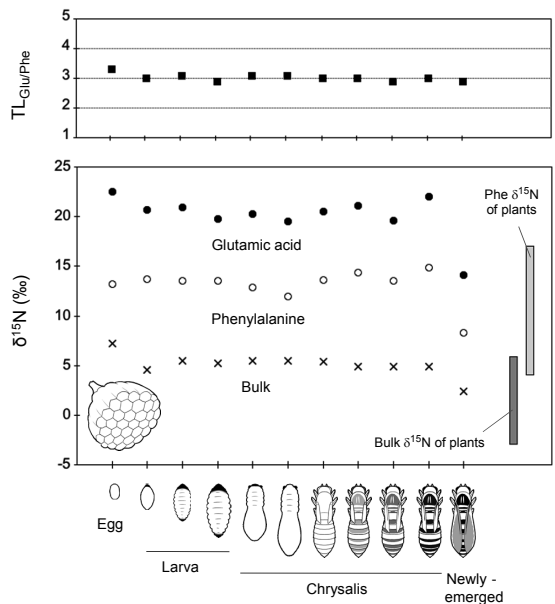


Fig. 4. Change in $\delta^{15}\text{N}$ values of bulk, glutamic acid (Glu), and phenylalanine (Phe), and the $TL_{\text{Glu/Phe}}$ values for the wasp *P. rotheyi* during metamorphosis (after Chikaraishi et al., 2011).

ルアラニンの同位体比も、bulkのそれと同じような（およそパラレルの）変動を示す。一方で、ハチのフェニルアラニンの同位体比の変動は、植物のそのバリエーションの中に完全に収まり、またアミノ酸の同位体比により見積もられた栄養段階（ $TL_{Glu/Pha}$ ）は、全ての期間を通じてほぼ「3」である。これはすなわち、bulkやアミノ酸（グルタミン酸、フェニルアラニン）で見られた同位体比のバリエーションは、主に餌の同位体比のバリエーションに由来するものであり、サナギ化～変態を経て栄養段階は変化しない（サナギ化～変態が、アミノ酸の同位体比を変化させない）ことを明示する。

このように、アミノ酸を用いた手法は、bulk法に比べて、(1) 栄養段階の見積りに一次生産者の情報を必要としない、すなわち、一次生産者の同位体比のバリエーションに影響されない、(2) 得られる栄養段階の精度が格段に高い、(3) ホルマリン固定試料、骨や殻に含まれるアミノ酸にも利用できる、という優れた長所があり（Chikaraishi et al., 2009, 2010; 力石ら, 2010; 小川ら, 未発表）、bulk法に替わる新しい手法として今後の幅広い利用が大いに期待されている。水棲生物で用いられる同位体比と栄養段階の関係式（式2）を、陸上環境にそのまま適用することはできないが、アミノ酸を用いた栄養段階推定法の基本原理は、陸上環境においても問題なく適応可能である。

4. 今後の展開

4.1. 生態学的研究の側面から

前述したように、アミノ酸を用いた栄養段階推定法は、水陸を問わず同じ基本原理で利用できる。しかしながら、式3の「 β 」の値が水棲藻類、C3植物、C4植物のそれぞれで異なるため、複数の系の一次生産者を利用する生物の場合には、本手法のみから栄養段階を正確に推定することはできない。この点については、試料全体の、あるいは、アミノ酸の炭素同位体比等を併用することで解決できるかもしれない。現在、アミノ酸の炭素同位体比測定については、アシル/メチルエステル（Ac/Me）誘導体化とその同位体分別の補正法（Corr et al, 2007a, 2007b）、エチルエステル（Et）誘

導体化と極性GCカラムを用いた同位体比測定法（Chikaraishi and Ohkouchi, 2010）、誘導体化を用いずにHPLC/IRMSにより炭素同位体比を測定する手法（Smith et al., 2009; Choy et al., 2010）などの研究が積極的に行われているので、近い将来に、アミノ酸の炭素同位体比を加えた議論も可能になるであろう。

一方で「 β 」の値が異なるということは、言い換えれば、水棲藻類、C3植物、C4植物を起点とするそれぞれの生態系が区別できるということでもある。例えばFig. 5に示すように、グルタミン酸の同位体比を縦軸に、フェニルアラニンの同位体比を横軸にとると、水棲藻類と陸上C3植物を起点とする生態系は、傾き20（ $=8.0 \div 0.4$ ）のラインで別々のところに描かれ、これらの両方の生態系に属する生物は、両者からの寄与率に応じて2つのラインの間にプロットされる。すなわち、各生態系の（フェニルアラニンの）窒素同位体比のバリエーションが十分に小さい場合には、複数の生態系に属する生物について、各生態系からの寄与率を見積もることができる（2つの生態系のラインの間に、試料の食物として予想される点を通る直線を引くと、両生態系からの距離の比は、どのように直線を引いても必ず等しくなる： $a:b = a':b'$ ）。実際にこの関係を利用して、Naito et al. (2010)

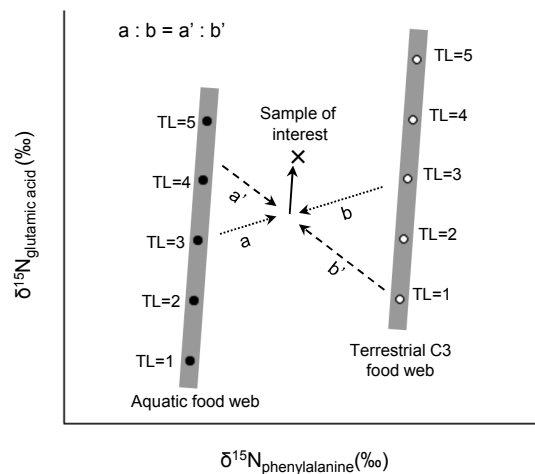


Fig. 5. Schematic of relationship between $\delta^{15}N$ values amino acids and trophic level in a sample where the basal resources include aquatic and terrestrial C3 plants.

は、縄文時代の遺跡から発掘された人骨・動物骨から、当時の人々の食料における陸海の寄与率を見積もっている。

次の大きな課題として、おそらく、(1)過去の生態系の復元と、(2)土壌などの腐食連鎖系への応用があげられる。アミノ酸を用いた手法は bulk 法とは異なり、過去の一次生産者の窒素同位体比の情報を得る必要がないので、アミノ酸さえ残っていれば恐竜 (例えば, Asara et al., 2007; Schwietzer et al., 2007) の栄養段階の復元も原理的には可能である。しかし、たとえ骨や貝殻などの中に閉じ込められているアミノ酸であったとしても、熱による変成・分解やバクテリアなどに由来するアミノ酸の付加について、十分に考慮されなければならない。また、土壌のアミノ酸の窒素同位体比については、Ostle et al. (1999) が、植物の根や地上部のフェニルアラニンの同位体比が 0~10% であるのに対して、土壌のそれは非常に低い値 (最低で -25% 以下) と報告して以来、彼らを中心に積極的な研究が続いているが (例えば, Bol et al., 2004, 2008), なぜそのような値を示すのかは未だに理解されていない。今後、これらの研究が盛んになっていくと予想されるが、得られる情報の精度を高め、質の高い議論を行うためには、まずは、バクテリアやアーキアを含めて腐食連鎖に関わる生物について、窒素源をコントロールした下での培養・飼育実験などを行い、基礎的なデータ・知見を増やしていくことが必要であろう (例えば, 山口ら, 未発表)。また、非タンパク性のアミノ酸や、D 体、L 体アミノ酸を区別した光学異性体の存在比、またはその同位体比の情報を正確に得ることも、大きな進展をもたらすと考えられる (例えば, Takano et al., 2009, 2010; 高野ら 2010)。

4.2. 生理学的研究の側面から

生化学的な合成・代謝反応において、安定同位体比が変化するという事は、そこに同位体効果 (isotope effect) を伴うプロセスがあるということであり、その変化量 (同位体分別: isotopic fractionation) は同位体効果とその反応量 (フロー) の関係式で得られるので、同位体の変化が共通の大きさであるならば、単一の反応系で等量の反応が行われたと見なすことができる。

式 3 の「 β 」の値は、シアノバクテリアや藻類などの水棲の一次生産者で、約 -3.4% であり (Chikarai-shi et al., 2009), この関係は、アンモニア (NH_3) を窒素源として培養したメタン菌などのアーキア (古細菌) や大腸菌などのバクテリア (真正細菌) においても成立する (山口ら, 未発表)。従属栄養生物では、水陸を問わず、餌とその消費者を比較すると、消費者のグルタミン酸の同位体比は約 8.0% 上昇し、フェニルアラニンのそれは約 0.4% しか上昇しない。そしてこの被食-捕食における同位体比の変化もやはり、従属栄養下で生育させた大腸菌やメタン菌でも共通である。これは、アーキア (古細菌)・バクテリア (真正細菌)・ユーカリア (真核生物) といった進化系統の位置にかかわらず、アミノ酸の基本的な生合成・代謝プロセスがほとんど等しいことを示唆する。それでは、なぜ陸上植物の「 β 」の値のみが異なるのであろうか? 可能性として、1) 陸上植物の独特の窒素同化システム、2) 陸上植物に特異的に存在するリグニン合成系が考えられる。陸上植物の根には、菌根菌という菌類が共生し、宿主の植物に窒素をアンモニアあるいは特定のアミノ酸 (グルタミン酸など) で供給している (Smith and Read, 2008)。アンモニアとしての供給であれば、「 β 」の値は水棲の一次生産者と同じ 3.4% になると考えられるが、アミノ酸を供給しているのであれば、異なる値を示す可能性がある。また、一方で、リグニンはフェニルアラニンから合成され、その最初の反応にアミノ基の脱離が含まれている。すなわち、この脱離反応が同位体分別を伴っていれば、「 β 」の値を大きく変える原因になり得る。

被食-捕食を通してのアミノ酸の同位体比がすべての生物で共通であることは、すべての生物で、アミノ酸の代謝プロセスやそのフローがほとんど同じであることを示唆する。不可欠アミノ酸 (必須アミノ酸) であるフェニルアラニンは、常に餌に含まれる一次生産者のそれに依存するしかないため、どの栄養段階の生物であってもその究極的な起源は一次生産者である。一方で、可欠アミノ酸 (非必須アミノ酸) であるグルタミン酸は、餌から獲得することもできるが、捕食者自身が合成することも可能である。一般的に、従属栄養生物では、必要な有機分子を獲得する方法と

して、外因性および内因性の分子をそのまま再利用する経路 (*salvage* 経路) と、新規に分子を生合成する経路 (*de novo* 経路) を持っていることが多い。例えば、分子内に硫黄を有するアミノ酸であるメチオニンでは、この *salvage* 経路の存在が比較的良好に調べられており (例えば、Houston et al., 1991; Sekowska et al., 2004; Pirkov et al., 2008)、メチオニンの獲得では、*salvage* 経路の利用により、硫黄の同化エネルギーの大部分をセーブすることができる (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997)。残念ながらグルタミン酸に関する研究はほとんどないが、おそらく、グルタミン酸についても同様なのであろう。すなわち、被食-捕食を通してのアミノ酸の同位体比の上昇が、どの生物であっても約 8.0‰ であることは、自然界では *salvage* 経路が主であり、*de novo* 経路はほとんど働いていないことを示唆する。このように、被食-捕食を通してのアミノ酸の同位体比の変化は、生体内での *salvage* 経路と *de novo* 経路のどちらを利用しているか (もしくは、双方の利用率) を知る、または、裏付ける重要な情報になると考えられる。

謝 辞

本稿の内容は、科学研究費 (力石・高野・小川) により実施した研究成果の一部を取り纏めたものである。本研究を進めるにあたり、和田英太郎先生 (海洋研究開発機構) には、様々なアドバイスをいただきました。編集委員の大場康弘博士 (北海道大学) をはじめ、陀安一郎先生と匿名の査読者には、本稿の質を高めるうえで、ポジティブ且つ非常に的確なアドバイスを頂きました。本研究プロジェクトを推進するにあたり北里洋領域長 (海洋研究開発機構) には様々な支援を頂きました。本稿の挿絵 (生物のイラスト) は廣野留都さんに提供して頂きました。心より厚く御礼申し上げます。最後に、本特集企画を支えて頂いた三瓶良和編集委員長 (島根大学) をはじめとする編集委員会、運営委員会の先生方、また、本特集に快く参加・協力して頂いた多くの著者の方に、この場を借りて心より御礼申し上げます。

引用文献

- Asara J.M., Schweitzer M.H., Freemark L.M., Phillips M. and Cantley L.C. (2007) Protein sequences from *Mastodon and Tyrannosaurus rex* revealed by mass spectrometry. *Science* **316**, 280-285.
- Bol L., Ostle N.J., Chenu C.C., Petzke K.-J., Werner R. A. and Balesdent J. (2004) Long term changes in the distribution and $\delta^{15}\text{N}$ values of individual soil amino acids in the absence of plant and fertiliser input. *Isotopes Environ. Health Stud.* **40**, 243-256.
- Bol L., Ostle N.J., Petzke K.-J., Chenu C.C. and Balesdent J. (2008) Amino acid ^{15}N in long-term bare fallow soils: influence of annual N fertilizer and manure applications. *J. Soil Sci.* **59**, 617-629.
- 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.
- 力石嘉人・柏山祐一郎・小川奈々子・大河内直彦 (2007) 生態学指標としての安定同位体：アミノ酸の窒素同位体分析による新展開. *Radioisotopes* **56**, 463-477.
- 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: Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K. (Eds.), *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, pp. 37-51.
- Chikaraishi Y. and Ohkouchi N. (2010) An improved method for precise determination of carbon isotopic composition of amino acids. In: Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K. (Eds.), *Earth, Life, and Isotopes*, Kyoto University Press, pp. 355-366.
- 力石嘉人・小川奈々子・高野淑識・土屋正史・大河内

- 直彦 (2010) アミノ酸の窒素同位体比を用いた水棲生物の栄養段階の解析. *地球化学* **44**, 233-241.
- Chikaraishi Y, Ogawa N.O., Doi H. and Ohkouchi N. (2011) $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 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.
- Choy K., Smith C.I., Fuller B.T. and Richards M.P. (2010) Investigation of amino acid $\delta^{13}\text{C}$ signatures in bone collagen to reconstruct human palaeodiets using liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Geochim. Cosmochim. Acta* **74**, 6093-6111.
- Corr L.T., Berstan R. and Evershed R.P. (2007a) Optimisation of derivatisation procedures for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ values of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 3759-3771.
- Corr L.T., Berstan R. and Evershed, R.P. (2007b) Development of *N*-acetyl methyl ester derivatives for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ values of amino acids using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 9082-9090.
- Houston M.E., Vander Jagt D.L. and Honek J.F. (1991) Synthesis and biological activity of fluorinated intermediates of the methionine salvage pathway. *Bioorg. Medic. Chem. Let.* **1**, 623-628.
- Lorrain A., Graham B., Ménard F., Popp B., Bouillon S., van Breugel P. and Cherel Y. (2009) Nitrogen and carbon isotope values of individual amino acids: a tool to study foraging ecology of penguins in the Southern Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **391**, 293-306.
- 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**, 4727-4744.
- McClelland J.W. and Montoya J.P. (2002) Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology* **83**, 2173-2180.
- Minagawa M. and Wada E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidences and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim. Cosmochim. Acta* **48**, 1135-1140.
- Naito Y.I., Honch N.V., Chikaraishi Y., Ohkouchi N. and 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. *Am. J. Phys. Anthropol.* **143**, 31-40.
- Ostle N.J., Bol R., Petzke K.J. and Jarvis S.C. (1999) Compound specific $\delta^{15}\text{N}$ values: amino acids in grassland and arable soils. *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1751-1755.
- Pirkov I., Norbeck J., Gustafsson L. and Albers E. (2008) A complete inventory of all enzymes in the eukaryotic methionine salvage pathway. *FEBS J.* **275**, 4111-4120.
- 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: Dawson T.E. and Siegwolf R.T.W. (Eds), *Stable isotopes as indicators of ecological change*, Academic Press, pp. 173-190.
- Schwietzer M.H., Suo Z., Avci R., Asara J.M., Allen M.A., Arce F.T. and Horber J.R. (2007) Analyses of soft tissue from *Tyrannosaurus rex* suggest the presence of protein. *Science* **316**, 277-280.
- Sekowska A., Dnervaud V., Ashida H., Michoud K., Haas D., Yokota A. and Danchin A. (2004) Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC microbial.* **4**, 1-17.
- Smith C.I., Fuller B.T., Choy K. and Richards M.P. (2009) A three-phase liquid chromatographic method for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of amino acids from biological protein hydrolysates using liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Anal. Chem.* **390**, 165-172.
- Smith S.E. and Read D.J. (2008) *Micorrhizal Symbiosis, Third Edition*, Academic Press.
- Takano Y., Chikaraishi Y., Ogawa N.O., Kitazato H. and Ohkouchi N. (2009) Compound-specific nitrogen

isotope analysis of D-alanine, L-alanine, and valine: application of diastereomer separation to $\delta^{15}\text{N}$ and Microbial Peptidoglycan Studies. *Anal. Chem.* **81**, 394-399.

Takano Y., Chikaraishi Y. and Ohkouchi N. (2010) Enantiomer-specific isotope analysis of D- and L-alanine: Nitrogen isotopic hetero- and homogeneity in microbial and chemical processes. In: Ohkouchi N., Tayasu I. and Koba K. (Eds.), *Earth, Life, and*

Isotopes, Kyoto University Press, pp. 387-402.

高野淑識・力石嘉人・大河内直彦 (2010) 微量湿式分析による分子レベル同位体比の品質管理と確度向上：特に天然存在比の正確な評価と Stable Isotope Probing (SIP) 法の応用に向けて. *Res. Org. Geochem.* **26**, 81-93.

Thomas D. and Surdin-Kerjan Y. (1997) Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 503-532.