

総説

生合成物質の分子内炭素同位体分布計測の有機地球化学的意義*

山田 桂大**

(2011年4月29日受付, 2011年7月1日受理)

Abstract

Intramolecular carbon isotopic analysis of biosynthetic products has potential to improve our knowledge on organic material cycles in a variety of environments. Glucose is one of the most important starting materials for biosynthetic products and its intramolecular carbon isotope distribution is essential information to understand carbon isotopic composition of biosynthetic products. Characteristics of intramolecular carbon isotope distribution in glucose from plant material and ethanol fermented from glucose are reviewed. At the moment the characteristic of intramolecular carbon isotope distribution in glucose have not been generalized. We need systematic investigation of intramolecular carbon isotope distribution in glucose and its descendents. GC-IRMS and ^{13}C -NMR are promising techniques for intramolecular carbon isotopic measurement for biosynthetic products.

1. はじめに

大気, 陸, 海洋およびそれらを横断する生態系といった地球規模の巨視的なシステムから生体内, 細胞規模の微視的なシステムまで, それらシステム中の有機物の循環を時間的・空間的に理解するためには, 有機物の起源を特定することや有機物が関与する反応機構を解明することが必要である。それには有機物を構成する軽元素(水素, 炭素, 窒素, 酸素, 硫黄等)の安定同位体比が有効な情報となる。ここでは有機物の骨格を形成する炭素の安定同位体比($\delta^{13}\text{C}$ 値)に着目する。有機物の $\delta^{13}\text{C}$ 値は, その計測対象を基に全有機物(バルク)レベル, 有機分子レベル, そして分子内レベルに分類できる。環境試料中の全有機物は様々

な起源や反応履歴をもつ個々の有機分子の混合物なので, バルクレベル $\delta^{13}\text{C}$ 値からは, 最も主要な構成成分のもつ起源情報や反応機構情報, あるいは構成成分間の平均化された起源情報や反応機構情報しか得られない。そのためにバルクレベル $\delta^{13}\text{C}$ 値を利用した有機物循環の議論には限界がある場合が多い。1990年代初めにガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計(GC-IRMS)が実用化され, 有機分子レベル $\delta^{13}\text{C}$ 値がng炭素の試料量で比較的容易に計測できるようになり, 分子種毎の起源推定や反応機構解読を利用した有機物循環の議論が過去20年間で飛躍的に進歩した(奈良岡ら, 1997参照)。生体内の生合成・代謝反応などからも分かるように, 個々の有機分子もまた様々な起源や反応履歴をもつ分子構成要素の混合物として

*Measurement of intramolecular carbon isotope distributions in biosynthetic products and its implications for organic geochemistry

**東京工業大学大学院・総合理工学研究科・化学環境学専攻 〒226-8502 神奈川県横浜市長津田町4259
Keita Yamada: Department of Environmental Chemistry and Engineering, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Yokohama 226-8502, Japan
e-mail: Yamada.k.ag@m.titech.ac.jp Tel/Fax: 045-924-5555

捉えることができる(例えば、カフェイン (Fig. 1), Weilacher et al., 1996)。従って有機分子レベル $\delta^{13}\text{C}$ 値には、各構成要素がもともと持つ起源情報と反応機構情報および各構成要素が結合あるいは分裂してその有機分子を形成する際の反応機構情報が混在している。つまり有機分子のもつ起源情報や反応履歴は本来分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値に内在し、それら分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値を計測、利用することで、かつてバクレベルから有機分子レベルの計測、利用へ発展した際と同様に、有機物循環議論の更なる詳細化、精緻化が期待できる。

これまで有機分子内レベル $\delta^{13}\text{C}$ 値は、主として生体試料を用いた有機分子の生合成代謝経路の解明に利用されてきた。分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測が生合成代謝経路の解明に有効であることをはじめて実験的データによって示したのが、生体試料中アミノ酸のカルボキシル基が、残りの分子構成要素に比べて高い $\delta^{13}\text{C}$ 値を持つことを見出した Abelson and Hoering (1961) による報告であった。その後、他の官能基についても、例えば、生体有機分子中のメチル基が相対的に低い $\delta^{13}\text{C}$ 値をもつことが、酢酸 (Meinschein et al., 1974) やバニリン (Krueger and Krueger, 1983) などに観測されてきた。1974 年には Rinaldi et al. (1974) によって、アセトインの完全な分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布が決定され、生体有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値が非統計的に分布していることが明らかにされた。さらに、1991 年には Rossmann et al. によって、様々な代謝有機分子の出発物質となるグルコースが非統計的な分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を持つことがはじめて計測された。この報告以降、グ

ルコース由来の代謝有機分子の分子レベル $\delta^{13}\text{C}$ 値および分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布をグルコースの非統計的な分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布と代謝過程に伴う同位体効果との両方に結びつけて解釈する概念が確立した。

生体有機分子の非統計的な分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を説明するための一般理論を構築しようとした最初の試みは、1985 年に Galimov によってなされたものであった。彼は、同位体分子種 (アイソトポマー) 毎に計算される熱力学的同位体係数 (β 係数) と観測される分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の間に相関があることから、分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布は基本的には熱力学的同位体平衡で支配されており、代謝過程に伴う同位体効果の影響はその相関からの偏差を生じる二次的な要因であると主張している (Galimov, 1985, 2006)。しかしながら、現在では、出発物質の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布と代謝過程に伴う同位体効果に加え、代謝経路の中間体プールと各分岐経路フラックスの大きさから生体有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を説明することが一般的である (例えば、Monson and Hayes, 1982; Schmidt et al., 1995)。

本稿では、生合成有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を考える上で基本となる光合成植物一次生産物であるグルコース、そしてグルコース由来の代謝生成物であるエタノールの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布について、現在得られている知見を紹介し、またそれらに関連して分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 分布計測法の現状を概観することで、有機地球化学における生合成有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布計測の意義と展望を述べる。

2. 光合成一次生産物グルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布

植物の光合成一次生産物であるグルコースが、基質 (CO_2 や HCO_3^-) に対して相対的に ^{13}C 欠乏であり、また C_3 型炭素固定と C_4 型炭素固定経路の違いにより ^{13}C 欠乏の程度が異なることは良く知られているが、この理由は、主としてはじめの炭素固定酵素 (RUBISCO (C_3 経路) と PEPC (C_4 経路)) 反応に伴う動的同位体効果の程度の違いおよび炭素固定率の違いである (Farquhar et al., 1982)。この酵素反応を含むカルビン回路を通して、固定された炭素が十分にかき混ぜられるので、炭素固定経路内の中間生成物はグルコースを

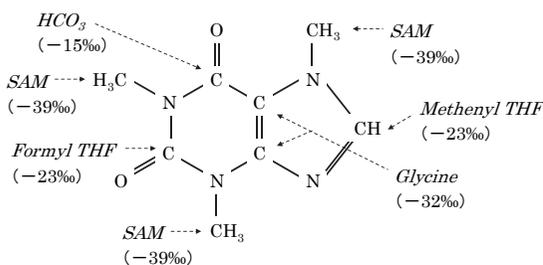


Fig. 1. Biosynthetic precursors for individual positions in caffeine and intramolecular carbon isotope distribution determined for natural plant tea leaves (adapted from Weilacher et al., 1996).

含め、統計的な分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を持つと考えられていた。しかしながら、Rossmann et al. (1991年)の計測によって、砂糖大根 (C_3 経路) スクロース由来およびトウモロコシ (C_4 経路) デンプン由来のグルコースが非統計的な分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を持つということがはじめて明らかにされた。その後しばらくこの結果が追試されることがなかったが、2009年に Gilbert et al. によって砂糖大根 (C_3 経路) スクロース、小麦 (C_3 経路) デンプンおよびトウモロコシ (C_4 経路) デンプン由来のグルコースの非統計的分子内 ^{13}C 値分布が確認された。Fig. 2 にグルコースの各炭素部位の $\delta^{13}\text{C}$ 値の分子全体の $\delta^{13}\text{C}$ 値に対する差 ($\Delta\delta$) の報告値を示す。部分的に分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を報告した研究 (Ivlev et al., 1987, Gleixner et al., 1993) やグルコース由来の発酵生成物の $\delta^{13}\text{C}$ 値から間接的に非統計分布を示した研究は他にもあるが、グルコースの C-1 部位から C-6 部位までを個別に計測した例は上記 2 報のみである。

Rossmann et al. は、グルコース分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の特徴として、(1) C_3 経路と C_4 経路、糖の蓄積形態 (スクロースかデンプンか) とは無関係に、分子全体の $\delta^{13}\text{C}$ 値と比較して C-3 部位と C-4 部位では ^{13}C 濃縮であり、C-6 部位では ^{13}C 欠乏であること、を指摘した。Gilbert et al. は、彼らの結果が Rossmann et al. によって得られた結果と概ね調和的であることに加え、(2) 同じ C_3 経路で比較した場合、デンプン由来グルコースに比べてスクロー

ス由来グルコースの ^{13}C 濃縮度が C-2 部位で低く、C-4 部位で高いこと、(3) 同じ蓄積形態 (デンプン) で比較した場合、 C_3 経路に比べて C_4 経路の ^{13}C 濃縮度が C-1 部位と C-6 部位で高いことを見出し、それぞれ糖の蓄積形態と炭素固定経路の違いが、分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布に影響を及ぼしている可能性を指摘した。これらグルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の特徴がどのようにして生じるのかについて、植物内の代謝経路 (Fig. 3) を参照しながら、現在提案されている仮説を以下に示す。

炭素固定回路内の酵素反応に伴う同位体効果

上記(1)で指摘した C-3 部位および C-4 部位の ^{13}C 濃縮メカニズムとして、Rossmann et al. は次のような仮説を提案した。カルビン回路内で形成されたジヒドロキシアセトリン酸 (DHAP) が葉緑体から細胞質に移送され、そこでトリオースリン酸イソメラーゼによりグリセルアルデヒド-3-リン酸 (GAP) との平衡反応が触媒される (Fig. 3, IE3)。GAP の一部は脱水素化され 3-ホスホグリセリン酸 (PGA) に変換される (IE4)。この反応に伴う同位体効果により GAP のアルデヒド炭素に ^{13}C が濃縮する。この ^{13}C 濃縮は平衡反応によって DHAP のヒドロキシルメチル炭素に伝播する。DHAP と GAP からアルドラーゼ反応によりフルクトース-1,6-ビスリン酸 (FBP) が形成され (IE1)、続いてグルコースが形成されるので、それぞれ DHAP のヒドロキシルメチル炭素と GAP のアルデヒド炭素に由来するグルコースの C-3 部位と C-4 部位に ^{13}C 濃縮が起きる。なお、DHAP の輸送過程に分別はないことは Gleixner et al. (1997) によって確認されている。

上記(2)で指摘したように、C-4 部位での分子全体の $\delta^{13}\text{C}$ 値に対する ^{13}C 濃縮の程度が、同じ C_3 経路に由来するグルコースに対しても、デンプン由来では 3%程度、スクロース由来では 6%程度と大きく異なる。一方、C-3 部位の ^{13}C 濃縮度はデンプン由来、スクロース由来ともに 2%程度で同じである (Fig. 2)。つまり、糖の蓄積形態によって 1 から 4%程度 C-3 部位と C-4 部位の ^{13}C 濃縮度が異なる。Rossmann et al. は、この C-3 部位と C-4 部位の ^{13}C 濃縮度の差に関して、アルドラーゼ反応に伴う同位体効果、DHAP と GAP 間の濃

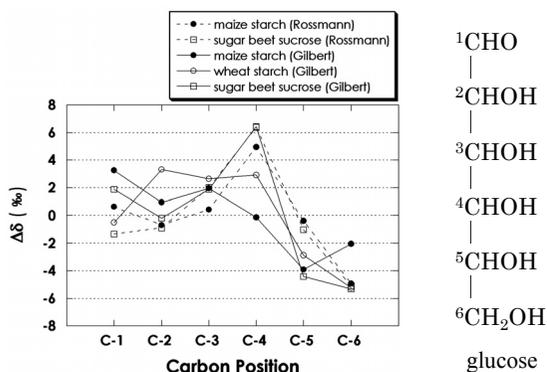


Fig. 2. Relative intramolecular carbon isotope distribution in glucose from C_3 and C_4 plants (adapted from Rossmann et al., 1991 and Gilbert et al., 2009).

と関係しているのではと推測している。しかし次に述べるようにこの部位は光呼吸という代謝によって影響を受けるかもしれない。

光呼吸

上記(3)で指摘されたように、炭素固定経路の違いによってもグルコース分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布に差が生じる可能性がある。炭素固定経路の違いによるグルコース分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の差に最も関連していると考えられている代謝経路は光呼吸である。光呼吸は、光条件下でのリブローズビスリン酸(RuBP)の酸化をRUBISCOが触媒する反応である(具体的には、RuBPと O_2 との反応から生じたグリコール酸塩がグリコール酸回路によってグリシン、セリンを経てグリセリン酸塩に変換される経路(Fig. 2))。この反応によって合成されるPGAは、RuBPのカルボキシレーションに由来するPGAと合わせてカルビン回路に再び組み込まれる。光呼吸経路には同位体効果が伴う酵素反応が存在するので(例えば、グリシンの脱カルボン酸)、RuBPのカルボキシレーション由来PGAと光呼吸由来PGAの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布は異なることが考えられる。 C_3 植物では光呼吸が重要であり、 C_4 植物では光呼吸がほとんど起きないので、 C_3 経路と C_4 経路におけるPGAの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布が異なり、結果、生成するグルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布様式に C_3 経路と C_4 経路間で差が生じることになる。光呼吸経路を考えた場合、経路途中のグリコール酸経路に伴い、生成するPGAの2つのヒドロキシルメチル炭素、すなわちグルコースのC-1/C-6部位とC-2/C-5部位の起源炭素が同位体分別を受けることが予想される。上記(3)で指摘された、 C_3 経路に比べて C_4 経路の ^{13}C 濃縮度がC-1部位とC-6部位で高いことにはこの光呼吸が関連しているかもしれないが、このような違いが生じるかどうかについての定量的な説明はまだされていない。

最近では、 C_3 経路由来グルコースの非統計的分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を、数値モデルで定量的に理解しようとする試みもある(Tcherkez et al., 2004)。このモデル研究からは、同じアルドラーゼ反応でも、反応が起こる場所が葉緑体か細胞質かによって同位体効果が異なること、グルコースC-3部位、

C-4部位におけるアルドラーゼ反応が可逆反応であること、光呼吸の程度によってアルドラーゼ反応に伴う同位体分別が変化すること、蓄積糖の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布が異なること、など多くの興味深い示唆が得られており、数値モデルによる分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の定量的理解の可能性が認識できる。しかし、これらの示唆はRossmann et al.の観測結果に合うように、様々なパラメーターを調節することで得られたものである。従って数値モデル研究の有効性を高めるためには、さらに観測を増やして上記分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の特徴が普遍的なものかどうかの検証を急ぐ必要がある。

3. グルコースを出発物質とする発酵生成物の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布

グルコースを出発物質とする代謝において、グルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布様式は代謝経路に沿ってより下流の分子へ伝播していく。発酵によるエタノールや遊離酢酸の生成のように、その生成率が高い場合には同位体分別が生じないとされており(例えば、Weber et al., 1997)、例えば*Saccharomyces cerevisiae*による発酵で放出される CO_2 および生成されるエタノールのメチル基とメチレン基の $\delta^{13}\text{C}$ 値は、それぞれ、出発物質グルコースのC-3/C-4部位、C-1/C-6部位およびC-2/C-5部位の $\delta^{13}\text{C}$ 値を反映していると考えられている(Fig. 4)。つまり飲料用エタノールや食酢など

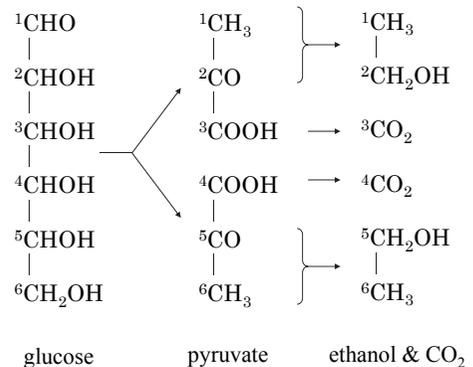


Fig. 4. Relationship of carbon skeleton between glucose and its fermentation products, pyruvate, CO_2 and ethanol.

の発酵生成物の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布は原料グルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の観点から解釈できるとされている。逆に、発酵生成物の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布から間接的にグルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布様式を探ることも可能であり、上記 Rossmann et al. のグルコース分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値の決定にも一部このことが利用されている。

糖を用いた実験室内発酵実験および製造工場から得られたエタノールに対して計測された分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を Table 1 にまとめた。比較のために化学合成エタノールの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の計測結果も示した。さらに上記グルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測結果を基にして計算される発酵エタノールの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値の期待値も示した。

計算されたエタノール分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布期待値は、メチル基(グルコースの C-1 部位と C-6 部位の平均値)とメチレン基(グルコースの C-2 部位と C-5 部位の平均値)の差が 2% 程度であり、経路別に見ると C₃ 経路グルコース由来のエタノールは、メチル基がメチレン基に対して 0.5% から 2% 程度¹³C 欠乏であり、一方 C₄ 経路グルコース由来のエタノールは、メチル基がメチレン基に対して 1% 程度の¹³C 濃縮あるいは 2% 程度の¹³C 欠乏であるという特徴を示す。

エタノールの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の計測値を初めて報告したのは Caer et al. (1991) であり、C₃ 植物由来の糖の発酵によって生成するエタノールでは、メチル基がメチレン基より¹³C 欠乏であり、一方 C₄ 植物由来エタノールではメチル基とメチレン基に差が見られなかったとした。計測の精度が不十分(約 2 から 8% 程度)であったために、メチル基とメチレン基の差を数値で表すことはできないが、もし差があったとしても 1.5% 以内の差であろうと結論しており、グルコース分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布から計算される期待値と調和的な結果であった。その後、メチル基とメチレン基の差を議論できる精度の高い計測値が 2 つのグループから報告されているが、分子内の特徴には食い違いが見られる。1 つは NMR を用いた計測結果である (Caytan et al., 2007; Thomas et al., 2010)。C₃ 植物由来の糖の発酵によって生成するエタノールでは、メチル基がメチレン基より 0.1 から 3.5% の範囲で¹³C 欠乏であり、一方 C₄ 植物由来エタノールで

はメチル基がメチレン基より 1.6 から 5.6% の範囲で¹³C 濃縮であり、C₃ 経路に見られたメチル基とメチレン基の関係が逆転することを見出している。また、期待値で示されたメチル基とメチレン基の 2% の差を越えた差があることも示唆している。もう 1 つは IRMS を用いた製造工場からのエタノールの計測結果である (Hattori, 2011)。C₃ 植物由来エタノールでは、メチル基がメチレン基より 4.6% の¹³C 欠乏であり、Caytan et al. (2007) と Thomas et al. (2010) と調和的な結果を報告している。しかしながら、C₄ 植物由来エタノールではメチル基がメチレン基に対して 0.2% の¹³C 濃縮あるいは 1.8% の¹³C 欠乏であり、Caytan et al. (2007) と Thomas et al. (2010) が示したメチル基メチレン基の逆転関係は見られず、むしろ期待値と調和的であることが示されている。

これら C₃ 植物糖由来エタノールの計測結果から、メチル基のメチレン基に対する¹³C 欠乏度が、期待値 (2% 程度) よりも大きな幅 (0 から 5% 程度) を持つことが示唆され、グルコースにおける C-1/C-6 部位の $\delta^{13}\text{C}$ 値が、Rossmann et al. や Gilbert et al. の観測値よりも変化に富んだ分布となっていることが考えられる。このことは C-1/C-6 部位が光呼吸によって影響を受けることと関連しているかもしれない。C₄ 植物糖由来エタノールに対する 2 グループ間の計測結果の食い違いに対する理由は現在のところ不明である (後述するように計測法の違いによる系統的な差の可能性もある)。また、Thomas et al. (2010) は、CAM 植物 (パイナップルとアガーベ) 由来の糖の発酵によって生成されたエタノールの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布も計測しており、メチル基のメチレン基に対する¹³C 欠乏度 (13.9% と 9.2%) が他のエタノールと比べて非常に大きいことを見出している。Hattori et al. (2011) も、パイナップル由来の食酢でメチル基のカルボキシル基に対する 18% という大きな¹³C 欠乏度を報告している。この理由についても未だ不明であるが、炭素固定経路の違いによるグルコース分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の制御メカニズムを考える上で重要なヒントとなるであろう。最後に、合成エタノールに関しては、分子レベル $\delta^{13}\text{C}$ 値が -30% と C₃ 植物糖由来のエタノールに近い値をもつが、メチル基とメチレン基の分子全体の $\delta^{13}\text{C}$ 値に対す

Table 1. Molecular and intramolecular $\delta^{13}\text{C}$ values measured for ethanol from fermentation of plant materials and those calculated from intramolecular isotope distribution in glucose

Sample	δ value (‰)					analytical method	literature
	original plant /synthetic	photosynthetic pathways	$\delta_{\text{ethanol bulk}}$	δ_{methyl}	$\delta_{\text{methylene}}$		
Measurement of ethanol							
beet	C ₃	-27.4	-28.2	-26.5	-1.7	NMR	Caytan et al., 2007
grape	C ₃	-24.8	-26.5	-23.0	-3.5		
sugarcane	C ₄	-12.2	-11.4	-13.0	1.6		
maize	C ₄	-10.1	-8.4	-11.8	3.4		
synthetic		-29.4	-26.0	-32.7	6.7		
beet	C ₃	-28.0	-28.0	-27.9	-0.1	NMR	Thomas et al., 2010
cane	C ₄	-12.4	-11.1	-13.8	2.7		
maize	C ₄	-10.8	-8.0	-13.6	5.6		
pineapple	CAM	-14.4	-21.3	-7.4	-13.9		
agave	CAM	-11.9	-16.5	-7.3	-9.2		
tapioca	C ₃	-27.9	-30.2	-25.6	-4.6	IRMS	Hattori, 2011
cane	C ₄	-12.5	-13.4	-11.6	-1.8		
maize	C ₄	-11.3	-11.2	-11.4	0.2		
synthetic		-29.7	-27.7	-31.6	3.9		
Calculation from intramolecular $\delta^{13}\text{C}$ distribution of glucose measured by Rossmann et al. and Gilbert et al.							
sugar beet-sucrose	C ₃	-27.3	-28.3	-26.3	-2.0	IRMS	Rossmann et al., 1991
sugar beet-sucrose	C ₃	-27.5	-27.7	-27.3	-0.5	NMR	Gilbert et al., 2009
wheat-starch	C ₃	-28.3	-28.9	-27.7	-1.2	NMR	Gilbert et al., 2009
maize-starch	C ₄	-11.0	-12.2	-9.9	-2.3	IRMS	Rossmann et al., 1991
maize-starch	C ₄	-10.3	-9.8	-10.7	0.9	NMR	Gilbert et al., 2009

る関係は逆であり、合成エタノールのメチル基はメチレン基に対して4から7%程度の ^{13}C 濃縮を示す。このような情報は天然物か人工物かを区別するような、特に食品における儀と判別や認証、管理に有効である。なぜなら、天然化合物の分子レベル $\delta^{13}\text{C}$ 値(δD 値も同様)を偽装することは比較的容易かもしれないが、分子内分布様式を偽装することは非常に困難であるからである。

4. 有機物の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測法の現状

有機物の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測には、高精度計測($\pm 0.5\%$ 程度)が可能であるデュアルインレット IRMS法が主として用いられている。しかしながら、デュアルインレット IRMS法では分子内の特定部位炭素をあらかじめ CO_2 に変換する必要があるために、複雑な有機分子を計測する場合には

非常に煩雑な前処理過程を必要とする。上述した Rossmann et al.によるグルコース計測では、化学分解と微生物分解を利用してより小さな分子へと分解した後に最終的に CO_2 に変換して各部位の $\delta^{13}\text{C}$ 値計測を行っている。また、このデュアルインレット IRMS計測を行う場合、各変換部位に対して通常約1mg炭素の試料量が必要である。一方で、煩雑な分解処理をすることなく、分子のまま部位毎の $\delta^{13}\text{C}$ 値を計測する方法としてNMRを用いた技術が発展してきた。上述した Gilbert et al.によるグルコース計測には、比較的容易な誘導体化のみを前処理としたNMR計測が利用されている。NMR法の天然存在度同位体比分析への適用開始当初の低い分析精度($\pm 8\%$ 程度, Caer et al., 1991)は、現在 $\pm 0.8\%$ まで改善されている(Gilbert et al., 2009; Thomas et al., 2010)。しかしながら、NMR法には、純度の高い目的分子を相当

量必要とし、例えばエタノールの分析では純エタノール 1 mL 程度を必要とする。有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値の計測例のほとんどが生体試料や食品に限られているのは、上記 2 つの計測方法が、多量の試料を必要とすること、分解、 CO_2 への変換あるいは分離精製、誘導体化を必要とすることと関連している。

IRMS を用いた分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測に関しては、GC-IRMS による分子レベル $\delta^{13}\text{C}$ 計測と同様、連続フロー型 IRMS を用いることで必要試料量を ng レベルにまで引き下げること、さらに混合物中の目的分子を計測することが可能となり、より濃度の低い環境試料への適用が期待できる。しかし、GC-IRMS を分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測に適用するには、GC で目的分子を分離した後オンラインで部位毎に分解し、さらにそれらの分解部位をオンラインで CO_2 へと変換する方法が必要である。Corso and Brenna (1997) は、GC で分離した目的分子をオンライン熱分解炉で分解し、さらにその熱分解生成物を 2 つ目の GC で分離した後に燃焼炉で CO_2 に変換して IRMS に導入するというシステム (GC-Py-GC-C-IRMS) をはじめて考案した。得られる分解生成物の $\delta^{13}\text{C}$ 計測値の再現性が良いこと ($<0.4\%$) や、熱分解に伴う同位体分別や再配列が計測しうる程度には起きないことから、混合物中の ng レベル有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測の可能性が示唆された。現在、GC-Py-GC-C-IRMS を用いた酢酸 (Dias et al., 2002; Yamada et al., 2002; Hattori et al., 2011) やアセトアルデヒド (Li, 未発表) などの低分子有機分子の計測が可能となっている。今後は、この計測技術をより複雑な有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値計測に拡張することが期待される。

エタノールの分析に関しては、上述したように NMR 法と IRMS 法による分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値の計測結果に食い違いが見られた。それぞれの方法で得られた C_3 植物糖、 C_4 植物糖由来のエタノールおよび化学合成エタノールの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値 (Table 1) を比較すると、それぞれ分子全体の $\delta^{13}\text{C}$ 値はほぼ同じであるのに、IRMS で得られるメチレン基の値が NMR 法で得られる値に対して系統的に約 2% 高くなっていることが見て取れる。従って、植物糖由来のエタノールのメチル基とメチレン基の差の特徴に見られた食い違いは、両計測法の系統

的なずれによるものかもしれない。全く同じ試料を用いた比較ではないので、もちろん試料の違いを反映している可能性も十分にあるが、これまで同じ試料を用いた NMR 法と IRMS 法の相互比較校正は行われたことがなく、今後早急に取り組むべき課題である。

計測法に関してもう 1 つの課題は、標準物質の整備である。現在、分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値の校正に利用可能な標準物質は存在しない。例えば、エタノールに関しては、上記 NMR 法と IRMS 法の相互比較校正に用いる試料が校正用標準物質として利用可能になると考えられるが、純度が高く、均質であり、多量に存在し、変質なく長期保存が可能であり、配布が容易であるという標準物質としての要件を満たすように留意しながら校正用標準物質を選定しなくてはならない。また、規格化にも利用できるように分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値の異なる数試料を揃える必要がある。

5. おわりに

本稿では、有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の例として、生合成の出発物質となるグルコースとグルコースの発酵生成物であるエタノールについて計測法の現状も含め紹介した。グルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布は、様々な生体有機分子の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の解釈に必要な不可欠であるにもかかわらず、これまで 2 例の報告しかなく、またその分布様式の特徴と支配要因についても十分には明らかにされていない。これまでの研究からは、代謝における各酵素反応に伴う同位体効果と光呼吸の程度のような外的環境要因の変化に伴う生理学状態の変化がグルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布様式に大きな影響を与えていると示唆される。また最近の発酵エタノールや酢酸の分析から、CAM 植物のグルコースの分子内分布が特徴的であることが示された。これらのことから、まずは、 C_3 、 C_4 、CAM 植物由来のグルコースについて分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布を網羅的に調査し、炭素固定経路の観点からグルコースの分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の特徴を明らかにすることが必要である。一方で、グルコースの代謝に関わる種々の酵素反応の同位体効果を決定することも重要である。得られる同位体効果の情

報を取り入れて、最終的には、グルコース含め炭素固定経路内の代謝物質の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布特徴と炭素固定経路、生理学状態との関係を説明する同位体代謝モデルを構築することが望まれる。植物の成長段階に応じて、区分(例えば葉緑体と細胞質)間の糖の輸送・分割量の変化や糖の蓄積形態の変化など、内的要因変化も分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布様式に影響を与えうるので、このような観測およびモデル化は定常状態が仮定できる成長段階で行うべきであろう。同位体代謝モデルの利用が可能となれば、代謝物質の分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布の変化を外的環境要因の変化による生理学的状態の変化として捉えることが可能となり、分子内 $\delta^{13}\text{C}$ 値分布が有機地球化学的な指標として活用できるようになるであろう。

現在、ルーチンで分子内 ^{13}C 計測が可能であるのは、エタノール、酢酸、アセトアルデヒドといった低分子量の有機分子に限られている。今後有機地球化学的に有用な有機分子(バイオマーカー分子)の分子内 ^{13}C 値分布の計測技術を発展させることが重要である。また現在利用されているNMR法とIRMS法の相互比較校正および校正標準物質の整備が急務である。

謝 辞

本特集号に執筆の機会を与えて下さいました力石嘉人博士(独立行政法人海洋研究開発機構)・大場康弘博士(北海道大学低温科学研究所)にお礼申し上げます。力石嘉人博士・高野淑識博士(独立行政法人海洋研究開発機構)には、本稿の査読を通し、有益なご指摘を頂きました。記して感謝いたします。

引用文献

Abelson P. and Hoering T. (1961) Carbon isotope fractionation in formation of amino acids by photosynthetic organisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 623-632.

Caer V., Trierweiler M., Martin G. and Martin M. (1991) Determination of site-specific carbon isotope ratios at natural abundance by carbon-13 nuclear

magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chem.* **63**, 2306-2313.

Caytan E., Botosoa E.P., Silvestre V., Robins R.J., Akoka S. and Remaud G. (2007) Accurate quantitative ^{13}C NMR spectroscopy: Repeatability over time of site-specific ^{13}C isotope ratio determination. *Anal. Chem.* **79**, 8266-8269.

Corso T.N. and Brenna J.T. (1997) High-precision position-specific isotope analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1049-1053.

Dias R., Freeman K.H. and Franks S.G. (2002) Gas chromatography-pyrolysis-isotope ratio mass spectrometry: a new method for investigating intramolecular isotopic variation in low molecular weight organic acids. *Org. Geochem.* **33**, 161-168.

Farquhar G.D., O'Leary M.H. and Berry J.A. (1982) On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. Plant Physiol.* **9**, 121-137.

Galimov E.M. (1985) Biological Fractionation of isotopes. Academic Press, New York, Toronto, and Orlando.

Galimov E.M. (2006) Phenomenon of life: Between equilibrium and non-linearity. Origin and principles of evolution. *Geochem. Int.* **44**, S1-S95.

Gilbert A., Silvestre V., Robins R. and Remaud G. (2009) Accurate quantitative isotopic ^{13}C NMR spectroscopy for the determination of the intramolecular distribution of ^{13}C in glucose at natural abundance. *Anal. Chem.* **81**, 8978-8985.

Gleixner G., Danier H.-J., Werner R.A. and Schmidt H.-L. (1993) Correlations between the ^{13}C content of primary and secondary plant products in different cell compartments and that in decomposing basidiomycetes. *Plant Physiol.* **102**, 1287-1290.

Gleixner G. and Schmidt H.-L. (1997) Carbon isotope effects on the fructose-1,6-bisphosphate aldolase reaction, origin for non-statistical ^{13}C distributions in carbohydrates. *J. Biol. Chem.* **272**, 5382-5387.

Hattori R. (2011) Discrimination of origin of ethanol by intramolecular carbon isotope ratio. Doctoral dissertation, Tokyo Institute of Technology.

- Hattori R., Yamada K., Kikuchi M., Hirano S. and Yoshida N. (2011) Intramolecular carbon isotope distribution of acetic acid in vinegar. *J. Agric. Food Chem.*, in press.
- Ivlev A.A., Lapin A.V. and Brizanova L.Y. (1987) Distribution of carbon isotopes ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in corn starch glucose. *Soviet Plant Physiol.* **30**, 395-400.
- Krueger D. and Krueger H. (1983) Carbon isotope in vanillin and the detection of falsified "natural" vanillin. *J. Agric. Food Chem.* **31**, 1265-1268.
- Meinschein W.G., Rinaldi G., Hayes J.M. and Schoeller D.A. (1974) Intramolecular isotopic order in Biologically produced acetic acid. *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 172-174.
- Monson D. and Hayes J. (1982) Biosynthetic control of the natural abundance of carbon 13 at specific positions within fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **257**, 5568-5575.
- 奈良岡 浩・山田桂太・松本公平・石渡良志 (1997) ガスクロマトグラフ燃焼質量同位体比分析計を用いた有機分子レベルの軽元素同位体比測定と地球化学への応用. *地球化学* **31**, 193-210.
- Rinaldi G., Meinschein W.G. and Hayes J.M. (1974) Intramolecular carbon isotopic distribution in biologically produced acetoin. *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 415-417.
- Rossmann A., Butenlechner M. and Schmidt H.-L. (1991) Evidence for a nonstatistical carbon isotope distribution in natural glucose. *Plant Physiol.* **96**, 609-614.
- Schmidt H.-L., Kexel H., Butzenlechner M., Schwarz S., Gleixner G., Thimet S., Werner R.A. and Gensler M. (1995) Non statistical isotope distribution in natural compounds: Mirror of their biosynthesis and key of their origin assignment. In *Stable Isotopes in the Biosphere* (eds Wada E., Yoneyama T., Minagawa M., Ando T. And Fry B.). Kyoto University Press, 17-35.
- Tcherkez G., Farquhar G., Badeck F. and Ghashghaie J. (2004) Theoretical considerations about carbon isotope distribution in glucose of C_3 plants. *Functional Plant Biology* **31**, 857-877.
- Thomas F., Randet C., Gilbert A., Silvestre V., Jamin E., Akoka S., Remaud G., Segebarth N. And Guillou C. (2010) Improved characterization of the botanical origin of sugar by carbon-13 SNIF-NMR applied to ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11580-11585.
- Weber D., Kexel H. and Schmidt H.-L. (1997) ^{13}C -pattern of natural glycerol: origin and practical importance. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2942-2046.
- Weilacher T., Gleixner G. and Schmidt H.-L. (1996) Carbon isotope pattern in purine alkaloids. A key to isotope discriminations in C_1 compounds. *Phytochemistry* **41**, 1073-1077.
- Yamada K., Tanaka M. Nakagawa F. and Yoshida N. (2002) On-line measurement of intramolecular carbon isotope distribution of acetic acid by continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 1059-1064.