



Title	Compound- and position-specific stable isotope methods for measuring the consumption of storage protein and lipids in plant physiology : implications for studies in ecology and geochemistry [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	滝沢, 侑子
Citation	北海道大学. 博士(環境科学) 甲第13105号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/70285
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Yuko_Takizawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士 (環境科学)

氏名 滝沢 侑子

学位論文題名

Compound- and position-specific stable isotope methods for measuring
the consumption of storage protein and lipids in plant physiology:
implications for studies in ecology and geochemistry

(植物の貯蔵アミノ酸・脂質の消費に伴う分子レベル／分子内安定同位体分別：
生態学・地球化学研究への応用を目指して)

生体分子中有機化合物の安定同位体比 (δ , 例えば, D/H, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ など) は, 一般的に, 生合成時における「基質の δ 」と, その物理化学・生化学的プロセスにおける「同位体分別 (ϵ)」, 特に生体試料の δ に影響を与えうる ϵ を持った 'Keyプロセス' を記録すると考えられている. これらの組み合わせの普遍性・一般性によってもたらされる生体試料の δ に基づいて, 環境試料から得られた δ は「生合成時の環境因子」や地球表層における「物質の起源や移動」を理解するためのツールとして, 幅広い分野で用いられている. その一方で, 生物は自身を成長させるために, あるいはエネルギーを獲得するために, 比較的短い期間で有機化合物の合成と分解を繰り返すため, その δ には「生合成 (生産) の ϵ 」のみならず「代謝 (分解) の ϵ 」も潜在的に含まれると考えられる. にもかかわらず, この「代謝」すなわち「有機物分解」の過程に, 生体試料の δ に影響を与える 'Keyプロセス' が存在するかどうか, その影響の見積もりに関しては, これまで定量的な議論や証拠が不十分であった. それは「有機物分解に由来する ϵ を観察することの出来る生体試料」を手に入れる困難さと, 有機物分解を定量的に評価するための手法・方法論が, 現状で1つ (アミノ酸安定窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$) を用いたアミノ酸異化 (脱アミノ反応) の評価) に限られており, どの基質 (糖, タンパク質, 脂質) が分解・利用された時に, どの有機分子の, どの元素に記録されるかを, 多面的・複合的に議論することができないためである.

そこで本論文では, 植物試料を対象に, 有機物分解が植物の δ を変えうるファクターになりえるかどうかを, (1) 既存の解析手法である $\delta^{15}\text{N}_{\text{AA}}$ から確認 (Chapter II) するとともに, 脂質を対象とした有機物生産／分解のバランスを評価するための新規手法の確立を目的として (2) 脂質分解に伴う ϵ の有無をパルミチン酸安定炭素・水素同位体比 ($\delta^{13}\text{C}_{16\text{FA}}$, $\delta\text{D}_{16\text{FA}}$) を用いて検討 (Chapter III, Section 3-1) し, (3) そのKeyプロセスと反応部位を明らかにするために脂肪酸分子内安定炭素 (カルボキシル基の炭素) 同位体比 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{FA-COOH}}$) 測定法の開発 (Chapter III, Section 3-2) をおこなった. 「有機物分解の寄与が大きい δ を持つ生体試料」として, Chapter IIでは, 「暗室で保管したサツマイモとそこから出た芽 (Section 2-1)」, 「葉が芽吹く前に咲く花 (Section 2-2)」, 「落葉樹の芽吹き始めの葉 (Section 2-3)」の, 光合成が無い, もしくは弱い条件下で育った3つの植物試料を対象に, Chapter IIIでは「暗室下で発芽させたゴマの種子」を対象とした.

一般的に, 光合成ができる「葉」などの組織が持つアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値は, グルタミン酸とフェニルアラニン

の差にして -8.4‰ , そこから算出されるエネルギー的栄養段階 ($TP_{\text{Glu/Phc}}$) は1.0であるのに対して, Section 2-1では, イモは -5.6‰ ($TP_{\text{Glu/Phc}}=1.4$), 芽は 0.7‰ ($TP_{\text{Glu/Phc}}=2.2$) という高い値を示した. これらの結果は, 植物試料から有機物分解 (アミノ酸の異化) のシグナルを検出できた初めての例である. またSection 2-2では, 葉が芽吹く '前' に咲く花における ^{15}N の濃縮 ($TP_{\text{Glu/Phc}}$ の上昇) は, 葉が芽吹いた '後' に咲く花 ($TP_{\text{Glu/Phc}}=1.0\pm 0.1$) に比べて, 顕著に大きくなる ($TP_{\text{Glu/Phc}}=2.2\pm 0.3$) ことが明らかとなった. これらの事実は, 光合成が弱い状況において, 植物はエネルギーや基質を得るために, 生体内に存在するアミノ酸を分解・利用すること, そしてそのアミノ酸の分解 (脱アミノ反応) とそれに伴う ϵ は, 植物の δ を変えうるKeyプロセスとして機能することを証明している. そしてSection 2-3では, このようなアミノ酸の分解と利用は, 落葉樹の葉が芽吹くプロセスにおいても共通しており, そのシグナルは芽吹き初期において顕著になり ($TP_{\text{Glu/Phc}}=1.7$), その後, 葉の成長に伴って減少 ($TP_{\text{Glu/Phc}}=1.1$) することを明らかにした. これらの結果から, 植物の δ には, 確かに有機物分解のシグナルが保存される可能性があり, そこにはアミノ酸の生産/分解のバランスの情報が記録されることが明らかとなった.

Section 3-1では「脂質の分解過程において, 検出可能な ϵ が得られるかどうか」を検証するために, 暗室下で「種子 (貯蔵性脂質であるトリアシルグリセロール: TAGを多く含む)」を発芽させる実験をおこない, 発芽前と後との試料を対象に, 相対存在量, 安定炭素・水素同位体比 (それぞれ $\delta^{13}\text{C}_{16\text{FA}}$ 値, $\delta\text{D}_{16\text{FA}}$ 値) を測定した. その結果, 発芽前 (種子) に比べて, 発芽後 (芽) では, 試料中のパルミチン酸成分の相対存在量は49%まで減少し, $\delta^{13}\text{C}_{16\text{FA}}$ 値のみにおいて有意な差 ($+2.9\pm 1.7\text{‰}$) を得た ($\delta\text{D}_{16\text{FA}}$ 値は測定誤差範囲内). これらの「相対存在量の減少」と「 ^{13}C の濃縮」という結果は (1) 暗室下で発芽する種子は, 確かにTAGを消費すること, そして(2)「脂質の分解過程に「炭素」を反応部位とした ϵ が存在する」ことを示唆した. Keyプロセスの候補としては, 脂質の異化・利用の初期過程である「酵素による貯蔵性脂質の加水分解 (TAG \rightarrow グリセロール + 脂肪酸)」が考えられ, もしこれが正しいければ, その時の反応部位は「貯蔵性脂質中の脂肪酸成分のカルボキシル基の炭素」となり, $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA-COOH}}$ 値はマスバランスにより $48\pm 27\text{‰}$ と算出される. これを検証するために, Section 3-2では貯蔵性の脂肪酸 (C16, C18など) を対象として, 分子内安定炭素 (カルボキシル基の炭素) 同位体比測定法を開発した. 分析系の構築は, ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計 (GC-IRMS) に, カルボキシル基の炭素の脱炭酸をおこなう熱分解炉 (1100°C) を設置することで達成した. これを用いて $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA-COOH}}$ 値を測定した結果, 発芽後の試料に含まれる脂肪酸成分のカルボキシル基の炭素に, 顕著に高い $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA-COOH}}$ 値 (63‰ の上昇) を検出した. 以上の事実から, 貯蔵性脂質 (すなわちTAG) が, 発芽のプロセスにおいて主要なエネルギー・基質の源になっていること, そして貯蔵性脂質の「酵素による加水分解」が, 炭素同位体に関して大きな ϵ を生み出すKeyプロセスであることを証明した. 本研究で得られた成果は, 今後, 生体試料や環境試料を対象とした「生合成と代謝 (生産と分解) を区別した」評価, 特に「有機物分解の定量的評価」をおこなう上での有力なツールとなる可能性を持っており, 物質循環・環境変遷の解析ツールとして役立てられることが期待される.