HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(環境科学)
Dissertation Number	甲第13105号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70285
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuko_Takizawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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, $^{13}C/^{12}C$, $^{15}N/^{14}N$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（$\delta^{15}N_{AA}$）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$\delta^{15}N_{AA}$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（$\delta^{13}C_{16FA}$，δD_{16FA}）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（$\delta^{13}C_{FA\text{-}COOH}$）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$\delta^{15}N$ 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（$TP_{Glu/Phe}$）は1.0であるのに対して，Section 2-1では，イモは−5.6‰（$TP_{Glu/Phe}$=1.4），芽は0.7‰（$TP_{Glu/Phe}$=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（$TP_{Glu/Phe}$の上昇）は，葉が芽吹いた‘後’に咲く花（$TP_{Glu/Phe}$=1.0±0.1）に比べて，顕著に大きくなる（$TP_{Glu/Phe}$=2.2±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の初期において顕著になり（$TP_{Glu/Phe}$=1.7），その後，葉の成長に伴って減少（$TP_{Glu/Phe}$=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$\delta^{13}C_{16FA}$値，δD_{16FA}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，$\delta^{13}C_{16FA}$値のみにおいて有意な差（+2.9±1.7‰）を得た（δD_{16FA}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 →グリセロール + 脂肪酸）」が考えられ，もしこれが正しければ，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，$\delta^{13}C_{FA\text{-}COOH}$値はマスバランスにより48±27‰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$\delta^{13}C_{FA\text{-}COOH}$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$\delta^{13}C_{FA\text{-}COOH}$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．