HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アミノ酸の安定同位体比を用いた生態系解析
Author(s)	力石, 嘉人
Citation	低温科学, 79, 13-21
Issue Date	2021-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.79.13
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81014
Type	departmental bulletin paper
File Information	05_p013-021_LT79.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 79 （2021） 13-21
doi: 10.14943/lowtemsci. 79. 13

アミノ酸の安定同位体比を用いた生態系解析

力石　嘉人[1)]

2020 年 12 月 5 日受付，2021 年 2 月 10 日受理

アミノ酸の安定窒素同位体比の測定法の開発と方法論の確立を経て，生物の栄養段階（生態系ピラミッドにおける階層）が優れた精度で推定できるようになったことにより，生物・生態系の研究は飛躍的に発展した．実際に，複雑な食物連鎖網における捕食―被食の関係や，生態系の中で何が起こっているのか，環境変化に対する影響や生物の適応などが正確に理解できるようになった．本稿ではその原理と応用研究を解説する．

Food webs viewed via stable nitrogen isotopic composition of amino acids

Yoshito Chikaraishi

Stable nitrogen isotope analysis of individual amino acids can be useful to illustrate the trophic position of organisms in food webs, and therefore has resulted in impressive advances in ecological studies. Indeed, this analysis has provided unprecedented accuracy in predicting the trophic tendencies of organisms, describing their interactions in complex food webs, elucidating the adaptation of organisms to environmental changes, etc. Here, we briefly review the principal of this tool and its application.

キーワード：安定同位体，窒素，アミノ酸，栄養段階，食物連鎖
Stable isotope, Nitrogen, Amino acid, Trophic position, Food web

1．はじめに

自然界の生態系では，生物間の捕食―被食の関係が極めて複雑に絡み合っており，その全容を観察等から正確に理解することは難しい．そこで生態学では，一次生産者（例：植物プランクトン）を「1」として，それを食べる一次消費者（例：動物プランクトン）を「2」，それを食べる二次消費者（例：小さい魚）を「3」，さらにそれを食べる三次消費者（例：大きい魚）を「4」とする「栄養段階」という概念を導入し，生態系ピラミッドにおける生物の位置（または，階層）を定量的な数字で捉えることで，複雑な生態系を単純化して理解してきた（図 1）．実際に，この栄養段階（値）もしくはその変化を知ることで，我々は，生物が何を食べているのかといった食性解析のみならず，生態系におけるそれぞれの生物の機能・役割や，人類活動が自然界の生物・生態系に与えている影響を評価してきた（例えば，VanderZanden et al., 1999）．

栄養段階を求める（数値化する）ために，これまで生態学では様々な手法が用いられてきた．しかし，自然界では，植物と草食動物を除く生物の多くが雑食者（omnivore：植物と動物の両方を食べる動物，multiple carnivore：様々な栄養段階の動物を食べる動物）であるために，研究対象の生物の「エサ生物」の特定は容易ではない．また，たとえ数値化できたとしても，得られた値には大きな誤差（例えば，栄養段階で±1～2）が潜在的に含まれており，導き出した値の正確さを担保できな

連絡先
力石　嘉人
北海道大学低温科学研究所
〒060-0819　札幌市北区北 19 条西 8 丁目
Tel. 011-706-5472
e-mail：ychikaraishi@lowtem.hokudai.ac.jp
1）北海道大学低温科学研究所
Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan

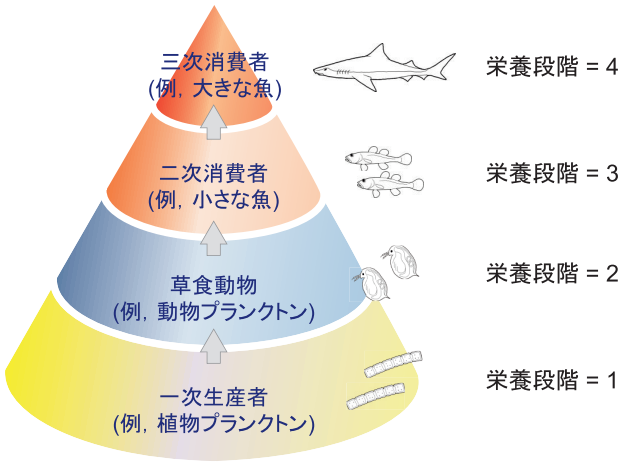


図 1：生態系ピラミッドの概念図と栄養段階

かった．例えば，体や口の大きさ，歯の形などを観察することで，生物間の相互関係を推定することも可能ではあるものの，栄養段階の「数値化」に至るのは困難である．また，胃内容物の解析は，研究対象の生物が実際に摂食したものがわかる一方で，自然界における捕食活動の一瞬のスナップショットでしかない．その上，胃の中に残存するものと捕食者が吸収したものは必ずしも一致しないというという問題があった．そこで，これまでの手法のデメリットを克服しうる手法として，2007～2009年にかけて，アミノ酸の窒素同位体比に基づく生物の栄養段階解析法が提案された（Chikaraishi et al, 2009, McCarthy et al., 2009, Popp et al., 2009）．これは，生物に含まれている 2 種類のアミノ酸の安定同位体比（$^{15}N/^{14}N$）の差を計測することによって生物の栄養段階を正確に推定する手法であり，提案されてから約 10 年の間に様々な研究に応用されるようになった．本稿では，その原理と代表的な研究例を紹介したい．

2．原理

2.1．安定同位体比の表記

アミノ酸は，水素・炭素・窒素・酸素・硫黄などの元素で構成され，これらの元素には質量が僅かに異なる安定同位体が存在する．例えば，窒素の場合，99.6337%が質量数 14 の窒素 14（^{14}N）で，残りの 0.3663%が質量数 15 の窒素 15（^{15}N）であり，安定同位体比の比率（$^{15}N/^{14}N$）は 0.0036765 となる．しかしこの値は，地球上の様々な生化学的反応において，質量が異なることに起因する「軽い同位体（例えば，窒素の場合には ^{14}N）の優先的な反応」が起こるために，元素の起源，反応過程，反応量などで変化する（$^{15}N/^{14}N$ の小数点 4，5 桁目が変化する）．

試料に含まれる安定同位体の比率の表記には，一般的に，国際的に定められた標準物質に対する千分率（δH 値，単位‰，式 1）が用いられている．

$$\delta H\ 値 = [(R_{試料}/R_{標準物質}) - 1] \times 1000 \qquad (式\ 1)$$

ただし，$R = H/L$

H と L は，それぞれ重い（例えば，^{15}N）と軽い（例えば，^{14}N）同位体の存在量を表す．従って，δH 値は，窒素の場合には $\delta^{15}N$ 値と表記する．試料の δH 値が正であれば，標準物質に対して重い同位体（H）が富むことを意味し，反対に負であれば，軽い同位体（L）が富むことを意味する．

2.2．食物連鎖におけるアミノ酸の $\delta^{15}N$ 値の変化

生物を構成する 20 種類のアミノ酸には，食物連鎖の捕食者と被食者の間で，$\delta^{15}N$ 値がほとんど変化しない Source アミノ酸（Src-AA，例えば，フェニルアラニン，メチオニンなど）と，$\delta^{15}N$ 値が 3-8‰上昇する Trophic アミノ酸（Tr-AA，例えば，グルタミン酸，アラニン，バリンなど）の 2 種類がある（図 2，図 3）[※1]．Src-AA は，分解（エネルギーを取り出すための異化）の初期反応にアミノ酸のアミノ基（窒素）が関与しないため，捕食者が Src-AA を分解しても $\delta^{15}N$ 値がほとんど変化しない．一方で Tr-AA は，分解の初期反応がアミノ基の脱離反応であるために，^{14}N が優先的に反応し，その結果，分解されずに残されたアミノ酸（このアミノ酸は後に捕食者の体を構築する）に ^{15}N が濃縮する（例えば，Chikaraishi et al., 2007, Takizawa et al., 2020）．そしてこのプロセスが，魚，甲殻類，昆虫，哺乳類，バクテリアなどの多くの生物の間で共通して成立するため（例えば，Steffan et al., 2015, Yamaguchi et al., 2017, McMahon and McCarthy, 2016），植物プランクトンから高次捕食者まで，生態系を構成する様々な生物の栄養段階が，以下の一般式（式 2）により推定できる（Chikaraishi et al., 2009）．

$$栄養段階 = (\delta^{15}N_{Tr} - \delta^{15}N_{Src} + \beta)/(\Delta_{Tr} - \Delta_{Src}) + 1 \qquad (式\ 2)$$

[※1]「Source アミノ酸，Trophic アミノ酸」の分類は，生体内でのアミノ酸の「分解反応」により決定される．一方で，一般的に使われている「必須アミノ酸，非必須アミノ酸」の分類は，生体内でのアミノ酸の「合成反応」により決まっている．また，Source アミノ酸なのか Trophic アミノ酸なのか，もしくは，さらに別の分類になるのかがわかっていないアミノ酸も多い．

分類	Trophic	Source	その他（よくわかっていない）
非必須	アラニン　アスパラギン酸　アスパラギン グルタミン　グルタミン酸　プロリン		グリシン　セリン　システイン　トレオニン
必須	バリン　ロイシン　イソロイシン	フェニルアラニン メチオニン	スレオニン　アルギニン　ヒスチジン リシン　トリプトファン

図 2：アミノ酸の分類

$\delta^{15}N_{Src}$，$\delta^{15}N_{Tr}$ はそれぞれ，Src-AA と Tr-AA の $\delta^{15}N$ 値を，β は一次生産者（植物や植物プランクトンなど）における両者のアミノ酸の $\delta^{15}N$ 値の差を，Δ_{Src}，Δ_{Tr} は，Src-AA と Tr-AA の食物連鎖の捕食者と被食者の間での $\delta^{15}N$ 値の変化を示す（図 3）．Src-AA と Tr-AA には，原理的には，様々なアミノ酸を組み合わせて用いることも，いくつかのアミノ酸の $\delta^{15}N$ 値の平均値を用いることも可能であるが，個々の生物におけるバラツキや，$\delta^{15}N$ 値の測定し易さを考慮すると，Src-AA にフェニルアラニンを，Tr-AA にグルタミン酸を用いた場合において，最も優れた精度（$1\sigma = 0.1$〜0.2）で栄養段階を求めることができると報告されている（Chikaraishi et al., 2009）．

$$\text{栄養段階} = (\delta^{15}N_{\text{グルタミン酸}} - \delta^{15}N_{\text{フェニルアラニン}} + \beta)/(8.0-0.4)+1 \quad \text{（式 3）}$$

フェニルアラニン，グルタミン酸の Δ 値はそれぞれ 0.4‰，8.0‰である．フェニルアラニン，グルタミン酸を用いた場合には，β は陸上植物（正確には，水草も含む維管束植物）を基点とする生態系では 8.4‰であり，海水・淡水における植物プランクトンやシアノバクテリアを基点とする生態系では −3.4‰となる（Chikaraishi et al., 2010）．

なおこの原理が，全ての生物において成立する（同じ，Δ_{Src}，Δ_{Tr} 値を持つ）かどうかは，残念ながら十分にわかっていない（例えば，McMahon and McCarthy, 2016）．測定法の信頼性を担保するうえで，様々な生物が持つ Δ_{Src}，Δ_{Tr} 値やそのバラツキ（そしてその要因）を知る必要があるが，同位体比が一定のエサを用いて，アミノ酸のターンオーバーを考慮したうえでの十分な期間の飼育を実施（これを controlled feeding experiment という）

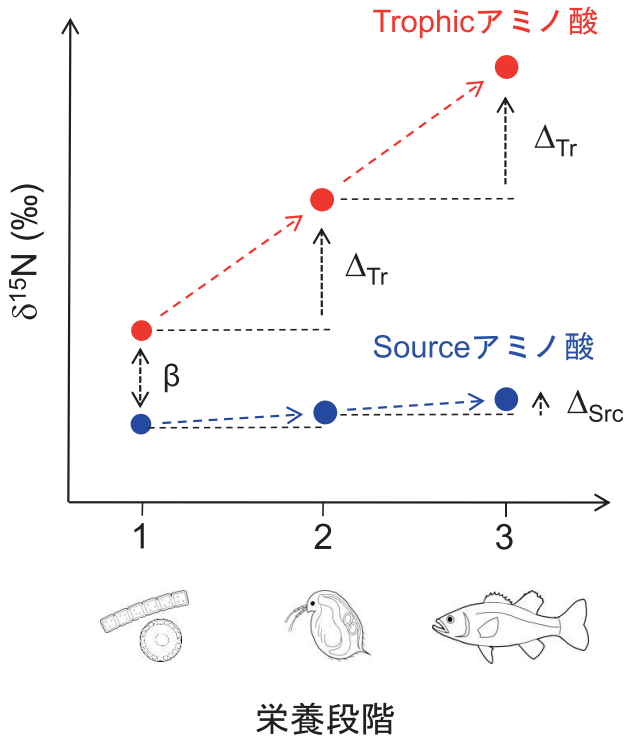


図 3：食物連鎖におけるアミノ酸の安定窒素同位体比の変化

することは容易ではない．そのため，とくに，単一のエサでの飼育が難しいとされる生物（爬虫類，鳥類，大型の動物など）や，寒冷域や無酸素環境などといった特殊な条件下で生育する生物に関するデータが著しく不足している．

2.3. アミノ酸の $\delta^{15}N$ 値の測定

アミノ酸の $\delta^{15}N$ 値の測定は一般的に，(1)試料の酸加水分解，(2)誘導体化と精製，(3)ガスクロマトグラフ—同位体比質量分析計（gas chromatograph-isotope ratio mass spectrometer：GC-IRMS）による $\delta^{15}N$ 値の測定により実施される．「(1)試料の酸加水分解」では，試料に

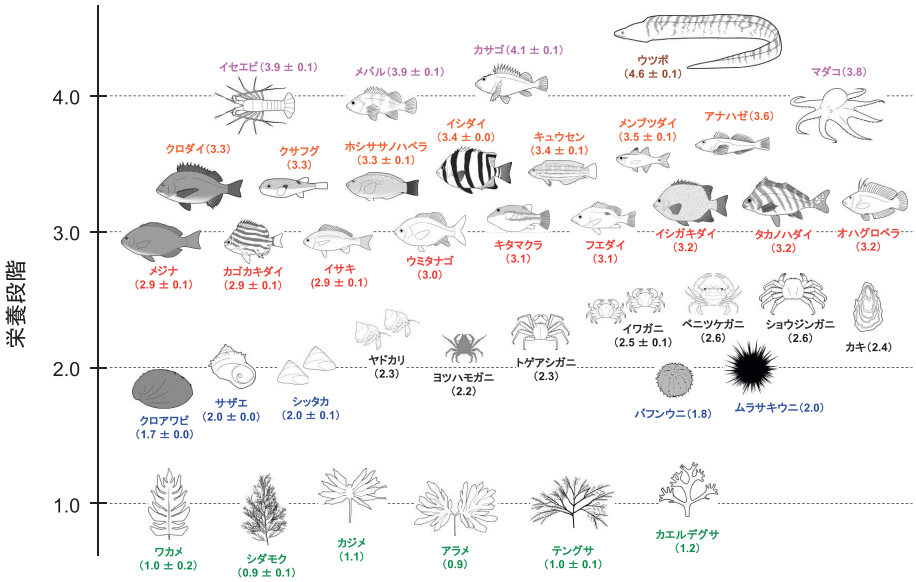


図 4：アミノ酸の δ^{15}N 値より求められた相模湾沿岸の岩礁域の生態系構造（Chikaraishi et al., 2014 を改変）

濃塩酸（HCl）を加え加熱することで，試料中のタンパク質をアミノ酸に加水分解する．「(2)粗精製と誘導体化」では，まず試料中の脂質成分を液―液抽出により除去し，アミノ酸が持つ「高い親水性，極性」という性質を，誘導体化（本誌，第 1 章，安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法―1：ガスクロマトグラフ-同位体比質量分析計を参照）により低下させ，また，GC-IRMS へ導入できるように精製する．これまでに，様々な誘導体化法が検討され用いられてきているが，試薬の毒性，誘導体化後のアミノ酸の安定性，GC-IRMS への負荷，誘導体化反応における同位体分別など様々（一長一短）である（Ohkouchi et al., 2017）ため，それぞれの研究室の環境にあわせて誘導体化法を選択する必要がある．またそれと並行して，誘導体化剤の毒性が低く，誘導体化されたアミノ酸の安定性が高く，また GC-IRMS へ与える負荷と人為的な同位体分別の影響が最小限にとどめられるような理想的な誘導体化法を開発する必要がある．なお著者の研究室では，アミノ酸のカルボキシル基（-COOH）をイソプロピルエステル化し，アミノ基をピバロイル化するピバロイル／イソプロピル（pivaloyl/isopropylesters, Pv/iPr）エステル化を用いている．「(3) GC-IRMS による δ^{15}N 値の測定」では，GC-IRMS による δ^{15}N 値の測定では，1 度の試料導入に対して，そこに含まれる個々のアミノ酸の δ^{15}N 値が測定される．δ^{15}N 値の測定に必要な時間は一般的に 1 測定あたり約 1～1.5 時間，試料量はアミノ酸一分子あたり窒素量で数ナノモル，測定精度は 0.4～0.8‰（1 σ）程度である．この測定手法は，冷凍試料や乾燥試料だけでなく，ホルマリンなどで固定されたもの，貝殻や骨，歯などの硬組織中に含まれているタンパク質にも問題なく用いることができる（例えば，Ogawa et al., 2013, Chikaraishi et al. 2014）．実際に，少なくとも数万年前の人骨や動物骨などの考古学的試料への応用も実施されている（例えば，Naito et al., 2010, 2013, 2016, Itahashi et al., 2018, 2019）．

3．実試料への応用

3.1．岩礁域生態系の構造解析

岩礁域では，多種多様な生物が生息し，また，捕食―被食関係が絡み合っているため，複雑な生態系構造を持つ．Chikaraishi et al.（2014）は，相模湾沿岸の岩礁域に生息する海藻，貝，カニ，エビ，魚などの様々な生物を採取し，アミノ酸の δ^{15}N 値から栄養段階を求め，岩礁域の生態系構造を視覚化した（図 4）．アミノ酸の δ^{15}N 値から見積もられた栄養段階は，ワカメなどの海藻が 0.9～1.1，アワビやサザエなどの海藻食の貝やウニなどが 1.7～2.0 であり，前者が一次生産者，後者が一次消費者であることがわかる．また，カニ・ヤドカリ・牡蠣などの栄養段階は，2.2～2.6 であり，これらの値から彼らが omnivore（植物と動物の両方を食べる雑食動物）であることがわかる．さらに様々な魚，伊勢エビ，マダコなどの栄養段階は，それぞれ，2.9～4.6，3.9，3.8 に分布し，彼らはこの海域における multiple carnivore（様々な栄養段階の動物を食べる雑食動物）であることがわかる．このように，アミノ酸の δ^{15}N 値から求めた栄養段階（誤差が± 0.1～0.2）から，雑食性のカニの中でも藻食性が

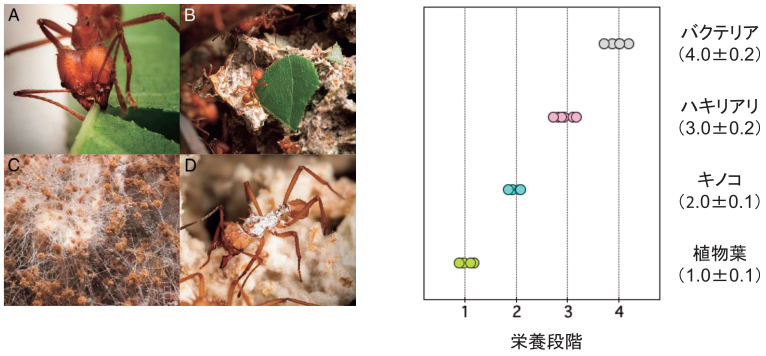


図 5：アミノ酸の δ^{15}N 値より求められた，植物葉，キノコ，ハキリアリ，ハキリアリの体に付いているバクテリアの栄養段階（Steffan et al., 2015）．写真：(A)植物葉を切り取っているハキリアリ，(B)切り取った葉を巣に運んでいるハキリアリ，(C)栽培されているキノコ（菌類），(D)アリの体に付いている白いバクテリア

強いものから肉食性の強いものがいることや，魚でも種類によって食性が多様であることを明らかとなった．

3.2. ハキリアリが構築する生態系

ハキリアリは，北アメリカの東南部や中南米の熱帯雨林に生息するアリである．キノコ(菌類)をエサとしているが，そのキノコはハキリアリ自らが，様々な木の葉を切り取り，巣に運び，巣の中で栽培したものである．Steffan et al.,（2015）は，ハキリアリの生態系を実験室で飼育・再現し，基礎生産者である植物の葉（*Quercus macrocarpa*），それを基に育てられたキノコ（*Leucoagaricus gongylophorus*），ハキリアリ（*Acromyrmex echinatior*），そしてハキリアリの体に付いているバクテリア（Actinobacteria：*Pseudonocardia*）をそれぞれ採取し，アミノ酸の δ^{15}N 値から栄養段階を算出し，生態系構造を視覚化した（図 5）．アミノ酸の δ^{15}N 値から見積もられた栄養段階は，植物葉が 1.0±0.1，キノコが 2.0±0.1，アリが 3.0±0.2 であり，当初の予想通りに，「植物葉はキノコのエサ」であり，また，「キノコはアリのエサ」であることが証明された．さらに興味深いことに，ハキリアリの体に付いているバクテリアの栄養段階は 4.0±0.2 であり，ハキリアリはバクテリアに食べられており，バクテリアはこの生態系において栄養段階の頂点にいることが明らかとなった．

3.3. 海鳥の栄養段階の推移

ハワイ諸島には，Hawaiian Petrel（*Pterodroma sandwichensis*）という海鳥が生息しており，彼らはイカや魚などを捕食する multiple omnivore であると考えられている．Hawaiian Petrel の体サイズは，この数百年間で著しく減少したことが骨格標本などの記録からわかって

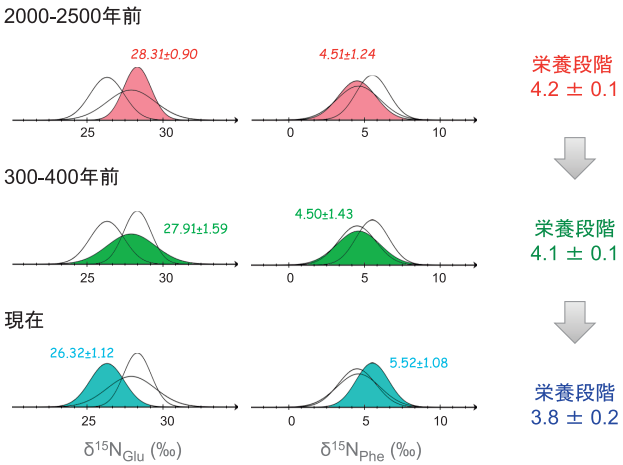


図 6：2000–2500 年前，300–400 年前，現在の Hawaiian Petrel の骨コラーゲンに含まれるアミノ酸（グルタミン酸とフェニルアラニン）の δ^{15}N 値，および求められた栄養段階（Ostrom et al., 2017）

いる．一般的に，生態系の上位にいる生物は，環境変化に対して最も影響を受けやすいと考えられいるため，Ostrom et al.（2017）は，2000–2500 年前，300–400 年前，現在の Hawaiian Petrel の骨から，骨コラーゲンに含まれるアミノ酸の δ^{15}N 値を測定し，それぞれの年代の Hawaiian Petrel の栄養段階を算出した（図 6）．骨コラーゲンに含まれるフェニルアラニンとグルタミン酸の δ^{15}N 値および栄養段階は，2000–2500 年前と 300–400 年前の試料の間ではほとんど変化しなかったのに対し，300–400 年前と現在の試料の間では，フェニルアラニンの δ^{15}N 値が 1.0‰の上昇を，グルタミン酸の δ^{15}N 値が 1.6‰の減少を示し，それに伴い栄養段階が 0.3 減少した．この年代（300–400 年前～現代）は，ハワイ諸島周辺において産業漁業が発展した時期であり，このことから，Hawaiian Petrel と人間との間で，魚などのエサ資源の

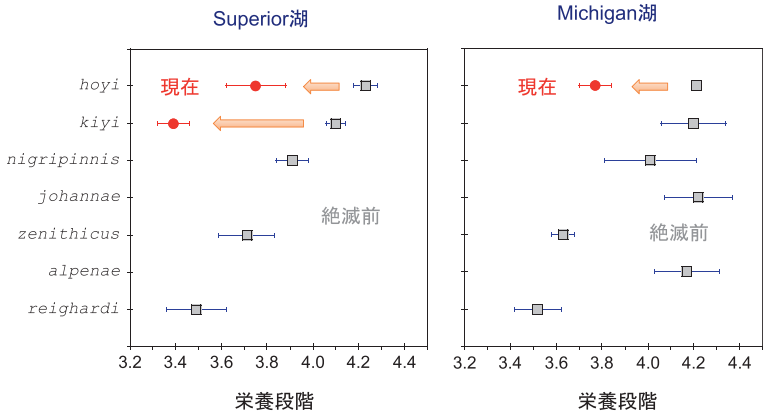


図 7：アミノ酸の δ^{15}N 値より求められた，アメリカ・五大湖（Superior 湖と Michigan 湖）の *Coregonus* 種の栄養段階：灰色が絶滅前で赤色が現存種（Blanke et al., 2018）

競争が激化したこと，それに伴いハワイ近海の生態系ピラミッドのサイズが小さくなった（食物連鎖が短くなった）ことが考えられた．

3.4. 五大湖の *Coregonus* 種の栄養段階の推移

アメリカ合衆国の五大湖には，かつて多くの種類の *Coregonus* 種（サケ科の淡水魚）が生息していたが，現在ではその多くが姿を消し，数種が確認できる程度である．Blanke et al.（2018）は，絶滅前に捕獲され，ホルマリン漬けで保管されていた 7 種，そして現在の湖から採取した 2 種の *Coregonus* 種を対象に，アミノ酸の δ^{15}N 値を測定し，絶滅前後における栄養段階の変化を比較した（図 7）．アミノ酸の δ^{15}N 値から見積もられた栄養段階は，絶滅前の *Coregonus* 種では 3.4〜4.2 と多様であり，*C. hoyi* と *C. kiyi* の 2 種では 4.0 以上という高い値となった．一方で，現存する *C. hoyi* と *C. kiyi* の 2 種の栄養段階は，それぞれ，3.8，3.4 であり，絶滅前に比べて栄養段階は著しく低下していることがわかった．この結果は，Ostrom et al.（2017）で述べたように，生態系に対する人間の介入（過剰な漁業による大きな環境変化）によって，*C. hoyi* と *C. kiyi* の 2 種は，短い食物連鎖の中で生きることを強いられている（短い食物連鎖に適応できたために生き残れた）ことを示唆している．一方で，他の多くの *Coregonus* 種は，このような外圧や大きな環境変化に耐えられなかったために絶滅してしまったと考えることができた．

3.5. 環境変化に伴う生物の栄養段階の変化

植物と草食動物を除く多くの生物の食性は，3.3. や 3.4. 章で述べてきたように，環境の変遷に伴って変化するポテンシャルを持っている．多様な種類の生物を摂食して生きていくことが可能な生物は，「ジェネラリスト（generalist）」とよばれ，彼らの栄養段階は，環境の変化（とくにエサ生物の多様性の変化）に対応して変化すると考えられている．一方で，限定的な，あるいは単一の種類の生物をエサとして食べる生物は，「スペシャリスト（specialist）」とよばれ，彼らの栄養段階は，環境の変化が起こったとしても変化せず，一定の値をもつと考えられている．この概念に基づくと，先述の 3.3，3.4. 章で示した Hawaiian Petrel や *C. hoyi* と *C. kiyi* は，generalist であるがゆえに，人間活動（漁業）によって生息環境が著しく変化しても，食性（エサ生物のバランス）を変化させることで生き残り，一方で絶滅してしまった多くの種類の *Coregonus* 種は，specialist であったために，生息環境の変化に対応できなかったと解釈することができる．この仮説を証明するために，Choi et al.（2020）は，韓国の河川に生息するカマツカ（*Pseudogobio esocinus*，specialist の代表種）とブラックバス（*Micropterus salmoides*，generalist の代表種）を，河川の複数地点から採取し，アミノ酸の δ^{15}N 値から栄養段階とその標準偏差（1 σ）を求め，生息数と生息環境のエサ資源の多様性との関係を調べた（図 8）．その結果，カマツカの栄養段階は，どのような生息環境であってもほとんど同じ値を持つが（標準偏差は 1 σ = 0.2 と非常に小さい），その個体数は，生息環境のエサ資源の多様性が小さくなるとともに，減少していることがわかった．一方でブラックバスについては，生息環境のエサ資源の多様性が小さくなると栄養段階は上昇し，その際に標準偏差も小さくなることがわかった．また，ブラックバスの個体数は，生息環境が変化してもほとんど変化しなかった．この結果は，generalist は，食性の多様性が大きいために，環境の変化（エサ資源の変化）に順応して個体数を維持するこ

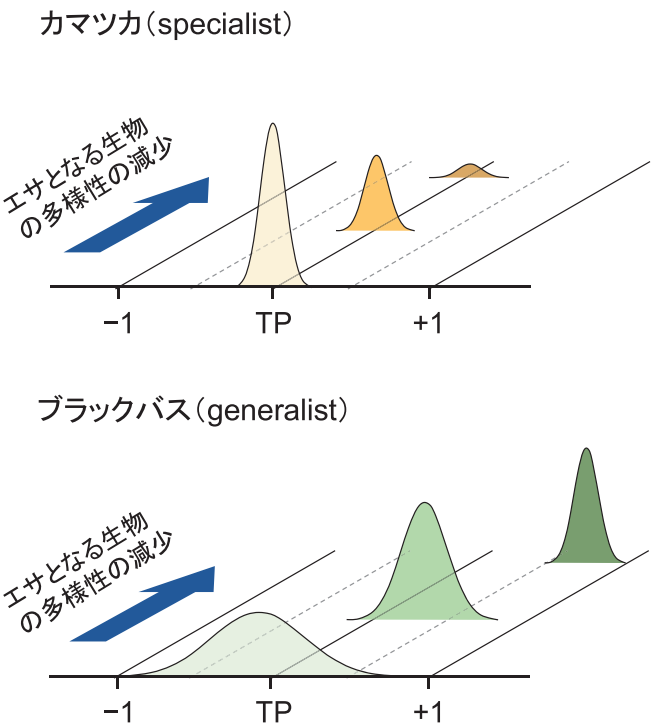


図 8：アミノ酸の δ^{15}N 値より求められた，カマツカとブラックバスの栄養段階とそのバリエーションの変化，生息数（標準分布のサイズ）と生息環境のエサ資源の多様性との関係（Choi et al., 2020）．

とができるのに対して，specialist は食性の多様性が小さいために，環境の変化（エサ資源の変化）に対応できずに個体数を維持できなくなっていることを，明確に示した．

4．今後の課題

研究対象の生物に含まれるアミノ酸の δ^{15}N 値に基づいて，その生物の栄養段階を優れた精度（1 σ=0.1〜0.2）で推定できる解析手法を確立したことは，生態学分野に大きなブレイクスルーをもたらし，この手法は，生態学のみならず，考古学・海洋生物学・昆虫学・地球化学などの周辺分野の研究においても積極的に用いられるようになった．しかし，この手法を広く，多様な生物・生態系に適用するためには，克服せねばならない以下の 3 つの大きな課題がある．

(1) controlled feeding experiment により，様々な生物種について，エサと飼育生物の間の Δ_{Src}，Δ_{Tr} 値を決定すること（2.2 参照）

(2) 用いる試薬の毒性が低く，化学的に安定な誘導体化物を生じ，かつ GC-IRMS への負荷が少なく，さらに人為的な同位体分別を生じない誘導体化法を，開発すること（2.3 参照）

(3) Δ_{Tr} 値が，様々な生物種で一定になる原理・科学的根拠（または，一定にならない時の特異的な条件）を明らかにすること

本誌第 1 章（安定同位体の天然存在量および安定同位体標識の検出法―1：ガスクロマトグラフ–同位体比質量分析計）で説明されているように，食物連鎖の捕食者と被食者の間での Trophic アミノ酸の δ^{15}N 値の上昇は，捕食者が，エサ（被食者）由来のアミノ酸を，脱アミノ化する際に生じる速度論的同位体分別のためであり，その程度（同位体分別の大きさ，Δ_{Tr}）はレイリーモデル（式 4）に従う．

$$\Delta_{Tr} \fallingdotseq 1000[F^{(\alpha-1)}-1] \qquad (式\ 4)$$

Δ_{Tr} が反応前後での同位体比の変化（$\delta^{15}N_{t=x}-\delta^{15}N_{t=0}$）を，$F$ が反応のフラックス（脱アミノ化されずに残ったアミノ酸の割合）を，α が反応固有の同位体効果（例えばグルタミン酸の場合，α=0.9938，Goto et al., 2018）を示す．この式 4 に基づくと，Δ_{Tr} 値は，脱アミノ化する反応のフラックス（F），すなわち「捕食者がエサ（被食者）由来のアミノ酸をどのくらい分解したか」の関数になる．シンプルに考えれば，F は，生物の成育環境や条件や，エネルギー消費量などにより多様になると考えら

れるが，実際には，魚，甲殻類，昆虫，哺乳類，バクテリアなどの多くの生物で，Δ_{Tr} 値（とくにグルタミン酸）は，ほとんど一定の値を持ち（例えば，Steffan et al., 2015, Yamaguchi et al., 2017, McMahon and McCarthy, 2016），それ故，前述の 3.1〜3.5 で述べたように，アミノ酸の δ^{15}N 値は，一次生産者から高次捕食者までの様々な生物の栄養段階の推定に適用することができる．それでは一体なぜ，多くの生物で Δ_{Tr} 値が類似した値になる（例えば，グルタミン酸で 8.0‰という値が普遍的に見つかる）のか，一方で，一体どのような条件，環境で，この Δ_{Tr} 値が変化するのかは，今後明らかにすべき課題である．

謝辞

本稿の内容は，日本学術振興会科学研究費，基盤研究 A（一般）20H00185（研究代表者　力石嘉人），挑戦的研究（萌芽）19H21888（研究代表者　力石嘉人）及び，シリコーン工業会（Silicon Industry Association of Japan）からの寄付金で実施した研究成果の一部を取りまとめたものである．

引用文献

Blanke, C., Chikaraishi, Y. and Vander Zanden, M. J. (2018) Historical niche partitioning and long-term trophic shifts in Laurentian Great Lakes deepwater Coregonids. *Ecosphere*, **9**, e02080.

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.

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 *Earth, Life, and Isotopes* (Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K., eds), Kyoto University Press, pp. 37–51.

Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, F. N., Sasaki, Y., Tsuchiya, M. and Ohkouchi, N. (2014) High-resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecol. Evol.*, **4**, 2423–2449.

Choi, B., Lee, C., Takizawa, Y., Chikaraishi, Y., Oh, H.-J. Chang, K.-H., Jang, M.-H., Kim, H.-W., Lee, K.-L. and Shin, K.-H. (2020) Trophic response to ecological conditions of habitats: Evidence from trophic variability of freshwater fish. *Ecol Evol.*, **10**, 7250–7260.

Goto, A. S., Miura, K., Korenaga ,T., Hasegawa, T., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2018) Fractionation of stable nitrogen isotopes (^{15}N/^{14}N) during enzymatic deamination of glutamic acid: implications for mass and energy transfers in the biosphere. *Geochem. J.*, **52**, 273–280.

Itahashi, Y., Tsuneki, A., Dougherty, S. P., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. and Yoneda, M. (2018) Reconstruction of Neolithic food consumption based on the δ15N values for individual amino acids at Tell el-Kerkh, northern Levant. *J. Archaeol. Sci.: Rep..*, **17**, 775–784.

Itahashi, Y., Erdal, Y. S., Tekin, H., Omar, L., Miyake, Y., Chikaraichi, Y., Ohkouchi, N. and Yoneda, M. (2019) Amino acid ^{15}N analysis reveals change in the importance of freshwater resources between the hunter-gatherer and farmer in the Neolithic upper Tigris. *Ame. J. Phys. Anthropol.,* **168**, 676–686.

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**, 4727–2744.

McMahon, K. W. and McCarthy, M. D. (2016) Embracing variability in amino acid δ15N fractionation: mechanisms, implications, and applications for trophic ecology. *Ecosphere*, **7**, e01511.

Naito, I. Y., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., Mukai, H., Shibata, Y., Honch, N. V., Dodo, Y., Ishida, H., Amano, T., Ono, H. and Yoneda, M. (2010) Dietary reconstruction of the Okhotsk Culture of Hokkaido, Japan, based on nitrogen isotopic composition of amino acids: implication for the correction of radiocarbon marine reservoir effects on human bones. *Radiocarbon*, **52**, 671–681.

Naito I. Y., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N. and Yoneda, M. (2013) Evaluation of carnivory in inland Jomon hunter-gatherers based on nitrogen isotopic compositions of individual amino acids in bone collagen. *J. Archaeol. Sci.*, **40**, 2913–2923.

Naito, Y. I., Drucker, D. G., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., Wißing, C., Semal, P. and Bocherens H. (2016) Ecological niche of Neanderthals from Spy cave revealed by nitrogen isotopes of individual amino acids in collagen. *J. Hum. Evol.,* **93**, 82–90.

Ohkouchi, N., Chikaraishi, Y., Close, H. G., Fry, B., Larsen, T., Madigan, D. J., McCarthy, M. D., McMahon, K. W., Nagata, T., Naito, Y. I., Ogawa, N. O., Popp, B. N., Steffan, S. A., Takano, Y., Tayasu, I., Wyatt, A. S. J., Yamaguchi, Y. T. and Yokoyama, Y. (2017) Advances in the application of amino acid nitrogen isotopic analysis in ecological and biogeochemical studies. *Org. Geochem.*, **113**, 150–174.

Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y. and 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. *Ecol Res.,* **28**, 697–702.

Ostrom, P. H., Wiley, A. E., James, H. F., Rossman, S., Walker, W. A., Zipkin, E. and Chikaraishi, Y. (2017) Broad-Scale Trophic Shift in the Pelagic North Pacific Revealed by an Oceanic Seabird. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.*, **284**, 20162436.

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 *Stable isotopes as indicators of ecological change* (Dawson, T. E. and Siegwolf R. T. W., eds) Academic Press. pp 173–190.

Steffan, A. S., Chikaraishi, Y., Currie, C. R., Horn, H., Gaines-Day, H. R., Pauli, J. N., Zalapa, J. and Ohkouchi, N. (2015) Microbes are trophic analogs of animals: Unification of the macro- and microbiome in food web ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **112**, 15119–15124.

Takizawa, Y., Takano, Y., Choi, B., Dharampal, P. S., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ohkouchi, N. and Chikaraishi, Y. (2020) A new insight into isotopic fractionation associated with decarboxylation in organisms: implications for amino acid isotope approaches in biogeoscience. *Prog. Earth Planet. Sci.*, **7**, 1–13.

Vander Zanden, M. J., Casselman, J. M. and Rasmussen, J. B. (1999) Stable isotope evidence for the food web consequences of species invasions in lakes. *Nature*, **401**, 464–467.

Yamaguchi, Y. T., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N. O., Imachi, H., Yokoyama, Y. and Ohkouchi, N. (2017) Fractionation of nitrogen isotopes during amino acid metabolism in heterotrophic and chemoautotrophic microbes across Eukarya, Bacteria, and Archaea: Effects of nitrogen sources and metabolic pathways. *Org Geochem.,* **111**, 101–112.