

海洋微生物の生態系解析に向けた 安定同位体の利用

山口 保彦, 大河内 直彦

水環境学会誌 第36巻 第7号 (2013)

pp. 242 ~ 246 別刷

公益社団法人 日本水環境学会

海洋微生物の生態系解析に向けた安定同位体の利用*

山口 保彦 大河内 直彦

1. はじめに

海洋環境中（海水および海洋堆積物）の微生物の代謝・生態を探るアプローチとして、有機分子の化合物レベル同位体組成分析について概説する。まず海洋微生物や化合物レベル同位体組成分析の基礎的事項について解説した後、とくに四つの有機分子グループ（脂質、色素、核酸、アミノ酸）に着目して、それぞれの化合物レベル同位体組成分析（とくに水素、炭素、窒素）から海洋微生物の代謝・生態を研究した具体的な事例や、最近の進展について紹介する。

2. 海洋微生物の物質循環における役割と謎

微生物の代謝は、地球の物質循環を駆動する“エンジン”であると考えられている¹⁾。例えばグローバルな一次生産の約半分は海洋で起きており、生産された有機物の大部分は海洋従属栄養微生物によって代謝され分解されている²⁾。一方で、海洋環境にはきわめて多様な微生物が生息しており、しかもその多くは難培養性であることも、近年の分子生物学的手法の進展により明らかになってきた。こうした多様な海洋微生物とその代謝・生態が、海洋の物質循環のプロセスにそれぞれどのように

関与しているのか、きわめて謎が多いのが現状である。

3. 有機分子の化合物レベル同位体組成分析

3.1 同位体天然存在度分析と同位体ラベル実験

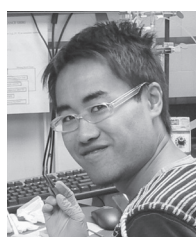
同位体を用いた海洋微生物の研究には、大きく分けて二つの種類が存在する。まず一つ目は、環境試料中の物質の同位体天然存在度を分析（観測）して、そのわずかな変動から海洋微生物の代謝・生態を推測する研究で、本稿では主にこちらを扱う。もう一つは、人工的に特定の同位体を濃縮した基質を添加して、微生物によるその同位体の同化・異化プロセスを追跡する実験（同位体ラベル実験）である。両者のアプローチともメリットとデメリットがあるため、組み合わせて互いに補完させあうことが、海洋微生物の代謝・生態の理解には重要である。

本稿で主に扱う同位体天然存在度分析の、同位体ラベル実験と比較した際の最大のメリットは、自然環境そのままの中で微生物が実際に何をしているのかについて、現場の情報が得られることである。そのほか、微生物プロセスの長期的な積算値が得られること、広域の物質循環の収支を計算できること、過去の微生物プロセスも復元可能なことなども、メリットとして挙げられる。逆にデメリットとしては、わずかな同位体組成の変動をとらえる必要があるため高精度な測定が必要なこと、自然環境中では様々なプロセスが同時に同位体組成に影響してしまうため結論が曖昧になりやすいこと、対象プロセスに関与した微生物の系統を特定する解像度が多くの場合で低いことなどが挙げられる。

3.2 なぜ化合物レベルか？

化合物レベル同位体組成分析とは、生物や環境試料に含まれる有機分子の同位体組成（水素：D/H、炭素： $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 、窒素： $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ など）を、化合物レベルで測定する手法である。同位体組成は、自然界の様々な物理的・化学的・生物的過程においてわずかに変化する。そして有機分子の同位体組成からは、各有機分子に特有の生物化学的過程（合成・代謝・分解など）や分子構造（機能）と密接にリンクした情報が得られるという特徴がある。環境中の有機物は、様々な生物に由来する多様な有機分子の混合物となっており、バルク（試料全体）分析ではその平均的な情報が得られるだけである。環境中での微生物の代謝・生態について情報を得るには、特定の有機分子のみを抽出・精製し、その化合物レベル同位体組成分析から、よりクリアな情報を取り出すことが重要となる。

特定の微生物グループが特異的に持つ有機分子（バイオマーカー）に着目すれば、環境中の代謝プロセスを微生物の系統と結びつけることも可能になる。物質循環のプロセス（何が起きているのか）に着目する地球化学と、



Yasuhiko T. Yamaguchi

平成25年 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了
同年 日本学術振興会特別研究員 PD
(東京大学大学院理学系研究科地球惑星科学専攻)
博士(理学)



Naohiko Ohkouchi

平成7年 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了
同年 日本学術振興会特別研究員 PD
(京大学生態学研究センター)
8年 北海道大学低温科学研究所助手
11年 ウズホール海洋研究所海洋化学・地球化学部博士研究員
14年 海洋研究開発機構地球内部変動研究センター研究員
17年 同グループリーダー
21年 同機構海洋・極限環境生物圏研究領域プログラムディレクター
日本地球化学会奨励賞、講談社科学出版賞、第28回海洋化学学術賞
博士(理学)

* Compound-Specific Isotope Analysis as a Tool to Study Microbial Processes in Marine Environments

プレイヤー（どのような微生物がいるのか）に着目する微生物学とを、ちょうど橋渡しするアプローチと言える。とくに、各微生物グループが環境中で実際にやっている代謝プロセスを定量的・半定量的に推定可能であることが、海洋微生物の物質循環における役割を理解していく際に重要なポイントとなる。例えば、有機分子バイオマーカーの安定炭素同位体組成は、微生物の炭素源の安定炭素同位体組成と、微生物代謝による炭素同位体分別を反映するため、それぞれの値が分かれば様々な炭素源や代謝の寄与割合を推定できる。

試料中の安定同位体組成は、国際標準物質のそれに対する千分偏差（ δ 値、単位：‰、パーミル）で定義される³⁾。水素、炭素、窒素の δ 値はそれぞれ、 δD 値、 $\delta^{13}C$ 値、 $\delta^{15}N$ 値と表記する。本稿では安定同位体組成に加えて、放射性炭素濃度（ $\Delta^{14}C$ ： $^{14}C/^{12}C$ ）を用いた研究も紹介するが、炭素同位体分別の影響を除去した $\Delta^{14}C$ 値が用いられる。

3.3 分析手法

有機分子の化合物レベル同位体組成分析は、(1) クロマトグラフィーなどにより目的の有機分子を単離・精製する、(2) 精製した有機分子を CO_2 、 N_2 、 H_2 などのガスに変換・精製する、(3) 精製したガスの同位体組成を測定する、という大きく分けて三つの工程を必要とする。従来は三つの工程が別々に分かれており、有機分子の単離やガスの精製に多くの労力と時間を費やさねばならず、また多量の試料が必要だった（オフライン分析：図1a）。

1990年代に、ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計（GC/IRMS）が開発され⁴⁾、三つの工程が連続的に結合されたことで（オンライン分析：図1b）、揮発性の有機分子であれば、試料に含まれる一つ一つの有機分子を事前に単離することなく、個々の化合物の同位体組成を一度の分析で連続的に測定できるようになった。測定に必要な試料量は1化合物・1元素あたり数ナノモルであり、測定に要する時間は1試料・1元素あたり数十分から1時間程度である。GC/IRMSの登場により、有機分子の化合物レベル同位体組成分

析を用いた研究は世界中で爆発的に広がり、有機地球化学を中心に様々な分野で、今日のように汎用的な研究ツールとなった。本ツールは脂質の安定炭素同位体組成および水素同位体組成、アミノ酸の窒素同位体組成の分析などに、とくに頻繁に用いられている。GC/IRMSを用いた有機分子の化合物レベル同位体組成分析の詳細（装置の概要、測定条件、注意点など）については、他の総説³⁾などを参照していただきたい。

2004年には、液体クロマトグラフィー/同位体比質量分析計（LC/IRMS）が開発され⁵⁾、アミノ酸や核酸、糖など不揮発性の有機分子に関しても、誘導体化せずに安定炭素同位体組成をオンラインで分析することが原理上可能になり、様々な分野で応用が広がりつつある⁶⁾。

なお化合物レベル放射性炭素分析や、クロロフィルなど不揮発性有機分子の窒素同位体組成分析などには、GC/IRMSやLC/IRMSが適用できないため、現在でも、有機分子単離と同位体組成分析を別々に行うオフライン分析が主に用いられている。

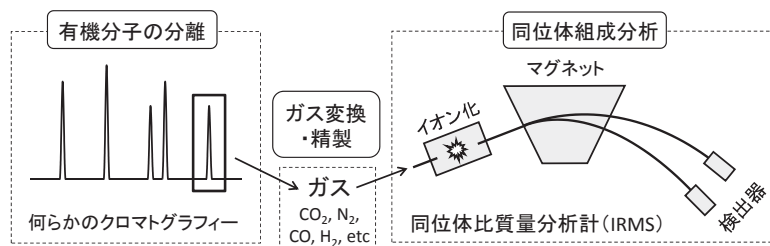
4. 有機分子同位体組成から探る海洋微生物の代謝・生態

4.1 脂質

微生物は、バクテリアやアーキアといった微生物グループごとに、ホパノイドやアーキオールなどグループ特異的な膜脂質分子（脂質バイオマーカー）を持つ（図2a）。そのため、脂質バイオマーカーの化合物レベル炭素同位体組成分析から、海洋微生物の代謝や炭素源を推定する研究が、これまで数多く行われてきた^{7,8)}。また、脂質分子は堆積物・堆積岩中にも保存されやすいため、現代だけでなく過去の海洋微生物の代謝・生態を復元する研究にも頻繁に用いられてきた。

現代の海洋環境の研究では例えば、嫌氣的メタン酸化アーキアの発見において、脂質バイオマーカー安定炭素同位体組成分析が大きく貢献した。カリフォルニア沖のメタン冷湧水域堆積物中のアーキア膜脂質（アーキオールなど）の $\delta^{13}C$ 値が、きわめて低い値（ $<-100\text{‰}$ ）を示すことが1999年に報告され、メタンを分解して炭素源とする代謝（嫌氣的メタン酸化）が示唆された⁹⁾。ま

(a) オフライン分析



(b) GC/IRMSシステム

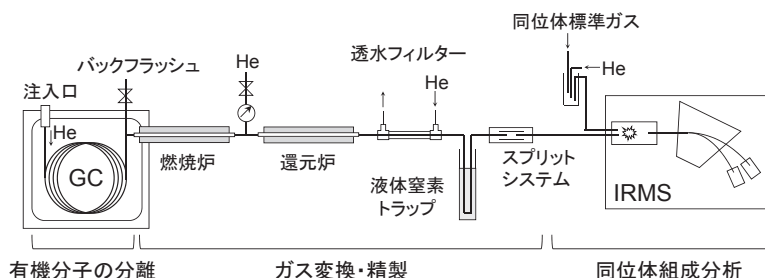


図1 化合物レベル同位体組成の分析システム³⁾

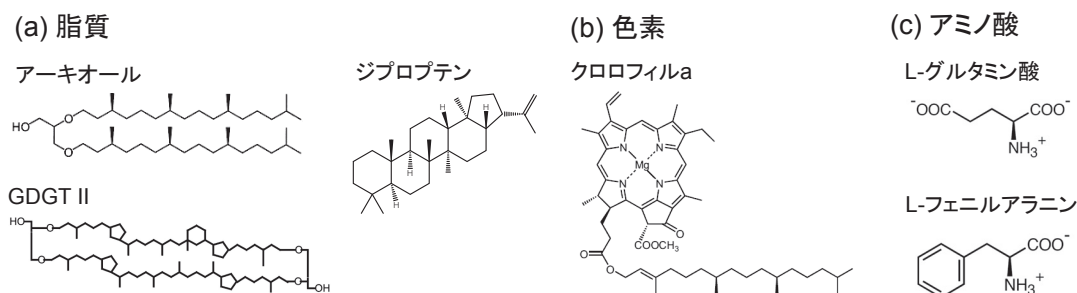


図2 海洋微生物の代謝・生態を研究するために化合物レベル同位体組成が分析された有機分子の例

他にも、深海海水中にはアンモニア酸化代謝能を持ったアーキアが卓越するが、北太平洋亜熱帯環流域の中深層海水中のアーキア膜脂質 (GDGTs) の $\Delta^{14}\text{C}$ 値からは、炭素源の大部分 (約 80%) が現場の溶存無機炭素であり、化学合成独立栄養代謝が実際に現場で卓越していることが示唆された¹⁰⁾。

過去の海洋環境の研究では例えば、バクテリア膜脂質 (ジプロプテンなどのホパノイド) の安定炭素同位体組成分析を用いた、過去の好氣的メタン酸化バクテリア生態系の復元が挙げられる。過去 2 万 5 千年分の日本海堆積物コア試料を用いた研究¹¹⁾ では、日本海が成層化して海洋深層が還元的になった時代 (約 1 万 5 千年前) に、ジプロプテンの $\delta^{13}\text{C}$ 値が -57% と低い値を示した。当時の海水中の酸化還元境界において、海洋深層由来の $\delta^{13}\text{C}$ 値が低いメタンを、好氣的メタン酸化バクテリアが分解して取り込んだ結果と考えられている。

微生物脂質バイオマーカー水素同位体組成を用いた研究は、炭素同位体組成を用いた研究に比べてきわめて少ないが、今後の進展が期待される。2009 年には、バクテリア膜脂質に含まれる脂肪酸の化合物レベル水素同位体組成分析から、バクテリアのエネルギー獲得代謝の種類 (光合成、従属栄養、化学合成) を区別できる可能性が示された¹²⁾。2011 年には、これまで測定が難しかったアーキア膜脂質の水素同位体組成についても測定法が報告された¹³⁾。

また、海洋堆積物中のアーキアは、非生物態の脂質分子を環境中から取り込んで再利用 (サルベージ) することが 2010 年に報告された¹⁴⁾。こうした代謝が自然界で普遍的に起こっていると、環境中の脂質バイオマーカーの同位体組成に影響する可能性がある。今後、サルベージが起こる条件や、サルベージ代謝と脂質新規合成代謝との割合を明らかにしていく必要があるだろう。

4.2 色素

クロロフィルやカロテノイドなど色素分子 (図 2b) の同位体組成は、光合成生物の代謝・生態を知る手がかりになりうる。脂質と同様に色素分子も堆積物・堆積岩中に保存されやすいため、とくに過去の海洋光合成微生物の代謝・生態の復元にしばしば用いられてきた。

クロロフィルやその分解生成物は、化合物中に窒素原子を含むため、化合物レベル窒素同位体組成分析によって、過去の海洋窒素循環や微生物窒素代謝を復元することが可能になる¹⁵⁾。例えば、クロロフィル分解生成物における $\delta^{15}\text{N}$ 値の結果から、白亜紀に海洋が大規模に貧酸素化した時期には、当時の海洋光合成生物の窒素源の大部分が窒素固定由来であり、窒素固定シアノバクテリ

アが海洋一次生産の大半を担っていた可能性が示唆されている¹⁶⁾。現代の海洋環境への応用はまだ少ないが、アミノ酸窒素同位体組成分析 (後述) と組み合わせることで、海洋の有機物循環における微生物の役割解明に有用である可能性がある¹⁷⁾。

4.3 アミノ酸

アミノ酸はタンパク質を構成する有機分子であり、生体有機物でも環境中非生物態有機物でも、量的に重要な割合を占める。アミノ酸は微生物による分解を比較的受けやすい有機分子とも考えられており、海洋環境中でのアミノ酸の動態を解明することは、有機物循環における微生物の役割を理解することにつながる。

アミノ酸の化合物レベル窒素同位体組成分析は、生態系の食物網解析に有用な手法として、21 世紀に入ってからとくに生態学分野で急速に応用が広がってきた。基本的な原理としては、被食-捕食を通して、捕食者のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値が餌に対して、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する。この二つのアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ 値の差から、生物の栄養段階を高い精度で見積もることができる¹⁸⁾ (図 3a)。手法の詳細については別の総説^{19,20)}などを参照していただきたい。

生態学分野での応用の広がり比べ、海洋環境中の有機物の生物地球化学分野では、アミノ酸の化合物レベル窒素同位体組成分析の研究例がまだ少ない²²⁾。この原因の一つには、有機物循環に重要な従属栄養微生物や化学合成独立栄養微生物について、アミノ酸窒素同位体組成に関する知見が乏しかったことが挙げられる。筆者らは最近、これまでに藻類や動物に見られたアミノ酸窒素同位体組成の変動ルールが、従属栄養微生物や化学合成独立栄養微生物の生体中アミノ酸についても同様に成立しうることを、微生物培養実験から見出した¹⁷⁾ (図 3b)。また、海洋従属栄養微生物による溶存有機物変質においても、同様のアミノ酸窒素同位体組成変動が起きることが示唆されている²¹⁾。こうした情報を基礎にして、アミノ酸の化合物レベル窒素同位体組成分析の生物地球化学的応用が、今後進展していくことが期待される。

筆者らはこれまでに、アミノ酸の化合物レベル窒素同位体組成分析などを用いて、海洋堆積物中のアミノ酸の動態における微生物の役割を探ってきた¹⁷⁾。例えば、日本海の海洋堆積物中のアミノ酸と光合成色素の化合物レベル窒素同位体組成を深度別に比較し、微生物によるアミノ酸の変質 (作り変え) の度合いを評価した。その結果、堆積物深部では微生物による堆積物中アミノ酸の作り変えは小さい一方で、海水や堆積物表層では、微生物

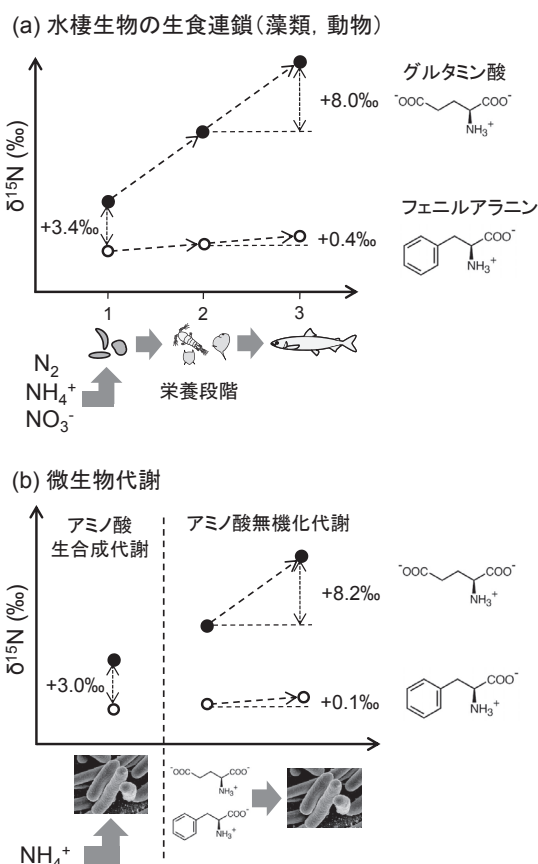


図3 生物代謝によるアミノ酸窒素同位体組成変動。(a) 水棲生物の生食連鎖(藻類, 動物)¹⁸⁾, (b) 従属栄養および化学合成独立栄養微生物の代謝¹⁷⁾。

による沈降粒子中/堆積物中アミノ酸の作り変えが活発に起きていたことが示唆された。

アミノ酸の化合物レベル安定炭素同位体組成については、窒素同位体組成と同様に、有機物循環における微生物の役割評価に有用であると考えられるが、0.5~1.0%以内の誤差で測定できる一般的・汎用的な手法は確立されていない¹⁹⁾。これまで、TFA/iPr誘導体化を用いて、GC/IRMSで安定炭素同位体組成を測定した研究も多数報告されているが、5%程度の誤差が生じる測定法であることが最近指摘されており²³⁾、解釈には注意が必要である。今後、GC/IRMSやLC/IRMSによる分析法の開発・改良が重要となる。

アミノ酸の立体異性体(L体, D体)を区別して同位体組成を分析することも、有機物循環における微生物の役割評価に大きな進展をもたらさう。生物は基本的にはL体アミノ酸で構成されているが、バクテリアは特定のアミノ酸(アラニン, グルタミン酸など)に関して高濃度のD体を生体内に含むため、D体アミノ酸をバクテリアのバイオマーカーとして用いることが可能である。海洋環境では、同位体ラベル実験におけるD体アミノ酸への同位体取り込みからバクテリアの代謝を推定する研究はいくつか報告されているが^{24,25)}、D体アミノ酸中の同位体天然存在度の報告は現状ではごく限られており、分析法の開発・改良²⁶⁾が今後も重要となる。

4.4 核酸

核酸(DNAおよびRNA)はすべての生物が持つ有機分子である一方、塩基配列は生物種ごとに異なり、種

特異性の高いバイオマーカーとしても利用できる。微生物生態学などではこれまで、同位体ラベル実験における核酸への同位体の取り込みを利用して、特定の代謝に関与する微生物種を特定する研究などが数多く行われてきた²⁷⁾。

一方で核酸中の同位体天然存在度を用いた研究は多くない。しかし海洋環境では、海水から抽出した微生物DNAの安定炭素同位体組成および放射性炭素同位体組成分析を応用することで、微生物の炭素源を推定する試みなどが、いくつか報告されている^{28,29)}。例えば、微生物DNAの $\Delta^{14}\text{C}$ 値から、北太平洋亜熱帯環流域の中深層では、化学合成独立栄養的に生産された有機物が現場の微生物生態系の炭素源として重要である可能性が示唆されている²⁹⁾。

最近では、Magnetic Bead Captureなどを用いて、特定の塩基配列の核酸だけを抽出して同位体組成を分析することで、特定の微生物グループの炭素源や代謝を推定することも可能になりつつある^{30,31)}。微生物の代謝・生態と系統とを、脂質や色素などよりも高解像度につなぐことができる可能性を持つ。

5. 今後の展望

有機分子の化合物レベル同位体組成分析の技術は、各有機分子の項で紹介した研究以外にも、改良や新手法の開発が急速に進んでいる。GC/IRMSが開発されて化合物レベル同位体組成分析が汎用的な研究ツールとなつてから、まだ20年強しか経過しておらず、分野としては発展途上の段階にある。今後、取得できるデータの種類や量が増えていけば、海洋微生物の代謝・生態について様々な角度から理解が進んでいくだろう。

例えば、GC/IRMSや核磁気共鳴(NMR)などを用いた、有機分子の分子内同位体組成分析(position-specific isotope analysis)の技術が、近年急速に進展しつつある³²⁾。有機分子内の各部位は、それぞれ前駆体となる化合物が異なり、各部位の同位体組成が保持している情報も異なる。有機分子の平均同位体組成からは見えにくかった微生物代謝のシグナルを、よりクリアにとらえることが可能になってくると期待される。

酸素, 硫黄, 塩素, 臭素など、本稿では扱わなかった元素の化合物レベル同位体組成を用いた研究も、今後の進展が期待される。例えば硫黄に関しては2009年に、ガスクロマトグラフィーと多重検出器型-誘導結合プラズマ質量分析計(MC-ICP-MS)を結合することで、極微量の有機分子の化合物レベル硫黄同位体組成($^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ など)をオンラインで分析できる手法が報告された³³⁾。

また、有機分子の同位体組成と微生物代謝の対応付けが進展することも、環境中の有機分子の同位体組成が持つ意味の解釈にとって重要である。有機分子中の同位体分別を評価する微生物培養実験を、様々な微生物種、基質、環境条件で行っていくことが、今後も重要になっていくだろう。

謝辞

まず、本稿を執筆する貴重な機会を与您てくださった日本水環境学会の皆さまに感謝申し上げます。力石嘉人博士, 高野淑識博士, 小川奈々子博士, 菅寿美博士, 井

町寛之博士, 金子雅則博士 (海洋研究開発機構), および横山祐典准教授 (東京大学大気海洋研究所) には, 有機分子の化合物レベル同位体組成分析や, 海洋の物質循環・微生物について, 非常に熱心なご指導をいただき, また様々な議論にご協力いただきました。心より厚くお礼申しあげます。

参 考 文 献

- 1) Falkowski, P. G., Fenchel, T. and Delong, E. F. (2008) The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles, *Science*, **320**, 1034-1039.
- 2) Azam, F. and Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems, *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 782-91.
- 3) 力石嘉人, 大場康弘 (2008) ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計による分子レベル安定同位体比分析法, *Res. Org. Geochem.*, **23/24**, 99-122.
- 4) Hayes, J. M., Freeman, K. H., Popp, B. N. and Hoham, C. H. (1990) Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes, *Org. Geochem.*, **16**, 1115-1128.
- 5) Krummen, M., Hilkert, A. W., Juchelka, D., Duhr, A., Schlüter, H.-J. and Pesch, R. (2004) A new concept for isotope ratio monitoring liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2260-2266.
- 6) Godin, J.-P. and McCullagh, J. S. O. (2011) Review: Current applications and challenges for liquid chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS), *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**, 3019-3028.
- 7) Pancost, R. D. and Sinninghe Damsté, J. S. (2003) Carbon isotopic compositions of prokaryotic lipids as tracers of carbon cycling in diverse settings, *Chemical Geology*, **195**, 29-58.
- 8) 金子雅則, 奈良岡浩 (2011) 微生物バイオマーカーの炭素・水素同位体組成, *Res. Org. Geochem.*, **27**, 55-72.
- 9) Hinrichs, K. U., Hayes, J. M., Sylva, S. P., Brewer, P. G. and DeLong, E. F. (1999) Methane-consuming archaeobacteria in marine sediments, *Nature*, **398**, 802-805.
- 10) Ingalls, A. E., Shah, S. R., Hansman, R. L., Aluwihare, L. I., Santos, G. M., Druffel, E. R. M. and Pearson, A. (2006) Quantifying archaeal community autotrophy in the mesopelagic ocean using natural radiocarbon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6442-6447.
- 11) Yamada, K., Ishiwatari, R., Matsumoto, K. and Naraoka, H. (1997) $\delta^{13}\text{C}$ records of dipteroptera in the Japan Sea sediments over the past 25 kyr, *Geochem. J.*, **31**, 315-321.
- 12) Zhang, X., Gillespie, A. L. and Sessions, A. L. (2009) Large D/H variations in bacterial lipids reflect central metabolic pathways, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12580-12586.
- 13) Kaneko, M., Kitajima, F. and Naraoka, H. (2011) Stable hydrogen isotope measurement of archaeal ether-bound hydrocarbons, *Org. Geochem.*, **42**, 166-172.
- 14) Takano, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Nomaki, H., Morono, Y., Inagaki, F., Kitazato, H., Hinrichs, K.-U. and Ohkouchi, N. (2010) Sedimentary membrane lipids recycled by deep-sea benthic archaea, *Nat. Geosci.*, **3**, 858-861.
- 15) 大河内直彦, 柏山祐一郎 (2009) クロロフィルの分子化石ポルフィリンの地球科学, 光合成研究, **19**, 141-153.
- 16) Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Kuroda, J., Shiro, M., Nomoto, S., Tada, R., Kitazato, H. and Ohkouchi, N. (2008) Diazotrophic cyanobacteria as the major photoautotrophs during mid-Cretaceous oceanic anoxic events: Nitrogen and carbon isotopic evidence from sedimentary porphyrin, *Org. Geochem.*, **39**, 532-549.
- 17) Yamaguchi, Y. T. (2013) Biogeochemical Dynamics of Amino Acids in Marine Sediments: Constraints from Compound-Specific Nitrogen Isotopic Composition and D/L Ratio, 139pp., PhD thesis, Univ. Tokyo.
- 18) 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. Methods*, **7**, 740-750.
- 19) 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.
- 20) 力石嘉人, 高野淑識, 小川奈々子, 佐々木瑠子, 土屋正史, 大河内直彦 (2011) 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, *Res. Org. Geochem.*, **27**, 3-11.
- 21) Calleja, M. L., Batista, F., Peacock, M., Kudela, R. and McCarthy, M. D. (2013) Changes in compound specific $\delta^{15}\text{N}$ amino acid signatures and D/L ratios in marine dissolved organic matter induced by heterotrophic bacterial reworking, *Mar. Chem.*, **149**, 32-44.
- 22) 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.
- 23) Dunn, P. J. H., Honch, N. V. and Evershed, R. P. (2011) Comparison of liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry (LC/IRMS) and gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS) for the determination of collagen amino acid $\delta^{13}\text{C}$ values for palaeodietary and palaeoecological rec, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **25**, 2995-3011.
- 24) Veuger, B., Middelburg, J. J., Boschker, H. T. S. and Houtekamer, M. (2005) Analysis of ^{15}N incorporation into D-alanine: A new method for tracing nitrogen uptake by bacteria, *Limnol. Oceanogr. Methods*, **3**, 230-240.
- 25) Veuger, B., Van Oevelen, D., Boschker, H. T. S. and Middelburg, J. J. (2006) Fate of peptidoglycan in an intertidal sediment: An in situ ^{13}C -labeling study, *Limnol. Oceanogr.*, **51**, 1572-1580.
- 26) 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.
- 27) Neufeld, J. D., Wagner, M. and Murrell, J. C. (2007) Who eats what, where and when? Isotope-labelling experiments are coming of age, *ISME J.*, **1**, 103-110.
- 28) Cherrier, J., Bauer, J. E., Druffel, E. R. M., Coffin, R. B. and Chanton, J. P. (1999) Radiocarbon in marine bacteria: Evidence for the ages of assimilated carbon, *Limnol. Oceanogr.*, **44**, 730-736.
- 29) Hansman, R. L., Griffin, S., Watson, J. T., Druffel, E. R. M., Ingalls, A. E., Pearson, A. and Aluwihare, L. I. (2009) The radiocarbon signature of microorganisms in the mesopelagic ocean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 6513-6518.
- 30) Pearson, A., Kraunz, K. S., Sessions, A. L., Dekas, A. E., Leavitt, W. D. and Edwards, K. J. (2008) Quantifying microbial utilization of petroleum hydrocarbons in salt marsh sediments by using the ^{13}C content of bacterial rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 1157-1166.
- 31) Miyatake, T., MacGregor, B. J. and Boschker, H. T. S. (2009) Linking microbial community function to phylogeny of sulfate-reducing *Deltaproteobacteria* in marine sediments by combining stable isotope probing with magnetic-bead capture hybridization of 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4927-4235.
- 32) 山田桂大 (2011) 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, *Res. Org. Geochem.*, **27**, 45-54.
- 33) Amrani, A., Sessions, A. L. and Adkins, J. F. (2009) Compound-specific $\delta^{34}\text{S}$ analysis of volatile organics by coupled GC/multicollector-ICPMS, *Anal. Chem.*, **81**, 9027-9034.