

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

力石 嘉人*・小川 奈々子*・高野 淑 識*
土屋 正 史*・大河内 直 彦*

(2010年5月14日受付, 2010年10月5日受理)

Food chain analysis by nitrogen isotopic composition of amino acids

Yoshito CHIKARAISHI*, Nanako O. OGAWA*, Yoshinori TAKANO*,
Masashi TSUCHIYA* and Naohiko OHKOUCHI*

* Institute of Biogeosciences,
Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC),
2-15 Natsushima, Yokosuka, Kanagawa 237-0061, Japan

Nitrogen isotopic composition ($\delta^{15}\text{N}$) of individual amino acids has recently been employed as a potential powerful method for estimating the trophic level of organisms in food webs. In metabolic processes, one group of amino acids has little change in their nitrogen isotopic composition (e.g., 0.4‰ for phenylalanine), although another group has a large isotopic fractionation (e.g., 8.0‰ for glutamic acid). This fractionation could be associated with the cleavage of carbon-nitrogen bond in the metabolic processes (e.g., transamination) of amino acids. Therefore, a comparison between $\delta^{15}\text{N}$ values of these two types of amino acids would provide the trophic level of organisms. In fact, we can estimate the trophic levels of aquatic organisms with a small error ($1\sigma = 0.12$), employing the equation: [Trophic level] = $(\delta^{15}\text{N}_{\text{glutamic acid}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{phenylalanine}} - 3.4)/7.6 + 1$. Thus, a key advantage of this method is that the trophic level can be obtained based on the $\delta^{15}\text{N}$ values of two amino acids from a single organism; consequently, unlike the bulk method, it is not necessary to characterize the $\delta^{15}\text{N}$ values of primary producers. Here, we review the principle of this amino acid method and its application to natural organisms in marine and freshwater environments.

Key words: stable isotope, ecology, food web, trophic level, nitrogen, amino acid

1. はじめに

天然の生態系では、植物プランクトン（一次生産者）は動物プランクトン（一次消費者）に、動物プランクトンは小さな魚（二次消費者）に、小さな魚は大きな魚（高次消費者）に食べられるという「食物連鎖」がある（Fig. 1）。そしてその中で生物の窒素同位体比は、被食-捕食の関係を通して被食者（餌）か

* 独立行政法人海洋研究開発機構海洋・極限環境生物圏領域

〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15

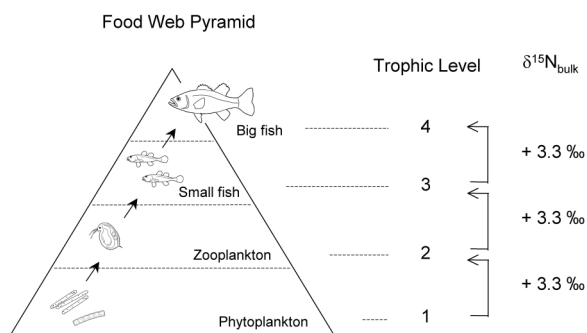


Fig. 1 Relationship between the trophic level (TL) and $\delta^{15}\text{N}$ of bulk organisms.

ら捕食者（消費者）に受け継がれるため、生態系に属する全ての生物の窒素同位体比は、一義的には食物連鎖網のベースにいる一次生産者の同位体比を反映する。例えば、海水中の硝酸イオンを窒素源として生育した植物プランクトンの全窒素同位体比（生き物まるごと、バルクの同位体比）は、+3~+10‰（例えば、Altabet and Francois, 1994）であるのに対し、窒素ガスの固定により生育したシアノバクテリアの全窒素同位体比は、約0‰（例えば、Minagawa and Wada, 1986）である。そのため、彼らを餌とする動物プランクトン、そしてその動物プランクトンを餌とする魚の全窒素同位体比は、この生産者の同位体比の違いを反映する（例えば、Wada and Hattori, 1976）。一方で動物の全窒素同位体比は、その動物が食べた餌に比べて平均で3.3%高い値になる（例えば、Miyake and Wada, 1967）。これは、動物は捕食によって餌から窒素を得る一方、代謝された窒素を尿素やアンモニアとして体外に排出し、その際に排出される窒素は ^{15}N に乏しく、体組織に残る窒素は ^{15}N に富むという同位体分別が起こるためである。この関係を利用することで、生物の全窒素同位体比からその生物の生態系の中での位置「栄養段階（trophic level, TL）」を推定することができる（式（1）, Minagawa and Wada, 1984; Wada and Yoshioka, 1995）。

$$\text{TL} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{生物}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{一次生産者}}) / 3.3 + 1 \quad (1)$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{生物}}$ は研究対象の生物の全窒素同位体比を、 $\delta^{15}\text{N}_{\text{一次生産者}}$ は研究対象の生態系の一次生産者の全窒素同位体比を表す。植物プランクトンの栄養段階が1であり、それを食べる動物プランクトンが2、さらに動物プランクトンを食べる魚が3となる。また、植物プランクトンと動物プランクトンの両方を捕食する魚は、2~3の中間的な値になる。

このように、生物の全窒素同位体比は、生物の栄養段階を明らかにし、生態系の食物連鎖網解析などの研究に有用な情報をもたらす。これまでに数多くの研究が行われ、多くの論文（例えば、Wada *et al.*, 1987; Hobson and Welch, 1992; Yoshii *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 2001）が発表されていることから、本手法の有用性は疑いようがない。とくに、窒素同位体比から得られる栄養段階の情報に、炭素同位体比の情報を加えて、生態系の食物連鎖構造を客観的に捉えるという手法は、現在の生態学研究にとって最も重要なアプローチの一つであり、また、この手法の登場により、

今日の“同位体生態学”と呼ばれる分野が発展してきた（和田, 1997; Fry, 2006）。

しかしこの手法には、(1)捕食に伴う $\delta^{15}\text{N}$ の上昇（3.3%）が系によって変化する、(2)妥当な $\delta^{15}\text{N}_{\text{一次生産者}}$ を求めることが難しい、という2つの問題があり、得られる結果の精度がしばしば議論の対象となってきた（例えば、Cabana and Rasmussen, 1996; Post, 2002; Matthews and Mazumder, 2005）。例えば、植物プランクトンの全窒素同位体比は、窒素源として窒素ガス、硝酸、アンモニアの何を使ったのか、またはその利用割合に応じて、ときには10%以上の非常に大きな変動を示す（例えば、Yoshioka *et al.*, 1994; Dore *et al.*, 2002）。また、単一の窒素源を用いても、その利用効率の違い（たくさん使ったのか、少し使ったのか）によっても、植物プランクトンの全窒素同位体比は大きく変動する（例えば、Altabet and Francois, 1994）。すなわち、この一次生産者の全窒素同位体比の変動（バックグラウンドの変動）が、捕食に伴う $\delta^{15}\text{N}$ の上昇（3.3%）に比べて大きすぎるために、これまでの研究では、生物の全窒素の窒素同位体比分析が、絶対的な栄養段階を定量的に示すツールというよりは、相対的な被食—捕食の関係を示すツールとして用いられることが多かったのである（例えば、Rau *et al.*, 1992; O'Reilly *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 2003）。

2000年代に入ると、この重い同位体（ ^{15}N ）の濃縮をバルク（生き物丸ごと）としてではなく、生物に含まれる個々の有機化合物、とりわけアミノ酸に注目した研究が行われるようになった（McClelland and Montoya, 2002; McClelland *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004; Pakhomov *et al.*, 2004）。それにより、捕食者のアミノ酸の窒素同位体比は餌に対して、フェニルアラニン（Phe）で約0.4%、グルタミン酸（Glu）で約8.0%高くなることがわかってきた（Fig. 2; Chikaraishi *et al.*, 2009）。すなわち、生物に含まれる両者のアミノ酸の窒素同位体比を比較することで栄養段階（式（2）；水棲生物の場合）や一次生産者の窒素同位体比を推定することができる（Chikaraishi *et al.*, 2009）。

$$\text{TL}_{\text{Glu/Phe}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1 \quad (2)$$

このアミノ酸を用いた分析法は、生物の栄養段階を推定するうえで、一次生産者の同位体比を必要とせず、言い換えれば、一次生産者の窒素同位体比の変動

に左右されずに、研究対象の生物に含まれる2つのアミノ酸の同位体比を見るだけで正確に栄養段階を推定することができるという点で本質的に優れている。

この手法の登場により、生物の栄養段階はカメラのピントを合わせたようにクリアに見ることができる

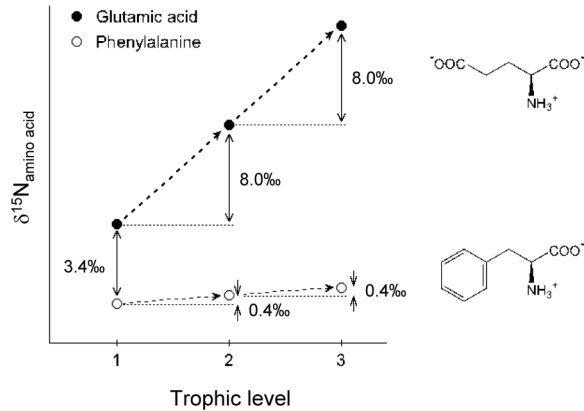


Fig. 2 Relationship between the trophic level (TL) and $\delta^{15}\text{N}$ of amino acids.

ようになった (Fig. 3, McCarthy *et al.*, 2007; Popp *et al.*, 2007; Chikaraishi *et al.*, 2009, 2010a)。生態系の一次生産者の値と考えることができるフェニルアラニンの窒素同位体比 (-3.4~+10.1‰) が示すように、天然の生物は、多様な窒素同位体比を持つ一次生産者を起点とする生態系に属している。しかし、アミノ酸の窒素同位体比 (式 (2)) により導かれた栄養段階 ($\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$) は、そのような一次生産者の同位体比のバラツキに関わらず、シアノバクテリア、植物プランクトン、海藻などの一次生産者が1、動物プランクトンや貝などの一次消費者が2と、生物学的な知見にぴったり一致する。また、カニやエビが2.5前後、魚が3~4、サメが4後半、というように、雑食者や高次消費者の栄養段階も非常に妥当な値を示す。

2. 原理

生体に含まれるアミノ酸には、食物連鎖に伴い窒素同位体比 ($\delta^{15}\text{N}$) がほとんど変化しないアミノ酸

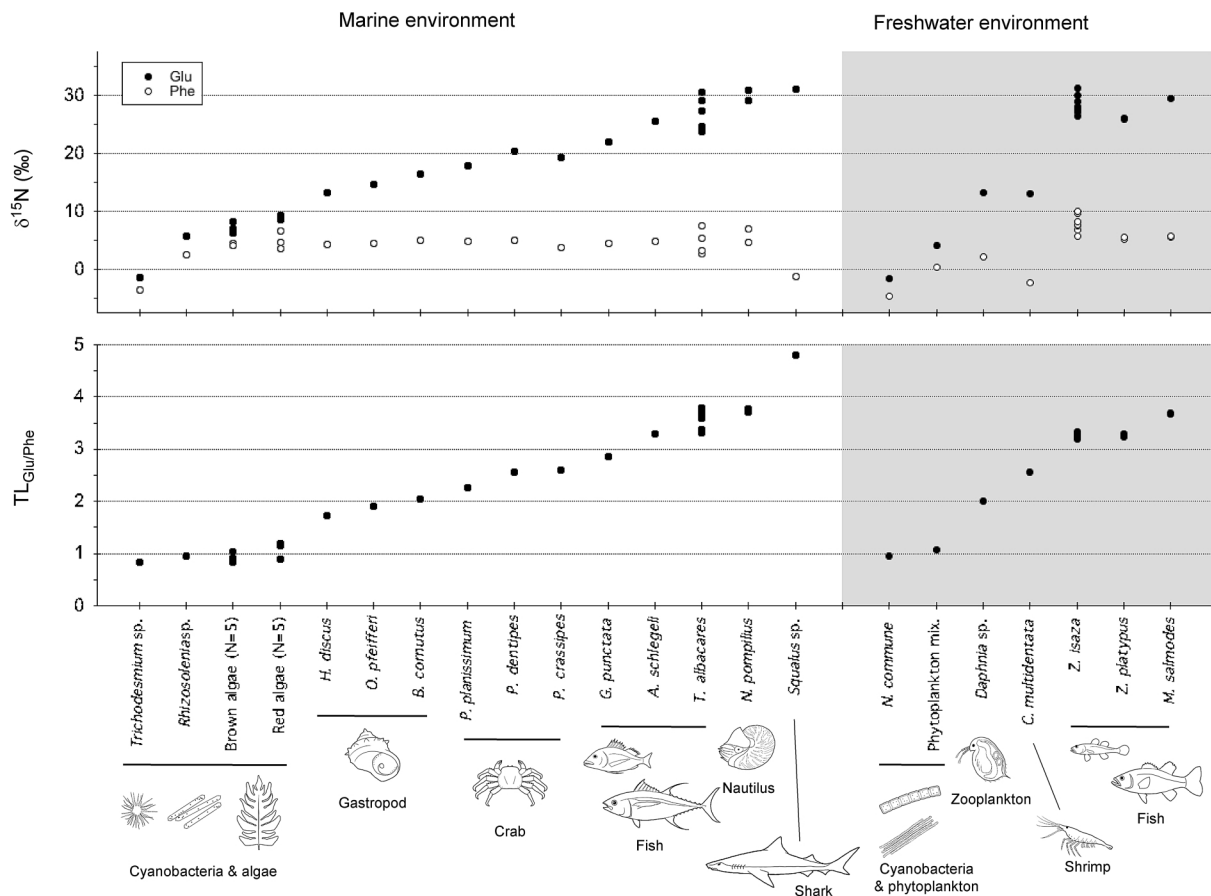


Fig. 3 $\delta^{15}\text{N}$ values of glutamic acid and phenylalanine, and the $\text{TL}_{\text{Glu/Phe}}$ values in natural aquatic organisms (after Popp *et al.*, 2007; Chikaraishi *et al.*, 2009, 2010a).

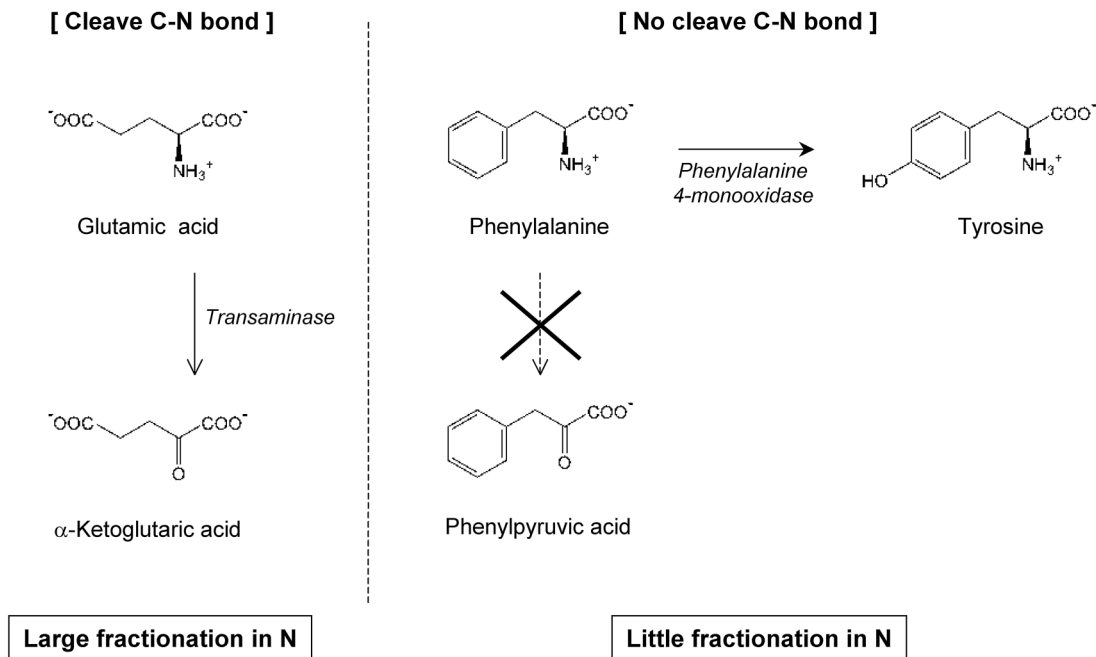


Fig. 4 Nitrogen isotopic fractionation during amino acid metabolisms.

(メチオニン, フェニルアラニンなど, Source amino acid) と, 3~8%上昇するアミノ酸 (アラニン, バリン, イソロイシン, プロリン, グルタミン酸など, Trophic amino acid) の2種類が存在する (McClelland and Montoya, 2002; Chikaraishi *et al.*, 2007)。これは, 両者の代謝系が異なるためである (Fig. 4; Bender, 2002)。前者のアミノ酸は, 代謝の主反応にアミノ基 (窒素) が関わらないため, 代謝されるアミノ酸と代謝されずに残るアミノ酸の間に同位体分別がほとんどない。一方で後者のアミノ酸は, 代謝の主反応がアミノ基の脱離反応であるために, 代謝されるアミノ酸と代謝されずに残るアミノ酸 (体組織になるアミノ酸) の間に同位体分別が起こる。そのため, 前者のアミノ酸の窒素同位体比は, 高次捕食者であっても生態系の一次生産者がはじめに持っていた値とほとんど一致する (Chikaraishi *et al.*, 2007, 2009)。また, どの栄養段階の生物であっても, その生物に含まれる両者のアミノ酸の窒素同位体比を比較することで, 以下の一般式より (式 (3)), 栄養段階 (TL) を推定することができる (Chikaraishi *et al.*, 2009)。

$$\text{TL} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{source}} - \beta) / (\Delta_{\text{trophic}} - \Delta_{\text{source}}) + 1 \quad (3)$$

$\delta^{15}\text{N}_{\text{source}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}}$ は, それぞれ, 食物連鎖に伴い窒

Table 1 Summary of the isotope difference between amino acid and phenylalanine (β), ^{15}N -enrichment factor along trophic level (Δ), and their variability (1σ) for aquatic organisms.

	β		Δ	
	Average	1σ	Average	1σ
Bulk	2.6	1.3	2.1	1.3
Alanine	3.2	1.2	6.1	2.1
Glycine	-2.3	3.4	3.7	3.9
Valine	4.6	1.2	5.0	1.7
Leucine	2.3	1.6	4.8	2.0
Isoleucine	2.9	0.8	4.8	1.7
Proline	3.1	1.7	6.1	1.6
Serine	-4.6	2.2	3.6	3.0
Methionine	-2.0	0.6	0.5	0.6
Glutamic acid	3.4	0.9	8.0	1.2
Phenylalanine	-	-	0.4	0.5

素同位体比が変化しないアミノ酸 (Source amino acid) と, 変化する (上昇する) アミノ酸 (Trophic amino acid) の同位体比を, β は一次生産者における両者のアミノ酸の同位体比の差を, Δ_{source} , Δ_{trophic} は, 両者のアミノ酸の食物連鎖に伴う同位体比の上昇値を示す。原理的には, $\delta^{15}\text{N}_{\text{source}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}}$ には様々なアミノ酸を用いることができるが, 式 (3) の各項 β , Δ_{trophic} , Δ_{source} の生物間でのバラツキ (Table 1) や, 同位体比の測定のしやすさ (次章参照) を考慮すると, $\delta^{15}\text{N}_{\text{source}}$ にフェニルアラニンを, $\delta^{15}\text{N}_{\text{trophic}}$ にグルタミン酸を用いた場合 (式 (2)) に最も優れた精度

($1\sigma = 0.12$) で栄養段階を求めることができる (Chikaraishi *et al.*, 2009)。

3. アミノ酸の窒素同位体比の測定

アミノ酸の窒素同位体比分析は一般的に、(1)生体試料の酸加水分解、(2)精製と誘導体化 (力石ほか, 2009)、(3)ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/IRMS) による同位体比測定 (力石・大場, 2008; Chikaraishi *et al.*, 2010b) で構成される。誘導体化には、ピバロイル/イソプロピル (Pv/iPr) エステル化 (Fig. 5a: カルボキシル基をイソプロピルエステル化し、アミノ基をピバロイル化したもの、例えば、Metges *et al.*, 1996)、または、トリフルオロアシル/イソプロピル (TFA/iPr) エステル化 (Fig. 5b: カルボキシル基をイソプロピルエステル化し、アミノ基をトリフルオロアシル化したもの、例えば、Engel *et al.*, 1990) が用いられる。ただし、フッ素を含む化合物は GC/IRMS に深刻なダメージを与える恐れがあるため、TFA/iPr エステル化を用いる場合は GC/IRMS の運用に細心の注意を払う必要がある (Chikaraishi *et al.*, 2010b)。

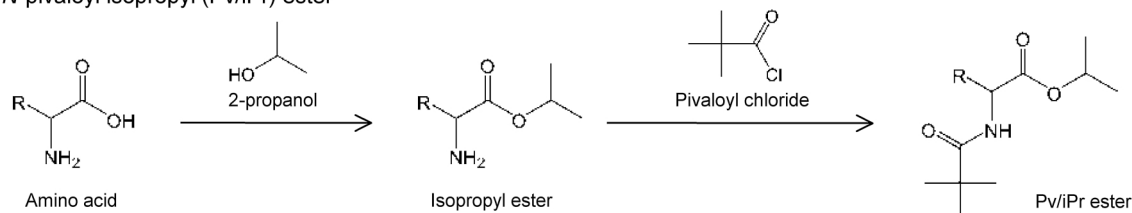
GC/IRMS での測定では、Fig. 6に示すようなクロマトグラムが得られ、個々のアミノ酸の窒素同位体比が測定される。同位体比を正確に測定するためには、個々のアミノ酸のピークを必ずベースライン上で分離しなければならない (力石・大場, 2008)。例えば Fig. 6では、アスパラギン酸とトレオニンのピークが重なっており、このような場合にはアスパラギン酸と

トレオニンの同位体比を個々に得ることはできない。一方で、グルタミン酸とフェニルアラニンのピークの周辺に他のアミノ酸や夾雑物のピークは見あたらず、グルタミン酸とフェニルアラニンの同位体比は、ほとんどの試料において容易に測定することができる。一般的に、1試料あたりの測定時間は40~60分、必要な試料量は各アミノ酸ごとに窒素量で約30 ng (窒素含有量が5%の試料であれば、試料全体で200~500 μg 程度)、測定精度は0.5% (1σ) 程度である (Chikaraishi *et al.*, 2010b)。

4. 今後の展開

アミノ酸を用いた手法は、バルク法に比べて、(1)栄養段階の見積りに一次生産者の情報を必要としない、(2)得られる栄養段階の精度が格段に高い、(3)少量の試料で分析できる、(4)ホルマリン固定試料、骨や殻に含まれるアミノ酸にも利用できる、という優れたアドバンテージがあり (Chikaraishi *et al.*, 2010a)、バルク法に替わる新しい手法として今後の幅広い利用が大いに期待されている。しかし、この新しい手法を用いた研究の実績は、残念ながらまだまだ限定的である。それは、アミノ酸の同位体比の研究が、まだ始まったばかりであるために、生体アミノ酸の同位体比の挙動に関する基礎的なデータが不足していることや、微小試料からアミノ酸の窒素同位体比を正確に測定できるようになるまでには前処理や GC/IRMS についてかなりの経験が必要となるためである。実際に、式 (2) は、植物プランクトンなどを一

(a) N-pivaloyl isopropyl (Pv/iPr) ester



(b) N-trifluoroacetyl isopropyl (TFA/iPr) ester

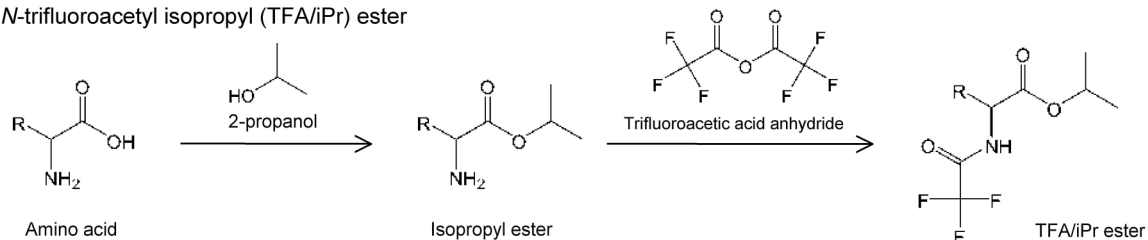


Fig. 5 Derivatizations employed for nitrogen isotope analysis of amino acids.

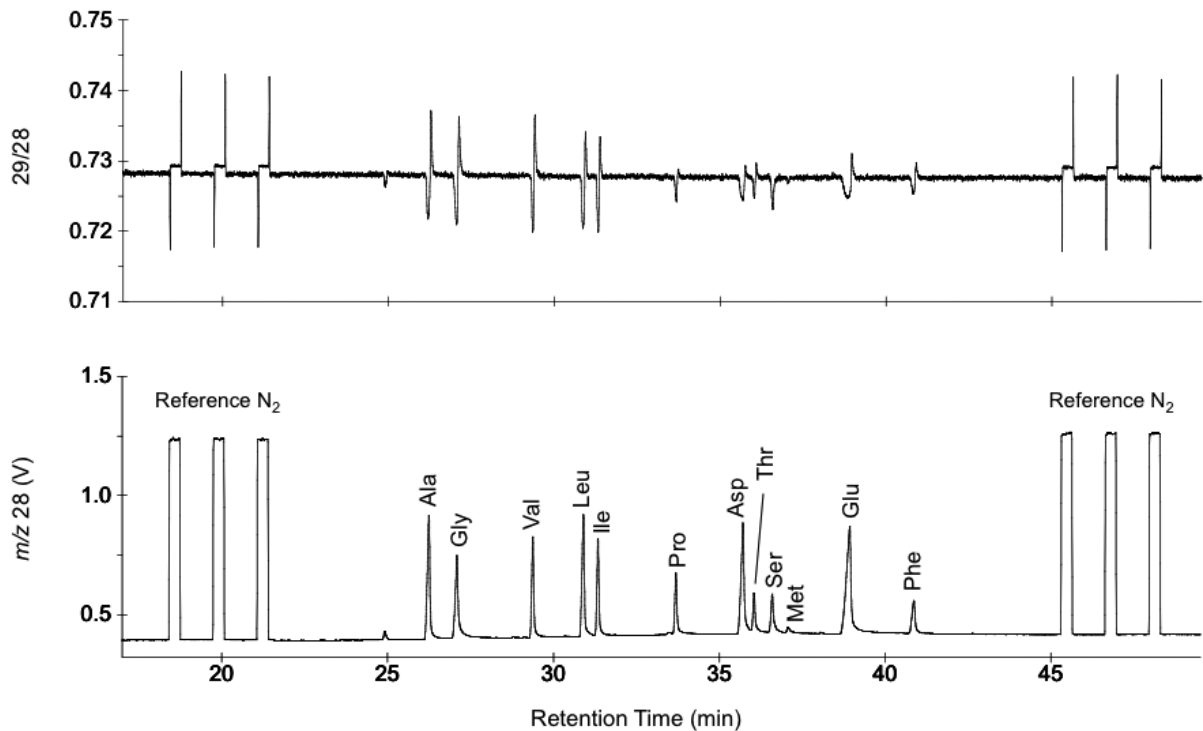


Fig. 6 Representative chromatogram of GC/IRMS analysis of amino acids.

次生産者として、動物プランクトン、魚などの生物で構成される水界生態系の生食連鎖においては、海棲、淡水棲にかかわらず、その妥当性が高く評価されているが (Fig. 3; Chikaraishi *et al.*, 2009), 式 (2) を直接、腐食連鎖系や陸上生態系、化学合成生態系、共生系などに適用できるかどうかは、まだはっきりしていない。また、式3の β は、水界生態系では+3.4%であるが、陸上生態系では、C3植物を起点とした場合に、-8.4%、C4植物を起点とした場合に+0.4%と、系によって異なる値をもつことが報告されている (Chikaraishi *et al.*, 2010a)。今後、得られる情報の精度を高め、質の高い議論を行うためには、様々なケースについて、培養やコントロール下での飼育実験などを通じて、基礎的なデータをさらに増やしていくことが必要である。また同時に、前処理や測定法の簡易化・最適化などの研究 (山口ほか, 2009) も重要である。

生態学における食物連鎖網研究の究極的な目標の1つは、生態系に生息する動物が何を餌としているかを明らかにすることであり、栄養段階の推定はその全体像を客観的に理解するためのひとつの手段にすぎない。フェニルアラニンの窒素同位体比が一次生産者のそれとほとんど一致すると言っても、コントロール下

での飼育実験や、生物学的に何が何を食べているかが明らかな系を除く複雑な自然界のほとんどのケースにおいては、これらの窒素同位体比から一次生産者を明確に特定することは簡単でない。しかし、アミノ酸の窒素同位体比から得られる栄養段階や一次生産者の窒素同位体比に加えて、アミノ酸の炭素同位体比を測定することができれば、複雑な天然の食物連鎖網をさらに詳しく捉えることができる可能性がある。例えば、植物プランクトンの炭素同位体比は、炭素固定に用いた光合成系の違いや溶存二酸化炭素の濃度・同位体比を反映してバリエーションをもつ。従って、炭素同位体比が測定できれば、Fig. 7に示すように、異なる炭素同位体比を持つ生態系に属する生物群を区別できる可能性がある。残念ながら、現時点では、生物に含まれる個々のアミノ酸の炭素同位体比を正しく (0.5~1.0%以内の誤差で) 測定する一般的・汎用的な手法は確立していない。これまで、TFA/iPr誘導体化を用いて、GC/IRMSで炭素同位体比を測定している論文が多数報告されているが、その全てが、誘導体化に伴う同位体分別についての正確な補正を行っていない (Chikaraishi and Ohkouchi, 2010)。1990年代前半以前に用いられていたような、イオン交換クロマトグラフィーにより個々のアミノ酸を単離し同位体比を測

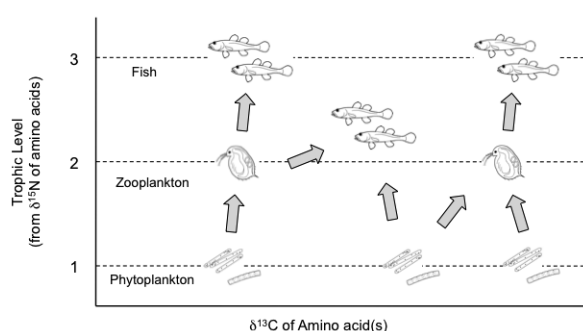


Fig. 7 Potential to access complex networks of food chain by $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ of amino acids.

定するという、一部の科学者だけが扱える特殊な技術で、分析に多くの試料と時間を必要とする手法（例えば、Engel and Macko, 1984; Hare *et al.*, 1991; Minagawa *et al.*, 1992）が、現時点で最も正確な同位体比を出すことのできる手法である。しかし、アシル／メチルエステル（Ac/Me）誘導体化とその同位体分別の補正法（Corr *et al.*, 2007a, 2007b）、エチルエステル（Et）誘導体化と極性 GC カラムを用いた同位体比測定法（Chikaraishi and Ohkouchi, 2010）、誘導体化を用いずに HPLC/IRMS により炭素同位体比を測定する手法（Smith *et al.*, 2009）などの研究が積極的に行われている。近い将来、アミノ酸の炭素同位体比を加えた議論も可能になるであろう。

D 体、L 体アミノ酸を区別した光学異性体レベルで同位体比の情報を得ることも、大きな進展をもたらすと考えられる。我々高等動物の身体を構成するタンパク質は、基本的に L 体アミノ酸で構成されているが、一部の臓器、組織や、バクテリアには多くの D 体アミノ酸が存在する。現在、光学異性体レベルでの同位体比測定法の開発も積極的に行われており（Takano *et al.*, 2009）、今後それらが一般的に利用できるようになれば、例えば、海洋や湖沼の POM（粒子状有機物）や堆積物におけるバクテリアの活動、生態系（腐食連鎖）の情報も得られるようになるであろう。

謝 辞

本稿の内容は、科学研究費補助金（力石・高野・小川）により実施した研究成果の一部を取り纏めたものである。本研究を進めるにあたり、和田英太郎先生（海洋研究開発機構）には、様々なアドバイスをいただきました。本研究プロジェクトを推進するにあたり北里洋領域長（海洋研究開発機構）には様々な支援を

頂きました。本稿の挿絵（水棲生物のイラスト）は廣野留都さんに提供して頂きました。心より厚く御礼申し上げます。また、匿名の査読者（2名）には、本稿の査読を通じて貴重なアドバイス・コメントを頂きました。記して厚く感謝致します。

引用文献

- Altabet, M. A. and Francois, R. (1994) Sedimentary nitrogen isotopic ratio as a recorder for surface ocean nitrate utilization. *Global Biogeochemical cycles*, **8**, 103-116.
- Bender, D. A. (2002) Introduction to Nutrition and Metabolism. CRC Press, London, UK.
- Cabana, G. and Rasmussen, J. B. (1996) Comparison of aquatic food chains using nitrogen isotopes. *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA*, **93**, 10844-10847.
- 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. *Researches in Organic Geochemistry*, **23/24**, 99-122.
- Chikaraishi, Y. and Ohkouchi, N. (2010) An improved method for precise determination of carbon isotopic composition of amino acids. In: *Earth, Life, and Isotopes* (eds. Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K.), Kyoto University Press, pp. 355-366.
- 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. *Marine Ecology Progress Series*, **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. *Limnology and Oceanography: Methods*, **7**, 740-750.
- 力石嘉人・高野淑識・大河内直彦（2009）アミノ酸（ピパロイル／イソプロピルエステル誘導体）の GC/MS による解析. *Researches in Organic Geochemistry*, **25**, 61-70.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O. and Ohkouchi, N. (2010a) Further evaluation of the trophic level estimation based on nitrogen isotopic composition of amino acids. In: *Earth, Life, and Isotopes* (eds. Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K.), Kyoto University Press, pp. 37-51.
- Chikaraishi, Y., Takano, Y., Ogawa, N. O. and Ohkouchi, N. (2010b) Instrumental optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry. In: *Earth, Life, and Isotopes* (eds. Ohkouchi, N., Tayasu, I. and Koba, K.), Kyoto University Press, pp. 367-386.
- Corr, L. T., Berstan, R. and Evershed, R. P. (2007a) Optimisation of derivatisation procedures for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ values of amino acids by gas chromatography/com-

- bustion/isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **21**, 3759–3771.
- Corr, L. T., Berstan, R. and Evershed, R. P. (2007b) Development of *N*-acetyl methyl ester derivatives for the determination of $\delta^{13}\text{C}$ values of amino acids using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **79**, 9082–9090.
- Dore, J. E., Brum, J. R., Tupas, L. M. and Karl, D. M. (2002) Seasonal and interannual variability in sources of nitrogen supporting export in the oligotrophic subtropical North Pacific Ocean. *Limnology and Oceanography*, **47**, 1595–1607.
- Engel, M. H. and Macko, S. A. (1984) Separation of amino acid enantiomers by high-performance liquid chromatography for stable nitrogen and carbon isotopic analyses. *Analytical Chemistry*, **56**, 2598–2600.
- Engel, M. H., Macko, S. A. and Silfer J. A. (1990) Carbon isotope composition of individual amino acids in the Murchison meteorite. *Nature*, **348**, 47–49.
- Fry, B. (2006) *Stable Isotope Ecology*. Springer, New York, USA.
- Hare, P. E., Fogel, M. L., Stafford, Jr. T. W., Mitchell, A. D. and Hoering, T. C. (1991) The isotopic composition of carbon and nitrogen in individual amino acids isolated from modern and fossil proteins. *Journal of Archaeological Science*, **18**, 277–292.
- Hobson, K. and Welch, H. E. (1992) Determination of trophic relationships within a high Arctic marine food web using $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analysis. *Marine Ecology Progress Series*, **84**, 9–18.
- Matthews, B. and Mazumder, A. (2005) Consequences of large temporal variability of zooplankton $\delta^{15}\text{N}$ for modeling fish trophic position and variation. *Limnology and Oceanography*, **50**, 1404–1414.
- 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. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **71**, 4727–4744.
- McClelland, J. W. and Montoya, J. P. (2002) Trophic relationships and the nitrogen isotopic composition of amino acids in plankton. *Ecology*, **83**, 2173–2180.
- McClelland, J. W., Holl, C. M. and Montoya, J. P. (2003) Relating low $\delta^{15}\text{N}$ values of zooplankton to N_2 -fixation in the tropical North Atlantic: insights provided by stable isotope ratios of amino acids. *Deep-Sea Research, I*, **50**, 849–861.
- Metges, C. C., Petzke, K. J. and Henning, U. (1996) Gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometric comparison of *N*-acetyl- and *N*-pivaloyl amino acid esters to measure ^{15}N isotopic abundances in physiological samples: A pilot study on amino acid synthesis in the upper gastro-intestinal tract of minipigs. *Journal of Mass Spectrometry*, **31**, 367–376.
- Minagawa, M. and Wada, E. (1984) Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: further evidences and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **48**, 1135–1140.
- Minagawa, M. and Wada, E. (1986) Nitrogen isotope ratios of red tide organisms in the East China Sea: a Characterization of biological nitrogen fixation. *Marine Chemistry*, **19**, 245–259.
- Minagawa, M., Egawa, S., Kabaya, Y. and Karasawa-Tsuru, K. (1992) Carbon and nitrogen isotope analysis for amino acids from biological sample. *Mass Spectroscopy*, **40**, 47–56.
- Miyake, Y. and Wada, E. (1967) The abundance ratio of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in marine environments. *Records of Oceanographic Works*, **9**, 37–53.
- O'Reilly, C. M., Hecky, R. E., Cohen, A. S. and Plisnier, P. -D. (2002) Interpreting stable isotopes in food webs: Recognizing the role of time averaging at different trophic levels. *Limnology and Oceanography*, **47**, 306–309.
- Ogawa, N. O., Koitabashi, T., Oda, H., Nakamura, T., Ohkouchi, N. and Wada, E. (2001) Fluctuations of nitrogen isotope ratio of gobiid fish (*Isaza*) specimens and sediments in Lake Biwa, Japan, during the 20th century. *Limnology and Oceanography*, **46**, 1228–1236.
- Pakhomov, E. A., McClelland, J. W., Bernard, K., Kaehler, S. and Montoya, J. P. (2004) Spatial and temporal shifts in stable isotope values of the bottom-dwelling shrimp *Nauticaris marionis* at the sub-Antarctic archipelago. *Marine Biology*, **144**, 317–325.
- 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* (eds. Dawson, T. E. and Siegwolf, R. T. W.), Academic Press, 173–190.
- Post, D. M. (2002) Using stable isotopes to estimate trophic position: models. Methods, and assumptions. *Ecology*, **83**, 703–718.
- Rau, G., H., Ainley, D. G., Bengtson, J. L., Torres, J. J. and Hopkins, T. L. (1992). $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ in weddell Sea birds, seals, and fish: implications for diet and trophic structure. *Marine Ecology Progress Series*, **84**, 1–8.
- Schmidt, K., Atkinson, A., Stubing, D., McClelland, J. W., Montoya, J. P. and Voss, M. (2003) Trophic relationships among Southern Ocean copepods and krill: Some uses and limitations of a stable isotope approach. *Limnology and Oceanography*, **48**, 277–289.
- Schmidt, K., McClelland, J. W., Mente, E., Montoya, J. P., Atkinson, A. and Voss, M. (2004) Trophic-level interpretation based on $\delta^{15}\text{N}$ values: implications of tissue-specific fractionation and amino acid composition. *Marine Ecology Progress Series*, **266**, 43–58.
- Smith, C. I., Fuller, B. T., Choy, K. and Richards, M. P. (2009)

- A three-phase liquid chromatographic method for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of amino acids from biological protein hydrolysates using liquid chromatography-isotope ratio mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **390**, 165–172.
- 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. *Analytical Chemistry*, **81**, 394–399.
- 和田英太郎 (1997) 窒素安定同位体による生物地球化学的研究. 地球化学, **31**, 17–25.
- Wada, E. and Hattori, A. (1976) Natural abundance of ^{15}N in particulate organic matter in the North Pacific Ocean. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **40**, 249–251.
- Wada, E. and Yoshioka, T. (1995) Isotope biogeochemistry of several aquatic ecosystem. *Geochemistry International*, **32**, 121–140.
- Wada, E., Terazaki, M., Kabaya, Y. and Nemoto, T. (1987). ^{15}N and ^{13}C abundances in the Antarctic ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web. *Deep-Sea Research*, **34**, 829–841.
- 山口保彦・力石嘉人・横山祐典・大河内直彦 (2009) アミノ酸 (エトキシカルボニル/エチルエステル誘導体) の GC/MS による解析. *Researches in Organic Geochemistry*, **25**, 71–82.
- Yoshii, K., Melnik, N. G., Timoshkin, O. A., Bondarenko, N. A., Anoshko, N., Yoshioka, T. and Wada, E. (1999) Stable isotope analyses of the pelagic food web in Lake Baikal. *Limnology and Oceanography*, **44**, 502–511.
- Yoshioka, T., Wada, E. and Hayashi, H. (1994) A stable isotope study on seasonal food web dynamics in a lake. *Ecology*, **75**, 835–846.