

同位体生理・生態学の動向 —自然界の食物連鎖を中心として

和田 英太郎*

1. はじめに

同位体比精密測定法は、分子振動の差を解析する Stable Isotope (SI) ワールド解析学であり、統計熱力学に支配された生物界の構造(Bigeleisen and Wolfsberg, 1958) を見る事が出来る。すなわち、SI 法は化学反応における同位体効果を基盤とする生物現象の解析法であり、物質の動態について生物種を超えた一般性が期待できる事象を扱う方法でもある(和田・神松, 2010)。従って、私の研究テーマは、「窒素・炭素安定同位体比で、生物界を透視する」と要約できる。当面の目的は、生態系並びに生物体内の N/C 同位体比の分布と変動から SI ワールドの規則性を明らかにし、自然生態系の食物連鎖の持続性について、代謝系のレベルまで深化して考察したいと思っている。この目標に沿って、自然界の生物の環境適応が十分に進み、同位体比の変動に一般性のある分布則が最も期待される“時間スケールの長い歴史を持つ食物連鎖”に注目した。この様な連鎖に組み込まれた動物は、一定の値の窒素・炭素同位体比を持つ餌を超長期世代に亘って取り込み、代謝系の分子レベルまで同位体比の分布が規格化されていることが期待できる。すなわち、生物の持続的存在から見て、アミノ酸代謝に関して 3R: Reduce, Recycle, Re-Use が十分に達成された代謝系が存続していると期待される。

この様な観点に立脚して、“Isotopically Ordered World の提示は可能か? ” を考察する。さらに、生物圏の進化における環境適応、特に食物連鎖の環境適応を分子振動から探求してゆき、

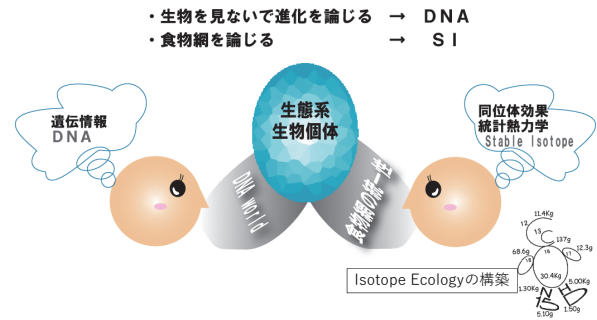


図1. 安定同位体 (SI) ワールドと DNA ワールドの統合を目指して

水界生態系の“同位体生理・生態学、生物地球化学の構築”を目指す。すなわち、巨視的生態系から生体内まで SI World と DNA World をつなぐこと(図1)が最終目標となる。

2. 生物界の窒素・炭素安定同位体比の変動要因

同位体生態系における窒素・炭素の同位体効果の生起部位を模式的に図2に纏めた。それぞれの数字は、① CO₂, CH₄, N₂O, NH₃, NO₃ の生成経路や起源の解明, ②・③藻類の生育生理, ④生体内同位体分布, ⑤食物網の構造, に対応している。

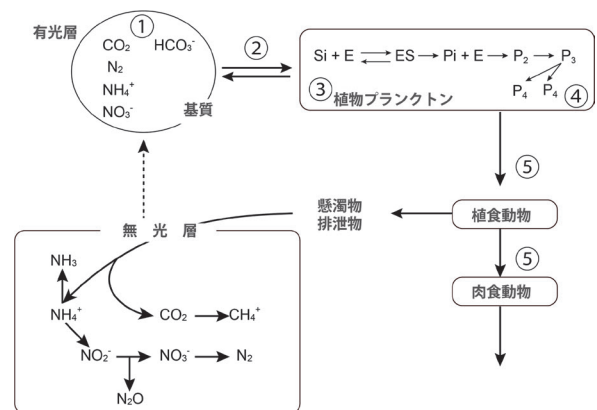


図2. 窒素炭素同位体比分別に注目した生態系の模式図

*京都大学名誉教授・総合地球環境学研究所名誉教授

① CO₂, CH₄, N₂O, NH₃, NO₃ の生成経路や起源

藻類の基質となる窒素・炭素の地球化学的物質循環で、大気二酸化炭素と海洋の全炭酸の間の炭素同位体交換反応、窒素固定、硝化・脱窒における窒素同位体効果、POMの分解過程、土壌系でのアンモニア吸着過程などにおける同位体分別などを挙げる事が出来る (Wada and Hattori, 1991).

②, ③藻類の生育生理

藻類の窒素・炭素同位体比は、基質の取り込みと細胞内の同位体効果 (α) の動態によって決定される。細胞あたりの同化速度 (生育速度 μ) の定常状態下では、下記の関係式が知られている (Wada and Hattori, 1991).

$$(\alpha - 1) = \Delta K_0^+ + (\Delta k_2 y - \Delta K_0^-) X \quad (1).$$

ここで、 α は NO₃ 取込・同化の見かけ上の窒素同位体分別係数、 ΔK_i は窒素同位体分別係数から 1 を引いた値、 k_0 は NO₃ の膜の出入り過程、 k_2

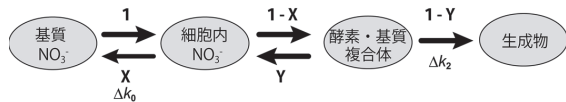


図 3a. 藻類による無機態窒素、二酸化炭素取り込みの模式図

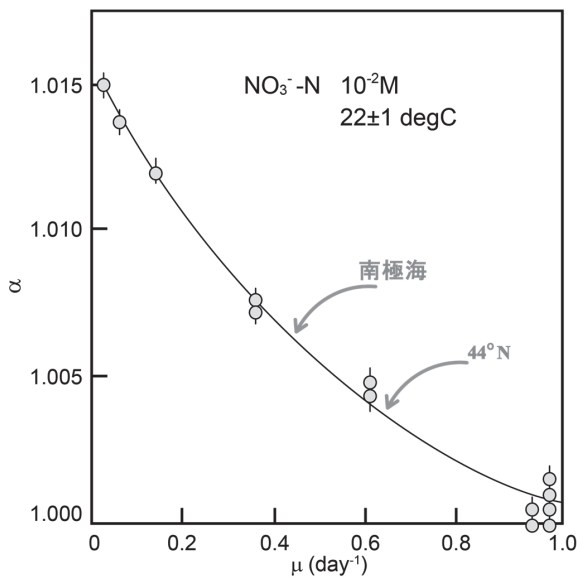


図 3b. 珪藻 *Phaeodactylum tricornutum* を光律速化で生育した時の、硝酸同化における窒素同位体分別 (α) と生育速度定数 (μ) の関係

は NO₃ の N-O ボンド開裂の過程に対応している。X・Y はそれぞれの逆反応の比率で 0 から 1 の間を取る (図 3 参照)。この結果は、生育速度が遅くなると藻類の窒素 ($\delta^{15}\text{N}$) は低くなる。逆に、生育速度が速くなると、基質律速になり基質の同位体比に近い値 (高い値) を示すことになる (炭素同位体比も同様である (図 3))。

④生体内同位体分布 (Amino Acid Trophic Level: AATL)

一般に換算質量の小さいアミノ基やカルボキシル基の脱アミノ・脱炭酸で炭素・窒素の同位体効果が起こりやすい。

窒素同位体の変動メカニズム (脱アミノ) として、次のプロセスが挙げられる。

- 1) 細胞質：食料の中の蛋白質はアミノ酸態で吸収されるが、その 9 割は動物のエネルギー源として使われる。このため細胞質中の餌由来の非必須アミノ酸は脱アミノされ、アラニン (Ala)、アスパラギン (Asp)、グルタミン酸 (Glu) になり、最終的には全ての脱アミノされたアミノ基は Glu の形となりミトコンドリア内に輸送される。この脱アミノで残った非必須アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ は高くなる。
- 2) ミトコンドリア：ミトコンドリアの膜系にのみグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) なる酵素が存在し、炭素と窒素のカップリングを支配する下記の反応を可逆的に行う。



ここで Glu のアミノ基の $\delta^{15}\text{N}$ は更に高くなる。事実、Chikaraishi et al. (2011; 力石ら 2011) の一連の結果によると、摂餌過程で Glu の $\delta^{15}\text{N}$ はフェニルアラニン (Phe) に比べ 7.6 % 高くなること、また、この値は、昆虫、魚類、哺乳類についても同じ値が得られていることが報告されている (図 4. Chikaraishi et al., 2999, 2011; 力石ら 2011)。後述する食物連鎖に沿った蛋白質の 3.4 % の濃縮も、このような脱アミノ時の窒素同位体

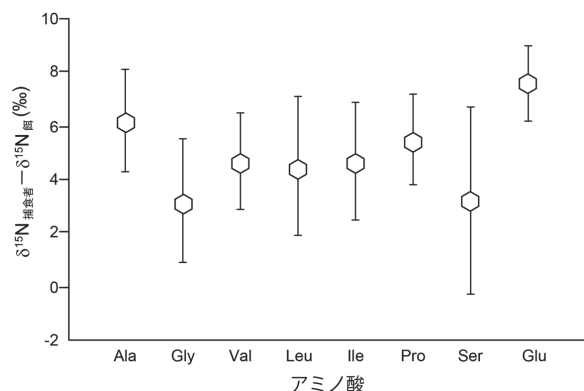


図 4. アミノ酸の窒素同位体比から動物の栄養段階を算出できる。摂餌における各アミノ酸の $\Delta\delta^{15}\text{N}$ は動物種に関わらず一定である。

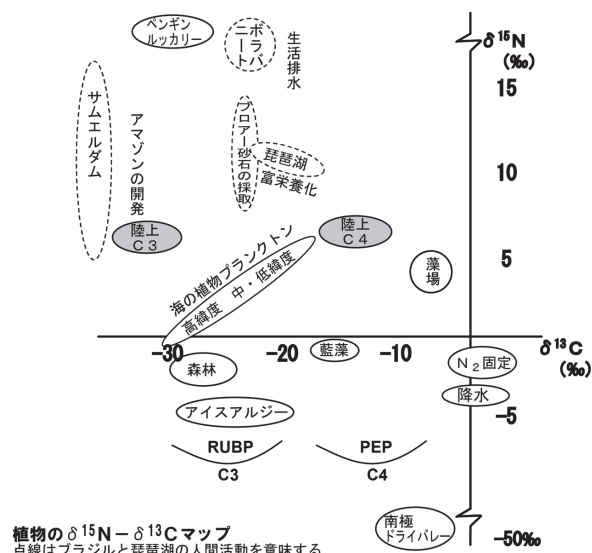
効果による。さらに、一次生産者のアミノ酸の窒素同位体比の変動パターンは、 C_3 植物を通して類似性が高く、アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ から算出される動物の栄養段階 (AATL) には対し、

$$\text{AATL}_{\text{animal}} = \frac{\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} + 3.4}{7.6} + 1 \quad (3),$$

の式が適応できる。ここで、Glu、Phe 以外の他のアミノ酸の摂餌濃縮率は一定の値を示す (Chikaraishiet al., 2009, 図 4)。ここから、自然界の食物連鎖に沿った動物のアミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ は、食物連鎖の起点となる一次生産者の各アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ が決まれば、各アミノ酸の一定の濃縮率を導入することによって連鎖中の高次動物の各アミノ酸の $\delta^{15}\text{N}$ が予測可能となり、「アミノ酸に関する Isotopically Ordered World (Ohkouchi et al., 2015)」が期待できることになる。

⑤食物連鎖

食物連鎖の出発点となる一次生産者 (植物、藻類) の同位体比は、環境に応じて地域的な特徴を示す (図 5 (a), (b))。また、高等植物では、炭酸固定経路の違いによる C_3 と C_4 植物によって $\delta^{13}\text{C}$ の値は大きく異なる (Wada et al., 2012)。一方、窒素安定同位体比は、生育に使われる窒素の起源を反映して、降水型、土壌型、窒素固定型等に区分される。このように、一次生産者の生息する地域性に応じて、これを摂餌する動物の $\delta^{15}\text{N}$ ・ $\delta^{13}\text{C}$ も地域性を示すことになる (Wada et al.,



植物の $\delta^{15}\text{N}$ - $\delta^{13}\text{C}$ マップ
点線はブラジルと珪藻湖の人間活動を意味する

図 5a. 食物連鎖の出発となる植物は環境に応じて地域的な特徴を示す。陸上の植物の炭素同位体比は C_3 と C_4 植物に分かれる。窒素同位体比は生育に使われる窒素の起源を反映して、降水型、土壌型、窒素固定型等に分かれる。

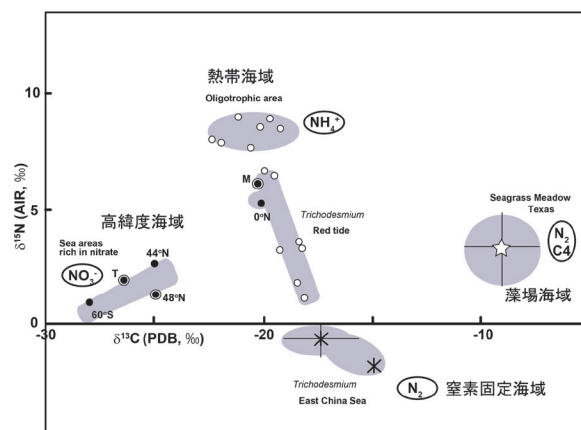


図 5b. 海洋の植物プランクトンの窒素・炭素同位体マップ

2013; 和田・野口, 2017)。これに関しては 4 節に詳しく述べる。

3. $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ の生物界における応用例

3-1. ヒトの髪の毛の同位体マップ

ヒトの髪の毛やコラーゲンも、過去に食べた食物の $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ を反映して変動することが知られている (米田ら, 2011)。考古学の分野では、アメリカンインディアンの世界におけるトウモロコシの伝播に関する研究、草食や肉食、魚類食の差異を区別する食文化の研究などが代表例となる。

3-2. オームルの鱗の $\delta^{13}\text{C}$ と大気 CO_2 の $\delta^{13}\text{C}$ の経年変化による比較

バイカル湖の主要有用魚種であるオームル（サケ科）の鱗の $\delta^{13}\text{C}$ の経年変化は、大気 CO_2 の変化と連動していることが見いだされた（Ogawa et al., 2000）。また、大気中の CO_2 の $\delta^{13}\text{C}$ は化石燃料の負荷によって年々低下しているが、これを反映した現象が高次の魚類にまで及んでいた。

3-3. 体組織と $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$ 値

16 個体のラットを同一の餌で飼育し、組織レベルでの $\delta^{15}\text{N}$ と $\delta^{13}\text{C}$ に違いがないことを見出した。また、昆虫、魚類、哺乳類では脳と心臓の $\delta^{15}\text{N}$ が高く（Ohkouchi, et al., 2015）、一方で、ハシビロガモ、ショウジョウトキ、ハシボソミズナギドリ、カワウなどの鳥類は調べた限り、脳が部位の中で最も低い $\delta^{15}\text{N}$ 値を示したが、理由は分かっていない。また近年、拒食症や妊娠によって、体を構成する蛋白質の $\delta^{15}\text{N} \cdot \delta^{13}\text{C}$ が変動することが知られてきた（Fuller, B.T. et al., 2005; Hatch, K.A. et al., 2006）。

3-4. 遺伝子解析への応用例

自然界に存在する親性元素の重い元素の存在による遺伝子（DNA）の複製に及ぼす影響は、進化の面から興味深い課題である。アユの目の DNA について、重水（ D_2O ）中で PCR（ポリメラーゼ連鎖反応法）を行ったところ、読み違いの最高値として、塩基ベースで 1.8×10^{-3} errors/bp の値が得られている（Minamoto et al., 2012）。この分野の今後の展開を期待したい。

4. 食物網の構造

4-1. 経験則（1）

動物（動物プランクトンや魚類、哺乳類など）の摂餌過程における $3.4 \pm 1.1\%$ の ^{15}N の濃縮、

$$\delta^{15}\text{N}_{\text{animal}} = 3.4 \times (\text{TL} - 1) + \delta^{15}\text{N}_{\text{plant}}$$

TL: Trophic level (4),

を見出した（和田・野口, 2017）。南極海でも 3.3% /TL の上昇が確認されている（Wada et al., 1987）。これらの知見から、バルクの筋肉についてほとんどの動物にみられる $\Delta\delta^{15}\text{N} = 3.4 \pm 1.1$ の ^{15}N の濃縮率のばらつきは、

- ②餌と捕食者の筋肉のアミノ酸組成の差、
- ③一次生産者の N/C 同位体比のばらつき、
- ④捕食者の生理状態（例えば、異化・同化など）、

によって変化すると考えられる。これを検証するためには、生体内（筋肉たんぱく質）のアミノ酸組成比と同じ組成比の餌を給餌させれば、 $\Delta\delta$ 値は一定となるのではないかと、という作業仮説が浮かび上がる。

4-2. 経験則（2）

一次生産者の $\delta^{15}\text{N} \cdot \delta^{13}\text{C}$ 値について、地域性が反映されることにふれた（図5）。これを出発点とする各食物連鎖は、 $\delta^{15}\text{N} - \delta^{13}\text{C}$ マップ上で一定の $\Delta\delta^{15}\text{N} / \Delta\delta^{13}\text{C}$ 比をもつ場合が多く報告されていた。この事実は、特に古代湖や外洋の水界生態系の食物連鎖について顕著にみられる。しかしながら、これら $\Delta\delta^{15}\text{N} / \Delta\delta^{13}\text{C}$ に関する比較検証では、データのバラツキの大きさから明確な結果が示せていなかった。これを検証するために、Aita et al. (2011) は北太平洋亜寒帯域および南極海で、Wada et al. (2013) はモンゴル草原、琵琶湖およびバイカル湖の陸水で得られた同位体比データ（図6）を用いて、各食物連鎖が持つ $\Delta\delta^{15}\text{N} / \Delta\delta^{13}\text{C}$ の違いについて共分散分析（ANCOVA）による統計的な検証を行った。その結果、海域においては

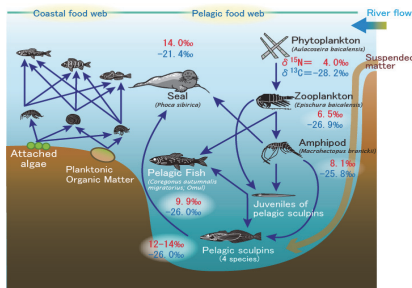
$$\delta^{15}\text{N} = (1.53 \pm 0.25) \times \delta^{13}\text{C} + \text{各生態系の定数} \quad (5),$$

陸水域の食物連鎖については、

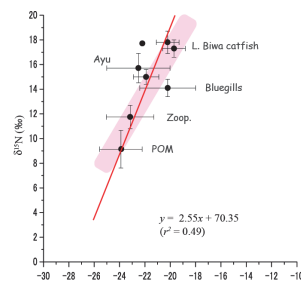
$$\delta^{15}\text{N} = (1.61 \pm 0.41) \times \delta^{13}\text{C} + \text{各生態系の定数} \quad (6),$$

が得られている。海域の $\Delta\delta^{15}\text{N} / \Delta\delta^{13}\text{C}$ は $1.53 \pm 0.25\%$ であり、陸水域の $1.61 \pm 0.41\%$ と大きく異なら

(a) バイカル湖



(b) 琵琶湖



(c) モンゴル草原

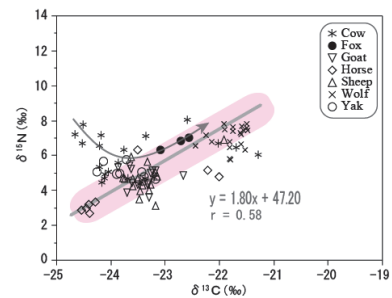


図 6. $\delta^{13}\text{C}$ と $\delta^{15}\text{N}$ の関係を生態系ごとに調べ統計処理 (共分散分析) すると有意で同じ勾配になる。

ない ($p < 0.05$). この結果から、海域及び陸水域の全ての食物連鎖から得られた経験式は、

$$\delta^{15}\text{N} = (1.62 \pm 0.24) \times \delta^{13}\text{C} + \text{各生態系の定数} \quad (7)$$

であった。この結果から、海域・陸域の区分なく、食物連鎖がもつ $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C}$ には大きな地域差がない、つまり、地域性や生物 (動物) 種に関わらず似通った $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C}$ をもっていることが示唆された (和田・野口, 2017)。この事実は、「食う-食われる」の過程における炭素・窒素同位体効果の比が生物に関わらず普遍的に一定の値を示す可能性を示唆する。この経験則は、窒素固定系が卓越している太平洋亜熱帯海域の食物連鎖についても見いだされている (Horii et al., 2018)。

一次生産者 (植物・藻類) の $\delta^{15}\text{N} \cdot \delta^{13}\text{C}$ 値は、生育速度に伴い大きく変化する。しかし、上述のような食物連鎖の経験則 $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C} = \text{一定}$ が得られた背景に、植食性および雑食性動物が草原や水界を移動しながら摂餌して、一次生産者の局所の変動を平均化 (均質化) する効果を組み込む必要がある。また、一般的に、生物 (動物) のエネルギー生成系・アミノ酸代謝系は概ね似通っており、窒素・炭素同位体分別は、脱アミノや脱炭酸のような生物に共通な反応段階で生起すると考えられる。したがって、主に脱アミノと脱炭酸のみで N/C の同位体効果が生起し、その影響が生物種に変わりなく捕食者の蛋白質のペプチド結合に現れることになることが予想される (図 7)。また、動物の体を作るアミノ酸は、餌と自己の蛋白質を分解したアミノ酸を使う salvage 経路と新規にア

αアミノ酸

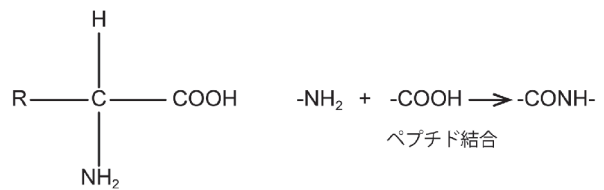


図 7. 一般に換算質量の小さいアミノ基やカルボキシル基の脱アミノ・脱炭酸で C/N の同位体効果が起こりやすい。アミノ酸のアミノ基と -COOH 基は脱アミノや脱炭酸によって ¹⁵N, ¹³C が濃縮されペプチド結合になることが予想されている。

ミノ酸を生合成する de novo 経路があるが、自然界の食物連鎖では動物は、denovo アミノ酸の経路はあまり動かないと予想される。(力石ら, 2011)。さらに、餌と自己体内の分解アミノ酸のみを生合成に利用し、その蛋白質合成のダイナミクスは似通っている、すなわち、同じ食物連鎖上にある餌と捕食者の筋肉たんぱく質の同位体組成が、アミノ酸レベルでは規則性が示唆される。

また、自然界の食物連鎖は、アミノ酸代謝に関して、

- ① Reuse : 餌のアミノ酸の再利用,
- ② Recycle : 自己の体の蛋白質が分解して生成するアミノ酸のリサイクル,
- ③ Reduce : 食物連鎖に於ける代謝系の機能的適応戦略の原理 (必要最小限の材料を使って、最大の効果が得られるように形作られる),

によって、代謝系の律速様式が似ている事がその背景にあると思われる。したがって、自然界の食物連鎖は、上記、三つの枠組みの中で贅肉を切り落として、その持続的存続を保っていると予想さ

れる。この点に関しては、今後、アミノ酸レベルでの $\Delta\delta^{13}\text{C}$ の変動の研究によって、メカニズムの詳細が明らかになる日も近いと思われる。此処にみられる二つの経験則は、“生態系を分子振動に基づく同位体効果で解析する筋道”、を拓く同位体生態学の扉を開けたと考えている。

6. これから

これらの経験則を検証し発展させることにより、生体内代謝系の動態の中で C/N Isotopically Ordered World の姿を描き出せる可能性が現実的なものとなりつつある。ここで提案する Isotopically Ordered World は、 C_3 植物を出発点とする生態系では器官（各種臓器、毛など）や各アミノ酸、各アミノ酸の分子内炭素・窒素同位体分布に規則性のあることを強く予想させる。この仮説を検証することが、この分野の新しい方向となる。また、SI 比の生体内の変動を切り口として、遺伝情報や発現機構の生物学を包括した SI から透視したメタボリックマップのダイナミクスの研究を進め、新しい SI 生理生態学を拓けることが期待される。将来、アミノ酸や低分子有機化合物の分子内同位体分布の研究開発などは、生態系食物網の研究ばかりでなく、医療診断への応用も期待される。

近年、生態学には分子生物学的な DNA 法と、安定同位体精密測定法が導入された。前者は生物界を遺伝情報で透視する方法であり、後者は物質や生命活動を分子振動の反応速度論（同位体効果）で透視する方法である。前者は研究者人口も多く、極めて生物・生命現象に直結しており、その学問領域はすさまじい発展を遂げている。後者を、ここでは Stable-Isotope: SI 法と呼ぶことにしたが、ある物質の生成経路や生態系におけるある動物の食物連鎖網の中における位置付けに関する知見を与える。近年、分子レベルで炭素・窒素同位体を測定する技術も進み、更にアミノ酸の窒素同位体比を測定することにより一義的に目的とする動物の栄養段階を知ることが可能となった。一方、バ

ルクの筋肉を試料とするこれまでの方法も、世界の代表的な食物連鎖について、生き物の種類に関わらず、炭素・窒素同位体効果の比 ($\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C}$) が動物の種類に関わらず似通っており、ほぼ一定であることを見出した。すなわち「食う－食われる」の過程における炭素・窒素同位体効果が、生物に関わらず $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C} = 1.6$ の値を示す。

これらの知見を纏めると、小さな作業仮説：タンパク合成系に関与する脱アミノや脱炭酸が、新たに合成された蛋白質の $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ や N/C 比を高める。すなわち、

- ①一般に藻類の $\delta^{15}\text{N}$ 、 $\delta^{13}\text{C}$ は、基質が取り込みの律速にならない場合、生育速度（光の強さに依存）の関数になり、地域ごとに特徴のある値を示す。一方、これら藻類から始まる食物連鎖がもつ $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C}$ の値には大きな差がなく、地域性や生物（動物）種に関わらず似通った $\Delta\delta^{15}\text{N}/\Delta\delta^{13}\text{C}$ をもっている。
- ②ラットの脳の各部位の $\delta^{15}\text{N}$ 値は、鳥類を除いて脳の $\delta^{15}\text{N}$ 値が高いことを見出した。これらの知見は、SI 精密測定法が、SI 生理・生態学に展開できる可能性を示唆している。

そして、21 世紀の新しい環境観として、以下のようなことを考えている。

地球温暖化、長寿命高齢化、経済のグローバル化に留まることを知らない資源消費と世界の展開等々は、文理融合型の超学際的、分野横断型の環境研究の重要性を高めている。一方、衛星観測画像データ、ISOSCAPE (ISOtopic landSCAPE)、人工知能 (A.I.) の発展は、自然生態系のような、これまで困難であった不均一複雑系の研究に、新しい展開を可能にし始めている。すなわち、高度な観測のデータベースセットの蓄積と A.I. の併用によって、これまでの帰納法を高度化することが可能となっている。帰納法の学問の大発展の時代（記述・観測 → ビッグデータ → AI

→ ヒトによる統合)で示すことが出来よう。

これからは、リモートセンシング、物質循環、社会システムの高度モニタリングを300年、1,000年にわたって精密に進め、地道に「関係の構造を見出す」出発点に我々はいるのであるのか。そのようなビッグデータをA.I.によって整理・統合し、それらから英知を絞って新しい哲理を創出していく、そのような時代の出発点に我々はいるのであるのか。

この論文を書くに際し、査読と図の修正をして戴いた海洋研究開発機構 野口(相田)真希氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Aita, M.N., Tadokoro, K., Ogawa, N.O., Hyodo, F., Ishii, R., Smith, S.L., Saino, T., Kishi, M.J., Saitoh, S. and Wada, E., Linear relationship between carbon and nitrogen isotope ratios along simple food chains in marine environments, *J. Plankton Res.*, 33, 1629–1642 (2011)
- Bigeleisen, J. and Wolfsberg, M., Theoretical and experimental aspects of isotope effects in chemical kinetics, In: *Advances in Chemical Physics* (ed. I. Prigogine), Wiley, pp. 15–76 (1958)
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. and Ohkouchi, N., Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnol. Oceanogr. Methods*, 7, 740–750 (2009)
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N.O., Doi, H. and Ohkouchi, N., $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios of amino acids as a tool for studying Terrestrial food webs: a case study of terrestrial insects (bees, wasps, and honets), *Ecol. Res.*, 26, 835–844 (2011)
- 力石嘉人, 高野淑識, 小川奈々子, 佐々木瑤子, 土屋史, 大河内直彦, 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析に向けて, *Res. Org. Geochem.*, 27, 3–11 (2011)
- Fuller, B.T., Fuller, J.L., Sage, N.E., Harris, D.A., O'Connell, T.C. and Hedges, R.E.M., Nitrogen balance and $\delta^{15}\text{N}$: why you're not what you eat during nutritional stress. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19, 2497–2506 (2005)
- Hatch, K.A., Crawford, M.A., Kunz, A.W., Thomsen, S.R., Eggett, D.L., Nelson, S.T. and Roeder, B.L., An objective means of diagnosing anorexia nervosa and bulimia nervosa using $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in hair, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 20, 3367–3373 (2006)
- Horii, S., Takahashi K., Shiozaki T., Hashihama F., Furuya K. (2018) Stable isotopic evidence for the differential contribution of diazotrophs to the epipelagic grazing food chain in the midPacific Ocean. *Global Ecology and Biogeography*
- Minamoto, T., Wada, E., Shimizu, I. (2012) A new method for random mutagenesis by error-prone polymerase chain reaction using heavy water *Pages 71–74, J Biotech 157(1):71–74*
- Ogawa, N., Yoshii, K., Melnik, N.G., Bondarenko, N.A., Timoshkin, O.A., Smirnova-Zalumi, N.S., Smirnov, V.V., and Wada, E. (2000) Carbon and nitrogen isotope studies of pelagic ecosystems and environmental fluctuations of Lake Baikal. In: *Lake Baikal* (ed. Minoura, K.). Elsevier Science B.V. The Netherlands. pp. 262–272.
- Ohkouchi, N., Ogawa, N.O., Chikaraishi, Y., Tanaka, H. and Wada, E., Biochemical and physiological bases for the use of carbon

- and nitrogen isotopes in environmental and ecological studies, *Prog. Earth. Planet. Sci.*, doi: 10.1186/s40645-015-0032-y (2015)
- 和田英太郎, 野口真希 (2017) 窒素・炭素安定同位体を用いた新食物連鎖解析法—その現状と今後—, *Radioisotopes* 66(9): 331–342 (2017) doi:10.3769/radioisotopes.66.331
- Wada, E., Terazaki, M., Kabaya, Y., Nemoto, T., ^{15}N and ^{13}C abundances in the Antarctic Ocean with emphasis on the biogeochemical structure of the food web. *Deep Sea Res.*, 34, 829–841 (1987)
- Wada, E. and Hattori, A., Nitrogen in the sea: forms, abundances and rate processes. CRC Press, Florida, USA, pp 208 (1991)
- 和田英太郎, 神松幸弘編著, 安定同位体というメカネ—人と環境のつながりを診る, 地球研叢書 昭和堂, 171pp (2010)
- Wada, E., Ohki, K., Yoshikawa, S., Parker, P.L., Baalen, C.V., Matsumoto, G.I., Aita, M.N. and Saino, T., Ecological aspects of carbon and nitrogen isotope ratios of cyanobacteria. *Plank. Bent. Res.*, 7, 135–145 (2012)
- Wada, E., Ishii, R., Aita, M.N., Ogawa, N.O., Hyodo, F., Kohzu, A. and Yamada, Y., Possible ideas on carbon and nitrogen trophic fractionation of food chains: A new aspect of food-chain stable isotope analysis in Lake Biwa, Lake Baikal and the Mongolian grasslands. *Ecol. Res.*, 28, 173–181 (2013)
- 米田穰, 陀安一郎, 石丸恵利子, 兵藤不二夫, 日下宗一郎, 覚張隆史, 湯本貴和, 同位体からみた日本列島の食生態の変遷., 日本列島の三万五千年—人と自然の環境史 第6巻 環境史をとらえる技法 (湯本貴和編, 責任編集 高原光, 村上哲明), 文一総合出版, pp. 85–103 (2011)