

平成30年6月15日現在

機関番号：82706

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12198

研究課題名（和文）縞状堆積物のバイオマーカーイメージングによる超高時間分解古気候復元

研究課題名（英文）Paleoenvironmental reconstruction by imaging mass spectrometry of banded sediment

研究代表者

井尻 暁 (IJIRI, Akira)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・主任研究員

研究者番号：70374212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：過去数万年～数100万年間の超高時間分解（1年～10年規模）の古環境解析を行うことで、急激な気候変動メカニズムの解明に貢献することを最終的な目的として、分子量100～3,000の有機分子を最小5ミクロンの高解像度でイメージングできる「イメージング質量顕微鏡」を用いて、海洋や湖沼の縞状堆積物の単層一枚一枚に含まれる環境変動の指標となる有機分子（バイオマーカー）の二次元分布をミクロン単位の高空間分解能でマッピングする手法を確立した。この手法を用いて各種地質試料のバイオマーカーマッピングを試みた。

研究成果の概要（英文）：We established the method to analyze a two-dimensional distribution of organic molecules (biomarkers), which is an index of environmental variation contained in single layer of oceanic and lake sediments, by using Imaging Mass Spectrometry. And, by using the method, we tried to analyze geological samples.

研究分野：地球化学

キーワード：イメージング質量分析 バイオマーカー 古気候復元

1. 研究開始当初の背景

世界各地の海底堆積物や湖沼堆積物などに記録された各種代替指標（プロキシ）の分析による過去数百万年間の気候変動の復元は、氷期-間氷期に伴う全球的な気候変動システムの解明に大きく貢献してきた。近年ではより高時間分解の研究が行われ、氷期には全球的に100年～1000年規模の急激な気候変動が起こっていたことが明らかになっている。さらに最近では、人間活動の活発化による大気中二酸化炭素濃度の増加とそれに伴う地球温暖化が懸念されており、その影響の正確な評価・予測の為に、1年～10年規模の超高時間分解での古気候復元が求められている。

年々降り積もった堆積物が乱されずに堆積し、その供給源の季節ごとの違いによりmm単位で縞模様を呈する年縞堆積物（縞状堆積物）は、年単位の気候変動の復元に最も理想的な堆積物である。実際に縞ごとの層に含まれる微化石の分析により、10年規模での気候変動の復元が試みられている（Katsuki et al., 2014, *GRL* など）。しかし、薄い単層から目的のプロキシとなる化学成分や微化石を抽出し分析を行うには、mm単位で地層を切り出す技術的な困難を伴い、単層一枚一枚を分析し、10年～100年さらには数万年分析するためには膨大な時間と労力が必要となる。

このような背景の中、最近になって、イオン化されやすい物質（マトリックス）を試料に塗布してレーザーを照射することで有機分子をイオン化する、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)法を用いた、分子量100～3,000の有機分子を最小5μmの高解像度で網羅的にイメージングできる「イメージング質量顕微鏡」が生体切片試料の有機分子イメージングを目的に開発された。

堆積物中の有機物は、プランクトンや、周囲から供給される植物や土壌有機物を起源とし、分子ごとの濃度や組成比は、一次生産や陸源有機物の寄与の有効な指標となる。これらの有機分子は、バイオマーカーと呼ばれ、古環境復元の研究に大きな役割を果たしている。

このイメージング質量顕微鏡を用いて、縞状堆積物の単層一枚一枚に含まれるバイオマーカーの二次元分布のイメージング画像を得ることができれば、縞状堆積物を用いた高時間分解の古気候復元研究に大きなブレイクスルーをもたらすと期待される。

予察的な研究として、下北八戸沖の海底表層堆積物試料の切片を作成しイメージング質量分析を行い、得られた各有機分子の分布画像を用いた主成分分析の結果から堆積物由来の有機分子の特定に成功している（図1；第1主成分が樹脂由来、第2主成分がマトリックス由来、第3主成分以後が堆積物由来、第3主成分のうちm/z: 300-350のピークは珪藻由来のバイオマーカーと考えられる。

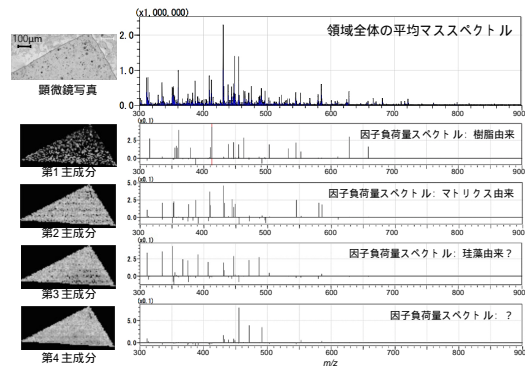


図1 下北八戸沖海底堆積物切片の有機分子イメージング

2. 研究の目的

本研究は、過去数万年～数100万年間の超高時間分解（1年～10年規模）の古環境解析を行うことで、急激な気候変動メカニズムの解明に貢献することを最終的な目的として、分子量100～3,000の有機分子を最小5μmの高解像度でイメージングできる「イメージング質量顕微鏡」を用いて、海洋や湖沼の縞状堆積物の単層一枚一枚に含まれる環境変動の指標となる有機分子（バイオマーカー）の二次元分布をμm単位の高空間分解能でマッピングする手法を確立することが目的である。

3. 研究の方法

本研究の遂行のために、地質試料の分析に適した前処理方法の検討を行った。

イメージング質量顕微鏡は生体試料の分析に特化して開発されたものであるため、堆積物の分析に適した前処理方法、分析条件の最適化が必要となる。通常の生体試料の場合は、導電性のあるITOコートされたガラススライドに、マイクロトームでスライスした凍結試料を融解接着するが、堆積物試料や地質試料はマイクロトームでスライスすることが難しい。また通常の地質試料は樹脂で固めてスライドガラスに貼り付けた後に研磨し研磨薄片を作るが、この方法では、ITOコートが剥がれてしまうという問題もあった。

このような地質試料や堆積物試料のための切片試料の作成方法について検討し、それぞれの試料に応じた切片作成方法を確立した。

(1) 脆い地質試料、岩石試料（サンゴ骨格、堆積物試料など）

試料を前もって樹脂包埋し、ステンレス製プレートに樹脂で接着する。この試料を岩石薄片のように研磨して研磨薄片を作る。研磨する際にITOコートが剥がれることなく、切片試料を作成することができる。ただし、切片試料の顕微鏡観察は落射光での観察のみである。樹脂包埋した試料は、イメージング分析を行った場合、バックグラウンドとして樹脂中の有機物を検出してしまうために、前

もって、樹脂のみのブランク測定が必要となる(学会発表)。

(2) 岩石試料

通常の岩石薄片試料と同様にスライドガラスに岩石切片を樹脂で接着し、研磨して研磨薄片を作成する。作成した研磨薄片を有機溶媒に浸し、接着した岩石薄片をスライドガラスから剥がす。この岩石薄片をITO コートしたスライドガラスに再度接着する。この手法の利点は、通常の薄片試料と同じく、透過光で顕微鏡観察が行えることである。欠点は溶媒に浸すことにより、試料中のバイオマーカーも溶出してしまう可能性があることである。

(3) 劈開のある試料

石膏などのように劈開がある岩石は、樹脂包埋も行わず、スライドへの接着も樹脂をつかわずに、薄く剥がした試料をカーボンテープで貼り付けることで、その他の有機物のコンタミネーションをおさえて試料を作成することができた(学会発表)。

(4) 隕石試料

他の有機物のコンタミネーションを極端に嫌う隕石などの試料については、試料を金箔におしつけて、それをカーボンテープでスライドに貼り付けて分析を行った(学会発表)。

4. 研究成果

確立した切片試料の作成方法を用いて、各種地質試料のバイオマーカー分析を試みた。

(1) サンゴ骨格のバイオマーカーイメージング

造礁性サンゴのバイオミネラル化で生成される骨格は、サンゴ礁を構成する主要物質である。少量の有機物と炭酸塩で構成されるサンゴ骨格は、マイクロメータスケールの円状の”石灰化中心(COC)”と、その周りを取り囲む”繊維状組織(Fiber)”等の微細構造が重なり合うことで形成される。では、COC と Fiber はどのように形成されるのか? このサンゴ骨格の微細構造形成機構解明は、サンゴ骨格を用いた古環境指標の信頼性向上、石灰化生物の保全、新規な有機・無機複合材料の創成など多岐への応用が期待される。これまで、COC と Fiber 間で、炭酸塩の結晶サイズがナノメータスケールで異なること、微量元素濃度や同位体比の偏在していることが明らかにされてきた。一方で、有機物はバイオミネラル化に重要であると考えられているが、COC と Fiber 形成にどのように関与するのか不明であった。そこでイメージング質量顕微鏡を利用し、マイクロメータスケールでの低分子量有機物のサンゴ骨格内分布を明らかにする実験を行った。

喜界島と石垣島で採取した *Porites*・*Acropora* 属の骨格試料は、次亜塩素酸ナトリウムで漂白し、樹脂包埋した。その後、試料を厚さ 0.1 mm 程度の薄片にした。2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)で蒸着した後、イメージング質量顕微鏡を用いて、解像度 < 5 μm での骨格内質量電荷比 $m/z < 900$ (positive and negative ion mode)を計測した。その結果、周囲の樹脂とは異なるが、サンゴ骨格内に一様に存在している特徴的な m/z を検出した。一方で、電子線マイクロアナライザー(EPMA)で計測した、有機物由来であると考えられているマグネシウム(Mg)や硫黄(S)は偏在しているが、 m/z の分布とは一致していなかった。これらの結果は、 $m/z < 900$ の有機物は COC や Fiber を形成するための鍵物質でないこと、Mg や S を含む有機物ではないことを示唆する。(学会発表)。

(2) 石膏中のバイオマーカーマッピング

イタリアのシチリア島で採取された全長数百 μm のフィラメント状化石微生物を含む石膏($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)のバイオマーカーマッピングを試みた。この石膏は、メッシニアン塩分危機(597-533 万年前に地中海全域において巨大蒸発岩体が形成された高塩化イベント)時に海水が5倍以上濃縮した環境において堆積したものである。全岩分析(石膏試料を粉碎して化石 DNA を抽出)の結果、シアノバクテリアの化石 DNA が含まれていることが報告されているが、後の二次的な混入の可能性も指摘されていた試料である。イメージング分析の結果、化石微生物部分に炭化水素結合を持つ化合物が濃集しており、真核生物起源のステラン類、バクテリア起源のホパン類と考えられる有機分子の分布をマッピングすることができた。これは、現代に見られるような真核生物と細菌の共生関係が当時の高塩環境にも存在した可能性を示唆する。現在、DNA 分析(破壊分析)を予察的に行っているが、生物源有機物の位置情報を化合物レベルで特定できていることはこの分析結果を評価する上で重要な判断材料となる。化石微生物の古 DNA 情報は、生命進化に対しても制約を与える重要な情報であるため、バイオマーカーや古 DNA の位置情報を制約できることを示した本研究は、地球科学だけでなく生物学など広い分野にインパクトを与えると期待される(学会発表)。

(3) メタン湧水由来炭酸塩岩中のバイオマーカーマッピング

メタン菌と硫酸還元バクテリアの共生により行われる嫌氣的メタン酸化によって生成された中新世の地層(1千万~1千5百万年前)から採取された炭酸塩岩中のバイオマーカーのイメージングを試みた。この結果、真核生物由来、バクテリア由来、メタン菌由

来のバイオマーカーらしき有機分子の局所分布を観察することができた。

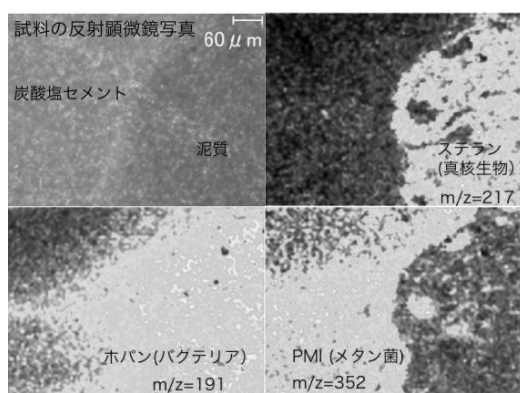


図 2 メタン湧水由来炭酸塩岩内のバイオマーカー分布

(4) 問題点

様々な地質試料で有機分子のマッピングを試みたが、目的とするバイオマーカーの本来の質量数と、イメージングを行った有機分子の質量数が、小数点以下1桁で異なることが明らかとなった。このことは、本来の目的バイオマーカーと異なる有機分子をマッピングしてしまった可能性を示唆する。今後、標準試料などを用いた詳細な検討が必要となる。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

高野淑識、伊左治雄太、山田桂太、橘省吾、井尻暁、大河内直彦「地球化学試料に含まれる炭質物の非破壊・半破壊・破壊分析によるシームレスイメージング解析」日本地球化学会第 64 回年会、東京工業大学(東京都目黒区) 2017.9.15

伊左治雄太、高野淑識、井尻暁、黒田潤一郎、吉村寿紘、Francisco J. Jimenez-Espejo、Stefano Lugli、稲垣史生、Vincio Manzi、Marco Roveri、川幡穂高、大河内直彦「MALDI-TOF/MS イメージング法による生物源有機分子マッピング:メッシニアン蒸発岩中の化石微生物の解明」日本地球化学会第 64 回年会、東京工業大学(東京都目黒区) 2017.9.15

嶋康輝、井尻暁、鴫聡子、稲垣史生、山口耕生「Porites・Acropora 属の骨格微細構造中における低分子量有機物と微量元素分布の関係」日本サンゴ礁学会 第 19 回大会、沖縄タイムスビル(沖縄県那覇市) 2016.12.3

Ito, M., Kebukawa, Y., Ijiri, A., Naraoka, H., “Coordinated NanoSIMS and iMScope Analyses for Extraterrestrial Organics in Murchison Matrix” Goldschmidt Conference 2016, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016.6.27

県横浜市) 2016.6.27

Sowa, K., Ijiri, A., Motai, S., Inagaki, F., Yamaguchi, E.K. “Spatial distribution of low molecular weight organic matter in micrometer skeletal structure of Acropora and Porites coral” 4th International Sclerochronological Conference 2016, Portland, U.S.A., 2016.6.6

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

井尻 暁 (IJIRI, Akira)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・高知コア研究所・主任研究員

研究者番号：70374212

(2) 研究分担者

池原 実 (IKEHARA, Minoru)

国立大学法人高知大学・教育研究部自然科学系理学部門・教授

研究者番号：90335919