

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13584

研究課題名(和文)地質時代の化学合成共生系の推定方法の開発：殻内アミノ酸窒素同位体比の活用

研究課題名(英文)EVALUATION OF EARLY DIAGENETIC INFLUENCE ON NITROGEN ISOTOPES WITHIN FOSSIL AMINO ACIDS: TOWARDS ESTIMATION OF ANCIENT FOOD WEBS AND CHEMOSYMBIOSIS

研究代表者

ジェンキンス ロバート (JENKINS, Robert)

金沢大学・自然システム学系・助教

研究者番号：10451824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年発展してきた生物試料に含まれる個別アミノ酸窒素同位体比に基づく食物網解析(栄養段階推定)法を化石に応用するための基礎実験を展開した。栄養段階が約2(藻類食)と想定されるサザエの現生(非加熱, 加熱200℃, 加熱400℃), 化石(鎌倉時代と縄文時代)試料を対象として, 殻の微細構造の観察と殻体内アミノ酸のD/Lとアミノ酸組成, アミノ酸窒素同位体比分析を行った。その結果, 400℃加熱では殻体内アミノ酸が消失していたが, それ以外はすべて殻体中にアミノ酸が残存し, その組成は現生非加熱と類似していた。また, 同位体比から計算される栄養段階は想定される約2となり, 本手法が化石に応用可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Compound-Specific Isotope Analysis (CSIA) of nitrogen within amino acids in the fossil shells provides a solution to reconstruct paleoecosystems. However fundamental studies on this relatively new techniques hasn't been performed yet. Thus, we use modern and fossil (800 and 6000 years ago) Turbo sazae (Gastropoda), which is presumed to be a primary consumer, i.e. its trophic level should be 2.0. Some of the modern materials were heated at 200 and 400 °C in an oven. We use the middle layer, consisting of a nacreous structure, of Turbo for this study. The sample heated at 400 °C were partially dissolved and no amino acid was found. The other samples, with excellent shell microstructures are present, show around 1.9-2.3 for the trophic level estimated on the basis of the CSIA of amino acids. The result indicates that early diagenesis will not affect the nitrogen isotopes of amino acids in shells for at least 6000 years.

研究分野：古生物学

キーワード：生態系復元 窒素同位体比 殻体内有機物 化石 アミノ酸 食物網解析

## 1. 研究開始当初の背景

過去の生態系を復元することは多くの古生物学者の「夢」であろう。生態系全体を復元するときに生物間の捕食-被食関係、すなわち「食物連鎖網」を復元することが重要となる。古生物においては捕食-被食関係を直接観察することが不可能であるので、過去の食物連鎖網の復元は化石の胃内容物の解析や歯などの捕食器官の形態に基づく推定などによって行われてきた (Chen et al., 1998; Kobayashi et al., 1999; Hone et al., 2012; Allain et al., 2012)。

また、生体を構成する有機物の窒素同位体比は餌の同位体比から約 3.4‰ 重くなることが「経験的に」知られており、これを利用した栄養段階<sup>1</sup>推定法が食物連鎖網の解明に広く使われてきた。しかしこの方法は一次生産者の窒素同位体比が必要であるが、一次生産者の窒素同位体比は海域や時代によって異なるため、地質試料へのこの方法の応用は事実上極めて難しかった。ところが近年各アミノ酸の窒素同位体比を測定する技術が開発され (McClelland and Montoya, 2002; Chikarashi et al. 2009), 上の問題を解決できる可能性がでてきた。なぜなら各アミノ酸ごとの窒素同位体比は、食物連鎖を経るごとに同位体的に濃縮するものとはほしくないものの2タイプあるためである。つまり、ある生物を構成するアミノ酸は一次生産者の同位体比を保持したアミノ酸と食物連鎖を経て濃縮したものの2種類あることがわかってきたのである。そこで各アミノ酸の窒素同位体比を個別に測定することにより、生体の窒素同位体比と同時に一次生産者の同位体比の両方を得ることができる。それらの差分を見ることによって各生物の生態系における位置、すなわち栄養段階を精確に推定できるようになる。アミノ酸は化石殻体中に保存されるため、この手法を化石に応用できる可能性が高い。現に、Naito et al. (2010) は縄文人を含む貝塚から産出した試料にこの手法を適用し、縄文人の食性を復元している。この研究例では海棲生物の栄養段階は現生生態系と比較して矛盾がないので、推定された栄養段階は正しいと判断しているが、化石硬組織およびアミノ酸の保存状態 (続成の程度評価) についての知見が不足しているのが現状であった。

この個別アミノ酸窒素同位体比に基づく生態系復元手法を化石へと応用が可能であれば、地質時代を通じた生態系の進化を具体

<sup>1</sup>栄養段階とは、食物網の中でのその生物の位置を数値化したものであり、一次生産者 (独立栄養生物) の栄養段階を 1.0 とし、一次消費者 (植物食動物) を 2.0、一次消費者のみを食べる二次消費者 (肉食動物) を 3.0、というように定義される。例えば、植物プランクトンと動物プランクトンを 1:1 の割合で食べる生物の栄養段階は 2.5 となる。

的な証拠に基づいて解明できるのみならず、研究実施者が長年取り組んできた化学合成生態系における軟体動物類と化学合成細菌の共生の起源なども明らかにできるだろう。それを実現するためにも、個別アミノ酸窒素同位体比に基づく生態系復元手法を化石に応用する基礎的研究が必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究ではアミノ酸窒素同位体比による栄養段階推定法の化石への応用をゴールに据え、(1) 殻体からのアミノ酸抽出法の確立、(2) 殻体の保存状態の観察・評価、(3) 軟体部と殻体中有機物のアミノ酸窒素同位体比が同一であるかの確認、(4) 現生試料の加熱実験によるアミノ酸の残存程度、(5) アミノ酸の化石化過程において生じるアミノ酸のラセミ化の程度による同位体比の変化、(6) 各試料や実験における殻の微細構造の保存状態なども確認を行うこととした。以上をもとに、個別アミノ酸窒素同位体比に基づく古生態系の復元の化石への応用可能性について評価するとともに、応用する際の試料の選別方法を確立することを目的とした。

なお、研究開始当初は化学合成群集構成種を試料として用いることを考えていたが、(1) 細菌の共生による影響などを排除したシンプルな系で実験すること、(2) 現生・化石各時代の試料が容易に入手できること、(3) 想定される栄養段階が判明していること、を考慮してサザエ (*Turbo sazae*) を主たる研究対象に据えることにした。サザエについては現生試料を対象にした研究で軟体部と殻体内有機物の双方が栄養段階 2.0 になることが確かめられており、その値が化石の保存の程度によってどのように変化するか検証が容易である。

## 3. 研究の方法

試料として、石川県羽咋産の現生サザエおよびホタテガイ、神奈川県由比ヶ浜遺跡 (鎌倉時代 13 世紀中葉~14 世紀前半) から産出した化石サザエ、福井県若狭市の鳥浜貝塚から産出した化石サザエ (縄文時代) を用いた。現生サザエは石川県金沢市の近江町市場で購入後、 $-20^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で冷凍保存した。また、現生サザエの殻体は、常温、 $200^{\circ}\text{C}$ 、 $400^{\circ}\text{C}$  (それぞれ大気圧、24 時間) にて加熱実験を行った。

各試料は殻の微細構造の観察のために走査型電子顕微鏡 (日本電子製 JSM-6010LV) を用いて観察した。結晶相の確認には粉末 X 線回折解析を Rigaku 社の Ultima IV を用いて確認した。

アミノ酸は Takano et al. (2010) および Chikarashi et al. (2014) に従って、各試料 (殻) を粉末化してリアクティブバイアル内で塩酸を用いた加水分解をおこない、その後適宜脱脂処理および陽イオン交換処理を行

った。その後アミノ酸試料を誘導体化した。誘導体化試料をガスクロマトグラフィー質量分析計 (Shimadzu GC-2010, GCMS-QP2010) を用いて各アミノ酸の同定を行った。アミノ酸の D/L 分析は GC-FID (HP6890 with Chirasil-L-Val) を用いた。各アミノ酸の窒素同位体比分析は GC/C/IRMS 分析装置 (Agilent 6890N GC with Thermo cinfoIII-Delta Plus XP; JAMSTEC) を利用した。

#### 4. 研究成果

##### 【殻の微細構造：サザエ】

サザエの殻は外層、中層、内層の3層に区分され、それぞれ混合稜柱構造、真珠構造、不規則稜柱構造であった。ふたは外層に似た微細構造であった。結晶相は外層はアラゴナイト・カルサイト、中層と内層とふたはアラゴナイトであった。一部のサザエの中層には微生物による浸食構造が見られた。また、サザエの外層には付着生物 (カサガイ類やフジツボ類) が付着していた。

加熱実験に供した試料は、200°C加熱は加熱前試料と変わらなかったが、400°C加熱試料では真珠構造の各結晶が丸みを帯びていた。

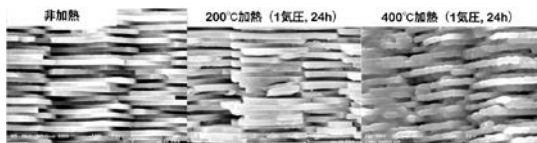


図1. サザエの殻体中層の微細構造 (電子顕微鏡写真)。非加熱および 200°C加熱試料はきれいなタブレット状の真珠構造を保っているが、400°C加熱試料では各タブレットが丸みを帯びている。

化石サザエの試料は、鎌倉時代の試料は内層がほとんど残っていなかったがいずれの層も現生と同様の微細構造であった。ふたの結晶はやや丸みを帯びていたがアラゴナイトであった。縄文時代の試料はふたは現生と同様の保存状態であったが、殻の中層由来の軸部 (殻軸) のみが保存されており、その部分の微細構造は現生と同様であった (図2)。

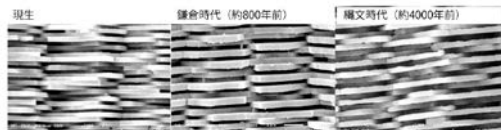


図2. サザエの殻体中層の微細構造 (電子顕微鏡写真) の現生と化石の比較。いずれの試料もタブレットの保存状態は良好で微細構造が保存されていると言える。

これ以降、殻体試料については微細構造の評価が容易な真珠層によって構成される中層を主たる分析対象とした。

##### 【各試料のアミノ酸組成】

本実験で殻から検出されたアミノ酸は全部で12種類であった。200°C加熱試料ではセリン、トレオニン、メチオニンの3種が消失していた。400°C加熱試料ではすべてのアミノ酸が消失していた。また、微生物浸食のあった現生試料ではバリン、ロイシン、プロリンの濃度が微生物浸食のない殻と比較して高かった。

アミノ酸のD/Lは加熱実験試料および微生物浸食を受けていた試料を除けば年代の古い試料ほどD/Lが1日近づいておりラセミ化が進行していた。200°C加熱試料は鎌倉時代および縄文時代の化石試料よりもD/Lが1に近づいておりラセミ化が進行していた。

これらの試料について、GC/C/IRMSによる各アミノ酸窒素同位体比分析およびグルタミン酸およびフェニルアラニンの同位体比を Chikaraishi et al. (2009) の栄養段階計算式に当てはめるといずれの試料でも藻類食のサザエで想定される栄養段階2付近となった (図3)。

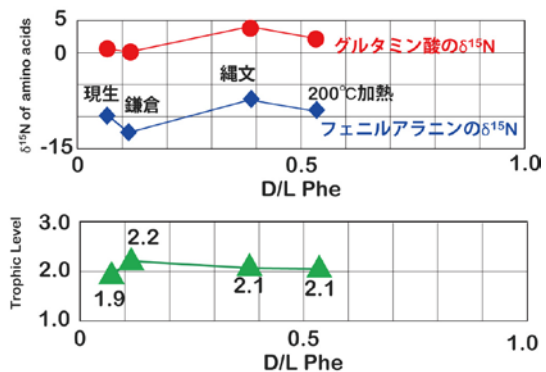


図3. 現生 (非加熱・200°C加熱) および化石 (鎌倉時代、縄文時代) のサザエ殻体中アミノ酸フェニルアラニンの D/L と各アミノ酸の窒素同位体比 (今回は食物網を経て同位体的に濃縮するグルタミン酸とほとんど濃縮がおこらないフェニルアラニン Chikaraishi et al. (2009) に基づく栄養段階 (TL; Trophic Level) 計算を行うと、ほぼすべて2付近になった。

##### 【まとめ】

現生の加熱実験から 200°C程度までは殻体内にアミノ酸が保存されることが明らかになった。この温度はこれまでに報告されているアミノ酸の分解温度付近でもあり整合的である。

加熱現生試料および鎌倉時代と縄文時代の化石試料においてはアミノ酸のラセミ化が進行していたが、栄養段階は現生の非加熱試料と同じく約2であった。このことはラセミ化作用は殻体内の個別アミノ酸窒素同位体比に基づく栄養段階評価法に影響を及ぼさないことを示している。

以上を総合すれば、殻体の微細構造が明瞭

に残っていれば地質時代の試料においても個別アミノ酸窒素同位体比に基づく栄養段階の推定が可能と言える。その際、試料の選定には電子顕微鏡レベルでの詳細な微細構造の観察、また、各微細構造毎の各アミノ酸の残存の程度などを調べて、化石試料の保存状態を評価して保存が良い試料を利用することが重要である。

#### 謝辞

本研究を進めるにあたって力石嘉人氏 (JAMSTEC) には様々な場面で適切なお助言、試料解析を行っていただいた。また、佐々木猛智氏 (東京大学)、松島義章氏 (金沢県生命の星・地球博物館)、福井県若狭三方縄文博物館には試料提供でお世話になった。機器分析に際しては長谷川卓氏、後藤晶子氏、奥寺浩樹氏、奥野正幸氏 (いずれも金沢大学) にお世話になった。記してお礼申し上げる。

#### 引用文献

- Allain, R., Xaisanavong, T., Richir, P., & Khentavong, B. (2012). The first definitive Asian spinosaurid (Dinosauria: Theropoda) from the early cretaceous of Laos. *Naturwissenschaften*, 99(5), 369-377. Chen, P. J., Dong, Z. M., & Zhen, S. N. (1998). An exceptionally well-preserved theropod dinosaur from the Yixian Formation of China. *Nature*, 391(6663), 147-152.
- Hone, D., Tsuihiji, T., Watabe, M., & Tsogtbaatr, K. (2012). Pterosaurs as a food source for small dromaeosaurs. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 331, 27-30.
- Kobayashi, I., & Samata, T. (2006). Bivalve shell structure and organic matrix. *Materials Science and Engineering: C*, 26(4), 692-698.
- Chikaraishi, Y., Ogawa, N. O., Kashiyama, Y., Takano, Y., Suga, H., Tomitani, A., Miyashita, H., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. (2009). Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography: Methods*, 7(11), 740-750.
- Chikaraishi, Y., Steffan, S. A., Ogawa, N. O., Ishikawa, N. F., Sasaki, Y., Tsuchiya, M., & Ohkouchi, N. (2014). High - resolution food webs based on nitrogen isotopic composition of amino acids. *Ecology and evolution*, 4(12), 2423-2449.**
- Naito, Y. I., Honch, N. V., Chikaraishi, Y., Ohkouchi, N., & Yoneda, M. (2010). Quantitative evaluation of marine protein contribution in ancient diets based on nitrogen isotope ratios of individual amino acids in bone collagen: an investigation at the Kitakogane Jomon site. *American Journal of Physical Anthropology*, 143(1), 31-40.
- Takano, Y., Kashiyama, Y., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y., & Ohkouchi, N. (2010). Isolation and

desalting with cation-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids: application to biogeochemical samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(16), 2317-2323.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 件)

現時点ではなし

[学会発表] (計 件)

1. 兀橋 大二郎, ジェンキンズ ロバート, 後藤 (桜井) 晶子, 力石 嘉人, 長谷川 卓 (2016) 個別アミノ酸窒素同位体比を用いた栄養段階推定法は化石に応用できるのか? ~初期続成が及ぼす殻体内アミノ酸の変質に着目して~. 日本地球惑星科学連合 2016年大会. 幕張. 2016.5.25.口頭.
2. HAGEHASHI, Daijiro, Robert G. JENKINS, Akiko S. GOTO, Yoshito CHIKARAISHI, and Takashi HASEGAWA: EVALUATION OF EARLY DIAGENETIC INFLUENCE ON NITROGEN ISOTOPES WITHIN FOSSIL AMINO ACIDS: TOWARDS AN ESTIMATION OF ANCIENT FOOD WEBS. 1st International Workshop on Ancient Hydrocarbon Seep and Cognate Communities. 13-17 June 2016. Warsaw, Poland. Poster.

[図書] (計 件)

現時点ではなし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.geobiology.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

ジェンキンズ ロバート (JENKINS, Robert)  
金沢大学・理工学域・自然システム学系

研究者番号: 10451824

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

兀橋 大二郎 (HAGEHASHI, Daijirou)

力石 嘉人 (CHIKARAISHI, Yoshito)

長谷川 卓 (HASEGAWA, Takashi)

後藤 晶子 (GOTO, Akiko)