

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18796

研究課題名(和文) 太古代地質試料の生物源有機分子イメージングで解き明かす光合成生物誕生と進化

研究課題名(英文) Investigation of birth and evolutionary history of photosynthetic organism by biomarker imaging of Achaean rocks

研究代表者

井尻 暁 (Ijiri, Akira)

神戸大学・海事科学研究科・准教授

研究者番号：70374212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、24億年前の地球大気酸素分圧上昇のきっかけとなった太古代のシアノバクテリアの発生時期を特定しその環境を明らかにすることを最終的な目的として、有機分子を最小 μm 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、現世のシアノバクテリア培養株、シアノバクテリアマット、太古代の頁岩やストロマトライトなどの岩石試料を分析し、バクテリアの指標となる有機分子(バイオマーカー)であるホパンの高空間分解能マッピングに成功した。本研究で成功した位置情報付きのバイオマーカーの2次元分布マッピングは、太古代のバイオマーカーの起源を論じるために重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酸素発生型光合成はいつ始まったのか？初期地球の進化において極めて重要であるこの疑問の回答は、まだ得られていない。シアノバクテリアとされる微化石様構造を持つ炭質物は約35億年前のチャートから発見されているが、その起源には疑問が呈されている。本研究では現世シアノバクテリアや、27億年前の頁岩やストロマトライトのイメージング質量分析により、バクテリアのバイオマーカーであるホパンの高分解能2次元マッピングに成功した。この研究手法は24億年前の地球大気酸素分圧上昇のきっかけとなった太古代のシアノバクテリアの発生時期を特定しその環境を明らかにするために重要な役割を果たすと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to determine when ancient cyanobacteria triggered an increase in the partial pressure of oxygen in the Earth's atmosphere 2.4 billion years ago, and clarifying their environment. Using an imaging mass spectrometry, we succeeded in the high-resolution mapping of hopan, which is a biomarker of bacteria, in the samples of modern cyanobacteria culture strains and cyanobacteria mat, as well as geological samples such as shale and stromatolites from 2.7 billion years ago. Our method of mapping the two-dimensional distribution of biomarkers, may play an important role in discussing the origin of the biomarkers in the Archaean.

研究分野：地球化学

キーワード：太古代 光合成生物 イメージング質量分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

二酸化炭素を固定し酸素を放出する光合成(酸素発生型光合成)の開始は、地球生命史の中でも最も重要なイベントである。始原的な酸素発生型光合成生物のシアノバクテリアは少なくとも24億年前の大気酸素分圧の急上昇したイベントまでには誕生していたとされており、最古のシアノバクテリアの存在の証拠として、27億年前の地層から分離されたシアノバクテリア起源バイオマーカー(2- α -メチルホパン)が報告されていたが(Brocks et al., 2003, *Geochim. Cosmochim. Acta*)、その後、実際には二次的混入物であったことが再報告されている(Rasmussen et al., 2008, *Nature*)。しかし、シアノバクテリアによって生成されると考えられている化石ストロマトライトは37億年前には出現し、約27億年前頃に多産し始めるとは提案されているものの、酸素発生型光合成の開始・繁栄時期については議論が続いている(Sessions et al., 2009 *Current Biol.*など)。

地質時代の岩石試料中からバイオマーカーを抽出するには、前処理段階で試料の粉碎・抽出を必要とするため、検出されたバイオマーカーの試料中における位置情報が失われてしまい、抽出されたバイオマーカーが二次的混入ではないことを証明することが難しい。実際に27億年前のシアノバクテリア起源バイオマーカーが現地性でないという証拠は、シアノバクテリアのバイオマーカーを含むと考えられる地層と、その周囲の地層の炭素安定同位体比を二次イオン質量分析法によって μm スケールで分析し、シアノバクテリアのバイオマーカーを含むと考えられる層の炭素同位体比が異なっていたことから得られた。もしバイオマーカーの分布を同様の μm スケールで分析することができれば、二次的な混入物かどうかの評価はより確実になり、併せてバイオマーカーの産状を詳細に知ることができると期待される。

2. 研究の目的

本研究は、24億年前の地球大気酸素分圧上昇のきっかけとなった、太古代のシアノバクテリアの発生時期を特定しその環境を明らかにすることを最終的な目的として、有機分子を最小3.5 μm 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、頁岩や、ストロマトライトなどの岩石試料に含まれる、バクテリアや真核生物の指標となる有機分子(バイオマーカー)の二次元分布を $\text{m}\mu$ 単位の高空間分解能でマッピングする手法を確立する。確立した手法を用いて、シアノバクテリアや真核生物のバイオマーカーが含まれるとされる27億年前の頁岩や、ストロマトライト中のバイオマーカーの局所分布を調べ、岩石試料の化学成分や岩相、鉱物分布との比較により、バイオマーカーが初生的なものなのか、埋没・化石化の過程で二次的に混入したものなのか区別し、議論が続いているシアノバクテリアの発生・繁茂時期について制約を与えることを目的とする。また、同様の手法を用いて、現世のストロマトライト中のバイオマーカーの局所分析により、ストロマトライトがシアノバクテリア以外の微生物作用で形成された可能性について検証する。

3. 研究の方法

近年、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3.5 μm 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。このイメージング質量顕微鏡を用いて、太古代の岩石試料に含まれるバクテリアなどの指標となる有機分子(バイオマーカー)の二次元分布を $\text{m}\mu$ 単位の高空間分解能でマッピングし、位置情報を明らかにし、岩相や鉱物分布と比較を行うことで、バイオマーカーが現地性のものなのか、埋没・化石化の過程で二次的に混入したものなのか区別することができると期待される。

4. 研究成果

1) 標準試料 2 +2 -,17 (H)-21 (H)-2-Methylhopane のイメージング質量分析

シアノバクテリアのバイオマーカーとされる 2-メチルホパンを含む標準試料 2 +2 -,17 (H)-21 (H)-2-Methylhopane をメーカーから購入し、この標準試料のイメージング質量分析が可能かどうかの確認実験を行った。

標準試料をメタノールで溶いた400 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ の標準溶液を調製し、黒色頁岩の薄片を張り付けたステンレス板の薄片部分と金属部分の直径1 mm 程度の微小領域を凹ませ、それぞれのクレーター様の穴に標準試料溶液を滴下した。薄片部分では標準試料を滴下した周辺部を、金属部分では目視により確認した標準試料の塗布の有無が顕著な範囲を、それぞれ測定した。その結果、上記の薄片部分と金属部分の両方において、標準試料を塗布した部分にのみ $m/z=368.4$ のピークが検出され、この標準試料のフラグメントは $m/z=368.4$ をメインとして検出されることがわかった(図1)。先行研究ではホパンのフラグメントは $m/z=191.2$ とされてきたが、今回の標準試料測定ではこの $m/z=191.2$ のピークを検出することはできなかった。これは、本研究の iMScope と従来法の GC-MS のイオン化の方法の違いによるものと考えられる。また、標準物質の化学構造式から $m/z=36.84$ のフラグメントは、側鎖が切れ、さらに2位のメチル基も置換していると考え

られる(図2)。このことはメチルホパンの検出は難しく、ホパン全般の検出は可能であることを示唆する。

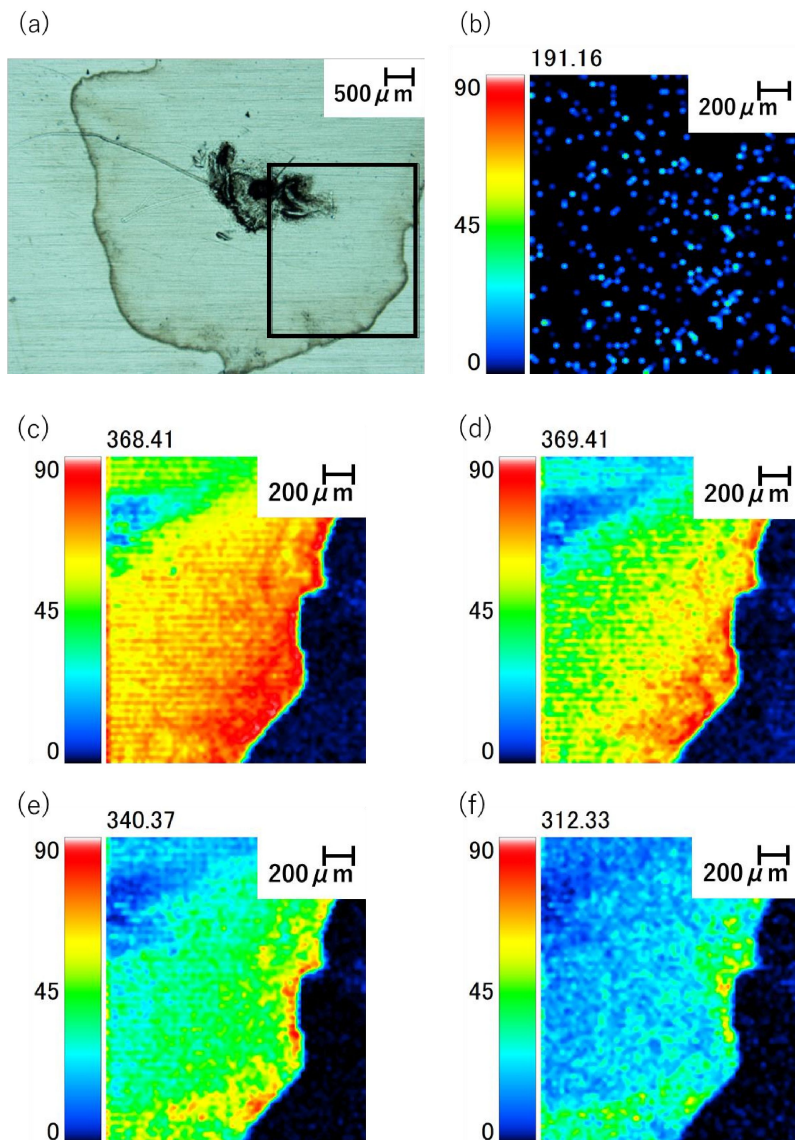
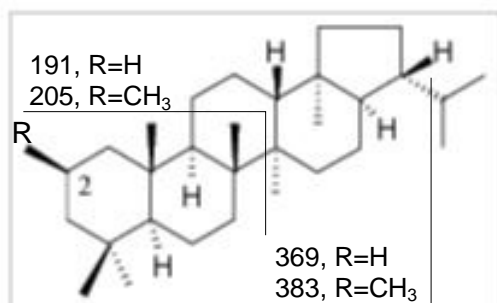


図1 標準試料2 +2 -,17 (H)-21 (H)-2-Methylhopane 溶液をステンレス板に塗布した試料のイメージ質量分析結果 (a)試料の落射型顕微鏡写真 (b-f) $m/z=191.2, 368.4, 369.4, 340.4, 312.3$ の分布。



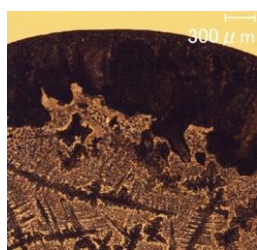
8632.31: 2β,17α(H),21β(H)-2-Methylhopane

図2 標準物質の化学構造式とフラグメンテーション

2) シアノバクテリア単離株分析

現世のシアノバクテリアのシアノバクテリアのバイオマーカーのイメージング分析が可能であるかどうかを調べるために、NIES より購入したシアノバクテリアの単離株 9 種を分析した。培地ごとスライドガラスに滴下し、ホットプレートで加熱乾燥させ、マトリックスとして DHB を蒸着後、分析を行った。選んだ単離株は、ゲノムが読まれていて、単細胞性・糸状・海水/淡水のものや陸上ストロマトライトに分布が確認されていたものをピックアップした。このうちの 2 種、*Prochlorococcus marinus* と *Synechococcus lepoliensis* は Naafs et al., 2021 Geobiology によって、2 メチルホパンの存在やそれを合成するための遺伝子を有するかが調べられており、この 2 種については 2 メチルホパンを合成する遺伝子をもたない。その他の 7 種については、*Spirullina* spp. 以外は、種によって 2-メチルホパンが検出されているものもあれば、ないものもある (Naafs et al. 2021)。

これらのイメージング質量分析の結果、 $m/z=192$ 付近のピークが共通して検出された。これはホパンの一般的なフラグメント 191 を検出したと考えられる。一方、メチルホパンのフラグメントである $m/z=205, 383$ 付近のピークは全ての単離株で検出されなかった。標準試料 2 +2 -, 17 (H)-21 (H)-2-Methylhopane のメインピークである $m/z=368$ 付近のピークは 2-メチルホパンを合成しない 2 種についても検出されており、 $m/z=368.4$ は 2-メチルホパンではなく、ホパンのフラグメントであることを強く示唆する (図 3)。結論として、DHB をマトリックスとする現在の分析手法では、メチルホパンを検出することができないが、ホパンのフラグメントはイメージング質量分析が可能であると考えられる。



205付近のピークなし。
培地の外側に濃集
ピコシアノバクテリアでiMScope上では細胞確認できなかった。

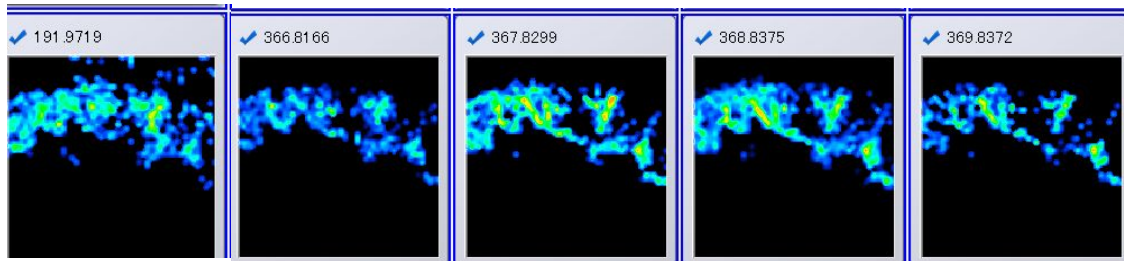


図 3 単離株 *Prochlorococcus marinus* のイメージング質量分析例 $m/z=192, 368, 369$ の強いピークが検出できた。

3) 現世シアノバクテリアマット

現世の天然試料中のシアノバクテリアマットでバクテリア由来のホパンのマッピングを試みた。試料は大分県長湯温泉トラバーチン表面に発達するシアノバクテリアで炭酸塩粒子や細胞外多糖を含む。ホルマリン固定後、エタノール PBS で冷蔵庫で保存していたものを、エタノールで脱水置換し、LRWhite レジン(アクリル系樹脂)Medium で埋包し切片を作成した。分析の結果、ホパンのフラグメントと同じピークが検出されたものの、その分布が試料の堆積構造に一致しなかったり、分布は一致するものの、 m/z が標準試料から 0.3 以上ずれていたりなど、確実にシアノバクテリア由来のバイオマーカーが検出できるとは言えない結果が得られた。

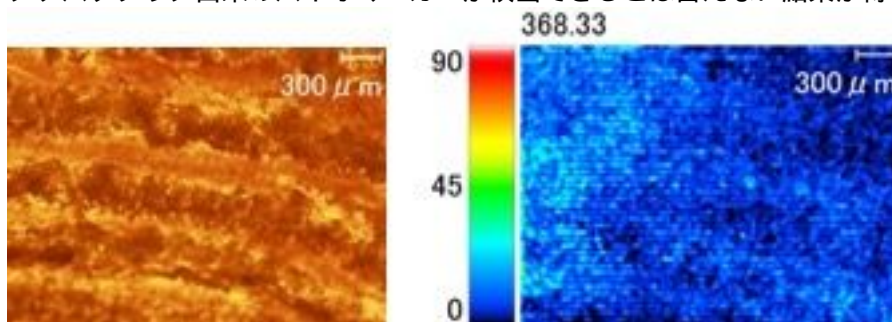


図 4 シアノバクテリアマットイメージング質量分析例

4) 太古代地質試料分析

太古代地質試料としてオーストラリア北西部ピルバラ地方の約 27 億年前岩石試料の分析を行

った。分析に供したのは RHDH2A (3 試料)、WRL(3 試料)、ABDP#10 (2 試料) である。RHDH2A (3 試料)、WRL(3 試料)はピルバラ地方の Mt. Bruce 超層群から陸上掘削により採取された黒色頁岩のドリルコア試料である。ABDP#10 は ABDP(Archean Biosphere Drilling project)によって同じくピルバラ地方のタンピアナ層で掘削されたストロマトライト炭酸塩岩のドリルコアサンプルである。その結果、一部の薄片試料で、 $m/z = 368.41$ とその他のホパン由来のフラグメントイオンが、堆積構造に沿った局所的な分布を示していることを初めて確認することができた。

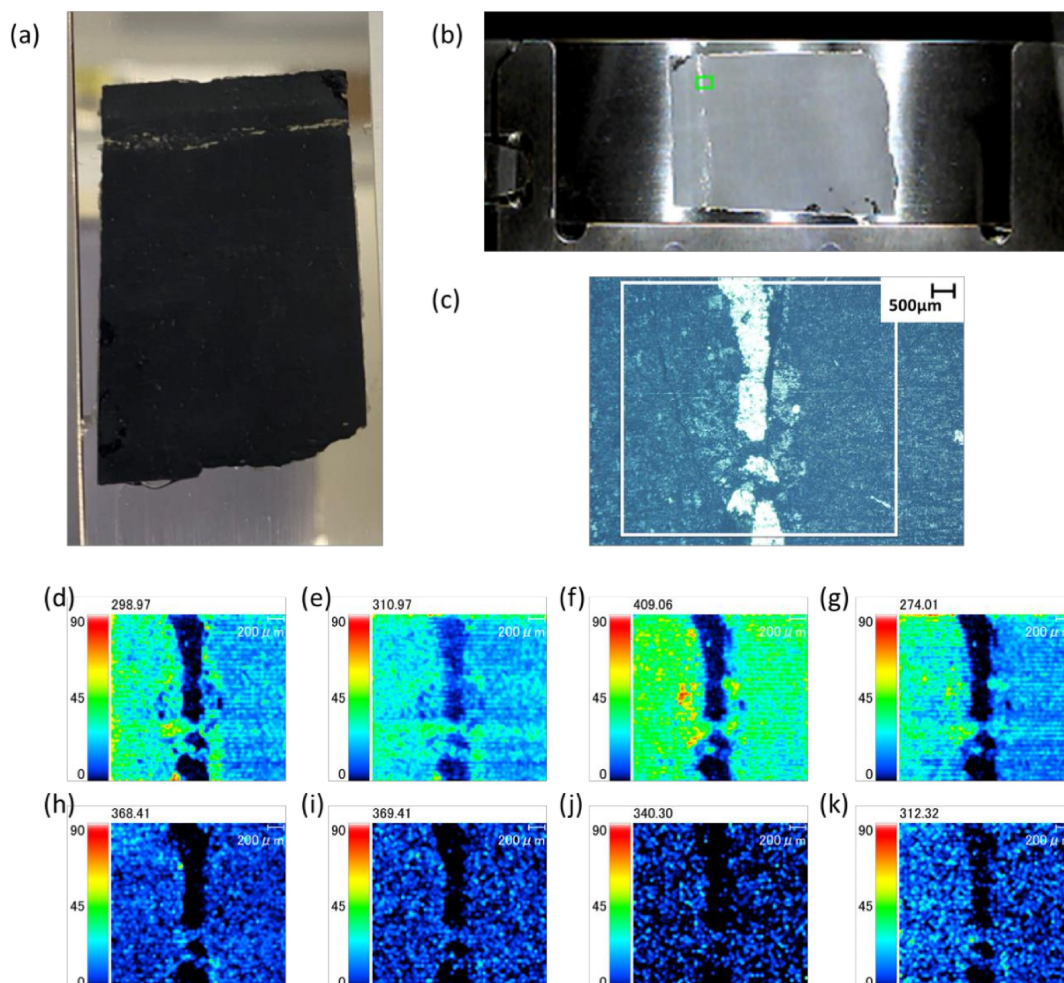


図5 WRL1-127-2 (27 億年前の黒色頁岩) のイメージング質量分析結果 (a-b) 薄片試料の全体写真、(c) 落射型顕微鏡写真 中央の白色の部分は黄鉄鉱 (d-k) 黄鉄鉱を挟む黒色頁岩中に特徴的な分布を示した m/z ピークの分布

5) 油浸透実験

岩石中に浸透した油分がどのように保存され、洗浄に耐え、MALDI-TOFMS で検出されるかを検証した。比較的低粘度の浸透性潤滑剤 (KURE 5-56) と比較的高粘度のオリーブオイルを、上記の2種の黒色頁岩に加えて泥岩・砂岩・玄武岩・花崗岩に浸透させた。これらの岩石から通常の方法で作成した薄片と、純水での超音波洗浄後に作成した薄片を用いて、測定を行った。その結果、浸透潤滑剤を塗布した部分にのみ $m/z = 242.3$ 、オリーブオイルを塗布した部分にのみ $m/z = 284.1$ のピークが検出された。超音波洗浄した試料からも同ピークが検出されたことから、水を用いた超音波洗浄だけでは油分は除去しきれないことがわかった。今後、機械油や石油等も用いたり、有機溶媒で超音波洗浄した場合の油分の残存具合を調べる等、よりシステムティックな浸透実験を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤大樹, 山口耕生, 井尻 暁, 奥村知世
2. 発表標題 イメージング質量分析による約27億年前の堆積岩中のバイオ マーカーマッピング
3. 学会等名 日本地質学会第128年学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山口 耕生 (Yamaguchi Kosei) (00359209)	東邦大学・理学部・准教授 (32661)	
研究分担者	奥村 知世 (Okumura Tomoyo) (90750000)	高知大学・海洋コア総合研究センター・特任助教 (16401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------