

平成21年6月30日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19840054
 研究課題名（和文） 有機化合物の分子レベル安定窒素同位体比分析による古海洋窒素サイクル復元法の研究
 研究課題名（英文） Reconstruction of marine nitrogen cycle by compound-specific stable nitrogen isotope analysis of organic compounds
 研究代表者
 カ石 嘉人（CHIKARAISHI YOSHITO）
 独立行政法人海洋研究開発機構・地球内部変動研究センター・研究員
 研究者番号：50455490

研究成果の概要：

堆積物や生物殻体（貝殻や骨）に含まれるアミノ酸・クロロフィルの安定窒素同位体比（ $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ）は、過去の地球環境の窒素サイクルを知り得る唯一のツールとして期待されている。本研究では、海洋堆積岩（数千万年前）・海洋堆積物（数百万年前～現在）・生物化石（数万年～現在）・ホルマリン固定生物（数十年前～現在）・貝殻（数年前～現在）などの様々な試料に対し本解析法を適用し、本手法が様々なケースに広く利用可能であることを証明した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球宇宙化学

キーワード：窒素同位体比，アミノ酸，クロロフィル，マレイミド，古海洋，窒素サイクル

1. 研究開始当初の背景

古海洋の窒素サイクルを復元する手法には、「堆積物全体の安定窒素安定同位体比分析」と「堆積物や生物殻体に含まれる有機化合物の安定窒素同位体分析」の二つがある。前者は表層堆積物の全体の安定窒素同位体比が直上海洋表層水の一次生産者のそれをおよそ反映していることを利用した復元法であり、世界中の研究者が広く用いている一般的な研究手法である。しかし、沈降過程や堆積物への埋没過程、さらに埋没後の続成過程における試料全体の安定窒素同位体比の変動は非常に大きく、過去の海洋窒素サイクルを読み解くうえで非常に大きな誤差を伴うという欠点を持つ。一方で後者は、海洋表

層の一次生産者の同位体比を正確に記録し、沈降過程や埋没過程・埋没後の続成過程における同位体比変化もほとんど考えられないため、過去の海洋窒素サイクルを復元するうえで質の良い情報を提供する。しかし、有機化合物の安定窒素同位体比分析を用いた古海洋窒素サイクルの復元研究は、これまでほとんど行われて来なかった。それは堆積物や生物殻体（貝殻や骨）に存在する有機化合物が非常に多種類の混合物であり、さらに各成分は超微量であるため、目的の有機化合物を単離・精製し、その安定同位体比を測定するということは、分離技術や感度的に非常に困難であったからである。

しかし研究代表者は、2006年度までの研究

で、ガスクロマトグラフ/同位体比質量分析計 (GC/IRMS) によるクロロフィル・アミノ酸の分子レベル安定窒素同位体比分析法を開発し、試料からのクロロフィル・アミノ酸の分離と、従来に比べて 1000 分の 1 以下の数ナノモル (10^{-9} モル) 程度の試料量での安定窒素同位体比測定を可能にした。これは例えば、海洋堆積物中のクロロフィルの安定窒素同位体比を得るために、これまでは数キログラムの堆積物を分析しなければならなかったものが、数グラムの堆積物から同じデータが得られることを意味する。また本法は、試料に含まれる複数の有機化合物の安定窒素同位体比を、一度の測定で連続的に分析することができる (図 1)。本分析法の開発により、堆積物中のクロロフィルや生物殻体中のアミノ酸の安定窒素同位体比が、世界で初めて実用レベルで測定できるようになり、「有機化合物の安定窒素同位体比分析による古海洋窒素サイクル復元法」を実用化するための基盤が整った。

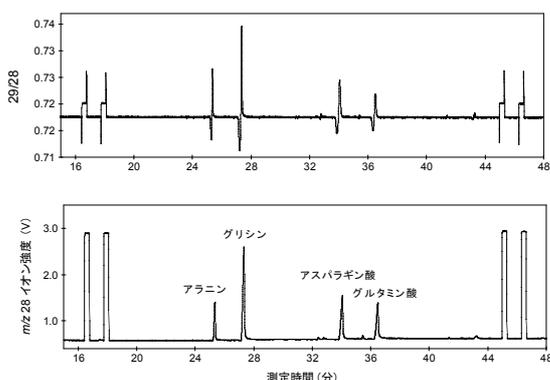


図 1 GC/IRMSで得られる代表的なクロマトグラム

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が 2006 度までに開発したクロロフィル・アミノ酸の分子レベル安定窒素同位体比分析法を年代スケールの異なる様々な実試料 (堆積物や生物) に応用し、「有機化合物の安定窒素同位体比分析による古海洋窒素サイクルの復元法」の有用性・汎用性を評価することである。

堆積岩や堆積物に含まれるクロロフィル及びその誘導体・続成物 (ポルフィリン) の安定窒素同位体比からは、当時の植物プランクトン・光合成細菌などの海洋一次生産者の安定窒素同位体比が得られ、堆積物に含まれる有孔虫の殻・貝殻・ホルマリン固定生物試料のアミノ酸の安定窒素同位体比からは、海洋一次生産者の安定窒素同位体比に加えて、それらの生物の栄養段階と食物連鎖網の情報が得られるはずである。本研究では、様々な試料を用いて、有機化合物の安定窒素同位体比が実際の窒素サイクルをどの程度

正確に捉えているのか、また、それが古海洋の窒素サイクル復元研究に、実際に応用可能であるのかを評価した。

3. 研究の方法

本研究は、基礎研究と応用研究で構成される。基礎研究では、窒素サイクルが既知の現世の海洋・湖沼から得られた試料を用い、表層堆積物に含まれるクロロフィルとその誘導体、表層堆積物中の有孔虫とその殻に含まれるアミノ酸、海藻・貝・魚などの生物試料に含まれるアミノ酸の安定窒素同位体比を測定し、クロロフィル、アミノ酸の安定窒素同位体比分析で得られる情報の真偽・精度・妥当性を評価した。なお、貝殻や骨等の試料については、生体のアミノ酸と殻体のアミノ酸の同位体比を比較し、試料としての殻体アミノ酸の妥当性を評価した。また、ホルマリン固定による安定窒素同位体比の変化も検証した。応用研究では、年代スケールの異なる様々な試料中のクロロフィル・アミノ酸の安定窒素同位体比分析を行い、各時代の海洋窒素サイクルを復元すると共に、本研究手法の有用性・汎用性を評価した。

4. 研究成果

基礎研究では、まず、植物や藻類・シアノバクテリアのクロロ色素、海洋・湖表層堆積物に含まれるクロロ色素・フェオ色素の窒素同位体比を測定し、光合成生物に含まれる異なる構造のクロロ色素 (例えば、褐藻ではクロロフィル a と c) の窒素同位体比がほぼ同じであること、また、水柱中や堆積物中でクロロフィルが続成変化を受けても、窒素同位体比が保存されていることを明らかにした (表 1)。

表 1 湖沼・海洋表層堆積物に含まれるクロロフィル類の窒素同位体比 (単位‰)

色素	様名湖	大槌湾
クロロフィル a	-4.1	-3.7
フェオフィチン a	-3.9	-4.0
フェオフィチン a'	-4.4	n.d.
ピロフェオフィチン a	-4.0	-3.2
ステリルクロリンエステル	-4.2	-3.9

これは、クロロフィルとその誘導体・続成物の窒素同位体比が、どの種類のクロロフィルにおいても、また堆積物への埋没後に続成変化を受けても、基本的に、最初に植物プランクトンによって作られた時の同位体比を保存していることを示す。

またアミノ酸については、シアノバクテリア・植物プランクトン・動物プランクトン・貝・蟹・海老・魚等の多様な生物試料に含まれるアミノ酸の窒素同位体比を測定し、フェニルアラニンの同位体比より得られる海洋

窒素の同位体比復元法と、フェニルアラニンとグルタミン酸の同位体比の比較により得られる栄養段階推定法(式1)が、様々な試料に対して普遍的に適用できることを確認した(図2)。

$$\text{栄養段階} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{Glu}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{Phe}} - 3.4) / 7.6 + 1 \quad (\text{式1})$$

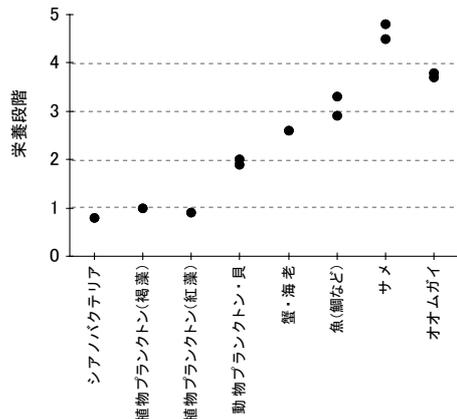


図2 アミノ酸の窒素同位体比より求めた生物の栄養段階

応用研究では、日本海の家成頁岩(数千万年前)・海洋堆積物(数百万年前～現在)・生物化石(数万年～現在)・ホルマリン固定生物(数十年前～現在)・貝殻(数年前～現在)等を用いた。その結果、クロロフィルとその続成産物の安定窒素同位体比からは、数千年前～現在までの試料について、当時の海洋一時生産者がどのような環境(とくに、窒素環境について)で生きていたのかをうまく復元することが可能であることがわかった。例えば、女川層堆積岩より得られたポルフィリン由来のマレイミドの窒素同位体比からは、酸化的な環境での窒素固定を伴う光合成活動と、その直下での還元的な環境で酸素を発生しない嫌気的な光合成の両者のシグナルを同時にとらえることができ、当時の海洋環境に還元的有光層が広がっていたことを復元することができた(図3)。

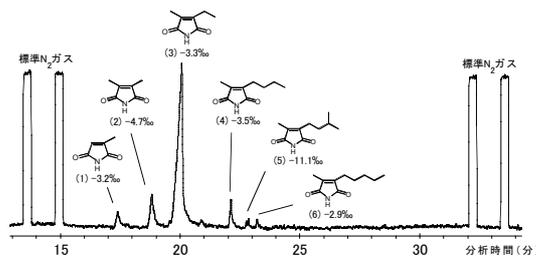


図3 Miocene marine shale層から得られたクロロフィル分解物の窒素同位体比:酸素存在下での光合成活動を示す(1)-(4)、(6)のもと、貧酸素化(アンモニア存在)下での光合成活動を示す(5)をはっきりと区別することができる

また、アミノ酸の安定窒素同位体比分析による栄養段階推定法は、ホルマリン固定等の影響を受けずに用いることが可能であり(図4)、貝殻や骨などの殻内有機物と生体との間に、窒素同位体比の差がほとんど無いことが明らかになった(図5)。

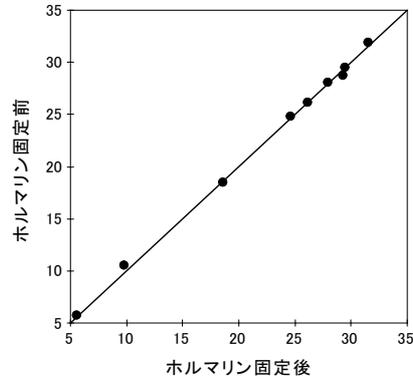


図4 ホルマリン固定前後でのアミノ酸の窒素同位体比比較

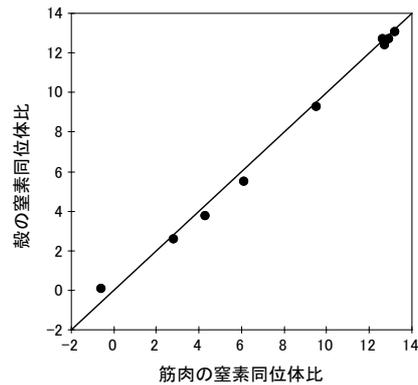


図5 アワビの筋肉と貝殻(最外郭)に含まれるアミノ酸の窒素同位体比の比較

これは、アミノ酸の窒素同位体比法が、ホルマリン試料や貝殻などの多種の試料に直接適用することができることを意味し、貝殻化石中にアミノ酸が比較的良く保存されている数万年～現在までについては、過去の海洋生態系食物連鎖網の情報を精度よく復元できることを示唆する。

以上のように、GC/IRMSを用いたアミノ酸・クロロフィルの安定窒素同位体比分析法は、海洋堆積岩(数千万年前)・海洋堆積物(数百万年前～現在)・生物化石(数万年～現在)・ホルマリン固定生物(数十年前～現在)・貝殻(数年前～現在)などの年代スケールの異なる様々な試料について適用することが可能であり、過去～現在の海洋窒素サイクルを精度良く復元することのできる有用な手法であることが証明された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① Y. Chikaraishi, N.O. Ogawa, Y. Kashiya, Y. Takano, H. Suga, A. Tomitani, H. Miyashita, H. Kitazato, N. Ohkouchi. 2009. Determination of aquatic food-web structure based on compound-specific nitrogen isotopic composition of amino acids. *Limnology and Oceanography Methods*, in press. 査読有
- ② Y. Chikaraishi, Y. Kashiya, N.O. Ogawa, H. Kitazato, M. Satoh, S. Nomoto, N. Ohkouchi. 2008. A compound-specific isotope method for measuring the stable nitrogen isotopic composition of tetrapyrroles. *Organic Geochemistry* **39**, 510-520. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 力石嘉人「アミノ酸の窒素同位体比を用いた食物連鎖網解析」日本地球化学会年会 2008. 9. 18. 東京大学
- ② Y. Chikaraishi, Chlorophyll derivatives in the sediment: evaluation of their sources and transformation processes based on natural H, C, and N isotope evidence. *7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms*. 2007. 12. 11. Kyoto.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力石 嘉人 (CHIKARAISHI YOSHITO)
独立行政法人海洋研究開発機構・地球内部
変動研究センター・研究員
研究者番号：50455490

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし