

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82706

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22244071

研究課題名(和文)古海洋の窒素サイクル研究の展開

研究課題名(英文) Investigation of paleo-nitrogen cycle

研究代表者

大河内 直彦(OHKOUCI, Naohiko)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・プログラムディレクター

研究者番号：00281832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,400,000円、(間接経費) 10,620,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、地質時代の海底堆積物に含まれるクロロフィル(光合成色素)およびその分解生成物の窒素安定同位体比( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ 比)測定を、世界ではじめて地質学試料に展開した。多くの海洋表層環境において、窒素は生物生産を制限している重要な栄養塩である。その栄養塩と生物生産の動態を、窒素同位体比を用いて復元した。ナミビア沖、日本海、南極アデリー海から採取された堆積物を分析した結果は、最大過去250万年間におけるそれらの海域の窒素サイクルの大枠を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first apply nitrogen stable isotopic compositions of chlorophylls and their derivatives from the sediment cores collected from several sites including Japan Sea, off Namibia, and Adelie drift in the Antactica. Off Namibia, the nitrogen isotopic record suggested the existence of strong upwelling throughout the last 2.5 million years. These chlorophyll isotope records are not necessarily consistent with the bulk isotopic record of sedimentary nitrogen applied for long. I concluded that nitrogen isotopic signature from the primary producers should be measured for the precise, rigorous reconstruction of paleo nitrogen cycle in the ocean.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：地球惑星科学・地球宇宙化学

キーワード：窒素同位体比

### 1. 研究開始当初の背景

現在の地球表層環境を規定している海洋の一次生産が、海洋表層水中の硝酸濃度によって規定されていることは広く知られている。窒素は地球環境の形成にとって特に重要な元素であるにもかかわらず、古海洋における窒素サイクルはこれまで徹密に議論されることはなかった。これは、窒素サイクルの重要な情報をもたらす窒素同位体比の分析上の都合からに他ならない。堆積物中に窒素原子を含むバイオマーカーが知られていないため、堆積物中に含まれる「全窒素の同位体比」を用いて窒素サイクルの復元はおこなわれてきた。しかし、国際的なコミュニティの中においては、そういった研究は必ずしも高い評価を受けていない。それはひとえに、堆積物中の全窒素同位体比が、堆積後の続成作用によって大きく変化することが広く知られており、指標自体の信頼性が低いことによる。

こういった状況の中で、研究代表者らは、海底堆積物や堆積岩中に含まれる有用な窒素を含むバイオマーカーの探索と、それを用いた過去の窒素サイクルを復元する手法の開発をおこなってきた。その結果、光合成色素である各種クロロフィルやポルフィリンと呼ばれる、クロロフィルの分解生成物(図1)を堆積物中から抽出し、その詳細な組成と窒素同位体比を測定する手法を開発することに成功した。そしてそれを用いて、白亜紀の海洋無酸素事変時に形成された黑色頁岩に含まれる多量の有機物が主に、貧栄養塩下でブルームを形成した窒素固定をおこなうシアノバクテリアに起源をもつことを明らかにした。しかし、この分析法では多量の試料を必要とするため、黑色頁岩のような有機物に富んだ堆積岩しか分析できず、それゆえ断続的に起きた無酸素海洋事変時のみの情報しか得ることができない。地球史のほとんどが、黑色頁岩ではない有機物に乏しい(重量比1%以下)堆積物として記録されていることを考えると、さらに微量で窒素サイクルを明らかにする手法を開発し、そういった堆積物から窒素サイクルに関わる情報を取り出す必要がある。そこで、研究代表者らは、ポルフィリンがさらに堆積物中で分解して生成するマレイミドと呼ばれる化合物に着目し(図1)、過去3年間にわたって分析法を検討してきた。その結果、わずか10 ngNでマレイミドの窒素同位体比を精密に測定する手法の開発に成功した。すなわち、有機物の乏しい堆積物からも、過去の窒素サイクル、ひいては古海洋環境の重要な鍵を得る方法論の確立に、世界で初めて成功した。この結果を受けて、地球表層環境の鍵を握る窒素サイクル復元を展開するための研究提案に至った。

### 2. 研究の目的

本研究の主たる目的は、堆積物中に保存さ

れているクロロフィルの化石分子の窒素同位体比を測定することと、それをもとに、過去の海洋表層における窒素サイクルを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

クロロフィルとその分解生成物を単離・精製する分析法は、基本的に Ohkouchi et al. (2005) に準じている。以下に簡単に説明する。堆積物を凍結乾燥した後、アセトンにより超音波抽出する。抽出物を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって単離する。カラムは Agilent 社製 SB-C18(4.6 mm x 250 mm, 5 mm)を用いた。フラクション・コレクターを用いて、クロロフィル a、フェオフィチン a、パイロフェオフィチン a などのピークを単離した。クロロフィル a やフェオフィチン a の場合は、逆相クロマトグラフィーではカロチノイドと coelution して精製できないので、順相クロマトグラフィーも用いて、再度分取をおこなった。

精製されたこれらのクロロフィル化合物は、微量化された元素分析計/同位体質量分析計(Ogawa et al., 2010)を用いて、窒素・炭素安定同位体比を測定した。

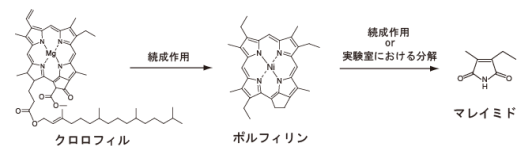


図1. クロロフィルは堆積物中で、ポルフィリンに変質する。そのポルフィリンをマレイミドに化学的に分解することによって窒素同位体比を極微量で測定することができるようになる。

### 4. 研究成果

#### ナミビア沖

国際深海底掘削計画によって南西大西洋、アフリカ南西部のナミビア沖で採取された堆積物(ODP site 1082, 21°05'S, 11°49'E, 水深1280 m)中に含まれるクロロフィル a の分解生成物(フェオフィチン a, パイロフェオフィチン a, ステリルクロリンエステル, クロロフィロン a)について窒素同位体比を測定した。この成果は本基盤研究(A)の成果であると同時に、JSPS Postdoctoral Fellow としてドイツから来日した Guillaume Leduc 氏との共同研究でもある。

図2に示すように、過去250万年を通して、クロロフィル分解生成物の窒素同位体比の多くは-1~+3‰の範囲にあり、長期的なトレンドをもつ変動は見られなかった。それに対し、バルク窒素同位体比は少々上昇トレンドをもっている。このことは、この海域において少なくとも250万年間にわたって大きな窒素サイクルの変動がなかったことを示唆している。

今回は、試料量の問題で、100 万年以前の試料についてはフェオフィチンやパイロフェオフィチンといったより指標性の強い化合物を単離することができず、やむなくクロロフィルの分解生成物が多数含まれている画分をまとめて、その窒素同位体比を測定した。そのため、100 万年前以前に関してはデータの確実性という観点で、100 万年以降のデータより劣るという点に注意が必要である。

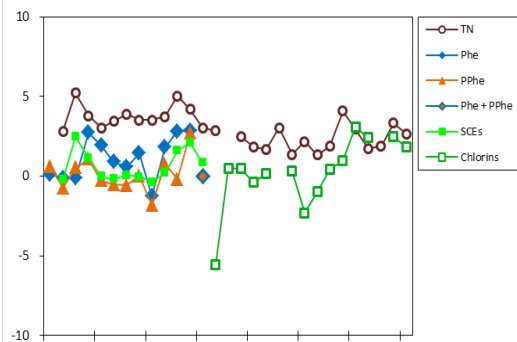


図 2．南東大西洋ナミビア沖の堆積物 ODP Site 1082 に含まれるクロロフィル分解生成物の窒素同位体比

### 日本海

秋田県沖の日本海で採取された海底堆積物 (KY04-PC07, 39°32'N, 139°21'E, 水深 860 m) 中からクロロフィル *a* の分解生成物 (フェオフィチン *a*, パイロフェオフォルバイド *a*, シクロフェオフォルバイド *a*, クロロフィロン *a*, ステリルクロリンエステル等) を抽出した後、それを単離・精製し、その窒素同位体比を測定した。その結果、図 3 に示す結果が得られた。

完新世はデータポイントは少ないものの、現在とほぼ同じ窒素同位体比(-3 ~ 0‰)が見

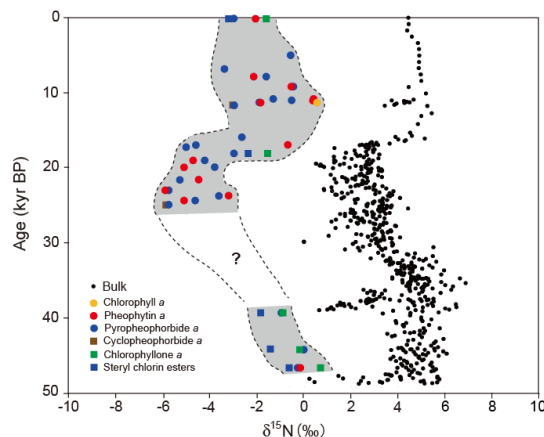


図 3．日本海 (秋田沖) の堆積物 KY04-09 PC-07 に含まれるクロロフィル分解生成物の窒素同位体比。

られた。しかし、最終氷期最寒期にあたる 25000 ~ 17000 年前には -6 ~ -3‰ となり、全体として完新世よりも約 3‰ の低下が見られた。さらに、47000 ~ 40000 年前は完新世の値に近い -2 ~ +1‰ であった。

クロロフィルのテトラピロール構造に含まれる窒素の安定同位体比は、細胞全体のそれにくらべて平均すると約 5‰ 低い値をもつことが知られている (例えば、Ohkouchi et al., 2006)。このことを考慮すると、最終氷期の日本海表層水中で生産される光合成生物の窒素同位体比は -1 ~ +2‰ と推定される。このことから、窒素固定をする光合成生物 (おそらくシアノバクテリア) が当時の日本海表層に窒素を供給する重要なプロセスだったことを示唆している。

### 南極海

本研究では、南極海のアデリー海盆で実施された IODP exp. によって採取された堆積物コア (U1357 hole B, 66°24.79'S, 140°25.57'E, 水深 1017 m) について、クロロフィルの分解生成物を抽出し、その窒素同位体比を測定した。この成果は本基盤研究 (A) の成果であるとともに、JSPS Postdoctoral Fellow としてフランスから来日した Johan Etourneau 氏との共同研究である。

バルク (全窒素) の窒素同位体比は、2000 年前の約 6‰ から徐々に低下し、およそ 100 年前には 1‰ になっている。それに対し、クロロフィル *a* およびその分解生成物の窒素同位体比には、このような長期変動は見られず、平均すると約 -5‰ 付近で一定している。このことから、過去 2000 年間にわたる堆積物中の有機物の分解によって、全窒素同位体比が徐々に上昇したと推定される。さらに、クロロフィルおよびその分解生成物の窒素同位体比は、周期的に変動しているようにも見える。すなわち、400 ~ 500 年前を中心に低く (-5‰ 前後)、1000 年前付近を中心に高く (-3‰ 前後)、1300 年前付近は再び低い値 (-5‰ 前後) を示している。現在の南極海では硝酸の利用効率は低く (2 割程度)、海洋表層で多くの硝酸が使われずに余っている。これは、光が不足していることと、鉄などの微量元素に枯渇しているためと考えられている。今回見出した窒素同位体比のゆらぎは、窒素利用効率 (窒素供給量と植物プランクトンによる利用量とのバランス) の変化で説明されるものと考えられる。

また興味深いことに、アデリー海における窒素同位体比の変動は、北半球高緯度、特にヨーロッパで見られる中世温暖期や小氷期といった気候変動と平行に変化しているようにも見える。北半球における気候変動が何らかのメカニズムで南極海にまで伝搬したのかもしれない。これらの成果については現在、論文執筆中である。

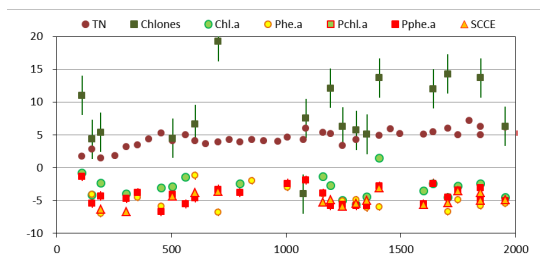


図4．南極海アデリードリフト堆積物 IODP Site U1357B に含まれるクロロフィル分解生成物の窒素同位体比。

#### まとめ

本研究では、各種堆積物中に含まれるクロロフィルおよびその分解生成物の窒素同位体比測定を、世界ではじめて展開した。ナミビア沖およびアデリー海はいずれも湧昇海域であり、海洋表層における生物生産はきわめて高い。しかし、窒素利用率が異なるため（ナミビア沖では>50%だが、アデリー海では20%程度）、窒素同位体比はアデリー海の方が低い値をもつことが示された。ナミビア沖の結果は、過去250万年にわたってこの湧昇が維持されてきたことを示している。

またこれまで一般的に古窒素サイクルの研究で用いられてきたバルク窒素同位体比は、クロロフィルの同位体比の結果とは必ずしも一致した結果を示してはならない。このことはクロロフィルなど一次生産者に特徴的な物質について窒素同位体比を測定しないと、間違った結論が得られる可能性を示唆している。これまで随分と多くの研究が、過去の窒素サイクルを知るためにバルク窒素同位体比を用いてきたが、今後は改めていくべきであろう。

今回の成果の一つとして、日本海の氷期に窒素固定が窒素を海洋表層に供給する役割を担っているという結果を得たが、これは白亜紀の黒色頁岩や中新世の女川層に含まれるポルフィリンの窒素同位体比から得られた結果と同じである。最終氷期の日本海は対馬海峡を細く残して、残りの海峡はすべて閉じてしまった。その結果、深層が還元的な環境になっていた。したがって、海洋深層が還元的になる時には、必ずといっていいほど海洋表層では窒素固定が盛んになるという傾向が見られた。これは脱窒によって系から窒素が失われるために窒素欠乏環境になり、窒素固定生物のニッチが開けたことを示唆しているものと思われる。地球表層環境における窒素サイクルにホメオスタシーが組み込まれており、実際にそれが機能してきたことが、本研究によって明らかになった。

#### 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9件)

Ohkouchi N and Takano Y (2013) Organic nitrogen: Sources, fates and chemistry. Treatise in Geochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., in press. 査読有

Kohzu A, Imai A, Ohkouchi N, Fukushima T, Matsushige K, Komatsu K, Kawasaki N, Miura S, Sato T (2011) Direct evidence for carbon isotope discrimination during sedimentation and diagenesis in Lake Kasumigaura. *Geochemistry, Geophysics, Geosystems*, **12**, doi:10.1029/2011GC003532. 査読有

Yamazaki A, Watanabe T, Ogawa NO, Ohkouchi N, Shirai K, Toratani M, Uematsu M (2011) Seasonal variations of nitrogen isotopic composition in Okinotori coral in the tropical Western Pacific; A new proxy for marine nitrate dynamics. *Journal of Geophysical Research – Biogeosciences*, **116**, G04005, doi:10.1029/2011JG001697. 査読有

Tayasu I, Hirasawa R, Ogawa NO, Ohkouchi N, Yamada K (2011) New organic reference materials for carbon- and nitrogen-stable isotope ratio measurements provided by Center for Ecological Research, Kyoto University, and Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology. *Limnology*, DOI 10.1007/s10201-011-0345-5. 査読有

黒田潤一郎, 鈴木勝彦, 大河内直彦 (2010) 白亜紀における大規模火山活動と地球環境変動のリンク. *地学雑誌*, **119**, 534-555. 査読有

Kashiyama Y, Ogawa NO, Kitazato H, Ohkouchi N (2010) Nitrogen and carbon isotopic compositions of copper, nickel, and vanadyl porphyrins in Cretaceous OAE black shales. in *Earth, Life, and Isotopes* (Eds. Ohkouchi N, Tayasu I, Koba K), Kyoto University Press, p. 313-335. 査読有

Chikaraishi Y, Takano Y, Ogawa NO, Ohkouchi N (2010) Instrument optimization for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids by gas chromatography/ combustion/ isotope ratio mass spectrometry. in *Earth, Life, and Isotopes* (Eds. Ohkouchi N, Tayasu I, Koba K), Kyoto University Press, p. 367-386. 査読有

Takano Y, Kashiyama Y, Ogawa NO, Chikaraishi Y, Ohkouchi N (2010) Isolation and desalination with ion-exchange chromatography for compound-specific nitrogen isotope analysis of amino acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **24**, 2317-2323. 査読有

Tyler J, Kashiyama Y, Ogawa NO, Yokoyama Y, Ikehara M, Nakagawa T, Ohkouchi N (2010) Tracking aquatic change using chlorine-specific carbon and nitrogen isotopes: The last glacial-interglacial transition at Lake Suigetsu,

Japan. *Geochemistry Geophysics Geosystems*, **11**, Q09010, doi:10.1029/2010GC003186. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

Etourneau J, Ogawa NO, Suga H, Campagne P, Djouraeu I, Bouloubassi I, Massé G, Crosta X, Ohkouchi N, A novel approach for studying marine nutrient cycling: application in the Adélie Basin (East Antarctica) for the last 2,000 years BP. *International Conference on Paleoceanography*, 2013 年 9 月 1 日, Barcelona-Sitges, Spain

Leduc G, Suga H, Ogawa N, Etourneau J, Schneider R, Ohkouchi N, Plio-Pleistocene evolution of nutrient cycling in the Benguela upwelling system: a chlorin-specific  $\delta^{15}\text{N}$  approach. *International Conference on Paleoceanography*. 2013 年 9 月 1 日, Barcelona-Sitges, Spain

Makabe A, Koba K, Yoshimizu C, Tayasu I, Ogawa NO, Ohkouchi N, Toyoda S, Yoshida N, Nagata T, Fate of atmospheric nitrate and nitrogen biogeochemical processes in Lake Biwa elucidated by multiple oxygen isotopes. ASLO, 滋賀県立びわ湖ホール, 2012 年 7 月 10 日, 滋賀県.

Ohkouchi N, What nitrogenous geomolecules tell about Earth's history? 地球惑星連合大会, 幕張メッセ国際会議場, 2012 年 5 月 24 日, 千葉県.

大河内直彦, クロロフィルとポルフィリン. 日本地球化学会(招待講演), 2012 年 9 月 17 日, 九州大学, 福岡県.

大河内直彦, 地球生物学入門. 地球惑星科学連合大会スペシャルレクチャー, 幕張メッセ国際会議場, 2011 年 5 月 24 日, 千葉県.

Ohkouchi N, Nitrogen isotopic compositions of sedimentary chlorophylls and porphyrins for reconstructing paleo nitrogen cycle. (Invited speaker) *International Conference on Paleoceanography*, 2010 年 8 月 30 日, La Jolla, USA

Ohkouchi N, Ogawa NO, Chikaraishi Y, Suga H, Kashiya Y, Stable isotopic compositions of chlorophylls as tools for tracing natural processes. (Invited speaker) *Sixth International Workshop on Supramolecular Nanoscience of Chemically Programmed Pigments*, 立命館大学, 2010 年 6 月 10 日, 京都府

〔図書〕(計 2 件)

大河内直彦 「地球のからくり」の謎に迫る. 新潮新書, 2012, pp. 237

Ohkouchi N, Tayasu I, Koba K (eds.) *Earth, Life, and Isotopes*. Kyoto University Press, 2010, pp. 415

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.jamstec.go.jp/bioeos/j/elhrp/biochem/takarabako.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大河内 直彦 (OHKOUCHI, Naohiko)  
独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・プログラムディレクター

研究者番号: 00281832

(2) 研究分担者

山田 桂太 (YAMADA, Keita)  
東京工業大学・大学院総合理工研究科・准教授

研究者番号: 70323780