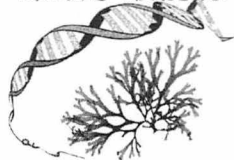


## 藻類学最前線



## 柏山祐一郎：地層に眠るクロロフィルの分子「化石」

ムラサキキャベツをすり鉢ですりつぶしてジャムの空き瓶に入れ、マニキュアの除光液を注ぐ。これに染抜き用のベンジンと水道水を振り混ぜてしばらくテーブルの上に放っておくと、紫色の懸濁液から濃い緑色の上澄みが分かれて2層になる。除光液の主成分であるアセトンにより抽出された有機化合物のうち、青緑色のクロロフィル *a* と黄色のカロテノイド類が、ベンジン—すなわち *n*-ヘキサン (= Benzene ではない!)—を主成分とする上層に分離されたのである。このことで、ムラサキキャベツも間違いなくクロロフィルを使って光合成をしていることが分かる。ちなみに、下層 (水とアセトン) は、アントシアニンが抽出されて赤紫色を呈する。これは夏休みの自由研究にもうってつけのカラフルな実験である。磯で採ってきた褐色のワカメやホンダワラ、あるいは冬の日本海の珍味、黒色のイワノリ (少し高級だが…) のように緑色をしていない藻類でも、ヨモギやピーマンと同じようにクロロフィルを持っていて、太陽の光を使って光合成をしている植物であることが小学生にでも実感できるだろう。しかし、同じ実験を真っ暗な深海底に降り積もった泥で行うと、やはり緑色がかかった上澄みが得られる。これはどう説明すればよいのか?

ここから先は、小学生の実験では難しい。この黄緑色の有機層を濃縮して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析すると、確かにクロロフィルが深海底の泥に含まれていることが分かる。図1は、北極海で採取された表層堆積物 (つまり深海底の泥) のアセトン抽出物を分析したクロマトグラムである。クロロフィル *a* が検出されている。しかし、これは光の届かない海の底に光合成を行う生物が活動しているという訳ではない。海洋の有光層で光合成生物が生産したクロロフィルのほとんどは、生物体の死後に光化学的あるいは熱的な分解・無機

化を受けるが、一部はマリンスノー (プランクトンの遺骸や糞粒などからなるマクロ懸濁粒子) と共に海底面まで重力沈降により運ばれ、海底堆積物中に保存される。事実、これら海洋堆積物は、クロロフィルの分解産物である様々なフェオ化合物 (図2) に富んでおり、クロロフィルはむしろごく僅かである (北極海の堆積物は例外的にクロロフィルをよく保存している)。つまり、深海底の泥の中には、海洋表層における光合成活動のなごりが記録されていることになる。例えば、Kashiyama *et al.* (2008c) は、世界中の海洋や湖沼の表層堆積物中から少量のクロロフィル *d* とその分解物を報告し、クロロフィル *d* を生産する光合成生物が世界的に存在することを初めて実証した。

ところで、水柱や堆積物中におけるクロロフィルのフェオ化合物への変質には、主に生物的作用が関わっていることが知られている。例えば、ステリルクロリンエステル (SCE) と総称されるフィトールの代わりにステロール類が結合したフェオ化合物は (図2) 海洋表層堆積物中にかなり普遍的に見いだされるが、このエステル交換反応は動物プランクトンの消化管内で起こっていると考えられている (例えば Harradine *et al.* 1996)。ただし、その生化学的な機構や生理学的な理由も含めて、詳細はまだ分かっていない。この SCE とパイロフェオフィチン (図2、共にクロロフィルからマグネシウムとメトキシカルボニル基が欠落したものは、堆積物中において化学的に安定であり、数万年以上前の海底堆積物のボーリングコア中からも見いだされる。また、シクロフェオフォルバイド *a* エノール (CPPaE) はクロロフィルの特徴である *exo5* 員環に接して *exo7* 員環を持つ奇妙なフェオ化合物であるが、これも動物プランクトンや高次捕食者の消化管内に濃集して見いだされることがあり、彼らの生物作用によりクロロフィル *a* からつくられると考えられている (Goericke *et al.* 2000)。このように、クロロフィルは次第に変質を受けながら堆積物中に保存されているのである。

さて、前置きが長くなったが、ここからが本題である。クロロフィル起源の化合物は、一体どのくらいの時間、堆積物中に保存されるのだろうか? 海洋底で形成された堆積物は、次第に圧密を受けながら堆積岩となり、一部は地上に露出する。例えば、秋田県の男鹿半島一帯に露出する女川層と呼ばれる珪質岩は、約 1000-1200 万年前 (中期中新世) に、当時の日本海沿岸のトラフ状の海盆で形成された堆積物である。この石を粉末にしてアセトンで抽出を試みても、残念ながら緑色の抽出液は得られないが、代わりに、より極性の低いジクロロメタンとメタノールの混合溶媒 (7:3, v/v) で抽出すると、赤褐色の抽出物が得られる。これをシリカゲルカラムク

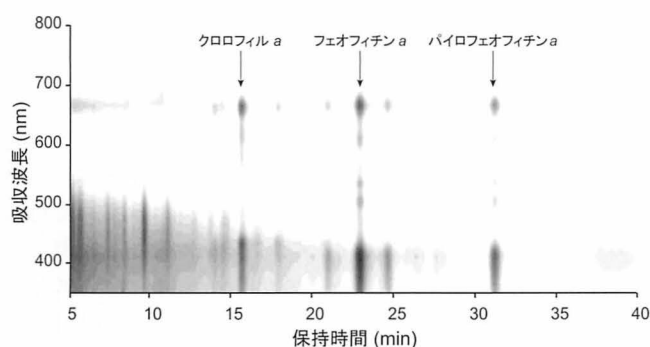


図1 南極海海洋表層堆積物のアセトン抽出物の HPLC クロマトグラム。

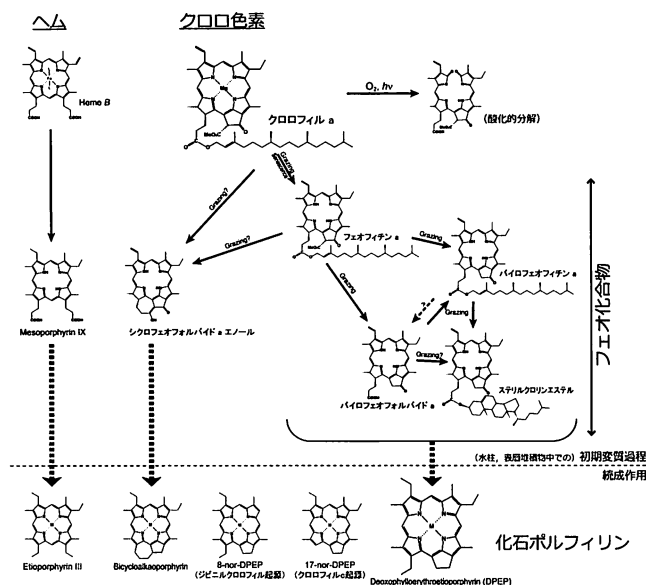


図2 代表的なフェオ化合物と化石ポルフィリンの化学構造とそれらの変性過程。Kashiyama *et al.* (in press) より改変。

ロマトグラフィーなどでさらに分離すると、鮮やかな赤紫色の化合物が得られる (Kashiyama *et al.* 2007a)。これはアルキルポルフィリンのパナジルオキシサイド錯体であり、HPLCでさらに分離すると、数多くの類似した化合物の混合物であることが分かる (図3)。一つ一つを単離して単結晶を作り、エックス線結晶構造解析を行うと、これらポルフィリンは、クロロフィルに特徴的なテトラピロール環を有する炭素骨格を持っていることが分かる (Kashiyama *et al.* 2007b, 2008b)。地層中から見いだされるポルフィリンのうち最も代表的な Deoxophylloerythroetioporphyrin (DPEP, 図2) を例に説明すると、テトラピロール環の右下の5員環から反時計回りに、メチル基、エチル基、メチル基、エチル基、メチル基、メチル基、エチル基という順にアルキル基が配されており、これらはクロロフィルから反応性の高い官能基を除いた構造に一致する。その際だった特徴である *exo5* 員環は、図3のクロマトグラム中の主要なパナジルアルキルポルフィリン全てに共通する構造である。これは、生物がつくる数あるポルフィリン化合物の中でもクロロフィル類にのみ知られている構造であり、すなわち、これら地層中から見いだされるポルフィリンが、太古の昔の光合成生物が生産したクロロフィル類を起源としている決定的な証拠である (Baker & Palmer 1978, Baker & Louda 1986, Callot & Ocampo 2000, Keely 2006)。

実際、この「化石ポルフィリン (Sedimentary porphyrin)」と呼ばれる化合物群—つまり過去の生物がつくったポルフィリン類の遺存物—は、堆積物、堆積岩、オイルシェール、石油、石炭などさまざまな地質学的試料中から広く見出される (Callot & Ocampo 2000)。その研究の歴史は古く、Treibs (1934, 1936) は、クロロフィルおよびヘムのテトラピ

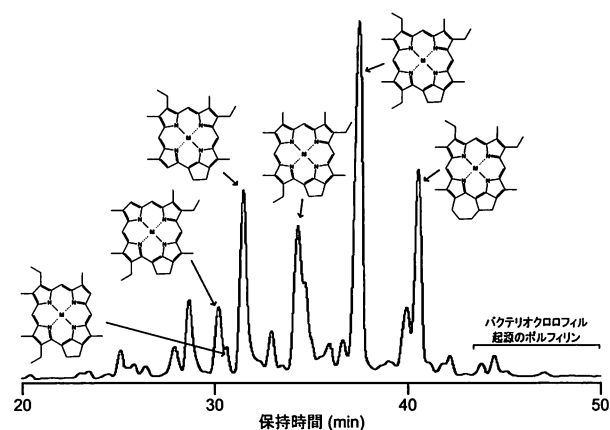


図3 中部中新統女川層の珪質泥岩中から得られた化石ポルフィリン (パナジルアルキルポルフィリン) の HPLC クロマトグラム。Kashiyama *et al.* (2008b) より一部改変。

ロール中心骨格に類似したポルフィリンを堆積岩中から報告し (それぞれ Deoxophylloerythroetioporphyrin (DPEP) と Etioporphyrin III, 図2), これらが生物起源の分子化石 (地質科学の分野で「バイオマーカー」と呼ばれる) であることを示唆した。以降、構造的に様々なバリエーションを持つ化石ポルフィリンが確認されてきている。例えば、前述の CPPaE と一致する *exo5* 員環と *exo7* 員環を併せ持つ化石ポルフィリンもよく知られた構造である。これら地質試料中から見いだされるポルフィリンは、主に酸化パナジウム (IV) やニッケル (II) の錯体として存在する (Callot & Ocampo 2000)。金属錯体を形成しないものや、銅 (II)、鉄 (III)、ガリウム (III)、亜鉛 (II) の錯体も知られる (Bonnett *et al.* 1983, Bonnett & Czechowski 1980, Junium *et al.* 2008)。化石ポルフィリンは主に有機質に富む還元的な堆積岩に濃集してみられるが、クロロフィルに比べ遙かに化学的に安定な金属ポルフィリンは何億年もの時間を超えても保存され、古くは十数億年前の原生代の堆積岩にも見いだされる。

さて、化石ポルフィリンには地球化学的な指標として二重の価値がある。一つめは、いくつかの化石ポルフィリンの化学構造が、起源分子の炭素骨格のユニークな特徴を保存していることを利用した、光合成生物を特定するバイオマーカーとしての価値である。例えば、図4に示した化石ポルフィリンの構造に見られるプロピル基やイソブチル基、ネオペンチル基といった炭素数3以上のアルキル鎖は、緑色硫黄細菌などが持つバクテリオクロロフィル *c*, *d*, *e* にのみ知られている特徴であり、絶対嫌気性光合成バクテリアの活動を示す証拠である (Gibbison *et al.* 1995)。上記の女川層からはプロピル基やブチル基を持つ化石ポルフィリンが確認され、当時の表層水塊に、緑色硫黄細菌が活動できるような硫化水素を伴う還元的な水塊が存在したことが示唆されている。このことから、当時の日本海は、現在の黒海のように循環が停滞して密度成層し、無酸素で還元的な深層水が有光層内部にまで拡大していたこと

が分かる (Kashiyama *et al.* 2008b)。このほかにも、クロロフィル *b* やクロロフィル *c*、あるいはジビニルクロロフィル類に起源を持つと考えられている化石ポルフィリンが知られている (図 2, Chicarelli & Maxwell 1984, Verne-Mismer *et al.* 1988, Kashiyama *et al.* 2007b, 2008b)。

二つめの価値は、化石ポルフィリンの安定同位体組成である。化石ポルフィリンは炭素、水素だけでなく窒素原子を含み、それらの同位体組成は、光合成生物に関する純粋な安定同位体情報を直接的に保持している。これは、従来の堆積岩全体の有機物の同位体分析では得られなかった高いレゾリューションを持つ古環境情報である。光合成生物の作り出す有機物の窒素同位体組成には、海洋表層における栄養状態を強く反映する窒素サイクルに関する情報がダイレクトに刻み込まれる (Ohkouchi *et al.* 2006)。これは、一般的な炭化水素のバイオマーカーにはない、化石ポルフィリンの際だった利点である。また、その炭素同位体組成には、主に光合成生物の炭素同化に関わる様々な生理的な情報が反映される (Kashiyama *et al.* 2008a, Ohkouchi *et al.* 2008)。つまり、化石ポルフィリンには、古海洋の光合成生態系が駆動した窒素循環や炭素循環の状態についての情報が秘められているのである。さらには、上記の化学構造に関する情報を加味し、個々の化石ポルフィリンごとに同位体組成を調べて各種光合成生物の状態を知ること、当時の光合成生態系を構造的に解析することも可能となる。

ただし、この画期的な地球生命史の研究手法も、化石ポルフィリンの化合物レベルでの安定同位体組成分析の技術的な困難さから、その有用性を認識されながらも、研究例は未だに限定的である (Hayes *et al.* 1987, Chicarelli *et al.* 1993)。筆者らの研究グループでは、HPLC を用いた化石ポルフィリンの単離精製手法と、数十ナノモルスケールというごく微量の窒素・炭素量で安定同位体組成を決定する技術を開発して、様々な堆積岩の炭素・窒素安定同位体比を詳細に研究している (Kashiyama *et al.* 2007a, Ogawa *et al.* in press)。最後に、筆者らが行った白亜紀の黒色頁岩の研究例を簡単に紹介してこの稿を閉じることにする。

白亜紀 (1.5-0.65 億年前) は、中生代の温室地球が極大に

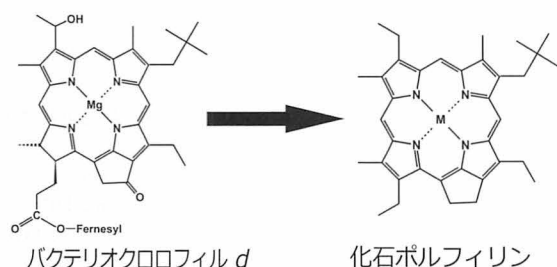


図 4 緑色硫黄細菌のつくるバクテリオクロロフィルとそれらを起源とする化石ポルフィリンの化学構造—バクテリオクロロフィル *d* の一種を例として。

達し、極域まで温暖な気候が広がった時代である (Jenkyns *et al.* 2004)。この時代には、「黒色頁岩」と呼ばれる有機物に非常に富んだ堆積岩が、断続的に全球的に形成され、これは「海洋無酸素事変(OAE: Oceanic Anoxic Event)」と呼ばれている。従来は、OAE は当時の海洋において熱塩循環が停止し、深層水が無酸素状態になり有機物の分解が妨げられた現象であると解釈されてきた。筆者らは、そのような海洋環境においては、生態系が大きく変化し、特に光合成一次生産を中心とした物質循環のパターンが違っており、そのことが現在の海洋では全く見られない黒色頁岩という異様な堆積岩の形成にとって決定的に重要であったと考え、化石ポルフィリンの安定同位体組成の研究を試みた (Ohkouchi *et al.* 1997, Kuroda *et al.* 2005)。図 5 は、黒色頁岩から単離精製された各種ポルフィリンそれぞれの窒素と炭素の同位体組成を示したものである (Kashiyama *et al.* 2008a, in press)。ほとんどの化石ポルフィリンが、窒素同位体比が  $-5 \pm 3 \text{ ‰}$ 、炭素同位体比が  $-18 \pm 3 \text{ ‰}$ 、という値を示すことが分かる (それぞれ  $\delta$  値と呼ばれ、国際同位体標準試料との間の同位体組成の僅かな違いを千分率偏差、単位 ‰ で表す)。結論として、これら化石ポルフィリンの窒素同位体組成は窒素固定生物に典型的な値であり、当時の光合成生態系が窒素固定経路を通した窒素の供給を直接的に受けていたことを強く示唆するものである。さらに、この黒色頁岩中には、クロロフィル *a* を起源とする化石ポルフィリン (DPEP, 図 2) が主要な構成要素として含まれていることから、窒素固定能と

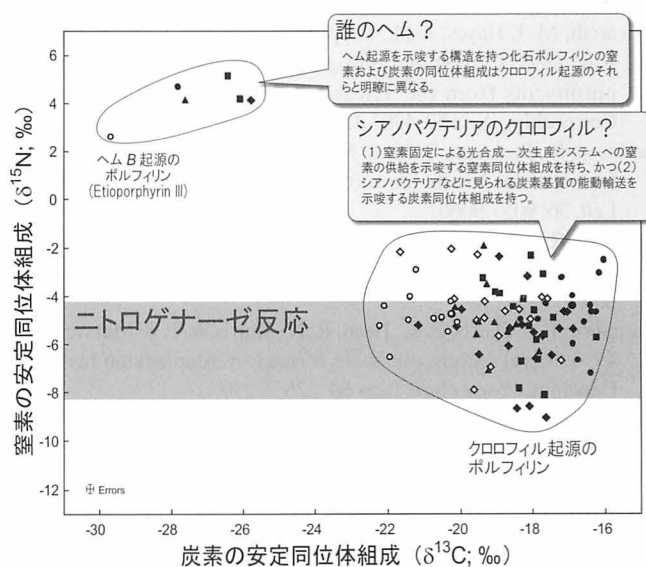


図 5 イタリア中部の露出する白亜系ボナレリ層 (黒色頁岩) から単離された化石ポルフィリンの窒素及び炭素安定同位体組成。同一シンボルの点群は同一試料 (ある地質学的な時間断面を代表する) から得られた複数の異なる化学構造を持つ化石ポルフィリンそれぞれの同位体組成を示し、異なるシンボルは異なる試料 (地質学的に異なる時間断面を代表する) を表す。Kashiyama *et al.* (in press) よりデータ使用。

クロロフィル *a* を用いた光合成能を併せ持つシアノバクテリアが当時の重要な構成要素であったと考えられた (Ohkouchi *et al.* 2006, Kashiya *et al.* 2008a)。しかし同時に、窒素固定能を持たない真核藻類だけが作り出すクロロフィル *c* を起源とする化石ポルフィリン (17-nor-DPEP, 図2) も、同様に窒素固定生物様の窒素同位体組成を示すことから、現世の一部の珪藻で知られているような真核藻類-窒素固定シアノバクテリア共生系 (Villareal 1992, Carpenter *et al.* 1999) が当時の光合成生態系の重要な構成要素であった可能性も提唱されてきている (Kashiya *et al.* 2008b, in press)。

## 引用文献

- Baker, E. R. & Palmer, S. E. 1978. Geochemistry of Porphyrins. In: Dolphin D. (ed.) The Porphyrins, Vol. 1, pp. 486-552. Academic Press, New York.
- Baker, E. R., Corwin, A. H., Klesper, E. & Wei, P. E. 1968. Deoxophylloerythroetioporphyrin, J. Org. Chem. 33: 3144-3148.
- Bonnett, R. & Czechowski, F. 1980. Gallium porphyrins in bituminous coal. Nature 283: 465-467.
- Bonnett, R., Burke, P. J., Czechowski, F. & Reszka, A. 1983. Porphyrins and metalloporphyrins in coal. Org. Geochem. 6: 177-182.
- Carpenter, E. J., Montoya, J. P., Burns, J., Mulholland, M. R., Subramaniam, A. & Capone, D. G. 1999. Extensive bloom of a N<sub>2</sub>-fixing diatom / cyanobacterial association in the tropical Atlantic Ocean. Mar. Ecol. Prog. Ser. 185: 273-283.
- Callot, H. J. & Ocampo, R. 2000. Geochemistry of porphyrins. In: Kadish, K. M., Smith, K. M. & Guillard, R. (eds.) The Porphyrin Handbook Vol. 1, pp. 349-398, Academic Press, New York.
- Chicarelli, M. I. & Maxwell, J. R. 1984. A naturally occurring, chlorophyll *b* related porphyrin. Tetrahedron Lett. 25: 4701-4704.
- Chicarelli, M. I., Hayes, J. M., Popp, B. N., Eckardt, C. B. & Maxwell, J. R. 1993. Carbon and nitrogen isotopic compositions of alkyl porphyrins from the Triassic Serpiano oil shale. Geochim. Cosmochim. Acta 57: 1307-1311.
- Gibson, R., Peakman, T. M. & Maxwell, J. R. 1995. Novel porphyrins as molecular fossils for anoxygenic photosynthesis. Tetrahedron Lett. 36: 9057-9060.
- Goericke, R., Strom, S. L. & Bell, M. A. 2000. Distribution and sources of cyclic pheophorbides in the environment. Limnol. Oceanogr. 45: 200-211.
- Harradine, P. J., Harris, P. G., Head, R. N., Harris, R. P. & Maxwell, J. R. 1996. Steryl chlorin esters are formed by zooplankton herbivory. Geochim. Cosmochim. Acta 60: 2265-2270.
- Hayes, J. M., Takigiku, R., Ocampo, R., Callot, H. J. & Albrecht, P. 1987. Isotopic compositions and probable origins of organic molecules in the Eocene Messel shales. Nature 329: 48-51.
- Jenkyns, H. C., Forster, A., Schouten, S. & Sinninghe-Damsté, J. S. 2004. High temperatures in the Late Cretaceous Arctic Ocean. Nature 432: 888-892.
- Junium, C. K., Mawson, D. H., Arthur, M. A., Freeman, K. H. & Keely, B. J. 2008. Unexpected occurrence and significance of zinc alkyl porphyrins in Cenomanian-Turonian black shales of the Demerara Rise. Org. Geochem. 39: 1081-1087.
- Kashiya, Y., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. 2007a. An improved method for isolation and purification of sedimentary porphyrins by high-performance liquid chromatography for compound-specific isotopic analysis. J. Chromatogr. A, 1138: 73-83.
- Kashiya, Y., Shiro, M., Tada, R. & Ohkouchi, N. 2007b. A novel vanadyl alkylporphyrins from geological samples: a possible derivative of divinylchlorophylls or bacteriochlorophyll *a*? Chem. Lett. 36: 706-707.
- Kashiya, Y., Ogawa, N. O., Kuroda, J., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. 2008a. Diazotrophic cyanobacteria as the major photoautotrophs during mid-Cretaceous Oceanic Anoxic Events: Nitrogen and carbon isotopic evidence from sedimentary porphyrins. Org. Geochem. 39: 532-549.
- Kashiya, Y., Ogawa, N. O., Tada, R., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. 2008b. Reconstruction of biogeochemistry and ecology of photoautotrophs based on the nitrogen and carbon isotopic compositions of vanadyl porphyrins from Miocene siliceous sediments. Biogeosci. 5: 797-816.
- Kashiya, Y., Miyashita, H., Ohkubo, S., Ogawa, N. O., Chikaraishi, Y., Takano, Y., Suga, H., Toyofuku, T., Nomaki, H., Kitazato, H., Nagata, T. & Ohkouchi, N. 2008c. Evidence of global chlorophyll *d*. Science 321: 658-658.
- Kashiya, Y., Ogawa, N. O., Nomoto, S., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. Nitrogen and carbon isotopic compositions of copper, nickel, and vanadyl porphyrins in Cretaceous black shales. In: Ohkouchi, N., Tayasu, I. & Koba, K. (eds.) Earth, Life and Isotopes. Kyoto University Press. in press.
- Keely, B. J. 2006. Geochemistry of chlorophylls. In: Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W. & Scheer, H. (eds.) Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. pp 535-561. Springer, Dordrecht.
- Kuroda, J., Ohkouchi, N., Ishii, T., Tokuyama, H. & Taira, A. 2005. Lamina-scale variations in sedimentary components in Cretaceous black shales by chemical compositional mapping: Implications for paleoenvironmental changes during Oceanic Anoxic Events. Geochim. Cosmochim. Acta 69: 1479-1494.
- Ohkouchi, N., Kawamura, K. & Taira, A. 1997. High abundances of hopanols and hopanoic acids in Cretaceous black shales. Ancient Biomol. 1: 183-192.
- Ohkouchi, N., Kashiya, Y., Kuroda, J., Ogawa, N. O. & Kitazato, H. 2006. The importance of diazotrophic cyanobacteria as primary producers during Cretaceous Oceanic Anoxic Event 2. Biogeosci. 3: 467-478.
- Ohkouchi, N., Nakajima, Y., Ogawa, N. O., Suga, H., Sakai, S. & Kitazato, H. 2008. Carbon isotopic composition of tetrapyrrole nucleus in chloropigments from a saline meromictic lake: A mechanistic view for interpreting isotopic signature of alkyl porphyrins in geological samples. Org. Geochem. 39: 521-531.
- Ogawa N. O., Nagata, T., Kitazato, H. & Ohkouchi, N. Ultra sensitive elemental analyzer/isotope ratio mass spectrometer for stable nitrogen and carbon isotope analyses. In: Ohkouchi, N., Tayasu, I. & Koba, K., (eds.) Earth, Life and Isotopes. Kyoto University Press. in press.
- Treibs, A. 1934. Chlorophyll- and hemin derivatives in bituminous rocks, petroleum, mineral waxes and asphalts. Annal. Chem., 510: 42-62.
- Treibs, A. 1936. Chlorophyll and hemin derivatives in organic materials. Angew. Chem. 49: 682-686.
- Verne-Misner, J., Ocampo, R., Callot, H. J. & Albrecht, P. 1988. Molecular fossils of chlorophyll *c* of the 17-nor-DPEP series. Structure determination, synthesis, geochemical significance. Tetrahedron Lett. 29: 371-374.
- Villareal, T. A. 1992. Marine nitrogen-fixing diatom-cyanobacteria symbioses. In: Carpenter, E. J., Capone, D. G. & Rueter, J. G. (eds.) Marine Pelagic Cyanobacteria: Trichodesmium and Other Diazotrophs. pp. 163-174. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. (海洋研究開発機構, 日本学術振興会特別研究員 PD)