博士（理　学）　中　島　陽　司

学位論文題名

# Tracing phototrophic bacteria in an anoxic-water ecosystem (Lake Kaiike, Japan) using pigment composition and compound-specific isotopic ratios

（色素化合物の組成および化合物個別安定同位体比を用いた還元的水界生態系における光合成細菌の追跡）

## 学位論文内容の要旨

**はじめに**

還元的環境にあった原始海洋において光合成を最も早く始めた生物は、酸素非発生型の光合成細菌であるとされ、生物の進化や地球表層環境の変遷を解明する上で、光合成細菌の活動を理解することが重要となってきている。しかし、光合成細菌は化石として残りにくく、従来型の顕微鏡観察による研究手法には限界があった。色素化合物は、光合成生物の有効な指標化合物である。すなわち、色素化合物の組成および化合物別安定同位体比解析からは、それぞれ、光合成生物の群集構造および生育環境についての情報が得られうる。しかし、この種の研究手法は主に植物プランクトンを対象として発展してきており、光合成細菌の色素化合物に関する知見は極めて乏しい。そこで、本論文は、光合成細菌が生育する貝池において幾つかのケーススタディを行い、色素化合物の組成および化合物個別安定同位体比の指標性について評価することを目的とした。

**貝池**

貝池は、鹿児島県上甑島に位置し、礫洲によって外海と隔てられた汽水湖である。湖水は恒常的な塩分密度成層状態にあり、水深約 5m から湖底まで還元的水塊が存在する。表層水は貧栄養環境にあり、水柱中の酸化還元境界には、酸素非発生型の光合成細菌を主体とする微生物密集層（バクテリアプレート）が確認されている。湖底から不撹乱採取された堆積物コアには、堆積物表層約 3cm にわたり、厚さ 1mm 未満の繊維状の微生物マットが形成されている。

**1. クロロフィル色素の組成を用いた酸化還元境界の微生物生態学**

本研究は、最近になり実用段階に入った高速液体クロマトグラフィー／大気化学イオン化法ー質量分析計を用いて、採取した懸濁粒子および湖底微生物マット中のクロロフィル色素を識別・定量し、クロロフィル色素の組成から光合成細菌の群集構造および生態を考察した。バクテリアプレートから、シアノバクテリアが生合成するクロロフィル *a*、紅色硫黄細菌が生合成するバクテリオクロロフィル *a* および緑色硫黄細菌が生合成するバクテリオクロロフィル *e* 類を高い濃度で検出した。なかでも、バクテリオクロロフィル *e* 類については、側鎖の炭素数で区別される３種の同族体が認められた。クロロフィル色素濃度の鉛直変化からは、水柱中でシ

アノバクテリア、紅色硫黄細菌および緑色硫黄細菌が鉛直方向に累帯しながら生育していることが明らかになった。また、バクテリアプレート直下で、炭素数の多いバクテリオクロロフィル *e* 同族体の相対的な増加が認められた。16s rDNA の解析結果と比較したところ、バクテリオクロロフィル *e* 同族体の相対濃度の変化が、緑色硫黄細菌の種組成の変化に対応することが初めて明らかになった。

**2. 色素化合物の化合物別同位体組成を用いた酸化還元境界の生物地球化学**

自然環境試料中の有機物は多様な有機分子の混合物であり、個々の有機分子は、その生合成経路や反応動態を反映した固有の安定同位体組成を持つと考えられている。本研究は、クロロフィル色素の化合物別炭素・窒素同位体比の同時測定が、光合成細菌の生理および水界の生物地球化学を理解する上で有効な研究手法であることを例示するものである。懸濁粒子および湖底微生物マットから、クロロフィル色素、その脱 Mg 誘導体およびカロテノイド色素など各種色素化合物を高速液体クロマトグラフィー／分取システムによって単離・精製し、元素分析計／質量分析計オンラインシステムにより炭素・窒素同位体比を測定するといった分析方法を確立した。色素化合物が持つ同位体情報を解析し、得られた結論は以下の通りである。（1）クロロフィル色素の脱 Mg 反応における同位体効果は、炭素および窒素同位体ともに認められなかった。（2）紅色硫黄細菌の光合成は、バクテリアプレートに限り行われているものと考えられた。（3）緑色硫黄細菌は、湖底微生物マット表層で光合成を行っており、微生物分解によりリサイクルされた二酸化炭素の利用および遅い生長速度により、$^{12}$C に濃集した炭素同位体組成を持つと考えられた（4）緑色硫黄細菌が大気窒素分子の固定を行っている可能性が示唆された。

**3. クロロフィル色素の分子内炭素同位体分布とジオポルフィリンからの古環境復元の可能性**

クロロフィル色素は、ポルフィリン環と側鎖から構成される。これまでの生化学的研究から、ポルフィリン環と側鎖は、クロロフィル色素の生合成過程における最終段階で結合することが知られている。このように生体内で生合成された有機分子は、生合成過程における種々の反応の履歴を反映した分子内炭素同位体分布を持つことが理論的に予測されてきた。本研究は、懸濁粒子および湖底微生物マットから抽出され、炭素同位体比が測定された各種クロロフィル色素を試料とし、クロロフィル色素の分子内炭素同位体分布の解析を行った。まず、クロロフィル色素の加水分解を行い、ポルフィリン環と側鎖を得た。次に、側鎖の炭素同位体比をガスクロマトグラフィー／燃焼／安定同位体質量分析計によって測定した。最後にポルフィリン環の炭素同位体比をマスバランス計算により求めた。これにより、次ぎの結果を得た。バクテリアプレート以浅では、クロロフィル分子内でポルフィリン環に約 1‰の $^{13}$C 濃集が認められた。また、バクテリアプレート以深の弱光環境下において生合成されたクロロフィル分子内では、ポルフィリン環への $^{13}$C 濃集の増加が認められた。これらクロロフィル分子内におけるポルフィリン環への $^{13}$C 濃集は、ポルフィリン環と側鎖の生合成経路の違いを反映しているものと解釈された。続成が進んだ堆積岩中には、クロロフィル色素から側鎖が加水分解した誘導体であるジオポルフィリンが広く存在することが知られている。本研究の結果から、堆積時に生合成されたクロロフィル色素の炭素同位体比を復元する際に、堆積岩から抽出されたジオポルフィリンの炭素同位体比に、1‰の補正値を加える必要があると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　岡　田　尚　武
副　査　　教　授　　鈴　木　徳　行
副　査　　研究員　　大河内　直　彦
（固体地球統合フロンティア研究システム）

学 位 論 文 題 名

## Tracing phototrophic bacteria in an anoxic-water ecosystem (Lake Kaiike, Japan) using pigment composition and compound-specific isotopic ratios

（色素化合物の組成および化合物個別安定同位体比を用いた
還元的水界生態系における光合成細菌の追跡）

酸素非発生型の光合成細菌は、初期地球において光合成を最も早く始めた生物と考えられている。したがって、太古代における地球表層環境の進化を解明する上で、光合成細菌の生理生態に関する情報は非常に重要である。光合成色素は光合成生物に特有の化合物であり、その組成および分子レベル安定同位体比解析からは、光合成生物の群集構造や生育環境などについての情報が得られうる。これまで、この種の研究は主に海洋性植物プランクトンを対象として発展してきた。一方で、光合成細菌の色素化合物に関する研究例は極めて乏しい。本論文は、酸化還元境界が表層水中に存在し、様々な光合成細菌が特殊な生態系をつくっている鹿児島県上甑島貝池において、色素化合物の組成および分子レベル・分子内安定同位体比の測定を行い、過去の光合成細菌の活動を復元するための指標としての有効性を明らかにしている。その概要は以下の通りである。

**貝池の概要**

貝池は最大水深約 11m の部分循環湖で、一年を通して $O_2/H_2S$ 境界が水深約５mに存在している。この酸化還元境界付近には、光合成細菌や化学合成細菌などからなる非常に高密度（各細菌の個体数>$10^6$ cell/$cm^3$）のバクテリアプレートが形成されている。湖底堆積物には、表層約 3cm にわたり、繊維状の微生物マットが形成されている。

**1. クロロフィル化合物の組成を用いた酸化還元境界の微生物生態学**

本研究では、高速液体クロマトグラフィー／大気化学イオン化法質量分析計を用いて、採取した懸濁粒子

および湖底微生物マット中のクロロフィル化合物を識別・定量し、クロロフィル化合物の組成から光合成細菌の群集構造および生態を考察した。バクテリアプレートから、シアノバクテリアが生合成するクロロフィル *a* (Chl *a*)、紅色硫黄細菌が生合成するバクテリオクロロフィル *a* (BChl *a*) および緑色硫黄細菌が生合成するバクテリオクロロフィル *e* 類 (BChls *e*) を高い濃度で検出した。なかでも、BChls *e* については、側鎖の炭素数で区別される３種の同族体 BChls $e_1$, $e_2$, $e_3$ を認めた。これらのクロロフィル化合物類の鉛直濃度変化からは、水柱中でシアノバクテリア、紅色硫黄細菌および緑色硫黄細菌が鉛直方向に累帯しながら生育していることを明らかにした。また、BChl *e* 同族体の相対濃度の変化が、緑色硫黄細菌の種組成の変化に対応することを明らかにした。

**2. 色素化合物の分子レベル同位体組成を用いた酸化還元境界の生物地球化学**

本研究では、貝池の懸濁粒子および湖底微生物マットから色素化合物をアセトンで抽出した後、クロロフィル化合物を順相および逆相高速液体クロマトグラフを用いて分取・精製した。その後、精製された化合物の炭素および窒素同位体比を元素分析計／同位体質量分析計を用いて測定した。バクテリアプレートから採取された緑色硫黄細菌起源の BChls *e* の炭素同位体比は、紅色硫黄細菌起源の BChl *a* に比べ約 9‰重い炭素同位体比をもっている。これは紅色硫黄細菌がカルビン回路を用いて二酸化炭素を固定しているのに対して、緑色硫黄細菌が還元的 TCA 回路を用いていることに起因していると考えられる。また BChl *a* は水深を通してほぼ一定の炭素同位体比を持つのに対して、BChls *e* は深層水中で約 1-2‰、湖底微生物マット中では約 6‰バクテリアプレートで見られる同位体比よりも軽い値を示した。これは緑色硫黄細菌が深層水中あるいは、湖底微生物マットにも生息し、有機物が分解して再生された二酸化炭素を用いて光合成していることを示している。他方、BChls *e* と BChl *a* の窒素同位体比はそれぞれ約-7‰、-2‰であり、バイオマス-クロロフィル間の同位体効果を考慮することにより、緑色硫黄細菌が窒素固定を行っていることが強く示唆された。

**3. クロロフィル化合物の分子内炭素同位体分布**

本研究は、貝池から単離・精製された各種クロロフィル化合物を試料とし、ポルフィリン環の炭素同位体比を測定し、クロロフィルの分子内同位体組成を明らかにした。その結果、クロロフィル分子内で $^{13}C$ がポルフィリン環に約 0.5-3‰濃縮していることを明らかにした。これはポルフィリン環の前駆体であるグリシンが側鎖の脂質の前駆体アセチル CoA よりも $^{13}C$ に濃縮していることを直接反映したものと考えた。

以上本論文は、嫌気的水界生態系にある貝池において、光合成細菌の群集構造やそこにおける炭素および窒素の生物地球化学プロセスを知る上で、色素化合物の組成および分子レベル安定同位体比解析が極めて有効であることを明らかにしている。また、光合成細菌がもつクロロフィル化合物の分子レベル・分子内安定同位体比解析を古海洋学および古生物学へ応用するための新しい研究手法の開拓にも大きく貢献しており、今後、地質試料を対象とした研究に本論文の成果が広く用いられることが期待できる。よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。